

2 Literaturübersicht

2.1 Nierenphysiologie

2.1.1 Morphologische Grundlagen

Die Nieren sind komplexe, multifunktionelle Organe, die lebenswichtige homöostatische Funktionen regulieren wie das Gleichgewicht der Körperflüssigkeiten, den Säure-Basen-Haushalt, den Elektrolythaushalt, die Produktion, die Modifikation und den Abbau von Hormonen sowie die Ausscheidung von Metaboliten und stickstoffhaltigen Stoffwechselprodukten.

Die Nieren werden anatomisch in die bindegewebige Kapsel, die Rindenzone, die Markzone und dem nach innen folgenden Nierenbecken, das in den Ureter mündet, unterteilt. Die harnbereitenden Einheiten (Nephronen) und das Sammelrohrsystem lassen sich folgendermaßen beschreiben (LIEBICH 1993): Das Malpighische oder Nierenkörperchen setzt sich aus dem Glomerulum und der umgebenden, doppelwandigen Bowmanschen Kapsel zusammen. Das Glomerulum ist ein Gefäßknäuel, das als Aufzweigung des arteriellen Vas afferens aufgefasst werden kann. Es wird von den Podozyten umschlossen, die sich vom inneren Blatt der Bowmanschen Kapsel ableiten. Zwischen ihren füschenförmigen Fortsätzen bleiben Spalten frei. Sie erfüllen die Funktionen der glomerulären Filtration, der Aufnahme höhermolekularer Stoffe, der Druckregulierung innerhalb des Nierenkörperchens und der Neubildung fibrillärer Anteile der Basalmembran. Als mechanischer Filter fungiert die Basalmembran, eine Struktur aus Makromolekülen und Glykoproteinen, die in einer Dicke von 0,1 bis 0,2 μm der Glomerulumwand von außen aufliegt.

Am Harnpol öffnet sich die Bowmansche Kapsel und entlässt den im Glomerulum gebildeten Primärharn in das Hauptstück, bestehend aus der Pars convoluta und der Pars recta des proximalen Tubulus. Von hier aus wird die Henlesche Schleife erreicht mit ihrem dünnen absteigenden und dem dicken aufsteigenden Ast, der in das Schaltstück oder den distalen Tubulus übergeht. Der distale Tubulus leitet mit dem kurzen Verbindungsstück in ein Sammelrohr. Mehrere Sammelrohre führen in die Ductus papillares, die auf dem Porenfeld der Nierenpapille ins Nierenbecken münden.

Der Hund besitzt etwa 400 000 Nephronen je Niere. Die Ausscheidungsfunktion der Niere für harnpflichtige Substanzen korreliert eng mit ihrer Fähigkeit zur Harnproduktion. Diese wird bestimmt durch drei Basisgrößen: glomeruläre Filtration, tubuläre Rückresorption und tubuläre Sekretion. Dieser Mechanismus wird durch eine Reihe von Hormonen renaler und nicht renaler Herkunft reguliert.

2.1.2 Glomeruläre Filtration, tubuläre Reabsorption und Sekretion

Die glomeruläre Filtration ist ein passiver Vorgang, bei dem infolge des Blutdrucks eine große Flüssigkeitsmenge durch die Membranen der Glomerula filtrierte wird. Dieses als Primärharn bezeichnete Filtrat des Blutes ist zellfrei und nahezu albuminfrei. Da Wasser und kleine Moleküle den Filter frei passieren, erscheinen sie fast in gleicher Konzentration wie im Plasma. Die Barriere der Basalmembran für Stoffe steigt mit der Größe der Moleküle. Unter normalen Bedingungen erreichen nur die intermediären Proteine, d.h. in der Größe von Albumin und nahezu keine Makromoleküle (z.B. IgG oder IgM) das Tubuluslumen (FINCO 1995a). Demgegenüber passieren Proteine unterhalb von 40 kDa und einem kleineren Radius von 30 Å, die sogenannten low-molecular-weight (LMW) Proteine, unbeschränkt den glomerulären Filter. Diese Proteine werden jedoch nur in vernachlässigbarer Menge unter physiologischen Bedingungen mit dem Harn ausgeschieden. Sie werden durch den sehr effizienten Mechanismus der proximalen Tubuluszellen rückresorbiert (D'AMICO und BAZZI 2003). Ferner ist ihre elektrische Ladung und ihre Konformation für die glomeruläre Filtration von Bedeutung.

Die weitere Zusammensetzung des Endharns wird weitestgehend von den Rückresorptions- und Sekretionsvorgängen im Tubulussystem bestimmt. Im proximalen Tubulus werden bereits 75% des Gesamtvolumens aus dem Primärharn isoton resorbiert. Gleichzeitig werden zahlreiche lebenswichtige Substanzen wie Glucose, Aminosäuren sowie die Elektrolyte Natrium, Kalium, Calcium und Phosphor aktiv und damit energieverbrauchend rückresorbiert. Dabei ist die Rückresorptionsfähigkeit etwa für Glucose und auch Mikronährstoffe beschränkt. Wenn ihre Blutkonzentration und damit die Konzentration im Primärharn steigt, wird nicht mehr die gesamte Glucose zurückgewonnen und erscheint im Harn. Im distalen Tubulus findet die Sekretion von Wasserstoffionen, Ammoniak und Kalium und die Rückresorption von Bikarbonat- und Natriumionen zur Regulation der Säure-Base-Homöostase, die Elektrolytbalance und die Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen statt. Durch ein Gegenstromsystem, die Henlesche Schleife, verbunden mit spezifischer Wasserreabsorption im Sammelrohr, wird der Endharn konzentriert. Die Macula

densa, eine spezifische Zellformation am Beginn des distalen gewundenen Tubulus, dient der Rückmeldung der Leistung des proximalen Tubulus und der Henleschen Schleife an das Glomerulum. Auf diese Weise kann die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) jedes Nephrons durch den Inhalt des dazugehörigen distalen Tubulus gesteuert werden (tubulo-glomerulärer Feedback). Die Nierenfunktion wird von Blutvolumen, hydrostatischem und kolloidosmotischen Druck, von der Zahl der funktionsfähigen glomerulären Kapillaren, von deren Permeabilität, vom Druck des Niereninterstitiums und dem intratubulären hydrostatischen Druck beeinflusst (SCHUREK et al. 1982).

2.1.3 Spezifische Faktoren der Nierenphysiologie

2.1.3.1 Vorkommen von Megalin und Cubilin als Rezeptoren und ihre Bedeutung

Während die Abläufe im Tubulus hinsichtlich Elektrolythaushalt, Säure-Basen-Homöostase und auch hormonelle Prozesse seit Jahrzehnten als bekannt gelten, konnten erst neuere Techniken der Molekularbiologie Erkenntnisse für das Verständnis der physiologischen Proteinreabsorption liefern. Vor allem die Epithelzellen des proximalen Tubulussystems sind für die Resorption der glomerulär filtrierten Plasmaproteine verantwortlich. Ihre luminalen (apikalen) Plasmamembran bildet durch eine Vielzahl von Mikrovilli einen Bürstensaum (brush-border), wodurch die Kontaktfläche für absorptive Prozesse erheblich vergrößert wird. Um einen Verlust an wichtigen Proteinen zu vermeiden, werden nahezu alle Proteine des Ultrafiltrates im proximalen Tubulusabschnitt reabsorbiert. Peptide und Proteine mit einer niedrigen molaren Masse unter 10 kDa werden an der Membran des Bürstensaums durch verschiedene Exopeptidasen gespalten und als Dipeptide oder Aminosäuren über Na⁺-abhängige Transportsysteme in die Zellen aufgenommen (GUDER und HOFMANN 1993). Nach derzeitigem Kenntnisstand unterliegen größere Proteine einem anderen Prozess, der Reabsorption durch eine rezeptorvermittelte Endozytose. Im Jahre 1982 wurde erstmals einer zweier Rezeptoren des proximalen Tubulus entdeckt, die eine bedeutende Rolle für die Reabsorption von Makromolekülen aus dem glomerulären Filtrat spielen (KERJASCHKI und FARQUHAR 1982). Diese durch Endozytose fungierenden Rezeptoren sind Megalin und Cubilin (Abb. 2.1).

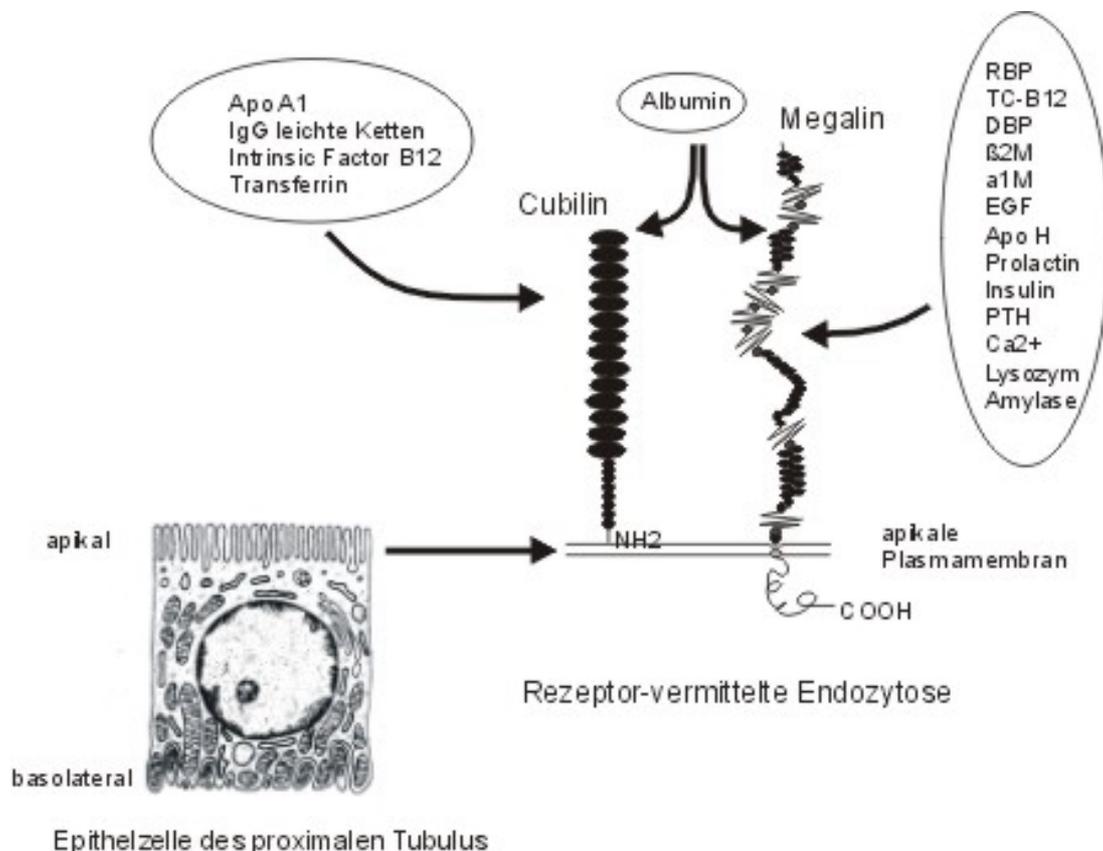


Abb. 2.1: Resorption vom proximalen Tubulus, Darstellung von Megalin- und Cubilin-Rezeptor, Zuordnung der jeweiligen Liganden (modifiziert nach CHRISTENSEN et al. 2001).

Sie werden neben anderen epithelialen Zellen in hoher Konzentration in der Niere an der apikalen Plasmamembran der Tubuluszellen exprimiert, wo sie die Rückresorption einer großen Anzahl verschiedener Proteinliganden beeinflussen (ORLANDO et al. 1998, MOESTRUP und KOZYRAKI 2000, CHRISTENSEN und BIRN 2001, VERROUST und KOZYRAKI 2001). Megalin, auch gp330 genannt, ist ein 600 kDa großes transmembranes Protein, das aufgrund struktureller Gemeinsamkeiten zu der Genfamilie der Low-Density-Lipoprotein-Rezeptoren gehört. Bezogen auf die Niere befindet sich dieser Rezeptor hauptsächlich apikal auf den proximalen Tubuluszellen und im geringeren Ausmaß auf den glomerulären Podozyten. Im distalen Tubulus ist Megalin nur während der Ontogenese der Nieren identifiziert worden (SAHALI et al. 1993). Cubilin, ebenfalls bekannt als Intrinsic Factor-Rezeptor (IF-R) für die Resorption von Cobalamin im Magen-Darm-Trakt, ist strukturell sehr unterschiedlich zu Megalin (BIRN et al. 1997). Cubilin besitzt eine Molmasse von 460 kDa und keine transmembrane Domäne. Cubilin wurde im Gegensatz zu Megalin nicht im Glomerulum gefunden, hat aber ähnliche Eigenschaften und benötigt Megalin als Corezeptor, da es den Endozytosevorgang nicht aktiv einleiten kann (KERJASCHKI und FARQUHAR 1983, BARTH und ARGRAVES 2001). Beide Rezeptoren sind für die normale tubuläre Reabsorption von Proteinen einschließlich Albumin von Bedeutung. Von den Proteinen, die physiologisch im glomerulären Filtrat erscheinen, bindet Cubilin Albumin, leichte Ketten von Immunglobulinen, HDL und Apolipoprotein A-I (BATUMAN et al. 1998, HAMMAD et al. 1999, KOZYRAKI et al. 1999, BIRN et al. 2000). Bisher konnte auch eine Vielzahl an Liganden von Megalin identifiziert werden. Dazu gehören unter anderem vitaminbindende Proteine (Retinol- und Vitamin D-Bindungsprotein, Transcobalamin II), verschiedene Hormone, Enzyme, Apolipoprotein H, Transthyretin (TTR), Albumin sowie β - und α 1-Mikroglobulin (CHRISTENSEN et al. 1992, 1999, CUI et al. 1996, MOESTRUP et al. 1996, 1998b, SOUSA et al. 2000). Dies ließ vermuten, dass der Multiligandenzepetor Megalin entscheidend an Metabolismus und Homöostase essentieller Mikronährstoffe beteiligt ist, insbesondere an Vitamin D, B₁₂ und A sowie Calcium. Das Vorhandensein von Megalin konnte auch für den Hund bestätigt werden (NYKJAER et al. 1999).

2.1.3.2 Bedeutung der Nieren für die Retinol-Homöostase

Der essentielle Mikronährstoff Vitamin A umfasst eine Gruppe von Verbindungen mit unterschiedlichen Wirkungen und zählt zu den fettlöslichen Vitaminen. Da nicht alle Verbindungen ein vitaminähnliches Wirkungsspektrum aufweisen, versteht man unter der Bezeichnung Vitamin A korrekterweise nur solche Derivate, die die gleiche biologische Wirkung wie all-*trans*-Retinol aufweisen und Symptome eines Vitamin-A-Mangels beseitigen (BLOMHOFF 1994b). Hunde und andere Tierarten der Ordnung Carnivora nehmen eine Sonderstellung hinsichtlich des Vitamin-A-Stoffwechsels ein. Sie transportieren Vitamin A im Blut nicht nur in Form von Retinol, sondern vorwiegend als Retinylester (SCHWEIGERT 1988). Der Transport lipophiler Verbindungen wird in den wässrigen Kompartimenten des Organismus durch lipidbindende Proteine vermittelt (BANASZAK et al. 1994). Während die Konzentration an Retinol im Blutplasma wie bei anderen Spezies durch ein spezifisches Trägerprotein, das Retinol-Bindungsprotein (RBP), homöostatisch reguliert wird (BLANER 1989), unterliegt die Konzentration der Lipoprotein-gebundenen Retinylester deutlichen Schwankungen (SCHWEIGERT et al. 1990). Diese Schwankungen können sowohl durch eine diätetische Supplementierung als auch durch Veränderungen im Lipoproteinstoffwechsel beeinflusst werden (SCHWEIGERT und BOK 2000, RAILA et al. 2002). Die abgestufte Regulation ist begründet durch die zentrale Bedeutung von Vitamin A für Prozesse des Sehvorgangs, des Wachstums, der Zelldifferenzierung, der Reproduktion, der embryonalen Entwicklung sowie der Immunfunktion (BLOMHOFF et al. 1990, 1991, 1992, SCHWEIGERT 1998). Längerfristig erhöhte Konzentrationen von Lipoprotein-gebundenen Retinylestern wie sie beim Hund beobachtet werden, sind beim Menschen nur in Zusammenhang mit einer chronischen Vitamin-A-Übersorgung zu sehen (SMITH und GOODMAN 1976). Sie werden für die Symptomatik einer Vitamin-A-Intoxikation verantwortlich gemacht, die bei Hunden unter diesen Bedingungen nicht beobachtet werden konnte (SCHWEIGERT und UEHLEIN-HARRELL 1989).

Die RBP-Retinolbindung konnte für verschiedene Fleischfresser darunter Hund, Füchse, Marderhund, Frettchen und Hauskatze nachgewiesen werden (RAILA et al. 2000). Das Retinol-Bindungsprotein gehört mit 21 kDa zu den niedermolekularen Proteinen, das in der Retinol-ungebundenen Form (apo-RBP) der glomerulären Filtration unterliegt. Ähnlich zum Menschen erfolgt die Synthese beim Fleischfresser vorwiegend in den Hepatozyten (RAILA et al. 2000). Der im Blutplasma zirkulierende RBP-Retinol Komplex (holo-RBP) ist überwiegend an Transthyretin (TTR), ein 55 kDa Protein, gebunden. Als holo-RBP-TTR Komplex erreicht er eine Masse von 76 kDa und ist folglich vor der glomerulären Filtration geschützt. Beim Menschen sind etwa 95% an TTR gebunden, die restlichen

5% werden frei filtriert und im proximalen Tubulus rückresorbiert (MUTO et al. 1973). Beim Hund konnte eine höhere Konzentration an TTR-ungebundenem RBP (holo-free RBP) im Blut gegenüber dem Menschen nachgewiesen werden (BURRI et al. 1993). Trotz des höheren Anteils von holo-free RBP wurde RBP im Harn von Hunden bei physiologischer Nierenfunktion nicht festgestellt (RAILA und SCHWEIGERT 2001). Die Reabsorption des RBP-Retinols verhindert den Verlust von Vitamin A (Retinol) über den Harn und ist die Voraussetzung für die Rückkehr in die Zirkulation. Der Mechanismus des Recyclings wird unterschiedlich erklärt. Bei einem 2-Schritt-Recycling Mechanismus wird zunächst der RBP-Retinoil-Komplex von Megalin zu den Lysosomen transportiert, in denen RBP unter Freisetzung von Retinol abgebaut wird. Im zweiten Schritt wird das freie Retinol erneut an ein neu synthetisiertes RBP-Molekül in der Nähe der basolateralen Membran gekoppelt, wo es anschließend in den Blutfluss abgegeben wird (CHRISTENSEN et al. 1999). In einer weiteren Studie konnte als 1-Schritt Mechanismus gezeigt werden, dass RBP durch Transzytose wieder in das Blutssystem abgegeben wird (MARINO et al. 2001). Dabei erfolgt zunächst die rezeptorvermittelte Endozytose über Megalin in die Epithelzellen der proximalen Nierentubuli.

2.1.3.3 Tamm-Horsfall Protein (THP) und seine Bedeutung für die renale Vitamin-A-Ausscheidung beim Hund

Das Tamm-Horsfall Protein (THP), benannt nach seinen Entdeckern im Jahre 1950 als Inhibitor der viralen Hämagglutination (TAMM und HORSFALL 1950), kommt in der Literatur ebenfalls unter dem Namen Uromodulin oder Tamm-Horsfall Mukoprotein vor. Es ist ein harnspezifisches Glykoprotein, das in den Epithelzellen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife sowie in distalen Tubuluszellen exprimiert und auf der luminalen Seite in den Harn sezerniert wird (BICHLER und KIRCHNER 1975, SIKRI et al. 1981, SCHWEIGERT et al. 2002). Aufgrund des hohen Kohlenhydratanteils neigt THP zur Gelbildung. In der Polymerform hat THP eine Molmasse von mehreren Millionen Dalton; seine Untereinheiten besitzen eine Größe von ca. 100 kDa (FLETCHER et al. 1970a, 1970b, SCHWEIGERT et al. 2002). Es wird in einer Konzentration von bis zu 100 mg pro Tag beim Menschen durch Sekretion in den Harn abgegeben (LYNN et al. 1982) und bildet die Hauptkomponente der hyalinen Harnzylinder (MCQUEEN 1962, WANGSIRIPAISAN et al. 2001). Trotz zahlreicher Studien bleiben die genauen Funktionen von THP ungeklärt. Bezogen auf die Nierenfunktion wird THP aufgrund seiner Tendenz zur Gelbildung für die Wasserimpermeabilität im aufsteigenden Schenkel der Henleschen Schleife und damit für die Aufrechterhaltung des osmotischen Gradienten im Nierenmark verantwortlich gemacht (KUMAR und MUCHMORE 1990). Wegen seiner elektronegativen Ladung kann THP als Regulator der Natrium- und Chloridbewegungen an der basolateralen Membran der Tubuluszellen wirken, indem es die Permeabilität für Natrium steigert und für Chlorid dagegen senkt (PERALDI 1992). Desweiteren werden ihm protektive Eigenschaften gegenüber einer urothelialen Besiedlung mit pathogenen Bakterien wie z.B. *Escherichia coli* zugesprochen (ISRAELE et al. 1987, LEEKER et al. 1997), sowie die Funktion als ein immunmodulatorisch wirkendes Molekül (HESSION et al. 1987). Weitere Funktionen, die nicht im direkten Zusammenhang mit der Nierenfunktion stehen, werden im Abschnitt über Urolithiasis erwähnt.

Beim Hund und anderen Carnivoren konnte eine besondere Rolle des THP bei der Vitamin-A Ausscheidung über den Harn nachgewiesen werden. Während beim Menschen Vitamin A unter physiologischen Bedingungen nur in Form von wasserlöslichen Metaboliten ausgeschieden wird, kommen im Harn von Hunden, Marderhunden, Frettchen und Füchsen gleichzeitig die fettlöslichen Retinylester vor (SCHWEIGERT et al. 1991, RAILA et al. 2000). Dabei fungiert das THP im Harn der Hunde als Transportprotein sowohl für Retinylester als auch Retinol (SCHWEIGERT et al. 2002). Diese beim Hund physiologische Ausscheidung wird beim Menschen nur während der Schwangerschaft beobachtet, die Retinylester sind dann an RBP gebunden. Der Mechanismus der Retinylesterausschleusung beim Hund ist im Detail noch nicht geklärt. Vermutet wird, dass die im Blut an Lipoproteine gebundenen Retinylester in die distalen Tubulusepithelzellen über Endozytose aufgenommen und im Zytoplasma an das vor Ort gebildete THP gebunden werden. In einem folgenden Schritt werden die Retinylester über Exozytose zusammen mit THP apikal ausgeschleust (RAILA 2001). Von entscheidendem Einfluss sowohl für den Vitamin-A-Gehalt im Plasma als auch für die Ausscheidung von Vitamin A ist die Höhe der Vitamin-A-Aufnahme über das Futter (SCHWEIGERT und BOK 2000). Ein Zusammenhang zwischen der Vitamin-A-Konzentration in Plasma und Harn war jedoch nicht abzuleiten.

2.1.3.4 Filtration und Rückresorption von Albumin

Bei der Betrachtung der Filtrationsvorgänge von Albumin in der Niere ist generell davon ausgegangen worden, dass der Transport durch das Glomerulum wegen repulsiver Ladungsinteraktionen zwischen Albumin und der negativ geladenen Basalmembran beschränkt wird. In den letzten Jahren wurde in zahlreichen Studien an Modellen und *in vivo* demonstriert, dass diese Ladungsinteraktionen zu vernachlässigen sind (ZAMPARO und COMPER 1990, COMPER et al. 1993, SMITH und COMPER 1996, CIARIMBOLI et al. 2001). Alleine die Molekülgröße ist für die Selektion ausschlaggebend (BURNE et al. 1997, OSICKA und COMPER 1998). Der Mechanismus der Rückresorption ist im einzelnen nicht bekannt. Wie bereits erwähnt, spielen bei der Resorption Megalin und Cubilin als Rezeptor des proximalen Tubulus eine wichtige Rolle. Für die Bindung an den Rezeptor sind die Gesamtladung, die Konfiguration und die Verteilung der Ladung des Albuminmoleküls von Bedeutung, wobei Albumin-Kationen fünfmal mehr resorbiert werden als Anionen (CHRISTENSEN et al. 1983). Als alternativer Weg wurde ein möglicher transtubulärer Mechanismus von Albumin durch die proximalen Tubuluszellen postuliert (EPPEL et al. 1999).

2.2 Niereninsuffizienz: Definition, Stadien und Bedeutung

Die in der Literatur häufige Vermischung von Begriffen, die sich auf klinische, labordiagnostische, pathologisch-anatomische bzw. histologische oder rein funktionelle Beschreibungen beziehen, macht den Symptomenkomplex der Nierenerkrankungen schwierig zu verstehen. Der in der deutschsprachigen Literatur benutzte Begriff der Niereninsuffizienz bezeichnet die eingeschränkte Fähigkeit der Niere, harnpflichtige Substanzen auszuschcheiden. Niereninsuffizienz oder auch Nierenversagen ist ein funktioneller klinischer Begriff, der keine Aussage über die Ursache beinhaltet. Weiter unterteilt wird in eine akute und chronische Form. Der Begriff der akuten Niereninsuffizienz wird dabei im allgemeinen für sämtliche Formen der (akuten) Azotämie verwendet. Die chronische Niereninsuffizienz (CNI) ist definiert als Azotämie renalen Ursprungs von mehr als einer zweiwöchigen Dauer (POLZIN et al. 2000). Unabhängig von der Ursache ist bei der chronischen Form der Untergang der Nephrone irreversibel und verläuft progressiv. Die Abgrenzung einer akuten von einer chronischen Niereninsuffizienz kann von erheblicher diagnostischer, prognostischer und therapeutischer Bedeutung sein. Jedoch ist eine Abgrenzung häufig nicht eindeutig möglich.

Unterschieden wird im englischen Schrifttum zwischen den Nierenkrankheiten (renal disease) und dem Nierenversagen (renal failure) (POLZIN und OSBORNE 1995). BUCHBORN und EDEL (1968) verstehen unter einem akuten Nierenversagen eine unabhängig von renalen Grundleiden kurzfristig entstehende und fakultativ zur Urämie fortschreitende, reversible Niereninsuffizienz, die durch plötzliche kritische Herabsetzung der renalen Ausscheidungsfunktion entsteht. Es handelt sich also primär nicht um eine Nierenerkrankung, sondern um eine Funktionsstörung. Hiervon zu unterscheiden sind Nierenkrankheiten (Nephropathien), die akut oder chronisch verlaufen. Abhängig von Quantität, Dauer und Schweregrad des betroffenen Nierengewebes kann es zu einer Funktionsstörung kommen. Die klinische Relevanz zwischen Nierenkrankheit und Nierenversagen bzw. Niereninsuffizienz zu unterscheiden, sehen POLZIN und OSBORNE (1995) allein darin begründet, dass eine symptomatische und unterstützende Therapie im Falle der Niereninsuffizienz generell bei Nierenkrankheiten jedoch erst bei Bestehen einer Funktionsstörung notwendig ist.

Die klinischen Konsequenzen bei einer Störung der Filtrations-, Rückresorptions- und Sekretionsvorgänge sind beträchtlich. Im Glomerulum machen sie sich als gestörte Ausscheidung unerwünschter Stoffwechselprodukte (wie Säuren, Harnstoff und Kreatinin) und als unerwünschte Ausscheidung lebenswichtiger Metaboliten besonders von Plasmaproteinen bemerkbar. Die Erhöhung harnpflichtiger Stoffe im Blut wird als Azotämie bezeichnet. Allerdings ist nicht jede Azotämie glomerulär und damit renal bedingt; sie kann auch prärenal (Herzinsuffizienz, Kreislaufstörung, akutes Nierenversagen) oder postrenal (Krankheiten der Harnwege) ausgelöst werden. Der labordiagnostisch genutzte Begriff Azotämie ist nicht identisch mit dem klinischen Syndrom der Urämie. Die Urämie kann prärenale, renale oder postrenale Ursachen haben und ist gekennzeichnet durch Azotämie, Elektrolytverschiebungen, hämatologische (Anämie), gastrointestinale und neuronale Symptome sowie Veränderungen am Skelett. Die Einteilung verschiedener Stadien der chronischen Niereninsuffizienz sind in Tabelle 2.1 erläutert. Nierenerkrankungen kommen beim Hund sehr häufig vor. BLOOM (1954) fand histologisch bei 55% aller seziierten Hunde und bei über 8jährigen Hunden sogar in 80% unterschiedlich stark ausgeprägte entzündliche Nierenveränderungen. Ebenfalls von klinischer Sicht wird die hohe Frequenz an Nierenerkrankungen hervorgehoben. MÜLLER (1966) fand bei 27% der Hunde, die jünger als 2 Jahre waren, eine Proteinurie und Zylindrurie. Über ähnliche Prozentsätze berichteten GÄRTNER (1967) mit 47% und DE SCHEPPER (1977) mit 13%.

Tab. 2.1: Stadien der chronischen Niereninsuffizienz (nach SARRE 1958).

| Stadium | Name | Klinische Merkmale |
|---------|---------------------------------------|---|
| I | Latenzstadium | Insgesamt ausreichende Nierenfunktion bei bestehender und fortschreitender Grunderkrankung der Nieren. |
| IIa | Stadium der vollen Kompensation | Eingeschränkte Leistungsbreite der Nieren mit geringfügiger Einschränkung der glomerulären Filtrationsleistung; Serumkreatinin und Harnstoff noch im Normbereich; beginnende Minderung der endokrinen Funktion. |
| | Stadium der kompensierten Retention | Mäßige Niereninsuffizienz mit konstanter Erhöhung von Harnstoff und Kreatinin im Serum; u. U. bereits klinische Zeichen einer Urämie. |
| III | Stadium der dekompenzierten Retention | Fortgeschrittene Niereninsuffizienz mit zunehmender, noch konservativ behandelbarer klinischer Symptomatik bei weiterer Erhöhung der Serumkonzentration harnpflichtiger Substanzen (Azotämie). |
| IV | Urämie | Terminale Niereninsuffizienz mit Zusammenbruch der exkretorischen und endokrinen Funktion der Nieren. |

2.2.1 Pathophysiologische Aspekte der Niere in der Regulation von Vitaminhaushalt und Proteinen

Eine normale Reabsorption des glomerulären Filtrates setzt die Funktionsfähigkeit der verschiedenen Rezeptoren im Tubulussystem voraus. Studien an Megalin-knockout Mäusen haben gezeigt, dass ein Fehlen des Megalin-Rezeptors zu einem renalen Verlust an verschiedenen niedermolekularen Proteinen führt (LEHESTE et al. 1999, CHRISTENSEN und BIRN 2001). Beachtliche Mengen an Vitamin-D-Bindungsprotein (DBP), 25-(OH)Vitamin D₂, RBP und Transcobalamin konnten im Harn dieser Mäuse gemessen werden. Gleichzeitig war die Plasmakonzentration der Vitamine reduziert. Die Störung der Vitaminhomöostase löste bei einigen dieser Mäuse ein Vitaminmangelsyndrom aus (NYKJAER et al. 1999, LEHESTE et al. 2003).

Frühe Untersuchungen zum Vitamin-A-Status beim Menschen mit verschiedenen Nierenerkrankungen haben signifikante Unterschiede gegenüber Gesunden sowohl im Plasma als auch im Harn feststellen können (POPPER et al. 1954, YATZIDIS et al. 1975, BOIE 1977). Bei chronisch Niereninsuffizienten wurde ein gegenüber der Norm erhöhter Retinol-Spiegel im Serum gefunden (SCHÖNE et al. 1984). Die Vitamin-A-Konzentrationen der Leber, die als Vitamin-A-Speicher fungiert, war bei den chronisch Niereninsuffizienten und Dialysepatienten um mehr als die Hälfte vermindert. Leberbiopsien von Menschen mit chronischer Niereninsuffizienz und erhöhter Vitamin-A-Konzentration im Plasma zeigten das Auftreten einer nodulären regenerativen Hyperplasie begleitet von vereinzelt fokalen perisinusoidalen Fibrosen (DOYLE et al. 2000). Im subendothelialen Bereich konnten Vakuolen in den Kupffer'schen Sternzellen beobachtet werden. Eine Transplantation der Niere reduzierte anfänglich die Vitamin-A-Serumkonzentration, einige Jahre nach dem chirurgischen Eingriff war der Gehalt bei normalem Serumkreatinin erneut erhöht (KELLEHER et al. 1983). Noch deutlicher als der Anstieg von Retinol war die Zunahme des Retinol-Bindungsproteins im Serum um mehr als das Vierfache gegenüber den Kontrollpatienten (SMITH und GOODMAN 1976, VAHLQUIST et al. 1982). Nierenkranke Patienten hatten ein molares Retinol zu RBP Verhältnis von 1 zu 2-3, das Verhältnis der Kontrollgruppe lag bei 1,1 µmol RBP je µmol Retinol (VAHLQUIST et al. 1979). Eine Strukturanalyse des RBP ergab, dass im Serum niereninsuffizienter Patienten besonders eine Form des RBP akkumuliert. Dieses sogenannte RBP2 ist am C-terminalen Ende um zwei Leucin Aminosäuren (182Leu-183Leu) verkürzt und wird bei normaler Nierenfunktion im proximalen Tubulus degradiert (JACONI et al. 1995). Die Bindungseigenschaften von RBP2 waren weder zu Retinol noch zu TTR

verändert. Außerdem fiel auf, dass vor allem apo-RBP im Serum der Niereninsuffizienten erhöht war und apo-RBP sowie 50% des holo-RBP nicht an Transthyretin gekoppelt vorlagen. Die hohen Mengen an TTR ungebundenem holo-RBP2 und holo-RBP wurden nur bei gestörter Nierenfunktion gefunden (JACONI et al. 1996). Der Mechanismus der Konfigurationsänderung bei der Entstehung von apo-RBP aus holo-RBP ist umstritten (FEX und HANSSON 1979, GLOVER 1983). Weitere Untersuchungen zum Metabolismus und zur Sekretion von Transportkomplexen des Retinols bei akutem Nierenversagen wurde an Hand von Tiermodellen durchgeführt. An der Ratte konnte gezeigt werden, dass der Metabolismus von Retinol in der Leber bei vorliegendem Nierenversagen nicht verändert war (GERLACH und ZILE 1991b). Die Ergebnisse ließen vermuten, dass die Niere eine wichtige Rolle bei der Rückkopplung zur Freisetzung von RBP aus der Leber übernimmt, während das periphere Zielgewebe nicht beeinflusst wurde. Bei Ratten mit einer experimentell ausgelösten akuten Niereninsuffizienz schien ein Anstieg des Retinol durch die regulatorische Wirkung der Niere auf die Leber bedingt zu sein, d.h. sowohl Retinol und RBP waren im Serum im gleichen Verhältnis erhöht (GERLACH und ZILE 1990).

Trotz der hohen Konzentration von Vitamin A konnten weder bei der Ratte noch beim Menschen Anzeichen einer Hypervitaminose A bestätigt werden (SMITH und GOODMAN 1971, 1976). Während bei der echten Hypervitaminose A eine Hyperretinylesterämie vorlag, war bei chronischer Niereninsuffizienz eine mit dem Anstieg des RBP verbundene Hyperretinolämie vorhanden. Bei der Hypervitaminose A resultiert der Anstieg durch die in der Chylomikronen- bzw. Lipoproteinfraktion transportierten Retinylester von normal < 10% auf > 60%. Unterschiedlich zur Niereninsuffizienz war bei einer Hypervitaminose der Gehalt an Vitamin A in der Leber signifikant erhöht (SMITH und GOODMAN 1971, 1976).

Welche Rolle das Tamm-Horsfall Protein, das im aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife und im distalen Tubulus gebildet wird, für die Beurteilung der Nierenerkrankung spielt, untersuchten verschiedene Autoren. TORFFVIT et al. (1998) konnten zeigen, dass bei reduzierter Nierenfunktion unterschiedlicher Ursache die Exkretionsrate von THP in den Harn vermindert war. Während Patienten mit chronischer Nierenerkrankung um die 4,8 mg THP in 24 Stunden über den Harn ausschieden, lag der Wert der gesunden Personen bei durchschnittlich 60 mg pro 24 Stunden. Die Funktion der Tubuluszellen, die THP synthetisieren, war bei chronischen Nephropathien reduziert (GRANT et al. 1973, THORNLEY et al. 1985). In Betracht wurde eine verminderte Proteinsyntheseaktivität der distalen Tubuluszellen gezogen, die möglicherweise durch die Menge des sezernierten THP widergespiegelt wurde. Eine Studie zur Lokalisation von THP innerhalb der distalen Tubuluszellen zeigte die Immunreaktivität von THP im Bereich der luminalen sowie basolateralen Zellmembran, im Zytoplasma und sogar extrazellulär (PEACH et al. 1988). Vermutet wurde, dass THP nicht nur in den Harn, sondern auch von der basolateralen Membran aus in das Interstitium sezerniert wird (TORFFVIT et al. 1998). Folglich reflektiert die Sekretion von THP über den Harn nur einen Teil des synthetisierten THP und genauso kann die Sekretion sich während der Erkrankung verändern. Weitere Studien bestätigten die reduzierte Ausscheidung von THP beim Vorliegen einer Nierenerkrankung (MCKENZIE und MCQUEEN 1969, SAMUELL 1979, NAKAGAWA 1987).

Der Rezeptor Cubilin spielt eine bedeutende Rolle bei der intestinalen Vitamin-B₁₂-Resorption (MOESTRUP et al. 1998a, KOZYRAKI et al. 1999). Eine Untersuchung von Hunden gemischter Rassen mit autosomal rezessiver vererbter Vitamin-B₁₂-Malabsorption ergab eine verminderte Expression von Cubilin im proximalen Tubulus (FYFE et al. 1991). Hunde, die ein Defekt bei der Bildung des Cubilins aufwiesen, zeigten eine herabgesetzte Reabsorption von Albumin gegenüber einer ungestörten Aufnahme bei gesunden Hunden. Gleichzeitig konnte eine hohe Exkretion von Transferrin über den Harn gemessen werden. Die gleiche Studie beschreibt Transferrin als einen zusätzlichen Liganden von Cubilin bei Mensch, Maus und Hund (KOZYRAKI et al. 2001).

Bei Untersuchungen der Interaktion zwischen Megalin und einer Reihe polybasischer und potentiell nephrotoxischer Substanzen konnte eine Bindung mit den Aminoglycosiden Gentamicin, Netilmicin sowie Amikacin und Polymyxin B belegt werden. Nach Endozytose akkumulierten diese Stoffe in den Lysosomen der proximalen Tubuluszellen, was schließlich zu einer Schädigung der betroffenen Zellen führen kann (MOESTRUP et al. 1995, SCHMITZ et al. 2002). Ähnliche Gegebenheiten lagen auch in den Haarzellen des Innenohrs vor, was die Nephro- und Ototoxizität der Aminoglycoside begründet. Ferner konnte demonstriert werden, dass Megalin als Mediator für die Albuminreabsorption im proximalen Tubulus unter dem Einfluss von Gentamicin deutlich weniger Albumin rückresorbiert (CUI et al. 1996).

Das Verständnis für die Entstehung der Glomerulosklerose und tubulointerstitiellen Fibrose als

uniformes histologisches Korrelat der terminalen Niereninsuffizienz hat heute dank intensiver Forschung substantielle Fortschritte gemacht. Das gemeinsame morphologische Erscheinungsbild verschiedener renaler Grunderkrankungen mit ganz unterschiedlichen pathophysiologischen Auslösemechanismen hat zu der Hypothese geführt, dass es unspezifische Faktoren geben muss, die unabhängig von der auslösenden Erkrankung die Progression der chronischen Niereninsuffizienz unterhalten. Als wichtige unspezifische Schrittmacher konnten eine Reihe von Faktoren aufgedeckt werden, die den Verlauf der chronischen Niereninsuffizienz negativ beeinflussen.

Chronische Niereninsuffizienzen gehen häufig mit einer Proteinurie einher. Neuere Untersuchungen über die Folgen dieser Proteinurie haben einen engen Zusammenhang mit dem Untergang von Tubuluszellen dargelegt (THOMAS et al. 1999). Ihre Apoptose wird vermutlich durch die Aussetzung der Tubuluszellen mit einem hohen Proteingehalt im Primärharn induziert. Mit Apoptose reagiert die Niere als prototypische Antwort auf nicht letale Zellschädigungen. Bei der Ratte führte die Proteinurie zur Tröpfchenbildung in den proximalen Tubuluszellen, zum Verlust des Bürstensaums und zur deutlichen Bildung von tubulären Zylindern (ANDERSON und RECANT 1962, EDDY et al. 1989). Dem Vorgang der Apoptose steht nur eine geringe Tendenz zur Proliferation gegenüber, was schließlich zur Atrophie der Tubuli (THOMAS et al. 1999), sowie möglicherweise zum Fortschreiten der Niereninsuffizienz führt (TRUONG et al. 1996, LAINE et al. 1997). Die Frage, ob alleine die Quantität der Proteinurie bei progressiv verlaufenden Nierenerkrankungen eine Rolle spielt, konnte verneint werden. *In vitro* Versuche an intakten Epithelzellen des proximalen Tubulus vom Menschen ließen die Schlussfolgerung zu, dass ebenso die Qualität eine mögliche Rolle während der frühen Entwicklung der interstitiellen Fibrose spielt (NEWMAN et al. 2000). Der Mechanismus der zugrundeliegenden tubulointerstitiellen Fibrose und das Fortschreiten der Nierenschädigung ist multifaktoriell bedingt. Ein Faktor ist die Reduktion der Anzahl noch funktionierender Nephrone, die zu einer schädigenden Hyperfiltration der verbleibenden Einheiten führt. Wurde zunächst die Proteinurie als Maß für den Schweregrad der glomerulären Läsion angesehen, wird derzeit die Exposition des proximalen Tubulussystems mit einer hohen Konzentration an Proteinen als direkter pathogener Mechanismus für eine Nierentoxizität verantwortlich gemacht (WILLIAMS und COLES 1994). Eine exzessive tubuläre Absorption von Proteinen verursacht die Produktion von proinflammatorischen Chemokinen und vasoaktiven Faktoren, wie z.B. das Monozyten chemoattractant protein-1 (MCP-1), Transforming growth factor- β (TGF- β) oder das Endothelin-1 (TAMAKI et al. 1994, ZOJA et al. 1995, WANG et al. 1997). Die Folge sind interstitielle Inflammation, regionale Ischämie, Proliferation von Fibroblasten und letztlich eine gesteigerte Synthese von extrazellulärer Matrix und Narbenbildung (REMUZZI et al. 1997).

2.2.2 Einteilung der Nephropathien

Der Begriff der Nephropathie beinhaltet eine Reihe von Erkrankungen mit unterschiedlichen pathologischen Mechanismen und morphologischen Erscheinungen. Eine Charakterisierung kann bezugnehmend auf eine extrarenale Beteiligung als primäre bzw. sekundäre Nephropathie erfolgen. Eine Einteilung ist ebenfalls nach klinischen Symptomen wie z.B. Proteinurie, Ödem, Aszites, Polyurie, Azotämie, Urämie oder nach dem Verlauf (progressiv *versus* nicht progressiv) sowie nach dem immunpathologischen Typ möglich. Beim Menschen wird eine Kategorisierung auf der morphologischen Basis nach Lichtmikroskopie, Immunfluoreszenz oder Elektronenmikroskopie vorgenommen, während bei Hund und Katze häufig nur die lichtmikroskopische Untersuchung zum Einsatz kommt.

Nach Lokalisation der Hauptveränderungen können die Nephropathien grundsätzlich in Glomerulopathien und in Tubulopathien eingeteilt werden. Es ist dabei zu beachten, dass glomeruläre und tubuläre Veränderungen gemeinsam auftreten können und dass häufig tubuläre Erscheinungen die Folge einer primären Schädigung der Glomerula darstellen. Vor allem bei längerem Bestehen eines Entzündungsprozesses ist es schwierig oder sogar unmöglich festzustellen, welche Gebiete der Niere zuerst und am stärksten verändert wurden, d.h. die ursprüngliche Nephritisform zu bestimmen. Während ein entzündlicher Prozess der Niere als Nephritis bezeichnet wird, definierte ZOLLINGER (1971) die Nephrose als eine doppelseitige, nicht vaskuläre und nicht eindeutig entzündliche Nierenveränderung, die sich in lokalen Stoffwechselstörungen äußert. Die Nephrose äußert sich durch degenerative Veränderungen und/oder Speicherungen verschiedener Stoffe. Während man früher die Nephrosen als rein degenerative Nierenerkrankungen definierte, weiß man heute, dass die größte Zahl der Nephrosen im Sinne einer Speicherung zu verstehen sind. Dementsprechend geht nur ein Teil der Nephrosen mit auffallenden klinischen Symptomen wie akutem Nierenversagen oder nephrotischem Syndrom einher.

Erste Ansätze zur Einteilung von Nephrosen beim Hund wurden im Jahre 1939 unternommen und ab den 70er Jahren intensiv fortgeführt (BLOOM 1939, MÜLLER-PEDDINGHAUS et al. 1976). Die derzeit verwendete Klassifizierung für den Menschen wird von der WHO vorgeschlagen und ist weitestgehend mit der Einteilung für den Hund vergleichbar.

Die Amyloidnephrose kann in Form einer idiopathischen (primären) Amyloidose ausschließlich in der Niere lokalisiert sein oder im Rahmen einer generalisierten Form vom Typ AA vorkommen. Histologisch zeigt sich, dass Amyloid bevorzugt im Mesangium der Glomerula abgelagert wird. Als Folge der durch die Amyloideinlagerungen bedingten erhöhten glomerulären Durchlässigkeit kommt es zu starker Proteinurie und in Abhängigkeit von der Dauer zur Ausbildung des nephrotischen Syndroms (OSBORNE et al. 1968, 1969). Eine Polyurie und ein mangelhaftes Harnkonzentrationsvermögen treten häufig infolge der sekundären tubulären Schädigung auf.

Die verschiedenen Formen der Glomerulonephritiden (GN) beschreiben morphologische Veränderungen, bei deren Pathogenese immunologische Vorgänge eine besondere Rolle spielen. Die Nieren sind wegen ihrer funktionellen und anatomischen Besonderheiten mehr als jedes andere Organ für die Manifestation immunpathologischer Reaktionen prädestiniert. Zum einen werden in der glomerulären Basalmembran im Rahmen des Filtrationsprozesses häufig Antigen-Antikörper-Komplexe abgelagert und zum anderen ist die glomeruläre Basalmembran wegen ihres hohen Anteils an organspezifischem Antigen der direkte Angriffspunkt für mehr oder minder nierenspezifische antikörpervermittelte Immunreaktionen. Immunhistologisch konnten Immunglobuline vom Typ IgG, seltener IgM oder IgA, Spaltprodukte des Komplementsystems C3 und/oder Properdin als unterbrochene herdförmige Ablagerungen unterschiedlicher Menge und Lokalisation nachgewiesen werden (OSBORNE et al. 1977). Der Ort der Ablagerungen hängt dabei in erster Linie von deren Größe ab: große Immunkomplexe dringen noch durch das Endothel, werden aber subendothelial abgefangen und von Mesangiumzellen phagozytiert (mesangiale GN); kleinere können durch die glomeruläre Basalmembran (membranöse GN) in den subepithelialen Bereich gelangen. Die Ablagerungen sind zusammen mit den anderen morphologischen Veränderungen für die nosologische Einordnung und prognostische Bewertung der verschiedenen Glomerulonephritiden von ausschlaggebender Bedeutung.

Tab. 2.2: Einteilung der Nephropathien beim Hund (nach MÜLLER-PEDDINGHAUS und TRAUTWEIN 1977b, 1978).

| Glomerulopathien | |
|---------------------------------------|--|
| Amyloidnephrose | |
| Membranöse Glomerulonephritis (GN) | a) membranöse GN mit „spikes“ b) membranöse GN ohne „spikes“ |
| Membranoproliferative GN | a) mit mesangialer Proliferation b) mit mesangialer Sklerosierung |
| Mesangial – proliferative GN | mesangial – proliferative GN |
| Mesangial – sklerosierende GN | |
| Tubulo – interstitielle Nephropathien | |
| Tubulonephrosen | a) ischämische b) toxische c) Speicherungsnephrosen |
| Interstitielle Nephritis | |

Die Gruppe der membranösen Glomerulonephritiden ist durch die diffuse Verdickung der Basalmembran und einer möglichen grobkörnigen subepithelialen Ablagerung gekennzeichnet. In den Kapillarschlingen fallen versilberbare, spikeartige Substanzdepots auf. Bei den membranösen

proliferativen Veränderungen kommt es zu einer scheinbaren charakteristischen Basalmembranverdoppelung infolge einer subendothelialen versilberbaren Grundsubstanzablagerung. Sie geht mit einer deutlichen Alteration des Mesangiums in Form von proliferativen oder auch mehr mesangial sklerosierenden Prozessen einher (MÜLLER-PEDDINGHAUS et al. 1976). Die mesangiale Form der GN zeigt ähnliche Veränderungen wie die zuvor erwähnten Unterformen der membranoproliferativen GN. Hier sind jedoch keine Alterationen der Basalmembran ausgeprägt.

Tubulonephrosen können durch Ischämie oder Toxine sowie durch intraepitheliale Speicherung oder intratubuläre bzw. interstitielle Ansammlung von Stoffen, die das Glomerulum passiert haben, verursacht werden. Die dabei auftretenden morphologischen Veränderungen wie trübe Schwellung, vakuolige Degeneration, Verfettung und Nekrose sind weitgehend unspezifisch, während die Art und Lokalisation der Produkte in der Regel eine nosologische Zuordnung zu bestimmten Krankheitsbildern erlaubt. Bei der interstitiellen Nephritis treten die entzündlichen Prozesse primär und hauptsächlich im Bereich des Nierenstomas auf (KROHN et al. 1971).

2.2.3 Proteinurie: Definition, Vorkommen, Bedeutung

Unter Proteinurie versteht man die Ausscheidung von Eiweiß im Urin. Die Harnproteine können sich aus verschiedenen Plasmaproteinen, Proteinen des Harntraktes und abhängig von der Methode der Harngewinnung aus Proteinen des Genitaltrakts zusammensetzen. Zu unterscheiden ist zwischen der physiologischen und pathologischen Proteinurie, wobei der Begriff „Proteinurie“ überwiegend im Zusammenhang mit pathologischen Konzentrationen verwendet wird. Bei gesunden Hunden wurde je nach Messmethode und Studie eine mittlere Harnproteinmenge von weniger als 20 mg/kg/Tag angegeben (DIBARTOLA et al. 1980, BIEWENGA et al. 1982, GRAUER et al. 1985). Ähnliche Größenverhältnisse wurden beim Menschen gefunden. Ein unter physiologischen Verhältnissen durchschnittlicher Eiweißverlust des Menschen beträgt 10 – 30 mg/Tag (CAO et al. 1975). Generell konnte weder beim Hund noch beim Menschen ein Zusammenhang zwischen Alter, Körperoberfläche oder -gewicht und der Menge ausgeschiedener Harnproteine ermittelt werden (RIGAS und HELLER 1951, DOETSCH 1972). Nur eine Studie, bei der Harn durch spontane Miktion gewonnen wurde, konnte eine Korrelation zwischen dem Geschlecht und der Proteinkonzentration feststellen (BARSANTI und FINCO 1979).

Zahlreiche Nephropathien gehen mit einer Proteinurie einher. Daher gilt die Beobachtung von Proteinen im Harn als ein wichtiger Indikator für eine Erkrankung der Nieren. Vorgenommen wird eine Klassifizierung der Proteinurie basierend auf der anatomischen Lokalisation, bei der es zum Eintritt des Eiweißes in den Harntrakt kommt. Die prärenale Proteinurie oder auch „Overload-Proteinurie“ kommt bei pathologisch erhöhter Serumkonzentration bestimmter Eiweiße mit Überschreitung der maximalen tubulären Rückresorptionskapazität vor. Dazu gehören die Bence-Jones-Proteinurie beim Plasmazytom, die Myoglobinurie oder Hämoglobinurie bei Trauma oder hämolytischer Anämie oder die Paraproteinurie infolge von Neoplasien wie z.B. Lymphom, Leukämie oder auch von chronischen Entzündungsprozessen (NOSEDA et al. 1980, ABDULKADYROV und BESSMELTSEV 1996). Die postrenale Proteinurie ist eine Form, die ebenfalls die Nierenfunktion nicht widerspiegelt. Sie ist die Folge von Infektionen oder neoplastischen Veränderungen der harnableitenden Organe.

Bei der renalen Proteinurie (Abb. 2.2) lassen sich pathogenetisch und klinisch zwei völlig unterschiedliche Formen differenzieren (MÜLLER-PEDDINGHAUS und TRAUTWEIN 1978): die glomeruläre und tubuläre Proteinurie. Sie sind die Konsequenz von zwei Mechanismen: 1. die abnormale transglomeruläre Passage von Proteinen aufgrund einer erhöhten Permeabilität der glomerulären Basalmembran und 2. eine unzureichende Reabsorption durch die Epithelzellen des proximalen Tubulus. Bei quantitativer Betrachtung kann ein Unterschied zwischen extrem hohen Harneiweißverlusten bei glomerulären und relativ geringen Harneiweißverlusten bei tubulären Nierenschäden festgestellt werden. Die Analysemethoden, ihre Interpretation und Anwendung sollen in den folgenden Kapiteln besprochen werden.

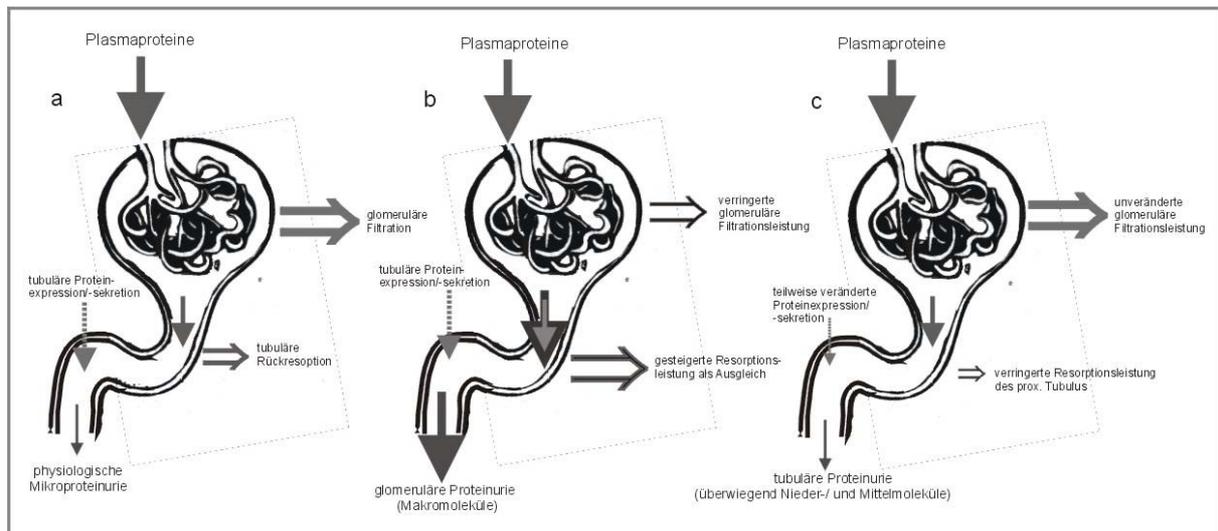


Abb. 2.2: Schematische Darstellung verschiedener renaler Proteinurieformen, a: physiologische Mikroproteinurie, b: erhöhte glomeruläre Permeabilität ohne Einschränkung der tubulären Reabsorption, c: gestörte tubuläre Reabsorption von normal filtrierten Proteinen.

2.2.4 Diagnostische Möglichkeiten zur Identifizierung von Nierenerkrankungen

2.2.4.1 Quantitative Parameter zur Bestimmung von Nephropathien beim Hund

Die bisher routinemäßig angewandten Methoden der Harnproteinanalyse bestimmen semiquantitativ (mittels Teststäbchen) oder quantitativ (Photometrie) die Proteinkonzentration im Harn. Durch Messen der in 24 Stunden ausgeschiedenen Harnmenge kann dann die Gesamtmenge der mit dem Harn ausgeschiedenen Proteine errechnet werden (CENTER et al. 1985). Eine einmalige Urinproteinbestimmung ist nur bedingt aussagekräftig, da Variationen hinsichtlich des Urinvolumens und des spezifischen Gewichtes nicht erfasst werden (MONROE et al. 1989). Da die Gewinnung des 24-Stunden-Sammelurins unter Praxisbedingungen kaum durchführbar ist, wurde ein neuer Parameter, das Protein-Kreatinin-Verhältnis im Urin, untersucht. Da die Kreatininausscheidung über die Niere allein von der glomerulären Filtrationsrate beeinflusst wird, ist das Urin-Protein-Kreatinin-Verhältnis (upc) unabhängig von Urinvolumen und spezifischem Uringewicht (FINCO und BARSANTI 1982). Eine signifikante Korrelation zwischen der 24-Stunden-Urinproteinausscheidung und dem upc-Wert konnte bewiesen werden (WHITE et al. 1984). Der Wert des upc-Verhältnisses war sowohl vom Zeitpunkt als auch von der Art der Uringewinnung unabhängig (GRAUER et al. 1985, JERGENS et al. 1987). Zahlreiche Untersuchungen sind unternommen worden, um genaue Referenzbereiche für eine physiologische bzw. pathologische Proteinausscheidung anzugeben, jedoch mit unterschiedlichen Ergebnissen. Das Limit der physiologischen Harnproteinausscheidung wird bei 20 mg/kg/24 Stunden angesehen bzw. ein upc-Wert von größer als 1,0 wird als abnormal beurteilt (WHITE et al. 1984, GRAUER et al. 1985). Eine weitere Studie definiert ein upc kleiner 0,4 als normal und ein upc größer 2,0 als abnormal (CENTER et al. 1985). LULICH und OSBORNE (1990) empfehlen folgende Richtwerte für die Interpretation des upc: 0 – 0,3 als normal; 0,3 – 1 als fraglich; > 1 als abnormal. Übereinstimmend wird empfohlen, dass Ergebnisse in einem fraglichen Bereich weiter überprüft werden sollten. Bisher durchgeführte Studien konnten mit der Ermittlung des upc-Verhältnisses nicht auf die Art oder den Schweregrad der Nierenfunktionsstörung schließen (WHITE et al. 1984). Lediglich sehr hohe Werte über 10 ließen eine Proteinurie infolge einer Amyloidnephrose oder membrano-proliferativen Glomerulopathie vermuten (OSBORNE et al. 1970, CENTER et al. 1985).

2.2.4.2 Qualitative Parameter zur Einteilung von glomerulären und tubulären Nierenerkrankungen

Für eine differenzierte nephrologische Diagnostik ist die reine quantitative Bestimmung einer Proteinurie nicht ausreichend. Selbst eine physiologische Proteinmenge im Urin schließt eine Nierenerkrankung nicht aus. Dies wird vor allem in Frühstadien von Systemerkrankungen (Hypertonie, Diabetes) sowie bei interstitiellen Erkrankungen beobachtet (BOESKEN et al. 1976b, MILTENYI 1979). Ab den 70er Jahren sind vor allem in der Humanmedizin analytische Verfahren der

Urinproteindifferenzierung in den Vordergrund getreten, die im wesentlichen die molekulare Größe der Bestandteile berücksichtigen. Da eine Proteinurie prinzipiell sämtliche Serumproteine enthalten kann, erscheinen Methoden zur Darstellung aller Proteine sinnvoll. Die Analyse mittels Zonen-Elektrophorese-Verfahren (Acetatfolien-, Immun-, Agarose-Elektrophorese u. a.) lässt zwar die Diagnose Paraproteinurie zu, hat aber für die nephrologische Diagnostik keinen Fortschritt gebracht. Erst die Anwendung der Chromatographie an Sephadex G-200 und schließlich die Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (PAGE) unter Beifügung des Detergens Natriumdodecylsulfat (SDS) hat eine Differenzierung der Proteine nach ihren molekularen Größen ermöglicht. Bei der SDS-PAGE wird durch Zusatz des Detergens zum Urin zunächst eine Nivellierung der Ladungen der Urinproteine erreicht, so dass in der folgenden Elektrophorese eine Auftrennung ausschließlich anhand der molaren Masse stattfindet. Da das Trennprinzip weitgehend den physiologischen Vorgängen bei der Ultrafiltration von Serumproteinen durch das glomeruläre Filter entspricht, erlaubt das Proteinstreifenmuster direkte Rückschlüsse auf die physiologischen bzw. pathophysiologischen Verhältnisse am Nephron (PESCE et al. 1976).

Tab. 2.3: Elemente der Proteinurie aus Abb. 2.3 hervorgehend.

| Renale Proteinurien | Zusammengesetzt aus folgenden Elementen | Schweregrad |
|----------------------------|---|-------------|
| selektiv glomerulär | A 4 oder A 2 | zunehmend ↓ |
| unselektiv glomerulär | A 1 | |
| inkomplett-tubulär | B 2 | zunehmend ↓ |
| komplett-tubulär | B 1 | |
| Extrarenale Proteinurie | | |
| postrenal – Serum Element | A 1/B 5 | |
| prärenal – Paraproteinurie | A 5/B 3 | |

Zur Auswertung wurde eine für den Menschen anerkannte Klassifikation erarbeitet, mit der die Proteinbanden systematisch eingeteilt werden konnten (BOESKEN 1985). Mit Hilfe des Proteinstreifenmusters konnte die Topographie der renalen Alterationen bestimmt werden (BALANT und FABRE 1979, WEBER und SCHOLZ 1985, WEBER et al. 1986).

Die Schädigung bestimmter Strukturen im Nephron führt zu einer charakteristischen Proteinveränderung, die beim Mensch von konstanter Zusammensetzung ist und als „Proteinurie-Element“ bezeichnet wird. Nach der molekularen Masse werden sie als makro- bzw. mikromolekulare Elemente bezeichnet. Kriterium ist das Albumin mit einer Molmasse von 65 - 68 kDa. Albumin unterliegt bei der glomerulären Filtration sowohl der größenabhängigen Porensiebung, als auch der ladungsabhängigen Filtersiebung und schließlich der tubulären Resorption. Das monomere Albumin kommt im Urin außerhalb der physiologischen Proteinurie nie isoliert als pathologische Proteinurie vor (BOESKEN et al. 1977). Grundsätzlich kann zwischen fünf verschiedenen Typen der Proteinurie unterschieden werden: 1. normale oder physiologische Proteinurie, 2. tubuläre bzw. LMW- Proteinurie (engl.: low-molecular-weight), 3. glomeruläre bzw. HMW- Proteinurie (engl.: high-molecular-weight), mit a) unselektiv-glomerulär und b) selektiv-glomerulär und 4. die gemischte Form (BALANT und FABRE 1979).

Der Nachweis makromolekularer Serumproteine ($M > 70$ kDa, z.B. IgG, α_2 -Makroglobulin oder IgM) ist ein Indiz für die Schädigung der glomerulären Membran. Der zusätzliche Nachweis eines mikromolekularen Elementes lässt dann auf ein postrenales Eintreten dieser Serumproteine schließen. Dabei dient Apo-A als Marker für eine postrenale Blutung (SCHIWARA und SPILLER 1989). Sind sämtliche makromolekulare Proteine vorhanden, spricht man von der unselektiv-glomerulären Proteinurie. Sie deutet auf eine schwerwiegende Schädigung im Glomerulum hin, die häufig mit anderen Proteinurie-Elementen gemischt auftritt, da das Tubulussystem mit geschädigt ist (D'AMICO und BAZZI 2003). Als selektiv-glomerulär werden Proteinurien bezeichnet, bei denen ausschließlich intermediäre Proteine wie Transferrin und Albumin auftreten. Diese Art weist auf eine Störung der ladungsabhängigen Filterfunktion des Glomerulum hin (WHITE 1981). Der Schweregrad dieser Proteinurie ist geringer als bei der unselektiven Form. Die relative Konzentration von 5 – 7

mikromolekularen Proteinen ($M < 40\text{kDa}$) weist auf eine tubuläre Resorptionsinsuffizienz für Proteine hin. Unterschieden wird eine komplette von einer inkompletten Form, bei der nur einzelne Mikroproteine im Bereich zwischen 66 und 30 kDa auftreten. Bei protrahierter Schädigung der Ladungs- und Größenselektivität des Glomerulumfilters steigt die Proteinkonzentration an intermediären, HMW sowie LMW im Ultrafiltrat weiter an. Ist der Reabsorptionsmechanismus im proximalen Tubulus erschöpft, erscheinen Proteine aller Molekülgrößen im Harn und es liegt eine gemischte Form vor. In Abbildung 2.3 sind die typischen Muster der Proteinbanden für die Klassifizierung in renal, extrarenal bzw. glomerulär und tubulär dargestellt.

| Protein | Molmasse $\times 10^3$ | Serum | Glomerulär | | | Tubulär | | PP | Hb |
|---------------------------|---------------------------|------------------|------------|----|----|---------|----|-------|----|
| | | Element A1/B5 | A1 | A4 | A2 | B2 | B1 | A5/B3 | B4 |
| 15 s-Ig | 320 | ■ | ■ | | | | | ■ | |
| 7s - Ig | 156 | ■ | ■ | | | | | | |
| di - Albumin | 130 | ■ | ■ | ■ | | | | | |
| THP | 100 | | | | | | | | |
| Transferrin | 89 | ■ | ■ | | ■ | | | | |
| Albumin | 67 | ■ | ■ | | ■ | ■ | ■ | ■ | |
| di - L-Ketten | (45) | | | | | ■ | ■ | | |
| Antitrypsin | 54 | | | | | ■ | ■ | | |
| α_1 - Glycoprotein | 44 | | | | | ■ | ■ | | |
| M - L-Ketten | (22) | | | | | ■ | ■ | | |
| di - Hb | 32 | ■ | | | | | | ■ | ■ |
| Apo A-1-BP | 29 | | | | | | | | |
| RBP | 21 | | | | | | ■ | | |
| M - Hb | 16 | | | | | | ■ | | ■ |
| β_2 - Mikroglobulin | 12 | | | | | | ■ | | ■ |

Abb. 2.3: Schema der Proteinurie-Elemente entsprechend ihrer Auftrennung nach der molekularen Größe (modifiziert nach BOESKEN 1985). *Ig* Immunglobulin, *di/M-L-Ketten* dimere/monomere leichte Immunglobulinketten, *THP* Tamm-Horsfall Protein, *ApoA-1-BP* ApoA-1 Bindungsprotein, *RBP* Retinol-Bindungsprotein, *Hb* Hämoglobin, *PP* Paraproteinurie; vergl. auch Tab. 2.3.

2.2.4.3 Angewandte qualitative Methoden in der Veterinärmedizin

Auch beim Hund wurde die SDS-Gelelektrophorese zur Diagnostik von Nephropathien und zu Verlaufskontrollen nierenerkrankter Patienten sowohl unter Verwendung der Coomassie-Brillantblau-Färbung, als auch der Silberfärbung angewendet (MÜLLER-PEDDINGHAUS und TRAUTWEIN 1977a, 1978, VOLPERT et al. 1989, LEOPOLD-TEMLER und NOLTE 1995). Andere Methoden, die lediglich nach der elektrischen Mobilität trennen, haben sich nicht als geeignet erwiesen (COYE et al. 1955, HARVEY und HOE 1966). Die genannten Autoren zeigten übereinstimmend, dass mit Hilfe der SDS-PAGE renale und extrarenale sowie tubuläre und glomeruläre Proteinurien beim Hund differenziert werden konnten. Die Untersuchungsergebnisse verschiedener Studien zeigten dabei eine gute Korrelation zwischen den mit der SDS-PAGE aufgetrennten Urinproteinmustern und den histopathologischen Nierenbefunden, so dass beim Hund auf der Basis des Proteinmusters eine grobe Differenzierung der Nephropathie für möglich gehalten wird (MÜLLER-PEDDINGHAUS und TRAUTWEIN 1977a, SCHULTZE und JENSEN 1989, VOLPERT et al. 1989).

2.2.4.4 Spezifische Markerproteine zur Lokalisierung der Nierenschädigung in der Humanmedizin

Die SDS-PAGE lässt mit ihren verschiedenen Proteinurie-Elementen Rückschlüsse auf die Lokalisation der Schädigung zu (BOESKEN et al. 1973, 1975, 1976a). Jedoch gewinnen Verfahren, die einzelne Proteine als Marker für bestimmte Veränderungen im Nephron identifizieren, immer mehr an Bedeutung (HAMPEL et al. 2001, NEDLEKOV und NELSON 2001). Mit Hilfe eines Standardproteingemisches können die bei der SDS-PAGE erscheinenden Proteinbanden einer Molmasse zugeordnet werden. Eine genaue Identifizierung der Proteine ist jedoch nur bedingt möglich, da die Banden mehr als nur ein Protein mit der selben molaren Masse enthalten können. Immunologische Methoden wie z.B. der Western-Blot bieten die Möglichkeit der eindeutigen Identifizierung der Proteine.

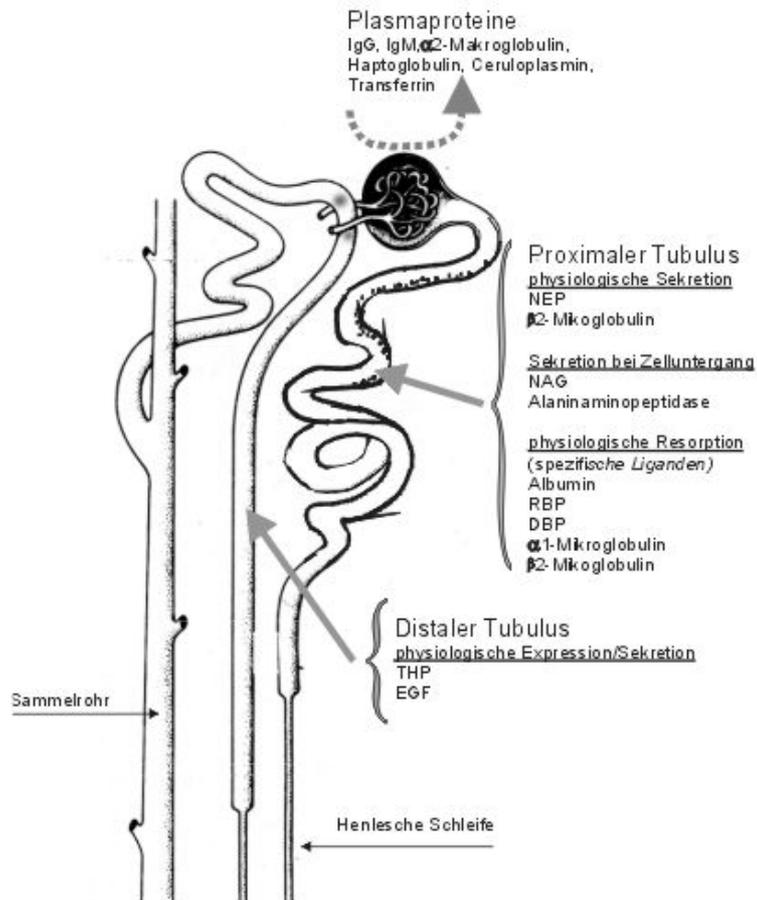


Abb. 2.4: Zuordnung verschiedener Markerproteine zu den jeweiligen Nephronabschnitten, *NEP* Neutrale Endopeptidase, *NAG* N-Acetyl-Glukosaminidase, *RBP* Retinol-Bindungsprotein, *DBP* Vitamin-D-Bindungsprotein, *THP* Tamm-Horsfall Protein, *EGF* Epidermal Growth Factor.

Eine Reihe von verschiedenen Markerproteinen sind in der Nierendiagnostik beim Menschen zum Einsatz gekommen und sind schematisch in Abb. 2.4 dargestellt. Zur Identifizierung von glomerulären Funktionsstörungen werden HMW-Proteine als Marker verwendet. Das am häufigsten verwendete Protein ist das IgG, aber auch andere wie Haptoglobin, Coeruloplasmin, IgM, Transferrin und das α -2-Makroglobulin (TISHKOV et al. 1978, CORSO et al. 1999, TENCER et al. 2000, BAKOUSH et al. 2001). Da ihre immunologische Identifizierung kaum zusätzliche Informationen gegenüber der SDS-PAGE liefert, werden sie als Marker selten in Anspruch genommen.

Als bedeutender hat sich die Identifizierung tubulärer Proteine erwiesen. Als Marker des Tubulussystems kommen Proteine bzw. Enzyme in Frage, die entweder Bestandteil der tubulären Epithelzellen sind, deren Rückresorption im Tubulussystem stattfindet (LMW-Proteine) oder die von den Tubuluszellen exprimiert und sezerniert werden. Ein häufig verwendeter Marker ist die N-Acetyl-

Glukosaminidase (NAG) (CALISKAN et al. 1996). NAG, ein Enzym der Tubuluszellen, wurde bei Schädigung der Zellen in den Harn abgegeben und korrelierte mit dem Grad der Proteinurie (KUNIN et al. 1978). Sowohl NAG als auch ein anderes Enzym, die Alaninaminopeptidase, wurden für die frühe Diagnostik bei akuten tubulären Schäden empfohlen (FLYNN 1990).

Bei chronischen Funktionsstörungen des Tubulussystems wurden Marker wie das α 1-Mikroglobulin oder das Retinol-Bindungsprotein (RBP) angewendet. α 1-Mikroglobulin, ein Glykoprotein mit einer Molmasse von 30 – 33 kDa vorwiegend in proximalen Tubuluszellen vorkommend, schien als Indikator bei tubulären und gemischten Proteinurien geeignet (WEBER und SCHOLZ 1985).

Tab. 2.4: Glomeruläre Markerproteine im Harn (durch Gelelektrophorese ermittelte Molmassen - in Klammern: Molmassen des Aminosäureanteils aus Proteindatenbank Swiss-Prot).

| Name/Datenbank Nr. | | Molmasse [Da] | Funktion/ Vorkommen | Literatur |
|---------------------------|-------------|-------------------|--|--|
| Immunglobulin M | IgM | 970 000 | Frühantikörper der primären Immunantwort, Serum | BAKOUSH et al. 2001 |
| Haptoglobulin | Hp | 310 000 | Akut-Phase-Protein, Bindung von freiem Hämoglobin zur Verhinderung eines renalen Eisenverlusts | TISHKOV et al. 1978 |
| α 2-Makroglobulin | α 2M | 160 797 | Proteinaseinhibitor im Plasma | TENCER et al. 1998 |
| Coeruloplasmin/ P00450 | Cp | 160 000 | Akut-Phase-Protein, 95% des Serumkupfers in dieser Form gespeichert. | NARITA et al. 2001 |
| Immunglobulin G | IgG | 150 000 | Protektive Antikörper der sekundären Immunantwort, Serum | BAZZI und D'AMICO 2002 |
| Transferrin/ P02787 | Tf | 77 000 (75181) | Eisentransport, Stimulation der Zellproliferation | MACGILLIVRAY et al. 1982, KAZUMI et al. 1999 |

Wie α 1-Mikroglobulin hat das Plasmaprotein RBP den Vorteil, dass es durch Rückresorption über den Megalin-Rezeptor spezifisch die Funktion des proximalen Tubulus widerspiegelt. RBP zeigte eine hohe Selektivität bei nierenkranken Kindern, jedoch gegenüber anderen Markern eine geringe Sensitivität (GRILLENBERGER et al. 1987), so dass α 1-Mikroglobulin als Marker für tubuläre Schäden von verschiedenen Autoren favorisiert wird (LUBEC et al. 1987). Bei schweren tubulären Abnormalitäten wurde eine deutliche höhere Sensitivität von RBP festgestellt (TOMLINSON et al. 1997). Vor allem eignete sich RBP für ein Monitoring der Nierenfunktion bei Diabetes mellitus (ABRASS 1984, BOSIN und MONJI 1987, ELLIS et al. 1998, SCHULTZ et al. 2001). Ferner wurde RBP als prognostischer Marker bei der Behandlung von steroidresponsiven Nephropathien eingesetzt (MASTROIANNI-KIRSZTAJN et al. 2000).

Dagegen ist das β 2-Mikroglobulin (M 12 – 14 kDa) weniger geeignet, da es aufgrund seiner pH-Instabilität bei der methodischen Aufbereitung zu falsch niedrigen bzw. falsch negativen Werten führen kann (TOPPING et al. 1986, FLYNN 1990).

α 1-Saures Glykoprotein ist ein Akut-Phase-Protein, das überwiegend als Antwort auf die Zytokine Interleukin 1 und 6 bzw. Tumor-Nekrose Faktor α von Hepatozyten oder Lymphozyten exprimiert wird und die Aktivität des Immunsystems moduliert. α 1-Saures Glykoprotein wurde ebenfalls als Marker der tubulären Funktion angewendet (LUBEC et al. 1987, CORSO et al. 1999). Die Neutrale Endopeptidase (NEP) mit einer molaren Masse von 94 kDa ist ein Ektoenzym des Bürstensaums des proximalen Tubulus und wird unter physiologischen Bedingungen in den Harn sezerniert. Eine Studie über die sogenannte „Chinese herbs nephropathy“ konnte eine verminderte Ausscheidung von NEP durch Dysfunktion des proximalen Tubulus zeigen (NORTIER et al. 1997).

Ein Marker der distalen Tubulusfunktion ist das Tamm-Horsfall Protein (THP) (ZIMMERHACKL 1993). Untersuchungen der THP-Konzentration im Harn nierenerkrankter Patienten führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. Während zum einen keine signifikanten Korrelationen zwischen THP, Serumkreatinin, Albuminexkretionsrate oder Diuresegrad nachzuweisen waren (TORFFVIT et al. 1992, CATALANO und TORFFVIT 1996), konnte andererseits eine verringerte Exkretion von THP bei Erkrankten gemessen werden (HOLMQUIST et al. 2001). Neuere Untersuchungen von TORFFVIT et al. (1998) stellen eine umgekehrte Korrelation zwischen der Exkretionsrate von THP und der Nierenfunktion bzw. der Natrium-Reabsorptionfähigkeit des distalen Tubulus fest. Bei Patienten mit einer akuten Niereninsuffizienz konnte eine reduzierte Sekretion von THP als Zeichen einer gestörten Zellfunktion ermittelt werden (HOWIE 1994). Eine noch deutlichere Korrelation bestand zwischen der Nierenfunktion und dem Epidermal Growth Factor (EGF), der wie THP in den distalen Tubuluszellen synthetisiert und in den Harn sezerniert wird (TORFFVIT et al. 1998).

Weiter wird von einem LMW-Protein mit einer Molmasse von 16 kDa, dem „Urine Protein 1“ (UP1) berichtet, dessen Verwendung als Marker erstmals von TOMLINSON et al. (1990) untersucht wurde. Es ist ein α 2-Glycomikroglobulin, das überwiegend in den Clarazellen der terminalen Bronchien und im männlichen Urogenitaltrakt nach der Pubertät synthetisiert wird. Wegen seines Syntheseortes wird es auch als Clarazell Protein (CC16) bezeichnet. Bei diabetischen Patienten eignete es sich als ein sensitiver Marker der renalen Tubulusfunktion, wobei es sich eher bei weiblichen Probanden bzw. männlichen vor der Geschlechtsreife als sinnvoll erwies (BERNARD et al. 1994).

In neueren Studien wurden verschiedene Proteine auf ihre Verwendung als Marker der glomerulären Filtrationsrate (GFR) untersucht. Als geeignet erschien Serum Cystatin C, ein nichtglykosiliertes Protein, das in konstanter Menge von allen untersuchten kernhaltigen Zellen produziert wird. Es wird frei vom Glomerulum filtriert und im Tubulus katabolisiert. Als Konsequenz seiner niedrigen Molmasse von 14 kDa und seiner gleichmäßigen Produktionsrate ist die Serumkonzentration hauptsächlich durch die GFR bestimmt. Bei der Ermittlung der GFR zeigte Cystatin übereinstimmend eine höhere Sensitivität gegenüber Kreatinin und schien für die Detektion von frühen Stadien der Niereninsuffizienz von Bedeutung zu sein (COLL et al. 2000, DONADIO et al. 2001, DWORKIN 2001, ODDOZE et al. 2001). Untersuchungen für den Hund bestätigten eine gute Korrelation von Serumcystatin mit der GFR und die Eignung für ein Screening von Hunden mit chronischer Niereninsuffizienz (ALMY et al. 2002). Bei Störungen der Nierenfunktion kommt es zu einem Cystatin C Anstieg im Plasma, der bei Hunden diagnostisch auswertbar war. Bislang hat sich jedoch Cystatin als diagnostischer Parameter beim Hund gegenüber der GFR und Kreatinin nicht durchgesetzt.

Tab. 2.5: Tubuläre Markerproteine im Harn bzw. Cystatin C im Serum (Molmassen durch Gelelektrophorese ermittelt - in Klammern: Molmassen des Aminosäureanteils aus Proteindatenbank Swiss-Prot).

| Name/Datenbanknr. | | Molmasse [Da] | Funktion/Vorkommen | Literatur |
|---|-------------|--------------------------|--|---|
| Tamm-Horsfall Protein/ P07911 | THP | 80 – 100 000 (67 137) | Synthese/Sekretion im dist. Tubulus, u.a.: Beeinflussung der Wasserimpermeabilität, Regulator der Na- und Cl-Bewegungen Vorort, sowie protektive antibakterielle Wirkung | TORFITT et al. 1992 |
| Alanin-Amino-peptidase | AAP | 96 – 98 000 | Enzym der Tubuluszellen | FLYNN 1990 |
| Neutrale Endo-peptidase/ P08473 | NEP | 94 000 (85382) | Ektoenzym des Bürstensaums | NORTIER et al. 1997 |
| N-Acetyl-Glukos-aminidase | NAG | 80 – 75 000 | Enzym der Tubuluszellen, Degradation von Heparansulfat | CALISKAN et al. 1996 |
| α 1-Saures Glykoprotein/ P02763 | AGP | 44 000 | Akut Phase Protein; Synthese in Hepato- und Leukozyten als Antwort auf IL1/6 und TNF- α , moduliert die Aktivität des Immunsystems | SELTING et al. 2000 |
| α 1-Mikroglobulin/ P02760 | α 1m | 30 – 33 000 (20 847) | Synthese: überwiegend prox. Tubulus + Leber; Vorkommen: Plasma, Harn, Liquor; Vorstufen für Proteolyse von Chymotrypsin, Elastase, Trypsin, sowie proteolytische Prozesse in Niere | WEBER und SCHOLZ 1985; VETR und GEBHARD 1990 |
| Retinol-Bindungsprotein/ P02753 | RBP | 21 071 | Trägerprotein für Vitamin A im Plasma, spezifische Reabsorption im proximalen Tubulus | SCHULZ et al. 2001; RASK et al. 1981; MONACO und ZANOTTI 1992 |
| Urine Protein 1 | UP1 | 16 000 | Synthese in Clarazellen und männlichem Urogenitaltrakt | TOMLINSON et al. 1990 |
| β 2-Mikroglobulin/ P01884 | β 2m | 11 731 | β -Kette des MHC Komplex I | TOPPING et al. 1986; CUNNINGHAM et al. 1973 |
| Epidermal Growth Factor/ P01183 | EGF | (6 222) | Synthese und Sekretion im distalen Tubulus, Stimulation von epidermalen und epithelialen Gewebe | TORFITT et al. 1998; GREGORY und PRESTON 1977 |
| Cystatin C/ P01034 | | 13 347 | Marker der GFR, lokaler Inhibitor der Cystein Protease | COLL et al. 2000; DONADIO et al. 2001; ALMY et al. 2002 |

2.3 Urolithiasis - Definition

Verschiedene Begriffe werden in der Literatur verwendet, die Präzipitate im Urin beschreiben. Je nach Größe und Konsistenz werden sie als Kristalle, Sand, Steine, Calculi oder Urolithen bezeichnet. Das Wort *Kristall* stammt aus dem Griechischen [griech.: *krystallosus*] und bedeutet *Eis*, bezugnehmend auf die innere Struktur bzw. dem Aufbau der symmetrischen Oberflächen. Im Lateinischen wird unter *Calculus* eine Art Kieselstein verstanden. *Urolith* hat seinen Ursprung im Griechischen, dabei steht *Lithos* für Stein und das Suffix *-uria* stammt vom griechischem Begriff für Harn, *Ouron*. Die bevorzugte Terminologie für abnormal mikroskopisch groß vorkommende Präzipitate im Urin ist die *Kristallurie*, während makroskopisch große Konkremente als *Urolithe* bzw. im Deutschen als *Harnsteine* bezeichnet werden. Harnsteine werden zum einen nach ihrer mineralischen Zusammensetzung und zum anderen nach ihrer Lokalisation – Nierensteine, Blasensteine, Urethraesteine - benannt.

2.3.1 Vorkommen und Bedeutung der Urolithiasis beim Hund

Beim Menschen ist das Erkrankungsbild sehr lange bekannt, die ältesten Funde stammen aus den Jahren 3000 – 4000 v. Chr.. Während der vergangenen Jahrhunderte waren Harnblasensteine vor allem bei Kindern die vorherrschende Form. Bis heute ist diese Art der Steine und Lokalisation fast völlig verschwunden, jedoch nimmt die Anzahl an Harnsteinen im oberen Harntrakt bei Erwachsenen signifikant zu. Fast 80% der Steine bestehen aus Calciumoxalat (CaOx) oder Calciumphosphat (CaP) mit einem deutlich höheren Anteil an Calciumoxalat (ROBERTSON 1993). Harnsteine bestehend aus Magnesiumammoniumphosphat (Synonyme: MAP, Struvit, Triammoniumphosphat) sind bei Menschen seltener und ausnahmslos in Verbindung mit einer Infektion des Harntraktes anzutreffen. Im Gegensatz dazu ist Struvit immer noch der am häufigsten vorkommende Harnstein beim Hund (OSBORNE et al. 1985). Auch beim Hund bildet sich der MAP in der Regel in Verbindung mit einer bakteriellen Harnwegsinfektion und wird als einziger, sicherlich aufgrund der anatomischen Situation, häufiger bei weiblichen Hunden gefunden (OSBORNE et al. 1986a). Er ist der einzige Harnsteintyp, der bei Hunden unter einem Jahr gefunden wird und tritt bei über 30 verschiedenen Rassen auf (FRANTI et al. 1999). Seit der Einführung angesäuerter Diäten zur Auflösung bzw. Prophylaxe von Struvitsteinen ist der Anteil an calciumhaltigen Harnsteinen zunächst in den USA und derzeit auch in Europa von 6 auf über 27% deutlich angestiegen (HESSE et al. 1997, LULICH et al. 1999). Weitere Harnsteintypen beim Hund sind Harnsäure, Natrium- bzw. Ammoniumurate, Cystin, Calciumphosphat, Silikat, Xanthin und Dihydroxyadenin. Die ersten fünf einschließlich MAP und Calciumoxalat sind die am häufigsten vorkommenden Arten (OSBORNE et al. 1999b). Es existieren klare Speziesunterschiede in der anatomischen Lokalisation von Harnsteinen. Obwohl 63% der Urolithe beim Menschen klein genug sind, um spontan über die harnableitenden Organe ausgeschieden zu werden, ist nicht geklärt, ob eine ähnliche Situation beim Hund existiert. Die große Mehrzahl der Steine, die bei Hund und Katze auftreten, befinden sich in Blase (ca. 61%) oder Urethra (ca. 34%). Beim Menschen ist eine Lokalisation in Blase oder Urethra mit nur 10% selten vertreten (MARKWELL et al. 2000). Vom Auftreten von Nephrolithen beim Hund wird äußerst selten berichtet. Obwohl es möglich ist, dass Nephrolithe bei Kleintieren unterdiagnostiziert bleiben, wird als Ursache die unterschiedliche Körperhaltung und damit die Lage der Nieren bei Vierbeinern in Betracht gezogen. Die bereits angesprochene Geschlechterverteilung verschiedener Harnsteintypen liegt beim Hund ähnlich wie beim Menschen auf der Seite der männlichen Tiere (männlich : weiblich 1,4:1) – mit einer Ausnahme: den Struvitsteinen. Betrachtet man die Rasseverteilung bei den einzelnen Harnsteinarten, so sind bestimmte Rassen prädisponierend beteiligt. Aufgrund eines erblichen Defektes haben Dalmatiner hauptsächlich Uratsteine (BARTGES et al. 1999) und der in Deutschland weitverbreitete Teckel sehr häufig Cystinsteine (BARTGES et al. 1994, OSBORNE et al. 1999c). CaOx-Urolithe treten häufiger bei männlichen und älteren Hunden auf. Bevorzugt betroffen sind kleine Rasse wie Yorkshire Terrier, West Highland White Terrier, Kleinschnauzer, Lhasa Apsos, Bichons Frises, Shih Tzu und Kleinpudel (LULICH et al. 1999).

Die Rezidivrate von Harnsteinen innerhalb eines Jahres nach Bildung des ersten Steines beträgt 15 – 25% beim Menschen und 18 – 47% beim Hund. Die höhere Rate beim Hund beruht wahrscheinlich auf der Tatsache, dass Hunde gegenüber Menschen mehr infektionsbedingte Steine haben und dass Harnwegsinfektionen schwerer zu bekämpfen sind.

2.3.2 Theorien der Lithogenese

Aus dem überwiegend humanmedizinischem Schrifttum lassen sich für die Harnsteingenesse im wesentlichen drei Theorien ableiten, von denen keine den Anspruch auf Alleingültigkeit erheben kann. Die Lithogenese wird einheitlich als ein diskontinuierlicher Prozess betrachtet, der unmittelbar ablaufende Stadien wie Nukleation oder Aggregation von Kristallen oder langsam verlaufende Stufen wie Kristallwachstum oder Auflösung beinhaltet. Der Stein ist die Konsequenz dieser Kristallisationsphasen, welche durch mannigfaltige Substanzen und Konditionen im Harn beeinflusst werden. Je nach Theorie ist die Gewichtung der verschiedenen Faktoren sehr unterschiedlich. Auf der Basis des derzeitigen Kenntnisstandes gehören die *Kristallisationstheorie*, die *Matrix-Nukleationstheorie* und die *Kristallisationsinhibitortheorie* zu den wichtigsten Hypothesen. Die Unterschiede sollen im Anschluss an allgemeinen Abläufe der Harnsteingenesse dargelegt werden.

Urin ist das Endprodukt entstehend nach glomerulärer Filtration und tubulärer Reabsorption bzw. Sekretion. Verschiedene Salze wie Calciumoxalat (CaOx), Calciumphosphat (CaP), Harnstoff oder Natriumurat kommen normalerweise in einer übersättigten Konzentration im Harn vor, die folgend kristallisieren können. Die Übersättigung aufgrund einer hohen molekularen Konzentration schwer löslicher Substanzen oder aufgrund einer geringen Ionendissoziation kann durch verschiedene Faktoren ausgelöst sein. Darunter fallen eine geringe Harnproduktion, tubuläre Defekte, exzessive intestinale Absorption oder diätetischer Intake von Salzen oder auch metabolische Störungen (COE et al. 1991b, DAUDON et al. 1995).

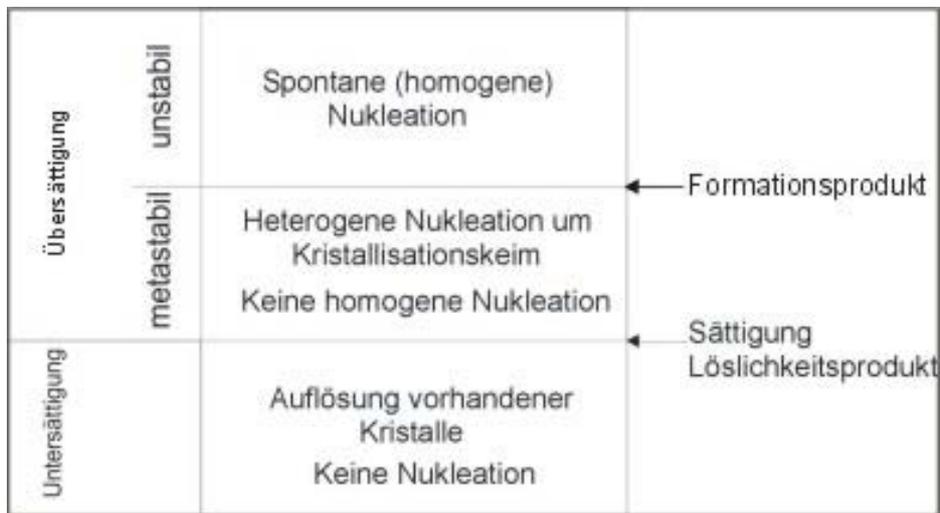


Abb. 2.5: Homogene und heterogene Nukleation von Kristallen im Urin in Abhängigkeit des Sättigungsgrades (modifiziert nach FLEISCH 1983).

Die Übersättigung von Salzen ist die erste Voraussetzung für die Kristallbildung. Dieser erste Schritt wird als Nukleation bezeichnet. Die Übersättigung eines Salzes ist definiert als Verhältnis zwischen seinem Ionenaktivitätsprodukt und Löslichkeitsprodukt. Ist der Grad der Übersättigung so hoch, dass es zur spontanen, sogenannten homogenen Nukleation kommt, ist das Formationsprodukt des Salzes überschritten und es liegt eine instabile übersättigte Lösung vor (Abb. 2.5). Liegt die Konzentration des Salzes unterhalb des Formationsproduktes, d.h. das Löslichkeitsprodukt wird überschritten, ist die Lösung metastabil übersättigt. Neue Kristalle können sich nur heterogen, d.h. um einen zusätzlichen Kristallisationskeim bilden. Dazu gehören bereits entstandene Kristalle, Zellfragmente, Bakterien oder Matrixproteine. Die meisten Prozesse der Steinbildung sind durch die heterogene Nukleation induziert, die weniger Aktivierungsenergie benötigt. Ein typisches Schema ist ein Calciumoxalatstein mit einem CaP- oder Harnsäure-Kristallisationskern (DAUDON et al. 1993). Liegt das Produkt der aktiven Konzentrationen von z.B. Calcium- und Oxalationen unterhalb des Löslichkeitsproduktes von CaOx, ist die Lösung untersättigt; neue Kristalle entstehen nicht, allenfalls schon vorhandene lösen sich auf. Die Nukleation ist für sich allein als sinnvolles Phänomen anzusehen, da sie die Übersättigung an kristallbildenden Ionen abbaut, ohne dass Partikel von kritischer Größe entstehen. Das Auftreten von Einzelkristallen im Urin ist als normal zu betrachten (FLEISCH 1978).

Der nächste Teilschritt in der Entstehung von Harnsteinen ist das Kristallwachstum. Im Gegensatz zur Kristallneubildung kann das Wachstum auch im moderat übersättigten Harn stattfinden. Die Kinetik

des Wachstums ist von jeder Oberflächenseite des Kristalls unterschiedlich, wodurch die bizarren Formen der Harnsteine zu erklären sind. Als Beispiel kann die Inkorporation kristallbildender Ionen durch die Adsorption von inhibitorisch wirkenden Substanzen an einer Stelle gestoppt werden. Die Wachstumsrate ist ein wichtiger Schritt für die Vergrößerung des Steines, jedoch ist sie allein nicht ausreichend für die Retention in Niere oder Blase, da der Harn in der Regel nur eine kurze Verweildauer in den jeweiligen Organen hat (DAUDON et al. 1995). Zusätzlich aggregieren die Kristalle zu Partikeln von pathophysiologisch relevanter Größe. Die Kristallaggregation ist ein schnell ablaufendes Phänomen, für das verschiedene Mechanismen verantwortlich sind: 1) Van der Waals – Kräfte, die die Aggregation durch elektrostatische Anziehungskräfte induzieren; 2) visköse Bindungen zwischen der Kristalloberfläche und starken elektronegativen Makromolekülen, die die Kristalloberfläche bedecken und als Zement zwischen Kristallen oder zwischen Kristall und Epithelzelloberfläche fungieren (LEAL und FINLAYSON 1977). Der Prozess der Aggregation wird als wichtigster Schritt der Harnsteinbildung gesehen (BAUMANN et al. 2000).

Obwohl der Organismus in der Lage ist, Kristalle und auch Aggregate mit dem Harn zu eliminieren, kommt es bei Steinbildnern zur Retention der Partikel in unterschiedlicher anatomischer Lokalisation und schließlich zum Ausbilden des Harnsteines. In Abbildung 2.6 sind die einzelnen Schritte der Lithogenese graphisch dargestellt.

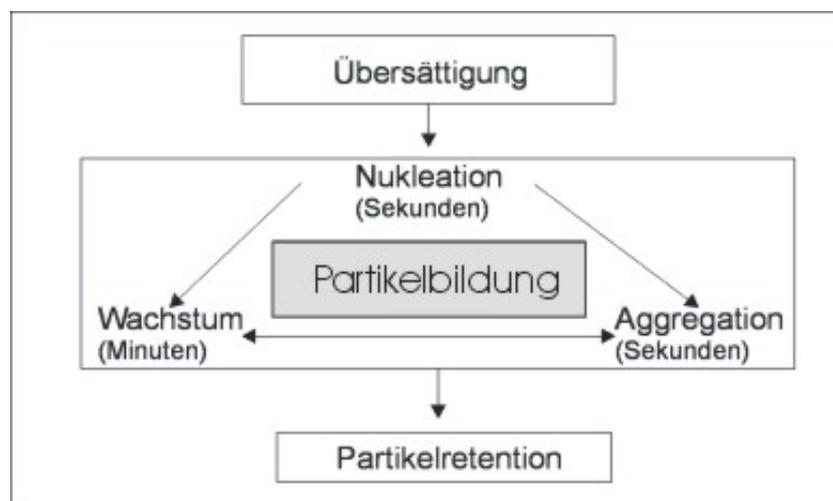


Abb. 2.6: Urinübersättigung, Partikelbildung und Partikelretention als Teilschritte der Entstehung von Nierensteinen (modifiziert nach HESS 1989).

Die *Kristallisationstheorie* geht davon aus, dass eine exzessive Übersättigung des Harns vorliegen muss, damit es zur Nukleation als rein physikochemischer Prozess kommt. Matrixproteine werden unspezifisch während des Wachstums im Urolith inkorporiert. Diese Hypothese enthält eine plausible Erklärung für die Entstehung von Cystin-, Urat- und MAP-Steinen. Sie ist ebenso für CaOx-Steinpatienten mit vorliegender Hypercalciurie, Hyperoxalurie oder einer Kombination von diesen anwendbar.

Im Gegensatz dazu vertritt die *Matrix-Nukleationstheorie* die Hypothese, dass gerade die Matrixsubstanzen die Nukleation fördern bzw. diese vorgeformte organische Matrix als Kristallisationskeim die primäre Determinante in der Entstehung darstellt. Gestützt wird diese These durch die Beobachtung, dass eine spezifische Komposition von Aminosäuren bei unterschiedlichen Steinarten vorkommen (SPECTOR et al. 1976). Die *Kristallisationsinhibitortheorie* hebt die Reduktion bzw. das Fehlen von organischen und nichtorganischen Inhibitoren als wichtigster Einflussfaktor bei der Bildung von calciumhaltigen Harnsteinen hervor.

2.3.2.1 Funktion und Bedeutung von Regulatoren für die Lithogenese

Im Harn auftretende organische oder anorganische Substanzen, welche die Kristallisationsvorgänge modifizieren, werden als Regulatoren bezeichnet (SMITH 1987). Darunter gehören Chelatoren, die in äquimolarer Konzentration zu einem steinbildenden Ion auftreten und mit diesem lösliche Komplexe bilden. Sie reduzieren durch die Bindung die freie Ionenaktivität und die Übersättigung. Das diagnostisch und therapeutisch wichtigste Beispiel ist das negativ geladene Citrat. Die

Citratkonzentration im Urin liegt im millimolaren Bereich also äquimolar zu Calcium (PAK 1987). Im Gegensatz zu den Chelatoren sind Inhibitoren Substanzen, die in rund 1000fach geringerer, mikromolarer Konzentration im Urin auftreten und deshalb die Übersättigung nicht beeinflussen (BAUMANN 1988). Sie sind überwiegend Makromoleküle (Gruppe 1 und 2) mit einem molekularen Gewicht zwischen 10 und 100 kDa und können in drei Gruppen eingeteilt werden: 1. Glykosaminoglykane (z.B. Chondroitinsulfat, Heparansulfat), 2. Glykoproteine (z.B. Nephrocalcin, Uropontin, THP) und 3. Ribonukleinsäuren (DAUDON et al. 1995). Wie Inhibitoren wirken auch Promotoren im mikromolaren Konzentrationsbereich. Es handelt sich ebenfalls um Makromoleküle, deren Oberflächen als Kristallisationskeime für heterogene Nukleation und Wachstum von Kristallen dienen. Ihre inhibitorische bzw. promotorische Wirkung kann sich auf einzelne Teilschritte der Steinbildung beschränken.

Der Einfluss von Inhibitoren bzw. Promotoren ist von Bedeutung, wenn keine exzessive Übersättigung des Harns vorliegt. In solchen Fällen findet immer eine homogene Nukleation statt und das Kristallwachstum kann durch Oberflächennukleation oder Diffusion kontrolliert ablaufen. Vorkommende Inhibitoren können folglich nur ganz geringe bzw. keine Wirkung zeigen. Als Konsequenz können Inhibitoren bzw. Promotoren nur Einfluss bei den sogenannten idiopathischen Urolithiasispatienten haben. Bei genetisch bedingter Cystinurie oder Uraturie liegt eine deutlich Übersättigung der Salze vor, so dass hier der modulierende Einfluss vernachlässigt werden muss (GRASES und CONTE 1992).

2.3.2.2 Einflussfaktoren auf die Bildung von Steintypen bei Mensch und Hund

Struvitsteine werden beim Menschen ausschließlich in Zusammenhang mit einer Infektion des Harntraktes beobachtet. Beteiligt sind überwiegend ureaseproduzierende Bakterien wie z.B. E. coli, Proteus, Streptokokken, Staphylokokken (BIBERSTEIN 1977, LING et al. 1979, ANG 1995, MEYRIER 1995, FARO und FENNER 1998). Dessen bakterielle Urease katalysiert die Hydrolyse von Harnstoff, wodurch zum einen die Harnstoffkonzentration und Alkalisierung und zum anderen die lokale Konzentration von Ammoniak, Bikarbonat und Karbonat ansteigen. Diese Kaskade biochemischer Prozesse führt zur Bildung von Struvitsteinen. Klinische und experimentelle Studien haben gezeigt, dass sich infektionsbedingte Struvitsteine beim Hund innerhalb von 2 – 8 Wochen bilden können (KLAUSNER et al. 1980). Zusätzlich kommt es beim Hund zur Bildung von Struvitsteinen als Konsequenz von metabolischen, sogenannten nichtinfektiösen Prozessen (WEAVER 1970, OSBORNE et al. 1986b).

Cystinurie ist ein autosomal rezessiver Defekt des resorptiven Transportmechanismus von Cystin und den dibasischen Aminosäuren Ornithin, Arginin und Lysin im Bereich des proximalen Tubulussystems der Niere und des Dünndarms. Kürzlich konnten zwei Subunits des renalen Cystintransports identifiziert werden. Mutationen der verantwortlichen Gene werden für den Phänotyp der Cystinurie verantwortlich gemacht (ALBERS et al. 2001). Bei Übersteigen des Löslichkeitsprodukts im sauren Harn bildet Cystin Kristalle bzw. Harnsteine (GOODYER et al. 1998).

Die Entstehung von Ammoniumuratsteinen bzw. Natriumuratsteinen kommt sowohl beim Menschen als auch beim Hund vor. Insbesondere sind Dalmatiner für diese Art der Steine prädisponiert. Gegenüber anderen Hunderassen besitzen sie eine reduzierte Aktivität der Uricase, so dass beim Abbau von Purinen vermehrt Harnsäure anfällt, anstatt weiter zu Allantoin umgesetzt zu werden. Vergleichsstudien zum Purinstoffwechsel in Leber und Niere bei Dalmatinern und Hunden anderer Rassen konnten feststellen, dass die Leber der Dalmatiner Harnsäure nur unvollständig zu Allantoin umwandelt, obwohl das Enzym in ausreichender Konzentration vorliegt (APPLEMAN et al. 1966, KUSTER et al. 1972). Zurückgeführt wurde dies auf eine partiell impermeable Zellmembran für Harnsäure in der Leber. Desweiteren reabsorbiert der proximale Tubulus der Niere weit weniger Harnsäure gegenüber anderen Rassen. Zusätzlich kann Harnsäure vom distalen Abschnitt sezerniert werden (FOREMAN 1984). Eine hohe Inzidenz von Ammoniumuratsteinen wurde außerdem bei Hunden mit Abnormitäten der Portalvenen beobachtet (KRUGER und OSBORNE 1986). Durch den Bypass der Leber kommt es zur reduzierten Umsetzung von Harnsäure zu Allantoin und Ammoniak zu Harnstoff.

Die Ätiopathogenese von calciumhaltigen Steinen ist bei Mensch und Hund nicht geklärt. Sie wird als Folge einer Konstellation von zugrundeliegenden Störungen angesehen. Diskutiert werden Veränderungen der Balance zwischen steinbildenden Salzen (Calcium, Oxalat und Phosphat) und Kristallisationsinhibitoren (Citrat, Magnesium, Mukoproteine) (LULICH et al. 1991, KRUGER et al. 1996, 1999).

2.3.3 Harnproteine bei Urolithiasispatienten und ihre Bedeutung für die Lithogenese

Harnproben sind in den meisten Fällen auf natürlichem und nichtinvasivem Weg zu gewinnen. Ihre Analyse als Erkrankungsindex ist bis in das Jahr 1770 zurückzuverfolgen, als COTUGNO als erster demonstrierte, dass Albumin nach Erhitzen im Harn bestimmter Patienten präzipitiert (BIANCHI-BOSISIO et al. 1991). Der Harn von Steinpatienten enthält bestimmte Proteine, die entweder in ihrer molekularen Struktur verändert erscheinen oder die in deutlich niedriger oder erhöhter Konzentration im Vergleich zu gesunden Menschen auftreten. Die Proteine erhielten besondere Aufmerksamkeit, da von ihnen inhibitorische sowie promotorische Wirkungen für die Lithogenese auszugehen schienen. Diverse Harnproteine sind beim Menschen bereits identifiziert worden (vergl. Tab. 2.6). Unterschiede des Harnproteinprofils traten ebenfalls auf, wenn radiologisch keine Steine bzw. Konkreme feststellbar waren. So ergaben quantitative Bestimmungen von verschiedenen Proteinen wie α -, β - und γ -Globuline, Matrix-Substanz-A und THP eine erhöhte Konzentration bei steinbildenden Patienten (BOYCE 1970). Zusätzliche Proteinbanden konnten bei der 2D-Gelelektrophorese als Besonderheit im Harn von 20 idiopathisch CaOx-Steinpatienten mit Rezidiven beobachten werden (GROVER und RESNICK 1995). Jedoch gelang es nicht, die acht Proteinbanden zu identifizieren, sondern ihnen konnte nur eine Molmasse zugeordnet werden. Mit Hilfe von Standards und reinen Proteinproben wurden Molmassen von ca. 43, 39,5, 29, 27, 26,5, 26, 25,5 und 18,5 kDa ermittelt. Proteinbanden mit sehr ähnlicher molekularer Masse wurden als Ergebnis posttranslationaler Addition basischer Gruppen an dasselbe Protein interpretiert. Ein Protein wurde als α 1-Saures Glykoprotein (M bei 42 – 44 kDa) identifiziert (GROVER und RESNICK 1995). Während es bei gesunden Menschen im Harn nur in geringer Konzentration vorkommt, lag bei den untersuchten Steinpatienten ein deutlich höherer Gehalt vor.

Ein Glykoprotein mit einer Molmasse zwischen 30 – 40 kDa, das Matrix-Substanz-A-Protein (MSA), hatte besondere Beachtung in den Sechzigern erhalten (KING et al. 1961, BOYCE und KING 1963, KING und BOYCE 1963, KEUTEL und KING 1964). Es ist renaler Herkunft und trat ausschließlich bei Patienten mit Harnsteinen bzw. anderen Nierenschädigungen in einer Konzentration von 23 mg/Tag auf (MOORE und GOWLAND 1975). In einer Studie stellte das Protein den größten Anteil der Steinmatrix dar und war gleichzeitig in der nichtultrafiltrierbaren Fraktion des Harns von Steinbildnern festzustellen (BOYCE et al. 1962). Der immunologische Nachweis ergab einen hohen Anteil an Glutamin- und Asparaginsäure, typisch für viele Matrixproteine. Eine genauere Identifizierung gelang jedoch nicht.

Uropontin, das sehr ähnlich zu dem im Plasma und im Knochen vorkommenden Osteopontin ist, besitzt eine starke inhibitorische Aktivität bei Nukleation, Aggregation und Wachstum von CaOx-Steinen (WORCESTER und BESHENSKY 1995). Vor seiner genauen Identifizierung wurde es häufig auch als Osteopontin bezeichnet. Es ist ein Glykoprotein, das weder Cystin- noch Carboxyglutaminsäurereste besitzt. Dafür ist es reich an Asparaginsäure, die für die Inhibitoraktivität eine Rolle spielt (SHIRAGA et al. 1992). Durch Immundetektion konnte Uropontin in den Zellen des aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife lokalisiert werden. Mit einer mittleren täglichen Ausscheidung von 185 ± 12 nmol bzw. 3 mg/l liegt es im Konzentrationsbereich, der eine deutliche inhibitorische Wirkung hat (ASPLIN et al. 1998, MIN et al. 1998).

Urinary Prothrombin Fragment 1 (UPTF 1), das vor der Identifizierung als Crystal-Matrix-Protein in der Literatur angesprochen wurde, wird ausschließlich von Epithelzellen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife exprimiert. Es unterscheidet sich von dem im Plasma vorkommenden PTF1. UPTF 1 konnte in 15 – 60% der Nephrone immunhistologisch nachgewiesen werden. Eine täglich Ausscheidung von 10 bis 15 mg d.h. 1 – 35 nmol/l konnte bei gesunden Probanden gemessen werden (STAPLETON et al. 1996). Die inhibitorische Wirkung entspricht der von THP (GROVER et al. 1998), die auf die Glutaminomäne zurückgeführt wird (RYALL et al. 1995).

Ein ebenfalls neuerer Inhibitor ist das Bikunin, das wie Prothrombin in die Familie des Inter- α -Trypsin-Inhibitor gehört. Ursprünglich als Uronic-acid-rich Protein bezeichnet, wurde es als leichte Kette des Inter- α -Inhibitors ($I\alpha$) identifiziert (ATMANI et al. 1996a). Bikunin wird neben der Leber auch in der Niere synthetisiert. Dieses Glykoprotein hat im SDS-PAGE eine molare Masse von 35 kDa gegenüber der 10 kDa leichteren Form im Plasma und wirkt als Inhibitor beim CaOx-Kristallwachstum und Aggregation (ATMANI et al. 1993, ATMANI und KHAN 1999). Die Wirkung ist jedoch schwächer als PTF1 und die Aktivität im Harn von Steinpatienten deutlich herabgesetzt (ATMANI et al. 1994). Steinpatienten scheiden zudem eine deutlich niedrigere Konzentration an UPTF 1 aus (MÉDÉTOGNON-BENISSAN et al. 1999). Neuere Studien, die die inhibitorischen Eigenschaften mehrerer Vertreter der Inter- α -Inhibitor Familie *in vitro* getestet haben, konnten nur relativ schwache

Aktivitäten von den schweren Ketten H1 und H2 sowie dem kompletten $\alpha 1$ messen, so dass ihnen eine nur unwesentliche Rolle in der Steinformation zugesprochen wird (DEAN et al. 2000).

Nephrocalcin, ein saures Glykoprotein mit einer Molmasse von 14 kDa, wurde erstmals 1978 isoliert (NAKAGAWA et al. 1978). Abhängig vom Polymerisierungsgrad differiert die molare Masse als Monomer, Dimer, Trimer oder Tetramer von 14 – 15, 23 – 30, 45 – 48 oder schließlich 60 – 68 kDa. Nephrocalcin wird im proximalen Tubulus sowie im dicken Ast der Henleschen Schleife gebildet und existiert in vier Isoformen mit unterschiedlichem Gehalt an Carboxyglutaminsäureresten (NAKAGAWA et al. 1985). Nephrocalcin A wirkte als ein starker Inhibitor und wird überwiegend bei gesunden Individuen gefunden. Dagegen ist die Isoform C ein deutlich schlechterer Inhibitor und kommt bei Patienten mit wiederkehrender Harnsteinbildung vor (MUSTAFI und NAKAGAWA 1996). Harnsteinbildende Patienten produzieren ein abnormales Molekül, dem die γ -Carboxyglutaminsäurereste fehlt (COE et al. 1991b). Die Glutaminsäurereste stabilisieren die dreidimensionale Konformation von Nephrocalcin zu Calcium während der Ionenbindung und sind folglich für die inhibitorische Wirkung von Bedeutung. Unter dem Einfluss des pH-Wertes oder der Ionenkonzentration des Harns verändert Nephrocalcin seine inhibitorische Wirkung, jedoch in abgeschwächter Form gegenüber THP (HESS et al. 1989). Untersuchungen über seine Herkunft ziehen in Betracht, dass Nephrocalcin ein Bestandteil des Bikunin sein könnte (TANG et al. 1995).

Sowohl im Harn als auch in CaOx-Steinen gelang es, ein Phosphoprotein zu isolieren, das eine partielle Strukturhomologie zu dem Lithostathin des Pankreas aufweist (VERDIER et al. 1992). Es hat eine höhere Molmasse von 23 kDa als Lithostathin und wird von den Epithelzellen des proximalen Tubulus sowie denen des dicken aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife exprimiert. Das renale Lithostathin besitzt eine protektive Rolle gegenüber Wachstum und Nukleation von Calciumcarbonatkristallen (GEIDER et al. 1996).

Eine inhibitorische Potenz gegenüber der Aggregation der CaOx-Kristalle konnte ebenfalls für $\alpha 1$ -Mikroglobulin ermittelt werden (GROVER et al. 1998). $\alpha 1$ -Mikroglobulin besitzt jedoch eine unbedeutendere Inhibitorrolle als THP oder Albumin. Die Molmasse wird beim Menschen mit knapp 39 kDa angegeben. $\alpha 1$ -Mikroglobulin wird in der Leber synthetisiert und ist in vielen physiologischen Flüssigkeiten wie Plasma, Urin und Liquor häufig als Komplex mit IgA oder Albumin zu finden. Im Harn kommt $\alpha 1$ -Mikroglobulin in sehr geringen Konzentrationen mit ca. 51 mM sowohl bei gesunden als auch Lithiasispatienten vor. Bei Menschen mit CaOx-Steinen ist die Harnkonzentration deutlich geringer (TARDIVEL et al. 1999). Es wirkt hemmend auf die Bildung von Trypsin und Plasmin, fördert aber proteolytische Prozesse in Niere und Harn (GROVER et al. 1998).

$\beta 2$ -Mikroglobulin wird in einer Konzentration von ca. 0,1 bis maximal 0,2 mg (entsprechend 0,01 nM) über den Harn des Menschen ausgeschieden. Untersuchungen über die Wirkung von $\beta 2$ -Mikroglobulin haben ergeben, dass selbst in einer 5fach höheren Konzentration als im normalen Harn kaum inhibitorische Aktivitäten zu messen sind (RESNICK et al. 1980). Dagegen inhibiert Albumin bereits bei einer Konzentration von 0,01 μ M die Aggregation, jedoch wesentlich schwächer als Nephrocalcin oder THP. Die durchschnittliche Harnkonzentration von Albumin lag um die 0,3 μ M/l beim Menschen (HESS et al. 1989).

Bei der Analyse über die Rolle von Glykosaminoglykanen für die Lithogenese wurden Heparin, Chondroitinsulfat und dem Heparin analogen Pentosanpolysulfat als Inhibitoren von Wachstum und Aggregation der CaOx-Kristalle identifiziert (FELLSTROM et al. 1986).

Tab. 2.6: Als Inhibitoren identifizierte sowie in Harnsteinen isolierte Harnproteine beim Menschen (Molmassen durch Gelelektrophorese ermittelt - in Klammern: Molmassen des Aminosäureanteils aus Proteindatenbank Swiss-Prot).

| Name/Datenbanknr. | M [Da] | Wirkung | Literatur |
|---|--------------------|---|---|
| THP (Uromodulin)/ P07911 | 80 – 100 000 | Inhibitor in nicht-polymerisiertem Zustand für Aggregation, sonst Promotor, kein Einfluss auf Nukleation oder Wachstum, Matrixprotein | MELICK et al. 1980 HESS et al. 1989 HALLSON et al. 1997 |
| Transferrin/ P02787 | 77 000 | Matrixprotein | FRAIJ 1989 |
| Albumin/ P49822 | 65 712 | Inhibitor von Aggregation, Matrixprotein | COE et al. 1991a, SPITZAUER et al. 1994 |
| Uropontin (Nephropontin, Urinary stone protein)/ P10451 | 50 000 (33 714) | Inhibitor von Nukleation, Aggregation und Wachstum bei CaOx, Matrixprotein | ASPLIN et al. 1998 SHIRAGA et al. 1992 |
| α 1-Saures Glykoprotein/ P02763 | 44 000 (21 560) | Inhibitor von Aggregation, Matrixprotein | GROVER und RESNICK 1995 |
| α 1-Antitrypsin/ P01009 | 42416 | Matrixprotein | UMEKAWA et al. 1993 |
| Bikunin (Uronic-acid- rich Protein)/ P02760 | 35 000 (15 974) | Inhibitor von Nukleation und Aggregation bei CaOx | VETR und GEBHARD 1990 ATMANI 2001 |
| Matrix-Substanz-A | 30 - 40 | Funktion unbekannt, aus Urolithen/ Harn isoliert, immunologische Aktivität mit Ouchterlony Präzipitation | BOYCE et al. 1962 MOORE und GOWLAND 1975 |
| Prothrombin Fragment 1 (Crystal Matrix Protein)/ P00734 | 31 000 (17 376) | Inhibitor von Aggregation und Nukleation von CaOx | RABIET et al. 1986 DOYLE et al. 1991 |
| α 1- Mikroglobulin/ P02760 | 30 000 (38 999) | Inhibitor von Aggregation | MORSE und RESNICK 1988 GROVER et al. 1998 |
| Apolipoprotein A1/ P02647 | 27 000 | Matrixprotein | DUSSOL et al. 1995 |
| Renales Lithostathin/ P05451 | 23 000 | Inhibitor von Wachstum und sekundärer Nukleation bei CaCO ₃ | VERDIER et al. 1992 |
| Retinol- Bindungsprotein/ P02753 | 21 000 | Matrixprotein | DUSSOL et al. 1995 |
| Nephrocalcin/ P54615 | 14 000 (10 459) | Inhibitor von Nukleation, Aggregation und Wachstum bei Ca-haltigen Steinen, Matrixprotein | NAKAGAWA et al. 1987 |
| β 2-Mikroglobulin/ P01884 | 11 000 (13 714) | Inhibitor von Aggregation | COE et al. 1991a |
| Glykosaminoglykane | | Inhibitor von Wachstum und Aggregation in artifiziellen Lösungen, Matrix | NISHIO et al. 1985 RYALL 1996 |

2.3.4 Matrixbestandteile der Harnsteine

2.3.4.1 Vorkommen

Der Harn stellt eine komplexe Zusammensetzung aus Wasser, Ionen, Salzen, Lipiden, Proteinen und anderen Metaboliten dar, welche in ihrer Gesamtheit den Prozess der Kristallisation bis hin zur Steinbildung beeinflussen können (BOYCE 1968, KHAN und HACKETT 1993). Unabhängig von ihrer mineralischen Zusammensetzung weisen die Harnsteine ein Netzwerk organischen Materials auf, das häufig als *organische Matrix* angesprochen wird. Diese nichtkristalline Phase verteilt sich überall zwischen der kristallinen Struktur, entweder in einer zufälligen Verteilung oder in einer fibrös-konzentrischen bzw. radiären Anordnung (KHAN et al. 1983, IWATA et al. 1988, 1992, KHAN und HACKETT 1993). Die organische Matrix kann zwischen 2 und 9% bis hin zu 62% der Trockenmasse eines Steines ausmachen. Chemisch besteht die Matrix aus ca. 64% Proteinen, 14% Kohlenhydraten und Lipiden, 10% gebundenem Wasser und 12% anorganischer Asche (BOYCE 1968). Die Hauptkomponente der organischen Matrix sind folglich Proteine, welche durchschnittlich 2 – 3% des Trockengewichtes eines Steines ausmachen. Die aus der organischen Matrix extrahierbaren Proteine sind zu ca. 25% löslich (BOYCE et al. 1962). Untersuchungen zur organischen Matrix von caninen Urolithen liegen bislang nicht vor.

2.3.4.2 Funktion und Bedeutung von Matrixproteinen bei der Harnsteinbildung

Die Ubiquität der organischen Matrix und die Tatsache, dass es sich hauptsächlich um Proteine handelt, ließ vermuten, dass diese Proteine eine Bedeutung für die Steinbildung haben. Proteine besitzen inhärente Fähigkeiten an Kristalle zu binden und können den Vorgang der Kristallisation in positiver oder negativer Weise modulieren (ADDADI und WEINER 1985). Während einerseits die Ansicht vertreten wurde, dass die organische Matrix die primär notwendige Substanz für die Steinbildung darstellt (BOYCE und KING 1959, LEAL und FINLAYSON 1977), wurde andererseits die Matrix als ein nur kopartizipierender Bestandteil diskutiert, der zufällig an Kristalle assoziiert wird (VERMEULEN und LYON 1968). Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Interaktionen zwischen der organischen Matrix und der mineralischen Phase in den ersten Schritten der Kristallisation besser zu verstehen. Jedoch wird der Sachverhalt immer noch kontrovers diskutiert.

Einige Matrixproteine sind bereits in verschiedenen humanen Steinarten charakterisiert worden. Die ersten aus Harnsteinen extrahierten Proteine waren Albumin und THP (BOYCE et al. 1962) sowie Matrix-Substanz-A (KEUTEL und KING 1964). Untersuchungen, bei denen im normalen Harn die CaOx-Kristallbildung induziert wurde, zeigten spezifische Interaktionen zwischen Protein und Kristall. Prothrombin Fragment 1 wurde selektiv inkorporiert, während Albumin und THP, die mengenmäßig am häufigsten vorkommenden Harnproteine, im Kristall nicht gefunden wurden (MORSE und RESNICK 1989, DOYLE et al. 1991, SUZUKI et al. 1994). Jedoch wurde der Harn bei diesen Versuchen zuvor zentrifugiert und filtriert. Albumin und insbesondere THP reagieren sehr empfindlich auf solche Prozeduren, d.h. sie gehen in großen Mengen verloren (ATMANI et al. 1996b). In einem *in vitro* Versuch, bei dem Harn ohne vorherige Behandlung eingesetzt wurde, war neben dem Prothrombin Fragment 1 vor allem Albumin sowie Uropontin in CaOx-Kristallen und in CaP-Kristallen überwiegend THP als organische Matrix enthalten (ATMANI und KHAN 2002). Albumin stellte die Hauptproteinkomponente dar. Ein ähnliches Ergebnis zeigten Studien von DUSSOL et al. (1995) und STAPLETON et al. (1996). Untersuchungen zu quantitativen Verhältnissen von Uropontin in der organischen Matrix stellten fest, dass sich die Konzentrationen je nach Steinart unterscheiden. Die höchsten Konzentrationen wurden in CaOx-Steinen, insbesondere bei Whewellit (CaOx-Monohydrate) gefunden. In CaP, d.h. in Brushit wurden 10fach und in Apatit 100fach niedrigere Gehalte gemessen (HOYER 1992).

Aus humanen Harnsteinen konnte ebenfalls Nephrocalcin isoliert werden (NAKAGAWA et al. 1987). Während im Harn der Steinbildner überwiegend Formen des Nephrocalcins vorkommen, die eine strukturelle Abnormität aufweisen, zeigt das im Stein enthaltene Nephrocalcin eine normale Affinität zu Calciumoxalatkristallen. Die veränderte Affinität wird auf das Fehlen von γ -Carboxyglutaminsäurereste zurückgeführt. Diese Unterschiede wurden damit begründet, dass im Stein die Form des Nephrocalcins adsorbiert wird, die die höchste Affinität für Calcium hat und somit nicht repräsentativ für den Urin ist (COE et al. 1991a).

Zahlreichen Studien über Bikunin haben ergeben, dass Bikunin in der organischen Matrix von CaOx zu finden ist. Bikunin ist in Abhängigkeit von einer fibrös-konzentrischen oder radiären Struktur des

Steines verteilt (ATMANI 2001).

In einer Studie über die Proteinzusammensetzung der organischen Matrix fünf morphologisch verschiedener Nierensteine konnten insgesamt 10 Proteine mit Hilfe des Western-Blottings identifiziert werden (DUSSOL et al. 1995). Neun dieser Proteine wurden in allen Steintypen gefunden, darunter Transferrin (77 kDa), Albumin, α 1-Saures Glykoprotein, α 1-Antitrypsin (43 kDa), verschiedene leichte Ketten der Immunglobuline (25, 29, 45 kDa), α 1-Mikroglobulin, Apolipoprotein A1 (27 kDa), renales Lithostathin und Retinol-Bindungsprotein. Dagegen enthielten β 2-Mikroglobulin nur CaOx- und Uratsteine. THP, Haptoglobin und Coeruloplasmin konnten dagegen nicht nachgewiesen werden. Ähnliche Ergebnisse erhielten SUGIMOTO et al. (1985), dabei lag unabhängig von der mineralischen Komponente eine identische Matrixzusammensetzung vor.

2.3.4.3 Die duale Rolle des THP in der Lithogenese

Zahlreiche Untersuchungen sind unternommen worden, um die immer noch kontrovers diskutierte Rolle des THP für die Steinformation zu klären. Einige Studien konnten THP aus der organischen Matrix natürlich gebildeter Harnsteine isolieren (BOYCE et al. 1962, GRANT et al. 1973, FRAIJ 1989). Basierend auf der Identifikation in humanen Urolithen wurde vermutet, dass THP als häufigstes Harnprotein eine wichtige Rolle bei der Steinbildung einnimmt. Trotzdem wurde THP mit einer durchschnittlichen Ausscheidungsrate von 20 – 200 mg pro Tag nur in Spuren in der organischen Matrix von Urolithen gefunden.

Eine Bindung von Calcium zu Mukoproteinen des Harns, von denen eines als THP identifiziert werden konnte, führte zu einer Präzipitation des gebildeten Calcium-Mukoprotein-Komplexes (BOYCE et al. 1954). Dieser Komplex wiederum kristallisierte im Harn vorkommende Salze wie CaP aus. Daraus entwickelte sich die Hypothese, dass Mukoproteine wie THP die Bildung von CaP-Kristallen erleichtern und dadurch die Bildung eines Kristallnidus für die Initiation der Steinformation fördern. Im Anschluss durchgeführte Studien ergaben, dass THP die Kristallformation nicht nur von CaP sondern auch für CaOx fördert (WORCESTER et al. 1988, YOSHIOKA et al. 1989). Darüber hinaus wird die Präzipitation von THP als ersten Schritt in der Steinbildung verantwortlich gemacht (HALLSON und ROSE 1979, HALLSON et al. 1981, ROSE und SULAIMAN 1982). In einem dynamischen System bewirkt THP die Agglomeration und Kristalladhäsion auf seiner Geloberfläche (CHEN et al. 2001).

In anderen Untersuchungen wurde jedoch von einer inhibitorischen Wirkung des THP berichtet (COE et al. 1991b, RYALL et al. 1991). THP verhinderte zum einen die spontane Präzipitation (KITAMURA und PAK 1982) und zum anderen die Agglomeration der CaOx-Kristalle (FELLSTROM et al. 1985, HESS et al. 1989). Der inhibitorische Effekt wurde auf eine sterische Behinderung zurückgeführt (RYALL et al. 1991). Nicht alle Untersuchungen konnten einen Effekt bei der Kristallisation ableiten (SOPHASAN et al. 1980).

Als Grundlage für die Diskrepanz der Eigenschaften von THP wird die Anwendung verschiedener Methoden und unterschiedlicher experimenteller Konditionen, die den Effekt von THP testen, angegeben (GROVER et al. 1990). Je nach Art des Harnes (artificialer, verdünnter, unveränderter oder evaporierter Harn) favorisieren die Untersuchungen THP als Inhibitor oder als Promotor. Mit Hilfe zwei verschiedener Methoden, der Evaporations- und der Oxalatkonzentrierungsmethode, wurde die Wirkung von THP im ultrafiltrierten Harn von gesunden Männern untersucht - mit dem Ergebnis, dass der Effekt von THP auf die CaOx-Kristallisation von der verwendeten Methode abhängt (GROVER et al. 1990). Bei der Übertragung der Ergebnisse auf *in vivo* Situationen kann nur für den Fall einer extremen Dehydratation des Betroffenen von einer fördernden Wirkung des THP ausgegangen werden. Unter physiologischen Bedingungen werden dagegen eher inhibitorische Einflüsse erwartet.

Ferner ist der Effekt von THP bei der Kristallaggregation durch bestimmte Faktoren modifiziert. Dazu gehören die Konzentration von THP selbst, der pH-Wert, das Vorkommen und die Konzentration von Citrat, Calcium und anderen Ionen (HESS 1991). Während Citrat eine promotorische Wirkung von THP zu einer inhibitorischen umkehrt (HESS et al. 1993, 2000), wird die inhibitorische Wirkung von THP bei steigender NaCl-Konzentration und abnehmendem pH-Wert des Harns eingeschränkt (MCQUEEN und ENGEL 1966). SCURR und ROBERTSON (1986b) demonstrierten den dualen Effekt von THP, der sich mit steigender Konzentration und Osmolarität von einem Inhibitor zu einem Promoter der Agglomeration verändert.

Diese Faktoren wirken sich auf die Neigung von THP zur Polymerisation aus (SCURR und ROBERTSON 1986a, HESS 1994). Während im Urin gesunder Menschen 90% des THP in der Form

von Aggregaten mit einer relativen molekularen Masse von 7×10^6 Da und in einem geringeren Ausmaß von 10% in Form von Untereinheiten (80 kDa) und Polymeren (28×10^6 Da) gefunden wurde, veränderte sich dieses Verhältnis zugunsten der Polymere bei Steinbildnern (MAXFIELD 1961, KUMAR und MUCHMORE 1990, BENKOVIC et al. 1995). Diese gelartigen Polymere bewirken eine schnelle Aggregation vorhandener Kristalle und agieren somit als Promotoren der Steinbildung. THP-Partikel von gesunden Probanden waren signifikant kleiner als die der Steinpatienten (BOEVE et al. 1994). Diese Größenunterschiede korrelieren mit einer Abnahme der Oberflächenladung von THP bei Steinpatienten, welches für die herabgesetzte inhibitorische Wirkung verantwortlich gemacht wird.

Andererseits wird die unterschiedliche Wirkung von THP auf eine differente molekulare Struktur zurückgeführt. Erste Vergleiche von THP gesunder und steinbildender Menschen ergaben Unterschiede des isoelektrischen Punktes, d.h. ein Unterschied in der Zusammensetzung der basischen und sauren Gruppen (SCHNIERLE et al. 1996). Bei einer Untersuchung der Kohlenhydratkomponente des THP-Moleküls konnte festgestellt werden, dass eine unterschiedliche Anzahl an Galaktosamine und N-Acetylneuraminsäure auftreten, d.h. Steinbildner weisen im Harn ein THP mit geringer Konzentration an Neuraminsäure auf (FLETCHER et al. 1970a, 1970b, KNORLE et al. 1994). Die strukturellen Unterschiede des THP zwischen gesunden und harnsteinbildenden Menschen konnten bestätigt werden (HESS et al. 1991), die Aminosäuresequenz unterschied sich jedoch nur unwesentlich (GOKHALE et al. 2001). Darüber hinaus erwies sich bei der *in vitro* CaOx-Kristallisation THP harnsteinbildender Patienten als ein wenig potenter Inhibitor (HESS 1994).

In der Humanmedizin ergab der quantitative Vergleich der Harnausscheidung von THP bei Gesunden und Urolithiasispatienten unterschiedliche Ergebnisse. Während in einigen Untersuchungen die Konzentration von THP im Harn von Steinpatienten gegenüber Gesunden deutlich erniedrigt war (WIKSTROM und WIESLANDER 1981, GAMBARO et al. 1984, GANTER et al. 1999), wurde andererseits festgestellt, dass nur bei Patienten mit Uratsteinen eine herabgesetzte THP-Exkretion vorlag. Bei CaOx-, CaP- und Cystinsteinpatienten konnte ein Unterschied im Harn nicht gemessen werden (BICHLER et al. 1979, 1999). Andere Resultate erhielten LYNN et al. (1982) und THORNELLY et al. (1985), bei denen keine Konzentrationsunterschiede bei der Exkretion von THP auftraten. Aber auch eine abnormal hohe Sekretion an THP wurde bei CaOx-Steinbildner gemessen (PORILE et al. 1993). Die Wirkung einer oralen Citratapplikation bei Patienten mit Harnsteinen führte zu einer höheren Ausscheidungsrate von THP, das in seiner Wirkung stärker inhibitorisch reagierte (FUSELIER et al. 1995).

Bei *in situ* Hybridisierungsuntersuchungen der mRNA von THP in der Rattenniere wurde THP bei den gesunden Tieren ausschließlich im dicken aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife nachgewiesen (GOKHALE et al. 1996, 2001). Ferner konnte demonstriert werden, dass die Expression der mRNA von THP abnehmend von Kortex zu Medulla auftritt, während die Expression im inneren Bereich der Medulla und der Papillen komplett fehlt. Im Falle einer Nephrolithiasis, die in Ratten durch Ethylenglykol induziert wurde, erschien THP zusätzlich in den Nierenpapillen, obwohl dort keine Synthese stattfand (GOKHALE et al. 1996, 2001) *In vitro* verhielten sich die Zellen des Tubulussystem und auch des Sammelrohres hinsichtlich den Kristallisationsmodulatoren Osteopontin und Bikunin von Ratten und Hunden anders als THP. Wurden Tubuluszellen hohen Konzentrationen von Calcium und Oxalat ausgesetzt, begann die Produktion von Osteopontin und Bikunin auch in den Zellreihen, die unter physiologischen Bedingungen keine Synthese dieser betrieben, nicht jedoch von THP (LIESKE et al. 1997, IIDA et al. 1999).

Obwohl THP auch im Harn anderer Säugetiere (HOWIE et al. 1993) gefunden wurde, wurden die meisten Informationen zum Einfluss von THP in der Harnsteingenesse des Hundes vom menschlichen THP abgeleitet. Quantitative aber auch qualitative Untersuchungen zu THP bei Hunden mit Urolithiasis liegen derzeit nicht vor. Wenige Studien existieren über die Wirkung von THP bei der Katze. So zeigten Katzen, die unter der Bildung von sogenannten urethralen „Plugs“ litten, einen deutlich höheren Gehalt an THP im Harn (RHODES et al. 1992). Bei *in vitro* Kristallisationsversuchen von feinem Harn gesunder Tiere wird bei steigendem pH-Wert und steigender Zugabe von THP die Bildung von Struvitkristallen gefördert, wobei gleichzeitig der Übersättigungsindex ansteigt (BUFFINGTON et al. 1994). Ähnlich wie beim Menschen haben verschiedene Ionen unterschiedlich starken Einfluss auf die Selbstaggregation von THP – abnehmend von Calcium über Magnesium zu Natrium. Dagegen wirkte sich die Harnstoffkonzentration gegenteilig auf die Polymerisierung von THP aus (RHODES et al. 1993). Schlussfolgernd wurde THP eine fördernde Rolle bei der felines Struvitbildung bzw. der Formation von Struvitplugs in der Urethra zugesprochen. Ziel der vorliegenden Studie war, die Untersuchungen auf den Hund auszuweiten und neue Informationen über den Einfluss von THP bei der caninen Urolithiasis zu erhalten.