

## 5 Diskussion

### 5.1 Effekt einer einmaligen oralen Vitamin-A-Dosierung auf die Vitamin-A-Konzentration im Blutplasma

Vitamin A ist physiologischerweise im Blutplasma von Hunden in Form von Retinol und von Retinylestern nachweisbar. Die Vitamin-A-Gesamtkonzentration vor der oralen Vitamin-A-Gabe beträgt in dieser Studie durchschnittlich  $6,47 \pm 1,94 \mu\text{g/ml}$ . Damit liegen diese Werte ungefähr 3-fach über denen, die bei vorhergehenden Untersuchungen beschrieben wurden (Schweigert 1988, Schweigert *et al.* 1990, Raila 2000). Bedingt durch die Besonderheit von Spezies der Ordnung *Carnivora*, Vitamin A vor allem in Form von Retinylestern zu transportieren, sind die Werte auch um ein Vielfaches höher als beim Menschen oder anderen Säugetieren (Goodman 1984a, Schweigert und Zucker 1991). Im Gegensatz zu den Retinylestern liegt die Konzentration an Retinol im Blutplasma von Carnivoren auf vergleichbarem Niveau anderer Säugetiere (Eckhoff *et al.* 1991, Vaisman *et al.* 1992, Schweigert und Thomann 1993). Auch die Übereinstimmung mit bisher ermittelten Werten für Retinol beim Hund ist gegeben (Schweigert 1988, Schweigert und Zucker 1991, Raila 2000).

Der Anteil an Retinylestern am Gesamt-Vitamin-A-Gehalt im Blut der Hunde in dieser Studie entspricht mit ca. 86% den Ergebnissen vorangegangener Untersuchungen, wo für Hunde und andere Caniden etwa 65-99% ermittelt wurden (Schweigert 1988, Thomann 1989, Schweigert *et al.* 1990, Schweigert und Bok 1998). Die Retinylester werden ausschließlich Lipoprotein-gebunden transportiert (Wilson *et al.* 1987, Schweigert 1988). Beim Menschen und bei der Ratte kommt es bei diesem hohen Anteil von an Lipoprotein-gebundenen-Vitamin-A-Estern zu Symptomen einer Vitamin-A-Intoxikation (Mallia *et al.* 1975, Smith und Goodman 1976). Im nüchternen Zustand sind Retinylester beim gesunden Menschen kaum nachweisbar ( $< 0,1 \mu\text{mol/l}$ ). Die Werte für Retinylester steigen postprandial nur in Folge der Vitamin-A-Absorption im Darm (Reinersdorff *et al.* 1996).

Im Nüchternblut tritt als dominierende Retinylesterfraktion Retinylstearat mit ca. 56% in Erscheinung. Damit sind die Werte zwei bis drei mal höher als für Retinylpalmitat. In der Literatur liegen diesbezüglich unterschiedliche Angaben vor. Die Werte reihen sich aber in die Mehrzahl der Veröffentlichungen ein. Während in den Untersuchungen von Schweigert (1988), Schweigert *et al.* (1990), Schweigert und Thomann (1993) Schweigert und Bok (1998) das Retinylstearat überwiegt, konnten Wilson *et al.* (1987) Retinylpalmitat als überwiegende Lipoprotein-Fraktion ermitteln. Bei den Untersuchungen von Raila *et al.* (2000) waren dagegen Retinylpalmitat und Retinylstearat zu etwa gleichen Teilen nachweisbar.

Die hohen Gesamt-Vitamin-A-Konzentrationen im Nüchternblut der hier untersuchten Tiere könnten im Zusammenhang mit dem hohen Vitamin-A-Gehalt der kommerziellen Diät von

15.000 IE/ kg Futter stehen. Der Vitamin-A-Gehalt in der Nahrung ist beispielsweise dreimal höher als bei Schweigert (1988), Schweigert *et al.* (1990) oder Schweigert und Bok (2000). Auch die unterschiedliche Futtermenge, die Art der Rationszusammensetzung, vor allem in Bezug auf den Proteingehalt sowie die Tatsache, dass es sich jeweils um verschiedene Rassen und Tiere mit unterschiedlichen Körpermassen handelt, haben wahrscheinlich Einfluss auf die Vitamin-A-Konzentration im Blut. Diese Annahme kann durch eine Langzeit-Fütterungsstudie von Schweigert und Bok (2000) unterstützt werden, bei der im Gegensatz zu Retinol die Retinylester-Konzentrationen mit zunehmenden bzw. abnehmenden Vitamin-A-Gehalt im Futter steigen bzw. fallen.

Nach der Gabe von 3000 IE RE/kg KG in Form von Retinylpalmitat zusammen mit fünf ml Sahne (30% Fett), erreichte die Retinylester-Gesamtkonzentration etwa nach acht Stunden ein Maximum und fiel innerhalb von 72 Stunden wieder auf den Ausgangswert zurück. Wilson *et al.* (1987) ermittelten in einer Studie mit einer Vitamin-A-Gabe von 100.000 IE zusammen mit 470 ml Sahne ein Maximum der Retinylester-Konzentration nach 24 Stunden. Die Applikation von Sahne erfolgte, da verschiedene Studien zeigten, dass für die Absorption von Retinol und  $\beta$ -Carotin im Darm eine gleichzeitige Fettaufnahme nötig ist und eine erhöhte Fettaufnahme die Absorption von lipophilen Nahrungsbestandteilen wesentlich erhöht (Roodenburg 2000).

Retinylstearat bleibt zwar während des gesamten Untersuchungszeitraumes die dominierende Fraktion der Retinylester, jedoch fiel Retinylstearat prozentual gegenüber Retinylpalmitat nach der Vitamin-A-Gabe ab und stieg erst nach acht Stunden an. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Studie von Watson überein, bei der durch orale Gabe von Retinylpalmitat der Chylomikronenstoffwechsel bei Hunden untersucht wurde (Watson *et al.* 1995). Im Darm resorbiertes Vitamin A scheint danach im Blutplasma von Hunden, wie beim Menschen, vorwiegend als Retinylpalmitat transportiert zu werden (Krasinski *et al.* 1989). Bei Gabe einer fetthaltigen Diät mit 100.000 IE Retinylestern bei 20-30jährigen gesunden Männern hatte die Retinylpalmitat-Konzentration nach drei bis vier Stunden einen Maximalwert im Blut. Bereits nach 24 bis 48 Stunden wurden bei diesen Probanden wieder Ausgangswerte gemessen. Dabei trat zeitlich gesehen (Diätaufnahme um 7.00 Uhr bzw. 22.00 Uhr) kein signifikanten Unterschied auf (Reinersdorff *et al.* 1996, Hadjadj *et al.* 1999). Die maximale Retinylester-Konzentration tritt beim Menschen wesentlich früher auf als beim Hund, wo Maximalwerte für Retinylester im Blutplasma erst nach acht Stunden erreicht werden. Die Kinetik der Vitamin-A-Resorption scheint daher bei Menschen und Hunden unterschiedlich zu sein.

Im Gegensatz zum Hund ist beim Menschen immer Retinylpalmitat mit ca. 70% die dominierende Vitamin-A-Ester-Fraktion (Reinersdorff *et al.* 1996). Die Werte für Retinylstearat liegen bei ca. 25%. Die restlichen 5-6% entfielen auf Retinyloleat. Die Unterschiede zwischen Mensch und Hund unterstützen die Hypothese einer fettunabhängigen Retinol-Veresterung (Huang und Goodman 1965, Goodman 1966). Diese Hypothese besagt, dass obwohl Retinylpalmitat oral aufgenommen wird die in der Darmmukosa neu synthetisierten Retinylester (Palmitat, Stearat, Oleat, Linoleat) in einem festem Verhältnis von 8:4:2:1 gebildet werden. Dieses Verhältnis spiegelt jedoch nicht die Fettsäurezusammensetzung der aufgenommenen Nahrung wider. Retinylpalmitat/-oleat ist auch beim Affen die dominierende Retinylester-Fraktion im Blutplasma, unabhängig davon in welcher Form und Lösung das Vitamin A gegeben wurde (Collins *et al.* 1992).

In einem Modell, das für Untersuchungen an Ratten aufgestellt wurde, wird angenommen, dass der Langzeitspeicher für Vitamin A in den Stellatumzellen langsam reagiert, während in den Hepatocyten ein geringere und schnell verfügbare Vitamin-A-Speicher vorliegen (Blomhoff 1987). Mit der Nahrung aufgenommenes Vitamin A wird als Retinylester in den Hepatocytenpool aufgenommen und nach Bedarf als RBP-Retinol ins Blutplasma abgegeben (Blaner 1989). Wird kein Vitamin A mit der Nahrung aufgenommen, wird zuerst für die weitere Ausschleusung von Vitamin A aus der Leber auf den Hepatocytenpool zurückgegriffen, bevor bei weiterem Mangel der Stellatumzellenspeicher genutzt wird (Green *et al.* 1985, Green *et al.* 1993). Die Aufnahme der Retinylester durch die Leber würde eine zunehmende Umsatzrate zu Retinol im Hepatocyten-Pool zur Folge haben. Es kommt dann zu vermehrten Auftreten von RBP-Retinol-Komplexen im Plasma (Reinersdorff *et al.* 1996). Dies könnte auch in der aktuellen Untersuchung den Retinolanstieg bei den Hunden begründen. In der vorliegenden Studie steigt die Plasmaretinol-Konzentration wesentlich geringer als die der Retinylester. Ein Konzentrationsmaximum ist nach etwa sechs Stunden erreicht. Dagegen sprechen jedoch die erniedrigten RBP-Konzentrationen in der postprandialen Phase. Da es postprandial nur im UZ-Rückstand zu einem Retinol-Anstieg und in den Lipoproteinfraktionen zu einem Retinol-Abfall kommt (was diese als Transportmittel ausschließt), bleibt der genaue Mechanismus der postprandialen Retinol-Ausschleusung weiterhin unklar.

## **5.2 Vitamin-A-Gehalt in den Chylomikronen**

Beim Menschen wird oral aufgenommenes Vitamin A in Form von Retinylestern zusammen mit Triglyceriden und anderen fettlöslichen Nahrungskomponenten in intestinale Chylomikronen eingebaut (Le *et al.* 1997, Harisson und Hussain 2001). In der vorliegenden Studie fällt die Retinylester-Konzentration in den Chylomikronen von der ersten Stunde nach Vitamin-A-Gabe stetig bis zur achten Stunde ab. Die maximale Retinylester-Konzentration in

den Chylomikronen liegt entweder vor der ersten Messung nach Vitamin-A-Applikation oder entspricht dieser. Die Verhältnisse der einzelnen Retinylester zueinander unterliegen keiner signifikanten Veränderung. Es fällt jedoch auf, dass der prozentuale Anteil von Retinylpalmitat und Retinylstearat an der Gesamretinylester-Konzentration ungefähr gleich groß ist. Damit verlaufen die ermittelten Werte nicht parallel zum Anstieg der Retinylester- und Triglycerid-Konzentrationen im Blutplasma. Die Maximalkonzentrationen der Retinylester werden im Serum nach acht Stunden bzw. zwischen acht und 24 Stunden erreicht, während die Retinylester im Chylomikronenunterstand bis acht Stunden nach Vitamin-A-Gabe kontinuierlich ansteigen. Die Verhältnisse zwischen Serum und Chylomikronen bzw. Chylomikronenunterstand verlaufen bei allen drei Retinylestern nahezu parallel. Das Verhältnis der Retinylester im Serum zu denen in den Chylomikronen steigt nach acht Stunden auf das acht- bis zehnfache der Messung nach einer Stunde.

Im Gegensatz zu der Retinylester-Konzentration in den Chylomikronen steigt diese im Chylomikronenunterstand deutlich an. Der prozentuale Anteil der einzelnen Retinylester bleibt dabei konstant. Damit scheint der Anstieg der Retinylester-Konzentration im Serum an die Zunahme der Retinylester im Chylomikronenunterstand gebunden zu sein. Ob die Maxima der Retinylester in Serum und Chylomikronenunterstand identisch sind lässt sich abschließend nicht sagen, denn dazu wären noch weitere Probenentnahmen notwendig gewesen, denen jedoch, wegen der häufigen Blutabnahmen, Tierschutzaspekte entgegenstanden. Die Frage, ob es bei Hunden neben dem Chylomikronentransport noch einen anderen Vitamin-A-Transport vom Darm zur Leber gibt, bleibt daher offen. Ein mögliches Transportvehikel könnte sich im Chylomikronenunterstand befinden. Im Gegensatz zu den hier dargestellten Untersuchungen am Hund wird das Maximum der Retinylpalmitat-Konzentration in den Chylomikronen von Menschen synchron zum Maximum im Blut erreicht (Hadjadj *et al.* 1999).

### **5.3 Vitamin-A-Gehalt in den Lipoproteinfraktionen**

Retinylester werden im Blutplasma von Hunden in allen drei Lipoprotein-Fraktionen (VLDL, LDL und HDL) kontinuierlich über verschiedene Studien hinweg nachgewiesen (Wilson *et al.* 1987, Schweigert 1988). So kann davon ausgegangen werden, dass die Mehrheit der Retinylester im Blut von Hunden aus der Leber und nicht aus dem Darm freigesetzt wird, wobei die Retinylester in den Chylomikronen in der Leber verstoffwechselt und anschließend an VLDL und LDL gebunden in das Blut abgegeben werden (Melchior *et al.* 1981, Wilson *et al.* 1987). In einer Studie an gesunden Menschen wurde nachgewiesen, dass es postprandial während des Anstiegs der Retinylester in den Chylomikronen zu deren Aufnahme in die Leber kommt. In einer zweiten, langsamer verlaufenden Phase liegen die Retinylester zusammen mit VLDL (meist aus der Leber stammend) vor (Berr 1992). Physiologische Veränderungen in

der Konzentration und prozentualen Zusammensetzung der Serumlipoproteine sind durch die sich verändernden Bedingungen der Lipidabsorption, Lipidsynthese und des Lipidkatabolismus bedingt. Unter konstanten Fütterungsbedingungen können diese Veränderungen jedoch minimiert werden (Ishihara K. 1976).

In den aktuellen Untersuchungen überwiegt in allen drei Lipoprotein-Fractionen Retinylstearat, gefolgt von Retinylpalmitat und Retinyloleat (Vgl. Tab. 5.1). Die prozentualen Anteile der Retinylester am Gesamtinylester verteilen sich während des gesamten Versuchsablauf mit ca. 55-65% für Retinylstearat, ca. 25-30% für Retinylpalmitat und ca. 10% für Retinyloleat relativ gleich.

Tab. 5.1: Prozentuale Aufteilung der Gesamtinylester im Blutplasma und in den Lipoproteinfraktionen beim Hund vor der Vitamin-A-Gabe (Mittelwerte).

	<b>Blutplasma</b>	<b>VLDL</b>	<b>LDL</b>	<b>HDL</b>
<b>Retinyloleat</b>	8	11	13	8
<b>Retinylpalmitat</b>	26	31	27	29
<b>Retinylstearat</b>	66	58	60	63

In einer früheren Untersuchung wurde festgestellt, dass die Retinylester im Plasma von 18 Stunden fastenden Hunden hauptsächlich zusammen mit LDL und kaum mit VLDL und HDL, vorliegen. Im Gegensatz dazu sind im Nüchternblut von Menschen, Ratten und Kaninchen geringe (max. 5% der Gesamt-Vitamin-A-Konzentration) oder keine Retinylester vorhanden (Smith und Goodman 1976). Nach Zufütterung von Vitamin A zusammen mit fettreichem Futter erschienen die Retinylester vorwiegend mit der LDL-Fraktion, gefolgt von VLDL- und HDL-Fraktion (Wilson *et al.* 1987).

Auch in den eigenen Untersuchungen wurden die Retinylester besonders in der LDL-Fraktion gemessen, gefolgt von VLDL und in noch geringerem Maße von HDL. In der LDL- und in der HDL-Fraktion wird das Retinylestermaximum acht Stunden nach Vitamin-A-Gabe erreicht. Für die VLDL-Fraktion gilt dies erst nach 24 Stunden. In der Studie von Wilson et al. (1987) wurden die Maxima nicht vor 24-48 Stunden erreicht. Am letzten Messpunkt nach 96 Stunden sind die Ausgangswerte noch nicht wieder erreicht. Bemerkenswert ist, dass nicht unerhebliche Konzentrationen an Retinol in den Lipoprotein-Fraktionen nachweisbar sind. Hieraus lässt sich aus der aktuellen Studie erstmals ableiten, dass Retinol im Blutplasma von Hunden nicht ausschließlich durch das Retinol-Bindungsprotein (RBP) transportiert wird.

#### **5.4 Gehalt des Retinol-Bindungsproteins im Blutplasma**

RBP konnte bei allen Hunden im Blutplasma durch eine Western-Blot-Analyse bei 21 kDa nachgewiesen werden, während es im Harn nicht nachweisbar war. Dieses Ergebnis stimmt mit der Studie von Raila überein (Raila 2000). Es ist eine weitere Bestätigung, dass im Blutplasma der spezifische Vitamin-A-Transport durch das RBP und der unspezifische Lipoprotein-gebundene Vitamin-A-Transport nebeneinander bestehen (Raila und Schweigert 2001b). Die nachweisbaren RBP-Konzentrationen liegen etwa zehnfach niedriger als die von erwachsenen Menschen (Goodman 1984b). Damit stehen die Ergebnisse im Gegensatz zu einer Untersuchung von Burri (1993), bei der höhere RBP-Konzentrationen beim Hund gemessen wurden. Hierbei wurde allerdings kein spezifischer RBP-Antikörper eingesetzt, stattdessen wurden zur Berechnung Absorptionsflächen nach der Trennung der Vitamin-A-Transportproteine nach Gelfiltration verwendet. Diese Diskrepanz konnte bisher nicht geklärt werden, da man bei dem verwendeten Antikörper von übereinstimmender Kreuzreaktivität ausgehen kann (Dako, persönliche Mitteilung). In Folgeuntersuchungen sind die ELISA-Ergebnisse aber bestätigt worden (Raila *et al.* 2003a).

Im Gegensatz zu den Erwartungen, die sich aus dem Anstieg der Retinol-Konzentration im Plasma ergaben, sank die Plasma-RBP-Konzentration nach der Vitamin-A-Applikation. Obwohl Retinol durch das RBP-TTR-System transportiert wird, verläuft die RBP-Konzentration keineswegs synchron mit den Retinolwerten im Blutplasma. Erst nach sechs Stunden begann ein Anstieg der RBP-Konzentration, der nach 24 Stunden über den Ausgangswerten lag. Es stellt sich daher die Frage, ob möglicherweise Retinol auch durch Lipoproteine transportiert werden kann, da ein Anstieg von RBP in den ersten vier Stunden in der VLDL-Fraktion nachweisbar ist. Allerdings kommt es während dieses Zeitraums auch zu einem Anstieg im UZ-Rückstand. Eine alternative Erklärung wäre, dass nach der oralen Vitamin-A-Applikation genügend Vitamin A in Form von Retinol und Retinylestern im Blutplasma zirkuliert und über einen unbekanntem Feedback-Mechanismus die

Ausschleusung von RBP aus den Hepatocyten vermindert wird. Möglich sind auch Feedback-Mechanismen über die Niere, da die Nieren, indem sie nicht an TTR gebundenes RBP-Retinol glomerulär filtrieren und Retinol und RBP rückresorbieren, zu 40-50% am RBP-Retinol im Blutplasma beitragen (Soprano *et al.* 1988). Während die Speicherung von Vitamin A vorwiegend in der Nierenrinde erfolgt, ist RBP nur in den Epithelzellen der proximalen Nierentubuli nachweisbar, so dass diesen Nierenzellen möglicherweise eine besondere Funktion im RBP-Metabolismus sowie im Vitamin-A-Stoffwechsel zukommt (Raila 2000, Raila *et al.* 2003b).

## **5.5 Gehalt an Triglyceriden und Cholesterol im Blutplasma und in den Lipoprotein-Fractionen**

Der postprandiale Lipidmetabolismus zog in der Vergangenheit erhebliche Aufmerksamkeit auf sich, nachdem bekannt wurde, dass beim Menschen postprandial auftretende triglyceridreiche Lipoproteine bei der Entwicklung der Arteriosklerose eine Rolle spielen (Hadjadj *et al.* 1999). Die Triglycerid-Konzentrationen im Blutplasma vor der Vitamin-A-Gabe entsprechen denen anderer Untersuchungen (Wilson *et al.* 1987, Watson *et al.* 1995). Beim Menschen liegen die Triglyceridwerte im Blut etwa doppelt so hoch (Berr und Kern 1984, Le *et al.* 1997, Hadjadj *et al.* 1999, Koutsari *et al.* 2000).

Nach der Aufnahme einer fetthaltigen Mahlzeit steigt beim Menschen mit dem Erscheinen der Chylomikronen die Plasmatriglycerid-Konzentration und erreicht ihr Maximum ca. vier Stunden nach oraler Vitamin-A-Gabe (Karpe *et al.* 1995, Lewis *et al.* 1990, Hadjadj 1999). Der Wert von vier Stunden wurde auch in den eigenen Untersuchungen beim Hund ermittelt. Dieses Ergebnis liegt damit in Übereinstimmung mit Wilson *et al.* (1987) und Watson *et al.* (1995). Die Maxima der Triglyceridwerte in den Chylomikronen und im Chylomikronenunterstand waren beim Menschen nicht signifikant verschieden und verliefen synchron mit dem Maximum des Triglyceridgehalts im Blutplasma (am Tag: 4,3 Stunden; über Nacht: 5,8 Stunden nach Vitamin-A-Aufnahme). Diese Synchronität wurde auch durch andere Autoren bestätigt (Hadjadj *et al.* 1999). Die Zeitpunkte der Triglyceridmaxima in den Chylomikronen und im Chylomikronenunterstand könnten sich deshalb ähneln, weil die triglyceridreichen Lipoproteine (nicht chylomikronenhaltige Fraktion), die aus der Leber kommen, den größten Teil der postprandialen Lipidantwort ausmachen (Karpe *et al.* 1995). Auch die vorliegenden Ergebnisse beim Hund zeigen mit vier Stunden nach Vitamin-A-Gabe eine Übereinstimmung des Zeitpunktes der Triglyceridmaximalwerte im Blutplasma und in den Lipoproteinfraktionen. Der postprandiale Anstieg von Vitamin A beim Menschen findet zu 80% in der VLDL-Fraktion statt (Schneemann *et al.* 1993). Die in der aktuellen Studie ermittelten Werte für den Hund sind davon sehr verschieden. Hier ist der Triglyceridanteil besonders in

den ersten 24 Stunden nach Vitamin-A-Gabe in der LDL-Fraktion, gefolgt von der VLDL-Fraktion, vertreten. Die Triglyceridwerte der einzelnen Lipoproteinfraktionen erreichen nach 24 Stunden wieder ungefähr Ausgangswerte. Beim Menschen wurden diese bereits nach acht Stunden gemessen (Hadjadj *et al.* 1999).

Die Messwerte der vorliegenden Studie stimmen mit den Cholesterolverwerten im nüchternen Blutplasma mit anderen Untersuchungen bei Hunden überein (Wilson *et al.* 1987, Barrie *et al.* 1993). Die Cholesterolkonzentrationen liegen um ca. ein Drittel höher als beim Menschen (Berr 1992, Le *et al.* 1997, Hadjadj *et al.* 1999, Koutsari *et al.* 2000). Die ermittelten Konzentrationen für Cholesterol in den Lipoproteinfraktionen unterscheiden sich jedoch von den Resultaten der Studie von Barri 1993, bei der Hunde verschiedener Rassen, verschiedenen Geschlechts und verschiedenen Alters zusammengefasst wurden, was allerdings keinen Einfluss auf die Konzentration hatte. Während in der vorliegenden Untersuchung das Cholesterol besonders an LDL gebunden ist, stellte Barri das HDL als dominierende Fraktion fest (Barrie *et al.* 1993).

Es fällt auf, dass die HDL-Fraktion vier Stunden nach Vitamin-A-Gabe eine wesentlich höhere Cholesterol-Konzentration aufweist, während diese in den LDL im gleichen Zeitraum absinkt. Die Ergebnisse für LDL und HDL scheinen sich im Verlaufe der Untersuchung anzunähern. Die LDL-Cholesterol-Werte sind bei Barrie (1993) bei Hunden mit Hyperadrenokortizismus und besonders bei Hypothyreose höher als die in den HDL. In der vorliegenden Studie wurde jedoch durch klinische Voruntersuchungen sichergestellt, dass die Hunde gesund waren. Möglicherweise könnte hier das Alter der Tiere von erst sechs Monaten eine Rolle spielen.

## **5.6 Vitamin-A- und Tamm-Horsfall-Protein-Ausscheidung im Harn**

Vitamin A konnte im Harn aller acht Hunde als Retinol und Retinylester nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis stellt eine weitere Bestätigung vorhergehender Untersuchungen zur renalen Vitamin-A-Ausscheidung beim Hund dar (Lawrie *et al.* 1941, Schweigert *et al.* 1991, Raila 2000, Schweigert und Bok 2000). Retinol und Retinylester können nicht nur im Harn von Hunden, sondern auch bei anderen Vertretern der Familie *Canidae*, wie Füchsen und Marderhunden, nachgewiesen werden (Schweigert *et al.* 1991, Raila *et al.* 2000). Im Harn von Rindern, Schafen, Pferden und Ratten sind dagegen keine fettlöslichen Vitamin-A-Derivate vorhanden (Schweigert *et al.* 1991). Spezies der Familie *Felidae* scheinen dagegen eine Mittelstellung einzunehmen, da etwa 50% aller Katzen Retinylester im Urin ausscheiden, deren Konzentrationen jedoch um ein Vielfaches geringer sind als die von Caniden (Raila *et al.* 2001). Diese verminderte Fähigkeit zur renalen Ausscheidung fettlöslicher Vitamin-A-Verbindungen könnte deshalb im Zusammenhang mit der erhöhten Empfindlichkeit von



Katzen gegenüber einer Vitamin-A-Intoxikation stehen (Raila und Schweigert 2001). Hinsichtlich der ausgeschiedenen Vitamin-A-Derivate zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Retinol vor der Vitamin-A-Gabe einen Anteil von ca. 54% am Gesamtvitamin A besitzt. Die Retinylester liegen als Retinylpalmitat/-oleat vor. Das im Blutplasma dominierende Retinylstearat ist dagegen nur in Spuren vorhanden. Sowohl die Konzentration als auch der prozentuale Anteil am Gesamtvitamin A sind Bestätigung für vorhergehende Veröffentlichungen (Schweigert *et al.* 1991, Schweigert 2000, Raila 2000).

Beim Menschen wurde eine physiologische Vitamin-A-Ausscheidung nur in Form von wasserlöslichen Vitamin-A-Metaboliten beobachtet (Lambert und De Leenheer 1985, Sass *et al.* 1995). Eine Ausscheidung von Retinol mit dem Urin ist nur bei bestimmten Erkrankungen, wie zum Beispiel bei tubulärer Nierenschädigung aufgrund akuten Infektionen oder bei der Schwangerschaft zu erwarten (Stephensen *et al.* 1994, Alvarez *et al.* 1995, Raila *et al.* 2003c). Als Ursache wird hierbei eine Störung der Funktion des Megalin-Rezeptors im proximalen Tubulus diskutiert. Dies führt zu einer verminderten tubuläre Reabsorption von holo-RBP aus dem Primärharn und damit zur Ausscheidung im Urin (Raila *et al.* 2003c). Somit kann die Konzentration an RBP als diagnostischer Marker für eine Nierenschädigung herangezogen werden (Hong und Chia 1998).

Die Bedeutung der renalen Vitamin-A-Ausscheidung von Hunden ist bisher unklar. Betrachtet man den Vitamin-A-Stoffwechsel dieser Tiere mit den enorm hohen Vitamin-A-Konzentrationen in Blut und Geweben, so könnte man schlussfolgern, dass die renale Ausscheidung von Retinol und Retinylestern ein physiologischer Schutzmechanismus gegenüber einer Vitamin-A-Intoxikation darstellt. Vergleichbar hohe Retinylester-Konzentrationen im Blut werden beim Menschen und der Ratte nur postprandial oder im Zusammenhang mit einer chronischen Vitamin-A-Intoxikation beobachtet (Mallia *et al.* 1975, Smith und Goodman 1976). Bisher gibt es nur eine Langzeitstudie, in der über 67 Wochen der Einfluss einer unterschiedlichen Vitamin-A-Dosierung über das Futter auf die renale Vitamin-A-Ausscheidung untersucht wurde (Schweigert und Bok 2000). Dabei wurde erkannt, dass die Vitamin-A-Ausscheidung im Urin durchaus von der Höhe der Vitamin-A-Aufnahme beeinflusst wird. So konnte eine erhöhte orale Vitamin-A-Gabe (2400 IE/kg KG über 56 Tage) die Vitamin-A-Ausscheidung über den Urin steigern, aber **1)** zeigten die untersuchten Hunde starke individuelle Schwankungen hinsichtlich der ausgeschiedenen Vitamin-A-Konzentrationen und **2)** wurden trotz verminderter Vitamin-A-Zufuhr (150 IE/kg KG über 56 Tage) vergleichbar hohe Vitamin-A-Konzentrationen im Harn gemessen, die mit denen während der hochdosierten Vitamin-A-Gabe vergleichbar waren.

In der vorliegenden Studie erhielten alle Hunde die gleiche Basaldiät. Nach der oralen Vitamin-A-Gabe von 3000 IE/kg KG stiegen deshalb die Vitamin-A-Plasmakonzentrationen relativ einheitlich an. Jedoch waren die Vitamin-A-Konzentrationen im Harn individuell sehr verschieden und die einmalige orale Vitamin-A-Gabe hatte nicht zwangsläufig bei allen Hunden einen Anstieg von Vitamin A im Urin zur Folge. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass den Nieren als Speicher von Vitamin A eine besondere Stellung im Vitamin-A-Stoffwechsel zukommt. Eine Hypothese hierzu wäre, dass Vitamin A erst dann im Urin erscheint, wenn die Vitamin-A-Speicherkapazität der Nieren überschritten ist. Jedoch ist die Speicherkapazität für Vitamin A in den Nieren von Caniden sehr groß, so dass es Zeitpunkte geben müsste, in der überhaupt kein Vitamin A ausgeschieden wird (Raila *et al.* 2000). Vier Hunde (Hund B, C, F und H) bilden die „non response“-Gruppe, d.h. bei ihr ist keine Veränderung der Vitamin-A-Werte im Urin nach der Vitamin-A-Gabe zu beobachten. Im Blutplasma dieser Tiere ist dagegen eine Retinol- und Retinylester-Response erkennbar. Die anderen Hunde (A, D, E und G) bilden die „reponse“-Gruppe. Zwar ist ihnen eine „response“ nach Vitamin-A-Gabe gemeinsam, allerdings unterscheidet sich diese teils erheblich. Bemerkenswert ist darüber hinaus, dass die Vitamin-A-Ausscheidung im Harn negativ mit der Gesamt-Vitamin-A-Konzentration im Blut korreliert. Aufgrund dieser Ergebnisse kann man schlussfolgern, dass **1)** die Vitamin-A-Ausscheidung bei Hunden ein biologisches Phänomen darstellt, welches individuell sehr verschieden ist **2)** die Vitamin-A-Ausscheidung bei Hunden nicht direkt vom Vitamin-A-Plasmawert beeinflusst wird, also losgelöst von der oralen Vitamin-A-Zufuhr erfolgt und deshalb **3)** auch diese Studie keine weiteren Anhaltspunkte zu den Regulationsmechanismen der renalen Vitamin-A-Ausscheidung beim Hund liefern kann. Hieraus ergibt sich wiederum die Frage, ob die Vitamin-A-Ausscheidung im Harn von Hunden tatsächlich ein Schutzmechanismus gegenüber Symptomen einer Vitamin-A-Intoxikation darstellt, weil unter den Bedingungen einer Vitamin-A-Vergiftung die Konzentration an Vitamin A im Plasma erheblich ansteigen würde, welche dann zu einer erhöhten renalen Ausscheidung führen sollte (Smith und Goodman 1976).

Erstmals wurden in der vorliegenden Studie Konzentrationen an Tamm-Horsfall-Protein (THP) im Hundeharn gemessen. Das THP wird in den Epithelzellen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife sowie im distalen Tubulus synthetisiert und durch Sekretion in den Harn abgegeben (Rindler *et al.* 1990). Im Harn von Hunden dient es zur Proteinbindung von Retinol und Retinylestern (Raila 2000, Schweigert *et al.* 2002). Die THP-Konzentrationen steigen in den hier vorgestellten Daten bis acht Stunden nach Vitamin-A-Gabe signifikant an und fallen bis zum Ende der Messungen nach 96 Stunden bis unter die Hälfte des Ausgangswertes ab. Dieses Ergebnis wurde durch die positive Korrelation von Vitamin A im Plasma und THP im Harn bestätigt. Zwischen der Ausscheidung an THP und Vitamin A im Urin besteht nur ein schwacher positiver Zusammenhang, der sich darüber hinaus nicht

statistisch absichern lässt. Man kann daher schlussfolgern, dass es keinen Zusammenhang zwischen beiden Parametern gibt. Dieses Ergebnis bestätigt die Untersuchungen von Raila (1999), in denen kein Zusammenhang zwischen der Intensität der THP-Proteinbande nach Auftrennung durch Gelelektrophorese und dem Vitamin-A-Gehalt im Harn hergestellt werden konnte. Es wird deshalb spekuliert, dass im Harn von Hunden zwei Formen an THP existieren, die sich durch ein unterschiedliches Verhalten in der Ultrazentrifuge isolieren lassen. Als holo-Form könnte das THP mit Vitamin A bzw. als apo-Form ohne Vitamin A assoziiert sein (Raila, persönliche Mitteilung). Noch unbekannte Signale könnten zur Beladung des apo-THP mit Vitamin A führen und damit die Vitamin-A-Ausscheidung im Harn regulieren (Schweigert *et al.* 2002). Die genauen Funktionen des THP sind jedoch noch ungeklärt (Raila und Schweigert 2001a). Es ist aber zu beachten, dass das THP als Bestandteil der physiologischen Proteinurie der Carnivoren zu werten ist (Raila und Schweigert 2001a, Schweigert *et al.* 2002). Dies muss bei der klinischen Diagnostik beachtet werden, da der quantitative Nachweis von Proteinen im Urin zu den wichtigsten Leitsymptomen einer Nephropathie zählt (Raila und Schweigert 2001b).

## **5.7 Schlussfolgerungen**

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen die Besonderheit von Hunden, Vitamin A im Blut vorwiegend als Retinylester zu transportieren. Dieser Transport erfolgt unspezifisch durch die Lipoproteine des Blutplasmas. Die Retinylester des Hundes liegen im Gegensatz zum Menschen besonders an LDL gebunden vor (Berr 1992). Im Gegensatz dazu sind die Retinolkonzentrationen an beim Hund auf etwa vergleichbarem Niveau anderer Säugetiere und unterliegen durch die Bindung an den RBP-TTR-Komplex einer homoöstatischen Regulation im Blut. Jedoch weicht nach einer einmaligen oralen Vitamin-A-Zufuhr die Vitamin-A-Kinetik sowohl im Blutplasma als auch in den Chylomikronen von Untersuchungsergebnissen beim Menschen ab (Reinersdorff *et al.* 1996, Hadjadj *et al.* 1999). Die Vitamin-A-Konzentrationen in den Chylomikronen verlaufen nicht parallel zum Anstieg der Retinylester- und Triglycerid-Konzentrationen im Blutplasma. Vielmehr trifft dies für den Verlauf der Retinylester im Chylomikronenunterstand zu. Es stellt sich daher die Frage, ob beim Hund weitere Transportmechanismen für Vitamin A vom Darm zur Leber existieren, die bisher unbekannt sind. Diese Fragestellung sollte durch künftige Studien bearbeitet werden. Auch der Abfall der Konzentrationen an RBP nach der oralen Vitamin-A-Gabe wirft neue Fragen hinsichtlich des Vitamin-A-Transports im Blut von Hunden auf, da zu erwarten gewesen wäre, dass sich RBP synchron zu den Anstieg der Retinol-Konzentrationen im Plasma verhält. Zusätzlich zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass Retinol auch durch die Lipoproteine des Blutplasmas transportiert werden kann.

Weiterhin wurde bestätigt, dass die Vitamin-A-Ausscheidung im Harn von Hunden sowohl als Retinol als auch als Retinylester erfolgt. Ein direkter Einfluss einer kurzzeitig hochdosierten Vitamin-A-Gabe auf die Vitamin-A-Ausscheidung im Urin war nicht nachweisbar, was Fragen hinsichtlich der physiologischen Bedeutung dieses Phänomens aufwirft. Sowohl Retinol als auch die Retinylester liegen im Urin an THP assoziiert vor, das aktiv durch die Epithelzellen des distalen Tubulus der Niere in das Tubuluslumen sezerniert wird (Raila 2000). Erstmals wurden in dieser Studie THP-Konzentrationen im Hundeharn gemessen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der THP-Konzentration und Vitamin-A-Konzentration konnte nicht festgestellt werden. RBP konnte im Hundeharn mittels Western Blot nicht nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis bestätigt bisherige Untersuchungen, die RBP als Trägerprotein für Vitamin A im Urin ausschließen (Raila *et al.* 2000, Schweigert *et al.* 2002). Damit ist es unwahrscheinlich, dass der Vitamin-A-Verlust beim Hund eine Folge der alleinigen glomerulären Filtration und erniedrigten tubulären Reabsorption von RBP ist. Dass die renale Exkretion von Vitamin A durch sekretorische Prozesse der Tubuluszellen der Nieren reguliert wird erscheint wahrscheinlicher, da das Auftreten der Retinylester im Blutplasma (Retinylstearat dominierend) und im Urin (fast ausschließlich Retinylpalmitat) sehr unterschiedlich ist.

Abschließend kann festgestellt werden, dass sich eine einmalige hohe Gabe an Vitamin A an gesunde Hunde auf die Retinol- und Retinylester-Konzentration im Blut auswirkt. Obwohl die Hälfte der untersuchten Hunde nach Vitamin-A-Gabe vermehrt Vitamin A über den Harn ausscheiden, konnte ein direkter Einfluss der Vitamin-A-Gabe auf den Vitamin-A-Gehalt im Urin nicht nachgewiesen werden. Sowohl der genaue Mechanismus der Vitamin-A-Ausscheidung als auch die sich daraus ergebenden Konsequenzen für die Vitamin-A-Aufnahme und für den Vitamin-A-Metabolismus bei Carnivoren erfordern weitere Studien und Untersuchungen.