

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Niereninsuffiziente Hunde

Die Patientengruppe setzte sich aus 13 verschiedenen Rassen und einem Mischlingshund zusammen. Bei den insgesamt 19 erkrankten Hunden war der Pudel dreimal vertreten, während die anderen Rassen ein- bis zweimal vorkamen. Dabei war das männliche Geschlecht mit 18 von insgesamt 19 untersuchten Tieren überdurchschnittlich repräsentiert. Bei den Patienten handelte es sich überwiegend um ältere Tiere, wobei das Alter von 1,5 bis 16 Jahre reichte und im Median bei 11 Jahren lag. Die 21 Kontrolltiere setzten sich aus 14 Rassen und 2 Mischlingshunden zusammen. Der Boxer und der DSH waren dreimal und die Dogge zweimal vertreten. Auch diese Gruppe bestand überwiegend aus männlichen Hunden (18). Vertreten waren sowohl Tiere jungen als auch geriatrischen Alters (1 – 15 Jahre), wobei das mediane Alter mit 6 Jahren unter dem der nierenkranken Hunde lag.

Aufgrund der Anamnese, der klinischen und klinisch-chemischen Parameter im weiteren Verlauf von bis zu vier Monaten konnte die Niereninsuffizienz weiter differenziert werden. Bei sechs Hunden lieferte eine pathohistologische Untersuchung die Diagnose. Somit hatten zwei Hunde eine akute Form und die übrigen 17 Hunde eine chronische Form der Niereninsuffizienz. Darunter befand sich ein Tier mit einem nephrotischen Syndrom.

Eine getrennte statistische Betrachtung der beiden Gruppen wurde wegen der zahlenmäßig kleinen Gruppe der akut niereninsuffizienten Hunde nicht vorgenommen. Darüber hinaus lagen die Werte der untersuchten Parameter dieser beiden Hunde überwiegend innerhalb des 25. – 75. Perzentils der chronisch niereninsuffizienten Hunde, so dass beide zu der Gruppe „Niereninsuffiziente Hunde“ zusammengefasst wurden. Im Anhang wurden die Daten der Hunde einzeln dargestellt.

#### 4.1.1 Klinische Parameter

Der Vergleich der beiden Gruppen ergab signifikante Unterschiede verschiedener Parameter von Plasma und Harn (Tabelle 4.1 und 4.2).

Tab. 4.1: Harnparameter von Kontroll- und Patientengruppe als Median und Perzentile.

Harn	Kontrollgruppe n = 21	Niereninsuffiziente Hunde n = 19	Signifikanz (p-Wert)
Spezifisches Gewicht	1.036 1.020 – 1046	1.012 1.010 – 1017	< 0,001
Protein [mg/dl]	29,0 11,8 – 83,9	77,2 20,9 – 204,7	< 0,05
Kreatinin [mg/dl]	354,1 168,1 – 482,6	47,5 27,4 – 68,0	< 0,001
upc-Verhältnis	0,11 0,05 – 0,21	1,62 0,45 – 3,51	< 0,001

Deutlich erhöhte Kreatinin-, Harnstoff-, Phosphor- und Cholesteringehalte wurden im Plasma der nierenkranken Hunde gemessen. Bis auf einen Patienten mit einem nephrotischen Syndrom hatten alle niereninsuffizienten Hunde ein Serumkreatinin oberhalb von 1,4 mg/dl und einen Serumharnstoff von über 40mg/dl. Dagegen war die Albuminkonzentration der erkrankten Hunde gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erniedrigt (vergl. Tab. 4.2). Besonders deutlich waren die verringerten Albuminkonzentrationen bei Hunden mit einer u. a. glomerulär bedingten Proteinurie. Niereninsuffiziente Hunde zeigten eine positive Korrelation zwischen Kreatinin und Harnstoff bzw. – Phosphor ( $\rho = 0,79$  und  $\rho = 0,4$ ;  $p < 0,001$ ) im Plasma. Dagegen war der Gehalt des Gesamtcalciums um so niedriger, je höher das Kreatinin der erkrankten Hunde war ( $\rho = -0,52$ ;  $p < 0,05$ ).

In der Patientengruppe war die Fähigkeit zur Harnkonzentrierung deutlich herabgesetzt, messbar durch ein niedrigeres spezifisches Gewicht ( $p < 0,001$ ). Nur zwei Hunde hatten ein spezifisches Gewicht von 1.021 bzw. 1.022, die übrigen 17 Patienten lagen unterhalb von 1.018. Elf Hunde hatten sogar einen isosthenurischen Harn. Die nierenkranken Hunde wiesen einen signifikant höheren Proteinverlust über den Harn auf, sowohl absolut als auch bezogen auf Kreatinin (upc-Verhältnis) ( $p < 0,001$ ). Bei 32% der gemessenen Harnproben lag der Wert des upc-Verhältnisses unterhalb von 1,0 und nur bei 42% oberhalb von 2,0. Der upc-Quotient korrelierte positiv mit dem Serumphosphorgehalt ( $\rho = 0,62$ ;  $p < 0,05$ ), bzw. korrelierte umgekehrt mit der Konzentration von Gesamtprotein und Albumin im Serum der Patienten ( $\rho = -0,74$  bzw.  $\rho = -0,83$ ;  $p < 0,001$ ). Keine Unterschiede konnten zwischen Hunden mit einem  $upc < 1$  und einem  $upc > 1$  für die Parameter Serumkreatinin, -harnstoff, -calcium, -phosphor, spezifisches Gewicht des Harns oder Urinkreatinin festgestellt werden.

Tab. 4.2: Plasmaparameter von Kontroll- und Patientengruppe als Median und Perzentile (n.s.: nicht signifikant).

Plasma		Kontrollgruppe n = 21	Niereninsuffiziente Hunde n = 19	Signifikanz (p-Wert)
Calcium	[mmol/l]	2,6	2,5	n.s.
		2,4 – 2,8	2,3 – 2,7	
Phosphor	[mmol/l]	1,2	2,1	< 0,01
		1,0 – 1,6	1,3 – 4,6	
Kreatinin	[mg/dl]	0,98	3,00	< 0,001
		0,79 – 1,12	2,35 – 7,47	
Harnstoff	[mg/dl]	33	155	< 0,001
		31 – 50	88 – 373	
Protein	[g/dl]	6,7	6,2	n.s.
		6,3 – 7,7	5,80 – 7,10	
Albumin	[g/dl]	3,5	2,7	< 0,001
		3,0 – 3,8	1,9 – 3,2	
Cholesterin	[mg/dl]	237	330	< 0,01
		197 – 282	263 – 371	

#### 4.1.2 Vitamin A, RBP, THP sowie Harnproteine bei niereninsuffizienten Hunden

##### 4.1.2.1 Vitamin-A-Gehalt im Blutserum und Harn

Vitamin A wird im Blut von Carnivoren in Form von Retinol und Retinylestern transportiert. Wie die Ergebnisse in Tab. 4.3 ergaben, hatte Retinylstearat mit 74% in der Kontrollgruppe und mit 53% in der Patientengruppe den größten Anteil an den Retinylestern und gleichzeitig am Gesamtvitamin A, wobei keine unterschiedliche Retinol- und Retinylesterverteilung zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden konnte. Im Vergleich zur Kontrollgruppe werden im Serum der nierenkranken Hunde signifikant höhere Konzentrationen bestimmter Vitamin-A-Derivate gemessen. So lag der mediane Gehalt von Retinol, Retinyloleat und Retinylpalmitat signifikant höher. Ein besonders deutlicher Unterschied war bei Retinylpalmitat zu verzeichnen ( $p < 0,001$ ).

Tab. 4.3: Konzentrationen an Retinol, Retinylestern und als Gesamretinylester ( $\Sigma$ Retinylester) in [mg/l] als Median und Perzentile.

Serum	Kontrollgruppe	Niereninsuffiziente Hunde	Signifikanz (p-Wert)
	n = 21	n = 19	
Retinol <sup>a</sup>	0,40 (7,3%)	0,73 (10,3%)	< 0,01
	0,35 – 0,54	0,54 – 1,19	
Retinyloleat	0,21 (4,2%)	0,38 (6,0%)	< 0,01
	0,15 – 0,35	0,29 – 0,59	
Retinylpalmitat	0,89 (17,7%)	2,08 (33,1%)	< 0,001
	0,57 – 1,48	1,30 – 3,74	
Retinylstearat	3,71 (73,9%)	3,33 (52,9%)	n.s.
	2,85 – 6,57	2,89 – 4,93	
$\Sigma$ Retinylester <sup>b</sup>	5,01 (91,1%)	6,29 (88,3%)	n.s.
	3,58 – 6,79	4,82 – 8,35	
Vitamin A <sup>c</sup>	5,41	7,12	n.s.
	4,01 – 7,31	5,43 – 9,08	

a: Prozentangaben von Retinol bezogen auf Gesamtvitamin A.

b: Summe aus Retinyloleat, -palmitat und -stearat; Prozentangaben von  $\Sigma$ Retinylester bezogen auf Gesamtvitamin A, Prozente der einzelnen Retinylester als Angaben bezogen auf  $\Sigma$ Retinylester.

c: Summe aus Retinol und Retinylester.

Die gemessenen Vitamin-A-Konzentrationen sind im Harn auf Kreatinin bezogen, um einen volumenbedingten Konzentrationsunterschied auszuschließen. Die nierenkranken Hunde schieden im Vergleich zu den gesunden signifikant höhere Konzentrationen an Retinol mit dem Harn aus ( $p < 0,01$ ), das durch die Berechnung der fraktionellen Clearance in Tab. 4.4 unterstrichen wird. Der prozentuale Anteil von Retinol an der Vitamin-A-Gesamtkonzentration betrug bei den nierenkranken Hunden 65% gegenüber 11% bei der Kontrollgruppe und war gleichzeitig die dominierende Fraktion im Harn. Ein Unterschied bei der Ausscheidung der Retinylester sowie der fraktionellen Clearance der Ester konnte dagegen nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zum Serum stellte Retinylpalmitat mit 90% in der Kontrollgruppe bzw. 73% in der nierenkranken Gruppe die dominierende Fraktion der Retinylester im Harn dar. Retinylstearat, das im Serum dominierte, war im Harn nur in Spuren messbar. Die niereninsuffizienten Hunde wiesen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Serumkreatinin und der fraktionellen Clearance von Retinol auf ( $\rho = 0,84$ ;  $p < 0,001$ ).

Tabelle 4.4: Konzentrationen an Retinol, Retinylestern und Gesamtvitamin A im Harn angegeben als Quotient durch die Kreatininkonzentration des Harns [ $\mu\text{g}/\text{mg}$ ], (FC = Fraktionelle Clearance ohne Einheit).

Harn	Kontrollgruppe n = 21	Niereninsuffiziente Hunde n = 19	Signifikanz (p-Wert)
Retinol <sup>a</sup>	0,06 (11,3%) 0,01 – 0,29	0,62 (65,3%) 0,20 – 1,57	< 0,01
Retinyleat	0,01 (3,3%) 0,00 – 0,03	0,02 (9,1%) 0,00 – 0,03	n.s.
Retinylpalmitat	0,27 (90%) 0,16 – 0,85	0,16 (72,7%) 0,07 – 0,31	n.s.
Retinylstearat	0,00 0,00 – 0,05	0,00 0,00 – 0,01	n.s.
$\Sigma$ Retinylester <sup>b</sup>	0,30 (56,6%) 0,16 – 0,93	0,22 (23,2%) 0,07 – 0,35	n.s.
Vitamin A <sup>c</sup>	0,53 0,19 – 1,58	0,95 0,42 – 1,72	n.s.
FC <sub>Retinol</sub>	0,15 0,03 – 0,52	2,96 0,67 – 5,74	< 0,001
FC <sub>Retinylester</sub>	0,06 0,03 – 0,18	0,14 0,04 – 0,31	n.s.

a: Prozentangaben von Retinol bezogen auf Gesamtvitamin A.

b: Summe aus Retinyleat, -palmitat und -stearat; Prozentangaben von  $\Sigma$ Retinylester bezogen auf Gesamtvitamin A, Prozente der einzelnen Retinylester als Angaben bezogen auf  $\Sigma$ Retinylester.

c: Summe aus Retinol und Retinylester.

Die fraktionelle Clearance wurde in Anlehnung an CONSTABLE (1991) an die folgende Formel für die jeweiligen Parameter errechnet:

$$\text{Fraktionelle Clearance} = \frac{U_x * S_{\text{Kreatinin}}}{U_{\text{Kreatinin}} * S_x} * 100$$

$U_x$ ,  $S_x$ ,  $U_{\text{Kreatinin}}$ ,  $S_{\text{Kreatinin}}$  repräsentieren die gemessenen Harn- und Serumkonzentrationen der jeweiligen Substanz x und Kreatinin.

#### 4.1.2.2 RBP im Blutserum und Harn

Bei der Bestimmung des RBP-Gehaltes im Serum konnten keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen festgestellt werden (Tab. 4.5). Berechnete man jedoch das molare Verhältnis von Retinol zu RBP, war das der nierenkranken Tiere signifikant erhöht ( $p < 0,001$ ). Je größer dieses Verhältnis war, d.h. je größer der Anteil von Retinol ist, der nicht an RBP gebunden vorliegt, desto größer war der Verlust von Retinol über den Harn ( $\rho = 0,63$ ;  $p < 0,05$ ). Hochsignifikante Unterschiede lagen bei der Exkretion von RBP über den Harn vor. Während die gesunden Tiere im Median kein RBP ausschieden, wurde im Harn der Patientengruppe eine mediane Konzentration von 123,9  $\mu\text{g/l}$  absolut bzw. 236,5 ng pro mg Kreatinin gemessen. Die fraktionelle Clearance von RBP betrug im Median 0,41%, wobei eine Variation von 0,09% bis 1,29% je nach Tier auftrat. Je höher die Serumkreatininkonzentration der niereninsuffizienten Hunde war, desto höher war ihre fraktionelle Clearance von RBP ( $\rho = 0,72$ ;  $p < 0,01$ ). Zusätzlich bestand ein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen RBP und Retinol im Harn ( $\rho = 0,81$ ;  $p < 0,001$ ), d.h. ein Anstieg des gemessenen RBP war begleitet von einem höheren Retinolgehalt.

Tab. 4.5: Konzentration von RBP im Serum und Harn, sowie das Verhältnis zu Retinol und Kreatinin als Median und Perzentile, (FC = Fraktionelle Clearance).

Serum	Kontrollgruppe	Niereninsuffiziente Hunde	Signifikanz (p-Wert)
	n = 21	n = 19	
RBP [mg/l]	2,82 2,34 – 3,58	2,84 2,01 – 4,14	n.s.
Retinol:RBP [mol]	1:0,1	1:0,05	< 0,001
<b>Harn</b>			
RBP [ $\mu\text{g/l}$ ]	0,0 0,0 – 3,5	123,9 72,2 – 163,9	< 0,001
RBP/Kreatinin [ng/mg]	0,0 0,0 – 0,82	236,5 98,7 – 423,4	< 0,001
FC <sub>RBP</sub>	0,0 0,00	0,41 0,09 – 1,29	< 0,001

#### 4.1.2.3 THP im Blutserum und Harn

Der Nachweis von THP im Serum verlief sowohl bei den gesunden als auch bei den erkrankten Tieren negativ. Im Harn der Kontrollgruppe konnte dagegen eine signifikant höhere Konzentration von THP gemessen werden, die im Harn der Patienten unterhalb der Nachweisgrenze lag. Einzelne Tiere schieden jedoch geringe Mengen THP aus. Bei diesen Tieren existierte ein umgekehrter Zusammenhang zwischen Serumkreatinin und THP im Harn ( $\rho = -0,62$ ;  $p < 0,01$ ). Je höher die gemessenen Kreatininwerte waren, desto geringer war die Sekretion von THP über den Harn. Desweiteren bestand eine Beziehung zwischen der Konzentration von Phosphor bzw. Calcium im Plasma und der Menge an THP im Harn ( $\rho = -0,54$  bzw.  $\rho = 0,66$ ;  $p < 0,01$ ). Je höher der gemessene Gehalt an Phosphor und je niedriger an Calcium im Plasma war, desto geringer war die ausgeschiedene Menge THP.

Tab. 4.6: Harnkonzentration von Tamm-Horsfall Protein im Harn (Median und Perzentile).

Harn	Kontrollgruppe n = 21	Niereninsuffiziente Hunde n = 19	Signifikanz (p-Wert)
THP [ $\mu\text{g/l}$ ]	269,4 193,3 – 300,9	0,0 0,0 – 36,7	< 0,001
THP/Kreatinin [ng/mg]	100,9 58,0 – 172,00	0,0 0,0 – 57,1	0,001

#### 4.1.2.4 Ergebnisse zur Untersuchung der Harnproteine bei niereninsuffizienten Hunden

Aufgrund des Harnproteinmusters, das mit Hilfe der Gelelektrophorese erstellt wurde und dem immunologischen Nachweis charakteristischer Harnproteinen mittels Western-Blot wurde eine Klassifizierung der Proteinurien vorgenommen (Tab. 4.7). Die Einteilung erfolgte gemäß den Angaben von MÜLLER-PEDDINGHAUS und TRAUTWEIN (1978), BOESKEN (1985b), BIEWENGA und GRUYS (1986a) und MEYER-LINDENBERG et al. (1997).

Tab. 4.7: Einteilung der Proteinurienmuster anhand der Markerproteine RBP, DBP, Albumin, Transferrin, THP und Immunglobulin G; Erscheinen der Proteine mit +, Fehlen mit – bezeichnet, \* Untersuchungen bei insgesamt 16 von 19 Patienten.

	Proteinurie Herkunft				
	glomerulär	glomerulär + selektiv tubulär	glomerulär + komplett tubulär	selektiv tubulär	komplett tubulär
Gruppe	1	2	3	4	5
RBP	-	-	+	-	+
DBP	-	+	+	+	+
Albumin	+	+	+	+	+
Transferrin	+	+	+	-	-
THP	+	+	+/-	+	+/-
IgG	+	+	+	-	-
Patienten*	0	2	6	2	6

Als Vergleich dienten die Ergebnisse der Kontrollhunde. Im Harn klinisch gesunder Hunde waren deutlich weniger und schwächere Proteinbanden festzustellen. Die in der SDS-PAGE auftretenden Proteine der Kontrolltiere hatten ein molekulares Gewicht von ca. 66 kDa (Albumin), ca. 33 kDa und mehrere unterhalb von 16 kDa. Eine zusätzliche Bande bei ca. 100 kDa tritt ebenfalls auf, die immunologisch als THP identifiziert wurde. Immunologisch ließen sich Albumin und THP, nicht jedoch RBP und Vitamin-D-Bindungsprotein (DBP) im Harn der gesunden Hunde nachweisen (Abb. 4.1). Dagegen war bei den nierenkranken Hunden ein Erscheinen der RBP- und DPB-Bande sowie je nach Lokalisation der Nierenstörung ein Fehlen der THP-Bande zu verzeichnen. Transferrin war sowohl bei erkrankten als auch gesunden Tieren nachzuweisen, wobei die nierengesunde Tiere eine nur schwache Bande zeigten. Im Harn vier niereninsuffizienter Hunde trat eine Doppelbande des RBP auf. Das IgG war nur bei Hunden mit einer glomerulären Filtrationsstörung im Harn nachzuweisen, jedoch

konnten Fragmente der Immunglobuline (schwere oder leichte Ketten) im Harn gesunder und nierenkranker Hunde nachgewiesen werden.

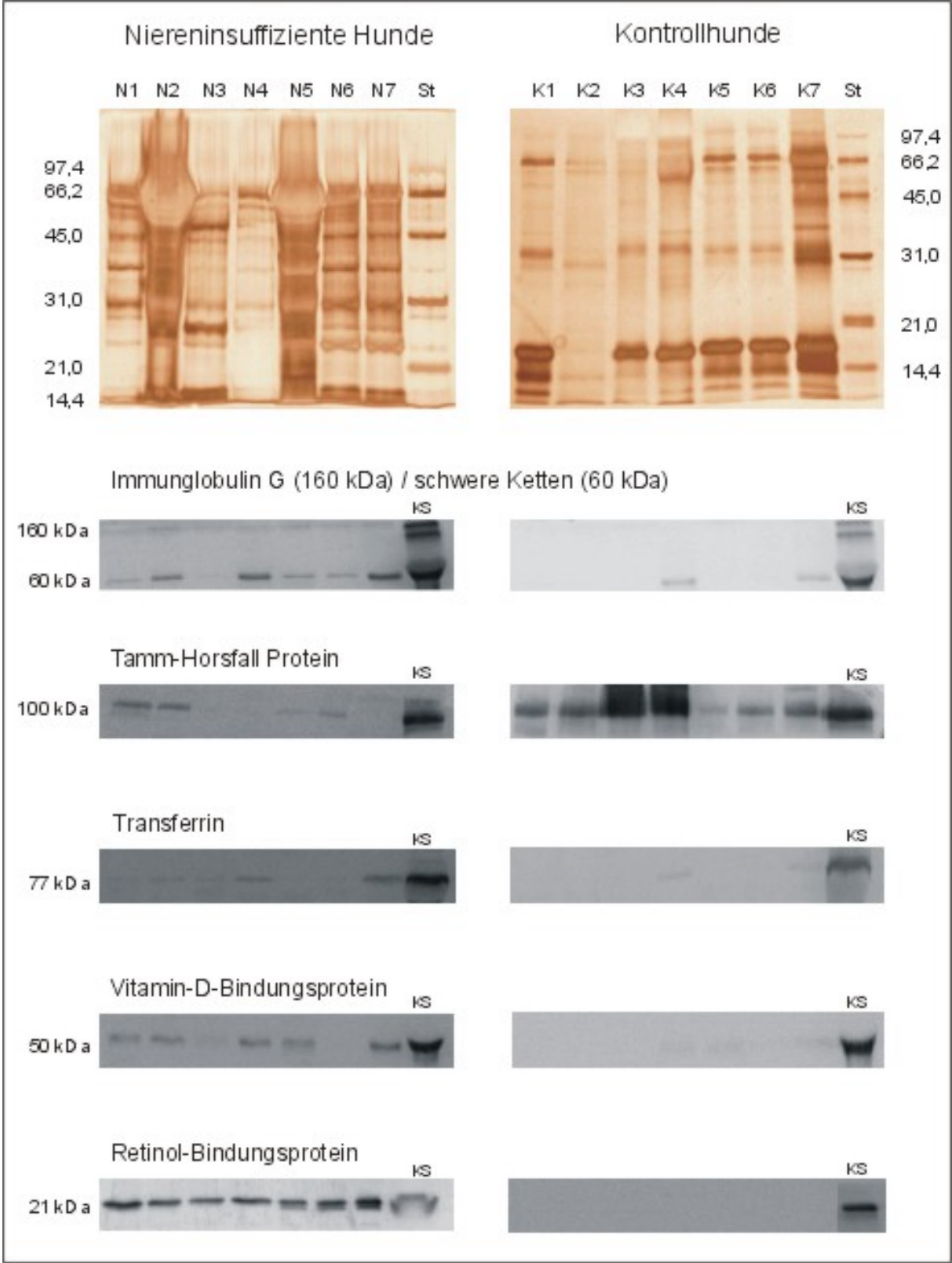


Abb. 4.1: Darstellung der Harnproteine mittels SDS-PAGE und Silberfärbung oben, links Hunde mit Niereninsuffizienz und rechts Kontrolltiere. Immunologischer Nachweis spezifischer Harnproteine mittels Western-Blot, KS = Kontrollserum.

Aufgrund der Einteilung konnten folgende signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen ermittelt werden (Tab. 4.8):

Tab. 4.8: Harnparameter der Gruppen verschiedener Proteinmuster als Median und Perzentile; \*signifikante Unterschiede auf dem Niveau  $p < 0,05$ ; (FC = Fraktionelle Clearance).

Gruppe	Proteinmuster			
	2 glomerulär + selektiv tubulär	3 glomerulär + komplett tubulär	4 selektiv tubulär	5 komplett tubulär
upc- Verhältnis	0,9 0,37 – 1,43	3,5* 2,3 – 7,7	0,3* 0,2 – 0,5	1,3* 0,4 – 3,2
Harnprotein [mg/dl]	128,5 25,0 – 232,0	190,7 106,1 – 342,1	17,3 15,3 – 19,2	49,7 19,5 – 100,3
FC <sub>RBP</sub>	0* 0	1,2* 0,3 – 2,1	0,1 0,07 – 0,14	0,6* 0,3 – 1,1
FC <sub>Retinol</sub>	0,5* 0,1 – 1,0	14,8* 3,1 – 18,7	0,4 0,0 – 0,1	3,2* 2,4 – 4,7

Patienten mit einer Proteinurie glomerulärer sowie komplett tubulärer Herkunft (Gruppe 3) besaßen eine signifikant höhere Proteinkonzentration im Harn als Patienten mit einer selektiv tubulären ( $p < 0,05$ ) oder komplett tubulären Proteinurie ( $p < 0,05$ ). Patienten, deren Proteinverlust rein glomerulärer Herkunft war, waren unter den untersuchten Hunden nicht vorhanden. Eine tubuläre Komponente kam bei sämtlichen Hunden vor. Selbst der Hund mit normalen Serumkreatinin und – harnstoffwerten und dem nephrotischen Syndrom wies eine gemischte Proteinurie auf, d. h. sowohl eine glomeruläre als auch eine selektiv tubuläre Komponente. Eine Proteinurie, die glomerulär und selektiv tubulär bedingt war, konnte durch die Ermittlung des upc-Verhältnisses nicht von einer rein tubulären Ursache unterschieden werden. Der upc-Wert lag sogar im Median mit 0,9 unter dem Wert der komplett tubulären Proteinurie mit 1,3. Die fraktionelle Clearance von RBP sowie von Retinol war in den Gruppen mit einer komplett tubulären Beteiligung des Proteinverlusts (Gruppe 3 und 5) deutlich gegenüber der Gruppe 2 mit einer glomerulär selektiven Proteinurie (Gruppe 3: glomerulär + komplett tubulär  $p < 0,05$ ; Gruppe 5: komplett tubulär  $p < 0,05$ ) erhöht.

#### 4.1.3 Charakterisierung der Proteinurie mittels „Surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight“ Massenspektrometrie (SELDI)

Die Reproduzierbarkeit der SELDI-Methode konnte anhand von drei charakteristischen Peaks eines Testharns gemessen werden. Die Schwankungen der Molmassen dieser drei Proteine war bei Messungen zwischen 10 und 100 kDa geringer als  $\pm 2000$  ppm (0,2%). Die Proteinprofile des Testharns von acht unterschiedlichen Spots eines ProteinChips waren nahezu identisch.

Ein signifikantes Merkmal bei der Untersuchung der Harnpeptide und -proteine mit Hilfe der SELDI-Massenspektrometrie war, dass Hunde mit einer Erkrankung der Nieren ein abweichendes Spektrummuster gegenüber der Kontrollgruppe aufwiesen, das anhand von repräsentativen Massenspektren in Abb. 4.2 dargestellt ist. Bei der Anwendung der gerätespezifischen Auswertungssoftware konnten 7 Proteine identifiziert werden, die sich in ihrer Intensität zwischen Kontrollgruppe und nierenkranken Hunden signifikant unterschieden. Dabei handelte es sich um die Proteine mit der mittleren Molmasse von 11,58, 12,41, 12,60, 14,58, 20,95, 27,85 (bzw. 27,47) und 65,69 kDa. Das 20,95 kDa Protein konnte mittels des Western-Blots als RBP charakterisiert werden.



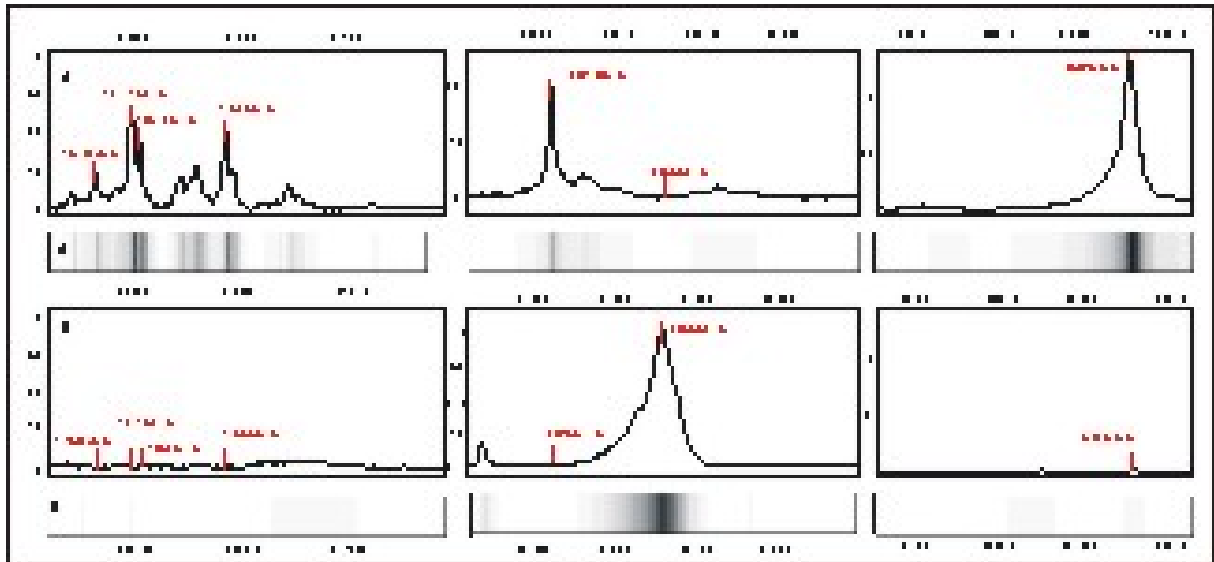


Abb. 4.2: Repräsentative Proteinmassenspektren und die dazugehörigen Gelsichten von Harnproben erhalten durch eine SAX II Chipoberfläche. Reihe A stammt von einem Hund mit Niereninsuffizienz und Reihe B von einem gesunden Tier. Die Zahlen geben die Molmassen der dazugehörigen Proteinpeaks an, Masse/Ladung (in Dalton). +H zeigt die einfache Ladung des Peaks an.

Bei dem Peak bei 65,69 kDa schien es sich um Albumin zu handeln, das mit einer kalkulierten Masse von 65,71 kDa in der Literatur für den Hund angegeben wird (SWISS PROT P49822) (SPITZAUER et al. 1994). Während sechs der identifizierten Proteine in der erkrankten Gruppe in einer deutlich höheren Intensität vertreten waren, erschien das Protein mit 27 kDa in reduzierter Intensität (vergl. Abb. 4.3). Ferner fiel auf, dass dieses Protein mit einer deutlichen Intensität bei 27,85 kDa im Harn der Kontrollgruppe auftrat, während die Patientengruppe vereinzelt einen schwachen Peak bei 27,47 kDa aufwies, d.h. das Protein schien um etwa 380 Da leichter.

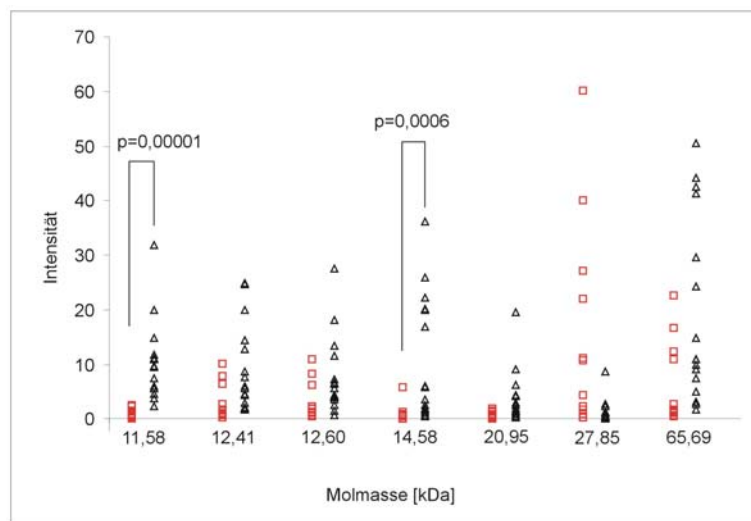


Abb. 4.3: Streudiagramm der 7 signifikanten Proteinpeaks verschiedener Harne der beiden Gruppen. □ Kontrollgruppe (n = 12), ▲ niereninsuffiziente Hunde (n = 16), y-Achse Intensität der Peaks, x-Achse Molmassen in Kilodalton.

Die deutlichsten Intensitätsunterschiede zwischen den Gruppen lagen bei den Proteinen mit der molekularen Masse von 11,58 kDa ( $p = 0,00001$ ) und von 14,58 kDa ( $p = 0,0006$ ). Die übrigen Proteine zeigten größere Schwankungen, das anhand eines Streudiagramms zu erkennen war (Abb. 4.3).

#### 4.1.4 Ergebnisse zur immunhistologischen Untersuchung der Nieren

Neben der Klassifizierung der Proteinurie mittels SDS-PAGE und Western-Blotting wurde bei vier Patienten zusätzliche eine immunhistologische Untersuchung der Nieren angeschlossen (Tab. 4.9).

Der histologische Befund von Patient 1 zeigte überwiegend unveränderte Glomerula, gelegentlich waren geringfügige Plasmaexsudationen im Kapselraum zu erkennen. Am markantesten war eine grobvakuolär-hydropische Degeneration der Hauptstückepithelien in Abb. 4.4 zu beobachten, die generalisiert auftrat. Zahlreiche Tubuli waren durch lichtbrechende Kristalle verlegt. Das Zytoplasma der Tubulusepithelien war hochgradig aufgehellt, stellenweise ganz fein gekörnt, zahlreiche Zellkerne waren pyknotisch oder kernwandhyperchromatisch. Der immunhistologisch gefärbte Anschnitt auf RBP zeigte eine positive Färbung bestimmter proximaler Tubulusbereiche (Abb. 4.5). Die Epithelien waren apikal und granulär im Zytoplasma gefärbt. Gleichzeitig befand sich im Lumen zahlreicher auch vakuolisiert erscheinender Tubuli eine Anfärbung. Beim Nachweis auf Megalin in Abb. 4.6 trat eine positive Reaktion ausschließlich apikal der proximalen Tubulusepithelien auf, unabhängig von der vakuolig-degenerativen Veränderung. Insgesamt nahm die Anzahl der gefärbten Tubuli in Richtung der Markzone deutlich ab. Die immunhistologische Anfärbung auf THP zeigte kräftig gefärbte distale Tubuluszellen, insbesondere der aufsteigende Ast in der äußeren Zone des Markes. Die Reaktion befand sich im Zytoplasma und Lumen (Abb. 4.7). Die Zellen der Tubuli contorta II waren dagegen nicht einheitlich gefärbt. Im Bereich der Kristalle erschien die Reaktion besonders stark. Dort lies sich gelegentlich THP im Interstitium nachweisen (Abb. 4.8).

Tab. 4.9: Zusammenstellung des Proteinmusters, quantitative Markerkonzentrationen im Harn und pathohistologische Befunde der 4 Hunde mit einer immunhistologischen Nierenuntersuchung.

Patient	Proteinmuster	RBP [ $\mu\text{g/l}$ ]	THP [ $\mu\text{g/l}$ ]	upc	Pathohistologische Befunde
1	Komplett tubulär	170,0	51,0	0,47	Nekrotisierende Tubulonephrose
2	Komplett tubulär	236,4	40,1	3,5	Hyalinose der Glomerula, Nierenmarkverkalkung
3	Glomerulär + komplett tubulär	41,1	0	2,3	Hochgr., chron., interstitielle Nephritis und Nierenamyloidose
4	Glomerulär + komplett tubulär	132,6	0	22,1	Chron. interstitielle Nephritis mit hochgr. bindegewebiger Induration, diffuse dystrophische Verkalkung

Im HE-Schnitt von Patient 2 waren in zahlreichen Glomerula hyalinartige Ablagerungen im Bereich des Mesangiums festzustellen. Die Kapselmembran schien unverändert. Die proximalen Tubulusepithelien waren z.T. kernlos und vakuolig verändert, häufig waren die Zellgrenzen nicht mehr erkennbar (Abb. 4.9). Einzelne Epithelzellen hatten sich von der Basallamina abgelöst und lagen im Lumen. Die distalen Tubuli waren nur vereinzelt betroffen. Ihre Zellgrenzen waren in diesen Fällen nicht mehr eindeutig auszumachen. Die Färbung auf RBP war überwiegend in der äußeren Rindenzone fokal lokalisiert und nahm in Richtung Nierenmark deutlich ab. Dort waren nur noch vereinzelte RBP-positive Tubuli anzutreffen (Abb. 4.10). Bezogen auf die Zelle trat die Farbreaktion sowohl apikal als auch seltener granulär im Zytoplasma auf. Die Verteilung der Färbung auf Megalin war mit der von RBP vergleichbar. Es existierten fokal angefärbte Bereiche neben kaum gefärbten prox. Tubuli, ebenfalls nach medullär abnehmend. Die Tubuluszellen reagierten ausschließlich apikal positiv (Abb. 4.11). Entsprechend zu Patient 1 zeigten die distalen Tubuli eine kräftig positive Reaktion auf THP und ein ähnliches Verteilungsmuster (Abb. 4.12).

Zahlreiche Glomerula des 3. Patienten in Abb. 4.13 zeigten eine deutliche Veränderung im Sinne einer hochgradigen bindegewebigen Proliferation der Basalmembran mit einer hyalinen Verquellung. Gleichsam waren proximaler und distaler Tubulus fibrosiert. Zahlreiche proximale und distale Tubuluszellen waren von der Basalmembran abgelöst, lagen jedoch überwiegend noch im Verband

vor. Multiple distale Tubuli waren zystisch dilatiert. Die Anzahl der Harnkanälchen war reduziert, die noch erhaltenen waren z.T. atrophisch. Das Interstitium hatte lymphoplasmazelluläre Infiltrate und war hochgradig bindegewebig induriert. Eine Anfärbung auf RBP war auf fokale Bereiche in der äußeren Rinde beschränkt. In Arealen mit massiver Fibrosierung blieb die Farbreaktion aus. Die positiv reagierenden prox. Tubuli waren überwiegend zytoplasmatisch granulär und selten apikal angefärbt (Abb. 4.14). Im Tubuluslumen waren ebenfalls gefärbte Bereiche. Megalin zeigte das gleiche Verteilungsmuster wie RBP mit einer rein apikalen Anfärbung (Abb. 4.15). Zusätzlich waren positive Reaktionen von einzelnen prox. Tubuli der inneren Rinde zu vermerken, die auf RBP nicht gefärbt waren. Auffällig war eine interstitielle Lokalisierung von THP mit lymphoplasmazellulärer Begleitung, d.h. neben einer insgesamt nur vereinzelt und schwachen Färbung der distalen Tubuli auf THP kam THP zudem interstitiell vor (Abb. 4.16 und 4.17).

Das histologische Bild von Patient 4 zeigte Glomerula, die gleichsinnig verändert waren. Manche Glomerula waren noch stärker als die in Abb. 4.18 zu sehenden betroffen. Deutlich war die drahtschlingenartige Beschaffenheit der verdickten Kapillarwände mit zusätzlich homogenen verquollenen Kapillarläppchen. Kapillarlumina waren nur noch stellenweise erkennbar. Streckenweise waren die Schlingen mit der Kapsel verklebt. Die Kapselmembran war nur geringgradig verdickt. Zahlreiche glomerulumnah gelegene Harnkanälchen zeigten vakuolär-hydropisch degenerierte Epithelzellen bei teilweise erhaltenen und teilweise degenerierten Kernen. Proximale und distale Tubuli waren gleichsam betroffen, wobei überwiegend keine Zellgrenzen mehr erkennbar waren. Das Lumen der distalen Tubuli war z.T. stark dilatiert (Abb. 4.19). Einige Zellen waren aus dem Verband gelöst. Nur noch wenige unauffällige Tubuli waren erkennbar. Nur ganz selten war eine apikal positive Reaktion bei der Färbung auf RBP sichtbar. Überwiegend war die Reaktion im Lumen völlig destruiert und dilatierter prox. Tubuli sowie einiger Glomerula lokalisiert (Abb. 4.20). Vereinzelt waren noch intakte proximale Tubuluszellen positiv auf Megalin gefärbt (Abb. 4.21). Diese befanden sich mehrheitlich am äußeren Rand der Rindenzone. Auch die Reaktion auf THP war deutlich eingeschränkt. Vereinzelt distale Tubuli waren entweder zytoplasmatisch und luminal gefärbt oder nur einige Zellen des Tubulus zeigten eine apikale Reaktion (Abb. 4.22).

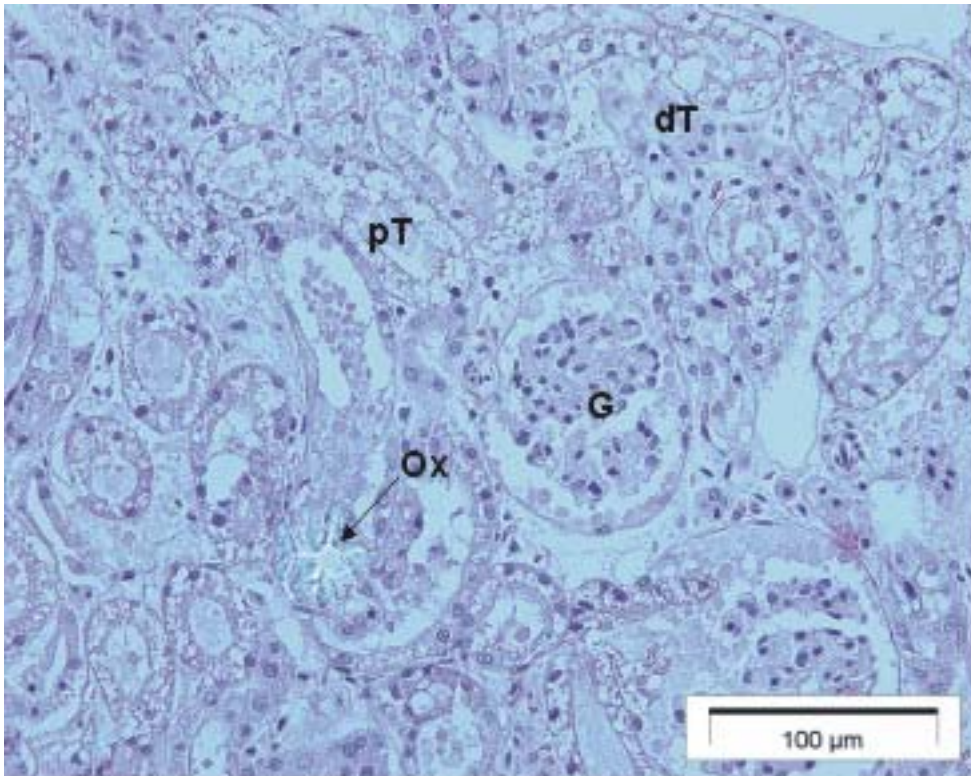


Abb. 4.4: Patient 1; Färbung Hämatoxylin-Eosin (HE), Ausschnitt der Rindenzone mit Glomerulum (G), proximalem Tubulus (pT) und distalem Tubulus (dT). Oxalatkristalle im Lumen (Ox).

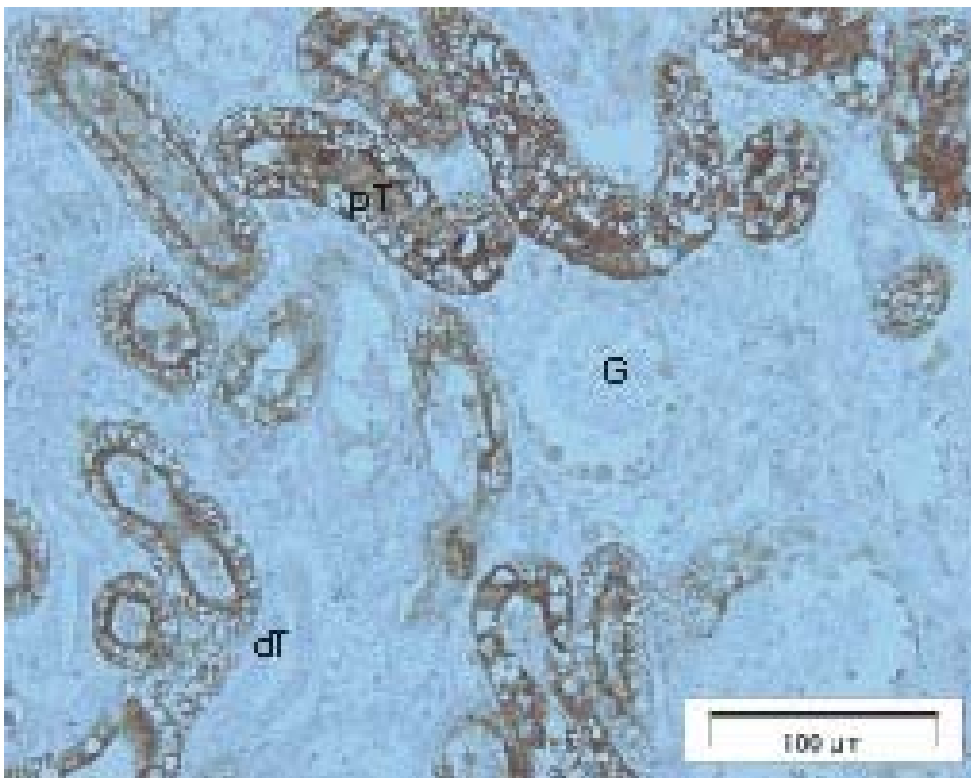


Abb. 4.5: Patient 1; Färbung auf RBP mit Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) - Methode, Rindenzone, gleicher Ausschnitt wie in Abb. 4.4.

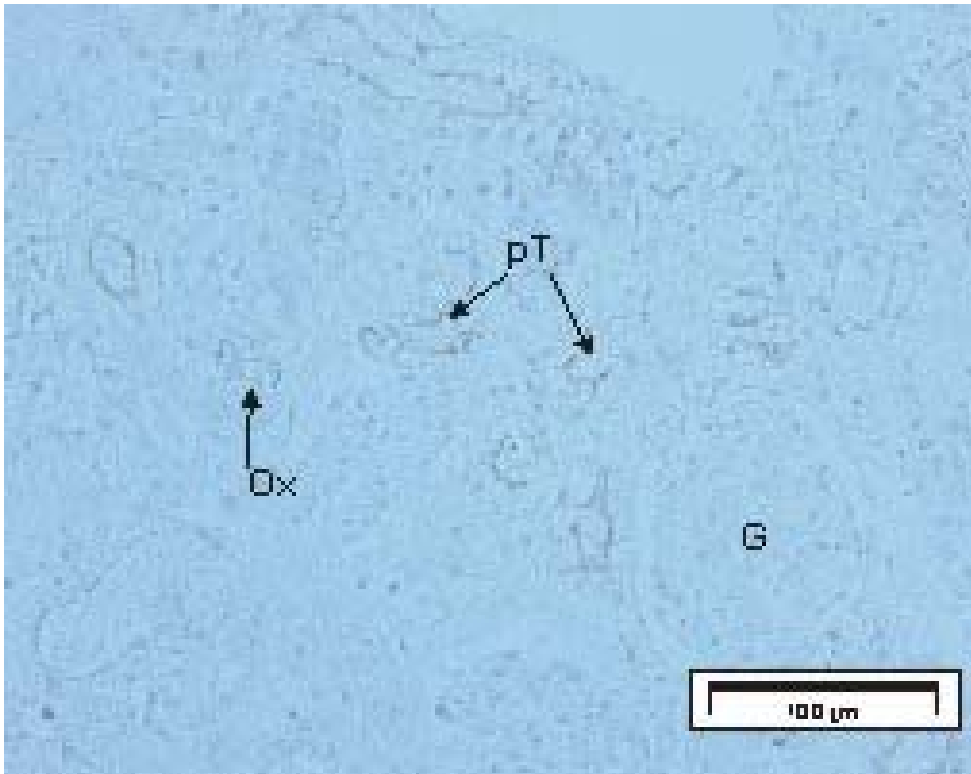


Abb. 4.6: Patient 1; Färbung auf Megalin mit PAP-Methode, Ausschnitt der Rindenzone mit Glomerulum (G), proximalem Tubulus (pT) und Oxalatkristalle im Lumen (Ox), gleicher Ausschnitt wie in Abb. 4.4 und 4.5.

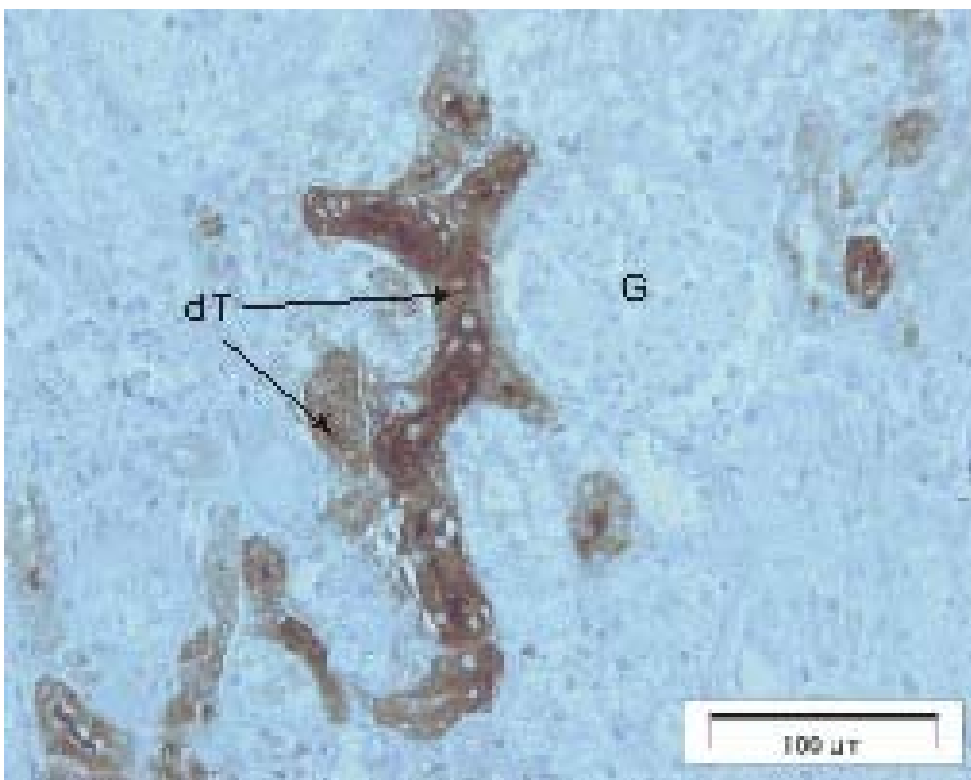


Abb. 4.7: Patient 1; Färbung auf THP mit PAP-Methode, Rindenzone.

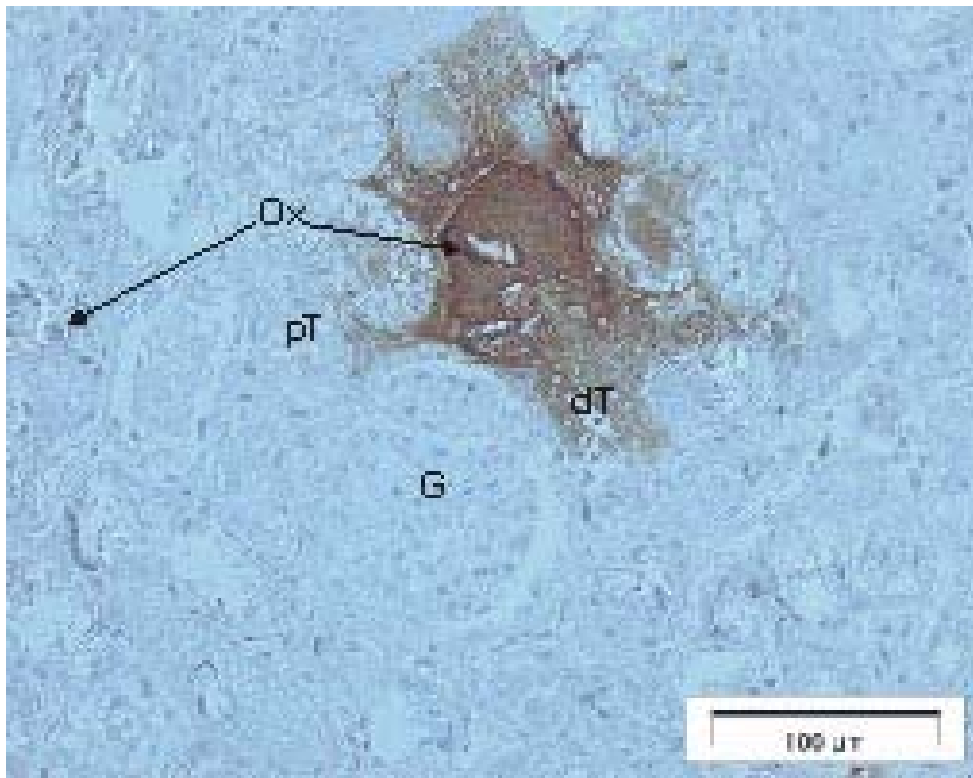


Abb. 4.8: Patient 1; Färbung auf THP mit PAP-Methode, Rindenzone mit Glomerulum (G), proximalem Tubulus (pT) und distalem Tubulus (dT), THP auch extrazellulär lokalisiert.

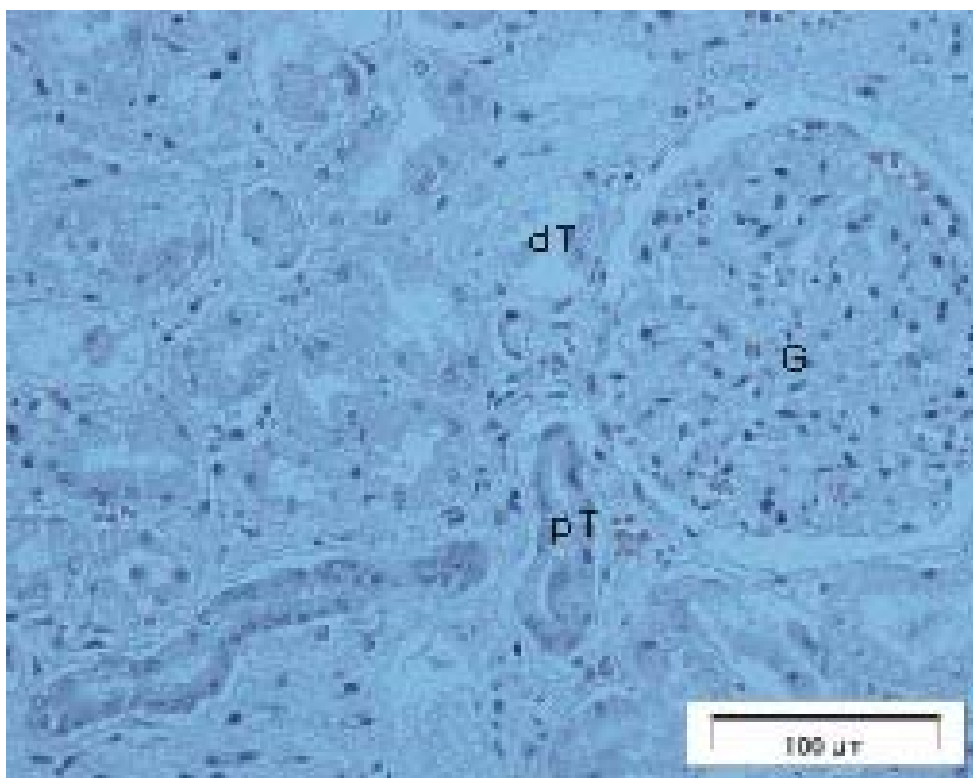


Abb. 4.9: Patient 2; HE-Färbung, Ausschnitt der Rindenzone mit Glomerulum (G), proximalem Tubulus (pT) und distalem Tubulus (dT).

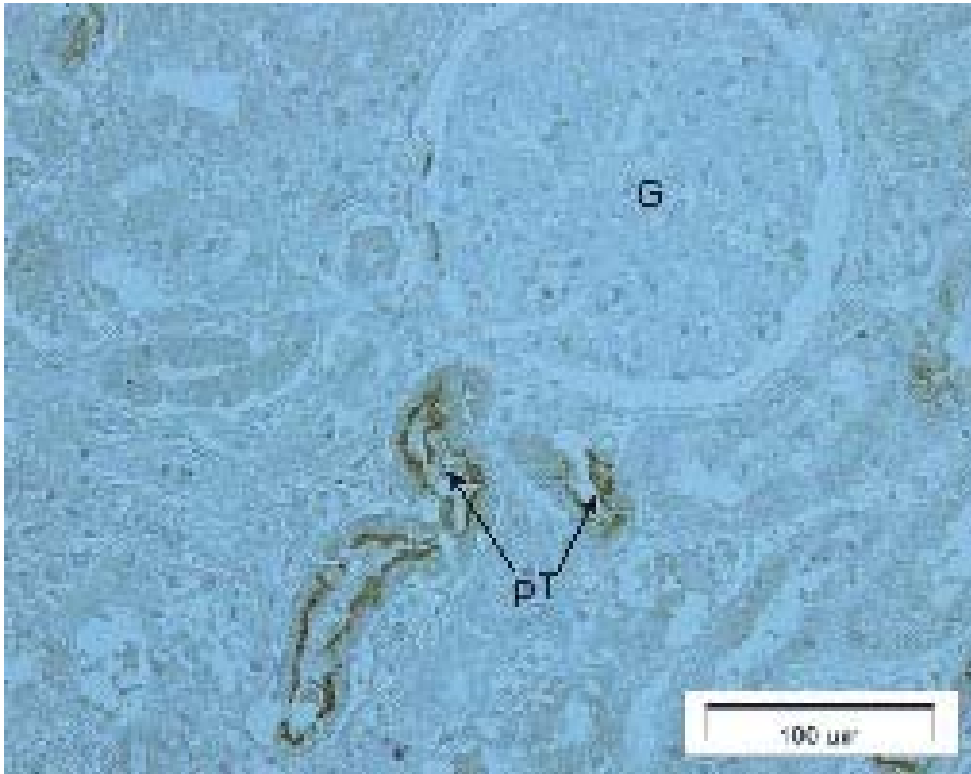


Abb. 4.10: Patient 2; Färbung auf RBP mit PAP-Methode, gleicher Ausschnitt wie in Abb. 4.9.

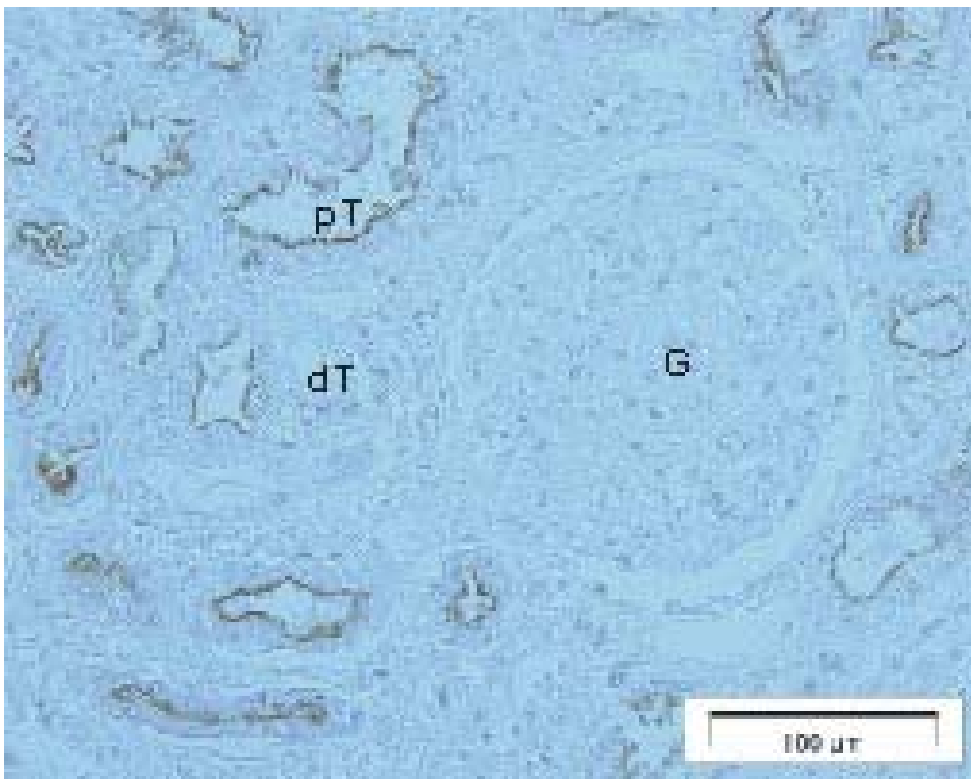


Abb. 4.11: Patient 2; Färbung auf Megalin mit PAP-Methode, gleicher Ausschnitt wie in Abb. 4.9 und 4.10, Glomerulum (G), proximaler Tubulus (pT) und distaler Tubulus (dT).

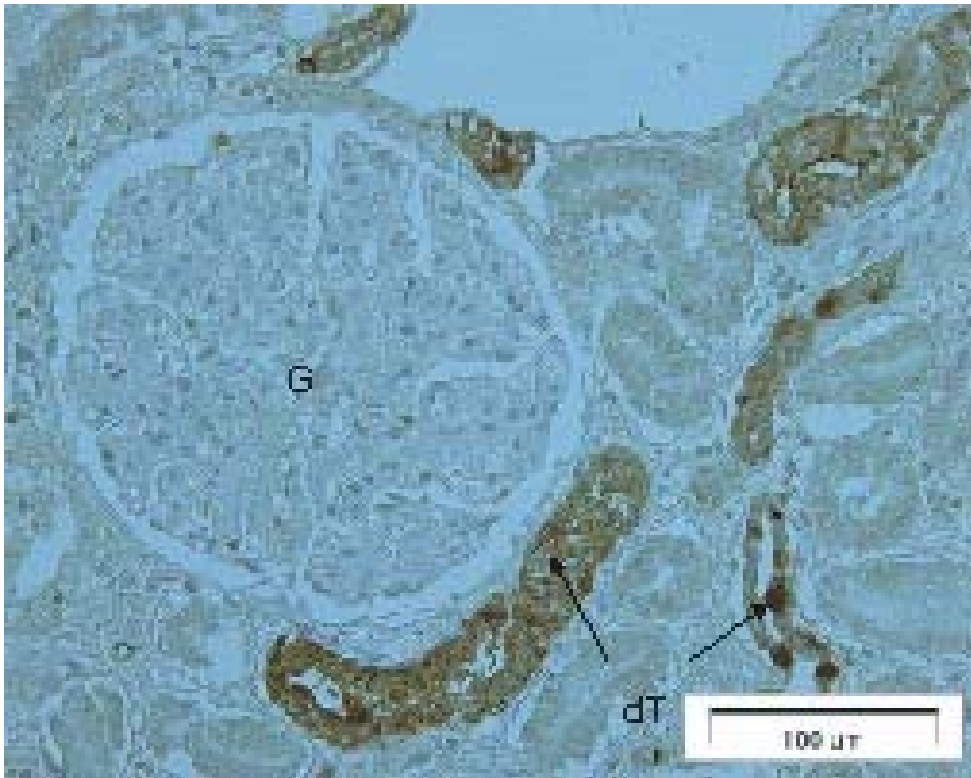


Abb. 4.12: Patient 2; Färbung auf THP mit PAP-Methode, Ausschnitt der Rindenzone mit Glomerulum (G), proximalem Tubulus (pT) und distalem Tubulus (dT).

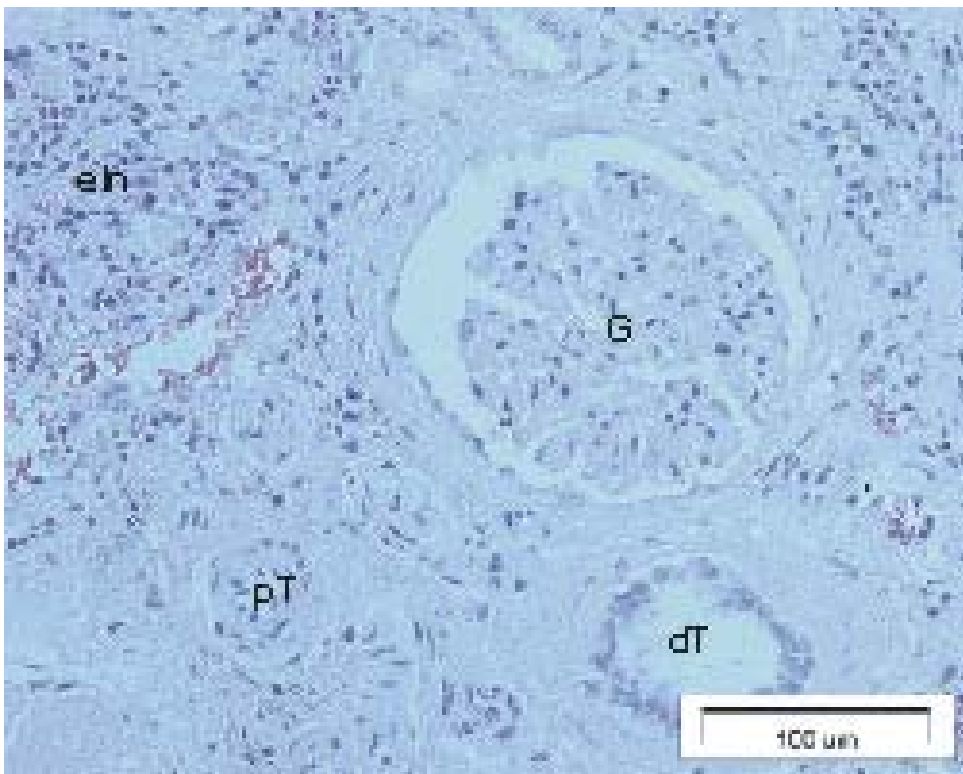


Abb. 4.13: Patient 3; HE-Färbung, Ausschnitt der Rindenzone mit Glomerulum (G), proximalem Tubulus (pT), distalem Tubulus (dT) und entzündliche Infiltrate (eln).



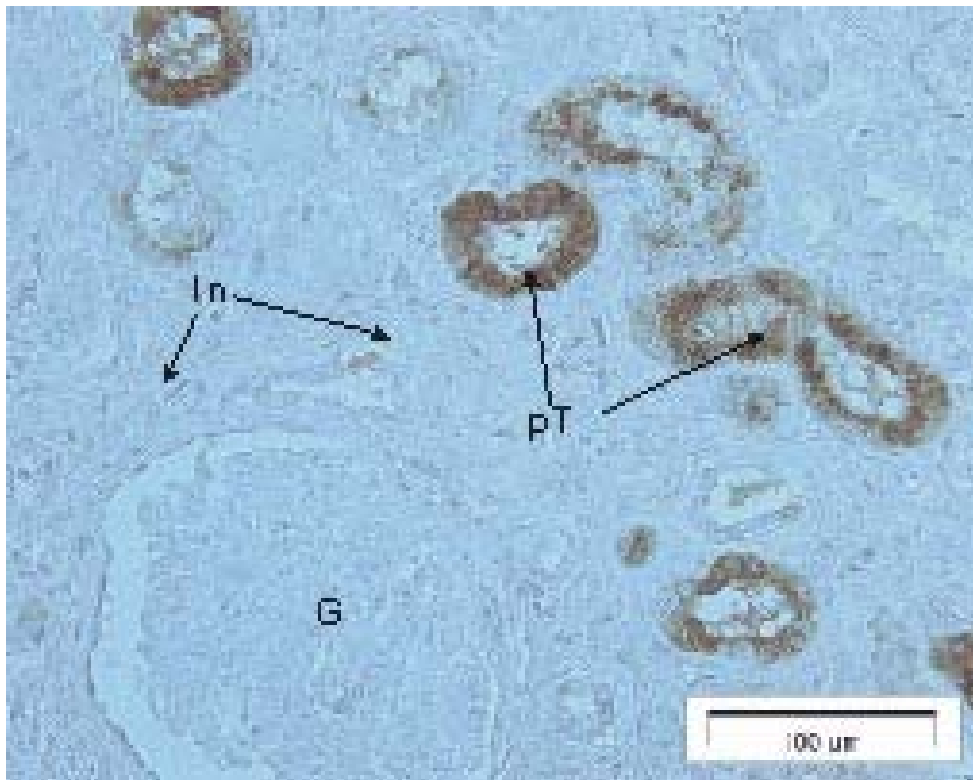


Abb. 4.14: Patient 3; Färbung auf RBP mit PAP-Technik, Rindenzone, proximaler Tubulus (pT) und Glomerulum (G), Interstitium (In) bindegewebig induriert.

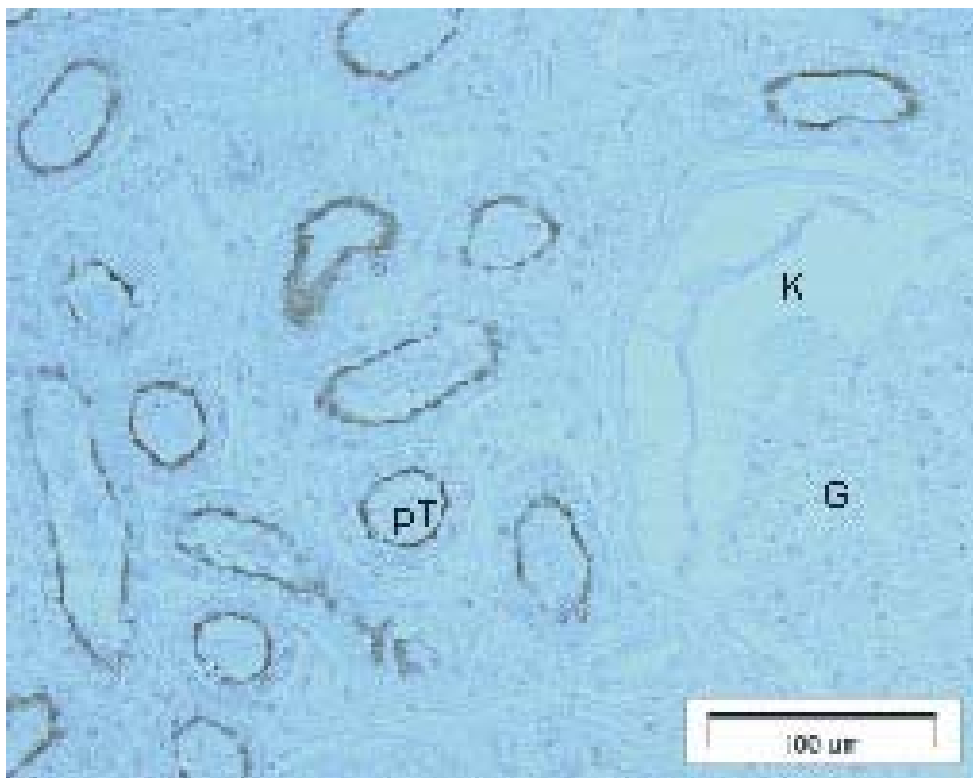


Abb. 4.15: Patient 3; Färbung auf Megalin nach PAP-Methode, Glomerulum (G), proximaler Tubulus (pT) und Kapselraum (K).

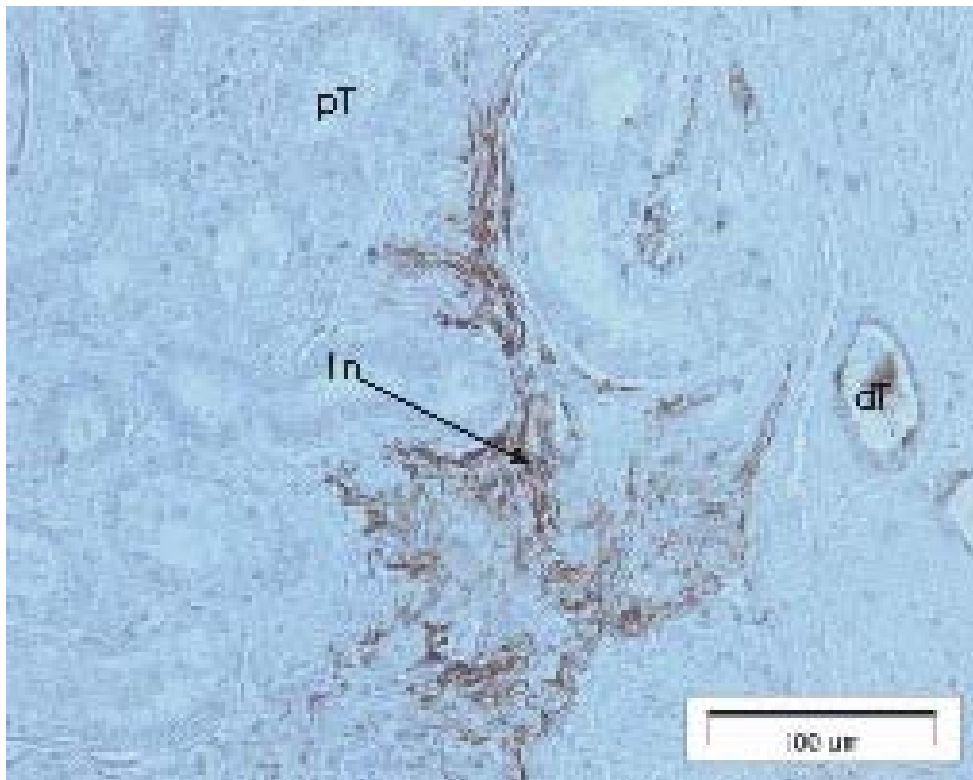


Abb. 4.16: Patient 3; THP-Färbung nach PAP-Methode, THP befindet sich extrazellulär im Interstitium (In).

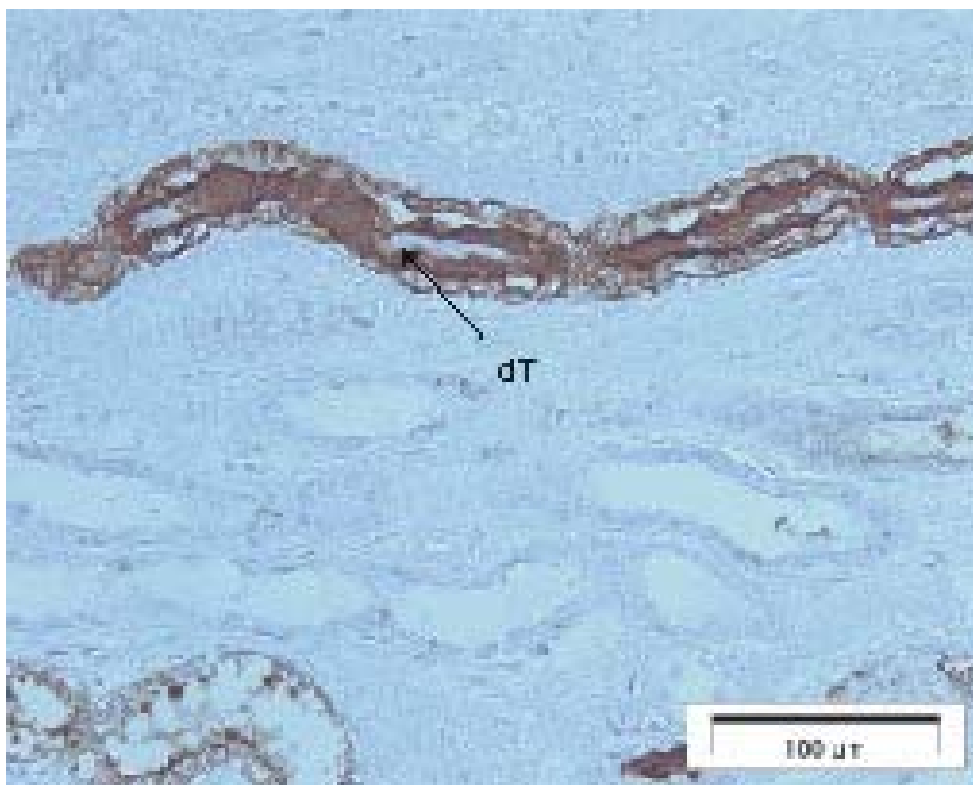


Abb. 4.17: Patient 3; THP-Färbung nach PAP-Technik.

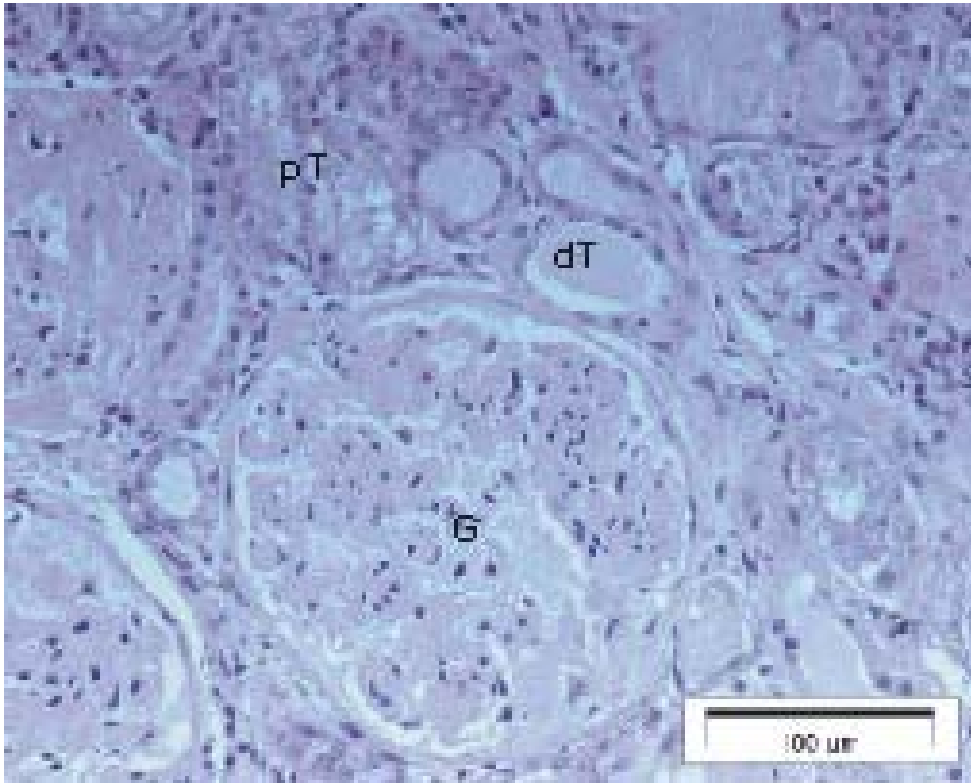


Abb. 4.18: Patient 4; HE-Färbung, Ausschnitt der Rindenzone mit Glomerulum (G), proximalem Tubulus (pT) und distalem Tubulus (dT).

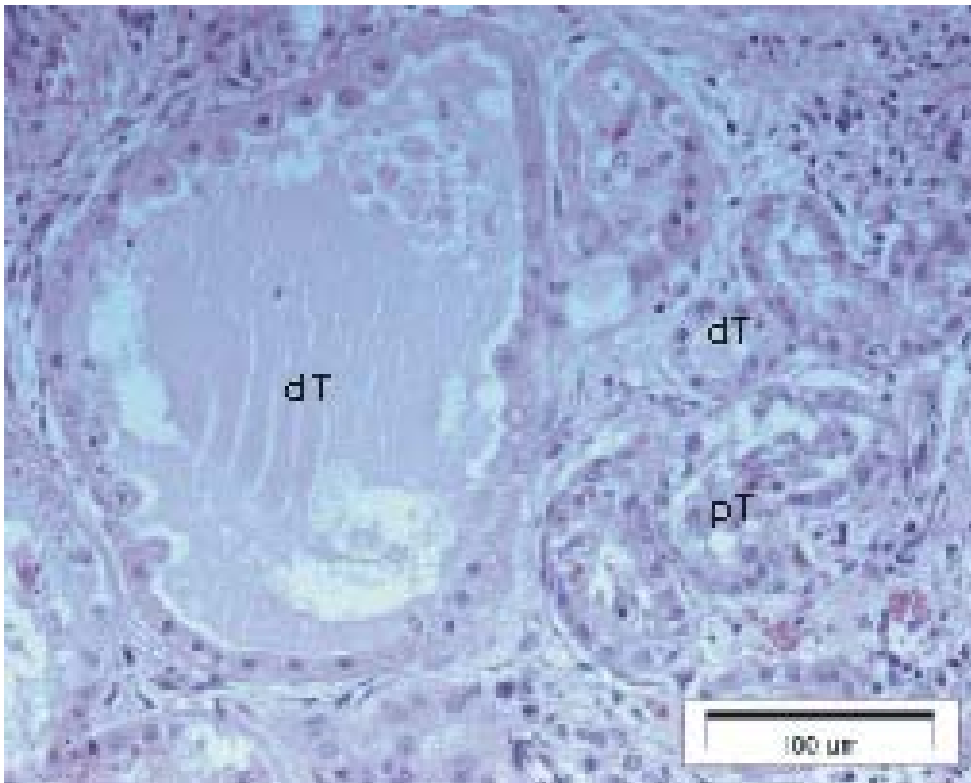


Abb. 4.19: Patient 4; HE-Färbung, Rindenzone, massiv dilatierter distaler Tubulus mit Exsudat.

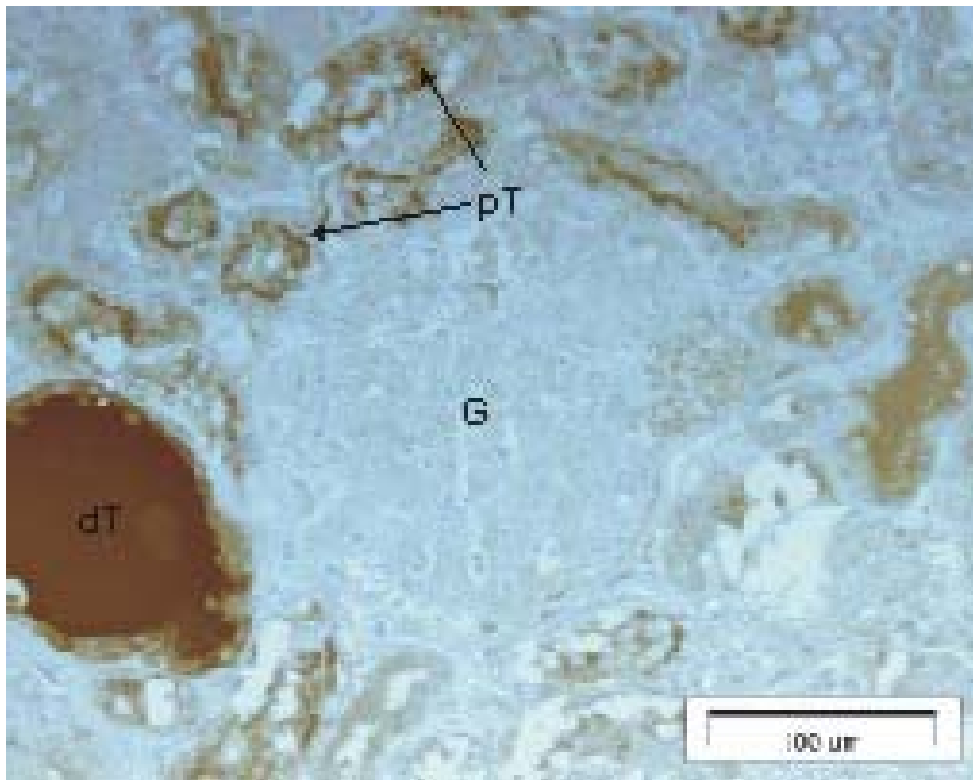


Abb. 4.20: Patient 4; Färbung auf RBP nach PAP-Methode, Ausschnitt der Rindenzone mit Glomerulum (G), prox. Tubulus (pT) und distalem Tubulus (dT) der massiv positiv reagiert.

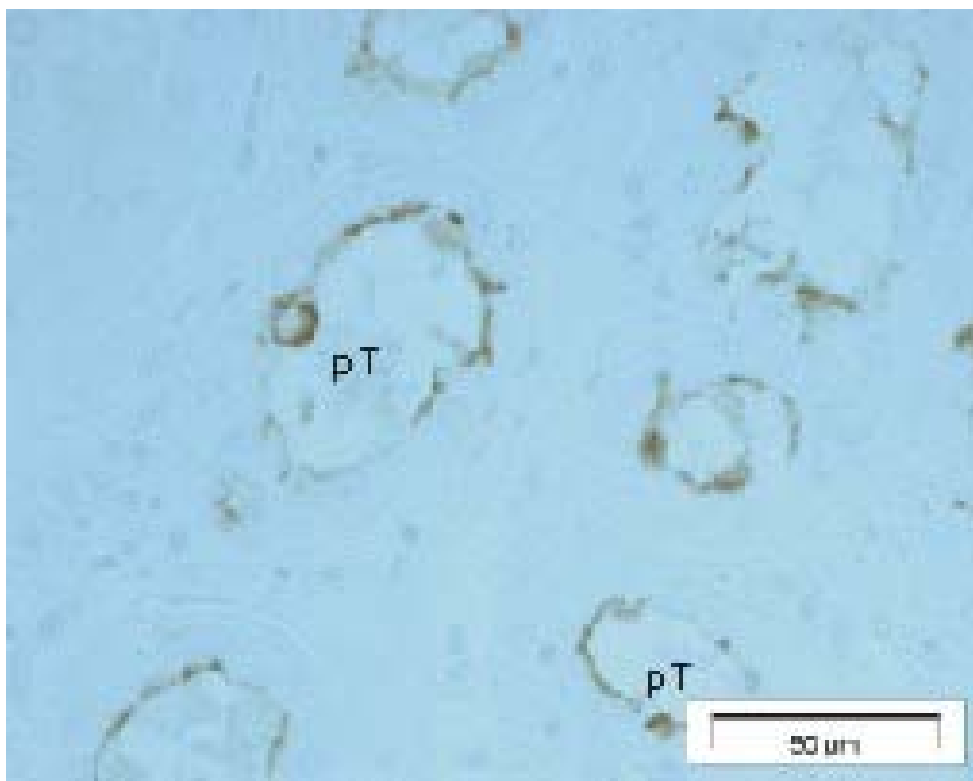


Abb. 4.21: Patient 4; Färbung auf Megalin mit PAP-Technik, Rindenzone.

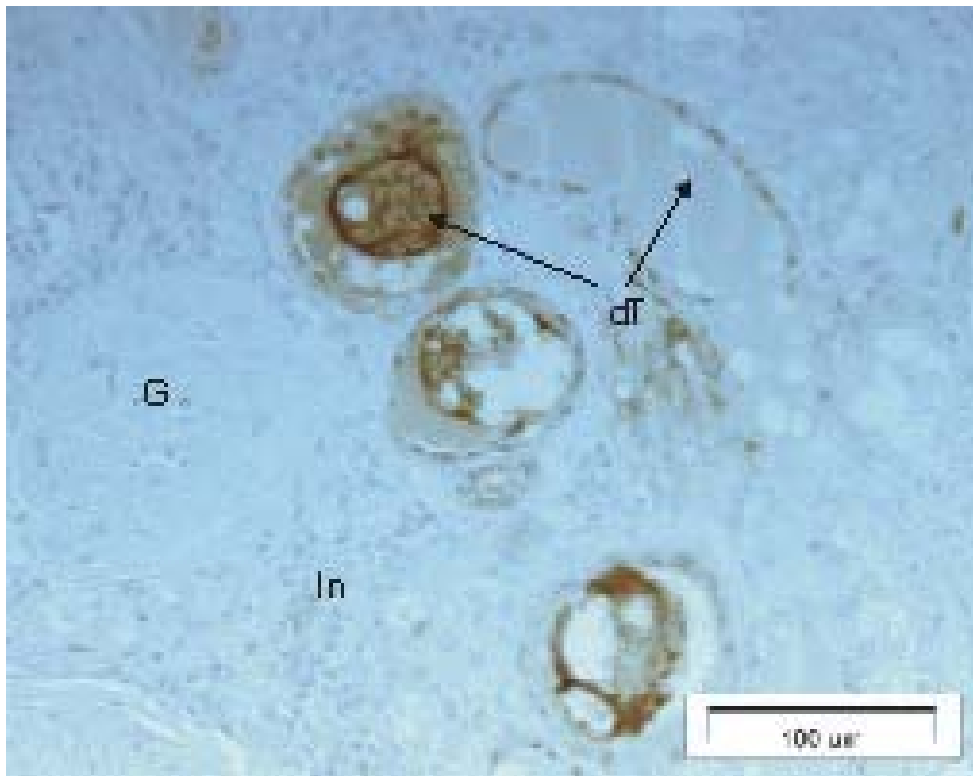


Abb. 4.22: Patient 4; Färbung auf THP, PAP-Methode, Rindenzone mit Glomerulum (G) und distalem Tubulus (dT).