

Cornelia Sonja Schick

Dr. med.

**Zytotoxizität von Röntgenkontrastmitteln in vitro:
Funktions- und Polaritätsuntersuchungen an polaren
Nierenepithelzellmonolayern**

Geboren am 10.5.1971 in Kaiserslautern

Reifeprüfung am 17.6.1990 in Llantwit Major/Wales

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1990/91 bis WS 1998/99

Physikum am 22.3.1993 an der Universität Giessen

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg und Guadalajara/Mexiko

Staatsexamen am 2.11.1998 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Herr Priv.-Doz. Dr. med. Ch. Haller

Die kontrastmittelinduzierte Nephropathie ist eine klinisch wichtige Komplikation der intravaskulären Kontrastmittelgabe, besonders bei Patienten mit vorbestehender Niereninsuffizienz. Neben einer Abnahme der Nierendurchblutung mit konsekutiver Hypoxie des Nierenmarks bewirken Kontrastmittel auch eine direkte Zytotoxizität auf Nierenepithelzellen. Die Mechanismen dieser direkten Zytotoxizität sind nicht bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde die Kontrastmitteltoxizität auf renale Tubuluszellen in vitro untersucht: die permanenten Zelllinien LLCPK, bzw. MDCK dienten als Modell für proximale, bzw. distale Tubulusepithelien. Da die vektoriellen Transportfunktionen in der Niere von der Polarität der tubulären Epithelzellen abhängig sind, wurde schwerpunktmäßig der Effekt der Kontrastmittel auf polare Zelleigenschaften analysiert. Neben Permeabilität und elektrischem Widerstand der Zellmonolayer wurde die polare Verteilung von Membranproteinen untersucht. Außerdem wurde die Vitalität der Zellen durch Ausschluß von Trypanblau getestet, bzw. die Art des kontrastmittelinduzierten Zelluntergangs durch die

TUNEL-Methode und Durchflußzytometrie analysiert. Um die Toxizität verschiedener Kontrastmittel zu vergleichen, wurden die Zellen mit gleichen Jodkonzentrationen (≤ 74 mg Jod/ml) der ionischen Kontrastmittel Diatrizoat (monomer, 2000 mosmol/kg) und Ioxaglat (dimer, 550 mosmol/kg) und der nicht-ionischen Kontrastmittel Iopamidol (monomer, 620 mosmol/kg), Iohexol (monomer, 800 mosmol/kg) und Iodixanol (dimer, 300 mosmol/kg) inkubiert. Die Polaritätsuntersuchungen wurden vorrangig an MDCK-Zellen durchgeführt, welche ein Standardmodell der Zellpolaritätsforschung sind. Als funktionelle Parameter polarer Monolayereigenschaften wurden der elektrische Widerstand und die Durchlässigkeit für Inulin bestimmt. Zum morphologischen Nachweis des polaren Zellphänotyps wurden Transmissions-Elektronenmikroskopie und indirekte Immunfluoreszenz eingesetzt. Für die Immunfluoreszenzanalysen wurden Antikörper gegen ein apikales Markerprotein der MDCK-Zellmembran (gp135) sowie gegen die lateralen MDCK-Membranproteine gp60, ZO-1, Occludin oder Uvomorulin/E-cadherin verwendet.

Die Kontrastmittel reduzierten die Anzahl vitaler MDCK- und LLCPK-Zellen stärker als gleich hypertone Mannit- oder NaCl-Lösungen. Dabei war eine Fragmentierung der nukleären DNA als Zeichen des programmierten Zelltods nachweisbar, insbesondere nach Inkubation mit Diatrizoat. Auch auf den elektrischen Widerstand sowie die Permeabilität der Zellmonolayer für Inulin hatte Diatrizoat einen stärkeren Einfluß als Kontrastmittel mit reduzierter Osmolalität. Die Zytotoxizität von Diatrizoat und in geringerem Umfang auch von Ioxaglat ging mit einer Umverteilung polarer (baso-)lateraler Membranproteine einher. Die teilweise Umverteilung der „tight-junction“-assoziierten Proteine ZO-1 und Occludin sowie des „adherence-junction“-Proteins Uvomorulin/E-cadherin könnte den Zusammenhalt der Zellverbände lockern und sowohl die Aufrechterhaltung der Zellpolarität als auch die Barrierefunktion der Monolayer stören. Physikochemische Faktoren wirken bei der Toxizität der Kontrastmittel mit: dies trifft besonders auf die Osmolalität zu, da auch hochosmolale Kontrollösungen (Mannit und NaCl) toxische Effekte haben. Außerdem ist hochosmolales Diatrizoat toxischer als Kontrastmittel mit reduzierter Osmolalität, unabhängig davon, ob es sich um ionische oder nicht-ionische Substanzen handelt. Allerdings erklärt die Osmolalität nicht vollständig die Kontrastmitteltoxizität, da gleich hyperosmolale Mannitlösungen weniger toxisch als Kontrastmittel sind. Die Ionenstärke spielt allenfalls eine untergeordnete Rolle bei der Entstehung der Zytotoxizität, da die ionische Substanz Ioxaglat insgesamt kaum toxischer ist als nicht-ionische Substanzen gleicher Osmolalität. Allerdings war bei beiden ionischen Kontrastmitteln eine Umverteilung polarer Membranproteine zu beobachten.

Eine Störung des polaren Zellphänotyps mit einem Verlust der Barrierefunktion des Tubulusepithels ist ein wesentlicher pathophysiologischer Mechanismus des akuten Nierenversagens. Die vorliegenden Befunde zeigen, daß auch bei der kontrastmittelbedingten Nephropathie einer Störung polarer Epithelzellfunktionen und Apoptose eine große Bedeutung zukommen dürfte. Der wichtigen Rolle der Osmolalität bei der Kontrastmitteltoxizität ist in der Klinik durch Volumenexpansion Rechnung zu tragen, um hyperosmolalen Urin, bzw. eine lange Verweildauer der Kontrastmittel in der Niere zu vermeiden.