

5 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den bestehenden renalen Funktionstest zur quantitativen Bestimmung der GFR über die $P\text{-}CL_{\text{terminal}}$ mit exogenem zugeführtem Kreatinin (Höchel et al., 2004) für Hunde eventuell zu vereinfachen. Es sollte untersucht werden, ob eine qualitative Unterscheidung der Hunde in „nierengesund“ ($GFR > 70\%$) und „nierenkrank“ ($GFR \leq 70\%$) mit nur insgesamt zwei Blutproben möglich ist. Zusätzlich sollte die diagnostische Aussagekraft dieser qualitativen Aussage geprüft werden. Durch die Bestimmung der GFR war es möglich, die obere Referenzgrenze für die physiologische Serum-[Kreatinin_{endo}] neu festzulegen und die untersuchten Parameter in Blut und Harn anhand ihrer diagnostischen Bedeutung zu beurteilen.

5.1 Ermittlung der Wiederauffindungsrate für Kreatinin im Hundeserum

Zur Bestimmung der $P\text{-}CL_{\text{terminal}}$ mit exogenem Kreatinin wurde den Hunden Kreatinin in der Dosierung von 2 g/m^2 KOF intravenös oder subkutan verabreicht. Nach neueren Untersuchungen kann der Marker exogenes Kreatinin in der Dosierung von 4 g/m^2 KOF auch oral verabreicht werden (Hartmann et al., 2006). Die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] erreichte 2 - 3 h nach Markerzufuhr bei dem renalen Funktionstest Werte zwischen 300 und $1.900\text{ }\mu\text{mol/l}$. Die Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] erfolgte mittels der Jaffé - Methode (Braun et al., 2003). Bei in der tierärztlichen Praxis ermittelten Werten der Serum-[Kreatinin_{endo}] werden Ergebnisse über $600\text{ }\mu\text{mol/l}$ seltener erreicht. In diesem Zusammenhang sollte untersucht werden, welche Wiederauffindungsrate von Kreatinin im Hundeserum die Jaffé - Methode und vergleichend dazu ein enzymatisches Verfahren besitzen.

Die enzymatische Methode beruht auf einer substratspezifischen Enzymreaktion. Sie gilt als genauere Bestimmungsmethode im Vergleich zu der auf einer Farbreaktion beruhenden Jaffé - Methode (Braun et al., 2003; Jung et al., 1987; Schwendenwein, 1989). Für die Bestimmung der Wiederauffindungsrate für Kreatinin wurde das enzymatische Verfahren, das auf der Reaktion der Kreatininase (= Kreatinin - Aminohydrolase) beruht, genutzt (Kap. 3.3.1.1). Nach Thrall et al. (2004) liegen die diagnostische Sensitivität und Spezifität beim enzymatischen Verfahren sehr hoch, während die Jaffé - Methode eine geringe Spezifität besitzen soll. Der Grund hierfür sind einige nichtkreatinine Chromogene, wie Acetessigsäure, Aceton, Pyruvat, Glukose und Ascorbinsäure, die nur bei der Farbreaktion der Jaffé - Methode unspezifisch mitreagieren können (Wahlefeld et al., 1972). Trotzdem wurde und wird diese Methode, da sie kostengünstig und einfach durchzuführen ist, in der Veterinärmedizin am häufigsten zur Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{endo}] angewendet (Braun et al., 2003; Thrall et al., 2004). Kraft (2004) befürwortet, dass die Jaffé - Methode

aufgrund der o. g. Störfaktoren in der klinischen Diagnostik heute nicht mehr zur Anwendung gelangen sollte, wohingegen Braun et al. (2003) beschreiben, dass die enzymatische Bestimmungsmethode noch nicht ausreichend an canines Serum adaptiert wurde. Aufgrund dieser gegensätzlichen Auffassungen wurden die nachstehenden Untersuchungen durchgeführt.

Im ersten Teil der Versuche wurde eine Serum-[Kreatinin] bis 10 mg/dl (884 $\mu\text{mol/l}$) gewählt. Mit beiden Bestimmungsverfahren konnten im Durchschnitt nahezu identische Wiederauffindungsraten für zugesetztes Kreatinin, wie 99,2 % (Jaffé - Methode) und 99,4 % (enzymatisches Verfahren) ermittelt werden. Damit waren im Messbereich von 0,98 - 9,0 mg/dl (86,6 - 795,6 $\mu\text{mol/l}$) beide Methoden als gleichermaßen zuverlässig zu bewerten.

Auffällig war, dass in allen Proben mit dem enzymatischen Verfahren geringfügig niedrigere Serum-[Kreatinin_{gesamt}] ermittelt wurden als mit der Jaffé - Methode. Diese Ergebnisse ähneln den Angaben von Evans (1986) und Jung et al. (1987). Die Autoren beschrieben, dass mit dem enzymatischen Verfahren etwas niedrigere Serum-[Kreatinin] gemessen werden. Die Ursache für diese Unterschiede lag vermutlich in den nichtkreatininen Chromogenen, die nur bei der Jaffé - Methode erfasst wurden und dadurch geringfügig „falsch“ höhere Werte ergaben.

Im zweiten Teil der Untersuchung wurde ein Bereich der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] von 9 - 50 mg/dl (796 - 4.420 $\mu\text{mol/l}$) gewählt. Im Rahmen des durchgeführten renalen Funktionstests ergaben sich bei acht von insgesamt $n = 89$ Tieren im Zeitraum 2 - 3 h nach Markerapplikation Werte zwischen 839 und 1.939 $\mu\text{mol/l}$.

Die Wiederauffindungsrate von Kreatinin war in diesem Teil der Untersuchung methodenabhängig unterschiedlich. Mittels enzymatischem Verfahren konnte im Konzentrationsbereich von 9,1 - 50 mg/dl (804 - 4.420 $\mu\text{mol/l}$) eine relativ konstante Wiederauffindungsrate zwischen 97,4 und 99,8 % detektiert werden. Vergleichend dazu zeigte die Jaffé - Methode nach einem geringgradigen Abfall ab einer Kreatininkonzentration von etwa 30 mg/dl (2.652 $\mu\text{mol/l}$) einen deutlichen Anstieg der Wiederauffindungsrate bis 113,3 % (Abb. 4: 5. Probe). Die Ursache für diesen starken Anstieg blieb vorerst ungeklärt. Da die Serumkonzentration an nichtkreatininen Chromogenen in jeder Probe (jeweils 1 ml Serum) gleich war, konnte hiermit der Anstieg der Wiederauffindungsrate nicht erklärt werden. Im Durchschnitt aller untersuchten Proben betrug die Wiederauffindungsrate für die Jaffé - Methode $103,9 \pm 8,2$ %. Zusammenfassend konnte nach dieser Studie festgestellt werden, dass mit dem enzymatischen Verfahren das zugesetzte Kreatinin um 1 - 2 % unterbewertet, dagegen mit der Jaffé-Methode um durchschnittlich 3 - 4 % überbewertet wurde.

Weil sehr hohe Kreatininkonzentrationen oft außerhalb des angegebenen Detektionsbereiches des Bestimmungsverfahrens liegen, wurden die Proben vor der

labordiagnostischen Analyse verdünnt. Dieselben Konzentrationen von 9 - 50 mg/dl (796 - 4.420 $\mu\text{mol/l}$) wurden nach einer Verdünnung von 1:10 mit Aqua dest. mit beiden Methoden bestimmt. Mittels enzymatischem Verfahren konnte auch nach der Verdünnung eine Kreatinin - Wiederauffindungsrate von $97,7 \pm 1,5 \%$ detektiert werden. Sie stimmte weitgehend mit den Befunden von $98,2 \pm 0,7 \%$ der unverdünnten Proben überein. Die Jaffé-Methode wies dagegen Schwankungen in der Wiederauffindungsrate zwischen 70 und über 90 % auf. Im Konzentrationsbereich von 9 mg/dl (795,6 $\mu\text{mol/l}$) lag die Wiederauffindungsrate in der 1:10 verdünnten Probe lediglich bei 70 %. Mit steigender Kreatininkonzentration in der verdünnten Probe nahm die Wiederauffindungsrate zu und zeigte eine ähnliche Tendenz wie diejenige des enzymatischen Verfahrens. Die gemessenen Werte lagen jedoch konstant unterhalb derjenigen des enzymatischen Verfahrens. Eine Erklärung könnte sein, dass bei einer Verdünnung mit Aqua dest. die bestehende Proteinmatrix der Serumprobe ebenfalls verdünnt wurde. Sie konnte folglich nicht mehr über die Farbreaktion der Jaffé - Methode detektiert werden, so dass ein Fehler in der Bestimmung auftrat. Unklar war jedoch der kontinuierliche Anstieg der Wiederauffindungsrate, obwohl die Proteinmatrix in jeder Serumprobe gleich groß blieb.

Aus den Untersuchungsbefunden kann geschlussfolgert werden, dass im Konzentrationsbereich von 10 - 50 mg/dl (884 - 4.500 $\mu\text{mol/l}$) eine Verdünnung der Probe zur Bestimmung mit dem enzymatischen Verfahren nicht erforderlich ist. Es entstand durch die Verdünnung eine Reduktion der durchschnittlichen Wiederauffindungsrate von 98,2 auf 97,7 %. Dasselbe gilt auch für die Bestimmung mit der Jaffé - Methode. Auch hier konnte durch eine Verdünnung der Probe (Wiederauffindungsrate: $87,7 \pm 6,4 \%$) weniger Kreatinin wiedergefunden werden als im unverdünnten Zustand (Wiederauffindungsrate: $103,9 \pm 8,2 \%$).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass bis zu einer Serum-[Kreatinin] von 30 mg/dl (2.600 $\mu\text{mol/l}$) eine Bestimmung sowohl mit der Jaffé - Methode als auch mit dem hier geprüften enzymatischen Verfahren gleichermaßen zuverlässig erfolgen kann. Bei den für diese Arbeit mit dem renalen Funktionstest untersuchten Hunden lag nach Kreatininzufuhr die höchste Serum-[Kreatinin_{gesamt}] bei 1.989,3 $\mu\text{mol/l}$. Sie hat damit die 2.600 $\mu\text{mol/l}$ (30 mg/dl) nicht überschritten und konnte aus diesem Grund bei guter analytischer Qualität mittels der Jaffé - Methode bestimmt werden. Sollte die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] bei der Durchführung des renalen Funktionstests den Wert von 2.600 $\mu\text{mol/l}$ überschreiten, dann ist die enzymatische Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] empfehlenswert. Hierfür sollte die Probe im unverdünnten Zustand gemessen werden.

Der Vergleich der Wiederauffindungsraten hat gezeigt, dass die kostengünstigere und in nahezu jedem Labor schnell und einfach durchzuführende Jaffé - Methode zur Bestimmung der Serumkreatininkonzentration bis zu einem Wert von etwa 2.600 $\mu\text{mol/l}$ (30 mg/dl) der

enzymatischen Methode ebenbürtig ist. Auch aus finanziellen Erwägungen und in Übereinstimmung mit Thrall et al. (2004) dürfte daher die Jaffé - Methode den Vorzug erhalten.

5.2 Beziehung zwischen der GFR und labordiagnostischen Parametern in Blut und Urin

Die Inzidenz von Nierenerkrankungen beim Hund wird in der Literatur zwischen 0,5 % und 7% angegeben (Brown, 2004; Watson, 2001).

Bei den für diese Arbeit untersuchten 89 Hunden besaßen 8 Tiere (9 %) eine deutlich erniedrigte GFR (< 40 % der Norm) mit nachweisbaren klinischen Symptomen und bestehender Azotämie. Weitere 36 Patienten (40,5 %) zeigten eine gering- bis mittelgradig erniedrigte GFR mit 40 - 70 % der Norm. Die restlichen 45 Tiere (50,5 %) wiesen eine GFR von > 70 % auf, die als physiologisch angesehen wurde.

Die Hunde mit gering- bis mittelgradiger GFR - Einschränkung konnten aufgrund einer Serum-[Kreatinin_{endo}] im Referenzbereich (präazotämisch) und fehlender klinischer Symptome (= subklinisch) in der Praxis ohne Durchführung des renalen Funktionstests mit quantitativer GFR - Bestimmung nicht als nierenkrank erkannt werden. Die beschriebenen Ergebnisse zum Vorkommen von Nierenfunktionsstörungen beim Hund ähnelten denen von Taugner (2003). Hier konnten bei einer relativ großen Anzahl (25,2 %) an seziierten Hunden eine Nephritis oder Schrumpfnieren festgestellt werden, während nur bei 5,96 % der Tiere intra vitam anhand der Klinik eine CNI diagnostiziert worden war. Die Anzahl an Hunden, die eine subklinische CNI besaßen, war damit sowohl bei Taugner (2003) mit 25,2 % als auch bei den für diese Arbeit untersuchten Patienten mit 40,5 % relativ beachtlich.

Unter den in diese Studie einbezogenen Hunden befanden sich 21 Versuchsbeagle, die alle eine GFR ≥ 70 % der Norm besaßen. Diese Tiere wurden unter anderen Bedingungen gehalten als die übrigen Hunde (Kap. 3.1). Es kann daher vermutet werden, dass die Anzahl an Tieren mit subklinischer CNI in der bestehenden Hundepopulation noch höher liegt als hier dargestellt ist. Zu bedenken ist außerdem, dass einige Hunde aufgrund von konkreten Problemen, wie PD/PU, in einer Tierarztpraxis vorgestellt wurden. Der Vorbericht ließ eine CNI vermuten, auf Grund dessen die GFR - Bestimmung der Patienten durchgeführt wurde. Die Mehrzahl der untersuchten Tiere (n = 44 Hunde) wurde jedoch mit dem renalen Funktionstest ohne bezüglich renaler Malfunktion verdächtiger Symptome untersucht. Insofern können die durchgeführten Untersuchungen zur Erfassung von renalen Funktionsdaten beim Hund mit Einschränkungen als annähernd repräsentative Stichprobe gelten.

GFR in Beziehung zu Blutbildveränderungen

Die Ergebnisse des roten Blutbildes, wie Erythrozytenzahl, Hämatokrit, Hämoglobin, MCV, MCH und MCHC zeigen, dass sich die Werte zwischen den Hunden mit einer GFR > 70 % der Norm (Gruppe 1: physiologische Verhältnisse) und Hunden mit einer GFR von 40 - 70 % der Norm (Gruppe 2: gering bis mäßig nierenkrank) kaum unterschieden. Dagegen zeigten die Hunde mit der deutlich reduzierten GFR von < 40 % der Norm (Gruppe 3: stark nierenkrank), mit Ausnahme der drei Erythrozytenindices, auffällige Auslenkungen der genannten Parameter (Kap. 4.1). Die Erythrozytenzahl, der Hämoglobingehalt sowie der Hämatokrit lagen bei diesen Patienten um etwa ein Drittel niedriger als bei Hunden der Gruppen 1 und 2 (Abb. 11). Sie befanden sich damit unterhalb des Referenzbereichs für den jeweiligen Parameter. Die Erythrozytenindices MCV, MCH und MCHC lagen bei allen drei Gruppen im Referenzbereich.

In der Literatur wird in fortgeschrittenen Stadien der CNI eine aregenerative, normozytäre und normochrome Anämie beschrieben (Brown, 1998; Kraft, 2003; Polzin *et al.*, 2000). Sie entsteht, weil im Endstadium der CNI die Erythropoetinproduktion in der Niere bereits über einen längeren Zeitraum eingeschränkt ist. Dadurch wird die Bildungsrate der Erythrozyten herabgesetzt. Folglich zeigt das Erythrogramm normal große Zellen (normozytär) in verminderter Anzahl, jedoch mit einer physiologischen Hämoglobinbeladung (normochrom). Über eine Bestimmung der Retikulozytenzahl kann die Anämie in aregenerativ oder regenerativ eingeteilt werden (Kraft und Dürr, 2004). Bei einer CNI ist die Retikulozytenzahl reduziert, weil die Erythrozytenproduktion durch den Erythropoetinmangel nicht ausreichend stimuliert wird. Daher kann die Anämie bei einer CNI als aregenerativ bezeichnet werden. Nach Polzin (2000) können zusätzlich bei einer CNI eine verminderte Überlebenszeit der Erythrozyten oder das Bestehen von Erythropoese - Inhibitoren im Serum von urämischen Patienten zu einer Anämie führen.

Die n = 8 Hunde mit stark reduzierter GFR in dieser Studie besaßen eine normozytäre, normochrome Anämie. Die aregenerative Form dieser Anämie konnte aufgrund der bestehenden CNI angenommen werden. Sie wurde jedoch nicht durch Zählung der Retikulozytenzahl bestätigt.

Das Leukogramm der für diese Studie untersuchten Hunde zeigte, dass die Tiere mit stark eingeschränkter GFR (Gruppe 3) eine Leukozytenzahl von durchschnittlich $15,3 \pm 8,2$ G/l aufwiesen. Eine Erhöhung der Leukozytenzahl kann physiologisch oder pathologisch sein. Die Gesamtzahl an Leukozyten im Blut wird durch einen marginalen und zentralen Pool gebildet (Kraft und Dürr, 2004). Im zentralen Pool befinden sich die Leukozyten, die vom Bildungsort über das Blut bis zum Wirkungsort transportiert werden. Der marginale Pool wird von Leukozyten gebildet, die sich an die Gefäßwand anlagern und als schnell verfügbare Reserve für den zirkulierenden Teil der Blutleukozyten angesehen werden können. Bei einer

Erhöhung des Blutdrucks werden infolge der schnelleren Strömungsgeschwindigkeit des Blutes die Leukozyten des marginalen Pools ins Blut abgeschwemmt. Somit erhöht sich der im Blut messbare zentrale Pool. Physiologischerweise steigt der Blutdruck bei körperlicher Belastung, Aufregung und während der Geburt („Stressleukozytose“). Eine pathologische Leukozytose existiert beispielsweise bei Infektionskrankheiten. Da chronisch niereninsuffiziente Patienten aufgrund einer verminderten körpereigenen Abwehr eine erhöhte Infektanfälligkeit besitzen, könnte eine Leukozytose bei diesen Patienten auf eine bestehende Infektion hindeuten (Kraft, 2003). Nach Kraft (2004) zeigten Tiere bei einer endogenen Intoxikation, wie Urämie, ebenfalls eine pathologische Leukozytose. Um Aufschluss über die Ursache der Leukozytose zu bekommen, könnte ein Differentialblutbild mit Bestimmung der einzelnen Leukozytenfraktionen angefertigt werden.

Die für diese Arbeit untersuchten Hunde mit einer stark reduzierten GFR (Gruppe 3) wiesen eine Leukozytenzahl am oberen Referenzbereich (12,0 (10,5-18,5) G/l) auf.

Die Thrombozyten gehören zum Hämostasese-System und zirkulieren frei im Blut. Ihre Produktion wird durch den Wachstumsfaktor Thrombopoetin reguliert. Eine reaktive Thrombozytose tritt nach Operationen, Blutverlust, Splenektomie oder Glukokortikoidgabe auf. Kraft (2004) beschreibt bei einer manifesten Urämie eine Funktionsbeeinträchtigung der Thrombozyten. Bei vermuteter Thrombozytopathie wird empfohlen, die Schleimhautblutungszeit zu bestimmen und, wenn nötig, Thrombozytenfunktionstests anzuschließen. Die Funktionsfähigkeit der Thrombozyten könnte mit diesen Thrombozytenfunktionstests, wie Thrombozyten - Aggregationstest, beurteilt werden. Solche Tests sind jedoch sehr aufwendig und werden daher nicht routinemäßig eingesetzt.

Die in dieser Studie untersuchten Hunde mit stark eingeschränkter GFR (Gruppe 3) zeigten mit 545 (275,5-643) G/l eine sehr weite Streuung der Thrombozytenzahl.

GFR in Beziehung zur Retention von Serum-inhaltsstoffen

Zwischen den GFR-Werten und den Befunden der untersuchten Parameter Serum-[Harnstoff], Serum-Natrium/Kalium-Quotient, Serum-[Kalzium_{gesamt}], Serum-[Chlorid], Serum-[Phosphat] und Serum-[Magnesium] besteht ein geringgradig nachweisbarer Zusammenhang.

Nach Thrall et al. (2004) steigt die Serum-[Harnstoff] an, wenn die GFR vermindert ist. Es wird jedoch darauf hingewiesen, dass die Serum-[Harnstoff] und die Serum-[Kreatinin_{endo}] sehr insensitive Parameter zur Bestimmung von renalen Malfunktionen darstellen. Ihre Werte sind erst erhöht, wenn ≥ 75 % der Nephrone funktionslos geworden sind (Finco und Duncan, 1976; Médaille et al., 2003; Polzin et al., 2000). Die vorliegenden Ergebnisse bestätigten diese Aussage (Abb. 12, 13). Zu beachten ist, dass auch Tiere mit einer GFR > 70 % eine Serum-[Harnstoff] über dem Referenzbereich aufwiesen. Mit dem Einfluss von extrarenalen Faktoren, wie Proteingehalt der Nahrung und im Körper existierender Katabolismus, könnten

die unterschiedlichen Werte für die Serum-[Harnstoff] bei den einzelnen Hunden erklärt werden (Finco, 1995; Finco und Duncan, 1976; Kraft, 2003). Die Serum-[Harnstoff] war daher nur bedingt geeignet, diagnostisch verwertbare Hinweise auf eine eingeschränkte GFR des Patienten zu geben.

Die Serum-[Kreatinin_{endo}] gilt als der günstigste Parameter zur indirekten Messung der GFR (Braun *et al.*, 2003; Finco und Duncan, 1976; Médaille *et al.*, 2003; Schwendenwein, 1989). Da in dieser Studie bei jedem Hund die GFR quantitativ bestimmt wurde, konnte sie nun zur korrespondierenden Serum-[Kreatinin_{endo}] in Beziehung gesetzt werden. Bis zu einer GFR-Reduktion auf 40 % der Norm stieg bei den Hunden die Serum-[Kreatinin_{endo}] nur geringfügig an. Erst bei einer GFR < 40 % der Norm war ein nachweisbarer Anstieg der Serum-[Kreatinin_{endo}] zu erkennen (Abb. 12). Diese Ergebnisse entsprechen denen von Höchel (2003) und Höchel *et al.* (2004). Sie zeigen deutlich den großen kreatininblinden Bereich, in dem die Serum-[Kreatinin_{endo}] trotz GFR-Abnahme gar nicht oder nicht sicher nachweisbar anstieg. Die Serum-[Kreatinin_{endo}] steht demnach in einem weiten Bereich nicht in linearer Beziehung zur GFR. Sie kann frühestens bei einer Reduktion der GFR auf < 40 % der Norm als Parameter zur Diagnose einer renalen Malfunktion eingesetzt werden. Dennoch korrelierte sie von allen untersuchten Parametern am besten mit der GFR.

Die Nieren regulieren den Elektrolythaushalt im Organismus. Die Ausscheidung der Elektrolyte Natrium, Kalium, Kalzium, Chlorid, Phosphat und Magnesium erfolgt zu einem großen Teil über die Nieren (Fromm und Hierholzer, 2000; Greger, 1999). Die Elektrolytkonzentration im Serum (Serum-[Elektrolyt]) wird sehr lange Zeit durch die enorme Kompensationsfähigkeit der Nieren im entsprechenden Referenzintervall gehalten. Erst im Endstadium der CNI, wenn die GFR < 40 % gesunken ist, sind die verbliebenen Nephrone nicht mehr in der Lage, die Serum-[Elektrolyt] im physiologischen Bereich zu halten. Folglich zeigt die Serum-[Elektrolyt] mehr oder weniger starke Abweichungen vom Referenzbereich, z. B. eine Hyperphosphatämie oder eine Hyperkaliämie (Moritz und Grünbaum, 2001a; Polzin *et al.*, 2000). Roth und Tayler (1999) stellten fest, dass 41 % der Hunde mit einem Na/K-Quotienten zwischen 20 und 24 eine Erkrankung der Nieren oder ableitenden Harnwege aufwiesen. Die Ergebnisse in Abbildung 15 zeigen, dass auch hier drei von vier Hunden mit einem Na/K-Quotienten < 27 eine renale Malfunktion aufwiesen. Dagegen besaßen sechs Patienten mit gleichermaßen reduzierter GFR Werte für den Na/K-Quotienten, die deutlich über 27 lagen (Abb. 15).

Die Serum-[Natrium], -[Kalium], -[Kalzium_{gesamt}], -[Chlorid] und -[Magnesium] sind nach Ergebnissen dieser Studie kaum oder gar nicht zur Frühdiagnostik von Nierenfunktionsstörungen geeignet.

GFR in Beziehung zu ausgewählten Harnparametern

Die Proteinurie wird häufig als ein diagnostisches Kriterium für renale Malfunktionen herangezogen (Moritz und Grünbaum, 2001b; Polzin *et al.*, 2000). Sie soll außerdem mitverantwortlich für das Fortschreiten der CNI sein (Grauer, 2005; Jacob *et al.*, 2005). So könnte nach Polzin *et al.* (2000) eine glomeruläre Proteinurie zu einer vermehrten Aufnahme des Proteins in die Tubuluszellen führen. Diese werden demzufolge geschädigt, und es kommt zum Fortschreiten der CNI. In den für diese Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnte jedoch kaum eine korrelative Beziehung zwischen der GFR und dem UPC festgestellt werden (Abb. 17). Lediglich bei stark reduzierter GFR auf < 40 % der Norm stieg der UPC - Wert über den Referenzbereich von 0,5 an. Bei Tieren mit gering und mäßig eingeschränkter GFR oder einer physiologischen GFR > 70 % der Norm existierten dagegen sowohl stark erhöhte UPC - Werte > 6 als auch Befunde im Normbereich (Abb. 17). Der Grad der GFR - Einschränkung korreliert nach diesen Ergebnissen nicht mit dem UPC - Quotienten. Die Ursache für einen erhöhten UPC - Wert könnte eine physiologische Proteinurie, z. B. aufgrund von Stress oder körperlicher Belastung, gewesen sein (Kraft und Dürr, 2004). Persistierende Proteinurien werden dagegen als pathologisch angesehen (Gary *et al.*, 2004; Grauer, 2005; Lees *et al.*, 2005). Da keine wiederholten Bestimmungen des UPC - Wertes der Hunde in dieser Studie erfolgten, konnte eine Persistenz der Proteinurie nicht bestätigt bzw. ausgeschlossen werden. Eine pathologische Proteinurie könnte bei uneingeschränkter GFR auch prärenale Ursachen, wie Zerstörung von Muskelgewebe, Infektionen des Geschlechtapparates oder Herzerkrankungen, haben (Grauer, 2005). Für eine derartige Ursache spräche bei einigen Tieren die geringgradige Erhöhung der UPC - Ratio (Abb. 17). Nach Suter (2004) ist die Intensität der Proteinurie bei der prärenalen Form geringer als bei der renalen Form. Als postrenale Ursachen für die Proteinurie bei einigen Hunden ohne renale Malfunktion kämen Urolithiasis, Traumata, bakterielle Zystitiden oder Neoplasien infrage (DiBartola *et al.*, 1980). Da keine weitere Harnuntersuchung, z. B. ein Harnsediment, erfolgte, konnten diese Ursachen bei den einbezogenen Hunden nicht ausgeschlossen werden.

Die weiterhin untersuchten Harnparameter zeigten erst deutliche Abweichungen, wenn die GFR < 40 % der Norm beträgt. Die FE_{Natrium} korrelierte von allen untersuchten Harnparametern am besten mit der GFR (Abb. 18). Die obere Referenzgrenze scheint jedoch mit 1 % sehr hoch angelegt, so dass sich fast alle untersuchten Tiere im Normbereich befanden. Nach diesen Untersuchungen könnte die obere Referenzgrenze für die FE_{Natrium} beim Hund auf 0,2 % herabgesetzt werden. Doch auch dann würden nierenfunktionsgestörte Hunde erst bei einer GFR < 40 % mit diesem Parameter detektiert werden können. Die $FE_{\text{Elektrolyte}}$ ist ein Parameter zur Erfassung von tubulären Störungen (Finco, 1999; Thrall *et al.*, 2004). Über den tubuloglomerulären Feedback beeinflussen tubuläre Störungen jedoch auch die GFR

(Fromm und Hierholzer, 2000). Eine erhöhte Harn-[Elektrolyt] entsteht durch eine verminderte tubuläre Reabsorption des betreffenden Elektrolyts aufgrund von Tubuluszellschäden (Thrall *et al.*, 2004). Dadurch erhöht sich auch die FE des entsprechenden Elektrolyts.

5.3 Grenzwert-Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{endo}] für die Diagnostik einer Azotämie

In der Literatur herrschen unterschiedliche Angaben darüber, welcher obere Grenzwert für die physiologische Serum-[Kreatinin_{endo}] bei Hunden anzuwenden ist (Kap. 4.3). Derartige Angaben sind klinisch von großem Interesse, weil pathologisch erhöhte Werte des Serumkreatinins zur Diagnostik der Azotämie verwendet werden. Als Azotämie bezeichnet man die Erhöhung an harnpflichtigen Stoffen, wie Kreatinin, Harnstoff und nichtproteinogenen Stickstoffabfallprodukten (Phosphate, Ammoniak, Guanidin, Indole, Amine, Sulfate), im Serum (Kraft und Dürr, 2004; Polzin *et al.*, 2000; Suter, 2004). Da eine Azotämie anhand des Serum-[Kreatinin_{endo}] definiert wird, ist es notwendig, den Grenzwert zwischen physiologischer und pathologisch erhöhter Serum-[Kreatinin_{endo}] festzulegen. Bei allen untersuchten Hunden wurde die GFR quantitativ bestimmt, so dass es nun erstmalig möglich war, die ebenfalls gemessene Serum-[Kreatinin_{endo}] zur GFR in Beziehung zu setzen. In dieser Arbeit wurden die diagnostische Sensitivität und Spezifität bestimmt, mit der unterschiedlich erniedrigte Zustandsvariablen, wie GFR-Werte von $\leq 30\%$, $\leq 40\%$, $\leq 50\%$ und $\leq 70\%$, anhand der Testvariable Serum-[Kreatinin_{endo}] diagnostiziert werden konnten.

Mit der höchsten diagnostischen Sensitivität von durchschnittlich 100 % und der Spezifität von 98,5 % konnte eine GFR $\leq 30\%$ mit dem Cut-off-Wert für die Serum-[Kreatinin_{endo}] von 171 $\mu\text{mol/l}$ ermittelt werden. Damit kann bei Hunden mit einer Serum-[Kreatinin_{endo}] ab 171 $\mu\text{mol/l}$ mit großer diagnostischer Sicherheit eine GFR von 30 % der Norm und darunter festgestellt werden. Wenn eine Reduktion der GFR jedoch erst bei 30 % und weniger erkannt wird, dann ist diese Angabe nicht als Frühdiagnostik zu bezeichnen. Wünschenswert wäre eine frühzeitigere Diagnose der renalen Malfunktion über die Serum-[Kreatinin_{endo}].

Je mehr sich die Werte für die Zustandsvariable GFR dem physiologischen Bereich von $> 70\%$ der Norm näherten, desto geringere Werte erreichten die Sensitivität und Spezifität für den jeweiligen Cut-off-Wert. Bei der Zustandsvariable GFR von $\leq 40\%$ der Norm konnte ein Cut-off-Wert für die Testvariable Serum-[Kreatinin_{endo}] von 144 $\mu\text{mol/l}$ bestimmt werden. Für diesen Cut-off-Wert betragen die diagnostische Sensitivität 88,9 % und die Spezifität 97,0 %. Hunde mit einer GFR von 40 % und weniger könnten demnach mittels einer Serum-[Kreatinin_{endo}] über 144 $\mu\text{mol/l}$ noch mit ausreichender diagnostischer Sicherheit detektiert werden. Eine GFR $\leq 40\%$ ist jedoch schon so stark eingeschränkt, dass ein Erkennen der Krankheit zu diesem Zeitpunkt ebenfalls nicht als Frühdiagnostik zu bezeichnen ist.

Nach Greiner et al. (2000) werden bei der Berechnung der AUC einer ROC - Kurve die Sensitivität und Spezifität gleich stark gewichtet. Eine AUC $> 0,9$ wird als sehr aussagekräftig bewertet (Tab. 21). Eine AUC von 1 spricht für einen perfekten Test. Mit 0,999 war die AUC bei einer GFR ≤ 30 % annähernd perfekt. Für die AUC bei einer GFR ≤ 40 % und ≤ 50 % bestanden Werte von 0,960 und 0,952, die nach der Einteilung von Greiner et al. (2000) ebenfalls als sehr exakt zu bewerten sind. Die Spezifität von 89,1 % für den Cut-off-Wert 116 $\mu\text{mol/l}$ der Serum-[Kreatinin_{endo}] lagen jedoch bei einer GFR ≤ 50 % sehr niedrig. Dadurch war der Anteil an Hunden, die über eine Serum-[Kreatinin_{endo}] von über 116 $\mu\text{mol/l}$ als falsch positiv getestet wurden, relativ groß. Auch die diagnostische Sensitivität für diesen Cut-off-Wert lag mit 88,7 % relativ niedrig. Bei einer Zustandsvariable GFR von ≤ 70 % der Norm befand sich der Cut-off-Wert für die Testvariable Serum-[Kreatinin_{endo}] bei 93 $\mu\text{mol/l}$. Die diagnostische Aussagekraft für diesen Cut-off-Wert war jedoch mit einer durchschnittlichen Sensitivität von 85,2 % und einer Spezifität von 72,8 % sehr gering. Es wurden viele Hunde als gesund angesprochen, obwohl ihre GFR reduziert war (= falsch negativ) und noch mehr Tiere wurden als krank diagnostiziert, obwohl ihre GFR im Normbereich > 70 % lag (= falsch positiv). Bei der Durchführung der quantitativen GFR-Bestimmung mit exogenem Kreatinin wird eine GFR von > 70 % der Norm als physiologisch angesehen (Höchel *et al.*, 2004). Es könnte deshalb bei Hunden eine Serum-[Kreatinin_{endo}] bis 93 $\mu\text{mol/l}$ als physiologischer Wert angesehen werden.

Nach den Ergebnissen der hier durchgeführten Studie ist die Serum-[Kreatinin_{endo}] ein sehr sicherer diagnostischer Marker bei einer auf ≤ 30 % der Norm abgesunkenen GFR. Mit einer noch ausreichenden diagnostischen Sicherheit von durchschnittlich 88,9 % Sensitivität und 97,0 % Spezifität konnte eine auf ≤ 40 % abgesunkene GFR über die Serum-[Kreatinin_{endo}] diagnostiziert werden. Zur Frühdiagnostik einer renalen Malfunktion ist die Serum-[Kreatinin_{endo}] jedoch nicht geeignet, da dann keine ausreichende diagnostische Sicherheit bestand. Die gewonnenen Erkenntnisse unterstützen die Ergebnisse von Höchel *et al.* (2004), in denen ein breiter kreatininblinder Bereich für das Serum-[Kreatinin_{endo}] aufgezeigt wurde. Zu beachten ist außerdem, dass die Serum-[Kreatinin_{endo}] stark vom Hydratationszustand des Patienten abhängt und daher klinisch kaum feststellbaren wechselnden Konzentrationsschwankungen unterliegen kann (English *et al.*, 1980).

In der Literatur wird übereinstimmend beschrieben, dass die beste Möglichkeit zur frühzeitigen Diagnose einer renalen Malfunktion die Bestimmung der GFR über Clearance-Methoden ist (Brown, 1994; Levey, 1990; Swan, 1994). Der Grund hierfür ist, dass eine renale Malfunktion frühzeitig erkannt werden sollte, um schnellstmöglich eine entsprechende Therapie einleiten zu können. Nur auf diese Weise kann dem chronisch nierenkranken Patienten eine längere Überlebenszeit ermöglicht werden (Grauer, 2005; Lees, 2004).

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit kann geschlossen werden, dass mit keinem der hier untersuchten Parameter die frühzeitige Diagnose einer renalen Malfunktion gestellt werden konnte.

5.4 Verteilung von exogen zugeführtem Kreatinin im Organismus als Voraussetzung für das „Zwei-Schritt-Verfahren“

In vorangegangenen Untersuchungen von Finnah (2003) und Höchel et al. (2004) wurde das Verfahren der modifizierten $P\text{-CL}_{\text{terminal}}$ mit exogenem Kreatinin zur quantitativen Bestimmung der GFR bei Katzen entwickelt und an den Hund adaptiert. Nach der Applikation des Kreatinins wird die Kreatinin-Konzentrations-Zeit-Kurve zunächst von zwei Variablen beeinflusst. Diese sind (1) die Verteilung des Kreatinins in den Kompartimenten des Körpers und (2) die renale Exkretion des Kreatinins. Die folgende Formel beschreibt diese Kreatinin-Konzentrations-Zeit-Kurve:

$$P_X(t) = A_1 \cdot e^{-\alpha_1 \cdot t} + A_2 \cdot e^{-\alpha_2 \cdot t} + B \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad (12)$$

P:	Plasma-Clearance der Substanz X zum Zeitpunkt t
A_1, A_2, B :	Lage der Geraden in Bezug zur Y-Achse
e:	Eulersche Zahl
t:	Zeit
β :	Steigung der Geraden

Die Formel besteht aus drei Termen. Die ersten beiden Terme beschreiben die Verteilung des Kreatinins in zwei verschiedene Kompartimente des Körpers, wie Intravasalraum und Extrazellularräum. Nach Abschluss der Verteilungsvorgänge des Kreatinins in den Kompartimenten des Körpers wird die Kreatinin-Konzentrations-Zeit-Kurve allein von der renalen Elimination des Markers bestimmt. Für die Berechnung der $P\text{-CL}_{\text{terminal}}$ sowie für die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen wurde nur der terminale Abschnitt der Formel 12 verwendet, welcher dem monoexponentiellen Teil der Kreatininausscheidungskurve entspricht.

Dieser monoexponentielle Teil der logarithmierten Kreatininausscheidungskurve wird mit folgender Formel berechnet:

$$Px(t) = B \cdot e^{-\beta t} \quad (13)$$

P: Plasma-Clearance der Substanz X zum Zeitpunkt t
 B: Lage der Geraden in Bezug zur Y-Achse
 e: Eulersche Zahl
 t: Zeit
 β : Steigung der Geraden

Der Exponent β beschreibt die Steigung der Geraden. Er ist negativ, da die Gerade im Zeitverlauf abfällt (= negative Steigung). Je größer der Wert des Exponenten β ist, desto schneller erfolgt die Kreatininausscheidung und desto besser ist die GFR des Patienten zu beurteilen. Für die quantitative Beurteilung der GFR ist somit allein der Exponent β ausschlaggebend.

In dieser Studie sollte eine Vereinfachung des renalen Funktionstests zur quantitativen Bestimmung der GFR untersucht werden. Es sollte möglich werden, mit nur insgesamt zwei Blutproben eine qualitative Unterscheidung der Hunde in „nierengesund“ und „nierenkrank“ vorzunehmen. Als Voraussetzung für diese Untersuchungen musste die Verteilung des Kreatinins in den Kompartimenten des Körpers vollständig abgeschlossen sein. Es galt daher zu prüfen, nach welcher Zeit diese Voraussetzung erfüllt war.

In Kapitel 4.3 konnte nachgewiesen werden, dass die Verteilung des exogen zugeführten Kreatinins sowohl bei nierenkranken als auch bei nierengesunden Hunden nach spätestens zwei Stunden abgeschlossen war. Damit konnte frühestens zwei Stunden nach der Kreatininzufuhr mit der Blutentnahme für die qualitative Bestimmung der GFR begonnen werden.

Für die Vereinfachung des bestehenden renalen Funktionstests wurden zunächst die Zeiträume 2 - 3 und 3 - 4 h nach der Kreatininapplikation für die Entnahme der zweiten Blutprobe untersucht. Für beide Zeiträume konnte ein geringgradiger Unterschied zwischen nierengesunden und nierenkranken Hunden festgestellt werden (Abb. 25 und 26). Die Streuung der Werte war jedoch so stark ausgeprägt, dass die AUC bei beiden ROC-Kurven unter 0,9 lag (Abb. 29 und 30) und damit nicht als sehr aussagekräftig galt (Greiner *et al.*, 2000). Damit konnte eine Probenentnahme in diesen beiden Zeiträumen zur qualitativen Unterscheidung der Hunde nicht herangezogen werden. Die Ursache könnte theoretisch in einer noch nicht abgeschlossenen Verteilung des exogen zugeführten Kreatinins liegen. Das widerspricht jedoch den ermittelten Ergebnissen aus Kap. 4.3, die eindeutig bestätigten, dass die Verteilung des zugeführten Kreatinins bei gesunden und nierenfunktionsgestörten Hunden nach spätestens zwei Stunden abgeschlossen war. Eine weitere mögliche Ursache könnte die Dauer der alleinigen Einwirkung der Nierenfunktion sein. Die Verteilungsvorgänge

des exogen zugeführten Kreatinins liefen bei nierengesunden und nierenkranken Hunden sehr unterschiedlich ab. Es konnte nach Abschluss der Verteilung nicht aus einem noch relativ hohen Wert der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] auf eine renale Malfunktion des Hundes geschlossen werden. Ebenso bedeutete eine niedrige Serum-[Kreatinin_{gesamt}] zu diesem Zeitpunkt nicht, dass der betreffende Hund nierengesund war. Nach Abschluss der Kreatininverteilung im Organismus war allein die renale Exkretion des Markers wirksam. Sie könnte die unterschiedlichen Ausgangswerte der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] nach Abschluss der Markerverteilung ausgleichen. Zum Zeitpunkt der Blutprobenentnahme nach 2 - 3 oder 3 - 4 h nach Kreatininapplikation war die Verteilung des exogen zugeführten Markers Kreatinin gerade erst abgeschlossen. Die alleinige Nierenfunktion war nur sehr kurz wirksam und hatte demzufolge auf die unterschiedlichen Ausgangswerte der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] nach Abschluss der Kreatininverteilung einen vermutlich zeitlich noch unzureichenden Einfluss. In einem späteren Zeitraum, wie 6 - 7 oder 7 - 7,5 h nach Kreatininzufuhr, wirkte die Nierenfunktion nach Abschluss der Verteilung im Organismus bereits vier Stunden oder länger auf die unterschiedlichen Serum-[Kreatinin_{gesamt}] bei nierengesunden und nierenkranken Hunden ein. Da die renale Exkretionsleistung bei nierenkranken Hunden eingeschränkt war, wurde nach der relativ langen Einwirkungszeit der alleinigen Nierenfunktion ein Unterschied zu nierengesunden Hunden wesentlich deutlicher sichtbar. Aus diesem Grund wurden nachfolgend die späteren Zeiträume, wie 6 - 7 h und 7 - 7,5 h nach exogener Kreatininzufuhr, zur Entnahme der zweiten Blutprobe untersucht. Sie lieferten eindeutig bessere Ergebnisse. Die AUC lag bei den ROC-Kurven in beiden Zeiträumen über 0,9, im Zeitraum 7 - 7,5 h nach Markerzufuhr mit 0,97 sogar sehr hoch (Abb. 31 und 32). Je später der Zeitraum für die zweite Blutprobenentnahme gewählt wurde, desto besser konnte zwischen nierenfunktionsgestörten und nierengesunden Hunden unterschieden werden. Der späteste hier untersuchte Zeitraum lag bei 7 - 7,5 h nach der Kreatinigungabe. Das exogen zugeführte Kreatinin blieb im Tierkörper nach Untersuchungen von Höchel et al. (2004) mit Werten $\geq 20 \mu\text{mol/l}$ auch nach 8 - 12 h noch detektierbar. Demnach wäre auch ein noch exakt festzustellender späterer Zeitraum von $> 7,5$ h nach Markerzufuhr für die diagnostische Blutprobenentnahme möglich.

Die Serum-[Kreatinin_{gesamt}] war bei allen untersuchten Zeiträumen deutlich aussagekräftiger als die Serum-[Kreatinin_{exo}] und lieferte höhere Werte für die AUC. Der Grund hierfür waren die bei der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] mit einbezogenen, unterschiedlich stark erhöhten Serum-[Kreatinin_{endo}]. Sie konnten bei nierenfunktionsgestörten Patienten bereits über dem Referenzbereich von $144 \mu\text{mol/l}$ liegen und hätten damit den Wert der Serum-[Kreatinin_{gesamt}] zusätzlich angehoben. Schlussfolgernd aus diesen Untersuchungen ergibt sich, dass eine Blutprobenentnahme vor der Kreatininapplikation zur Bestimmung der Serum-[Kreatinin_{endo}] entfallen kann.

Als Cut-off-Wert für die Serum-[Kreatinin_{gesamt}], bei der die diagnostische Sensitivität und Spezifität mit durchschnittlich 100 % bzw. 90 % am größten waren, lag bei 270 µmol/l (Tab. 22). Das bedeutet, dass eine Serum-[Kreatinin_{gesamt}] von 270 µmol/l und darüber im Zeitraum von 7 - 7,5 h nach Markerapplikation den Hund als nierenfunktionsgestört detektierte. Demnach würde nach subkutaner oder intravenöser Kreatininapplikation eine einzige Blutprobenentnahme im Zeitraum von 7 - 7,5 h nach Markerzufuhr den Hundepatienten als nierengesund (GFR > 70 %) oder renal funktionsgestört (GFR ≤ 70 %) einordnen können. Das Ausmaß der Nierenfunktionsstörung konnte jedoch mit diesem „Screening-Test“ nicht bestimmt werden. Hierfür und zur Kontrolle von bereits eingeleiteten Therapiemaßnahmen muss ein zweiter Schritt zum Einsatz kommen („Zwei-Schritt-Verfahren“). Hierbei wird mit Hilfe der terminalen P-CL von exogenem Kreatinin die GFR quantitativ bestimmt.

Ausblick für weiterführende Untersuchungen:

Der Vergleich der GFR mit ausgewählten Blut- und Harnparametern hat gezeigt, dass eine renale Malfunktion ab einer GFR von 40 % und darunter auch mit der fraktionellen Elektrolytausscheidung detektiert werden könnte. In der heutigen Praxis findet dieser Parameter jedoch wenig Beachtung. Es sollte daher weiter untersucht werden, mit welcher diagnostischen Qualität eine renale Malfunktion beispielsweise mit der FE_{Natrium} detektiert werden kann. In Bezug zur GFR könnte ein neuer Referenzbereich für die FE_{Natrium} festgelegt werden.

Die Intensität der Proteinurie gilt als ein Marker zur Diagnostik und Beurteilung von Nierenfunktionsstörungen. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der GFR und der Intensität der Proteinurie gefunden werden. Die Persistenz der Proteinurie wurde jedoch nicht untersucht. Es könnte daher in weiteren Untersuchungen durch wiederholte Bestimmung des UPC - Wertes eine Persistenz der Proteinurie eventuell bestätigt und nachfolgend ein möglicher Zusammenhang zwischen der GFR und der UPC-Ratio untersucht werden.

An n = 20 nierengesunden und n = 8 nierenkranken Hunden wurde in dieser Studie gezeigt, dass mit nur einer Blutprobe im Zeitraum 7 - 7,5 h nach Kreatininapplikation eine qualitative Einteilung der Hunde in „nierengesund“ und „nierenkrank“ möglich war. Hierzu könnte in weiteren Untersuchungen an einer größeren Anzahl an Hunden der hier bestimmte Grenzwert zur Unterscheidung der Hunde bestätigt oder korrigiert werden. Desweiteren könnte ein noch späterer Zeitraum, wie 7,5 - 8 h nach der Kreatininapplikation, für die Entnahme der Blutprobe bezüglich diagnostischer Aussagen untersucht werden.

Da Katzen noch häufiger an einer CNI erkranken als Hunde, könnte das hier an Hunden getestete Verfahren zur qualitativen Unterscheidung der Patienten mit nur einer Blutprobe nach der Kreatininzufuhr auch an Katzen getestet werden. Gerade hier wäre die Entnahme

einer möglichst geringen Anzahl an Blutproben aufgrund der oft mangelhaften Kooperation der Patienten von Vorteil.