

## 5 Diskussion

### 5.1 Niereninsuffiziente Hunde

Nierenerkrankungen treten beim Hund relativ häufig auf und sind bei dieser Spezies eine ernstzunehmende Krankheits- und Todesursache. Zur Niereninsuffizienz kommt es, wenn eine Erkrankung die Nieren in einer Form beeinträchtigt, dass diese ihre lebenswichtigen homöostatischen Funktionen nicht mehr ausüben kann. Eine Niereninsuffizienz bei Hunden wird selten in einem früheren, präazotämischen Stadium erkannt. Gründe dafür sind überwiegend in der Diagnostik zu suchen, da Nephropathien aufgrund der hohen Reservekapazität der Nieren über einen langen Zeitraum klinisch inapparent verlaufen (FINCO und DUNCAN 1976). In der Regel hat es der Tierarzt mit einer Azotämie als Zufallsbefund bei älteren Patienten zu tun oder mit Patienten, bei denen bestehende unspezifische klinische Symptome wie Gewichtsverlust, Erbrechen oder Apathie auf eine Urämie zurückzuführen sind. Abhängig vom zeitlichen Verlauf kann die Niereninsuffizienz in die akute und die chronische Form eingeteilt werden. Für die Therapie und Prognose bereits manifester Nephropathien ist die Charakterisierung der zugrundeliegenden Funktionsstörung als auch die Klassifizierung der Nephropathie (glomerulär vs. tubulär-interstitiell) von wesentlicher Bedeutung (GRÜNBAUM et al. 1991).

Die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) bietet die Möglichkeit, eine Beurteilung der Nierenfunktion vorzunehmen, wurde jedoch in dieser Studie nicht durchgeführt. Schon 1926 war von REHBERG Kreatinin zur Messung der GFR verwendet worden. Obwohl diese Substanz in Abhängigkeit von der Konzentration im Plasma nicht nur filtriert sondern zu einem geringen Teil im distalen Tubulus auch sezerniert wird, hat sich die Bestimmung der endogenen und exogenen Kreatinin-Clearance zur Messung der GFR in der Humanmedizin und auch Tiermedizin durchgesetzt (PAYNE 1986, FINCO 1995b). Für die medizinische Beurteilung der Kreatinin-Clearance muss berücksichtigt werden, dass die Nierenfunktion in dreierlei Weise die Plasmakonzentration beeinflusst. Zunächst ist sie an der Biosynthese des Kreatinins beteiligt (NARAYANAN und APPLETON 1980). Eine Verminderung der tubulären Nierenfunktion führt zu einem Abfall des Muskelkreatins und damit des Serumkreatinins. Diese Rolle der Niere ist eine mögliche Ursache für die Beobachtung, dass erst eine Einschränkung der glomerulären Funktion von über 50% zu einem Anstieg des Kreatinins im Serum führt (sog. kreatininblinder Bereich). Ein Anstieg des Serumkreatinins führt auf der anderen Seite zu gesteigerter tubulärer Sekretion, die bei der Messung einer Kreatinin-Clearance einen zu hohen Wert gegenüber der wahren, mit Inulin oder Isotopenmethoden gemessenen Clearance ergibt. Die durch Sekretion von Kreatinin verursachte Überschätzung der Clearance, die bei 60 ml/min um 50%, bei 0-20 ml/min um 100% zu hoch liegt, schränkt die Anwendung dieses Verfahrens zur Messung der glomerulären Filtration bei eingeschränkter Nierenfunktion ein (GUDER 1995). Wegen der vielen Einschränkungen der Interpretation durch mangelnde analytische Spezifität und Fehlerquellen hat man versucht, durch Messung anderer Parameter im Blut oder Harn die Ergebnisse der Kreatininbestimmung zu sichern. So hat in neuerer Zeit auch die Bestimmung glomerulär filtrierbarer oder anderer nieren-spezifischer Proteine Eingang in die Humandiagnostik gefunden (GUDER und HOFMANN 1992).

Ziel der Arbeit war es, den Harn von nierenkranken Hunden auf spezifische Proteinmarker hin zu untersuchen und diese für eine Bestimmung der betroffenen Nierenabschnitte heranzuziehen. Die 19 niereninsuffizienten Hunde (2 akute, 17 chronische Formen) wurden dazu in eine Gruppe zusammengefasst, da zum einen eine getrennte Betrachtung statistisch nicht sinnvoll erschien und zum anderen sich die Parameterwerte der 2 Hunde mit akuter Niereninsuffizienz innerhalb der Perzentile der restlichen Hunde befanden.

#### 5.1.1 Klinische und klinisch-chemische Parameter

Die Bestimmung von Serumharnstoff und -kreatinin wird seit über 50 Jahren zur Ermittlung der Nierenfunktion herangezogen, jedoch ist die Bewertung für eine Beurteilung hinsichtlich Schweregrad, Lokalisation und Prognose unzureichend (ALLEN et al. 1985). Durch den zunehmenden Untergang der Nephrone kommt es infolge einer erhöhten Perfusion zunächst zu einer Mehrleistung der noch intakten Nephrone (MITCH et al. 1980). Schließlich wird eine zunehmende Retention harnpflichtiger Stoffe beobachtet. Klinische Symptome treten erst nach Ausfall von etwa 75% der Gesamtnephronenzahl auf (FINCO und DUNCAN 1976). Für die Beurteilung, inwieweit Schweregrad und die Serumparameter korrelieren, kann die Bestimmung der GFR herangezogen werden, die hier jedoch nicht eingesetzt wurde. Es konnte auch keine Korrelation zwischen dem upc-Verhältnis und der Höhe der Azotämie hergestellt werden, was die Beobachtungen von ALLEN et al. (1985)

bestätigten. Der Vergleich zwischen Serumharnstoff bzw. -kreatinin und der Proteinurieform ergab innerhalb der eigenen Patienten keine statistischen Unterschiede.

Eine Hypoproteinämie insbesondere eine Hypalbuminämie wird häufig in Verbindung mit einer Glomerulopathie gefunden (LEES 1995). Auch die eigene Patientengruppe zeigte eine verringerte Albuminkonzentration im Blut, die jedoch auch bei Tieren mit einer tubulär bedingten Proteinurie bestand. Die Bestimmung der Albuminkonzentration liefert zwar einen Hinweis auf eine Glomerulopathie, jedoch ist sie kein hinreichender Parameter. Ebenfalls nicht auszuschließen ist, dass der niedrige Serumproteingehalt durch eine alimentäre Mangelversorgung oder Diarrhoe verursacht wurde (LEES 1995), da die 19 Hunde dieser Studie häufig an Inappetenz, Vomitus und/oder Diarrhoe litten.

Nierenkranke Menschen zeigen eine Vielzahl von Störungen des Lipidstoffwechsels mit Erhöhungen der Plasmakonzentration von LDL und VLDL sowie assoziierter Hypercholesterinämie und Hypertriglyzeridämie (MOORHEAD et al. 1986). Auch die niereninsuffizienten Hunde wiesen einen erhöhten Cholesterinspiegel auf. Jedoch ist dieser Parameter vorsichtig zu interpretieren, da bei einigen Tieren keine Nüchternblutentnahme vorlag und dies einen unphysiologisch erhöhten Wert vortäuschen kann.

Für die Interpretation des spezifischen Gewichtes von zufällig genommenen Harnproben ist die Kenntnis des Hydratationsstatus, der Serumharnstoff- bzw. Serumkreatininwerte sowie die Kenntnis von verabreichten Medikamenten bzw. Infusionen nötig. Klinische Studien bei Hunden ergaben, dass ein spezifisches Gewicht von 1.030 und höher eine adäquate Anzahl an funktionstüchtigen Nephronen voraussetzt (OSBORNE et al. 1995). Variierende Konzentrierungsfähigkeit des glomerulären Filtrates sind typische Befunde bei allen Formen von Niereninsuffizienz. Der totale Verlust der Harnkonzentrierungsfähigkeit (spez. Gewicht 1.008 – 1.012 entspricht dem glomerulären Filtrat) entwickelt sich meist langsam. Ferner reflektiert ein niedriges spezifisches Harngewicht bedingt durch eine fehlende Konzentrierungsfähigkeit der Nieren eher die Nephronfunktion und weniger die Funktion von distalem Tubulus bzw. Sammelrohr (OSBORNE et al. 1995). Die Funktionseinschränkung wird überwiegend durch Faktoren verursacht, die nicht direkt mit einer Störung des distalen Tubulus einhergehen. Ähnliche Beobachtungen waren innerhalb der Patientengruppe zu machen. So waren nicht alle 19 Hunde isosthenurisch, sieben Hunde zeigen eine geringfügige Konzentrierungsfähigkeit mit Werten zwischen 1.013 und 1.022.

Die Einteilung in akute bzw. chronische Niereninsuffizienz konnte durch die Verlaufskontrollen bzw. die pathohistologischen Befunde vorgenommen werden.

### 5.1.2 Veränderungen im Vitamin-A-Stoffwechsel bei niereninsuffizienten Hunden

Im Rahmen der eigenen Untersuchungen bewegten sich die Vitamin-A-Gesamtkonzentrationen der Hundeseren in einem Bereich von 4,5 bis 9,1 µg/ml und bestätigten die Ergebnisse früherer Studien (BAKER et al. 1986, WILSON et al. 1987). Die Vitamin-A-Konzentrationen dieser Hunde lagen 10 bis 50fach höher im Vergleich zu anderen Spezies (SCHWEIGERT et al. 1990). Zurückzuführen waren diese Gehalte vor allem auf einen hohen Anteil der Retinylester mit ca. 88% (Tab.4.3). Über dieses Phänomen berichteten erstmals CLAUSEN et al. (1942). Übereinstimmend mit den Ergebnissen früherer Studien war in der eigenen Untersuchungsgruppe Retinylstearat die dominierende Fraktion (SCHWEIGERT 1988, SCHWEIGERT et al. 1991, RIBAYA-MERCADO et al. 1994). Eine andere Verteilung stellten WILSON et al. (1987) und RAILA et al. (2000) für den Hund fest. WILSON et al. (1987) fanden Retinylpalmitat als dominierenden Vitamin-A-Ester, während in der Studie von RAILA et al. (2000) Retinylpalmitat und -stearat zu gleichen Teilen vorkamen. Wie in Tab. 4.3 erkennbar, variierten die Gehalte der Retinylester zwischen den einzelnen Hunden stark, was als physiologisches Phänomen in früheren Untersuchungen angesprochen wurde (SCHWEIGERT et al. 1998). In einem Fütterungsversuch konnte gezeigt werden, dass sowohl die Futterart als auch der Vitamin-A-Gehalt einen Einfluss auf die Blutwerte der Retinylester haben (SCHWEIGERT et al. 1990). Während die Konzentration der Retinylester dosisabhängig auf die Vitamin-A-Zufuhr reagierte, war Retinol diesem Einfluss nicht unterzogen. Ferner beeinflusste das Alter adulter Tiere nicht den Vitamin-A-Status (SCHWEIGERT et al. 1998). Die in die eigene Studie eingegangenen Hunde waren adult, so dass der Altersaspekt unberücksichtigt bleiben konnte.

Soweit bekannt liegen keine Ergebnisse über mögliche Veränderungen des Vitamin-A-Status von Hunden mit Nephropathien vor. Erstmals konnte durch die Untersuchungen des Vitamin-A-Status bei nierenkranken Hunden ein erhöhter Serumretinolgehalt dokumentiert werden. Dagegen waren keine deutlichen Unterschiede der Retinylesterkonzentrationen im Serum zwischen gesunden und niereninsuffizienten Hunden feststellbar, da die Retinylestergehalte beider Gruppen von großen

individuellen Schwankungen gekennzeichnet waren. Innerhalb der Fraktionen waren die Retinylester zugunsten von Retinylpalmitat und -oleat verlagert. Insgesamt blieb jedoch Retinylstearat die dominierende Fraktion. Die nur geringfügigen Unterschiede innerhalb der Vitamin-A-Ester können als ein möglicher Einfluss der Fütterung angesehen werden. Ähnlich zum Menschen mit einer chronischen Niereninsuffizienz fiel bei den erkrankten Hunden eine Hyperretinolämie auf (SCHÖNE et al. 1984). Nach Induktion einer akuten Niereninsuffizienz hatten Ratten im Tierversuch einen erhöhten Retinolgehalt im Serum (GERLACH und ZILE 1990). Der Anstieg des Serumretinols wird im Zusammenhang mit einem gleichzeitigen RBP-Anstieg beobachtet (ADONCECCHI et al. 1984). Diese Beobachtung konnte bei den erkrankten Hunden nicht bestätigt werden (siehe 5.1.3). Ein Anstieg der Retinylester wie beim Hund konnte beim Menschen nur vereinzelt festgestellt werden (WILSON et al. 1985). Die Retinylestererhöhung beim Menschen wird auf eine Störung des Metabolismus der Chylomikronen-Remnants zurückgeführt (WILSON et al. 1985). Untersuchungen über eine mögliche Abnahme der Vitamin-A-Speicher in der Leber, wie sie beim Menschen beschrieben werden, wurden in der vorliegenden Studie nicht durchgeführt (DOYLE et al. 2000).

Bemerkenswert war die bei den nierenkranken Hunden vorkommende Hyperretinolämie mit einem gleichzeitig signifikant erhöhten renalen Verlust von Retinol. Durch die gesteigerte fraktionelle Clearance war Retinol mit über 65% die dominierende Fraktion im Harn (Tab. 4.4). Die niereninsuffizienten Hunde wiesen einen deutlichen Zusammenhang zwischen Serumkreatinin und der fraktionellen Clearance von Retinol auf. Übereinstimmend mit früheren Studien waren im Harn der Hunde auch fettlösliche Retinylester zu beobachten (RAILA et al. 2000, SCHWEIGERT et al. 2002). Unterschiede in der Verteilung der Retinylester zwischen gesunden und nierenkranken Hunden waren im Urin nicht feststellbar. 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, die im Serum anteilmäßig am stärksten vertretende Fraktion, kam im Harn kaum vor. Die Dominanz von Retinylpalmitat im Harn innerhalb der Retinylester wurde ebenfalls zuvor beobachtet (SCHWEIGERT et al. 1991, RAILA et al. 2000). Ein Zusammenhang zur alimentären Vitamin-A-Zufuhr konnte jedoch nicht hergestellt werden, da Aussagen zu renalen Exkretionsmechanismen von Vitamin A bisher uneinheitlich sind. Eine glomeruläre Filtration mit Übertritt von Vitamin A zusammen mit den Blutlipiden erscheint jedoch als nicht wahrscheinlich, da im Blutplasma Retinylstearat und im Harn dagegen Retinylpalmitat überwiegt. Glomerulär filtriertes RBP-Retinol könnte nach Rezeptorvermittelter Rückresorption in proximalen Tubuluszellen verestert und nach Kopplung an das spezifische Bindungsprotein in die Nierenkanälchen sezerniert werden. Ebenfalls ist ein transzellulärer Transport von Retinol oder Retinylestern aus dem Blutplasma, eine folgende Ver- bzw. Umesterung in den Tubuli und die anschließende Kopplung und Abgabe in den Harn denkbar.

### 5.1.3 Bedeutung von RBP und Megalin für die renale Clearance und Diagnostik bei niereninsuffizienten Hunden

Übereinstimmend mit früheren Untersuchungen von MUTO et al. (1973) und RAILA et al. (2000) konnte Retinol-Bindungsprotein (RBP) im Blutserum des gesamten Hundekollektivs der eigenen Studie nachgewiesen werden. Jedoch sind bislang quantitative Ergebnisse für den Hund nicht vorhanden. Ein Vergleich war nur mit Angaben für den Menschen möglich. Die Serum-RBP-Konzentration von Hunden dieser Studie lagen in einem Bereich von 2,0 bis über 5,0 mg/l und damit etwa 10fach niedriger als die Werte beim Menschen (BOSIN und MONJI 1987). Eine wie bei niereninsuffizienten Menschen beschriebene erhöhte Serum-RBP Konzentration konnte beim Hund nicht verifiziert werden (Tab. 4.5) (SMITH und GOODMAN 1976). Eine Molekülanalyse von RBP bei Nierenerkrankungen des Menschen hat gezeigt, dass es zu einer Akkumulation von verschiedenen RBP-Molekülen im Serum kommt, die bei normaler Funktion sezerniert werden (JACONI et al. 1995). Das RBP<sub>2</sub>, ein am C-terminalen Ende um zwei Aminosäuren verkürztes Molekül, ist bei Funktionsstörungen der Nieren in höheren Konzentrationen im Blut nachweisbar. Im Harn nierenkranker Probanden konnten insgesamt vier RBP-Isoformen isoliert werden (MINIC et al. 1997). Dabei handelte es sich um zwei apo-holo Paare, während das zweite Paar durch Desaminierung aus dem ersten entsteht. Bei apo-RBP handelt es sich um die Retinol-ungebundene Form dagegen ist holo-RBP mit Retinol gebunden. Der Ort des Prozesses ist nicht eindeutig lokalisiert, jedoch wird davon ausgegangen, dass die Reaktion in den erkrankten Tubuli stattfindet, da die RBP-Heterogenität nicht bei gesunden Individuen auftritt (MINIC et al. 1997). Das Erscheinen von Doppel- bzw. Dreifachbanden im Western-Blot wies auch bei den nierenkranken Hunden auf verschiedene RBP-Isoformen hin (Abb. 4.1).

Ergebnisse aus Tiermodellen ließen vermuten, dass die Nieren eine wichtige Rolle bei der

Rückkopplung zur Freisetzung von RBP aus der Leber übernehmen (GERLACH und ZILE 1991b). Ferner wurde der Anstieg des Serumretinols als Rückkopplung auf die erhöhte RBP- Konzentration im Blut gesehen (STEWART und FLEMING 1982). Bei den nierenkranken Hunden dieser Studie kam es dagegen zu einer von RBP unabhängigen Retinolerhöhung. Bei gesunden Menschen ist das molare Verhältnis von Retinol zu RBP nahezu 1 (VAHLQUIST et al. 1979) und steigt bei Nierenkranken auf bis zu 1:3. Der Grund ist eine Störung der renalen Clearance von holo-RBP, die RBP deutlicher als Retinol ansteigen lässt (JACONI et al. 1995). Dieser Mechanismus wurde auch bei Ratten mit experimentell herbeigeführter akuter Niereninsuffizienz beobachtet (GERLACH und ZILE 1990). Als Ursache für den Anstieg von RBP und Retinol wurde die gestörte glomeruläre Filtration von retinolfreiem RBP (apo-RBP) und der reduzierten Degradation im proximalen Tubulus gesehen. Apo-RBP scheint einen positiven Feedback-Mechanismus auf das periphere Gewebe für die Freisetzung von holo-RBP aus der Leber zu haben (GERLACH und ZILE 1991a). Schon beim den gesunden Hunden dieser Studie lag das Retinol/RBP-Verhältnis durchschnittlich mit 1:0,1 deutlich darüber. Das Retinol/RBP-Verhältnis der niereninsuffizienten Hunde war gegenüber den gesunden Tieren noch weiter erhöht (Tab. 4.5). Im Gegensatz zum Menschen stieg RBP jedoch nicht an. Folglich scheint ein größerer Anteil von Retinol nicht an RBP gebunden zu sein. Wahrscheinlich ist hier die unspezifische Bindung von Retinol an Lipoproteine.

Entsprechend zum Menschen konnte im Harn der gesunden Hunde RBP nicht nachgewiesen werden, was bereits von RAILA et al. (2000) gezeigt wurde. Dagegen schieden die niereninsuffizienten Hunde RBP über ihren Harn aus. POULIK et al. (1975) zeigten, dass RBP im Harn von Hunden nach Nierentransplantation erscheint. Der Nachweis von RBP neben anderen niedermolekularen Proteinen im Harn dient beim Menschen als Marker einer tubulären Proteinurie (SCARPIONI et al. 1976, TOPPING et al. 1986, TOMLINSON et al. 1997). Für den Hund konnte eine hohe Sensitivität für RBP als Marker bei Azotämie und Proteinurie durch die eigenen Untersuchungen ermittelt werden. Beim Menschen spielt die Ausscheidung von RBP eine wichtige Rolle zur Früherkennung von Nierenfunktionsstörungen bei Risikopatienten mit Diabetes mellitus oder Herz-Kreislaufstörungen (GUY et al. 1997). Selbst bei den azotämischen Hunden mit einem upc-Verhältnis knapp unter 1 konnte RBP im Harn nachgewiesen werden. Somit zeigte das Erscheinen von RBP im Harn bei diesen Tieren eine Störung der proximalen Tubuli an bevor es zur einer diagnostisch relevanten Proteinurie kam. Mit Hilfe der immunhistologischen Untersuchungen konnte die hohe Spezifität von RBP als Marker einer Schädigung des proximalen Tubulusabschnitts nachgewiesen werden. Durch die erstmalig durchgeführten quantitativen RBP-Bestimmungen wurde ein Zusammenhang zwischen Serumkreatinin und der fraktionellen Ausscheidung von RBP festgestellt. Offen bleibt, inwieweit RBP gegenüber Kreatinin sensitiver auf eine Nierenschädigung, insbesondere eine tubuläre Schädigung reagiert. Dazu ist ein Screening von noch nicht azotämischen Tieren notwendig.

Im Vergleich zum Menschen lag ein höherer Anteil an Transthyretin-ungebundenem RBP im Blutplasma von gesunden Hunden vor (MUTO et al. 1973). Untersuchungen bei nierenkranken Menschen konnten zeigen, dass der Anteil an TTR-ungebundenem RBP im Krankheitsfall ansteigt (SCARPIONI et al. 1976). Dieser Anteil wird aufgrund der geringeren Molmasse (21 kDa) glomerulär frei filtriert und kann bei eingeschränkter Rückresorption ein Erscheinen von Retinol und RBP im Harn erklären. Neuere Untersuchungen begründen das Auftreten von RBP im Harn durch die Funktionseinschränkung des Megalin-Rezeptors (CHRISTENSEN et al. 1999). Versuche an Megalin-Knockout Mäusen haben hohe renale Verluste sowohl von RBP als auch von Retinol festgestellt (LEHESTE et al. 1999). Desweiteren stehen infolge der Akut-Phase-Antwort gebildete Zytokine in Verdacht, eine Störung des Megalin-Rezeptors zu verursachen (STEPHENSEN et al. 1994, KANALAS und HOPFER 1997). Wie in der Studie von NYKJAER et al. (1999) beschrieben, bestätigten die eigenen immunhistologischen Untersuchungen das Vorhandensein des Megalin-Rezeptors beim Hund (Abb. 4.6, 4.11, 4.15 und 4.21). Der Rezeptor war apikal der proximalen Tubuluszellen lokalisiert. Ferner schien eine Störung der Megalin-Rezeptoren und eine Einschränkung der RBP-Rückresorption im gegenseitigen Einfluss zu stehen. Im Unterschied zu gesunden Hunden schien im Harn der nierenkranken Tiere Retinol nicht ausschließlich an THP gebunden zu sein, sondern gleichzeitig auch an RBP. Diese Hypothese stützt sich auf die Beobachtung einer positiven Korrelation von RBP und Retinol im Harn der erkrankten Hunde.

#### 5.1.4 Ausscheidung von THP bei Hunden mit Niereninsuffizienz

Erste Untersuchungen haben gezeigt, dass das Trägerprotein für Vitamin A im Harn von Hunden ähnliche Eigenschaften wie ein Lipoprotein des Blutplasmas besitzt (SCHWEIGERT et al. 1991). 1999 gelang es RAILA, das Trägerprotein zu isolieren und als Tamm-Horsfall Protein zu identifizieren. Die Synthese des THP findet in den Epithelien der dicken aufsteigenden Abschnitten der Henlesche

Schleife und des distalen Tubulus statt und wird physiologisch in den Harn sezerniert (BACHMANN et al. 1990, RAILA et al. 2003). Übereinstimmend mit den genannten Studien konnte der Syntheseort von THP durch die immunhistologische Färbung der untersuchten Nieren bestätigt werden (Abb. 4.7, 4.8, 4.12, 4.17 und 4.22). Unter physiologischen Bedingungen wurde beim Hund eine THP-Konzentration von 193 bis 301 µg/l im Harn gemessen (Tab. 4.6). Bezogen auf den Wert Kreatinin beträgt die Konzentration von THP etwa 1‰ des Gesamtproteins im Harn. Im Vergleich zum Menschen mit einer durchschnittlichen Menge von 50 – 100 mg/Tag bzw. 1,7 – 2,1 mg THP pro mmol Kreatinin oder 40 µg pro mg Kreatinin lag die sezernierte Menge an THP beim gesunden Hund mit ca. 8,4 µg pro mmol Kreatinin nahezu 250 bis 400fach darunter (LYNN et al. 1982, BADE et al. 1996, GLAUSER et al. 2000). Selbst die THP-Konzentration im Harn von klinisch gesunden Katzen liegt mit  $49,2 \pm 35,5$  mg/l deutlich höher (RHODES et al. 1992).

Bei der Mehrzahl der niereninsuffizienten Hunde konnte THP im Harn nicht mehr detektiert werden (Tab. 4.6). Ferner konnte ein Zusammenhang zwischen Serumkreatinin und der ausgeschiedenen THP-Konzentration hergeleitet werden. Ähnliche Auswirkungen einer Nephropathie auf die THP-Exkretion wurde beim Menschen beobachtet (THORNLEY et al. 1985). Verschiedene Autoren stellten übereinstimmend fest, dass bei einer chronischen Niereninsuffizienz die Exkretion deutlich verringert war (SAMUELL 1979, DAWNAY und CATTELL 1981, LYNN 1982). Die Korrelation zwischen der THP-Ausscheidung und der Kreatininclearance war hoch signifikant (LYNN und MARSHALL 1984). Jedoch war die mittlere Exkretion pro funktionstüchtigem Nephron nicht verändert (GRANT et al. 1973). Aufgrund dieser Erkenntnis nehmen die genannten Autoren an, dass die Hypothese der "intakten Nephrone" zu trifft (BRICKER et al. 1960, GRANT et al. 1973). Beim Hund ist darüber hinaus die besondere Rolle des THP als Trägerprotein von Retinol und Retinylestern im Harn zu berücksichtigen (SCHWEIGERT et al. 2002). Unklar blieb der Mechanismus der Retinylester-Ausscheidung, wenn es zu einer eingeschränkten THP-Sezernierung bei den nierenkranken Hunden kam. Bei der Mehrzahl der niereninsuffizienten Hunde konnte zwar THP nur noch in Spuren gemessen werden, jedoch waren keine Unterschiede bei der renalen Clearance der Retinylester festzustellen. Scheinbar limitierte THP nicht die Ausscheidung von Retinol oder Retinylestern.

Unabhängig von den eigenen quantitativen THP-Bestimmungen fiel bei den immunhistologischen Untersuchung der Nieren ebenfalls eine herabgesetzte THP-Synthese auf (Abschnitt 4.1.4). Nur noch einzelne distale Tubuli zeigten ein normales Bild mit diffus intrazytoplasmatisch und apikal verstärkter Reaktion, wie es bereits beschrieben wurde (RAILA et al. 2003). Verschiedene Studien konnten demonstrieren, dass THP nicht nur intrazellulär in den distalen Tubuluszellen, sondern im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen auch extrazellulär im Interstitium lokalisiert ist (FASTH et al. 1986, THOMAS et al. 1993b, TORFFVIT et al. 1998). In den Abb. 4.8 und 4.16 war extrazellulär lokalisiertes THP sowie eine lymphoplasmazelluläre Infiltration bei zwei niereninsuffizienten Hunden zu erkennen. Für THP wurde eine Ligandenwirkung für Zytokine wie Interleukin-1, Interleukin-2 und Tumor Nekrosefaktor beschrieben (HESSION et al. 1987). Die chronische immunassoziierte Aktivierung einer mononukleären Phagozytose durch THP wird als Voranschreiten des Gewebsuntergangs mit Fibrose interpretiert (THOMAS et al. 1993a), das in dem folgenden Flussdiagramm schematisch dargestellt ist (Abb. 5.1). Schlussfolgernd war THP ein sensitiver Marker für eine Schädigung der distalen Tubulusabschnitte beim Hund.

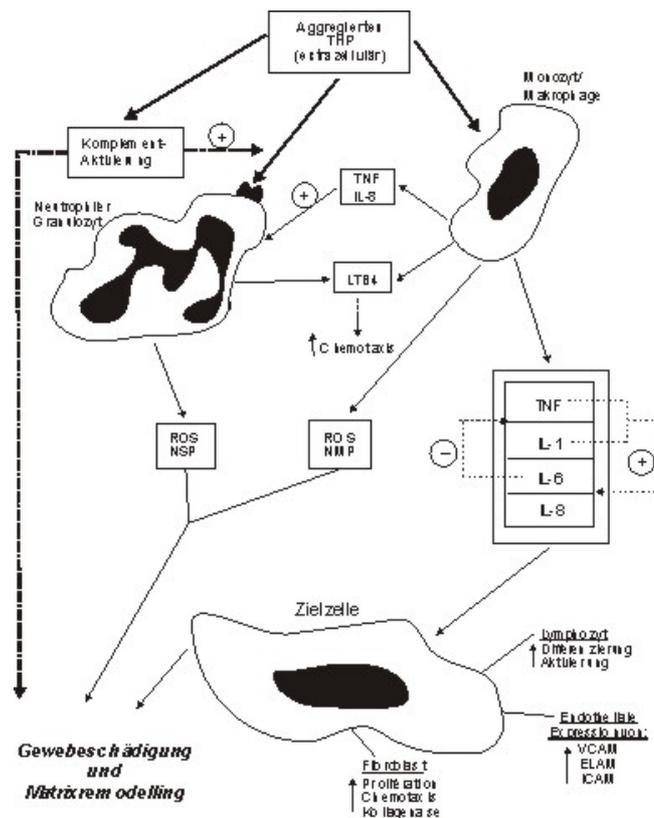


Abb. 5.1: Flussdiagramm zur Darstellung des potentiellen Mechanismus einer THP-induzierten tubulointerstiellen Entzündung (modifiziert nach THOMAS et al. 1993a). ROS = reaktive Sauerstoffverbindungen; NSP = neutrale Serinproteinasen; NMP = neutrale Metalloproteinasen; LTB4 = Leukotrien B4; VCAM = vaskuläre Zelladhäsionsmoleküle; ELAM = endotheliale Leukozytenadhäsionsmoleküle; ICAM = interzelluläre Adhäsionsmoleküle.

### 5.1.5 Bedeutung spezifischer Harnproteine für die Diagnosestellung von Nierenerkrankungen

Die Proteinausscheidung wird insbesondere von der Gesamtmenge des Urins beeinflusst: Je geringer die Urinmenge ist, um so höher ist scheinbar die Proteinmenge, und je größer die Urinmenge ist, um so scheinbar geringer ist der Proteingehalt. Sinnvoller ist die Beurteilung der Proteinurie durch eine Bezugsgröße, dem Urin-Protein/Kreatinin-Quotienten (upc). Wie verschiedene Studien gezeigt haben, gelang es wegen Überschneidungen jedoch nicht, mit dem upc-Quotienten bei mittleren bis kleinen Werten eine Glomerulopathie von einer interstitiellen Nephropathie zu differenzieren (GRAUER et al. 1985, BIEWENGA und GRUYS 1986b, HÖRAUF et al. 1990). Qualitative Harnproteinanalysen, bei denen die Proteine mittels SDS-PAGE in ca. 30 Fraktionen unterschiedlicher Molekülgröße aufgeschlüsselt werden, sind hinsichtlich einer Klassifizierung deutlich überlegen (HARVEY und HOE 1966, MÜLLER-PEDDINGHAUS und TRAUTWEIN 1978, HÖRAUF et al. 1989). Die Proteinurie der untersuchten niereninsuffizienten Hunde konnten durch die SDS-PAGE in ein Muster mit glomerulärer, tubulärer sowie einer Kombination beider Formen eingeteilt werden (Abschnitt 4.1.2.4). Die Berechnung des upc-Verhältnis zeigte übereinstimmend mit der Literatur die eingeschränkte Anwendbarkeit zur Abgrenzung. So hatten unsere Hunde mit einer glomerulär und selektiv tubulären Proteinurie einen kleineren Wert gegenüber Tieren mit einer komplett tubulären Proteinurie (vergl. Tab 4.9). Schwierigkeiten einer eindeutigen Abgrenzung zur physiologischen Proteinurie traten dann auf, wenn sich die Muster der Gelelektrophorese kaum voneinander unterschieden. Dort bot der Nachweis charakteristischer Proteine Abhilfe. Der immunologische Nachweis einer Kombination verschiedener Harnproteine mittels Western-Blot zeigte erstmals die Möglichkeit, eine Klassifizierung der Proteinurie vorzunehmen. Die nachgewiesenen Harnproteine waren entweder wegen ihrer Molekülgröße (z.B. IgG oder Transferrin), wegen ihrer Ligandenfunktion (DBP, RBP) oder wegen des Expressionsorts (THP) für einen Abschnitt des Nephrons spezifisch, d.h. ihr Erscheinen bzw. Fehlen lieferte den

Hinweis, welche Abschnitte betroffen waren (Tab. 4.7). Einzelne Harnproteine wie z.B. IgG, Albumin oder Transferrin sind beim Hund bereits zum Einsatz gekommen (MEYER-LINDENBERG et al. 1997). Transferrin, das als intermediäres Protein in Spuren auch bei gesunden Tieren im Harn erscheint (MÜLLER-PEDDINGHAUS und TRAUTWEIN 1977a), wird in deutlichen Konzentrationen ausgeschieden, wenn eine moderate Schädigung der glomerulären Basalmembran vorliegt. Diese Störung äußert sich in der Größen- und Ladungsdurchlässigkeit bestimmter Proteine (JOACHIM et al. 1964). In diesem Fall spricht man von einer selektiven glomerulären Proteinurie. Das Vorliegen von schweren glomerulären Schäden begleitet durch einen vollständigen Verlust der selektiven Basalmembrandurchlässigkeit führt zu einer unselektiven Makroproteinurie mit IgG, IgM,  $\alpha$ 2-Makroglobulin, Haptoglobulin, Transferrin und meist auch niedermolekularen Proteinen (WEBER et al. 1986). Das Vorliegen einer Makroproteinurie wird sowohl beim Menschen (BOESKEN 1985a) als auch beim Hund (MÜLLER-PEDDINGHAUS und TRAUTWEIN 1977a, LEOPOLD-TEMLER und NOLTE 1995) als diagnostisches Kriterium von pathologischen Veränderungen an den Glomerula herangezogen. In den eigenen Untersuchungen korrelierten derartige histologische Veränderungen bei den zwei Hunden mit einer glomerulären Proteinurie. Zur Diagnostik tubulärer oder interstitieller Nierenerkrankungen wird beim Menschen und beim Hund die Ausscheidung von niedermolekularen Proteinen herangezogen (BOESKEN und MAMIER 1985, VOLPERT et al. 1989). Ihre Bedeutung ist für die Früherkennung von Nierenschäden beim Menschen in den letzten 10 Jahren in den Vordergrund gerückt. Bei den niereninsuffizienten Hunden dieser Studie wurde eine tubuläre Proteinurie häufiger beobachtet als eine glomeruläre. Eine selektive tubuläre Proteinurie steht in Verbindung mit einer Störung der Porendurchlässigkeit und wird selten bei länger bestehenden Nierenproblemen beobachtet. Entsprechend der vorangestellten Hypothese zeigten nur Hunde mit einem komplett tubulären Proteinmuster eine höhere fraktionelle Clearance von RBP und Retinol. Als Ursache kommt die Schädigung der proximalen Tubuli in Frage. Die tubuläre Proteinurie wird in neueren Humanstudien für das Fortschreiten der Erkrankung verantwortlich gemacht. Bei einer erhöhten transglomerulären Passage der Proteine wird der reabsorptive Mechanismus der Tubuluszellen verstärkt beansprucht. Die Schädigung dieser Zellen und darüber hinaus des Interstitiums korreliert mit Schwere und Dauer der Proteinurie (D'AMICO und BAZZI 2003). Als Folge der Proteinurie wird die gesteigerte Syntheserate von verschiedenen, sich gegenseitig beeinflussenden vasoaktiven und proinflammatorischen Substanzen wie Endothelin-1 oder Monozyten-Chemoattractant Protein-1 (MCP1) gesehen (ABBATE et al. 1998). Die Freisetzung dieser Substanzen führt zu einer Migration von Makrophagen und T-Lymphozyten in das renale Interstitium, das ebenfalls in den histologischen Nierenpräparaten zweier Hunde zu beobachten war. Dort bewirken sie ihrerseits die Bildung extrazellulärer Matrix und eine Fibrose. Interstitielle Makrophagen sind die Quelle für verschiedene fibrosefördernde Wachstumsfaktoren und Zytokine wie NF- $\kappa$ B, TGF- $\beta$ , TNF und IL1/2/6. Aus der Erkenntnis der pathophysiologischen Abläufe ist das Ziel der therapeutischen Behandlung von Nierenkranken, eine Reduktion der Proteinurie zu erreichen. Die Gabe von ACE-Hemmern und Angiotensin II Typ 1 Rezeptorantagonisten erzielten die Wirkung. Dabei spielt die antihypertensive Wirkung der Medikamente eine untergeordnete Rolle (PRAGA und MORALES 2002).

Die neue Technik der SELDI-TOF Massenspektrometrie (MS) wurde in der vorliegenden Studie erstmals zur Untersuchung von Harnproteinen bei Hunden angewandt. Durch die Wahl der Chipoberfläche und den Waschbedingungen konnten die Proteine aufgrund ihrer Molekulareigenschaften vorselektiert werden. Ferner lieferte die Auswertung der SELDI-Spektren sehr genaue Molmassen, was zu einer Auftrennung von bis zu 250 verschiedenen Proteinen je Harnprobe führte. Die Stärke dieser Methode liegt in der Bestimmung niedermolekularer Proteine und sogar Peptiden, was in den eigenen Untersuchung und weiteren Studien demonstriert werden konnte (WRIGHT et al. 2000, HAMPEL et al. 2001, VLAHOU et al. 2001). Mit Hilfe einer gerätespezifischen Software können Unterschiede zwischen Gruppen nicht nur in Zahlen, sondern auch graphisch dargestellt werden. Vergleichbar mit der Methode der SELDI-TOF MS ist die bislang überwiegend in der Humanmedizin angewandte 2D-Gelelektrophorese. Sie trennt durch die Wahl des pH-Gradienten die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt auf. In einem zweiten Schritt folgt die Auftrennung nach ihrer molaren Masse. Nachteil der 2D-Gelelektrophorese gegenüber der SELDI-TOF MS ist der höhere Probeneinsatz, die deutlich längere Versuchszeit, die Beschränkung auf Proteine mit einer Molekülgröße über 15 kDa und die häufig schwierige Auswertung der Gele durch Überlagerung der Banden. Insgesamt erwies sich die Methode der SELDI-TOF MS als ein präzises, reproduzierbares und hochempfindliches Instrument zur Analyse von Harnproteinen bei Hunden. Ferner zeigte ihre Anwendung in den eigenen Untersuchungen, dass sechs verschiedene Proteine mit einer signifikant höheren Intensität bei den nierenkranken Hunden vorkamen. Einschränkend war jedoch die

Heterogenität der Spektren anzumerken, die zu großen Standardabweichungen der gemessenen Intensitäten führte. Diese Beobachtungen werden auch bei der Bestimmung der Peptid- bzw. Proteinzusammensetzung von humanem Harn gemacht. Die Methode der SELDI-TOF MS bietet jedoch als eine „High throughput“-Technik die Möglichkeit, eine große Anzahl von Proben zu screenen, um trotz bestehender physiologischer Heterogenität spezifische Peptide oder Proteine zwischen den Gruppen zu identifizieren. Die Unterschiede der Proteinurie bei Nierenerkrankungen können das Ergebnis einer Überexpression und/oder einer abnormalen Ausscheidung von Proteinen sein. Sie können auch als Konsequenz der zugrundeliegenden Erkrankung modifiziert sein, d.h. glykosiliert, phosphoryliert oder ähnliches sowie durch abnormale Aktivierung des proteolytischen Degradierungswegs abgespalten sein. Diese Art einer Veränderung könnte das Auftreten eines Proteins mit einer Molmasse von 27,85 kDa im Harn der gesunden Hunde und mit 27,47 kDa bei den nierenkranken Hunden erklären. Außerdem war dieses Protein (M 27,47 kDa) bei den nierenkranken Hunden und auch bei einigen Hunden mit Urolithiasis signifikant reduziert. Noch deutlicher wurde die Anwendung einer mathematischen Transformation. Das Verhältnis von dem 27,47 kDa Protein zu Albumin (M 65,69 kDa) lag bei der Patientengruppe ca. 10fach unter dem der Kontrollhunde. Die Identifizierung des Proteins und die Lokalisation seines Expressionsortes könnten einen neuen Marker für das Vorliegen einer Funktionsstörung der Nieren offenbaren. Aufgrund der immunologischen Detektion von RBP bei 21 kDa wurde vermutet, dass es sich beim dem Peak mit einer Molmasse von 20,95 kDa um RBP handelt. Verglichen mit anderen Ergebnissen könnte der signifikante Peak bei 11,58 kDa  $\beta$ 2-Mikroglobulin sein, das ebenfalls bei Nephritiden im Harn erscheint (NEDELKOV und NELSON 2001) und als Marker Anwendung findet. Weitere Studien sind notwendig, um die charakterisierten Proteine aufzureinigen und zu identifizieren.

## 5.2 Urolithiasis

Die in einem 2<sup>1/2</sup>jährigen Zeitraum vorgestellten Hunde dieser Studie litten ausschließlich an Blasen- oder Harnröhrensteinen. Die Dominanz dieser Lokalisationen wird ebenfalls in der veterinärmedizinischen Literatur erwähnt, wobei dort die Blasensteine mit ca. 61% gegenüber den Harnröhrensteinen mit ca. 34% überwiegen (LING und RUDBY 1986). Die höhere Inzidenz eigener Patienten mit Harnröhrensteinen mag sicherlich am Auftreten von akuten Symptomen wie der Anurie bzw. Dysurie liegen, so dass diese Hunde als Notfall in der Klinik und Poliklinik für kleine Haustiere vorgestellt wurden. Bei Patienten mit Blasensteinen verläuft das klinische Bild überwiegend mild bzw. chronisch, so dass häufig die Behandlung durch den Haustierarzt erfolgt.

Wie auch in der genannten Studie von LING und RUDBY (1986) war das männliche Geschlecht in den eigenen Untersuchungen deutlich häufiger betroffen. Die sieben weiblichen Tiere waren an Struvituroolithiasis in Begleitung einer bakteriellen Cystitis erkrankt. Struvite sind die einzigen Harnsteine, bei denen vorwiegend weibliche Hunde betroffen sind (LING et al. 1998a). Durchschnittlich erkranken Rüden zweimal häufiger an Harnsteinen. Wie in epidemiologischen Studien beschrieben, tritt Urolithiasis in allen Altersgruppen auf (HESSE 1990, LING et al. 1998b). Der jüngste Hund unserer Studie war 1,5 Jahre und der älteste knapp 13 Jahre alt. Insgesamt steigt die Erkrankungshäufigkeit bis zu einem Alter von ca. 6 Jahren deutlich an und bildet entsprechend bekannter Studien ein breites Maximum bis zum 8. Lebensjahr (HESSE 1990).

Bezüglich der Rassen war eine breite Verteilung des untersuchten Hundekollektivs zu erkennen. Unter den 25 Harnsteinpatienten waren 13 verschiedene Rassen vertreten, wobei der Yorkshire Terrier, Shih Tzu, Dackel und Dalmatiner mehr als einmal vorkam. Die über einen Zeitraum von 12 Jahren durchgeführten epidemiologischen Studien zeigen, dass nahezu alle Hunderassen Harnsteine bilden (HESSE et al. 1997). Entsprechend der allgemeinen Häufigkeit der Hundepopulation bilden Teckel die meisten Urolithe, wie auch andere kleine Rassen wie Pudel, Terrier, Schnauzer und Pekinese bevorzugt zur Steinbildung neigen. Inwieweit genetische Ursachen für die Bildung von Harnsteinen verantwortlich sind, lässt sich sicher nur bei den Dalmatinern bzw. bei den Rassen mit Cystinsteinbildung beweisen (BARTGES et al. 1999).

Zwei Drittel der analysierten Steine bestanden aus einer Substanz (monomineralisch), die restlichen enthielten zwei oder auch mehrere Substanzen, wobei ein Bestandteil dominierte. Die Auswertung wurde daher nach den Hauptbestandteilen vorgenommen. Die bei den 25 Hunden analysierten Arten Struvit, CaOx, Urat und Cystin sind die am häufigsten vorkommenden Urolithe bei Hunden (HESSE et al. 1997, WENKEL et al. 1998, OSBORNE et al. 1999b). Struvit wurde mit 44% wie bei anderen Untersuchern als häufigste Steinart gefunden (BOVEE und MCGUIRE 1984, OSBORNE et al. 1986a). Unter den vier Arten kam Cystin in dieser Studie am seltensten vor und wird auch von den genannten Autoren mit nur 2 – 3% angegeben. Übereinstimmend mit epidemiologischen Auswertungen aus den USA und Europa, bei denen calciumhaltige Harnsteine beim Hund in ihrer Anzahl über die letzten 2 Jahrzehnte angestiegen sind, hatten 32% der 25 Hunde CaOx-Steine (HESSE et al. 1997, WENKEL et al. 1998, OSBORNE et al. 1999b). Auffallend war das Auftreten von CaOx-Steinen besonders bei den kleinen Rassen. Außerdem handelte es sich mit einer Ausnahme um sterile Harnsteine. Dass die Dalmatiner unserer Studie ausschließlich Uratsteine bildeten, spricht für eine genetische Ursache (BARTGES et al. 1999, OSBORNE et al. 1999c). Bei den analysierten Struvitsteinen handelte es sich mit 90% um bakteriell bedingte Harnsteine, während eine bakterielle Cystitis bei den anderen Harnsteinarten selten auftrat. Dieser Zusammenhang wird in zahlreichen Studien beschrieben (KLAUSNER und OSBORNE 1980, OSBORNE et al. 1986b, GRIFFITH und OSBORNE 1987). Die genannten Autoren erwähnen, dass etwa 70% der an Struvituroolithiasis erkrankten Hunde gleichzeitig eine Harnwegsinfektion mit ureasebildenden Bakterien wie *Staphylokokken* und *Proteus spp.* aufweisen. Die Hydrolyse von Harnstoff durch das Enzym Urease führt letztlich zur Bildung von Ammoniak und Carbonat. Dies sind ideale Bedingungen für die Bildung von Struvitsteinen und fördert darüber hinaus die Entstehung einiger anderer Harnsteintypen wie Calciumcarbonat- und Apatitsteine.

### 5.2.1 Klinische Parameter

Übereinstimmend mit Berichten über Hunde mit Urolithiasis konnten die Bestimmungen spezifischer Serumparameter keine Hinweise für die Ursache der Harnsteine geben. So hatten sämtliche Hunde mit CaOx-Steinen eine Normokalzämie bzw. die Hunde mit Struvitsteinen eine Normomagnesämie. Im umgekehrten Fall könnte die erhöhte Konzentration im Serum eine vermehrte Ausscheidung der Elektrolyte über den Harn bewirken und damit eine Bildung der entsprechenden Harnsteine fördern. Hunde mit CaOx-Urolithiasis zeigten eine verringerte Magnesium- und Gesamtproteinkonzentration im

Serum gegenüber den Kontrollhunden. Dies konnte jedoch das Auftreten von Harnsteinen nicht erklären (Tab. 4.11). Unterschiedliche Faktoren wie vor allem die alimentäre Versorgung oder eine Malabsorption im Magen-Darmtrakt können solche Unterschiede bewirken.

Dagegen waren im Harn deutlichere Unterschiede zwischen Harnsteinpatienten und Kontrolltieren feststellbar. Der Harn von Struvitpatienten hatte einen deutlichen höheren pH-Wert, sicherlich begründet durch die bereits erwähnte bakterielle Begleitinfektion. Seit einigen Jahren ist die Beeinflussung des Harn-pH-Wertes über eine Diät ein wichtiger Bestandteil der Therapie der Struvituroolithiasis (OSBORNE et al. 1989). Der Harn-pH-Wert ist bei der Struvitbildung ein sehr viel bedeutsamerer Faktor als der Magnesiumgehalt des Futters (OSBORNE et al. 1999a). Dies liegt daran, dass Veränderungen des Harn-pH-Wertes einen proportional viel größeren Effekt auf das Aktivitätsprodukt des Struvits haben als Konzentrationsänderungen einer oder mehrerer konkrementbildender Einzelkomponenten. Im Harn unserer Struvitpatienten waren keine höheren Konzentrationen einzelner Elektrolyte wie Magnesium oder Calcium festzustellen, das mit dem erwähnten Phänomen konform geht (Tab. 4.12). Die Proteinurie der Struvitpatienten könnte tubulär oder postrenal durch die Cystitis verursacht sein (Abb. 4.23).

CaOx-Steine entstehen bevorzugt im alkalischen Milieu, was sich bei den untersuchten Harnproben durch den höheren pH-Wert zeigte. Ferner war die deutliche Hyperkalziurie bei gleichzeitiger normaler Kalziämie der Hunde mit CaOx-Urolithen auffällig. Dieser Zusammenhang wird sowohl beim Menschen als auch Hund beobachtet (OSBORNE et al. 1986c, BORGHI et al. 1995, LLOYD et al. 1997). Eine Erklärung für das Auftreten einer Hyperkalziurie häufig in Verbindung mit Hyperoxalurie und Hyperuricosurie konnte bislang nicht gefunden werden. Beim Menschen wird deshalb von einer idiopathischen Hyperkalziurie bzw. CaOx-Urolithiasis gesprochen (BORGHI et al. 1995, SCHEINMAN et al. 2000). In Erwägung werden Mutationen des CICN5-Chlorid-Kanal-Gens gezogen. Dieses Phänomen wird bei Menschen beobachtet, die an einer Dent's Disease (X-linked Nephrolithiasis) erkranken (SCHEINMAN et al. 2000). Zusätzlich wird bei dieser Erkrankung häufig eine Proteinurie mit niedermolekularen Proteinen festgestellt. Die Hunde mit CaOx-Steinen zeigten den größten upc-Quotienten im Vergleich zu den anderen Steinpatienten. Eine Proteinurie bedingt durch die mechanische Irritation des Blasenepithels oder auch eine Schädigung der Tubuli durch Rückstau des Harns aufgrund der vor allem bei den CaOx-Steinpatienten vorkommenden Harnröhrenobstruktion war ebenfalls ursächlich in Erwägung zu ziehen.

### 5.2.2 Einfluss von Vitamin A auf die Lithogenese

Der Harn von Vitamin-A-defizienten Ratten hat einen signifikant niedrigeren Gehalt an Glykosaminoglykanen, Citrat, Pyrrophosphat, Phytat, welche als Inhibitoren der Lithogenese diskutiert werden (BICHLER et al. 1982, FELSTRÖM et al. 1985). Vitamin A ist an der Synthese von Glykoproteinen und Proteinoglykanen beteiligt (GRASES et al. 1998). Ihre Wirkung liegt in der Inhibition der Kristallisation, sowie in der antiadherenten Funktion am Uroepithelium Kristalle zu inkrustieren (SEE und WILLIAMS 1992, GRASES et al. 1996). Außerdem wurden bei Ratten mit einer Vitamin-A-Defizienz histologisch Läsionen des Uroepithels beobachtet. Eine weitere Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen einer Vitamin-A-Defizienz und der reduzierten Ausscheidung von THP (BICHLER et al. 1983). Aus diesem Grund wird Vitamin A eine wichtige Funktion bei der Prävention von Urolithen zugesprochen. Bei der Betrachtung einzelner Aspekte sollte jedoch nicht außeracht gelassen werden, dass die Steinformation ein multifaktorielles Geschehen ist. Die Alteration des Uroepithels, das die Nierenpapillen überdeckt, ist ein Faktor unter vielen. Der Vitamin-A-Status wurde in dieser Studie zum ersten Mal bei der Urolithiasis des Hundes untersucht. Ein Vergleich mit gesunden Hunden zeigte erhöhte Retinolkonzentrationen im Serum, die besonders deutlich in der Gruppe der Struvit- und Uratsteine auftraten. Wie unter 5.1.2 bereits erwähnt, unterlag Retinol keinem alimentären Einfluss (SCHWEIGERT et al. 1990). Unterschiede in der Verteilung der Retinylester im Plasma konnten nicht festgestellt werden. Wie bei gesunden Tieren war vielmehr auch bei sämtlichen Hunden mit Harnsteinen Retinylstearat die dominierende Fraktion der Vitamin-A-Ester. Retinylpalmitat und Retinyloleat traten ähnlich zu den Ergebnissen der aufgeführten Autoren in niedrigeren Konzentrationen auf (SCHWEIGERT 1988, SCHWEIGERT et al. 1991, RIBAYAMERCADO et al. 1994). Aufgrund der erhobenen Daten schien der Einfluss eines Retinoldefizits auf die Bildung von Harnsteinen bei unseren 25 Hunden im Gegensatz zu den Laborratten eher unwahrscheinlich (GRASES et al. 1996). Warum es jedoch zu einer Hyperretinolämie kam und ob diesbezüglich ein Zusammenhang existierte, konnte mit der eigenen Studie nicht beantwortet werden, sondern bedarf folgender Untersuchungen.

Ein Unterschied der Vitamin-A-Ausscheidung konnte im Harn gesunder und bei Hunden mit

Urolithiasis nicht festgestellt werden. Zwar lag die mediane Retinolkonzentration der erkrankten Tiere über der Kontrollgruppe, jedoch war dieser Unterschied wegen der Variationsbreite der Werte nicht signifikant. Die Verteilung der Retinylester im Harn war vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Studien (RAILA et al. 2000, SCHWEIGERT und BOK 2000). Im Gegensatz zum Plasma war im Harn Retinylpalmitat mit über 50 bis sogar 90% die stärkste Fraktion, gefolgt von Retinyleoleat mit 4 – 8% (Tab. 4.14). Retinylstearat war nur in Spuren vorhanden. Die Ergebnisse zum Vitamin-A-Gehalt bei Hunden mit Harnsteinen ließen kein Zusammenhang zwischen Vitamin A und der Bildung von Harnsteinen erkennen. Dies steht im Gegensatz zu Versuchen an Labortieren, bei denen ein Defizit an Vitamin A einen fördernden Einfluss auf die Harnsteinbildung hatte (GRASES et al. 1998).

### 5.2.3 Bedeutung von RBP

Ähnlich zum Vitamin A sind bisher keine Daten über RBP bei Hunden mit Urolithiasis vorhanden. So konnte erstmals gezeigt werden, dass unabhängig von der Art der Harnsteine keine Unterschiede des Serum-RBP messbar waren. Stellte man jedoch den Retinolgehalt des Serums ins molare Verhältnis zum gemessenen RBP, wurde wie bei den niereninsuffizienten Hunden deutlich, dass der Anteil Retinol anstieg, der nicht an RBP gebunden vorliegt. Vermutlich wird wie bei den nierenkranken Hunden ein Teil des Serumretinols unspezifisch an Lipoproteine der VLDL/LDL-Reihe oder an Albumin gebunden. Retinol und Retinylester benötigen aufgrund ihres lipophilen Molekülcharakters in einem wässrigen Kompartiment wie Blut einen Lösungsvermittler. Nach hydrolytischer Spaltung der aus der Nahrung resorbierten Vitamin-A-Ester wird Retinol abhängig vom Vitamin-A-Status in den Leberparenchymzellen gespeichert oder als Retinol-RBP-Komplex (holo-RBP) in das Blutplasma zur Versorgung des peripheren Gewebes sezerniert (BLANER 1989, BLOMHOFF 1994a). Ergebnisse aus Tiermodellen an Nieren demonstrieren eine Rückkopplungsfunktion zur Freisetzung von RBP aus der Leber (GERLACH und ZILE 1991b). Nach Abgabe von Retinol an das periphere Zielgewebe und nach Rückresorption im proximalen Tubulusabschnitt der Niere reflektiert die apo-RBP-Konzentration den Retinolverbrauch. Für die Leber liefert sie ein Signal zur Ausschleusung des holo-RBP (GERLACH und ZILE 1990). Eine Erklärung für das Auftreten der Hyperretinolämie bei gleichzeitig unverändertem RBP-Gehalt sowohl bei den nierenkranken Hunden als auch bei den Hunden mit Urolithiasis lieferte diese Beobachtung nicht.

Den Ergebnissen von RAILA et al. (2000) entsprechend konnte RBP im Harn gesunder Hunde nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe des Western-Blots bzw. der ELISA-Methode konnte gezeigt werden, dass einzelne Hunde mit Urolithen RBP in Spuren über ihren Harn ausscheiden. Die Konzentrationen lag 20fach niedriger als bei niereninsuffizienten Hunden. Der Nachweis von RBP im Harn dient beim Menschen als Marker einer tubulären Schädigung (TOPPING et al. 1986, TOMLINSON et al. 1997). Das Auftreten des RBP könnte auch bei den untersuchten Hunden auf eine tubuläre Schädigung zurückzuführen sein. Überwiegend bei Hunden mit einer Harnröhrenobstruktion und einem temporären Harnrückstau wurde die RBP-Ausscheidung festgestellt. Ein Zusammenhang zwischen einem möglichen ursächlichen Defekt des Megalin-Rezeptors und einem Harnsteintyp konnte aus den Daten nicht erhoben werden.

### 5.2.4 Bedeutung von THP auf die Harnsteinbildung beim Hund

Es wird allgemein akzeptiert, dass die Steinbildung ein Kristallisationsprozess im übersättigten Harn ist. Übersättigung ist die treibende Kraft für die Bildung des Nidus und die anschließende Transformation in sichtbare Partikel während des Wachstums. Der sowohl beim Menschen als auch beim Kleintier gebräuchlichste Prädiktor für die Kristallbildung ist der Grad der Übersättigung. Er wird meist als relative Supersaturation (RSS) ausgedrückt. Der Wert stellt das Verhältnis zwischen dem Aktivitätsprodukt der steinbildenden Ionen im Urin und dem korrespondierendem Löslichkeitsprodukt in einer artifiziellen Lösung dar (BORGHI et al. 1995). Ein Wert über 1 bedeutet Übersättigung des Harns bezüglich des untersuchten Salzes. Die kürzlich von ROBERTSON et al. (2002) durchgeführten Messungen des Kristallisationspotentials beim gesunden Hund haben ergeben, dass der Urin bezüglich CaOx und Magnesiumammoniumphosphat übersättigt ist. Daraufhin stellt sich die Frage, warum es nicht häufiger zu einer Bildung von Steinen kommt. Scheinbar ist der Einfluss von Kristallisationsinhibitoren im Urin auch beim Hund von Bedeutung, obwohl nur wenige Studien beim Hund diesen Faktor untersuchen. Während niedermolekulare Inhibitoren wie Magnesium, Citrat oder andere Spurenmetalle auf ihre inhibitorische Wirkung beim Hund untersucht wurden, sind die Ergebnisse makromolekularer Inhibitoren wie THP, Glykosaminoglykane oder Nephrocalcin überwiegend aus vorhandenen Humanstudien übernommen worden.

Die eigenen Untersuchungen lieferten erstmals für den Hund Ergebnisse sowohl über die Quantität

von THP als auch über das Verhalten von THP im Harn bei Zugabe von Substanzen, die für Kristallisationsprozesse von Bedeutung sein können. Einzig bei Katzen, die wegen FLUTD (engl.: feline lower urinary tract disease) auffällig wurden, sind Studien zum Verhalten von THP vorgenommen worden. *In vitro* Versuche konnten zeigen, dass sich die Eigenschaften von THP der Katze durch Faktoren wie pH-Wert, Harnstoff sowie Salzkonzentrationen des Harns verändern (RHODES et al. 1993). THP zeigt eine höhere Neigung zur Polymerisierung sobald der pH-Wert oder die Salzkonzentration des Urins durch Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  erhöht ist. Eine Erhöhung der THP-Konzentration selbst führt zu einer schnelleren Präzipitation, die ebenfalls von BUFFINGTON et al. (1994) demonstriert werden konnte. Die Präzipitation von THP wird als erster Schritt in der Harnsteinformation angesehen (HALLSON und ROSE 1979). Ähnliche Einflussfaktoren auf die Selbstaggregation sind für den Menschen beschrieben (HESS 1994). In alkalischen Lösungen mit niedriger Osmolarität und niedrigen Calciumkonzentration agiert THP als starker Inhibitor gegenüber der Aggregation im Steinbildungsprozess. Dagegen fördern ein saures und konzentriertes Medium die Selbstaggregation von THP und gleichzeitig seine herabgesetzte inhibitorische Aktivität. Die eigenen Untersuchungen zur Polymerisation von THP unter dem Einfluss von Calcium lieferten vergleichbare Ergebnisse wie bei Katze und Mensch. So nahm die Konzentration an THP im Überstand mit der Zugabe von Calciumchlorid zum Ausgangsharn der untersuchten Hunde ab. Dabei lag eine deutliche Aggregationsneigung erst ab einer Konzentration von 0,1 M vor und stieg mit zunehmender Konzentration an (Abb. 4.29). HALLSON et al. (1997) konnten zeigen, dass diese Aggregationsneigung oder auch Polymerisation von THP durch die in den Neuraminsäureresten vorkommenden Carboxylgruppen beeinflusst wird. Sie sind für die Bindung zu Calcium verantwortlich. Die Gelbildung von THP setzt ein, wenn ca. 80% der negativ geladenen Carboxylgruppen durch die Ionenbindung zu  $\text{Ca}^{2+}$  neutralisiert sind und das tritt bei einer Konzentration von 5-6 nM freien  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen ein. Bei einem pH von 8 reichen bereits niedrige Konzentrationen an  $\text{Ca}^{2+}$  aus, damit es zu einer Gelbildung kommt (CLEAVE et al. 1972). Anders als beim Menschen dient THP als Trägerprotein für Vitamin-A-Derivate im Harn von Hunden. Diese von SCHWEIGERT et al. (1991) erstmals gezeigte und von RAILA (1999) bestätigte Besonderheit im Vitamin-A-Stoffwechsel bei Carnivoren scheint Einfluss auf die Polymerisation von THP zu haben. So ergaben die Ausfällungsversuche mit  $\text{CaCl}_2$  eine Abnahme der Retinylester nach Zugabe des Salzes, während eine Veränderung der Retinolkonzentration statistisch nicht messbar wurde. Aus den Ergebnissen konnte die Hypothese abgeleitet werden, dass bei Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  zunächst das mit Retinylester komplex gebundene holo-THP ausfällt, während das apo-THP erst bei weiterer Erhöhung der  $\text{CaCl}_2$ -Konzentration präzipitiert. Die Ergebnisse ließen vermuten, dass Retinylester die Aggregationsneigung von THP erhöhen. Welche Bedeutung dies für die alimentäre Versorgung von Hunden bei Urolithiasis haben kann, konnte aus den Ergebnissen nicht abgeleitet werden.

Neben dem Präzipitationsverhalten wurde in den eigenen Untersuchungen die quantitative Ausscheidung von THP bei den Hunden mit Urolithiasis gemessen. Unabhängig von der Art der Urolithe konnte eine deutlich erniedrigte Ausscheidung von THP bei sämtlichen Hunden unabhängig von der Harnsteinart festgestellt werden (Tab. 4.16). Dies stand im Gegensatz zu den erhöhten Werten bei Katzen mit FLUTD (RHODES et al. 1992). Eine erhöhte THP-Konzentration bei Katzen wird in Verbindung mit einem lokalen Abwehrmechanismus gegen virale, fungale oder auch bakterielle Harnwegsentzündungen gebracht. Als Folge wird die erhöhte Produktion von Mukoproteinen und inflammatorischen Agentien gesehen, die eine Ursache für die Bildung von matrix-crystallinen Urethraplugs der Katze sein kann (OSBORNE et al. 1992). Diese Rückschlüsse konnten nicht auf das eigene Patientengut übertragen werden, denn selbst Hunde mit einer bakteriellen Begleitinfektion der harnableitenden Organe zeigten eine signifikante THP-Reduktion gegenüber gesunden Tieren. Die in unserer Studie erhaltenen Ergebnisse entsprachen eher denen beim Menschen. Quantitative Studien zum humanen THP ergaben eine überwiegend herabgesetzte Sekretion (FUSELIER et al. 1995, ROMERO et al. 1997, GANTER et al. 1999, GLAUSER et al. 2000). Je nach Studie berichten die genannten Autoren von einer Reduktion der THP-Ausscheidung bei Steinpatienten von 16 – 68% gegenüber gesunden Individuen, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Harnsteinarten ergaben. Die verminderte THP-Ausscheidung der Hunde lag mit 85 – 94% deutlich darunter. Sie war wie beim Menschen nicht zwischen den Steinarten unterschiedlich.

Als weiteren Gesichtspunkt konnten GLAUSER et al. (2000) feststellen, dass nur bei gesunden Individuen eine vermehrte Calcium- und Oxalatausschleusung mit einer steigenden THP-Ausscheidung einhergeht. Der protektive Mechanismus schien bei Urolithiasispatienten zu fehlen. Jedoch konnten andere Autoren keine quantitativen Unterschiede zwischen gesunden und an Harnsteinen erkrankten Menschen messen (THORNLEY et al. 1985).

Die Ursache für eine veränderte THP-Ausscheidung ist bislang nicht sicher geklärt. In Frage kommen Defekte im Bereich der Nierentubuli wie sie beim Hund infolge einer Pyelonephritis oder interstitieller Nephritiden sowie angeborener Insuffizienzen entstehen können. Derartige Veränderungen können nachfolgend im distalen Tubulus zu Störungen der Azidifizierung führen. Das daraus entstehende Krankheitsbild der renalen tubulären Azidose ist gekennzeichnet durch das Unvermögen im Tubulussystem einen  $H^+$ -Ionen-Gradienten aufzubauen. Unter den zwei vorkommenden Formen der renalen tubulären Azidose ist die distale Form (RTA I) für die Steinbildung von Interesse (BICHLER et al. 1979). Neben der Azidifizierungsstörung treten eine höhere Calcium- und Phosphatausscheidung sowie eine verminderte Ausscheidung von Citrat, THP und Glykosaminoglykanen in Erscheinung (BICHLER et al. 1995). GANTER et al. (1999) berichten von einer niedrigeren THP-Ausscheidung und einer verringerten Citratkonzentration im Harn der Nephrolithiasispatienten und schließen auf eine tubuläre Dysfunktion des distalen Abschnitts. Auch in der Veterinärmedizin wird ein Zusammenhang zwischen einer renalen tubulären Azidose und der Entstehung von Urolithen gesehen (POLZIN et al. 1986).

Wie für den Menschen beschrieben, spielt THP eine inhibitorische Rolle für das Wachstum und vor allem für die Aggregation von Kristallen zu größeren Partikeln (GROVER et al. 1998). Eine reduzierte THP-Sekretion wie sie bei den Hunden mit Urolithiasis beobachtet wurde, könnte eine schnellere Aggregation zur Folge haben. Als Konsequenz kommt es zur Bildung von Partikeln, die wegen ihrer Größe über den Harnapparat schlechter ausgeschieden werden können und den Grundstein für die weitere Formation geben. Diese Hypothese steht im Einklang mit der Beobachtung, dass gesunde Individuen Kristalle bilden (HALLSON und ROSE 1976). Gesunde und selbst Steinbildner sind in der Lage, diese Kristalle mit dem Harn auszuscheiden. Jedoch werden bei erkrankten Personen und auch Hunden mehr und größere Kristalle im Harn gefunden.

Als weitere Ursache einer reduzierten THP-Expression kommt eine Ureterobstruktion in Betracht (STORCH et al. 1992). Der Druckanstieg sowie die funktionellen und humoralen Effekte spielen möglicherweise eine Rolle für die verringerte THP und auch EGF-Expression. Eine solche Situation könnte durchaus bei den Fällen zugrunde liegen, bei denen die untersuchten Hunde Urethralsteine hatten und eine temporäre Harnwegsobstruktion vorlag.

### 5.2.5 Bedeutung von Harnproteinen bei Urolithiasis

Der Harn wird als ein protektives kolloidales System verstanden, indem die vorkommenden Makromoleküle eine positive Wirkung auf die Stabilität haben (BUTT 1952). Liegt eine Störung oder Veränderung vor, so kann es zur Bildung von Steinen kommen. Kristallnukleation und die folgende Retention sind die ersten Schritte in der Harnsteinbildung, die im Medium Urin ablaufen. Folglich müssen Matrixproteine zum Zeitpunkt der Steinformation im Harn anwesend sein. Urin beinhaltet zahlreiche Komponenten, die fähig sind den Kristallisationsprozess zu inhibieren. Bislang gibt es jedoch keinen Hinweis auf ein einzelnes Protein, welches die entscheidendste Rolle spielt. Bedeutender ist die Komplexität der Harnzusammensetzung. Da steinbildende Patienten eine höhere Proabilität zur Bildung von Kristallen haben, kann davon ausgegangen werden, dass diese Proteine häufiger oder reduziert im Harn vorkommen als bei Gesunden. Neben THP und RBP konnte bei einigen der untersuchten Hunden mit Urolithiasis das Vitamin-D-Bindungsprotein (DBP) im Harn nachgewiesen werden. Das 53 kDa -Trägerprotein für 25-Hydroxy-Vitamin  $D_3$  kommt im Plasma vor, wird glomerulär filtriert und proximal im Tubulussystem, ähnlich wie RBP, über den Megalinrezeptor rückresorbiert (CHRISTENSEN et al. 1998). Unter physiologischen Bedingungen ist kein DBP im Harn enthalten, das durch ein Fehlen der Bande im Western-Blot bei den gesunden Hunden bestätigt werden kann (Abb. 4.1). Eine Ausscheidung von DBP war häufiger festzustellen als die von RBP. Bei Hunden, die RBP im Harn enthielten, trat zu 91% (10 von 11) gleichzeitig auch DBP auf. Beim Auftreten von DBP im Harn wurde dagegen nur bei knapp 53% (10 von 19) gleichzeitig RBP gefunden. Vergleiche mit anderen Studien waren wegen fehlender Ergebnisse derzeit nicht möglich, so dass die pathophysiologischen Ursachen unklar bleiben. Als mögliche Ursache ist die Störung der Megalin-Rezeptorfunktion infolge einer temporären Harnwegsobstruktion durch Urethralsteine in Betracht zu ziehen. Einzelne Hunde hatten jedoch auch bei ungestörtem Harnabsatz ein oder beide Proteine im Harn. Ein Zusammenhang zwischen Harnsteinart und Ausscheidung einer der beiden Proteine konnte nicht festgestellt werden.

Eine postrenale Herkunft der Proteine war ebenfalls denkbar, da Urolithe durch mechanische Irritation oder begleitende Bakterien eine Entzündung des Harntrakts verursachen können. Demgegenüber stehen die Ergebnisse von GROVER und RESNICK (1995), die durch Harnuntersuchungen bei Urolithiasispatienten zeigten, dass spezifische Proteine nicht als Produkt der Zellwandverletzung

resultieren, sondern ebenfalls auftraten, wenn zum Zeitpunkt der Probennahme keine sichtbaren Urolithe vorhanden waren.

Erstmals konnte durch die Methode der SELDI-TOF Massenspektrometrie Ergebnisse zu Proteinprofilen bei Urolithiasis des Hundes gezeigt werden. Wie bei den Untersuchungen des Harns der nierenkranken Hunde erwies sich diese Analysenmethode als geeignetes Instrument, um Unterschiede im Proteinmuster sowohl graphisch sichtbar zu machen als auch statistisch berechnen zu können. Besonders geeignet erschien die Methode für Peptide und Protein von kleiner molekularer Größe (kleiner 30 kDa). Im Vergleich zur Gelelektrophorese, die eine Auftrennung von Proteinen selbst im Kilodalton-Bereich nur unzureichend und unterhalb von 10 kDa kaum erbringen kann, konnte mit Hilfe der SELDI-TOF MS den Proteinpeaks genaue molekulare Gewichte zugeteilt werden und außerdem molekulare Unterschiede ab 200 – 300 Da dargestellt werden, d.h. in der Größenordnung von einer Aminosäure. Der Harn von Hunden mit Urolithiasis hatte gegenüber der Kontrollgruppe statistisch festzustellende Unterschiede spezifischer Proteine. Ferner ergaben sich gleichzeitig Unterschiede im Harn zwischen Hunden mit Struvit, Calciumoxalat und Urat. Ein Sichtbarmachen dieser Unterschiede konnten elektrophoretische Methoden nicht erbringen. Die Größe der Cystingruppe war für eine statistische Auswertung zu klein und wurde nicht in die Interpretation miteinbezogen. Bis auf ein Protein (Molmasse 27,47 kDa) kam es unabhängig von der Steinart zu einer erhöhten Intensitätsmessung der Proteine. Im Harn der Urolithiasispatienten war das Protein, das bei der Kontrollgruppe mit der Molmasse von 27,85 kDa gemessen wurde, um ca. 380 Da leichter. Eine Modifikation dieses Proteins wäre wie bei den Niereninsuffizienten möglich. Jedoch konnte die bisher analysierte Anzahl von Harnproben keinen Marker für das Auftreten einer Urolithiasis mit Hilfe der SELDI-TOF MS erbringen, wie es für die Hunde mit einer Niereninsuffizienz möglich war. Hunde mit Struvitsteinen hatten eine durchschnittlich höhere Anzahl vor allem an Peptiden, was wahrscheinlich im Zusammenhang mit einer bakteriellen Entzündung stand. Wie die Berechnung des upc-Verhältnis zeigte, lag bei den Hunden mit Urolithiasis ein höherer Proteingehalt im Urin vor. Inwieweit die Proteine Ursache, Folge oder auch unabhängiger Begleiter sein können, konnte anhand der Ergebnisse nicht eruiert werden. Eine Klärung des Expressionsortes sowie eines möglichen Zusammenhangs mit der Lithogenese erfordert weiterführende Untersuchungen.

#### 5.2.6 Pathogenetische und diagnostische Bedeutung der Matrixproteine von Harnsteinen

Erstmals wurde in dieser Arbeit, die organische Matrix von Harnsteinen beim Hund untersucht. Erste Untersuchungen zu humanen Urolithen wurden dagegen bereits zwischen 1950 und 1960 vorgenommen (BOYCE und GARVEY 1956, KING und BOYCE 1963, BOYCE 1968). Die zahlreichen Studien zur organischen Matrix von Harnsteinen zeigen, wie groß das Interesse an ihrer Zusammensetzung ist. Von den zahlreich entdeckten Proteinen wurden selten mehr als 5 Proteine gleichzeitig identifiziert. Sehr unterschiedliche Ergebnisse lassen auf Probleme mit Probenaufbereitung und auch Analysenmethode schließen. Bei der Matrixextraktion sind ca. 25% der Proteine löslich. Die restlichen 75% sind nur schwer erfassbar (BOYCE et al. 1962). Ähnliche Probleme konnten wir bei der qualitativen Bestimmung der organischen Matrix beobachten. Zum einen erwies sich die Extraktion als sehr zeitaufwendig, d.h. selbst durch Wechseln des Extraktionsmediums kam es auch nach drei Wochen nicht zu einer völligen Auflösung des Minerals. Zum anderen bedingte die zur Verfügung stehende Menge an Harnsteinen pro Patient eine geringe Ausbeute, da 6% den maximalen Anteil an organischer Matrix im Harnstein ausmacht. Eine Auftrennung der Proteinextrakte mit Hilfe der Gelelektrophorese lieferte bei fast allen Harnsteinpatienten drei Banden. Das Protein mit der Bande bei ca. 66 kDa wurde als Albumin identifiziert. In der Studie von DUSSOL et al. (1995) erschien Albumin ebenfalls als stärkstes Protein der organischen Matrix. Ferner konnte in der Steinmatrix der Hunde eine Bande bei 31 kDa und bei 14,4 kDa festgestellt werden. DOYLE et al. (1991) und ATMANI et al. (1998) wiesen in ihren Studien ein Protein mit 30 kDa nach, das als Cristall-Matrix-Protein bezeichnet wird. Darüber hinaus kommt das aus Harnsteinen isolierte  $\alpha$ 2-Mikroglobulin mit ca. 30 kDa in Frage (MORSE und RESNICK 1988). Der Nachweis von THP als Bestandteil der organischen Matrix bei den Hunden dieser Studie verlief negativ. Selbst beim Menschen, bei dem THP das mengenmäßig am häufigsten vorkommende Harnprotein ist, fiel der Nachweis mit unterschiedlichem Erfolg aus. Während THP in einigen Studien als Matrixbestandteil identifiziert werden konnte (GRANT et al. 1973, MELICK et al. 1980, FRAIJ 1989), fanden andere kein THP in Harnsteinen oder Harnkristallen (DOYLE et al. 1991, DUSSOL et al. 1995). Auch RBP, das neben acht weiteren Proteinen im Steinextrakt beim Menschen der selben Harnsteinarten nachgewiesen wurde (DUSSOL et al. 1995), konnte in den Harnsteinen der Hunde nicht identifiziert werden.

Die hochempfindliche SELDI-TOF MS konnte im Vergleich zur Gelelektrophorese weitere Proteine identifizieren. Dabei konnten sämtliche im Extrakt vorkommende Proteine gleichzeitig im Harn nachgewiesen werden. Entsprechend eines höheren Proteingehaltes im Harn traten bei Struvitsteinen gegenüber anderen Arten sowohl höhere Intensitäten als auch zahlreichere Peaks auf. Insbesondere bei CaOx-Steinen fielen zwei Proteine (15,3 und 16,0 kDa) auf, die in allen Extrakten der CaOx-Urolithe auftraten. Entsprechend den Ergebnissen der SDS-PAGE enthielten die Extrakte der Urate die geringste Anzahl an Proteinen. Die Heterogenität der nachgewiesenen Matrixproteine wird in zahlreichen Untersuchungen bestätigt. Die Inkorporation von Harnproteinen in Urolithe wird von vielen Autoren als ein selektiver Prozess angesehen (BOYCE und KING 1963, BOYCE 1968, MORSE und RESNICK 1989, DOYLE et al. 1991). Als Begründung für den selektiven Vorgang wird häufig die umgekehrte Schlussfolgerung angegeben, d.h. falls der Prozess der Inkorporation unabhängig von der mineralischen Komponente ist, sind identische Proteinmuster zu erwarten, die in Experimenten nicht auftreten. Jedoch ist der Vergleich zwischen Extrakten unterschiedlicher Harnsteinminerale sowohl in vorausgegangenem als auch in dieser Studie vorsichtig zu interpretieren. Grund dafür ist die Verwendung verschiedener Extraktionslösungen und ein mögliches unterschiedliches Lösungsverhalten der Proteine unter den gewählten Bedingungen. Desweiteren lässt die unterschiedliche Vorbehandlung von Harn und Extrakt einen quantitativen Vergleich der Proteine in unserem Fall nicht zu. Die Auswertung der durch die hochempfindliche und spezifische SELDI-TOF MS enthaltenen Proteinspektren setzt eine identische Probenaufbereitung voraus. Folglich können nur beschreibend Aussagen über das Vorhandensein von Proteinen in den Extrakten getroffen werden. Ein Nichtdetektieren lässt jedoch nicht auf ein Fehlen des Matrixproteins schließen.

Bislang konnten die Untersuchungen der organischen Matrix keine sicheren Ergebnisse über die Rolle der inkorporierten Proteine liefern. Unklar bleibt, inwieweit diese Proteine zu Beginn der Nukleation oder Aggregation aktiv als Inhibitoren oder Promotoren beteiligt sind, oder ob sie im Laufe der Steinbildung unspezifisch eingeschlossen werden.

### **5.3 Schlussfolgerungen**

Im Kollektiv der niereninsuffizienten Hunde befanden sich 17 chronisch und nur 2 akut erkrankte Tiere. Aufgrund der kleinen Anzahl an akut niereninsuffizienten Hunden gelang es nicht, eine Differenzierung zwischen den Formen akut – chronisch mit Hilfe der analysierten Parametern vorzunehmen. Diagnostisch sind klinisch asymptomatisch verlaufenden Nierenerkrankungen nicht zu erfassen, solange die noch intakten Nephrone die zusätzlichen Funktionen übernehmen können. Daher bietet die Bestimmung spezifischer Markerproteine den Vorteil, Schädigungen des Nephrons zu lokalisieren und die Funktionalität der betroffenen Abschnitte bestimmen zu können. Die Proteine sind entweder wegen ihrer Molekülgröße (IgG, Transferrin und Albumin), wegen ihrer Rezeptorfunktion (RBP und DBP) oder wegen ihres Expressionsortes (THP) für einen Abschnitt des Nephrons spezifisch. Die Untersuchungen der vorliegenden Studie haben gezeigt, dass die Bestimmung vor allem von RBP und THP eine diagnostische Bedeutung bei Nierenerkrankungen des Hundes haben kann. Sie stellen Markerproteine dar, die wie beim Menschen die Funktionsfähigkeit spezifischer Abschnitte in der Niere widerspiegeln. Ferner konnte mit Hilfe der immunohistochemischen Untersuchungen die Topographie der renalen Alterationen zusätzlich unterstrichen werden. Offen bleibt, inwieweit sich RBP und THP gegenüber zum Beispiel Kreatinin als sensiblere Prädiktoren einer Nierenschädigung eignen. Die Ergebnisse bilden einen Ansatzpunkt zu weiteren Untersuchungen. Ebenfalls zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass es bei Hunden mit vorliegender Niereninsuffizienz zu Veränderungen im Vitamin-A-Stoffwechsel kommt. Durch die eingeschränkte Nierenfunktion kommt es zu einem erhöhten Verlust vor allem an Retinol über den Harn. Niereninsuffiziente Hunde scheinen mit einer Konzentrationserhöhung von Retinol im Serum zu reagieren. RBP im Plasma als treibende Kraft einer Retinolfreisetzung aus der Leber ist bei den erkrankten Hunden im Gegensatz zu Menschen nicht erhöht.

Im Zusammenhang mit Urolithiasis bei Hunden haben die Untersuchungen der vorliegenden Studie gezeigt, dass neben den bekannten Faktoren der Urinübersättigung mit kristalloiden Salzen oder der bakteriellen Infektion spezifische Harnproteine in den Prozess der Steinbildung involviert sind. Vor allem in Humanstudien sind zahlreiche Versuche unternommen worden, um die Rolle dieser Proteine für die Lithogenese zu erkennen. Obwohl die Studie nicht überprüft, ob THP als direkte Ursache der Urolithiasis bei Hunden in Frage kommt, legt sie jedoch eine hohe Korrelation zwischen einer reduzierten THP-Konzentration im Harn und dem Erscheinen von Urolithen dar. Wie beim Menschen scheint die inhibitorische Fähigkeit des THP von seinem Milieu abhängig zu sein und darüber hinaus

eine zusätzliche Einschränkung durch die Bindung mit Retinylester zu erfahren. Trotz eines höheren Serumretinolspiegels bei Hunden mit Urolithiasis kann ein Einfluss von Vitamin A bei den untersuchten Tieren nicht festgestellt werden. Wie die niereninsuffizienten Tiere scheiden einige Hunde mit Urolithiasis RBP oder DBP aus, das unter physiologischen Bedingungen im proximalen Tubulus komplett rückresorbiert wird. Die Ursache für die Störung der Tubulusfunktion, sowohl proximal als auch distal, bleibt weiterhin unklar. Die Veränderungen der einzelnen Parameter treten bei allen vier untersuchten Harnsteinarten auf und die relativ geringe Fallzahl kann keinen Unterschied zwischen den Typen darstellen. Mit Hilfe der hoch sensiblen SELDI-Methode gelang es, eine größere Anzahl an Matrixproteinen nachzuweisen, was die SDS-PAGE nicht leisten konnte. Außerdem konnten spezifische Harnproteine einer bestimmten Harnsteinart durch die SELDI-Technik zugeteilt werden.