

**Aus dem Institut für Ernährungswissenschaft der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Potsdam  
vorgelegt über das  
Institut für Tierernährung des Fachbereiches Veterinärmedizin der  
Freien Universität Berlin**

**Vitamin-A-Stoffwechsel der Katze:  
Transport im Blut, Verteilung in den Geweben  
und Ausscheidung über den Harn**

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

**vorgelegt von  
Una Mathews, geb. Henschel  
Tierärztin  
aus Potsdam**

**Berlin 2010**

**Journal-Nr.: 3403**

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. L. Brunnberg  
Erster Gutachter: Univ.-Prof. Dr. J. Zentek  
Zweiter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F. J. Schweigert  
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. H. Martens

*Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):*

blood, carotenoids, cats, kidneys, liver, retinyl esters, urine

Tag der Promotion: 10.11.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-875-3

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

Dissertation, Freie Universität Berlin

**D 188**

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

© Mensch und Buch Verlag 2010

Choriner Str. 85 - 10119 Berlin

verlag@menschundbuch.de – www.menschundbuch.de

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>2</b>
<b>2.1</b>	<b>Vorkommen und Bedeutung von Vitamin A</b>	<b>2</b>
<b>2.2</b>	<b>Vorkommen und Bedeutung von Carotinoiden</b>	<b>5</b>
<b>2.3</b>	<b>Aufnahme, Transport und Speicherung von Vitamin A</b>	<b>8</b>
2.3.1	Intestinale Absorption von Retinol und Retinylestern	8
2.3.2	Transport und Verteilung von Vitamin A	9
2.3.3	Vitamin-A-Stoffwechsel in der Leber	10
<b>2.4</b>	<b>Vitamin-A-Transport im Blut</b>	<b>11</b>
2.4.1	Spezifischer Vitamin-A-Transport durch das Retinolbindungsprotein	11
2.4.2	Unspezifischer Vitamin-A-Transport durch Lipoproteine	13
2.4.3	Zytoplasmatische Vitamin-A-Bindungsproteine und nukleäre Rezeptoren	15
2.4.4	Beeinflussung der Vitamin-A-Konzentration im Blut durch die Fütterung	16
<b>2.5</b>	<b>Vitamin-A-Stoffwechsel in der Niere</b>	<b>18</b>
<b>2.6</b>	<b>Vitamin-A-Ausscheidung im Harn von Karnivoren</b>	<b>21</b>
<b>2.7</b>	<b>Vitamin-A-Imbalancen und Besonderheiten des felines Vitamin-A-Stoffwechsels</b>	<b>23</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>3.1</b>	<b>Tiere</b>	<b>27</b>
<b>3.2</b>	<b>Probennahme und -konservierung</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zum Gehalt an Retinol, Retinylestern und Carotinoiden in Blutplasma, Harn, Gallenflüssigkeit sowie in Leber und Nieren</b>	<b>30</b>
3.3.1	Extraktionsverfahren	30
3.3.1.1	Extraktionsverfahren für Plasma, Harn und Gallenflüssigkeit	30
3.3.1.2	Extraktionsverfahren für Organproben	30
3.3.2	Umkehrphasen-HPLC-Analyse	31
3.3.3	Identifizierung und Quantifizierung von Retinol, Retinylestern und Carotinoiden	31
<b>3.4</b>	<b>Analysen zum Gehalt und der Verteilung von Retinol-Bindungsprotein in Blut und Harn</b>	<b>33</b>
3.4.1	Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunblotting	33
3.4.2	Immunologischer Nachweis von RBP mittels Western-Blot-Technik	33
<b>3.5</b>	<b>Immunhistologischer Nachweis von RBP in Leber und Niere</b>	<b>34</b>
3.5.1	Herstellung der histologischen Präparate	34
3.5.2	Lösungen und Puffer	35
3.5.3	Antikörper	35
3.5.4	Durchführung	36
<b>3.6</b>	<b>Biochemische Analysen des Blutplasmas</b>	<b>37</b>
3.6.1	Triglyceridbestimmung	37
3.6.2	Cholesterolbestimmung	38
3.6.3	Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff	38

---

<b>3.7</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Vitamin A und <math>\beta</math>-Carotinkonzentration im Blutplasma und Harn klinisch gesunder Katzen</b>	<b>40</b>
4.1.1	Blutplasmaanalyse	40
4.1.2	Harnanalyse	41
4.1.3	Vergleich der Konzentration von Vitamin A und $\beta$ -Carotin in Blutplasma und Harn gesunder Katzen	42
<b>4.2</b>	<b>Vitamin A und <math>\beta</math>-Carotin im Blutplasma, Harn und Gallenflüssigkeit erkrankter Katzen</b>	<b>43</b>
4.2.1	Blutplasmaanalyse	43
4.2.2	Gallenflüssigkeitsanalyse	44
4.2.3	Harnanalyse	45
<b>4.3</b>	<b>Gegenüberstellung der Konzentrationen an Vitamin A und <math>\beta</math>-Carotin gesunder und erkrankter Katzen</b>	<b>46</b>
4.3.1	Vitamin A und $\beta$ -Carotin im Blut gesunder und erkrankter Katzen	46
4.3.2	Vitamin A und $\beta$ -Carotin im Harn gesunder und erkrankter Tiere	47
<b>4.4</b>	<b>Vitamin A und <math>\beta</math>-Carotin in Leber und Niere</b>	<b>49</b>
<b>4.5</b>	<b>Konzentration an Triglyceriden und Cholesterol im Blutplasma</b>	<b>53</b>
<b>4.6</b>	<b>Immunologischer RBP-Nachweis in Blutplasma und Harn</b>	<b>55</b>
4.6.1	RBP-Nachweis im Blutplasma	55
4.6.2	RBP-Nachweis im Harn	55
<b>4.7</b>	<b>Der Nachweis und die Verteilung von RBP in der Leber und der Niere</b>	<b>57</b>
4.7.1	Physiologische RBP-Verteilung	57
4.7.2	Verteilung von RBP bei verschiedenen Nierenerkrankungen	59
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<b>5.1</b>	<b>Vitamin-A-Konzentration sowie der Nachweis von RBP im Blutplasma und Harn</b>	<b>65</b>
5.1.1	Vitamin A und RBP im Blutplasma	65
5.1.2	Vitamin A und RBP im Harn	70
<b>5.2</b>	<b>Vitamin-A-Konzentration sowie der Nachweis von RBP in Leber und Nieren</b>	<b>73</b>
5.2.1	Vitamin A und RBP im Lebergewebe	73
5.2.2	Vitamin A und RBP im Nierengewebe	76
<b>5.3</b>	<b><math>\beta</math>-Carotin-Konzentration im Blutplasma, Harn und Gallenflüssigkeit, Leber und Nieren</b>	<b>79</b>
<b>5.4</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>84</b>
<b>7</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>90</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

$\alpha$	Alpha
Abb.	Abbildung
AAFCO	<i>Assoziation of American Feed Control Officials</i>
ALBP	Adipozyten-Lipid-Bindungsprotein
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ARAT	Acetyl-Coenzym-A-Retinol-Acyltransferase
$\beta$	Beta
BHT	Butylhydroxytoluol
bzw.	beziehungsweise
ca.	(lat.: <i>circa</i> ) ungefähr
cDNA	komplementäre Desoxyribonucleinsäure
CRBP	zelluläres Retinol-Bindungsprotein
CRABP	zelluläres Retinsäure-Bindungsprotein
CRALBP	zelluläres Retinal-Bindungsprotein
DCT	(engl.: <i>distal convoluted tubule</i> ) distaler gewundener Tubulus
DBP	Vitamin-D-Bindungsprotein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EBP	Androgen-abhängiges epididymales Bindungsprotein
eLBP	extrazelluläres Lipid-Bindungsprotein
ELISA	engl.: <i>enzyme-linked immuno sorbent assay</i>
EHK	Europäische Hauskatze
et al.	(lat.: <i>et alii</i> ) und andere
$\gamma$	Gamma
g	Erdbeschleunigung
GPC	Gelpermeations-Chromatographie
GPI	Glycosylphosphatylinositol
HDL	(engl.: <i>high density lipoproteins</i> ) Lipoproteine hoher Dichte
IDL	(engl.: <i>intermediate density lipoproteins</i> ) Lipoproteine intermediärer Dichte
IE	Internationale Einheiten

---

IgG	Immunglobulin G
iLBP	intrazelluläre Lipid-Bindungsproteine
IRBP	Interphotorezeptor-Retinol-Bindungsprotein
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KM	Körpermasse
KJ	Kilojoul
$\lambda$	Wellenlänge
LBP	Lipid-bindende-Proteine
LDL	(engl.: <i>low density lipoproteins</i> ) Lipoproteine niedriger Dichte
LRAT	Lecithin-Retinol-Acyltransferase
m	Mittelwert
mA	Milliampere
max	maximal
MG	Molekulargewicht
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
M	molare Masse
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
N	normal
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NRC	<i>National Research Council</i>
n	Anzahl
n.d.	(engl.: <i>not detectable</i> ) unter der Nachweisgrenze
ng	Nanogramm
PAG	Polyacrylamid-Gel
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PDA	Photodiodenarray
pH	pH-Wert
%	Prozent
RA	Retinsäure
RAR	Retinsäure-Rezeptor

---

RBP	Retinolbindungsprotein
RE	Retinoläquivalent
RP-HPLC	(engl.: <i>reversed phase high pressure liquid chromatography</i> Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie)
RB	Referenzbereich
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	totale Acrylamidkonzentration im Gel
Tab.	Tabelle
TAL	(engl.: <i>thick ascending limb</i> ) dicker aufsteigender Abschnitt der Henle-Schleife
TBS	(engl.: <i>tris buffered saline</i> ) Tris-Puffer
TBST	Tris-Puffer mit Tween 20
TC II	Transcobalamin II
THP	Tamm-Horsfall-Protein
TTR	Transthyretin
U/min	Umdrehung pro Minute
UV-Licht	ultraviolettes Licht
UZ	Ultrazentrifugation
UZR	Ultrazentrifugationsrückstand
V	Volt
VC	Variationskoeffizient
Vis	visuelles Licht
VLDL	(engl.: <i>very low density lipoproteins</i> ) Lipoproteine sehr niedriger Dichte
v/v	Volumen zu Volumen
vs.	(lat.: <i>versus</i> ) gegen
W	Watt
w/v	Gewicht zu Volumen
z.B.	Zum Beispiel



## 1 Einleitung

Als essentieller Mikronährstoff hat Vitamin A eine zentrale Bedeutung für die Regulation einer Vielzahl von physiologischen Funktionen wie Wachstum, Reproduktion, Zelldifferenzierung, embryonale Entwicklung, Immunsystem und Sehvorgang (BLOMHOFF, 1994). Der Vitamin-A-Bedarf kann auf zwei Wegen gedeckt werden: einerseits durch die Aufnahme von präformiertem Retinol und Retinylester tierischen Ursprungs andererseits durch Umwandlung von Carotinoiden, die Provitamin-A-Aktivität besitzen, wie beispielsweise  $\beta$ -Carotin (SCHWEIGERT, 1998). Die Umwandlung von  $\beta$ -Carotin in Vitamin A wird vorwiegend in den Enterozyten, aber auch in der Leber und den Ovarien vollzogen (GOODWIN, 1986). Aufgrund der Regulationsfunktion von Vitamin A im embryonalen und adulten Organismus unterliegt der Vitamin-A-Stoffwechsel einer strengen Homöostase. Durch die Bindung von Retinol an das Retinol-Bindungsprotein (RBP) wird die Plasmakonzentration unabhängig vom Vitamin-A-Speicher der Leber konstant gehalten (BLOMHOFF et al., 1990). Bei einigen Spezies, wie Kaniden und Musteliden, sind Besonderheiten im Vitamin-A-Metabolismus bekannt. Neben dem physiologischen Vorkommen von Lipoprotein-gebundenen-Retinylestern in hohen Plasmakonzentrationen (SCHWEIGERT et al., 1990a) wurde auch die physiologische Ausscheidung von Retinol und Retinylestern im Harn beschrieben (SCHWEIGERT et al., 1991; SCHWEIGERT und BOK, 1998). Diese physiologische Besonderheit wird möglicherweise als Ursache für die geringere Empfindlichkeit von Kaniden gegenüber einer Vitamin-A-Intoxikation gesehen (CLINE et al., 1997). Bei den Untersuchungen von Katzen wurde ebenfalls ein Transport von Retinylestern im Blut nachgewiesen (SCHWEIGERT et al., 1990a). Über Aspekte des Vitamin-A-Metabolismus der Katzen, wie die Verteilung von Vitamin A und RBP im Gewebe oder die Ausscheidung von Vitamin A im Harn, liegen bisher noch keine Ergebnisse vor. Diese sind jedoch bedeutsam, um die Sensibilität von Katzen gegenüber einer chronischen Vitamin-A-Hypervitaminose zu untersuchen (SEAWRIGHT und ENGLISH, 1967). Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, Erkenntnisse zum Vitamin-A-Stoffwechsel von Katzen hinsichtlich des Plasmatransports, der Gewebeverteilung in Leber und Nieren und der Ausscheidung von Retinol, Retinylestern und Carotinoiden in Gallenflüssigkeit und im Harn zu gewinnen. Dabei soll untersucht werden, ob Unterschiede in der Retinol- und Retinylesterkonzentration im Plasma, in den Geweben und im Harn bei gesunden sowie kranken Katzen nachweisbar sind.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Vorkommen und Bedeutung von Vitamin A

McCOLLUM wies 1913 gemeinsam mit DAVIS die Bedeutung eines fettlöslichen Faktors (Vitamin A) für das Wachstum von Tieren nach. 1917 wurde ein Mangel an dem fettlöslichen Faktor A als Ursache für Xerophthalmie benannt (McCOLLUM und SIMMONDS, 1917). 1920 wurde dann die Bezeichnung „Vitamin A“ für den fettlöslichen Faktor A eingeführt. KARRER et al. klärten 1931 die Struktur von Vitamin A (Retinol) auf. Der allgemeine Begriff „Vitamin A“ umfasst eine Gruppe von Stoffen mit chemisch verwandter Zusammensetzung. Die Bezeichnung „Vitamin A“ ist dabei nur gerechtfertigt, wenn die Substanz qualitativ das gesamte biologische Wirkungsspektrum von *all-trans*-Retinol aufweist und alle Symptome eines Vitamin-A-Mangels beseitigen kann. Dagegen werden alle natürlichen und synthetischen Vitamin-A-Derivate unabhängig von ihrer biologischen Aktivität unter dem Begriff „Retinoide“ zusammengefasst (RAILA und SCHWEIGERT, 2001). Neben Retinol sind Retinal, die Retinsäure sowie die Retinylester bedeutsame Vitamin-A-Derivate (BLOMHOFF et al., 1992). Die Hauptvitamin-A-Quellen in der Nahrung sind Carotinoide (Abb. 1) mit Provitamin-A-Wirkung sowie präformierte Retinylester und Retinol aus tierischen Geweben.  $\beta$ -Carotin als wichtigstes Provitamin A ist vor allem in Karotten, Gemüsepflanzen und Futtergräsern enthalten (OLSON, 1994). Vitamin A ist ein essentieller Faktor im menschlichen und tierischen Organismus für das Wachstum und die physiologische Funktion der Keim- und Schleimhautepithelien (DE LUCA, 1991). Bereits sehr früh wurde die Bedeutung von Vitamin A für die Embryonalentwicklung erkannt. Sowohl ein Mangel als auch ein Überschuss an Vitamin A führt zu schwerwiegenden Störungen in der Entwicklung des Embryos. Dabei war die Aufklärung der Bedeutung der Retinsäure als Ligand für spezifische nukleäre Rezeptoren und die Beeinflussung der Genexpression verschiedener Zellen ein bedeutsamer Schritt in der Vitamin-A-Forschung (SCHWEIGERT, 1998). Vitamin A wird je nach chemischer Herkunft in verschiedene Reihen eingeteilt. Die Vitamin-A-1-Reihe, deren Verbindungen sich von *all-trans*-Retinol ableiten, findet man vorwiegend im tierischen Organismus - vor allem in Leber und Leberölen, Milchprodukten und Eiern sowie Salzwasserfischen. Die Vitamin-A-2-Reihe wird von 3,4-Didehydroretinol abgeleitet und ist vorwiegend in Süßwasserlebewesen wie Fischen, Krebsen, Amphibien und Reptilien zu finden. Die chemischen Strukturen der wichtigsten Vitamin-A-Verbindungen sind in Abb. 2 dargestellt.

Die biologische Wirkdosis wird in Gewichtseinheiten angegeben wobei 1 IE Vitamin A der biologischen Wirkung von 0,3 µg *all-trans*-Retinol bzw. 0,344 µg *all-trans*-Retinylacetat entspricht. Zur Beurteilung der Gesamtaktivität von Vitamin A aus verschiedenen Nahrungsquellen mit unterschiedlichem Gehalt an Retinol, Retinylestern und Retinal wurde der Begriff „Retinoläquivalent“ (RE) eingeführt. Ein Retinoläquivalent entspricht der Wirkung von 1 µg *all-trans*-Retinol.



Abb. 1: Mikroskopische Aufnahme von  $\beta$ -Carotin. (Mit freundlicher Genehmigung von Oliver MECKES- Firma Eye of Sience)

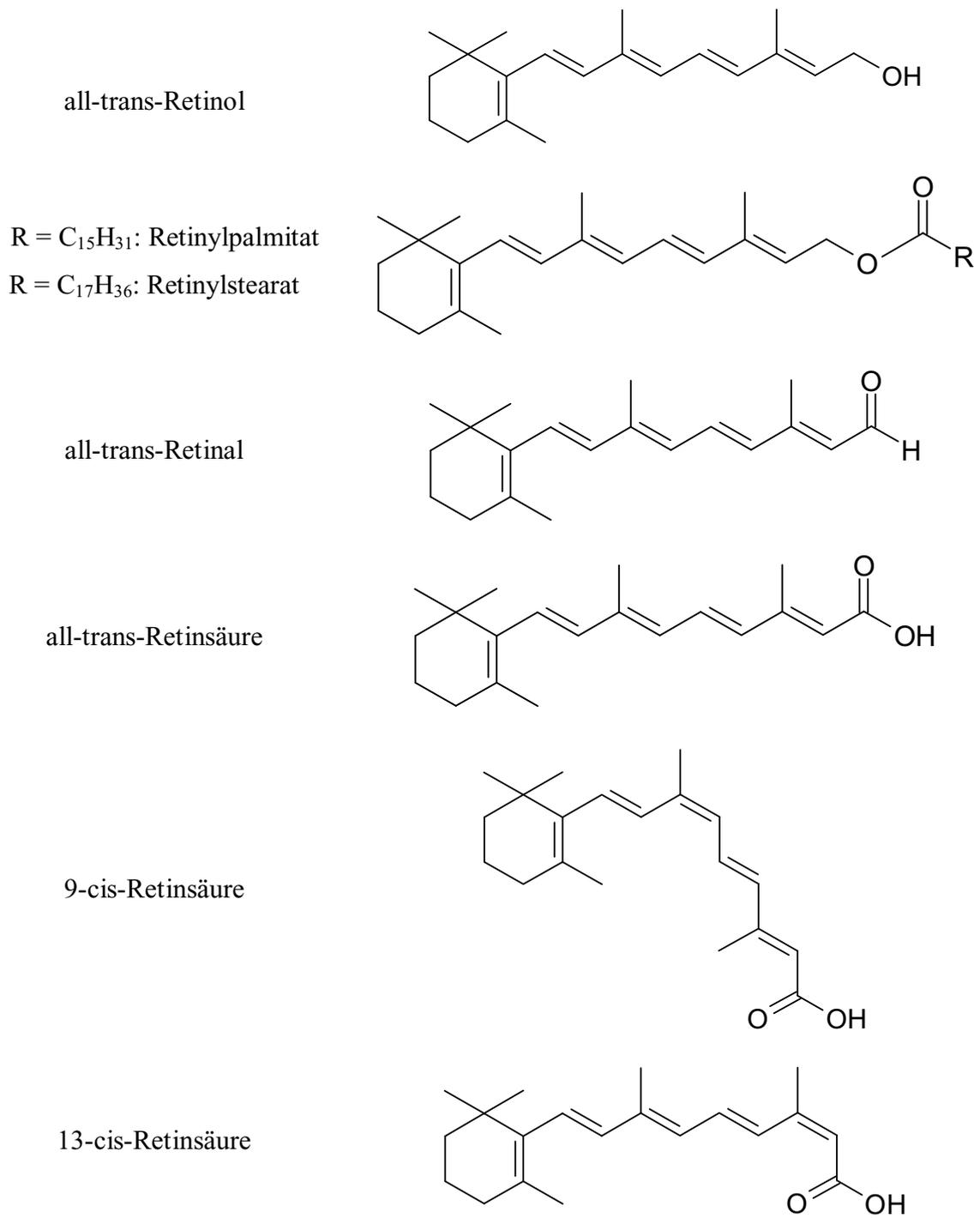


Abb. 2: Struktur physiologisch bedeutsamer Vitamin-A-Derivate.

## 2.2 Vorkommen und Bedeutung von Carotinoiden

Das Carotin wurde bereits 1831 durch WACKENRODER als fettlöslicher Farbstoff der Möhre (*Daucus carota*) beschrieben. KARRER und Mitarbeiter analysierten 1931 die Struktur des Carotins. Carotinoide sind Lipochrome - fettlösliche, gelbe bis rotviolette Polyenfarbstoffe pflanzlicher Herkunft. Sie umfassen eine Klasse von Kohlenwasserstoffen (Carotine) und ihre oxydierten Derivate (Xanthophylle), die aus 8 Isopreneinheiten bestehen (ISLER, 1971). Die Carotinoide kommen meist in größeren Strukturen wie Chloroplasten der Pflanzenzellen, den Membranen und den Lipidtröpfchen vor und sind essentieller Bestandteil des Photosyntheseprozesses. Des Weiteren sind Carotinoide Bestandteile in Protein-Carotinoid-Komplexen (z.B. von Krebsen) und liegen als Lycopin in Tomaten nahezu kristallin vor (Abb. 3). Von den mehr als 600 bekannten Carotinoiden besitzen nur ca. 50 Provitamin-A-Wirkungen wie z.B.:  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -Carotin und  $\beta$ -Cryptoxanthin (Abb. 4).  $\beta$ -Carotin besitzt die größte Provitamin-A-Aktivität.

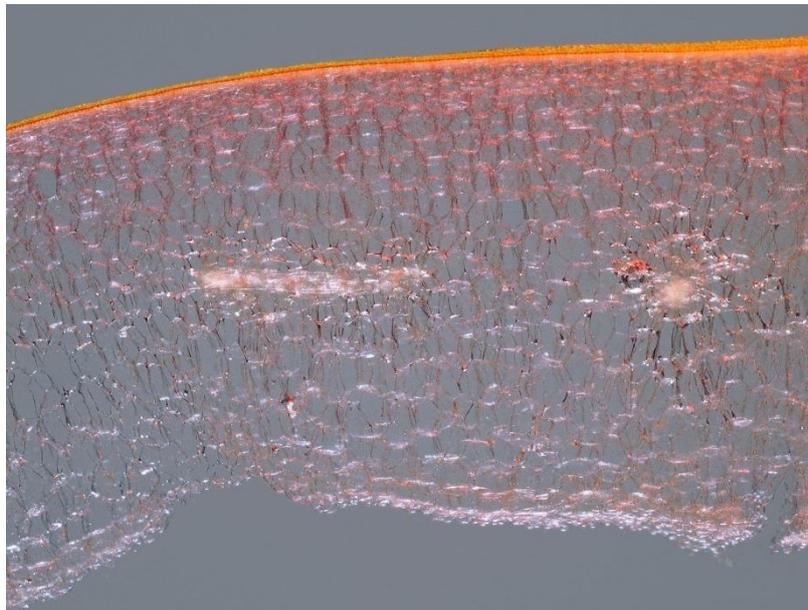


Abb. 3: Mikroskopischer Querschnitt durch die Frucht einer Tomate (*Lycopersicon esculentum*) mit hoher Konzentration an Lycopin (Mit freundlicher Genehmigung von Herrn Oliver MECKES- Firma Eye of Science).

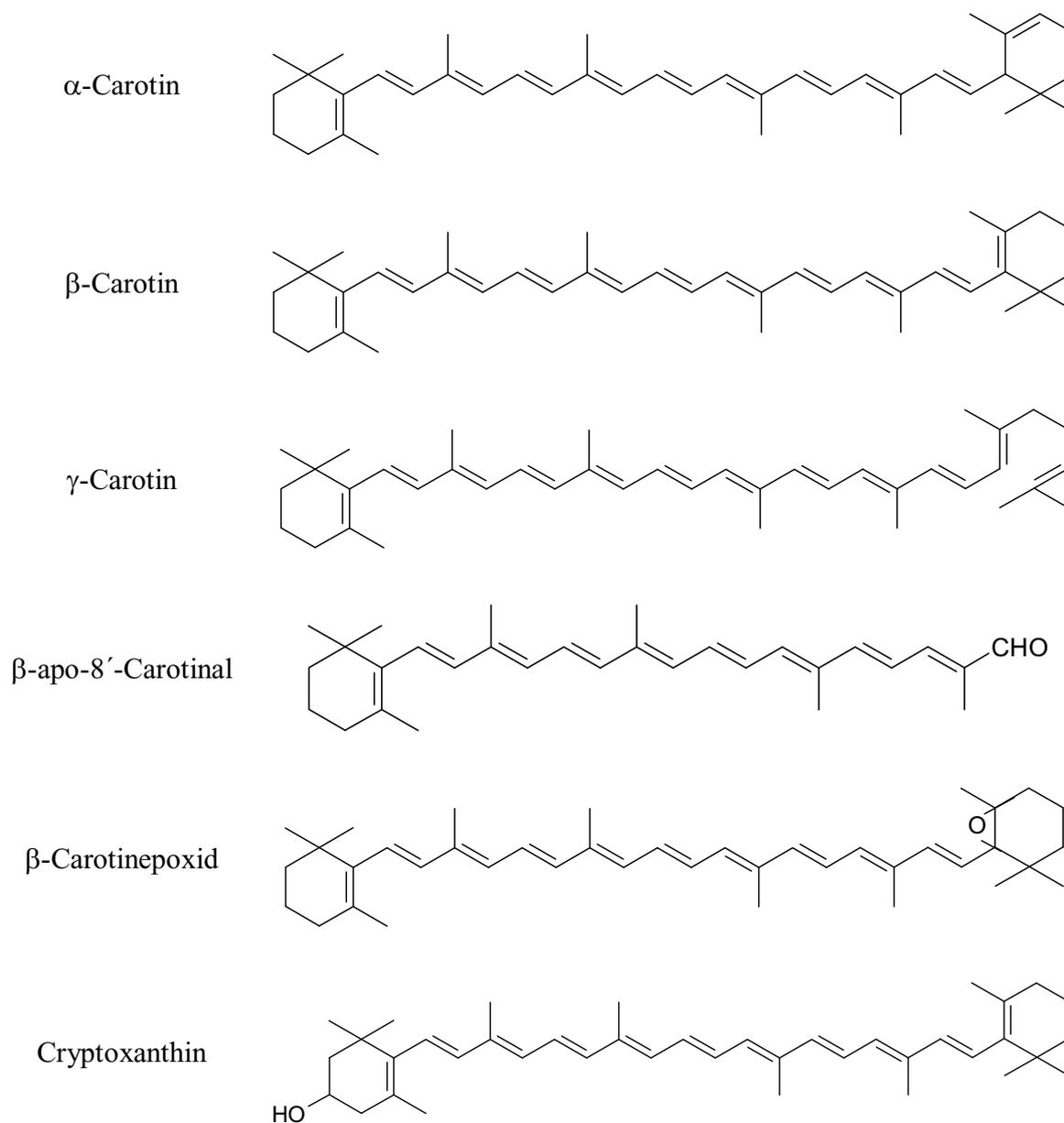


Abb. 4: Struktur der als Provitamin A wirksamen Carotinoide.

Xanthophylle besitzen - bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Cryptoxanthin) - keine Vitamin-A-Wirkung (HANCK et al., 1991). Zu den Xanthophyllen gehören unter anderem Astaxanthin, Canthaxanthin und Zeaxanthin. Viele Carotinoide sind vorwiegend an der Färbung von Pflanzen und Tieren beteiligt (GOODWIN, 1986). Während beim Menschen zwischen 5 und 50 % der Nahrungscarotinoide absorbiert werden (BLOMHOFF et al., 1992), gibt es bei den verschiedenen Tierspezies unterschiedliche Fähigkeiten der Carotinoidaufnahme sowie des Transports. Im Blut von z.B. Schweinen, Schafen, Nagern

und Karnivoren - so genannten „Weiß-Fett-Tieren“- werden Carotinoide kaum oder gar nicht absorbiert. Bei „Gelb-Fett-Tieren“, wie Pferd oder Rind erfolgt eine vorrangige  $\beta$ -Carotinaufnahme. Mensch und Primaten nehmen sowohl Carotine wie  $\beta$ -Carotin als auch Xanthophylle auf (GOODWIN, 1986). Nach bisherigen Untersuchungen sind Katzen möglicherweise auf Grund des Fehlens der intestinalen und hepatischen  $\beta$ -Carotin-15-15'-Dioxygenase (BCDO) nicht in der Lage,  $\beta$ -Carotin als Provitamin A zu nutzen (AHMAD, 1931; GERSHOFF et al., 1957; SCHWEIGERT et al., 2002 a). Neuere Untersuchungen zeigen, dass nach oraler Aufnahme von  $\beta$ -Carotin sowohl bei Hunden als auch bei Katzen eine unveränderte intestinale Resorption erfolgt (CHEW et al., 2000; SCHWEIGERT et al., 2002). Katzen nehmen oral verabreichtes  $\beta$ -Carotin über die Intestinalmucosa auf und transferieren es in die Blutleukozyten. In den Leukozyten wird das  $\beta$ -Carotin insbesondere in den Mitochondrien, aber auch in den Mikrosomen, dem Zytosol und dem Kern gespeichert (CHEW et al., 2000). Auf Grund der fehlenden BCDO-Aktivität führt die alleinige Gabe von  $\beta$ -Carotin zur Ausbildung der typischen Symptome eines Vitamin-A-Mangels, wie Wachstums- und Reproduktionsstörungen, metaplastischen Veränderungen des Atmungs- und Genitalapparates, der Bindehaut und der Speicheldrüsen (GERSHOFF, 1956). Einige Studien beschäftigen sich vor allem mit der Wirkung von Carotinoiden auf das Immunsystem. KIM et al. (2000) wiesen bei Katzen die Beeinflussung der humoralen und zellvermittelten Immunität nach oraler Gabe von Lutein nach. Neben einem zeit- und dosisabhängigen Anstieg der Lymphozytenzahl im Blutplasma und der Plasma-IgE-Konzentration wurde auch eine Beeinflussung anderer Komponenten, wie der T-Helferzellen beobachtet. Ähnliche Wirkungen auf das Immunsystem von Mensch und Maus sind von Lycopin, Astaxanthin und Canthaxanthin bekannt (KIM et al., 2000).

Weitere Untersuchungen befassen sich mit dem Einfluss von  $\beta$ -Carotin, Vitamin E und C als Antioxidantien. Der Zusatz dieser Vitamine zum Futter von Katzen mit chronischen Nierenerkrankungen führte zu einer signifikanten Senkung der durch oxidativen Stress hervorgerufenen DNA-Schädigungen in Lymphozyten (SHIGUANG und ROBINSON-PAETAU, 2004). Wie auch beim Menschen und bei Ratten mit chronischen Nierenerkrankungen nachgewiesen, trägt der Anstieg des oxidativen Stresses zur Progression der Schädigung im Nierengewebe bei. Der Zusatz von  $\beta$ -Carotin, Vitamin E und C zum Futter von Ratten mit chronischen Nierenerkrankungen führte zur Reduzierung

der Glomerulosklerose und der interstitiellen und tubulären Schädigungen Nierengewebe. Die Nahrungssupplementierung bei Katzen mit chronischen Nierenerkrankungen kann daher einen effektiven Schutz der DNA vor oxidativen Schäden bieten (SHIGUANG und ROBINSON-PAETAU, 2004).

### **2.3 Aufnahme, Transport und Speicherung von Vitamin A**

#### **2.3.1 Intestinale Absorption von Retinol und Retinylestern**

Retinylester aus Futtermitteln tierischen Ursprungs werden im Dünndarm enzymatisch durch unspezifische Pankreaslipasen und eine Retinylester-Hydrolase in Retinol und Fettsäuren gespalten. Die intestinale Resorption von Retinol in physiologischen Mengen erfolgt anschließend durch erleichterte Diffusion zusammen mit anderen fettlöslichen Nahrungsbestandteilen. Liegt Retinol in pharmakologischen Dosierungen vor, kommt es zur passiven Diffusion (BLOMHOFF et al., 1992). Die Resorptionsrate wird entscheidend von Qualität und Quantität der Nahrungsfettbestandteile beeinflusst. In den Enterozyten wird Retinol nach der Bindung an das zelluläre Retinol-Bindungsprotein II (CRBP II) mit langkettigen Fettsäuren zu Retinylestern verestert, um anschließend in Chylomikronen verpackt in die Darmlymphe abgegeben zu werden. Bei der intestinalen Veresterung des Retinols spielen 2 Enzyme eine entscheidende Rolle: die Acyl-CoA-Retinol-Acyltransferase (ARAT) und die Lecithin-Retinol-Acyltransferase (LRAT).

Während der Aufnahme physiologischer Konzentrationen an Retinol wirkt LRAT bei der Veresterung mit. Wenn jedoch große Mengen an Retinol aufgenommen werden und die Kapazität des CRBP II gesättigt ist, wird ARAT in die Retinolveresterung involviert (BLOMHOFF, 1990). Die Chylomikronen werden in der Darmlymphe über den *Ductus thoracicus* in den Blutkreislauf abgegeben (Abb. 5). Chylomikronen transportieren neben Retinylestern auch andere fettlösliche Verbindungen wie Carotinoide, Triacylglyceride, Phospholipide und Cholesterol.

### 2.3.2 Transport und Verteilung von Vitamin A

Die Chylomikronen-Retinylesterpartikel unterliegen während der Zirkulation im Blutkreislauf einer durch eine endotheliale Lipoproteinlipase gesteuerten Spaltungsreaktion, in deren Ergebnis kleinere Partikel, die Chylomikronen-Remnants, entstehen. Der Hauptanteil dieser Chylomikronen-Remnants wird in der Leber aufgenommen. Die Aufnahme der Chylomikronen-Remnants geschieht unter Beteiligung eines Zelloberflächenrezeptors, der den Umbau des Apolipoproteinanteils (ApoB und ApoE) der Chylomikronen-Remnants steuert. Die Chylomikronen realisieren den Transport von Retinylestern, Carotinoiden, Triacylglyceriden, Phospholipiden, Cholesterol und anderen fettlöslichen Verbindungen in der Darmlymphe und im Blutplasma. Die während der Fettabsorption erhöhte Chylomikronenkonzentration sinkt nach der Futteraufnahme wieder ab (BLOMHOFF, 1994). Während der Zirkulation gelangt ein geringer Anteil der Retinylester in das Knochenmark, die Milz, das Fettgewebe, die Skelettmuskulatur, die Hoden, die Ovarien, die Lunge und die Nieren. Dieser extrahepatische Weg ist besonders während intensiver Zellproliferations- und Differenzierungsvorgänge von Bedeutung (BLOMHOFF et al., 1992). PAIK et al. (2004) beobachteten, dass 25-30 % der chylomikronengebundenen Retinylester einem extrahepatischen Abbau unterliegen. RBP-defiziente Mäuse zeigten bei den Untersuchungen nur im Frühstadium ihrer Entwicklung Störungen des Sehvermögens. Diese konnten durch Gabe einer Vitamin-A-reichen Diät beseitigt werden. Die Tiere konnten trotz RBP-Mangel ihren Vitamin-A-Bedarf über die tägliche Futteraufnahme regulieren. Die Versorgung der Zelle mit Vitamin A wurde dabei über albumingebundene Retinsäure, Retinyl- $\beta$ -Glukuronide, Lipoprotein-gebundene-Retinylester und Carotinoide sowie chylomikronengebundene Retinylester realisiert.

### 2.3.3 Vitamin-A-Stoffwechsel in der Leber

In der Leber werden die Chylomikronenremnants in den Parenchymzellen (Hepatozyten) aufgenommen. Dabei erfolgt eine Hydrolyse der Chylomikron-Retinylester in der Plasmamembran durch die Retinylesterhydrolase zu Retinol und Fettsäuren. Die Hepatozyten gelten auch als Kurzzeitspeicher für Retinol (BLOMHOFF et al., 1990). Das Retinol wird dann rasch im endoplasmatischen Retikulum der Hepatozyten an das Retinol-Bindungsprotein (RBP) gebunden. Anschließend erfolgt der Transfer von Retinol in die perisinusoidalen Fettspeicherzellen, auch Stern- oder Itozellen genannt (Abb. 5). Entsprechend dem jeweiligen Vitamin-A-Status erfolgt entweder eine Speicherung des Retinols in der Leber oder eine Abgabe an die peripheren Gewebe (RAILA und SCHWEIGERT, 2002). Bei Säugetieren sind gewöhnlich 50-80 % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes in der Leber gespeichert. 90 % davon sind in den Stern- oder Itozellen der Leber enthalten und liegen zumeist in Form von Retinylestern vor. Die restlichen 10 % befinden sich in den Hepatozyten (BLOMHOFF et al., 1992). Der Transport von Retinol aus den Hepatozyten in die Sternzellen wird durch RBP vermittelt. In den Sternzellen werden die Retinylester in großen zytoplasmatischen Lipidtropfen gespeichert. Die Zahl und Größe dieser Tropfen ist dabei vom vorhandenen Vitamin-A-Gehalt abhängig (BLOMHOFF, 1990). Bei Ratten und beim Menschen reicht der Vitamin-A-Speicher in den Sternzellen für mehrere Monate zur Deckung des Vitamin-A-Bedarfs aus. Ähnlich den Itozellen der Leber gibt es auch Itozellen in anderen Organen, wie den Nieren, dem Herz, den großen Blutgefäßen, den Ovarien, den Hoden und dem Darm. Diese Sternzellen speichern bei reichem Vitamin-A-Angebot ebenfalls Retinylester (NAGY et al., 1997). Im Blutplasma zirkulierendes Retinol liegt immer in Form von RBP-gebundenem Retinol vor. Noch ungeklärt ist, ob neben den Hepatozyten auch die Itozellen in der Lage sind, RBP zu synthetisieren (BLOMHOFF, 1990; SCHWEIGERT, 1998). SAUVANT et al. (2001) haben an Rattenzellkulturen nachgewiesen, dass für die Retinolmobilisation aus den Lebersternzellen keine RBP-Synthese oder RBP-Mobilisation stattfindet. Der Transfer von Retinol aus der Sternzellen in die Hepatozyten findet direkt über die Zellmembran statt. Retinol stellt bei den meisten Säugetieren nur einen Anteil von unter 5 % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes der Leber dar. Bei Katzen und Seerobben jedoch beträgt der Retinolanteil 50 bzw. 30 % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes (SCHWEIGERT, 1995).

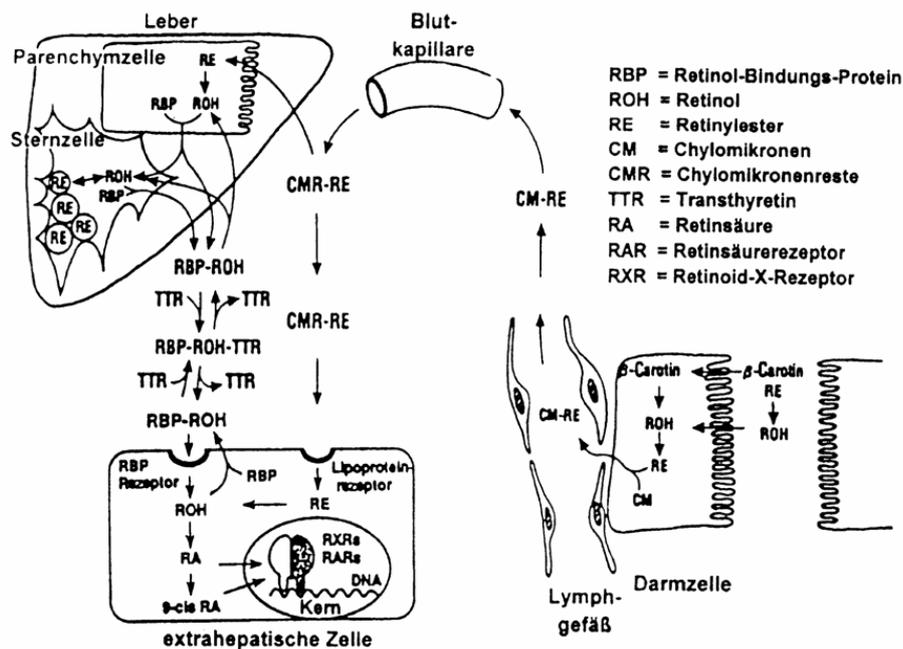


Abb. 5: Vitamin-A-Metabolismus (modifiziert nach BLOMHOFF, 1994).

## 2.4 Vitamin-A-Transport im Blut

### 2.4.1 Spezifischer Vitamin-A-Transport durch das Retinolbindungsprotein

Das Retinol-Bindungsprotein (RBP) gehört zu einer Gruppe strukturverwandter Lipidbindender-Proteine (LPB), die kleine hydrophobe Moleküle, z.B. Gallenpigmente binden. Die dreidimensionale Struktur gibt Hinweise auf eine hydrophobe Tasche, die in der Lage ist, ein Molekül Retinol aufzunehmen. Neben Retinol können auch andere Vitamin-A-Metaboliten wie Retinsäure, Retinal und Retinolisomere mit gleicher Affinität gebunden werden. Dagegen können langkettige Retinylester und andere fettlösliche Substanzen (Cholesterin, Fettsäuren) nicht an RBP gebunden werden (BLOMHOFF et al., 1992). Durch die Bindung von Retinol an RBP unterliegt der Vitamin-A-Transport im Blut von Fleischfressern, wie auch bei anderen Spezies, einer strengen homöostatischen Regulation, was eine kontinuierliche und konstante RE Versorgung der peripheren Gewebe mit Vitamin A garantiert. Erst wenn durch einen Vitamin-A-Mangel in der Nahrung die Speicher in der Leber fast erschöpft sind, kommt es zum Abfall der Plasma-Retinol-Konzentration (OLSON, 1984; RAILA, 1999). Bei Fleischfressern erfolgte der Nachweis von RBP unter anderem im Blut von Hunden, Füchsen, Marderhunden und Frettchen

(RAILA et al., 2000; RAILA und SCHWEIGERT, 2002). Die RBP-Synthese erfolgt primär in den Hepatozyten, wobei auch eine RBP-Synthese in den Sternzellen diskutiert wird (BLOMHOFF et al., 1990). Neben der Leber wurde auch in anderen Geweben, z.B. der Niere, den Lungen, der Milz, der Skelettmuskulatur und dem Fettgewebe das Vorhandensein von RBP-mRNA nachgewiesen (MAKOVER et al., 1989). Retinol und RBP liegen im Blutplasma in Form eines Komplexes (holo-RBP) vor, dessen Molmasse 21 kDa beträgt. In den Hepatozyten verbindet sich dieser Komplex mit dem Plasmaprotein Transthyretin (TTR) (55 kDa), wodurch der Proteinkomplex eine Molmasse von 76 kDa erhält, was ihn vor glomerulärer Filtration schützt (RAILA und SCHWEIGERT, 2001). Bei Hunden konnten jedoch auch erhöhte Konzentrationen von TTR-ungebundenem RBP im Blut nachgewiesen werden (MUTO, 1973), so dass dieses TTR-ungebundene RBP (21 kDa) glomerulär filtriert wird. In den Epithelzellen der proximalen Nierentubuli wird dieses RBP aber wieder vollständig rückresorbiert. Bei der immunhistochemischen Untersuchung von Hundenieren konnte Megalin als extrazellulärer RBP-Rezeptor in der apicalen Membran der proximalen renalen Tubuluszellen nachgewiesen werden (RAILA, 2003). Über diese Rezeptoren wird RBP aus dem Ultrafiltrat reabsorbiert und ist bei physiologischer Nierenfunktion der Hunde daher im Harn nicht nachweisbar (RAILA und SCHWEIGERT, 2001). Im Gegensatz zu früheren Annahmen wird Retinol nach Aufnahme in das Zielgewebe nicht irreversibel metabolisiert, sondern recycelt ca. 7-13 mal im Blutplasma, bevor es endgültig abgebaut wird (GREEN et al., 1985). Dieser Retinol-Turnover findet zu etwa 50 % in der Niere, zu 20 % in der Leber und zu 30 % in anderen Geweben statt. Für die Aufnahme von Retinol in die Zielzellen wird der spezifische RBP-Membranrezeptor STRA6 benötigt (KAWAGUCHI et al., 2007). STRA6 bindet RBP mit hoher Affinität und reguliert so eine stabile Vitamin-A-Aufnahme in den Zellen des embryonalen und adulten Organismus, wie z.B. Gehirn, Auge, Plazenta, Hoden, Lunge und Milz. Im Lebergewebe dagegen wurden physiologisch bedingt weniger STRA6-Rezeptoren nachgewiesen. In der Leber wird Vitamin A gespeichert um es an RBP gebunden zu den peripheren Organen zu transportieren. Eine hohe Konzentration von STRA6 in der Leber würde zur Wiederaufnahme des Vitamin A in die Leberzellen führen. Die Regulierung der Retinolaufnahme in die Zelle geschieht über das zelluläre Retinol-Bindungsprotein I (CRBP I). Nach der Retinolaufnahme zerfällt der RBP-Transthyretin-Komplex. Das apo-RBP wird daraufhin glomerulär filtriert und im proximalen Tubulussystem abgebaut (BLOMHOFF et al., 1990).

### 2.4.2 Unspezifischer Vitamin-A-Transport durch Lipoproteine

Neben dem spezifischen Vitamin-A-Transport mittels RBP existiert ein weiterer Transportmechanismus im Blut: der unspezifische Transport durch die Lipoproteine. Diese bestehen aus einem Komplex von Lipiden und Proteinen, auch Apoproteine genannt. Durch die Bindung an die verschiedenen Lipoproteinfraktionen (VLDL, LDL, HDL) werden bei den Karnivoren Retinylester (vorwiegend Retinylpalmitat und Retinylstearat) im Blut transportiert. Die für Fleischfresser physiologisch hohen Konzentrationen an Retinylestern in Form von Retinylstearat findet man beim Menschen nur bei postprandialer Lipämie oder bei einer chronischen Vitamin-A-Intoxikation (SMITH und GOODMAN, 1976) – vorwiegend in Form von Retinylpalmitat. Die Lipoproteine werden in Abhängigkeit von der Menge an gebundenen Lipiden in verschiedene Dichteklassen unterteilt:

1. Chylomikronen: Dichte zwischen 0,95 und 0,97 g/ml
2. Very Low Density Lipoproteine (VLDL): Dichte zwischen 0,97 und 1,006 g/ml
3. Low Density Lipoproteine (LDL): Dichte zwischen 1,006 und 1,063 g/ml
4. High Density Lipoproteine (HDL): Dichte zwischen 1,063 und 1,21 g/ml.

Auch hinsichtlich der prozentualen Zusammensetzung unterscheiden sich die verschiedenen Lipoproteine (Tab. 1). Die verschiedenen lipophilen Substanzen sind je nach Tierart unterschiedlich auf die verschiedenen Fraktionen verteilt. Während beim Menschen  $\beta$ -Carotin hauptsächlich an die LDL-Fraktion gebunden ist, erfolgt die Bindung beim Rind vorwiegend an die HDL-Fraktion (SCHWEIGERT et al., 1990a). Beim Rind wurde eine Verschiebung der Lipoproteinverteilung während der Trächtigkeit und der Kolostumphase beobachtet (SCHWEIGERT, 1995). 70-75 % der im Blutplasma von Hunden, Silber- und Blaufüchsen sowie Marderhunden zirkulierenden Retinylester werden an VLDL und LDL gebunden transportiert. Diese Lipoproteinfraktion macht jedoch nur etwa 15 % der Gesamtlipoproteine im Serum dieser Tierarten aus (THOMANN, 1989).

Tab. 1 Prozentuale Zusammensetzung humaner Lipoproteine (nach KLEBER und SCHLEE, 1988).

	<b>Chylomikronen</b>	<b>VLDL</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>
Proteine	1-2	8-10	18-22	47-52
Triglyceride	85-90	50-55	6-10	3-6
Cholesterol	2-3	6-8	8-12	2-4
Cholesterolester	3-4	14-16	35-45	12-18
Phospholipide	6-8	18-20	20-25	25-30

Neben den genannten spezifischen und unspezifischen Transportproteinen gibt es weitere intrazelluläre Transportproteine für Vitamin A (Tab. 2), beispielsweise in der Retina (Interphotorezeptor-Retinol-Bindungsprotein) und im Nebenhoden (Androgenabhängiges epididymales Bindungsprotein).

Tab. 2 Extrazelluläre Transport- und Bindungsproteine für Vitamin A (modifiziert nach BLOMHOFF, 1994).

<b>Protein</b>	<b>MW (kDa)</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Ligand</b>	<b>Funktion</b>
Chylo- mikronen	20.000-200.000	Darmlymphe, Blutplasma	Retinylester, Carotinoide	unspezifischer Transport, postprandial
VDL / LDL	2.000-20.000	Blutplasma	Carotinoide, Retinylester	unspezifischer Transport postprandial oder bei Vitamin-A- Intoxikation
RBP	21	Blutplasma, Interstitium	Retinol	spezifischer Transport
IRBP	140	Retina	Retinol, Retinal	interzellulärer Transport
EBP	20	Nebenhoden	Retinsäure	interzellulärer Transport

### 2.4.3 Zytoplasmatische Vitamin-A-Bindungsproteine und nukleäre Rezeptoren

Innerhalb der Zelle stehen verschiedene zytoplasmatische Bindungsproteine zur Verfügung (Tab. 3). Neben dem zellulären Retinol-Bindungsprotein Typ I (CRBP I) gibt es zwei zytoplasmatische Retinsäure-Bindungsproteine (CRABP I und II) sowie das zelluläre Retinal-Bindungsprotein (CRALBP) (BLOMHOFF et al., 1992; SCHWEIGERT, 1998). CRBP I vermittelt den Vitamin-A-Transport durch epitheliale Zellbarrieren, wie die Blut-Hoden-, die Blut-Retina- und die Blut-Hirn-Schranke. Weiterhin bewirkt CRBP I die Oxidation von Retinol zu Retinsäure sowie die Retinol-Veresterung und -Hydrolyse in der Leber (BLOMHOFF, 1994). CRBP II dient in der Darmmukosa als spezifisches intrazelluläres Transportprotein für all-*trans*-Retinol. Im Gegensatz zu CRBP II jedoch kann CRBP I kein Retinal binden. Die zellulären Bindungsproteine sind bei den verschiedenen Spezies durch einen hohen Grad an Übereinstimmung der Aminosäuresequenz gekennzeichnet. Sie haben einerseits die Aufgabe, die Retinoide in den Zellkern oder den Ort des Stoffwechsels zu transportieren, andererseits können sie den Anteil der freien, ungebundenen Retinoide in der Zelle regulieren und diese somit vor einer unspezifischen Oxidation schützen (SCHWEIGERT, 1998).

Die Wirkungsmechanismen der Retinoide werden bis auf wenige Ausnahmen (Auge, Hoden) durch Retinsäure über rezeptorvermittelte Zellkernreaktionen kontrolliert (MANGELSDORF, 1994). Als nukleäre Retinsäurerezeptoren fungieren die Gruppe der all-*trans*-Retinsäurerezeptoren (RAR) sowie die Gruppe der 9-*cis*-Retinsäurerezeptoren (RXR) (Tab. 3). Zusammen mit den Rezeptoren der Steroid- und Thyroidhormone gehören die Retinsäurerezeptoren zu einer Familie strukturgleicher Proteine, deren Funktion die Kontrolle der genetischen Transkription ist (SCHWEIGERT, 1998).

Tab. 3 Intrazelluläre Transportproteine und nukleäre Rezeptoren für Vitamin A (modifiziert nach ONG, 1987; NISHIWAKI et al., 1990 und BLOMHOFF, 1994).

Protein	MW (kDa)	Lokalisation	Ligand	Funktion
CRBP I	15,7	Leber, Hoden, Retina	Retinol	intrazellulärer Transport, Regulation der Retinol-veresterung und Hydrolyse
CRBP II	15,6	Dünndarm	Retinol, Retinal	intrazellulärer Transport, Regulation der Retinal-Reduktion und Retinol-Veresterung
CRBP III	15,4	Fischauge	Retinol	Bindung von Retinol und Retinsäure
CRALBP	33	Retina	Retinol, Retinal	Vitamin-A-Transport
CRABP I	15,5	Embryo ubiquitär	Retinsäure	Regulation freier Retinsäure
CRABP II	15	Embryo, Epidermis	Retinsäure	Regulation freier Retinsäure
RAR ( $\alpha, \beta, \gamma$ )	48	Zellkern	Retinsäure	Beeinflussung der Genexpression
RXR ( $\alpha, \beta, \gamma$ )	48	Zellkern	Retinsäure	Beeinflussung der Genexpression

#### 2.4.4 Beeinflussung der Vitamin-A-Konzentration im Blut durch die Fütterung

Im Gegensatz zum Menschen, bei dem die Vitamin-A-Konzentration im Blut durch das RBP streng homöostatisch reguliert wird, unterliegt der Vitamin-A-Blutspiegel der Karnivoren auf Grund des hohen Anteils an Lipoprotein-gebundenen Vitamin-A-Estern keiner derartigen Regulation (WILSON et al., 1987; SCHWEIGERT und BOK, 1998). Neben den Retinylestern werden auch andere lipophile Substanzen wie Vitamin E, Triglyceride, Cholesterol und Phospholipide durch die Lipoproteine transportiert. Des Weiteren könnte auch die Futtermittelzusammensetzung für die Vitamin-A-Konzentration im Blut von Bedeutung sein.

Die Absorption von Vitamin A im Darm sowie die Lebersekretion der Lipoproteine werden möglicherweise vom Futterproteingehalt beeinflusst (SCHWEIGERT und UEHLEIN-HARRELL, 1989). SCHWEIGERT und BOK (1998) untersuchten an Hunden den Einfluss einer unterschiedlichen Vitamin-A-Versorgung mit dem Futter auf die Blut-Vitamin-A-Konzentration. Dabei konnte ein signifikanter Einfluss der Vitamin-A-Zufuhr mit dem Futter auf die Retinylesterkonzentration im Blut festgestellt werden. Die Retinolkonzentration im Blut blieb dagegen unbeeinflusst. Auch bei einer reduzierten Vitamin-A-Versorgung waren Retinylester im Blut nachweisbar und die Sekretion von Lipoprotein-gebundenen-Retinylestern durch die Leber kommt nicht zum Erliegen. Ähnliche Zusammenhänge lassen sich auch für Katzen vermuten. Derartigen Studien wurden jedoch bislang noch nicht durchgeführt.

Für die Beurteilung des Vitamin-A-Versorgungsstatus von Hunden kann daher nur die Plasma-Retinylester-Konzentration als Indikator genutzt werden. Voraussetzung ist die Ermittlung eines Retinylester-Basalwertes bei bedarfsgerechter Vitamin-A-Zufuhr. Die Ausscheidung von Vitamin A im Harn spiegelt im Gegensatz zum Blutplasma die Vitamin-A-Aufnahme über das Futter nicht wider. Lediglich bei einer Versorgung, die dem täglichen Vitamin-A-Bedarf (75 IE/kg KG) oder weniger entspricht, kann eine reduzierte Ausscheidung von Vitamin A mit dem Harn nachgewiesen werden (RAILA und SCHWEIGERT, 2002).

## 2.5 Vitamin-A-Stoffwechsel in der Niere

Das in der Leber synthetisierte RBP bildet mit dem Transthyretin (TTR) und Retinol einen Komplex mit einer Molmasse von 76 kDa, wodurch dieser vor einer glomerulären Filtration geschützt ist (SCHWEIGERT et al., 1991a; RAILA und SCHWEIGERT 2001). Daneben zirkuliert jedoch ca. 5 % des RBP als TTR-ungebundenes holo-RBP im Blut. Des Weiteren findet eine Dissoziation des apo-RBP-TTR-Komplexes nach Abgabe des Retinols in den extrahepatischen Zielzellen statt. Damit ergibt sich sowohl für das TTR-ungebundene holo-RBP als auch für das apo-RBP eine Molmasse von 21 kDa, was zu einer glomerulären Filtration führt (GOODMAN, 1984). Bei physiologischer Nierenfunktion wird dieses RBP aus dem Ultrafiltrat (Abb. 6) in die proximalen Tubulusepithelzellen rückresorbiert. Neuere Untersuchungen zeigen, dass diese Reabsorption von holo- und apo-RBP im proximalen Tubulussystem durch Megalin-vermittelte Endozytose erfolgt (CHRISTENSEN et al., 2001).

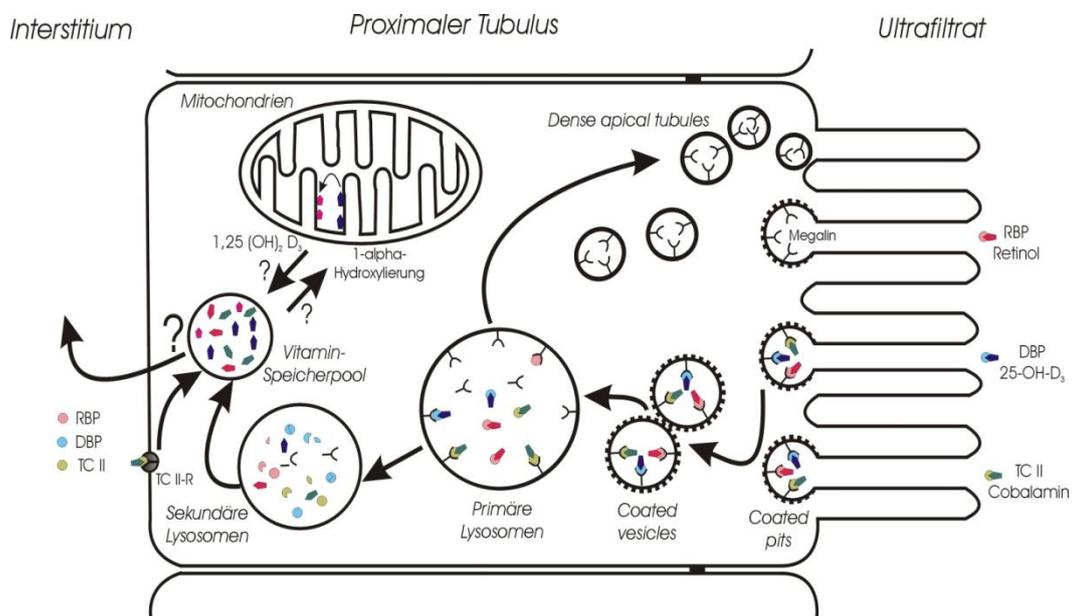


Abb. 6: Schematische Darstellung des Vitamin-Stoffwechsels in den Epithelzellen des proximalen Nierentubulus (RAILA und SCHWEIGERT, 2001).

Der spezifische Oberflächenrezeptor in den Epithelzellen des proximalen Tubulussystems, der für die Bindung und endozytotische Aufnahme von Proteinen und anderen Substanzen aus dem Ultrafiltrat verantwortlich ist, wurde als Megalin/Glycoprotein 330 identifiziert (CHRISTENSEN et al., 1998). Megalin wird aufgrund seiner strukturellen Eigenschaften der LDL-Rezeptor-Superfamilie zugeordnet. Es wurde neben den Epithelzellen des renalen proximalen Tubulus auch in anderen epithelialen Geweben, wie Nebenhoden, Endometrium, Eileiter, Nebenschilddrüse, Lunge und Dottersack nachgewiesen (ZHENG et al., 1994).

Als rezeptorvermittelte Endozytose bezeichnet man einen Mechanismus, bei dem ein oder mehrere Liganden an Rezeptoren der Plasmamembran gebunden und anschließend selektiv in spezifische Membrandomänen, den *clathrin coated pits*, durch Plasmainvagination in die Zelle aufgenommen werden (CHRISTENSEN et al., 1998). Die *coated pits* fusionieren innerhalb der Zelle zu *coated vesicles*. Nach Freigabe des Clathringerüsts erfolgt in primären und sekundären Lysosomen der enzymatische Abbau der Transportproteine. Der Ligand unterliegt in den Lysosomen einem weiteren Abbau (BARTH und ARGRAVES, 2001; CHRISTENSEN et al., 1998). Megalin wird in *dense apical tubules* zur apikalen Plasmamembran rücktransportiert und steht zur erneuten Bindung zur Verfügung. Möglicherweise erfolgt innerhalb der Zelle eine Speicherung der Vitamine (RAILA und SCHWEIGERT, 2001). Untersuchungen über den Einfluss von Nierenerkrankungen auf den Vitamin-A-Stoffwechsel liegen überwiegend aus der Humanmedizin vor. Verschiedene Studien zeigen bei Patienten mit chronischem Nierenversagen einen Anstieg der Retinol-, RBP- und TTR-Konzentration im Blut (SMITH und GOODMAN, 1971; YATZIDIS et al., 1975; VAHLQUIST et al., 1982; SCHÖNE et al., 1985). Dabei konnte ein Zusammenhang zwischen dem Schweregrad der chronischen Nierenerkrankung und dem Anstieg der Retinolkonzentration im Blut nachgewiesen werden. Die höchsten Retinolkonzentrationen wurden bei Dialysepatienten nachgewiesen. Während eine Korrelation zwischen der Retinol- und der RBP-Konzentration bestätigt werden konnte, war jedoch kein Zusammenhang der Retinolkonzentration mit den Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen (beide Nierenfunktionsparameter) im Blutplasma nachzuweisen (VANNUCCHI et al., 1992). WILSON und Mitarbeiter (1985) ermittelten außerdem eine Retention von Retinylestern im Blut der nierenkranken Patienten. Als Ursache dafür wird

der veränderte Chylomikronen-Metabolismus vermutet. Die erhöhten Vitamin-A-Konzentrationen im Blutplasma bei chronischem Nierenversagen werden vermutlich durch die verminderte glomeruläre Filtrationsrate hervorgerufen. Diese führt zu einem Anstieg der RBP-Konzentration im Blut und folglich zu einer Erhöhung des molaren Verhältnisses von RBP zu Retinol (SMITH und GOODMAN, 1971). GERLACH und ZILE (1990) wiesen in einer experimentellen Studie bei Ratten nach, dass es sich um apo-RBP handelt, dessen steigende Konzentration ein Signal an die Leber über peripheren Vitamin-A-Bedarf auslöst. Der durch verminderte glomeruläre Filtration hervorgerufene Anstieg der apo-RBP-Konzentration führt zur vermehrten Abgabe von holo-RBP aus der Leber. Gleichzeitig unterliegt dieses niedermolekulare RBP bei chronischem Nierenversagen verminderter glomerulärer Filtration und tubulärem Abbau. Des Weiteren vermuten YATZIDIS et al. (1975) eine steigende Vitamin-A-Konzentration durch eine verminderte Ausscheidung von Retinol. Retinol wird nach Transformation zu Retinsäure in der Niere mit der Gallenflüssigkeit ausgeschieden. Aufgrund des Verlustes an Nierengewebe bei chronischem Nierenversagen sinkt die Verstoffwechslung von Retinol zu Retinsäure und die Retinolkonzentration steigt.

RAILA et al. (2003) ermitteln bei Hunden mit chronischer Niereinsuffizienz einen Anstieg der Retinolkonzentration, jedoch keine Erhöhung der RBP-Konzentration im Blutplasma. Gleichzeitig wird ein vermehrtes Ausscheiden von RBP im Harn von Hunden mit chronischer Niereninsuffizienz nachgewiesen. Als Ursache dafür wird eine renale tubuläre Schädigung einhergehend mit einer Megalindysfunktion gesehen. Dadurch kommt es zu einer verminderten RBP-Reabsorption aus dem Ultrafiltrat. Unter physiologischen Bedingungen scheiden Hunde große Mengen von Retinol und Retinylestern gebunden an THP mit dem Harn aus. Bei den Hunden mit chronischer Niereninsuffizienz werden als Folge der Schädigung des distalen Nierentubulussystems signifikant geringere THP-Konzentrationen im Harn analysiert. Die Retinylesterkonzentration im Harn von gesunden und erkrankten Hunden unterscheidet sich nicht signifikant. Die renale tubuläre Dysfunktion als Ursache für einen erhöhten RBP-Ausscheidung und eine sinkende THP-Konzentration im Harn ist verbunden mit einem Anstieg der Plasmaretinolkonzentration bei Hunden mit chronischer Niereninsuffizienz. Für die Diagnostik von Störungen der Nierenfunktion könnte die Messung der Vitamin-A-Trägerproteine (RBP und THP) im Harn ein wertvolles Hilfsmittel sein.

## 2.6 Vitamin-A-Ausscheidung im Harn von Karnivoren

Während bei den meisten Spezies eine Ausscheidung von fettlöslichen Vitamin-A-Verbindungen im Harn nur bei pathologischen Zuständen zu verzeichnen ist, wurde bei verschiedenen Karnivoren eine physiologische Ausscheidung von Vitamin A mit dem Harn ermittelt. CATEL wies 1938 erstmals im Harn von Hunden Vitamin A nach. In den Folgejahren ermittelten verschiedene Autoren regelmäßig Vitamin A im Harn von Hunden, jedoch in sehr variierenden Konzentrationen. Während im Harn gesunder Menschen, Kaninchen und Wildkatzen kein Vitamin A detektiert werden konnte (HEYWOOD, 1967), gelang es SCHWEIGERT und ZUCKER (1991), sowohl Retinol als auch Retinylester im Harn von Hunden, Füchsen, Marderhunden sowie trächtigen und laktierenden Kegelrobben nachzuweisen. In weiteren Untersuchungen an Rindern, Schafen, Pferden, Ratten, Nerzen und Hauskatzen konnte jedoch kein Vitamin A im Harn ermittelt werden (SCHWEIGERT und ZUCKER, 1991; BUCHHOLZ et al., 1993). Die physiologische Ausscheidung fettlöslicher Vitamin-A-Verbindungen mit dem Harn gilt als Besonderheit der Kaniden innerhalb der Gattung *Carnivora* (BUCHHOLZ et al., 1993; RAILA und SCHWEIGERT, 2002). Ein Zusammenhang zwischen der Fähigkeit der Ausscheidung fettlöslicher Vitamin-A-Verbindungen im Harn und dem physiologisch unspezifischen Retinylestertransport im Blutplasma von Kaniden konnte noch nicht nachgewiesen werden (SCHWEIGERT et al., 1990a). Denkbar ist jedoch, dass die renale Ausscheidung von Vitamin A einen Schutzmechanismus gegenüber einer Vitamin-A-Intoxikation bei Kaniden darstellt (RAILA und SCHWEIGERT, 2001).

Bei der Untersuchung der Proteinbindung von Vitamin A im Harn wurde ein Protein isoliert, das ähnliche Eigenschaften wie ein Lipoprotein des Blutplasmas besitzt. SCHWEIGERT et al. (2002) gelang es, dieses Protein als Tamm-Horsfall-Glykoprotein (THP) zu charakterisieren. Ursprünglich wurde das THP nur als Vitamin-A-bindendes Protein in Zusammenhang mit der Ausscheidung von Vitamin A im Harn von Kaniden betrachtet. Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass das THP an der basolateralen Zellmembran des distalen Tubulusepithels eine LDL-Rezeptorfunktion ausübt und Lipoprotein-gebundene-Retinylester aus dem Blut aufnimmt (RAILA et al., 1997). Durch Exozytose von Vitamin A mit dem an der apikalen Zellmembran lokalisierten THP würde dann der Mechanismus der renalen Vitamin-A-Ausscheidung von verschiedenen Kaniden

eine Erklärung finden (Abb. 7). In den Epithelzellen des dicken aufsteigenden Astes der Henle-Schleife sowie des distalen Tubulus erfolgt die Synthese des Tamm-Horsfall-Proteins (THP), das sich innerhalb der Zelle in einem apikalen vesikulären Kompartiment anreichert. Das THP ist auch an der lateralen Membran nachweisbar. Die zelluläre Aufnahme von Vitamin A erfolgt als Retinol nach Dissoziation des holo-RBP-Komplexes oder in Form von Lipoprotein-gebundenen-Retinyestern über rezeptorvermittelte Endozytose. Durch bisher nicht bekannte Mechanismen kommt es zur Assoziation von THP und Retinol sowie Retinyestern, die im Harn als Komplex nachweisbar sind (RAILA und SCHWEIGERT, 2001).

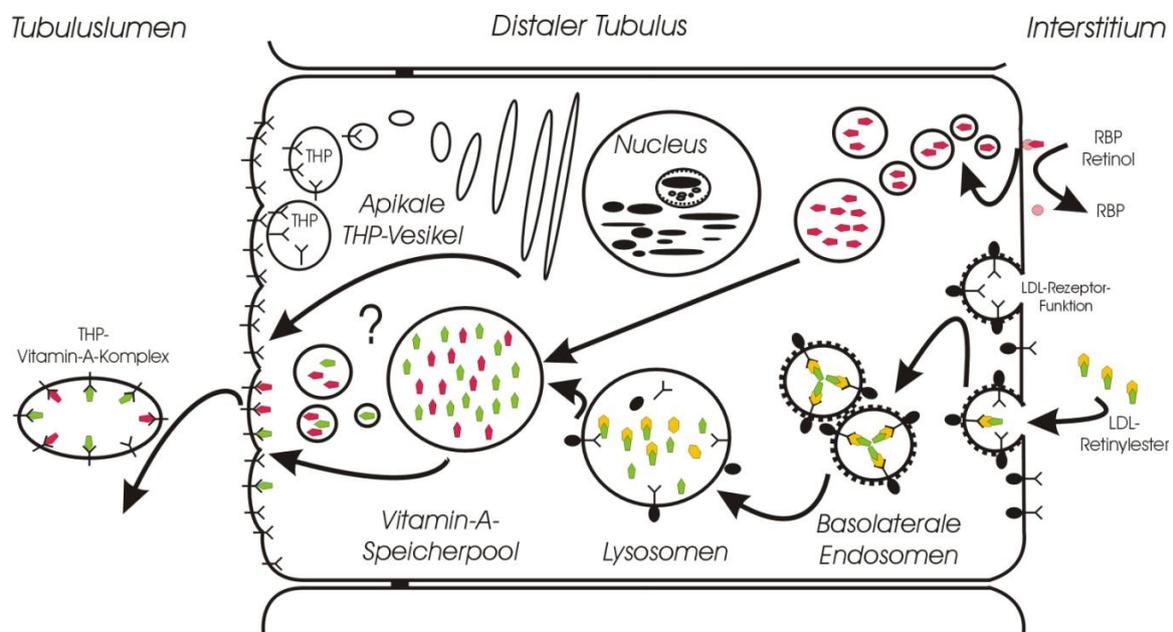


Abb. 7: Modell zu den möglichen Mechanismen der renalen Sekretion von Retinol und Retinyestern bei Hunden und anderen Kaniden (RAILA und SCHWEIGERT, 2001).

Ein Vitamin-A-Defizit und Veränderungen im Stoffwechsel des THP sind möglicherweise in die Pathogenese der Urolithiasis bei Hunden involviert (Raila et al., 2003 a). Bei den betroffenen Tieren ist die Plasma-Retinol-Konzentration erhöht, jedoch gibt es keinen Un-

terschied hinsichtlich der RBP- und Retinylesterkonzentration im Blutplasma. Die Retinylester- und Retinolausscheidung im Harn ist bei den Hunden mit Urolithiasis nur leicht erhöht. Deutliche Unterschiede sind bei der RBP-Konzentration im Harn zu verzeichnen. Bei den erkrankten Hunden wird deutlich mehr RBP im Harn ausgeschieden und gleichzeitig weniger THP im Harn analysiert. Ursächlich wird eine Störung der Nierenfunktion als Ursache oder Konsequenz der Urolithiasis vermutet. Diese Aspekte benötigen weitergehender Klärung.

VAN HOEK et al. (2008) weisen erstmals bei Katzen RBP im Harn als putativen Marker für Nierenerkrankungen nach. Dazu wurden neben dem Harn gesunder Katzen auch der von Katzen mit chronischer Niereninsuffizienz und Katzen mit Hyperthyreose untersucht. Bei dem Vergleich der RBP: Urin-Creatinin-Ratio lag das Ergebnis bei den gesunden Katzen unterhalb des Nachweisbereichs. Katzen mit chronischer Niereninsuffizienz und Tiere mit Hyperthyreose hatten trotz starker Variationen der Einzeltiere ähnliche relative RBP-Konzentrationen im Harn.

## **2.7 Vitamin-A-Imbalancen und Besonderheiten des felines Vitamin-A-Stoffwechsels**

Sowohl die Über- als auch die Unterversorgung mit Vitamin A führt bei Katzen wie auch bei anderen Säugetieren und dem Menschen zu nachhaltigen Schäden. In den fünfziger Jahren wurde von mehreren Autoren in Australien über das Auftreten von Skeletterkrankungen bei Katzen im Alter zwischen 2-9 Jahren berichtet. SEAWRIGHT prägt 1964 den Begriff der „Deformierenden Zervikalspondylose“ und führt wie die anderen Autoren die Veränderungen insbesondere an der Halswirbelsäule und den langen Röhrenknochen auf eine Langzeitfütterung mit Rinderleber zurück, die einen hohen Vitamin-A-Gehalt aufwies (SEAWRIGHT et al., 1965). Der Vitamin-A-Gehalt der Leber der erkrankten Katzen betrug bis zu 25.000 µg/g. Bei gesunden Katzen beträgt der Vitamin-A-Gehalt durchschnittlich 1155 µg/g (MOORE et al., 1963). Durch die Vitamin-A-Wirkung auf das Knochenwachstum und den -umbau entstehen knöcherne Exostosen entlang der Muskelansatzstellen der Halswirbel und der langen Röhrenknochen der Vordergliedmaßen (SEAWRIGHT et al., 1967; CLARK et al., 1970). Zu Beginn der Erkrankung zeigen die Tiere Anorexie, Gewichtsverlust, Lethargie, Bewegungsunlust und

Hyperästhesie. Mangelnde Fellpflege führt zu Ekzemen, diffuser Alopezie und Dermatitis (WITTMANN, 1993). Auch experimentell konnten durch hohe Gaben von Vitamin A über einen langen Zeitraum die typischen Veränderungen am Skelett ausgelöst werden. Bei Vitamin-A-Übersorgung wurden zwei Haupteffekte auf das Skelettsystem der Katzen nachgewiesen:

1. Die Reduktion der Knochengestalt aufgrund der Unterdrückung der periostalen Osteoblastenaktivität
2. Die Reduktion des Längenwachstums aufgrund degenerativer Veränderungen am Knorpel der Epiphysenfugen.

Während beim Jungtier die akute Form der Vitamin-A-Intoxikation durch herabgesetzte Chondrozytenproliferation an den Wachstumsfugen und Unterdrückung der periostalen Osteoblastenaktivität das Knochenwachstum akut und meist permanent verändert, finden sich die durch stark verminderte Osteoblastenaktivität in Verbindung mit erhöhter Osteoklasie verursachten Exostosen hauptsächlich bei adulten Tieren als Resultat einer chronisch erhöhten Vitamin-A-Zufuhr (CLARK and SEAWRIGHT, 1970; CLARK, 1970; CLARK, 1973; BONATH und PRIEUR, 1998). Untersuchungen von CLARK et al. (1970) zeigen, dass auch ein optimales Calcium-Phosphor-Verhältnis in der Ration keinerlei Einfluss auf die Ausbildung der Exostosen hat. Neben den typischen Skelettveränderungen traten auch Veränderungen im Bereich der Maulhöhle auf. Proliferative Gingivitis und eine retardierende Entwicklung der Zahnalveolen sind Ursache des Verlustes von Incisivi nach Vitamin-A-Übersorgung von Katzenwelpen (SEAWRIGHT und HRDLICKA, 1974). FREYTAG et al. (2003) konnten in einer Langzeitstudie bei Welpen von Katzen, die während der Trächtigkeit mit einer Konzentration von 306000 RE/ kg Futtermittel versorgt wurden, die typischen Defekte wie Gaumenspalten, Verkürzung der Mandibula, Colonstenosen, vergrößerte Herzstrukturen und Entwicklungsstörungen an Wirbelsäule und Dünndarm nachweisen. Auch in den Weichteilgeweben kommt es bei Vitamin-A-Übersorgung zu Strukturveränderungen. Abnormale Lipidablagerungen mit hohem Gehalt an Vitamin A wurden in Leber, Nieren, Lunge, Nebennieren und Lymphknoten nachgewiesen (SEAWRIGHT und ENGLISH, 1967). Da es besonders im retikuloendothelialen System von Leber, Milz und Lymphknoten zur Ansammlung der Lipidablagerungen kommt, wird eine Beeinträchtigung der Phagozytosefunktion dieser Organe vermutet, in deren Folge eine erhöhte Krankheitsanfälligkeit zu erwarten ist.

Bei männlichen Tieren verursachte eine Überversorgung von Vitamin A eine temporäre Infertilität, wohingegen weibliche Katzen keinerlei Beeinflussung der Reproduktion zeigten (HAYES, 1982). Bei Hunden, Katzen und Ratten traten die Toxizitätssymptome der Vitamin-A-Überversorgung erst bei 10-mal höheren Werten auf als bei Mensch und anderen Säugern. POBISCH und ONDERSCHEKA (1976) weisen bei Katzen mit Vitamin-A-Intoxikation eine 13-mal höhere Vitamin-A-Konzentration im Blut nach als bei gesunden Tieren. Gleichzeitig finden sie jedoch - im Gegensatz zu SEAWRIGHT et al. (1967) - bei etwa 20 % der Katzen, die an Vitamin-A-Intoxikation erkrankten, nur innerhalb der physiologischen Norm liegende Plasma-Vitamin-A-Konzentrationen.

Die relative Unempfindlichkeit auf hoch dosierte Vitamin-A-Zufuhr insbesondere bei Kaniden kann auf die Besonderheiten dieser Tiere beim Vitamin-A-Transport im Blut, dem Einfluss der Fütterung auf den Vitamin-A-Blutspiegel und in der Vitamin-A-Ausscheidung über den Harn gesehen werden (SCHWEIGERT und ZUCKER, 1991). Die Bedeutung von Vitamin A für die Embryonalentwicklung, das Wachstum und die Differenzierung wurde bereits sehr früh erkannt. So werden bei einem Mangel an Vitamin A in Abhängigkeit vom Zeitraum der Trächtigkeit Missbildungen an Herz, Schilddrüse, Auge, Gliedmaßen, Leber, Nieren, Reproduktionsorganen, Lungen, Zwerchfell, Darm beobachtet (SCHWEIGERT, 1998). Teratogene Effekte einer übermäßigen Vitamin-A-Aufnahme wurden sowohl bei Säugern als auch beim Menschen nachgewiesen. BONATH und PRIEUR (1998) beschreiben eine durch erhöhte Vitamin-A-Zufuhr verursachte generalisierte Osteoporose, in deren Verlauf die Muskelansätze am Knochen durch Muskelzug aus ihrer Verankerung gelöst werden, was zur reaktiven Knochenneubildung führt. Typisch für eine Vitamin-A-Intoxikation sind Knochendeformationen ohne Knochenverlust an den Ansatzstellen großer Muskeln im Bereich der Wirbelsäule und der großen Gelenke, was z.B. bei älteren Katzen nach chronischer Aufnahme zu hoher Vitamin-A-Mengen Ankylosen und Spondylosen zur Folge haben kann.

Neben der Vitamin-A-Überversorgung berichten einige Autoren auch von experimentell erzeugter Vitamin-A-Hypovitaminose (GERSHOFF, 1957; SCOTT et al., 1964). Insbesondere bei Katzenwelpen wurde ein verlangsamtes Knochenwachstum, squamöse Metaplasie des Respirationstraktes, der Speicheldrüsen und des Endometriums sowie der

---

Konjunktiven festgestellt. Infolge des Vitamin-A-Mangels kam es durch die Bildung subpleuraler Zysten häufig zu Infektionen im Lungenbereich. Fokale Dysplasien des exokrinen Pankreasgewebes sowie Hypoplasien des Hodengewebes, der Nebennieren und der Haut wurden nachgewiesen (GERSHOFF, 1957). Im Bereich des Auges konnten Konjunktivitis, Keratitis, Vaskularisation der Kornea, progressive Destruktion der Retinazellen und Kataraktbildung beobachtet werden (SCOTT et al., 1964).

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tiere

Für die Untersuchungen wurden von 35 klinisch gesunden Katzen (*Felis catus*) im Alter zwischen 5 Monaten und 11 Jahren ( $2 \pm 2,5$  Jahre) Blut und Harnproben entnommen. Die Tiere (16 weibliche und 19 männliche) wurden jeweils zu Kastrationszwecken in der Tierarztpraxis „Am Schlaatz“ in Potsdam vorgestellt. Des Weiteren wurden von 12 Katzen Blut, Harn, Gallenflüssigkeit und Gewebeproben von Leber und Nieren entnommen. Das Alter dieser euthanasierten Tiere (6 weibliche und 6 männliche) betrug zwischen 1 und 16 Jahren ( $9,1 \pm 5,0$  Jahre). Da alle Tiere konsekutiv ausgewählt wurden, war eine genaue Fütterungsanalyse nicht möglich. Die meisten Tiere erhielten laut Auskunft der Tierhalter kommerzielles Katzenfutter.

Basierend auf den Empfehlungen des National Research Council (NRC) von 1986 beträgt der Mindestbedarf an Vitamin A bei Trächtigkeit und Laktation 6000 IE/ kg Futter (in der Trockensubstanz) sowie für die Erhaltung 3333 IE/ kg Futter ( in der Trockensubstanz). Die Association of American Feed Control Officials (AAFCO, 1998) empfiehlt bei Fortpflanzung und Wachstum 9000 IE/ kg Futter und für die Erhaltung 5000 IE/ kg Futter (bezogen auf die Trockensubstanz). Für die Fütterung von Katzen wurde 2006 vom NRC ein Bedarf an Retinol für tragende und laktierende Katzen sowie Katzenwelpen von 400 µg Retinol je 4,187 MJ Futtermittelenergiegehalt und 200 µg Retinol je 4,187 MJ Futtermittelenergiegehalt für adulte Katzen angenommen werden.

Die 12 Katzen, von denen neben Blut- und Harnproben auch Leber- und Nierengewebeproben sowie Gallenflüssigkeit untersucht wurden, sind aus den verschiedensten Gründen euthanasiert worden. In Tabelle 4 sind alle Tiere mit Rasse, Geschlecht, Alter und der klinischen Diagnose erfasst. Auf Grund der Vielzahl an klinischen Erkrankungen wurden die Tiere in Gruppen analysiert, um eine Auswertung der Befunde zu erleichtern. Als Grundlage der Gruppierung dienten zum einen die Nierenparameter Kreatinin und Harnstoff sowie als Kriterien für den Lipidstoffwechsel die Triglycerid- und Cholesterolverte im Blutplasma. Daraufhin wurden drei Gruppen ermittelt:

##### **Gruppe 1:** n = 4

Alle Tiere zeigten erhöhte Cholesterolverte ( $>155$  mg/dl [Referenzwert: 70-150 mg/dl]) und Triglyceridwerte ( $>115$  mg/dl [Referenzwert: 50-100 mg/dl]). Bei drei der vier Tiere waren

ebenfalls die Nierenparameter (Harnstoff >75 mg/dl [Referenzwert 16,03-36 mg/dl], Kreatinin > 4,8 mg/dl [Referenzwert: 0,8-2,39 mg/dl]) stark erhöht.

#### **Gruppe 2 : n = 3**

Bei diesen 3 Tieren waren die Nierenwerte im Normbereich (Harnstoff 16-36 mg/dl Kreatinin 0,8-2,39 mg/dl). Im Lipidstoffwechsel war jedoch eine Erhöhung der Triglyceridwerte (>100 mg/dl) zu verzeichnen, während die Cholesterolvereinerungen normal waren (39- 63 mg/dl).

#### **Gruppe 3: n = 5**

Diese Tiere wiesen neben den Primärerkrankungen keinerlei Veränderungen der Nieren- und Lipidstoffwechselwerte auf .

### **3.2 Probennahme und -konservierung**

Die Blut- und Harnentnahme erfolgte am narkotisierten Tier (Injektionsnarkose 0,1 ml/kg Körpergewicht Ketamin 10 % und 0,1 ml/kg KM Xylazin 10 %). Zur Gewinnung der Blutproben wurde die *Vena cephalica antebrachii* punktiert und das Blut in Lithium-Heparin-Röhrchen gesammelt. Anschließend wurde zur Plasmagewinnung die Probe bei 8400 x g für die Dauer von 95 Sekunden zentrifugiert (Zentrifuge StatSpin MP, Firma Stat Spin Technologies, Massachusetts, USA). Das Plasma wurde in lichtundurchlässigen Polyesterolröhrchen abpipettiert und bei -35 °C aufbewahrt. Mittels Blasenpunktion erfolgte die Harngewinnung bei den weiblichen Katzen, während die männlichen Tiere katheterisiert wurden. Der Harn wurde makroskopisch und mittels Teststreifen (Meditest Combi 11, Firma Macherey-Nagel, Düren) semiquantitativ beurteilt. Nach Zentrifugation bei 2900 x g für 45 Sekunden wurde das Sediment abgetrennt und mikroskopisch untersucht. Der Harn wurde ebenfalls in lichtundurchlässige Polyesterolröhrchen abpipettiert und bei -35 °C eingefroren. Die Entnahme der Leber- und Nierenproben sowie der Gallenflüssigkeit erfolgte unmittelbar nach Eintritt des Todes des Tieres (Herz- und Atemstillstand). Dazu wurden der linke Leberlappen Lobus sinister und die linke Niere freipräpariert, in Aluminiumfolie verpackt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und daran anschließend bei -80 °C gelagert. Die restliche Leberprobe sowie die rechte Niere wurden für die histologische Untersuchung in 0,5 cm große Würfel geschnitten und in 4 % Phosphat-gepufferter Formalinlösung fixiert. Die Gallenflüssigkeit

wurde mittels Punktion der Gallenblase gewonnen, makroskopisch beurteilt und in lichtundurchlässigen Polyesterl rhrchen bei -35  C eingefroren.

Tab. 4 Klinischer Vorbericht der erkrankten Katzen

	<b>Rasse</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter in Jahren</b>	<b>Diagnose</b>
<b>Gruppe 1</b>	EHK	m, kastriert	4	Chronische Niereninsuffizienz
	EHK	w	9	Chronische Niereninsuffizienz
	Siam	m, kastriert	14	Diabetes mellitus
	Perser	w, kastriert	13	Felines Polyzystisches Syndrom
<b>Gruppe 2</b>	EHK	m, kastriert	1	Polytrauma
	EHK	w, kastriert	1	FIP, purulente Aszites
	EHK	m, kastriert	14	Chronisch Diarrhoe
<b>Gruppe 3</b>	EHK	w, kastriert	3	Cardiomyopathie
	EHK	w	8	Pyometra
	EHK	w	13	Adenokarzinom der Mammaleiste mit Metastasen der regionären Lymphknoten
	EHK	m, kastriert	16	Gastroenteritis
	EHK	m, kastriert	15	Pankreatitis

### **3.3 Untersuchungen zum Gehalt an Retinol, Retinylestern und Carotinoiden in Blutplasma, Harn, Gallenflüssigkeit sowie in Leber und Nieren**

#### **3.3.1 Extraktionsverfahren**

##### **3.3.1.1 Extraktionsverfahren für Plasma, Harn und Gallenflüssigkeit**

Die Bestimmung der Konzentrationen an Retinol, Retinylestern und Carotinoiden erfolgte mittels der Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC). Dazu wurden 200 µl Probenmaterial zur Proteinfällung mit 200 µl Ethanol versetzt, kurz geschüttelt und jeweils 1 ml n-Hexan, versetzt mit 0,05 % (w/v) Butylhydroxytoluol (BHT) als Antioxidants, hinzugeben. Diese Lösung wurde 10 Minuten geschüttelt und anschließend 10 Minuten bei 1500 x g zentrifugiert. Mittels einer Pasteurpipette wurde die obere organische Phase in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die restliche wässrige Phase wurde nochmals mit 1 ml n-Hexan nachextrahiert. Die gewonnenen Extrakte wurden anschließend unter Stickstoff bei 35-40 °C zur Trockenen eingengt. Der getrocknete Extrakt wurde danach in 200 µl Isopropanol aufgenommen, 30 Sekunden geschüttelt und für 5 Minuten in ein Ultraschallbad gegeben. Nach kurzem Schütteln wurden die Proben für die HPLC-Analyse in Injektionsgefäße überführt.

##### **3.3.1.2 Extraktionsverfahren für Organproben**

Zur Gewebeextraktion wurden 1,5 g grob zerkleinertes Gewebe mit 5 ml eines Extraktionsgemisches aus n-Hexan (versetzt mit 0,05 % BHT): Isopropanol, 3:2 v:v in ein Glaszentrifugenröhrchen gegeben. Die Proben wurden 15 Sekunden mittels Ultraturrax (Firma IKA Labortechnik, Janke und Kunkel GmbH, Staufen) zerkleinert und 10 Minuten bei 4 °C und 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in Blue Cups (Firma Greiner, Frickenhausen) überführt und der Rückstand erneut extrahiert. Zu den gesammelten Überständen wurden 5 ml einer 0,1 M Natriumchloridlösung hinzugefügt, um die organische von der wässrigen Phase zu trennen. Die Proben wurden 30 Minuten bei Zimmertemperatur unter Lichtausschluss stehen gelassen und anschließend der organische

Überstand wiederum in die Blue Cups überführt. Zu der wässrigen Phase wurden nochmals 7,5 ml n-Hexan hinzugefügt, geschüttelt und 30 Minuten stehen gelassen. Danach wurde die obere organische Phase zu den Restextrakten in die Blue Cups gegeben und mit n-Hexan bis zu einem Gesamtvolumen von 20 ml aufgefüllt. Von diesem organischen Extrakt wurden 3 ml Probenmaterial (bei Leberproben lediglich 100 µl) unter Stickstoff bei 35-40 °C Wasserbad zur Trockenen eingengt. Der getrocknete Extrakt wurde in 200 µl Isopropanol mit Methanol: Wasser (90:10, v/v, 0,4 g/l Ammoniumacetat in Wasser) aufgenommen, geschüttelt und 5 Minuten stehen gelassen. Von der so vorbereiteten Probe wurden 200 µl in Autosamplervials überführt und mittels HPLC analysiert.

### 3.3.2 Umkehrphasen-HPLC-Analyse

Die Trennung und quantitative Bestimmung der Vitamin-A- und Carotenoid-Konzentrationen erfolgte mittels RP-HPLC (SCHWEIGERT et al., 2000). Das verwendete HPLC-System bestand aus WATERS™ 515 HPLC-Pumpen und Pump-Control-Modul sowie WATERS™ 717 plus Autosampler und WATERS™ 996 Photodioden-Array Detector (PDA) (Waters, Eschborn). Das gesamte System wurde durch die gerätespezifische Software MILLENIUM 2010 gesteuert. Das Lösungssystem bestand aus dem Eluenten A mit Methanol (Roth Chemie, Karlsruhe), Wasser (90:10; v/v, mit 0,4 g/l Ammoniumacetat in Wasser) und dem Eluenten B mit Methanol: Methyl-*tert*-butyl-ether (Sigma, Deisenhofen), Wasser (8:90:2; v:v:v, mit 0,1 g/l Ammoniumacetat in Wasser). Die Flussrate in der Säule betrug 1 ml/min. Über einen Stufengradienten wurde Eluent A linear abnehmend durch Eluent B ergänzt. Nach 30 Minuten wurde die Säule zum Äquilibrieren auf 100 % Eluent A zurückgestellt. Die Gesamtlaufzeit betrug 55 Minuten.

### 3.3.3 Identifizierung und Quantifizierung von Retinol, Retinylestern und Carotinoiden

Für die Identifizierung und Quantifizierung von Retinol, Retinyloleat, -palmitat und -stearat wurde ein Photodiodenarray (PDA 996; Waters) bei einer Wellenlänge von 325 nm genutzt. Zur Identifikation von Retinol und Retinylestern wurden Vergleiche der

Retentionszeiten und Absorptionsmaxima sowie Peakflächen mit externen Standards durchgeführt. Nach ROSS (1981) wird davon ausgegangen, dass bei einer Wellenlänge von 325 nm die UV-Absorption der Retinylester nur vom Retinolanteil, jedoch nicht von der jeweiligen langkettigen Fettsäure abhängig ist. Damit ist die Absorption gleicher Mengen Retinol und Retinylester äquivalent. Die Retinolkonzentration im jeweiligen Ester konnte somit durch den Vergleich der chromatographischen Peakfläche mit der Fläche eines bekannten externen Retinolstandards als Retinoläquivalent (RE) berechnet werden. Die Messung der Carotinoide erfolgte bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die Ergebnisse wurden im Vergleich mit Standard Referenzmaterial 968 a (Nat. Inst. Standards Technology, Gaithersburg, USA) ermittelt. Zur Validierung der HPLC-Methode wurden die Nachweisgrenze, die Extraktionswiederfindung, die Repetierbarkeit und die Reproduzierbarkeit für Retinol und Retinylpalmitat bestimmt (Tab. 5).

Tab. 5 Validierung der HPLC-Methode.

	<b>Nachweisgrenze</b>	<b>Extraktionswiederfindung</b>	<b>Repetierbarkeit</b>	<b>Reproduzierbarkeit</b>
Retinol	4 ng/ml	97,4 ± 6,9 %	2,1 % VC	3,0 % VC
Retinylpalmitat	5,4 ng/ml	96,3 ± 4,5 %	4,6 % VC	9,1 % VC

### **3.4 Analysen zum Gehalt und der Verteilung von Retinol-Bindungsprotein in Blut und Harn**

#### **3.4.1 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Immunblotting**

Die Proteintrennung in Plasma und Harn wurde mittels Natrium-Dodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Für die Analyse wurden jeweils 5 µl Plasma bzw. 20 µl Harn sowie die Probenpufferlösung (0,152 g Tris, 2 ml Glycerol, 0,2 g SDS, 0,2 ml Mercaptoethanol, 0,1 mg Bromphenolblau, mit Aqua-bidest ad 10 ml Lösung; pH 6,8) eingesetzt. Als kommerzielle Standardlösungen wurden für die Plasmaanalysen der LMR-Standard (BioRad, München) und für die Harnuntersuchungen der Low Range Silver Stain Standard (BioRad) genutzt. Die Elektrophorese wurde in Vertikalkammern (Mini-Protean II; BioRad) mit 0,5 mm dicken Gelen durchgeführt. Nach dem System von LAEMMLI (1970) erfolgte die Proteintrennung in 12 %igen SDS-Polyacrylamidgelen (PAG) mit 3 %igen Sammelgelen. Die Verdünnung mit dem Probenpuffer betrug für die Coomassie-Färbung des Plasmas 1:100, für die Silbernitratfärbung der Harnproben 1:1. Die verdünnten Proben wurden 5 Minuten bei 100° C im Wasserbad erhitzt und anschließend jeweils 15 µl je Slot aufgetragen. Der verwendete Standard wurde mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde unter Kühlung bei einer konstanten Stromstärke von 30 mA 1 Stunde lang durchgeführt. Die Plasmaproben wurden mittels Coomassie-Blue-Färbung behandelt. Zur Anfärbung der Banden der Harnproben wurde die Silbernitratfärbung nach HEUKESHOVEN und DERNICK (1986) verwendet.

#### **3.4.2 Immunologischer Nachweis von RBP mittels Western-Blot-Technik**

Mittels Blot-Technik wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF, Immobilon; Milipore Corp., Bedford, USA) übertragen. Als Transferpuffer diente eine Lösung aus 2,93 g Glycerin, 5,81 g Tris, 0,38 g SDS, 200 ml Methanol sowie Aqua-bidest ad 1 l. Die Transferkammer enthielt Membran und Gel, die jeweils mit einem Filter und Schwamm bedeckt wurden. Gelseitig befand sich die Kathode und membranseitig die Anode. Die Transferkassette wurde von Transferpuffer

bedeckt und in der Transferkammer (Mini Trans-Blot™, BioRad) bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup> 1 Stunde lang geblottet. Anschließend wird die Blotmembran in TBST-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20; pH 7,5) gespült und eine Stunde bei Raumtemperatur in TBST-Puffer versetzt mit 5 % (w/v) Magermilchpulver (Glücksklee, Nestle AG, Frankfurt a. M.) geblockt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu sättigen. Anschließend erfolgte die Inkubierung mit einem peroxidasekonjugierten Antiserum gegen humanes Serum-RBP vom Kaninchen (Code Nr. A 301, Dako Diagnostika, Hamburg). Das Antiserum wurde im Verhältnis 1:300 mit dem TBST-Puffer (1 % Magermilch, 0,05 % Tween 20, w/v) verdünnt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Danach wurde viermal 10 Minuten auf dem Schüttler mit 0,3 % TBST (0,3 % Tween 20) gewaschen. Die Detektion wurde mittels Luminolreaktion durchgeführt. Dafür wurde das Chemiluminescence-Detektion-Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) benutzt. Nach einer Inkubationsdauer von 2 Minuten mit dem Luminolreagenz wurde die Lösung von der Membran mit Filterpapier (3MM-Papier; Whatman Laboratory Division, Maldstone, GB) entfernt. Anschließend wurde die Membran mit der nach oben zeigenden Proteinseite in den Fluor-S™ Multimager (BioRad) gelegt. Die Aufnahme und Auswertung der Reaktion erfolgte mittels des gerätespezifischen Softwareprogramms Multi-Analyst™-PC, Version 1.1 (BioRad).

### **3.5 Immunhistologischer Nachweis von RBP in Leber und Niere**

#### **3.5.1 Herstellung der histologischen Präparate**

Die unmittelbar nach der Euthanasie des Tieres entnommenen Leber- und Nierenproben wurden in 4 %iger Phosphat-gepufferter-Formaldehyd-Lösung fixiert und innerhalb von 48 Stunden weiterverarbeitet. Die Auswaschung der Fixierflüssigkeit erfolgte über eine aufsteigende Alkoholreihe, wobei eine schrittweise Entwässerung und Härtung der Gewebeproben eintrat. Zur Einbettung in Paraffin wurde der Gewebeblock bei einer Paraffintemperatur von 56 °C eingegossen. Mittels eines Schlittenmikrotoms wurde der Paraffinblock in 3-4 µm dicke Schnitte zerlegt. Die Schnitte wurden auf Super-Frost-Plus™-Objektträger (Firma Menzel-Gläser, Glasbearbeitungswerk GmbH & Co. KG, Braunschweig) aufgetragen. Die Trocknung der Schnitte erfolgte über Nacht bei 37 °C.

### 3.5.2 Lösungen und Puffer

#### Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6)

Stammlösung

60,57 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Lösung, pH 7,6 (Sigma, Deisenhofen)

610 ml Aqua dest.

390 ml HCl 1 N

Gebrauchslösung

100 ml Stammlösung

900 ml NaCl 0,8 % in Aqua dest.

#### Imidazol / HCl- Puffer (pH 7,1)

6,81 g Imidazol (Merck, Darmstadt)

Aqua dest. ad 1000 ml

pH-Werteinstellung mittels 500 ml 0,1 N HCl

### 3.5.3 Antikörper

Primärantikörper :

1:400 in 20 % Schweineserum in TBS verdünntem Kaninchen-anti-human RBP (Code-Nr. A040, Dako Diagnostika GmbH , Hamburg)

Sekundärantikörper :

1:100 in 20 % Schweineserum in TBS verdünntem Schweine-anti-Kaninchen IgG (Code- Nr. Z113, Dako)

Peroxidase anti-Peroxidase-Komplex :

1:100 in 20 % Schweineserum in TBS verdünnte Kaninchen-PAP (Code-Nr. Z 113, Dako)

### 3.5.4 Durchführung

Der RBP-Nachweis erfolgte mit der Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP) nach STEINBERGER et al. (1970). Alle Färbeschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt.

1. Nach dem Beschriften der Objektträger erfolgte die Entparaffinierung in Xylol-Ersatz (Roti™-Histol) für 10 Minuten und die zweimalige Rehydrierung in Isopropanol und die einmalige Rehydrierung in 96 % Alkohol für je 3 Minuten.
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase in Methanol mit frisch zugesetztem 0,5 % Wasserstoffperoxid (PerhydroI™ 30 % Wasserstoffperoxid p.a.; Merck, Darmstadt) für 30 Minuten.
3. Waschen in TBS (Tris-buffered-saline, pH 7,6).
4. Überführung der Schnitte aus der Küvette in die Coverplates (Life Science Int. GmbH, Frankfurt/Main).
5. Blockierung der unspezifischen Hintergrundfärbung durch Inkubation mit 20 % Schweineserum in TBS für 10 Minuten.
6. Zugabe von 100 µl des Primärantikörpers bzw. des Kontrollserums in die Coverplates und Inkubation über Nacht bei 4 °C.
7. Spülen der Coverplates mit jeweils 2 ml TBS.
8. Zugabe von jeweils 100 µl Sekundärantikörper je Coverplate und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur.
9. Spülen mit 2 ml TBS je Coverplate.
10. Zugabe von 100 µl Kaninchen-PAP je Coverplate und Inkubation bei Raumtemperatur für 30 Minuten.
11. Spülen der Coverplates mit jeweils 2 ml TBS.
12. Überführung der Schnitte aus den Coverplates in eine Küvette.
13. Visualisierung des Antigen-Antikörper-Komplexes mittels DAB (3,3' Diaminobenzidintetrahydrochlorid, Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm). Die Schnitte wurden unter ständigem Rühren in DAB mit 0,01 % Wasserstoffperoxid (30 %) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1) für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.
14. Dreimaliges Waschen in TBS für je 5 Minuten.

15. Waschen in Aqua dest. für 5 Minuten.
16. Gegenfärbung der Schnitte mit Papanicolaous-Hämatoxylin (Merck, Darmstadt) für 10 Sekunden mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser für 5 Minuten.
17. Entwässern der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe (je 3 Minuten in 50 %, 70 %, 80 %, 96 % Alkohol und in Isopropanol). Klären in Roti™-Histol für je 5 Minuten und Xylol für 10 Minuten.
18. Eindecken der Objektträger mit CANADABALSAM.
19. Trocknen der Präparate über Nacht und anschließende mikroskopische Auswertung.

Die Auswertung der PAP-gefärbten-Schnitte erfolgte mit einem Standardmikroskop (Olympus, Hamburg) unter Verwendung von 10er, 20er und 40er Objektiven. Hell- bis dunkelbraune feingranulierte Reaktionsprodukte in den jeweiligen Schnitten wurden als positiver Nachweis gewertet, wenn diese in den jeweiligen Kontrollschnitten nicht nachweisbar waren.

### **3.6 Biochemische Analysen des Blutplasmas**

#### **3.6.1 Triglyceridbestimmung**

Das Testprinzip beruhte auf der Hydrolyse der Triacylglyceride (TAG) mittels Lipoproteinlipase zu Glycerol und freien Fettsäuren. In Anwesenheit einer Glycerokinase und Glycerophosphat-Oxidase kommt es zur Bildung von Wasserstoffperoxid. Durch die anschließende Peroxidasereaktion entsteht ein Quinonimin-Farbstoff, dessen Absorption proportional zur TAG-Konzentration ist. Zur Analyse wurden 96-Well-Mikrotiterplatten genutzt. Zur Konzentrationsbestimmung wurde eine Standardreihe (beginnend mit einer Konzentration von 250 mg/100 ml) in 6 Verdünnungen in Doppelbestimmung vermessen. Daran anschließend folgten jeweils 5 µl der Proben. Die Analyse wurde durch Positiv- und Negativkontrollen vervollständigt. Proben und Kalibrator wurden mit je 200 µl Triglycerid-Reagenz (Infinity™ Triglyzeride Methode Nr. 343; Sigma Diagnostics) versetzt.

Alle Proben wurden als Doppelbestimmung angesetzt und bei Raumtemperatur für 15 Minuten inkubiert. Die Extinktionsmessung erfolgte mittels Microplate Reader Model 550 (Bio-Rad) bei einer Wellenlänge von 570 nm und wurde durch Microplate Manager Software (Version 4.0, Bio-Rad) ausgewertet. Die Berechnung der Triglyceridkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve.

### **3.6.2 Cholesterolbestimmung**

Cholesterolester werden durch die Cholesterol-Esterase zu Cholesterol gespalten, welches dann durch Cholesteroloxidase zur Bildung von Wasserstoffperoxid führt. Die Peroxidase katalysiert die Ankoppelung von Wasserstoffperoxid an das Chromogen unter Bildung von Chinonimin-Farbstoff (Absorptionsmaximum 500 nm). Die Absorption ist direkt proportional zur Konzentration an Gesamtcholesterol. Analog der Triglyceridbestimmung wurde der Ansatz als Doppelbestimmung auf die Mikrotiterplatte aufgetragen. Anschließend wurden je 5 µl der Probe aufgebracht und die Analysereihe durch Positiv- und Negativkontrollen vervollständigt. Die Probe bzw. der Kalibrator wurden mit je 200 µl Cholesterolreagenz (Cholesterol Methode-Nr. 352, Sigma) versetzt. Die Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 15 Minuten durchgeführt. Die Extinktionsmessung mittels Microplate Reader Plattenphotometer Model 550 (Bio-Read) erfolgte bei einer Wellenlänge von 490 nm. Die Auswertung wurde unter Nutzung der Microplate Manager Software (Version 4.0, Bio-Rad) vorgenommen. Die Berechnung der Cholesterolkonzentration erfolgte anhand einer Standardkurve.

### **3.6.3 Bestimmung von Kreatinin und Harnstoff**

Die Bestimmung der Kreatinin- und Harnstoffkonzentration im Plasma erfolgte mittels Vet-Test-Gerät (Firma IDEXX, USA). Über photometrische Messreihen wurden die Parameter im Plasma bestimmt. Die Auswertung der Messungen erfolgt durch die systemspezifische Software Vet-Test Version 5.0.

### 3.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als arithmetisches Mittel mit der dazugehörigen Standardabweichung angegeben. Für die Varianzanalyse wurden der Kruskal-Wallis-Test genutzt. Die Bearbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe der SAS-Software Version 8.0 (SAS Institute Cary, NC, USA). Werte von  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

Ergab der Kruskal-Wallis-Test ein signifikanter Unterschied, wurde ergänzend der Vergleich der 2 Gruppen mit dem Mann-Whitney-U-Test durchgeführt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vitamin A und $\beta$ -Carotinkonzentration im Blutplasma und Harn klinisch gesunder Katzen

#### 4.1.1 Blutplasmaanalyse

In allen Blutplasmaproben konnten Retinol und Retinylester sowie  $\beta$ -Carotin nachgewiesen werden. Die Gesamtkonzentration an Vitamin A betrug  $976 \pm 458$  ng/ml. Dabei hatte Retinol ( $240 \pm 64$  ng/ml) einen Anteil von  $30 \pm 17$  % an der Vitamin-A-Gesamtkonzentration. Der Hauptanteil an Vitamin A liegt im Katzenblut jedoch als Retinylester vor ( $70 \pm 17$  %). Auch bei den Retinylestern ist ein deutliches Verteilungsmuster zu erkennen. Retinylstearat dominiert mit  $61 \pm 6$  % des Gesamtestergehaltes, während der Gehalt an Retinylpalmitat  $36 \pm 13$  % und Retinyloleat lediglich  $5 \pm 3$  % des Gesamtestergehaltes beträgt. Beim Vergleich von weiblichen und männlichen Tieren hinsichtlich der Gesamt-Vitamin-A-Konzentration, des Retinol- und Retinylestergehaltes sowie des Retinylester-Verteilungsmusters konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden (Tab. 6).

Tab. 6 Konzentration an Vitamin A und Retinylestern im Blutplasma von klinisch gesunden Katzen (ng/ml, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Gruppe	Vitamin A	Retinol	Retinyl-oleat	Retinyl-palmitat	Retinyl-stearat	Summe der Ester
<i>Gesamt</i> (n=33)	$976 \pm 458$	$240 \pm 64$	$30 \pm 18$	$275 \pm 281$	$443 \pm 290$	$736 \pm 460$
<i>Männlich</i> (n=18)	$986 \pm 402$	$241 \pm 77$	$36 \pm 17$	$299 \pm 337$	$408 \pm 261$	$744 \pm 408$
<i>Weiblich</i> (n=15)	$1021 \pm 569$	$235 \pm 43$	$23 \pm 17$	$334 \pm 400$	$458 \pm 345$	$786 \pm 571$

Bemerkenswert erscheint, dass in allen Blutplasmaproben gesunder Katzen  $\beta$ -Carotin in einer durchschnittlichen Konzentration von  $15 \pm 10$  ng/ml nachgewiesen werden konnte.

Des Weiteren wurden in 78 % der Proben gesunder Tiere neben  $\beta$ -Carotin auch andere Carotine ( $\alpha$ -Carotin und 9-*cis*- $\beta$ -Carotin) sowie Xanthophylle, wie Lutein, Zeaxanthin, Lycopin und  $\beta$ -Cryptoxanthin analysiert (Tab. 7).

Tab. 7 Konzentration an Carotinen und Xanthophyllen im Blutplasma gesunder Katzen (ng/ml, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) sowie deren Nachweishäufigkeit (NWH).

Gruppe	Lycopin	9-cis- $\beta$ -Carotin	$\beta$ -Carotin	$\alpha$ -Carotin	$\beta$ -Cryptoxanthin	Zeaxanthin	Lutein
Gesamt (n=33)	13 $\pm$ 0,6	2 $\pm$ 1	15 $\pm$ 10	1 $\pm$ 0,7	5 $\pm$ 5	5 $\pm$ 6	9 $\pm$ 12
Männlich (n=18)	13 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,5	11 $\pm$ 7	1 $\pm$ 1	3 $\pm$ 2	3 $\pm$ 0,8	5 $\pm$ 7
Weiblich (n=15)	13 $\pm$ 0,8	2 $\pm$ 1	18 $\pm$ 9	1 $\pm$ 0,5	6 $\pm$ 7	8 $\pm$ 8	14 $\pm$ 17
NWH (%) <sup>1</sup>	6 %	75 %	100 %	66 %	42 %	21 %	12 %

<sup>1</sup>Nachweishäufigkeit der Carotine und Xanthophylle in allen Proben gesunder Katzen

#### 4.1.2 Harnanalyse

Die Analyse zum Vitamin-A-Gehalt im Harn klinisch gesunder Katzen ergab, dass die individuelle Variationsbreite in den Konzentrationen an Retinol und Retinylestern bemerkenswert hoch ist (Tab. 8). So konnte in 18 der 35 Harnproben (51 %) kein Vitamin A detektiert werden. Retinol wurde lediglich in 5 Proben, Retinylester in 15 Proben nachgewiesen. Während 42 % der untersuchten Katzen Retinylester im Harn ausscheiden, konnte Retinol nur bei 14 % ermittelt werden. Quantitativ befinden sich fast gleich viel Retinol (durchschnittlich 27 ng/ml) und Retinylester (durchschnittlich 21 ng/ml) im Harn. Dominierende Fraktion der Retinylester war Retinylstearat mit 64  $\pm$  17 % der Gesamtester. Es wurde jedoch nur in 12 der 35 Proben (34 %) nachgewiesen. Retinylpalmitat hingegen konnte in 40 % der Proben ermittelt werden. Retinylpalmitat nahm jedoch lediglich 44  $\pm$  33 % des Gesamt-estergehaltes ein. Retinyloleat wurde nur in 5 Proben nachgewiesen. Weder  $\beta$ -Carotin noch andere Carotinoide konnten im Harn ermittelt werden.

In Bezug auf die Geschlechtsverteilung konnte bei weiblichen Tieren eine deutlich höhere Konzentration an Vitamin A im Harn festgestellt werden (Tab. 8). Die Retinolkonzentration bei Katzen ist 47 % höher als bei Katern. Die Retinylesterkonzentration der Kater beträgt nur 31 % der für die Katzen analysierten Gesamtester.

Während bei Retinyleat und Retinylpalmitat keine Unterschiede in der Geschlechtsverteilung bestehen, ergibt die Retinylstearatkonzentration der Kater lediglich 35 % der bei Katzen detektierten Konzentration.

Tab. 8 Konzentration an Vitamin A, Retinol und Retinylestern im Harn klinisch gesunder Katzen (ng/ml, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

	Vitamin A	Retinol	Retinyl- oleat	Retinyl- palmitat	Retinyl- stearat	Summe Ester
<i>Gesamt</i> ( <i>n=35</i> )	48 $\pm$ 109	27 $\pm$ 80	1 $\pm$ 8	3 $\pm$ 6	13 $\pm$ 51	21 $\pm$ 62
<i>Männlich</i> ( <i>n=19</i> )	28 $\pm$ 75	16 $\pm$ 70	0,6 $\pm$ 1	4 $\pm$ 8	7 $\pm$ 13	8 $\pm$ 11
<i>Weiblich</i> ( <i>n=16</i> )	59 $\pm$ 122	33 $\pm$ 92	3 $\pm$ 12	2 $\pm$ 3	20 $\pm$ 75	26 $\pm$ 90

#### 4.1.3 Vergleich der Konzentration von Vitamin A und $\beta$ -Carotin in Blutplasma und Harn gesunder Katzen

Der Vergleich der Gesamt-Vitamin-A-Konzentration im Blutplasma und im Harn der Katzen zeigt signifikante Unterschiede ( $p < 0,05$ ) (Tab. 9). Gleiches gilt auch für die Konzentration von Retinol, Retinylpalmitat und -stearat. Die Vitamin-A-Konzentration im Harn beträgt nur 5 % der Plasma-Vitamin-A-Konzentration. Die Retinolkonzentration im Harn liegt mit 11 % der Plasma-Retinol-Konzentration etwas höher. Die Gesamtsterkonzentration im Harn dagegen beträgt nur 2,7 % der Plasma-Ester-Konzentration. Während im Blutplasma der Retinolanteil am Gesamt-Vitamin-A  $30 \pm 17\%$  beträgt, ist die Retinolkonzentration im Harn mit  $13 \pm 34\%$  deutlich geringer, wobei auch nur bei der Hälfte aller Harnproben Vitamin A nachgewiesen wurde.  $\beta$ -Carotin ist im Gegensatz zum Blut im Harn nicht detektierbar. Geschlechtsspezifische Unterschiede in der Vitamin-A-Konzentration zeigen sich nicht im Blutplasma. Im Harn dagegen scheiden Katzen deutlich mehr Vitamin A (Retinol und Retinylstearat) aus als Kater.

Tab. 9 Konzentration an Vitamin A, Retinylestern und  $\beta$ -Carotin in Blutplasma und Harn klinisch gesunder Katzen (ng/ml, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

	Vitamin A	Retinol	Retinyl-oleat	Retinyl-palmitat	Retinyl-stearat	$\beta$ -Carotin
<i>Blutplasma</i> (n=33)	976 $\pm$ 458*	240 $\pm$ 64*	30 $\pm$ 18	275 $\pm$ 281*	443 $\pm$ 290*	15 $\pm$ 10
<i>Harn</i> (n=35)	48 $\pm$ 109	27 $\pm$ 80	1 $\pm$ 8	3 $\pm$ 6	13 $\pm$ 51	n.d.

\* Signifikanter Unterschied zur Konzentration im Harn (P < 0,05)

## 4.2 Vitamin A und $\beta$ -Carotin im Blutplasma, Harn und Gallenflüssigkeit erkrankter Katzen

### 4.2.1 Blutplasmaanalyse

In allen Blutplasmaproben erkrankter Tiere konnten Retinol, Retinylester und  $\beta$ -Carotin nachgewiesen werden. Die Gesamtkonzentration an Vitamin A betrug  $3875 \pm 7965$  ng/ml. Die höchste Vitamin-A-Konzentration wurde in Gruppe 1 (den nierenkranken Tieren) nachgewiesen ( $10178 \pm 13994$  ng/ml). In Gruppe 2 und 3 wurden deutlich geringere Vitamin- A-Konzentrationen ermittelt (Tab. 10). Der Anteil der analysierten Retinylester an der Gesamt-Vitamin-A-Konzentration beträgt bei den erkrankten Tieren  $72 \pm 20$  %. In Gruppe 1 wurde der höchste Esteranteil an der Gesamt-Vitamin-A-Konzentration gemessen ( $83 \pm 18$  %). Dominierende Esterfraktion stellt in Gruppe 1 und 2 Retinyl-palmitat, in Gruppe 3 jedoch Retinylstearat dar. Die Retinolkonzentration betrug  $296 \pm 221$  ng/ml. In der Gruppe der nierenkranken Tiere (Gruppe 1) wurde die höchste Retinolkonzentration ( $489 \pm 317$  ng/ml) gemessen.  $\beta$ -Carotin wurde in 81 % der Blutplasmaproben erkrankter Katzen nachgewiesen ( $8 \pm 9$  ng/ml). Weiterhin konnten Spuren von  $\alpha$ -Carotin und 9-*cis*- $\beta$ -Carotin bei der Hälfte der erkrankten Katzen nachgewiesen werden. Lutein, Lycopin, Zeaxanthin und  $\beta$ -Cryptoxanthin hingegen konnten nur bei einzelnen Katzen in geringer Konzentration ermittelt werden (Tab. 11).

Tab. 10 Konzentration an Vitamin A, Retinol und Retinylestern im Blutplasma erkrankter Katzen ( $\mu\text{g/ml}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Gruppe	Vitamin A	Retinol	Retinyl-oleat	Retinyl-palmitat	Retinyl-stearat	Summe Ester
1 (n=4)	10,1 $\pm$ 3,9	0,4 $\pm$ 0,3	0,27 $\pm$ 0,3	9,0 $\pm$ 13	0,41 $\pm$ 0,29	9,68 $\pm$ 1,68
2 (n=3)	2,1 $\pm$ 1,4	0,2 $\pm$ 0,1	0,09 $\pm$ 0,06	0,96 $\pm$ 0,7	0,83 $\pm$ 0,6	1,88 $\pm$ 1,32
3 (n=5)	0,4 $\pm$ 0,2	0,2 $\pm$ 0,08	0,01 $\pm$ 0,01	0,1 $\pm$ 0,4	0,15 $\pm$ 0,1	0,26 $\pm$ 0,18
MW $\pm$ SD	3,8 $\pm$ 7,9	0,29 $\pm$ 0,2	0,12 $\pm$ 0,2	3,03 $\pm$ 7,41	0,43 $\pm$ 0,44	3,58 $\pm$ 7,76

Tab. 11 Konzentration an Carotinen und Xanthophyllen im Blutplasma erkrankter Katzen ( $\text{ng/ml}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung) und deren Nachweishäufigkeit (NWH).

Gruppe	Lycopin	9-cis- $\beta$ -Carotin	$\beta$ -Carotin	$\alpha$ -Carotin	$\beta$ -Cryptoxanthin	Zeaxanthin	Lutein
gesamt(12)	12 <sup>1</sup>	1 $\pm$ 0,4	10 $\pm$ 9	3 $\pm$ 4	2,0 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,8	2 $\pm$ 1
männlich(6)	0	1 $\pm$ 0,9	11 $\pm$ 10	2 $\pm$ 4	2,1 <sup>1</sup>	0,8 $\pm$ 1	1,6 <sup>1</sup>
weiblich(6)	12 <sup>1</sup>	1 $\pm$ 0,2	9 $\pm$ 4	4 $\pm$ 6	2,5 $\pm$ 0,5	2 <sup>1</sup>	3,2 <sup>1</sup>
NWH(%) <sup>2</sup>	8 %	54 %	81 %	45 %	27 %	27 %	18 %

<sup>1</sup>Nachweis nur in einer Probe

<sup>2</sup>Nachweishäufigkeit der Carotine und Xanthophylle bei allen Proben erkrankter Katzen

#### 4.2.2 Gallenflüssigkeitsanalyse

In allen 11 untersuchten Proben von Gallenflüssigkeit konnte Retinol mit einem durchschnittlichen Gehalt von  $672 \pm 320 \text{ ng/ml}$  nachgewiesen werden. Die Retinolwerte variierten zwischen 325 und 1283  $\text{ng/ml}$ . Im Gegensatz dazu wurden Ester nur in zwei

Proben ermittelt: Bei Tier Nr. 10 mit Urämie wurden Retinylpalmitat (24 %) und Retinylstearat (5 % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes) nachgewiesen. Bei der Katze Nr. 23 mit Mammakarzinom entsprachen 11 % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes Retinyleoleat, 54 % Retinylpalmitat und 13 % Retinylstearat. In keiner der Proben wurden  $\beta$ -Carotin oder andere Carotenoide detektiert.

#### 4.2.3 Harnanalyse

Im Vergleich zu den Katzen der Gruppen 2 und 3 sind bei den Katzen der Gruppe 1 mit erhöhten Nieren- und Fettstoffwechselfparametern sowohl die Gesamt-Vitamin-A-Konzentration als auch die Retinylesterkonzentrationen im Harn deutlich geringer. Die Vitamin-A-Konzentration beträgt  $37 \pm 65$  % des Durchschnittswertes der erkrankten Tiere insgesamt und liegt damit ebenfalls wie auch die Gesamtsterkonzentration unter den Werten der gesunden Tiere. Retinyleoleat und Retinylstearat konnten weder in Gruppe 1, noch in Gruppe 2 nachgewiesen werden (Tab. 12). In der Gruppe 2, den Tieren mit normalen Nieren-, aber erhöhten Fettstoffwechselwerten, liegen die höchsten Vitamin-A-Konzentrationen ( $211 \pm 306$  ng/ml) vor. Verursacht wird dieser Wert ausschließlich durch den hohen Retinolgehalt ( $211 \pm 305$  ng/ml). Die Tiere der Gruppe 3 haben im Vergleich zu den gesunden Katzen erhöhte Vitamin-A- und Retinolkonzentrationen im Harn. Nur in dieser Gruppe konnten neben Retinylpalmitat auch -stearat nachgewiesen werden.

Tab. 12 Vitamin A, Retinol und Retinylester im Harn erkrankter Tiere  
(ng/ml, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

Gr. Nr.	Vitamin A	Retinol	Retinyl - oleat	Retinyl- palmitat	Retinyl- stearat	Gesamt- Ester
1 (n=4)	$36 \pm 72$	$34 \pm 69$	n.d.	$1 \pm 3$	n.d.	$1 \pm 3$
2 (n=3)	$211 \pm 306$	$211 \pm 305$	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
3 (n=5)	$125 \pm 141$	$120 \pm 147$	n.d.	$1 \pm 3$	$3 \pm 7$	$5 \pm 10$

### 4.3 Gegenüberstellung der Konzentrationen an Vitamin A und $\beta$ -Carotin gesunder und erkrankter Katzen

#### 4.3.1 Vitamin A und $\beta$ -Carotin im Blut gesunder und erkrankter Katzen

Trotz geringer Probenzahl ( $n=12$ ), ist eine deutliche Veränderung im Vitamin-A-Gehalt der Proben erkrankter Katzen zu erkennen. Bei den Tieren mit Nierenerkrankungen und Veränderungen im Lipidstoffwechsel lag die Vitamin-A-Konzentration im Blut um ein Zehnfaches höher als bei den gesunden Katzen (Abb. 8). Der erhöhte Gesamt-Vitamin-A-Spiegel ist auf einen gestiegenen Retinylpalmitatspiegel zurückzuführen. Die Retinylpalmitatkonzentration im Blutplasma der kranken Katzen ist elf Mal höher als die der gesunden Tiere. In Gruppe 1 beträgt der Retinylestergehalt  $83 \pm 18$  % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes, bei den gesunden Katzen hingegen nur  $70 \pm 17$  %. Das Esterverteilungsmuster ist in Gruppe 1 und 2 gegenüber den gesunden Tieren ebenfalls verändert. In diesen beiden Gruppen dominiert Retinylpalmitat (in Gruppe 1:  $73 \pm 34$  % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes). In Gruppe 3 liegen alle Werte unter denen der gesunden Tiere. Die ermittelten  $\beta$ -Carotinwerte liegen in allen Gruppen kranker Tiere ( $10 \pm 9$  ng/ml) unter denen der gesunden Tiere ( $15 \pm 10$  ng/ml). Bei 100 % der gesunden jedoch lediglich bei 81 % der kranken Katzen wurde  $\beta$ -Carotin im Blutplasma nachgewiesen.

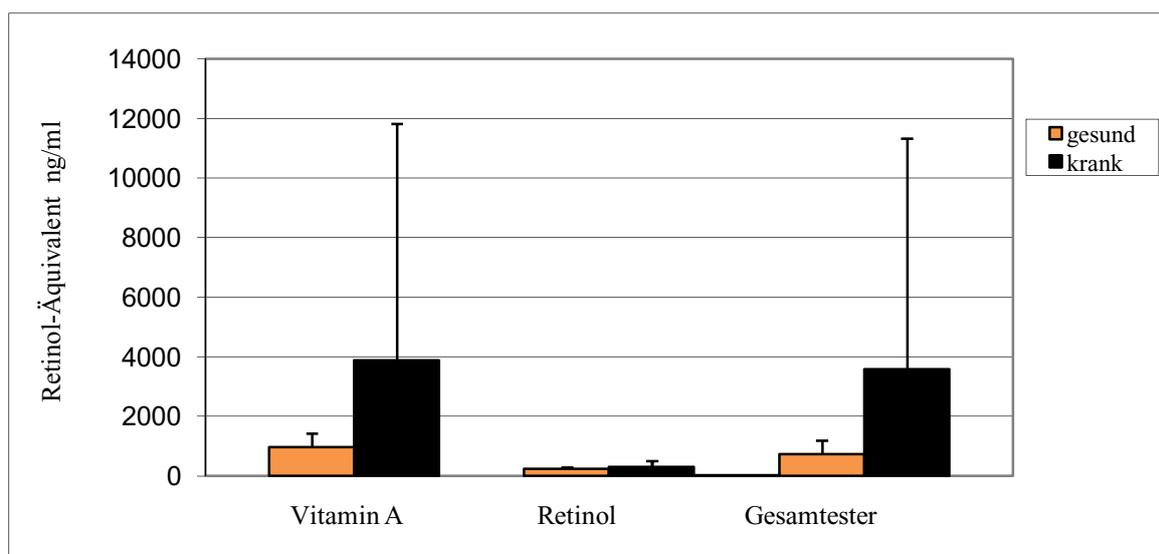


Abb. 8: Vergleich von Vitamin A, Retinol und Retinylester im Blutplasma gesunder ( $n=35$ ) und kranker Katzen ( $n=12$ ) (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Bei dem Vergleich der Konzentration im Blutplasma gesunder und kranker Katzen zeigt sich ein signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ) bei den Konzentrationen von Vitamin A, Retinyloleat, Retinylpalmitat (Abb.9) und Gesamtestern. Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die Konzentrationen an Retinol, Retinylstearat und  $\beta$ -Carotin nicht signifikant.

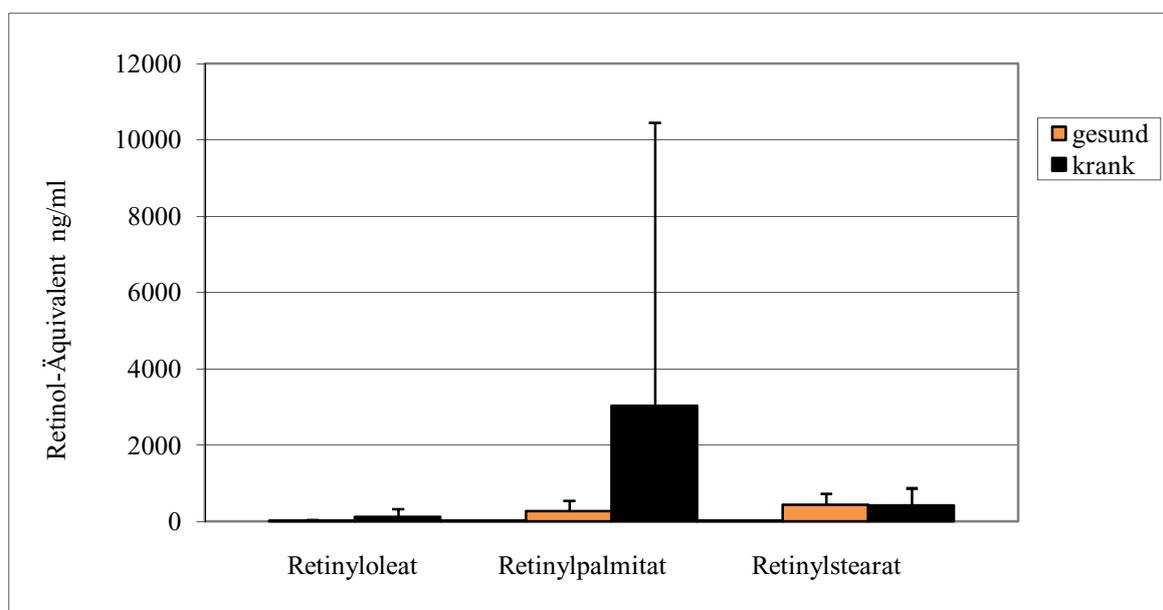


Abb. 9: Vergleich der Esteranteile im Blutplasma bei gesunden ( $n=35$ ) und kranken ( $n=12$ ) Katzen (Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung)

#### 4.3.2 Vitamin A und $\beta$ -Carotin im Harn gesunder und erkrankter Tiere

Bei etwa der Hälfte der erkrankten Katzen (45 %) wurde Vitamin A im Harn nachgewiesen. Der Vitamin-A-Gehalt in den Harnproben erkrankter Katzen ist deutlich höher (mehr als 2,5 fach) als bei gesunden Tieren (Abb.10). Die Ursache liegt in den hohen Retinolwerten, die etwa fünffach höher sind als bei den gesunden Tieren. Bei 70 % der erkrankten Katzen sowie bei 14 % der gesunden Tiere konnte Retinol im Harn nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist, dass in allen 3 Gruppen kranker Tiere der Retinolgehalt  $99,7 \pm 0,4$  % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes betrug. Bei den gesunden Tieren betrug dieser Wert nur  $13 \pm 34$  %. Im Gegensatz dazu scheiden die erkrankten Katzen nur ca. ein Zehntel der Menge an Retinylester im Harn aus, die bei den gesunden

Tieren ermittelt wurden. Während bei den gesunden Katzen Retinylstearat den überwiegenden Teil ( $64 \pm 17 \%$ ) der Ester darstellt, beträgt der Gehalt an Retinylstearat  $16 \pm 33 \%$  und Retinylpalmitat  $82 \pm 34 \%$  der Gesamtester bei den erkrankten Katzen. Ebenfalls auffallend ist, dass die Katzen der Gruppe 1 mit erhöhten Nieren- und Lipidstoffwechselwerten sich hinsichtlich des Gesamt-Vitamin-A-Wertes und des Retinolwertes im Harn kaum von den gesunden Tieren unterscheiden. Lediglich hinsichtlich der Retinylesterkonzentration und -verteilung gibt es zwischen den beiden Gruppen deutliche Unterschiede.

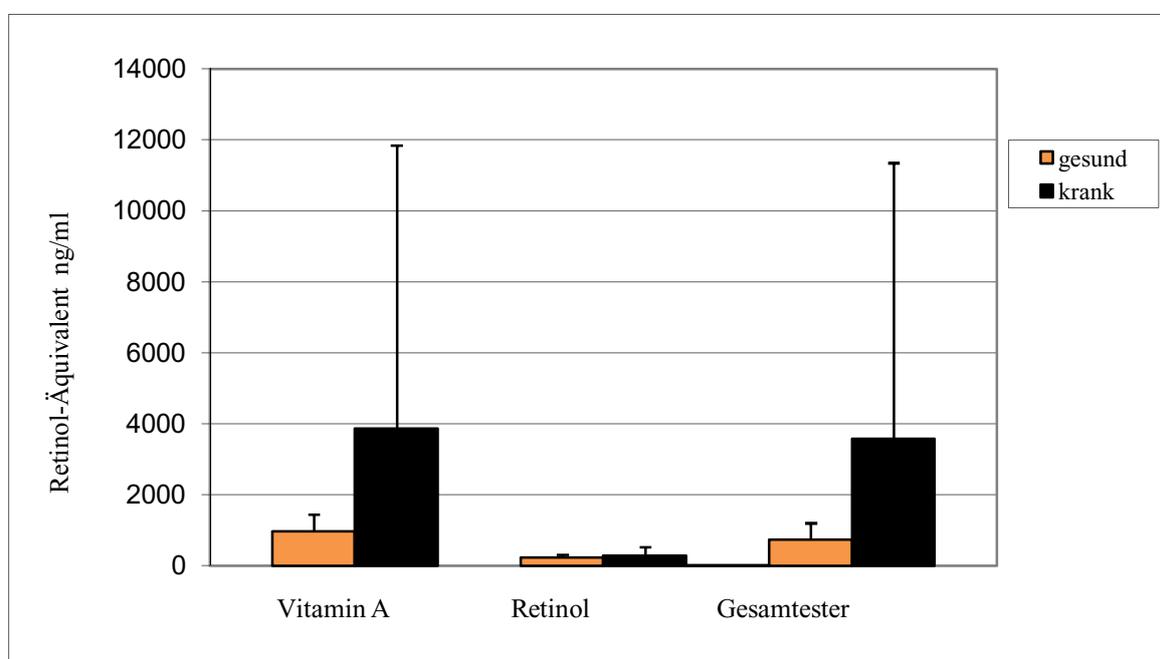


Abb. 10: Vitamin-A-, Retinol- und Retinylesterkonzentration im Harn gesunder ( $n=35$ ) und kranker ( $n=12$ ) Katzen (ng/ml, Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung). In 18 von 35 Proben der gesunden Katzen und in 5 von 12 Proben der kranken Katzen war kein Vitamin A nachweisbar.

Nur die Retinolkonzentrationen im Harn der beiden Gruppen zeigen einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ). Die Retinylester- und die Gesamt-Vitamin-A-Konzentrationen unterscheiden sich nicht statistisch signifikant.  $\beta$ -Carotin oder Carotinoide wurden in keiner der Proben detektiert.

#### 4.4 Vitamin A und $\beta$ -Carotin in Leber und Niere

Der durchschnittliche Vitamin-A-Gehalt in der Leber betrug  $4314 \pm 2043 \mu\text{g/g}$ . In allen 3 Gruppen sind die Vitamin-A-Werte der Leber mindestens 100-fach höher als die der Nieren. Der Retinolanteil am Gesamt-Vitamin-A-Gehalt der Leber betrug in den einzelnen Gruppen maximal 0,1 %. Retinylpalmitat dominierte im Esterverteilungsmuster. Die Konzentration betrug 67 % des Gesamtestergehaltes. Der Gehalt an Retinyloleat und Retinylstearat in der Leber waren dagegen nicht unterschiedlich. Der durchschnittliche Vitamin-A-Gehalt in der Niere betrug  $11 \pm 8 \mu\text{g/g}$ , wobei es deutliche Unterschiede im Vergleich von Nierenrinde und Nierenmark gab (Tab. 13,14).

Tab. 13 Vitamin A, Retinol- und Gesamtsterkonzentrationen in Leber und Niere ( $\mu\text{g/g}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Organ	Vitamin A	Retinol	Gesamtster
Leber	$4314 \pm 2043^*$	$4,7 \pm 6,4$	$4309 \pm 2039^*$
Niere	$11,4 \pm 8,2$	$1,1 \pm 0,9$	$10,7 \pm 8,7$

\*Signifikanter Unterschied zur Niere ( $p < 0,05$ )

Tab. 14 Retinylesterkonzentrationen in Leber und Niere ( $\mu\text{g/g}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Organ	Retinyloleat	Retinylpalmitat	Retinylstearat
Leber	$613 \pm 389^*$	$2918 \pm 1418^*$	$777 \pm 489^*$
Niere	$2,4 \pm 2,8$	$5,2 \pm 4,1$	$3,0 \pm 2,7$

\*Signifikanter Unterschied zur Niere ( $p < 0,05$ )

In der Nierenrinde wurde eine durchschnittliche Vitamin-A-Konzentration von  $14 \pm 9 \mu\text{g/g}$  ermittelt. Im Nierenmark lag dieser Wert (Tab. 15) bei durchschnittlich  $8 \pm 6 \mu\text{g/g}$ . Bei der Verteilung der verschiedenen Ester konnte einheitlich in allen Gruppen sowohl in Nierenmark als auch in Nierenrinde eine Dominanz von Retinylpalmitat (wie auch in der Leber) festgestellt werden. Der Anteil von Retinol am Vitamin-A-Gehalt variierte in den einzelnen Proben von 1,7 - 63 % und beträgt im Durchschnitt 14,8 %. In keiner der Leber- oder Nierenproben wurde  $\beta$ -Carotin nachgewiesen.

Tab.15 Vitamin A, Retinol- und Retinylesterkonzentrationen in Nierenmark und Nierenrinde ( $\mu\text{g/g}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Organ	Vitamin A	Retinol	Retinyl-oleat	Retinyl-palmitat	Retinyl-stearat	Gesamt-Ester
<b>Nierenmark</b>	$8,7 \pm 6,2$	$0,4 \pm 0,3$	$2,0 \pm 2,7$	$4,1 \pm 3,1$	$2,9 \pm 3,2$	$9,1 \pm 8,5$
<b>Nierenrinde</b>	$14 \pm 9$	$1,8 \pm 1$	$2,8 \pm 2,9$	$6,2 \pm 4,9$	$3,2 \pm 2,1$	$12 \pm 9$

#### Vergleich der Vitamin-A-Konzentration in Leber und Nieren der einzelnen Gruppen

##### *Vitamin- A-Konzentration in der Leber*

Die höchste Konzentration an Vitamin A und Retinylestern (Tab. 16, 17) wurde in Gruppe 1 - den nierenkranken Tieren - ermittelt, die jedoch nicht signifikant unterschiedlich zu denen der Gruppe 2 und 3 war. Bei dem Ersterverteilungsmuster zeigt sich in allen 3 Gruppen eine Dominanz von Retinylpalmitat gegenüber Retinylstearat und Retinyloleat. In Gruppe 2 - den Katzen mit normalen Nierenwerten, jedoch erhöhten Fettstoffwechselwerten - konnte in keiner der drei Proben Retinol detektiert werden. In Gruppe 1 und 3 hingegen waren geringe Retinolkonzentrationen im Lebergewebe vorhanden.

Tab. 16 Konzentration an Vitamin-A, Retinol und Retinylestern in der Leber ( $\mu\text{g/g}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Gruppe	Vitamin A	Retinol	Gesamttester
1 (n=4)	5198 $\pm$ 2553	8 $\pm$ 7	5189 $\pm$ 2549
2 (n=3)	2669 $\pm$ 1028	0	2669 $\pm$ 1028
3 (n=5)	4595 $\pm$ 1698	4,3 $\pm$ 6,2	4590 $\pm$ 1696

Tab. 17 Konzentration an Retinylestern in der Leber ( $\mu\text{g/g}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Gruppe	Retinyleoleat	Retinylpalmitat	Retinylstearat
1 (n=4)	743 $\pm$ 546	3662 $\pm$ 1858	783 $\pm$ 744
2 (n=3)	355 $\pm$ 121	1783 $\pm$ 728	531 $\pm$ 192
3 (n=5)	665 $\pm$ 335	3003 $\pm$ 1006	921 $\pm$ 377

#### *Vitamin-A-Konzentration in der Niere*

In der Nierenrinde (Tab. 18) wurden in allen 3 Gruppen ähnliche Konzentrationen an Retinylestern und Vitamin A ermittelt. Im Nierenmark (Tab. 19) konnten in der Gruppe 1 - den nierenkranken Katzen - die höchsten Werte an Retinylestern und Vitamin A detektiert werden. In den Gruppe 2 und 3 betrug der Vitamin-A-Gehalt im Nierenmark nur 38 % des Vitamin-A-Gehaltes in der Nierenrinde. In der Gruppe 1 jedoch wurden in der Nierenrinde nur 85 % der Vitamin-A-Konzentration vom Nierenmark ermittelt. Auch die Retinylesterkonzentrationen waren bei den Gruppen 2 und 3 im Nierenmark deutlich niedriger als in der Nierenrinde. In Gruppe 1 jedoch, den nierenkranken Tieren, waren die Retinylesterkonzentrationen im Nierenmark 41 % höher als in der Nierenrinde.

Die Retinolkonzentration im Nierenmark variiert in den einzelnen Gruppen zwischen 15 % (Gruppe 2) und 50 % (Gruppe 1) der Retinolkonzentration in der Nierenrinde. Wie auch in der Leber dominiert im Esterverteilungsmuster sowohl in Nierenmark als auch in Nierenrinde Retinylpalmitat gegenüber Retinylstearat und -oleat.

Tab.18 Konzentration an Vitamin A und Retinylestern in der Nierenrinde ( $\mu\text{g/g}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Gruppe	Vitamin A	Retinol	Retinyl-oleat	Retinyl-palmitat	Retinyl-stearat	Gesamt-Ester
1 (n=4)	12 $\pm$ 12	1 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 1	6 $\pm$ 8	2 $\pm$ 2	11 $\pm$ 12
2 (n=3)	20 $\pm$ 6	2 $\pm$ 1	5 $\pm$ 3	7 $\pm$ 0,6	4 $\pm$ 1	17 $\pm$ 5
3 (n=5)	11 $\pm$ 7	1 $\pm$ 0,8	2 $\pm$ 2	4 $\pm$ 3	2 $\pm$ 1	9 $\pm$ 7

Tab. 19 Konzentration an Vitamin A und Retinylestern im Nierenmark ( $\mu\text{g/g}$ , Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Gruppe	Vitamin A	Retinol	Retinyl-oleat	Retinyl-palmitat	Retinyl-stearat	Gesamt-Ester
1 (n=4)	14 $\pm$ 8	0,5 $\pm$ 0,5	3,9 $\pm$ 4,4	6,5 $\pm$ 3	5,2 $\pm$ 5,1	15,6 $\pm$ 12,1
2 (n=3)	6 $\pm$ 0,8	0,3 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,3	2 $\pm$ 0,2	1 $\pm$ 0,2	5 $\pm$ 0,7
3 (n=5)	6 $\pm$ 5	0,4 $\pm$ 0,1	1 $\pm$ 0,7	3 $\pm$ 3	1 $\pm$ 0,9	6 $\pm$ 4

#### 4.5 Konzentration an Triglyceriden und Cholesterol im Blutplasma

Sowohl die Blutplasmaproben der gesunden als auch die erkrankter Katzen wurden mit Hilfe quantitativ-enzymatischer Bestimmungen auf ihre Gesamtcholesterol- (Abb. 11) sowie die Triglyceridkonzentration (Abb. 12) untersucht.

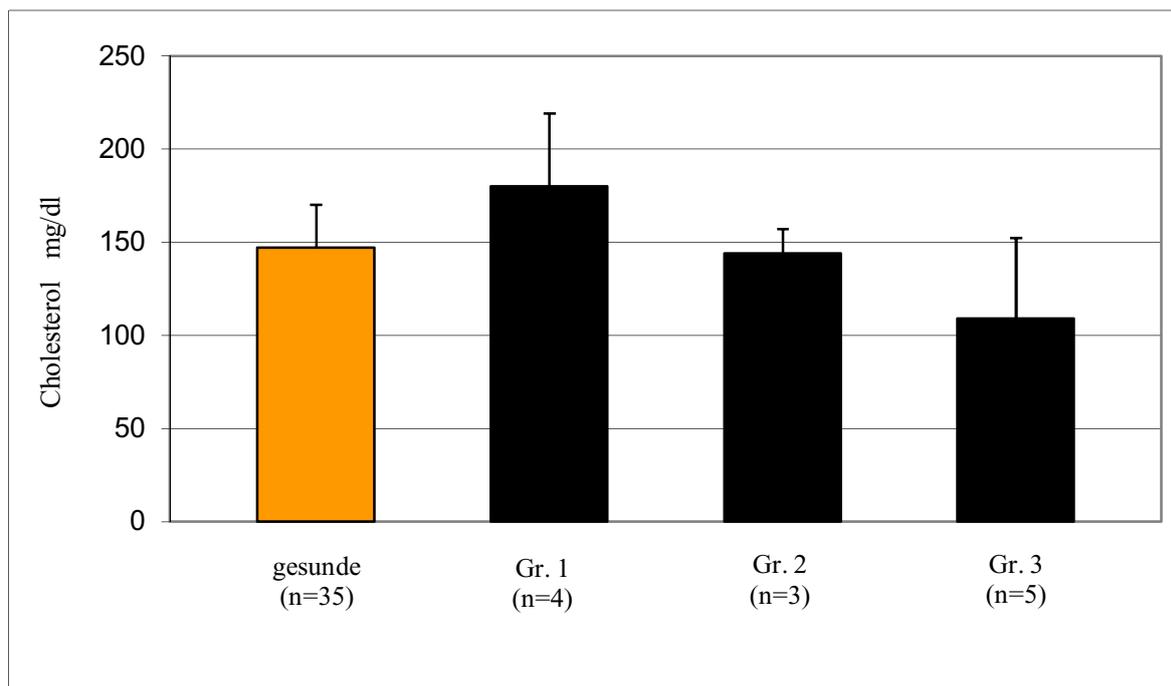


Abb. 11: Vergleich der Cholesterolkonzentration im Blut der gesunden und klinisch erkrankten Katzen (mg/dl; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

Bei den 35 gesunden Tieren betrug die durchschnittliche Cholesterolkonzentration  $147 \pm 23$  mg/dl und entsprach dem für Katzen üblichen Referenzbereich (70-150 mg/dl). Bei den erkrankten Tieren erfolgte wiederum die Einteilung in die 3 Gruppen. In Gruppe 1 wurden mit  $180 \pm 39$  mg/dl die höchsten Cholesterolwerte ermittelt. Die Cholesterolkonzentration in Gruppe 2 ( $144 \pm 13$  mg/dl) entsprach etwa dem Wert der gesunden Tiere. In Gruppe 3 waren die Werte ( $105 \pm 32$  mg/dl) etwas geringer als bei den gesunden Tieren.

Der durchschnittliche Triglyceridgehalt des Plasmas der 35 gesunden Katzen betrug  $52 \pm 13$  mg/dl. Dagegen konnte in Gruppe 1, den vorwiegend nierenkranken Tieren, eine mehr als doppelt so hohe Konzentration ( $115 \pm 18$  mg/dl) ermittelt werden. Auch in Gruppe 2 war der Triglyceridgehalt des Plasmas ( $91 \pm 7$  mg/dl) deutlich erhöht gegenüber den gesunden Tieren, lag aber noch im für Katzen üblichen Referenzbereich (50-100 mg/dl). Dagegen lag die Triglyceridkonzentration in Gruppe 3 ( $44 \pm 8$  mg/dl) unter dem Durchschnitt der gesunden Tiere.

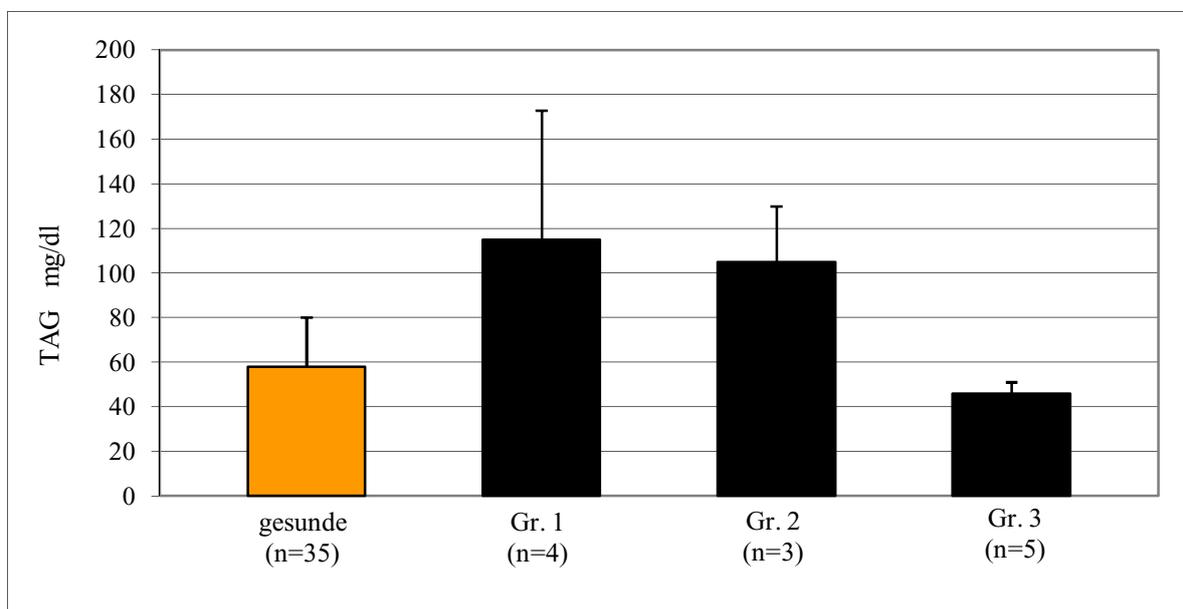


Abb. 12: Vergleich der Triglyceridkonzentration im Blut gesunder und erkrankter Katzen (mg/dl; Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung).

## 4.6 Immunologischer RBP-Nachweis in Blutplasma und Harn

### 4.6.1 RBP-Nachweis im Blutplasma

Sowohl die Proben klinisch gesunder wie auch die erkrankter Katzen wurden mittels Western-Blot-Technik immunologisch auf das Vorhandensein von RBP untersucht. Im Blutplasma aller Tiere konnte RBP mit einem Molekulargewicht von 21 kDa nachgewiesen werden (Abb.13). Im Vergleich zum Humanstandard war die RBP-Immunreaktion deutlich geringer. Auch innerhalb der verschiedenen Proben konnte eine deutlich stärkere Lumineszenz der Proben mit hohem Retinolgehalt im Plasma verzeichnet werden.

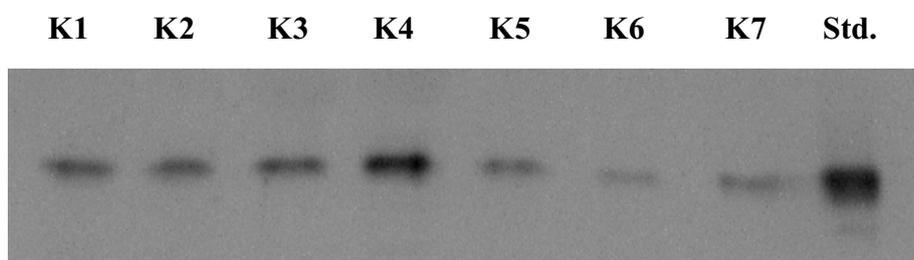


Abb. 83: Immunologischer Nachweis des RBP im Katzenplasma mittels Western-Blot.

Standard: Humanserum für Blot 1:20 verdünnt (1,21 mg/l RBP). Auftrag: 15 µl. Verdünnung: Katzenserum 1:20 für Blot und 1:40 für Färbung. Katze K4 mit der intensivsten Lumineszenz hat den höchsten Retinolwert (855 ng/ml). Katze K6 mit der geringsten Lumineszenz hat den geringsten Retinolwert (173 ng/ml).

### 4.6.2 RBP-Nachweis im Harn

Im Katzenharn wurde nur in vier der Proben klinisch erkrankter Katzen, die Retinol enthielten, RBP detektiert (Abb. 14). Dabei konnte wie auch beim Blutplasma ein Zusammenhang zwischen dem Retinolgehalt im Harn und der Stärke der Lumineszenz der Probe nachgewiesen werden. In Harnproben klinisch gesunder Katzen, die auch in 5 Fällen Retinol mit dem Harn ausgeschieden hatten, konnte dagegen kein RBP detektiert werden.

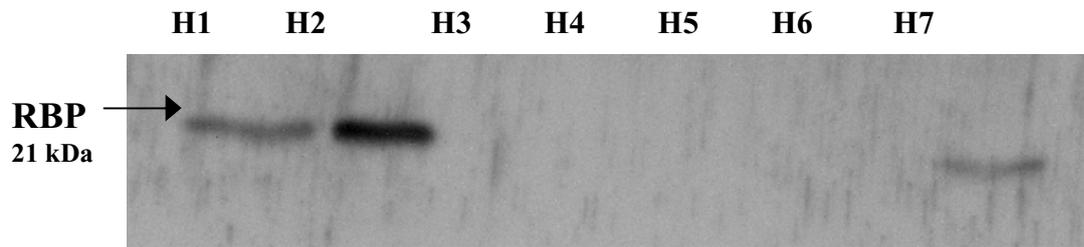


Abb. 94: Immunologischer Nachweis des RBP im Katzenharn mittels Western-Blot

Auftrag: 15 $\mu$ l. Verdünnung: Katzenharn 1:1. Katze H2 mit der intensivsten Lumineszenz hat den höchsten Retinolwert (302 ng/ml). Katze H7 mit der geringsten Lumineszenz hat den geringsten Retinolwert (72 ng/ml). Katzen H3 - H6 zeigten keinerlei Reaktion. Bei diesen Tieren wurde auch mittels HPLC kein Retinol im Harn analysiert.

## 4.7 Der Nachweis und die Verteilung von RBP in der Leber und der Niere

### 4.7.1 Physiologische RBP-Verteilung

#### Nachweis von RBP in der Leber

In allen Leberparenchymzellen (Hepatozyten) kann eine spezifische zytoplasmatische Färbung beobachtet werden. Das RBP ist diffus in den Hepatozyten verteilt. Ein deutlicher Unterschied in der Intensität der Färbung kann zwischen den zentrolobulären und den peripheren Hepatozyten ermittelt werden. Zentrolobulär ist die Färbung wesentlich intensiver als peripher.

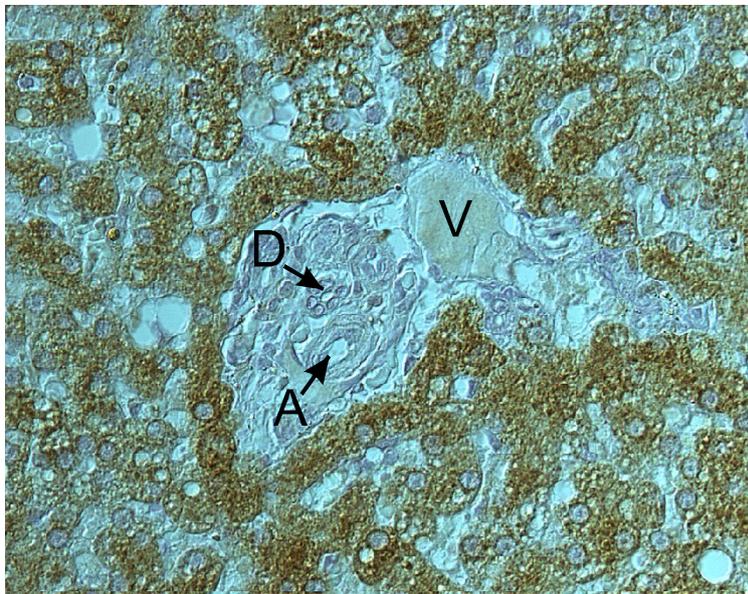


Abb. 105: **Immunhistologische Darstellung von RBP in der Katzenleber.** Die Visualisierung des gebundenen RBP erfolgte unter Verwendung von Diaminobenzidin mittels PAP-Methode. Die Parenchymzellen des periportal Gewebes zeigen eine deutliche Farbreaktion. GLISSONSCHE Trias bestehend aus *A. hepatica* (A), *V. portae* (V) und *Ductuli biliferi* (D). (Immunhistologie, Normarski Interferenzkontrast).

### Nachweis von RBP in den Nieren

In den Nieren wurde eine unterschiedliche RBP-Verteilung in den Zellen festgestellt. In den Epithelzellen der proximalen gewundenen Tubulusabschnitte der Nierenrinde ist eine deutlich positive Reaktion zu erkennen. Die apikalen zytoplasmatischen Vesikel zeigen eine stark positive RBP-Reaktion, wohingegen das Zytoplasma weniger intensiv gefärbt ist. Die Intensität der Färbung variiert jedoch in den einzelnen Tubuli. Im Gegensatz dazu konnte weder in den glomerulären Strukturen, der Henle-Schleife, den distalen Tubuli noch in den Sammelrohren eine signifikante Färbungsreaktion festgestellt werden.



Abb. 116: Immunhistologische Darstellung von RBP in der Katzeniere

Die Visualisierung des gebundenen RBP erfolgte unter Verwendung von Diaminobenzidin mittels PAP-Methode. Intensive Farbreaktion ist in den Zellen des proximalen gewundenen Tubulus zu beobachten. Insbesondere die apikalen zytoplasmatischen Vesikel zeigen eine auffallend starke Reaktion (Pfeilspitzen). Die Anfärbung des Zytoplasmas ist weniger kräftig. Jedoch im basolateralen Bereich der Zellen des proximalen Tubulus kann wieder eine intensivere Farbreaktion beobachtet werden (Pfeile). Glomerulum (G) (Immunhistologie, Normarski Interferenzkontrast).

Der immunhistologische Nachweis von RBP in der Leber und der Niere wurde mittels Peroxidase-anti-Peroxidase-Methode (PAP) durchgeführt. Die Organe stammten von jeweils 6 männlichen und weiblichen Hauskatzen im Alter von 1-16 Jahren. Es wurden sowohl Organe untersucht, die optisch frei von pathologischen Befunden waren, als auch Organe mit pathologischen Veränderungen.

#### **4.7.2 Verteilung von RBP bei verschiedenen Nierenerkrankungen**

Am Fall von fünf erkrankten Katzen sollen Veränderungen der Verteilung von RBP im Nierengewebe aufgezeigt werden. Trotz verschiedener Grunderkrankungen (chronische Niereninsuffizienz, Leukose, polyzystisches Syndrom der Perserkatze, Diabetes mellitus, Pyometra) wiesen alle Tiere chronische Nephropathien sowie hochgradige pathohistologische Veränderungen im Nierengewebe auf. Neben den klinischen Vorberichten und den verabreichten Futtermitteln sind auch die Harnstoff- und Kreatininwerte sowie die Vitamin-A-Konzentrationen im Blut, Harn, Leber und Niere sowie das Vorhandensein von RBP im Harn der einzelnen Tiere aufgeführt. Während bei allen fünf ausgewählten Tieren Retinol im Harn nachgewiesen wurde, konnte RBP nur im Harn einer Katze detektiert werden.

Die Referenzbereiche der Harnstoff- und Kreatininwerte wurden aus der systemspezifischen Software des Vet- Test-Gerätes der Firma IDEXX, USA Version 5.0 übernommen.

Die Referenzbereiche der Vitamin-A-Konzentrationen in Blut, Leber, Niere, Harn wurden aus Mittelwert und Standardabweichung aller untersuchten Katzen ermittelt.

**Fallbericht Nr. 1:**

EHK, weiblich, 8 Jahre, vorgestellt mit Polydipsie, Polyurie, hochgradiger Pyometra, Nephritis

Futter: handelsübliches Trockenfutter verschiedener Hersteller, selten Dosenfutter

Nierenwerte:

Kreatinin: 0,99 mg/dl (RB: 0,8-2,39 mg/dl)  
Harnstoff: 23,78 mg/dl (RB: 16,03-36,08 mg/dl)

Histologischer Nierenbefund:

massive Pyelonephritis mit mononukleären Zellen, Glomerulonephritis

Vitamin-A-Konzentration:

	Katze Nr.1	Referenzbereich aller untersuchten Katzen
Blut:	0,71 mg/l	0,97 ± 0,45 mg/l
Leber:	2006 mg/kg	4314 ± 2043 mg/kg
Nierenrinde:	11,6 mg/kg	14,1 ± 9,3 mg/kg
Nierenmark:	11,1 mg/kg	8,7 ± 6,2 mg/kg
Harn:	n.d.	0,04 ± 0,09 mg/l
RBP im Harn:	negativ	

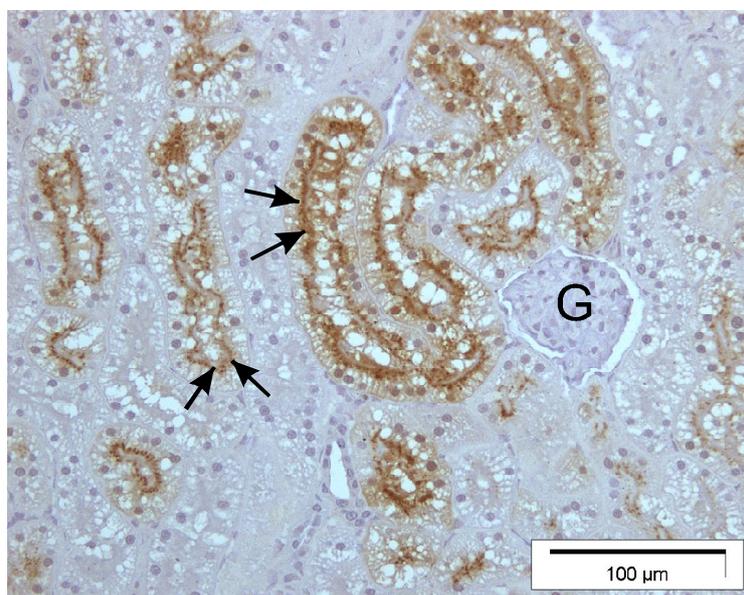


Abb. 17: Immunhistologische Darstellung von RBP im Nierengewebe

Deutlicher Nachweis von RBP in den Epithelzellen der proximalen Nierentubuli der Katze. Besonders im Bereich der apikalen Membran ist eine intensive granuläre RBP-Detektion erkennbar (Pfeilspitzen). Im basolateralen Zellbereich ist lediglich eine leichte diffuse zytoplasmatische Färbung zu beobachten. In den Glomeruli (G) findet keinerlei Anfärbung statt.

**Fallbericht Nr. 2:**

EHK, männlich, kastriert, 5 Jahre, vorgestellt mit Apathie, geschwürig-eitriger Paradontitis, hochgradigen Atembeschwerden, blassen Schleimhäuten, Polyurie

Futter: Handelsübliches Dosen- und Trockenfutter für Katzen

Blutwerte:

Kreatinin:	4,81 mg/dl	(RB: 0,8-2,39 mg/dl)
Harnstoff:	130,3 mg/dl	(RB:16,03-36 mg/dl)

Histologischer Nierenbefund:

Schrumpfniere

Vitamin-A-Konzentration:

	Katze Nr.2	Referenzbereich aller Katzen
Blut:	26, 27 mg/l	0, 97 ± 0, 45 mg/l
Leber:	4038 mg/kg	4314 ± 2043 mg/kg
Nierenrinde:	8,7 mg/kg	14,1 ± 9,3 mg/kg
Nierenmark:	4,9 mg/kg	8,7 ± 6,2 mg/kg
Harn:	0,016 mg/l (Ester)	0,04 ± 0,09 mg/l
RBP im Harn:	negativ	

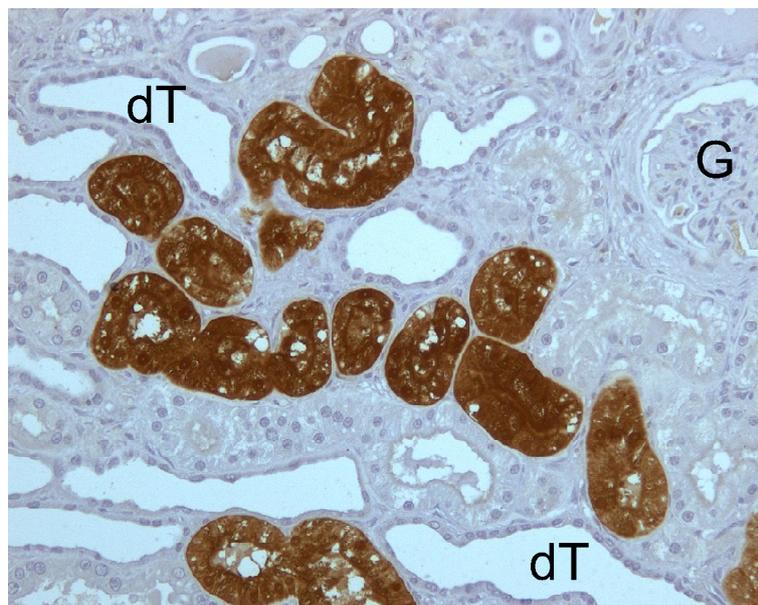


Abb. 18: Immunhistologische Darstellung von RBP im Nierengewebe

Massive Ansammlung von RBP in mehreren Abschnitten der proximalen Nierentubuli. Dort ist eine gleichmäßige Sättigung mit RBP sowohl im apikalen als auch im basolateralen Zellbereich erkennbar. Eine Farbdifferenzierung innerhalb dieser Zellabschnitte ist kaum zu verzeichnen. Des Weiteren sind vereinzelt noch funktionstüchtige Tubulusbereiche mit dezenter apikaler Anfärbung zu beobachten. In den Glomeruli (G) kommt es zu keiner Anfärbung. Es sind jedoch Fibrosen im periglomerulären Gewebe und dilatierten Tubuli (dT) erkennbar.

**Fallbericht Nr. 3:**

EHK, weiblich, 9 Jahre, vorgestellt wegen mangelnder Futteraufnahme seit 3 Wochen, Polyurie, Polydipsie, teilweise Diarrhoe

Futter: Handelsübliches Dosenfutter für Katzen, zeitweilig auch Essensreste

Blutwerte:

Kreatinin:	12,7 mg/dl	(RB: 0,8-2,39 mg/dl)
Harnstoff:	151 mg/dl	(RB: 16,03-36,08 mg/dl)

Histologischer Befund:

Chronisch interstitielle Leukose, Fibrosen, Entzündungen im Nierenmarkbereich

Vitamin-A-Konzentration:

	Katze Nr.3	Referenzbereich aller Katzen
Blut:	3,3 mg/l	0,97 ± 0,45 mg/l
Leber:	7167 mg/kg	4314 ± 2043 mg/kg
Nierenrinde:	2,7 mg/kg	14,1 ± 9,3 mg/kg
Nierenmark:	15,2 mg/kg	8,7 ± 6,2 mg/kg
Harn:	0,003 mg/l (Ester)	0,04 ± 0,09 mg/l
RBP im Harn:	negativ	

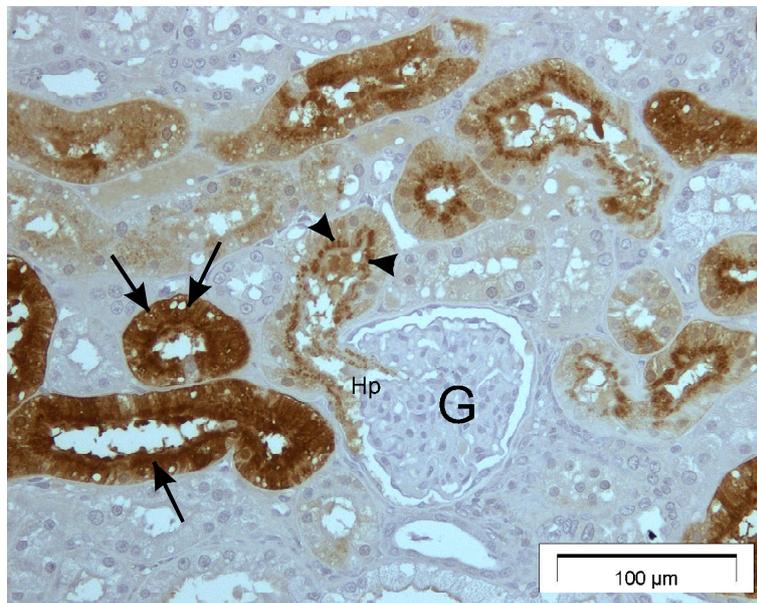


Abb.19: Immunhistologische Darstellung von RBP im Nierengewebe

In dieser Abbildung sind deutliche Unterschiede in der Ansammlung von RBP innerhalb der proximalen Tubulusabschnitte erkennbar: Neben Bereichen mit deutlicher apikaler, granulärer RBP-Detektion (Pfeilspitzen) und dezent-diffuser RBP-Detektion im zytoplasmatischen und basolateralen Abschnitt sind auch proximale Tubulusbereiche zu beobachten, in denen eine massive Sättigung mit RBP (Pfeile) in allen Zellabschnitten zu verzeichnen ist. In den Glomeruli (G) gibt es keine Anfärbung. Hp = Harnpol.

**Fallbericht Nr. 4:**

Siamkatze, männlich, kastriert, 14 Jahre, Diabetes mellitus seit 6 Jahren, seitdem Behandlung mit Insulininjektionen und Fütterung von Feline w/d Trockenfutter, Firma Hills (rohfaserreich), vorgestellt mit massiver Diarrhoe und Vomitus sowie Anurie

Futter:

Seit 2 Tagen Geflügelfleisch, Reis, Möhren und Rindfleisch als Schonkost

Blutwerte:

Kreatinin:	1,03 mg/dl	(RB: 0,8-2,39 mg/dl)
Harnstoff:	30,88 mg/dl	(RB: 16,03-36 mg/dl)

Histologischer Nierenbefund:

chronisch interstitielle Fibrose, Bowmannsche Kapselfibrose, Atrophie der Glomerulashlingen

Vitamin-A-Konzentration:

	Katze Nr.4	Referenzbereich aller Katzen
Blut:	0,87 mg/l	0,97 ± 0,45 mg/l
Leber:	2146 mg/kg	4314 ± 2043 mg/kg
Nierenrinde:	31,3 mg/kg	14,1 ± 9,3 mg/kg
Nierenmark:	10,5 mg/kg	8,7 ± 6,2 mg/kg
Harn:	0,141 mg/l (Retinol + Ester)	0,04 ± 0,09 mg/l
RBP im Harn:	negativ	

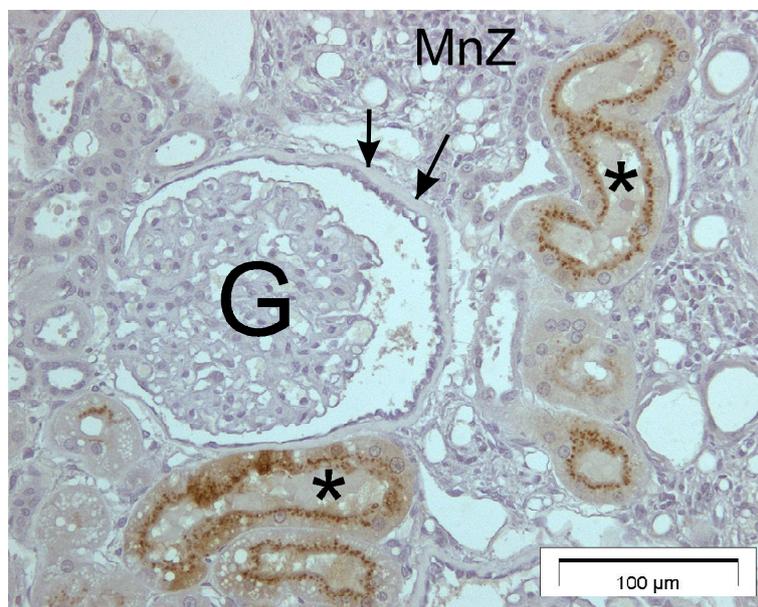


Abb. 20 Immunhistologische Darstellung von RBP im Nierengewebe

In den Epithelzellen der proximalen Nierentubuli ist eine deutliche apikal-granuläre RBP-Anfärbung (\*) zu erkennen. Neben dem Glomerulum (G) mit Fibrose der Bowmannschen Kapsel (Pfeile) sind auch interstitielle Fibrosen und mononukleäre Zellen (MnZ) zu verzeichnen.

**Fallbericht Nr. 5:**

Perserkatze, weiblich, kastriert, 13,5 Jahre, vorgestellt wegen Polydipsie und Polyurie, Kachexie, Apathie. Diagnose: Felines polyzystisches Syndrom der Perserkatze, sowie Nierenversagen (Sektionsbefund: mehrere bis taubeneigroße Zysten an Nieren und Leber)

Futter:

diverse Sorten handelsüblichen Katzenfutters, Essensreste, Fleisch roh und gekocht

Blutwerte:

Kreatinin:	4,98 mg/dl	(RB: 0,8-2,39 mg/dl)
Harnstoff:	76,15 mg/dl	(RB: 16,03-36 mg/dl)

Histologischer Nierenbefund: Schrumpfniere mit Proteinzyllindern in den Tubuli

Vitamin-A-Konzentration:

	Katze Nr.5	Referenzbereich aller untersuchten Katzen
Blut:	3,45 mg/l	0,97 ± 0,45 mg/l
Leber:	7439 mg/kg	4314 ± 2043 mg/kg
Nierenrinde:	7,18 mg/kg	14,1 ± 9,3 mg/kg
Nierenmark:	23,7 mg/kg	8,7 ± 6,2 mg/kg
Harn:	0,2943 mg/l (Retinol)	0,04 ± 0,09 mg/l
RBP im Harn:	positiv	

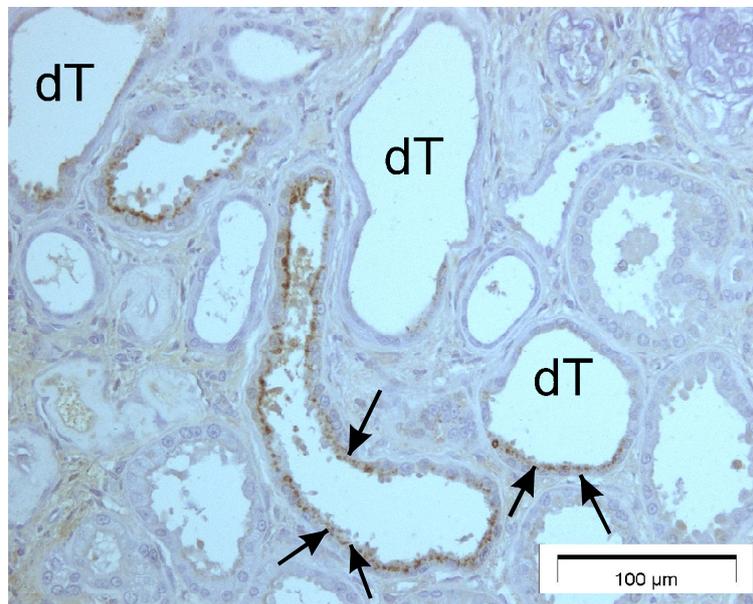


Abb. 21: Immunhistologische Darstellung von RBP im Nierengewebe

Diese Schrumpfniere ist durch schwach ausgebildete bzw. im Untergang befindliche Zellstrukturen geprägt. In einzelnen Abschnitten der dilatierter Tubuli (dT) ist eine apikale granuläre RBP-Detektion (Pfeile) erkennbar. In den Tubuli befinden sich z.T. Proteinzyllinder.

## 5 Diskussion

### 5.1 Vitamin-A-Konzentration sowie der Nachweis von RBP im Blutplasma und Harn

#### 5.1.1 Vitamin A und RBP im Blutplasma

Vitamin A wird bei Katzen, wie auch bei anderen Vertretern der Karnivoren, in Form von Retinol und Retinylestern im Blut transportiert. Im Blutplasma der untersuchten Katzen liegt die durchschnittliche Vitamin-A-Konzentration bei  $0,97 \pm 0,45 \mu\text{g/ml}$ . Ähnliche Werte ermittelten SCHWEIGERT und UEHLEIN-HARRELL (1989); SCHWEIGERT et al. (1990a) und SCHWEIGERT und ZUCKER (1991). Für Hunde, Silberfuchse und Marderhunde ermittelte RAILA (1999) eine durchschnittliche Vitamin-A-Plasmakonzentration von  $1,8 \mu\text{g/ml}$ . Höhere Werte haben SCHWEIGERT und UEHLEIN-HARRELL (1989) für verschiedene Vertreter der *Canidae* und *Mustelidae* gemessen. Generell wird in den Untersuchungen für viele Tierarten eine große Variabilität der Plasma-Vitamin-A-Konzentration beschrieben (SCHWEIGERT et al., 1990 a; SCHWEIGERT und ZUCKER, 1991). Als Ursache dieser Variabilität wird neben dem Vitamin-A-Gehalt des Futters auch die Art des Futters diskutiert. In einer Fütterungsstudie über 67 Wochen konnte der Einfluß einer unterschiedlichen Vitamin-A-Versorgung auf die Vitamin-A-Konzentration im Blut von Hunden nachgewiesen werden (SCHWEIGERT und BOK, 1998). Dabei zeigte sich, dass trotz reduzierter Vitamin-A-Versorgung ( $<75 \text{ IE/kg KM}$ ) Retinylester im Blut nachweisbar waren. Das bedeutet, dass die Sekretion der Lipoprotein-gebundenen Retinylester durch die Leber auch in Vitamin-A-Mangelsituationen nicht zum Erliegen kommt. Nach Umstellung der Hunde auf einen sehr hohen Vitamin-A-Gehalt im Futter ( $2400 \text{ IE/kg KM}$ ) stieg die Retinylesterkonzentration im Blut rasch an. Somit konnte ein Zusammenhang zwischen dem Vitamin-A-Gehalt im Futter und der Konzentration der Retinylester im Blutplasma von Hunden ermittelt werden. Neben dem Vitamin-A-Gehalt der Ration scheint auch die Rationszusammensetzung, insbesondere der Proteingehalt, für die Vitamin-A-Konzentration im Blut bedeutsam zu sein (SCHWEIGERT, et al., 1990). Der Nahrungsproteingehalt beeinflusst möglicherweise die intestinale Vitamin-A-Resorption oder die Lipoproteinsynthese in der Leber. Untersuchungen dieser Art bei Katzen wurden bisher nicht durchgeführt.

Aufgrund der streng homöostatischen Regulation des Plasma-Retinolspiegels durch das RBP leitet OLSON (1984) für den Menschen einen hypothetischen Zusammenhang zwischen der Retinol-Plasma-Konzentration und der Leber-Vitamin-A-Konzentration ab. Danach kommt es erst bei fast vollständiger Entleerung der Vitamin-A-Speicher in der Leber zu einem Abfall der Plasma-Retinol-Konzentration bzw. bei einer Überschreitung der Vitamin-A-Speicherkapazität der Leber zu einem Anstieg der Vitamin-A-Konzentration im Blut.

Beim Menschen unterliegt die Plasma-Retinol-Konzentration einer strengen homöostatischen Regulierung durch die spezifische Bindung von Retinol an das RBP (BLOMHOFF et al., 1990). Auch für die untersuchten Katzen konnte dieser Transportmechanismus aufgrund des Nachweises von RBP im Plasma bestätigt werden. In allen untersuchten Proben konnte RBP mittels Western Blot bei etwa 21 kDa nachgewiesen werden.

Obwohl keine Fütterungsanalyse mit den untersuchten Katzen stattfand, kann von einer ähnlichen Versorgung der Tiere mit Vitamin A über kommerzielles Futter ausgegangen werden. Unabhängig von der Vitamin-A-Zufuhr über das Futter bleibt die Retinolkonzentration im Gegensatz zur Retinylesterkonzentration im Blut von gesunden und kranken Tieren relativ konstant. Diese Tatsache beobachteten SCHWEIGERT und BOK (1998) ebenfalls bei Fütterungsversuchen mit Hunden. Daher ergibt sich für die Diagnostik, dass die Vitamin-A-Konzentration im Blut als wenig aussagekräftig über den Vitamin-A-Status angesehen werden kann. Der durchschnittliche Anteil von Retinol am Gesamtvitamin-A-Gehalt des Katzenplasmas beträgt etwa 30 %. Ähnliche Werte wurden bereits für Katzen beschrieben (SCHWEIGERT et al., 1990a). Für in zoologischen Gärten gehaltene Vertreter der Gattung *Felidae* wurde ein Plasma-Retinol-Anteil zwischen 60-100 % ermittelt (SCHWEIGERT, 1995). Bei Hunden beträgt der Retinolanteil 50 %, bei Füchsen 35 % und bei Marderhunden 72 % des Gesamt-Vitamin-A-Gehaltes im Plasma (RAILA, 1999). Deutlich geringer ist der Retinolanteil beim Silberfuchs mit ca. 6 % (THOMANN, 1989). Die im Vergleich zu anderen Karnivoren geringere Vitamin-A-Konzentration im Katzenplasma resultiert möglicherweise aus der geringeren Retinolkonzentration. Diese sollte jedoch nicht als Zeichen eines Vitamin-A-Defizites interpretiert werden. Innerhalb der Ordnung *Carnivora* zeigt sich eine hohe Variabilität in

der Plasma-Retinol-Konzentration (SCHWEIGERT et al., 1990a). Die Retinylester im Blutplasma werden an die Lipoproteinfraktionen (VDL, LDL, HDL) gebunden transportiert (WILSON et al., 1987; SCHWEIGERT, 1988). 70-75 % der Retinylester sind bei Hunden, Füchsen und Marderhunden an die Fraktionen VLDL/LDL gebunden (THOMANN, 1989; RAILA 1999). Somit werden die Retinylester in Verbindung mit den Lipoproteinen aus der Leber in den Blutkreislauf abgegeben. Bei Mensch und Ratte wird eine Erhöhung der Plasma-Retinylesterkonzentration nur postprandial (ECKHOFF, 1991) bzw. bei akuter oder chronischer Vitamin-A-Intoxikation beobachtet (SMITH und GOODMAN, 1976). Bei Vitamin-A-Intoxikationen werden Retinylester auch an Lipoproteine gebunden nachgewiesen. Während beim Menschen bei Vitamin-A-Intoxikationen vorwiegend erhöhte Plasma-Retinylpalmitatkonzentrationen ermittelt werden, können bei Hunden erhöhte Plasma-Retinylstearatkonzentrationen beobachtet werden (RAILA et al., 2003). Im Gegensatz zum Menschen ist der Nachweis eines erhöhten Plasma-Retinylesterspiegel bei Karnivoren physiologisch und nicht mit Zeichen einer Intoxikation verbunden (SCHWEIGERT und BOK, 1998). Der Gehalt an Retinylestern ( $0,73 \pm 0,46 \mu\text{g/ml}$ ) im Blutplasma der Katzen beträgt das Dreifache des ermittelten Retinolwertes ( $0,24 \pm 0,06 \mu\text{g/ml}$ ). Dieses Ergebnis bestätigt bisherige Untersuchungen, in denen für Hauskatzen ein 2,3fach höherer Retinylesterwert gegenüber dem Retinolwert ermittelt wurde (SCHWEIGERT et al., 1989).

Jedoch gibt es innerhalb der Gattung *Felidae* Unterschiede. Während für Geparde ein annähernd gleicher Retinylester- und Retinolgehalt ermittelt wurde, traten bei Jaguar und Schneeleopard im Blutplasma wesentlich höhere Retinol- als Retinylesterwerte (SCHWEIGERT et al., 1989). Bei vielen Untersuchungen von Hunden und anderen Kaniden wurde Vitamin A hauptsächlich als Retinylester nachgewiesen (SCHWEIGERT, 1988; THOMANN, 1989; SCHWEIGERT et al., 1990a).

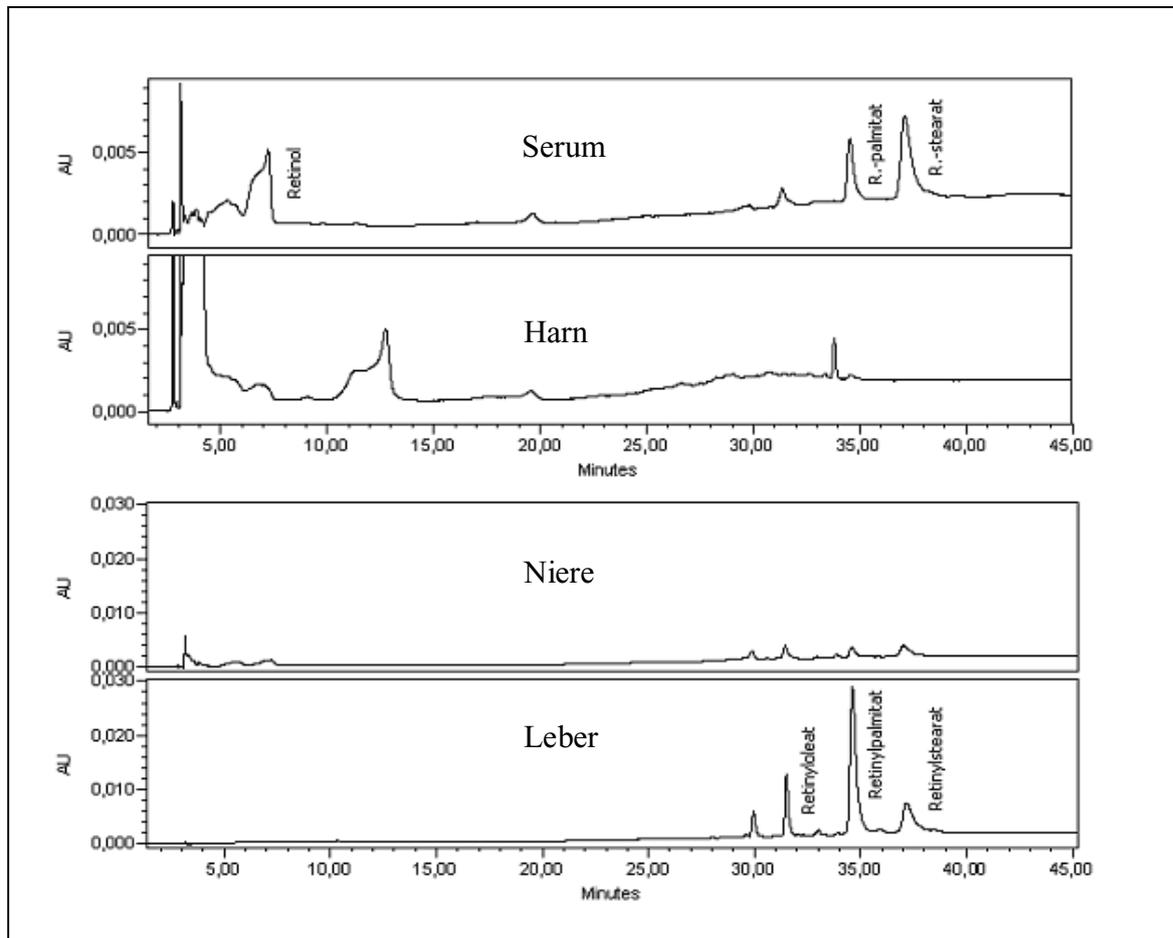


Abb.122: HPLC-Chromatogramme von einer Katze (Blut, Harn, Leber, Niere)

Absorption bei  $\lambda=325$  nm

In anderen Arbeiten an Hunden und Marderhunden wurde ein höherer Anteil an Retinol als an Retinylestern ermittelt, während beim Silberfuchs die Anteile annähernd gleich waren (BUCHHOLZ et al., 1993; RAILA, 1999). Das Esterverteilungsmuster im Serum (Abb. 22) der untersuchten gesunden Katzen zeigt eine deutliche Dominanz von Retinylstearat ( $0,44 \pm 0,29$   $\mu\text{g/ml}$ ) gegenüber Retinylpalmitat ( $0,27 \pm 0,28$   $\mu\text{g/ml}$ ) und Retinyleleat ( $0,03 \pm 0,01$   $\mu\text{g/ml}$ ). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Kaniden und Musteliden beschrieben (SCHWEIGERT et al., 1990a; SCHWEIGERT und THOMANN, 1993). Einige Autoren berichten jedoch auch von gleichen Anteilen an Retinylstearat und Retinylpalmitat bei Hund und Marderhund (RAILA, 1999) oder einer Dominanz von Retinylpalmitat gegenüber Retinylstearat bei Nerzen (BUCHHOLZ et al., 1993; SCHWEIGERT und UEHLEIN- HARRELL, 1989).

Veränderungen der Vitamin-A-Konzentration im Blutplasma bei Hunden werden auch bei verschiedenen Erkrankungen, wie Ikterus, Leberdystrophie, Hauterkrankungen und Fettstoffwechselstörungen beschrieben (SCHWEIGERT und UEHLEIN-HARRELL, 1989). Bei Mensch und Ratte sind Veränderungen im Vitamin-A-Stoffwechsel bei Erkrankungen der Leber, der Nieren und der Schilddrüse sowie bei akuten Entzündungen bekannt (SMITH und GOODMAN, 1976). Bei der Untersuchung der Blutproben der kranken Katzen konnten deutliche Unterschiede in der Vitamin-A-Konzentration zu den gesunden Katzen festgestellt werden. Die Tiere mit Nierenerkrankungen und Veränderungen im Lipidstoffwechsel zeigten zehnfach höhere Vitamin-A-Konzentrationen als die gesunden Tiere. Während die Retinolkonzentrationen in den beiden Gruppen kaum abweichen, unterscheiden sich die Retinylesterkonzentrationen im Plasma erheblich voneinander. In der vorliegenden Studie kehrt sich jedoch bei den kranken Katzen das Verhältnis zu Gunsten von Retinylpalmitat ( $3,0 \pm 7,4 \mu\text{g/ml}$ ) gegenüber Retinylstearat ( $0,43 \pm 0,43 \mu\text{g/ml}$ ) und Retinyloleat ( $0,1 \pm 2,1 \mu\text{g/ml}$ ) um, während bei den gesunden Katzen Retinylstearat im Blutplasma dominiert. SCHWEIGERT und UEHLEIN-HARRELL (1989) ermitteln für gesunde Katzen ebenfalls eine Dominanz von Retinylstearat gegenüber Retinylpalmitat. Die Ursachen können vielfältiger Natur sein. Erkrankte Katzen zeigen ein deutlich verändertes Fressverhalten, so dass schon Veränderungen in der Futter-Vitamin-A-Konzentration vorliegen können. Des Weiteren kann der unspezifische Transport der Retinylester durch Veränderungen im Lipidstoffwechsel beeinflusst worden sein. Auch eine veränderte Enzymaktivität von mikrosomalen Enzymen wie ARAT und LRAT bei erkrankten Tieren könnte die Retinylesterkonzentration beeinflussen. Eine entscheidende Rolle spielen jedoch die veränderten Nierenstrukturen - insbesondere tubuläre Schäden, die zu Störungen der Rückresorption von niedermolekularen Proteinen wie RBP führen.

Detaillierte Untersuchungen des Vitamin-A-Stoffwechsels nierenkranker Katzen liegen bisher jedoch nicht vor. Möglicherweise könnte künftig das Verhältnis von Retinylpalmitat und Retinylstearat im Serum von Katzen als Marker zur Erkennung von Erkrankungen dienen.

Ein eventueller Einfluss des Alters der untersuchten Katzen auf die Vitamin-A-Konzentration im Blut, wie für Katzen (POBISCH und ONDERSCHEKA, 1976) und Hunde (SCHWEIGERT et al., 1998) nachgewiesen, kann in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden, da alle Tiere bereits ausgewachsen waren.

Katzen reagieren auf langzeitige Fütterung mit Leber bzw. auf hochdosierte Vitamin-A-Gabe im Gegensatz zu Hunden mit den Symptomen einer Vitamin-A-Intoxikation (SEAWRIGHT, 1965; CLARK und SEAWRIGHT, 1968; CLARK, 1970 und 1971). Klinische Anzeichen dieser Erkrankung sind Exostosen, insbesondere der Halswirbelsäule, Deformierungen an Knochen und Ankylosen der Schulter-, Ellenbogen- oder Kniegelenke. Auch bei trächtigen Katzen kam es nach Langzeitfütterung von 306000 RE/kg Futter zu Mißbildungen der Welpen und Totgeburten (FREYTAG). Dieser Unterschied zu Hunden und anderen Karnivoren lässt andere Mechanismen der Regulation des Vitamin-A-Stoffwechsels der Katzen vermuten. Zur Klärung einer möglichen Ausscheidung von Vitamin A über den Harn ähnlich dem Hund sind jedoch definierte Fütterungsversuche notwendig.

### **5.1.2 Vitamin A und RBP im Harn**

Bei Mensch und Ratte findet eine renale Vitamin-A-Ausscheidung nur in Form wasserlöslicher Vitamin-A-Metaboliten statt (LAMBERT und De LEENHEER, 1985). In der Schwangerschaft oder während akuter Infektionen beim Menschen kann eine Retinolausscheidung mit dem Harn nachgewiesen werden (RICHTER, 1964; ALVAREZ et al., 1995, RAILA et al., 2004). Im Harn von Pferden, Rindern, Schweinen, Schafen und Kaninchen wurde bisher kein Vitamin A festgestellt (SCHWEIGERT et al., 1990b). Eine physiologische Vitamin-A-Ausscheidung ist von Hunden, Marderhunden, Frettchen und Füchsen bekannt (SCHWEIGERT et al., 1990b; SCHWEIGERT und BOK, 1998; RAILA, 1999). In früheren Untersuchungen von Katzen wurde kein Vitamin A im Harn nachgewiesen (HEYWOOD, 1967; THOMANN, 1989; SCHWEIGERT et al., 1990a; BUCHHOLZ et al., 1993). In der vorliegenden Studie konnte bei etwa der Hälfte der gesunden Tiere kein Vitamin A detektiert werden. Bei den anderen Katzen wurde Vitamin A in Form von Retinol und bzw. oder Retinylestern ausgeschieden. Bei 42 % der

Katzen konnten geringe Konzentrationen an Retinylestern ( $19 \pm 62$  ng/ml) und bei 14 % Retinol ( $24 \pm 80$  ng/ml) im Harn nachgewiesen werden. Bei den kranken Katzen wurde Vitamin A bei 54 % der Tiere in Form von Retinol und bzw. oder Retinylestern detektiert. Im Vergleich zu den gesunden Tieren wurden jedoch wesentlich höhere Konzentrationen an Retinol ( $114 \pm 178$  ng/ml), aber nur Spuren von Retinylestern ( $2,8 \pm 6,8$  ng/ml) ermittelt. Eine mögliche Ursache könnte eine veränderte RBP-Ausscheidung bei erkrankten Tieren sein. Somit könnte die Retinolkonzentration im Harn von Katzen möglicherweise als Marker für Nierenerkrankungen eingesetzt werden. Diese These erfordert jedoch weitere definierte Fütterungsversuche.

Charakteristisch sind die individuellen Unterschiede, die sich sowohl in der Vitamin-A-Konzentration, als auch im Retinoidmuster im Harn widerspiegeln. Auch die relativ große Standardabweichung ist Ausdruck dieser Schwankungsbreite. Ähnliche Beobachtungen machten RAILA (1999) und SCHWEIGERT und BOK (1998) bei Hunden. Die Vitamin-A-Konzentration im Harn der gesunden Katzen beträgt 4,9 % - der kranken Katzen 3 % der Vitamin-A-Konzentration des Blutplasmas. Für Hunde weist RAILA (1999) eine Vitamin-A-Konzentration von 440 ng/ml im Harn nach - eine zehnfach höhere Konzentration als bei den untersuchten gesunden sowie eine vierfach höhere Konzentration als bei den kranken Katzen. Die tägliche Vitamin-A-Ausscheidung beträgt bei Hunden zwischen 15 und 65 % der täglichen Vitamin-A-Aufnahme (SCHWEIGERT et al., 1990b). Die verminderte Fähigkeit zur renalen Ausscheidung von Vitamin A könnte daher möglicherweise in Zusammenhang mit der erhöhten Empfänglichkeit von Katzen gegenüber Vitamin-A-Intoxikationen gesehen werden. Für weitere Untersuchungen der Vitamin-A-Konzentration im Harn von Katzen sollten das Harnvolumen der Tiere, sowie die Harn-Creatinin- Konzentration untersucht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde darauf verzichtete.

Die deutlich höhere Vitamin-A-Konzentration im Harn kranker Katzen im Vergleich zu den gesunden Tieren ergibt sich aus den viereinhalbmal höheren Retinolkonzentrationen im Harn kranker Tiere. Dabei beträgt der Retinolanteil 99 % der Gesamt-Vitamin-A-Konzentration im Harn der kranken Katzen. Als eine mögliche Ursache können tubuläre Schäden des Nierengewebes gesehen werden, die zu einer Ausscheidung von RBP-

gebundenem Retinol mit dem Harn führen. Die Tatsache, dass bei 58 % der retinolpositiven kranken Katzen auch der immunologische Nachweis von RBP im Western-Blot gelang, bestätigt diese These. Von ähnlichen Beobachtungen zur Ausscheidung von Retinol und RBP mit dem Harn berichten STEPHENSEN et al. (1994) bei Patienten mit akuten Infektionen, Kindern mit bakterieller Diarrhoe und HIV-Patienten.

VAN HOEK et al. (2007) untersuchen Immunoassays des RBP im Harn von Katzen. Dabei wurden RBP: Kreatinin-Ratio im Harn gesunder Katzen mit denen von Katzen mit chronischer Niereninsuffizienz bzw. Hyperthyreose verglichen. Es konnten signifikant höhere RBP-Konzentrationen im Harn kranker Tiere nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls RBP im Harn einiger der erkrankten Katzen detektiert werden. Auffällig ist jedoch, dass die Gruppe der Katzen mit ausgeprägten Nierenschäden (erhöhten Kreatinin- und Harnstoffkonzentrationen im Blut) annähernd gleiche Retinol- ( $34 \pm 69$  ng/ml) und Vitamin-A-Konzentrationen ( $36 \pm 72$  ng/ml) im Harn aufweisen wie die gesunden Tiere. Der Einfluss veränderter Ausscheidungsmechanismen für RBP-gebundenes Retinol des versagenden Nierengewebes bedarf zur Klärung dessen weiterer Untersuchungen.

Retinol und Retinylester sind hydrophobe Verbindungen, die in wässrigem Milieu Trägerstrukturen wie RBP bzw. Lipoproteine (im Blutplasma) benötigen. Im Harn von Hunden wurde ein ähnliches Trägerprotein analysiert: eines Tamm-Horsfall ähnlichen Proteins (THP). Es besitzt eine Molmasse von 100 kDa (RAILA, 1999; SCHWEIGERT et al., 2002). Canines THP wird in den Epithelzellen des aufsteigenden Astes der Henle-Schleife und im distalen Tubulus synthetisiert und durch Sekretion in den Harn abgegeben (RAILA und SCHWEIGERT, 2001; SCHWEIGERT et al., 2002). Im Zusammenhang mit der renalen Ausscheidung von Vitamin A ist das THP als Bestandteil der physiologischen Proteinurie von Hunden zu sehen. RHODES et al. (1992) haben die Bildung von felinem THP in den Epithelzellen aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und Sekretion mit dem Harn nachgewiesen. Da bei 42 % der Katzen bei denen Retinol im Harn nachgewiesen wurde der immunologische Nachweis von RBP negativ war, sind vermutlich weitere Trägerproteine im Harn von Katzen vorhanden. Die Bedeutung von THP bei der Ausscheidung von Vitamin A im Harn von Katzen wurde bisher jedoch nicht untersucht.

Retinol wurde lediglich in 5 von 35 untersuchten Harnproben gesunder Tiere nachgewiesen. In keiner dieser Harnproben klinisch gesunder Katzen konnte ein immunologischer Nachweis von RBP mittels Western-Blot erfolgen. In der Gruppe der zwölf erkrankten Tiere befand sich in 7 Harnproben Retinol. In 4 der retinolpositiven Proben kranker Katzen konnte auch RBP mittels Western-Blot analysiert werden. In 3 Fällen handelte es sich um klinisch kranke Tiere im Alter zwischen 13 und 16 Jahren (Polyzystisches Syndrom der Perserkatze, Gastroenteritis sowie Pankreatitis). Obwohl 2 Tiere keine veränderten Nieren- und Lipidstoffwechselwerte zeigten, können tubuläre Nierenschädigungen in diesem Alter nicht völlig ausgeschlossen werden. Diese könnten Ursache einer verminderten RBP-Rückresorption sein. Auch beim Menschen ist eine erhöhte Ausscheidung von RBP während der Schwangerschaft und bei akuten Infektionen zu beobachten (RICHTER, 1964; RAILA et al., 2004). Bei Patienten mit akuten Infektionen sind Proteinurien festzustellen, deren Ursache tubuläre Resorptionsstörungen darstellen. STEPHENSEN et al. (1994) fanden bei diesen Patienten eine Korrelation zwischen der Ausscheidung von RBP und Retinol im Harn, die in Verbindung mit dem Anstieg der inflammatorischen Zytokine im Blutplasma während der Akute-Phase-Reaktion gesehen wird. Zytokine verursachen Schäden im renalen Tubulussystem und bewirken gleichzeitig eine verminderte TTR-Synthese in der Leber. Die verminderte TTR-Synthese führt zu einem Anstieg des TTR-ungebundenen RBP im Blut. Dieses RBP ist somit in der Niere frei filtrierbar. Ähnliche Untersuchungen für Katzen liegen bisher nicht vor.

## **5.2 Vitamin-A-Konzentration sowie der Nachweis von RBP in Leber und Nieren**

### **5.2.1 Vitamin A und RBP im Lebergewebe**

In der Leber - dem Hauptspeicherorgan für Vitamin A - werden bis zu 80 % des Vitamin A des Körpers gespeichert (BLOMHOFF et al., 1990; BLANER, 1994). Die ermittelte Vitamin-A-Konzentration in Katzenlebern von durchschnittlich 4314 µg/g liegt deutlich über den für andere Karnivoren bekannten Werten. Für Hunde ermittelte RAILA (1999) eine durchschnittliche Vitamin-A-Konzentration von 1376 µg/g. Ähnliche Werte sind für Frettchen und Nerze analysiert worden (BUCHHOLZ et al., 1993). Wesentlich niedrigere

Konzentrationen an Vitamin A wurden für Marderhunde, Füchse und Silberfüchse in der Literatur beschrieben (SCHWEIGERT und THOMANN, 1993; RAILA, 1999). Für Katzen sind aber auch wesentlich geringere Leber-Vitamin-A-Konzentrationen (1035 µg/g) ermittelt worden (POBISCH und ONDERSCHEKA, 1976). Beim Menschen beträgt die durchschnittliche Vitamin-A-Konzentration der Leber 149 µg/g. Die physiologische Schwankungsbreite liegt zwischen 20 und 300 µg/g Lebergewebe (OLSON, 1984). Innerhalb dieses Bereiches jedoch bleibt die Retinolkonzentration im Blut konstant. Die Vitamin-A-Konzentration der Leber ist von der Vitamin-A-Zufuhr abhängig (SMITH und GOODMAN, 1976). Daher hat die Nahrungs-Vitamin-A-Konzentration den größten Einfluss auf die Leber-Vitamin-A-Konzentration. OLSON (1984) ermittelt einen hypothetischen Zusammenhang zwischen der Konzentration an Retinol im Blutplasma und dem Vitamin-A-Gehalt der Leber. Erst nach fast völliger Entleerung des in der Leber gespeicherten Vitamin A erfolgt ein Abfall der Retinolkonzentration im Blut. Ein Anstieg der Vitamin-A-Konzentration im Blut ist dagegen erst bei einer Überschreitung der Leberspeicherkapazität zu erwarten. Als Folge tritt dann ein erhöhter Anteil an Lipoprotein-gebundenen Retinylestern im Blut auf, der für die Symptomatik der Vitamin-A-Intoxikation verantwortlich gemacht wird (SMITH und GOODMAN, 1976).

Die bei Katzen ermittelten hohen Konzentrationen an Vitamin A in der Leber würden beim Menschen nur im Falle einer chronischen Vitamin-A-Intoxikation auftreten. Auch der hohe Anteil an Lipoprotein-gebundenen Retinylestern im Blutplasma der gesunden ( $736 \pm 460$  ng/ml) und der kranken ( $3579 \pm 7763$  ng/ml) Tiere könnte in diesem Sinne interpretiert werden. Bei keiner der untersuchten Katzen jedoch gab es ein Symptom einer Intoxikation durch Vitamin A. Bei Katzen mit einer akuten Vitamin-A-Intoxikation wurden 19-fach höhere Vitamin-A-Konzentrationen der Leber als bei gesunden Tieren beschrieben (POBISCH und ONDERSCHEKA, 1976).

Vitamin A liegt in der Leber als Retinol und Retinylester vor. Bei den untersuchten Katzen der vorliegenden Arbeit beträgt der Retinolanteil lediglich 0,1 % der Gesamt-Vitamin-A-Konzentration der Leber. SCHWEIGERT (1995) weist bei Katzen einen Retinolanteil von 50 % in der Leber nach. Auch der Leber-Retinol-Anteil von Silberfüchsen (15 %), Hunden (11 %), sowie Nerzen und Frettchen (jeweils 6 %) (RAILA, 1999; BUCHHOLZ et al.,

1993) ist wesentlich höher, als bei den hier untersuchten Katzen. Die vorherrschende Esterfraktion bei Katzen stellt Retinylpalmitat (67 % der Gesamtester) dar. Ähnliche Verhältnisse wurden für Hunde und Marderhunde beschrieben. Bei Silberfüchsen wird von einer annähernd gleichen Konzentration an Retinylpalmitat und Retinylstearat berichtet (RAILA, 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte in jeder der untersuchten Gallenflüssigkeitsproben Retinol (durchschnittlich 0,67 µg/ml) nachgewiesen werden. Ähnliche Werte ermittelte THOMANN (1989) sowohl für Hunde (0,4 µg/ml), Blaufüchse (0,4 µg/ml) und auch Silberfüchse (0,6 µg/ml). Marderhunde jedoch haben einen wesentlich höheren Retinolgehalt (16,3 µg/ml) in der Gallenflüssigkeit. Das mit der Gallenflüssigkeit ausgeschiedene Retinol unterliegt dem enterohepatischen Kreislauf und wird aus dem Darm erneut absorbiert.

Die Leberparenchymzellen stellen den Hauptsyntheseort für RBP im Organismus dar (BLANER, 1989). In der vorliegenden Arbeit wurde die Verteilung von RBP in der Leber von Katzen erstmals immunhistologisch dargestellt. Eine spezifische zytoplasmatische RBP-Reaktion ist nur in den Hepatozyten darstellbar. Ähnliche Verhältnisse liegen für Untersuchungen an Hunden, Silberfüchsen und Marderhunden vor (RAILA, 1999). KATO et al. (1984) beschreiben bei immunhistologischen Untersuchungen der Hepatozyten in Rattenlebern unterschiedliche Reaktionsintensitäten der spezifisch-zytoplasmatischen RBP-Reaktion in den Hepatozyten in Abhängigkeit vom Vitamin-A-Status. Eine intensivere Reaktion erfolgt bei Vitamin-A-Mangel, verursacht durch eine RBP-Ansammlung in den Hepatozyten auf Grund mangelnder Beladung des RBP mit Retinol (SMITH und GOODMAN, 1979). Ebenfalls die perisinusoidalen Fettspeicherzellen, auch Ito- oder Sternzellen genannt, sind von besonderer Bedeutung im Vitamin-A-Stoffwechsel der Leber (BLOMHOFF et al., 1990). Sie dienen der Vitamin-A-Speicherung und wurden bei einigen Carnivoren aufgrund der Vitamin-A-Autofluoreszenz mikroskopisch lokalisiert (BONITZ et al., 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch in keiner Leberprobe immunreaktives RBP in den perisinusoidalen Fettspeicherzellen histologisch nachgewiesen werden. Es wurde bisher noch nicht geklärt werden, ob perisinusoidale Fettspeicherzellen in der Lage sind immunreaktives RBP zu synthetisieren (SOPRANO und BLANER, 1994). SAUVANT et al. (2001) wiesen nach, dass für die Retinilmobilisation aus den Leber-Sternzellen keine Synthese oder Sekretion von RBP erforderlich ist. Der Retinoltransfer in die Hepatozyten findet durch Membrantransfer statt.

### 5.2.2. Vitamin A und RBP im Nierengewebe

Bei vielen Carnivoren sind hohe Konzentrationen an Vitamin A in den Nieren nachgewiesen worden. RAILA et al. (2000) ermittelten eine durchschnittliche Vitamin-A-Konzentration von 474  $\mu\text{g/g}$  bei Füchsen, 291  $\mu\text{g/g}$  bei Marderhunden und 200  $\mu\text{g/g}$  bei Hunden. Diese Werte entsprechen etwa dem 300-fachen der Nieren-Vitamin-A-Konzentration des Menschen (RAICA et al., 1972). Für Katzen jedoch wurde mit  $11 \pm 8,2$   $\mu\text{g/g}$  eine deutlich geringere Konzentration an Vitamin A in den Nieren ermittelt. Dabei kann nochmals zwischen dem Vitamin-A-Gehalt der Nierenrinde ( $14,1 \pm 9,3$   $\mu\text{g/g}$ ) und dem Nierenmark ( $8,7 \pm 6,2$   $\mu\text{g/g}$ ) differenziert werden. Bei gesunden Katzen sind sowohl die Retinol- als auch die Retinylesterkonzentration im Nierenmark deutlich geringer als in der Nierenrinde. LOWE et al. (1957) fanden eine durchschnittliche Nieren-Vitamin-A-Konzentration von 30  $\mu\text{g/g}$  und MOORE et al. (1963) von durchschnittlich 45  $\mu\text{g/g}$  bei Katzen. Auch für Frettchen wurden ähnlich geringe Vitamin-A-Konzentrationen (durchschnittlich 27  $\mu\text{g/g}$ ) in den Nieren nachgewiesen (RIBAYA-MERCADO et al., 1994). Die Bedeutung der Niere als Speicher von Vitamin A im Organismus scheint daher bei Katzen und Frettchen deutlich geringer zu sein als bei anderen Karnivoren.

In der vorliegenden Arbeit wurde in den Nieren eine bis zu 377-fach geringere Vitamin-A-Konzentration als in der Leber festgestellt. Auch für Kaniden, Wildkatzen und den Menschen werden in der Literatur wesentlich höhere Konzentrationen an Vitamin A in der Leber als in den Nieren beschrieben (HEYWOOD, 1967; RAICA et al., 1972; RAILA et al., 2000). Im Gegensatz dazu berichten andere Autoren bei Katzen von niedrigeren Vitamin-A-Konzentrationen der Leber im Vergleich zu den Nieren (LOWE et al., 1957; MOORE et al., 1963). Die in eigenen Untersuchungen ermittelten Nieren-Vitamin-A-Konzentrationen liegen unter den Werten früherer Untersuchungen von Hauskatzen, jedoch über den Werten, die für in zoologischen Gärten gehaltene Wildkatzenarten ermittelt wurden (LOWE et al., 1957; MOORE et al., 1963; HEYWOOD, 1967; SEAWRIGHT and ENGLISH, 1967). Der Vitamin-A-Gehalt in der Niere ist wie in der Leber von der Vitamin-A-Versorgung über das Futter abhängig. Untersuchungen an Ratten ergaben, dass bei erhöhter oraler Vitamin-A-Zufuhr sowohl die Vitamin-A-Konzentration in der Leber wie auch in der Niere ansteigen (NAGY et al.,

1997). Auch MOORE et al. (1963) beschreiben den Einfluss der Vitamin-A-Konzentration des Futters auf den Vitamin-A-Gehalt der Nieren von Katzen. Wie auch in der Leber stellt Retinylpalmitat die dominierende Esterfraktion in der Niere dar. Bei Hunden, Silberfüchsen und Marderhunden wird ebenfalls von einer Dominanz von Retinylpalmitat (und -oleat) in Leber und Niere berichtet (RAILA et al., 2000). Im Gegensatz zu Leber und Niere stellt im Blutplasma Retinylstearat die dominierende Esterfraktion dar. Auch im Harn dominiert Retinylstearat. Dieser Umstand bestätigt, dass die renale Ausscheidung von Vitamin A keine einfache glomeruläre Filtration ist, da sich das Retinylestermuster zwischen Blutplasma, Nieren und Harn verändert (SCHWEIGERT et al., 2002).

Katzen mit hochgradigen Nierenerkrankungen besitzen jedoch eine höhere Vitamin-A-Konzentration (sowohl Retinol- als auch Retinylesterkonzentration) im Nierenmark als in der Nierenrinde. Als mögliche Ursache für diesen Sachverhalt ist die sinkende glomeruläre Filtrationsrate im Nierengewebe von Katzen mit chronischer Niereninsuffizienz zu sehen. In deren Folge kommt es zur vermehrten Ansammlung von Retinol, Retinylestern und RBP im Nierengewebe. In der Humanmedizin ist die Vitamin-A-Hypervitaminose ein häufiges Symptom bei Patienten mit Niereninsuffizienz. Die Kreatininkonzentration im Serum korreliert dabei positiv mit der Vitamin-A-Konzentration im Plasma (GILMOUR et al., 1993). Als Hauptursache der hohen Plasma-Vitamin-A-Konzentration wird die RBP-Konzentration bei Niereninsuffizienz gesehen. Die RBP-Verteilung in den Katzennieren der untersuchten Tiere konzentriert sich auf die Epithelzellen der proximal gewundenen Tubulusabschnitte der Nierenrinde. Für Hunde, Marderhunde und Silberfüchse wurde ein ähnliches zelluläres Verteilungsmuster für RBP ermittelt (RAILA et al., 2000). KATO et al. (1984) lokalisierten RBP bei Mensch und Ratte ebenfalls in den proximal gewundenen Nierentubuli. Die RBP-Verteilung bei Katzen steht in Übereinstimmung mit dem Vitamin-A-Metabolismus im renalen proximalen Tubulus. In den Epithelzellen des proximalen Tubulussystems befindet sich der LDL-Rezeptor Megalin, der Transportproteine und andere Substanzen aus dem Ultrafiltrat bindet und mittels Endozytose in die Epithelzellen schleust. Nach der Megalin vermittelten Endozytose von RBP-gebundenem Retinol erfolgt die Dissoziation in den Endosomen. Megalin wird in den *dense apicale tubules* zur apikalen Plasmamembran rücktransportiert und steht der erneuten Ligandenbindung zur Verfügung. RBP dagegen wird in den Lyso-

zymen enzymatisch abgebaut (CHRISTENSEN et al., 1998). Zur zellulären Lokalisation von Vitamin A existieren unterschiedliche Arbeiten. POPPER (1944) beschreibt fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen bei Ratten und dem Menschen. Während bei Ratten Vitamin A physiologischerweise im Endothel und den intertubulären Kapillaren nachweisbar ist, konnten beim Menschen nur beim Vorliegen von Nephropathien Vitamin A im proximalen Tubulussystem und den benachbarten Histiozyten nachgewiesen werden. In Hunden beschränkte sich die Vitamin-A-Autofluoreszenz auf Lipidtröpfchen in der Henleschen Schleife (RAILA et al., 2000). Für die untersuchten Katzen lässt sich vermuten, dass das RBP-gebundene Retinol mittels Megalin vermittelter Endozytose aus dem Ultrafiltrat reabsorbiert wird. Die beobachtete zytoplasmatische Färbung ist ein möglicher Hinweis für eine Neusynthese von RBP im proximalen Tubulus (CHRISTENSEN et al., 1998).

Bei den Mechanismen der renalen Sekretion von Retinol und Retinylestern beim Menschen ebenso wie bei Hunden und anderen Kaniden muss das THP ebenfalls erwähnt werden. In den Epithelzellen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife und im distalen Tubulus erfolgt die Synthese des THP, welches sich innerhalb der Zelle anreichert. Die zelluläre Aufnahme von Vitamin A erfolgt als Retinol nach der Dissoziation des holo-RBP-Komplexes oder in Form von Lipoprotein-gebundenen Retinylestern über rezeptorvermittelte Endozytose. Durch bisher unbekannte Mechanismen kommt es zur Verbindung von THP und Retinol, sowie Retinylestern, die im Harn von Hunden nachweisbar sind (SCHWEIGERT et al., 2002). Die Vermutung, dass THP bei der Vitamin-A-Ausscheidung von Katzen involviert ist, liegt nahe bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Im Interstitium von Ratten konnten in neueren Untersuchungen spezifische Vitamin-A-Speicherzellen (Itozellen) nachgewiesen werden (NAGY et al., 1997). Auch bei Katzen wird Vitamin A vorwiegend in der Nierenrinde gespeichert. Da im Vergleich zu anderen Karnivoren bei Katzen eine deutlich geringere Vitamin-A-Konzentration der Nieren ermittelt wurde, scheint hier die Bedeutung der Nieren als Vitamin-A-Speicher geringer zu sein. Bei den untersuchten nierenkranken Katzen zeigte sich in Abhängigkeit vom jeweiligen Krankheitsbild eine sehr unterschiedliche Verteilung von RBP. Je nach vorliegendem Stadium der Niereninsuffizienz kommt es entsprechend der renalen Hyperfiltrationstheorie zu einer

verstärkten Ansammlung von RBP im Nierengewebe. Bei einigen Tieren war eine massive Sättigung der Epithelzellen des proximalen Tubulussystems zu verzeichnen. Bei anderen Tieren war nur im Bereich der apikalen Membran des proximalen Tubulussystems eine deutliche Anfärbung zu erkennen. In Abhängigkeit von der Stärke der tubulären Schäden kommt es somit wahrscheinlich zur veränderten Rückresorption von Vitamin A. Bei massiver Sättigung der Epithelzellen des proximalen Tubulussystems mit RBP ist vermutlich die Aufnahmekapazität der Zellen überschritten, was eine Ausscheidung von RBP-gebundenem Retinol erklären würde.

### **5.3 $\beta$ -Carotin-Konzentration im Blutplasma, Harn und Gallenflüssigkeit, Leber und Nieren**

Auf Grund eines Mangels des intestinalen  $\beta$ -Carotin-15-15'-Monooxygenase sind Katzen nicht in der Lage,  $\beta$ -Carotin im Darm zu Retinol zu spalten (AHMAD, 1931; GERSHOFF et al., 1957). Daher entwickeln Katzen sowohl bei alleiniger oraler als auch bei intravenöser  $\beta$ -Carotingabe als Vitamin-A-Quelle die typischen Symptome eines Vitamin-A-Mangels (GERSHOFF et al., 1957). Die Bedeutung von Carotinoiden als wichtiges Antioxidanz führte zu neueren Untersuchungen des Carotinoidmetabolismus, insbesondere seiner immun modulierenden Funktion bei Katzen (KIM et al., 2000; SCHWEIGERT et al., 2002). In deren Ergebnis konnte eindeutig bewiesen werden, dass Katzen  $\beta$ -Carotin und andere Carotinoide, wie Lutein absorbieren können. In den eigenen Untersuchungen wurde bei allen untersuchten gesunden Katzen  $\beta$ -Carotin im Blutplasma mit einer Konzentration von  $15 \pm 10$  ng/ml nachgewiesen. Bei 6 % der gesunden Katzen konnte auch Lycopin ( $13 \pm 0,6$  ng/ml) detektiert werden und bei 12 % der gesunden Tiere wurde Lutein ( $9 \pm 12$ ng/ml) analysiert. Des Weiteren wurden Spuren von  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Cryptoxanthin und Zeaxanthin ermittelt. Bei den untersuchten kranken Katzen wurden bei 81 % der Tiere  $\beta$ -Carotin ( $10 \pm 9$  ng/ml) sowie bei 18 % der Tiere Lutein ( $2 \pm 1$  ng/ml) nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass  $\beta$ -Carotin und andere Carotinoide nicht nur in pharmakologischen Mengen aufgenommen werden, sondern physiologisch aus dem Futter intestinal resorbiert werden. Die Immunmodulation durch Carotinoide wurde bereits nachgewiesen:  $\beta$ -Carotin steigert die Zahl der T-Helfer-Zellen und erhöht die Anzahl von

Interleukin-2-Rezeptoren der Killerzellen beim Menschen. Bei Mäusen verbessert die Gabe von  $\beta$ -Carotin die Proliferation von T-Zellen (CHEW et al., 2000). In den Leukozyten selbst spielt  $\beta$ -Carotin eine bedeutende Rolle bei der Aufrechterhaltung der strukturellen und funktionellen Integrität. Es reduziert die Bildung von freien Radikalen in den Lipidmembranen, den Lysosomen und dem endoplasmatischen Retikulum im Gewebe (CHEW et al., 2000). Bei den eigenen Untersuchungen konnte bei 19 % kranken Tieren keinerlei  $\beta$ -Carotin nachgewiesen werden. Bei den anderen kranken Katzen war die  $\beta$ -Carotin-Konzentration etwa 1/3 geringer als bei den gesunden Katzen. Dieses Ergebnis zeigt möglicherweise den erhöhten Bedarf erkrankter Tiere an  $\beta$ -Carotin, was bei der Rationszusammensetzung berücksichtigt werden sollte.

In der vorliegenden Untersuchung konnten weder  $\beta$ -Carotin, noch andere Carotinoide in der Leber, der Gallenflüssigkeit, den Nieren und im Harn nachgewiesen werden. SCHWEIGERT et al. (2002) weisen jedoch nach einer oraler Einmalgabe von  $\beta$ -Carotin dieses auch im Harn der Katzen nach. Auch bei Frettchen konnten RAILA und SCHWEIGERT (1999, unveröffentlicht) ähnliche Beobachtungen machen. Dabei blieb der Mechanismus der  $\beta$ -Carotinausscheidung jedoch bislang ungeklärt. Katzen stellen ein potentiell Modell zur Untersuchung der Bedeutung von  $\beta$ -Carotin als Antioxidanz und Immunmodulator dar, da es keine Beeinflussung durch die Pro-Vitamin-A-Wirkung gibt.

#### 5.4 Schlussfolgerungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Katzen hinsichtlich des Vitamin-A-Stoffwechsels eine Sonderstellung einnehmen. Es existieren zwei Transportmechanismen für den Transport von Vitamin A im Blutplasma. Retinol wird spezifisch über das RBP transportiert, das in den Hepatozyten synthetisiert und als Retinol-RBP-TTR-Komplex im Blut transportiert wird. Wie auch bei anderen Carnivoren unterliegt damit die Plasma-Retinol-Konzentration einer strengen homöostatischen Regulation. Neben dem spezifischen Transport durch das RBP, existiert auch bei Katzen ein zweiter Transportmechanismus für Vitamin A. Dabei werden Retinylester (vorwiegend

Retinylstearat und Retinylpalmitat) durch Bindung an Lipoproteine transportiert. Durch diese unspezifische Bindung der Retinylester an die Lipoproteine ist eine strenge homöostatische Regulation des überwiegenden Teils des im Blut transportierten Vitamin A nicht möglich. Während vergleichsweise hohe Konzentrationen an Retinylestern beim Menschen nur während der postprandialen Lipämie oder als Folge einer chronischen Vitamin-A-Intoxikation beobachtet werden (SCHWEIGERT und BOK, 1998), wurden bei Hunden Symptome einer Vitamin-A-Intoxikation nicht beobachtet. Katzen jedoch stellen diesbezüglich eine Ausnahme dar. Sie reagieren auf eine langfristige Fütterung mit hohen Dosen von Vitamin A mit typischen Symptomen wie Exostosen der langen Röhrenknochen, zervikalen Spondylosen, Lähmungen vor allem der Vordergliedmaßen und Bewegungsstörungen von Kopf und Hals, sowie Geburten toter Katzenwelpen oder von Welpen mit Defekten an Schädel, Augen, Haut, Darm, Lunge, Herz und Gefäßen (SEAWRIGHT et al., 1965; FREYTAG et al., 2003 ).

Die Vitamin-A-Konzentration in der Leber der untersuchten Katzen ist wesentlich höher als bisher ermittelte Werte für Mensch, Ratte, Wildkatzen und Kaniden (HEYWOOD, 1967; RAILA et al., 2000). Das Lebergewebe stellt auch bei Katzen den Hauptspeicher an Vitamin A im Organismus dar. Aufgrund der hohen Retinylesterkonzentration müssen Tierarten der Gattung *Carnivora* über bisher unbekannte Regulationsmechanismen verfügen, die sie vor zellulären Schäden durch toxische Vitamin-A-Effekte schützen.

Die Vitamin-A-Konzentration der Leber ist bei Katzen um ein Vielfaches höher als die in der Niere. Die Nieren besitzen bei der Katze wie auch bei anderen Carnivoren eine zentrale Rolle im Vitamin-A-Stoffwechsel. Obwohl Katzen im Vergleich zu Hunden nur geringe Mengen Vitamin A in den Nieren speichern und nur jede zweite Katze Vitamin A in Spuren ausscheidet, sind doch die Nieren wesentlich am RBP-Metabolismus beteiligt. RBP ist nur in den Epithelzellen des proximalen Tubulussystems der Niere nachweisbar. Trotz deutlicher Spezies spezifischer Unterschiede in der Vitamin-A-Verteilung im Vergleich von Carnivoren zu Mensch und Ratte, wird auch bei diesen RBP ausschließlich apikal und intrazytoplasmatisch in den Epithelzellen des proximalen Tubulussystems lokalisiert (KATO et al., 1984). Diese RBP-Verteilung steht in Übereinstimmung mit dem Vitamin-A-Metabolismus im renalen proximalen Tubulus. Somit lässt sich auch für Katzen vermu-

ten, dass das RBP-gebundene Retinol mittels Megalin vermittelter Endozytose aus dem Ultrafiltrat reabsorbiert wird. Der weitere Vitamin-A-Stoffwechselweg ist bisher nicht aufgeklärt worden. Möglicherweise erfolgt eine Speicherung von Vitamin A oder eine Rückführung in den systemischen Kreislauf.

Die zentrale Rolle der Nieren im Vitamin-A-Stoffwechsel der Katzen wird besonders deutlich bei der Betrachtung der Vitamin-A-Konzentrationen im Blut, Harn und Nierengewebe nierenkranker Katzen. In der vorliegenden Arbeit konnten deutliche Unterschiede in der Vitamin-A-Konzentration im Blut und Harn gesunder und nierenkranker Katzen ermittelt werden. Die Tiere mit den Nierenerkrankungen und den Veränderungen im Lipidstoffwechsel zeigen signifikant höhere Retinylesterkonzentrationen und ein verändertes Esterverteilungsmuster. Bei den kranken Katzen verkehrt sich das Verhältnis zu Gunsten von Retinylpalmitat gegenüber Retinylstearat. Die Ursachen können vielfältiger Natur sein. Neben verändertem Fressverhalten erkrankter Tiere kann auch der unspezifische Transport der Retinylester durch Veränderungen im Lipidstoffwechsel beeinflusst worden sein. Auch veränderte Enzymaktivität von mikrosomalen Enzymen wie ARAT und LRAT bei erkrankten Tieren beeinflussen möglicherweise die Retinylesterkonzentration im Blut. Eine entscheidende Rolle spielen jedoch die veränderten Nierenstrukturen - insbesondere tubuläre Schäden, die zu Störungen in der RBP-Rückresorption und der Vitamin-A-Ausscheidung führen. In deren Folge kommt es zu einer Ausscheidung von RBP-gebundenem Retinol mit dem Harn. Vermutlich sind die steigenden Retinylesterwerte im Blutplasma niereninsuffizienter Katzen auf eine reduzierte renale Ausscheidung der Retinylester zurückzuführen. Jedoch liegen detaillierte Untersuchungen des Vitamin-A-Stoffwechsels nierenkranker Katzen liegen bisher nicht vor. Das Verhältnis von Retinylpalmitat und Retinylstearat im Serum sowie die Retinolkonzentration im Harn von Katzen können möglicherweise als Marker zur Erkennung von renalen Erkrankungen dienen. Diese These erfordert jedoch weitere definierte Fütterungsversuche.

Die Bedeutung von Carotinoiden als wichtiges Antioxidanz führte zu neueren Untersuchungen des Carotinoidmetabolismus, insbesondere seiner immunmodulierenden Funktion bei Katzen (KIM et al., 2000; SCHWEIGERT et al., 2002). Erstmals konnte in

der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, dass Katzen in der Lage sind, Carotine und Xanthophylle zu absorbieren. Im Blutplasma aller untersuchten Katzen wurden  $\beta$ -Carotin sowie häufig auch Lycopin und Lutein analysiert. Des Weiteren wurden Spuren von  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Cryptoxanthin und Zeaxanthin ermittelt, jedoch konnten weder  $\beta$ -Carotin noch andere Carotinoide in der Leber, der Gallenflüssigkeit, den Nieren und im Harn nachgewiesen werden. Dabei bleibt der Mechanismus der  $\beta$ -Carotinausscheidung jedoch bislang ungeklärt. Beachtet werden sollte die deutlich geringere Konzentration an Carotenoiden im Blutplasma erkrankter Tiere. Mit der besseren prophylaktischen und therapeutischen Carotin- und Xanthophyllversorgung dieser Katzen bietet sich möglicherweise ein interessanter Ansatzpunkt zur Stärkung der Immunfunktion.

## 6 Zusammenfassung

Wie Hunde und andere Tierarten der Ordnung *Carnivora* nehmen Katzen eine Sonderstellung in Bezug auf den Vitamin-A-Stoffwechsel ein: Sie besitzen physiologisch hohe Vitamin-A-Konzentrationen im Blut. Ursache dafür ist das Vorhandensein eines erhöhten Anteils an Retinylestern, die unspezifisch im Blut durch Lipoproteine transportiert werden. Während beim Mensch und bei Ratten dieser unspezifische Transportweg nur in Zusammenhang mit einer Vitamin-A-Hypervitaminose zu beobachten ist, tritt dieser bei Katzen und anderen Karnivoren physiologisch neben dem streng homöostatisch regulierten Transport von Retinol durch RBP auf. Die für Hunde und andere Kaniden belegte physiologische Ausscheidung von Vitamin A mit dem Harn konnte für Katzen bisher nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtung wird als eine Ursache der erhöhten Anfälligkeit von Katzen angenommen, auf langfristige Aufnahmen großer Mengen Vitamin A mit den typischen Symptomen einer Vitamin-A-Intoxikation zu reagieren. Ziel dieser Arbeit war die Analyse der Konzentration von Retinol, Retinylestern und des RBP sowie der Carotinoide im Blutplasma, Harn, Leber und Nieren von zufällig ausgewählten Hauskatzen. Eingebunden in die Untersuchung war die Analyse des Vitamin-A-Stoffwechsels im Organismus nierenkranker Katzen. Daher wurden von 35 klinisch gesunden Katzen (unterschiedlich in Rasse, Geschlecht und Alter) Blut- und Harnproben genommen. Zusätzlich wurden von 12 Tieren, die aus unterschiedlichsten Gründen euthanasiert wurden, Blut-, Harn-, Gallenflüssigkeits-, Lebergewebs- und Nierengewebsproben entnommen. Da die Proben konsekutiv in einer Tierarztpraxis gesammelt wurden, waren kaum Informationen zum Ernährungsstatus erhältlich. Die Vitamin-A- (Retinol und Retinylester) sowie die Carotinoidebestimmung erfolgten mittels Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC). Nach SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese der Blut- und Harnproben wurde im Western-Blot das RBP nachgewiesen. Gleichzeitig erfolgte die immunhistologische RBP-Analyse an Leber- und Nierenschnitten. Vitamin A wurde in allen untersuchten Proben (Blut, Harn, Gallenflüssigkeit, Leber und Niere) in Form von Retinol und Retinylestern (Retinololeat, -palmitat und -stearat) analysiert. RBP konnte in allen Blutproben sowie in den Hepatozyten der Leber und den Epithelzellen des proximal gewundenen Nierentubulussystems, nicht jedoch im Harn gesunder Katzen nachgewiesen werden. Die Gesamtkonzentration an Vitamin A im Blutplasma betrug im Durchschnitt  $976 \pm 458$  ng/ml. Retinol hatte einen Anteil von 25 % an der Vitamin-A-Gesamtkonzentration.

Der überwiegende Teil des Vitamin A liegt im Katzenblut jedoch als Retinylester vor (75 %). Auch bei den Retinylestern ist ein deutliches Verteilungsmuster zu erkennen. Retinylstearat dominiert mit 60 % des Gesamtstergehaltes, während der Gehalt an Retinylpalmitat 37 % und Retinyloleat lediglich 4 % des Gesamtstergehaltes betrug.

Im Vergleich zu anderen Karnivoren haben Katzen sehr hohe Vitamin-A-Konzentrationen in der Leber. Da jedoch innerhalb der Ordnung *Carnivora* große Spezies spezifische Unterschiede der Leberwerte auftreten, kann eine Beurteilung des Vitamin-A-Status anhand der Vitamin-A-Speicherkapazität der Leber nur bei Kenntnis entsprechender Grunddaten erfolgen, die jedoch definierte Fütterungsversuche erfordern. Wie auch bei anderen Karnivoren ist die Leber der Hauptspeicher für Vitamin A. Dabei unterscheidet sich jedoch die Vitamin-A-Konzentration der Leber von Katzen ( $4314 \pm 2043 \mu\text{g/g}$ ) deutlich von der anderer Carnivoren. Dagegen können in der Niere von Katzen nur sehr geringe Vitamin-A-Konzentrationen ( $11,4 \pm 8,2 \mu\text{g/g}$ ) detektiert werden. Die Nieren von Katzen scheinen daher eine untergeordnete Rolle bei der Vitamin-A-Speicherung zu spielen. Die Vitamin-A-Konzentration in der Nierenrinde war höher als im Nierenmark. Im Gegensatz zu früheren Untersuchungen konnte bei der Hälfte der untersuchten Katzen Vitamin A im Harn in Form von Retinol ( $24 \pm 80 \text{ ng/ml}$ ) und Retinylestern ( $20 \pm 62 \text{ ng/ml}$ ) analysiert werden. Somit konnte erstmals nachgewiesen werden, dass Katzen auch in der Lage sind, Vitamin A - wenn auch in geringen Mengen - mit dem Harn auszuscheiden. Da diese Verbindungen lipophilen Charakter haben, müssen sie im wässrigen Milieu des Harns an ein bisher unbekanntes Protein gebunden vorliegen. Da RBP in keiner Harnprobe gesunder Katzen analysiert wurde, scheidet es als mögliches Retinol-Trägerprotein im Harn aus. Das eventuelle Vorhandensein eines dem Kaniden THP ähnlichen Proteins bei Katzen bedarf weiterer Untersuchungen. Das Unvermögen der Katzen, größere Mengen an Vitamin A mit dem Harn auszuscheiden, könnte als eine mögliche Ursache für deren erhöhte Anfälligkeit gegenüber chronischer Vitamin-A-Hypervitaminose betrachtet werden.

Im Gegensatz zu den gesunden Katzen wurden bei nierenkranken Katzen, die auch veränderte Lipidstoffwechselwerte aufwiesen, deutliche Unterschiede im Vitamin-A-Stoffwechsel festgestellt. Bedingt durch tubuläre Schäden des Nierengewebes kommt es zu Veränderungen im RBP-Metabolismus. Eine massive Ansammlung von RBP

im Bereich der Epithelzellen des proximalen Tubulussystems konnte in den histologischen Schnitten beobachtet werden. Gleichzeitig kommt es bei vier Tieren zur Ausscheidung von RBP-gebundenem Retinol mit dem Harn. Möglicherweise können die stark erhöhten Retinylesterwerte im Blutplasma nierenkranker Katzen auf eine verminderte renale Ausscheidung der Retinylester zurückgeführt werden. Eine Korrelation zwischen den Schädigungen im Nierengewebe und der RBP-Ausscheidung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden. Der Gesamtesterwert der Harnproben der kranken Katzen (durchschnittlich 2,77 ng/ml) ist gegenüber den gesunden Tieren (durchschnittlich 20,5 ng/ml) deutlich reduziert. Neben der Ausscheidung von Vitamin A über den Harn konnte auch die Ausscheidung von Retinol (0,67 µg/ml) mit der Gallenflüssigkeit nachgewiesen werden.

Im Blutplasma aller untersuchten Katzen konnte  $\beta$ -Carotin in einer durchschnittlichen Konzentration von 14 ng/ml analysiert werden. Daneben wurden ebenfalls Lycopin und Lutein in ähnlicher Konzentration sowie Spuren von  $\alpha$ -Carotin,  $\beta$ -Cryptoxanthin und Zeaxanthin nachgewiesen. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass  $\beta$ -Carotin und Carotinoide nicht nur in pharmakologischen Mengen aufgenommen, sondern physiologisch aus dem Futter intestinal resorbiert werden. Weder  $\beta$ -Carotin, noch andere Carotinoide konnten in der Leber, Gallenflüssigkeit, Niere oder im Harn nachgewiesen werden. Erkrankte Tiere weisen als Ausdruck einer möglichen Unterversorgung bzw. eines erhöhten Bedarfs deutlich geringere Konzentrationen an Carotin und anderen Carotenoiden im Blutplasma auf. Dieser Ansatzpunkt sollte bei der Versorgung kranker Katzen Berücksichtigung finden. Katzen sind zwar nicht in der Lage, Vitamin A aus  $\beta$ -Carotin zu synthetisieren, jedoch stellen sie ein potentiell Modell zur Untersuchung von Carotinoiden als Antioxidanzien und Immunmodulatoren dar, da es keine Beeinflussung durch die Pro-Vitamin-A-Wirkung gibt. Katzen nehmen also auch innerhalb der Ordnung *Carnivora* eine Sonderstellung hinsichtlich der Ausscheidung von Vitamin A mit dem Harn und des Carotinoidstoffwechsels ein und bieten noch einige interessante Ansatzpunkte für weitere Untersuchungen zur Erforschung des Vitamin-A-Stoffwechsels von Carnivoren.

**Vitamin A metabolism in domestic cats:  
Plasma transport, tissue distribution and urinary excretion**

## 7 Summary

Cats and other species of the order *Carnivora* possess a particular position with respect to their vitamin A metabolism, because they do transport vitamin A in the blood physiologically as retinyl esters bound to all fractions of plasma lipoproteins. In humans and rodents, however, elevated concentrations of plasma retinyl ester are only observed as a postprandial consequence of vitamin A absorption in the gut or under conditions of an acute or chronic vitamin A intoxication. In cats and carnivores this way of retinyl ester transport in plasma is physiologically accompanied with the transport of retinol bound to retinol binding protein (RBP). In cats, the physiological excretion of vitamin A with the urine, which has been verified in dogs and other canines has not been investigated hitherto. In cats this observation is supposed to be a cause for the increased susceptibility to long-term intake of high amounts of vitamin A leading to typical symptoms of vitamin A intoxication. Therefore, the objective of this study was to determine concentrations of retinol, retinyl esters and RBP as well as carotenoids in plasma, urine, liver and kidneys of randomly selected domestic cats. The analysis of the vitamin A metabolism in cats suffering from several diseases was also part of the investigation.

Blood and urine were obtained from 35 clinically healthy cats of different pedigree, sex and age. Additionally, 12 cats were necropsied and samples of liver, bile and kidney were collected for the determination of vitamin A, carotenoids and RBP. Since the samples were randomly obtained from an animal hospital, no information concerning their nutritional status was available. Vitamin A (retinol and retinyl esters) and carotenoids were determined using a modified gradient reversed phase HPLC-system (Waters, Eschborn, Germany). The presence of RBP in plasma and urine was assessed using SDS-polyacrylamidgel-electrophoresis and subsequent Western blot analysis. The distribution of RBP in liver and kidney samples was carried out using immunohistochemistry.

In general, vitamin A was detected as retinol and retinyl esters (retinyl oleate, palmitate and stearate) in all specimens investigated (plasma, urine, bile, liver and kidney. RBP could be verified in all blood samples as well as in the hepatocytes of the liver and the proximal convoluted tubules of the kidney epithelial cells. RBP was not detectable in urine of healthy cats.

The mean total vitamin A concentration in the plasma was 976 ng/ml. In the plasma, vitamin A was predominantly present as retinyl esters (75 %), whilst retinol shared 25 % of total vitamin A concentration. With regard to the retinyl ester pattern, retinyl stearate dominated with 60 % of total ester concentration, whilst retinyl palmitate was representing 37 % and retinyl oleate 4 % of total retinyl esters. In comparison with other carnivores, investigated cats had high vitamin A concentrations in the liver ( $4314 \pm 2043 \mu\text{g/g}$ ). Because there are species specific differences in the hepatic vitamin A concentrations among carnivores, a judgement of the vitamin A status by means of the vitamin A storage capacity of the liver can only be made if basic data are available which, however, requires defined feeding experiments. By contrast, only small vitamin A concentrations ( $11.4 \pm 8.2 \mu\text{g/g}$ ) can be detected in kidneys of cats. The kidneys of cats seem to play only a minor role in the storage of vitamin A. The vitamin A concentration in the renal cortex was higher than those in the renal medulla. Contrary to earlier investigations, in half of the investigated urine samples, vitamin A could be detected in form of retinol ( $24 \pm 80 \text{ ng/ml}$ ) and retinyl esters ( $20 \pm 62 \text{ ng/ml}$ ). Thus, it could be verified for the first time that cats are also able to excrete vitamin A physiologically in the urine. Since the lipophilic nature of vitamin A, it must be bound to protein in the aqueous environment of the urine. Because RBP could not be found in any of the urine samples of healthy cats, RBP can be excluded as possible carrier protein for vitamin A in urine. The existence of a similar protein in cats as THP in dogs and other canines needs further investigations.

The inability of cats to excrete higher amounts of vitamin A with the urine could be considered as a possible cause for their increased susceptibility to chronic vitamin A intoxication. In contrast to healthy cats, distinct differences were found in the vitamin A metabolism in cats suffering from kidney disease, which showed also changed in lipid metabolism values. Because of the pathohistological alterations in the kidney tubules, modifications in the RBP metabolism can also be noted. Immunohistological sections show

an accumulation of RBP in the epithelium cells lining the proximal convoluted tubules of the kidneys. Simultaneously, RBP-bound retinol was detected in urine samples of diseased cats. It is likely that the high concentration of retinyl esters in the plasma of cats suffering from the kidneys disease can be due to a decreased renal excretion of retinyl esters. The total concentration of retinyl esters in urine of diseased cats (mean: 2.77 ng/ml) is clearly reduced in comparison to healthy cats (mean value 20.5 ng/ml). In addition to the renal excretion of vitamin A, an excretion of retinol (0.67 ng/ml) with the bile could also be verified.

$\beta$ -carotene in a mean concentration of 14 ng/ml could be found in plasma of all examined cats. Moreover, lycopene and lutein in a similar concentration as well as traces of  $\alpha$ -carotene,  $\beta$ -cryptoxanthin and zeaxanthin were detected. These results suggest that  $\beta$ -carotene and other carotenoids are physiologically absorbed in the intestine from the feed. Neither  $\beta$ -carotene nor any other carotenoids could be verified in liver, bile and kidney or in the urine. Diseased cats show less concentrations of  $\beta$ -carotene and other carotenoids in plasma, which is likely due to a lower dietary supply and/or raised carotenoid requirement. This fact should be considered during the supply of diseased cats, because cats seem to be unable to synthesize vitamin A from  $\beta$ -carotene. That is why they represent a potential model for the investigation of carotene and carotenoids as antioxidants and immune modulators since there is no influence by the pro-vitamin-A-effect. In conclusion, the results of the study show that domestic cats possess a peculiar role among carnivores with regard to the storage of vitamin A in the liver, the excretion of vitamin A in the urine and metabolism of the  $\beta$ -carotene and carotenoids. These animals still offer a quite interesting model for further investigations.

## 8 Literaturverzeichnis

AAFCO, 1998

Official Publication

AHMAD, B. (1931):

The fate of carotene after absorption in the animal organism.

Biochem. J. **25**: 1195-1204.

ALVAREZ, J. O., E. Salazar-Lindo, J. Kohatsu, P. Miranda, C. B. Stephensen (1995):

Urinary excretion of retinol in children with acute diarrhea.

Am. J. Clin. Nutr. **61**: 1273-1276.

BARTH, J. L. and W. S. Argraves (2001):

Cubilin and megalin: partners in lipoprotein- and vitamin-metabolism.

Trends Cardiovasc. Med. **11**: 26-31.

BLANER, W. S. (1989):

Retinol-binding protein: the serum transport protein for vitamin A.

Endocr. Rev. **10**: 308-316.

BLANER, W. S. (1994):

Retinoid (Vitamin A) metabolism and the liver.

In: The Liver: Biology and Pathobiology. I. M: Arias, J. L. Boyer, N. Fausto, W. B.

Jakoby, D. A. Schachter and D. A. Shafritz (eds.), New York: Raven Press, 529-541.

BLOMHOFF, R., M. H. Green, T. Berg and K. R. Norum (1990):

Transport and storage of vitamin A.

Science **250**: 399-403.

BLOMHOFF, R., M. H. Green and K. R. Norum (1992):

Vitamin A: Physiological and biochemical processing.

Annu. Rev. Nutr. **12**: 37-57.

BLOMHOFF, R. (1994):

Transport and metabolism of vitamin A.

Nutr. Rev. **52**: 13-23.

BONATH, K. H. und W. D. Prieur (1998):

Stoffwechselerkrankungen des Skelettsystems.

In: Kleintierkrankheiten Band **3**: Orthopädische Chirurgie und Traumatologie, Stuttgart:

Verlag Eugen Ulmer, S. 472-477.

BONITZ, K., G. Gutte, I. Buchholz und F. Schweigert (1995):

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zum Nachweis von Vitamin A in den Geweben von Schwein und Nerz.

In: 5. Symposium Vitamine und weitere Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und

Tier. R. Schubert, G. Flachowsky und R. Bitsch (Hrsg.), Weimar: Buch- und

Kunstdruckerei Kessler GmbH, S. 67-72.

BUCHHOLZ, I., U. D. Wenzel und F. J. Schweigert (1993):

Bestimmung von Vitamin A im Blutplasma, in Geweben und im Harn von Nerzen mittels HPLC und Photodiodenarray.

In: 4. Symposium „Vitamine und weitere Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und

Tier.“ G. Flachowsky, F. Schöne und A. Hennig (Hrsg.), Niederkleen: Wissenschaftlicher

Fachverlag Dr. Fleck, S. 31-34.

CATEL, W. (1938):

Klinische und tierexperimentelle Studien über die normale und pathologische Physiologie des A-Vitamins.

Monatsschr. Kinderheilkd. **73**: 316-344.

CHEW, B. P., J. S. Park, B. C. Weng, T. S. Wong, M.G. Hayek and G. A. Reinhart (2000):

Dietary  $\beta$ -carotene absorption by blood plasma and leukocytes in domestic cats.

Am. Society of Nutritional Sciences:

J. Nutr. **130**: 2322-2325.

CHRISTENSEN, E.I., H. Birn, P. Verroust, S. K. Moestrup (1998):

Membrane receptors for endocytosis in the renal proximal tubule.

Int. Rev. Cytol. **180**: 237-284.

CHRISTENSEN, E. I. and H. Birn (2001):

Megalyn and cubilin: synergistic endocytic receptors in renal proximal tubule.

Am. J. Physiol. Renal Physiol. **280**: 562-573.

CLARK, L. (1970):

The effect of excess vitamin A on longbone growth in kittens.

J. Comp. Pathol. **80**: 625-634.

CLARK, L. (1971):

Hypervitaminosis A: a review.

Austr. Vet. J. **47**: 568-571.

CLARK, L. (1973):

Growth rates of epiphysial plates in normal kittens and kittens fed excess vitamin A.

J. Comp. Pathol. **83**: 447-461.

CLARK, L. and A. A. Seawright (1968):

Skeletal abnormalities in the hindlimbs of young cats as a result of hypervitaminosis A.

Nature **217**: 1174-1176.

CLARK, L. and A. A. Seawright (1970):

Longbone abnormalities in kittens following vitamin A administration.

J. Comp. Pathol. **80**: 113-121.

CLARK, L., A. A. Seawright and J. Hrdlicka (1970):

Exostosen in hypervitaminotic A cats with optimal calcium-phosphorus intakes.

J. Smal Anim. Pract. **11**: 553-561.

CLINE, J.L., G. L. Czarnecki-Maulden, J. M. Losonsky, C. R. Sipe, R. A. Easter (1997):  
Effect of increasing dietary vitamin A on bone density in adult dogs.  
J. Anim. Sci. **75**: 2980-2985.

DE LUCA, L. M. (1991):  
Retinoids and their receptors in differentiation, embryogenesis and neoplasia.  
FASEB J. **5**: 2924 -2933.

DOYLE, S., P. Conlon, D. Royston (2000) :  
Vitamin A induced stellate cell hyperplasia and fibrosis in renal failure.  
Histopathology **36**: 90-91.

ECKHOFF, C., M. D. Collins, H. Nau (1991):  
Human plasma all-*trans*-, 13-*cis*- and 13-*cis*-oxoretinoic acid profiles during subchronic  
vitamin A supplementation: Comparison to retinol and retinyl ester plasma levels.  
J. Nutr. **121**: 1016-1025.

FREYTAG, T. L., S. M. Liu, Q. R. Rogers and J. G. Morris (2003)  
Teratogenic effects of chronic ingestion of high levels of vitamin A in cats.  
J. Anim. Physiol. A. Anim. Nutr. **87**: 42-51

GERLACH, T.H., M. H. Zile (1990):  
Upregulation of serum retinol in experimental acute renal failure.  
FASEB J. **4**: 2511-2517.

GERSHOFF, S. N., D. M. Hegsted and E. A. Lentini (1957):  
Vitamin A deficiency in cats.  
J. Lab. Invest. **6**: 227-240.

GILMOUR E. R., G. H. Harlty, T. H. J. Goodship (1993) :  
Trace elements and vitamins in renal disease.  
In MITCH W. E., S. Klahr: Nutrition and the Kidney. 2<sup>nd</sup> ed. Boston: 114-131.

GOODMAN, D. S., R. Blomstrand, B. Werner, H. S. Huang, T. Shiratori (1966):

The intestinal absorption and metabolism of vitamin A and  $\beta$ -carotene in man.

J. Clin. Invest. **45**: 1615-1623.

GOODMAN, D. S. (1984):

Plasma retinol-binding protein.

In: The Retinoids. M.B. Sporn, A.B. Roberts and D.S. Goodman (eds.).

2: Orlando, Academic Press: 41-88.

GOODWIN, T. W. (1986):

Metabolism, nutrition and function of carotenoids.

Ann. Rev. Nutr. **6**: 273-297.

GREEN, M. H., L. R. Uhl, J. B. Green (1985):

A multicompartmental model of vitamin A kinetics in rats with marginal liver vitamin A stores.

J. Lipid Res. **26**: 806-818.

HANCK, A.B., C.C. KUENZLE, W.F. REHM (1991):

Vitamin A

Vitamin in Einzeldarstellungen: Band 1, Verlag Paul Parey

HAYES, K. C. (1982):

Nutritional problems in cats: taurin deficiency and vitamin A excess.

Can. Vet. J. **23**: 2-5.

HAZEWINKEL, H.A.W. (1994):

Skeletal disease (Chapter 22). In WILLS, J. M., SIMPSON, K. W. (eds.): The Waltham Book of Clinical Nutrition of Dog and Cat. Elsevier Science, Oxford: 395.

HEUKESHOVEN, J. und R. Dernick (1986):

Zitiert nach Westermeier, R. (1991): SDS-Polyacrylamid-Elektrophorese: Coomassie- und Silberfärbung. In: Elektrophorese-Praktikum. R.Westermeier (Hrsg.), Weinheim: VCH Verlagsgesellschaft mbH, S. 182.

HEYWOOD, R. (1967):

Vitamin A in the liver and kidney of some felidae.

Br. Vet. J. **123**: 390-396.

ISLER, O. (1971):

Carotenoids.

Basel, Stuttgart: Verlag Birkenhäuser

KARRER, P., A. Helfenstein, H. Wehrli, B. Pieper, R. Morf (1931):

The constitution of lycopin and carotene.

Helv. Chim. Acta **14**: 614-632.

KATO, M., K. Kato, D. S. Goodman (1984):

Immunocytochemical studies on the localization of plasma and cellular retinol-binding proteins and of transthyretin (prealbumin) in rat liver and kidney.

J. Cell. Biol. **98**: 1696-1704.

KAWAGUCHI, R., Y. Jiamei, J. Honda, J. Hu, J. Whitelegge, P. Ping, P. Wiita, D. Bok, H. Sun (2007):

A membrane receptor for retinol-binding protein mediates cellular uptake of vitamin A.

Science **315**: 820-825.

KIM, H. W., B. P. Chew, T. S. Wong, J. S. Park, B. B. C. Weng, K. M. Byrne, M. G. Hayek and G. A. Reinhart (2000):

Modulation of humoral and cell-mediated immune responses by dietary lutein in cats.

Vet. Immunol. Immunopathol. **73**: 331-341.

KLEBER, H.-P., D. Schlee (1988):

Biochemie II : Lipoproteine: 325-330

Gustav Fischer Verlag Jena.

KOLB, E. (1999):

Der Gehalt an Vitaminen im Blut, im Blutplasma, in Geweben und in der Milch von Haustieren – Bedeutung für Gesundheit und Diagnostik.

In: Vitamine - Tierernährung und Gesundheit. Hoffmann-La Roche AG, S. 22-42.

KRAFT, W. und U. M. Dürr (1997):

Klinische Labordiagnostik in der Tiermedizin. (4.Auflage)

Schattauer Verlag, Stuttgart - New York.

LAEMMLI, U. (1970):

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

Nature **227**: 680-685.

LAMBERT, W. E. and A. P. De Leenheer (1985):

Demonstration of retinoic acid isomers in human urine under physiological conditions.

Experientia **41**: 359-360.

LOWE, J. S., R. A. Morton and J. Vernon (1957):

Unsaponifiable constituents of kidney in various species.

Biochem. J. **67**: 228-234.

MAKOVER, A., D. R. Soprano, M. L. Wyatt, D. S. Goodman (1989):

Localization of retinol-binding protein messenger RNA in the rat kidney and perinephric fat tissue.

J. Lipid Res. **30**: 171-180.

MANGELSDORF D. J. (1994):

Vitamin A receptors.

Nutr. Rev. **52**: 32-44.

McCOLLUM, E. V., M. Davis (1913):

Necessity of certain lipids in the diet during growth.

J. Biol. Chem. **15**: 167-175.

McCOLLUM, E. V., N. Simmonds (1917):

A biological analysis of pellagra-producing diets: the minimum requirements of the two unidentified dietary factors for maintenance as contrasted with growth.

J. Biol. Chem. **32**: 181-188.

MOORE, T., I. M. Sharman and P. P. Scott (1963):

Vitamin A in the kidney of cat.

Res. Vet. Sci. **4**: 397-407.

MUTO, Y., F. R. Smith, D. S. Goodman (1973):

Comparative studies of retinol transport in plasma.

J. Lipid Res. **14**: 525-532.

NAGY, N. E., K. B. Holven, N. Ross, H. Senoo, N. Kojima, K. R. Norum, R. Blomhoff (1997):

Storage of vitamin A in extrahepatic stellate cells in normal rats.

J. Lipid Res. **38**: 645-658.

NRC (1986):

Nutrient requirements of domestic animals: Nutrient requirements of dogs and cats.

National Academy of Science, National Research Council, Washington D.C.

NRC (2006):

Nutrient requirements of domestic animals: Nutrient requirements of dogs and cats.

National Academy of Science, National Research Council, Washington D.C.

OLSON, J. A. (1984):

Serum levels of vitamin A and carotenoids as reflectors of nutritional status.

J. Natl. Cancer Inst. **73**: 1439-1444.

OLSON, J. A. (1994):

Needs and sources of carotenoids and vitamin A.

Nutr. Rev. **43**: 67-73.

PAIK, J., S. Vogel, L. Quadro, R. Piantedosi, M. Gottesman, K. Lai, L. Hamberger, M. de Moraes Vieira, W. S. Blaner:

Vitamin A: Overlapping delivery pathways to tissues from circulation.

J. Nutr. **413**: 276-280.

POBISCH, R. und K. Ondersheka (1976):

Die Vitamin-A-Hypervitaminose bei der Katze.

Wien. Tierärztl. Mschr. **63**: 334-343.

POPPER, H. (1944):

Distribution of vitamin A in tissue as visualized by fluorescence microscopy.

Physiol. Rev. **24**: 205-224.

RAICA JR., N., J. Scott, L. Lowry, H. E. Sauberlich (1972):

Vitamin A concentration in human tissues collected from five areas in the United States.

Am. J. Clin. Nutr. **25** : 291-296.

RAILA, J. und F. J. Schweigert (1999):

Tamm-Horsfall-Glykoprotein als Vitamin-A-bindendes Protein im Harn von Kaniden.

In: Bericht des 23. Kongresses der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft e.V.,  
Teil 1 : Vorträge, Leitthema : „Aktuelle Forschung“, Bad Nauheim

Verlag: Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft, S. 284-291.

RAILA, J., I. Buchholz und F. J. Schweigert (1997):

Untersuchungen zur Vitamin-A-Bindung im Harn von Hunden.

In: 5. Symposium „Vitamine und Zusatzstoffe in der Ernährung von Mensch und Tier.“

R. Schubert, G. Flachowsky, R. Bitsch, G. Jahreis (Hrsg.), Weimar: Buch- und  
Kunstdruckerei Kessler GmbH, S.123-128.

RAILA, J. (1999):

Untersuchungen zur Ausscheidung von Vitamin A im Harn von Kaniden.

Diss. med. vet. Leipzig.

RAILA, J., I. Buchholz, H. Aupperle, G. Raila, H. A. Schoon and F. J. Schweigert (2000):

The distribution of vitamin A and retinol-binding protein in the blood plasma, urine, liver  
and kidneys of carnivores.

Vet. Res. **31**: 541-551.

- RAILA, J., S. Forterre, B. Kohn, L. Brunnberg, F. J. Schweigert (2003):  
Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs.  
*Am. J. Vet. Res.*, Vol. **64**, No 7: 874- 879.
- RAILA, J., S. Forterre, F. J. Schweigert (2003):  
Levels of retinol and retinyl esters in plasma and urine of dogs with urolithiasis.  
*J. Vet. Med. A* **50**, 380-382.
- RAILA, J., R. Radon, A. Trüpschuch und F. J. Schweigert (2002):  
Retinol and retinyl ester responses in the blood plasma and urine of dogs after a single oral dose of vitamin A.  
*J. Nutr.* **132**: 1673-1675.
- RAILA, J. und F. J. Schweigert (2001):  
Zur Bedeutung der Nieren im Vitamin-Stoffwechsel.  
*Berl. Münch. Tierärztl. Wschr.* **114**: 257-265.
- RAILA, J. und F. J. Schweigert (2002):  
Physiologische Besonderheiten im Vitamin-A-Stoffwechsel von Karnivoren.  
*Tierärztl. Praxis* **30K**: 1-7.
- RAILA, J., Neumann U. und F. J. Schweigert (2003):  
Immunochemical localization of megalin, retinol-binding protein and Tamm-Horsfall glycoprotein in the kidneys of dogs.  
*Vet. Res. Commun.* 2003, **27**: 125-135.
- RAILA, J., K. Wirth, F. Chen, U. Büschner, J. W. Dudenhausen, F. J. Schweigert (2004):  
Excretion of vitamin A in urine of women during normal pregnancy and pregnancy complications.  
*Ann. Nutr. Metab.* 2004, **48**: 357-364.

RHODES, D. C. J., E. J. Hinsman, J. A. Rhodes and E. C. Hawkins (1992):

Urinary Tamm-Horsfall glycoprotein concentrations in normal and urolithiasis-affected male cats-determined by an ELISA.

J. Vet. Med. **39**, 621-634.

RICHARD, M. J., J. T. Holck and D. C. Beitz (1989):

Lipogenesis in liver and adipose tissue of the domestic cat.

Comp. Biochem. Physiol. B., **93**: 561-564.

RICHTER, J. (1964):

Die Ausscheidung von Vitamin A im Harn während der Gravidität.

Z. Geburtsh. Gynäkol. **162**: 206-211.

RIBAYA-MERCADO, J. D., M. C. Blanco, J. C. Fox, R. M. Russell (1994):

High concentrations of vitamin A esters circulate primarily as retinyl stearat and are stored primarily as retinyl palmitate in ferret tissues.

J. Am. Coll. Nutr. **13**: 83-86.

ROSS, A. C. (1981):

Separation of long-chain fatty acid esters of retinol by high-performance liquid chromatography.

Anal. Biochem. **115**: 324-330.

SAUVANT, P., V. Sapin, M.-C. Alexandre-Gouabau, I. Dodeman, S. Delpal, L. Quadro, A. Partier, A. Abergel, V. Colantuoni, E. Rock, V. Azais-Braesco (2001):

Retinol mobilization from cultured rat hepatic stellate cells does not require retinol-binding protein synthesis and secretion.

Int. J. Biochem. Cell. Biol. **33**: 1000-1012.

SCHÖNE, S., G. Stein, A. Stelzner, D. Geinitz, D. Scholz, E. Keil, F. Schöne (1985):

Untersuchung über den Vitamin-A-Status von Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz.

Z. Klin. Med. **40**: 645-648.

SCHWEIGERT, F. J. (1988):

Insensitivity of dogs to the effects of non-specific bound vitamin A in plasma.

Intern. J. Vit. Nutr. Res. **58**: 23-25.

SCHWEIGERT, F. J. und S. Uehlein-Harrell (1989):

Diagnostische Bedeutung Lipoprotein-gebundener Vitamin-A-Ester im Blutplasma von Karnivoren.

Tierärztl. Prax. Suppl. **5**: 78-80.

SCHWEIGERT, F. J., Uehlein-Harrell, S. und H. Zucker (1990):

Effect of feeding on vitamin A concentrations in blood plasma of dogs.

J. Vet. Med. A **37**: 605-609.

SCHWEIGERT, F. J., O. A. Ryder, W. A. Rambeck and H. Zucker (1990a):

The majority of vitamin A is transported as retinyl esters in the blood of most carnivores.

Comp. Biochem. Physiol. Vol. **95A**: 573-578.

SCHWEIGERT, F. J., E. Thomann and H. Zucker (1990b):

Vitamin A in the urine of carnivores.

Int. J. Vitam. Nutr. Res. **61** : 110-113.

SCHWEIGERT, F. J. und H. Zucker (1991):

Besonderheiten im Vitamin-A-Stoffwechsel der Ordnung *Carnivora* - Eine Übersicht.

Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. **104**: 89-98.

SCHWEIGERT, F. J. und E. Thomann (1993):

Vitamin A und E bei Karnivoren: Transport im Blut und Organverteilung.

Mh. Vet. Med. **48**: 25-29.

SCHWEIGERT, F. J. (1995):

Comperative aspects of vitamin A and carotenoid metabolism in exotic mammals.

Research and captive propagation / ed. by U. Gansloßer, J. K. Hodges, W. Kaufmanns.

Fürth: Filander-Verl.: 130-146.

SCHWEIGERT, F. J. (1998):

Vitamin A: Stoffwechsel, Genexpression und embryonale Entwicklung.

Übers. Tierernährg. **26**: 1-24.

SCHWEIGERT, F. J., I. Buchholz and K. Bonitz (1998):

Effect of age on the levels of retinol and retinyl esters in blood plasma, liver and kidney of dogs.

Internat. J. Vit. Nutr. Res. **68**: 237-241.

SCHWEIGERT, F. J. and C. Gottwald (1999):

Effect of parturition on levels of vitamin A and E and of  $\beta$ -carotene in plasma and milk of mares.

Equine Vet. J. **31**: 319-323.

SCHWEIGERT, F. J. und V. Bok (1998):

Vitamin A in blood plasma and urine of dogs is affected by the dietary level of vitamin A.

Int. J. Vitam. Nutr. Res. **70**: 84-91.

SCHWEIGERT, F. J., A. Hurtienne, K. Bathe (2000):

Improved extraction procedure for Carotenoids from human milk.

Int. J. Vitam. Nutr. Res. **70**: 1-5.

SCHWEIGERT, F. J., J. Raila, B. Wichert und E. Kienzle (2002):

Cats absorb  $\beta$ -carotene, but it is not converted to vitamin A.

J. Nutr. **132**: 15-21.

SCOTT, P. P., J. P. Greaves and M. G. Scott (1964):

Nutritional blindness in cat.

Exp. Eye Res. **3**: 357-364.

SCOTT, P. P. and S. Y. Thompson (1969):

The influence of maternal intake of vitamin A on liver and kidney stores in kitten.

J. Physiol. **201**: 79-80.

SEAWRIGHT, A. A., P. B. English and R. J. Gartner (1965):

Hypervitaminosis A and hyperostosis of the cat.

Nature **206**: 1171-1172.

SEAWRIGHT, A. A. and P. B. English (1967):

Hypervitaminosis A and deforming cervical spondylosis of the cat.

J. Comp. Path. **77**: 29-39.

SEAWRIGHT, A. A. and J. Hrdlicka (1974):

Pathogenetic factors in tooth loss in young cats on a high daily oral intake of vitamin A.

Austr. Vet. J. **50**: 133-141.

SHIGUANG YU, PhD and I. Robinson-Paetau (2004):

Dietary supplements of vitamin E, C, and  $\beta$ -carotene reduce DNA damage in cats with renal insufficiency.

Experim. Biol. **4**, Abstract: 598

SMITH, F.R., D.S. Goodman (1971)

The effects of diseases of the liver, thyroid, and the kidneys on the transport of vitamin A in human plasma.

J. Clin. Invest. **50**: 2426-2436.

SMITH, F. R., D. S. Goodman (1976):

Vitamin A transport in human vitamin A toxicity.

New Engl. J. Med. **294**: 805-808.

SMITH, F. R., D. S. Goodman (1979):

Retinol-binding protein and the regulation of vitamin A transport.

Federation Proc. **38**: 2504-2509

SOPRANO, D. R. and W. S. Blaner (1994):

Plasma retinol-binding protein.

In: The Retinoids: Biology, Chemistry and Medicine. M. B. Sporn, A. B. Roberts and D. S. Goodman (eds.), New York: Raven Press, 257-281.

STEINBERGER, L. A., P. H. Hardy, Jr., J. J. Curculis and H. G. Meyer (1970):

The unlabeled antibody enzyme method of immunohistochemistry: preparation and properties of soluble antigen-antibody complex (horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes.

J. Histochem. Cytochem. **18**: 315-333.

STEPHENSON, C. B., J. O. Alvarez, J. Kohatsu, R. Hardmeier, J. I. Kennedy, Jr. and R. B. Gammon, Jr. (1994):

Vitamin A is excreted in the urine during acute infection.

Am. J. Nutr. **60**: 388-392.

THOMANN, E. (1989):

Vitamin-A-Stoffwechsel des Hundes und anderer Kaniden: Transport im Blut, Organverteilung und Ausscheidung über den Harn.

Diss. med. vet. München.

VAHLQUIST, A., B. Berne, C. Berne (1982):

Skin content and plasma transport of vitamin A and beta-carotene in chronic renal failure.

Eur. J. Clin. Invest. **12**: 63-67.

VAN HOEK, I., S. Daminet, S. Notebaert, I. Janssens, E. Meyer (2008):

Immunoassay of Urinary retinol binding protein as a putative renal marker in cats.

J. Immunol. Methods **329**: 208-213.

VANNUCCHI, M.T., H. Vannucchi, M. Humphreys (1992):

Serum levels of vitamin A and retinol binding protein in chronic renal patients treated by continuous ambulatorial peritoneal dialysis.

Int. J. Vitam. Nutr. Res. **62**: 107-112.

WACKENRODER, H. (1831):

Über das Oleum radicis Dauci aetherum, das Carotin etc.

Magazin Pharmaz. **33**: 144.

WILSON, D.E., I. F. Chan, A.K. Cheung, W. Dutz, K.N. Buchi (1985):

Retinylester retention in chronic renal failure. Further evidence for a defect in chylomicron remnant metabolism.

Atherosclerosis **57**: 189-197.

WILSON, D. E., J. Hejazi, N. L. Elstad, I. F. Chan, J. M. Gleeson, P. H. Iverius (1987):

Novel aspects of vitamin A metabolism in the dog: distribution of lipoprotein retinyl esters in vitamin A-deprived and cholesterol-fed animals.

Biochim. Biophys. Acta **922**: 247-258.

WITTMANN, F. (1993):

A-Hypervitaminose - ein Fütterungsschicksal.

Prakt. Tierarzt **6**: 543.

YATZIDIS, H., P. Digenis, P. Fountas (1975):

Hypervitaminosis A accompanying advanced chronic renal failure.

Brit. Med. J.: 352-353.

ZHENG G., D. R. Bachinsky, M. Abbate, G. Andres, D. Brown, I. Stamenkovic, J. L. Niles, R. T. McCluskey (1994):

Gp 330: receptor and autoantigen.

Ann. N.Y. Acad. Sci. **737**: 154-162.

## **Publikationsverzeichnis**

Teile dieser Arbeit wurden unter dem Titel "Plasma transport and tissue distribution of  $\beta$ -carotene, vitamin A and retinol-binding protein in domestic cats" veröffentlicht in *Comperative Biochemistry and Physiology Part A* 130 (2001) 849-856. Autoren der Veröffentlichung sind Dr. Jens Raila, Professor Florian J. Schweigert und Una Mathews.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. F. J. Schweigert für die Überlassung des interessanten Themas, das es mir erlaubte, meine praktische Tätigkeit mit wissenschaftlicher Arbeit zu verbinden.

Herrn Professor Dr. J. Zentek danke ich für die Möglichkeit der Promotion am Institut für Tierernährung des Fachbereiches Veterinärmedizin der FU Berlin.

Besonders herzlich möchte ich Herrn Dr. J. Raila für die Einarbeitung in das Gebiet der Retinoide sowie die jederzeit gewährte geduldige und freundliche Unterstützung und die zahlreichen Anregungen bei der Anfertigung dieser Arbeit danken. Gleichzeitig gilt mein Dank auch seiner Frau, Dr. G. Raila, für die Hilfe bei der Erarbeitung der histologischen und pathohistologischen Befunde.

Weiterhin danke ich Frau A. Hurtienne für die Unterstützung bei der Einarbeitung und Durchführung der HPLC-Analysen.

Frau E. Pilz möchte ich danken für die gewährte Hilfe bei der Erarbeitung der Western-Blot- und chromatographischen Analysen.

Ferner danke ich Frau U. Neumann für die Zusammenarbeit bei der Herstellung der histologischen Präparate.

Abschließend möchte ich mich bei allen Mitarbeitern, Doktoranden und Diplomanden des Institutes für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam, sowie des Instituts für Tierernährung der FU Berlin für die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Des weiteren danke ich meinem Ehemann Karsten Mathews und allen Familienmitgliedern für ihre vielfältige Unterstützung, die es mir erst ermöglicht hat neben meiner beruflichen Tätigkeit diese Doktorarbeit anzufertigen.

### **Selbständigkeitserklärung:**

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Wildenbruch, den 6.12.2008