

Aus der Klinik und Poliklinik für Radiologie  
der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Jens Ricke

**Funktionelle Magnetresonanztomographie der akuten  
Nierentransplantatabstoßung im experimentellen  
Tiermodell**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Manuel Marcus Kolb  
aus  
München

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Mike Notohamiprodjo

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Fischereeder  
Prof. Dr. med. Thomas Pfluger

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 21.02.19

Meiner Familie

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	4
2. Einleitung.....	6
2.1. Geschichte der Nierentransplantation .....	6
2.2. Pathophysiologie des Transplantatversagens.....	12
2.2.1. Hyperakute Abstoßung .....	12
2.2.2. Verzögerte Transplantatfunktion .....	12
2.2.3. Akute Abstoßung .....	14
2.2.4. Chronische Abstoßung .....	16
2.2.5. Chronische Allograft Dysfunktion.....	17
2.3. Chemokine als Angriffspunkt für eine Immunomodulation.....	18
2.4. Diagnostik der Nierentransplantation.....	20
2.4.1. Perkutane Nierenbiopsie .....	20
2.4.2. Ultraschall .....	20
2.4.3. Magnetresonanztomographie.....	21
3. Fragestellung und experimentelle Strategie .....	22
4. Methoden und Materialien .....	24
4.1. Tierausswahl.....	24
4.2. Narkose .....	24
4.3. Operation.....	24
4.4. Therapieschemata .....	26
4.5. Untersuchungszeitpunkt .....	27
4.6. Laser Doppler Flow.....	27
4.7. Messvorbereitung zur MRT .....	28
4.8. Magnetresonanztomographie .....	30
4.8.1. Magnetresonanztomographie-Technik.....	30
4.8.1.1. Magnetresonanztomographie-Grundlagen.....	30
4.8.1.2. T2-gewichtete Sequenzen .....	30
4.8.1.3. T1-gewichtete Sequenzen .....	31
4.8.1.4. k-Raum und Bildentstehung .....	32
4.8.1.5. Diffusionsgewichtete MRT .....	33

4.8.1.6. Dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT .....	35
4.8.2. MRT-Messprotokoll .....	38
4.8.2.1. Morphologische Bildgebung .....	38
4.8.2.2. Diffusionsgewichtete MRT .....	39
4.8.2.3. Dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT .....	39
4.8.3. Bilddatenauswertung .....	40
3.8.3.1. Diffusionsgewichtete MRT .....	41
3.8.3.2. Dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT .....	42
4.9. Histologie .....	43
4.10. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	44
4.11. Immunhistochemie .....	45
4.12. Statistische Analyse .....	46
5. Ergebnisse .....	47
5.1. Laser Doppler Flussmessung .....	47
5.2. Magnetresonanztomographie .....	48
5.2.1. Diffusionsgewichtete MRT .....	48
5.2.2. Dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT .....	50
5.3. Histologie .....	52
5.4. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion .....	55
5.5. Immunhistochemie .....	57
5.6. Korrelation der einzelnen Ergebnisse .....	58
6. Diskussion .....	59
6.1. Die Hauptergebnisse im Kontext .....	59
6.1.1. Magnetresonanztomographie .....	59
6.1.2. Histologische Befunde .....	61
6.2. Einschränkungen .....	62
6.3. Zusammenfassung .....	63
7. Abkürzungsverzeichnis .....	64
8. Literaturverzeichnis .....	66
9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis .....	76
9.1. Abbildungsverzeichnis .....	76
9.2. Tabellenverzeichnis .....	77

10. Anhang .....	78
10.1. Zusätzliche Bilddokumente .....	78
10.2. Preise im Zusammenhang mit der Dissertation .....	79
10.3. Originalartikel.....	79
10.4. Journalistische Artikel in Zusammenhang mit der Dissertation.....	80
10.5. Danksagung.....	85
10.6. Curriculum Vitae .....	86
10.7 Eidesstattliche Versicherung.....	88

## 1. Zusammenfassung

**Hintergrund:** Der Goldstandard der Abstoßungsdiagnostik nach Nierentransplantation ist die perkutane Biopsie, welche verschiedene Risiken hat. Die funktionelle Magnetresonanztomographie (MRT) bietet die Möglichkeit einer nicht-invasiven Diagnostik. Die diffusionsgewichtete MRT gibt ohne Kontrastmittel Aussagen über Zelldichte, Ödem und kapillare Perfusion und ermöglicht somit eine Unterscheidung zwischen akuter Abstoßung, tubulärer Nekrose und gesunden Nieren. Die dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT (**dynamic contrast enhanced, DCE-MRT**) liefert pharmakodynamische Parameter über die Mikrozirkulation, wie z.B. den Plasmafluss.

**Zielsetzung:** Ziel dieser Studie war es im Mausmodell zu untersuchen, ob die diffusionsgewichtete MRT und DCE-MRT frühe pathologische Veränderungen im Rahmen der akuten Abstoßung nachweisen und gleichzeitig Therapieeffekte wie z.B. mit dem CCL2-Antagonisten mNOX-E36 abbilden kann.

**Methoden:** Nach der allogenen orthotopen Transplantation von Nieren von Balb/c-Mäusen auf C57Bl/6-Mäuse wurden die Tiere in folgende Gruppen (je n=5) eingeteilt: Monotherapie mit Cyclosporin A, Monotherapie mit mNOX-E36, Kombinationstherapie von subtherapeutisch dosiertem Cyclosporin A und mNOX-E36 und Monotherapie mit inaktivem remNOX-E36 als Therapiekontrollen. Als Kontrollen wurden syngene Transplantationen von C57Bl/6 auf C57Bl/6 verwendet.

Das CCL2-spezifische L-Enantiomer RNA-Spiegelmer mNOX-E36 schränkt die CCL2/CCR2-vermittelte Leukozyten-Rekrutierung ein. Spiegelmere haben eine hohe Biostabilität, da sie vom Körper nur schwer als exogen erkannt werden.

Am zehnten postoperativen Tag erfolgte an einem 3T-MRT die nicht-invasive Diagnostik mittels diffusionsgewichteter Bildgebung und DCE-MRT mit einer zeitlichen Auflösung von 1,5 Sekunden. Abschließend wurden die Nieren explantiert und histopathologisch, laborchemisch und immunhistochemisch untersucht, wobei eine Einstufung gemäß den Banff-Stadien erfolgte.

Zur statistischen Auswertung wurden nach Testung auf Normalverteilung mit ungepaarten, zweiseitigen t-Tests analysiert. Die Korrelationen der MR-Parameter und Histopathologie wurden durch Spearmans Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Alpha betrug jeweils 0,05 und wurde nach Bonferroni korrigiert.

**Ergebnisse:** Die diffusionsgewichtete MRT zeigte einen signifikanten Vorteil der Kombinationstherapie und syngenen Kontrollen gegenüber der Therapiekontrollgruppe (je  $p < 0,002$ ). In der DCE-MRT gab es für den kortikalen Plasmafluss einen signifikanteren Vorteil von Cyclosporin A mit und ohne mNOX-E36 und der syngenen Kontrollen im Vergleich zu den Therapiekontrollen (je  $p < 0,001$ ). Für die Monotherapie mit mNOX-E36 wurde jeweils kein signifikanter Vorteil nachgewiesen.

In der Histologie gab es unter Therapie geringere Nekrosezonen, dieser Effekt war für Therapien mit Cyclosporin am deutlichsten. Die syngenen Kontrollen hatten weniger entzündliche Veränderungen als alle anderen Gruppen (alle  $p < 0,05$ ) außer für intimale Arteriitis unter Cyclosporin A-Monotherapie. Unter der Kombinationstherapie war die Tubulitis am geringsten ausgeprägt (signifikant gegenüber mNOX-E36 Monotherapie  $p = 0,01$ ). Unter mNOX-E36-Monotherapie kam es jedoch zur signifikant deutlichsten Ausprägung der intimalen Arteriitis im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen (alle  $p < 0,02$ ). Für proinflammatorische Zytokine zeigte sich ein additiver Effekt der Kombinationstherapie im Vergleich zu den Monotherapien. In der Beurteilung nach Banff konnte jedoch kein additiver Effekt von mNOX-E36 abgebildet werden. In der Immunhistochemie gab es eine signifikant geringere Monozyteninfiltration unter der Kombinationstherapie im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen (alle  $p < 0,0001$ ).

Der kortikale Plasmafluss korreliert negativ zu der intimalen Arteriitis ( $r = -0,63$ ). Ebenso korreliert die diffusionsgewichtete Bildgebung negativ zu der Monozyteninfiltration ( $r = -0,81$ ) und der interstitiellen Entzündung ( $r = -0,73$ ).

**Diskussion:** In dieser experimentellen Tierstudie wurden pathophysiologische Veränderungen nach Nierentransplantation in der funktionellen MRT abgebildet. Die dabei verwendete diffusionsgewichtete Bildgebung und DCE-MRT lassen unterschiedliche Aussagen zu, die teils mit dem Goldstandard korrelieren. Therapieerfolge können in der MRT nachgewiesen werden. Das neuartige Spiegelmer mNOX-E36 hat einen positiven Effekt auf die Monozyteninfiltration und die Ausschüttung von pro-entzündlichen Zytokinen. Eine Einteilung nach Banff kann die Effekte von mNOX-E36 nicht vollständig abbilden. Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer multimodalen Beurteilung von Nierentransplantaten.



## 2. Einleitung

### 2.1. Geschichte der Nierentransplantation

Sowohl akute (**acute kidney injury, AKI**) als chronische Nierenerkrankungen (**chronic kidney disease, CKD**) können unbehandelt zu einer terminalen Niereninsuffizienz führen. Prädestinierend für eine akute Nierenschädigung sind u.a. pulmonale und kardiale Vorerkrankungen, Alter über 65 Jahre, akute Infektionserkrankungen oder maligne Grunderkrankungen (1). Es gibt aktuell keine allgemein anerkannte Einteilung der AKI (2). Die Arbeitsgruppe *Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO)* (3) empfiehlt jedoch die in Tabelle 1 dargestellte Einteilung (Tabelle 1). Eine der Langzeit-Konsequenzen der AKI ist die fortschreitende Nierenfibrose, welche selbst zur CKD führt (2, 4).

Stadium	Serum-Kreatinin-Erhöhung (in $\mu\text{mol/l}$ )	Urinausscheidung (in $\text{ml/kg/h}$ )
1	> 0,3 ODER 150 – 190 % Anstieg	< 0,5 für 6 – 12 h
2	200 – 290 % Anstieg	< 0,5 für > 12 h
3	> 4,0 ODER > 300% Anstieg ODER Beginn der Dialyse	< 0,3 für > 24 h ODER 0 für > 12 h

Tabelle 1: Einteilung der akuten Nierenschädigung nach KDIGO in drei Stadien gemäß der Serum-Kreatinin-Konzentration und der Urinausscheidung (3).

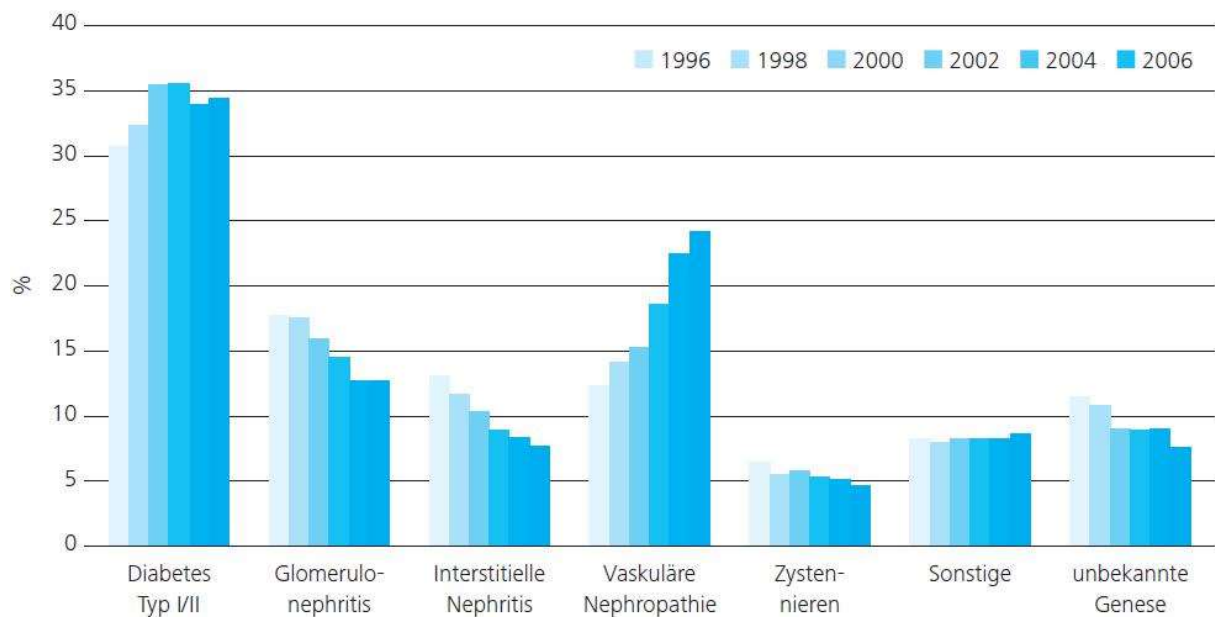
Die akute Nierenschädigung ist neben chronischen Erkrankungen, wie z.B. durch Diabetes Typ I, ein Grund für eine chronische Nierenschädigung. Die CKD ist ein entscheidender Faktor für das Gesamtüberleben von Patienten. Das Gesamtrisiko wird mittels der CGA-Klassifikation (**C**ausa, **G**lomeruläre Filtrationsrate und **A**lbumin; Tabelle 2) abgeschätzt (5, 6). Es konnte gezeigt werden, dass eine CKD zu einer deutlichen Häufung von kardiovaskulären Ereignissen, einer erhöhten Hospitalisierungsrate sowie einer erhöhten Todesrate führt (7, 8).

CGA			Albuminurie (in mg/g)			
			Stadium	A1	A2	A3
			Einschränkung	Normal bis leicht erhöht	Moderat erhöht	Stark erhöht
GFR (in ml/min/1,73m <sup>2</sup> )	Stadium	Einschränkung		< 30	30 - 300	> 300
	G1	Keine	> 89			
	G2	Mild	60 – 89			
	G3a	Mild bis moderat	45 – 59			
	G3b	Moderat bis schwer	30 – 44			
	G4	Schwer	15 – 29			
	G5	Versagen	< 15			

Tabelle 2: CGA-Klassifizierung für die chronische Nierenschädigung mit einer farbkodierten Stratifizierung für ein schlechtes Gesamtüberleben (6).

Legende: Risiko für schlechtes Outcome. Grün: Niedriges Risiko. Gelb: Moderat erhöhtes Risiko. Orange: Hohes Risiko. Rot: Sehr hohes Risiko.

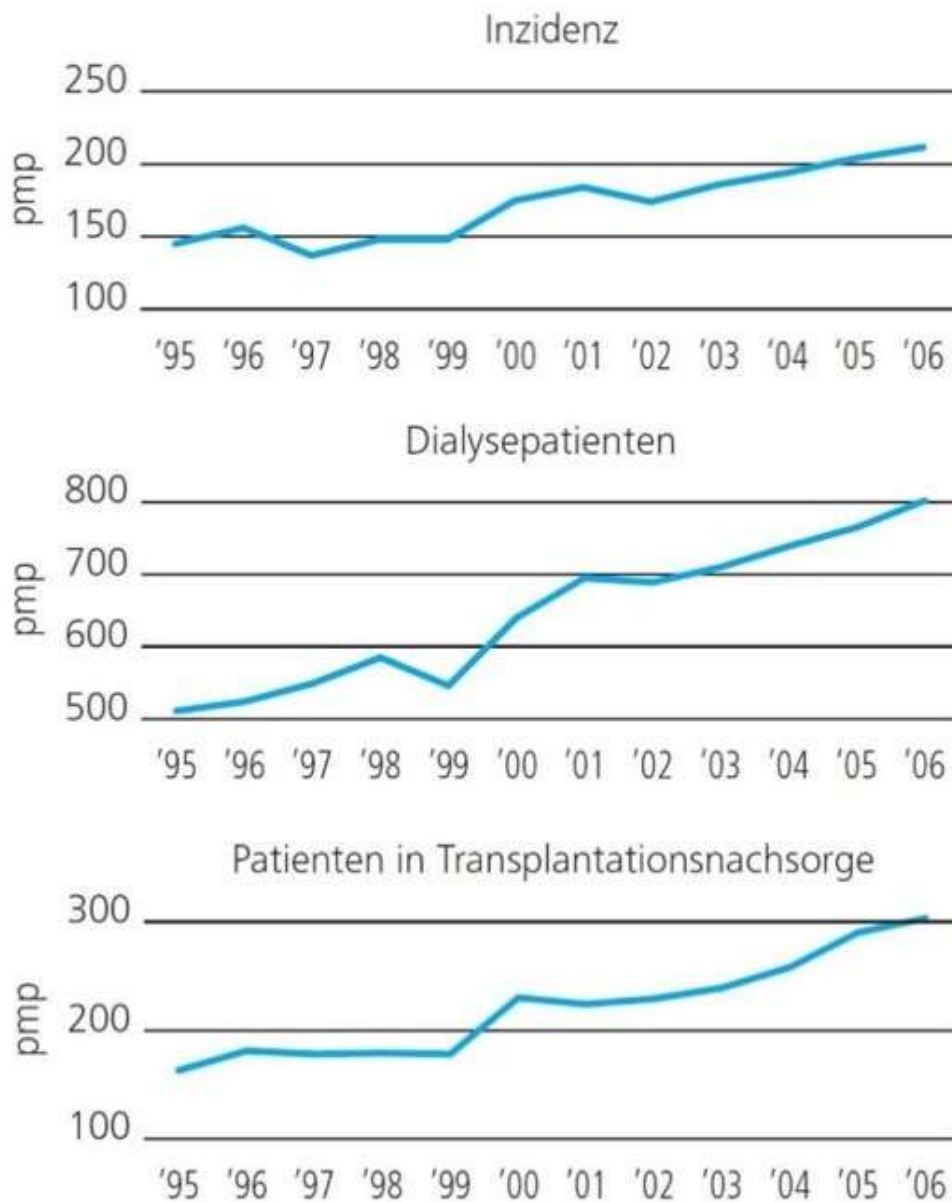
Der terminalen Niereninsuffizienz liegt eine heterogene Gruppe an Grundursachen vor (Abbildung 1) und erfordert die Zuhilfenahme von Nierenersatzverfahren. Diese Schädigung betrifft sowohl die endokrine Funktion der Niere als auch ihre Funktion als ausscheidendes Organ.



**Abbildung 1: Diagnose bei Beginn einer Nierenersatztherapie in Deutschland (9).**

Legende: Prozentuale Verteilung der Diagnose zu Beginn einer Nierenersatztherapie von 1996 bis 2006.

Laut aktuellstem QuaSi-Niere-Bericht 2006/2007 wurden zum Stichtag (31.12.2006) 91.718 Bundesbürger mit chronischer Nierenersatztherapie behandelt (9), davon 66.508 dialysepflichtige Menschen und 25.210 Menschen in Nachsorge nach Nierentransplantation. Im Vergleich zu 1995 wird die stetig steigende Relevanz von Nierenersatzverfahren auch für die Bundesrepublik Deutschland deutlich, da sowohl die Inzidenz der terminalen Niereninsuffizienz, als auch die Anzahl von Patienten in der Transplantationsnachsorge und unter Dialyse stetig steigt (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Nierenersatzverfahren in Deutschland von 1995 bis 2006 (9).**

Legende: Oben: Inzidenz von Nierentransplantationen. Mitte: Anzahl der Dialysepatienten. Unten: Patienten in Transplantationsnachsorge. pmp: pro Millionen Einwohner.

Die Nierentransplantation ist von den eingesetzten Nierenersatzverfahren im Gegensatz zur Hämo- und Peritonealdialyse mit der längsten Lebenserwartung der Patienten sowie der besten Lebensqualität verbunden (10-13). Die Deutsche Stiftung Organspende gibt an, dass derzeit allein in Deutschland mehr als 8000 Patienten auf eine Nierenspende warten, wobei die Wartezeit aufgrund Organmangel oft länger als 6 Jahre beträgt (14). Um diesem Mangel entgegenzuwirken, werden in manchen Ländern bereits Transplantate in suboptimalen Bedingungen, wie zum Beispiel mit

verlängerter Ischämiezeit oder von sehr alten Spendern, verwendet, was erhöhte Abstoßungsraten zur Folge hat (15).

1902 wurden die ersten experimentellen Nierentransplantationen zeitgleich durch den Österreicher Emerich Ullmann und den Franzosen Alexis Carrel an Hunden durchgeführt. Als 1936 die erste Transplantation einer menschlichen Leichenniere durch den ukrainischen Chirurgen Yurii Voronoy geschah, überlebte die Patientin nur wenige Tage (16). 1954 wurde die erste erfolgreiche Transplantation zwischen Zwillingen unter dem Nephrologen John P. Merrill durchgeführt. Hierfür erhielt der Operateur, Joseph Murray, 1990 den Nobelpreis der Medizin (17, 18). In der Bundesrepublik Deutschland wurde 1963 die erste allogene Nierentransplantation von Wilhelm Brosig und Reinhold Nagel durchgeführt (19).

Die Immunsuppression verblieb jedoch als limitierender Faktor. Vor Entdeckung der Kortikosteroide war die Ganzkörperbestrahlung die einzige Option. Kurz darauf folgte die Anwendung von Azathioprin und schließlich Cyclosporin A (CsA). Heutzutage steht eine Vielzahl von Medikamenten zur immunsuppressiven Therapie zur Verfügung (Tabelle 3).

<b>Gruppe</b>	<b>Wirkstoff</b>
Glucocorticoide (GC)	Methylprednisolon Prednisolon
Purin-Synthesehemmer	Azathioprin (AZA) Mycophenolat-Mofetil (MMF) Mycophenolat-Natrium
Calcineurin-Inhibitoren	Cyclosporin A (CsA) Tacrolimus / FK 506 (Tac)
mTOR-Inhibitoren (mTORi)	Sirolimus Everolimus
Polyklonale Antikörper	Antihuman T-Zell-Immunsereum (Kaninchen) Antihuman-T-Zell-Immunsereum (Pferd)
Monoklonale Antikörper	Anti-CD3 (Maus) Anti-IL-2-Rezeptor: Basiliximab (chimär Maus/Mensch) Anti-CD20 (chimär Maus/Mensch)

**Tabelle 3: Übersicht aktueller Medikamentenoptionen nach Nierentransplantation.**

Diese aktuellen Fortschritte in der Therapie haben die Ergebnisse in der frühen Phase nach Nierentransplantationen deutlich verbessert. Die Transplantatüberlebensrate für ein Jahr beträgt über 90% (20). Doch das Langzeitüberleben hat sich in den letzten zwei Jahrzehnten nur mäßig verbessert (21). Dies gilt für die Transplantation aller parenchymatösen Organe (22). Das 10-Jahres-Transplantatüberleben liegt bei nur 57% (20). Die entscheidenden zugrundeliegenden Mechanismen sind bis jetzt noch nicht hinreichend geklärt (23-25).

Sowohl akute als auch chronische Abstoßungen führen zu einer verminderten Transplantatleistung (26-28). Heutzutage ist eine Vielzahl von Medikamenten zur Immunomodulation in Gebrauch (29-32). Einer der Grundpfeiler dieser Therapie, der Calcineurininhibitor CsA führt aber selbst langfristig zur Schädigung des Transplantats, wie folgende Auflistung zeigt (Tabelle 4) (33, 34).

<b>Nebenwirkung</b>	<b>GC</b>	<b>CsA</b>	<b>Tac</b>	<b>mTORi</b>	<b>MMF</b>	<b>AZA</b>
neuer Diabetes mellitus	+	+	++	+		
Dyslipidämie	+	+		++		
Hypertension	++	++	+			
Osteopenie	++	+	+			
Anämie/Leukopenie				+	+	+
Wundheilungsstörung				+		
Diarrhö/Übelkeit/Erbrechen			+		++	
Proteinurie				++		
Erniedrigte GFR		+	+			

**Tabelle 4: Nebenwirkungen der Immunsuppression (5).**  
 Legende: +: häufige Nebenwirkung. ++: sehr häufige Nebenwirkung.

Die Situation heute ist also in keinem Fall ideal. Laut dem QuasiNiere-Bericht 2006/2007 sind 3,1% der 20.640 in Transplantationsnachsorge befindlichen Patienten im Jahr 2006 wieder dialysepflichtig geworden (9).

## **2.2. Pathophysiologie des Transplantatversagens**

Das Versagen eines Transplantats kann nach den chirurgischen Komplikationen verschiedene Ursachen haben, wie z.B. durch die Toxizität von Cyclosporin A oder durch das humane Polyomavirus 1. Eine Infektion ist die häufigste lebensbedrohliche Gefahr nach einer Nierentransplantation (35, 36).

Für die restlichen Ursachen eines Transplantatversagens erscheint in der Regel die zeitliche Einteilung sinnvoll, da sie im klinischen Rahmen am leichtesten auf den Patienten anzuwenden ist:

- Hyperakute Abstoßung
- Verzögerte Transplantatfunktion (**delayed graft function, DGF**)
- Akute Abstoßung
- Chronische Abstoßung (**chronic allograft nephropathy, CAN**)
- Chronische Allograft-Dysfunktion (CAD)

### **2.2.1. Hyperakute Abstoßung**

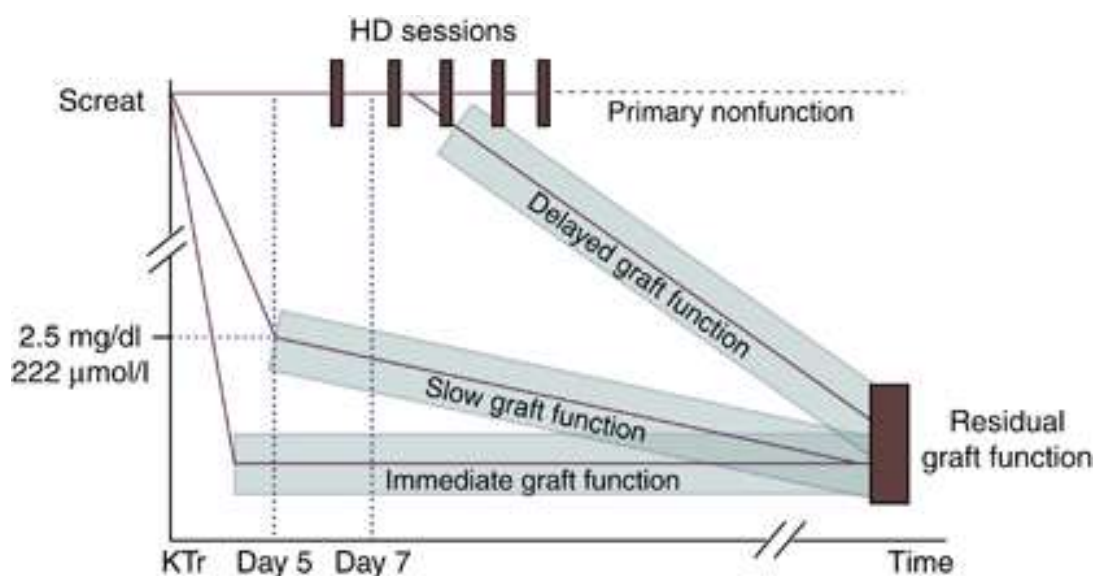
Die hyperakute Abstoßung wird durch vorbestehende zytotoxische Antikörper gegen ABO- oder HLA-Antigene des Transplantats vermittelt (37). Es kommt innerhalb von Minuten bis Stunden nach Transplantation zu einer Aktivierung der Komplementärfaktoren, Endothelschäden und Thrombosen. Dadurch kommt es zu ausgiebigen Nekrosen. Heutzutage geschieht dies dank Cross-Match nur noch in ca. 0,5% der Fälle. Die Niere erscheint bereits intraoperativ als weich und zyanotisch, sie produziert keinen Urin. Die einzige Therapie hierfür ist die Nephrektomie (37, 38).

### **2.2.2. Verzögerte Transplantatfunktion**

Häufiges Problem in der unmittelbaren postoperativen Phase ist die verzögerte Aufnahme der Transplantatfunktion. Die United Network for Organ Sharing definiert die verzögerte Transplantatfunktion durch die Notwendigkeit einer Dialyse innerhalb der ersten Woche nach Nierentransplantation, was die am häufigsten verwendete Definition darstellt (Abbildung 5). Es existieren jedoch siebzehn weitere Definitionen (39). Bei ca. 25% der postmortalen Spenden tritt dieses Problem auf (40). Der Ischämie-Reperfusionsschaden konnte als wesentliche Ursache hierfür identifiziert werden (41, 42). Für eine tiefere Analyse der Ischämie-Reperfusionsschäden empfiehlt sich die Arbeit von Eltzhig und Eckle, die klar macht, dass Ischämie-Reperfusionsschäden nicht nur im Bereich der verzögerten Transplantatfunktion,

sondern auch für die Autoimmunität und die Aktivierung von Immunabwehr relevant sind (43).

Die verzögerte Transplantatfunktion korreliert mit der Dauer der kalten Ischämiezeit, es gibt aber sehr unterschiedliche Meinungen über eine Assoziation mit einer verringerten Langzeitprognose (40, 44-50). Sie wird durch interstitielle Fibrose und tubuläre Atrophie vermittelt (24, 47, 50). Renale Hypoxie aktiviert proapoptotische Wege, wie zum Beispiel Tumorsuppressor Phosphoprotein p53 (51). Oxidativer Stress und reaktive Sauerstoffspezies führen zu einer Hochregulierung der proinflammatorischen Zytokine, welche wiederum zur Infiltration durch aktivierte Leukozyten führt (52). Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit verzögerter Transplantatfunktion ein erhöhtes Risiko für akute Abstoßung, tubuläre Atrophien und interstitielle Entzündungen haben (53, 54). Eine Metaanalyse zeigte, dass das relative Risiko (RR) für Patienten, die eine verzögerte Transplantatfunktion erleiden, ihr Transplantat zu verlieren bei 1,41 liegt. In zwölf Studien konnte kein Zusammenhang zwischen verzögerter Transplantatfunktion und Überlebenszeit oder erhöhten Serum-Kreatinin-Werten gefunden werden. Die Metaanalyse zeigte auch, dass DGF-Patienten ein RR von 1,38 für eine akute Abstoßung hatten (39). Bis heute gibt es noch keine wirksamen Diagnosemöglichkeiten, um eine verzögerte Transplantatfunktion frühzeitig erkennen zu können (55).



**Abbildung 3: Serum-Kreatinin im Zeitverlauf nach Transplantation (55).**

Drei unterschiedliche Verläufe eines Nierentransplantats in Bezug auf die Filtrationsleistung.

Legende: Screat: Serum-Kreatinin. KTr: Nierentransplantation. HD: Hämodialyse.

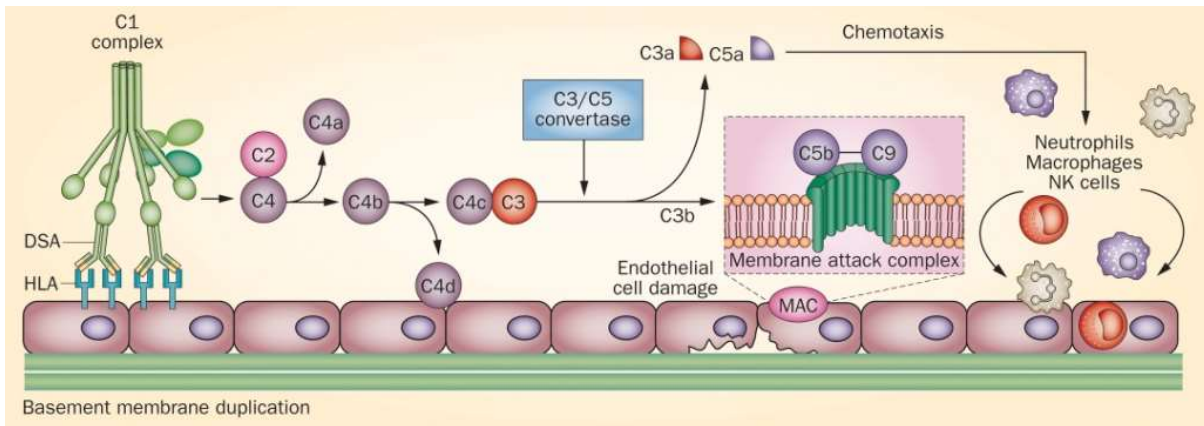


### 2.2.3. Akute Abstoßung

Zur akuten Abstoßung kommt es nach Tagen bis Wochen. Bis zum fünften postoperativen Tag wird diese Transplantatschädigung auch akzelerierte akute Abstoßung genannt. Bei der akuten Abstoßung kommt es häufig zu Rezidiven, unabhängig vom zeitlichen Abstand zur Transplantation. Seit Langem ist bereits bekannt, dass späte akute Abstoßungen schwerwiegendere Folgen für das Langzeitüberleben des Transplantats haben als frühe (56). Man unterscheidet weiterhin zwischen einer zellulär vermittelten (**acute cellular rejection**, ACR) und einer humoralen Abstoßung (**acute humoral rejection**, AHR). Letztere wird auch **acute antibody-mediated rejection** (ABMR) genannt. Die ACR zeigt meist das Bild einer Tubulitis, während eine AHR meist zu einer Endothelialitis führt. Diese Unterscheidung ist von therapeutischer Relevanz. Die späte akute Abstoßung ist häufiger eine humorale Abstoßung (57, 58).

Bei der akuten humoralen Abstoßung kommt es zu einer Antikörper-vermittelten Reaktion gegen die humane Leukozytenantigen (HLA) Class I und II- sowie nicht-Haupthistokompatibilitätskomplex (non Major Histocompatibility Complex, non-MHC-) Proteine des Transplantats. Diese DSA (donor-specific antibodies) sind selbst in niedrigen Konzentrationen mit einem schlechteren Transplantatüberleben verknüpft (59). Das inaktive Spaltprodukt des aktivierten Komplementsystems ist C4d, welches vor Ort bindet. Die aktiven Produkte C3a und C5a schließlich fördern die Infiltration durch proinflammatorische Zellen, wie z.B. natürlichen Killerzellen (NK) oder Makrophagen (Abbildung 6). Zusätzlich entsteht ein Gewebeschaden direkt durch den *membran-attack-complex* (MAC), welcher direkt zum Zelltod führen kann (57, 60). In hohen Konzentrationen kann DSA auch zu lytischen Läsionen führen. Dadurch werden Plättchenfaktoren aktiviert und es kommt zur profibrotischen Aktivierung und Mikrothromben (61). Für die Diagnostik ist grundsätzlich C4d relevant, was jedoch kritisch zu sehen ist. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass in C4d-negativen Fällen von Abstoßung eine ENDAT (endothelial-associated transcripts) Expression vorliegt, was auf bisher noch nicht vollständig erforschte, alternative Wege der Abstoßung hindeutet (62-67).

Die rein zellulär vermittelte akute Abstoßung stellt heute mit den Medikamenten aus Tabelle 4 ein gut therapierbares Problem dar (68, 69).



**Abbildung 4: Akute Abstoßung schematisch dargestellt (60).**

Die akute humorale Abstoßung basiert auf einer Antikörper-vermittelten Reaktion gegen HLA- und non-MHC-Proteine des Transplantats. Je mehr DSA genannte Antikörper vorliegen, desto ausgeprägter ist dieser Vorgang. Die aktiven Spaltprodukte des dadurch aktivierten Komplementsystems C3a und C5a vermitteln sowohl die Infiltration durch proinflammatorische Zellen, wie Neutrophile, natürliche Killerzellen (NK) und Makrophagen, vermitteln aber auch direkten Gewebeschaden durch den membran-attack-complex (MAC). Der MAC kann ebenfalls zum Zelltod führen.

Quantifiziert wird die akute Abstoßung typischerweise mittels des Banff-Scores, welcher Histologie, Immunhistologie und Serologie inkorporiert (Tabelle 5). Dieser wurde im Laufe der Jahre vielfachen Änderungen unterzogen, wobei die Immunhistologie eine zunehmende Rolle einnimmt. In der aktuellen Version von 2013 kam so der Nachweis von C4d in den peritubulären Kapillaren als Biomarker für ein schlechtes Transplantatüberleben hinzu (62, 70-74).

Methoden	Details
Histologie (mind. 1)	Mikrovaskuläre Entzündung
	Intimale oder transmurale Arteriitis
	Akute thrombotische Mikroangiopathie
	Akute tubuläre Verletzung
Immunhistologie (mind. 1)	C4d Nachweis in peritubulären Kapillaren
	Mäßige mikrovaskuläre Entzündung
	ENDAT Expression
Serologische Untersuchung	Nachweis von DSA

Tabelle 5: Banff Update 2013 für diagnostische Methoden der akuten Abstoßung (62, 74).

#### 2.2.4. Chronische Abstoßung

Die chronische Transplantatabstoßung ist ein multifaktorielles, antikörper- und zellvermitteltes Geschehen das Monate bis Jahre nach einer Nierentransplantation auftreten kann. Im Vordergrund stehen Fibrose und Sklerose des Transplantats.

Bei der chronischen Antikörper-vermittelten Abstoßung kommt es neben Veränderungen der akuten humeralen Abstoßung zur Glomerulopathie. Die aktivierten Endothelzellen führen zu einer myointimalen Proliferation. In der Folge führt dies zu einer arteriellen intimalen Fibrose sowie zu Doppelungen der peritubulären, kapillären Basalmembranen. Lumenverengung und größere Diffusionsstrecken führen zudem zu Ischämie und Hypertension. Die durch C3a/C5a erhöhte Makrophagenkonzentration führt per Wachstumsfaktoren wie PDGF (platelet derived growth factor) und FGF (fibroblast growth factor) zur Fibroblastenvermehrung. Gleichzeitig kommt es dadurch zur Proliferation von Mesangialzellen in den Glomeruli. Hier werden Matrixproteine vermehrt ausgeschüttet, was zu einer Sklerosierung des Transplantats führt. Durch diese Glomerulopathie wird das Renin-Angiotensin-System aktiviert, wodurch die Blutversorgung der Niere weiter verschlechtert wird. Schlussendlich führen diese Vorgänge zu einer Durchblutungsstörung. Die Unterversorgung des Transplantats resultiert unbehandelt in dessen Untergang (62, 75).

Wie bei der akuten Abstoßung wird hierbei der entsprechend angepasste Banff-Score (Tabelle 6) zur Klassifizierung herangezogen (62, 70-72, 74).

<b>Methode</b>	<b>Details</b>
Morphologie (mind. 1)	Glomerulopathie
	Ausgeprägte Doppelungen der peritubulären, kapillären Basalmembranen (im Elektronenmikroskop)
	Arterielle intimale Fibrose
Immunhistologie (mind. 1)	C4d Nachweis in peritubulären Kapillaren
	Mäßige mikrovaskuläre Entzündung
	ENDAT Expression
Serologische Untersuchung	Nachweis von Donor-spezifischen Antikörpern (z.B. HLA)

Tabelle 6: Banff Update 2013 für chronische Abstoßung (62, 74).

### **2.2.5. Chronische Allograft Dysfunktion**

Eine Chronische Allograft Dysfunktion (CAD) ist eine zumeist durch Fibrosen und Sklerosen geprägte Einschränkung der Transplantatleistung. Zu den Ursachen zählen neben der akuten und chronischen Abstoßung auch Therapieschäden, Rezidive der Ursprungserkrankung oder *de novo* Nierenerkrankungen. Jedoch führen sowohl wiederholte Infektionen als auch Hypertension zu einer chronischen Allograft Dysfunktion. Die genaueren Einzelheiten sind jedoch nicht von inhaltlicher Relevanz für den Forschungsgegenstand dieser Arbeit. Für weitere Informationen zu diesem Thema eignen sich die Arbeiten von Racusen et al. und Fadili et al. (63, 65).

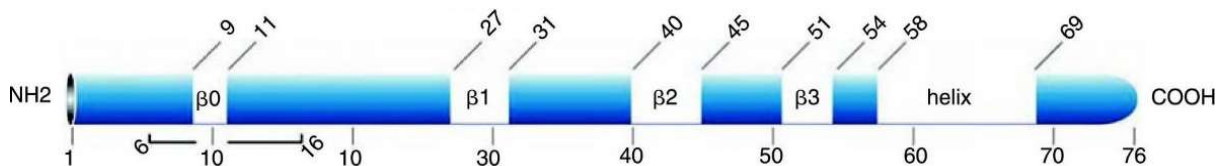
### **2.3. Chemokine als Angriffspunkt für eine Immunomodulation**

Chemokine spielen in der allogenen Abstoßung eine wichtige Rolle (28). Chemokine sind kleine basische Moleküle, welche als chemotaktische Zytokine agieren. Oft bindet ein Chemokin an mehrere Rezeptoren, welche oft mehrere mögliche Bindungsstellen für verschiedene Chemokine aufweisen (76). Über Konzentrationsgradienten steuern sie die Chemotaxis, also die zielgerichtete Bewegung von Zellen (77). Chemokine können nach Funktion und nach Struktur eingeteilt werden. Die meisten Chemokine haben eine inflammatorische Funktion, andere agieren im Rahmen der Homöostase. Nach ihrer Struktur sortiert gibt es folgende Familien CC, CXC, CX3C und C.

Das Monozyten-chemotaktische Protein 1 (MCP-1, Abbildung 5 und 6), welches auch Chemokin-Ligand 2 (CCL2) genannt wird, gehört zu der CC-Familie der Chemokine und bindet unter anderem an den CC Chemokin-Rezeptor Typ 2 (CCR2). Bei oxidativem Stress, durch Zytokine sowie durch Wachstumsfaktoren wird es von einer Vielzahl an Zellen ausgeschüttet. Dies zeigt die Rolle von CCL2 bei akuter und chronischer Entzündung auf (78). Die Hauptquelle hierbei sind Makrophagen (79, 80). Es konnte erstmals 1988 *in vitro* gezeigt werden, dass CCL2-Expression Monozyten anzieht (81). Heute sind die Relevanz und die Vielzahl an verschiedenen Aktivitäten von CCL2 differenzierter darstellbar (82-86). Für die Abstoßung entscheidend ist die Aktivierung vom Makrophagen. Lloy et al. zeigten dies für die Nephritis und die Rolle von CCL2 bei irreversiblen Nierenschäden durch interstitielle Fibrose (85).

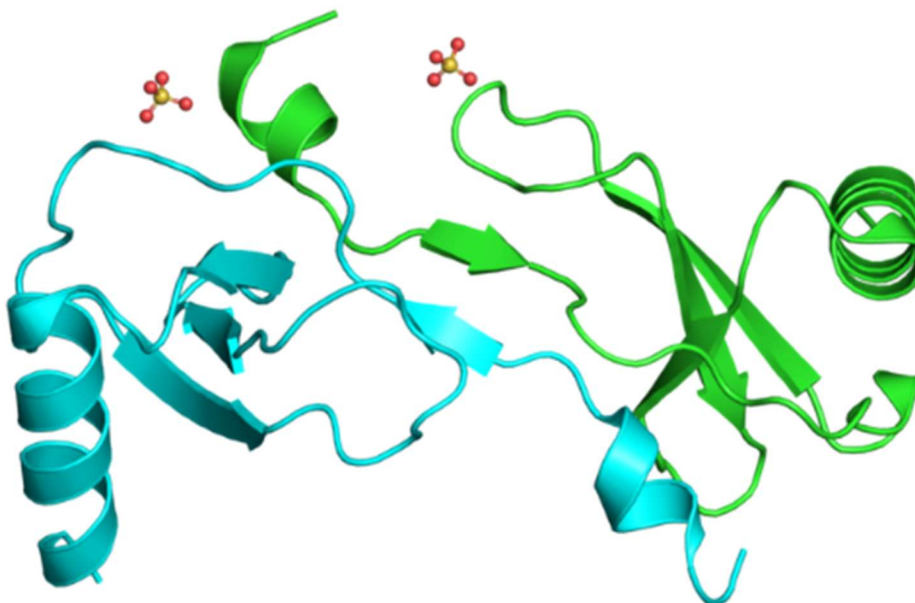
Neben der Wirkung auf Makrophagen hat CCL2 einen Effekt auf die T-Zell-Immunität. Es führt während der TCR (T-cell Receptor) gesteuerten Entwicklung von T-Lymphozyten über IL-4-Promoter zur Reifung von TH2-Isotypen der T-Helfer-Zellen. Diese Untergruppe kann in B-Zellen zu einem Isotypenswitch führen und somit die Immunantwort anpassen (87). Neben der Relevanz für viele andere Krankheiten wie Multiple Sklerose konnte ein Zusammenhang zwischen CCL2 mit anderen Vertretern der CC-Familie und sowohl akuter als auch chronischer Abstoßung gezeigt werden (28, 88-90). Auch kann CCL2 im Urin als Marker für akute Nierenschädigung verwendet werden (91-93). Es überrascht also nicht, dass CCL2 als Angriffspunkt für pharmakologische Therapieansätze dient (94, 95).

Das CCL2-spezifische L-Enantiomer RNA-Spiegelmer mNOX-E36 in dieser Studie wurde am 3'-Ende mit 40 kDa Polyethylenglykol modifiziert. Spiegelmere sind Spiegelbild-Oligonukleotide, welche an pharmakologisch relevante Zielstrukturen binden können. Es neutralisiert die physiologischen Effekte des murinen CCL2 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* ähnlich der Antikörper-Antigen-Erkennung (96, 97). Es konnte gezeigt werden, dass mNOX-E36 eine positive Auswirkung auf die Leukozyten-Rekrutierung und die entzündliche Antwort bei parenchymatöser interstitieller Nephritis hat (98-102). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass mNOX-E36 einen positiven Effekt auf das Transplantatüberleben bei der Herztransplantation an der Maus hat (103). Aufgrund ihrer dem Original nahen Struktur können Spiegelmere nicht von den körpereigenen Nukleasen als körperfremd erkannt werden. Dies führt zu einer erhöhten Biostabilität (96).



**Abbildung 5: CCL2 2D-Struktur (84).**

Dies ist die zweidimensionale Primärstruktur des CCL2-Proteins mit 11025 Dalton.



**Abbildung 6: CCL2 Dimer 3D-Struktur (104).**

Dies zeigt die dreidimensionale Tertiärstruktur von CCL2.

## **2.4. Diagnostik der Nierentransplantation**

Eine frühzeitige Entdeckung von Schäden am Transplantat ist also von großer Bedeutung, damit eine entsprechende Therapie frühzeitig eingeleitet und somit die Transplantatschädigung weitest möglich begrenzt werden kann.

### **2.4.1. Perkutane Nierenbiopsie**

Der Goldstandard der Diagnostik ist bis heute die perkutane Nierenbiopsie (**p**ercutaneous **r**enal **b**iopsy, PRB). Diese Methode wurde 1951 von Iversen und Brun entwickelt und mit leichter Abwandlung in der heutigen Routine verwendet (105, 106). Des Weiteren wird die Prozedur meist ultraschallgesteuert durchgeführt. Diese Erweiterungen führen zu erfolgreichen Diagnosen in über 95% der Fälle (107). Jedoch bleibt die PRB nicht ohne Risiken. Es kann zu Infektionen kommen. Neben Fistelbildungen stehen Blutungskomplikationen deutlich im Vordergrund (108). Patienten müssen im Idealfall für 24 Stunden beobachtet werden, da über 33% der Komplikationen zwischen acht und vierundzwanzig Stunden nach der Biopsie stattfinden (109). Es wird also deutlich, dass die PRB nicht nur für den Patienten belastend ist, sondern auch längere Hospitalisierungszeiten mit sich bringen kann. Auch kam es nach einer PRB bereits zum Verlust des Transplantats und zum Tod (110). Ein weiterer Nachteil der PRB ist, dass Abstoßungsreaktionen oft nur fleckig und fokal im Transplantat beginnen und somit repräsentative Biopsien nicht immer möglich sind. Eine wichtige absolute Kontraindikation ist ein aktives Blutungsgeschehen.

### **2.4.2. Ultraschall**

Der diagnostische Ultraschall ohne Probeentnahme hat mehrere Nachteile. Aufgrund der geringen Kosten und der hohen Verfügbarkeit ist er jedoch die am häufigsten benutzte Bildgebungsmodalität. Eine Doppler-Darstellung von frühen Abstoßungspathologien ist aber nicht möglich, da zuerst nicht darstellbare, kleine Gefäße betroffen sind (111). Zusätzlich kann der Doppler-Ultraschall nicht zwischen akuter tubulärer Nekrose und akuter Abstoßung unterscheiden (112). Die Größe einer Niere nimmt direkt nach Nierentransplantation deutlich zu und ist während einer akuten Abstoßung sehr variabel (113): Es konnte außerdem gezeigt werden, dass während der Abstoßung auch keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Grauwerte nachgewiesen werden konnten (114, 115). Dagegen wurde gezeigt, dass ein erhöhter *resistance index*, d.h. unspezifisch auf die Diagnose bezogen, aber mit

einem schlechteren Transplantatüberleben verbunden ist (116). Weitere Limitationen des Ultraschalls sind die Untersucherabhängigkeit sowie eine reduzierte Bildqualität bei Adipositas und Darmgasüberlagerungen. Komplikationen wie Hydronephrosen, Thrombosen und andere Pathologien der größeren Gefäße und extrarenale Flüssigkeitsansammlungen können exzellent detektiert werden (117). Kontrastverstärkter Ultraschall könnte die diagnostische Qualität weiter verbessern, da er detailliertere Aussagen über die Perfusion des gesamten Organs liefert, und ist daher Gegenstand aktueller Forschungen in Bezug auf Transplantatdiagnostik (118).

### **2.4.3. Magnetresonanztomographie**

In der Magnetresonanztomographie (MRT) hingegen lassen sich größere Gefäße ohne Kontrastmittel und Strahlenbelastung darstellen. Für die Darstellung kleinerer Gefäße, in denen sich frühe pathologische Veränderungen der Niere zeigen, werden jedoch nach wie vor MR-Kontrastmittel benötigt. Diese basieren auf Gadolinium und bergen die Gefahr, bei eingeschränkter Nierenfunktion zu einer nephrogenen systemischen Fibrose (NSF) zu führen (119). Zudem kann es zur Deposition von Gadolinium im Gehirn kommen. Dies ist zum aktuellen Forschungsstand jedoch von unklarer medizinischer Relevanz (120). Jedoch können die pathologischen Veränderungen durch die Abstoßungsreaktionen erst in fortgeschrittenen Stadien bildmorphologisch nachgewiesen werden.

Die funktionelle multiparametrische MRT erweitert die reine Morphologie um pathophysiologische Veränderungen. Die diffusionsgewichtete Bildgebung (**d**iffusion **w**eighted **i**maging, DWI) gibt ohne Kontrastmittel Auskunft über die Zellularität und Beweglichkeit von freiem Wasser und findet sich in der Routine der onkologischen und neuroradiologischen Diagnostik wieder (121, 122). Kontrastmittelunterstützt lassen sich dynamische Sequenzen akquirieren (**d**ynamic **c**ontrast **e**nhanced, DCE-MRT), die bei geeigneter zeitlicher Auflösung pharmakodynamische Parameter durch quantitative und semiquantitative Auswertungen generieren (122, 123). Daneben gibt es noch viele weitere Ansätze, wie die BOLD-Technik (blood oxygen level-dependent), mit der sich beispielsweise viele klinische Parameter ohne KM-Belastung aufzeichnen lassen (124).

Zum Zeitpunkt des Studienstartes wurden die Parameter der funktionellen MRT nicht mit den histopathologischen Veränderungen nach Nierentransplantation korreliert (122, 123, 125-131). Darüber hinaus wurde die Darstellung von Therapieeffekten in der Magnetresonanztomographie bisher noch nicht durchgeführt.



### **3. Fragestellung und experimentelle Strategie**

Die funktionelle MRT als nicht-invasive Nierendiagnostik hat sich in den letzten Jahren kontinuierlich fortentwickelt. Im Gegensatz zur bioptischen Diagnostik gibt die MRT Aussagen über das gesamte Organ, was bei oft fokal beginnenden Abstoßungsreaktionen hohe Relevanz hat. Die diffusionsgewichtete Bildgebung gibt ohne exogenes Kontrastmittel Aussagen über Zelldichte und Ödem in Abhängigkeit der kapillären Perfusion an und kann zwischen akuter Abstoßung, tubulärer Nekrose und gesunden Nieren unterscheiden. Die DCE-MRT ermöglicht hyper- und hypoperfundierte Nierenabschnitte mit pathophysiologischen Parametern wie Plasmafluss oder Verteilung des Blutvolumens zu identifizieren. Zum aktuellen Zeitpunkt wurde im Tiermodell keine Darstellung von Therapieeffekten durchgeführt.

Zu diesem Zweck sollten in dieser Arbeit verschiedene Therapieschemata im allogenen Mausmodell auf ihre Wirkung getestet werden. Die Monotherapie von Cyclosporin A sollte mit der Monotherapie eines neuen Spiegelmers und mit einer Kombinationstherapie von beiden verglichen werden. Eine Gruppe nach syngener Transplantation zur Erfassung der OP-Folgen ohne Abstoßungsreaktion und eine Gruppe mit inaktiver Spiegelmer-Monotherapie nach allogener Transplantation mit theoretisch maximalen Abstoßungsfolgen dienten als Kontrollgruppen. Die Gruppen wurden anschließend an die funktionelle MRT zum Vergleich unter Berücksichtigung des Banff-Scores histopathologisch, immunhistochemisch und mittels RT-PCR untersucht.

Die Nullhypothese lautete: Die funktionelle MRT kann mittels diffusionsgewichteter MRT und DCE-MRT Aussagen über den Therapieerfolg bei Nierentransplantaten treffen und ist mit der bioptisch gestützten Diagnostik vergleichbar.

Die Alternativhypothese lautete: Die funktionelle MRT kann mittels diffusionsgewichteter MRT und DCE-MRT Aussagen über den Therapieerfolg bei Nierentransplantaten treffen, welche in dieser Form nicht durch die bioptisch gestützte Diagnostik getroffen werden können.

Die experimentelle Strategie im zeitlichen Überblick:

- Tag 0: Allogene und syngene Nierentransplantation
- Tag 0: Einteilung in Therapiegruppen
  - Monotherapie mit Cyclosporin A
  - Monotherapie mit mNOX-E36
  - Kombinationstherapie aus subtherapeutischem Cyclosporin A und mNOX-E36
  - Therapiekontrolle durch Therapie mit inaktivem remNOX-E36
  - Operationskontrolle durch syngene Transplantate
- Tag 10: Diagnostik
  - Laser Doppler-Flow-Messung
  - Funktionelle MRT
    - Diffusionsgewichtete Bildgebung
    - Dynamisch Kontrastmittel-verstärkte MRT
  - Explantation der Nieren und histologische Fixierung
- Im Verlauf: Weiterführende Diagnostik
  - Nachverarbeitung der MRT-Daten
  - Histologische und laborchemische Analyse

Erwartete Ergebnisse:

- Erfolgreiche Durchführung von fMRT bei Mäusen.
- Kombinationstherapie ist den Monotherapien überlegen.
- Kombinationstherapie ist den syngenen Kontrollen unterlegen.
- Jede Therapiegruppe ist der Therapiekontrollgruppe überlegen.
- Erfolgreiche Korrelation von histologisch/laborchemischer Analyse mit fMRT.

Die Versuche fanden am Standort Großhadern der Universitätsklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München statt. Beteiligt waren Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Radiologie, des Transplantationszentrums der Chirurgischen Klinik und Poliklinik, des Pathologischen Instituts und der Abteilung für Nephrologie der Medizinischen Klinik und Poliklinik IV.

## **4. Methoden und Materialien**

### **4.1. Tierauswahl**

Bei Kleintiermodellen sind C57/B6 (H<sup>2b</sup>) und Balb/c (H<sup>2b</sup>) Mäuse erfolgreich erprobte Tiere für Nierenversuche und bieten einen guten Vergleich zum Menschen durch eine intra-abdominelle Transplantation (132). Die Tiere wurden im Alter von 6 bis 8 Wochen von Charles River (Sulzfeld, Germany) geliefert. Alle Tiere wurden in Standardkäfigen mit Filteraufsatz unter normalen Bedingungen bei freiem Zugriff auf Nahrung und Trinken gehalten. Die Versuche wurden gemäß dem deutschen Tierschutzgesetztes unter folgenden Nummern registriert: Tierversuchsantragsnummern 55.2-1-54-2532-19-11 und 55.2-1-54-2531-148-10. Tiere mit unvollständigen Untersuchungen oder OP-Komplikationen (siehe Kapitel 4.3.) wurden von der Auswertung ausgeschlossen.

### **4.2. Narkose**

Durch eine intraperitoneale Injektion von einer Mischung aus Midazolam (5,0 mg/kg i.p.), Medetomidin (0,5 mg/kg i.p.) und Fentanyl (0,05 mg/kg i.p.) (MMF-Narkose) wurde die Narkose beim jeweiligen Tier eingeleitet (MMF-Narkose).

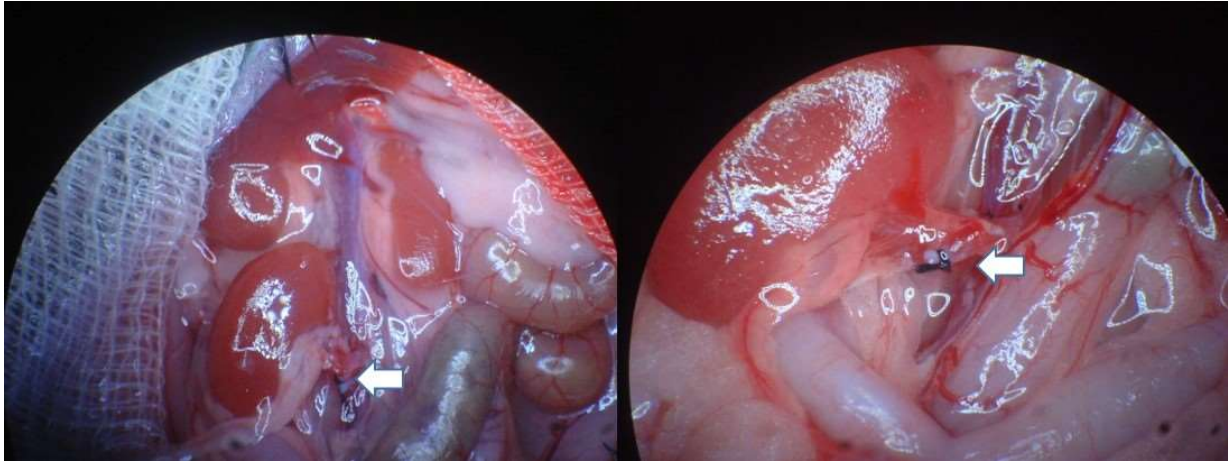
### **4.3. Operation**

Im Rahmen dieser Versuche wurde die Nierentransplantation in Anlehnung an die von Russell et al. (169) beschriebene Technik durchgeführt. Dafür wurden Brust- und Bauchareale rasiert und mit Alkohol gesäubert. Längs entlang der Medianlinie wurde die Bauchdecke des Empfängers eröffnet und der Aorto-Cavale-Gefäßstrang aufgesucht. Unterhalb sowie auf der Höhe der Nierengefäße wurden Aorta abdominalis und Vena cava inferior stumpf vom umliegenden Fettgewebe befreit und dargestellt. Die rechte Arteria renalis, die rechte Vena renalis und der rechte Ureter wurden herauspräpariert, danach ligiert und schließlich durchtrennt. Die gesamte rechte Niere des Empfängers konnte nun entfernt werden. Abschließend wurde der Operationsbereich mit einer feuchten Kompresse abgedeckt. Anschließend wurde das Abdomen des Spendertiers eröffnet. Im Gegensatz zum Spender wurde beim Empfänger die linke Arteria, Vena renalis, der linke Ureter, Aorta und Vena cava kranial und kaudal der Nierengefäße freipräpariert. Es folgte eine Injektion von Heparin in die Vena cava inferior. Nach etwa einer Minute wurde die Aorta kranial der Nierengefäße abgeklemmt und ca. drei Milliliter eiskalte Kochsalzlösung über die Aorta abdominalis verabreicht, um die Nieren des Spendertiers zu perfundieren. Das

passierte unter gleichzeitigem Einschnitt in die Vena cava, um für den nötigen Ablauf zu sorgen. Nach erfolgter Perfusion wurden die Nierengefäße mit jeweils einem Patch von der Aorta und der Vena cava und der Ureter mit einem Patch aus dem Blasendach abgesetzt. Das Transplantat wurde entnommen und in eiskalter physiologischer Kochsalzlösung aufbewahrt. Dann wurden mit Gefäßklemmen die Bauchgefäße des Empfängers abgeklemmt. Daraufhin wurden die Aorta abdominalis und die Vena cava inferior längs eröffnet, um mit den Nierengefäßen des Transplantats End-zu-Seit anastomosiert zu werden. Dies geschah unter dem OP-Mikroskop mit bis zu 40-facher Vergrößerung in mikrochirurgischer Technik mit 10-0 Prolene. Während der Transplantation wurde die Niere durch Aufbringen eiskalter physiologischer Kochsalzlösung gekühlt. Nach Fertigstellung der Anastomosen wurden die Klemmen entfernt und das Transplantat somit wieder an den Blutstrom angeschlossen. Im seltenen Fall einer Blutung erfolgte die Stillung. Zum Wiederanschluss des Ureters wurde das Blasendach des Empfängertiers eingeschnitten. In die so entstandene Öffnung wurde der Blasendachpatch der Spenderniere eingenäht. Dies geschah ebenfalls mit der mikrochirurgischen Nahttechnik mit 10-0 Prolene. Um ein Abknicken der Gefäße des Transplantats bei Bewegungen des Versuchstiers zu vermeiden wurde die Niere noch mit ihrer Fascia renalis am umgebenden Gewebe vernäht. Für den intraoperativen Situs und Blick auf die Gefäßanastomose siehe Abbildung 7.

Der Bauchverschluss erfolgte mit 5-0 Prolene. Abschließend wurden den operierten Tieren noch subkutan ca. 1-1,5 ml sterile, physiologische Kochsalzlösung zur Flüssigkeitssubstitution verabreicht. Dies wurde an den drei folgenden postoperativen Tagen wiederholt. Während der ersten zwei postoperativen Tage erhielten die Tiere Buprenorphin (0.05 – 0.1 mg/kg KG) s.c. alle zwölf Stunden. Intra- und postoperativ wurden die Versuchstiere auf Wärmematten gewärmt.

Typische Komplikationen betreffen, wie in der Literatur vorbeschrieben, vor allem die Gefäßanastomosen (133, 134). Hier kam es zu Thrombosen, Embolien, Stenosen und Blutungen. Tiere mit diesen Komplikationen wurden von der Studie ausgeschlossen.



**Abbildung 7: Intraoperative Übersicht der Nierentransplantation. (Von Dr. A. Kalnins zur Verfügung gestellt).**

Jeweils links im Bild befindet sich das Nierentransplantat und am rechten Rand Teile des Darms. Die Pfeile zeigen jeweils auf die Gefäßanastomosen. Eine Stenose oder Insuffizienz hier bedeutet meist den Transplantatverlust. Die Ureteranastomose befindet sich direkt am Blasendach. Eine Ureterstenose führt zur Hydronephrose und ebenfalls häufig zum Verlust des Transplantats. Anschließend wird das Transplantat noch am peritonealen Blatt fixiert um einen Verlust durch übermäßige Mobilität zu vermeiden.

#### 4.4. Therapieschemata

Die medikamentöse Therapie der Nierentransplantation umfasst viele verschiedene Bausteine. Wie oben bereits beschrieben, gab es gerade in den letzten Jahren viele Neuzulassungen.

In dieser Studie wurde unter anderem Cyclosporin A (CsA) verwendet, welches vom Pilz *Tolypocladium inflatum* gebildet wird. Es ist ein lipophiles Peptid und besteht aus elf Aminosäuren. Calcineurin, eine Calcium/Calmodulin-abhängige Phosphatase, wird durch den Komplex aus CsA und dem Immunophilin Cyclophylin A hemmend gebunden. Hierdurch kann NF-AT (nuclear factor activating T-Cell) das Interleukin-2 (IL-2)-Gen nicht mehr aktivieren. IL-2 ist ein Proliferations- und Differenzierungssignal für T-Lymphozyten. Durch CsA wird also die T-Zell-Aktivität gesenkt. Zusätzlich induziert CsA den *transforming growth factor beta* (TGF- $\beta$ ), welcher antiproliferativ wirkt und aktivierungshemmend für die T-Zellen ist (135).

Das mit CsA verglichene Spiegelmer trägt den Namen mNOX-E36 (5'-GGCGACAUUGGUUGGG CAUGAGGCGAGGCCCUUGAUGAAUCCGCGGCCA-3') (NOXXON Pharma AG, Berlin, Deutschland). mNOX-E36 interferiert wie bereits beschrieben mit CCL2/CCR2. Zum Vergleich wurde eine Gruppe mit revmNOX-E36 (5'-ACCGGCGCCUAAGUAGUUUCCCGGAGCGGGUACGGGUUGGUUACAGCGG-

3') (NOXXON Pharma AG, Berlin, Deutschland) als Kontrolle behandelt. Diese Abänderung von mNOX-E36 führt zu einem Verlust der pharmakologischen Wirkung.

Die Monotherapie mit CsA erfolgte mit 10 mg/kg Körpergewicht/d, die Monotherapie mit mNOX-E36 und respektive revmNOX-E36 erfolgte mit 15,5 mg/kg Körpergewicht/d. Die Kombinationstherapie erfolgte mit 8 mg/kg Körpergewicht/d CsA und 15,5 mg/kg Körpergewicht/d mNOX-E36.

Daraus ergibt sich folgende Gruppenzuordnung (Tabelle 7):

Gruppe	Therapie	Anzahl	Funktion
Syngen (C57Bl/6 auf C57Bl/6)	Keine	5	Operationskontrollen
Allogen (Balb/c auf C57Bl/6)	revmNOX-E36	5	Therapiekontrollen
Allogen (Balb/c auf C57Bl/6)	CsA	5	Monotherapie
Allogen (Balb/c auf C57Bl/6)	mNOX-E36	5	Monotherapie
Allogen (Balb/c auf C57Bl/6)	mNOX-36+CsA	5	Kombinationstherapie

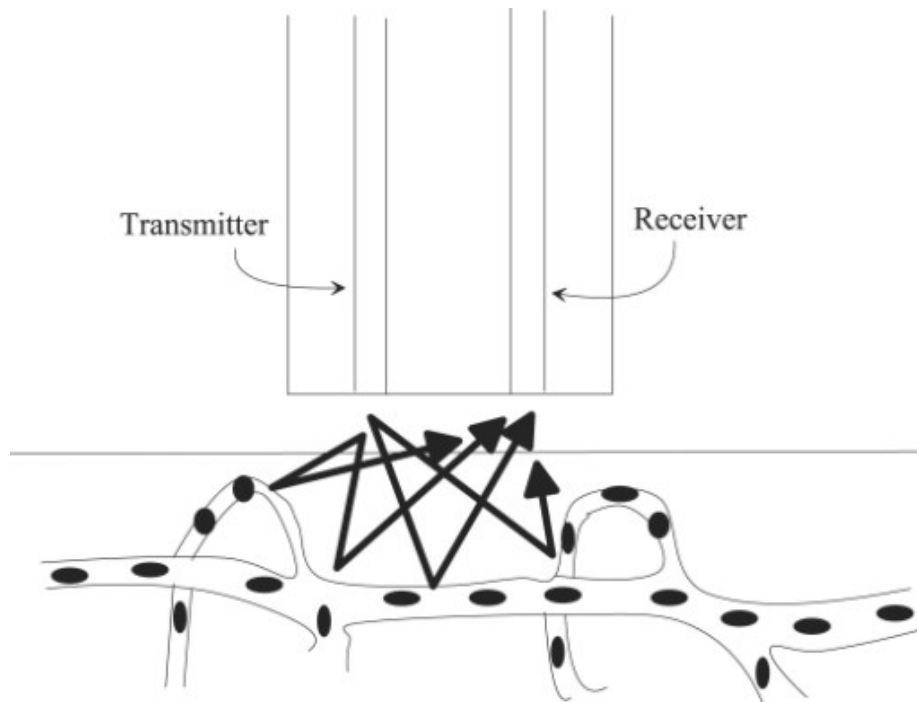
Tabelle 7: Gruppenzuordnung.

#### 4.5. Untersuchungszeitpunkt

Die Tiere wurden am zehnten postoperativen Tag der Diagnostik zugeführt. Dieser Zeitpunkt erlaubt eine deutliche Ausprägung der pathophysiologischen Vorgänge ohne das Überleben der Versuchstiere bis zum Messzeitpunkt zu sehr zu gefährden.

#### 4.6. Laser Doppler Flow

LDF ist eine Technik bei der der Doppler-Effekt eines monochromen Laserstrahls mit konstanter Wellenlänge ausgenutzt wird (Abbildung 8). Es kommt zu einer Änderung der Wellenlänge, sobald das Licht auf die sich bewegenden roten Blutkörper trifft und reflektiert wird. Die Amplituden- und Frequenzverteilung dieser Veränderung korreliert dabei mit der Geschwindigkeit und Anzahl der roten Blutkörperchen (136, 137).



**Abbildung 8. Laser Doppler Flussmessung (136).**

Die Schemazeichnung zeigt wie der Doppler-Effekt zur Bestimmung der Flussgeschwindigkeit benutzt wird. Die gleiche Theorie ermöglicht die Geschwindigkeitsmessung im Ultraschall. Die Laser Doppler Flussmessung arbeitet jedoch ohne Winkelkorrektur.

Neben der geringen Eindringtiefe ist die wichtigste Limitation, dass bei dieser Untersuchungsmethode keine absoluten Werte ermittelt werden können und die Untersuchung abhängig von der Erfahrung des Untersuchers ist.

LDF-Messungen wurden direkt vor der MRT am Tag 10 durchgeführt. Die Flussmessungen wurden mit einem LDF-Gerät mit LFM-2 Mikroproben durchgeführt. (Lea Medizintechnik, Gießen, Deutschland). Die Eindringtiefe betrug hierbei 2 mm.

#### **4.7. Messvorbereitung zur MRT**

Die Mäuse wurden einzeln durch MMF-Narkose in Narkose versetzt (siehe 4.2.). Nach Ausbleiben einer Schmerzreaktion wurden die Tiere mit dem Bauch nach unten auf die Untersuchungsbaure gelegt. In dieser Position wurde ein speziell angefertigter Katheter in eine der Schwanzvenen eingebracht und mit handelsüblichem Sekundenkleber fixiert (Abbildung 9). Danach wurde das Tier ohne Verzögerung in den Scanner gelegt.



**Abbildung 9: Messvorbereitung.**

Nach der intraperitonealen Narkose kann die Maus nach ca. fünf Minuten aus dem Käfig entnommen werden. Sie wird auf einer präparierten Bahre in Bauchlage aufgelegt. Eine Fixierung ist dank der Narkose nicht nötig. Anschließend wird mit einem selbst hergestellten Katheter ein Schwanzvenenzugang sichergestellt. Dieser wird an der Maus und an der Unterlage fixiert. Über diesen wird während der kontrastverstärkten MRT das Kontrastmittel gespritzt.



## 4.8. Magnetresonanztomographie

### 4.8.1. Magnetresonanztomographie-Technik

#### 4.8.1.1. Magnetresonanztomographie-Grundlagen

Nachdem 1946 zum ersten Mal die magnetische Resonanz von Atomkernen nachgewiesen wurde, veröffentlichte Paul C. Lauterbur 1973 seine Theorie zum MRT (138-141). Diese Theorie baute auf den Studien von Erik Odeblad auf (142).

Die Grundlage der MRT ist die Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance, NMR). Jedes Proton hat eine Ladung, eine Masse und eine Eigenrotation, genannt Spin. Für die MRT relevant sind die Protonen des Wasserstoffatoms im Wasser, da Wasser im menschlichen Körper in hoher Konzentration vorliegt und spezielle Fließeigenschaften besitzt. Es können jedoch auch andere Atome mit ungerader Protonenanzahl verwendet werden. Der Spin dieser Protonen kann vereinfacht als Rotation um die Achse seiner Ladung dargestellt werden. Dies führt dazu, dass das Proton eine magnetische Komponente bekommt; einem kleinen Stabmagneten nicht unähnlich. Da dieser kleinste Magnet aber immer noch einen Spin und eine Masse besitzt, kommt es zu einem Drehimpuls. Die Kombination aus allen diesen Eigenschaften wird NMR genannt (143).

Wenn sich ein Proton in einem Magnetfeld befindet, beginnt es zu taumeln, oder genauer gesagt zu präzedieren. Die Frequenz, mit der es sich aus seiner Achse herausbewegt, ist abhängig von der Stärke des angelegten Magnetfeldes und aller Eigenschaften des Teilchens. Diese Frequenz der Kernpräzession nennt man Larmorfrequenz  $\omega$  mit der Einheit Hertz Hz.

$$\omega = \gamma \times B_0$$

Die Stärke eines Magnetfelds  $B$  wird in Tesla  $T$  angegeben. Der skalierende Faktor, das gyromagnetische Verhältnis  $\gamma$ , hat die Einheit Hz/T. Für Wasserstoffatome ist dieser Wert ca. 42,6 MHz/T.

#### 4.8.1.2. T2-gewichtete Sequenzen

In einer Spin-Echo-Pulssequenz gibt es zwei Radiofrequenz-Pulse (RF-Pulse) (Abbildung 10). Der erste kippt die Spins um  $90^\circ$  direkt in die transversale x-y-Ebene. Zu Beginn sind alle Spins in-phase und das NMR-Signal am stärksten. Direkt danach beginnt die Dephasierung. Dieser Dephasierung wirkt der zweite RF-Puls mit  $180^\circ$

entgegen. Er wird zur Hälfte der Echozeit (time to echo, TE) gesendet. Dies wendet die Ausrichtung aller Spins in die entgegengesetzte Richtung. Nach einer weiteren halben Echozeit sollten nun alle Spins zur entgegengesetzten z-Achse ausgerichtet sein. Das gemessene Signal wird auch als Hahn-Echo bezeichnet. In Wirklichkeit wird dieser Zustand aber durch die zeitabhängige Dephasierung nicht erreicht und die Nettomagnetisierung ist geringer als zu Beginn. Je länger also die TE gewählt wird, desto größer ist der Signalverlust. Das gemessene Signal wird auch als Echo bezeichnet. Da Materialien unterschiedliche Spin-Spin-Dephasierungen, also T2-Zeiten, besitzen, geben sie bei gleicher TE unterschiedlich große Echos. So entstehen die Helligkeitsunterschiede in einem T2-gewichteten Bild (144-146).

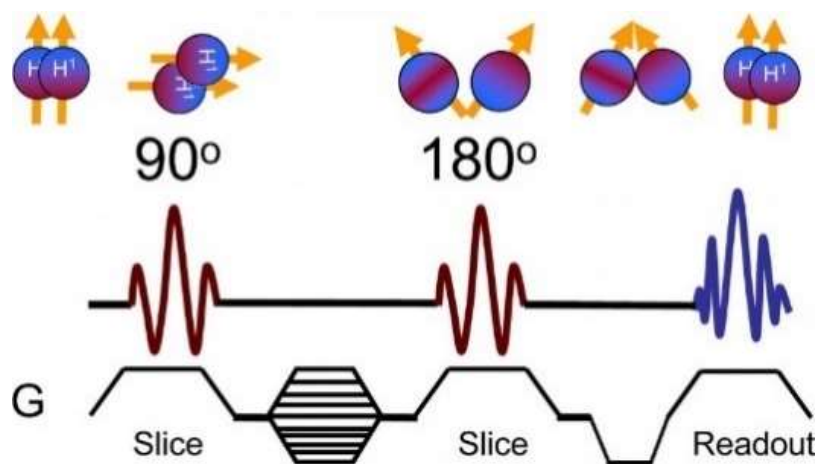


Abbildung 10: Spin Echo Sequenz im zeitlichen Verlauf (145).  
 Legende: Oben: Ausrichtung der Atome. Unten: Zeitpunkt der Anregung.

#### 4.8.1.3. T1-gewichtete Sequenzen

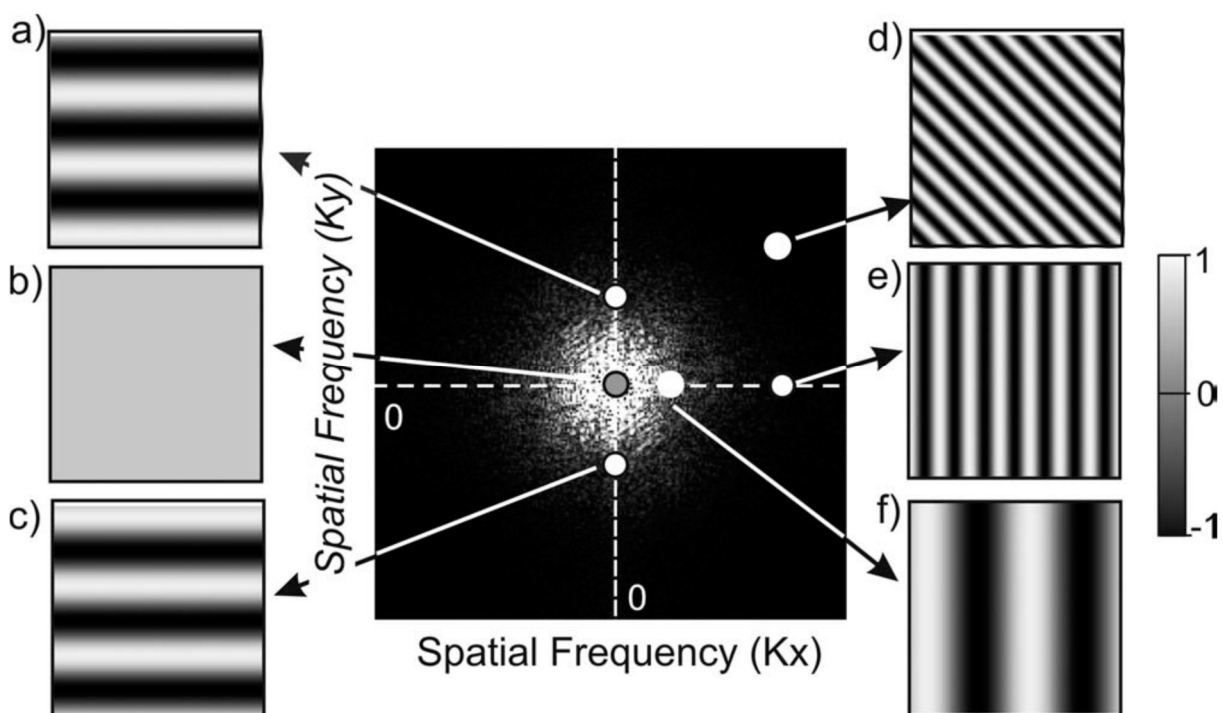
Die Energie, die durch einen RF-Puls in eine Materie eingebracht wird, verteilt sich auf die einzelnen Protonen. Von den Protonen verteilt sie sich dann auf den gesamten untersuchten Körper, der hierfür auch als Gitter bezeichnet wird. Diese Spin-Gitter-Relaxation braucht länger als die T2-Zeit und wird als Longitudinalrelaxation T1-Zeit bezeichnet. Sie ist als Zeit definiert, die verstreicht bis nach einer Erregung die Nettomagnetisierung wieder  $1 - 1/e$  oder ca. 63% des initialen Equilibriumszustandes erreicht. Verschiedene Materialien haben verschiedene T1-Zeiten. Eine moderne T1-gewichtete Sequenz wiederholt die Koppelung von 90°-, 180°-Puls und Echo. Die Wiederholungsrate wird TR (time to repetition) genannt. Innerhalb einer TR erreichen also nicht alle unterschiedlichen

Materialien ihre T1-Zeit und so entstehen die Helligkeitsunterschiede im T1-gewichteten Bild (145).

#### 4.8.1.4. k-Raum und Bildentstehung

Eine detaillierte Erklärung des k-Raums und der Bildentstehung in der MRT übersteigt den Rahmen dieser Dissertation. Vereinfacht sei deshalb Folgendes gesagt: Das endgültige MR-Bild entsteht durch eine Überlagerung von Streifenmustern mit verschiedenen Eigenschaften. Jedes einzelne Muster bedeckt das ganze Bild. Eine Streifenabfolge hat folgende Eigenschaften: Dichte, Winkel, Amplitude und Phase. All diese Informationen sind in einem Punkt des k-Raums hinterlegt. Den Vorgang der Bildentstehung macht die Fourier-Transformation möglich (147).

Der k-Raum ist ein zweidimensionaler Raum mit einer  $K_x$ - und einer  $K_y$ -Achse (Abbildung 11). Jeder Punkt im k-Raum kodiert Informationen für das gesamte Bild. Außerdem haben k-Raum und das finale Bild die gleiche Matrixgröße.



**Abbildung 11: k-Raum (143).**

Die Rohdaten der MRT-Messung werden im k-Raum repräsentiert. In der regulären MRT wird der k-Raum Zeile für Zeile gefüllt. Moderne Aufnahmetechniken füllen ihn subtotal in unterschiedlichen Mustern. In jedem Punkt des k-Raums wird Dichte, Winkel, Amplitude und Phase kodiert. Jeder Punkt hier liefert Informationen über das gesamte Bild. Anders herum wird jeder Punkt im finalen Bild aus allen k-Raum-Punkten zusammen gebildet.

Legende: a-f: Exemplarische Frequenzkodierungen aus repräsentativen Teilen des k-Raums.

#### 4.8.1.5. Diffusionsgewichtete MRT

Die diffusionsgewichtete MRT (**diffusion weighted imaging, DWI**) basiert auf der ungeordneten Wärmebewegung, der sogenannten Brown'schen Molekularbewegung von Wassermolekülen (148). Diese dreidimensionalen Bewegungen wurden auch als intravoxel incoherent motion (IVIM) bezeichnet. Bei Körpertemperatur ist die Bewegung sehr schnell. Sie wird jedoch durch Kollisionen mit anderen Wassermolekülen, oder den raumbegrenzenden Zellstrukturen verringert. Während einer Akquisition von ca. 100 ms werden etwa 20 µm zurückgelegt (149).

Die Diffusion kann auf verschiedene Arten gemessen werden. Neben Spin-Echo-Sequenzen kommen hierbei auch echoplanare (echo planar imaging, EPI) Sequenzen zum Tragen. Nach einem 90° RF-Puls wird ein Dephasierungsgradientenpuls dazu geschaltet. Dieser löst die Phasenkohärenz auf, indem er die Larmor-Frequenz ortsgebunden verändert (149-151). Nach dem 180° RF-Puls wird erneut ein entgegengesetzter ansonsten identischer Gradientenpuls angelegt. Fand eine Diffusionsbewegung statt, kann nun ein Signalverlust gemessen werden. Fand jedoch keine statt, gleicht der zweite Gradientenpuls den ersten komplett aus (152).

In der DWI wird der *apparent diffusion coefficient* (ADC) als quantitativer Parameter berechnet. Der ADC erlaubt somit Aussagen über die molekulare Diffusion (151, 153-156). Er berechnet sich für den Signalverlust zwischen der Signalintensität  $S_0$  vor Anlage der Gradienten, also bei  $b = 0 \text{ s/mm}^2$ , und der Signalintensität  $S_1$  zum Messzeitpunkt wie folgt:

$$ADC = \left(-\frac{1}{b}\right) \times \ln\left(\frac{S_1}{S_0}\right)$$

Der b-Wert mit dem Wert aus dem gyromagnetischen Verhältnis ( $\gamma$ ), der Amplitude der Diffusionsgradienten ( $G$ ), der Länge der Gradientenpulse ( $\delta$ ) und dem Zeitabstand zwischen den beiden Gradientenpulsen ( $\Delta$ ) wird wie folgt berechnet:

$$b = (\gamma \times G \times \delta)^2 \times \left(\Delta - \frac{\delta}{3}\right)$$

Der ADC ist abhängig von der kapillaren Perfusion und der Diffusion von Wasser in und zwischen den unterschiedlichen Räumen. Somit weist eine Veränderung des ADC auf mikrostrukturelle Veränderungen hin (155). Bei Zunahme der Zellgröße oder

–dichte, wie bei einem Ödem oder einer Zellinfiltration, nimmt der Extravaskulärraum ab. Der ADC kann also zur Erkennung von krankhaften Veränderungen in Organen herangezogen werden (121). Auch kann die DWI Veränderungen aufzeigen, bevor sie in der konventionellen MRT dargestellt werden können (157). Ähnlich dem k-Raum werden die Bilddaten der DWI im dreidimensionalen q-Raum kodiert (149). Die DWI ist zum heutigen Zeitpunkt ein häufiger Bestandteil der funktionellen MRT des Abdomens und insbesondere der Nieren (121, 122, 124-127, 131, 158-164).

#### 4.8.1.6. Dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT

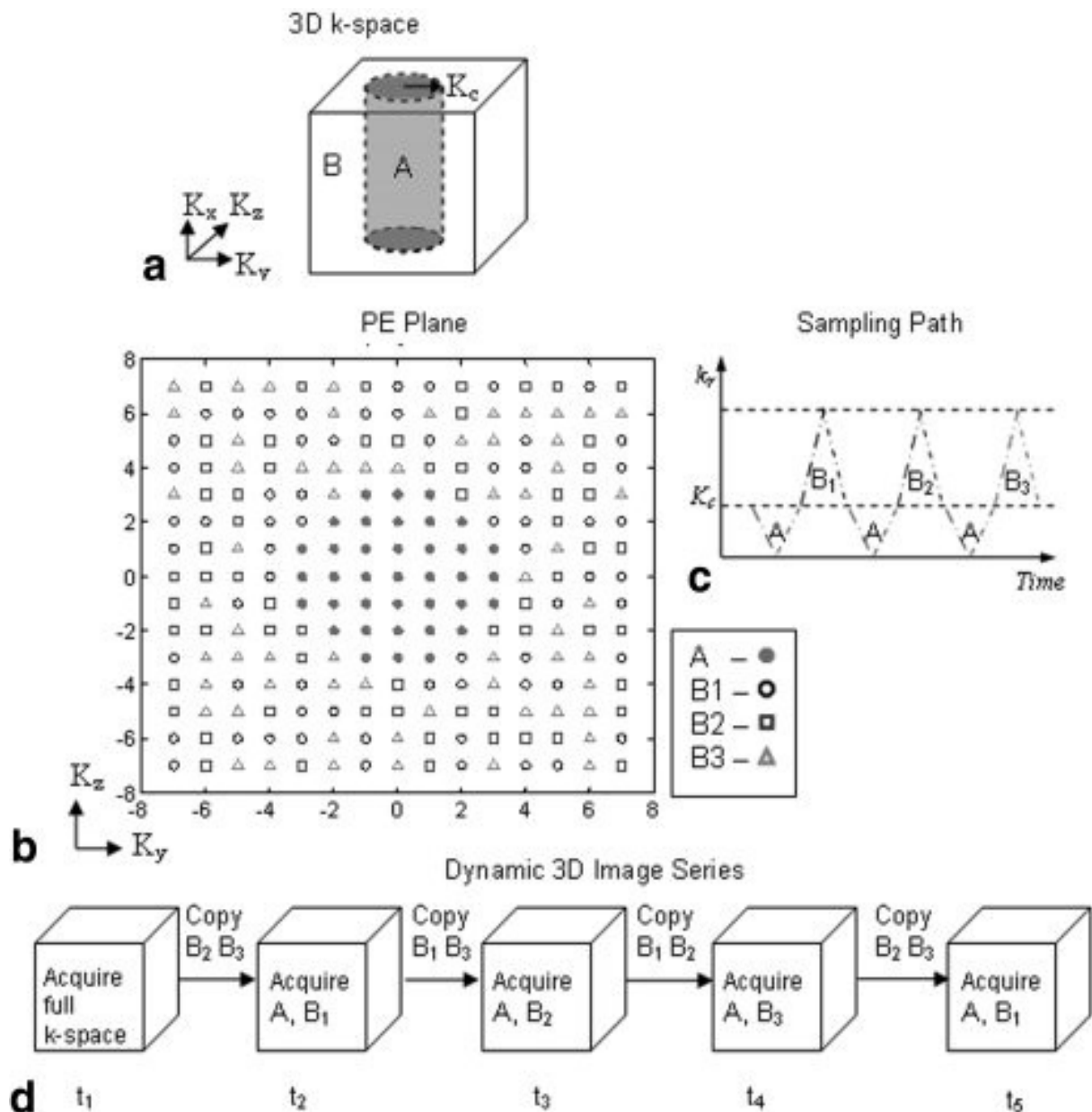
Die dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT (dynamic contrast enhanced, DCE-MRT) ist eine Technik, welche in unterschiedlichen Gebieten Einsatz findet (123, 124, 165-172).

Zur Akquisition eines DCE-MRT-Datensatzes wird zunächst Kontrastmittel benötigt, welches venös in den untersuchten Körper eingebracht wird. Aktuelle MR-Kontrastmittel basieren in der Regel auf dreifach positiv geladenen Gadolinium-Ionen. Mit sieben ungepaarten freien Elektronen ist Gadolinium hochgradig paramagnetisch und verkürzt so die T1- und T2-Zeit eines Gewebes. Dies erwirkt eine Kontrasterhöhung, welche proportional zur Menge an akkumuliertem Kontrastmittel ist. Kontrastmittel-verstärkte Sequenzen sind typischerweise T1-gewichtet. Da Gadolinium allerdings stark toxisch ist, wird es auf verschiedene Arten in Chelate gebunden und von der Interaktion mit dem Gewebe abgeschirmt. Das hier verwendete Gadobutrol gehört zu den extrazellulären, makrozyklisch gebundenen Kontrastmitteln. Dies bedeutet, dass es keine spezielle Affinität für unterschiedliche Gewebe hat, und, dass es ein geringes Risiko für die nephrogene systemische Fibrose (NSF) und intrakranielle Ablagerungen aufweist (173).

Im Gegensatz zu konventionellen kontrastverstärkten Aufnahmen wird bei der DCE-MRT über einen längeren Zeitraum wiederholt derselbe Bereich untersucht. Hierbei wird aber nicht jedes Mal der komplette k-Raum mit Daten gefüllt. Je nach Hersteller verwenden die DCE-MRT-Sequenzen unterschiedliche Strategien, den nun dreidimensionalen k-Raum unvollständig zu füllen. Grundlage hierfür ist die keyhole Technik (174). Die hier verwendete TWIST-(time-resolved angiography with stochastic trajectories) Sequenz (Siemens Healthcare Sector, Erlangen, Deutschland) funktioniert wie folgt:

Im dreidimensionalen k-Raum steht, wie in Abbildung 11a veranschaulicht, die  $K_y$ - $K_z$ -Ebene für das einzelne Bild und die  $K_x$ -Richtung für die fortschreitende Zeit. Abbildung 11b zeigt vereinfacht, dass die einzelne bildkodierende Ebene in den zentralen Bereich A und der periphere Raum nicht-kontinuierlich in weitere etwa gleichgroße Bereiche B1 bis B3 aufgeteilt wird. Die komplette  $K_y$ - $K_z$ -Ebene wird nur ein einziges Mal am Beginn oder Ende der kompletten Sequenz ausgelesen. Danach wird alternierend das Zentrum A und ein Teilbereich  $B_n$  ausgelesen (Abbildung 11). Die Hälfte der Messzeit wird also Zentrum A ausgelesen (165). Hierbei wird die

Tatsache ausgenutzt, dass das Zentrum eines zweidimensionalen k-Raums die großen Kontraständerungen und die Peripherie eher die Details eines Bildes kodiert (143).



**Abbildung 12 TWIST Technik (165).**

Die TWIST-Technik gewinnt Geschwindigkeit durch die subtotale Füllung des k-Raums mit Messdaten. Nach einer vollen Akquisition werden große Bestandteile des k-Raums 1:1 aus der vorausgegangenen Messung übernommen. Bei jedem Schritt wird jedoch das Zentrum ausgelesen, da hier die Kontraständerungen aufgenommen werden.

Legende: a: 3-D k-Raum. b: Alternierendes Auslesemuster der TWIST-Technik zu einem Zeitpunkt. c, d: Alternierendes Auslesemuster der TWIST-Technik im zeitlichen Verlauf.

Auf diese Weise lassen sich Aussagen über die Dynamik des Kontrastmittels treffen. Es wird hierbei dem Körper einmalig Kontrastmittel als intravaskulärer Bolus zugeführt. Wird nur die Zielregion untersucht, können nun semiquantitative Aussagen über das Kontrastmittelverhalten getroffen werden. Wird allerdings noch zusätzlich die Aorta mittels einer *arterial input function* (AIF) beobachtet, können durch den gemessenen Zeitpunkt der Ankunft des Bolus quantitative Aussagen getroffen werden.

Die quantitativen Aussagen lassen sich zu *plasma flow* (PF, in ml/100ml/min), *mean transit time* (MTT, in s) und *volume of distribution* (VoD, in ml/100ml) zusammenfassen. Der Parameter *plasma flow* gibt hierbei die Menge an Blutplasma an, welche pro 100ml Blut in einer Minute durch die Nieren fließt und ist somit vom Hämatokrit abhängig. Dies ist ein Marker für die allgemeine Durchblutung eines Gewebes. Der Parameter *mean transit time* hingegen ist ein gemittelter Wert, welcher eine Aussage über die Geschwindigkeit des Blutflusses trifft, in dem die Zeit angegeben wird, welche ein Kontrastmittelbolus braucht um von der Arterie über das Kapillarnetzwerk in die Vene überzutreten. Eine hohe *mean transit time* ist also ein Zeichen für einen geminderten Blutfluss innerhalb eines Gewebes. Der Parameter *volume of distribution* zeigt an, wieviel kapillares Blut sich in einem definierten Anteil von Gewebe befindet.

Die DCE-MRT unterliegt einigen Einschränkungen. Im Gegensatz zur Untersuchung des Menschen ist der Kontrastmittelbolus in der Maus deutlich schneller. Mit einem dedizierten Tier-MRT hätte eine höhere zeitliche Auflösung ermöglicht werden können. Somit konnten in dieser Studie keine komplexen multi-compartment Modelle eingesetzt werden, da weitere Aussagen nicht möglich waren. Diese Modelle erlauben eine nicht-invasive Messung der GFR einzelner Nieren (173, 200). Eine Bewegungskorrektur der Datensätze erschien im Mausmodell als nicht nötig (201).



#### 4.8.2. MRT-Messprotokoll

Das Messprotokoll der vorliegenden Forschung beinhaltete neben der schnellen Übersichtsaufnahme zur Planung, zwei morphologische Darstellungen, an denen dann die funktionellen Sequenzen orientiert wurden (s.u.). Anschließend wurde mittels der DWI Sequenz, die ersten funktionellen Daten erhoben. Abschließend erfolgte die DCE-MRT mit einer Bolusgabe von Gadobutrol (Gadovist®, Bayer Healthcare Pharmaceuticals, Berlin, Germany). Die gesamte Untersuchungszeit betrug ungefähr 30 Minuten.

Alle Versuche wurden an einem klinischen 3 T-Scanner (Magnetom VERIO, Siemens Healthcare Sector, Erlangen, Deutschland) mit einer dedizierten 8 Kanal Ganzkörper-Mausspule (Rapid Biomedical, Rimpfing, Deutschland) durchgeführt, die von 3T bis 9,4T zugelassen ist. Zur Signalverstärkung wurden beidseits neben der Spule Wasserphantome platziert.

##### 4.8.2.1. Morphologische Bildgebung

Es wurde eine koronare und eine axiale T2-gewichtete Turbo Spin Echo- (TSE) Sequenz angefertigt.

Name	T2 Turbo-Spin-Echo
Orientierung	Koronar
Auflösung	0,3 x 0,3 x 1 mm <sup>3</sup>
Anzahl der Schichten	29
Art	TSE
Repetition Time	6740 ms
Echo Time	89 ms

Tabelle 8: T2 TSE-Sequenz koronar.

Name	T2 Turbo-Spin-Echo
Orientierung	Axial
Auflösung	0,3 x 0,3 x 3 mm <sup>3</sup>
Anzahl der Schichten	8
Art	TSE
Repetition Time	6740 ms
Echo Time	89 ms

Tabelle 9: T2 TSE-Sequenz axial.

#### 4.8.2.2. Diffusionsgewichtete MRT

Es wurden dafür axiale Sequenzen mit b-Werten von 0 s/mm<sup>2</sup> bis 800 s/mm<sup>2</sup> in folgenden Abstufungen akquiriert: 0 s/mm<sup>2</sup>, 10 s/mm<sup>2</sup>, 30 s/mm<sup>2</sup>, 50 s/mm<sup>2</sup>, 80 s/mm<sup>2</sup>, 120 s/mm<sup>2</sup>, 250 s/mm<sup>2</sup>, 400 s/mm<sup>2</sup>, 600 s/mm<sup>2</sup>, 800 s/mm<sup>2</sup>.

Name	IVIM_10b_values tra_0,6x0,6x3
Orientierung	Axial
Auflösung	0,6 x 0,6 x 3 mm <sup>3</sup>
Anzahl der Schichten	11
Art	EPI
b-Werte	0 s/mm <sup>2</sup> bis 800 s/mm <sup>2</sup>
Repetition Time	2600 ms
Echo Time	90 ms

Tabelle 10: IVIM-Sequenz axial.

#### 4.8.2.3. Dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT

Mit einer um 15 Sekunden verzögerten Bolus-Gabe von 0.05 ml/kg Gadobutrol in 100µl NaCl-Lösung über eine Schwanzvene wurde die DCE-MRT begonnen.

Name	KM_TWIST_tra_dyn_Niere
Orientierung	Axial
Auflösung	0,4 x 0,4 x 2 mm <sup>3</sup>
Anzahl der Schichten	17
Zeitauflösung	1,5 s /Volumen
Gesamtdauer	6:00 min
Anzahl der Wiederholungen	240
Repetition Time	6,57 ms
Echo Time	2,37 ms

Tabelle 11: TWIST-Sequenz axial.

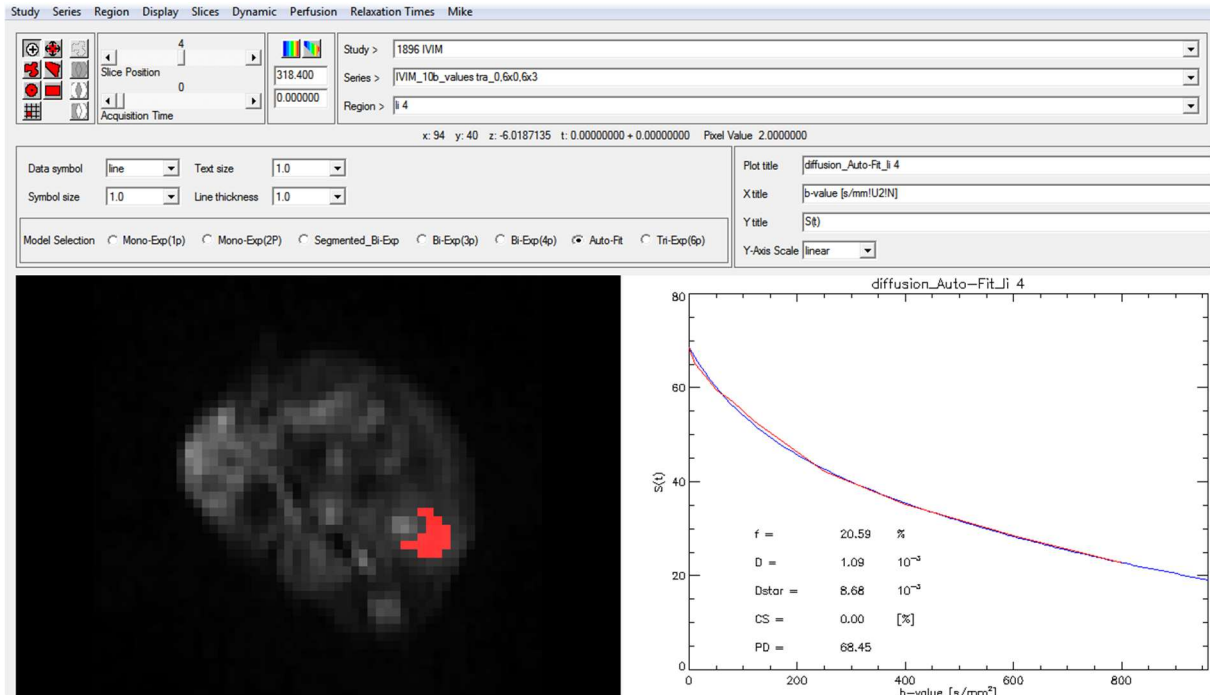
### **4.8.3. Bilddatenauswertung**

Die Nachverarbeitung der MR-Daten wurde in PMI 0.4 (Platform for Research in Medical Imaging) durchgeführt. PMI 0.4 ist eine modulare Software, für die die einzelnen Berechnungsvorgänge programmiert und implementiert wurden. Es basiert auf der Programmiersprache IDL (ITT VIS, Boulder, Colorado, USA).

Nach dem korrekten Einlesen der Daten wurden zuerst die gesamten Nieren ohne Nierenbecken, also Rinde und Mark einzeln manuell markiert. Zur besseren Lokalisation wurden die anatomischen T2-TSE-Bilder benutzt. Direkte Grenzgebiete wurden ausgeschlossen, um Partialvolumeneffekte zu verhindern. Die untersuchten Bereiche werden auch *regions of interest* (ROI) genannt. Alle ROIs wurden von einem Facharzt für Radiologie gesetzt.

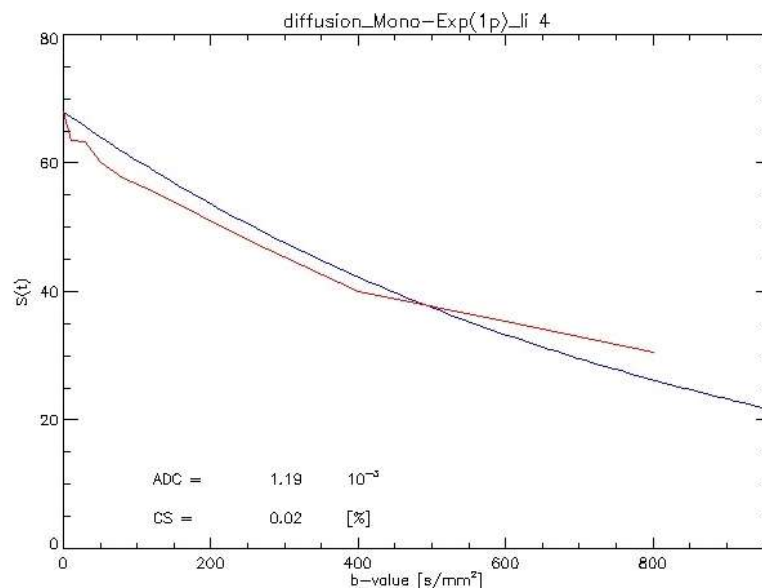
### 3.8.3.1. Diffusionsgewichtete MRT

Die Diffusionsdaten wurden nach b-Werten sortiert in PMI 0.4 geladen. Zum Vergleich wurden nur ROIs über die ganzen Nieren ohne Nierenbecken verwendet (Abbildung 13). Der ADC berechnet sich wie bereits beschrieben durch eine monoexponentielle Modellierung des Signalabfalls über alle b-Werte (Abbildung 14).



**Abbildung 13: PMI 0.4 Diffusion.**

Legende: Links: Diffusionsgewichtetes MRT-Bild mit rot markierter ROI (linke Niere). Rechts: Verlauf der Signalintensität (y-Achse) der ROI über die gemessenen B-Werte (x-Achse) mit auto-fit-Anpassung.

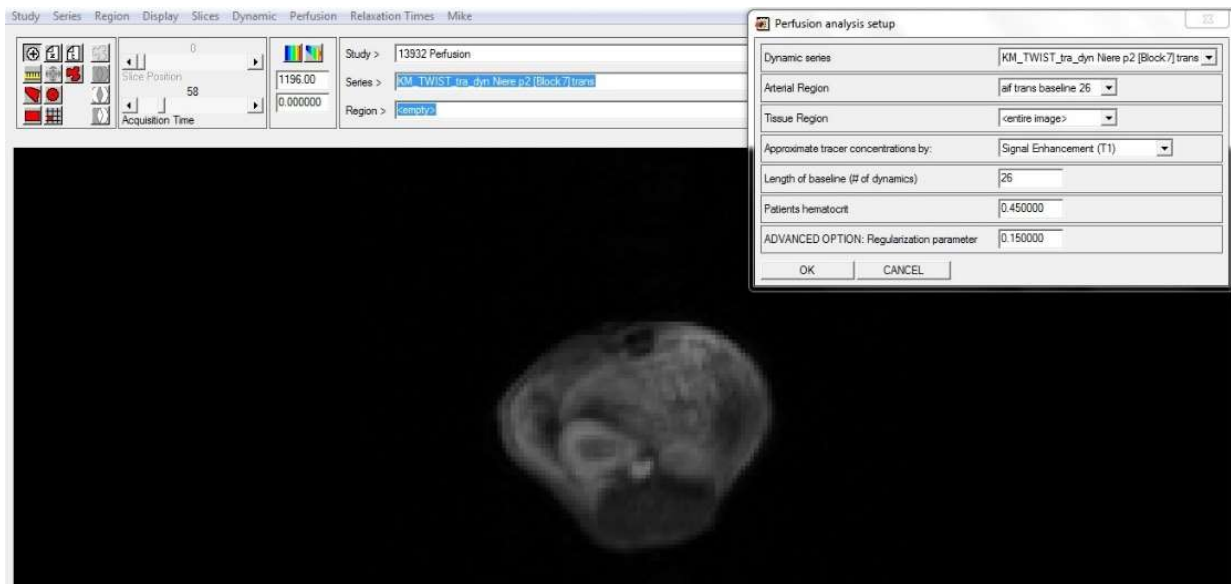


**Abbildung 14: Diffusion monoexponentiell.**

Legende: Verlauf der Signalintensität (y-Achse) der ROI über die gemessenen B-Werte (x-Achse) mit monoexponentieller Anpassung zur Berechnung des ADC-Werts.

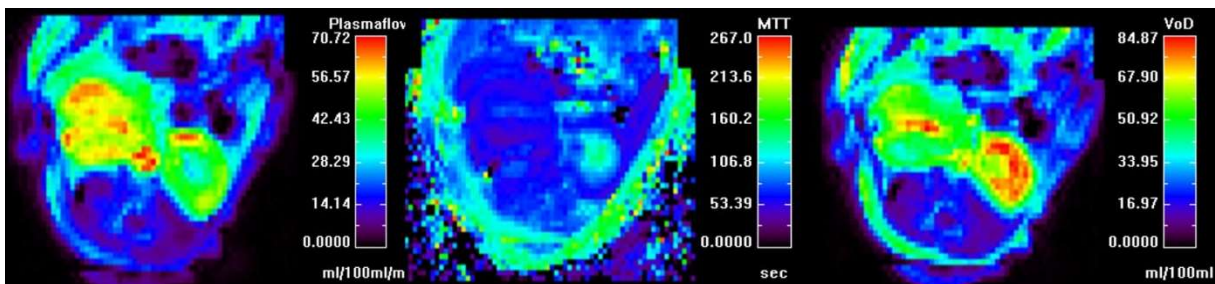
### 3.8.3.2. Dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT

Zur Berechnung der Perfusionsparameter wurden die Bilddaten in PMI 0.4 geladen. Die ROIs zu Analyse wurden in die Nierenrinde gesetzt. Eine weitere ROI wurde in die Aorta abdominalis gesetzt um dort als *arterial input function* das Anfluten von Kontrastmittel zu detektieren. Die Zeit bis zum ersten Einstrom von Kontrastmittel wird *baseline* genannt. Diese wurde individuell für die Berechnungen angepasst Die dynamischen Daten wurden mit einer modellfreien Entfaltung analysiert, welche im Gegensatz zu komplexen multikompartimentellen Modellen sehr robust ist. Die entstandenen Parameterkarten wurden in PMI 0.4 zur besseren Veranschaulichung farbkodiert dargestellt (Abbildung 15 und 16).



**Abbildung 15: PMI 0.4 Perfusion.**

Legende: Groß: DCE-Bild zu einem Zeitpunkt mit Transplantatniere (links im Bild) und Eigenniere (rechts im Bild) im Vergleich. Rechts oben: Auswahl der Parameter zur Perfusionsanalyse.



**Abbildung 16: Perfusionsanalyse.**

Transplantatniere (jeweils links im Bild) und Eigenniere (jeweils rechts im Bild) im Vergleich. Das Transplantat zeigt in diesem Fall eine gute Durchblutung.

Legende: Links: Plasmafluss in ml/100ml/min. Mitte: Mean transit time in sec. Rechts: Volume of distribution in ml/100ml.

#### **4.9. Histologie**

Direkt nach der MRT wurden die Nieren entnommen. Hierbei wurde bei noch sederter Maus der Tod durch Genickbruch und simultanes Ausbluten herbeigeführt. Die Nieren wurden per abdominellem Zugang im Zuge des Ausblutens entfernt.

Die Proben wurden der Länge nach geteilt und 12 bis max. 24 Stunden in 4% neutral gepufferter Formaldehyd-Lösung bei Raumtemperatur fixiert. Am zweiten Tag wurde das Gewebe eine Stunde unter fließendem Wasser gewaschen. Danach wurden die Proben in aufsteigend konzentrierten Ethanol-Lösungen (70%/96%/100%), dann Xylol dehydriert und schließlich Paraffin ausgesetzt. Dies geschah im Gewebeprozessor Histomaster (MDS Gruppe Bavimed - Medim MDS GmbH Busek, Deutschland). Am dritten Tag wurden die Gewebekassetten im Tissue Tek-Automat (Sakura Finetek Europe B.V) paraffiniert und schließlich mit der Schnittfläche nach unten auf Metallkassetten transferiert. Die auf -20°C gekühlten Metallkassetten konnten dann im Schlittenmikrotom HM 400 (Microm Laborgeräte GmbH, Walldorf, Deutschland) bearbeitet werden. Hierbei wurden die finalen Schnitte auf SuperFrostPlus Haftobjektträger aufgebracht. Abschließend wurden sie im Wärmeschrank bei 60°C für 5 Minuten getrocknet.

Für die Hämalaun-Eosin (HE)-Färbung wurden die Gewebeschnitte wieder deparaffiniert und rehydriert. Danach folgten die progressive Färbung mit Hämalaun und die regressive Färbung mit Eosin. Nach erneuter Dehydrierung wurden die Objektträger mit einem Deckgläschen verschlossen.

Für die Periodic acid-Schiff (PAS-)-Färbung wurde das PAS-Färbekit HP01.1 genutzt. Die Gewebeschnitte wurden hierfür ebenfalls deparaffiniert und rehydriert. Nach einer Hydrolyse mit 1 %-iger Perjodsäure wurden die Proben gewaschen, um danach dem Schiff-Reagenz bei Raumtemperatur für 20 Minuten ausgesetzt zu werden. Anschließend folgte eine progressive Färbung mit Hämalaun. Nach erneuter Dehydrierung wurden die Objektträger mit einem Deckgläschen verschlossen.

Die Materialien sind in Tabelle 12 aufgelistet.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Formaldehyd-Lösung	SAV LP GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Xylol-Lösung	VWR, Radnor, Pennsylvania, USA
Paraffin	Sakura Finetek Europe B.V., Alphen aan den Rijn, Niederlande
Gewebe- und Metallkassetten	Vogel GmbH & Co. KG, Fernwald, Deutschland
Haftobjektträger und Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland
Hämalaun und Eosin	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
PAS-Färbekit HP 0.01	Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

**Tabelle 12: Materialienliste Histologie.**

Die histologische Untersuchung wurde von einem der Diagnose gegenüber geblindeten Nephrologen durchgeführt. Es wurden für interstitielle Entzündung, intimale Arteriitis, Tubulitis und Glomerulitis in einem 4-Punkte-Ranking (0-3) Werte vergeben und der Banff-Score für akute Abstoßung ermittelt.

#### **4.10. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine weit etablierte Technik. Hierbei werden zwei Techniken miteinander verknüpft. Per reverser Transkriptase wird aus der zu untersuchenden RNA eine Komplementär-DNA (cDNA) erzeugt. Die neu erzeugte cDNA wird nun per PCR vervielfältigt. Die PCR durchläuft dabei drei Stufen pro Zyklus. Zuerst wird durch eine Temperaturerhöhung auf ca. 96°C der DNA-Strang denaturiert. Nach Abkühlung auf ca. 68°C werden die Primer angelagert. Primer sind zu einem Ende des DNA-Strangs komplementäre DNA-Stücke. Dies nennt sich Primärhybridisierung. Die genaue Temperatur richtet sich nach der Länge der Primer. Schlussendlich folgt die Elongation durch thermostabile DNA-Polymerasen (175, 176).

Die RNA wurde mittels Trizol (Invitrogen) herausgelöst. Um m(essenger)RNA-Expression zu messen, wurde 1µg RNA entnommen und in einem LightCycler (Roche, Basel, Schweiz) analysiert.

Interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) hat im Körper unter anderem die Aufgabe eines Makrophagenaktivators. Des Weiteren fördert es die Expression von Class I und Class II *major histocompatibility complexes* (MHC), welche eine große Rolle im Transplantationssetting haben. Es wird von natürlichen Killerzellen und T-Zellen ausgeschüttet (177, 178).

Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ) wird hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet. Neben vielen weiteren Wirkungen ist es migrationsfördernd für neutrophile Granulozyten und ist somit ein Marker für Entzündungen (179-181).

Der B-Zellen aktivierende Faktor (BAFF) ist TNF-Ligand und wird unter anderem von aktivierten T-Zellen ausgeschüttet. BAFF fördert die B-Zellen-Reifung und greift in viele Regulationssysteme ein, die auch bei Abstoßungen relevant sind (182, 183).

$\beta$ -Actin hatte hierbei die Rolle des unreguliert exprimierten Haushaltsgens und diente als Kontrolle.

Folgende Primer wurden verwendet (Tabelle 13):

Primer	Vorwärts	Rückwärts
IFN- $\gamma$	5'-TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA-3'	5'- TGGCTCTGCAGGATTTTCATG-3'
TNF- $\alpha$	5'-CCATTCCTGAGTTCTGCAAG-3'	5'-GCAAATATAAATAGAGGGGGGC-3'
BAFF	5'-TCCAGCAGTTTCACAGCGAT-3'	5'-TTGACTCCAGCGGTCAACTC-3'
$\beta$ -Actin	5'-CCCTAAGGCCAACCGTGAAA-3'	5'-ACGACCAAGGCATACAGGGA-3'

Tabelle 13: RT-PCR Primer.

#### 4.11. Immunhistochemie

In der Immunhistochemie werden Antigene auf Gewebeschnitten gefärbt, um sie dann optisch darzustellen. Dies ist möglich, da Antikörper spezifisch an eine antigene Determinante binden. Bei einer solchen Affinität wird er Primärantikörper genannt. Im darauffolgenden Schritt wird an den Primärantikörper ein Sekundärantikörper gebunden. Dieser ist mit einem Enzym verknüpft, wobei meistens ein biotinylierter Antikörper verwendet wird. An diesem wiederum bindet der Avidin-biotinylierte Peroxidase-Komplex, welchem Wasserstoffperoxid als Substrat angeboten wird. Die entstehenden Protonen oxidieren farblose Chromogene, die dadurch farbig werden.

Die Immunhistochemie wurde an 3  $\mu$ m dicken Querschnitten durchgeführt. Diese wurden wie bereits zuvor entparaffiniert. Zur Wiedergewinnung der Antigene wurde



die Proteinase K für 20 Minuten bei 37 °C verwendet. Nun wurde mit 30 %igem Wasserstoffperoxid geblockt und wiederholt gewaschen. Nachdem mit 2.5%igem Ziegenserum geblockt wurde und wiederum gewaschen wurde, konnte der Primärantikörper anti–mouse F4/80 im Verhältnis 1:100 zur Inkubation über Nacht bei 4°C hinzugefügt werden. Zur Detektion wurde das ImmPRESS HRP Kit bei Raumtemperatur benutzt. Die Proben wurden mit 3.3'-Diaminobenzidin entwickelt. Zur Färbung wurde Methylgrün bei 37°C verwendet. Abschließend wurde wieder dehydriert und mit Deckgläschen verschlossen.

Die Materialien sind in Tabelle 14 aufgelistet.

<b>Material</b>	<b>Hersteller</b>
Proteinase K, 3.3'-Diaminobenzidin und Methylgrün	Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri
Ziegenserum und ImmPRESS HRP Kit	Vector laboratories, Burlingame, California
Anti-mouse F4/80-AK	eBioscience, San Diego, California
Haftobjektträger und Deckgläser	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH & Co KG, Sondheim v. d. Rhön, Deutschland

Tabelle 14: Material Immunhistochemie.

Zur Analyse wurden fünf zufällig ausgewählte Gesichtsfelder pro Schnitt unter 20-facher Vergrößerung verwendet. Diese wurden danach mit Image J (National Institutes of Health, Bethesda, Maryland), einer auf Java basierenden Software zur Bildnachbearbeitung und -analyse untersucht, um die infiltrierten Bereiche zu quantifizieren.

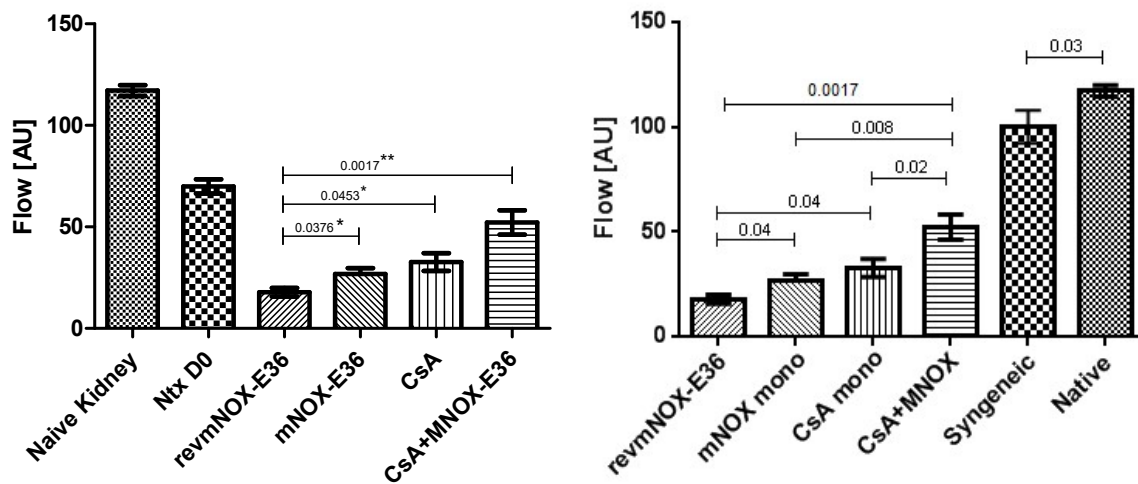
#### **4.12. Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung wurde mit Microsoft Excel 2013 (Microsoft, Redmond, Washington, USA), SPSS 15 (IBM, Armonk, New York, USA) und Prism 6.00 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA) durchgeführt. Die Gruppen wurden nach Testung auf Normalverteilung mit dem Kolgorow-Smirnow-Test mit ungepaarten, zweiseitigen t-Tests analysiert. Korrelationen der metrischen MR-Parameter und der ordinalen Histopathologie wurden mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  durch Spearmans Rangkorrelationskoeffizient berechnet. Bei multipler Testung wurde die Bonferroni-Methode angewandt.

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Laser Doppler Flussmessung

Direkt postoperativ am Tag der Transplantation (D0) wiesen die Transplantatnieren eine signifikant schlechtere Perfusion als die Eigennieren auf ( $69,96 \pm 10,47$  vs.  $113,56 \pm 12,87$  AU;  $p < 0,0001$ ). Im postoperativen Verlauf verschlechterten sich alle Therapiegruppen nach der Transplantation auf die jeweiligen folgenden Werte vom zehnten Tag direkt vor der MRT. Die niedrigsten Perfusionswerte zeigte die Therapiekontroll-Gruppe ( $17,80 \pm 4,30$ ) und war allen anderen Therapiegruppen signifikant unterlegen (Abbildung 17 links). Beide Monotherapien hatten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich ( $p < 0,4$ ). Die Kombinationstherapie ( $52,21 \pm 12,00$ ) hatte darüber hinaus einen signifikanten Unterschied gegenüber der Monotherapie mit mNOX-E36 ( $26,84 \pm 5,75$ ;  $p = 0,008$ ) und der Monotherapie mit CsA ( $36,36 \pm 11,25$ ;  $p = 0,02$ ) (Abbildung 17).



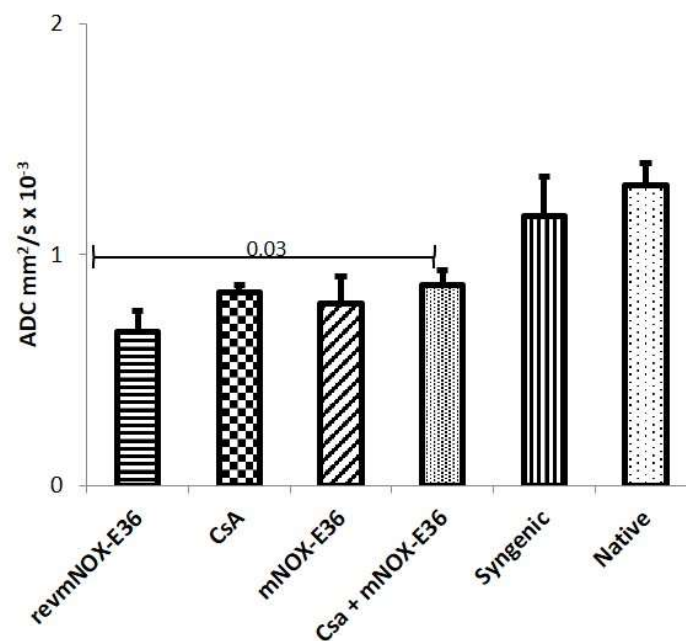
**Abbildung 17: Laser Doppler Flussmessung Ergebnisse.**

Die Therapiekontrollen mit revmNOX-E36 zeigten die schlechtesten Durchblutungswerte (rechts). Es gab kein Unterschied zwischen den Monotherapien. Unter der Kombinationstherapie besserten sich die Durchblutungswerte. Im Vergleich mit den direkt postoperativen Werten zeigte sich jedoch eine Durchblutungsabnahme aller allogenen Nierentransplantate unabhängig von der Therapiezuordnung (links).

## 5.2. Magnetresonanztomographie

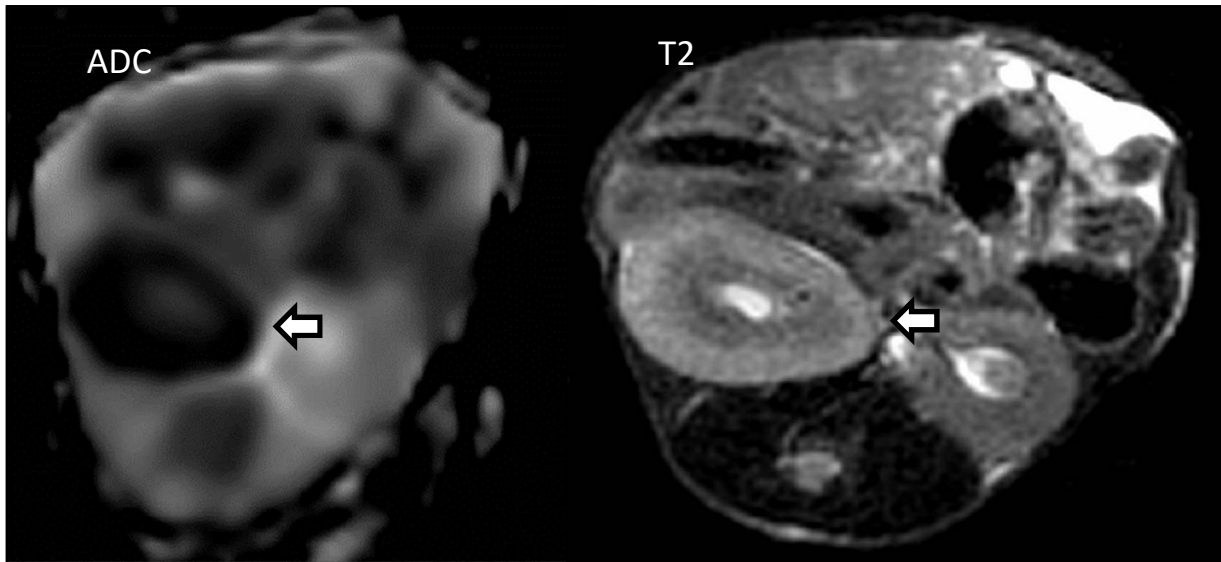
### 5.2.1. Diffusionsgewichtete MRT

Die signifikant geringste Diffusionseinschränkung hatten die Eigennieren im Vergleich zu allen Therapiegruppen ( $1,29 \pm 0,12 \text{ mm}^2/\text{s}$ ;  $p < 0,05$ ). Die größte Diffusionseinschränkung zeigte die Therapiekontrollgruppe mit revmNOX-E36 ( $0,63 \pm 0,08 \text{ mm}^2/\text{s}$ ) und war sowohl der Monotherapie mit CsA ( $0,78 \pm 0,09 \text{ mm}^2/\text{s}$ ;  $p = 0,05$ ), als auch signifikant der Kombinationstherapie ( $0,90 \pm 0,06 \text{ mm}^2/\text{s}$ ;  $p = 0,002$ ) und den syngeneten Kontrollen ( $1,17 \pm 0,16 \text{ mm}^2/\text{s}$ ;  $p < 0,001$ ) unterlegen (Abbildung 19). Beide Monotherapien hatten keinen signifikanten Unterschied im Vergleich. Für die Kombinationstherapie wurde ein signifikant geringerer ADC als bei den syngeneten Kontrollen ( $p < 0,001$ ) gemessen.



**Abbildung 18: Diffusionsgewichtete Bildgebung Ergebnisse.**

Die akute Abstoßung unter der Therapiekontrolle mit revmNOX-E36 zeigte einen niedrigen ADC-Wert, also eine deutliche Diffusionseinschränkung. Unter Kombinationstherapie besserte sich die Diffusionseinschränkung signifikant, blieb aber den syngeneten OP-Kontrollen unterlegen.

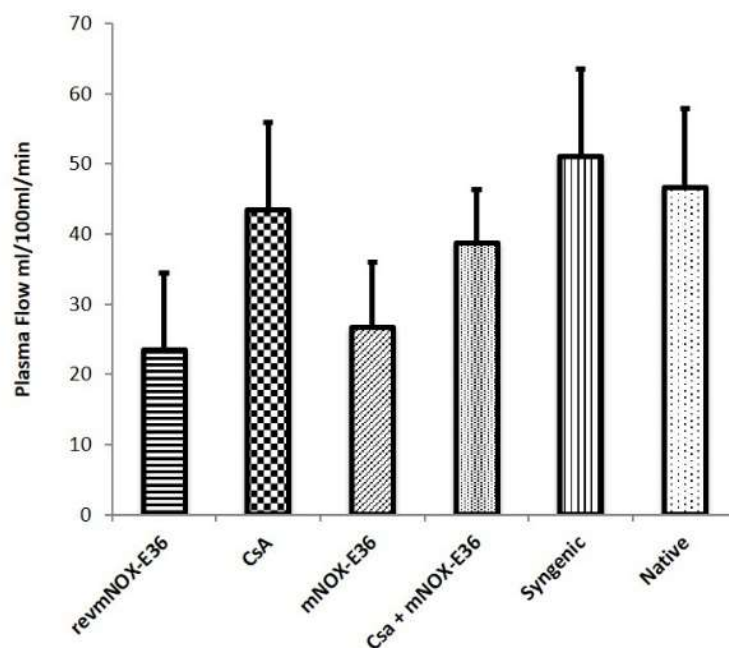


**Abbildung 19: ADC-Map (links) und T2-Bild (rechts) einer Therapiekontrolle.**

Unter revmNOX-E36 zeigt das Nierentransplantat (Pfeil) eine akute Abstoßung. In der ADC-Karte lässt sich hypointens/dunkel die Diffusionseinschränkung abgrenzen. In der T2-Wichtung erscheint hyperintens/hell das Ödem im Nierenparenchym. Im Vergleich dazu befindet sich angrenzend eine der Eigennieren ohne Pathologie.

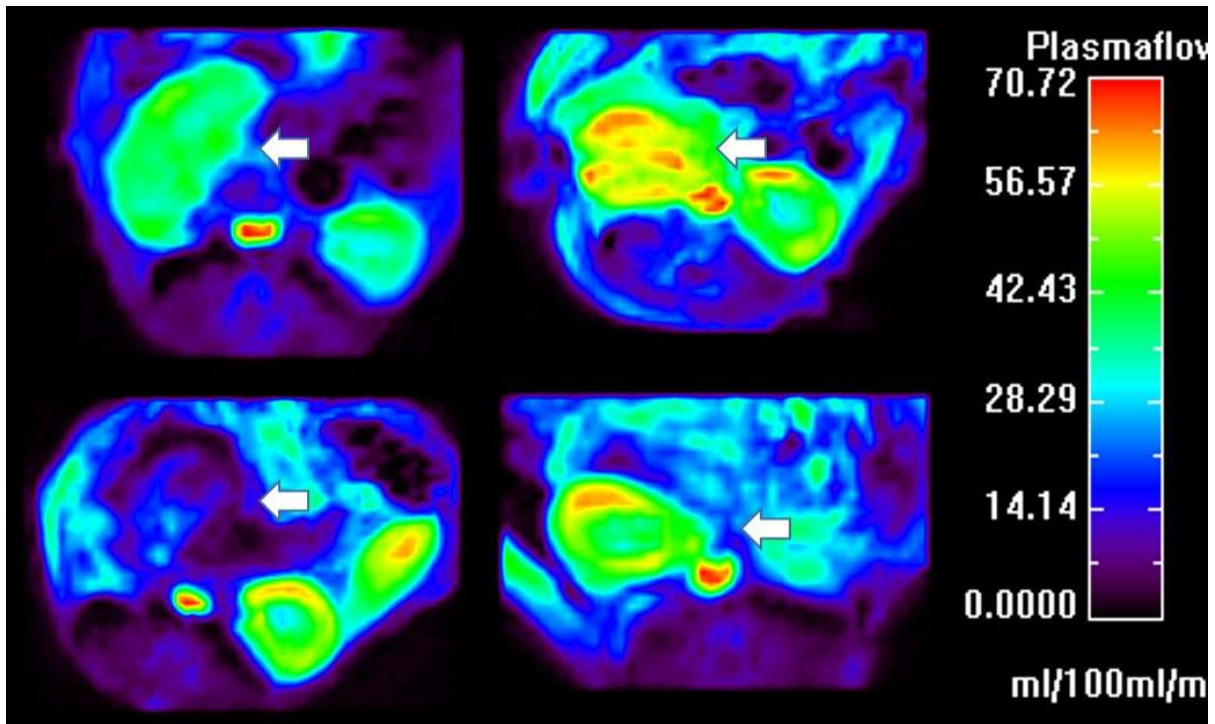
### 5.2.2. Dynamische Kontrastmittel-verstärkte MRT

Die relativ hohen Standardabweichungen weisen auf deutliche Schwankungen der Perfusionsmessungen (Plasmafluss) hin. Syngene Kontrollen ( $51,03 \pm 12,49$  ml/100ml/min) und Eigennieren ( $46,65 \pm 11,20$  ml/100ml/min) wiesen keinen signifikanten Unterschied auf. Die Therapiekontrollen mit revmNOX-E36 ( $23,48 \pm 10,95$  ml/100ml/min) hatten signifikant niedrigere Perfusionswerte als die syngene Kontrollgruppe ( $51,03 \pm 12,49$  ml/100ml/min;  $p < 0,01$ ) und die CsA-Monotherapie ( $43,43 \pm 12,49$  ml/100ml/min;  $p = 0,02$ ) sowie schlechtere Ergebnisse für die Kombinationstherapie ( $38,75 \pm 7,53$  ml/100ml/min;  $p = 0,03$ ). Die mNOX-E36-Monotherapie ( $26,60 \pm 9,36$  ml/100ml/min) ließ keinen signifikant positiven Effekt im Vergleich zu den Therapiegruppen erkennen.



**Abbildung 20: Plasmafluss -Ergebnisse.**

Die akute Abstoßung unter der Therapiekontrolle mit revmNOX-E36 offenbarte eine reduzierte Organperfusion. Unter CsA alleine und in Kombination mit mNOX-E36 zeigte sich eine verbesserte Perfusion, welche vergleichbar mit syngenen OP-Kontrollen und Eigennieren ist.



**Abbildung 21: Plasmafluss von Nierentransplantaten.**

Der Pfeil verweist jeweils auf das Nierentransplantat. Unter Cyclosporin A-Therapie blieb die Perfusion erhalten. Die Kombinationstherapie zeigte einen Plasmafluss vergleichbar mit dem der syngenem OP-Kontrollen ohne Abstoßung. Die Therapiekontrolle in akuter Abstoßung hatte ein Defizit des Plasmaflusses.

Legende: Links oben: CsA-Monotherapie. Rechts oben: Kombinationstherapie. Links unten: Therapiekontrolle mit revmNOX-E36. Rechts unten: Syngene OP-Kontrolle.

Die Auswertung der *mean transit time* und des *volume of distribution* wies teils sehr hohe Standardabweichungen auf. Signifikante Unterschiede für die *volume of distribution* konnten zwischen der mNOX-E36-Monotherapie und die Kombinationstherapie ( $p=0,02$ ), die CsA-Monotherapie ( $p<0,01$ ) und die syngenem Kontrollen ( $p=0,03$ ) gezeigt werden. Bezüglich des Parameters *mean transit time* konnten signifikante Unterschiede zwischen den Therapiekontrollen mit revmNOX-E36 und allen anderen Gruppen aufgedeckt werden (alle  $p>0,05$ ). Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle 15 dargestellt.

Gruppe	mean transit time	volume of distribution
Syngen	38,15 ± 9,83	64,47 ± 36,98
revmNOX-E36	82,00 ± 38,11	35,52 ± 19,26
mNOX-E36	53,91 ± 14,57	19,63 ± 6,50
CsA	48,10 ± 12,74	41,60 ± 6,99
CsA + mNOX-E36	55,00 ± 10,12	38,37 ± 11,57

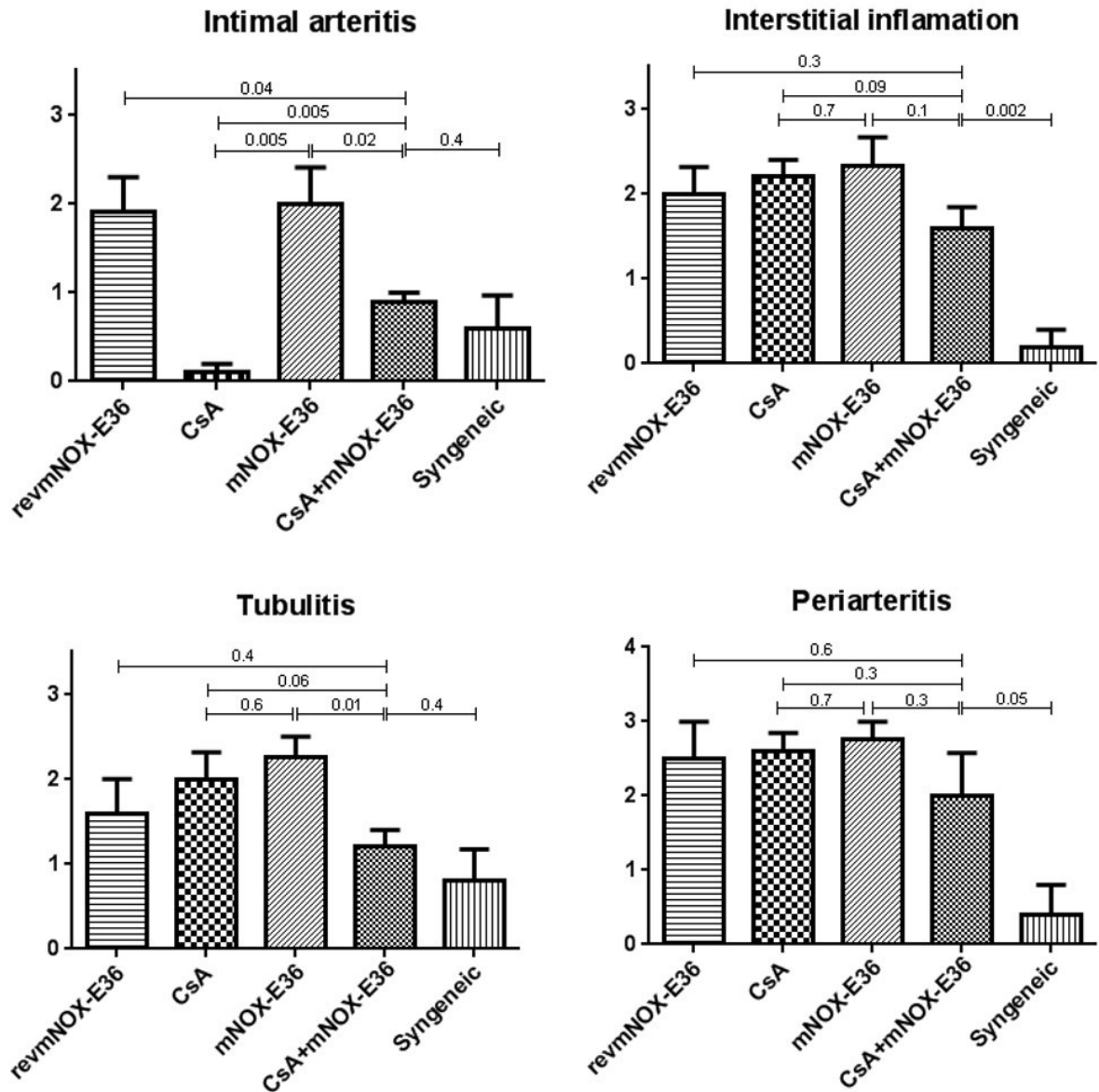
Tabelle 15: Ergebnisse von mean transit time (in s) und volume of distribution (in ml/100ml).

### 5.3. Histologie

Die Histologie konnte die kompletten Vorgänge einer Transplantatabstoßung nicht vollständig darstellen (Abbildung 22). Alle Gruppen wiesen Zeichen der Abstoßung gemäß der Banff-Kriterien nach (Tabelle 16). Die Kontrollgruppen hatten mit >80 % die ausgeprägtesten Infarkt- und Nekrose-Areale. Unter mNOX-E36-Monotherapie waren es nur 5-10%. Infarkt-Areale konnten bei CsA-Monotherapie oder Kombinationstherapie nicht nachgewiesen werden. Bei der genaueren Aufschlüsselung der Veränderungen in intimale Arteriitis, interstitielle Entzündung, Tubulitis und Periarteriitis zeigten sich weniger deutliche Unterschiede. Syngene Kontrollen hatten kaum Entzündungszeichen. Im Vergleich zu ihnen hatten die Therapiegruppen deutlich erhöhte Abstoßungsparameter. Ein Vorteil der Kombinationstherapie gegenüber den Monotherapien wurde deutlich. Dieser Vorteil ist jedoch für die Tubulitis nur im Bezug zur mNOX-E36-Monotherapie signifikant ( $p < 0,04$ ). Für die intimale Arteriitis wurde kein Effekt durch mNOX-E36-Monotherapie nachgewiesen. Die Kombinationstherapie war der mNOX-E36-Monotherapie überlegen ( $p < 0,02$ ). Jedoch war die CsA-Monotherapie der Kombinationstherapie deutlich überlegen ( $p < 0,005$ ). Da die CsA-Monotherapie auch den syngenen Kontrollen überlegen war, ist hier ein technischer Messfehler anzunehmen.

Gruppe	Intimale Arteriitis	Interstitielle Entzündung	Tubulitis	Periarteriitis
Syngen	0,6 ± 0,7	0,2 ± 0,4	0,8 ± 0,7	0,4 ± 0,8
revmNOX-E36	1,9 ± 0,8	2,0 ± 0,6	1,6 ± 0,8	2,5 ± 0,5
mNOX-E36	2,0 ± 0,7	2,3 ± 0,5	2,3 ± 0,0	2,8 ± 0,4
CsA	0,1 ± 0,2	2,2 ± 0,4	2,0 ± 0,6	2,6 ± 0,5
CsA + mNOX-E36	0,9 ± 0,2	1,6 ± 0,5	1,2 ± 0,4	2,0 ± 1,0

Tabelle 16: Histologie Ergebnisse.



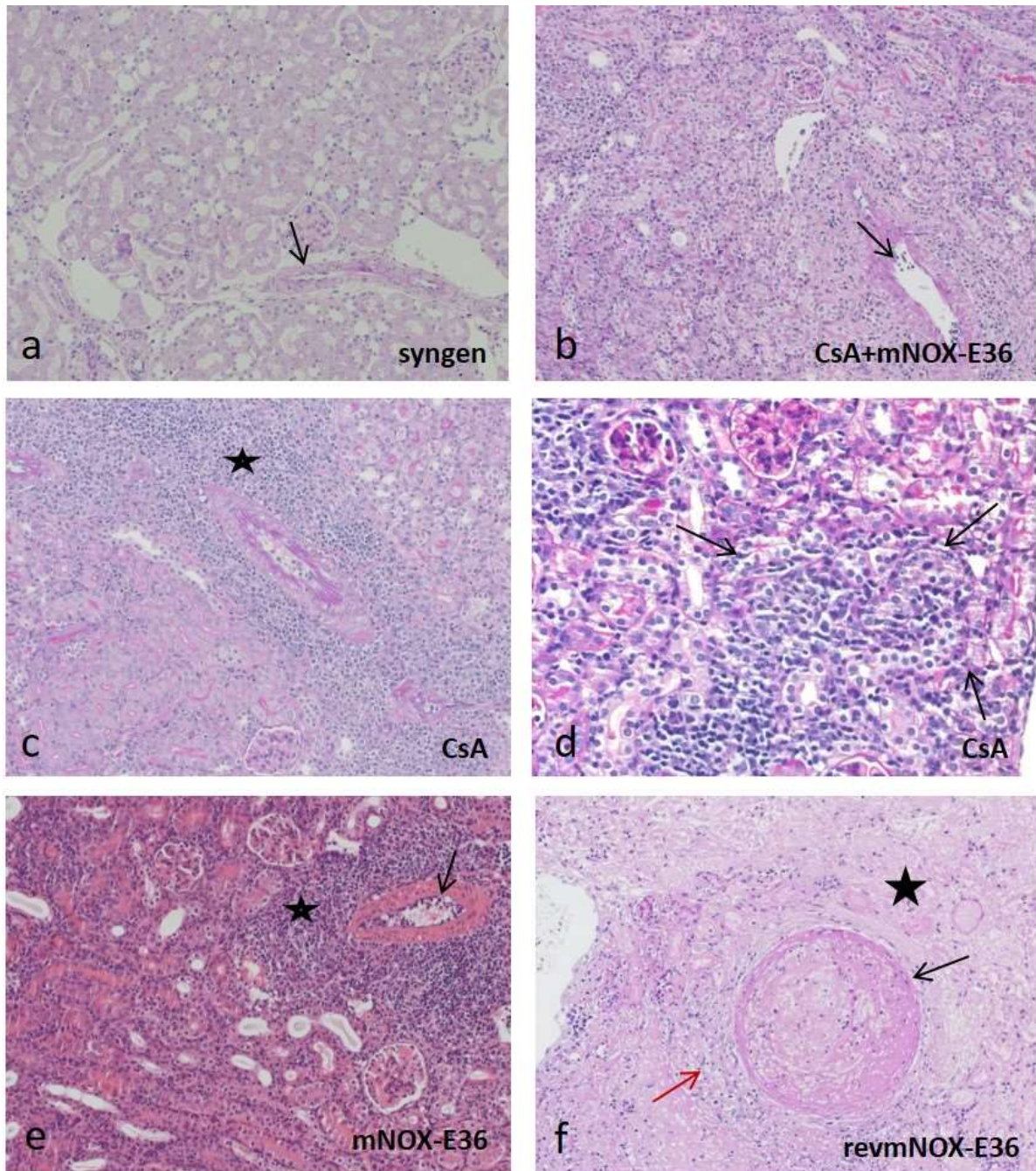
**Abbildung 22: Histologie Ergebnisse.**

Legende: Links oben: Intimale Arteriitis. Rechts oben: Interstitielle Entzündung. Links unten: Tubulitis. Rechts unten: Periarteriitis. In den histologischen Abstoßungskriterien zeigte sich nur ein Therapieeffekt für die CsA-Monotherapie und die Kombinationstherapie in Bezug auf die intimale Arteriitis. Ein Therapievorteil durch mNOX-E36 konnte nicht signifikant dargestellt werden.

	Syngen	revmNOX-E36	mNOX-E36	CsA	CsA + mNOX-E36
Banff	2II, 2II, 2II, 2II, 4IA	4IIB/2II, 4IIB/2II, 4IIB/2II, 4III, 4IIB	4IIB/2II, 4IIB/2II, 4IIB/2II, 4IIB/2II, 4III	3/2II, 4IA/2II, 4IA/2II, 4IA/2II, 4IB/2II	3/2II, 4IIA, 4IIA/2II, 4IIA/2II, 4IIA/2II

**Tabelle 17: Histologie Banff-Scores der einzelnen Gruppen.**





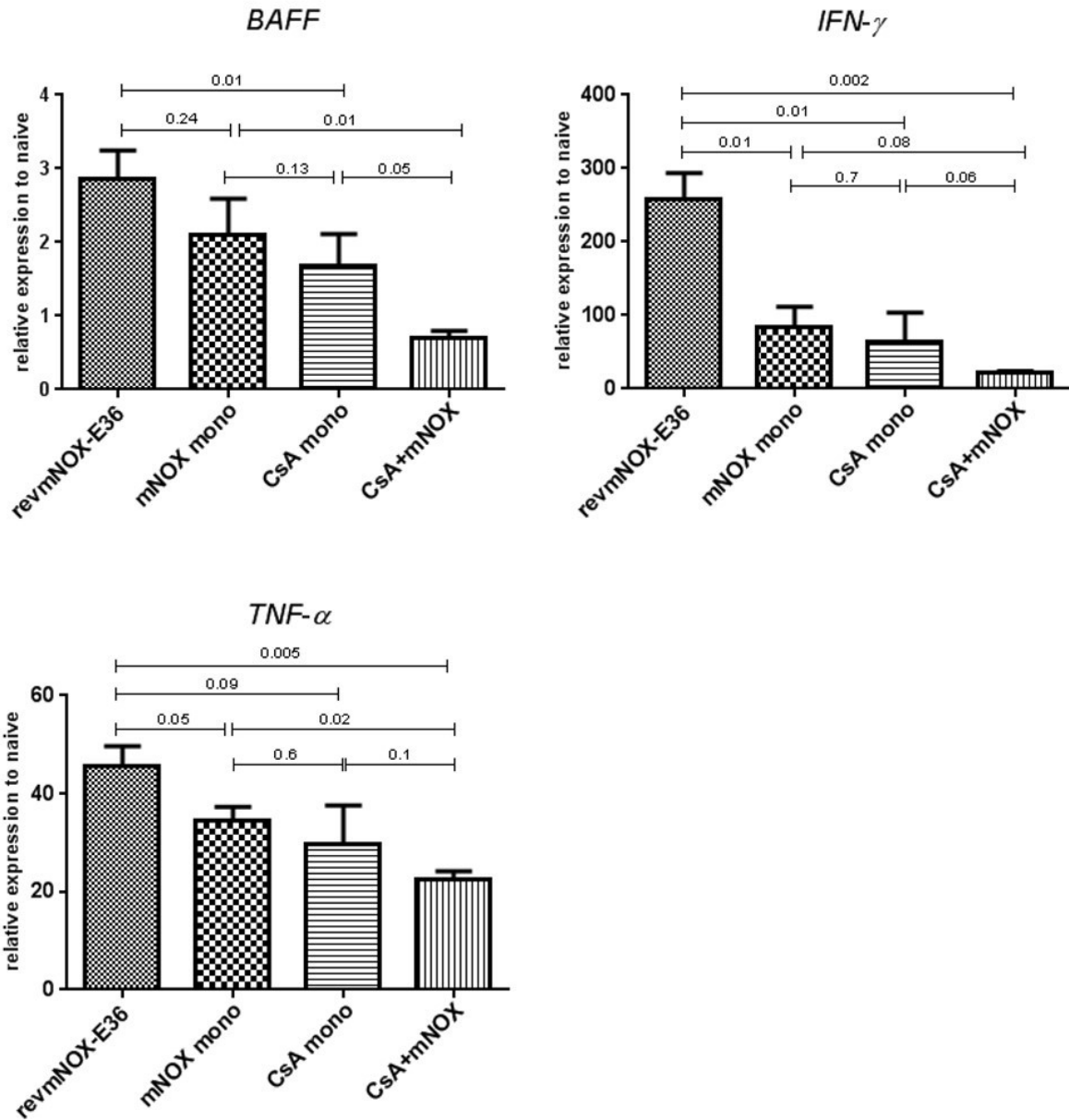
**Abbildung 23: Histologie der Transplantatnieren in 200-facher Vergrößerung. (A. Wagner).**

a: Syngen. Keine intimale Arteriitis, interstitielle Entzündung oder Tubulitis (Pfeil). b: CsA + mNOX-E36. Geringe intimale Arteriitis, interstitielle Entzündung oder Tubulitis (Pfeil). c: CsA. Mäßige intimale Arteriitis, interstitielle Entzündung. Perivaskuläre Lymphozyteninfiltration (Stern). d: CsA. Schwere Tubulitis (Pfeil). e: mNOX-E36. Mäßige intimale Arteriitis, interstitielle Entzündung. Perivaskuläre Lymphozyteninfiltration (Stern). f: revmNOX-E36. Fibrinoide Veränderungen der Arterie mit Nekrose der glatten Muskelzellen (schwarzer Pfeil) mit resultierender Parenchymnekrose (Stern). Milde interstitielle Entzündung (roter Pfeil).

Legende: a, b, c, e: PAS-Färbung. D: HE-Färbung.

#### **5.4. Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion**

Die RT-PCR gibt Auskunft über die Konzentrationen der pro-entzündlichen Zytokine innerhalb des Transplantats (Abbildung 24). Im Vergleich von Kombinationstherapie zu den Kontrollen konnte eine Senkung der Konzentrationen von BAFF-, IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -mRNA (BAFF:  $p < 0,0001$ ; IFN- $\gamma$ :  $p = 0,0002$ ; TNF- $\alpha$ :  $p = 0,0005$ ) nachgewiesen werden. Die Monotherapie mit mNOX-E36 hatte erniedrigte IFN- $\gamma$ - und TNF- $\alpha$ -mRNA-Konzentrationen (IFN- $\gamma$ :  $p = 0,01$ ; TNF- $\alpha$ :  $p = 0,05$ ). Die Monotherapie mit CsA wies ebenfalls reduzierte Konzentrationen von BAFF- und IFN- $\gamma$ -mRNA (BAFF:  $p = 0,01$ ; IFN- $\gamma$ :  $p = 0,01$ ) im Vergleich zu den Kontrollen auf. Die Kombinationstherapie zeigte in Bezug auf BAFF einen positiven Effekt im Vergleich zu den beiden Monotherapien (CsA+mNOX-E36 vs. mNOX-E36:  $p = 0,01$ ; CsA+mNOX-E36 vs. CsA:  $p = 0,05$ ). Keine Signifikanz, jedoch ein deutlicher Trend, erwies sich hierbei auch für IFN- $\gamma$  (CsA+mNOX-E36 vs. mNOX-E36:  $p = 0,08$ ; CsA+mNOX-E36 vs. CsA:  $p = 0,06$ ). Für TNF- $\alpha$  zeigte sich nur eine Signifikanz im Vergleich der Kombinationstherapie zur mNOX-E36-Monotherapie ( $p = 0,02$ ), jedoch nicht zur CsA-Monotherapie ( $p = 0,1$ ).

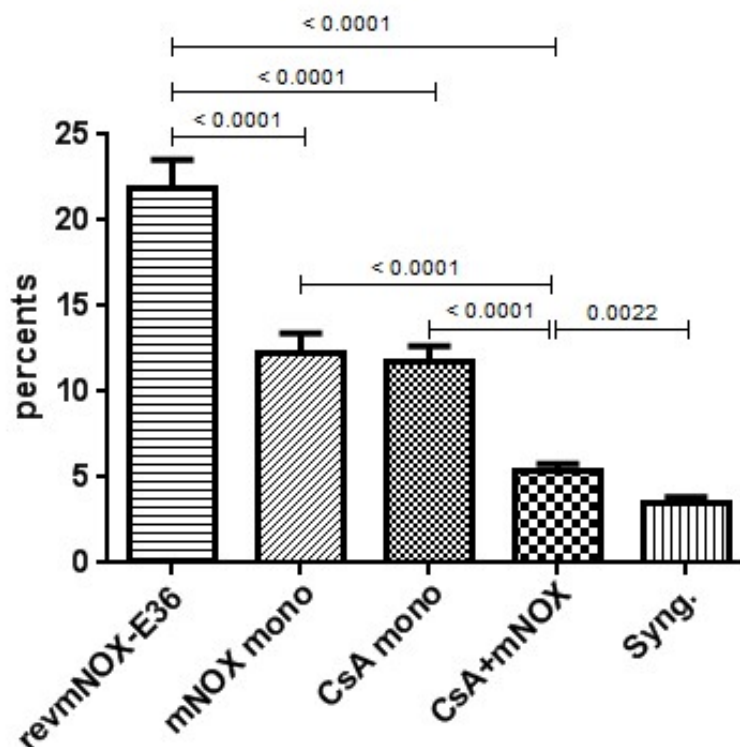


**Abbildung 24: RT-PCR Ergebnisse.**

Legende: Links oben BAFF. Recht oben: IFN- $\gamma$ . Unten: TNF- $\alpha$ . Die mRNA-Nachweise der pro-entzündlichen Zytokine zeigten eine klare Reduktion unter Therapie, wobei der Unterschied nur zwischen unbehandelten Kontrollen (revmNOX-E36) und mNOX-E36-Monotherapie in Bezug auf TNF- $\alpha$  nicht signifikant ist. Die Kombinationstherapie hatte außer im Vergleich von CsA-Monotherapie und Kombinationstherapie bei TNF- $\alpha$  einen signifikanten Vorteil nachgewiesen.

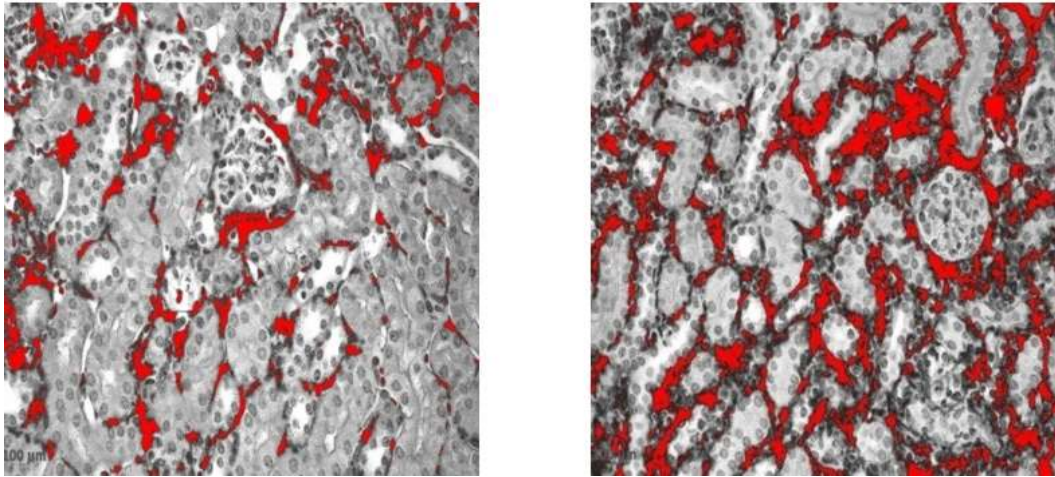
## 5.5. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie gibt Auskunft über die Ausprägung der F4/80-positiven Monozyteninfiltration innerhalb des Transplantats (Abbildung 25 und 26). Die Infiltrationsdichte war in den unbehandelten Kontrollen mit  $22,1 \pm 2,3$  % signifikant höher als in der Monotherapie-Gruppe (CsA  $10,8 \pm 1,5$  %:  $p < 0,0001$ ; mNOX-E36  $10,8 \pm 1,8$  %:  $p < 0,0001$ ). Die Monotherapien untereinander wiesen keine signifikanten Unterschiede auf. Die Kombinationstherapie zeigte mit  $5,2 \pm 1,2$  % Infiltrationsdichte einen deutlichen additiven Effekt im Vergleich zu den Monotherapien (CsA+mNOX-E36 vs. CsA:  $p < 0,0001$ ; CsA+mNOX-E36 vs. mNOX-E36:  $p < 0,0001$ ). Die Kombinationstherapie erreichte somit fast vergleichbare Ergebnisse wie die syngenen Kontrollen mit  $3,4 \pm 0,5$  %.



**Abbildung 25: Immunhistochemie F4/80 Ergebnisse.**

Legende: Die signifikant höchste Monozyteninfiltration zeigten die unbehandelten Kontrollen (revmNOX-E36). Im Vergleich zu den Monotherapie-Gruppen hatte die Kombinationstherapie-Gruppe eine deutliche und signifikante Reduktion der Infiltrationsdichte. Die geringste Monozyteninfiltration wurde bei den syngenen Kontrollen gemessen, welche durch keine der anderen Therapiegruppen erreicht werden konnte.



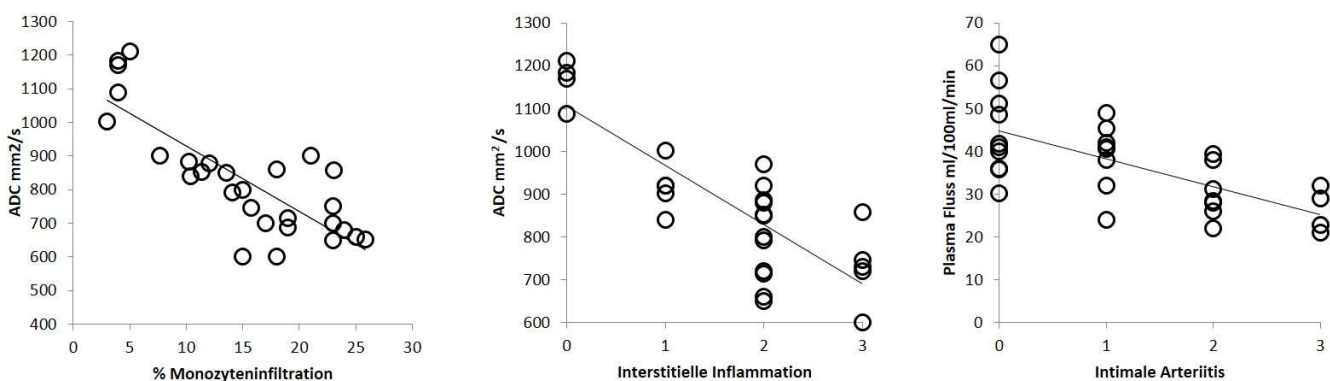
**Abbildung 26: Monozyteninfiltration in F4/80-Färbung in 40-facher Vergrößerung. (A. Kalnins).**

In der F4/80-Färbung markiert rot das Ausmaß der Monozyteninfiltration und in diesen Fällen die signifikante Reduktion der Infiltration durch die Kombinationstherapie im Vergleich zur Monotherapie mit Cyclosporin A.

Legende: Links: Kombinationstherapie. Rechts: Monotherapie CsA.

## 5.6. Korrelation der einzelnen Ergebnisse

Im Vergleich der einzelnen Messdaten korreliert der kortikale Plasmafluss negativ mit der intimalen Arteriitis ( $p < 0,05$ ;  $r = -0,68$ ; Abbildung 27 rechts). Genauso signifikant waren auch die Korrelationen von ADC zu der interstitiellen Entzündung ( $r = -0,78$ ) und zu der Makrophageninfiltration ( $r = -0,72$ ) (Abbildung 27 links und Mitte).



**Abbildung 27: Korrelationen der Einzelergebnisse.**

Legende: Links: Signifikante negative Korrelation zwischen Diffusion und Immunhistochemie ( $r = -0,68$ ). Mitte: Signifikante negative Korrelation zwischen Diffusion und Histologie ( $r = -0,78$ ). Rechts: Signifikante negative Korrelation zwischen Perfusion und Histologie ( $r = -0,72$ ).

## **6. Diskussion**

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass pathophysiologische Veränderungen nach Nierentransplantation in der MRT abgebildet werden können. Die dabei verwendeten Methoden, die diffusionsgewichtete MRT und DCE-MRT, geben Auskunft über unterschiedliche pathophysiologische Vorgänge, die teils mit der bioptischen Aufarbeitung als Goldstandard korrelierten. Des Weiteren bildet die MRT Therapieerfolge nicht-invasiv ab. Dies ist wichtig, da die invasive perkutane Biopsie Risiken wie Blutungen und Infektionen birgt. Eine Hemmung der CCL2-Achse durch mNOX-E36 hat additive Effekte, welche sich nicht vollständig durch eine Klassifikation nach Banff darstellen ließen.

### **6.1. Die Hauptergebnisse im Kontext**

#### **6.1.1. Magnetresonanztomographie**

Die MRT als nicht-invasive Methode zur Diagnostik der akuten Abstoßung nach Nierentransplantation konnte bereits 1987 die Überlegenheit gegenüber Szintigraphie und Ultraschall in Bezug auf histologisch gesicherte Abstoßungen zeigen (184). Ein diagnostischer Vorteil gegenüber der Histopathologie in Kombination mit Immunhistologie konnte jedoch bis dato nicht erreicht werden.

Mit der diffusionsgewichteten MRT zeigten Palmucci et al. in 40 Patienten, dass der ADC-Wert der Medulla als besten Vergleichswert zur laborchemisch gemessenen Nierenfunktion korreliert (185). Blondin et al. berichteten, dass die Berechnung des ADC in unterschiedlichen Modellen, inklusive der monoexponentiellen Berechnung aus dieser Studie, mit der Nierenfunktion korreliert (186). Abou-El-Ghar et al. stellten durch sinkende ADC-Werte die Detektierbarkeit von Dysfunktionen in nierentransplantierten Patienten dar, konnten jedoch nicht zwischen akuter tubulärer Nekrose und akuter Abstoßung unterscheiden (187).

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass die akute Abstoßung eine Verminderung der freien Diffusion, also einen kleineren ADC-Wert, bewirkt. Diese eingeschränkte Beweglichkeit kann durch ein erhöhtes zelluläres Volumen durch die in der Histologie nachgewiesene Entzündungsreaktionen oder durch die erhöhte zelluläre Dichte durch die in der RT-PCR nachgewiesene CCL2-vermittelte Leukozytenrekrutierung zustande kommen.

Durch den ADC wird nämlich nicht nur reine Diffusion, d.h. Beweglichkeit der Wassermoleküle dargestellt, sondern auch eine sogenannte Pseudodiffusion, die durch Blutbewegung in den Kapillaren stattfindet. Um den Einfluss von kapillarer Perfusion auf die Ergebnisse zu differenzieren, können Intra-voxel incoherent motion (IVIM)-Messungen mit mehreren b-Werten durchgeführt werden. Die IVIM bietet den Vorteil, dass u.a. der Parameter *true diffusion*  $D$  berechnet werden kann. Hierbei wird der Anteil der Pseudodiffusion  $D^*$  durch die kapillare Perfusion berechnet, so dass eine genauere Aussage über den verbliebenen strukturell bedingten Anteil der Diffusion getroffen werden kann (149, 154). Die b-Werte reichen hierbei typischerweise von 0 s/mm<sup>2</sup> bis 800 s/mm<sup>2</sup> (155). Werte über 1000 s/mm<sup>2</sup> können verwendet werden, um die Artefakte durch die T2-Querrelaxation zu minimieren (188). Dieser Effekt wird auch *T2 shine through* genannt. Die *true diffusion*  $D$  lässt sich durch eine Messung mit mehr v.a. niedrigen, d.h. gering diffusionsgewichteten b-Werten erfassen. Nun kann der Verlauf der Signalintensität entlang der b-Werte besser als mit einer monoexponentiellen Verlaufskurve dargestellt werden (Bild im Anhang Kapitel 10.1.). Obwohl die Messungen in dieser Studie mit mehreren b-Werten durchgeführt wurden, fiel die Entscheidung auf die monoexponentielle Auswertung, da die Messung der *true diffusion* inkonklusiv war. Die Daten befinden sich zur Einsicht im Anhang Kapitel 10.1. Wie jedoch bereits oben beschrieben wiesen Blondin et al. nach, dass die Berechnung des ADC sowohl in monoexponentiell, als auch in komplexeren Modellen mit der Nierenfunktion korrelieren (186).

Die Unterscheidung von akuter Abstoßung und akuter tubulärer Nekrose ist auf Grund der unterschiedlichen Therapien jedoch von therapeutischer Relevanz, wobei auch beide Pathologien gleichzeitig vorliegen können. Die akute Abstoßung ist in der histopathologischen Diagnostik mit einer Tubulitis und Arteriitis gekennzeichnet (72). Eine Studie von Aktas et al. demonstrierte in der die Tc-99m DTPA Szintigraphie in der akuten Abstoßung eine insgesamt schlechtere Perfusion (189). Notghi et al. belegten nuklearmedizinisch im Vergleich dazu, dass die akute tubuläre Nekrose eine erhaltene kortikale Perfusion mit verlangsamter medullärer Perfusion aufweist (190). Die Unterschiede zwischen Perfusion in Cortex und Medulla sind nach unseren Ergebnissen gut zu erfassen, womit eine Unterscheidung von akuter Abstoßung und akuter tubulärer Nekrose durch die DCE-MRT möglich erscheint.

Hierzu passend zeigte sich in unserer Studie eine Korrelation zwischen Plasmafluss und intimaler Arteriitis.

### **6.1.2. Histologische Befunde**

In der vorgelegten Studie wird erstmals über den Effekt eines CCL2-Spiegelmer auf das Abstoßungsgeschehen bei Nierentransplantaten berichtet. Es ist bekannt, dass CCL2 an den Rezeptor CCR2 bindet und eine zentrale Rolle bei der Makrophagen-Rekrutierung ist. Belperio et al. wiesen dies für die Bronchiolitis obliterans als Resultat von akuter Abstoßung nach Lungentransplantation durch Antikörper gegen CCL2 in Mäusen nach (191). Abdi et al. belegten die Relevanz von CCR2 bei Pankreas-Inselzell- und Herztransplantationen durch einen Überlebensvorteil von CCR2-negativen Mäusen (192). Lee et al. konnten durch Blockade der CCL2/CCR2-Achse sowohl durch CCL2-Antikörper, als auch durch CCR2-negative Mäuse das Überleben von Pankreas-Inselzellen in Kombination mit subtherapeutischer Immunsuppression signifikant verbessern (193). Für die akute Nierenschädigung konnten Nishihara et al. eine Korrelation zwischen CCL2 im Urin und schlechtem Outcome aufzeigen (194). Das Spiegelmer mNOX-E36 greift hemmend in die CCL2/CCR2 vermittelte Makrophagen-Rekrutierung ein. Ehling et al. belegten einen positiven Effekt von mNOX-E36 auf die Makrophagen-abhängige Angiogenese bei chronischer Leberfibrose (195). Ninichuk et al. konnten eine Reduktion der GFR-Einschränkung und Glomerulosklerose in einem Diabetes-Modell nachweisen (100). Darüber hinaus wiesen Kulkarni et al. nach, dass mit mNOX-E36 die Cyclosporin A-Dosis bei Lupusnephritis reduziert werden konnte (99, 102). Erste Ergebnisse in Transplantationsmodellen konnten Kalnins et al. für Herztransplantationen aufzeigen. Hier zeigte mNOX-E36 gegenüber revmNOX-E36 einen signifikanten Überlebensvorteil der Herztransplantate. In Kombination mit Cyclosporin A zeigte sich eine deutliche Reduzierung des Entzündungsgeschehens (103).

In dieser Studie wurde gezeigt, dass mNOX-E36 einen gewissen positiven Effekt auf allogene Nierentransplantate hat. Bereits in Monotherapie wurden die Monozyteninfiltration und die Ausschüttung von pro-entzündlichen Zytokinen signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert. Histologie und DCE-MRT zeigte jedoch keine verbesserte Organdurchblutung. In der Einteilung nach Banff zeigte mNOX-E36 keinen Vorteil, obwohl es zu weniger Infarkten und Nekrosen kam. In der Kombination mit Cyclosporin A werden nachweislich weniger Makrophagen in das



Organ rekrutiert ohne dabei einen Vorteil nach Banff zu erreichen. Dies begründet sich darin, dass die intimale Arteriitis unter mNOX-E36-Monotherapie geringer ausgeprägt war, als unter der Kombinationstherapie. Dies zeigt sich auch in nicht-signifikantem Ausmaß in der DCE-MRT. Zum aktuellen Zeitpunkt gibt es keine Erklärung für dieses Ergebnis. Theoretisch ist dies durch eine geringere Monozyteninfiltration erklärbar, jedoch erfordert dies eine dedizierte weiterführende Untersuchung. Die Tatsache, dass in der histologischen Analyse in Bezug auf die intimale Arteriitis die Monotherapie mit Cyclosporin A besser abschnitt als die syngenen Kontrollen, ist am ehesten auf einen Messfehler zurück zu führen.

Die Effekte von mNOX-E36 konnten durch eine Kombination von diffusionsgewichteter MRT und DCE-MRT erkannt werden und können nicht vollständig durch die Banff-Klassifikation erfasst werden. Mehrere Banff-Arbeitsgruppen kamen zu ähnlichen Schlüssen und erweitern ihren Ansatz um objektivere evidenzbasierte Methoden, wie Diagnostik anhand von patientenspezifischen Risikoprofilen zu stratifizieren (196). Somit erscheint ein komplementärer Ansatz unter Verwendung von verschiedenen MRT-Techniken zur Beurteilung der Therapieeffekte als sinnvoll.

In der Translation zum Menschen konnte bereits gezeigt werden, dass die gleiche Technik der DCE-MRT an Nieren verlässlich pharmakodynamische Parameter wie die glomeruläre Filtrationsrate erheben kann. Die Technik erlaubt außerdem die Charakterisierung von Nierenraumforderungen und deren Metastasen (197).

## **6.2. Einschränkungen**

Auf Grund von hygienischen Bestimmungen waren alle MRT-Messungen der Endpunkt des Beobachtungszeitraumes. Ein anderes Studiendesign mit wiederholten Messungen würde durch den Verlauf der MRT-Messungen größeren Aufschluss über die pharmakologischen und pathologischen Veränderungen ermöglichen. Dies würde allerdings eine deutlich höhere Belastung für die Versuchstiere bedeuten. Messungen an einem dedizierten Tier-MRT könnten einige der angesprochenen Limitationen verbessern. Hüper et al. (198, 199) kamen mit ihren Studien an einem solchen Kleintier-MRT jedoch zu vergleichbaren Ergebnissen unter der Einschränkung, dass keine Therapieeffekte untersucht wurden.

Bei der Laser-Doppler-Bildgebung wird die Perfusion in geringer Eindringtiefe ohne Darstellung in absoluten Einheiten gemessen. Außerdem ist die Reproduzierbarkeit stark eingeschränkt.

### **6.3. Zusammenfassung**

In dieser Studie konnte die funktionelle MRT von akuten Nierenabstoßungsreaktionen reproduzierbar durchgeführt werden. Die akute Abstoßung kann in der MRT identifiziert werden.

Die funktionellen MRT-Parameter entsprechen z.T. der histopathologischen und immunohistochemischen Aufarbeitung, liefern teils jedoch zusätzliche Informationen. Dies ist eine wertvolle Information, da die akute Abstoßung fokal beginnt. Während der Goldstandard der perkutanen Biopsie nur Aussagen über kleine Teile der Niere treffen kann, liefert die funktionelle MRT Aussagen über das ganze Transplantat.

Eine Einordnung der Biopsie-Ergebnisse nach den gängigen Banff-Kriterien kann manche pathophysiologischen Vorgänge, die durch das neuartige Spiegelmer-Medikament mNOX-E36 verändert werden, nicht abbilden. Eine zusätzliche Beurteilung mittels MRT liefert hier zusätzliche Aussagen über das Therapieansprechen.

Für eine weiterführende Analyse der Pathophysiologie sollte als nächster Schritt eine tierexperimentelle Studie mit mehreren Messzeitpunkten erfolgen, wie auch Hüper et al. durchgeführt haben (198, 199). Dies sollte auch genauere Aufschlüsse über den Effekt des neuartigen Spiegelmers mNOX-E36 bringen.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

ADC apparent diffusion coefficient  
AIF aortic input function  
AKI acute kidney injury  
BAFF B cell activation factor  
CCL2 Chemokin Ligand 2  
CCR2 Chemokin Rezeptor Typ 2  
cDNA Komplementär-DNA  
CKD chronic kidney disease  
CsA Cyclosporin A  
DCE-MRT dynamic contrast enhanced MRT  
DGF delayed graft function  
DNA Desoxyribonukleinsäure  
DWI diffusion weighted imaging  
fMRT funktionelle MRT  
HE Hämalaun-Eosin  
IL-2 Interleukin 2  
INF- $\gamma$  Interferon gamma  
i.p. intraperitoneal  
i.v. intravenös  
IVIM intravoxel incoherent motion  
IRI ischemia reperfusion injury  
LDF Laser Doppler flowmetry  
MCP-1 Monozyten chemotaktisches Protein 1  
MMF-Narkose Midazolam-Medetomidin-Fentanyl-Narkose  
mRNA messenger RNA  
MRT Magnetresonanztomographie  
MTT mean transit time  
NF-AT nuclear factor activating T-Cell  
NSF nephrogene systemische Fibrose  
PAS periodic acid-Schiff  
PRB percutaneous renal biopsy  
KG Körpergewicht

RF Radiofrequenz

RNA Ribonukleinsäure

RT-PCR Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

RT Repetition Time

TE Echo Time

TGF $\beta$  transforming growth factor beta

TNF- $\alpha$  Tumornekrosefaktor alpha

TSE Turbo Spin Echo

TWIST time-resolved angiography with stochastic trajectories

VoD Volume of Distribution

## 8. Literaturverzeichnis

1. de Mendonca A, Vincent JL, Suter PM, Moreno R, Dearden NM, Antonelli M, et al. Acute renal failure in the ICU: risk factors and outcome evaluated by the SOFA score. *Intensive care medicine*. 2000;26(7):915-21.
2. Mehta RL, Kellum JA, Shah SV, Molitoris BA, Ronco C, Warnock DG, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury. *Crit Care*. 2007;11(2):R31.
3. (KDIGO) KDIGO, Group AKIW. KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int Suppl*. 2012;3:1-138.
4. Leung KC, Tonelli M, James MT. Chronic kidney disease following acute kidney injury-risk and outcomes. *Nat Rev Nephrol*. 2013;9(2):77-85.
5. (KDIGO) KDIGO, Group TW. KDIGO clinical practice guideline for the care of kidney transplant recipients. *Am J Transplant*. 2009;9 Suppl 3:S1-155.
6. (KDIGO) KDIGO, Group TW. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney Int Suppl*. 2013;3:1-150.
7. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu CY. Chronic kidney disease and the risks of death, cardiovascular events, and hospitalization. *The New England journal of medicine*. 2004;351(13):1296-305.
8. Tonelli M, Wiebe N, Culleton B, House A, Rabbat C, Fok M, et al. Chronic kidney disease and mortality risk: a systematic review. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17(7):2034-47.
9. Frei U S-HH. QuasiNiere 2006/2007 Nierenersatztherapie in Deutschland. 2007.
10. Schnuelle P, Lorenz D, Trede M, Van Der Woude FJ. Impact of renal cadaveric transplantation on survival in end-stage renal failure: evidence for reduced mortality risk compared with hemodialysis during long-term follow-up. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(11):2135-41.
11. Gill JS, Tonelli M, Johnson N, Kiberd B, Landsberg D, Pereira BJ. The impact of waiting time and comorbid conditions on the survival benefit of kidney transplantation. *Kidney Int*. 2005;68(5):2345-51.
12. Oniscu GC, Brown H, Forsythe JL. Impact of cadaveric renal transplantation on survival in patients listed for transplantation. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(6):1859-65.
13. Waiser J, Budde K, Schreiber M, Peibst O, Koch U, Bohler T, et al. The quality of life in end stage renal disease care. *Transpl Int*. 1998;11 Suppl 1:S42-5.
14. Locatelli F, Pozzoni P, Del Vecchio L. Renal replacement therapy in patients with diabetes and end-stage renal disease. *J Am Soc Nephrol*. 2004;15 Suppl 1:S25-9.
15. Matos AC, Requião-Moura LR, Clarizia G, Durao Junior Mde S, Tonato EJ, Chinen R, et al. Expanding the pool of kidney donors: use of kidneys with acute renal dysfunction. *Einstein (Sao Paulo)*. 2015;13(2):319-25.
16. Matevossian E, Kern H, Huser N, Doll D, Snopok Y, Nahrig J, et al. Surgeon Yurii Voronoy (1895-1961) - a pioneer in the history of clinical transplantation: in memoriam at the 75th anniversary of the first human kidney transplantation. *Transpl Int*. 2009;22(12):1132-9.
17. Barry JM, Murray JE. The first human renal transplants. *J Urol*. 2006;176(3):888-90.
18. Murray JE. The 50th anniversary of the first successful human organ transplant. *Revista de investigacion clinica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutricion*. 2005;57(2):118-9.
19. Brosig W, Nagel R. [Current results of kidney transplantation]. *Wiener klinische Wochenschrift*. 1967;79(25):515-20.
20. Gondos A, Dohler B, Brenner H, Opelz G. Kidney Graft Survival in Europe and the United States: Strikingly Different Long-term Outcomes. *Transplantation*. 2012.
21. Lamb KE, Lodhi S, Meier-Kriesche HU. Long-term renal allograft survival in the United States: a critical reappraisal. *Am J Transplant*. 2011;11(3):450-62.
22. Lodhi SA, Lamb KE, Meier-Kriesche HU. Solid organ allograft survival improvement in the United States: the long-term does not mirror the dramatic short-term success. *Am J Transplant*. 2011;11(6):1226-35.

23. Li C, Yang CW. The pathogenesis and treatment of chronic allograft nephropathy. *Nat Rev Nephrol.* 2009;5(9):513-9.
24. Nankivell BJ, Kuypers DR. Diagnosis and prevention of chronic kidney allograft loss. *Lancet.* 2011;378(9800):1428-37.
25. Jevnikar AM, Mannon RB. Late kidney allograft loss: what we know about it, and what we can do about it. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3 Suppl 2:S56-67.
26. Takemoto SK, Zeevi A, Feng S, Colvin RB, Jordan S, Kobashigawa J, et al. National conference to assess antibody-mediated rejection in solid organ transplantation. *Am J Transplant.* 2004;4(7):1033-41.
27. Mihatsch MJ, Ryffel B, Gudat F. Morphological criteria of chronic rejection: differential diagnosis, including cyclosporine nephropathy. *Transplant Proc.* 1993;25(2):2031-7.
28. Hancock WW. Chemokine receptor-dependent alloresponses. *Immunological reviews.* 2003;196:37-50.
29. Marcen R. Immunosuppressive drugs in kidney transplantation: impact on patient survival, and incidence of cardiovascular disease, malignancy and infection. *Drugs.* 2009;69(16):2227-43.
30. Budde K, Giessing M, Liefeldt L, Neumayer HH, Glander P. [Modern immunosuppression following renal transplantation. Standard or tailor made?]. *Urologe A.* 2006;45(1):9-17.
31. Lee VW, Chapman JR. Sirolimus: its role in nephrology. *Nephrology (Carlton).* 2005;10(6):606-14.
32. Morath C, Arns W, Schwenger V, Mehrabi A, Fonouni H, Schmidt J, et al. Sirolimus in renal transplantation. *Nephrol Dial Transplant.* 2007;22 Suppl 8:viii61-viii5.
33. Bennett WM. Insights into chronic cyclosporine nephrotoxicity. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 1996;34(11):515-9.
34. Bennett WM, DeMattos A, Meyer MM, Andoh T, Barry JM. Chronic cyclosporine nephropathy: the Achilles' heel of immunosuppressive therapy. *Kidney international.* 1996;50(4):1089-100.
35. Sia IG, Paya CV. Infectious complications following renal transplantation. *Surg Clin North Am.* 1998;78(1):95-112.
36. Parasuraman R, Yee J, Karthikeyan V, del Busto R. Infectious complications in renal transplant recipients. *Adv Chronic Kidney Dis.* 2006;13(3):280-94.
37. Patel R, Terasaki PI. Significance of the Positive Crossmatch Test in Kidney Transplantation. *New England Journal of Medicine.* 1969;280(14):735-9.
38. Bhowmik DM, Dinda AK, Mahanta P, Agarwal SK. The evolution of the Banff classification schema for diagnosing renal allograft rejection and its implications for clinicians. *Indian Journal of Nephrology.* 2010;20(1):2-8.
39. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica RN, Jr., Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant.* 2009;24(3):1039-47.
40. Sharif A, Borrows R. Delayed graft function after kidney transplantation: the clinical perspective. *Am J Kidney Dis.* 2013;62(1):150-8.
41. Cheung KP, Kasimsetty SG, McKay DB. Innate immunity in donor procurement. *Curr Opin Organ Transplant.* 2013;18(2):154-60.
42. Salvadori M, Rosso G, Bertoni E. Update on ischemia-reperfusion injury in kidney transplantation: Pathogenesis and treatment. *World Journal of Transplantation.* 2015;5(2):52-67.
43. Eltzhig HK, Eckle T. Ischemia and reperfusion--from mechanism to translation. *Nat Med.* 2011;17(11):1391-401.
44. Mikhalski D, Wissing KM, Ghisdal L, Broeders N, Touly M, Hoang AD, et al. Cold ischemia is a major determinant of acute rejection and renal graft survival in the modern era of immunosuppression. *Transplantation.* 2008;85(7 Suppl):S3-9.
45. Boom H, Mallat MJ, de Fijter JW, Zwinderman AH, Paul LC. Delayed graft function influences renal function, but not survival. *Kidney Int.* 2000;58(2):859-66.

46. Giral-Classe M, Hourmant M, Cantarovich D, Dantal J, Blancho G, Daguin P, et al. Delayed graft function of more than six days strongly decreases long-term survival of transplanted kidneys. *Kidney Int.* 1998;54(3):972-8.
47. Grosso G, Corona D, Mistretta A, Zerbo D, Sinagra N, Giaquinta A, et al. Delayed graft function and long-term outcome in kidney transplantation. *Transplant Proc.* 2012;44(7):1879-83.
48. Howard RJ, Pfaff WW, Brunson ME, Ramos EL, Peterson JC, Croker BP, et al. Delayed graft function is associated with an increased incidence of occult rejection and results in poorer graft survival. *Transplant Proc.* 1993;25(1 Pt 2):884.
49. Marcen R, Orofino L, Pascual J, de la Cal MA, Teruel JL, Villafruela JJ, et al. Delayed graft function does not reduce the survival of renal transplant allografts. *Transplantation.* 1998;66(4):461-6.
50. Siedlecki A, Irish W, Brennan DC. Delayed graft function in the kidney transplant. *Am J Transplant.* 2011;11(11):2279-96.
51. Molitoris BA, Dagher PC, Sandoval RM, Campos SB, Ashush H, Fridman E, et al. siRNA targeted to p53 attenuates ischemic and cisplatin-induced acute kidney injury. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20(8):1754-64.
52. Li X, Hassoun HT, Santora R, Rabb H. Organ crosstalk: the role of the kidney. *Curr Opin Crit Care.* 2009;15(6):481-7.
53. Shoskes DA, Halloran PF. Delayed graft function in renal transplantation: etiology, management and long-term significance. *J Urol.* 1996;155(6):1831-40.
54. Perico N, Cattaneo D, Sayegh MH, Remuzzi G. Delayed graft function in kidney transplantation. *Lancet.* 2004;364(9447):1814-27.
55. Schroppel B, Legendre C. Delayed kidney graft function: from mechanism to translation. *Kidney Int.* 2014;86(2):251-8.
56. Basadonna GP, Matas AJ, Gillingham KJ, Payne WD, Dunn DL, Sutherland DE, et al. Early versus late acute renal allograft rejection: impact on chronic rejection. *Transplantation.* 1993;55(5):993-5.
57. Collins AB, Schneeberger EE, Pascual MA, Saidman SL, Williams WW, Tolckoff-Rubin N, et al. Complement activation in acute humoral renal allograft rejection: diagnostic significance of C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(10):2208-14.
58. Halloran PF, Schlaut J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I response. II. Clinical and pathologic features of renal transplants with anti-class I-like antibody. *Transplantation.* 1992;53(3):550-5.
59. Mohan S, Palanisamy A, Tsapepas D, Tanriover B, Crew RJ, Dube G, et al. Donor-Specific Antibodies Adversely Affect Kidney Allograft Outcomes. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23(12):2061-71.
60. Stegall MD, Chedid MF, Cornell LD. The role of complement in antibody-mediated rejection in kidney transplantation. *Nat Rev Nephrol.* 2012;8(11):670-8.
61. Racusen LC, Haas M. Antibody-mediated rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2006;1(3):415-20.
62. Haas M, Sis B, Racusen LC, Solez K, Glotz D, Colvin RB, et al. Banff 2013 meeting report: inclusion of c4d-negative antibody-mediated rejection and antibody-associated arterial lesions. *Am J Transplant.* 2014;14(2):272-83.
63. Fadili W, Habib Allah M, Laouad I. Chronic renal allograft dysfunction: risk factors, immunology and prevention. *Arab J Nephrol Transplant.* 2013;6(1):45-50.
64. Mauiyyedi S, Pelle PD, Saidman S, Collins AB, Pascual M, Tolckoff-Rubin NE, et al. Chronic humoral rejection: identification of antibody-mediated chronic renal allograft rejection by C4d deposits in peritubular capillaries. *J Am Soc Nephrol.* 2001;12(3):574-82.
65. Racusen LC, Regele H. The pathology of chronic allograft dysfunction. *Kidney Int Suppl.* 2010(119):S27-32.
66. Sis B, Halloran PF. Endothelial transcripts uncover a previously unknown phenotype: C4d-negative antibody-mediated rejection. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(1):42-8.

67. Sis B, Jhangri GS, Bunnag S, Allanach K, Kaplan B, Halloran PF. Endothelial gene expression in kidney transplants with alloantibody indicates antibody-mediated damage despite lack of C4d staining. *Am J Transplant*. 2009;9(10):2312-23.
68. Tantravahi J, Womer KL, Kaplan B. Why hasn't eliminating acute rejection improved graft survival? *Annual review of medicine*. 2007;58:369-85.
69. Halloran PF, Wadgymar A, Ritchie S, Falk J, Solez K, Srinivasa NS. The significance of the anti-class I antibody response. I. Clinical and pathologic features of anti-class I-mediated rejection. *Transplantation*. 1990;49(1):85-91.
70. Gaber LW, Moore LW, Gaber AO, First MR, Guttmann RD, Pouletty P, et al. A multicenter report on the utilization of Banff grading in acute renal rejection. The 1995 Efficacy Endpoints Conference. *Transplant Proc*. 1997;29(1-2):184-5.
71. Mengel M, Sis B, Haas M, Colvin RB, Halloran PF, Racusen LC, et al. Banff 2011 Meeting report: new concepts in antibody-mediated rejection. *Am J Transplant*. 2012;12(3):563-70.
72. Racusen LC, Solez K, Colvin RB, Bonsib SM, Castro MC, Cavallo T, et al. The Banff 97 working classification of renal allograft pathology. *Kidney Int*. 1999;55(2):713-23.
73. Solez K, Axelsen RA, Benediktsson H, Burdick JF, Cohen AH, Colvin RB, et al. International standardization of criteria for the histologic diagnosis of renal allograft rejection: the Banff working classification of kidney transplant pathology. *Kidney Int*. 1993;44(2):411-22.
74. Haas M. An updated Banff schema for diagnosis of antibody-mediated rejection in renal allografts. *Curr Opin Organ Transplant*. 2014;19(3):315-22.
75. Liapis G, Singh HK, Derebail VK, Gasim AM, Kozlowski T, Nিকেleit V. Diagnostic significance of peritubular capillary basement membrane multilaminations in kidney allografts: old concepts revisited. *Transplantation*. 2012;94(6):620-9.
76. Rollins BJ. Chemokines. *Blood*. 1997;90(3):909-28.
77. Kohidai L, Csaba G. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, RANTES and TNF-alpha) in the unicellular *Tetrahymena pyriformis*. *Cytokine*. 1998;10(7):481-6.
78. Conti P, DiGioacchino M. MCP-1 and RANTES are mediators of acute and chronic inflammation. *Allergy and asthma proceedings : the official journal of regional and state allergy societies*. 2001;22(3):133-7.
79. Yoshimura T, Robinson EA, Tanaka S, Appella E, Leonard EJ. Purification and amino acid analysis of two human monocyte chemoattractants produced by phytohemagglutinin-stimulated human blood mononuclear leukocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1989;142(6):1956-62.
80. Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS letters*. 1989;244(2):487-93.
81. Valente AJ, Graves DT, Vialle-Valentin CE, Delgado R, Schwartz CJ. Purification of a monocyte chemotactic factor secreted by nonhuman primate vascular cells in culture. *Biochemistry*. 1988;27(11):4162-8.
82. Melgarejo E, Medina MÁ, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Monocyte chemoattractant protein-1: A key mediator in inflammatory processes. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 2009;41(5):998-1001.
83. Yadav A, Saini V, Arora S. MCP-1: Chemoattractant with a role beyond immunity: A review. *Clinica Chimica Acta*. 2010;411(21-22):1570-9.
84. Deshmane SL, Kremlev S, Amini S, Sawaya BE. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research*. 2009;29(6):313-26.
85. Lloyd CM, Minto AW, Dorf ME, Proudfoot A, Wells TN, Salant DJ, et al. RANTES and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) play an important role in the inflammatory phase of crescentic nephritis, but only MCP-1 is involved in crescent formation and interstitial fibrosis. *The Journal of experimental medicine*. 1997;185(7):1371-80.
86. Castellani ML, De Lutiis MA, Toniato E, Conti F, Felaco P, Fulcheri M, et al. Impact of RANTES, MCP-1 and IL-8 in mast cells. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*. 2010;24(1):1-6.



87. Gu L, Tseng S, Horner RM, Tam C, Loda M, Rollins BJ. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature*. 2000;404(6776):407-11.
88. Gao W, Faia KL, Csizmadia V, Smiley ST, Soler D, King JA, et al. Beneficial effects of targeting CCR5 in allograft recipients. *Transplantation*. 2001;72(7):1199-205.
89. Horiguchi K, Kitagawa-Sakakida S, Sawa Y, Li ZZ, Fukushima N, Shirakura R, et al. Selective chemokine and receptor gene expressions in allografts that develop transplant vasculopathy. *The Journal of heart and lung transplantation : the official publication of the International Society for Heart Transplantation*. 2002;21(10):1090-100.
90. Thorburn E, Kolesar L, Brabcova E, Petrickova K, Petricek M, Jaresova M, et al. CXC and CC chemokines induced in human renal epithelial cells by inflammatory cytokines. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2009;117(7):477-87.
91. Kim SC, Page EK, Knechtle SJ. Urine proteomics in kidney transplantation. *Transplantation reviews (Orlando, Fla)*. 2014;28(1):15-20.
92. Obermuller N, Geiger H, Weipert C, Urbschat A. Current developments in early diagnosis of acute kidney injury. *International urology and nephrology*. 2014;46(1):1-7.
93. Rice JC, Spence JS, Yetman DL, Safirstein RL. Monocyte chemoattractant protein-1 expression correlates with monocyte infiltration in the post-ischemic kidney. *Renal failure*. 2002;24(6):703-23.
94. Xia M, Sui Z. Recent developments in CCR2 antagonists. *Expert opinion on therapeutic patents*. 2009;19(3):295-303.
95. Daly C, Rollins BJ. Monocyte chemoattractant protein-1 (CCL2) in inflammatory disease and adaptive immunity: therapeutic opportunities and controversies. *Microcirculation (New York, NY : 1994)*. 2003;10(3-4):247-57.
96. Klussmann S, Nolte A, Bald R, Erdmann VA, Furste JP. Mirror-image RNA that binds D-adenosine. *Nature biotechnology*. 1996;14(9):1112-5.
97. Hancock WW, Wang L, Ye Q, Han R, Lee I. Chemokines and their receptors as markers of allograft rejection and targets for immunosuppression. *Curr Opin Immunol*. 2003;15(5):479-86.
98. Darisipudi MN, Kulkarni OP, Sayyed SG, Ryu M, Migliorini A, Sagrinati C, et al. Dual blockade of the homeostatic chemokine CXCL12 and the proinflammatory chemokine CCL2 has additive protective effects on diabetic kidney disease. *Am J Pathol*. 2011;179(1):116-24.
99. Kulkarni O, Eulberg D, Selve N, Zollner S, Allam R, Pawar RD, et al. Anti-Ccl2 Spiegelmer permits 75% dose reduction of cyclophosphamide to control diffuse proliferative lupus nephritis and pneumonitis in MRL-Fas(lpr) mice. *J Pharmacol Exp Ther*. 2009;328(2):371-7.
100. Ninichuk V, Clauss S, Kulkarni O, Schmid H, Segerer S, Radomska E, et al. Late onset of Ccl2 blockade with the Spiegelmer mNOX-E36-3'PEG prevents glomerulosclerosis and improves glomerular filtration rate in db/db mice. *Am J Pathol*. 2008;172(3):628-37.
101. Kulkarni O, Anders HJ. CCL2/MCP-1 als neues Target beim systemischen Lupus erythematodes und der Lupusnephritis. *Z Rheumatol*. 2008;67(3):220-4.
102. Kulkarni O, Pawar RD, Purschke W, Eulberg D, Selve N, Buchner K, et al. Spiegelmer Inhibition of CCL2/MCP-1 Ameliorates Lupus Nephritis in MRL-(Fas)lpr Mice. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2007;18(8):2350-8.
103. Kalnins A, Thomas MN, Andrassy M, Muller S, Wagner A, Pratschke S, et al. Spiegelmer-Inhibition of MCP-1/CCR2 - potential as an adjunct immunosuppressive therapy in transplantation. *Scand J Immunol*. 2015.
104. Lubkowski J, Bujacz G, Boque L, Domaille PJ, Handel TM, Wlodawer A. The structure of MCP-1 in two crystal forms provides a rare example of variable quaternary interactions. *Nature structural biology*. 1997;4(1):64-9.
105. Iversen P, Brun C. Aspiration biopsy of the kidney. *Am J Med*. 1951;11(3):324-30.
106. Kark RM, Muehrcke RC. Biopsy of kidney in prone position. *Lancet*. 1954;266(6821):1047-9.
107. Korbet SM. Percutaneous renal biopsy. *Semin Nephrol*. 2002;22(3):254-67.
108. Mendelssohn DC, Cole EH. Outcomes of percutaneous kidney biopsy, including those of solitary native kidneys. *Am J Kidney Dis*. 1995;26(4):580-5.
109. Whittier WL, Korbet SM. Renal biopsy: update. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2004;13(6):661-5.

110. Franke M, Kramarczyk A, Taylan C, Maintz D, Hoppe B, Koerber F. Ultrasound-guided percutaneous renal biopsy in 295 children and adolescents: role of ultrasound and analysis of complications. *PloS one*. 2014;9(12):e114737.
111. Grant EG, Perrella RR. Wishing won't make it so: duplex Doppler sonography in the evaluation of renal transplant dysfunction. *AJR American journal of roentgenology*. 1990;155(3):538-9.
112. Granata A, Di Nicolo P, Scarfia VR, Insalaco M, Lentini P, Veroux M, et al. Renal transplantation parenchymal complications: what Doppler ultrasound can and cannot do. *Journal of ultrasound*. 2015;18(2):109-16.
113. Khosroshahi HT, Tarzamani M, Oskui RA. Doppler ultrasonography before and 6 to 12 months after kidney transplantation. *Transplant Proc*. 2005;37(7):2976-81.
114. Linkowski GD, Warvariv V, Filly RA, Vincenti F. Sonography in the diagnosis of acute renal allograft rejection and cyclosporine nephrotoxicity. *AJR American journal of roentgenology*. 1987;148(2):291-5.
115. Kelcz F, Pozniak MA, Pirsch JD, Oberly TD. Pyramidal appearance and resistive index: insensitive and nonspecific sonographic indicators of renal transplant rejection. *AJR American journal of roentgenology*. 1990;155(3):531-5.
116. Radermacher J, Mengel M, Ellis S, Stuh S, Hiss M, Schwarz A, et al. The renal arterial resistance index and renal allograft survival. *N Engl J Med*. 2003;349(2):115-24.
117. Irshad A, Ackerman SJ, Campbell AS, Anis M. An overview of renal transplantation: current practice and use of ultrasound. *Seminars in ultrasound, CT, and MR*. 2009;30(4):298-314.
118. Grzelak P, Szymczyk K, Strzelczyk J, Kurnatowska I, Sapięha M, Nowicki M, et al. Perfusion of kidney graft pyramids and cortex in contrast-enhanced ultrasonography in the determination of the cause of delayed graft function. *Annals of transplantation : quarterly of the Polish Transplantation Society*. 2011;16(1):48-53.
119. Idee JM, Fretellier N, Robic C, Corot C. The role of gadolinium chelates in the mechanism of nephrogenic systemic fibrosis: A critical update. *Critical reviews in toxicology*. 2014;44(10):895-913.
120. Aime S, Caravan P. Biodistribution of gadolinium-based contrast agents, including gadolinium deposition. *J Magn Reson Imaging*. 2009;30(6):1259-67.
121. Notohamiprodjo M, Glaser C, Herrmann KA, Dietrich O, Attenberger UI, Reiser MF, et al. Diffusion tensor imaging of the kidney with parallel imaging: initial clinical experience. *Investigative radiology*. 2008;43(10):677-85.
122. Notohamiprodjo M, Reiser MF, Sourbron SP. Diffusion and perfusion of the kidney. *European journal of radiology*. 2010;76(3):337-47.
123. Notohamiprodjo M, Sourbron S, Staehler M, Michaely HJ, Attenberger UI, Schmidt GP, et al. Measuring perfusion and permeability in renal cell carcinoma with dynamic contrast-enhanced MRI: a pilot study. *J Magn Reson Imaging*. 2010;31(2):490-501.
124. Notohamiprodjo M, Staehler M, Steiner N, Schwab F, Sourbron SP, Michaely HJ, et al. Combined diffusion-weighted, blood oxygen level-dependent, and dynamic contrast-enhanced MRI for characterization and differentiation of renal cell carcinoma. *Acad Radiol*. 2013;20(6):685-93.
125. Lanzman RS, Ljimini A, Pentang G, Zgoura P, Zenginli H, Kropil P, et al. Kidney transplant: functional assessment with diffusion-tensor MR imaging at 3T. *Radiology*. 2013;266(1):218-25.
126. Blondin D, Lanzman RS, Mathys C, Grottemeyer D, Voiculescu A, Sandmann W, et al. [Functional MRI of transplanted kidneys using diffusion-weighted imaging]. *Rofo*. 2009;181(12):1162-7.
127. Hueper K, Hartung D, Gutberlet M, Gueler F, Sann H, Husen B, et al. Magnetic resonance diffusion tensor imaging for evaluation of histopathological changes in a rat model of diabetic nephropathy. *Investigative radiology*. 2012;47(7):430-7.
128. Hueper K, Rong S, Gutberlet M, Hartung D, Mengel M, Lu X, et al. T2 relaxation time and apparent diffusion coefficient for noninvasive assessment of renal pathology after acute kidney injury in mice: comparison with histopathology. *Investigative radiology*. 2013;48(12):834-42.

129. Eisenberger U, Binser T, Thoeny HC, Boesch C, Frey FJ, Vermathen P. Living renal allograft transplantation: diffusion-weighted MR imaging in longitudinal follow-up of the donated and the remaining kidney. *Radiology*. 2014;270(3):800-8.
130. Eisenberger U, Thoeny HC, Binser T, Gugger M, Frey FJ, Boesch C, et al. Evaluation of renal allograft function early after transplantation with diffusion-weighted MR imaging. *European radiology*. 2010;20(6):1374-83.
131. Thoeny HC, Zumstein D, Simon-Zoula S, Eisenberger U, De Keyzer F, Hofmann L, et al. Functional evaluation of transplanted kidneys with diffusion-weighted and BOLD MR imaging: initial experience. *Radiology*. 2006;241(3):812-21.
132. Tse GH, Hughes J, Marson LP. Systematic review of mouse kidney transplantation. *Transpl Int*. 2013;26(12):1149-60.
133. Zhang Z, Schlachta C, Duff J, Stiller C, Grant D, Zhong R. Improved techniques for kidney transplantation in mice. *Microsurgery*. 1995;16(2):103-9.
134. Martins PN. Learning curve, surgical results and operative complications for kidney transplantation in mice. *Microsurgery*. 2006;26(8):590-3.
135. Dunn CJ, Wagstaff AJ, Perry CM, Plosker GL, Goa KL. Cyclosporin: an updated review of the pharmacokinetic properties, clinical efficacy and tolerability of a microemulsion-based formulation (neoral)<sup>1</sup> in organ transplantation. *Drugs*. 2001;61(13):1957-2016.
136. Shiogai Y, Stefanovska A, McClintock PVE. Nonlinear dynamics of cardiovascular ageing. *Physics Reports*. 2010;488(2-3):51-110.
137. Babos L, Jarai Z, Nemcsik J. Evaluation of microvascular reactivity with laser Doppler flowmetry in chronic kidney disease. *World J Nephrol*. 2013;2(3):77-83.
138. Lauterbur PC. Image formation by induced local interactions. Examples employing nuclear magnetic resonance. 1973. *Clin Orthop Relat Res*. 1989(244):3-6.
139. Lauterbur PC. Nobel Lecture. All science is interdisciplinary--from magnetic moments to molecules to men. *Biosci Rep*. 2004;24(3):165-78.
140. Bloembergen N, Purcell EM, Pound RV. Nuclear magnetic relaxation. *Nature*. 1947;160(4066):475.
141. Bloch F. Nuclear Induction. *Physical Review*. 1946;70(7-8):460-74.
142. Odeblad E, Lindstrom G. Some preliminary observations on the proton magnetic resonance in biologic samples. *Acta radiologica (Stockholm, Sweden : 1987)*. 1955;43(6):469-76.
143. Plewes DB, Kucharczyk W. Physics of MRI: a primer. *J Magn Reson Imaging*. 2012;35(5):1038-54.
144. Hahn EL. Spin Echoes. *Physical Review*. 1950;80(4):580-94.
145. Bitar R, Leung G, Perng R, Tadros S, Moody AR, Sarrazin J, et al. MR pulse sequences: what every radiologist wants to know but is afraid to ask. *Radiographics*. 2006;26(2):513-37.
146. Meiboom S GD. Modified Spin-Echo Method for Measuring Nuclear Relaxation Times. *Review of Scientific Instruments*. 1958;29(8):688-91.
147. Twieg DB. The k-trajectory formulation of the NMR imaging process with applications in analysis and synthesis of imaging methods. *Medical physics*. 1983;10(5):610-21.
148. Carr HY, Purcell EM. Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments. *Physical Review*. 1954;94(3):630-8.
149. Hagmann P, Jonasson L, Maeder P, Thiran JP, Wedeen VJ, Meuli R. Understanding diffusion MR imaging techniques: from scalar diffusion-weighted imaging to diffusion tensor imaging and beyond. *Radiographics*. 2006;26 Suppl 1:S205-23.
150. Heiland S, Sartor K. [Magnetic resonance tomography in stroke--its methodological bases and clinical use]. *Rofo*. 1999;171(1):3-14.
151. Le Bihan D, Turner R, Douek P, Patronas N. Diffusion MR imaging: clinical applications. *AJR American journal of roentgenology*. 1992;159(3):591-9.
152. Mori S, Barker PB. Diffusion magnetic resonance imaging: its principle and applications. *Anat Rec*. 1999;257(3):102-9.
153. Le Bihan D, Turner R, Douek P, Patronas N. Diffusion MR imaging: clinical applications. *AJR American journal of roentgenology*. 1992;159(3):591-9.

154. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Aubin ML, Vignaud J, Laval-Jeantet M. Separation of diffusion and perfusion in intravoxel incoherent motion MR imaging. *Radiology*. 1988;168(2):497-505.
155. Le Bihan D, Breton E, Lallemand D, Grenier P, Cabanis E, Laval-Jeantet M. MR imaging of intravoxel incoherent motions: application to diffusion and perfusion in neurologic disorders. *Radiology*. 1986;161(2):401-7.
156. Stejskal E, Tanner J. Spin diffusion measurements: spin echoes in the presence of a time-dependent field gradient. *The journal of chemical physics*. 1965;42(1):288-92.
157. Moseley ME, Kucharczyk J, Mintorovitch J, Cohen Y, Kurhanewicz J, Derugin N, et al. Diffusion-weighted MR imaging of acute stroke: correlation with T2-weighted and magnetic susceptibility-enhanced MR imaging in cats. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1990;11(3):423-9.
158. Yang D, Ye Q, Williams DS, Hitchens TK, Ho C. Normal and transplanted rat kidneys: diffusion MR imaging at 7 T. *Radiology*. 2004;231(3):702-9.
159. Shah B, Anderson SW, Scalera J, Jara H, Soto JA. Quantitative MR imaging: physical principles and sequence design in abdominal imaging. *Radiographics*. 2011;31(3):867-80.
160. Thoeny HC, De Keyzer F. Diffusion-weighted MR imaging of native and transplanted kidneys. *Radiology*. 2011;259(1):25-38.
161. Thoeny HC, De Keyzer F, Oyen RH, Peeters RR. Diffusion-weighted MR imaging of kidneys in healthy volunteers and patients with parenchymal diseases: initial experience. *Radiology*. 2005;235(3):911-7.
162. Thoeny HC, Grenier N. Science to practice: Can diffusion-weighted MR imaging findings be used as biomarkers to monitor the progression of renal fibrosis? *Radiology*. 2010;255(3):667-8.
163. Togao O, Doi S, Kuro-o M, Masaki T, Yorioka N, Takahashi M. Assessment of renal fibrosis with diffusion-weighted MR imaging: study with murine model of unilateral ureteral obstruction. *Radiology*. 2010;255(3):772-80.
164. Wittsack HJ, Lanzman RS, Quentin M, Kuhlemann J, Klasen J, Pentang G, et al. Temporally resolved electrocardiogram-triggered diffusion-weighted imaging of the human kidney: correlation between intravoxel incoherent motion parameters and renal blood flow at different time points of the cardiac cycle. *Investigative radiology*. 2012;47(4):226-30.
165. Song T, Laine AF, Chen Q, Rusinek H, Bokacheva L, Lim RP, et al. Optimal k-space sampling for dynamic contrast-enhanced MRI with an application to MR renography. *Magnetic Resonance in Medicine*. 2009;61(5):1242-8.
166. Chandarana H, Lee VS. Renal functional MRI: Are we ready for clinical application? *AJR American journal of roentgenology*. 2009;192(6):1550-7.
167. Fenchel M, Martirosian P, Langanke J, Giersch J, Miller S, Stauder NI, et al. Perfusion MR imaging with FAIR true FISP spin labeling in patients with and without renal artery stenosis: initial experience. *Radiology*. 2006;238(3):1013-21.
168. Khalifa F, Soliman A, El-Baz A, Abou El-Ghar M, El-Diasty T, Gimel'farb G, et al. Models and methods for analyzing DCE-MRI: a review. *Medical physics*. 2014;41(12):124301.
169. Lee VS, Rusinek H, Noz ME, Lee P, Raghavan M, Kramer EL. Dynamic Three-dimensional MR Renography for the Measurement of Single Kidney Function: Initial Experience. *Radiology*. 2003;227(1):289-94.
170. Michaely HJ, Sourbron SP, Buettner C, Lodemann KP, Reiser MF, Schoenberg SO. Temporal constraints in renal perfusion imaging with a 2-compartment model. *Investigative radiology*. 2008;43(2):120-8.
171. Zollner FG, Zimmer F, Klotz S, Hoeger S, Schad LR. Renal perfusion in acute kidney injury with DCE-MRI: deconvolution analysis versus two-compartment filtration model. *Magn Reson Imaging*. 2014;32(6):781-5.
172. Oostendorp M, de Vries EE, Slenter JM, Peutz-Kootstra CJ, Snoeijs MG, Post MJ, et al. MRI of renal oxygenation and function after normothermic ischemia-reperfusion injury. *NMR Biomed*. 2011;24(2):194-200.

173. Rohrer M, Bauer H, Mintorovitch J, Requardt M, Weinmann HJ. Comparison of magnetic properties of MRI contrast media solutions at different magnetic field strengths. *Investigative radiology*. 2005;40(11):715-24.
174. Van Vaals JJ, Brummer ME, Thomas Dixon W, Tuithof HH, Engels H, Nelson RC, et al. "Keyhole" method for accelerating imaging of contrast agent uptake. *Journal of Magnetic Resonance Imaging*. 1993;3(4):671-5.
175. Spiegelman S, Watson KF, Kacian DL. Synthesis of DNA Complements of Natural RNAs: A General Approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1971;68(11):2843-5.
176. Johnston DR, Sayegh MH, Madsen JC. Overcoming cardiac allograft vasculopathy (CAV) by inducing tolerance. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2002;7:e116-8.
177. Green JA, Cooperband SR, Kibrick S. Immune specific induction of interferon production in cultures of human blood lymphocytes. *Science*. 1969;164(3886):1415-7.
178. Gray PW, Goeddel DV. Structure of the human immune interferon gene. *Nature*. 1982;298(5877):859-63.
179. Harris J, Keane J. How tumour necrosis factor blockers interfere with tuberculosis immunity. *Clin Exp Immunol*. 2010;161(1):1-9.
180. Rahman MM, McFadden G. Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathogens*. 2006;2(2):e4.
181. Hehlgans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115(1):1-20.
182. Moore PA, Belvedere O, Orr A, Pieri K, LaFleur DW, Feng P, et al. BLYS: member of the tumor necrosis factor family and B lymphocyte stimulator. *Science*. 1999;285(5425):260-3.
183. Xu H, Ma X, He X, Dong P, Xue D, Zhang Y, et al. Serum miR-338-5p, soluble B-cell-activating factor, allo-antibodies, and renal transplantation. *Transplant Proc*. 2015;47(2):337-42.
184. Hricak H, Terrier F, Marotti M, Engelstad BL, Filly RA, Vincenti F, et al. Posttransplant renal rejection: comparison of quantitative scintigraphy, US, and MR imaging. *Radiology*. 1987;162(3):685-8.
185. Palmucci S, Cappello G, Attina G, Foti PV, Siverino RO, Roccasalva F, et al. Diffusion weighted imaging and diffusion tensor imaging in the evaluation of transplanted kidneys. *European journal of radiology open*. 2015;2:71-80.
186. Blondin D, Lanzman RS, Klasen J, Scherer A, Miese F, Kropil P, et al. Diffusion-attenuated MRI signal of renal allografts: comparison of two different statistical models. *AJR American journal of roentgenology*. 2011;196(6):W701-5.
187. Abou-El-Ghar ME, El-Diasty TA, El-Assmy AM, Refaie HF, Refaie AF, Ghoneim MA. Role of diffusion-weighted MRI in diagnosis of acute renal allograft dysfunction: a prospective preliminary study. *The British journal of radiology*. 2012;85(1014):e206-11.
188. Geijer B, Sundgren PC, Lindgren A, Brockstedt S, Stahlberg F, Holtas S. The value of b required to avoid T2 shine-through from old lacunar infarcts in diffusion-weighted imaging. *Neuroradiology*. 2001;43(7):511-7.
189. Aktas A, Aras M, Colak T, Gencoglu A, Moray G. Indicators of acute rejection on Tc-99m DTPA renal scintigraphy. *Transplant Proc*. 2006;38(2):443-8.
190. Notghi A, Merrick MV, Anderton JL, Yates PA. Value of the gamma camera renogram in the differential diagnosis of acute tubular necrosis and rejection in the early post-transplant period. Comparison with biopsy findings. *British journal of urology*. 1989;63(6):594-9.
191. Belperio JA, Keane MP, Burdick MD, Lynch JP, 3rd, Xue YY, Berlin A, et al. Critical role for the chemokine MCP-1/CCR2 in the pathogenesis of bronchiolitis obliterans syndrome. *The Journal of clinical investigation*. 2001;108(4):547-56.
192. Abdi R, Means TK, Ito T, Smith RN, Najafian N, Jurewicz M, et al. Differential role of CCR2 in islet and heart allograft rejection: tissue specificity of chemokine/chemokine receptor function in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2004;172(2):767-75.
193. Lee I, Wang L, Wells AD, Ye Q, Han R, Dorf ME, et al. Blocking the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 chemokine pathway induces permanent survival of islet allografts through a

programmed death-1 ligand-1-dependent mechanism. *Journal of immunology* (Baltimore, Md : 1950). 2003;171(12):6929-35.

194. Nishihara K, Masuda S, Shinke H, Ozawa A, Ichimura T, Yonezawa A, et al. Urinary chemokine (C-C motif) ligand 2 (monocyte chemoattractant protein-1) as a tubular injury marker for early detection of cisplatin-induced nephrotoxicity. *Biochemical pharmacology*. 2013;85(4):570-82.

195. Ehling J, Bartneck M, Wei X, Gremse F, Fecht V, Mockel D, et al. CCL2-dependent infiltrating macrophages promote angiogenesis in progressive liver fibrosis. *Gut*. 2014;63(12):1960-71.

196. Broecker V, Mengel M. The significance of histological diagnosis in renal allograft biopsies in 2014. *Transpl Int*. 2015;28(2):136-45.

197. Winter KS, Helck AD, Ingrisich M, Staehler M, Stief C, Sommer WH, et al. Dynamic contrast-enhanced magnetic resonance imaging assessment of kidney function and renal masses: single slice versus whole organ/tumor. *Investigative radiology*. 2014;49(11):720-7.

198. Hueper K, Gutberlet M, Brasen JH, Jang MS, Thorenz A, Chen R, et al. Multiparametric Functional MRI: Non-Invasive Imaging of Inflammation and Edema Formation after Kidney Transplantation in Mice. *PloS one*. 2016;11(9):e0162705.

199. Hueper K, Hensen B, Gutberlet M, Chen R, Hartung D, Barrmeyer A, et al. Kidney Transplantation: Multiparametric Functional Magnetic Resonance Imaging for Assessment of Renal Allograft Pathophysiology in Mice. *Investigative radiology*. 2016;51(1):58-65.

## 9. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 9.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Diagnose bei Beginn einer Nierenersatztherapie in Deutschland (9).....	8
Abbildung 2: Nierenersatzverfahren in Deutschland von 1995 bis 2006 (9). ....	9
Abbildung 3: Serum-Kreatinin im Zeitverlauf nach Transplantation (55). ....	13
Abbildung 4: Akute Abstoßung schematisch dargestellt (60). ....	15
Abbildung 5: CCL2 2D-Struktur (84). ....	19
Abbildung 6: CCL2 Dimer 3D-Struktur (104). ....	19
Abbildung 7: Intraoperative Übersicht der Nierentransplantation. (Von Dr. A. Kalnins zur Verfügung gestellt).....	26
Abbildung 8: Laser Doppler Flussmessung (136).....	28
Abbildung 9: Messvorbereitung.....	29
Abbildung 10: Spin Echo Sequenz im zeitlichen Verlauf (145).....	31
Abbildung 11: k-Raum (143).....	32
Abbildung 12 TWIST Technik (165). ....	36
Abbildung 13: PMI 0.4 Diffusion.....	41
Abbildung 14: Diffusion monoexponentiell. ....	41
Abbildung 15: PMI 0.4 Perfusion.....	42
Abbildung 16: Perfusionsanalyse. ....	42
Abbildung 17: Laser Doppler Flussmessung Ergebnisse.....	47
Abbildung 18: Diffusionsgewichtete Bildgebung Ergebnisse. ....	48
Abbildung 19: ADC-Map (links) und T2-Bild (rechts) einer Therapiekontrolle. ....	49
Abbildung 20: Plasmafluss -Ergebnisse. ....	50
Abbildung 21: Plasmafluss von Nierentransplantaten. ....	51
Abbildung 22: Histologie Ergebnisse. ....	53
Abbildung 23: Histologie der Transplantatnieren in 200-facher Vergrößerung. (A. Wagner).....	54
Abbildung 24: RT-PCR Ergebnisse. ....	56
Abbildung 25: Immunhistochemie F4/80 Ergebnisse. ....	57
Abbildung 26: Monozyteninfiltration in F4/80-Färbung in 40-facher Vergrößerung. (A. Kalnins). ....	58
Abbildung 27: Korrelationen der Einzelergebnisse. ....	58

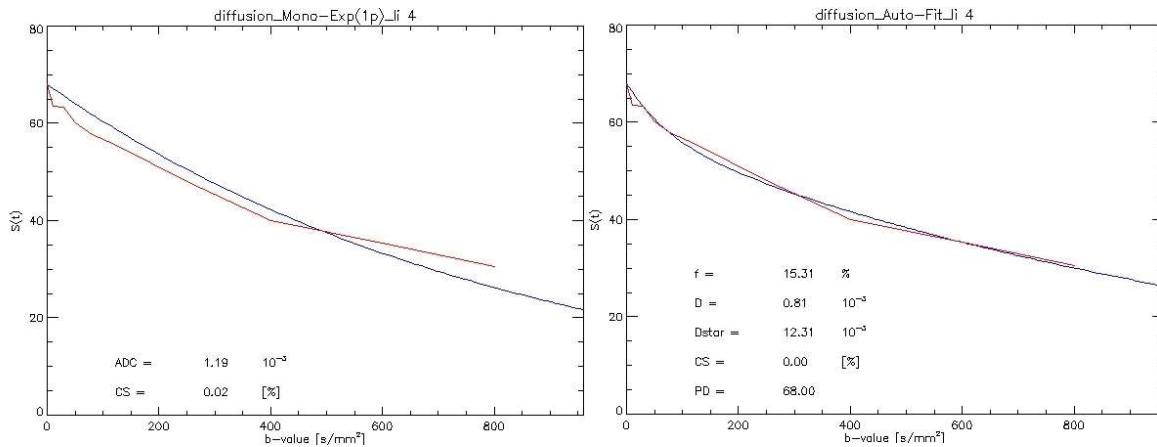
## 9.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Einteilung der akuten Nierenschädigung nach KDIGO in drei Stadien gemäß der Serum-Kreatinin-Konzentration und der Urinausscheidung (3). .....	6
Tabelle 2: CGA-Klassifizierung für die chronische Nierenschädigung mit einer farbkodierten Stratifizierung für ein schlechtes Gesamtüberleben (6). .....	7
Tabelle 3: Übersicht aktueller Medikamentenoptionen nach Nierentransplantation. ....	10
Tabelle 4: Nebenwirkungen der Immunsuppression (5). .....	11
Tabelle 5: Banff Update 2013 für diagnostische Methoden der akuten Abstoßung (62, 74). .....	15
Tabelle 6: Banff Update 2013 für chronische Abstoßung (62, 74). .....	16
Tabelle 7: Gruppenzuordnung. ....	27
Tabelle 8: T2 TSE-Sequenz koronar. ....	38
Tabelle 9: T2 TSE-Sequenz axial. ....	38
Tabelle 10: IVIM-Sequenz axial. ....	39
Tabelle 11: TWIST-Sequenz axial. ....	39
Tabelle 12: Materialienliste Histologie. ....	44
Tabelle 13: RT-PCR Primer. ....	45
Tabelle 14: Material Immunhistochemie. ....	46
Tabelle 15: Ergebnisse von mean transit time (in s) und volume of distribution (in ml/100ml). ....	51
Tabelle 16: Histologie Ergebnisse. ....	52
Tabelle 17: Histologie Banff-Scores der einzelnen Gruppen. ....	53



## 10. Anhang

### 10.1. Zusätzliche Bilddokumente



Unterschiedliche Berechnungsformen in der diffusionsgewichteten MRT, links die monoexponentielle Berechnung und rechts durch einen komplexen *auto-fit*-Algorithmus mit besserer Angleichung an die gemessenen Werte.

Die in dieser Studie gemessenen IVIM Daten waren nicht konklusiv und sind somit nicht teil der Auswertung. Im Sinne der Vollständigkeit findet sich in der folgenden Tabelle eine Übersicht.

Gruppe	True diffusion D*
Syngen	8,6 ± 7,4
revmNOX-E36	11,8 ± 12,4
mNOX-E36	3,1 ± 0,3
CsA	17,2 ± 21,2
CsA + mNOX-E36	8,0 ± 5,2

## **10.2. Preise im Zusammenhang mit der Dissertation**

Auf dem Deutschen Röntgenkongresses 2013 in Hamburg wurde Prof. Dr. med. Mike Notohamiprodjo mit dem Young Investigator Award für dieses Thema von der Deutschen Röntgengesellschaft ausgezeichnet.

Auf der DoktaMed 2012 in München wurde ich mit dem Posterpreis für die beste Präsentation ausgezeichnet.

Auf der 23rd European Students' Conference 2013 in Berlin mit dem Thema „Trends in Transplantation“ wurde ich als Winner of Session Radiologyausgelobt.

## **10.3. Originalartikel**

Notohamiprodjo M, Kalnins A, Andrassy M, et al. Multiparametric Functional MRI: A Tool to Uncover Subtle Changes following Allogeneic Renal Transplantation.

PLoS One. 2016;11(11):e0165532. Published 2016 Nov 7.

doi:10.1371/journal.pone.0165532

## 10.4. Journalistische Artikel in Zusammenhang mit der Dissertation

Für das Nachwuchsportal [www.hellste-köpfe.de](http://www.hellste-köpfe.de) der Deutschen Röntgen Gesellschaft veröffentlichte Dorothee Oestreicher am 11.02.2013 folgenden Artikel.

### Der Traum einer virtuellen Nierenbiopsie - Was Bildgebung mit Transplantatabstoßung verbindet ein Promotionsbericht aus der Radiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Dorothee Oestreicher, 11.02.2013

*Wie kann funktionelle MR-Bildgebung die Therapie bei Nierentransplantationen unterstützen? Mit dieser Frage beschäftigt sich Manuel Kolb in seiner Dissertation, die er an der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU) schreibt. Die Bildgebung an der LMU teilt sich in das Institut für Klinische Radiologie und in die Abteilung für Neuroradiologie; mit der Nuklearmedizin besteht eine enge Kooperation. Am Campus Großhadern treffe ich Manuel und den Betreuer seiner Doktorarbeit, PD Dr. Mike Notohamiprodjo, um mehr über Ihr spannendes Forschungsprojekt zu erfahren.*



PD Dr. Notohamiprodjo und Manuel Kolb (Foto: Matthias Francke)

#### Worum geht es bei der Doktorarbeit?

Die Kernidee der Doktorarbeit lässt sich kurz zusammenfassen: funktionelle MR- Bildgebung am Mausmodell bei Nierentransplantaten zu verwenden. Aber wozu? Manuel erklärt das so: „ Nach einer Transplantation möchte man Aussagen über den Zustand und Therapieerfolg treffen. Vor allem, wenn es um Abstoßungsreaktionen geht, ist es wichtig, zwischen ‚echten‘ Abstoßungen zu unterscheiden und denen, die durch Ischämieschäden verursacht werden.“ Bei Tieren kann man Abstoßungen simulieren und treatments testen. Mittels MRT werden dann die Mäuse gemessen: Hierfür werden spezielle Methoden angewendet; so genannte Diffusions- gewichtete (DWI) Messungen sowie die dynamische kontrastmittelverstärkte Perfusions-MRT (*dynamic contrast-enhanced, DCE- MRT*) (siehe auch unten).

## Klinischer Hintergrund

Bei Patienten mit Nierentransplantation können Abstoßungsreaktionen auftreten, die einer umgehenden Therapie bedürfen. Zur Abklärung einer Abstoßungsreaktion werden Biopsien des Nierentransplantates durchgeführt. Für eine Optimierung der Behandlung, d.h. eine Abwägung zwischen Transplantatverlust und –erhalt sowie Nebenwirkungen der eingesetzten Präparate und Methoden, ist Forschung unerlässlich.

## Wie kommt man an eine solche Doktorarbeit und was macht die Betreuung aus?

Manuel, der 23 Jahre alt ist und im neunten Semester an der LMU studiert, lernte seinen jetzigen Betreuer während einer Famulatur kennen. Während dieser Zeit entstand auch sein Wunsch, die Doktorarbeit in diesem Bereich zu schreiben, denn da, so erzählt Manuel heute, hat „das Fach es geschafft, mich in der Praxis zu fesseln. Während der Uni war das nicht der Fall.“ Herr PD Dr. Notohamiprodjo als Betreuer war damit ein Glücksfall für Manuel, denn er ist mit Abläufen an der Universität bestens vertraut: Nach dem Studium an der LMU absolvierte er seine Assistenzarztzeit - neben einem Auslandsaufenthalt am Langone Medical Center New York - am Institut für Klinische Radiologie und krönte diesen Weg mit der Habilitation 2012. Manuel begann seine Doktorarbeit im Oktober 2011 und muss nun die Daten zusammenführen und die Dissertation schreiben. „Eine große Hilfe ist, dass ich mit meinem Betreuer in ständigem Kontakt stehe und ihn mindestens einmal im Monat persönlich treffe“, berichtet Manuel.

## Wie gestaltet sich die Arbeitsaufteilung?

Während Herr PD Notohamiprodjo für die Planung und Techniken verantwortlich war und Dr. Aivars Kalnins die Operationen durchführte, erzählt Manuel: „Meine Hauptaufgabe bestand darin, neben der Vorbereitung der Tiere und Entnahme der Niere die MRT-Messungen durchzuführen. Und natürlich musste ich danach dann diese Daten auswerten.“ Aber das ist nicht alles, in Projekten dieser Größe ist auch Interdisziplinarität gefordert: „Nicht nur wir allein arbeiten an der Studie, wir haben eng mit der Chirurgie der LMU, vor allem persönlich unterstützt durch Herrn Dr. Kalnins und Herrn PD. Dr. Andrassy, zusammengearbeitet. Und wir wurden auch durch die Arbeitsgruppe Experimentelle Radiologie unter Leitung von Prof. Nikolaou unterstützt.“

## Das Ziel vor Augen

Sein Ziel, die Nieren bewerten zu können, hat Manuel soweit erreicht. Die Perfusions- und Diffusionsbildgebung hat sich dabei unter diversen Techniken und Methoden als zuverlässig und aussagekräftig etabliert. Manuels Arbeit ist eng verknüpft mit den wissenschaftlichen Fragestellungen seines Betreuers (siehe unten). Ein wichtiger Aspekt ist auch die Übertragung der Erkenntnisse beziehungsweise die Bedeutung für den Menschen. Ein Ziel der Studien ist es, Patienten in Zukunft eine virtuelle Biopsie anbieten zu können. Dafür bleibt aber noch Entwicklungspotential. „Der Traum einer virtuellen Nierenbiopsie ist noch nicht erreicht“, erklärt er, „denn bei Menschen müssen noch viele andere Faktoren wie beispielsweise Bewegungskorrektur in die Überlegungen mit einbezogen werden.“

## Doktorarbeit im Rahmen des Doktorandenkollegs: eine neue Idee

Hilfreich für eine gelungene Doktorarbeit sind nicht nur die persönlichen Zusammentreffen. Herrn PD Notohamiprodjo initiierte das „Doktorandenkolleg“, das 14tägig in Großhadern stattfindet. Themen wie „Abstract/ Poster/ Paper“, „Statistik für Einsteiger“, „Berufsbild Radiologie und Gender Aspekte“ werden verknüpft, darüber hinaus gibt es die Möglichkeit für die Studenten, ihre Arbeit vorzustellen - und das alles unter jeweiligem Teaching eines erfahrenen Radiologen. „Nicht nur, dass der Austausch untereinander gefördert wird“, findet Manuel positiv, sondern vor allem, dass „gerade in den Vorträgen der Ärzte wichtige Punkte für den Beruf Radiologe aufgezeigt werden“. Für alle Interessenten hat die Uni rund um die Doktorarbeiten am Institut für Klinische Radiologie übrigens auch Informationen unter [http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Institut-fuer-Klinische-Radiologie/de/Lehre/info\\_fuer\\_doktoranden/index.html](http://www.klinikum.uni-muenchen.de/Institut-fuer-Klinische-Radiologie/de/Lehre/info_fuer_doktoranden/index.html) zusammengestellt.

## Preisgekrönt

Für ihre Arbeit wurden beide bereits ausgezeichnet: Manuel stellte seine Arbeit auf der Doktorandenmesse und mit Auszeichnung auf dem Studentenkongress DoktaMed der LMU vor: „Die dort vergebene Forschungsförderung setzte ich für die aktive Teilnahme an der 23. European Students' Conference in Berlin ein. Auf diesem internationalen Studentenkongress stellte ich meine Daten erneut mit einer Posterpräsentation vor und bekam anschließend als ‚Winner of Session Radiology‘ die Gelegenheit, die LMU Radiologie mit meiner Doktorarbeit in einem Vortrag zu vertreten.“

Die Fragestellung „Kombinierte IVIM-DTI zur MRT-Untersuchung der Fluss- und Diffusionsanisotropie der Niere“ von Herrn PD Dr. Notohamiprodjo wurde als einer der Beiträge bereits während des Röntgenkongresses 2012 im Rahmen des Young Investigator Awards präsentiert. Für die Studie am Menschen erhielt er den Magna cum laude Award bei der International Society of Magnetic Resonance in Medicine (ISMRM) in Melbourne. Auch wird die vorgestellte Arbeit nun durch die Förderung für Forschung und Lehre (FöFoLe) der Universität finanziell gefördert.



## Und für die Zukunft...

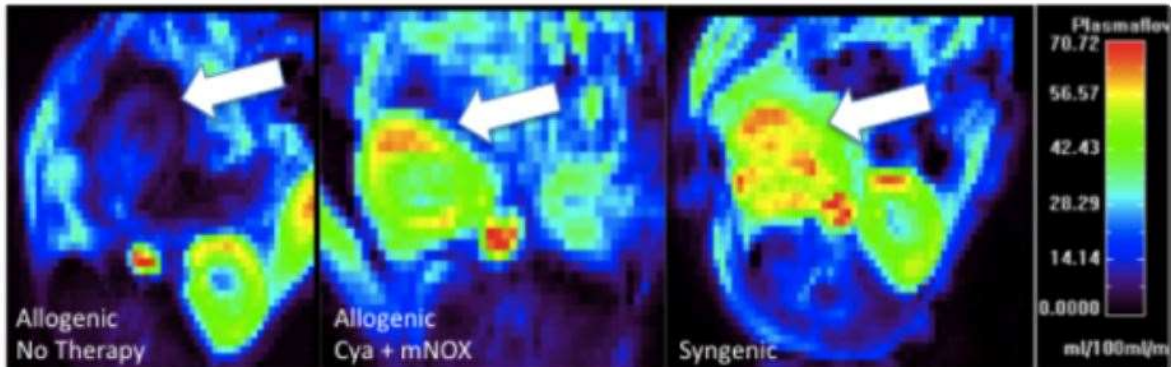
...ist bei soviel Enthusiasmus, Engagement und Teamwork die Antwort auf die Frage, welche Fachrichtung Manuel später anstrebt, keine Überraschung: „Ja, ich möchte Radiologe werden und forschen. Beides, vor allem bestätigt durch die Famulatur und die Doktorarbeit.“

**Vielen Dank und alles Gute für Herrn PD Dr. med Mike Notohamiprodjo und Manuel Kolb!**

## Die Doktorarbeit und ihre Durchführung

Im Mausmodell wurde zunächst eine akute Transplantatabstoßung der Niere simuliert. Es wurden drei Therapiegruppen gebildet: Therapie mit CyA (Ciclosporin A), Kombination mit mNOX (einem neuartigen Chemokin-Blocker) oder keine Therapie.

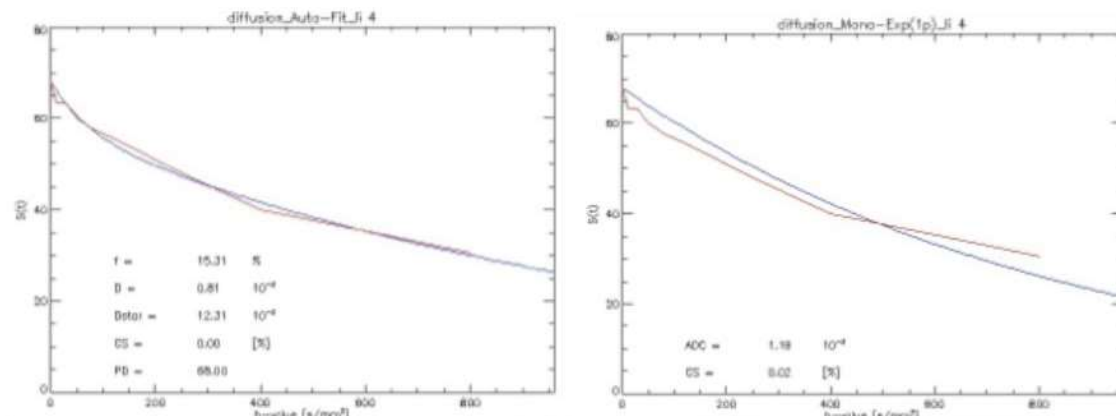
Neben einer immunhistochemischen Auswertung (monozytäre Infiltration) spielte dann die DWI folgende Rolle: Aus den Bildern wurde ein quantitativer Wert der molekularen Wasserdiffusion ermittelt, der apparent diffusion coefficient (ADC). Aufgrund verschiedener Faktoren (Abhängigkeit der Diffusion von Wasser im Extravaskulärraum, kapilläre Perfusion) kann er als Indikator für mikrostrukturelle Veränderungen gewertet werden.



Perfusionsuntersuchung

Dem DCE-MRT für die Darstellung der Perfusion lag eine TWIST-Sequenz (eine schnelle Sequenz, genauer: Time-resolved angiography With Interleaved Stochastic Trajectories) nach Injektion des Kontrastmittels Gadobutrol zu Grunde. „Bei dieser Technik wird das gadoliniumhaltige Kontrastmittel glomerulär filtriert und verlässt die Niere entweder über die Nierenvenen oder das tubuläre System. Durch die Analyse der dynamischen Kontrastmittelanflutung als zeitabhängige Funktion ist es möglich, klinisch relevante Parameter wie Blutfluss, Blutvolumen und Transitzeiten abzuleiten“, erklärt Manuel. Im nächsten Schritt wurden in Ischämie- und Reperfuisionsmodellen die experimentellen Grundlagen stetig optimiert.

Durch Nutzung des Intravoxel Incoherent Motion Imaging (IVIM) und des dadurch ermittelten „true-diffusion“-Parameters wurde die DWI verbessert, da aus diesem die Pseudodiffusion durch Kapillaren herausgerechnet wird. Und letztlich ist es durch die Forschung jetzt möglich, die glomeruläre Filtration jeder Niere separat zu messen.



IVIM (linke Abbildung) versus ADC (rechte Abbildung)

### **Forschung am Menschen**

Herr PD. Dr. Notohamiprodjo, der die beschriebenen bildgebenden Verfahren schon mehrere Jahre an Menschen erprobt, hat das mögliche Forschungsspektrum nun durch die Tiermodelle erweitert. Die Anwendung am Menschen erfolgte mit Hilfe von acht Probanden. So wurde erstmals die Diffusionstensorbildgebung (DTI) mit der IVIM-Methode zur separaten Untersuchung der Diffusions- (Struktur) und Pseudodiffusions (Fluss) -anisotropie der Niere kombiniert. Das Ergebnis kann sich sehen lassen: durch die entwickelten Vorgehensweisen erscheint es möglich, eine verminderte tubuläre Funktion von einem irreversiblen strukturellen Schaden abgrenzen zu können, d.h. Aussagen unter anderem über diabetische Glomerulopathien oder Transplantatabstoßung treffen zu können.

Quelle: <http://www.hellste-koepfe.de/site/forschung/promotion-radiologie/der-traum-einer-virtuellen-nierenbiopsie> (zuletzt geöffnet: 22.08.16)

## **10.5. Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Mike Notohamiprodjo für seine stete und unerschöpfliche Unterstützung, die weit über diese Doktorarbeit hinausging und bis heute geht.

Des Weiteren möchte ich Dr. Aivars Kalnins für die unzähligen Operationen und die Hilfe bei den Messungen danken.

Den Herren Prof. Dr. M. Guba, Prof. Dr. Dr. M. Reiser, PD Dr. J. Andrassy und v.a. Herrn Prof. Dr. Konstantin Nikolaou gilt mein Dank für die Ermöglichung dieser Dissertation.

Außerdem möchte ich mich bei Anne Wagner für ihre wertvolle Hilfe im Labor und beim Methodenteil danken.

Meiner Familie möchte ich für ihre immerwährende Unterstützung danken. Ein besonderer Dank gilt auch Juliana Krohn, die mich immer neu angespornt und unterstützt hat.

Für das Gegenlesen danke ich herzlichst Prof. Dr. Mike Notohamiprodjo, meiner Mutter und Juliana Krohn.



## 10.6. Curriculum Vitae

### Persönliche Daten

---

Name Manuel Marcus Kolb  
Geburtsdatum 11.05.1989  
Geburtsort München  
Nationalität deutsch

### Beruflicher Werdegang

---

09/2015 - jetzt Assistenzarzt, Radiologische Klinik,  
Abteilung für Diagnostische und Interventionelle Radiologie,  
Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
08/2014 - 12/2014 Werkstudent, Smart Reporting GmbH & Co. KG  
(Erstellen von radiologischen Templates)  
06/2012 - 11/2012 Werkstudent, Nephrologisches Labor von Prof. Guba, LMU  
(Durchführung von tierexperimentellen Versuchen)  
09/2011 - 05/2013 Studentische Leitung, Klinik und Poliklinik für Radiologie, LMU  
Campus Innenstadt, München (Durchführung nativer MRT-  
Untersuchungen und studentische Koordination)  
09/2008 - 06/2013 Werkstudent, Geriatrische Rehabilitation, Krankenhaus der  
Barmherzigen Brüder (Krankenpflege)

### Ausbildung

---

#### Schule

1995 - 1999 Grundschule Fürstenrieder Straße, München  
1999 - 2008 Max-Planck-Gymnasium, München

#### Studium

10/2008 - 09/2010 Vorklinik an der LMU/TU, München  
08/2010 Physikum  
10/2010 - 05/2015 Klinisches Studium an der LMU, München  
09/2013 - 12/2013 Auslandssemester: Department of Clinical Radiology,  
Hadassah Ein Kerem, Jerusalem  
04/2014 Schriftliches Staatsexamen

05/2014 - 04/2015 Praktisches Jahr  
 Wahlfach Radiologie: Klinik und Poliklinik für Radiologie, LMU  
 Innere Medizin: Klinikum Traunstein, Kliniken Südostbayern AG  
 Chirurgie: Klinikum Dritter Orden München - Nymphenburg  
 05/2015 Mündliches Staatsexamen  
 05/2015 Approbation

### **Universitäres Engagement**

2009 - 2013 Tutor für Erstsemester-Studenten für MeCuM  
 2011 - 2014 Layout und Texte für die medizinische Studentenzeitung  
 "Synapse"  
 2012 - 2013 Junior-Mentor für MeCuM-Mentor  
 2012 - 2013 Ressortleiter Abstracts der DoktaMed 2013

### **Stipendien, Auszeichnungen und Vorträge**

#### Stipendien

2017 Invest in the Youth-Stipendium des ECR 2017  
 2013 Hellste Köpfe Stipendium der Deutschen Röntgengesellschaft  
 durch Prof. Dr. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR  
 2013 LMUExchange durch Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. T. Ruzicka  
 2012 Forschungsförderung der DoktaMed 2012 durch MeCuM, LMU

#### Auszeichnungen und Vorträge im Rahmen der Doktorarbeit

05/2012 DoktaMed 2012, München, Posterpreis für beste Präsentation  
 09/2012 23<sup>rd</sup> European Students' Conference, Berlin, Winner of Session  
 Radiology  
 10/2012 Doktorandenkolleg, Klinik und Poliklinik für Radiologie, Vortrag

### **Ehrenamtliches Engagement**

2014 - 2015 Refugio, München, Mathenachhilfe für unbegleitete Flüchtlinge

## 10.7 Eidesstattliche Versicherung

**Kolb, Manuel Marcus**

---

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

### **Funktionelle Magnetresonanztomographie der akuten Nierentransplantatabstoßung im experimentellen Tiermodell**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

**München, 23.02.19**

---

Ort, Datum

**Manuel Kolb**

---

Unterschrift Doktorand