

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

Als Patienten dienten Hunde, die in einem Zeitraum von Mai 2000 bis Februar 2002 in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere der Freien Universität Berlin vorgestellt wurden. 19 Hunde wurden aufgrund klinischer und klinisch-chemischer Parameter der Patientengruppe "Niereninsuffizienz" zugeordnet. Als Einschlusskriterien galten eine Azotämie mit den Werten Serumkreatinin über 1,4 mg/dl und Serumharnstoff über 40 mg/dl sowie einer ungenügenden Harnkonzentrierungsfähigkeit. Weiterhin wurden Hunde mit einem upc-Verhältnis größer 1 bei gleichzeitig inaktivem Harnsediment in die Gruppe der niereninsuffizienten Tiere aufgenommen. Hunde, deren Azotämie prä- oder postrenal bedingt war, gingen nicht in die Studie ein. In die Gruppe der Harnsteinpatienten wurden 25 Hunde eingeordnet, bei denen mittels radiologischer bzw. sonographischer Untersuchungen die Diagnose Urolithiasis gestellt wurde. Als Kontrollgruppe dienten 21 Hunde, die zur Routineuntersuchung, Impfungen oder wegen orthopädischer Probleme in die Klinik kamen. Anamnestisch fehlende Hinweise auf eine Nierenerkrankung oder einem Harnsteinleiden galten als Voraussetzung für die Aufnahme in die Kontrollgruppe. Zusätzlich mussten Nierenfunktionsparameter und Harnstatus bezüglich Harnzylinder und Harnkristalle im Normbereich liegen. Als obere Grenzwerte für Harnstoff und Kreatinin im Serum gesunder Hunde galten 40 mg/dl bzw. 1,4 mg/dl.

3.2 Probennahme und –konservierung

Der Harn wurde überwiegend via eines Harnkatheters vor Beginn einer Infusionstherapie gewonnen. Im Falle eines operativen Eingriffs zur Exploration der Harnsteine wurde der Harn *intra operationem* mittels Zystozentese gewonnen. Nachfolgend wurde der Harn aliquotiert und bei 3000 U/min für 5 min bei 24 °C in der Labofuge 400 (Fa. Heraeus, Hanau) zentrifugiert. Der Überstand wurde vom zellulären und korpuskulären Pellet abdekantiert. Nach Aliquotieren wurden die Proben bis zur Analyse bei –25 °C in Cryo-Röhrchen (Cryovial 1,2 ml, Fa. Roth, Karlsruhe) tiefgefroren und durch eine Aluminiumfolie vor äußerem Lichteinfluss geschützt.

Zur Gewinnung von Serum und Heparin-Plasma wurde die *V. cephalica superficialis* bzw. die *V. saphena magna* der Hunde punktiert. Nach Zentrifugieren bei 3000 U/min (Labofuge 400, Heraeus) über 5 min konnte das Serum bzw. Plasma als Überstand abpipettiert, aliquotiert, tiefgefroren bei –25 °C und lichtgeschützt bis zur Analyse aufbewahrt werden.

Die Harnsteine wurden *intra operationem* je nach Lokalisation entweder aus der Blase oder der Harnröhre der Hunde entfernt. Nach vorsichtiger Reinigung mit physiologischer NaCl-Lösung wurden die Harnsteine einzeln in Aluminiumfolie verpackt und bei –25 °C bis zur Aufarbeitung konserviert. Die Nieren von vier nierenkranken Hunden wurde *post mortem* entnommen und zur immunhistologischen Untersuchung in 4% Formaldehydlösung konserviert und in Paraffin eingebettet.

3.3 Bestimmung klinischer Parameter

3.3.1 Blut

Im Heparin-Plasma wurde die Konzentration von Gesamtprotein, Albumin, Cholesterin, Harnstoff, Kreatinin, Calcium, Magnesium und Phosphor analysiert.

3.3.2 Harn

Im Harn wurden insbesondere die folgenden Parameter untersucht: 1) bei der Gruppe der Niereninsuffizienten das Gesamtprotein und Kreatinin, ein Harnstatus mit spezifischem Gewicht, pH-Wert, Nitrit, Glucose, Ketonkörper, Bilirubin, Hämoglobin bzw. Erythrozyten sowie eine Sedimentanalyse (Untersuchung auf Erythrozyten, Leukozyten, Zylinder, Epithelzellen, Kristalle sowie Bakterien); 2) bei den Harnsteinpatienten der pH-Wert, das Gesamtprotein und Kreatinin, die Calcium- und Magnesiumkonzentration sowie das Harnsediment. Sämtliche aufgeführten Parameter wurden auch bei der Kontrollgruppe untersucht. Eine Harnkultur wurde beim Auftreten von Bakterien im Harnsediment angeschlossen.

3.3.3 Methoden

Das spezifische Gewicht des Harns wurde durch ein URICON-N Refraktometer (Fa. Atago, Japan) abgelesen. Die Parameter Nitrit, Glucose, Ketonkörper, Bilirubin, Hämoglobin bzw. Erythrozyten wurden mit Hilfe eines Combur¹⁰-Test[®]-Streifen (Fa. Roche Diagnostics, Basel, Schweiz) bestimmt. Nach Zentrifugieren des Harns in einer Labofuge A (Heraeus) bei 3000 U/min wurde das Sediment

unter einem Zeiss-Mikroskop mit einer 25facher Vergrößerung durchleuchtet und auf die genannten Parameter hin untersucht. Harnkristalle wurden aufgrund ihrer charakteristischen Kristallstruktur identifiziert. Der pH-Wert des Harns wurde unmittelbar nach Gewinnen durch ein Glas-pH Meter (pH Meter 766 Calimatic, Fa. Knick, Berlin) gemessen.

Die Parameter Gesamtprotein, Albumin, Kreatinin, Calcium, Magnesium, Phosphat und Gesamtcholesterin wurden im Rahmen der Routineanalytik durch einen Cobas Mira Plus Autoanalyser (Fa. Hoffmann-La Roche, Basel, Schweiz) unter Verwendung kommerzieller Reagenzien bestimmt. Die Methode der Gesamteiweiß-Bestimmung beruht auf dem Prinzip der Biuret-Reaktion, bei dem das Protein mit Kupfer-II-Ionen einen Farbkomplex in einer alkalischen Lösung bildet (SAVORY et al. 1968). Albumin wurde im Serum durch die Umsetzung mit Bromokresolgrün als Farbreagenz bei einem pH von 4,2 bestimmt. Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrat einen gelb-orange gefärbten Komplex, dessen Farbintensität direkt proportional der Kreatininkonzentration photometrisch gemessen wurde (VASILIADES 1976). Die Colorimetrie bei der Bestimmung von Calcium beruht auf der Entstehung eines farbigen Komplexes von Ca^{2+} -Ionen mit Arsenazo III im neutralen Medium. Die Absorption ist der Konzentration von Calcium in der Probe proportional. Magnesium wurde durch Zugabe des Farbreagenz Calmagit ohne Enteiweißung im alkalischen Milieu bestimmt. Die Phosphationen-Konzentration der Probe wurde durch Extinktion bei 340 nm gemessen. Dazu wurde die Probe mit Ammoniummolybdat im sauren Milieu zu einem Phosphomolybdat-Komplex umgesetzt. Die Methode der Gesamtcholesterin-Bestimmung beruht auf dem Prinzip der enzymatischen Umsetzung von Cholesterinestern. Dazu wurde die enzymatische Aktivität von entstehender Peroxidase gemessen. Die angewendeten Testkits wurden von ABX Diagnostics (Montpellier, Frankreich) erworben.

Die Bestimmung des Harnstoffes wurde potentiometrisch mit Hilfe des NOVA CRT (Fa. NOVA Biomedical, Rödermark) gemessen. Das Prinzip basiert auf einer enzymatischen Reaktion des Harnstoffes beim Vorliegen des Enzyms Urease zu Ammoniak, Kohlendioxid und Wasser. Ammoniak wandelt sich durch die vorhandenen H^+ -Ionen der Probe zum Ammoniumion um, welches dann mittels einer ionenselektiven NH_3^+ -Elektrode bestimmt werden kann.

3.4 Untersuchung zur Verteilung von Vitamin A, Retinol-Bindungsprotein (RBP), Tamm-Horsfall Protein (THP) in Blutserum und Harn sowie weitere Harnproteine

3.4.1 Retinol- und Retinylesterbestimmung

3.4.1.1 Extraktionsverfahren

Zur quantitativen Bestimmung von Retinol und Retinylester im Blutserum und Harn wurde die Umkehrphasen-Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie (RP-HPLC) angewandt. Für die Extraktion wurde je 200 µl Serum bzw. 600 µl Harn mit gleicher Menge Ethanol und fünffacher Menge n-Hexan mit 0,05% Butylhydroxytoluol (BHT) versetzt. Das Lösungsgemisch wurde anschließend jeweils 10 min geschüttelt und bei 1500 U/min zentrifugiert Labofuge A (Heraeus). Die obere organische Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die verbleibende wässrige Phase wurde nochmals mit n-Hexan in gleicher Weise extrahiert. Die vereinigten Überstände wurden unter Stickstoff bei 37 °C zur Trockene evaporiert, der Rückstand in 200 µl eines Lösungsmittelgemisches aus Acetonitril : Methanol : Dichlormethan im Verhältnis 70:20:10 aufgenommen und 5 min im Ultraschallbad behandelt. Retinol und die Retinylester der Harnproben wurden durch die Methode der Extraktion um ein 3faches konzentriert. Die vorbereiteten Proben wurden in Injektionsgefäßen umgefüllt in die HPLC-Analytik eingesetzt.

3.4.1.2 Umkehrphasen-HPLC-Analysen

Die Konzentration des Retinols und der Retinylester wurde durch die RP-HPLC gemessen. Ein automatischer Autosampler (Model 465, Fa. Kontron Instruments, USA) injiziert jeweils 150 µl Probenextrakt. Die Trennung erfolgte isokratisch über eine bei 30 °C thermostatisierte C18-Säule (Wärmequelle: Waters Column Heater Module, USA; C18-Säule: Repro Sil C18, 200 x 4 mm; Partikeldurchmesser 5 µm, Fa. Dr. A. Maisch, Ammerbuch, 2. Säule: Ultrasphere OSD 45 x 4,6 mm, Korngröße 5 µm, Fa. Beckmann, USA) mit einer mobilen Phase aus Acetonitril : Methanol : Dichlormethan (Mischungsverhältnis von 70:20:10). Die Flussrate betrug 1,2 ml/min (HPLC Pumpen 422S, Kontron). Die Detektion erfolgte simultan mit einem

programmierbaren Adsorptionsdetektor (Spectroflow 783, Fa. ABI Analytical Kratos Division, USA) bei einer Wellenlänge von 325 nm. Über eine gerätespezifische Software Data System 450-MT 2/DAS Series (Kontron) erfolgte die Steuerung der Anlage und die Auswertung der Chromatogramme.

3.4.1.3 Quantifizierung von Retinol und Retinylester

Die Identifizierung und Quantifizierung von Retinol und den Retinylestern erfolgte durch die Retentionszeiten und Peakflächen von jeweiligen Standardsubstanzen. Dabei wurden die Peakflächen der bekannten Standardkonzentrationen mit denen der Proben verglichen. Die Wiederfindung der Extraktion von Retinol betrug 97,68% mit einem Variationskoeffizient V_k von 1,98 und die für Retinylpalmitat betrug 92,23% mit V_k von 2,99.

3.4.1.4 Standards und Chemikalien

Die Standards Retinol und Retinylpalmitat waren von der Fa. Sigma, Deisenhofen. Retinyloleat und –stearat wurden von der Fa. LaRoche, Basel bezogen. Sämtliche eingesetzten Lösungsmittel hatten HPLC-Qualität und stammten von der Fa. Roth.

3.4.2 Untersuchungen zum Retinol-Bindungsprotein (RBP)

3.4.2.1 Natriumdodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Voraussetzung eines immunologischen Nachweis von RBP mittels Western-Blot ist die Durchführung einer Auftrennung der Plasma- bzw. Harnproteine durch eine Gelelektrophorese. Die vertikale Elektrophorese wurde in Mini-Protean® III (Fa. BioRad, München) mit 83 x 73 x 5 mm großen SDS-Gelen durchgeführt. Die Gele wurden entsprechend dem Prinzip von LAEMMLI (1970) präpariert. Zur Trennung wurde ein 12%iges SDS-Polyacrylamidgel (PAG) hergestellt, bestehend aus 150 mM Tris-HCl, pH 8,8 in 0,1% w/v SDS, 121 g/l Acrylamid / N,N'-Methylenbisacrylamid, 0,76 ml/l TEMED und 0,5 g/l Ammoniumpersulfat. Das 3%ige Sammelgel bestand aus 50 mM Tris-HCl, pH 6,8 in 0,1% w/v SDS, 39,9 g/l Acrylamid/Bisacrylamid, 1 ml/l TEMED und 0,5 g/l Ammoniumpersulfat. Die Serumproben wurden im Verhältnis 1:100 verdünnt. Die Urinproben wurden entweder direkt oder nach einer Verdünnung auf 100 – 300 mg Protein/l zur Analyse eingesetzt. Nach der Verdünnung wurden die Proben im Verhältnis 1:1 mit einem Probenpuffer (125 mM Tris, 20% Glycerol, 2% SDS, 2% 2-Mercaptoethanol; pH 6,8) gemischt und zur vollständigen Denaturierung 5 min im Wasserbad bei 95 °C erhitzt. 15 µl der behandelten Proben wurden je Gelslot aufgegeben. Je Gel kam zusätzlich ein kommerzieller Molekulargewichtsstandard (Silver Stain Standard Low Range; BioRad) in einem Slot hinzu. Die Elektrophorese wurde für ca. 1 Stunde bei konstanter Stromstärke von 40 mA fortgeführt. Der Elektrodenpuffer war wie folgt zusammengesetzt: 25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% w/v SDS, pH 8,3.

Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden wurden die Gele der Serumproben nach einer 30minütigen Fixierung mit 10% Essigsäure und 40% Methanol in eine 0,05% Coomassie Brilliant Blue R Färbung (in 50% Methanol, 10% Essigsäure) für 20 min eingelegt. Eine Entfärbung folgte über 60 min in 5% Methanol und 7% Essigsäure. Die Proteinbanden der Harnproben wurden durch eine Silbernitratfärbung nach HEUKESHOVEN und DERNICK (1988) angefärbt.

3.4.2.2 Immunologischer Nachweis von RBP mittels Western-Blot

Im Anschluss an die Auftrennung der Proteine durch die SDS-PAGE konnte der immunologische Nachweis von RBP im Harn und Serum mit Hilfe der Western-Blot-Technik erfolgen. Der Transfer der Proteine auf eine Polyvinylidendifluoridmembran (PVDF, Immobilon; Fa. Millipore Corp., Bedford, USA) wurde durch ein Transblot-Verfahren (Mini Trans-Blot™; BioRad) bei konstanter Spannung von 100 V und max. 400 mA unter Kühlung durchgeführt. Als Transferpuffer kam 48 mM Tris, 39 mM Glycin, 0,038% SDS, 20% Methanol zum Einsatz. Nach dem Blotting von einer Stunde wurde die Membran kurz in einem TBS-Tween-Puffer (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,1% Tween20; pH 7,5) gewaschen. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran eine Stunde in dem TBS-Tween-Puffer mit 5% Magermilchpulver (Roth) behandelt. Anschließend wurde die Membran mit einem peroxidasekonjugierten Antiserum gegen humanes Serum-RBP vom Kaninchen (Code Nr. P0304, Dako Diagnostika, Hamburg) über 90 min inkubiert. Das Antiserum wurde 1:300 in einem TBS-Tween Puffer mit 0,5% Magermilchpulver (0,05% Tween20) verdünnt. Humanes Blutserum wurde als Positivkontrolle auf jedem Blot mitgeführt. Vor der abschließenden Detektion wurde die Membran

dreimal für 10 min mit einem TBST-Puffer (0,3% Tween20) gereinigt. Die Detektion der RPB-Banden erfolgte durch Chemilumineszenz mit dem Luminol-Reagenz (Chemiluminescence Detektion Kit, Boehringer Mannheim, Mannheim) in dem Flour-STM Multimager (BioRad). Die computergestützte Auswertung erfolgte mittels der gerätespezifischen Software Multi-Analyst^{TM/PC}, Version 1.1 (BioRad).

3.4.2.3 Immunhistologischer Nachweis von RBP

3.4.2.3.1 Histologische Präparation und Färbung

Die Fixierung der Nieren in 4%igem neutral gepufferten Formalin und die Einbettung der Organe in Paraplast erfolgte nach einem Standardverfahren am Institut für Pathologie der Fakultät für Tiermedizin der FU Berlin. Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Fa. Medium Histotechnologie, Gießen) wurden von den eingebetteten Organproben 3 – 4 µm dicke Schnitte angefertigt, die anschließend auf den Objektträgern (SuperFrost[®]Plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) im Wärmeschrank bei 37 °C über Nacht getrocknet wurden. Folgend wurde die Entraffinierung und Rehydrierung durchgeführt. Dazu verbleiben die Objektträger für zunächst 10 min in Rotihistol, anschließend zweimalig für 3 min in Isopropanol und schließlich für jeweils 3 min in Alkohol in absteigender Konzentration von 96%, 80% und 70%. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidase wurden die Objektträger 1 Stunde in eine Methanol-H₂O₂-Lösung (170 ml Methanol, 4 ml H₂O₂ 30%ig) gegeben. Nach einer Waschung mit TBS-Puffer über 1 – 2 min wurden die Schnitte in Coverplates (Life Science, Fa. Shandon, Frankfurt/Main) überführt. Durch ein 30minütiges Einwirken einer 5%igen BSA-Lösung wurden unspezifische Bindungen geblockt. Zur Markierung wurden in die Coverplates jeweils 100 µl der Primärantikörperlösung (A0040) pipettiert und bei 4 °C im Kühlschrank über Nacht inkubiert. Zwischen den nachfolgend eingesetzten Antikörper erfolgte eine Waschung der Proben mit jeweils 2 ml einer TBS-Lösung über 10 min. RBP wurde durch die Peroxidase-anti-Peroxidase Methode nachgewiesen. Dazu werden die Schnitte mit einem Schwein-anti-Kaninchen IgG (Z0196) und der Peroxidase-anti-Peroxidase (Z0113) nacheinander über jeweils 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift mit TBS über 10 min wurden die Objektträger aus den Coverplates in eine Küvette überführt und schließlich 1 min in einer Färbelösung (DAB) unter ständigem Rühren bei Raumtemperatur angefärbt. Es folgten mehrere Waschschriffe für jeweils 5 min, dreimaliges Waschen mit TBS-Puffer und einmal mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Proben in Papanicolaou's Hämatoxylin nach Sicht gegengefärbt und unter Leitungswasser gebläut. In einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Schnitte entwässert, beginnend mit 50%igem Rotihistol, bis zu 96%igem Alkohol, folgend Isopropanol, Rotihistol für jeweils 3 min und abschließend für 10 min in Xylol. Zuletzt wurden die Schnitte in Kanadabalsam eingedeckelt und haltbargemacht.

3.4.2.3.2 Durchführung und Auswertung

Die gefärbten Histoschnitte werden unter einem Lichtmikroskop (Olympus BX50, Japan) mit einer 100-fachen Vergrößerung auf ihre Vorkommen und Lokalisation von RBP untersucht.

3.4.2.4 *Quantitative Bestimmung des RBP durch ELISA sowie Validierung der ELISA-Methode*

Die folgende Vorschrift zur quantitativen Bestimmung von RBP korrespondiert mit den üblich empfohlenen Instruktionen für ein Sandwich-ELISA (Enzyme linked immunoabsorbend assay) (DAKOPATTS 1983).

Polystyrenmicrotiter Platten (Greiner, Frickenhausen) wurden für 2 Stunden bei 37 °C unter Bewegung inkubiert, jeder Well enthielt 50 µl eines Kaninchen anti-human Serum-RBP IgG in einem 50 mM Carbonat-Puffer, pH 9,6 (Endkonzentration 10 µg/ml). Ein automatischer Washer (Columbus Washer, Fa. Tecan, Crailsheim) reinigt die Platten viermal mit einem PBS-Tween Waschpuffer bestehend aus 10 mM Phosphat Puffer, 150 mM NaCl und 0,05% Tween20, pH 7,4. Vor dem Auftragen wurden die Serumproben 1:500 und die Harnproben 1:10 mit PBS mit 0,1% BSA vorverdünnt. Eine Standardreihe bestehend aus 7 Verdünnungsstufen mit Konzentrationen zwischen 45 und 2 ng/ml wurde für jede Platte aus dem Kontrollserum (SL OQIM 13, Fa. Dade Behring, Marburg) hergestellt. 50 µl Aliquote von Standard, verdünnte Serum- und Harnprobe wurden als Dreifachansatz in die Wells pipettiert und 90 min unter Bewegung bei 37 °C auf dem Unimax 1010 (Fa. Heidolph, Schwabach) inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS/Tween-Puffer wurde je Well 50 µl eines kreuzreagierenden peroxidasekonjugierten anti-RBP IgG (verdünnt 1:1000 in PBS mit 0,1% BSA) zugegeben und erneut 90 min unter gleichen

Bedingungen inkubiert. Nach abschließendem Waschen erfolgte die Färbung mit 100 µl eines o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid enthaltenen Substrates (3,7 mM o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid, 50 mM Na₂HPO₄·12H₂O, 25 mM Citronensäurepuffer, pH 5,2; 0,012% H₂O₂). Die Reaktion wurde mit 50 µl einer 1 M Schwefelsäure nach 20 min gestoppt. Die Absorption jedes Wells wurde bei 490 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Microplate Reader Model 550, BioRad) und der dazugehörigen Software (Microplate Manager 4.0, BioRad) gemessen. Die Konzentration der Standardreihe wurde halblogarithmisch gegen die Absorption dargestellt und der lineare Anteil der Kalibrierungskurve einer Regressionsanalyse unterworfen. Die Proben, deren Absorption innerhalb des linearen Verlaufes lagen, wurden ausgewählt und ihre Konzentration mit Hilfe der Software kalkuliert.

Zur Validierung der ELISA-Methode für die Bestimmung von RBP wurde eine Nachweisgrenze von 2,2 µg/l ermittelt, definiert als die minimale Konzentration an RBP, deren Absorption mindestens um drei Standardabweichungen über dem mittleren Leerwert liegt. Sie ist die oberer Rauschgrenze mit einer 50%igen Wahrscheinlichkeit. Die Erfassungsgrenze lag bei 2,5 µg/l, als Differenz von mindestens 6facher Standardabweichung über dem mittleren Leerwert und hatte eine 99,8%ige Wahrscheinlichkeit. Die Wiederfindung von RBP war $92 \pm 15\%$. Die Reproduzierbarkeit innerhalb eines Versuches lag bei einem Variationskoeffizient von 2,9% und zwischen den Versuchen bei 4,2%.

3.4.2.5 Antikörper und Standard

Für die qualitative und quantitative Bestimmung von RBP wurden die folgenden Antikörper bzw. Standard eingesetzt:

1. peroxidasekonjugiertes Antiserum gegen humanes Serum-RBP vom Kaninchen (Code Nr. P0304, Dako Diagnostika, Hamburg);
2. Kaninchen-anti-human Serum-RBP (Code Nr. A0040, Dako) 1:400 in TBS-Puffer mit 1% BSA verdünnt;
3. Schwein-anti-Kaninchen IgG (Code Nr. Z0196, Dako) 1:100 in TBS-Puffer mit 1% BSA verdünnt;
4. Kaninchen PAP (Code Nr. Z0113, Dako) 1:100 in TBS-Puffer mit 1% BSA verdünnt;
5. Humaner N Protein Standard SL OQIM 13 (Fa. Dade Behring, Marburg).

3.4.2.6 Lösungen und Reagenzien

Für die Analysen wurden die folgenden Chemikalien verwendet:

Lösungsmittel:

Rotihistol, Isopropanol, Xylol, Alkohol, Methanol, 30% H₂O₂ (Fa. Roth KG, Karlsruhe)

Tris-buffered saline (TBS, pH 7,6):

50 mM Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan (Fa. Roth)

125 mM NaCl (Fa. Roth)

Färbelösungen:

- I. 100 mg Diaminobezidintetrahydrochlorid (Fa. Fulka) mit 0,01% H₂O₂ (30%ig) in 200 ml Imidazol / HCl – Puffer (60 mM Imidazol mit HCl auf pH 7,1; Fa. Merck)
- II. Papanicolaou's Lösung 1:20 in Aqua dest. verdünnt und filtriert (Fa. Merck)

Weitere Chemikalien:

1. Bovine Serumalbuminfraktion V, (Code Nr. 11930, Fa. Serva Electrophoresis, Hamburg);
2. Kanadabalsam (Roth);
3. o-Phenylendiamin-Dihydrochlorid OPD Tabletten (Code Nr. P-8787, Fa. Sigma, Deisenhofen);
4. Tween (Fa. Sigma, Taufkirchen)

3.4.3 Untersuchungen zum Tamm-Horsfall Protein (THP)

3.4.3.1 Immunologischer Nachweis von THP mittels Western-Blot

Entsprechend des immunologischen Nachweis von RBP wurde der Nachweis für THP im Western-Blot im Anschluss an die SDS-Gelelektrophorese durchgeführt. Die Durchführung des Proteintransfers auf die PVDF-Membran wurde wie unter 3.4.2.2 beschrieben vorgenommen. Erst ab dem Inkubieren mit dem nachzuweisenden Antikörper unterschieden sich die Arbeitsvorgänge wie folgt: Für den Nachweis von THP war die Behandlung mit zwei aufeinander einwirkenden Antikörper notwendig. Zunächst wurde die Membran mit dem Schaf anti-human THP Antikörper behandelt. Als zweiter Antikörper folgte Kaninchen anti-Schaf Immunglobulin. Beide Antikörper wurden 1:1000 in einem TBS-Tween Puffer mit 0,5% Magermilchpulver (0,05% Tween20) verdünnt und wirkten über 60 min unter Bewegung auf die Membran ein. Zwischen der Inkubation mit den Antikörpern wurde die Membran 10 min mit einem TBS-Tween Puffer (0,1% Tween20) gewaschen und im Anschluss dreimalig für 10 min mit einem TBS-Tween Puffer (0,3% Tween20) gereinigt. Die folgende Detektionsmethode durch Chemilumineszenz war identisch mit der unter 3.4.2.2 aufgeführten.

3.4.3.2 Immunhistologischer Nachweis von THP

Die Durchführung der immunhistologischen Färbung von THP entspricht weitestgehend der unter 3.4.2.3 für RBP aufgeführten Vorschrift. Unterschiedlich war die Verwendung der Antikörper, da die indirekte Peroxidase-Methode gewählt wurde. Dazu wurde ein Primär- (AB733) und ein Sekundärantikörper (P0163) bei gleicher Inkubationszeit wie bei RBP angewendet, so dass die Waschschritte zwischen den 2. und 3. Antikörper entfallen konnten. Die Antikörper wurden 1:100 in TBS-Puffer mit 1% BSA verdünnt. Außerdem wurde die Einwirkdauer der Färbelösung auf 30 Sekunden verkürzt. Alle übrigen Schritte waren identisch.

3.4.3.3 Quantitative Bestimmung von THP mittels ELISA

Für die quantitative Bestimmung von THP im Harn bzw. Serum wurde die für RBP verwendete ELISA-Methode folgenderweise modifiziert: Zunächst wurden die Microtiterplatten (Greiner) mit einem Antikörper Schaf-anti-human THP in einer Konzentration von 1 µg/ml beschichtet und für 2 Stunden unter Bewegung inkubiert. Nach dreimaligem Waschkvorgang mit einem PBS-Puffer (10 mM Phosphat Puffer, 150 mM NaCl, pH 7,4) wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 200 µl eines Substrats (PBS mit 1% BSA) über 2 Stunden im Brutschrank bei 37 °C abgesättigt. Dem wiederholten Waschkvorgang mit PBS folgte die Auftragung der Harn- bzw. Serumproben, sowie eines Standards mit acht Verdünnungsstufen. Die Harnproben wurden zuvor mit PBS/0,1% BSA-Lösung von 1:5 bis 1:50 verdünnt. Serumproben wurden unverdünnt aufgetragen. Als Standard diente ein kommerziell erhältliches, gereinigtes THP (Fa. Chemicon) in einer Konzentration von 1 mg/ml. Eine Standardreihe mit 500 bis 3,9 µg/l wurde auf jede Platte pipettiert. Proben und Standard wurden als Dreifachansatz 60 min bei 37 °C in Bewegung inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit einem PBS-Puffer mit 0,05% Tween20, pH 7,4 fünfmal gewaschen. Um vorhandenes THP im weiteren Verlauf farblich umsetzen zu können, wurden die Platten zunächst mit biotinyliertem Schaf-anti-human THP IgG (1:2000 in PBS/0,1% BSA verdünnt) und folgend mit peroxidase-konjugiertem Streptavidin (1:5000 in PBS/0,1% BSA, 0,05% Tween20 verdünnt) behandelt. Dazu wurden je 50 µl der Substrate aufgegeben und über 60 min bei 37 °C unter Bewegung inkubiert. Zwischen den Substraten wurde dreimal und abschließend fünfmal mit PBS-Puffer gewaschen. Die Färbung, die anschließende Messung der Absorption bei 490 nm und die Auswertung erfolgte entsprechend der Vorschrift für RBP unter 3.4.2.4 aufgeführt.

Die Kalibrierung der ELISA-Methode für THP ergab eine Bestimmungsgrenze von 3,5 µg/l, eine Wiederfindungsrate von $103 \pm 5\%$ im Harn und eine Reproduzierbarkeit innerhalb eines Versuches mit einem Variationskoeffizient von 4,8% und zwischen den Versuchen von 7,1%. Die Erfassungsgrenze lag bei 3,9 µg/l.

3.4.3.4 Standard und Antikörper

Als Standard kam zum Einsatz: THP Standard (Chemicon International, Temecula, USA). Die folgenden Antikörper wurden für die qualitative und quantitative Methoden verwendet:

1. Polyklonaler Antikörper vom Schaf Anti-human Tamm-Horsfall Glycoprotein

(AB 733, Chemicon);

2. Kaninchen Anti-Schaf IgG HRP-konjugiert (Code Nr. P0163, Dako) in TBS-Puffer mit 1% BSA verdünnt;
3. Biotinyliertes Antiserum gegen THP vom Schaf (Lot. M9L002, Chemicon);
4. Peroxidasekonjugiertes Streptavidin (Code Nr. P0397, Dako).

3.4.4 Untersuchungen zu weiteren Harnproteinen

Zur Beurteilung des jeweiligen Harnproteinmusters und der anschließenden Klassifizierung wurde die zu Beginn durchgeführte Gelelektrophorese herangezogen. Im Folgenden sollten weitere Harnproteine durch einen immunologischen Nachweis identifiziert werden. Dazu dienten jeweils die vorausgehende SDS-PAGE der Harnproben mit dem anschließend durchgeführten Western-Blot. Die Methodik entsprach der zuvor unter 3.4.2.1 und 3.4.2.2 erwähnten Versuchsvorschrift. Die Wahl des Antikörpers für die Inkubation der Membran war je nach Protein unterschiedlich.

3.4.4.1 Immunologischer Nachweis von IgG mittels Western-Blot

Die verwendete Antikörper (1. IgG A0423 und 2. Schwein-anti-Kaninchen P0217) wurden in einer Verdünnung von 1:1000 in TBS-Tween 0,05% und 0,5% Magermilchpulver nacheinander für je 90 min unter Bewegung auf die Membran inkubiert. Ein 10minütiger Waschvorgang wurde zwischen der Einwirkung der Antikörper eingefügt.

3.4.4.2 Immunologischer Nachweis von Albumin mittels Western-Blot

Zum Nachweis von Albumin wurden für die Inkubierung zwei aufeinander folgenden Antikörper verwendet. Der erste Antikörper (Albumin A0001, Dako) wurde 1:1000 in TBS-Tween 0,05% Puffer verdünnt. Als zweiter wurde der HRP-konjugierte Antikörper (AK P0217 HRP-konj., Dako) in gleicher Verdünnung eingesetzt. Die Einwirkzeit unter gleichen Bedingungen wie zuvor betrug jeweils 90 min. Außerdem erfolgte nach jedem Schritt ein Waschvorgang mit TBS Tween 0,01% über 10 min.

3.4.4.3 Immunologischer Nachweis von Transferrin mittels Western-Blot

Zum Nachweis von Transferrin kamen die folgenden Antikörper zum Einsatz: 1. AK Transferrin A0061 in einer Verdünnung 1:300 und 2. der zuvor verwendete HRP-konjugierte Antikörper (P0217) 1:1000 verdünnt. Einwirkzeit und Waschvorgänge entsprachen dem zuvor angewendeten Prinzip.

3.4.4.4 Immunologischer Nachweis von Vitamin-D bindendem Protein (DBP) mittels Western-Blot

Auch beim Nachweis des Vitamin-D bindendem Protein wurden für die Inkubation zwei Antikörper verwendet. Zunächst der AK A0021 Gc-Globulin und als zweiter der HRP-konjugierte Antikörper (AK P0217), beide in einer Verdünnung von 1:1000. Wie oben galten die gleichen Bedingungen für Einwirkung und Waschen.

3.4.4.5 Auswertung

Die Detektion von immunologisch positiven Banden wurde durch den Flour-STM Multimager (BioRad) erfasst. Die computergestützte Auswertung erfolgte mittels der gerätespezifischen Software Multi-Analyst^{TM/PC}, Version 1.1 (BioRad). Ein Erscheinen einer Bande des jeweilig immunologisch umgesetzten Proteins wurde als positives Ergebnis gewertet.

3.4.4.6 Immunhistologischer Nachweis von Megalin

Die Vorschrift zur Versuchsdurchführung entsprach der unter 3.4.2.3.1 für RBP aufgeführten. Unterschiede waren in der Anwendung der Antikörper gegeben. Wie bei THP kamen auch bei Megalin insgesamt nur 2 Antikörper zu Einsatz. Die Inkubationszeiten waren jedoch identisch. Die Färbezeit mit dem DAB-Reagenz betrug hier 2 min.

3.4.4.7 Antikörper

Folgende Antikörper der Firma Dako Diagnostics, Hamburg wurden verwendet:

1. Kaninchen Anti-human IgG (Code Nr. A0423);
2. Peroxidasekonjugiertes Schwein Anti-Kaninchen Antiserum (Code Nr. P0217);
3. Kaninchen Anti-human Albumin (Code Nr. A0001);
4. Kaninchen Anti-human Transferrin (Code Nr. A0061);
5. Kaninchen Anti-human Gc-Globulin (Code Nr. A0021);

Antikörper für Megalinfärbung:

1. Ziege Anti-Megalin SerumIgG (Eigenproduktion) 1:50 000 in TBS-Puffer mit 1% BSA verdünnt;
2. Kaninchen Anti-Schaf IgG, HRP konjugiert (Code Nr. P0163, Dako) 1:100 in TBS-Puffer mit 1% BSA verdünnt.

3.4.5 Charakterisierung einzelner Harnproteine mittels „Surface enhanced laser desorption/ionisation - time-of-flight“ Massenspektrometrie (SELDI – TOF MS)

Die SELDI-TOF Massenspektrometrie (engl. surface enhanced laser desorption/ionisation time-of-flight) kombiniert zwei effektive Techniken, die Chromatographie und die Massenspektrometrie. Das Prinzip beruht auf der Bindung von bestimmten Proteinen der Probe auf einer spezifisch ausgewählten Oberfläche eines Metallchips sowie der folgenden Behandlung durch verschiedene Waschschritte. Die verbleibenden Proteine werden in einem zweiten Schritt durch einen Laser ionisiert und von der Oberfläche des Chips abgelöst. Je nach Stärke der Ionisation sowie der Masse des Moleküls unterscheidet sich die Flugzeit bis zu einem Detektor, der diese Daten verarbeitet und als Ergebnis ein Chromatogramm mit den dazugehörigen Molmassen ausgibt.

Für die Analyse der Harnprofile wurde ein SAX2 Chip (Fa. Ciphergen Biosystem, Fremont, CA, USA) ausgewählt. Der SAX2 reagiert als starker Anionenaustauscher. Seine aktiven Spots enthalten kationische quarternäre Aminosäuregruppen, die mit den negative Oberflächenladungen der Proteinen mit niedrigen isoelektrischen Punkt interagieren. Zunächst wurden die Chips mit einem Bindungspuffer (Tris HCl 0,1M; pH 8,5; 0,02% Triton X-100) vorbehandelt, um die selektive Bindung zu erhöhen. Dazu wurden die Chips in einen Bioprocessor eingespannt und auf jeden Spot 300 µl des Puffers aufgegeben. Die Inkubation erfolgte zweimalig bei 30 °C für jeweils 10 min. Anschließend wurden 200 µl Probe und 100 µl des gleichen Puffers pro Spot aufgetragen und bei 30 °C und unter Schütteln bei 220 bis 250 U/min für 30 min inkubiert. Die nichtgebundenen Proteine wurden durch wiederholte Waschungen mit 300 µl Puffer (dreimal) entfernt. Nach Lösen des Bioprocessors wurden die Chips mit jeweils 8 ml dest. Wasser von den Salzen befreit. Abschließend wurde 1µl einer gesättigten EAM-Lösung (engl. energy-absorbing molecule; Sinapinsäure in 50% Acetonitril und 0,5% Trifluoressigsäure) auf jeden Spot pipettiert und getrocknet. Im zweiten Schritt wurden die Proben im ProteinChip System (PBS II Serie; Ciphergen) analysiert. Dazu wurden die Spots mit einem Nitrogenlaser in einer Stärke von 3000 V und 680 ns, sowie einer Wiederholungsrate von 10 HZ unter Vakuum beschossen. Die Proteine werden dadurch von der Oberfläche abgelöst und gleichzeitig ionisiert. Die geladenen Proteine werden von einem Detektor mit Hilfe der TOF-Analyse bestimmt und ihren Molmassen zugeteilt. Insgesamt wurden die Spots 120 Mal beschossen und die Real-Time Signale als Mittelwert für je ein Spektrum verwendet. Diese Spektren werden im positiven Ionenmodus gesammelt und mit der Ciphergen Peak Software (Version 3.1) ausgewertet. Zur Kalibrierung der Molmassen wird ein Standard bestehend aus Cytochrome C (equine cardiac 12360,1 Da), Myoglobin (equine cardiac 16951,5 Da), GAPDH (Kaninchen 35688 Da), Albumin (Rinderserum 66433 Da) und β-Galaktosidase (E. coli 116351 Da) der Fa. Ciphergen angewendet. In die Auswertung wurden Peaks einbezogen, deren Amplitude 3fach höher als das mittlere Hintergrundrauschen betrug. Die Reproduzierbarkeit der Molmassen wurde anhand verschiedener Aliquote eines Harns auf 8 Spots ermittelt.

3.5 Untersuchungen zum Vorkommen von Harnproteinen in Harnsteinen von Hunden

3.5.1 Charakterisierung der Harnsteinart

Bei jedem Patienten wurde die Bestimmung der Harnsteinart durch die Experimentelle Urologie der Klinik und Poliklinik für Urologie der Friedrich-Wilhelm Universität Bonn vorgenommen. Dort wurde mittels der Infrarotspektroskopie die prozentualen Gehalte der Mineralien der jeweiligen Harnsteine festgestellt.

3.5.2 Extraktion der organischen Matrix

Je nach Art der Harnsteine wurde das Verfahren zur Extraktion der organischen Matrix variiert.

3.5.2.1 Struvitsteine

Die Struvitsteine der einzelnen Patienten wurden zunächst mit physiologischer NaCl-Lösung unter Schwenken 24 Stunden bei 4 °C gewaschen. Nach Trocknung der gereinigten Harnsteine wurden die Proben mit einem Mörser zerrieben und eine Einwaage von 5 g jedes Patienten in 50 ml Zentrifugenröhrchen (Fa. TPP, Schweiz) gefüllt. Diesen wurde jeweils 15 ml eines Citronensäure-Phosphat-Puffer nach McILVAIN (pH 5,8), 150 µl NaN₃-Lösung und 20 µl eines Proteasehemmer zugesetzt. Diese Extraktionsmischung konnte 7 Tage bei 4 °C unter Rühren auf einem Magnetrührer einwirken. Nach Zentrifugieren in der Biofuge pico (Fa. Heraeus, Hanau) bei 3800 U/min über 10 min bei 4 °C wurden die Überstände abgetrennt und bis zur weiteren Aufbereitung bei -80 °C tiefgefroren. Die Extraktion der Rückstände wurde dreimal unter gleichen Bedingungen wiederholt und die Überstände vereinigt.

Anschließend erfolgte eine Entsalzung und Einengung der Überstände mittels eines VariPerm M (Fa. Kronlab, Sinsheim) nach dem Prinzip der Gegenstromdialyse. Als extrakapillarer Dialysepuffer wurde destilliertes H₂O mit 0,01% EDTA verwendet. Bei einem extrakapillaren Fluss von 3 – 5 ml/min und einer intrakapillaren Fließgeschwindigkeit von 0,5 – 1 ml/min wurde die Umpufferung und Entsalzung über Nacht durchgeführt. Folgend wurde der extrakapillare Dialysepuffer durch ein 20%ige Polyethylenglycol-Lösung (PEG 20.000, Roth) ersetzt und eine Einengung der Proben auf ein Volumen von 5 ml innerhalb von 2 Stunden vorgenommen. Die schließlich erhaltenen Proben wiesen einen pH von 6,8 bis 7,2 auf. Bis zur weiteren Verarbeitung werden die Proben bei -80 °C tiefgefroren.

3.5.2.2 Calciumoxalatsteine

Zu Beginn wurden die Calciumoxalatsteine der Patienten mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschen und getrocknet. Je 1 – 5 g der pulverisierten Steine wurden in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen abgewogen und mit 10 ml eines Extraktionspuffergemisches (0,5 M EDTA in 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 8,0, 100 µl NaN₃, 10 µl Proteasehemmer) versetzt. Nach dem Protokoll von SIDDIQUI (1998) fand die Extraktion unter Rühren über 7 Tage bei 4 °C statt und wurde dreimal wiederholt. Die Überstände wurden durch Zentrifugieren bei 3800 U/min über 10 min gewonnen und vereinigt. Zwischenzeitlich wurden die Überstände bei -80 °C aufbewahrt. Zur Entsalzung und Einengung wurde eine Dialyse mit Hilfe des VariPerm M angewendet. Die Überstände wurden dazu gegen 10 mM Na₂CO₃ mit 0,05% Bolyxethylenlaurylether dialysiert. Die Konzentrierung der Proben auf 5 ml durch Einwirkung von 20%igem PEG fand im Anschluss statt. Die Proben werden bei -80 °C tiefgefroren bis zur Verarbeitung aufbewahrt.

3.5.2.3 Uratsteine

Die Uratsteine werden nach der gleichen Methode wie die Calciumoxalatsteine bearbeitet.

3.5.2.4 Chemikalien

Citronensäure-Phosphat-Puffer nach MCILVAN (pH 5,8):

4mM C₆H₈O₇ · H₂O und 12,1 mM Na₂HPO₄ · 2H₂O

Extraktionspuffergemisch:

0,5 M EDTA und 50 mM Tris/HCl Puffer (pH 8,0)

3.5.3 Charakterisierung der organischen Matrix mittels SDS-PAGE

Die unter 3.5.2 aufbereiteten Proben wurden im Anschluss für die SDS-PAGE wie unter 3.4.2.1 weiter verarbeitet. Zum Sichtbarmachen der Proteinbanden der organischen Matrix wurde die Silberfärbung nach HEUKESHOVEN und DERNICK (1988) verwendet.

3.5.4 Charakterisierung der organischen Matrix mittels SELDI-TOF MS

Entsprechend der Methode unter 3.4.5 wurden die Proteinlysate der Harnsteinextrakte hinsichtlich ihres Proteinmusters mittels der SELDI-Methode untersucht.

3.6 Untersuchungen zum Einfluss von Calciumchlorid auf THP und Vitamin A beim Hund

Von 10 Hunden wurde der Harn zur Präzipitation von THP durch die Zugabe von Calciumchlorid verwendet. Je Probe wurden 10 Aliquote mit 1 ml Harn in einem Eppendorfgefäß (Fa. Eppendorf, Hamburg) hergestellt. Außerdem wurden 10 verschiedene CaCl_2 -Lösungen in den folgenden Konzentrationen hergestellt: 1 M, 0,5 M, 0,1 M, 0,05 M, 0,01 M, 5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,1 mM, 0,05 mM. Zu den Aliquoten einer jeden Probe wurde je 100 μl der 10 verschiedenen CaCl_2 -Lösungen gegeben. Anschließend wurden die Proben im Kleinschüttler (TTS 2 Yelloline, Fa. IKA Labortechnik, Staufen) bei 2000/min gemischt und im Kühlschrank bei 4 °C über Nacht stehen gelassen. Um das entstandene Präzipitat von der überstehenden Lösung zu trennen, wurden die Proben bei 3800 U/min in der Labofuge 400 (Heraeus) zentrifugiert. Die Überstände wurden für quantitative Bestimmung von THP, Retinol und Retinylester weiter aufbereitet. THP wurde durch die unter 3.4.3.3 beschriebene ELISA Methode quantitativ bestimmt. Zur quantitativen Analytik der Vitamin-A-Derivate wurde die Methode der HPLC, wie unter 3.4.1 aufgeführt, angewendet.

3.7 Statistische Auswertung

Zur Auswertung der Daten wurde das Programm SPSS Version 10.0 angewendet. Es wurde davon ausgegangen, dass die Daten der Teilerhebung keiner Normalverteilung unterliegen. Die Daten sind als Median dargestellt und zusätzlich ist der Bereich des 25. – 75. Perzentil in den Tabellen angegeben. In der Gruppe der Cystinharnsteine sind die gemessenen Einzelwerte dargestellt. Der Kruskal-Wallis Test wurde für die Varianzanalyse und post hoc wurde der Mann-Whitney-U Test für Mehrfachvergleiche angewandt. Korrelationen wurden mit dem Spearman-Korrelation Koeffiziententest ($\rho = \text{Rho}$) ermittelt. Deskriptive Statistiken wurden gleichsam durchgeführt. Als statistisch signifikant galten Ergebnisse, die einen p-Wert von mindestens kleiner 0,05 aufweisen. Also mit einer mindestens 95%igen Wahrscheinlichkeit von einem nicht zufällig entstandenem Unterschied ausgegangen werden konnte. Lag p kleiner 0,01 oder sogar 0,001 wurde von einer 99%igen bzw. 99,9%igen Sicherheit ausgegangen. Für statistische Kalkulationen wurde die Bestimmungsgrenze der ELISA-Methode für RBP im Harn bei 2,5 $\mu\text{g/l}$ und für THP bei 3,5 $\mu\text{g/l}$ festgelegt.