

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Versuchstiere und Patientengut

Die Clearancebestimmung wurde an insgesamt 91 Katzen unterschiedlicher Rassen und Altersstufen durchgeführt.

In die Untersuchungen gingen neben klinisch „nierengesunden“ Katzen und Katzen mit klinisch manifester Nephropathie auch solche Tiere ein, bei denen auf Grund der klinischen Symptomatik der Verdacht auf eine Nierenerkrankung bestand oder bei denen die Nierenfunktionen vor dem Einsatz nephrotoxischer Medikamente (v. a. von Chemotherapeutika) zur Festlegung der Dosierung überprüft werden sollten.

Die Katzen wurden in folgende Gruppen unterteilt:

Gruppe 1: klinisch „nierengesunde“ Katzen (n=25),

Gruppe 2: Katzen mit klinisch manifester Niereninsuffizienz (n=34),

Gruppe 3: Katzen mit Verdacht auf eine subklinische Nierenfunktionsstörung, Katzen bei denen eine andere Grunderkrankung vorlag, welche die Nierenfunktionen mit beeinträchtigen kann, und Katzen, bei denen zur Festlegung der Dosierung nephrotoxischer Medikamente eine Überprüfung der Nierenfunktionen angezeigt war (n=32).

In die Gruppe der klinisch „nierengesunden“ Katzen (**Gruppe 1**) wurden Tiere mit im Referenzbereich liegenden Serumharnstoff- und Creatinin-Werten sowie im Referenzbereich liegender Harndichte aufgenommen. Die Bestimmung weiterer Blut- und Harnparameter diente dazu, das Bild des Gesundheitsstatus der Tiere abzurunden. Sofern Röntgen- und Ultraschallbilder verfügbar waren, wurden diese in die Beurteilung mit einbezogen. Die zu Grunde gelegten Referenzbereiche sind den Tabellen 3-10 und 3-12 zu entnehmen. Da nicht von allen Katzen Probenmaterial für alle Laborbestimmungen gewonnen werden konnte, unterschied sich die Anzahl der jeweils in die Abbildungen 4-1 bis 4-3 einfließenden Tiere.

Zur Ermittlung des Referenzbereichs für die modifizierte Plasmaclearance ($P-CL_{\text{terminal}}$) der Substanz Creatinin wurden ausschließlich die bei den Katzen der Gruppe 1 ermittelten Werte herangezogen.

In **Gruppe 2** wurden alle Katzen mit erhöhten Serum-Creatinin- und/oder Harnstoffwerten eingeordnet. Diese Tiere dienten dazu, den Zusammenhang zwischen GFR-

Werten und etablierten „Retentionsparametern“ der Nieren zu überprüfen sowie den Bereich zu bestimmen, ab dem die Prognose als sehr ungünstig zu stellen war.

In **Gruppe 3** wurden die Katzen eingeordnet, bei denen ein Verdacht auf eine subklinische Nierenfunktionsstörung vorlag. Von den dieser Gruppe zugeordneten Katzen wiesen n=10 im Ultraschall in Zahl und Größe unterschiedliche Zysten und n=2 Katzen Veränderungen des Harnstatus auf.

Bei den Tieren lag keine Erhöhung der Serum-Harnstoff- und/oder -Creatinin-Werte vor. Diese Katzen dienten dazu festzustellen, inwieweit die Clearancebestimmung anhand der modifizierten Plasmaclearance des Markers Creatinin im sog. Creatinin-blinden Bereich zur Früherkennung einer kompensierten Nierenerkrankung geeignet war.

Die Herkunft der Katzen sowie ihre Einordnung in die Gruppen 1-3 ist Tabelle 3-1 zu entnehmen.

Insgesamt wurden 25 Versuchskatzen untersucht. Davon stammten 11 von der Firma Biopharm und 14 aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FU Berlin. Sie wurden alle der Gruppe 1 zugeordnet. Die übrigen Katzen wurden als Patienten in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin und der I. Med. Tierklinik der Universität München vorgestellt. Die unter „Sonstige“ aufgeführten Katzen stammten aus anderen Praxen oder wurden von den Katzenhaltern für die Clearancebestimmung zur Verfügung gestellt.

Tabelle 3-1: Herkunft der Versuchskatzen und Patienten sowie Einordnung in die Gruppen 1-3

	Anzahl der Katzen			
	Gesamt	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3
Fa. Biopharm	11	11	0	0
Institut für Pharmakologie und Toxikologie der FU Berlin	14	14	0	0
I. Med. Tierklinik der LMU München	24	0	16	8
Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin	18	0	4	14
Sonstige	24	0	14	10
Gesamt	91	25	34	32

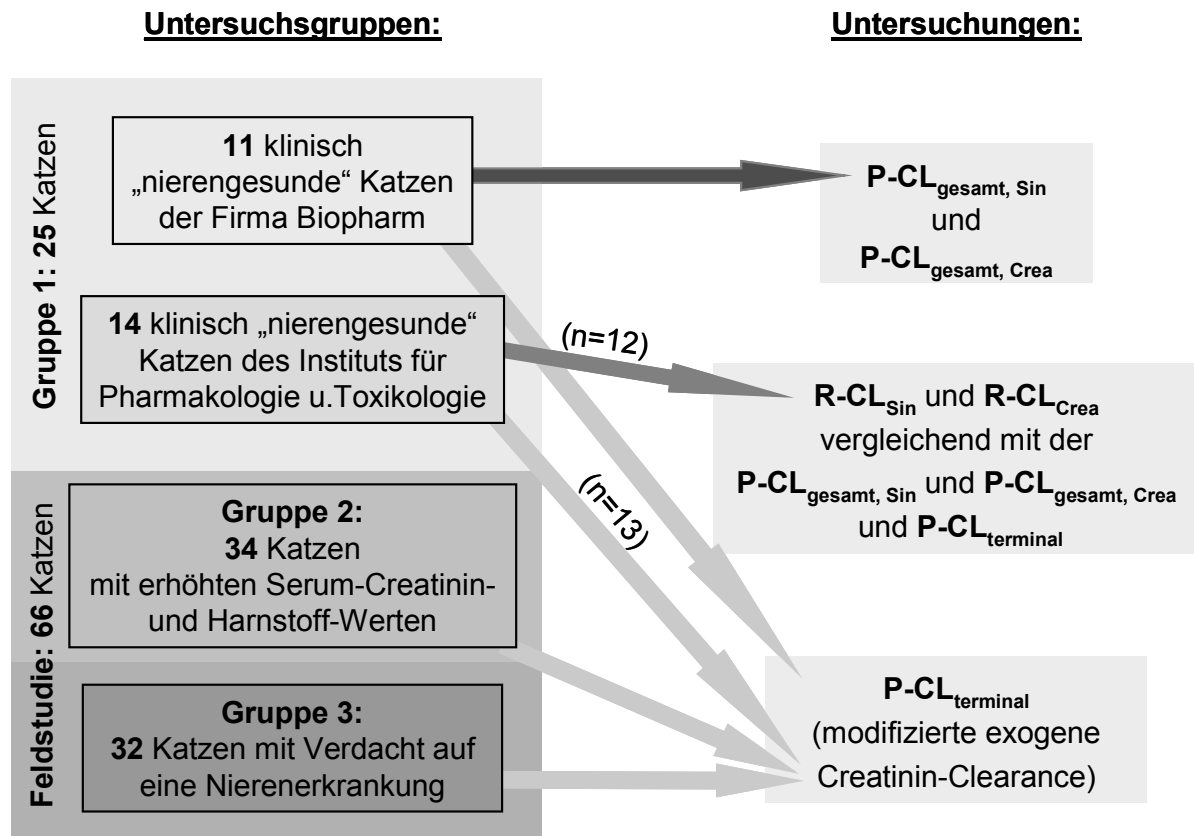


Abbildung 3-1: Einteilung der Katzen in Untersuchungsgruppen und durchgeführte Clearancemessungen.

Von den 14 Katzen des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie wurde bei $n=12$ Tieren die Bestimmungen der R-CL durchgeführt.

Für die Bestimmung der $P-CL_{\text{terminal}}$ wurden 11 dieser Tiere sowie zwei andere Katzen verwendet, so dass insgesamt $n=13$ Tiere in die Untersuchung eingingen.

Bei 90 Katzen wurde die modifizierte Plasmaclearance des Markers Creatinin (modifizierte exogene Creatinin-Clearance, $P-CL_{\text{terminal}}$) durchgeführt (Abbildung 3-1, hellgraue Pfeile). Weiterhin wurde bei einem Teil der Katzen ($n=11$) die Plasmaclearance als Gesamtclearance ($P-CL_{\text{gesamt}}$) von Creatinin und Sinistrin (mittelgraue Pfeile) und bei $n=12$ weiteren Tieren die renale Clearance (R-CL) dieser Marker bestimmt (dunkelgraue Pfeile). Welche Untersuchungen im Einzelnen an den Katzen durchgeführt wurden, ist Kapitel 3.2 und Abbildung 3-1 zu entnehmen.

Rasse- und Geschlechtsverteilung

Es wurden insgesamt 66 Katzen der Rasse Europäisch Kurzhaar (EKH), 15 Perserkatzen, 4 Siamkatzen und jeweils eine Katze der Rassen Karthäuser und Oriental Red sowie 2 Perser-Mischlinge und 2 Burma-Katzen untersucht. Von den insgesamt 91 Katzen waren 49 männlich (davon 29 kastriert) und 41 weiblich (davon 12 kastriert) (Tabelle 3-2).

Tabelle 3-2: Rasse- und Geschlechtsverteilung der untersuchten Katzen.

Anzahl insg.		91	Anteil (%)
Rasse	EKH	66	72,5
	Perser	15	16,5
	Siam	4	4,4
	Karthäuser	1	1,1
	Burma	2	2,2
	Oriental Red	1	1,1
	Perser-Mix	2	2,2
Geschlecht	weiblich	29	31,9
	weiblich kastriert	12	13,2
	männlich	20	22,0
	männlich kastriert	29	31,9
	unbekannt	1	1,1

Altersverteilung

Die Katzen wurden in 4 Altersklassen unterteilt (Tabelle 3-3). Die Altersklasse 1 bestand aus Tieren, die jünger als 2 Jahre waren. Die Altersklasse 2 enthielt 2-6 Jahre alte Tiere, Klasse 3 die >6-10 Jahre alten Tiere und in Klasse 4 wurden Tiere eingeordnet, deren Alter mehr als 10 Jahre betrug.

Tabelle 3-3: Altersklassen der untersuchten Katzen.

Altersklasse	Alter	Anzahl n	Anteil an den untersuchten Katzen (%)
1	< 2 J.	26	28,6
2	2 - 6 J.	14	15,4
3	> 6 - 10 J.	18	19,8
4	> 10 J.	31	34,1
-	unbekannt	2	2,2

3.2 Untersuchungsverfahren

3.2.1 Markersubstanzen und Dosierung

Die Creatinin-Lösung wurde durch Einbringen von 5 g Creatinin (Fa. Merck KG, Darmstadt) mittels einer Venenverweilkanüle (B. Braun, Melsungen) in 100 ml Flaschen *Aqua ad inj.* (Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg) hergestellt.

Sinistrin wurde als gebrauchsfertige 25 %ige Lösung (Inutest[®]) von der Fa. Fresenius (Linz, Österreich) bezogen.

Creatinin wurde in einer Dosis von 2 g je m² Körperoberfläche (KOF) und Sinistrin in einer Dosis von 9 g je m² KOF verabreicht. Die Berechnung der KOF erfolgte nach der Meeh'-Formel (MEEH, 1879; SPECTOR, 1961):

$$[21] \text{ KOF} = \text{KM}^{0,667} \cdot k$$

$$k_{\text{Katze}} = 0,1$$

KOF: Körperoberfläche (m²)

KM: Körpermasse (kg)

3.2.2 Durchführung der Plasmaclearance

Die Plasmaclearance (P-CL) wurde am nicht sedierten Tier ermittelt.

Die Katzen erhielten 12 Stunden vor und während des Versuchs kein Futter; Trinkwasser stand *ad lib.* zur Verfügung. (Ausnahme: 1 Versuchsreihe zur Bestimmung der Gesamtclearance erfolgte mit gefütterten Tieren, s. Studie 1)

Die Blutentnahmen und die Applikation der Markersubstanzen erfolgten über die *Vena cephalica antebrachii*. Zu diesem Zweck wurde nach Rasur und Desinfektion der Punktionsstelle ein venöser Zugang mittels einer Venenverweilkanüle (Vasocan[®] Braunüle[®] 20 G 1¼'', Fa. B. Braun, Melsungen) gelegt.

Für die Erstellung des Blutbildes wurde ca. 1 ml Blut in ein EDTA-K Röhrchen (Fa. Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth) und für die übrigen Blutparameter wurden 2 ml Blut in ein Serumröhrchen (Fa. Kabe Labortechnik) entnommen. Anschließend wurden dem Tier die Creatinin-Lösung und ggf. die Sinistrin-Lösung über die Braunüle appliziert.

Die Braunüle wurde mit einem Mandrin Vasofix[®] (20G x 33 mm, Fa. B. Braun) verschlossen und mit einem Verband aus Rolta[®]-Watte (Fa. Hartmann, Heidenheim) und Peha-Haft[®] (Fa. Hartmann) gesichert.

Jeweils zu den Blutentnahmezeitpunkten (s. u.) wurden Verband und Mandrin entfernt und nach Verwerfen einiger Tropfen ca. 2 ml Blut in ein Serumröhrchen entnommen.

Nach der letzten Blutentnahme wurde die Braunüle entfernt und die Punktionsstelle mit einem Druckverband versorgt.

Insgesamt sind 3 Studien zur Bestimmung der Plasmaclearance (P-CL) mit unterschiedlichen Blutentnahmezeitpunkten durchgeführt worden (Tabellen 3-4 bis 3-6):

Studie 1: Zur Bestimmung der Gesamtclearance (P-CL_{gesamt}) wurde bei 11 Tieren der Gruppe 1 die Plasmaclearance der Marker Sinistrin und Creatinin ermittelt. Der Ab-

lauf der Untersuchung sowie die Zeitpunkte, an denen die Blutproben entnommen wurden, sind Tabelle 3-4 zu entnehmen.

Tabelle 3-4: Zeitpunkte der Probenentnahmen zur Ermittlung der P-CL_{gesamt} der Marker Sinistrin und Creatinin bei 11 klinisch „nierengesunden“ Katzen (Katze 15-25).

Probe	Maßnahmen	Zeit (min)
1	Entnahme von Blutproben für Hämatologie und Elektrolytbestimmung, Bestimmung des Basiswertes Creatinin	-5
-	Applikation der Markersubstanzen	0
2	Entnahme jeweils einer Blutprobe zur Bestimmung des Creatinin- und Sinistrin-Gehaltes	5
3		15
4		30
5		40
6		60
7		120
8		180
9		360
10		540
11		720

Es wurde bei jedem Tier 3 Mal eine Bestimmung der P-CL_{gesamt} mit unterschiedlicher Applikationsart der Markersubstanzen bzw. Fütterung durchgeführt:

- a) Bei der ersten Versuchsserie wurden den Tieren beide Markersubstanzen *i. v.* appliziert, und die Tiere wurden 12 h vor und während des Versuchs **nüchtern** gehalten.
- b) Während der zweiten Versuchsserie wurden wieder beide Markersubstanzen *i. v.* appliziert, die Tiere wurden 12 h vor Versuchsbeginn nüchtern gehalten, erhielten aber während des Versuchs **Trockenfutter ad lib.** und 100 g Feuchtfutter pro Tier.
- c) In der dritten Versuchsserie wurden die Tiere 12 h vor und während des Versuchs **nüchtern** gehalten. Es wurde ihnen ausschließlich Creatinin *s. c.* appliziert.

Ziel war es, den Zeitraum *p. appl.* der Markersubstanz, innerhalb dessen der Abfall des Creatinin-Spiegels im Blut ausschließlich durch renale Elimination zu Stande kommt, einzugrenzen sowie den Einfluss der Fütterung und der unterschiedlichen Applikationsarten auf die Clearance zu untersuchen.

Studie 2: Bei 13 klinisch „nierengesunden“ Katzen der Gruppe 1 wurde die P-CL_{terminal} der Substanz Creatinin anhand von 4 Blutproben nach Applikation des

Markers bestimmt (Tabelle 3-5). Die Tiere wurden 12 h vor und während der Untersuchung nüchtern gehalten; Wasser stand *ad lib.* zur Verfügung.

Ziel war es – zusammen mit den Ergebnissen aus Studie 1a) – einen Referenzbereich für die $P\text{-}CL_{\text{terminal}}$ festzulegen.

Tabelle 3-5: Zeitpunkte der Probenentnahmen zur Ermittlung der $P\text{-}CL_{\text{terminal}}$ des Markers Creatinin bei 13 klinisch „nierengesunden“ Katzen (Katze 1-8, 10-14).

Gruppe1: n=8	Gruppe 2: n=5
1. ante applicationem	
Applikation der Creatininlösung	
2. 180 min post appl.	2. 120 min post appl.
3. 240 min post appl.	3. 360 min post appl.
4. 300 min post appl.	4. 420 min post appl.
5. 540 min post appl.	5. 480 min post appl.

Studie 3 (Feldstudie): Die Bestimmungen der Plasmaclearance anhand von 3 Blutproben, die in der terminalen Phase der Ausscheidung des exogenen Creatinins entnommen wurden, wurde sowohl bei klinisch „nierengesunden“ Katzen der Gruppe 1 als auch bei Katzen der Gruppen 2 und 3 (Abbildung 3-1) durchgeführt. Alle Tiere waren 12 h vor und während der Untersuchung nüchtern; Wasser stand *ad lib.* zur Verfügung. Bei den Tieren der Gruppen 2 und 3 erfolgten die Blutentnahmen in einem Zeitraum von 3-8 h *p. appl.* des Creatinins. Falls möglich, wurden aus Gründen der besseren Vergleichbarkeit der Ergebnisse der Clearancebestimmung die in Tabelle 3-6 angegebenen Entnahmezeitpunkte verwendet.

Tabelle 3-6: Zeitpunkte der Probenentnahmen zur Ermittlung der $P\text{-}CL_{\text{terminal}}$ bei klinisch „nierengesunden“ und bei nierenkranken Katzen unterschiedlicher Altersstufen und Rassen (Feldstudie).

1. Blutprobe	ante applicationem
Applikation der Markersubstanz	
2. Blutprobe	180 min post appl.
3. Blutprobe	240 min post appl.
4. Blutprobe	360 min post appl.

Falls andere Zeitpunkte zur Anwendung gelangten, wurde mit der Entnahme der Proben frühestens 180 Minuten *p. appl.* begonnen. Der Zeitraum zwischen den Probenentnahmen betrug mindestens eine Stunde.

Die Blutproben zur Serumgewinnung wurden 10 Minuten in der Eppendorf Zentrifuge 5403 (Fa. Eppendorf Nethler-Hinz, Hamburg) zentrifugiert (relative Zentrifugalbeschleunigung: 2594 x g) und das gewonnene Serum in zwei Eppendorfgefäße abpipettiert (1x zur Sinistrin-Bestimmung, 1x für Creatinin-Bestimmung und klinische Chemie). Die Proben für die Sinistrin-Bestimmung wurden bis zur Analyse bei ca. -20°C gelagert und die Proben zur Creatinin-Bestimmung zusammen mit dem EDTA-Blut bis zur Analyse bei ca. 5°C im Kühlschrank aufbewahrt.

3.2.3 Durchführung der renalen Clearance

Die renale Clearance (R-CL) wurde nach der von FINCO et al. (1981) beschriebenen Methode (vgl. Kap. 2.3.2.1 und Abbildung 3-2) als R-CL nach *i. v.* Bolusapplikation von Creatinin und Sinistrin durchgeführt. Bei dieser Methode war aus den gewonnenen Proben auch die gleichzeitige Bestimmung der P-CL möglich. Dies bot den Vorteil, dass beide Clearancebestimmungen (R-CL und P-CL) direkt miteinander vergleichbar waren. Einflüsse, die zum Tragen kommen können, wenn beide Untersuchungen an verschiedenen Tagen durchgeführt werden (z. B. unterschiedliche Fütterung, Sedation), konnten so ausgeschlossen werden.

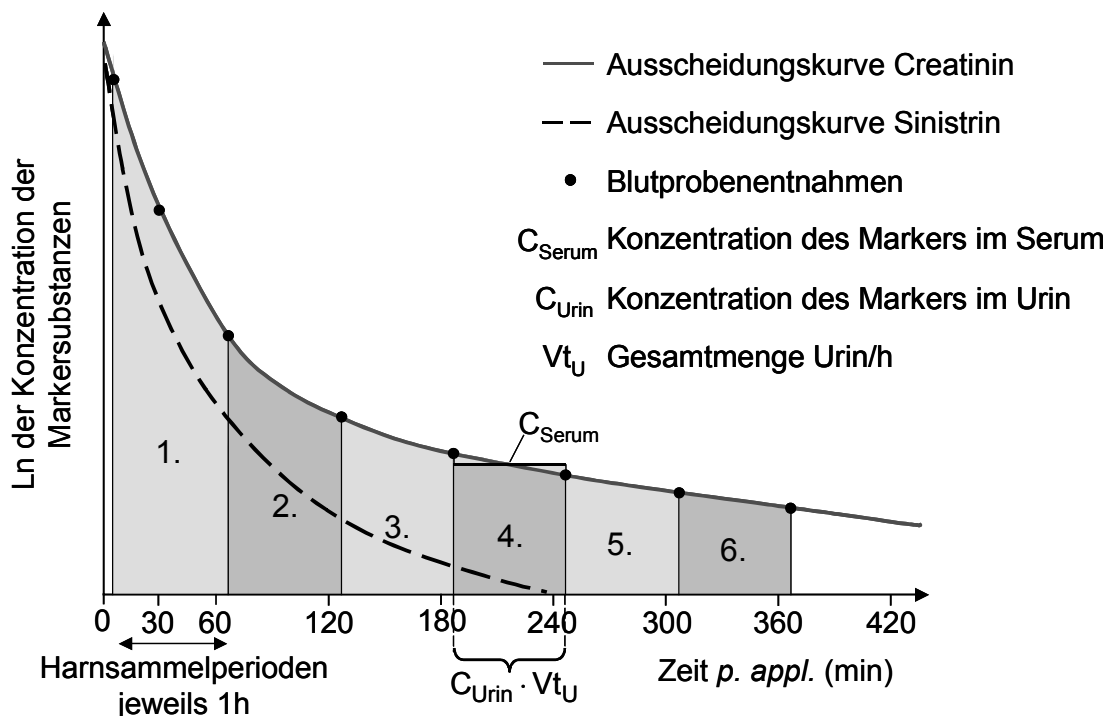


Abbildung 3-2: Versuchsplan für die Durchführung der R-CL nach FINCO et al. (1981)

Das Prinzip der Clearanceberechnung ist exemplarisch für die Substanz Creatinin anhand der 4. Harnsammelperiode dargestellt. Die Berechnung erfolgt analog auch für Sinistrin und für die anderen Harnsammelperioden nach Formel [3].

Die Dauer des gesamten Versuchs betrug 6 Stunden.

Die Katzen erhielten 12 Stunden vor und während des Versuchs kein Futter; Trinkwasser stand *ad lib.* zur Verfügung. Zur Ruhigstellung wurde den Tieren ca. 10 Minuten vor Versuchsbeginn jeweils 15 mg/kg Ketamin (Ketamin 10 %, Fa. Essex, München), 0,5 mg/kg Midazolam (Midazolam 15 mg, Fa. Ratiopharm, Ulm) und 0,01 mg Atropin (Atropinsulfat[®], Fa. B. Braun, AG, Melsungen) *i. m.* injiziert.

Anschließend wurden nach Rasur und Desinfektion der Punktionsstellen bei jedem Tier zwei venöse Zugänge mittels Venenverweilkanüle (Vasocan[®] Braunüle[®] 20 G 1¼'', Fa. B. Braun, Melsungen) in beide *Vv. cephalicae antebrachii* gelegt. Ein venöser Zugang wurde zur Applikation der Markersubstanzen und für die Infusion, der andere zur Blutentnahme genutzt.

Für die Erstellung eines Blutbildes wurde ca. 1 ml Blut in ein EDTA-K Röhrchen (Fa. Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth) sowie für die übrigen Blutparameter (vgl. Kap. 3.3.3) 2 ml Blut in ein Serumröhrchen (Fa. Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth) entnommen.

Mittels eines Harnkatheters (Katzen-Katheter, Fa. Kruuse, Dänemark) wurde die Harnblase der Katzen katheterisiert. Der Katheter wurde vor dem Einführen mit etwas Gel (Xylocain[®] Viskös 2 %, Fa. Astra Zeneca GmbH, Wedel) benetzt und anschließend mit zwei Einzelheften mit Supramid 4/0 (Fa. Heiland, Hamburg) an der Haut befestigt. Für weibliche Tiere wurden Katheter mit einem Außendurchmesser von 1,3 mm und für männliche Tiere Katheter mit einem Außendurchmesser von 1,0 mm verwendet. Mittels Urin-Monovetten (Fa. Sarstedt, Nümbrecht) wurde die Harnblase vollständig entleert.

Um die Körpertemperatur der Tiere konstant zu halten, wurden die Probanden auf einer Wärmematte gelagert. Die Rektal-Temperatur wurde im Abstand von ca. 60 Minuten kontrolliert.

Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurde zu Beginn des Versuchs und nach ca. 3 h Refobacin[®] Augensalbe (Fa. Merck, Darmstadt) in beide Augen appliziert.

Zur Deckung des Flüssigkeitserhaltungsbedarfs erhielten die Katzen während der gesamten Versuchsdauer eine Dauertropfinfusion von 80 ml/kg/24 h einer Vollelektrolytlösung (Sterofundin[®] VG-5, Fa. B. Braun AG, Melsungen) mittels Dosifix[®] (Fa. B. Braun AG, Melsungen). Zur Aufrechterhaltung der Sedation über den Versuchszeitraum wurden 0,1-0,4 mg/kg/min Propofol (Rapinovel[®], Fa. Essex, München) und

0,2-0,4 mg/KG/min Midazolam (Midazolam-Ratiopharm 15 mg, Fa. Ratiopharm, Ulm) *i. v.* in ca. 20-minütigen Intervallen appliziert.

Zum Zeitpunkt 0 wurden den Tieren 9 g Sinistrin/m² KOF (Inutest[®], Fa. Fresenius Linz, Österreich) und 2 g Creatinin/m² KOF (5,0 g Creatinin [Fa. Merck KG, Darmstadt] in 100 ml *Aqua ad inj.* [Fa. Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg]) *i. v.* verabreicht. Die Dosierung entsprach damit der auch für die P-CL_{terminal} und die P-CL_{gesamt} verwendeten Dosierung (vgl. Kap. 3.2.1).

Danach wurde die Harnblase unter Ultraschallkontrolle mit einer 10 ml Spritze (Fa. Codan, Dänemark) vollständig entleert, mit 10 ml *Aqua ad inj.* (Fa. Serum-Werk Bernburg AG, Bernburg) gespült und nochmals entleert. Die Spüllösung wurde zu der entnommenen Harnmenge hinzugegeben, dann wurde der Katheter durch Aufsetzen einer 2 ml Spritze (Fa. Heiland, Hamburg) verschlossen.

Nach 5 und 30 Minuten wurden jeweils 2 ml Blut in ein Serumröhrchen (Fa. Kabe Labortechnik, Nümbrecht-Elsenroth) zur Creatinin- und Sinistrin-Bestimmung entnommen.

Zu den Zeitpunkten 60, 120, 180, 240 und 360 Minuten nach Versuchsbeginn wurde der Katheter geöffnet, die gesamte Harnmenge unter Ultraschallkontrolle mittels einer 10 ml Spritze entnommen, die Harnblase mit 10 ml *Aqua ad inj.* gespült sowie nochmals vollständig entleert und die 2 ml Spritze zum Verschluss wieder aufgesetzt. Jeweils gleichzeitig mit der Urinentnahme wurden je 2 ml Blut in ein Serumröhrchen zur Bestimmung der Creatinin- und Sinistrin-Konzentrationen entnommen.

Nach Ende des Versuchs wurden der Harnkatheter sowie die Venenverweilkanülen entfernt. Die Tiere erhielten bis zum vollständigen Abklingen der Sedation kein Futter.

3.3 Labormethoden

3.3.1 Creatinin-Bestimmung in Serum und Harn

3.3.1.1 Bestimmungsmethoden

Die Creatinin-Werte im Blutserum wurden für die Studien an den Versuchskatzen im Institut für veterinärmedizinische Diagnostik Berlin mittels eines kinetischen Farbtests nach der Jaffé-Methode (Roche Hitachi, Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) ermittelt.

Die Creatinin-Bestimmung erfolgte bei allen Tieren im Blut-Serum. Es wird aber, da die Ergebnisse bei Creatinin-Bestimmungen in Serum und Plasma nahezu identisch sind (KRAFT und DÜRR, 1999), im Folgenden trotzdem der in der Literatur gängige Begriff der Plasmaclearance (vgl. Kap. 2.3.2.2) verwendet.

Um zu überprüfen, ob und inwieweit die Creatinin-Bestimmungsmethode einen Einfluss auf die Ergebnisse der Clearancemessung hat, wurden die Serum- und die Urinproben der Untersuchung zur R-CL zusätzlich zur Jaffé-Methode auch nach der enzymatischen Methode ermittelt (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: VK der Creatinin-Bestimmung bei der R-CL nach Angaben des Labors.

Methode	Gerät	VK Urin	VK Serum
Kinet. Farbttest n. Jaffé	Roche Hitachi	5,2	4,7
Enzymatischer Farbttest	Roche Hitachi	5,2	4,7

Bei den an der I. Med. Tierklinik der Universität München durchgeführten Untersuchungen wurden die Werte mit dem enzymatischen Farbttest Crea Plus (Fa. Boehringer Mannheim Systems) mittels des Hitachi 717 Automatic Analyzers (Fa. Boehringer, Mannheim, VK=3,8 %) bestimmt.

In der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der FU Berlin erfolgte die Creatinin-Bestimmung anhand des Roche Cobas Fara (Fa. Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach der Jaffé-Methode.

3.3.1.2 Vergleich der Jaffé-Methode mit der enzymatischen Creatinin-Bestimmung

Um die in der Literatur u. a. bei Hunden und Menschen beschriebenen Unterschiede in den Ergebnissen von Creatinin-Bestimmungen zwischen der Jaffé- und der enzymatischen Methode (vgl. Kap. 2.4.2) bzgl. der untersuchten Blutserum- und Harnproben der Katzen beurteilen zu können, wurde der Creatinin-Gehalt von insgesamt 220 Proben (117 Serumproben und 103 Urinproben) aus der Studie zur R-CL (vgl. Kap. 3.2.3) nach beiden Methoden bestimmt.

Die Creatinin-Werte in den nach der enzymatischen Methode bestimmten Proben lagen in den meisten Fällen höher, als die Werte die sich bei Messung derselben Proben nach der Jaffé-Methode ergaben (Abbildung 3-3).

Die Ergebnisse der Bestimmungen mittels enzymatischer Methode unterschieden sich signifikant von den Ergebnissen der Bestimmungen mit der Jaffé-Methode (Wilcoxon-Test $p < 0,001$).

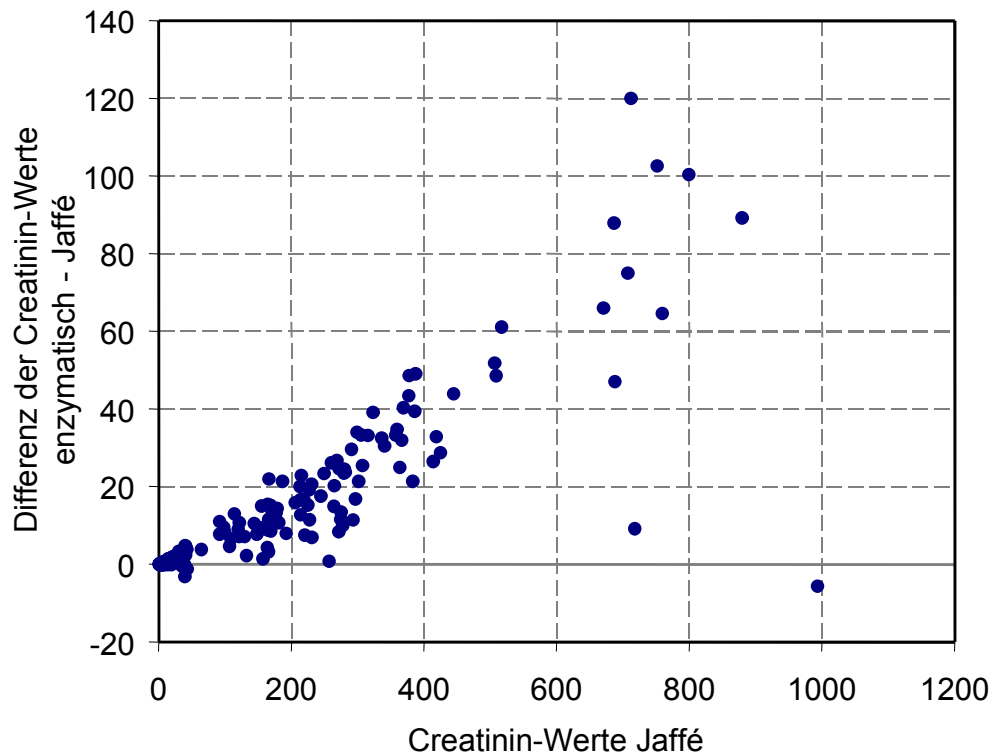


Abbildung 3-3: Ergebnisse der Creatinin-Bestimmung in 220 Blutserum- und Urinproben nach der Jaffé- und der enzymatischen Methode. Aufgetragen sind die Differenzen der Creatinin-Werte zwischen enzymatischer und Jaffé-Methode gegen die Werte der Bestimmung nach der Jaffé-Methode.

Um die Größe des Unterschiedes zwischen den Ergebnissen der Jaffé- und der enzymatischen Methode beurteilen zu können, erfolgte eine Berechnung der Abweichungen in %. Da die Jaffé-Methode in den meisten Laboren zur Anwendung gelangt, wurden im Folgenden die Ergebnisse der Bestimmung nach der Jaffé-Methode gleich 100 % gesetzt. Auf diese Weise wurde ermittelt, wie weit die Ergebnisse der Bestimmungen nach der enzymatischen Methode im Verhältnis hiervon abwichen.

Die Ergebnisse der Bestimmung nach der enzymatischen Methode lagen 6,25 % (3,89-8,49) (Median, 1.-3. Quartil) über den Ergebnissen der Bestimmung nach der Jaffé-Methode. Bei den 103 Urinproben lagen die ermittelten Werte der enzymatischen Methode in allen Fällen über 100 %, bei den 117 Serumproben waren es nur wenige Werte, die darunter lagen (Abbildung 3-4). Die Abweichungen der Serumwerte unterschieden sich signifikant von den Abweichungen der Werte der Urinproben (Mann-Whitney-U-Test $p < 0,001$).

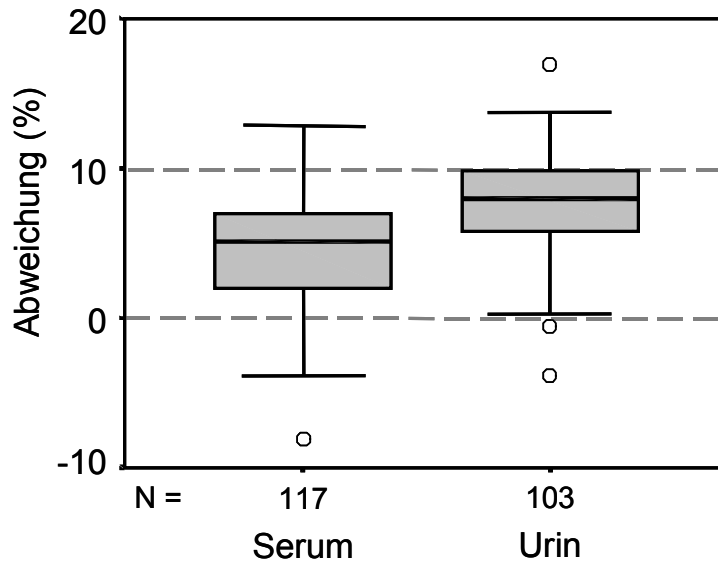


Abbildung 3-4: Abweichung der Werte der Bestimmung der Proben nach der enzymatischen Methode von den Ergebnissen nach der Jaffé-Methode. Die Ergebnisse der Jaffé-Bestimmung wurden gleich 100 % gesetzt.

Creatinin-Werte in Serumproben wurden durch Bestimmung mittels der enzymatischen Methode um 5,1% (2,0-7,0) (Median, 1.-3. Quartil) höher gemessen. Creatinin-Werte in Urinproben fielen bei Bestimmung nach der enzymatischen Methode um 8,0 % (5,7-9,9) (Median, 1.-3. Quartil) höher aus als bei Bestimmung nach der Jaffé-Methode.

Setzte man diese im Mittel auftretende Abweichung in die Formel zur Bestimmung der renalen Clearance (vgl. Kap. 2.3.2.1, Formel [3]) ein, so errechneten sich, dass Clearancewerte, bei denen der Creatinin-Gehalt in den Proben nach der enzymatischen Methode ermittelt wurde, mit einem Faktor von 1,028 zu multiplizieren waren, um zu dem gleichen Clearancewert wie nach Bestimmung der Proben mittels Jaffé-Methode zu kommen ([22] und [23]).

$$[22] R-CL_{\text{Crea}} = \frac{\text{Crea}_{\text{U}}(\text{Jaffé}) \cdot 1,080 \cdot V_{\text{tU}}}{\text{Crea}_{\text{P}}(\text{Jaffé}) \cdot 1,051}$$

$$[23] R-CL_{\text{Crea}}(\text{enzymatisch}) = CL_{\text{Crea}}(\text{Jaffé}) \cdot 1,028$$

Eine Abweichung des Clearancewertes um 2,8 % zwischen beiden Methoden war jedoch nicht so hoch, dass dieser Einfluss wesentlich zum Tragen kam, da der Fehler innerhalb des Bereiches für den VK der Creatinin-Bestimmung lag (s. o.).

Die höheren Werte bei der Messung nach der enzymatischen Methode stehen im Widerspruch zu Angaben in der Literatur, nach denen es bei Anwendung der Jaffé-Me-

thode durch den Einfluss von Nicht-Creatinin-Chromogenen im Blut zu einer Unterschätzung der wahren GFR kommen soll (vgl. Kap. 2.4.2).

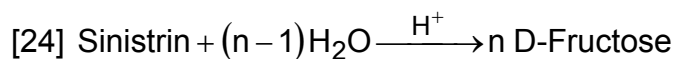
3.3.2 Sinistrin-Bestimmung in Serum und Harn

3.3.2.1 Testdurchführung

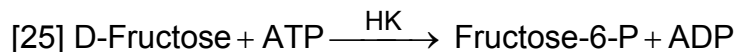
Die Bestimmung der Sinistrinkonzentration in Serum und Urin wurde mittels D-Glucose/D-Fructose UV-Test (Hersteller: Fa. r-biopharm, Darmstadt) durchgeführt. Dabei handelt es sich um einen Test-Kit zur vollenzymatischen Bestimmung von D-Glucose und D-Fructose in Lebensmitteln und anderen Probematerialien (s. auch Abbildung 2-13).

Testprinzip

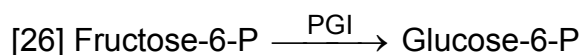
Durch saure Hydrolyse mittels Perchlorsäure (0,3 mol/l) erfolgt eine Aufspaltung des Polyfructosans Sinistrin in die einzelnen Fructosemoleküle [24] (BERGMEYER, 1984).



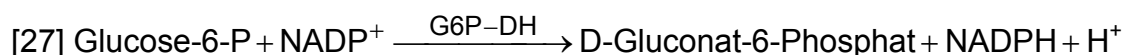
Die entstandene D-Fructose wird durch das Enzym Hexokinase (HK) und nach Zugabe von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) zu D-Fructose-6-Phosphat (Fructose-6-P) phosphoryliert, wobei gleichzeitig Adenosin-5'-diphosphat (ADP) entsteht [25].



Fructose -6-P wird durch das Enzym Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in Glucose-6-Phosphat (Glucose-6-P) überführt [26].



In Gegenwart des Enzyms Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6P-DH) wird Glucose-6-P von Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADP) zu D-Gluconat-6-Phosphat oxidiert. Es entsteht reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH) [27]. Die während der Reaktion gebildete NADPH-Menge ist der D-Fructose-Menge äquivalent.



Die Messgröße NADPH wird bei 340 nm photometrisch bestimmt (Photometer LP 300S, Dr. Lange GmbH, Berlin).

Testdurchführung

In einem Eppendorfgemäß wurde 0,1 ml Serum durch Zugabe von 0,9 ml Perchlorsäure (0,3 mol/l) bei Zimmertemperatur enteiweißt. Danach wurde die Probe einige Sekunden mittels des Schüttelgerätes Reax 2000 (Fa. Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kehlheim) durchmischt und anschließend 5 Minuten bei einer Zentrifugalkraft von 8.500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in zwei Eppendorfgemäß abpipettiert. Ein Eppendorfgemäß wurde 15 Minuten im Wasserbad (GFL Wasserbad Thermed 5001, Gesellschaft für Labortechnik, Großburgwedel) bei 80°C inkubiert (Probelösung), das zweite diente als Proben-Leerwert-Ansatz und verblieb bei Raumtemperatur.

Durch die Temperatureinwirkung und die Säure erfolgte die hydrolytische Aufspaltung des Sinistrins in einzelne Fructosemoleküle. Nach Abkühlung der Probenlösung auf Raumtemperatur wurde folgender Bestimmungsansatz hergestellt (Tabelle 3-8):

In drei Küvetten (Leerwert-Ansatz und Doppelbestimmung) wurden jeweils 1,9 ml *Aqua bidest.* und 1,0 ml Lösung 1 des Test-Kits (ATP, NADP, Puffer) gegeben. Für den Leerwert-Ansatz wurde 0,1 ml Proben-Leerwert-Ansatz dazugegeben und in die beiden anderen Küvetten jeweils 0,1 ml Probenansatz. Der Proben-Leerwert-Ansatz dient der Bestimmung der freien Glucose und Fructose im Blutserum (BERGMEYER, 1984).

Tabelle 3-8: Einzelschritte des Bestimmungsverfahrens.

in Küvetten pipettieren	Probenleerwert	Probe (2x)
Lösung 1	1,000 ml	1,000 ml
aus Leerwertansatz	0,100 ml	
Probelösung		0,100 ml
Bidest. Wasser	1,900 ml	1,900 ml
mischen, nach ca. 3 Minuten Extinktionen der Lösung messen (E1). Reaktion starten durch Zugabe von		
Suspension 2	0,020 ml	0,020 ml
mischen, nach ca. 10-15 Minuten Extinktionen der Lösung messen (E2). Anschließend zugeben		
Suspension 3	0,020 ml	0,020 ml
mischen, nach 10-15 Minuten Extinktion der Lösungen messen (E3).		

Nach Stillstand der Vorreaktion (ca. 3 min) wurde die Extinktion E_1 gemessen, anschließend wurde in alle drei Küvetten jeweils 0,020 ml Suspension 2 des Test-Kits (Hexokinase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) gegeben. Nach 15 Minuten

erfolgte die Bestimmung der Extinktion E_2 . Es wurden 0,020 ml der Suspension 3 (Phosphoglucose-Isomerase) dazugegeben, und nach weiteren 15 Minuten wurde die Extinktion E_3 gemessen.

Die Sinistrin-Bestimmung im Urin wurde analog zu der im Blutserum durchgeführt. Lediglich bei der Urinprobe 1 jedes Tieres wurde auf Grund des hohen Sinistrin-Gehaltes eine Verdünnung von 1 Teil Urin auf 9 Teile Wasser durchgeführt.

Berechnung

Die Berechnung erfolgt nach folgender Formel:

$$[28] \Delta E_{\text{Fructose}} = (E_3 - E_2)_{\text{Probe}} - (E_3 - E_2)_{\text{Leerwert}}$$

$$[29] C_{\text{Inulin}} = \frac{V \cdot \text{MG} \cdot F}{\epsilon \cdot d \cdot v \cdot 1000} \cdot \Delta E$$

V: Testvolumen [ml]

v: Probevolumen [ml]

MG: Molekulargewicht der zu bestimmenden Substanz [g/mol]

d: Schichtdicke [cm]

ϵ : Extinktionskoeffizient von NADPH bei 340 nm = $6,3 \text{ [l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}]$

$$[30] C_{\text{Inulin}} = \frac{3,040 \cdot 162,16 \cdot \Delta E_{\text{Fructose}} \cdot F}{\epsilon \cdot 0,100 \cdot 1,00 \cdot 1000} \text{ [g}_{\text{Inulin}}/\text{l}_{\text{Probe}}]$$

Der Verdünnungsfaktor F für die Bestimmung von Sinistrin im **Blutserum** errechnet sich aus folgenden Faktoren:

$$F = \frac{0,100 \cdot 1,03 \cdot 0,92 + 0,900}{0,100} = 9,9476$$

Flüssigkeitsanteil im Serum: 0,92

Dichte des Serums: 1,03 g/ml

Probevolumen: 0,100 ml

Perchlorsäure-Volumen: 0,900 ml

Nach Einsetzen aller Faktoren ergibt sich folgende Berechnungsformel:

$$[31] C_{\text{Inulin}} = 7,784 \cdot \Delta E_{\text{Fructose}} \text{ [g}_{\text{Inulin}}/\text{l}_{\text{Probe}}]$$

Der Verdünnungsfaktor F für die Bestimmung von Sinistrin im **Urin** beträgt $F=10$. Wie bereits oben erwähnt, war auf Grund der hohen Sinistrin-Konzentrationen in den Urinproben 1 aller Tiere eine weitere Verdünnung notwendig, so dass F für die Probe 1 100 betrug.

Daraus ergibt sich für die Bestimmung von Sinistrin im Urin für die Probe 1:

$$[32] C_{\text{Inulin}} = 78,249 \cdot \Delta E_{\text{Fructose}} \text{ [g}_{\text{Inulin}}/\text{l}_{\text{Probe}}]$$

Für die Urinproben 2-6 gilt:

$$[33] C_{\text{Inulin}} = 7,825 \cdot \Delta E_{\text{Fructose}} [g_{\text{Inulin}}/l_{\text{Probe}}]$$

Für jede Blutserum- und Urinprobe war ein eigener Leerwert zu bestimmen. Die Doppelbestimmung der Probe diente der Überprüfung der Genauigkeit. Aus den Ergebnissen der Doppelbestimmung wurde der Mittelwert gebildet. Bei einer Abweichung von $>0,010$ Extinktionseinheiten zwischen den Doppelbestimmungen wurde die Messung der Werte wiederholt.

3.3.2.2 Präzision und Richtigkeit der Methode

Da auf dem deutschen Arzneimittelmarkt kein speziell für die Sinistrinbestimmung entwickelter Test-Kit erhältlich ist, wurde die vom Hersteller des Sinistrins (Fa. Fresenius, Linz) empfohlene Methode der hydrolytischen Aufspaltung durch Perchlorsäure und anschließenden vollenzymatischen Analyse mittels eines D-Glucose/D-Fructose UV-Tests verwendet.

Zur Etablierung des Tests wurden Versuchsreihen mit unterschiedlichen, definierten Konzentrationen von Sinistrin in Blutserum und *Aqua dest.* unter verschiedenen Versuchsbedingungen durchgeführt (Tabelle 8-1 im Anhang).

Präzision

Die Präzision einer Methode ist die Abweichung der Messwerte untereinander bei mehrfacher Bestimmung einer Probe (BECKER, 1987).

Laut Beschreibung des Test-Kits ist bei einer Doppelbestimmung, ausgehend von einer Probenlösung, mit Unterschieden bei den Extinktionsdifferenzen von 0,005 bis 0,010 Extinktionseinheiten zu rechnen. Das entspricht bei einem Probenvolumen $v=0,100$ ml und Messung bei 340 nm einer Konzentration von 4-8 mg Fructose/l.

Da bei der Probenvorbereitung eine Verdünnung vorgenommen wurde (Zugabe von 0,9 ml Perchlorsäure zu 0,1 ml Serum), ist mit dem Verdünnungsfaktor F zu multiplizieren. Es ist also davon auszugehen, dass die gemessenen Sinistrin-Konzentrationen um 40-80 mg/l um den tatsächlichen Wert schwanken. Diese Feststellung zur Präzision des Verfahrens konnte durch die eigenen Untersuchungen bestätigt werden (Tabelle 8-1).

Sensitivität

Unter Sensitivität ist die analytische Empfindlichkeit eines Tests zu verstehen (BECKER, 1987).

Die geringste Extinktionsdifferenz, die das Bestimmungsverfahren unterscheiden kann, beträgt 0,005 Extinktionseinheiten oder 0,4 μg Inulin pro Ansatz. Das ent-

sprache bei einem Probevolumen von 0,100 ml 4 mg/l Probelösung (BERGMEYER, 1984). Auf Grund des Verdünnungsfaktors (s. o.) ergibt sich auch hier ein Wert von 40-80 mg/l.

Die gemessenen Extinktionsdifferenzen zwischen den Messungen E_1 , E_2 und E_3 sollten zur Erzielung eines ausreichend präzisen Ergebnisses in der Regel mindestens 0,100 Extinktionseinheiten betragen.

Die untere Nachweisgrenze von 40-80 mg D-Fructose/l ergibt sich ebenfalls aus der Extinktionsdifferenz von 0,005-0,010 und dem Probevolumen von 0,100 ml.

Spezifität

Die analytische Spezifität ist ein Maß dafür, inwieweit das verwendete Verfahren nur die zu untersuchende Substanz erfasst bzw. in welchen Mengen andere Substanzen mitbestimmt werden (BECKER, 1987).

Da laut Beipackzettel die Enzyme für die Umsetzung der D-Glucose (Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase) und der D-Fructose (Phosphoglucoseisomerase) spezifisch sind, hat die Blutserumglucose keinen Einfluss auf das Analyseergebnis. Die Präzision der D-Fructosebestimmung ist erst ab einem Verhältnis von D-Glucose zu D-Fructose von mehr als 10:1 beeinträchtigt.

Linearität und Richtigkeit

Die Richtigkeit einer Methode ist definiert als die Differenz der Messwerte in Relation zum vorgegebenen Sollwert (BECKER, 1987). Diese wird im Folgenden als Wiederauffindungsrate (WAR) des Sinistrins (1-Richtigkeit) angegeben.

Zur Überprüfung der Linearität der Wiederauffindung des Sinistrins im Blutserum wurden 84 Einzelmessungen bei Konzentrationen zwischen 20 und 2000 mg/l durchgeführt (Tabelle 8-1). In diesem Konzentrationsbereich lag die mittlere Wiederauffindungsrate bei 89,7 %, der Variationskoeffizient betrug 6,6 %.

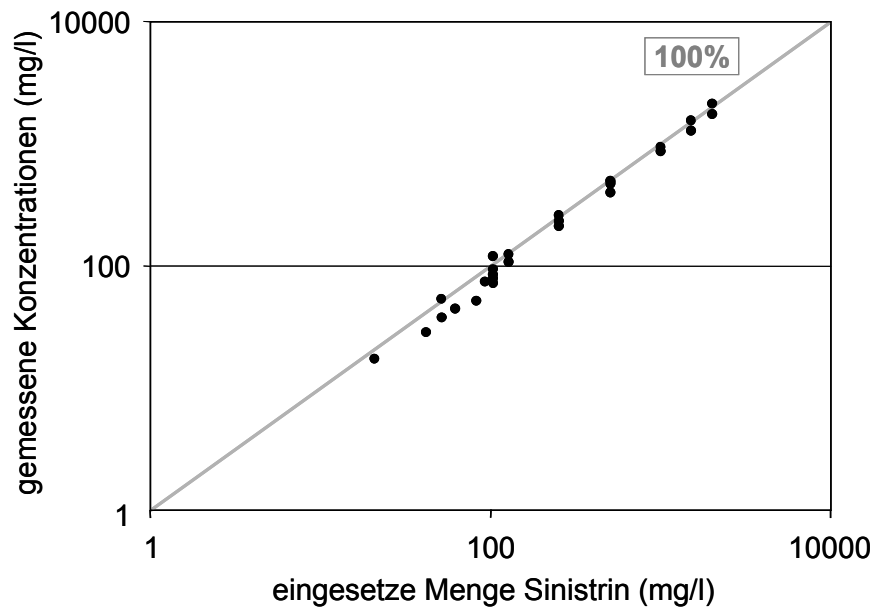


Abbildung 3-5: Vorgegebene Sinistrin-Konzentrationen in Relation zur Wiederauffindungsrate.

Da auf Grund der durch die Bestimmungsmethode gegebenen Präzision mit Abweichungen von 40-80 mg (s. o.) zu rechnen war, lag bei geringen Konzentrationen ein größerer relativer Fehler vor. Bei Konzentrationen unter 100 mg/l war die Wiederauffindungsrate geringer als bei höheren Konzentrationen, und die Schwankungen der Wiederauffindungsraten waren größer (Abbildungen 3–5 und 3–6).

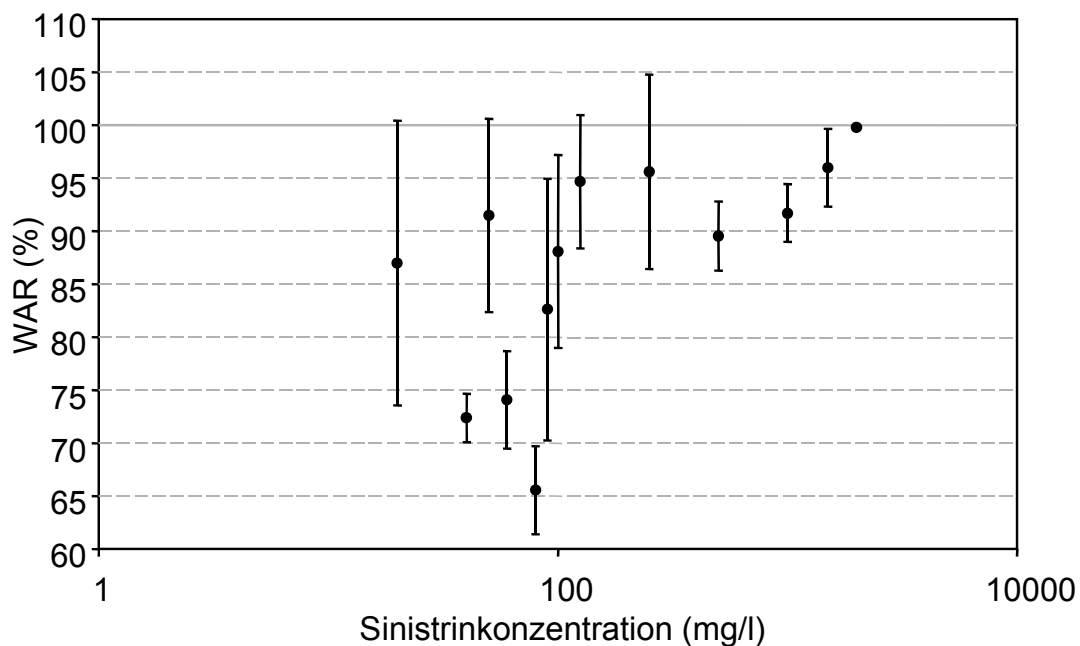


Abbildung 3-6: Wiederauffindungsraten (WAR) bei verschiedenen Konzentrationen (angegeben sind jeweils die MW der Einzelmessungen \pm SD). Die Anzahl der bei den verschiedenen Konzentrationen durchgeführten Einzelbestimmungen ist Tabelle 8-1 zu entnehmen.

Die Bestimmung zeitlich aufeinanderfolgender Serumproben nach Bolusinjektion von Sinistrin (s. Kap. 3.2.3) ergab bis auf wenige Ausnahmen absteigende Konzentrationen auch in niedrigen Messbereichen. Daraus ist zu folgern, dass die Methode der Sinistrin-Bestimmung eine ausreichende Präzision aufweist.

Fehlerquellen

Da eine mögliche Ursache für unzureichende Wiederauffindungsraten in einer ungenügenden Enteiweißung der Proben liegen kann, wurden neben der empfohlenen Säurekonzentration von 0,3 mol/l auch Versuche mit 0,6 und 0,9 mol/l Perchlorsäure durchgeführt. Das zu untersuchende Blutserum enthielt 500 mg Sinistrin/l.

Bereits bei einer Säurekonzentration von 0,3 mol/l erfolgt eine nahezu vollständige Entproteinisierung der Probenlösung (Tabelle 3-9). Eine höhere Säurekonzentration ergab keine bessere Enteiweißung. Wahrscheinlich auf Grund von durch den nicht mehr optimalen pH-Wert abnehmenden Enzymaktivitäten stellten sich nachfolgend schlechtere Wiederauffindungsraten ein.

Tabelle 3-9: pH-Wert, Proteingehalt und Wiederauffindungsrate des Sinistrins in Abhängigkeit von der eingesetzten Säurekonzentration (Perchlorsäure).

Säurekonzentration (mol/l)	n	pH-Wert der Probelösung	Proteingehalt (g/dl)	MW der WAR (%)
0,3	6	7,53	< 0,01	85
0,6	4	7,31	< 0,01	59
0,9	4	7,10	0,02	14

Vergleichende Bestimmung von Sinistrin und Inulin

Wie in Kap. 2.4.3 beschrieben, ist das Verhalten von Sinistrin im Körper dem von Inulin gleichzusetzen. Laut MERTZ und SARRE (1963) soll auch die quantitative Bestimmung von Sinistrin in Harn und Plasma mit der von Inulin identisch sein. Beide Stoffe werden durch hydrolytische Spaltung in einzelne Fructosemoleküle und einen kleinen Anteil an Glucosemolekülen zerlegt.

Um nachzuweisen, dass diese Feststellung auch für die von uns angewandte Methode gilt, wurden (analog zu den oben beschriebenen Versuchen zur Bestimmung der WAR von Sinistrin) Inulin-Lösungen in verschiedenen Konzentrationen von 50-2000 mg Inulin/l *Aqua dest.* hergestellt (Abbildung 3-7). Die Messungen ergaben eine mittlere Wiederauffindungsrate von 92,2 % mit einem VK von 8,1 % und unterschied-

den sich damit nur geringfügig von den beim Sinistrin gemessenen Werten (mittlere WAR 89,7 %, VK 6,6 %).

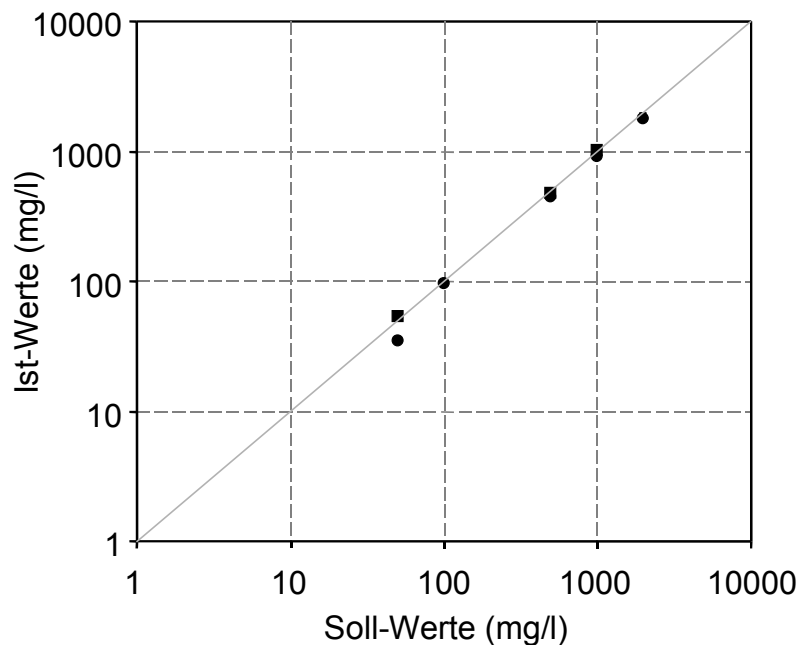


Abbildung 3-7: Wiederauffindungsraten von Inulin in Aqua dest. bei verschiedenen Konzentrationen.

Bei jeder Konzentration wurden 2 Doppelbestimmungen durchgeführt.

Da sich der Marker Sinistrin also weder durch seinen Kinetik im Körper noch durch den labordiagnostischen Nachweis in Blutserum oder Harn wesentlich von dem Marker Inulin unterscheidet, können die nach Anwendung der Sinistrin-Clearance ermittelten Werte mit den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen und Aussagen zur Inulin-Clearance verglichen werden.

Änderungen des Bestimmungsverfahrens für Sinistrin

Auf Grund der Voruntersuchungen wurde die Methode der Sinistrin-Bestimmung gegenüber der Anleitung zum Test-Kit folgendermaßen abgewandelt.

Es wurde lediglich **ein** Ansatz aus Serum und Perchlorsäure für einen Leerwertansatz und die beiden Probenansätze für eine Doppelbestimmung hergestellt. Dadurch, dass die Enteiweißung in einem Schritt erfolgte, konnte eine wesentlich geringere Abweichung zwischen den Doppelbestimmungen erzielt werden.

Perchlorsäure und Serum wurden mit Hilfe des Schüttelgerätes Reax 2000 (Fa. Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim) gründlich durchmischt, um eine möglichst vollständige Enteiweißung der Serumproben zu erzielen.

Nach der Zentrifugation wurde der entstandene Überstand abpipettiert. Dadurch wurde verhindert, dass eine partielle Durchmischung von Überstand und Proteinen erfolgte.

In der Anleitung zum Test-Kit wird empfohlen, bei Zuckerkonzentrationen über 500 mg/l eine 10-fache Verdünnung der Serumprobe vorzunehmen. In eigenen Untersuchungen bei Sinistrin-Konzentrationen von 1000, 1500 und 2000 mg/l konnte jedoch in den unverdünnten Proben bei allen drei Konzentrationen eine bessere Wiederauffindungsrate nachgewiesen werden (Tabelle 8-1). Aus diesem Grund wurde bei der Bestimmung der Sinistrin-Werte im Katzenserum auf eine Verdünnung verzichtet. Bei den Urinproben wurde lediglich bei Probe 1 (erste Urin-Sammelperiode nach Sinistrin-Applikation) eine Verdünnung vorgenommen (vgl. Kap. 3.3.2.1).

Bei Konzentrationen unter 80 mg/l wird eine Erhöhung des Probenvolumens zur Erzielung ausreichend großer Extinktionsdifferenzen empfohlen. Eine höhere Wiederauffindungsrate durch Einsatz eines größeren Probenvolumens (0,2 oder 0,5 ml) bei Konzentrationen ≤ 100 mg/l konnte durch eigene Untersuchungen bestätigt werden (Tabelle 8-1). Bei der Bestimmung zeitlich aufeinanderfolgender Serumproben bestand die Schwierigkeit festzulegen, ab wann mehr Probenvolumen einzusetzen ist. Uns stand nur eine begrenzte Menge Probenvolumen zur Verfügung. Da bei Werten unter 100 mg/l auf Grund der Präzision der Methode ohnehin mit Fehlern von 40-80 mg/l zu rechnen ist (s. o.), wurde einheitlich in allen Konzentrationsbereichen ein Probenvolumen von 0,100 ml verwendet.

3.3.3 Weitere Blutparameter

Bei den Versuchskatzen, deren Clearancewerte zur Bestimmung des Referenzbereichs für die GFR verwendet wurden, wurden nachfolgend aufgeführte Laborparameter erhoben (Tabelle 3-10).

Diese dienten dazu, den Gesundheitszustand der Katzen möglichst umfassend beurteilen zu können. Es sollten ausschließlich die Werte klinisch gesunder Katzen zur Bildung des Referenzbereichs für die GFR verwendet werden.

Tabelle 3-10: Parameter in Blut und Blutserum, Bestimmungsmethoden und Analysegeräte mit VK, sowie Referenzbereiche (Referenzbereiche nach KRAFT und DÜRR, 1999).

Parameter	Bestimmungsmethode	Gerät	VK (%)	Referenzbereich	
Natrium	Indir. ionenselektive Messung	Modulares System ISE900 (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)	1,3	145 - 158 mmol/l	
Kalium	Indir. ionenselektive Messung		2,1	3,0 - 4,8 mmol/l	
Creatinin	s. Tabelle 3-7			<168 µmol/l	
Calcium	Kresolphthalein Komplex	Modulares System P800 (Fa. Roche Diagnostics, Mannheim)	1,6	2,3 – 3,0 mmol/l	
Phosphat	Ammoniummolybdat Komplex		2,4	0,8 – 1,9 mmol/l	
Magnesium	photometrischer Farbtest (Xylidylblau)		3	0,6 – 1,3 mmol/l	
Harnstoff	Urease-GLDH Methode		3,4	5,0 – 11,3 mmol/l	
Glucose	enzymatische Bestimmung (Hexokinase-Methode)		3,6	3,9 – 8,3 mmol/l	
Alanin-Amino-Transferase (ALT)	kinetischer UV-Test		4,3	bis 1167 nkat/l	
Protein, gesamt	photometrische Biuret-Methode		2	57-94 g/l	
Osmolalität	Cryoskopie			290 – 315 mosmol/kg H ₂ O	
Erythrozyten	Widerstandsmessung		Blutzell-Counter SE-9000 (Fa. Sysmex, Norderstedt)	1,9	5,0 – 10,0 x 10 ¹² /l
Thrombozytenzahl	Widerstandsmessung			2,8	180 – 550 10 ⁹ /l
Hämoglobin	SLS Hb Messung	1,3		5,6 – 9,3 mmol/l	
Hämatokrit		2,1		0,30 – 0,44 l/l	
Leukozyten	Widerstandsmessung			6 – 11 10 ⁹ /l	
Neutrophile Granulozyten	Mikroskop, manuelle Differenzierung		4,4	60 – 78 %	
Eosinophile Granulozyten	Mikroskop, manuelle Differenzierung		3,9	0 – 6 %	
Basophile Granulozyten	Mikroskop, manuelle Differenzierung		3,9	bis 1 %	
Lymphozyten	Mikroskop, manuelle Differenzierung		3,9	15 – 38 %	
Monozyten	Mikroskop, manuelle Differenzierung		3,9	0 – 4 %	
MCHC	Berechnung			19-22 mmol/l	
MCH				0,8 – 1,0 fmol	
MCV				40 – 55 fl	

3.3.4 Harnuntersuchung

Ebenso wie die in Kapitel 3.3.3 genannten Blutwerte diente auch die Ermittlung des Harnstatus dazu, die Einordnung der Versuchskatzen in Gruppe 1 (vgl. Kap. 3.1) zu bestätigen bzw. eventuelle Anzeichen einer subklinischen Nierenerkrankung aufzudecken.

In den Harnproben wurden die in Tabelle 3-11 angegebenen Parameter im Institut für veterinärmedizinische Diagnostik Berlin ermittelt. In die Bestimmung des Harnstatus wurden die in Tabelle 3-12 angegebenen Parameter und Quotienten einbezogen.

Tabelle 3-11: Parameter im Harn und dabei verwendete Bestimmungsmethoden bzw. Analysengeräte.

Parameter	Bestimmungsmethode	Gerät	VK (%)
Natrium	Indir. ionenselektive Messung	Roche Hitachi	1,3
Kalium	Indir. ionenselektive Messung		2,1
Calcium	Kresolphthalein Komplex		1,6
Phosphat	Ammoniummolybdat Komplex		2,4
Magnesium	photometrischer Farbttest (Xylidylblau)		3,0
Harnstoff	Urease-GLDH Methode		3,4
Protein	Biuret mit Probenleerwert		2,0
Osmolalität	Gefrierpunktserniedrigung	Osmometer	

Tabelle 3-12: Parameter und Quotienten zur Bestimmung des Harnstatus (nach KRAFT und DÜRR, 1999 und GRÜNBAUM, 2000).*

Parameter	Referenzbereich
Dichte (g/l)	1.001 - 1.080
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	975 - 2.545
Gesamtprotein (g/l)	< 1
Protein-Creatinin-Quotient $U_{P/Crea}$	< 0,3
Harn-Plasma-Creatinin-Quotient U_{Crea}/P_{Crea}	> 100
Harn-Plasma-Osmolalitätsquotient U/P_{Osm}	> 3
renale fraktionelle Elektrolytausscheidung:	
FE _{Na} (%)*	0,0 - 0,7
FE _K (%)*	0,0 - 20,0
FE _P (%)*	3,0 - 39,0

3.4 Datenauswertung

3.4.1 Clearanceberechnung

3.4.1.1 Berechnung der Gesamtclearance ($P\text{-CL}_{\text{gesamt}}$)

Die $P\text{-CL}_{\text{gesamt}}$ errechnet sich nach Formel [4] (vgl. Kap. 2.3.2.2). Die Berechnung wurde mittels des Programms TopFit 2.0 nach dem Nicht-Kompartiment-Modell anhand der logarithmisch trapezoidalen Rechenregel durchgeführt. Die Extrapolation für die AUC-Abschnitte von t_0 bis t_1 und t_{last} bis t_∞ erfolgte wie in Kap. 2.3.2.3 beschrieben.

3.4.1.2 Berechnung der terminalen Clearance ($P\text{-CL}_{\text{terminal}}$)

Die Ausscheidung der Markersubstanzen Sinistrin und Creatinin wird durch drei e-Funktionen bestimmt (vgl. Kap. 2.3.2.3). Die erste Phase der Ausscheidung ist neben den Eliminationsvorgängen durch die Umverteilung des Markers aus dem Intravasal- in den Extravasalraum gekennzeichnet (Abbildung 3-8, hellgraue Linie). Die dunkelgraue Linie beschreibt weitere Umverteilungsvorgänge in den Intrazellularräum oder transzelluläre Kompartimente, und die gestrichelte schwarze Linie stellt die Elimination des Markers durch renale Ausscheidung dar.

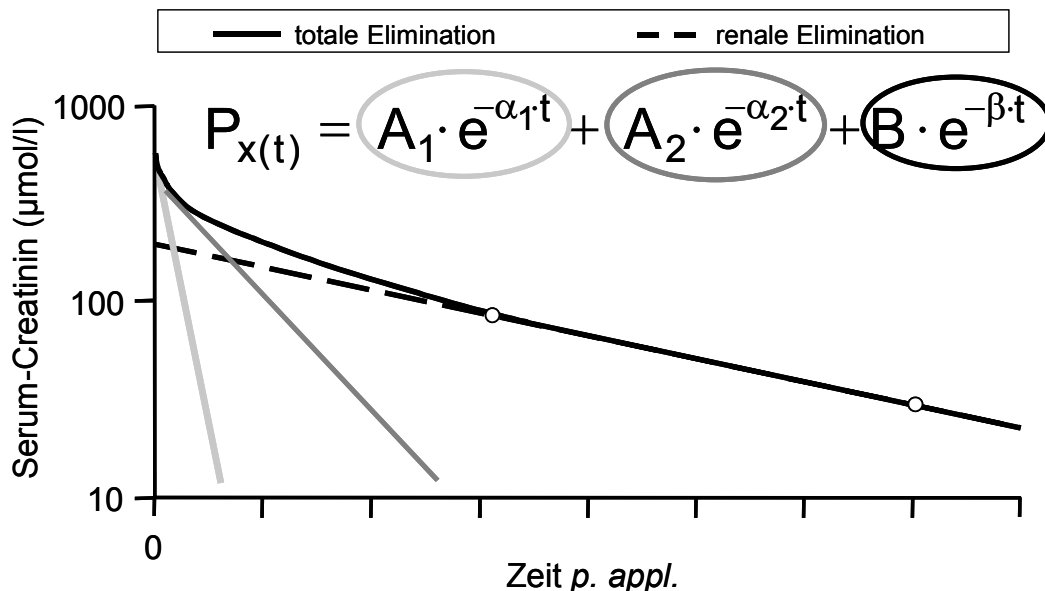


Abbildung 3-8: Die Ausscheidung von Creatinin lässt sich als Summe von drei e-Funktionen darstellen. Die beiden Punkte kennzeichnen die monoexponentielle Phase der Ausscheidung des Creatinins.

Ziel der Untersuchungen war es, den Bereich zu bestimmen, in dem die Umverteilungsprozesse abgeschlossen sind und der Abfall der Serum-Konzentrations-Zeit-Kurve des Markers in erster Linie durch die renale Elimination bestimmt wird (Bereich zwischen den beiden Punkten in Abbildung 3-8). In diesem Bereich stellt sich die Ausscheidungskurve in semilogarithmischer Darstellung als Gerade dar.

In diesem Bereich wird die Ausscheidungskurve durch die Exponentialfunktion

$$[34] C(t) = B \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

beschrieben. Dabei wird der Abfall der Geraden und damit die Ausscheidungsgeschwindigkeit der Markersubstanz durch die Höhe des Absolutbetrags des Exponenten β bestimmt.

Zur Berechnung der Clearance muss die Größe der Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve bestimmt werden.

Die Creatinin-Konzentration zu einem Zeitpunkt t errechnet sich nach Formel [35]:

$$[35] C_{\text{Crea}}(t) = B \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

Die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ist das Integral dieser Funktion vom Zeitpunkt 0 bis ∞ [36].

$$[36] \text{AUC} = \int_0^{\infty} C_{\text{Crea}}(t) dt = \int_0^{\infty} B \cdot e^{-\beta \cdot t} dt = \left(\frac{B}{-\beta} \cdot e^{-\beta \cdot \infty} \right) - \left(\frac{B}{-\beta} \cdot e^{-\beta \cdot 0} \right) = \frac{B}{-\beta} \cdot (e^{-\beta \cdot \infty} - e^0) = \frac{B}{\beta}$$

Daraus ergibt sich für die Berechnung der P-CL_{terminal}:

$$[37] \text{P-CL}_{\text{terminal}} = \frac{\text{Dosis}}{\text{AUC}} = \frac{\text{Dosis}}{\frac{B}{\beta}} = \frac{\text{Dosis} \cdot \beta}{B}$$

Mittels einer Excel-Tabelle kann die Clearance der Patiententiere (P-CL_{pat}) berechnet werden:

$$[38] \text{P-CL}_{\text{ref}} = \frac{\text{Dosis} \cdot \beta_{\text{ref}}}{B_{\text{ref}}}$$

$$[39] \text{P-CL}_{\text{pat}} = \frac{\text{Dosis} \cdot \beta_{\text{pat}}}{B_{\text{pat}}}$$

Das Verhältnis P-CL_{pat}/P-CL_{ref} kann als Maß zur einfachen Beurteilung der GFR des Patienten im Verhältnis zum Referenzwert herangezogen werden (relative GFR).

$$[40] \text{GFR} (\%) = \frac{\text{P-CL}_{\text{pat}}}{\text{P-CL}_{\text{ref}}} \cdot 100\% = \frac{\frac{\text{Dosis} \cdot \beta_{\text{pat}}}{B_{\text{pat}}}}{\frac{\text{Dosis} \cdot \beta_{\text{ref}}}{B_{\text{ref}}}} = \frac{\text{Dosis} \cdot \beta_{\text{pat}} \cdot B_{\text{ref}}}{B_{\text{pat}} \cdot \text{Dosis} \cdot \beta_{\text{ref}}}$$

Diese Gleichung lässt sich unter der Voraussetzung gleicher Dosen/m² KOF und $B_{\text{pat}}=B_{\text{ref}}$ umwandeln in:

$$[41] \text{ GFR (\%)} = \frac{\beta_{\text{pat}}}{\beta_{\text{ref}}}$$

Die relative GFR eines Patienten errechnet sich als Quotient von β_{pat} und β_{ref} .

3.4.1.3 Berechnung der renalen Clearance (R-CL)

Die Berechnung der renalen Clearance nach Bolusinjektion erfolgte, ebenso wie bei der R-CL mit Dauertropfinfusion beschrieben (vgl. Kap. 2.3.2.1), für jede Sammelperiode und für beide Markersubstanzen nach Formel [3].

Berechnung der Harnzeitvolumina für die 6 Sammelperioden

Zur Vermeidung von Ungenauigkeiten bei der Bestimmung des Volumens des gewonnenen Harns (V_U) wurde dieses anhand der Masse von Harn und zum Spülen verwendetem *Aqua ad inj.* und des spezifischen Gewichts dieser Mischung berechnet [42]. Das spezifische Gewicht wurde mittels eines Refraktometers (Fa. Eickemeyer, Tuttlingen) und die Masse mittels einer Präzisionswaage (Fa. Sartorius AG, Göttingen) bestimmt.

$$[42] V_U \text{ (ml)} = \frac{\text{Masse}_{\text{Harn+Spülflüssigkeit}} \text{ (g)}}{\text{spezifisches Gewicht (g/ml)}} - \text{Masse}_{\text{Spülflüssigkeit}} \text{ (g)} \cdot 1000$$

Um das Harnzeitvolumen (V_{tU} in ml/min/m²) zu erhalten, wurde dieser Wert durch die exakte Dauer der Sammelperiode (in min) sowie durch die Größe der Körperoberfläche (KOF in m²) geteilt.

Berechnung der mittleren Markerkonzentration im Serum

Die mittlere Markerkonzentration im Serum (C_{mean}) ist anhand der Konzentrationen in den beiden Proben, die jeweils am Anfang (t_1) und am Ende (t_2) einer Sammelperiode gewonnen wurden, nach der logarithmischen Rechenregel zu bestimmen [43]. Diese bestimmt die Gerade, die durch die beiden Markerkonzentrationen am Anfang und am Ende der Sammelperiode festgelegt wird.

$$[43] C_t = B \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

Formel [43] ist identisch mit Formel [34], stellt hier aber nur die Art der Verbindung zwischen zwei Messpunkten (C_{t_1} und C_{t_2}) dar und ist nicht an die Bedingungen eines monoexponentiellen Verlaufs wie in Formel [34] gebunden.

β errechnet sich nach Formel [44]:

$$[44] \beta = \frac{(\ln C_{t_1} - \ln C_{t_2})}{t_2 - t_1}$$

Der Wert für B wird nach Formel [45] berechnet:

$$[45] B = \frac{C_t}{e^{-\beta \cdot t}}$$

Anschließend wird nach Formel [46] das Integral gebildet, um die Fläche unterhalb der Kurve (AUD) zu berechnen:

$$[46] \int_{t_1}^{t_2} B \cdot e^{-\beta \cdot t} = \frac{B}{-\beta} \cdot (e^{-\beta \cdot t_2} - e^{-\beta \cdot t_1})$$

Da die beiden Flächen y und x bei der gesuchten Konzentration (C_{mean}) gleich groß sind, kann man die Fläche unter der Kurve zu einem Rechteck ergänzen (Abbildung 3-9). Daraus folgt, dass die Fläche unter der Kurve ($\text{AUD}_{\text{Kurve}}$) gleich der Fläche des Rechtecks AUD_{mean} ist.

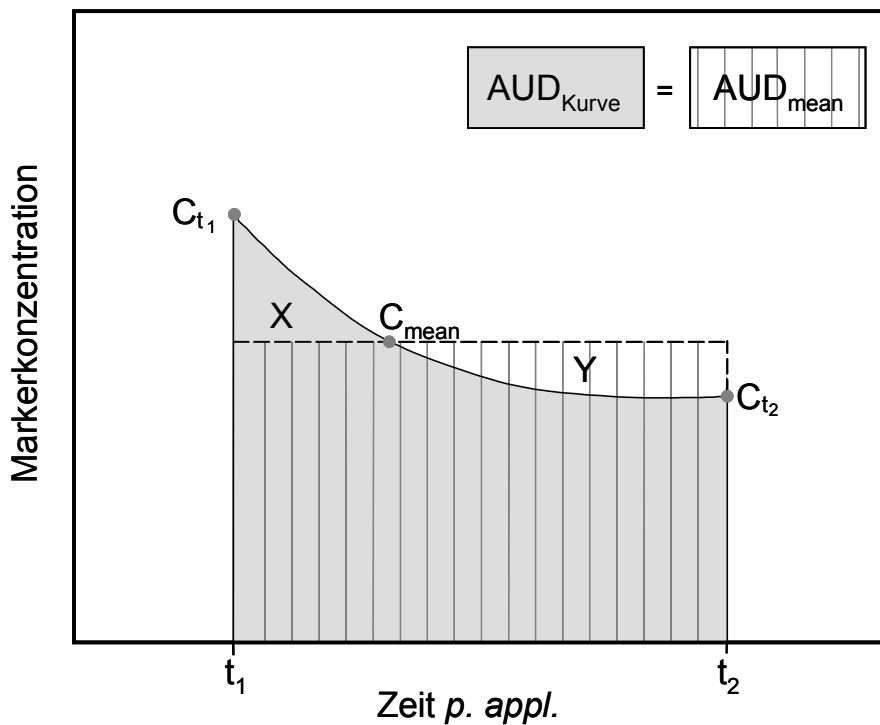


Abbildung 3-9: Prinzip der Berechnung von C_{mean} .

Da sich die Fläche eines Rechtecks als Produkt der beiden Kantenlängen berechnet, ergibt sich für die Berechnung von C_{mean} :

$$[46] C_{\text{mean}} \cdot (t_2 - t_1) = \text{AUD}_{\text{mean}}$$

Die mittlere Konzentration (C_{mean}) berechnet sich also:

$$[47] C_{\text{mean}} = \frac{\text{AUD}_{\text{mean}}}{t_2 - t_1}$$

3.4.2 Beurteilung der renalen Behandlung von Creatinin (FE_{Crea})

Da Sinistrin ausschließlich durch glomeruläre Filtration ausgeschieden wird (vgl. Kap. 2.4.3), können durch den Vergleich von Sinistrin- und Creatinin-Ausscheidung Rückschlüsse auf die renale Behandlung des Creatinins gezogen werden. Dazu wird der Quotient von CL_{Sin} und CL_{Crea} gebildet. Dieser wird als fraktionelle Exkretion von Creatinin (FE_{Crea}) bezeichnet [49] und stellt ein Maß für die tubuläre Behandlung des Creatinins dar (HÖCHEL et al., 2003).

$$[49] FE_{\text{Crea}} = \frac{CL_{\text{Crea}}}{CL_{\text{Sin}}}$$

Wird Creatinin – ebenso wie Sinistrin – ausschließlich durch glomeruläre Filtration ausgeschieden, so beträgt der Quotient von CL_{Sin} und CL_{Crea} 1. Ist die FE_{Crea} größer als 1, so liegt eine tubuläre Netto-Sekretion vor. Ist sie hingegen kleiner als 1, so wird Creatinin reabsorbiert (Abbildung 3-10). Bei diesen Angaben handelt es sich immer um Netto-Transportvorgänge, d. h. ein FE_{Crea} -Wert von >1 schließt nicht aus, dass während des Transportes durch das Tubulussystem auch Reabsorptionsvorgänge stattfinden. In der Summe überwiegen jedoch Sekretionsvorgänge.

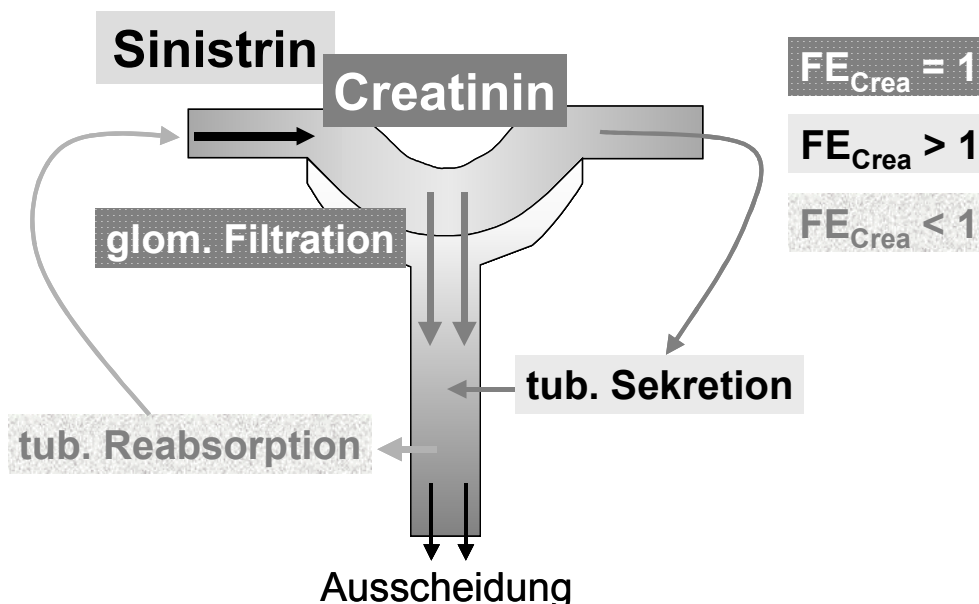


Abbildung 3-10: Modell zur möglichen renalen Behandlung von Creatinin (FINNAH et al., 2002).

Wie in Kap. 2.4.2 beschrieben, sind in verschiedenen Untersuchungen sehr unterschiedliche Werte für die fraktionelle Exkretion von Creatinin gefunden worden, die sich sowohl zwischen den Tierarten als auch abhängig von den Untersuchungsbedingungen stark unterscheiden.

3.4.3 Ermittlung der Referenzkurve/Referenzbereiche für $P\text{-CL}_{\text{terminal}}$

Als Datenbasis für die Bestimmung des Referenzbereichs dienten die Werte von 22 klinisch „nierengesunden“ Katzen, die vor Versuchsbeginn >12 h nüchtern waren und denen die Creatinin-Lösung *i. v.* appliziert wurde.

Für alle Tiere wurden sämtliche Exponenten β für alle aufeinanderfolgenden Zeitintervalle ab 120 min *p. appl.* berechnet. Daraus wurde der Mittelwert der Exponenten β sowie Standardabweichung, 1., 2. und 3. Quartil für jedes Tier bestimmt. Alle weiteren Berechnungen erfolgten mit dem mittleren Exponenten (MW) pro Tier.

Der Referenzbereich für den Exponenten β wurde folgendermaßen bestimmt: Auf der Grundlage der mittleren Exponenten je Tier ($n=25$) wurden der Mittelwert (MW), die Standardabweichung (SD), das 99 % Konfidenzintervall (CI) sowie der 95 % Erwartungswert ($EW = MW \pm 2,08 \times SD$) berechnet.

Zur Ermittlung der Referenzkurve wurde in SigmaPlot for Windows (Version 5.00) eine Regressionsanalyse basierend auf dem Median der Exponenten β mit einem 3- bzw. 2-Kompartimentmodell durchgeführt.

Die Validierung und Anpassung des Referenzbereichs erfolgte auf Grundlage folgender Verfahren:

Mittels einer receiver operating characteristic curve (ROC)-Analyse kann die Abhängigkeit von Sensitivität und Spezifität eines quantitativen Diagnoseverfahrens betrachtet werden (FLETCHER et al., 1996).

Dabei wurde folgende Definitionen für Sensitivität und Spezifität verwendet:

$$[50] \text{ Sensitivität} = \frac{n_{\text{richtig positiv}}}{n_{\text{richtig positiv}} + n_{\text{falsch negativ}}}$$

$$[51] \text{ Spezifität} = \frac{n_{\text{richtig negativ}}}{n_{\text{richtig negativ}} + n_{\text{falsch positiv}}}$$

Als richtig positiv wurden Ergebnisse von Tieren eingeordnet, bei denen eine Azotämie vorlag und die einen erniedrigten Clearancewert aufwiesen, und als richtig negativ wurden demzufolge Tiere eingeordnet, deren Serum-Creatinin- und Clearancewert im Referenzbereich lagen. Als falsch negativ wurde das Vorliegen einer Azot-

ämie bei einem Clearancewert im Referenzbereich eingeordnet. Falsch positive Ergebnisse im eigentlichen Sinn konnten nicht vorkommen, da auch bei einem Serum-Creatinin-Wert im Referenzbereich das Vorliegen einer Einschränkung der Nierenfunktionen nicht ausgeschlossen werden kann.

Zur Durchführung der ROC-Analyse wurde die Rate richtig positiver Ergebnisse (Sensitivität) gegen die Rate falsch positiver Ergebnisse (1-Spezifität) für verschiedene Cut-Off-Values (Schwellenwerte, mögliche Grenzen für den Exponenten β) aufgetragen. Durch treppenförmige Verbindung der Werte entsteht eine ROC-Kurve. Dabei handelt es sich um eine nicht-parametrische Darstellung der Werte (GREINER et al., 2000).

Die möglichen Grenze für den Exponenten β wurden in einem Bereich von 0,0010 bis 0,0050 verschoben, und es wurde betrachtet, wie sich Sensitivität und Spezifität jeweils verhalten.

Anhand der Größe der Fläche unter dieser Kurve kann die diagnostische Leistungsfähigkeit eines Tests beurteilt werden. Bei einem perfekten Test würde die ROC-Kurve konstant bei dem Wert 1 liegen, und die Größe der Fläche unter der Kurve wäre gleich 1.

Die Erstellung der ROC und die Berechnung der AUC erfolgte mittels des Programms CMDT Version 1.0 β .

<http://city.vetmed.fu-berlin.de/~mgreiner/CMDT/cmdt.htm>

Die Bestimmung des optimalen Grenzwertes erfolgte mittels der „Two Graph ROC Analysis“ (GREINER et al., 1995). Bei diesem Analyseverfahren werden Sensitivität und Spezifität als abhängige Variablen gegen verschiedene angenommene Grenzwerte (unabhängige Variable) aufgetragen. Der optimale Grenzwert d_0 ist definiert als derjenige Wert, bei dem die Differenz zwischen Sensitivität und Spezifität minimal ist. Dies gilt unter der Voraussetzung, dass Sensitivität und Spezifität als gleich wichtig bewertet werden.

Zur Überprüfung der mittels „Two Graph ROC Analysis“ ermittelten Grenzwertes wurde außerdem der Misclassification Cost Term (MCT) bestimmt. Anhand dessen kann derjenige Grenzwert ermittelt werden, bei dem die zu erwartenden Schäden durch falsch positive/falsch negative Ergebnisse so gering wie möglich sind (GREINER, 1996).

Diese Methode kann angewandt werden, wenn einerseits die Prävalenz der Erkrankung in der Population bekannt ist und andererseits die Schäden, die durch falsch

negative bzw. durch falsch positive Ergebnisse entstehen, eingeschätzt werden können (GREINER, 1996). Der MCT ist nach BERKSON (1947) definiert als

$$[52] \text{ MCT} = (1-p) \cdot (1-Sp) + r \cdot p \cdot (1-Se)$$

$$\text{wobei } r = \frac{\text{Schaden (FN)}}{\text{Schaden (FP)}}$$

p: Prävalenz

Se: Sensitivität

Sp: Spezifität

FN: Anzahl falsch negativer Ergebnisse

FP: Anzahl falsch positiver Ergebnisse

3.4.4 Parameter zur Beurteilung der Validität der P-CL_{terminal}

Bestimmtheitsmaß (R²)

Die Bestimmung der P-CL_{terminal} erfolgte – wie in Kap. 3.4.1.2 beschrieben – anhand der Messung der Serum-Creatinin-Konzentrationen innerhalb der monoexponentiellen Phase der Creatinin-Ausscheidung, in der die Abnahme der Creatinin-Konzentration in erster Linie durch die renale Elimination bestimmt wird. Dabei ist es möglich, die P-CL_{terminal} anhand von 2 Proben *p. appl.* zu berechnen. Da 2 Messpunkte *per def.* immer auf einer Geraden liegen, ist, um eine Aussage über die Validität der Messung zu erhalten und die Plausibilität des Messergebnisses zu überprüfen, die Entnahme von mindestens 3 Blutproben *p. appl.* vorzunehmen.

Anhand von drei Messwerten lässt sich durch die Berechnung des Bestimmtheitsmaßes der Regression (R²) ein Maß für die Güte der Anpassung an die Regressionsgerade gewinnen. Das Bestimmtheitsmaß beschreibt, welcher Anteil der Varianz der abhängigen Variable y der Varianz der unabhängigen Variable x zugerechnet werden kann. Die Werte für R² liegen in dem Bereich von 0 (keine Zusammenhang) bis 1 (alle Werte befinden sich auf der Regressionsgeraden).

Verteilungsvolumen (V_d)

Nach HEIENE und MOE (1998) ist die Höhe des Exponenten β nicht ausschließlich von der Clearance, sondern auch von der Größe des Verteilungsvolumens V_d abhängig [53].

$$[53] \text{ Exponent } \beta = \frac{CL}{V_d}$$

D. h. die Clearanceberechnung anhand der Höhe des Exponenten β ergibt bei verschiedenen Tieren mit gleicher GFR nur dann identische Clearancewerte, wenn die Verteilungsvolumina dieser Tiere gleich groß sind.

Da das Verteilungsvolumen nach Formel [54] in direkter Relation zu Faktor B steht und da die verabreichte Dosis der Markersubstanz bei allen Tieren identisch war, dienten die Werte des Faktors B auch zur Beurteilung des Einflusses des Verteilungsvolumens auf die Clearanceberechnung bei den Katzen der verschiedenen Gruppen.

$$[54] V_d = \frac{\text{Dosis}}{\text{Faktor B}} \quad (\text{vgl. Kap. 2.3.2.2, Formel [4] und Kap. 2.3.2.3, Formel [14]})$$

Faktor B

Der Faktor B (vgl. Kap. 3.4.1.2, Formel [34]) beschreibt die Lage der Regressionsgerade in Bezug auf die y-Achse. Er wurde für die Tiere der Gruppe 1 berechnet, und der Median dieser Werte diente als Referenzwert für die Tiere der Feldstudie (Gruppen 2 und 3). Bei der Berechnung der $P\text{-}CL_{\text{terminal}}$ wurde dieser also im Folgenden als konstant angenommen, und die Clearance wurde ausschließlich anhand des Exponenten β berechnet.

Um zu überprüfen, inwieweit diese Annahme zutreffend bzw. wie groß der sich daraus ergebende Fehler war, wurden die Werte des Faktors B getrennt nach Gruppen dargestellt.

Weiterhin war zu klären, ob eine systematische Beziehung zwischen dem Clearancewert und Faktor B als Parameter zur Beurteilung des Verteilungsvolumens (s. o.) bestand.

3.4.5 Statistische Auswertung

Die Werte wurden zunächst in Excel-Tabellen (Microsoft® Excel 1997) zusammengefasst. Auf der Grundlage dieser Tabellen konnte mit Hilfe der Windows-Anwendung SPSS 10.0.7 Beziehungen zwischen den einzelnen Parametern untersucht werden.

Die Ergebnisse wurden entweder in Form der Medians (MD) (1.-3. Quartil) oder als Mittelwert (MW) \pm Standardabweichung (SD) angegeben.

Die zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse erfolgte bevorzugt als Box-and-Whiskers-Plots (kurz: Boxplots), die Lage, Streuung und Konzentration von Beobachtungswerten veranschaulichen (SAURWEIN und HÖNEKOPP, 1994). Boxplots sind eine graphische Umsetzung zentraler numerischer Informationen wie Minimum,

Maximum, Median und Quartile. Im Gegensatz zur Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichung setzen Boxplots keine Normalverteilung der Werte voraus.

Der graue Kasten (Box) umfasst jeweils den Wertebereich, der zwischen dem ersten und dritten Quartil liegt und 50 % aller Beobachtungen enthält. Die Position des Medians wird durch die schwarze Linie innerhalb des Kastens markiert. Die "Bartenden" werden durch das 1,5fache des Interquartilabstandes vom oberen bzw. unteren Ende des Kastens bestimmt und eingezeichnet, sofern Werte in diesem Bereich vorhanden sind. Werte außerhalb dieser Grenzen werden als Ausreißer (\circ) gekennzeichnet, sofern sie zwischen dem 1,5- und 3fachen des Interquartilabstandes von den Kastengrenzen entfernt sind. Extremwerte ($*$) weichen um mindestens den 3fachen Interquartilabstand von diesen Grenzen ab. Bei der Benennung der Ausreißer und Extremwerte wurde jeweils die Nummer des Tieres angegeben. Die N-Zahl gibt die Anzahl der Werte je Merkmal an.

Die Wahl des Testverfahrens richtete sich nach der Fragestellung (Vergleich zweier oder mehrerer Gruppen) und nach der Beziehung der Merkmale untereinander (abhängig/unabhängig). Für abhängige Merkmale, wie der Vergleich von Clearancewerten unter verschiedenen Bedingungen bei denselben Tieren, wurden der Wilcoxon bzw. der Friedman-Test verwendet, für unabhängige Merkmale (verschiedene Individuen) wurden der U-Test nach Mann und Whitney bzw. der H-Test nach Kruskal und Wallis verwendet (CLAUß und EBNER, 1989). Zur Wertung der Testergebnisse ist die jeweilige Überschreitungswahrscheinlichkeit p angegeben. Die Nullhypothese, dass die untersuchten Gruppen der gleichen Grundgesamtheit entstammen, wurde bei $p < 0,05$ abgelehnt. Alle Signifikanzprüfungen wurden über die Windows-Anwendung SPSS 10.0.7 realisiert. Die Ergebnisse statistischer Signifikanzprüfungen wurden im Sinne ihrer biologischen Relevanz und Schlüssigkeit interpretiert.

Die lineare Korrelation zwischen zwei Parametern wurde mittels der Berechnung des Korrelationskoeffizienten nach Pearson überprüft. Dabei wurde bei Testergebnissen mit $p < 0,05$ die Korrelation als signifikant bewertet.