

## Eigene Untersuchungen

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Tiere, Probennahme, -konservierung und Versuchsablauf

Für die Untersuchungen wurden Blut- und Harnproben von acht Hunden analysiert. Es handelte sich um männliche 6-7 Monate alte Hunde der Rasse Beagle ( $10,2 \pm 0,6$  kg Körpergewicht, von Harlan-Winkelmann, Borcheln, Deutschland) aus der Tierzucht und -haltung der Schering AG in Berlin. Das Untersuchungsprotokoll wurde tierschutzrechtlich von der zuständigen Behörde (Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin; AZ: G0062/00) begutachtet und genehmigt. Die zur Durchführung des Versuchsablaufes erforderlichen Anlagen, Geräte und sonstigen Mittel waren in den Tierlaboratorien der Schering AG vorhanden. Die Aufbereitung und Auswertung der Proben erfolgte am Institut für Ernährungswissenschaft der Universität Potsdam. Nach Beendigung des Versuches verblieben die Tiere in den Räumen der Tierzucht und Tierhaltung der Schering AG.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere umfassend klinisch untersucht. Es konnten dabei keine Anzeichen einer Erkrankung festgestellt werden. Auch während des Versuchsablaufes kam es bei den Tieren zu keiner gesundheitlichen Beeinträchtigung. Die Blutentnahmen erfolgten aus der *Vena cephalica antebrachii*. Von jeder Blutentnahme wurde sofort nach Probengewinnung der Hämatokrit bestimmt. Aufgrund der häufigen Blutabnahmen hätte der Abfall des Hämatokrits auf unter 32% einen Versuchsabbruch zur Folge gehabt. Parallel dazu wurden die Tiere 18 Stunden am Tag im Stoffwechsellkäfig untergebracht. So konnten Harnproben von 48 Stunden vor bis 96 Stunden nach der oralen Vitamin-A-Applikation gesammelt werden. Die Hunde befanden sich dabei täglich 18 Stunden im Stoffwechsellkäfig und erhielten aus Tierschutzgründen (Empfehlung der Tierversuchskommission) die restlichen sechs Stunden Auslauf.

Die Blutentnahmen zur Bestimmung der Ausgangswerte erfolgten 48 Stunden vor sowie 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24, 48, 72 und 96 Stunden nach Verabreichung des Vitamin-A-Bolus in EDTA beschichteter Röhrchen (siehe Abb. 3.1). Die Vitamin-A-Gabe erfolgte nach 16-stündigem Fasten als Bolus von 10.000 IE Vitamin A/kg Körpergewicht (3000 RE/kg KG) in Form von Retinylpalmitat (URSOVIT® A, wässrig, Serumwerk Bernburg AG, Deutschland) zusammen mit fünf ml Sahne (30% Fettanteil) mittels Spritze direkt in den hinteren Maulbereich. Täglich bekamen die Hunde um 11.00 Uhr, jeweils nach der Blutentnahme, ca. 250g Futter der Marke Altromin (Altromin Gesellschaft für Tierernährung mbH, Deutschland). Die Tiere konnten frei Wasser aufnehmen. Das Blutplasma wurde innerhalb von vier Stunden durch Zentrifugation für zehn Minuten bei  $1500 \times g$  bei  $4^{\circ}\text{C}$  gewonnen. Es fand entweder direkt zur Chylomikronenpräparation Verwendung oder wurde bis zur Analyse unter Stickstoff bei ca. –

80 °C eingefroren. Die Uringewinnung erfolgte über 18 Stunden täglich durch mit Aluminium-Folie vor Licht geschützte Auffanggefäße am Stoffwechselkäfig. Das Urinvolumen wurde gemessen und gekühlt zum Labor transportiert. Aus Tierschutzgründen wurde eine Urinentnahme mittels Katheter abgelehnt, so das acht Stunden nach Vitamin-A-Gabe nur von der Hälfte der Tiere Harn aufgefangen werden konnte. Der Urin wurde in Polyesterlörhrchen aliquotiert, mit Stickstoff begast und ebenfalls bei -80 °C gelagert.

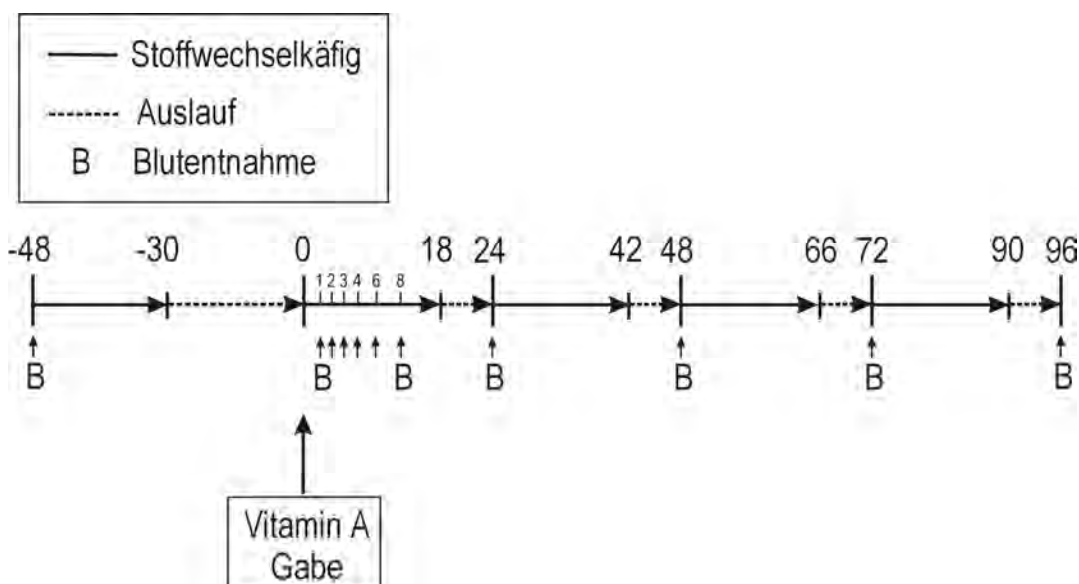


Abb. 3.1: Versuchsdesign (Zeitpunkte der Blutabnahme sowie Aufenthalt in den Stoffwechselkäfigen; Stunde 0 entspricht der oralen Verabreichung des Vitamin-A-haltigen Bolus von 3000 RE/kg Körpergewicht).

### 3.2 Chylomikronen-Trennung

Zur Chylomikronen Trennung fand eine modifizierte Methode nach Terpstra *et al.* (1981) (Terpstra 1985) Anwendung. Dabei ist zur Chylomikronengewinnung die Herstellung von zwei Trennschichten aus Kaliumbromid (KBr) notwendig. Bei der folgenden Unterschichtung wird je 1ml destilliertes Wasser, KBr-Lösung der Dichte 1,1 und 1,225 sowie das Serum in ein 4,4 ml Polyallomer-Rörhrchen vorsichtig pipettiert. Danach erfolgte die Zentrifugierung in einer Ultrazentrifuge über 30 Minuten bei 100.000 x g bei 10 °C (Ultrazentrifuge Sorvall® Ultra Pro 80 mit einem SW-41-Rotor; Kendro Laboratory Products). Die flotierten Chylomikronen (Dichte < 1,006 g/ml) wurden abpipettiert, gewogen und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C eingefroren.

### **3.3 Lipoproteintrennung**

Die Trennung der Lipoproteine des Blutplasmas erfolgte mittels präparativer Ultrazentrifugation in einem selbstaufbauenden Gradienten durch Iodixanol, 60% w/v (Optiprep™) nach der Methode von Graham *et al.* (Graham 1996). sechs ml 5%iges Iodixanol in NaCl-Hepes-Puffer (0,5 + 5,5 ml) wurden in Ultracrimp-Röhrchen (Sorvall, Newtown, USA) mit fünf ml 15% Iodixanol in Serum (0,5 + 4,5 ml) und 2,5 ml 25%iges Iodixanol in NaCl-Hepes-Puffer (1,75 + 1,25 ml) unterschichtet. Der Ultrazentrifugationslauf wurde in einer Sorvall Ultra Pro 80 präparativen Ultrazentrifuge (Kendro Laboratory Products, Berlin) mit einem Festwinkelrotor (Step Saver 65V13, Sorvall) bei 350.000 x *g*, einer Kammertemperatur von 4°C und einer Laufzeit von 2 h 30 min durchgeführt. Nach dem Zentrifugationslauf wurden mittels einem Grade-Unloader Fraktionen zu je ein ml gesammelt und dessen Dichte mittels einem Pyknometer geprüft. Anhand der Dichte wurden die einzelnen Lipoproteinfraktionen VLDL ( $d < 1,006$  g/ml), LDL ( $d < 1,19$  g/ml) und HDL ( $d < 1,21$  g/ml) gepoolt, aliquotiert, mit Stickstoff begast und für die Analytik bei -80 °C eingefroren.

### **3.4 Retinol- und Retinylesterbestimmung**

Die qualitative und quantitative Bestimmung von Vitamin A im Blutplasma und im Harn erfolgt nach organischer Extraktion durch Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (HPLC). Die Peakdetektion wurde anhand der Retentionszeit im Vergleich zu externen Standards durchgeführt. Um den Einfluss verschiedener Harnvolumina auszuschließen, wurde der Vitamin-A-Gehalt im Harn auf die jeweilige Kreatininkonzentration im Harn korrigiert.

#### **3.4.1 Extraktionsverfahren**

Die organische Extraktion der Lipidanteile der Proben ist Voraussetzung für die Vitamin-A-Bestimmung mittels HPLC. Bei der Analyse des Serums wurden 100 µl Probe, bei den Chylomikronen und beim Chylomikronenunterstand je 200 µl Probe sowie beim Urin 600 µl Probe zur Ausfällung der Proteine mit der jeweils gleichen Menge Ethanol versetzt. Nach kurzem Schütteln erfolgte die Zugabe von 500, 1000 bzw. 3000 µl n-Hexan, das jeweils 0,05% Butylhydroxytoluol (BHT) als Antioxidationsmittel enthielt. Die so vorbereiteten Proben blieben dann jeweils fünf Minuten im Schüttler und wurden anschließend für 10 Minuten bei 3800 U/min zentrifugiert. Mit der Pasteur-Pipette wurde dann die obere organische Phase abpipettiert und in ein zweites Röhrchen überführt. Nach einer nochmaligen Extraktion der restlichen wässrigen Phase mit jeweils wieder der gleichen Menge n-Hexan wurden die gewonnenen Extrakte vereint, unter Stickstoff im Wasserbad (ca. 35-40 °C) eingedunstet und der so getrocknete Extrakt in 200 µl Isopropanol aufgenommen. Nach 30 sekundigen Schütteln kamen die Proben für fünf Minuten ins Ultraschallbad, wurden dann nochmals für eine Minute geschüttelt und in die Injektionsgefäße umgefüllt.

### **3.4.2 HPLC-Analyse**

Mittels eines automatischen Probengebers (Autosampler 465; Biotek-Instruments) wurden 150 µl Probenextrakt injiziert. Die Trennung erfolgte durch eine Ultra Sphere-ODS-Säule (45x5 µm; Fa. Beckman, USA). Als Eluent diente ein Gemisch aus 70% Acetonitril, 20% Dichlormethan und 10% Methanol. Die Flussrate betrug 1 ml/min (Pumpen: HPLC pump 420; Biotek Instruments); die Laufzeit sieben Minuten. Die Detektion erfolgte simultan mit einem UV-Visdetektor (Spectroflow 783 Programmable Absorbance Detector, ABI-Analytical Kratos Division) bei einer Wellenlänge von 325 nm. Die Steuerung der Anlage und Auswertung der Chromatogramme wurde mit der gerätespezifischen Software HPLC-Controller 457 Version 1.6 (Kratos Instruments) durchgeführt.

Die Standards Retinol, Retinylpalmitat sowie Retinylstearat stammten von der Fa. Sigma, Deisenhofen. Acetonitril, Methanol, Dichlormethan und Isopropanol, Ethanol und n-Hexan hatten HPLC-Qualität und wurden von der Fa. Roth, Karlsruhe bezogen.

## **3.5 Untersuchungen zum Retinol-Bindungsprotein (RBP) und Tamm-Horsfall-Protein (THP)**

### **3.5.1 Natrium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Gelelektrophoresen wurden in einer Vertikalkammer (Mini-Protean™II; Bio-Rad, München) mit 0,5 mm dicken Gelen durchgeführt. Die Trennung der Proteine unter denaturierten Bedingungen erfolgte in 12%igen SDS-Polyacrylamidgelen (PAG) mit 3%igen Sammelgelen nach Laemmli (Laemmli 1970). Die Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer (125 mM Tris; 20% Glycerol, 2% SDS, 2% 2-Mercaptoethanol; pH 6,8) verdünnt und fünf Minuten bei 95°C im Wasserbad behandelt. Je Geltasche wurden 15 µg Protein aufgetragen. Ein kommerzieller Molekulargewichtsstandard (Silver Stain Standard; Bio-Rad) wurde mit aufgetragen. Die SDS-PAGE wurde konstant mit einer Stromstärke von 30 mA unter Kühlung durchgeführt. Die Dauer der Trennung betrug ca. eine Stunde. Zur Färbung der Proteinbanden wurde die Coomassie-Färbung (Plasma) oder die Silbernitratfärbung (Harn) angewandt.

### **3.5.2 Immunologischer Nachweis von Retinol-Bindungsprotein im Western-Blot**

Zum immunologischen Nachweis von RBP im Serum und Harn wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF, Immobilon; Millipore Corp., Bedford, USA) gebロットet. Der Transfer der Proteine (Transferpuffer: 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,038% SDS, 20% Methanol) erfolgte durch ein Tankblot-Verfahren (Mini Trans-Blot™; Bio-Rad) bei konstanter Stromstärke von 0,8 mA/cm<sup>2</sup>. Die Blotzeit betrug 60 Minuten. Nach

dem Proteintransfer wurde die Blotmembran kurz in TBS-Tween-Puffer (50 mM Tris; 150 mM NaCl; 0,1% Tween 20; pH 7,5) gewaschen und unspezifische Bindungsstellen eine Stunde bei Raumtemperatur in TBST-Puffer mit 5% (w/v) Magermilchpulver (Glücksklee, Nestle AG, Frankfurt/M.) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Inkubierung mit einem peroxidasekonjugierten Antiserum gegen humanes Serum-RBP vom Kaninchen (Code Nr. A 301, Dako Diagnostika, Hamburg). Das Antiserum wurde 1:300 in TBST-Puffer (1% Magermilchpulver; 0,05% Tween 29, w/v) verdünnt. Als Positivkontrolle diente humanes Blutserum. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Danach wurde die Membran viermal in TBST-Puffer (0,3% Tween 20) gewaschen. Zur RBP-Detektion diente die Luminolreaktion (Chemiluminescence Detektion Kit, Boeringer Mannheim, Mannheim). Die Membran wurde zwei Minuten mit dem Luminolreagenz inkubiert. Die Lösung wurde anschließend mit Filterpapier (3MM-Papier; Whatman Laboratory Division, Maldstone, GB) entfernt und mit der Proteinseite nach oben in Fluor-S™ Multimager (Bio-Rad) gelegt. Die Aufnahme der Chemilumineszenz erfolgte mit Hilfe der gerätespezifischen Software Multi-Analyst™/PC, Version 1.1 (Bio-Rad).

### **3.5.3 Quantitative Bestimmung von RBP und THP im Serum und im Urin mittels Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay (ELISA)**

#### **3.5.3.1 RBP-ELISA**

Polystyren-Microtiterplatten (Greiner, Frickhausen, Deutschland) wurden für zwei Stunden bei 37°C mit kreuzreagierendem anti-humanen RBP IgG vom Kaninchen (Dako; 50 µl/Well mit 1,2 µg/ml Puffer überzogen, 50 mM Carbonat-Puffer, pH 9,6) inkubiert. Danach erfolgte eine viermalige Waschung der Wells mit 200 µl Spülpuffer (10 mM Phosphat-Puffer mit 150 mM NaCl und 0,05% Tween 20). Nach der Beschichtung mit RBP-Standardlösung (N Protein-Standard/ Standard SL OQIM 13, Dade Behring, Deutschland), verdünntem Plasma (1:5000) beziehungsweise Urinproben (1:50; 50 µl/Well) wurden die aufgetragenen Proben für Stunden bei 37°C inkubiert. Nach vier weiteren Waschungen werden die Platten mit peroxidasekonjugiertem anti-RBP IgG (Dako; 1:2000 verdünnt in PBS-Tween, 50 µl/Well) beschichtet und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach vier weiteren Waschungen entwickelte sich durch Zugabe von o-Phenylenediamine-Dihydrochlorid (OPD, Sigma, Deisenhofen, Deutschland, 100 µl/Well mM Lösung von 50 mM Disodium-Phosphat mit 25 mM Citronensäure-Puffer, pH 5,2 mit 0,012% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nach 30 Minuten bei Raumtemperatur eine Farbveränderung. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von einem Mol H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (50µl/Well) gestoppt. Die Ablesung der Absorption erfolgte bei 490 nm mit einem Plattenphotometer (Microplate Reader, Bio-Rad, Modell 550). Es wurden Doppelanalysen durchgeführt. Die Standardkurve wurde bei jeder Platte ermittelt und zur Berechnung der RBP-Konzentration der Proben genutzt. Zur Validierung der ELISA-Methode für die Bestimmung von RBP wurde

eine Nachweisgrenze von 2,2 µg/l ermittelt, definiert als die minimale Konzentration an RBP, deren Absorption mindestens um drei Standardabweichungen über den mittleren Leerwert liegt. Die Wiederfindung einer definierten Menge an RBP lag bei  $92 \pm 15\%$ . Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Versuches lag bei einem Variationskoeffizienten von 2,9% und zwischen den Versuchen von 4,2%.

### **3.5.3.2 THP-ELISA**

Nach dem Vorwaschen der Platten mit PBS wurden diese dann kräftig ausklopf. Die Beschichtung der Platte erfolgte mit der Ausgangskonzentration des Schaf anti-human THP-Antikörper 1:500, 1:1000, 1:2000 mit 50 µl/Well). Die beschichtete Platte wurde zugedeckt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Dem Zusetzen von PBS mit 1% BSA als Blockpuffer (frisch angesetzt, 200 µl/Well) folgte eine zweistündige Inkubation bei 37°C. Nach dreimaliger Waschung mit PBS wurden Standard (gereinigtes THP; Chemicon) und Proben aufgetragen (50 µl/Well). Dazu wurden die Harnproben 1:50 mit PBS-Puffer verdünnt. Nach einer viermaligen Waschung mit PBS/Tween die erfolgt die Detektion des AK. Dazu wurden die Platten mit biotinylierten Schaf-anti-human THP (1: 2000 verdünnt) beschichtet und eine Stunde bei 37°C unter Bewegung inkubiert. Nach einer weiteren dreimaligen Waschung mit PBS erfolgte die Zugabe von 50 µl Streptavidin-POD (1:5000 in PBS+ BSA+ 50µl Tween/10ml) und die Proben wurden eine weitere Stunde bei 37 °C unter Bewegung inkubiert. Nach fünf weiteren Waschungen entwickelte sich durch Zugabe von 100 µl/Well POD eine Farbveränderung (eine Tablette wurde in 10 ml Citrat-Puffer pH 5,2 aufgelöst und vier µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden hinzugefügt). Nach 20-minütiger Inkubation im Dunkeln wurde durch Hinzufügen von 50 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/ Well die Reaktion gestoppt. Es folgte eine zweistündige inkubation im Dunkeln. Danach konnte die Absorption mit einem Plattenphotometer bei 490 nm (Bio-Rad, Microplate-Reader, Modell 550) abgelesen werden. Es wurden Doppelanalysen durchgeführt. Die Standardkurve wurde bei jeder Platte ermittelt und zur Berechnung der THP-Konzentration der Proben genutzt (Vgl. Abb. 3.2). Die Validierung der ELISA-Methode für THP ergab eine Bestimmungsgrenze von 3,5 µg/l; eine Wiederfindungsrate von  $103 \pm 5\%$  im Harn und eine Reproduzierbarkeit innerhalb eines Versuches mit einem Variationskoeffizienten von 4,8% und zwischen den Versuchen von 7,1%.

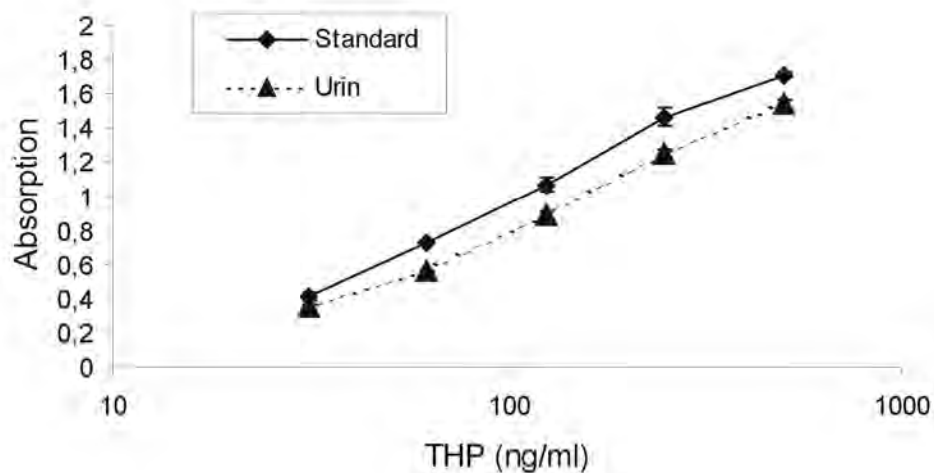


Abb. 3.2: Validierung des THP-Assays. Die Abbildung zeigt die konzentrationsabhängige Parallelität zwischen humanen THP-Standard und Urin gesunder Hunde.

### 3.6 Bestimmung der Konzentration von Triglyceriden, Cholesterol und Protein im Serum und in den Lipoproteinfraktionen

Die Bestimmung der Konzentration von Triglyceriden, Cholesterol und Protein im Serum und in den Lipoproteinfraktionen erfolgte mit Hilfe enzymatischer Testverfahren. Hierzu wurden kommerzielle Testkits der Firma Sigma, Deisenhofen, Deutschland genutzt. Die Prüfung der Richtigkeit der Analysen erfolgte mittels genormter Kontrollseren (Accutrol™ Chemistry Controls, normal, Accumark™ Controls). Zur Messung wurde jeweils das Plattenphotometer von Bio-Rad (Microplate-Reader, Bio-Rad, Software: Microplate Manager, Version 4.0, Bio-Rad) verwendet.

#### 3.6.1 Triglyceridbestimmung

Nach Herstellung einer Standardreihe (Verdünnungsreihe Glycerol-Standard, 250mg/ 100ml) wurden fünf µl Probe oder Standard mit 200 µl Reagenz beschichtet. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 570 nm im Plattenphotometer. Bei dieser Reaktion fand eine enzymatische Spaltung (Lipase) der Triglyceride statt. Das aus der Reaktion entstandene Glycerin wurde dann bei einer Wellenlänge von 570 nm bestimmt.

### 3.6.2 Cholesterolbestimmung

Nach Herstellung einer Standardreihe (geometrische Verdünnungsreihe Kalibrator, 250 mg/100 ml) wurden fünf µl Probe oder Standard mit 200 µl Reagenz beschichtet. Nach einer Inkubation für 15 Minuten bei Raumtemperatur erfolgte die Messung bei 500 nm im Plattenphotometer. Bei dieser Reaktion wurde zunächst Cholesterinsäureester durch spezifische Esterase in freies Cholesterin und Fettsäuren überführt. Unter Anwesenheit einer Cholesterinoxidase entstand 4-Cholesteron und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Wasserstoffperoxid wird in Anwesenheit einer Peroxidase an das Chromogen 4-Aminoantipyrin und p-Hydroxybenzolsulfonsäure gekoppelt. Der entstehende Chinonimin-Farbstoff hat ein Absorptionsmaximum bei 500 nm.

### 3.6.3. Proteinbestimmung im Plasma

Die Gesamtproteinkonzentration im Blutplasma wurde mittels BCA (Bicinchoninsäure 2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure) nach der von Smith *et al.* beschriebenen Methode durchgeführt (Smith *et al.* 1985). Für die Durchführung der Methode ist die Herstellung von zwei Reagenzien (A und B) notwendig, die bei Raumtemperatur unbegrenzt haltbar sind.

A: 1% (w/v) BCA (Bicinchoninsäure 2,2'-Bichinoly-4,4'-dicarbonsäure), Na<sub>2</sub>-Salz  
2% (w/v) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> x H<sub>2</sub>O  
0,16% (w/v) Na<sub>2</sub>Tartrat  
0,4% (w/v) NaOH  
0,95% (w/v) NaHCO<sub>3</sub>

B: 4% CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O

Die Herstellung der Arbeitsreagenz erfolgte durch Mischung von 100 Vol. A mit 2 Vol. B. Für die Herstellung der Albuminstammlösung wurden 100mg BSA (bovine serum albumin, Fraction V; Serva, Heidelberg) zu 10 ml Aqua dest. zugegeben. Nach Herstellung einer Standardreihe (geometrische Verdünnungsreihe) wurden 20 µl Probe oder Standard mit 300 µl Reagenz beschichtet. Nach einer Inkubation bei 37 °C für 30 Minuten im Brutschrank erfolgte die Messung bei 570 nm im Plattenphotometer nach 5-minütiger Abkühlung der Platten auf Zimmertemperatur.

## 3.7 Bestimmung von Protein und Kreatinin im Urin

### 3.7.1 Proteinbestimmung im Urin nach Bradford

Das Prinzip dieser Proteinbestimmungsmethode beruht auf der Bindung von Proteinen an den Farbstoff Coomassie-Brilliantblau G-250. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des



Farbstoffes von 465 nm (ohne gebundenes Protein) auf 595 nm (mit gebundenem Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist damit ein Maß für den Proteingehalt einer Lösung. Zunächst erfolgte die Herstellung der Bradford-Reagenz. Dazu wurden 100mg Coomassie-Brilliantblau G-250 unter Rühren in 50 ml 96%igen Ethanol gelöst. Nach der Zugabe von 100 ml 85%iger  $H_3PO_4$  erfolgte die Auffüllung mit Aqua dest. auf 1000 ml. Nachdem am nächsten Tag die Reagenz filtriert wurde, konnte eine Eichreihe von 0 bis 50  $\mu g$  Protein (BSA, Fraction V; Serva, Heidelberg) hergestellt werden. 100  $\mu l$  Probe wurden mit 900  $\mu l$  Bradford-Reagenz versetzt und die Platte mit je 300  $\mu l$  im Doppelansatz beschichtet. Nach 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei 570 nm im Plattenphotometer gemessen.

### **3.7.2 Kreatininbestimmung im Urin mittels Jaffe-Reaktion**

Kreatinin bildet mit Pikrinsäure im alkalischen Milieu einen rot-orangen Farbkomplex. Die Menge des entstandenen Farbstoffs ist ein Maß für den Kreatiningehalt der untersuchten Probe und kann photometrisch ermittelt werden. Die Kreatinin-Bestimmung erfolgte mit einem modifizierten Kreatinin-Kit (Sigma Creatinine Kit 555-A). Es wurden 100  $\mu l$  Kreatinin-Standardlösung bzw. 100  $\mu l$  Harnprobe (1:20 verdünnt in Aqua dest.) bzw. 100  $\mu l$  Aqua dest. (Leerwert) in Küvetten (1,5 ml Halbmikroküvetten) pipettiert. Anschließend wurde in jede Küvette 1000  $\mu l$  alkalische Pikratlösung zugesetzt, sogleich gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. In einem Zweistrahlphotometer (Uvikon, Kontron) wurde die Absorption von Standard und Proben jeweils gegen den Leerwert bei einer Wellenlänge von 500 nm gemessen. Nachfolgend wurden 33  $\mu l$  Säure-Reagenz je Küvette zugegeben, sofort gründlich gemischt und nochmals fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei sich der Farbkomplex auflöste. Durch eine weitere Messung der Absorption von Standard und Proben gegen den Leerwert bei 500 nm Wellenlänge wurden störende Chromogene ermittelt. Die unbekanntes Kreatinin-Konzentrationen wurden ausgehend vom Absorptionswert der Kreatinin-Standardlösung (3 mg/dl) berechnet.

### **3.8 Statistische Auswertung**

Die dargestellten Daten sind entweder Einzelwerte oder die jeweiligen Mittelwerte aller acht Hunde mit den dazugehörigen Standardabweichungen. Korrelationen zwischen den untersuchten Variablen wurden mit dem Spearman-Rank-Koeffiziententest ermittelt. Unterschiede im Zeitverlauf einzelner Variablen wurden mit Hilfe des Allgemeinen linearen Modells für Messwiederholungen angewandt. Unterschiede zwischen den einzelnen Probenzeitpunkten wurden durch wiederholten Test der Innersubjektkontraste festgestellt. Als statistisch signifikant gelten Ergebnisse, die einen *P*-Wert von mindestens  $<0,05$  aufweisen. Dabei wird mit mindestens 95%iger Wahrscheinlichkeit von einem nicht zufällig entstandenem

Unterschied ausgegangen. Zur Auswertung der Daten wurde das Programm SPSS Version 10.0 verwendet. Weiterhin erfolgte für jede Variable im Blutplasma die Bestimmung der Fläche unter der Kurve (AUC) sowie die maximalen Zeit- und Konzentrationsanstiege (Matthews *et al.* 1990). Hierfür wurde das PC-Programm Excel 2000 verwendet.