

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Material und Methoden

3.1.1 Allgemeine Bemerkungen

Die Arbeit besteht aus einer klinischen sowie einer histopathologischen Studie. Während im klinischen Teil Blut- und Harnproben von Hunden mit Niereninsuffizienzen, Nierenwertveränderungen oder Cystitis untersucht wurden, so wurden im Rahmen der histopathologischen Studie Nierenschnitte von nierenkranken Tieren bezüglich der Verteilung von THP und RBP analysiert.

3.1.2 Klinische Studie

Im klinischen Teil dieser Arbeit wurden Blut- und Harnproben von 22 Hunden unterschiedlicher Rasse, unterschiedlichen Alters und Geschlechts labordiagnostisch (Blutbild, Blutchemie, Harnparameter) sowie elektrophoretisch und hochdruck-flüssigkeitschromatographisch auf ihren Gehalt an THP, RBP bzw. Vitamin A untersucht. Die Blut- und Harnproben der Hunde stammten von Tieren mit labordiagnostisch veränderten Harn- und/oder Nierenwerten, die in der Klinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin vorgestellt wurden:

Übersicht über die Patienten der klinischen Studie gibt Tabelle 3.1

Tab. 3.1: Patienten der klinischen Studie:

Hund	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)	Gewicht (kg)
1	Irischer Wolfshund	männlich	3 Monate	15
2	Berner Sennenhund	weiblich	4	40
3	Dt. Schäferhund	weiblich kastriert	7	30
4	Shar Pei	männlich kastriert	2	20
5	Riesenschnauzer	weiblich	4	28
6	Rottweiler	männlich	7	40
7	Rauhaardackel	männlich	15	9
8	Mischling (groß)	männlich	1	18
9	Cocker Spaniel	männlich	11	14
10	WesthighlandTerrier	männlich	11	9
11	Zwergschnauzer	männlich	14	9
12	Dobermann	männlich kastriert	9	23
13	YorkshireTerrier	weiblich	13	4
14	Cocker Spaniel	weiblich kastriert	14	14
15	Rottweiler	weiblich	10	42
16	Mischling (groß)	männlich	3	32
17	Pudel (klein)	männlich kastriert	10	9
18	Rottweiler	männlich	6	51
19	Berner Sennenhund	weiblich	9	39
20	Mischling	männlich	12	15
21	Langhaardackel	männlich	8	7
22	Yorkshire Terrier	männlich	7	2

Die Diagnose wurde in der Regel aufgrund der klinischen und labordiagnostischen Befunde gestellt. Bei einigen Patienten waren röntgenologische und sonographische Befunde für die Diagnosestellung wichtig. Anhand dieser Diagnosen ließen sich die Hunde in 4 Gruppen einteilen (siehe Legende 3.1):

- Gruppe 1: Akute Niereninsuffizienzen
- Gruppe 2: Chronische Niereninsuffizienzen
- Gruppe 3: Sonstige
(Nierenwertveränderungen aufgrund verschiedener Erkrankungen)
- Gruppe 4: Cystitiden

Legende 3.1: Einteilung der Patienten in Gruppen

Akute Niereninsuffizienz	Hund 1 bis 4
Chronische Niereninsuffizienz	Hund 5 bis 12
Sonstige	Hund 13 bis 20
Cystitis	Hund 21 bis 23

3.1.3 Probennahme

Die Harnproben wurden mit Hilfe der Cystozentese, bei den männlichen Tieren teilweise durch sterile Katheterisierung gewonnen. Der Harn wurde makroskopisch und labordiagnostisch auf die in Tabelle 3.2 dargestellten Parameter untersucht. Als Referenzwerte dienten die von Kraft et. al. (1999) in der "Klinischen Labordiagnostik in der Tiermedizin" angegebenen Laborwerte:

Tab. 3.2: Labordiagnostische Harnparameter:

Labordiagnostische Harnparameter	Referenzwerte (Kraft et al., 1999)
Farbe	blassgelb bis braungelb
Geruch	“fleischbrüh- bis knoblauchartig”
Spezifisches Gewicht	1,001-1,065
pH	5,5-7,0
Nitrite	negativ
Urobilinogen	negativ bis schwach positiv
Bilirubin	negativ, einfach positive und vorübergehend zweifach positive Reaktion nicht aussagekräftig ¹
Blut	negativ
Hämoglobin	negativ
Erythrozyten	0 bis 1 Erythrozyt pro Gesichtsfeld bei 350facher Vergrößerung
Leukozyten	1 bis 4 Leukozyten pro Gesichtsfeld bei 350facher Vergrößerung
Epithelien	vereinzelt
Zylinder	vereinzelt
Kristalle	Kaliumoxalatkristalle sind physiologisch beim Hund nach pflanzlicher Nahrung; Vorkommen anderer Kristalle deutet auf pathologisches Geschehen hin
Bakterien	negativ, aber nur das positive Resultat ist aussagekräftig
Protein	6-53 mg / dl
Ketonkörper	negativ
Glukose	negativ

¹ Beim Hund werden geringere Mengen an Bilirubin auch bei gesunden Tieren gefunden, ohne dass dies einen Krankheitswert haben muss (Kraft et al., 1999).

Der Harnstatus wurde mit Hilfe von Harnsticks (Leukozyten, Nitrit, pH, Protein, Glukose, Ketonkörper, Urobilinogen, Bilirubin, Blut, pH) (Combur-9-Test, Roche, Grenzach-Wyhlen) erstellt. Das spezifische Gewicht der Harnproben wurde mit einem Refraktometer (Uricon-N, Atago, Japan) bestimmt. Für die Untersuchung des Harnsedimentes wurde der Harn 10 Minuten lang bei 2000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Labofuge A, Kendro, Hanau). Anschließend wurde das Harnsediment mikroskopisch mit 40facher Vergrößerung hinsichtlich seiner Zusammensetzung auf Erythrozyten, Leukozyten, Epithelien, Harnzylinder, Bakterien und Kristalle untersucht (Zeiss Mikro, Zeiss, Jena).

Die Blutentnahme erfolgte durch Punktion der *Vena cephalica antebrachii*. Im Blut wurden auf folgende Parameter analysiert (Tab. 3.3a und b)

Tab. 3.3 a: Hämatologie:

Hämatologische Parameter	Referenzwerte (Kraft et al., 1999)
Erythrozyten	5,5-8,5 x 10 ⁶ / µl
Leukozyten	6000-15000 (/ µl)
Hämatokrit	44-52 %
Hämoglobin	15,0-19,0 g / dl
Thrombozyten	150.000-500.000 / µl
MCV	60-77 µm ³
MCH	17-23 pg
MCHC	31-34 g / dl
Lymphozyten	13-30 % bzw. 1000-3600 /µl
Granulozyten	neutrophile: Stabkernige: 0-4 % bzw. 0-500 / µl Segmentkernige: 55-75 % bzw. 3000-6000 / µl eosinophile: 0-6 % bzw. 40-600 / µl basophile: selten (bis 1 %) bzw. 40 / µl
Monozyten	0-4 % bzw. 0,2 mg / dl

Tab. 3.3 b: Blutchemie:

Blutchemie	Referenzwerte (Kraft und Dürr, 1999)
Natrium	140-155 mmol / l
Kalium	3,5-5,1 mmol / l
Kalzium	2,3-3,0 mmol / l
Phosphor	0,7-1,6 mmol / l
Magnesium	0,6-1,3 mmol / l
Glukose	70-120 mg /dl Plasma
Harnstoff	20-50 mg / dl
Kreatinin	0,4-1,2 mg / dl
Alanin-Amino-Transferase (ALT)	bis 55 IU / l
Aspartat-Amino-Transferase (AST)	bis 25 IU / l
Alkalische Phosphatase (AP)	altersabhängig: bis 530 IU / l bis 3 Monate, bis 146 IU / l bis 1-2 Jahre, bis 100 IU / l 2-8 Jahre, bis 183 IU / l über 10 Jahre
Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)	bis 6 IU / l
Protein	5,4-7,5 g / dl
Albumin	2,5-4,4 g / dl
Cholesterin	120-390 mg / dl
Bilirubin	bis 0,2 mg / dl

Für die hämatologische Blutuntersuchung wurde Blut in EDTA-Kalium beschichtete Blutröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) abgenommen und anschließend mittels Standardverfahren mit dem Cell-Dyn 3500 (Abbott, Wiesbaden) untersucht.

Das Blut zur Bestimmung der klinischen Chemie wurde in Lithium-Heparin beschichtete Blutröhrchen abgenommen und 5 Minuten bei 4000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert (Minifuge RF, Kendro, vormals Heraeus Sepatech, Hanau). Anschließend wurde der Gehalt an Natrium, Kalium, Glukose sowie Harnstoff mit dem Nova Biochemical (Nova, Rödermark) gemessen, während die übrigen Parameter mit dem Cobas Mira Plus (Roche, Grenzach-Wyhlen) bestimmt wurden.

Das Plasma sowie der Urin wurden in Polyesterl rhrchen aliquotiert und bei -20°C für die Elektrophorese und die Hochdruckfl ssigkeitschromatographie (HPLC) aufbewahrt.

3.1.4 Qualitative Bestimmung von RBP und THP in Blutplasma und Harn

Der quantitative Nachweis von RBP und THP im Blutplasma und Harn erfolgte mit Hilfe der Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und des Western Blots:

3.1.4.1 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese fand mit Hilfe des BioRad-Kleinelektrophoresesystems in einer Vertikalkammer (Mini-Protean II; BioRad, München) statt. Dabei erfolgte die Proteintrennung unter denaturierten Bedingungen in 0,5 mm dicken, 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen (PAG) mit 3%igen Sammelgelen nach Laemmli (1970). Nach Verdünnung der Proben im Verhältnis 1:1 mit dem Probenpuffer (125 mM Tris; 20 % Glycerol; 2 % SDS; 2 % 2-Mercaptoethanol; pH 6,8), wurden die Proben bei 95°C im Wasserbad (5 Min) erwärmt. Anschließend wurden in jede Geltasche 15 ng des Protein-Puffergemisches eingebracht. Zur Kontrolle wurde ein Molekulargewichtsstandart aufgetragen (Silver Stain Standard; BioRad). Bei einer Stromstärke von 30 mA erfolgte die Proteintrennung unter Kühlung. Nach einer Stunde wurde eines der beiden Gele nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1986) mit der Silbernitratfärbung behandelt. Die Bildauswertung erfolgte densitometrisch mit dem Fluor-S Multimager System (BioRad, München). Das zweite Gel wurde im Rahmen des immunologischen Nachweises von RBP und THP der Methode des Western-Blots unterzogen.

3.1.4.2 Immunologischer Nachweis von RBP und THP im Western-Blot

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden bei einer Stromstärke von $0,8\text{ mA/cm}^2$ im Tankblot-Verfahren (Mini Trans-Blot; BioRad) auf eine Polyvinylfluoridmembran (PVDF, Immobilon Millipore Corp., Bedford, USA) transferiert. Als Transferpuffer wurde 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0.038 % SDS, sowie 20% Methanol verwendet. Nach 60 minütigem Proteintransfer wurde die Blotmembran 1 min in TBS-Tween-Puffer (50mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1 % Tween 20; pH 7,%) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran 90 Minuten bei Raumtemperatur in TBST-Puffer 0,1 % mit 5 % Magermilch (Gl cksklee, Nestle AG, Frankfurt am Main) geblockt.

Für die Detektion des THP wurde als Primärantikörper der Schaf-*anti-human* THP (Chemicon International, Inc., Temecula, USA) verwendet. Die Membran wurde mit 15 µl des Antikörpers, 14,985 ml TBST 0,05 % und 150 mg Magermilchpulver 1 Stunde auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Membran 10 Minuten lang mit 0,1% TBST gewaschen und anschließend mit dem Kaninchen anti-Schaf IgG (DAKO Diagnostika, Hamburg) (1:1000) und mit dem Peroxidase-konjugierten Antiserum gegen humanes Serum RBP vom Kaninchen (Code Nr. A 301, Dako Diagnostika, Hamburg) (1.250) 1 Stunde lang inkubiert.

Nachdem die Membran 3 x 10 min mit TBST 0,3 % Waschpuffer gewaschen wurde, erfolgte die Proteindetektion mit Hilfe der Luminolreaktion (Chemiluminescence Detektion Kit, Boehringer Mannheim, Mannheim). Dabei wurde die Membran 2 Minuten lang mit dem Luminolreagenz inkubiert und danach mit der Proteinseite nach oben in den Fluor-S Multimager (BioRad) gelegt. Die Aufnahme der Chemiluminiszenz erfolgte mit Hilfe der gerätespezifischen Software Multi-Analyst PC Version 1.1 (BioRad).

Die Bewertung und Dokumentation der erhobenen Befunde erfolgte in standardisierten Protokollen anhand der Intensität des Reaktionsproduktes (Legende 3.2):

Legende 3.2: Bewertung der Intensität der Immunreaktion des Proteins im Western Blot

-	keine Reaktion
(+)	schwache Intensität
+	normale Intensität
++	starke Intensität
+++	sehr starke Intensität

Zum Vergleich wurde außerdem der Harn von 4 gesunden Hunden mit der Methode der SDS-PAGE und des Western Blots untersucht:

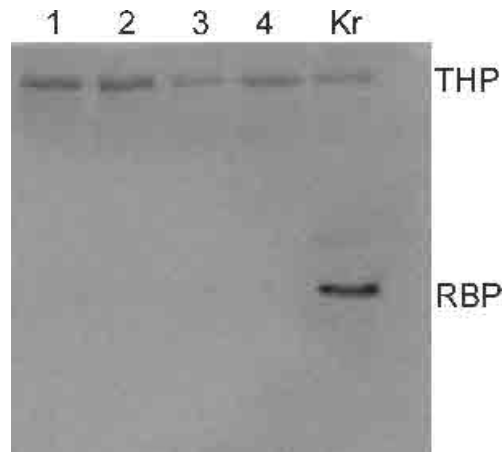


Abb. 3.1: Immunologische Detektion des THP im Harn gesunder Hunde (1-4), sowie von THP und RBP im Harn eines kranken Hundes (Kr); (Western Blot); Die Intensität der Immunreaktionen des Proteins wurde folgendermaßen bewertet:

THP: Hund 1 +; Hund 2: +; Hund 3: (+); Hund 4: (+); kranker Hund: (+);
RBP: Hund 1 -; Hund 2: -; Hund 3: -; Hund 4: -; kranker Hund: ++

3.1.5 Retinol- und Retinylesterbestimmung in Blutplasma und Harn

Die Bestimmung von Retinol und Retinylester wurde mit Hilfe der Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) durchgeführt. Zunächst wurden die Harn- und Plasmaproben für die HPLC vorbereitet:

3.1.5.1 Extraktion der Plasma- und Harnproben

1. Extraktion der Lipidanteile in Anlehnung an eine nach Vuilleumier et al. (1983) modifizierte Methode:

Ausfällung der Proteine 200 µl Probenmaterial mit 200 µl Ethanol versetzen, schütteln, Zugabe von 1 ml n-Hexan (mit 0,05% (w/v) Butylhydroxytoluol (BHT) als Antioxidationsmittel versetzt).

2. 10 minütiges Schütteln der vorbereiteten Proben, 10 minütige Zentrifugation bei 1500 x g und Überführen der oberen organischen Phase in ein Zentrifugenröhrchen.
3. Nachextraktion der restlichen wässrigen Phase mit 1 ml n-Hexan und Vereinigung der gewonnenen Überstände.
4. Einengung der Überstände zur Trockene mit Hilfe von Stickstoff im Wasserbad bei 35-40 °C.
5. Aufnahme der organischen Reste in 200 µl eines Gemisches aus Acetonitril : Methanol, 85:15 v/v; 0,01% (w/v) Ammoniumacetat und 5 minütige Ultraschallbehandlung der Proben.

Die so vorbereiteten Proben wurden über die HPLC analysiert. Dabei kamen folgende Standards und Chemikalien zur Anwendung:

Standards

Retinol, Retinylpalmitat (Fa. Sigma, Deisenhofen)

Chemikalien

Acetonitril, Ammoniumacetat, Methanol, Isopropanol (alle mit HPLC-Qualität), n-Hexan (Fa. Roth, Karlsruhe).

3.1.5.2 Umkehrphasen-Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Mit Hilfe des automatischen Probengebers wurden 150 µl Probenextrakt (Autosampler, Model 717 plus; Waters Inc., Milford, USA) injiziert. Nach der Probenaufgabe und der Vorsäule (10 x 4 mm; Grom, Ammerbuch) erfolgte die Trennung durch die Inertsil-ODS-Säule (250 x 4 mm; 5 µm Teilchengröße, 150Å Porengröße; Grom). Ein binärer Gradient (Krinsky et al., 1990) aus dem Eluenten A (Acetonitril : Methanol, 85:15 v/v; 0,01% (wv) Ammoniumacetat) und B (Isopropanol 100%) diente als mobile Phase. Die Flussrate betrug 1 ml/min (Pumpen, Model 515; Waters). Nach 7 Minuten Laufzeit wurde der Eluent A durch 30 % des Eluent B ergänzt. Nach weiteren 30 Minuten erfolgte im Rahmen des Äquilibrieren die Rückstellung auf 100% Eluent A. Die HPLC dauerte 40 Minuten pro Durchlauf. Das Retinol und die Retinylester wurden simultan mit

einem Photodiodenarray (PDA, Model 996; Waters) bei einer Wellenlänge von 325 nm detektiert. Die gerätespezifische Software (Millenium™ 2015, Waters) steuerte die Anlage und führte die Auswertung der Chromatogramme durch.

3.1.5.3 Quantifizierung des Retinols und der Retinylester

Das Retinol konnte über den Vergleich der Retentionszeiten, der Peakspektren sowie der Peakflächen eines externen Standards identifiziert und quantifiziert werden. Bei der Messung der Retinylester wurde davon ausgegangen, dass die UV-Absorption der Retinylester vom Retinolanteil abhängig ist und somit die Absorption gleicher Mengen von Retinol und Retinylestern adäquat ist (Ross, 1981). So konnte die Retinolkonzentration des Esters über den Vergleich der Peakfläche eines Retinolstandards als Retinoläquivalente berechnet werden.

3.1.6 Histopathologische Studie

Im histopathologischen Teil der Arbeit wurden Nierenschnitte von 90 nierenkranken Hunden unterschiedlicher Rasse, Alters und Geschlechts aus dem Institut für Veterinär-Pathologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig histopathologisch und immunhistologisch untersucht.

3.1.6.1 Probennahme, -konservierung und histologische Aufbereitung

Die Nieren wurden im Rahmen der pathologischen Sektion entnommen und zunächst in 4%igem neutral gepuffertem Formalin fixiert und anschließend nach einem Standardverfahren im Hypercenter XP (Fa. Shandon, Frankfurt) in Paraplast (Fa. Vogel, Medizinische Technik und Elektronik GmbH & Co. KG, Gießen) eingebettet. Die eingebetteten Organproben wurden mit einem Rotationsmikrotom (Medium Histotechnologie, Gießen) in 3-4 µm dicke Schnitte geschnitten. Anschließend wurden die Proben auf Super-Frost-Plus™ Objektträger aufgebracht und über Nacht im Wärmeschrank bei 37 °C getrocknet.

3.1.6.2 Immunhistologischer Nachweis von RBP und THP in Hundenieren

Patientengut:

Bei dem Probenmaterial handelt es sich um Nierengewebeproben von 50 männlichen und 40 weiblichen Hunden. Die Tiere wurden entsprechend ihrer histopathologischen Diagnosen in folgende Gruppen unterteilt:

Gruppe 1: Hunde mit Kreislaufstörungen

Gruppe 2: Hunde mit Nephritiden

Gruppe 3: Hunde mit Nephrosen

Gruppe 4: Hunde mit Tumoren

Kreislaufstörungen

- Hyperämie (n=13)
- Blutung (n=3)
- Infarkt (n=5)

Nephritiden

- Akute interstitielle Nephritis (n=2)
- Chronische interstitielle Nephritis (n=19)
- Chronische Glomerulonephritis (n=7)
- Pyelonephritis (n=9)

Nephrosen

- Glomerulosklerose (n=3)
- Glomeruläre Lipidose (n=2)
- Konkrement-speicherungs-nephrose (n=1)
- Hyalinspeicherungs-nephrose (n=1)
- Pigmentspeicherungs-nephrose (n=5)
- Fettspeicherungs-nephrose (n=2)

Tumoren

- Hämangiosarkometastase (n=1)
- Multiples Myelom (n=1)
- Plattenepithelkarzinom (n=1)
- Schilddrüsenkarzinom (n=1)
- Lymphosarkometastase (n=1)

Im Rahmen der Arbeit wurden pro Hund jeweils eine Hämatoxylin-Eosinfärbung sowie je eine immunhistologische Färbung gegen RBP und THP angefertigt

3.1.6.3 Material und Arbeitsmethoden

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) (nach Mayer)

Folgende Lösungen kamen bei der HE- Färbung zur Anwendung:

Hämatoxylin nach Mayer

1g Hämatoxylin krist. (Merck, Darmstadt)
0,2 g Natriumjodat (Merck)
50 g Kalialaun (Merck)
50 g Chloralhydrat (Merck)
0,2 g Zitronensäure krist. (Roth, Karlsruhe)
ad 1000 ml *Aqua dest.*

Eosin Stammlösung

1000 ml Eosin Chroma flüssig (Chroma-Gesellschaft, Münster)
Alkohol 2%ig

Eosin Gebrauchslösung

Eosin Stammlösung
Alkohol (96%)
Im Verhältnis 1:3 mischen

Durchführung

1. Entparaffinieren der Schnitte für 10 min in Xylol (Roth) und anschließend in absteigender Alkoholreihe für je 3 min (96 % Alkohol, 70 % Alkohol).
2. Färben der Schnitte mit Hämatoxylin-Lösung für 7 min.
3. Wässern unter laufendem Leitungswasser für 15 min.
4. Färben der Schnitte mit der Eosin-Gebrauchslösung für 2 min.
5. Wässern unter laufendem Leitungswasser für 15 min.

6. Entwässern der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe für jeweils 3 min (70% Alkohol, 80% Alkohol, 96% Alkohol); anschließend 10 Minuten Xylol.
7. Eindeckeln der Objektträger mit Canadabalsam (Roth).

Nach 24 stündigem Trocknen der HE-gefärbten Schnitte wurden sie mit einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg) in 10-facher, 20-facher und 40-facher Vergrößerung untersucht.

3.1.7 Nachweis von RBP

Folgende Antikörper und Seren kamen für den Nachweis von RBP zur Anwendung:

Primärantikörper: Kaninchen-*anti*-human RBP (Code Nr. A 0040, Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) 1:400 in 20%igem Schweineserum/ TBS

Sekundärantikörper: Schwein-*anti*-Kaninchen IgG (Code Nr. Z 0196, Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) 1:100 in 20%igem Schweineserum/TBS

PAP-Komplex: Kaninchen-PAP 1:100 (Code Nr. Z 0113, Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) in 20%igem Schweineserum/TBS

Seren: Das Schweineserum entstammt von Schweinen, deren Serum sterilfiltriert und mit 0,05% Merthiolat (Dako Diagnostika GmbH, Hamburg) haltbargemacht wurde. Zur Gewinnung des Kaninchen-Serums wurde gesunden Kaninchen Blut abgenommen, welches nach zwei- bis vierstündiger Stehenlassen zehn Minuten bei 3000 U/min zentrifugiert wurde.

Puffer

Imidazol/HCl-Puffer 0,1 (pH 7,1)

4,1 g Imidazol (Merck, Darmstadt)
Aqua dest ad. 1000 ml
50 ml 1M HCl

Lösungen

Tris-Buffered-Saline (TBS, pH 7,6)

TBS-Stammlösung:
60,57 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Sigma, Deisenhofen)
610 ml *Aqua dest.*
390 HCl 1N

TBS-Gebrauchslösung:
100 ml Stammlösung
900ml NaCl 0,8% in *Aqua dest.*

3,3-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid-Lösung (DAB)

100 mg DAB in 200ml 0,1M Imidazol/HCl-Puffer (pH 7,1), unmittelbar vor Gebrauch 70 µl H₂O₂ (30%) dazugeben.

Papanicolaous Lösung

Papanicolaous (Merck, Darmstadt)
Aqua dest.
Im Verhältnis 1:20 mischen

3.1.7.1 Durchführung und mikroskopische Auswertung

1. Entparaffinieren der Schnitte in Roti-Histol für 10 min, anschließend Rehydrierung in absteigender Alkoholreihe für jeweils drei min (Isopropanol, 96%iger Alkohol, 80%iger Alkohol, 70%iger Alkohol).
2. Inaktivierung der endogenen Peroxidase mittels Methanol und unmittelbar zugegebenem 0,5% H₂O₂ (Perhydrol 30% H₂O₂ p.a.; Merck, Darmstadt) für 45 min.
3. Waschen in TBS.
4. Überführen der Objektträger in die *Coverplates* (Life Science Int. GmbH, Frankfurt am Main).
5. Inkubation mit Schweineserum/TBS (1:2) über 10 min.
6. Benetzung der Objektträger mit jeweils 100 µl des Primärantikörpers (1:400 in 20% Schweineserum/TBS); die negativ gekennzeichneten Kontrollobjektträger werden stattdessen mit dem Kontrollserum (20% Schweineserum/TBS) versehen.
7. Inkubation der Coverplates über Nacht bei 4 °C.
8. Waschen mit je 2 ml TBS.
9. 30 minütige Inkubation aller Objektträger mit jeweils 100 µl des Sekundärantikörpers (1:100 in 20% Schweineserum/TBS).
10. Waschen mit je 2 ml TBS.
11. 30 minütige Inkubation aller Objektträger mit jeweils 100 µl des Kaninchen-PAP (1:100 in 20% Schweineserum/TBS).
12. Waschen mit je 2 ml TBS.

13. 10 minütige Inkubation unter ständigem Rühren in 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB, Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01% H₂O₂ (30%) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1) bei Raumtemperatur.
14. Drei mal je 5 min waschen in TBS, anschließend einmal 5 min Waschen in *Aqua dest.*
15. 10 sek Gegenfärben in Papanicolaous-Hämatoxylin (Merck) für 10 sek und 5 minütiges Bläuen der Schnitte in Leitungswasser.
16. Entwässern der Schnitte in aufsteigender Alkoholreihe für je 3 min: 50% Alkohol, 70% Alkohol, 80% Alkohol, 96% Alkohol, Isopropanol, Rotihistol; für 10 min in reines Xylol).
17. Eindeckeln der Schnitte.

Nach 24 stündigem Trocknen der PAP-gefärbten Schnitte, wurden sie mit einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg) in 10facher, 20facher und 40facher Vergrößerung auf immunhistologische Färbungen untersucht.

3.1.8 Nachweis von THP

Folgende Antikörper und Seren kamen für den Nachweis von THP zur Anwendung:

Primärantikörper: Schaf-anti-human THP (Chemicon International, Inc.) 1:1600 in 20 %igem Kaninchenserum/TBS

Sekundärantikörper: Peroxidasekonjugiertes Kaninchen anti-Schaf IgG (Dako) 1:100 in 20 %igem Kaninchenserum/TBS

Bovines Serumalbumin (BSA): 5% (RIA-grade, Gerbu Biotechnik, Gaiberg)

Beim Nachweis des THP wurden die selben Puffer und Lösungen angewandt, die für das RBP verwendet wurden (Imidazol/HCl-Puffer, TBS). Die immunhistologische Färbung gegen das THP wurde in Anlehnung an das Protokoll des immunhistologischen Nachweis des RBP durchgeführt.

3.1.8.1 Durchführung und mikroskopische Auswertung

1. Blocken des unspezifischen Hintergrundes mit jeweils 100 µl 5 %igem BSA
2. 2 minütige Inkubation unter ständigem Rühren in 3,3-Diaminobenzidintetrahydrochlorid (DAB, Fluka Feinchemikalien GmbH, Neu Ulm) mit 0,01% H₂O₂ (30%) in 0,1 M Imidazolpuffer (pH 7,1) bei Raumtemperatur.
3. Nach 24 stündigem Trocknen der THP-gefärbten Schnitte wurden sie mit einem Lichtmikroskop (Olympus, Hamburg) mit 10er, 20er und 40er Objektiven auf positive Reaktionen durchgemustert.

3.1.9 Auswertung der Immunhistologie

Als positive Reaktionen wurden in der Schnittebene liegende, hell- bis dunkelbraune feingranuläre Reaktionsprodukte gewertet, die im Kontrollpräparat nicht nachweisbar waren. Homogene hellbeige bis hellbraune Färbungen, die vorwiegend im Bereich von Kollagenfasern und Plasmainsudationen auftraten, wurden als negativ bewertet. Ebenso wurde Lipofuszin, das sich in Form von solitären hellbraunen punktförmigen Reaktionen intraepithelial präsentiert, nicht als Reaktionsprodukt gewertet. Das eisenhaltige Pigment Hämosiderin, welches in Folge von Blutabbau in den Makrophagen und Epithelzellen vorkommt, trat auch im Kontrollpräparat als hellbraunes, grobscholliges intrazelluläres Pigment auf und wurde ebenfalls nicht als Reaktionsprodukt interpretiert. Zur Beurteilung des physiologischen Verteilungsmusters des RBP und des THP, wurden Nierenschnitte von 6 gesunden Hunden angefertigt und neben einer HE-Färbung nach den selben immunhistologischen Methoden wie die Nierenschnitte der kranken Hunde gegen das RBP und das THP gefärbt. Anhand der gesunden Nieren wurde die jeweilige physiologische Verteilung der beiden Proteine untersucht.

3.10 Physiologische Verteilung des RBP und des THP

RBP ist in der Nierenrinde im proximalen gewundenen Tubulus diffus intrazytoplasmatisch verteilt, wobei es basal schwächer als apikal vorlag, so dass das Protein in Form eines feingranulären supranukleären apikalen Randsaumes prominierte. Die intrazytoplasmatische Intensität der Färbungen variierten sowohl für das RBP, als auch für das THP, wobei die Reaktionsprodukte des RBP in der Regel

hellbraun waren, während sich das THP vorwiegend in einem dunkleren Braunton (mittel- bis dunkelbraun) präsentierte. Das THP ist unter physiologischen Bedingungen in den Epithelzellen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife (TAL) und in der Pars convoluta (DCT) lokalisiert. Im Gegensatz zum feingranulierten RBP tritt es strukturell homogen auf. Das THP ist in der Zelle apikal stärker angereichert als basal, wodurch es auch hier zur Entstehung eines apikalen Randsaumes kommt (Tab. 3.4).

Tab 3.4: Die physiologische Verteilung des RBP und des THP:

Eigenschaften des Reaktionsproduktes	RBP	THP
Lokalisation	Tubulus proximalis: Pars convoluta	Tubulus distalis: Pars recta der Henleschen Schleife und proximaler Teil der Pars convoluta
Intrazelluläre Verteilung	apikal > basal apikaler Randsaum	apikal > basal apikaler Randsaum
Farbintensität	hellbraun (+)	mittel- bis dunkelbraun (++/+++)
Struktur	feingranulär	homogen

Anschließend wurden alle Nierenschnitte von Hunden mit Nierenerkrankungen mit den Nierenschnitten der gesunden Hunde verglichen und mit Hilfe eines einheitlichen Schemas qualitativ und quantitativ auf ein Vorliegen des RBP und des THP untersucht (siehe Legende 3.3). Dabei wurden folgende morphologische Strukturen beurteilt:

Legende 3.3 : Schema zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der Immunhistologie:

Bowman Kapsel

- parietal
- peripolar

Glomerulum

- endothelial
- mesangial

Proximaler Tubulus: Endothelzellen

- basal intrazytoplasmatisch
- apikal intrazytoplasmatisch

Distaler Tubulus: Endothelzellen

- basal intrazytoplasmatisch
- apikal intrazytoplasmatisch

Nierenbecken: Übergangsepithel

Blutgefäße

Interstitium

Menge und Intensität des Proteins (Semiquantitativ und -quantitativ)

Anschließend wurde das vorhandene Protein in den jeweiligen morphologischen Strukturen nach den folgenden Kriterien beurteilt (siehe Legende 3.4):

- Menge des vorhandenen Proteins (Quantität)
- Intensität der Färbung (Qualität)
- Menge und Farbintensität des Proteins im erkrankten Gebiet verglichen mit dem restlichen Schnitt und im Vergleich mit dem gesunden Schnitt

Legende 3.4: Qualitative und quantitative Verteilung des Proteins wurden folgendermaßen bewertet:

∅	kein Protein
+	geringgradig
++	mittelgradig
+++	hochgradig