

Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) -  
erste Untersuchungen eines neuen renalen Biomarkers  
bei gesunden Hunden und Hunden mit einer akuten  
oder chronischen Nierenerkrankung

---

**WEIS JESSICA**



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Dr. med. vet.**

beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



*edition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2015

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2015

© 2015 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin  
Klinik für Kleintiere  
(Innere Medizin)  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus - Liebig - Universität Gießen

Betreuer: Prof. Dr. Reto Neiger

**Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL) - erste  
Untersuchungen eines neuen renalen Biomarkers bei gesunden  
Hunden und Hunden mit einer akuten oder chronischen  
Nierenerkrankung**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Doktorgrades beim  
Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

**Jessica Weis**

Tierärztin aus Offenbach am Main

Gießen 2014

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h. c. Martin Kramer

---

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Reto Neiger

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Joachim Roth

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2014

---

Meinen Eltern und Steffen

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus - Liebig - Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

Jessica Weis

Gießen 2014

## **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis	I - IV
Abkürzungsverzeichnis	V - VIII

<b>I.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	1
<b>II.</b>	<b>LITERATURÜBERSICHT</b>	3
<b>1.</b>	<b>Nierenerkrankungen beim Hund</b>	3
1.1.	Akute Nierenschädigung (AKI)	3
1.1.1.	Definition	3
1.1.2.	Ätiologie	4
1.1.3.	Phasen der AKI	5
1.1.4.	Stadieneinteilung nach IRIS	6
1.1.5.	Therapie	7
1.1.5.1.	Spezifische Therapie	7
1.1.5.2.	Symptomatische Therapie	7
1.1.6.	Prognose	8
1.2.	Chronische Nierenerkrankung (CKD)	8
1.2.1.	Definition	8
1.2.2.	Ätiologie	8
1.2.3.	Stadieneinteilung nach IRIS	9
1.2.4.	Therapie	12
1.2.5.	Prognose	12
1.3.	Differenzierung AKI und CKD	13
<b>2.</b>	<b>Labordiagnostische Evaluation der Nierenfunktion</b>	13
2.1.	Definition Biomarker	13
2.2.	Anforderungen an den idealen renalen Biomarker	13
2.3.	Klinisch etablierte renale Biomarker	14
2.3.1.	Evaluation der glomerulären Funktion	14
2.3.1.1.	Azotämie	14

2.3.1.2.	Harnstoff	14
2.3.1.3.	Kreatinin	15
2.3.1.4.	Clearance-Methoden	16
2.3.1.5.	Proteinurie/ Albuminurie	19
2.3.1.5.1.	Mikroalbuminurie	21
2.3.2.	Evaluation der tubulären Funktion	22
2.3.2.1.	Spezifisches Gewicht des Urins (USG)	22
2.3.2.1.	Fraktionierte Exkretion von Elektrolyten (FE)	22
<b>3</b>	<b>Ausgewählte neue renale Biomarker</b>	<b>24</b>
3.1.	Cystatin C	24
3.2.	Retinol-bindendes Protein	26
3.3.	N-Acetyl- $\beta$ -D-Glukosaminidase	27
3.4.	Interleukin-18	29
3.5.	Kidney injury molecule-1	30
3.6.	<b>Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL)</b>	<b>31</b>
3.6.1.	Biologie	31
3.6.2.	NGAL als renaler Biomarker	32
3.6.2.1.	Syntheseorte von NGAL	32
3.6.2.2.	Klinischer Einsatz von NGAL	33
3.6.2.2.1.	Tiermodell	33
3.6.2.2.2.	Humanmedizin	34
3.6.2.2.3.	NGAL beim Hund	37
<b>III</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>43</b>
<b>1.</b>	<b>Gesunde Hunde</b>	<b>43</b>
1.1.	Einschlusskriterien	43
1.2.	Ausschlusskriterien	43
1.3.	Signalement, Anamnese und klinische Untersuchung	44
1.4.	Labordiagnostische Untersuchungen	44
1.4.1.	Blutuntersuchung	45
1.4.2.	Urinuntersuchung	46



1.4.3.	Inulin-Plasmaclearance	47
<b>2.</b>	<b>Hunde mit einer Nierenerkrankung</b>	<b>48</b>
2.1.	Einschlusskriterien	48
2.2.	Ausschlusskriterien	48
2.3.	Untersuchungen am Tier	49
2.4.	Definition renale Azotämie	49
2.5.	Einteilung der Studienpopulation	50
<b>3.</b>	<b>Bestimmung der NGAL-Konzentration beim Hund</b>	<b>52</b>
3.1.	Dog NGAL ELISA Kit	52
3.2.	Testdurchführung	53
<b>4.</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>54</b>
<b>IV.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
<b>1.</b>	<b>Gesunde Studienpopulation</b>	<b>55</b>
1.1.	Patienten	55
1.2.	Untersuchungen am Tier	56
1.3.	Labordiagnostische Untersuchungen	56
1.3.1.	Blutuntersuchung	56
1.3.2.	Urinuntersuchung	57
1.3.3.	Glomeruläre Filtrationsrate	57
1.4.	NGAL	57
<b>2.</b>	<b>Hunde mit einer Nierenerkrankung</b>	<b>58</b>
2.1.	Patienten	58
2.2.	Retrospektive Datenanalyse	60
2.3.	NGAL	60
2.3.1.	Akute Nierenerkrankung (AKI)	60
2.3.2.	Chronische Nierenerkrankung (CKD)	60

2.3.3.	Einfluss von klinischen Parametern und Parametern der retrospektiven Datenanalyse auf NGAL-Konzentrationen	64
<b>3.</b>	<b>Intra-Assay-Varianz</b>	<b>65</b>
<b>V.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>66</b>
<b>VI.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>75</b>
<b>VII.</b>	<b>SUMMARY</b>	<b>77</b>
<b>VIII</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>79</b>
<b>IX.</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>99</b>

## **Abkürzungsverzeichnis**

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
AK	Antikörper
AKI	Akute Nierenerkrankung („acute kidney injury“)
areg. Anämie	Aregenerative Anämie
AUC	Fläche unter der Kurve („area under the curve“)
AUC-ROC	Fläche unter der Kurve-Grenzwertoptimierungskurve („area under the curve“, „receiver operating characteristic“)
BS	Berner Sennenhund
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CKD	Chronische Nierenerkrankung („chronic kidney disease“)
CL <sub>Plasma</sub>	Plasma-Clearance
CL <sub>renal</sub>	Renale Clearance
C <sub>P</sub>	Plasmakonzentration der Indikatorsubstanz
C <sub>U</sub>	Urinkonzentration der Indikatorsubstanz
D	Indikator dosis
de novo	von Neuem
dl	Deziliter
DSH	Deutscher Schäferhund
E. Coli	Escherichia coli
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ESS	Englischer Springer Spaniel
et al.	und Mitarbeiter („et alii“)
evtl.	eventuell
FCR	Flat Coated Retriever
FE	Fraktionierte Exkretion von Elektrolyten
FE <sub>Na</sub>	Fraktionierte Exkretion von Natrium
FE <sub>Cl</sub>	Fraktionierte Exkretion von Chlor
FE <sub>K</sub>	Fraktionierte Exkretion von Kalium
FE <sub>P</sub>	Fraktionierte Exkretion von Phosphor
%FE <sub>X</sub>	Fraktionierte Exkretion eines beliebigen Elektrolyts (in %)
g	Gramm

## Abkürzungsverzeichnis

GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
ggf.	gegebenenfalls
GR	Golden Retriever
h	Stunde/ Stunden
Htc	Hämatokrit
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IL-18	Interleukin-18
IRIS	International Renal Interest Society
J	Jahr/ Jahre
JRT	Jack Russel Terrier
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KIM-1	Kidney injury molecule-1
KMN	Kontrastmittel-induzierte Nephropathie
KOF	Körperoberfläche
l	Liter
L	Hunde mit einer Leptospirose
LR	Labrador Retriever
LV	Leptospirose-Verdacht
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
M	männlich
MAT	Mikroagglutinationstest
max.	maximal
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mmol	Millimol
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
n	Anzahl
NAG	N-Acetyl-β-D-Glukosaminidase
nb	nicht bekannt
Neutrophile	neutrophile Granulozyten
ng	Nanogramm

## Abkürzungsverzeichnis

NGAL	Neutrophilen Gelatinase – assoziiertes Lipocalin
nL	Hunde mit einer AKI, die nicht an einer Leptospirose erkrankt sind
NSAIDs	nichtsteroidale Antiphlogistika („non steroidal anti-inflammatory drugs“)
p	p-Wert
PCR	Polymerase Chain Reaction
pg	Pikogramm
P <sub>Kr</sub>	Plasma-Kreatininkonzentration
PLT	Thrombozyten („platelets“)
pNGAL	Plasma-NGAL-Konzentration
P <sub>x</sub>	Plasma-Elektrolytkonzentration
r	Korrelationskoeffizient
RBC	Erythrozyten („red blood cells“)
RBP	Retinol-bindendes Protein
reg. Anämie	Regenerative Anämie
RIFLE	Risk Injury Failure Loss End-stage renal disease
RNA	Ribonukleinsäure
ROC	Receiver Operating Characteristic
RPM	Umdrehungen pro Minute (“revolutions per minute“)
RR	Rhodesian Ridgeback
sNGAL	Serum/ Plasma-NGAL-Konzentration
sp.	Spezies
SPSS	Statistical Package for the Social Science
SSD	Shetland Sheepdog
TMB	Tetramethylbenzidin
TP	Gesamteiweiß (“Totalprotein“)
U	Urinvolumen
u.a.	unter anderem
U <sub>Kr</sub>	Urin-Kreatininkonzentration
UNCR	urine NGAL to creatinine ratio
uNGAL	Urin-NGAL-Konzentration
UNKQ	Urin-NGAL/ Kreatinin-Quotient
UPC	Urin-Protein/ Kreatinin-Quotient

## Abkürzungsverzeichnis

USG	Urin-spezifisches Gewicht
U <sub>x</sub>	Urin-Elektrolytkonzentration
W	weiblich
WBC	Leukozyten („white blood cells“)
WHWT	West Highland White Terrier
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
>	größer als
≥	größer-gleich
<	kleiner

## **I. EINLEITUNG**

Die akute Nierenschädigung (acute kidney injury = AKI) ist charakterisiert durch einen plötzlichen Funktionsverlust der Nieren und stellt einen akut lebensbedrohlichen Zustand dar (LANGSTON 2010). Sie macht in der Humanmedizin 1% der Krankenhauseinweisungen aus und ist eine häufige Komplikation hospitalisierter Patienten (5-10%) (KAUFMAN et al. 1991, NASH et al. 2002, UCHINO 2005). Bereits ein Serumkreatininanstieg > 25% vom Ausgangswert geht mit einer doppelten Mortalität hospitalisierter Patienten einher (LASSNIGG et al. 2008). Die Inzidenz der AKI in der Tiermedizin ist nicht bekannt.

Im Gegensatz zur chronischen Nierenerkrankung (chronic kidney disease = CKD), bei der maximal ein stabiler Krankheitszustand erreicht werden kann, ist bei der AKI eine vollständige Erholung des Patienten ohne eine bleibende signifikante Nierenfunktionsstörung möglich (DIBARTOLA 2010). Das Wissen, um welche Form der Nierenerkrankung es sich handelt, spielt somit eine entscheidende Rolle für die Therapie und Prognose. Die herkömmliche Diagnostik weist hier jedoch Einschränkungen auf. Harnstoff und Kreatinin besitzen nur eine geringe Sensitivität für einen abrupten Abfall der Nierenfunktion und Kreatinin steigt erst an, wenn bereits mehr als 75 % der funktionsfähigen Nephrone funktionsunfähig sind (DIBARTOLA 2010). Akute Veränderungen der Nierenfunktion werden somit erst verzögert erkannt; ein Zeitrahmen, der nicht für nephroprotektive Maßnahmen genutzt werden kann. Auch die Differenzierung einer akuten von einer chronischen Nierenerkrankung kann zur Herausforderung werden und neben labordiagnostischen Parametern müssen anamnestische, klinische und bildgebende Befunde herangezogen werden.

In der Humanmedizin ist das Neutrophilen Gelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL) aktuell der vielversprechendste renale Biomarker zur Früherkennung einer AKI. NGAL steigt im Serum früher und stärker an als Kreatinin und die NGAL-Expression in Serum und Urin korreliert eng mit dem Grad der Schädigung (HAASE et al. 2011a). Außerdem erlaubt eine einzige Urin-NGAL-Messung die Differenzierung einer AKI von einer CKD und prärenalen Azotämie (NICKOLAS et al. 2008).

## Einleitung

Auch ein caniner NGAL ELISA Test Kit wird angeboten, es liegen jedoch nur wenige Daten zur labordiagnostischen Beurteilung beim Hund vor. Ziel dieser Studie war somit eine erste Evaluation von NGAL als renalen Biomarker beim renal gesunden Hund sowie Hunden mit einer AKI oder CKD.



## **II. LITERATURÜBERSICHT**

### **1. Nierenerkrankungen beim Hund**

Unter den Begriff der Nierenerkrankung fallen morphologische oder funktionelle Veränderungen einer oder beider Nieren, unabhängig von deren Ausmaß. Erst wenn die Nieren ihre regulatorischen, exkretorischen und endokrinen Funktionen nicht mehr aufrecht erhalten können, spricht man von Nierenerkrankung. Als Folge kommt es zu einer Retention harnpflichtiger Substanzen, sowie zu Störungen im Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt. Dies tritt ein, wenn 75% oder mehr der ursprünglichen Nephrone funktionsunfähig sind (POLZIN 2010).

#### **1.1. Akute Nierenschädigung (AKI)**

##### **1.1.1. Definition**

Die AKI ist charakterisiert durch einen plötzlichen und anhaltenden, jedoch prinzipiell reversiblen Funktionsverlust der Nieren. Als Folge sinken die renale Filtrationsleistung und damit auch das Harnvolumen und es kommt zu einem Anstieg stickstoffhaltiger Stoffwechselprodukte im Blut. Insbesondere ein Anstieg des Serum-Kreatininwertes über den Referenzbereich bei gleichzeitiger Abwesenheit eines chronischen Krankheitsverlaufs wird als Definitionskriterium herangezogen (LANGSTON 2010). Kreatinin steigt jedoch erst an, wenn bereits 75% oder mehr der Nephrone funktionsunfähig sind und ist damit ein insensitiver und retrospektiver Parameter. Darüber hinaus wird die Serum-Kreatininkonzentration durch nicht-renale Faktoren wie Alter, Geschlecht und Muskelmasse beeinflusst und lässt aufgrund seiner rein glomerulären Filtration keine Aussage über die tubuläre Funktion zu (DIBARTOLA 2010). Ein noch im Referenzbereich gelegener Anstieg der Serum-Kreatininkonzentration kann daher bereits Ausdruck einer ausgeprägten Nierenfunktionsstörung sein (LANGSTON 2010). 2004 wurden die bis dahin in der Humanmedizin bestehenden 30 Definitionen einer AKI in einer internationalen Konsensuskonferenz durch ein einheitliches Klassifikationssystem (RIFLE; Risk, Injury, Failure, Loss, End-stage renal disease) ersetzt (BELLOMO et al. 2004).

Anhand gradueller Anstiege der Serum-Kreatininwerte vom Ausgangswert bzw. einer Reduktion des Harnvolumens erfolgt eine Stadieneinteilung der AKI. Eine Übertragung der RIFLE-Kriterien auf die Tiermedizin ist nur schwer möglich, da der Kreatinin-Ausgangswert häufig nicht bekannt ist und eine objektive Messung der Urinausscheidung in der Regel erst bei einer bestehenden Nierenfunktionsstörung erfolgt (LANGSTON 2010). 2013 wurden von der International Renal Interest Society (IRIS) erstmals Richtlinien zur Stadieneinteilung einer AKI speziell bei Hunden und Katzen veröffentlicht (siehe Kapitel 1.1.4.).

### **1.1.2. Ätiologie**

Ätiologisch wird die AKI in prärenale, intrinsisch renale und postrenale Ursachen unterteilt.

Prärenale Ursachen umfassen alle Vorgänge, die zu einem Absinken des renalen Blutflusses führen (z.B. Hypovolämie, Hypotension, Schock, Anästhesie). Die prärenale Azotämie ist reversibel, wenn das zugrundeliegende Problem zeitnah therapiert wird.

Eine intrinsisch renale Azotämie ist Folge einer strukturellen Schädigung des Nierenparenchyms. Am häufigsten betroffen ist das Tubulussystem.

Die Ursachen für eine intrinsisch renale AKI sind sehr vielfältig:

- Ischämie (Schock, Thrombose)
- primäre Nierenerkrankung (Leptospirose, Neoplasie)
- sekundäre Erkrankung mit renaler Manifestation (Sepsis)
- Nephrotoxine (Ethylenglykol, Antibiotika, Diuretika)

Infektiöse, toxische und ischämische Ursachen kommen beim Hund am häufigsten vor.

Eine Obstruktion oder Leckage der Harnwege ist Ursache einer postrenalen Azotämie. Postrenale Ursachen werden häufig frühzeitig erkannt und bei einer zeitnahen Behandlung ist die Azotämie meistens vollständig reversibel.

Eine Kombination der Kategorien ist beim individuellen Patienten möglich. Langanhaltende prä- oder postrenale Schäden können zu intrinsischen Nierenschäden führen (LANGSTON 2010, STOKES 2009).

### **1.1.3. Phasen der AKI**

Die akute Nierenschädigung kann in 4 Phasen unterteilt werden.

Die Induktion beginnt unmittelbar nach dem Niereninsult, wenn der Nierenschaden gesetzt wird und verläuft asymptomatisch. Die Dauer dieser Phase ist sehr variabel. Sie endet mit dem Auftreten greifbarer Veränderungen der Nierenfunktion (z.B. Reduktion der Urinproduktion, Anstieg von Harnstoff und Kreatinin).

Während der Extension kommt es durch anhaltende ischämische und hypoxische Prozesse, sowie durch Entzündungsvorgänge zu Apoptose und Zelltod.

Die Behandlung einer AKI ist während dieser zwei Phasen am erfolgversprechendsten.

Die Erhaltungsphase dauert 1 bis 3 Wochen. Die Urinproduktion kann stark variieren. Irreversible Nierenschäden liegen vor.

Während der Erholungsphase sinken die Nierenwerte und es kommt zu einem Anstieg der Urinproduktion (Phase der Polyurie). Eine vollständige Erholung der Nierenfunktion ist möglich. Die Regenerations- und Reparationsvorgänge des Nierengewebes können bis zu 3 Monate in Anspruch nehmen (LANGSTON 2010, ROSS 2009).

#### **1.1.4. Stadieneinteilung nach IRIS**

2013 wurden von der International Renal Interest Society (IRIS), analog zur Klassifizierung einer CKD, Richtlinien zur Stadieneinteilung einer AKI veröffentlicht. Wie auch bei der chronischen Nierenerkrankung erfolgt eine Klassifizierung insbesondere anhand der Serum-Kreatininkonzentration in Grad I-V. Da im Gegensatz zur CKD nicht nur stabile Patienten einer Gradeinteilung unterzogen werden, repräsentiert das aktuelle Stadium lediglich eine Momentaufnahme und kurzfristige Veränderungen sind im Verlauf der Erkrankung möglich.

##### IRIS AKI Grad I:

- nicht-azotämische Hunde und Katzen (Kreatininkonzentration  $< 140 \mu\text{mol/l}$ ) mit charakteristischen Hinweisen auf eine AKI (Anamnese, Klinik, Laborbefunde, bildgebende Befunde, gemessene Oligurie/ Anurie über 6 Stunden, Ansprechen auf Volumenersatztherapie)
- Patienten mit einem Anstieg der Kreatininkonzentration innerhalb des Referenzbereiches um  $\geq 26,4 \mu\text{mol/l}$  innerhalb von 48 Stunden
- Das Ansprechen auf Volumenersatztherapie ist definiert als Anstieg der Urinproduktion auf  $> 1\text{ml/kg/h}$  innerhalb von 6 Stunden und/ oder Absinken der Kreatininkonzentration auf den Ausgangswert innerhalb von 48 Stunden

##### IRIS AKI Grad II:

- geringgradige Azotämie (Kreatininkonzentration von  $141\text{-}220 \mu\text{mol/l}$ ) in Kombination mit charakteristischen Hinweisen auf eine AKI
- Patienten mit einer bereits bekannten CKD und einem Anstieg der Kreatininkonzentration um  $\geq 26,4 \mu\text{mol/l}$  vom Ausgangswert innerhalb von 48 Stunden

##### IRIS AKI Grad III:

- Kreatininkonzentration von  $221\text{-}439 \mu\text{mol/l}$  in Kombination mit charakteristischen Hinweisen auf eine AKI

IRIS AKI Grad IV:

- Kreatininkonzentration von 440-880 µmol/l in Kombination mit charakteristischen Hinweisen auf eine AKI

IRIS AKI Grad V:

- Kreatininkonzentration > 880 µmol/l in Kombination mit charakteristischen Hinweisen auf eine AKI

Innerhalb der einzelnen Grade erfolgt dann eine weitere Einteilung in Unterkategorien:

- Oligurie (Urinproduktion < 1 ml/kg/h) oder Anurie (keine Urinproduktion) über 6 Stunden
- nicht-oligurisch (Urinproduktion > 1 ml/kg/h)
- Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie

(ANONYMUS 2014)

### **1.1.5. Therapie**

#### **1.1.5.1. Spezifische Therapie**

Ist die genaue Ursache bekannt und eine kausale Therapie möglich (z.B. Ethanol-Verabreichung bei Ethylenglykol-Intoxikation oder spezifische Antibiotika-Therapie bei Leptospirose), sollte diese immer erfolgen (ROSS 2009).

#### **1.1.5.2. Symptomatische Therapie**

Die unterstützende Therapie umfasst verschiedene Punkte:

- optimales Flüssigkeitsmanagement
- Management der Oligurie/ Anurie, ggf. Dialyse
- Ausgleich von Imbalancen im Elektrolyt- und Säure-Basen-Haushalt
- Therapie der Hypertension

- Ernährungsmanagement

(LANGSTON 2010, ROSS 2009)

### **1.1.6. Prognose**

Die Prognose der AKI ist stark abhängig von der auslösenden Ursache und dem Ansprechen auf Therapie (ROSS 2009).

## **1.2. Chronische Nierenerkrankung (CKD)**

### **1.2.1. Definition**

Bei der CKD handelt es sich um eine irreversible und langsam fortschreitende Erkrankung. Ihre Chronizität ist definiert als:

- mindestens 3 Monate bestehender Nierenschaden (mit oder ohne reduzierte GFR)
- Reduktion der GFR um mehr als 50% für mindestens 3 Monate

(POLZIN 2010)

### **1.2.2. Ätiologie**

Die Auslöser einer CKD sind sehr vielfältig und man unterscheidet ursächlich familiäre, angeborene und erworbene Erkrankungen. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung kann die auslösende Ursache häufig nicht mehr identifiziert werden (POLZIN 2010). Unabhängig von der auslösenden Ursache kommt es zu einem Fortschreiten des Funktionsverlusts. Man spricht hier auch von der spontanen Progression. Aufgrund von Kompensationsmechanismen ist die Niere nach einer Schädigung zunächst in der Lage, ihre Funktion fortzusetzen. Durch intraglomeruläre Hypertension und -filtration sowie glomeruläre Hypertrophie wird die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) aufrechterhalten. Kommt es langfristig zu einer vermehrten

Belastung intakter Nephronen, treten jedoch unvermeidliche funktionelle und morphologische Veränderungen auf, die schließlich zu einer Verschlechterung der Nierenfunktion führen (CHEW et al. 2011).

### 1.2.3. Stadieneinteilung nach IRIS

Die International Renal Interest Society (IRIS) hat ein System zur Stadieneinteilung der CKD entwickelt, mit dem Ziel Diagnose, Prognose und Therapie der CKD zu vereinfachen und zu vereinheitlichen. Nach der Diagnosestellung erfolgt eine Einteilung anhand des Kreatininwertes in die Stadien I-IV. Renale Proteinurie (Urin-Protein/ Kreatinin-Quotient) und Blutdruck werden zur Einteilung in Unterkategorien herangezogen. Für jedes Stadium und jede Unterkategorie sind bestimmte Therapierichtlinien festgelegt, eine einheitliche Behandlung kann somit gewährleistet werden (ELLIOTT & WATSON 2009, POLZIN 2010).

**Tabelle 1:** IRIS Stadieneinteilung anhand der Serum-Kreatininkonzentration

<b>Stadium</b>	<b>Kreatininkonzentration (µmol/l)</b>	
gefährdet	< 125	Nicht-azotämisch. Für den Patienten besteht jedoch aufgrund des Vorberichts ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer CKD (z.B. Einsatz nephrotoxischer Medikamente, hohes Alter)
1	< 125	Nicht-azotämisch. Es liegen jedoch andere Hinweise auf eine Nierenfunktionsstörung vor (z.B. erniedrigtes

Literaturübersicht

		urinspezifisches Gewicht, renale Proteinurie, Anstieg der Kreatininkonzentration innerhalb des Referenzbereichs in seriell gemessenen Proben)
2	125 - 180	Geringgradige Azotämie. Ein Kreatinin-Wert von 125 µmol/l liegt für viele Labore noch im Referenzbereich. Ein Kreatinin-Wert im oberen Referenzbereich kann jedoch aufgrund der geringen Sensitivität von Kreatinin als Screening-Test schon auf eine Nierenfunktionsstörung hinweisen. Klinische Symptome fehlen oder sind nur mild ausgeprägt.
3	181 - 440	Mittelgradige Azotämie. Geht häufig mit klinischen Symptomen einher.
4	> 440	Steigendes Risiko für die Entwicklung einer urämischen Krise



**Tabelle 2:** IRIS Untereinteilung anhand der Proteinurie

Urin-Protein/ Kreatinin-Quotient	Unterstadium
< 0,2	nicht-proteinurisch
0,2 - 0,5	grenzwertige Proteinurie
> 0,5	Proteinurie

**Tabelle 3:** IRIS Untereinteilung anhand der Blutdruckwerte

Systolischer Blutdruck (mmHg)	Diastolischer Blutdruck (mmHg)	Unterstadium
< 150	< 95	0 minimales Risiko für Endorganschäden
150 - 159	95 - 99	1 geringes Risiko für Endorganschäden
160 - 179	100 - 119	2 moderates Risiko für Endorganschäden
≥ 180	≥ 120	3 hohes Risiko für Endorganschäden

kein Hinweis auf Endorganschäden/ Komplikationen	Keine Komplikationen
Endorganschäden/ Komplikationen festgestellt	Komplikationen

Blutdruck nicht gemessen	Risiko für Endorganschäden nicht ermittelt
--------------------------	--

(ELLIOTT & WATSON 2009)

#### **1.2.4. Therapie**

Keine Behandlung kann die bereits bestehenden, irreversiblen Nierenschäden korrigieren. Klinische und biochemische Folgen einer CKD können jedoch häufig mit symptomatischer Therapie reduziert werden und das Fortschreiten der Erkrankung kann durch therapeutische Maßnahmen verlangsamt werden.

Eckpfeiler der CKD-Therapie:

- Absetzen potentiell nephrotoxischer Arzneimittel
- Identifikation und Behandlung von prä- und postrenalen Faktoren
- Ausschluss von behandelbaren renalen Erkrankungen
- Ausschluss behandelbarer nicht-renaler Erkrankungen, die zur Aufrechterhaltung der Nierenschädigung beitragen

(ELLIOTT & WATSON 2009, POLZIN 2010)

#### **1.2.5. Prognose**

Die Prognose der CKD wird durch eine Vielzahl an Faktoren beeinflusst (z.B. Qualität der medizinischen Versorgung, Besitzer-Compliance). Patienten mit chronischer Nierenerkrankung können oft für viele Monate bis Jahre mit guter Lebensqualität überleben (POLZIN 2010).

### **1.3. Differenzierung AKI und CKD**

Da die AKI wie bereits beschrieben einen potentiell reversiblen Krankheitszustand darstellt, ist eine zeitnahe Unterscheidung in AKI oder CKD von großer therapeutischer und prognostischer Relevanz. Im klinischen Alltag kann die Unterscheidung, um welche Form der Nierenerkrankung es sich handelt, zur Herausforderung werden, da keine eindeutigen Differenzierungskriterien existieren. Anamnestische, klinische, labordiagnostische und bildgebende Befunde können hilfreich sein (DIBARTOLA 2010, GERBER et al. 2004, LANGSTON 2010, POLZIN 2010). Parameter, die zur Abgrenzung beitragen können, sind der Tabelle 10 zu entnehmen.

## **2. Labordiagnostische Evaluation der Nierenfunktion**

### **2.1. Definition Biomarker**

Biomarker sind objektiv messbare Indikatoren zur Beurteilung von physiologischen und pathophysiologischen Zuständen oder pharmakologischen Reaktionen auf therapeutische Maßnahmen (Biomarkers Definition Working Group 2001).

### **2.2. Anforderungen an den idealen renalen Biomarker**

Der ideale Biomarker zur Vorhersage einer Nierenschädigung sollte organspezifisch sein, die Detektion einer Nierenschädigung auch in frühen Stadien der Erkrankung ermöglichen und zur Verlaufs- und Therapiekontrolle geeignet sein. Er sollte eine hohe Sensitivität und Spezifität aufweisen und neben einem klaren Trennwert für die Diagnose oder den Ausschluss der Erkrankung Aussagen über den Schweregrad der Nierenschädigung zulassen. Er sollte in der Lage sein den Nierenschaden zu lokalisieren (glomerulär, tubulär, beides) und prä-, post- sowie nicht-renale Prozesse von intrinsisch renalen Schäden zu differenzieren. Das biologische Material des Markers sollte jederzeit und nicht invasiv verfügbar sein. Eine weitere Voraussetzung ist die zeitnahe, kostengünstige und störunanfällige laborchemische Messung (NGUYEN & DEVARAJAN 2008; HAASE & HAASE-FIELITZ 2011)

## **2.3. Klinisch etablierte renale Biomarker**

### **2.3.1. Evaluation der glomerulären Funktion**

Ein wesentlicher Bestandteil der Nierenfunktionsdiagnostik ist die Beurteilung der glomerulären Funktion, da ein direkter Zusammenhang zwischen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und der funktionsfähigen Nierenmasse besteht (DIBARTOLA 2010)

#### **2.3.1.1 Azotämie**

Bei einer Azotämie handelt es sich um eine erhöhte Konzentration stickstoffhaltiger Stoffwechselabbauprodukte, vor allem Harnstoff und Kreatinin, im Blut. Ätiologisch unterscheidet man eine prärenale, postrenale und primär renale Azotämie. Eine prärenale Azotämie ist Folge einer reduzierten Nierenperfusion (z.B. schwere Dehydratation, Herzversagen), während eine postrenale Azotämie auf einer Störung der Urinausscheidung beruht (z.B. Urethraobstruktion, Uroabdomen). Die primär renale Azotämie resultiert aus einer Erkrankung des Nierenparenchyms (AKI und CKD) (DIBARTOLA 2010).

#### **2.3.1.2. Serum-Harnstoff**

Harnstoff wird in der Leber aus endo- und exogenen Proteinen synthetisiert. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend renal durch glomeruläre Filtration und die Serum-Harnstoffkonzentration korreliert invers mit der glomerulären Filtrationsrate (GFR). In den Nierentubuli wird Harnstoff passiv rückresorbiert. Ein verminderter Harnfluss, z.B. im Rahmen einer Dehydratation, führt somit zu einer gesteigerten Harnstoffreabsorption. Außerdem wird die Serum-Harnstoffkonzentration durch verschiedene nicht-renale Faktoren (Proteingehalt der Nahrung, gastrointestinale Blutungen, Lebererkrankungen) beeinflusst (Tabelle 4) und kann somit über- oder unterschätzt werden (DIBARTOLA 2010).

### **2.3.1.3. Serum-Kreatinin**

Kreatinin ist ein harnpflichtiges Endprodukt des Muskelstoffwechsels und die täglich anfallende Kreatininmenge ist damit stark abhängig von der individuellen Muskelmasse. Auch die Nachweismethode (Jaffé-Reaktion) kann einen Effekt auf die Serum-Kreatininkonzentration ausüben, jedoch ist sie unbeeinflusst von der Nahrungsaufnahme, unterliegt keinem Metabolismus und wird rein glomerulär filtriert. Im steady-state ist die Kreatininausscheidung relativ konstant und die Serum-Kreatininkonzentration korreliert invers mit der GFR. Obwohl die Serum-Kreatininkonzentration mit abnehmender GFR steigt, ist diese Beziehung aufgrund von Kompensationsmechanismen nicht linear. So resultieren starke Abnahmen der GFR in frühen Stadien einer Nierenerkrankung nur in einem geringen Anstieg der Serum-Kreatininkonzentration, aufgrund der weiten Spanne auch innerhalb des Referenzbereiches, während eine geringgradige Reduktion der GFR in fortgeschrittenen Stadien deutliche Änderungen der Serum-Kreatininkonzentration zur Folge hat. Das gleiche gilt auch für die Serum-Harnstoffkonzentration. Sind alle nicht-renalen Faktoren beseitigt oder ausgeschlossen und die Serum-Kreatininkonzentration liegt weiterhin über dem Referenzbereich, sind mindestens 75% der ursprünglichen Nephronenpopulation funktionsunfähig (DIBARTOLA 2010, SANDERSON 2009).

Harnstoff und Kreatinin dienen somit nur einer groben Einschätzung der glomerulären Funktion und im Referenzbereich gelegene Werte sind nicht mit einer ungestörten Nierenfunktion gleichzusetzen. Einzelne Messungen erlauben keine Unterscheidung zwischen akuten und chronischen, reversiblen und nicht-reversiblen, sowie progressiven und nicht-progressiven Prozessen und tragen nicht zur Ursachenfindung (prärenal, primär renal, postrenal) bei (DIBARTOLA 2010, SANDERSON 2009).

**Tabelle 4:** Beeinflussung der labordiagnostischen Parameter Harnstoff und Kreatinin nebst einer Azotämie.

	<b>Erhöht</b>	<b>Erniedrigt</b>
<b>Harnstoff</b>	Erhöhter Proteingehalt der Nahrung	Erniedrigter Proteingehalt der Nahrung
	Gastrointestinale Blutungen	Lebererkrankungen
	Katabolismus	Polyurie/Polydipsie
	Gabe von Glukokortikoiden	
	Fieber	
<b>Kreatinin</b>	Männliche Tiere	Junge Tiere
	Fütterung mit Frischfleisch	Kachexie
	Starke Bemuskelung	

#### 2.3.1.4. Clearance-Methoden

Eine nahezu exakte Bestimmung der GFR ist mit verschiedenen Clearance-Methoden möglich. Die Clearance ist definiert als das Plasmavolumen, das pro Zeiteinheit durch die Nieren von einer Indikatorsubstanz gereinigt wird. Sie wird in ml/min/kg KG oder in ml/min/m<sup>2</sup> KOF angegeben.

Eine geeignete Indikatorsubstanz muss folgende Eigenschaften besitzen:

- ausschließlich renale Elimination
- freie glomeruläre Filtration
- unterliegt keiner tubulären Sekretion und Reabsorption
- ist nicht an andere Stoffe gebunden

- übt keinen Einfluss auf die Nierenfunktion aus
- ist nicht nephrotoxisch

Erfüllt eine Substanz diese Voraussetzungen, kann die Clearance dieser Substanz mit der GFR gleichgesetzt werden. Inulin kommt der idealen Marker - Substanz am nächsten.

Verschiedene nicht-renale Faktoren beeinflussen die GFR:

- Alter, Geschlecht, Rasse
- Proteinaufnahme
- Hydratationsstatus
- Natriumhaushalt
- individuelle Schwankungen von Tag zu Tag
- zirkadianer Rhythmus

Eine weite Referenzspanne ist die Folge. Clearance-Methoden müssen an nüchternen und normal hydrierten Patienten durchgeführt werden. Grundsätzlich unterscheidet man 2 Clearance-Methoden: Renale und Plasma Clearance.

### Renale Clearance ( $CL_{\text{renal}}$ )

Nach einer Bolusinjektion mit anschließender kontinuierlicher Infusion wird ein konstanter Blutspiegel der Indikatorsubstanz erreicht und der Urin über einen Harnblasenkatheter während der Versuchsdauer gesammelt. Die renale Clearance von Inulin ist die akzeptierte Referenzmethode zur Bestimmung der GFR. Die Berechnung der GFR erfolgt nach folgender Formel:

$$CL_{\text{renal}} = (U \times C_U) / C_P$$

U = produziertes Urinvolumen

$C_U$  = Urin-Konzentration der Indikatorsubstanz

$C_P$  = Plasmakonzentration der Indikatorsubstanz

In Tabelle 5 sind Vor- und Nachteile dieser Methode aufgeführt.

**Tabelle 5:** Vor- und Nachteile der renalen Clearance

<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Goldstandard (Inulin)	Katheterisierung der Harnblase
Einfache Berechnung der GFR	Infektionsrisiko
	unvollständiges Entleeren der Harnblase führt zu Unterschätzung der GFR
	konstanter Blutspiegel der Indikatorsubstanz wird nicht immer erreicht

Plasma-Clearance ( $CL_{\text{Plasma}}$ )

Bei der Plasma-Clearance-Methode (sog. single-injection-method) wird die Indikatorsubstanz einmalig appliziert. Anschließend erfolgen Blutprobenentnahmen zu definierten Zeitpunkten und die zeitabhängige Konzentrationsabnahme des Indikators im Blut wird gemessen. Die Errechnung der Clearance erfolgt, indem die Indikatordosis durch die Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve geteilt wird. Folgende Formel wird hierfür verwendet:

$$CL_{\text{Plasma}} = D/AUC$$

D = Indikatordosis

AUC = Fläche unter der Konzentrations-Zeit-Kurve ("area-under-the-plasma-concentration-versus-time-curve")

In Tabelle 6 sind Vor- und Nachteile dieser Methode aufgeführt.



**Tabelle 6:** Vor- und Nachteile der Plasma-Clearance

<b>Vorteile</b>	<b>Nachteile</b>
Urin-Sammeln entfällt	Blutprobenentnahme zu exakten Zeitpunkten
	Genauigkeit abhängig von verwendetem pharmakokinetischem Modell

Clearancemethoden sind kostenintensiv, arbeitsaufwendig und erlauben kein intensives Monitoring kritisch kranker Patienten. Unter klinischen Bedingungen kommen sie daher in der Tiermedizin vor allem zur Detektion von Nierenerkrankungen im kreatininblinden Bereich zum Einsatz (HEIENE & LEFEBVRE 2007, HEIENE & MOE 1998).

#### **2.3.1.5. Proteinurie/ Albuminurie**

Der Begriff Proteinurie beschreibt das übermäßige Vorhandensein von Eiweißen jeglicher Art im Urin. Das dominierende Protein stellt hierbei Albumin dar. Aufgrund der selektiven Permeabilität der glomerulären Kapillarwand gelangen Proteine mit einem Molekulargewicht > 60000 Dalton (Molekulargewicht Albumin 69000 Dalton) unter physiologischen Verhältnissen nicht bzw. nur in sehr geringen Mengen in den Primärharn. Die Kapillarwand ist außerdem negativ geladen. Negativ geladene Proteine werden somit zusätzlich am Durchtritt gehindert. Kleinere und größere positiv geladene Proteine die das Glomerulum passieren können, werden fast vollständig von den proximalen Tubulusepithelzellen rückresorbiert (GRAUER 2011). Die Ursachen einer Proteinurie sind vielfältig und können in drei Kategorien unterteilt werden. Eine *prärenale Proteinurie* ist gekennzeichnet durch ein Überangebot an normalen (z.B. Hämoglobin im Rahmen einer Hämolyse, Myoglobin infolge einer Rhabdomyolyse) oder anormalen niedermolekularen Plasmaproteinen (Bence-Jones-Proteine bei einem multiplen Myelom), welche frei filtriert werden. Aufgrund der pathologisch erhöhten Konzentration an Plasmaproteinen kommt es zu einem Überschreiten der Resorptionskapazität im proximalen Tubulus. Die selektive

Permeabilität des Glomerulums ist nicht geschädigt. Die *renale Proteinurie* lässt sich in eine funktionelle und pathologische Proteinurie unterteilen. Eine funktionelle renale Proteinurie liegt vor, wenn vorübergehende Zustände (z.B. Fieber, körperliche Anstrengung) die Nierenphysiologie beeinflussen. Die Proteinurie ist mild und transient. Nierenschäden liegen nicht vor. Die pathologisch renale Proteinurie ist Folge von strukturellen oder funktionellen Nierenschäden (LEES et al. 2005). Sie ist insbesondere Kennzeichen einer Glomerulopathie, kann jedoch sowohl aufgrund von glomerulären als auch tubulären Läsionen entstehen (GRAUER 2011). In einer retrospektiven Auswertung von 137 Hunden mit Protein-Verlust-Nephropathie konnte bei 48% der Fälle keine auslösende Ursache identifiziert werden, bei 20% wurde eine Tumorerkrankung festgestellt, 12% wiesen eine Infektion auf und bei 15% der Hunde wurde eine nicht-infektiöse Entzündung festgestellt (COOK & COWGILL 1996). Von einer *postrenalen Proteinurie* spricht man, wenn die Proteine erst nach Eintritt in das Nierenbecken in den Urin gelangt sind. Mögliche Ursachen hierfür sind Blutungen oder Entzündungen im unteren Harntrakt oder Genitaltrakt (LEES et al. 2005).

Die Diagnose einer pathologisch renalen Proteinurie/ Albuminurie darf erst dann gestellt werden, wenn prä- und postrenale Ursachen ausgeschlossen wurden und die Persistenz der Proteinurie gesichert ist (mindestens drei positive Resultate innerhalb von zwei Wochen). Anschließend sollte eine Quantifizierung der Proteinurie mittels Urin-Protein/ -Kreatinin-Quotient vorgenommen werden (LEES et al. 2005).

**Tabelle 7:** Einteilung der Proteinurie anhand des Urin-Protein/ -Kreatinin-Quotienten

<b>Urin-Protein/ Kreatinin-Quotient</b>	<b>Interpretation</b>
< 0,2	nicht-proteinurisch
0,2 - 0,5	grenzwertige Proteinurie
> 0,5	Proteinurie

(ELLIOTT & WATSON 2009)

### **2.3.1.5.1. Mikroalbuminurie**

Konventionelle Urin-Teststreifen werden routinemäßig als Screening-Tests zur Detektion einer Proteinurie herangezogen. Damit ein solcher Urin-Teststreifen positiv für Proteine ausfällt, muss die Albuminkonzentration im Urin 30 mg/dl oder mehr betragen (Makroalbuminurie). Gesunde Hunde weisen allerdings lediglich eine Albuminkonzentration von etwa 1mg/dl im Urin auf. Albuminwerte zwischen 1-30 mg/dl, welche als Mikroalbuminurie bezeichnet werden, entgehen somit häufig einer Detektion (GRAUER 2011). Die Feststellung einer Mikroalbuminurie kann die Diagnose einer pathologisch erhöhten Eiweißausscheidung eventuell zu einem früheren Zeitpunkt ermöglichen, so dass umgehend geeignete Maßnahmen eingeleitet werden können (PRESSLER 2013). In der Humanmedizin korrelieren Vorhandensein und Ausmaß einer Mikroalbuminurie stark mit einer schlechten Prognose. Bei Patienten mit Diabetes mellitus ist eine Mikroalbuminurie zur Vorhersage einer diabetischen Nephropathie geeignet (MOGENSEN et al. 1985-1986, VIBERTI et al. 1982). Bei vielen Erkrankungen, die mit einer Mikroalbuminurie einhergehen können (z.B. Tumorerkrankungen, IBD, Pankreatitis), korreliert der Grad der Mikroalbuminurie mit der Schwere der Erkrankung (GOSLING 1995). Auch bei Hunden mit X-chromosomal vererbter Nephropathie (HSIEH et al. 2005) und Dirofilariose (GRAUER et al. 2002) sowie bei Soft Coated Wheaten Terriern mit Proteinverlust-Nephropathie (VADEN et al. 2001) konnte vor dem Auftreten einer Makroalbuminurie eine Mikroalbuminurie nachgewiesen werden. Bei Hunden mit Herzwurmerkrankung sind histologische Nierenveränderungen bereits mit dem Auftreten einer Mikroalbuminurie nachweisbar (GRAUER et al. 2002). Eine Mikroalbuminurie wurde bei Hunden auch im Zusammenhang mit einer Nierenerkrankung, Pankreatitis und kardiovaskulären Erkrankungen festgestellt (WHITTEMORE et al. 2006, PRESSLER et al. 2002). Ein normaler Urin-Protein/Kreatinin-Quotient schließt das Vorhandensein einer Mikroalbuminurie nicht aus (PRESSLER et al. 2003). Inwiefern eine Mikroalbuminurie bei Hunden mit der Prognose korreliert ist unklar (WHITTEMORE et al. 2006). Auch für Hunde und Katzen existieren speziesspezifische Tests zur Detektion einer Mikroalbuminurie. Bei dem Assay, der im Rahmen der patientennahen Labordiagnostik zur Verfügung steht handelt sich um einen semiquantitativen Test. Die Ergebnisse werden nicht in Form eines präzisen Zahlenwerts, sondern als negativ, schwach positiv, mittelgradig

positiv und stark positiv angegeben (PRESSLER 2013). Der für die Mikroalbuminurie angegebene Referenzbereich variiert aber möglicherweise in Abhängigkeit von Alter und Rasse (RADECKI et al. 2003). Aktuell bestehen noch viele Unklarheiten bezüglich der Interpretation einer Mikroalbuminurie und der Notwendigkeit weitere diagnostische oder therapeutische Maßnahmen einzuleiten (PRESSLER 2013).

### **2.3.2. Evaluation der tubulären Funktion**

Eine wichtige Funktion der Nieren ist ihre Beteiligung an der Regelung des Flüssigkeitshaushaltes. Je nach aktuellem Bedarf des Organismus können die Nieren einen hoch konzentrierten oder extrem verdünnten Harn produzieren (DIBARTOLA 2010).

#### **2.3.2.1. Spezifisches Gewicht des Urins (USG)**

Das USG spiegelt die Konzentration an gelösten Stoffen im Urin wider und ist abhängig von der Anzahl und dem Molekulargewicht der gelösten Partikel. Die Begriffe Isosthenurie, Hyposthenurie und Hypersthenurie beziehen sich auf isoosmolaren, hypoosmolaren und hyperosmolaren Urin, verglichen mit dem Blutplasma. Das USG unterliegt einer ausgeprägten inter- und intraindividuellen Variabilität und besitzt auch beim gesunden Tier eine weite Referenzspanne von 1.006 - > 1.050 (VAN VONDEREN et al. 1997). Im Morgenurin ist das USG höher als abends. Um konzentrierten Harn ausscheiden zu können, müssen mindestens 33% aller Nephrone funktionsfähig sein. Eine einzelne Messung ohne Berücksichtigung des Hydratationszustandes des Tieres ist nicht aussagekräftig (HEIENE & LEFEBVRE 2007, DIBARTOLA 2010).

#### **2.3.2.2. Fraktionierte Exkretion von Elektrolyten (FE)**

Eine wichtige Funktion der Nieren ist die Regulation des Elektrolythaushaltes. Nicht proteingebundene Elektrolyte werden frei durch das Glomerulum filtriert und anschließend im proximalen Tubulus, der Henle Schleife und im distalen Tubulus resorbiert (PRESSLER 2013). Die fraktionierte Exkretion von Elektrolyten (FE) ist

definiert als Anteil der gefilterten Elektrolyte, der nicht tubulär resorbiert wird und folglich im Urin ausgeschieden wird (LEFEBVRE et al. 2008). Die FE erlaubt daher eine gewisse Beurteilung der tubulären Funktion (DIBARTOLA 2010). Der klinische Einsatz der FE ist jedoch eingeschränkt, da vielfältige exogene (Rasse, Alter, Elektrolytzusammensetzung der Nahrung) und endogene Faktoren (Hormoneinfluss, Nierenfunktion, Flussrate des Ultrafiltrats durch das Nephron, Volumenstatus, Medikamenteneinfluss) den Elektrolythaushalt beeinflussen.

Sie wird bestimmt, indem die Clearance des Elektrolyts mit der Clearance von Kreatinin ins Verhältnis gesetzt wird.

$$\%FE_X = ((U_X * P_{K_r}) / (U_{K_r} * P_X)) * 100$$

$U_X$  = Urin-Elektrolytkonzentration

$P_{K_r}$  = Plasma-Kreatininkonzentration

$U_{K_r}$  = Urin-Kreatininkonzentration

$P_X$  = Plasma-Elektrolytkonzentration

Aufgrund der vielen Einflussfaktoren existieren keine exakten Referenzwerte (LEFEBVRE et al. 2008, PRESSLER 2013). Physiologisch gelten beim Hund Werte < 1 % für die  $FE_{Na}$  und  $FE_{Cl}$ , < 20% für die  $FE_K$  und < 39% für die  $FE_P$  (DIBARTOLA 2010). Diese Werte gelten jedoch nur für Tiere mit Plasma-Elektrolytkonzentrationen im Normbereich, da adaptive Mechanismen im Rahmen der physiologischen Elektrolyt-Homöostase ebenfalls zu Abweichungen von der Norm führen, ohne dass ein pathologischer Prozess zugrundeliegt. Die Auswertung der FE sollte daher immer im Hinblick auf die Elektrolytkonzentration im Blut sowie der klinischen Befunde erfolgen (LEFEBVRE et al. 2008).

Für die Interpretation des Ergebnisses sind daher zu berücksichtigen:

- die Elektrolytkonzentration im Blut; liegt diese oberhalb des Referenzbereichs sollte die FE höher als normal ausfallen und umgekehrt
- mögliche Endokrinopathien; verschiedene Hormone üben einen Einfluss auf die renale Exkretion und Resorption von Elektrolyten aus (z.B. bedingt ein Aldosteronmangel im Rahmen eines Hypoadrenokortizismus eine verminderte

Natriumresorption, bei einer gleichzeitig gesteigerten renalen Kaliumaufnahme)

- die Nierenfunktion; viele Tiere mit akuter oder chronischer Nierenerkrankung weisen aufgrund der ausgeprägten Kompensationsfähigkeit der Nieren weiterhin Plasma-Elektrolytkonzentrationen im Normbereich auf. Ein sekundär renaler Hyperparathyreoidismus, eine mögliche Begleiterscheinung der chronischen Nierenerkrankung, kann die FE von Kalzium und Phosphor unvorhersehbar verändern und Tiere mit einer ausgeprägten Polyurie sind in Folge der hohen Flussrate des Ultrafiltrats durch das Nephron möglicherweise nicht in der Lage die Elektrolyte adäquat zu resorbieren.

Aufgrund der großen inter- und intraindividuellen Variabilität der FE und der fehlenden Möglichkeit sämtliche Auswirkungen auf die Elektrolytausscheidung vorherzusehen, ist der klinische Einsatz der FE zur Diagnose von Nierenerkrankungen begrenzt. Die FE kann jedoch eine kostengünstige Methode darstellen, um bei einer limitierten Anzahl von Differentialdiagnosen zur Priorisierung dieser beizutragen (PRESSLER 2013).

### **3. Ausgewählte neue renale Biomarker**

#### **3.1. Cystatin C**

Cystatin C ist ein Cystein-Proteinase-Inhibitor und wird von nahezu allen kernhaltigen Zellen gebildet. Da Cystatin C mit einem Molekulargewicht von 13359 Dalton zu den niedermolekularen Proteinen zählt und bei einem physiologischen pH positiv geladen ist, kann es den glomerulären Filter frei passieren. Die Ausscheidung erfolgt ausschließlich renal. Im proximalen Tubulus wird Cystatin C resorbiert und fast vollständig katabolisiert. Ein Abfall der glomerulären Filtrationsrate hat einen Anstieg der Cystatin C-Serumkonzentration zur Folge und bei Erkrankungen des Tubulussystems kommt es zu einem Anstieg der Cystatin C-Urinkonzentration (WEHNER et al. 2008).

In der Humanmedizin wird Cystatin C vor allem als Marker zur Beurteilung der GFR bei Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung eingesetzt (COBRIN et al

2013a). In verschiedenen humanmedizinischen Studien konnte belegt werden, dass Cystatin C eine Reduktion der GFR mit einer höheren Sensitivität erkennt als Kreatinin. Cystatin C war Kreatinin außerdem bei der Detektion geringer Veränderungen der GFR überlegen (KYHSE-ANDERSON et al. 1994, HERGET-ROSENTHAL et al. 2004). Die Sensitivität von Cystatin C zur Vorhersage einer AKI variiert je nach Studie jedoch stark (HERGET-ROSENTHAL et al. 2004, ROYAKKERS et al. 2011).

Auch Hunde mit Nierenerkrankungen unterschiedlicher Ursache wiesen verglichen mit einer gesunden Studienpopulation signifikant erhöhte Cystatin C-Serumkonzentrationen auf (WEHNER et al. 2008, MIYAGAWA et al. 2009). Cystatin C korrelierte eng mit der mittels exogener Kreatinin-Plasma-Clearance (WEHNER et al. 2008) bzw. Iohexol-Clearance (MIYAGAWA et al. 2009) gemessenen GFR und war hier in beiden Studien der Serum-Kreatininkonzentration überlegen. Almy und Mitarbeiter (2002) konnten dagegen keinen Vorteil von Cystatin C gegenüber Kreatinin feststellen. Laut Wehner und Mitarbeiter (2008) ist die Cystatin C-Serumkonzentration unbeeinflusst von Alter, Körpergewicht, Geschlecht und nicht-renalen Erkrankungen (Infektionen, Tumorerkrankungen). Braun und Mitarbeiter (2002) stellten eine höhere Cystatin C-Serumkonzentration bei sehr jungen und alten Hunden fest sowie bei Hunden mit einem Körpergewicht über 15 kg. Laut Pagitz und Mitarbeiter (2007) ist Cystatin C Kreatinin bezüglich der biologischen Varianz nicht überlegen.

Erhöhte Cystatin C-Urinkonzentrationen erlauben beim Menschen die Erfassung von tubulären Dysfunktionen, sowohl bei rein tubulären Nephropathien, als auch tubuloglomerulären Mischformen. Die Cystatin C-Urinkonzentration kann jedoch auch bei rein glomerulären Nephropathien erhöht sein, wenn die tubuläre Resorptionskapazität für Cystatin C aufgrund eines übermäßigen Anfallens von Albumin eingeschränkt ist (CONTI et al. 2006). Multizentrische Studien zur Cystatin C-Urinkonzentration lieferten stark unterschiedliche Untersuchungsergebnisse. Während manche Studien die Schlussfolgerung zulassen, dass eine erhöhte Cystatin C-Konzentration im Urin bei kritisch kranken Patienten und solchen mit Sepsis in der Lage ist eine AKI früh zu erkennen und die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie vorherzusehen, war die nach kardiovaskulären Eingriffen postoperativ gemessene Cystatin C-Urinkonzentration weder ein früher Prädiktor

einer AKI, noch war der Parameter von prognostischer Relevanz (KOYNER & PARIKH 2013).

Auch beim Hund ist der Urin-Cystatin C/ -Kreatinin-Quotient in der Lage, Hunde mit einer Nierenerkrankung (13 Hunde mit CKD, 2 Hunde mit AKI) von Gesunden und solchen mit nicht-renalen Erkrankungen zu unterscheiden. Der Einfluss einer Proteinurie auf die Cystatin C-Urinkonzentration und Nierenbiopsien zur histologischen Klassifizierung der Nierenerkrankungen wurden nicht untersucht (MONTI et al. 2012).

### **3.2. Retinol-bindendes Protein**

Das Retinol-bindende Protein (RBP) zählt zu den niedermolekularen Proteinen (Molekulargewicht 21000 Dalton). Es wird in der Leber synthetisiert und dient als Transportprotein für Retinol (Vitamin A). Der RBP-Retinol-Komplex ist im Plasma an Transthyretin gebunden. Die Affinität des RBP zu Transthyretin nimmt erst ab, wenn Retinol an das Zielgewebe abgegeben wurde. Das nicht komplexierte RBP kann dann frei das Glomerulum passieren und wird anschließend im proximalen Tubulus fast vollständig katabolisiert. Ist die tubuläre Resorptionsfähigkeit aufgrund einer tubulointerstitiellen Schädigung gestört, kann das RBP im Urin nachgewiesen werden (DE LOOR et al. 2013).

Beim Menschen ist das RBP ein sensitiver Indikator für das Vorliegen einer tubulären Dysfunktion bei Patienten mit verschiedenen Formen von Glomerulopathien. (KIRSZTAJN et al. 2002). Das RBP ist außerdem ein vielversprechender Parameter zur frühen Vorhersage einer AKI. Es kann dazu beitragen, Schwere und Prognose der Erkrankung einzuschätzen (PARIKH et al. 2010). Bei Kindern und Jugendlichen mit insulinabhängigem Diabetes mellitus und normalen Urin-Albuminkonzentrationen war eine erhöhte RBP-Urinkonzentration ein Marker für die spätere Entwicklung einer Mikroalbuminurie und im folgenden einer diabetischen Nephropathie (GINEVRI et al. 1992).

Auch bei Hunden mit CKD war der Urin-RBP/ -Kreatinin-Quotient signifikant höher als bei gesunden Hunden unterschiedlichen Alters. Das Alter übte keinen Einfluss auf die RBP-Konzentration aus (SMETS et al. 2010). Nabyt und Mitarbeiter (2012)



untersuchten verschiedene Harnproteine bei 25 Hunden mit X-chromosomal vererbter Nephropathie (Modell der progressiven Proteinverlust-Nephropathie) und 19 gesunden Hunden. Der Urin-RBP/ -Kreatinin-Quotient war vor einem Anstieg der Serum-Kreatininkonzentration in der Lage, gesunde und kranke Hunde zu unterscheiden. Eine erhöhte RBP-Urinkonzentration konnte jedoch erst nach Entwicklung einer Proteinurie (UPC > 0,5) festgestellt werden. Der Urin-RBP/ -Kreatinin-Quotient korrelierte von allen Harnproteinen am besten mit der Serum-Kreatininkonzentration, der GFR und den histologischen Nierenveränderungen. Im Gegensatz zu den anderen Harnparametern war der Urin-RBP/ -Kreatinin-Quotient in der Lage, den progressiven Verlauf der Erkrankung widerzuspiegeln und scheint damit auch für eine Verlaufskontrolle in späteren Stadien der Erkrankung geeignet zu sein.

Raila und Mitarbeiter (2010) konnten ebenfalls zeigen, dass der Urin-RBP/ -Kreatinin-Quotient bei Hunden mit einer Azotämie signifikant erhöht ist. Er war jedoch nicht in der Lage, nicht azotämische Hunde mit einer reduzierten GFR (exogene Plasma-Kreatinin-Clearance) zu erkennen.

Aufgrund dieser zum Teil widersprüchlichen Studienergebnisse sind weitere Untersuchungen notwendig, um den gesamten Nutzen des RBPs in der Diagnose von Nierenerkrankungen zu klären.

### **3.3. N-Acetyl- $\beta$ -D-Glukosaminidase**

N-Acetyl- $\beta$ -D-Glukosaminidase (NAG) ist ein lysosomales Enzym mit einem Molekulargewicht von 150000 Dalton, das in allen Zellen des Körpers, einschließlich den proximalen Tubulusepithelzellen vorkommt. Da die Größe dieses Enzyms eine glomeruläre Filtration nicht erlaubt, ist seine Anwesenheit im Harn auf die Sekretion aus den Tubulusepithelzellen zurückzuführen. Physiologischerweise wird NAG nur in geringen Mengen mittels Exocytose in den Urin abgegeben. Eine erhöhte NAG-Aktivität im Urin wird daher als diagnostischer Marker einer tubulären Schädigung diskutiert (DE LOOR et al. 2013).

Laut Skálová (2005) ist die NAG-Aktivität im Urin beim Menschen ein sensitiver Marker der tubulären Dysfunktion bei unterschiedlichen Krankheitszuständen. Sie ist insbesondere ein sensitiver Indikator für die momentane Aktivität der Nierenerkrankung (MISHRA et al. 2012) und kann dazu beitragen die Diagnose einer AKI zu bestätigen sowie Schwere und Prognose der Erkrankung einzuschätzen (PARIKH et al. 2010).

Mishra und Mitarbeiter (2012) untersuchten die NAG-Aktivität (Urin-NAG/ -Kreatinin-Quotient) von 35 Kindern mit primärem (idiopathischem) nephrotischem Syndrom und stellten eine signifikante positive Korrelation mit dem Urin-Protein/ -Kreatinin-Quotienten ( $r=0,8479$ ) fest. Es ist bekannt, dass bei vielen glomerulären Erkrankungen ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Proteinurie und der tubulointerstitiellen Schädigung besteht. Die pathologische und persistierende Proteinurie kann in späteren Stadien der Erkrankung toxisch für das Tubulusepithel sein. Es ist bewiesen, dass eine erhöhte NAG-Aktivität bei Glomerulopathien auf eine Freisetzung des Enzyms aus tubulären Nierenzellen zurückzuführen ist und nicht auf eine beschädigte glomeruläre Kapillarwand (BAZZI et al. 2002). Es ist jedoch wahrscheinlich, dass eine massive Proteinurie auch ohne das Vorliegen von tubulären Schäden eine erhöhte Urin-NAG-Aktivität verursachen kann. Dies ist möglich, wenn eine gesteigerte lysosomale Aktivität aufgrund der erhöhten Aufnahme gefilterter Proteine vorliegt. Eine erhöhte NAG-Aktivität ist somit sowohl ein Indikator für einen tubulären Schaden, als auch für den Funktionsstatus der Nierentubuli (MISHRA et al. 2012).

Auch beim Hund wurden verschiedene Untersuchungen zur NAG-Aktivität durchgeführt. Verglichen mit gesunden Hunden, war NAG bei Hunden mit einer X-chromosomal vererbten Proteinverlust-Nephropathie signifikant erhöht. NAG konnte bereits vor einem Anstieg der Serum-Kreatinin-Konzentration nachgewiesen werden (NABITY et al. 2012). Von allen in dieser Studie untersuchten Harnproteinen konnte nur beim Urin-NAG/ -Kreatinin-Quotienten ein signifikanter Anstieg festgestellt werden, bevor eine Proteinurie nachweisbar war, was diesen Parameter möglicherweise zur Frühdiagnose einer Protein-Verlust-Nephropathie eignet. NAG war jedoch nicht in der Lage den progressiven Verlauf der Erkrankung zu reflektieren. Während im frühen Krankheitsstadium ein Anstieg beobachtet werden konnte, folgte anschließend eine relativ konstante NAG-Ausscheidung (NABITY et

al. 2012). Smets und Mitarbeiter (2010) konnten zwar einen signifikanten Unterschied der NAG-Aktivität (Urin-NAG/ -Kreatinin-Quotient) bei gesunden Hunden und Hunden mit einer CKD feststellen, jedoch lag ein großer Bereich der Überlappung innerhalb der beiden Gruppen vor. Palacio und Mitarbeiter (1997) untersuchten die Aktivität verschiedener Urinenzyme, darunter auch NAG, bei 15 Hunden mit Leishmaniose. Alle Hunde wiesen histologische Nierenveränderungen auf. Die Serum-Harnstoff- und Serum-Kreatininkonzentrationen waren nicht in der Lage, die erkrankten Hunde von einer gesunden Studienpopulation zu unterscheiden, während die NAG-Aktivität bei den betroffenen Hunden signifikant erhöht war.

### **3.4. Interleukin-18**

Interleukin-18 (IL-18) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das unter anderem von den Schaltzellen (auch Zwischenzellen), welche im distalen Tubulus und Sammelrohr lokalisiert sind, synthetisiert und gespeichert wird. IL-18 induziert eine Vielzahl an proinflammatorischen Mediatoren, die bei der Progression verschiedener Nierenerkrankungen von großer Bedeutung sind. Hierzu zählen unter anderem der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ , Interleukin-1 $\beta$  sowie verschiedene Adhäsionsmoleküle, Chemokine und Matrix-Metalloproteinasen (GAUER et al. 2007). Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-18 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung einer ischämischen akuten tubulären Nekrose spielt (MELNIKOV et al 2001; MELNIKOV et al. 2002). In der Humanmedizin ist die Interleukin-18-Urinaktivität einer der vielversprechendsten neuen renalen Biomarker zur Frühdiagnose einer AKI und wird derzeit intensiv beforscht (DE LOOR et al. 2013).

Parik und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass die IL-18-Urinkonzentration bei Patient mit AKI signifikant höher war, als bei einer gesunden Kontrollgruppe sowie Patienten mit einer prärenalen Azotämie, Harnwegsinfektion, CKD oder nephrotischem Syndrom.

Eine erhöhte IL-18-Urinkonzentration war bereits 24-48 Stunden vor einem Anstieg der Serum-Kreatininkonzentration in der Lage, Patienten mit einer AKI zu identifizieren. Die initiale (Tag 0) IL-18-Urinkonzentration war außerdem ein

unabhängiger Prädiktor für die Mortalität (PARIKH et al. 2005). IL-18 war ein geeigneter Prädiktor einer AKI nach kardiopulmonalem Bypass (PARIKH et al. 2006), bei einer verzögerten Transplantatfunktion nach Nierentransplantationen (PARIKH et al. 2006a) und der Kontrast-induzierten Nephropathie (LING et al. 2008). In Anbetracht der Tatsache, dass IL-18 ein proinflammatorisches Zytokin ist, das insbesondere auch bei der Sepsis von großer Bedeutung ist, ist ein Einfluss von koexistierenden Faktoren wie Endotoxämien oder entzündlichen und autoimmunen Erkrankungen auf die IL-18-Urinkonzentration durchaus denkbar. Es ist bekannt, dass die IL-18-Plasmakonzentration bei Patienten mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen (IBD, systemischer Lupus Erythematodes, Schuppenflechte, Hepatitis und Multipler Sklerose) erhöht ist. Die proinflammatorischen Eigenschaften von IL-18 und seine Hochregulation im Rahmen von vielen entzündlichen Prozessen begrenzen somit Sensitivität und Spezifität dieses Zytokins als Biomarker der AKI (URBSCHAT et al. 2011).

Auch beim Hund wurden erhöhte IL-18-Serumkonzentrationen im Rahmen verschiedener entzündlicher Erkrankungen beschrieben, wie der primär immunvermittelten Anämie (KJELGAARD-HANSEN et al. 2011), der sinunasalen Aspergillose (PEETERS et al. 2006) und der autoimmunen Thyreoiditis (CHOI et al. 2006).

McDuffie und Mitarbeiter (2010) untersuchten verschiedene Urinparameter, darunter auch IL-18, von Hunden mit Cisplatin-induzierter AKI. Während u.a. bei Interleukin-2 und Interleukin-8 vor einem Anstieg der Serum-Kreatininkonzentration ein signifikanter Anstieg beider Zytokine verzeichnet werden konnte, wird IL-18 im Folgenden nicht weiter erwähnt.

Weitere Untersuchungen zur IL-18-Urinaktivität bei Hunden mit experimentell induzierter oder natürlich vorkommender Nierenerkrankung wurden bisher nicht durchgeführt.

### **3.5. Kidney injury molecule-1**

Das Kidney injury molecule-1 (Kim-1) ist ein transmembranes Typ 1 Glykoprotein der Zellmembran. In der Niere wird Kim-1, das unter normalen Bedingungen nur gering exprimiert wird, 8-48 Stunden nach einer ischämischen Schädigung von den

proximalen Tubulusepithelzellen hochreguliert. Man geht davon aus, dass Kim-1 bei der Dedifferenzierung und Proliferation von überlebenden Tubulusepithelzellen von Bedeutung ist und damit einen wichtigen Beitrag zur Regeneration des Tubulusepithels liefert (ICHIMURA et al. 1998). Kim-1 gilt somit als sensitiver Urinmarker für proximale Tubulusepithelschäden und wird damit insbesondere als Biomarker einer AKI beforscht.

Erhöhte Kim-1-Urinkonzentrationen wurden bei Menschen mit ischämischen, nephrotoxischen oder septischen Nierenschäden nachgewiesen, sowie bei Patienten mit polyzystischer Nierenerkrankung und Nierentumor (Review Pressler).

Liangos und Mitarbeiter (2007) stellten einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Kim-1-Urinkonzentration und dem klinischen Endpunkt (Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie, Tod) bei Patienten mit einer AKI fest.

Aktuell existieren keine Publikationen zur Kim-1-Urinkonzentration bei Hunden.

### **3.6. Neutrophilen Gelatinase-assoziiertes Lipocalin (NGAL)**

#### **3.6.1 Biologie**

Das Neutrophilen Gelatinase-assoziierte Lipocalin zählt zur Proteinfamilie der Lipocaline und ist auch als Lipocalin 2 oder Siderocalin bekannt. Das humane NGAL ist ein Protease-resistentes und damit im Urin stabiles Polypeptid mit einem Molekulargewicht von 25000 Dalton (HAASE et al. 2011a). Es wurde erstmals in aktivierten neutrophilen Granulozyten, in kovalenter Bindung mit dem Enzym Gelatinase, nachgewiesen (KJELDSEN et al. 1993). Wie alle Lipocaline ist auch NGAL auf die Bindung und den Transport kleiner, lipophiler Moleküle spezialisiert. Siderophore, von Bakterien synthetisierte und eisenbindende Moleküle, zählen zu den wichtigsten Liganden der Lipocaline. Zu den wichtigsten biologischen Funktionen von NGAL zählt der bakteriostatische Effekt durch Eisenentzug (SCHMIDT-OTT et al. 2007). NGAL ist an Wachstum und Differenzierung von Nierenepithelzellen beteiligt (YANG et al. 2002), besitzt als NGAL-Siderophoren-Eisenkomplex eine regulatorische Funktion im renalen Eisenstoffwechsel und wirkt

nach Induktion einer ischämischen AKI (Mausmodell) proliferations- und epithelisierungsfördernd (MISHRA et al. 2004).

Während NGAL unter physiologischen Bedingungen nur in geringen Mengen in neutrophilen Granulozyten (BORREGAARD et al. 1995) und unterschiedlichen menschlichen Geweben (v.a. Trachea, Lungen, Magen, Kolon) exprimiert wird (COWLAND et al. 1997, FRIEDL et al. 1999), konnte eine deutliche Induktion in stimulierten Epithelzellen festgestellt werden. Neben einer Nierenschädigung (MISHRA et al. 2004) konnte eine NGAL-Expression auch im Rahmen einer epithelialen Entzündung des Darms (PLAYFORD et al. 2006), der Haut und der Atemwege (COWLAND et al. 2003), sowie bei bakteriellen Infektionen (FLO et al. 2004) und Tumorerkrankungen (DEVARAJAN 2007, HANAI et al. 2005, NIELSEN et al. 1996) beobachtet werden.

### **3.6.2. NGAL als renaler Biomarker**

In einem genomweiten Screening (Tiermodell) wurde das NGAL als eines der frühest induzierten Gene bzw. Proteine bei ischämischer oder toxischer Nierenschädigung identifiziert (MISHRA et al. 2003, SUPAVEKIN et al. 2003). Verglichen mit dem Expressionsmuster im gesunden Organ, konnte ein bis zu 1000-facher NGAL-mRNA-Anstieg festgestellt werden (MORI et al. 2005).

#### **3.6.2.1. Syntheseorte von NGAL**

Das NGAL-Protein kann in Blut und Urin nachgewiesen werden. Es existieren zwei Sammelbecken, ein renaler (uNGAL) und ein systemischer Pool (sNGAL).

Im Rahmen einer akuten Nierenschädigung kommt es in den distalen Anteilen des Nephrons - speziell im dicken aufsteigenden Teil der Henle-Schleife und im Sammelrohr - zu einer massiven Hochregulation der NGAL-mRNA-Expression (SCHMIDT-OTT et al. 2006). Obwohl Plasma-NGAL frei durch das Glomerulum filtriert wird, erscheint es nicht im Urin, da im proximalen Tubulus eine effektive Megalin-vermittelte Endozytose stattfindet. MORI und Mitarbeiter (2005) konnten zeigen, dass sich systemisch injiziertes, markiertes NGAL zwar im proximalen Tubulus anreichert, aber später nicht im Urin erscheint. Eine Urin-NGAL-Ausscheidung liegt somit nur dann vor, wenn der proximale Tubulus geschädigt ist

und eine Reabsorption nicht möglich und/ oder die NGAL-de novo-Synthese gesteigert ist. Die Urin-NGAL-Ausscheidung ist ein Real-time Indikator der aktiven Nierenschädigung (MORI et al. 2007).

Der systemische NGAL-Pool scheint die Nieren nicht als Ursprungsquelle zu haben. In Tierstudien konnte beobachtet werden, dass das in der Niere nach einseitiger Ischämie synthetisierte NGAL kaum der Zirkulation zugeführt wird (Blutprobenentnahme aus ipsilateraler Nierenvene), jedoch reichlich im ipsilateralen Ureter nachgewiesen werden kann (SCHMIDT-OTT et al. 2007).

Entfernte Organe, besonders Leber und Lunge, werden jedoch bei einer Schädigung der Niere ebenfalls zur NGAL-Produktion veranlasst und ihre NGAL-Proteine werden dem Blutkreislauf zugeführt (GRIGORYEV et al. 2008). Darüber hinaus kann als Akute-Phase-Reaktion eine Freisetzung aus neutrophilen Granulozyten zum systemischen Pool beitragen. Außerdem führt eine Abnahme der GFR zu einer verminderten renalen Clearance von NGAL und damit zu einer vermehrten Akkumulation im systemischen Kreislauf. Die Auswirkungen dieser Mechanismen auf einen Anstieg der Plasma-NGAL-Konzentration im Rahmen einer AKI müssen noch geklärt werden (DEVARAJAN 2010).

### **3.6.2.2. Klinischer Einsatz von NGAL**

#### **3.6.2.2.1. Tiermodell**

Am Mausmodell konnte gezeigt werden, dass NGAL bereits 2 Stunden (erster Urinabsatz) nach Induktion einer ischämischen Nierenschädigung (unilaterale bzw. bilaterale Ischämie über 45 bzw. 30 Minuten) bei allen Versuchstieren im Urin nachgewiesen werden kann. Während der Serum-Kreatininspiegel keine Veränderung zum Ausgangswert zeigte, konnte bei allen Versuchsmäusen eine deutliche NGAL Induktion auch im Rahmen einer milden, subklinischen renalen Ischämie (bilaterale Ischämie über 5, 10 oder 20 Minuten) nachgewiesen werden.

Verglichen mit jenen Tieren, bei denen eine ausgeprägte Nierenischämie erzeugt wurde, konnte NGAL erst leicht zeitverzögert im Urin nachgewiesen werden (nach 4 Stunden bei 10- und 20-minütiger Ischämie bzw. nach 6 Stunden bei 5-minütiger Ischämie). Im Urin der Kontrollgruppe fand sich kein NGAL. Die NGAL-

Ausscheidung korreliert somit eng mit Grad und Dauer der Nierenschädigung (MISHRA et al. 2003).

#### **3.6.2.2.2. Humanmedizin**

MORI und Mitarbeiter (2005) konnten dann auch beim Menschen mit AKI eine ausgeprägte Akkumulation von NGAL in Urin, Serum und renalen Tubuluszellen belegen. Verglichen mit der Ausgangskonzentration war die sNGAL-Konzentration um das 7-fache und die uNGAL-Konzentration um das 25-fache erhöht.

Verschiedene Arbeitsgruppen bewiesen anschließend auch den großen klinischen Nutzen von NGAL.

Seriell gewonnene Serum- und Urinproben von 71 Kindern wurden nach kardiopulmonalem Bypass zur Behandlung von angeborenen Herzerkrankungen auf die NGAL-Freisetzung hin untersucht. Die Urin- und Serum-NGAL-Ausgangswerte waren bei allen Kindern niedrig und vergleichbar mit den Werten der Kontrollgruppe. 20 Kinder entwickelten nach dem Eingriff eine AKI (definiert als 50%iger Anstieg des Serumkreatinins vom Basiswert). Bei Patienten mit AKI stiegen die Serum- und Urin-NGAL-Werte 2 Stunden nach Bypass signifikant an ( $p < 0,0001$ ). Ein Serum-Kreatinin-Anstieg konnte bei acht Patienten nach 24-48 Stunden, bei 12 Patienten sogar erst nach 48-72 Stunden beobachtet werden. Der 2 Stunden nach Herzchirurgie ermittelte uNGAL-Wert war der stärkste unabhängige Prognosefaktor für eine akute Nierenschädigung. Urin-NGAL-Werte  $> 50 \mu\text{g/l}$  gingen mit einer Sensitivität von 100 % und einer Spezifität von 98 % einher (MISHRA et al. 2005).

Auch beim erwachsenen Patienten ist die Bestimmung von NGAL aus Urin nach einer kardiopulmonalen Bypass-Operation ein Prädiktor für die Entwicklung einer AKI (WAGENER et al. 2006, TULADHAR et al. 2009). Obwohl die uNGAL-Werte zunächst bei allen Patienten unmittelbar nach der Bypass-Operation signifikant vom Ausgangswert anstiegen, kehrten die Werte bei Patienten ohne AKI innerhalb von einer Stunde wieder zum Basalwert zurück. Patienten mit akuter Nierenschädigung (definiert als 50%iger Anstieg des Serumkreatinins vom Basiswert) hatten signifikant höhere uNGAL-Peak-Werte und die uNGAL-Werte blieben nach dem Eingriff über



24 Stunden erhöht. Die Serumkreatinin-Messung 24 Stunden nach der Bypass-Operation war nicht in der Lage jene Patienten mit einer AKI zu erkennen (WAGENER et al. 2006).

Die Höhe der Urin-NGAL-Konzentration korreliert eng mit Dauer und Schwere der AKI, der Dauer des Krankenhausaufenthaltes, der Notwendigkeit einer Dialyse und dem Tod (BENETT et al. 2008).

Eine einzige Urin-NGAL-Messung zum Zeitpunkt der Einlieferung in der Notaufnahme kann eine akute Nierenschädigung von einer prärenalen Azotämie, einer nicht-progressiven chronischen Nierenerkrankung und einer normalen Nierenfunktion unterscheiden. Die Werte für Serumkreatinin weisen in diesen vier Gruppen eine starke Überlappung auf. Urin-NGAL erkennt die AKI unabhängig von der Ursache der Nierenschädigung. Verglichen mit anderen neuen Biomarkern einer AKI (N-Acetyl- $\beta$ -D-Glukosaminidase, Alpha-1-Mikroglobulin, Alpha-1-saures Glykoprotein) ist NGAL besser zur Detektion einer AKI geeignet und hat einen höheren Stellenwert als Prädiktor, auch für andere klinische Endpunkte wie die Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie, Aufnahme auf die Intensivstation und Krankenhausmortalität (NICKOLAS et al. 2008).

In der Humanmedizin ist Cisplatin eines der am häufigsten verwendeten Chemotherapeutika zur Behandlung von soliden Tumoren. Der Einsatz von Cisplatin ist jedoch aufgrund der erheblichen Nephrotoxizität begrenzt. 25-35% der Chemotherapiepatienten entwickeln eine AKI. Im Mausmodell einer Cisplatin-induzierten nephrotoxischen Nierenschädigung stieg NGAL bereits 3 Stunden nach Cisplatin-Gabe dosis- und zeitabhängig an, während keine nennenswerten Serumkreatinin-Veränderungen bis zu 96 Stunden nach Cisplatin-Injektion verzeichnet werden konnten (MISHRA et al. 2004). Auch beim Menschen kann ein früher Anstieg der uNGAL-Konzentration zur Detektion einer Cisplatin-induzierten AKI (definiert als 25%iger Anstieg des Serumkreatinins vom Ausgangswert) beitragen. Zu diesem Fazit kamen Gaspari und Mitarbeiter (2009). Ein Anstieg der Urin-NGAL-Konzentration 2 Tage nach Cisplatin-Verabreichung erlaubte die Vorhersage einer AKI ( $p < 0,05$ ). NGAL war dem Serumkreatinin-Anstieg um  $4,5 \pm 2,2$  Tage voraus.

Bei der Kontrastmittel-induzierten Nephropathie (KMN) handelt es sich um die dritthäufigste Ursache einer im Krankenhaus erworbenen AKI. Verschiedene Forschungsgruppen untersuchten den Wert von NGAL als prädiktiven Biomarker einer Kontrastmittelnephropathie. In prospektiven Studien an Kindern und Erwachsenen erlaubte eine Urin- oder Plasma-NGAL-Bestimmung innerhalb weniger Stunden nach Kontrastmittel-Applikation die Vorhersage einer KMN (HIRSCH et al. 2007, LING et al. 2008). Eine Metaanalyse von Haase und Mitarbeitern (2009) ergab eine AUC-ROC von 0,894 für die Vorhersage einer KMN (AKI definiert als 25%iger Anstieg des Serumkreatinins vom Ausgangswert).

In großen, multizentrischen Studien bewährte sich NGAL in der Transplantationsmedizin außerdem als Parameter zur Vorhersage einer verzögerten Transplantat-Funktion (definiert als Notwendigkeit einer Dialyse innerhalb der ersten postoperativen Woche) nach Nierentransplantation. Eine einzige Urin-NGAL-Messung am Tag der Transplantation identifizierte jene Patienten, die eine verzögerte Transplantations-Funktion (tritt in der Regel 2-4 Tage nach Transplantation auf) entwickelten (HALL et al. 2010, PARIKH et al. 2006a).

Aufgrund seines hohen prädiktiven Wertes wurde NGAL auch bereits als Biomarker zur Überwachung interventioneller Studien eingesetzt. Die Urin-NGAL-Konzentration wurde herangezogen, um die Nierenfunktion unter Verwendung eines neuartigen kardiopulmonalen Bypass-Systems, verglichen mit dem aktuellen Bypass-Standard, zu beurteilen (CAPUANO et al. 2009). HAASE und Mitarbeiter (2009a) bewiesen in einer doppelblinden, randomisierten, kontrollierten Studie an 100 erwachsenen kardiochirurgischen Patienten, dass die Urin-NGAL-Konzentration in der Lage ist den nephroprotektiven Effekt von Natriumbikarbonat zur Prävention der akuten Nierenschädigung, verglichen mit einer Kontrollgruppe (Natriumchlorid), zu detektieren.

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass NGAL auch als Marker einer chronischen Nierenerkrankung und deren Schweregrad geeignet ist. In einer Studie an 45 Kindern und Jugendlichen mit CKD Stadium 2-4 korrelierte die Serum-NGAL-Konzentration eng mit der Serum-Kreatininkonzentration und der GFR (Ioversol-Clearance). Bei einer stärkeren Nierenfunktionsstörung mit einer GFR < 30

ml/min/1,73m<sup>2</sup> KOF korreliert die Serum-NGAL-Konzentration besser mit der GFR als Serum-Kreatinin und Cystatin C (MITSNEFES et al. 2007). Verschiedene Studien von Bolignano und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Urin- und Serum-NGAL-Werte von Patienten mit einer CKD unterschiedlicher Ursache signifikant höher waren, verglichen mit der Kontrollgruppe. NGAL (sNGAL, uNGAL) korrelierte eng mit der Serum-Kreatininkonzentration und der GFR (NGAL korrelierte stärker mit der GFR als Serum-Kreatinin). NGAL ist ein besserer Prädiktor für die GFR als Serum-Kreatinin. Die NGAL-Konzentration ist ein Indikator für die Schwere der Nierenschädigung und ein starker, unabhängiger Prädiktor für die Progression (definiert als Verdopplung des Serum-Kreatinin-Ausgangswertes und/ oder der Entwicklung einer Nierenerkrankung im Endstadium) einer CKD. Alle Probanden mit einem progressiven Verlauf wiesen signifikant höhere sNGAL- und uNGAL-Werte auf als jene ohne Progression (BOLIGNANO et al. 2008, BOLIGNANO et al. 2009). Yilmaz und Mitarbeiter (2009) konnten zeigen, dass uNGAL auch bei einer Harnwegsinfektion erhöht ist. Die Urin-NGAL-Konzentration ist nach Ausschluss einer AKI und CKD für die Vorhersage einer Harnwegsinfektion geeignet.

Das biologische Material (Blut, Urin) zur Bestimmung der NGAL-Konzentration ist jederzeit und nicht-invasiv verfügbar. Für die Humanmedizin sind bereits Schnelltests (patientennahe Labordiagnostik) erhältlich. Sowohl für die Bestimmung der Urin-, als auch der Plasma-NGAL-Konzentration sind nur Probenmengen im Mikroliter-Bereich notwendig. Das Ergebnis liegt innerhalb einer halben Stunde vor. NGAL erfüllt damit auch viele Anforderungen an einen guten Biomarker (DEVARAJAN 2010).

### **3.6.2.2.3. NGAL beim Hund**

Über die Serum- und Urin-NGAL-Konzentrationen bei Hunden existieren bisher nur wenige Daten.

Nabity und Mitarbeiter (2012) untersuchten verschiedene renale Biomarker, darunter NGAL (UNKQ), bei 25 Hunden mit X-chromosomal vererbter Nierenerkrankung (Proteinverlust-Nephropathie) und 19 gesunden Wurfgeschwistern. Der UNKQ war bereits in frühen Stadien der Erkrankung (vor einem Anstieg der Serum-Kreatininkonzentration) in der Lage gesunde von erkrankten Hunden zu

unterscheiden. Mit Fortschreiten der Nierenerkrankung (definiert als Anstieg der Serum-Kreatininkonzentration, Abnahme der GFR, Nachweis von interstitieller Fibrose in der pathohistologischen Untersuchung von Nierenbiopsien) wurden jedoch relativ konstante UNKQ-Werte detektiert. Progressive Veränderungen werden so in späteren Stadien einer Nierenerkrankung möglicherweise nicht erkannt.

Nach Induktion einer Gentamicin-induzierten nephrotoxischen AKI konnte bei zwei von sechs Hunden ein 7-facher Anstieg von uNGAL vom Ausgangswert an Tag 5 bzw. Tag 9 beobachtet werden. Der Serum Kreatinin-Wert blieb bis Tag 14 bzw. Tag 16 im Referenzbereich. Zum Zeitpunkt einer Verdopplung des Kreatinins vom Ausgangswert konnte ein Anstieg des uNGAL um das 789-fache festgestellt werden (Palm et al. 2012).

Lee und Mitarbeiter (2012) verglichen die sNGAL- und uNGAL-Werte von 12 Hunden mit AKI (definiert als Serum-Kreatinin-Anstieg um 26,5 µmol/l oder mehr vom Ausgangswert innerhalb von 48 Stunden) nach verschiedenen chirurgischen Eingriffen, mit jenen die keine AKI (27 Hunde) entwickelten.

Die Hunde der AKI-Gruppe wiesen 12 Stunden nach dem Eingriff signifikant höhere uNGAL-Konzentrationen auf. Im Gegensatz dazu konnten bis 24 Stunden nach dem Eingriff innerhalb der beiden Gruppen keine Unterschiede in der Serum-Kreatininkonzentration festgestellt werden. Die Urin-NGAL-Konzentration ist auch beim Hund ein prädiktiver Biomarker für eine AKI nach chirurgischen Eingriffen.

Auch KAI und Mitarbeiter (2013) untersuchten den Nutzen von uNGAL als sensitiven Biomarker einer Gentamicin-induzierten AKI. Zwei männlichen Beaglen wurde über 9 Tage Gentamicin in einer Dosis von 25 mg/kg (Hund 1) bzw. 50 mg/kg (Hund 2) einmal täglich subkutan appliziert. Die Urin-NGAL-Konzentration wurde zu den Zeitpunkten -6, 3, 5 und 10 gemessen und mit der Serum-Kreatininkonzentration, bestimmt zu den Zeitpunkten -5, 1, 3, 5 und 10 und der an Tag 10 post Euthanasie durchgeführten pathohistologischen Untersuchung verglichen.

Ein signifikanter Anstieg der Urin-NGAL-Konzentration um das 141-fache vom Ausgangswert konnte bei Hund 1 (25 mg/kg Gentamicin/Tag) an Tag 10 festgestellt werden. Die Serum-Kreatininkonzentration zeigte während des gesamten Versuchs

keine klinisch relevanten Veränderungen (weniger als 25 % vom Ausgangswert). Histologisch fanden sich lediglich milde Nierenveränderungen.

Bei Hund 2 (50 mg/kg Gentamicin/Tag) konnte ein 32-facher bzw. 225-facher Anstieg an Tag 3 bzw. 5 vom Basalwert detektiert werden. Aufgrund einer sistierenden Harnproduktion war eine Uringewinnung an Tag 10 nicht möglich. Eine deutliche Veränderung der Serum-Kreatininkonzentration wurde bei Hund 2 erst an Tag 10 festgestellt. Die pathologische Untersuchung der Nieren ergab bereits makroskopisch deutliche Abweichungen von der Norm und auch histologisch wurden ausgeprägte Nierenveränderungen (z.B. tubuläre Nekrose) festgestellt. Die Urin-NGAL-Konzentration scheint somit ein sensitiver Indikator der Gentamicin-induzierten AKI beim Hund zu sein und steigt früher und stärker an als Kreatinin.

Der UNKQ ist ein sensitiver und spezifischer Marker sowohl für azotämische, als auch für frühe nicht-azotämische Formen der AKI. Zu dieser Schlussfolgerung kamen Segev und Mitarbeiter (2013), indem sie 94 Hunde untersuchten (gesunde Hunde, Hunde mit einer Erkrankung der unteren Harnwege, Hunde mit chronischer Nierenerkrankung, Hunde mit einer AKI und Azotämie sowie Hunde mit einer AKI und Serum-Kreatininwerten im Normbereich, welche im Verlauf des stationären Aufenthaltes eine AKI mit Azotämie entwickelten). Hunde mit einer AKI (unabhängig vom Schweregrad) wiesen einen signifikant höheren UNKQ auf, verglichen mit allen anderen Studiengruppen ( $p < 0,001$ ). Weiterhin bestand ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,005$ ) der UNKQ Werte bei Hunden mit einer chronischen Nierenerkrankung (CKD) und Hunden mit einer unteren Harnwegserkrankung (bakterielle Zystitis, Neoplasie, Urolithiasis) sowie bei Hunden mit einer CKD und gesunden Hunden ( $p < 0,001$ ). Hunde mit einer Erkrankung der unteren Harnwege wiesen einen höheren UNKQ auf als gesunde Hunde ( $p < 0,001$ ).

Im Vergleich mit 42 gesunden Hunden wiesen 11 Hunde mit CKD signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere NGAL-Werte (sNGAL, uNGAL, UNKQ) auf. sNGAL ( $p = 0,0001$ ), uNGAL ( $p < 0,0001$ ) und der UNKQ ( $p < 0,0001$ ) korrelierten signifikant mit der Serum-Kreatininkonzentration. Bei den Hunden mit CKD ergab sich sowohl für Serum-Kreatinin, als auch für sNGAL eine signifikante ( $p < 0,005$ ), gute Korrelation ( $r = 0,77$  für beide Parameter) mit der initial gemessenen GFR (Plasma-Clearance von Technetium-99m-Diethylentriaminpentaessigsäure). 6 Monate später (Studienende)

korrelierte die GFR zusätzlich zu Serum-Kreatinin und sNGAL auch mit uNGAL ( $r = 0,76$ ;  $p = 0,029$ ) und dem UNKQ ( $r = 0,74$ ;  $p = 0,036$ ). sNGAL ( $r = 0,83$ ;  $p = 0,01$ ) und uNGAL wiesen zu diesem Zeitpunkt eine bessere Korrelation mit der GFR auf, als die Serum-Kreatininkonzentration ( $r = 0,72$ ;  $p = 0,02$ ). Signifikante Abweichungen der GFR zu Beginn der Studie und nach 6 Monaten wurden nicht festgestellt (COBRIN et al. 2013).

Cobrin und Mitarbeiter (2013) verglichen außerdem die Serum- und Urin-NGAL-Konzentrationen von gesunden Hunden ( $n = 42$ ), Hunden mit CKD ( $n = 11$ ), Hunden mit Tumorerkrankungen ohne renale Beteiligung (21 Hunde mit Lymphosarkom, 12 Hunde mit Karzinom) und Hunden mit induzierter (5  $\mu\text{g}/\text{kg}$  E.coli-Lipopolysaccharide intravenös) Sepsis ( $n = 15$ ). sNGAL war signifikant höher bei Hunden mit CKD, Lymphosarkom, Karzinom und Sepsis als bei gesunden Hunden. Mit Ausnahme der Sepsis-Hunde, waren uNGAL und UNKQ verglichen mit der gesunden Studienpopulation bei allen Studiengruppen signifikant erhöht. Innerhalb der Gruppen CKD, Lymphosarkom und Karzinom konnte kein signifikanter Unterschied in der Serum-oder Urin-NGAL-Konzentration festgestellt werden. Innerhalb der Gruppen CKD und Karzinom ergab sich bezüglich des UNKQ ebenfalls kein statistisch signifikanter Unterschied. Aufgrund der stärkeren Beeinflussung der Serum-NGAL-Konzentration durch nicht-renale Erkrankungen und der damit verbundenen verminderten Spezifität von sNGAL als Biomarker einer Nierenschädigung, scheint insbesondere der UNKQ von großer klinischer Bedeutung zu sein. Erhöhte NGAL-Konzentrationen sollten daher bei Hunden mit Tumorverdacht oder diagnostizierter Tumorerkrankung mit Vorsicht interpretiert werden. Möglicherweise ist NGAL außerdem als Marker für die Tumordiagnostik beim Hund (insbesondere bei Karzinomen) geeignet.

Daure und Mitarbeiter (2013) untersuchten den Einfluss einer Harnwegsinfektion auf die Urin-NGAL-Konzentration. In die Studie eingeschlossen wurden 80 nicht-azotämische Hunde mit Verdacht auf eine Harnwegsinfektion sowie 19 gesunde Hunde. Basierend auf dem Resultat der bakteriologischen Urinkultur wurden die Studienpatienten in drei Gruppen eingeteilt: 19 gesunde Hunde (Kontrollgruppe), 25 Hunde mit positiver Harnkultur (positive Gruppe), 55 Hunde mit Verdacht auf eine bakterielle Harnwegsinfektion, aber negativer Urinkultur (negative Gruppe). NGAL

(uNGAL, UNKQ) war bei den Patienten der positiven Gruppe signifikant ( $p < 0,0001$ ) erhöht, verglichen mit der Kontrollgruppe und der negativen Gruppe. Soll die Urin-NGAL-Konzentration als diagnostischer Indikator einer Nierenerkrankung herangezogen werden, sollte eine Harnwegsinfektion daher immer über eine Harnkultur ausgeschlossen werden. Ein uNGAL Cut-off-Wert von 3,38 ng/ml erlaubt eine Differenzierung der Hunde mit Harnwegsinfektion und der nicht betroffenen Hunde mit einer Sensitivität und Spezifität von 76 % bzw. 70 %. Aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität ist der Cut-off-Wert daher weniger zur klaren Trennung beider Gruppen geeignet, kann aber bei Patienten mit vermutetem Harnwegsinfekt möglicherweise zur Entscheidung beitragen, ob eine Antibiotikatherapie bereits vor Erhalt des Kulturbefundes eingeleitet werden sollte.

Hsu und Mitarbeiter (2014) untersuchten den diagnostischen und prognostischen Wert von sNGAL und uNGAL bei 57 Hunden mit einer Azotämie (definiert als Serum-Kreatinin  $> 1,5$  mg/dl). Ausgeschlossen wurden lediglich jene Patienten mit einer postrenalen Azotämie aufgrund einer Harnwegsobstruktion. 17 Patienten wurden der Gruppe AKI und 40 Hunde der Gruppe CKD zugeordnet. 12 gesunde Hunde bildeten die Kontrollgruppe. Das Überleben war definiert als 30 (AKI) bzw. 90 (CKD) Tage nach Diagnosestellung. Infolge der Nierenfunktion euthanasierte Hunde wurden als verstorben klassifiziert. Eine Euthanasie aus anderen Gründen führte zum Studienausschluss.

Hunde mit einer Azotämie wiesen signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere Serum- und Urin-NGAL-Konzentrationen auf als die Kontrollgruppe. NGAL ist in der Lage, Hunde mit einer eingeschränkten Nierenfunktion zu erkennen. Alle verstorbenen Hunde der CKD-Gruppe wiesen außerdem signifikant höhere NGAL-Werte (sNGAL, uNGAL) auf, verglichen mit den Überlebenden. Bei einer Serum-NGAL-Konzentration  $\geq 50,6$  ng/ml betrug die mittlere Überlebenszeit der Hunde mit CKD 7 Tage, ein sNGAL unterhalb des Cut-off-Wertes ging mit einer signifikant längeren mittleren Überlebenszeit von 35 Tagen einher. sNGAL war ein besserer prognostischer Indikator als Serum-Kreatinin bei Hunden mit CKD. Ähnliche Zusammenhänge konnten in der AKI-Gruppe nicht festgestellt werden. Eine zu geringe statistische Power ist hier jedoch aufgrund der geringen Fallzahl möglich.

Die Serum-NGAL-Konzentration ist kein verlässlicher Indikator für die Schwere der Erkrankung bei Hunden mit CKD. Zu diesem Ergebnis kamen Ahn und Hyun (2014). 62 Hunde mit CKD wurden, basierend auf den Richtlinien der International Renal Interest Society (IRIS), in die Stadien I (n = 7), II (n = 8), III (n = 40) und IV (n = 7) gruppiert. 8 gesunde Hunde bildeten die Kontrollgruppe. Die Serum-NGAL-Konzentrationen zeigen innerhalb aller Gruppen, insbesondere innerhalb der IRIS Stadien I-III, deutliche Überlappungen. Statistisch signifikante Unterschiede fanden sich lediglich zwischen der Kontrollgruppe und den IRIS Stadien III und IV sowie zwischen dem IRIS Stadium IV und allen anderen IRIS Stadien.



### **III. MATERIAL UND METHODEN**

#### **1. Gesunde Hunde**

Zwischen September 2011 und Oktober 2011 wurden insgesamt 20 Hunde untersucht. Hierbei handelte es sich um Tiere von Mitarbeitern und um private Blutspender der Klinik für Kleintiere der Justus–Liebig–Universität Gießen. Detaillierte Angaben zur Studienpopulation können der Tabelle 11 entnommen werden. Die Studie wurde vom Regierungspräsidium Gießen unter der Nummer 35/2011 bewilligt.

##### **1.1. Einschlusskriterien**

In die Studie eingeschlossen wurden adulte (über ein Jahr alt), für den Besitzer klinisch unauffällige (ungestörtes Allgemeinbefinden, normale Futter- und Wasseraufnahme, ungestörter Kot- und Urinabsatz) Hunde. Weiterhin waren Normalbefunde in der klinischen und labordiagnostischen (Hämatologie, Blutchemie, Urinuntersuchung) Untersuchung erforderlich. Zum Ausschluss einer Nierenerkrankung wurde bei jedem Patienten zusätzlich der Blutdruck gemessen und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt.

##### **1.2. Ausschlusskriterien**

Von der Studie ausgeschlossen wurden Hunde mit einer Nierenerkrankung oder einer Erkrankung mit sekundärer Beeinträchtigung der Nierenfunktion (z.B. Herzerkrankung, Diabetes mellitus, Hypo-/ Hyperadrenokortizismus). Des Weiteren führte eine weniger als 4 Wochen zurückliegende Einnahme von Medikamenten, welche die Nierenfunktion beeinflussen (z.B. Diuretika, Kortikosteroide, Antibiotika, NSAIDs, ACE-Inhibitoren) zum Studienausschluss. Hunde mit einer kürzer als 4 Wochen zurückliegenden Anästhesie oder Blutspende sowie Hunde mit einem Blutdruck > 150mmHg wurden ebenfalls von der Teilnahme ausgeschlossen.

### **1.3. Signalement, Anamnese und klinische Untersuchung**

Von jedem Patienten wurden Rasse, Geschlecht und Alter dokumentiert und das exakte Körpergewicht zum Zeitpunkt der Vorstellung ermittelt. Neben einer genauen Anamneseerhebung wurden eine ausführliche allgemeine und spezielle klinische Untersuchung durchgeführt. Anamnestisch wurden insbesondere auch das Trinkverhalten und der Urinabsatz detailliert erfragt. Bei der klinischen Untersuchung wurde speziell auf mögliche Symptome einer Nierenerkrankung, wie eine abnormale Nierenpalpation, Dehydratation, Schleimhautbefunde und ein verminderter Ernährungszustand geachtet. Weiterhin wurde von jedem Studienpatienten der systolische Blutdruck nicht-invasiv mittels Doppler-Sphygmomanometrie gemessen. Hierfür wurde der Patient in rechte Seitenlage verbracht und das Haarkleid der linken Vordergliedmaße proximal des Ballens im Bereich des Arcus palmaris superficialis ausgeschieden. Die Blutdruckmanschette wurde so ausgewählt, dass ihre Breite ca. 40% des Gliedmaßenumfangs betrug. Anschließend wurde die Manschette distal des Ellbogens (auf Höhe der Herzbasis) angelegt und mit einem Manometer verbunden. Nach Aufbringen von Ultraschallgel auf den Ultraschallsensor wurde das akustische Pulssignal gesucht. Mit dessen Erhalt wurde die Blutdruckmanschette aufgeblasen, bis das akustische Signal nicht mehr hörbar war, jedoch maximal 40mmHg über diesen Wert. Anschließend wurde der Druck wieder langsam abgelassen. Der Druck, bei dem das Doppler-Signal wieder hörbar war, wurde als systolischer Blutdruck angenommen (STEPIEN 2010, BROWN et al. 2007). Systolische Blutdruckwerte bis 150mmHg wurden als physiologisch eingestuft (STEPIEN & RAPOPORT 1999).

### **1.4. Labordiagnostische Untersuchungen**

Von jedem Studienpatienten wurden bei der Vorstellung Blut- und Urinproben gewonnen. Diese wurden umgehend nach der Entnahme von den medizinisch-technischen Assistenten des Labors der Klinik für Kleintiere aufgearbeitet. Von jedem Patienten wurden außerdem Blut- und Urinproben zur späteren Bestimmung von NGAL eingefroren. Weiterhin wurde bei jedem Hund eine Inulin-Plasmaclearance durchgeführt. Die weiterführenden labordiagnostischen Untersuchungen wurden zur Abklärung einer normalen Nierenfunktion, sowie zum

Ausschluss einer bestehenden Erkrankung vorgenommen. Alle Patienten wurden für die weiterführenden Untersuchungen nüchtern (keine Futteraufnahme über mindestens 12 Stunden) vorgestellt.

#### **1.4.1. Blutuntersuchung**

Die Blutproben wurden aus der Vena cephalica antebrachii oder Vena saphena entnommen und umgehend nach der Entnahme labordiagnostisch aufbereitet. Von jedem Patienten wurde eine vollständige hämatologische und blutchemische Untersuchung durchgeführt. Außerdem wurden Blutproben bei 10.000 RPM für 1 Minute abzentrifugiert und das Heparin-Plasma bei -80°C zur späteren Bestimmung von NGAL eingefroren.

**Tabelle 8:** Einzelparameter und Bestimmungsmethoden der Blutuntersuchung

<b>Parameter</b>	<b>Testmethode</b>
Hämatologie: Hämatokrit, Erythrozytenzahl, Hämoglobinkonzentration, Leukozytenzahl, Thrombozytenzahl	ADVIA® 2120 Siemens Healthcare Diagnostics GmbH (Eschborn, Deutschland)
Chemieprofil: Harnstoff, Kreatinin, Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium ionisiert, Phosphat, Magnesium gesamt/ ionisiert, Gesamteiweiß, Albumin, Globulin, Glukose, Bilirubin, Cholesterin, Triglyzeride, Alkalische Phosphatase, Alanin-Aminotransferase, Glutamatdehydrogenase, Kreatinkinase	Pentra 400 ABX Horiba (Darmstadt, Deutschland)

### 1.4.2.        **Urinuntersuchung**

Für die Urinuntersuchung wurde ausschließlich steril gewonnener Harn verwendet. Zur Probengewinnung wurde bei Hündinnen eine ultraschallgestützte Zystozentese durchgeführt, Rüden wurden für die Urinentnahme katheterisiert. Der Urin wurde direkt im Anschluss an die Entnahme bei 2500 RPM für 10 Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und Überstand und Sediment labordiagnostisch weiter aufbereitet. Die Urin - Screeninguntersuchung umfasste die Bestimmung des urinspezifischen Gewichts, die semiquantitative Teststreifenuntersuchung und eine mikroskopische Sedimentuntersuchung. Sofern von den Tierbesitzern mitgebracht, wurde auch von Morgenurin (Spontanurin) eine Bestimmung des spezifischen Gewichts vorgenommen. Für eine spätere Berechnung des Urin-NGAL/ Kreatinin-Quotienten (UNKQ) wurde bei allen Patienten zusätzlich eine quantitative Bestimmung von Kreatinin durchgeführt. Bei allen Hunden die in der semiquantitativen Teststreifenuntersuchung eine Proteinurie aufwiesen, wurde außerdem der Urin-Protein/ Kreatinin-Quotient berechnet. Weiterhin wurde von allen Patienten eine bakteriologische Urinuntersuchung im Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Leiter: Prof. Dr. C. Ewers) durchgeführt. Zusätzlich wurde zur späteren Bestimmung des NGAL - Gehaltes ein Teil des Urinüberstandes umgehend bei -80°C eingefroren.

Die einzelnen Parameter der Urinuntersuchung, sowie die jeweils verwendeten Bestimmungsmethoden sind der Tabelle 9 zu entnehmen.

**Tabelle 9:** Einzelparameter und Bestimmungsmethoden der Urinuntersuchung

<b>Parameter</b>	<b>Testmethode</b>
<b>Spezifisches Gewicht</b>	Handrefraktometer A. Krüss (Hamburg, Deutschland)
<b>Semiquantitative Teststreifenuntersuchung:</b> pH-Wert, Eiweiß, Glukose, Bilirubin,	Harnanalysesystem „Clinitek® STATUS“ Bayer Vital GmbH (Fernwald, Deutschland)

Urobilinogen, Nitrit, Ketonkörper, Blut/ Hämoglobin	Teststreifen Multistix® 10 SG Siemens Healthcare Diagnostics GmbH (Eschborn, Deutschland)
<b>Kreatinin</b>	Enzymatischer Farbttest „CREA PAP“ Axonlab AG (Stuttgart, Deutschland)
<b>Urinprotein</b>	Pyrogallolrot-Methode
<b>Mikroskopische Sedimentuntersuchung (40fache Vergrößerung):</b> Zellen, Zylinder, Kristalle, Bakterien	Binokulares Mikroskop „Olympus CX31“ Olympus Deutschland GmbH (Hamburg, Deutschland)  Zentrifuge
<b>Bakteriologische Urinuntersuchung:</b> Blut-Agar, Gassner Agar; Anzucht über 48h bei 37°C; Begutachtung nach 24h und 48h), Serumbouillon; Anzucht über 24h bei 37°C, anschließend Aufbringen auf Blut- und Gassner-Agar	Blut-Agar-Basis Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)  Gassner-Agar Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

### 1.4.3. Inulin - Plasmaclearance

Bei jedem Patienten wurde zur Ermittlung der GFR eine Inulin-Plasmaclearance (Single-Injektion-Methode, HALLER et al. 1998) durchgeführt. Hierfür wurde bereits anamnestisch sichergestellt, dass die Hunde mindestens 12 Stunden kein Futter aufgenommen hatten. Wasser stand den Hunden jederzeit, auch während der Untersuchungsdauer, zur Verfügung.

Das exakte Körpergewicht wurde bestimmt und im Anschluss erfolgte die Berechnung der Körperoberfläche mit folgender Formel (PLUMB 1995):

$$\text{Körperoberfläche (m}^2\text{)} = \frac{10,1 \times (\text{Körpergewicht [g]}^{2/3})}{10^4}$$

Jeder Patient erhielt zwei, an unterschiedlichen Gliedmaßen lokalisierte, Venenverweilkatheter (Vena cephalica antebrachii oder Vena saphena). Nach der intravenösen Applikation von  $3 \text{ g/m}^2$  Körperoberfläche Sinistrin (Inutest®, Fresenius Kabi Austria GmbH) über 30 Sekunden folgten Blutprobenentnahmen 3, 20, 40, 80 und 120 Minuten nach der Injektion. Um einer Kontamination der Blutproben mit Sinistrinresten vorzubeugen, wurden Sinistrininjektion und Blutprobenentnahme an unterschiedlichen Venenverweilkathetern vorgenommen. Im weiteren Verlauf wurden die Blutproben nach ausreichender Gerinnung bei 10.000 RPM für 1 Minute abzentrifugiert und das Serum bei  $-20^\circ\text{C}$  eingefroren und anschließend verschickt. Die Sinistrinbestimmung wurde im veterinärmedizinischen Labor ALOMED (Radolfzell-Böhringen, Deutschland) durchgeführt. Für die mathematische Berechnung der GFR wurde ein spezielles Auswertungsprogramm (Software Inusoft), basierend auf einem Zweikompartement-Modell, verwendet.

## **2. Hunde mit einer Nierenerkrankung**

In die Studie eingegangen sind alle Hunde, die zwischen November 2010 und November 2011 in der Klinik für Kleintiere der Justus-Liebig-Universität Gießen bzw. der Kleintierklinik der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern mit einer Azotämie vorgestellt wurden oder während des Klinikaufenthaltes eine solche entwickelten. Insgesamt wurden 88 Hunde untersucht.

### **2.1. Einschlusskriterien**

In die Studie eingeschlossen wurden nur jene Patienten, bei denen im weiteren Verlauf eine renale Azotämie diagnostiziert wurde. Die Definition einer renalen Azotämie ist unter 2.4. beschrieben.

### **2.2. Ausschlusskriterien**

Ausgeschlossen wurden alle Hunde mit einer prä- oder postrenalen Azotämie.

### **2.3. Untersuchungen am Tier**

Die klinische Untersuchung jedes Patienten wurde durch die Tierärzte und Tierärztinnen der teilnehmenden Kliniken durchgeführt. Von jedem Patienten wurden Rasse, Geschlecht, Alter und Körpergewicht zum Zeitpunkt der Vorstellung dokumentiert und neben einer detaillierten Anamneseerhebung wurden eine gründliche allgemeine und spezielle klinische Untersuchung durchgeführt. Alle weiterführenden diagnostischen Maßnahmen erfolgten im Ermessen der betreuenden Tierärzte und umfassten in der Regel eine vollständige hämatologische und blutchemische Untersuchung, einen Harnstatus, sowie bildgebende Verfahren (Röntgen und Sonographie) des Abdomens. Im Rahmen der Blut- und Urinentnahme (Spontan-, Katheter- oder Zystozenteseharn) wurden Blut- und Urinproben (Aufbereitung der Proben wie unter 1.4.1. und 1.4.2. beschrieben) zur späteren Bestimmung von NGAL bei -80°C eingefroren. Die Probenentnahme erfolgte innerhalb von 24 Stunden nach der Vorstellung oder nach Entwicklung einer Azotämie.

### **2.4. Definition renale Azotämie**

Für das Vorliegen einer renalen Azotämie mussten folgende Faktoren erfüllt sein (GEIGY et al. 2011):

- eine Plasmakreatinin-Konzentration von  $> 122 \mu\text{mol/l}$  (oberer Referenzbereich), bestehend für mindestens 24 Stunden nach Ausgleich prärenalere Einflüsse
- das gleichzeitige Vorliegen einer inadäquaten Harnkonzentration

Konnte initial kein Urin gewonnen werden (Oligurie, Anurie) oder waren Hunde bereits mit einer Infusionstherapie vorbehandelt, wurde eine Unterscheidung zwischen prärenalere und renaler Azotämie aufgrund der anamnestischen und klinischen Befunde, dem Ansprechen auf Infusionstherapie und dem Krankheitsverlauf vorgenommen.

## 2.5. Einteilung der Studienpopulation

Retrospektiv erfolgte eine Einteilung der Studienpatienten in zwei Gruppen:

- Hunde mit einer chronischen Nierenerkrankung (CKD)
- Hunde mit einer akuten Nierenerkrankung (AKI)

Hinweise auf das Vorliegen der einen oder anderen Form wurden aus der Anamnese, der klinischen, labordiagnostischen und bildgebenden Befunde, sowie dem Krankheitsverlauf gewonnen (Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Kriterien zur Unterscheidung einer akuten (AKI) von einer chronischen (CKD) Nierenerkrankung (LANGSTON 2010, POLZIN 2010, GERBER et al. 2004)

	<b>AKI</b>	<b>CKD</b>
<b>Anamnese</b>	akutes Auftreten der Symptomatik (Polyurie, Oligurie/ Anurie, Anorexie, Erbrechen, Lethargie), Toxinaufnahme, Trauma, kürzlich noch normales Serum-Kreatinin	länger bestehende Symptomatik (Polyurie/ Polydipsie, Gewichtsverlust)
<b>Klinische Befunde</b>	normaler Ernährungszustand, Dehydratation/ Hypovolämie, Nierenpalpation: normal bis vergrößert, glatte Oberfläche, evtl. schmerzhaft	chronisch kranker Habitus, reduzierter Ernährungszustand, stumpfes Haarkleid, Nierenpalpation: normal bis klein, unregelmäßige Oberfläche
<b>Laborbefunde</b>		



- Blutuntersuchung	Hämatokrit: normal bis erhöht (reg. Anämie bei Blutung möglich), Hypokalzämie, Hypo- oder Hyperkaliämie	Hämatokrit: normal bis erniedrigt (areg. Anämie), Hypokaliämie,
- Urinuntersuchung	Glukosurie, Zylindrurie	persistierende (> 3 Monate) Proteinurie, inaktives Harnsediment
<b>Bildgebende Diagnostik</b>	Nierengröße: normal bis vergrößert	Nierengröße: normal bis klein, Oberfläche: unregelmäßig
<b>Krankheitsverlauf</b>	vollständige Erholung möglich	max. stabiler Zustand erreichbar, progressives Fortschreiten

Innerhalb der Studienpopulation mit einer AKI wurde dann eine weitere Zuordnung in „Hunde mit Leptospirose“ und „Hunde ohne Leptospirose“ vorgenommen. Bei allen Hunden, die an einer Leptospirose erkrankt waren, handelte es sich um Patienten der Kleintierklinik der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern. Eines der folgenden Kriterien musste für die Diagnosestellung einer Leptospirose erfüllt sein (GEIGY et al. 2011):

- positive Urin-PCR
- 4-fach erhöhter Mikroagglutinationstest-Titer (gepaarte Serumproben)
- MAT-Titer  $\geq$  1:800 für Nicht-Impfstoff-Serotypen oder
- MAT-Titer  $\geq$  1:3200 für Impfstoff-Serotypen

Hunde, die aufgrund des klinischen Verlaufs und der labordiagnostischen Befunde verdächtig für das Vorliegen einer Leptospirose waren, aber vor der

Diagnosestellung verstarben, wurden ebenfalls in die Gruppe „Hunde mit Leptospirose“ eingeteilt.

Folgende Parameter wurden für die spätere Datenanalyse außerdem herangezogen:

- blutchemische Untersuchung am Tag der Probenentnahme
- Urinausscheidung (Normurie, Polyurie, Oligurie/ Anurie)
- Notwendigkeit einer Hämo- oder Peritonealdialyse während des stationären Aufenthaltes (ja/nein)
- das Überleben 30 Tage nach Entlassung (ja/nein)

Die retrospektive Datenanalyse wurde unabhängig von den NGAL-Messungen durchgeführt.

### **3. Bestimmung der NGAL-Konzentration beim Hund**

Die Messung der NGAL-Konzentration erfolgte aus Heparin-Plasma- und Urinproben (Überstand) unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Kit (Dog NGAL ELISA Kit, BioPorto® Diagnostics A/S, Gentofte Dänemark).

#### **3.1. Dog NGAL ELISA Kit**

Das Dog NGAL ELISA Kit beruht auf dem Prinzip eines Sandwich-ELISA. Ein fest an die Wells der Mikrotiterplatte gebundener Capture-AK (monoklonaler Maus Anti – NGAL Hund Antikörper) bindet nach Zugabe einer Antigen (NGAL) enthaltenden Probe (Plasma, Urin) das Antigen. Die anschließende Zugabe von einem Detektor-AK (biotinylierter Hund-NGAL Antikörper) führt zur Ausbildung eines Antigen-AK-Komplex. Ein hinzugefügter Enzym-gekoppelter Signal-AK (Meerrettichperoxidase-konjugiertes Streptavidin) bildet dann einen Komplex mit dem Detektor-AK. Die Zugabe eines Chromogens (TMB (Tetramethylbenzidin) Substrat) führt unter dem Einfluss der Meerrettichperoxidase zu einem Farbumschlag nach Blau und nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure (Stopplösung) bildet sich ein stabiler gelber Farbkomplex.

### **3.2. Testdurchführung**

- Aufwärmen der bei +4°C gelagerten Kitbestandteile (Mikrotiterplatte und Reagenzien), sowie der bei -80°C aufbewahrten Plasma- und Urinproben auf Raumtemperatur (20-25°C)
- Herstellung der Waschlösung; Auffüllen des 25x Wash Solution Conc. Reagenz mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 Liter, anschließend gründlich mischen
- Anfertigung des Probediluent; Auffüllen des 5x Sample Diluent Conc. Reagenz mit destilliertem Wasser auf ein Gesamtvolumen von 250 ml, anschließend gründlich mischen
- Durchmischen der Plasma- und Urinproben durch vorsichtiges Schwenken; bei partikulärer Verunreinigung wiederholt Zentrifugieren und Überstand abpipettieren
- Verdünnen der Proben (1:100-Verdünnung) mit dem zuvor erstellten Sample Diluent
- je 100µl von jedem Kalibrator (Dog NGAL Calibrator 1-8; 0, 4, 10, 20, 40, 100, 200, 400 pg/ml), sowie von den verdünnten Proben im Doppelansatz in die 96 Well Mikrotiterplatte dispensieren
- Abdecken der Wells und Inkubation bei Zimmertemperatur über 60 Minuten
- dreimalige Waschung der Mikrotiterplatte unter Verwendung eines automatischen Waschgerätes (microplate washer „PW 40“, Bio-Rad Laboratories GmbH, München Deutschland) zur Entfernung von ungebundenen Probenbestandteilen
- Zugabe von jeweils 100µl des biotinylierten Hund-NGAL Antikörper Reagenz zu den Proben
- Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur über 60 Minuten
- dreimalige Waschung der Mikrotiterplatte zur Beseitigung ungebundener Detektions-AK aus der Probe
- Zugabe von jeweils 100µl Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin zu den Proben
- Inkubation der abgedeckten Mikrotiterplatte bei Raumtemperatur über 60 Minuten

- dreimalige Waschung der Mikrotiterplatte
- Zufügen von jeweils 100µl TMB Substrat zu den Proben und Mikrotiterplatte lichtgeschützt abdecken
- Inkubation bei Raumtemperatur; die Inkubationszeit startet mit dem Befüllen der ersten Well-Reihe
- exakt 10 Sekunden nach Beginn der Inkubation Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 100µl Stopplösung
- Messen der Farbintensität mit einem ELISA-Reader (Absorbance Microplate Reader „PR 3100 TSC“, Bio-Rad Laboratories GmbH, München Deutschland) bei 450nm

Die NGAL-Konzentration jeder Probe wurde anschließend anhand einer Standardkurve, basierend auf einem 4-Parameter-Logistik Regressionsmodell, bestimmt (Software „Magellan CE 5.2.x“, Tecan Group Ltd., Männedorf Schweiz). Proben, deren NGAL-Konzentration über dem Detektionslimit lag wurden in höheren Verdünnungsstufen erneut gemessen (Plasmaproben maximal 1:800 und Urinproben maximal 1:6400).

#### **4. Statistische Auswertung**

Die Datenanalyse erfolgte mit SPSS (Statistical Package for the Social Science) 14.0. Aufgrund einer fehlenden Normalverteilung in der untersuchten Population erfolgte die statistische Auswertung unter Verwendung nichtparametrischer Tests. Der Mann-Whitney-U-Test fand Anwendung zum Vergleich der Urin- und Plasma-NGAL-Konzentrationen von gesunden Hunden und solchen mit einer Azotämie, sowie zum Vergleich relevanter klinischer Daten innerhalb der Studiengruppen (gesunde Hunde, AKI, CKD). Ein Vergleich der Urin- und Plasma-NGAL-Konzentrationen und des Urin-NGAL/ Kreatinin-Quotienten innerhalb der Gruppen AKI und CKD erfolgte mit einem linearen Regressionsmodell.

Die Ergebnisse wurden als Median und Range angegeben. Als signifikant galt  $p < 0,05$

## IV. ERGEBNISSE

### 1. Gesunde Studienpopulation

#### 1.1. Patienten

Von den insgesamt 20 untersuchten Hunden wurden 2 aufgrund einer asymptomatischen bakteriellen Zystitis (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*) von der Studie ausgeschlossen. Die verbliebenen 18 Patienten gehörten 12 unterschiedlichen Rassen an. Das Geschlechterverhältnis war mit neun weiblichen und ebenso viel männlichen Tieren ausgeglichen. Das Alter variierte zwischen 1 und 11 Jahren (Median 3,5 Jahre). Detaillierte Angaben zur Rasse-, Geschlechts- und Altersverteilung sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

**Tabelle 11:** Rasse-, Geschlechts- und Altersverteilung der gesunden Studienpopulation

Rasse	Anzahl	Geschlecht		Altersgruppenverteilung		
		W	M	< 5 J.	5 - 10 J.	> 10 J.
Verschiedene (*)	7	5	2	4	3	0
DSH	3	1	2	2	1	0
GR	2	1	1	2	0	0
Mischlinge	2	0	2	0	1	1
Rauhaardackel	2	0	2	2	0	0
RR	2	2	0	1	1	0
Gesamt	18	9	9	11	6	1

(\*) jeweils ein Patient aus folgenden Rassen:

Border Collie, Brandlbracke, Deutsche Dogge, Deutsch Langhaar, Englische Bulldogge, Husky, Kurzhaardackel

## 1.2. Untersuchungen am Tier

Der systolische Blutdruck lag bei allen Studienpatienten im Referenzbereich (Median 125 mmHg, Range 90 bis 150 mmHg).

## 1.3. Labordiagnostische Untersuchungen

### 1.3.1. Blutuntersuchung

Alle Hunde wiesen lediglich unspezifische Blutwertveränderungen auf. In den Tabellen 12 und 14 sind die wichtigsten Parameter der hämatologischen und blutchemischen Untersuchung zusammengefasst.

**Tabelle 12:** Klinisch relevante hämatologische Parameter der gesunden Studiengruppe

<b>Parameter (Einheit) [Referenzbereich]</b>	<b>Median (Range) n=18</b>
WBC ( $10^9/l$ ) [5,48 - 13,74]	8,70 (5,50 - 14,10)
Neutrophile ( $10^9/l$ ) [2,78 - 8,73]	4,82 (3,78 - 8,67)
RBC ( $10^{12}/l$ ) [5,64 - 8,30]	6,99 (5,78 - 8,72)
Hämoglobin (mmol/l) [8,06 - 12,21]	12,75 (10,00 - 15,50)

## Ergebnisse

Htc (l/l) [0,39 - 0,56]	0,49 (0,39 - 0,58)
PLT (10 <sup>9</sup> /l) [150 - 500]	243 (128 - 346)

### **1.3.2. Urinuntersuchung**

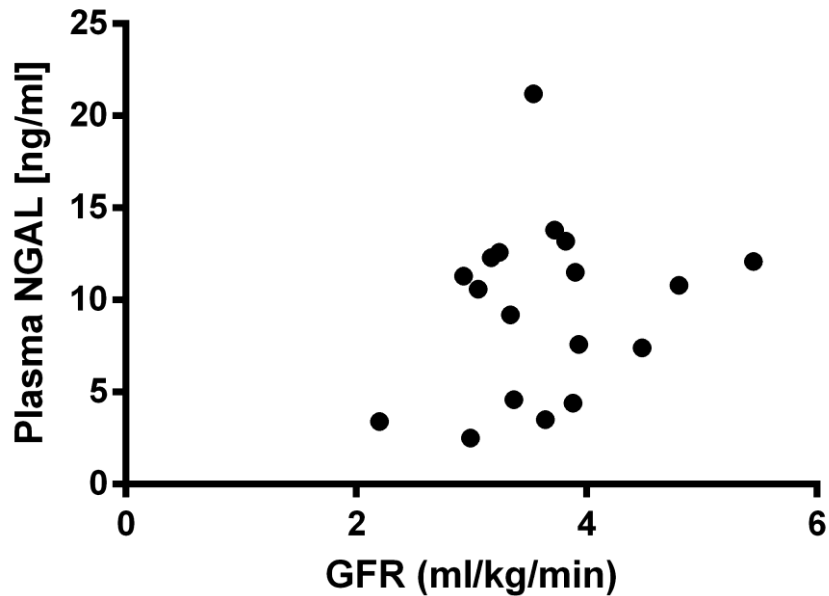
Alle klinisch relevanten Befunde der Urinuntersuchung sind der Tabelle 14 zu entnehmen. Bei 5 Patienten wurde in der Urinkultur ein geringer Keimgehalt an *Micrococcus sp.* bzw. *Streptococcus epidermidis* nachgewiesen. Diese sind in Rücksprache mit dem Institut für Hygiene und Infektionskrankheiten der Tiere (Leiter: Prof. Dr. C. Ewers) apathogen und als Kontaminanten bei der Probenentnahme zu werten.

### **1.3.3. Glomeruläre Filtrationsrate**

Mit Ausnahme von einem Studienpatienten lag die GFR bei allen Hunden im Referenzbereich. Detaillierte Angaben sind der Tabelle 14 zu entnehmen.

### **1.4. NGAL**

Die medianen NGAL–Werte betragen im Plasma 10,6 (Range 2,5 bis 21,2) ng/ml und im Urin 0,2 (Range 0,2 bis 11,7) ng/ml. Bei 10 Hunden lag der Urin NGAL-Wert unterhalb der Assaygrenze von 0,2 ng/ml. Der Urin-NGAL/ Kreatinin–Quotient (UNKQ) betrug im Median 2,1 (Range 0,5 bis 45,8) [x10e-8] (Tabelle 14). Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen Plasma-NGAL–Konzentrationen ( $p = 0,38$ ;  $r = 0,22$ ) bzw. Urin-NGAL-Werten ( $p = 0,97$ ;  $r = 0,01$ ) und der GFR (Abbildung 1). Verglichen mit den Plasma-NGAL-Konzentrationen und dem UNKQ der Hunde mit einer renalen Azotämie wies die gesunde Studienpopulation signifikant niedrigere Werte auf ( $p < 0,001$ , Abbildungen 2 und 3).



**Abbildung 1:** Korrelation zwischen der Plasma-NGAL-Konzentration und der GFR der gesunden Studienpopulation

## 2. Hunde mit einer Nierenerkrankung

### 2.1. Patienten

Insgesamt wurden 88 azotämische Hunde untersucht. 5 Tiere wurden aufgrund einer nicht-renalen Azotämie (4 Hunde mit einer prärenalen und 1 Hund mit einer postrenalen Azotämie) von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Die Studienpopulation setzte sich aus 41 Rassen zusammen, Mischlingshunde waren am häufigsten vertreten. 54 % der nierenkranken Tiere waren männlich, bei 3 Hunden ist das Geschlecht nicht bekannt. Das Alter betrug zwischen 1 und 15 Jahren (Median 7 Jahre). Retrospektiv wurden 53 Hunde als AKI (64 %) und 30 Hunde als CKD (36 %) klassifiziert. Innerhalb der AKI-Gruppe wurde bei 28 Patienten (53 %) eine Leptospirose diagnostiziert, bzw. bestand der Verdacht auf das Zugrundeliegen einer Leptospirose. Detaillierte Angaben zur Rasse-, Geschlechts- und Altersverteilung sind der Tabelle 13 zu entnehmen.



**Tabelle 13:** Rasse-, Geschlechts- und Altersverteilung der Studienpopulation mit einer Nierenerkrankung

Rasse	AKI		CKD	Geschlecht			Altersgruppenverteilung			
	L/ LV	nL		W	M	nb	< 5 J.	5 - 10 J.	> 10 J.	nb
Verschiedene (*)	12	8	7	12	15	0	9	15	3	0
BS (n=6)	0	1	5	2	3	1	3	2	0	1
Bullmastiff (n=2)	1	1	0	1	1	0	2	0	0	0
Cairn Terrier (n=2)	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
Dackel (n=3)	0	2	1	2	0	1	1	1	1	0
DSH (n=3)	1	1	1	1	2	0	0	3	0	0
ESS (n=2)	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0
FCR (n=2)	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1
GR (n=4)	2	1	1	2	2	0	1	2	0	1
JRT (n=2)	2	0	0	2	0	0	0	2	0	0
LR (n=5)	3	2	0	1	4	0	2	3	0	0
Malteser (n=2)	0	0	2	0	2	0	0	0	2	0
Mischlinge (n=19)	3	9	7	6	12	1	5	11	3	0
SSD (n=2)	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0
Zwergschnauzer (n=2)	0	0	2	2	0	0	2	0	0	0
<b>Gesamt (n=83)</b>	<b>28</b>	<b>25</b>	<b>30</b>	<b>35</b>	<b>45</b>	<b>3</b>	<b>27</b>	<b>42</b>	<b>11</b>	<b>3</b>

(\*) jeweils ein Patient aus folgenden Rassen:

Airdale Terrier, Alaskan Malamute, Australian Shepard, Berger des Pyrénées, Deutsche Dogge, Deutscher Wachtelhund, Dogo Argentino, Französische Bulldogge, Havanese, Hovawart, Irish Terrier, Lagotto, Mittelschnauzer, Otterhund, Pudel, Riesenschnauzer, Saluki, Shar Pei, Shelti, Siberian Husky, Springer Spaniel, Tibet Terrier, Weimaraner, West Highland White Terrier, Whippet, Yorkshire Terrier, Zwergpinscher

## **2.2. Retrospektive Datenanalyse**

Zum Zeitpunkt der stationären Aufnahme waren 24 Hunde oligurisch bis anurisch, 30 polyurisch und 24 wiesen eine Normurie auf. Von 5 Hunden liegen keine Angaben zum Urinabsatz vor. 21 Hunde (20 AKI, 1 CKD) wurden hämodialysiert und bei 2 Patienten wurde eine Peritonealdialyse durchgeführt. 30 Tage nach Entlassung lebten noch 34 von 83 Patienten, 45 Hunde waren nicht mehr am Leben und von 4 Patienten liegen diesbezüglich keine Informationen vor.

## **2.3. NGAL**

### **2.3.1. Akute Nierenerkrankung (AKI)**

Die medianen NGAL-Konzentrationen der Hunde mit einer AKI betragen im Plasma 49 (Range 6-469) ng/ml und im Urin 60 (Range 0-1473) ng/ml. Der Urin-NGAL/ Kreatinin-Quotient (UNKQ) betrug im Median 2365,8 (Range 35,6-994668,8) [x10e-8] (Tabellen 14 und 15). Verglichen mit der CKD-Gruppe wiesen die Plasma-NGAL-Werte der AKI-Gruppe signifikant höhere Werte auf ( $p = 0,004$ , Abbildung 2).

### **2.3.2. Chronische Nierenerkrankung (CKD)**

Die medianen NGAL-Konzentrationen der CKD-Gruppe betragen im Plasma 35 (Range 8-98) ng/ml und im Urin 67 (Range 0-409) ng/ml. Der Urin-NGAL/ Kreatinin-Quotient (UNKQ) betrug im Median 2778,2 (Range 4,6-30626,2) [x10e-8] (Tabelle 14, Abbildungen 2 und 3).

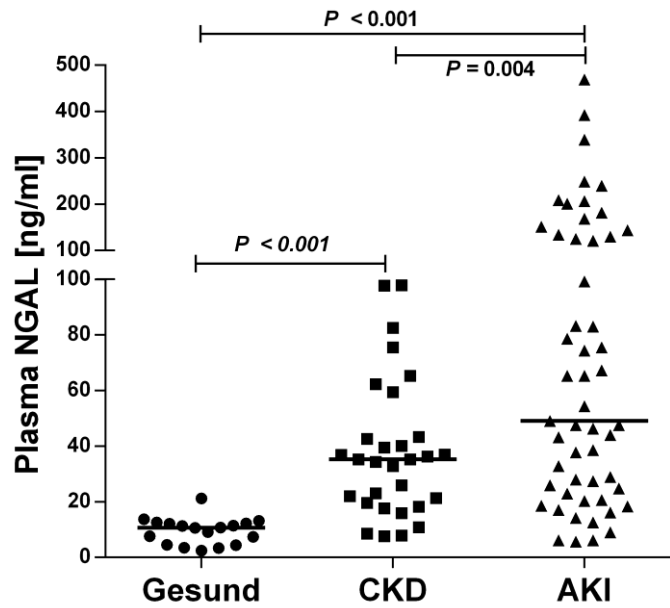
**Tabelle 14:** Zusammenfassung klinisch und labordiagnostisch relevanter Parameter der gesamten Studienpopulation

<b>Parameter</b> (Einheit) [Referenzbereich]	<b>gesunde Hunde</b> Median (Range) n = 18	<b>AKI</b> Median (Range) n = 53	<b>CKD</b> Median (Range) n = 30
Alter (J)	3,5 (1,0 - 11,0) n = 18	7,0 (1,0 - 12,0) n = 53	6,0 (1,0 - 15,0) n = 29
Geschlecht (M : W)	9 : 9 n = 18	32 : 21 n = 53	13 : 17 n = 30
Harnstoff (mmol/l) [3,3 - 9,82]	6,77 (4,16 - 12,59) n = 18	51,2 (11,17 - 109,3) n = 53	35,14 (9 - 116,86) n = 30
Kreatinin (µmol/l) [53 - 122]	83,5 (51 - 104) n = 18	632,0 (204 - 2030) n = 53	297,5 (98 - 1127) n = 30
Phosphor (mmol/l) [0,79 - 2,10]	1,34 (0,83 - 1,75) n = 18	3,85 (0,59 - 9,79) n = 53	2,035 (0,62 - 8,86) n = 30
Kalium (mmol/l) [3,35 - 4,37]	4,02 (3,7 - 4,66) n = 18	4,6 (2,9 - 7,87) n = 53	4,275 (3,22 - 7,03) n = 30
USG [> 1030]	1040 (1030 - 1050) n = 18	1016 (1008 - 1035) n = 29	1014 (1006 - 1031) n = 27
UPC	0,1 (0 - 0,4) n = 11	1,95 (0,1 - 23) n = 16	2,4 (0 - 13,5) n = 21
GFR (ml/min/kg) [2,6 - 4,5]	3,59 (2,2 - 5,45) n = 18	nicht ermittelt	nicht ermittelt
pNGAL (ng/ml)	10,7 (2,5 - 21,2) n = 18	49,1 (5,7 - 469) n = 53	35,3 (7,7 - 97,9) n = 30
uNGAL (ng/ml)	0,2 (0,2 - 11,7) n = 18	59,8 (0,2 - 1472,6) n = 21	66,5 (0,2 - 408,5) n = 16
UNKQ [x10e-8]	2,11 (0,47 - 45,75) n = 18	2365,77 (35,56 - 994668,8) n = 21	2778,18 (4,55 - 30626,21) n = 16

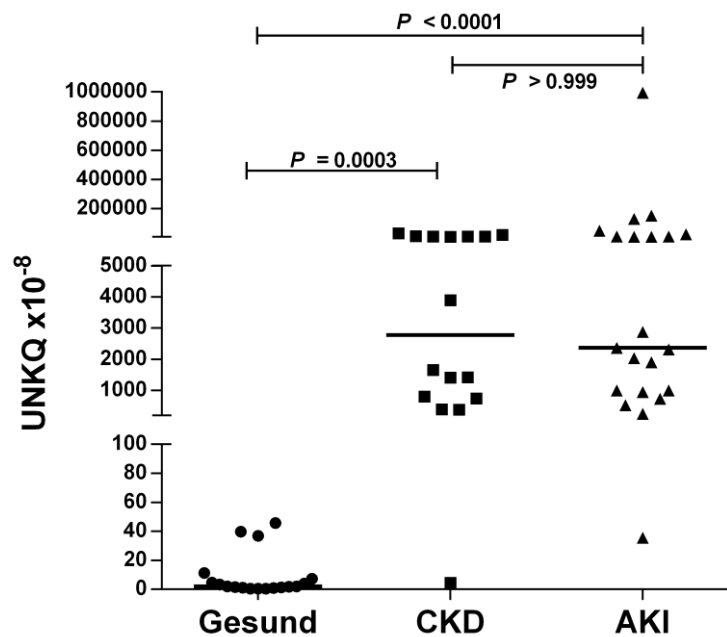
**Tabelle 15:** Zusammenfassung klinisch und labordiagnostisch relevanter Parameter der Hunde mit einer Leptospirose und AKI anderer Ursache

<b>Parameter (Einheit) [Referenzbereich]</b>	<b>Leptospirose Median (Range) n = 28</b>	<b>nicht Leptospirose Median (Range) n = 25</b>
Alter (J)	6 (1 - 11) n = 27	7,0 (1 - 12) n = 25
Geschlecht (M : W)	20 : 8 n = 28	12 : 13 n = 25
Harnstoff (mmol/l) [3,3 - 9,82]	54,54 (13,18 - 109,3) n = 28	44,2 (11,17 - 98,41) n = 25
Kreatinin (µmol/l) [53 - 122]	788,0 (266 - 2030) n = 28	474,0 (204 - 1462) n = 25
Phosphor (mmol/l) [0,79 - 2,10]	4,025 (1,2 - 9,79) n = 28	3,65 (0,59 - 8,97) n = 25
Kalium (mmol/l) [3,35 - 4,37]	4,85 (3 - 7,8) n = 28	4,21 (2,9 - 7,87) n = 25
USG [> 1030]	1014 (1009 - 1023) n = 11	1016 (1008 - 1035) n = 18
UPC	2,2 (0,3 - 3,4) n = 4	1,95 (0,1 - 23) n = 12
pNGAL (ng/ml)	51,7 (9,0 - 469,0) n = 28	28,0 (5,7 - 339,2) n = 25
uNGAL (ng/ml)	86,9 (41,7 - 106,3) n = 3	56,2 (0,2 - 1472,6) n = 18
UNKQ [x10e-8]	2036,53 (1907,55 - 2879,21) n = 3	3704,30 (35,56 - 994668,80) n = 18

## Ergebnisse



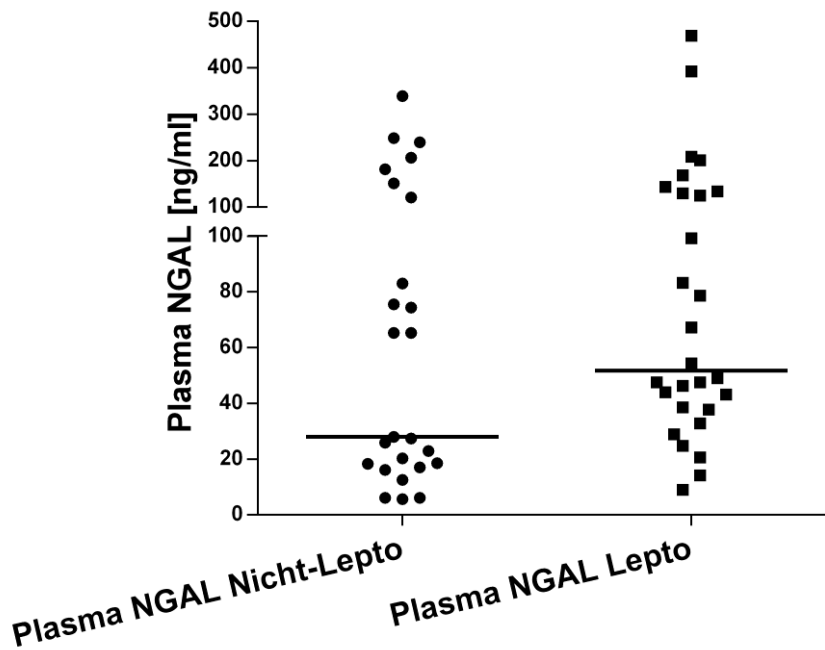
**Abbildung 2:** Darstellung der Plasma-NGAL-Konzentrationen (Plasma NGAL) bei gesunden Hunden sowie Hunden mit einer akuten (AKI) und chronischen (CKD) Nierenerkrankung. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.



**Abbildung 3:** Darstellung der Urin-NGAL/ Kreatinin-Quotienten (UNKQ) bei gesunden Hunden sowie Hunden mit einer akuten (AKI) und chronischen (CKD) Nierenerkrankung. Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

### 2.3.3. Einfluss von klinischen Parametern und Parametern der retrospektiven Datenanalyse auf NGAL-Konzentrationen

Im linearen Regressionsmodell übte lediglich die Erkrankung selbst (AKI oder CKD) einen signifikanten Einfluss auf die Plasma-NGAL-Konzentration aus ( $p = 0,004$ ). Alter ( $p = 0,438$ ), Geschlecht ( $p = 0,597$ ), Gewicht ( $p = 0,231$ ), die Notwendigkeit einer Dialyse ( $p = 0,540$ ), das Überleben 30 Tage nach Entlassung ( $p = 0,335$ ), die Diagnose einer Leptospirose ( $p = 0,496$ , Abbildung 4), sowie der Vorstellungsort (Justus-Liebig-Universität Gießen oder Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern) wiesen diesbezüglich keine Signifikanz auf. Ein signifikanter Einfluss von Parametern auf den Urin-NGAL/ -Kreatinin-Quotienten konnte nicht nachgewiesen werden (Alter  $p = 0,858$ , Geschlecht  $p = 0,638$ , Gewicht  $p = 0,765$ , Notwendigkeit einer Dialyse  $p = 0,692$ , Überleben  $p = 0,459$ , Diagnose einer Leptospirose  $p = 0,678$ , Vorstellungsort  $p = 0,542$ , Erkrankung  $p = 0,266$ ).



**Abbildung 4:** Darstellung der Plasma-NGAL-Konzentrationen (Plasma NGAL) bei Hunden mit akuter Nierenerkrankung (AKI) aufgrund einer Leptospirose (Lepto) sowie anderen Ursachen einer AKI (Nicht-Lepto). Die horizontalen Linien repräsentieren den Median.

### **3. Intra-Assay-Varianz**

Für die im Doppelansatz gemessenen Plasma-NGAL-Konzentrationen wurde eine Intra-Assay-Varianz von 3,1 % errechnet, für die Urin-NGAL-Konzentrationen von 4,8 %.

## **V. DISKUSSION**

Die akute Nierenschädigung ist eine lebensbedrohliche Erkrankung und ihre Mortalitätsrate liegt beim Hund bei über 50% (STOKES & BARTGES 2006). Eine frühe Diagnose und damit verbunden ein zeitnaher Therapiebeginn können die Prognose entscheidend verbessern. Die herkömmliche Labordiagnostik weist hier jedoch starke Einschränkungen auf. Die Forschung der vergangenen Jahre hat das Protein NGAL als einen der vielversprechendsten neuen renalen Biomarker, insbesondere zur sensitiven Vorhersage einer AKI, beim Menschen identifiziert. Obwohl mittlerweile auch ein kommerziell erhältliches canines NGAL ELISA Test Kit angeboten wird, liegen nur wenige Daten zur labordiagnostischen Beurteilung beim Hund vor.

In der vorliegenden Studie wiesen Hunde mit einer renalen Azotämie signifikant höhere Plasma-NGAL-Konzentrationen und UNKQ-Werte auf, verglichen mit der gesunden Studienpopulation. Diese Resultate sind vergleichbar mit humanmedizinischen Ergebnissen (MISHRA et al. 2005, HIRSCH et al. 2007, TULADHAR et al. 2009). Wagener und Mitarbeiter (2011) konnten zeigen, dass der UNKQ in der Lage ist Patienten mit einer post-operativen (Lebertransplantation) AKI vorherzusagen. Verglichen mit einer gesunden Studiengruppe wiesen Patienten mit einer CKD signifikant höhere Plasma-NGAL-Konzentrationen und UNKQ-Werte auf (BOLIGNANO et al. 2008). Auch in der Tiermedizin liegen bereits vergleichbare Resultate vor. Verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe wiesen Hunde mit einer chronischen Nierenerkrankung (IRIS Stadium I bis IV) signifikant höhere NGAL-Werte (sNGAL, uNGAL, UNKQ) auf (COBRIN et al. 2013). Auch bei Hunden mit einer X-chromosomal vererbten Protein-Verlust-Nephropathie war der UNKQ in der Lage zwischen gesunden und erkrankten Hunden zu Differenzieren (NABITY et al. 2012). Segev und Mitarbeiter (2013) stellten fest, dass Hunde mit einer AKI und CKD höhere UNKQ aufweisen als die gesunde Studienpopulation.

Im Vergleich AKI und CKD wiesen Hunde mit einer AKI statistisch signifikant höhere Plasma-NGAL-Konzentrationen, jedoch nicht UNKQ-Werte, auf. Unsere Ergebnisse lassen somit die Schlussfolgerung zu, dass die Plasma-NGAL-Konzentration, nicht



jedoch der UNKQ, auch beim Hund zur Differenzierung einer AKI von einer CKD bei Hunden mit einer renalen Azotämie beitragen kann. Beim Menschen wird jedoch häufig nur die Urin-NGAL-Konzentration herangezogen. So konnten Nickolas und Mitarbeiter (2008) zeigen, dass eine einzige Messung der Urin-NGAL-Konzentration zur Unterscheidung einer AKI von einer CKD beitragen kann.

Unsere Ergebnisse decken sich diesbezüglich auch nicht mit den Resultaten der 2012 veröffentlichten Studie von Lee und Mitarbeitern. Die absolute Urin-NGAL-Konzentration war hier auch beim Hund ein prädiktiver Biomarker für eine AKI nach chirurgischen Eingriffen. Die Serum-NGAL-Konzentration wies in dieser Studie jedoch keinen signifikanten Unterschied innerhalb der Studienpopulation (Hunde mit einer AKI; Hunde ohne AKI) auf. Aufgrund des unterschiedlichen Studiendesigns ist ein direkter Studienvergleich allerdings nur eingeschränkt möglich. Da Lee und Mitarbeiter Urinuntersuchungen zu definierten Zeitpunkten nach einem geplanten chirurgischen Eingriff durchführten, ist eine Überlegenheit der Urin-NGAL-Konzentration gegenüber der Plasma-NGAL-Konzentration in diesem Fall möglich. Auch Segev und Mitarbeiter (2013) stellten einen signifikanten Unterschied im UNKQ von Hunden in unterschiedlichen Stadien einer AKI (IRIS AKI Grad I-V) und Hunden mit einer CKD fest. Plasma-NGAL-Konzentrationen wurden nicht bestimmt.

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz kann die fehlende Urinanalyse von Patienten mit einer anurischen AKI in der vorliegenden Studie sein. In der Studie von Segev und Mitarbeiter (2013) wurden die Patienten nach IRIS AKI Graden eingeteilt. Insbesondere IRIS AKI Grad I (keine Azotämie), aber auch IRIS AKI Grad II (milde Azotämie) erfassen jedoch auch Patienten die auf eine Volumentherapie mit einem Absinken der Serum-Kreatininkonzentration und/ oder einem Anstieg der Urinproduktion reagieren (ANONYMUS 2014). Eine prärenale Azotämie kann zwar zu intrinsischen Nierenschäden führen, geht aber nicht zwangsläufig mit einer Nierenerkrankung einher (LANGSTON 2010, STOKES 2009). In der vorliegenden Studie wurden jedoch nur Hunde mit einer renalen Azotämie eingeschlossen. Vermehrt anurische AKI Patienten und daraus resultierend fehlende Urinanalysen sind möglich.

Unter dem Aspekt, dass eine Anurie ein häufiges Symptom einer AKI darstellt, scheint die Plasma-NGAL-Konzentration zur Differenzierung einer akuten von einer chronischen Nierenerkrankung jedoch von größerer klinischer Bedeutung zu sein.

Außerdem können die geringen Fallzahlen zu einer zu geringen statistischen Power geführt haben.

Obwohl unsere Datenanalyse einen signifikanten Unterschied in den Plasma-NGAL-Konzentrationen zwischen den Studiengruppen AKI und CKD ergab, existiert ein großer Bereich, indem sich die gemessenen NGAL-Werte überlappen.

Es bestand keine signifikante Korrelation zwischen Plasma-NGAL-Konzentrationen ( $p = 0,38$ ;  $r = 0,22$ ) bzw. Urin-NGAL-Werten ( $p = 0,97$ ;  $r = 0,01$ ) und der GFR bei den gesunden Hunden. Da NGAL als Schädigungsmarker den Schweregrad einer tubulären Schädigung anzeigt und keinen glomerulären Funktionsparameter darstellt, war dieses Ergebnis zu erwarten. Kreatinin wird rein glomerulär filtriert, unterliegt keiner tubulären Reabsorption und nur einer minimalen Sekretion. Kreatinin korreliert somit invers mit der GFR und ist ein Indikator der Nierenfunktion (LEFEBVRE 2011). Eine fehlende Korrelation zwischen NGAL-Werten und der Serum-Kreatininkonzentration war daher ebenfalls zu erwarten.

In der Humanmedizin konnte bei 69 Patienten mit einer chronischen Nierenerkrankung eine signifikante Korrelation von NGAL (sNGAL und uNGAL) mit der GFR festgestellt werden (BOLIGNANO et al. 2008). In dieser Studie war NGAL der Serum-Kreatininkonzentration sogar überlegen. Auch Mitsnefes und Mitarbeiter (2007) stellten bei 54 Kindern mit CKD eine signifikante Korrelation der Serum-NGAL-Konzentration mit der GFR fest.

Auch Cobrin und Mitarbeiter (2013) stellten eine Korrelation von NGAL mit der GFR (bestimmt bei Hunden mit unterschiedlichen Schweregraden einer CKD) fest. Während zu Beginn der Studie nur die Serum-NGAL-Konzentration mit der GFR korrelierte ( $r = 0,77$ ), waren es zum Studienende (6 Monate später) sowohl die Serum-NGAL-Konzentration ( $r = 0,83$ ), als auch die Urin-NGAL-Konzentration ( $r = 0,76$ ) und der UNKQ ( $r = 0,74$ ). Ein signifikanter Unterschied der Serum-Kreatininkonzentration sowie der GFR initial und 6 Monate später konnte nicht detektiert werden. Eine Bestimmung der GFR bei der gesunden Studienpopulation wurde hier nicht durchgeführt.

Eine Messung der GFR von Hunden mit einer renalen Azotämie wurde in der vorliegenden Studie nicht vorgenommen.

Bei Hunden mit einer X-chromosomal vererbten Proteinverlust-Nephropathie (Nabity et al. 2012) konnte ebenso wie in der vorliegenden Studie keine Korrelation zwischen der GFR und dem UNKQ nachgewiesen werden ( $r = 0,34$ ).

Eine gewisse Korrelation mit der GFR, insbesondere von sNGAL, scheint auch verständlich, da sNGAL glomerulär filtriert wird und jede Verringerung der glomerulären Filtrationsrate zu einer systemischen Akkumulation führt. Davon ausgehend, dass NGAL jedoch vielmehr ein Indikator für die aktuell ablaufende, aktive Nierenschädigung ist (MORI et al. 2007), scheint es möglich, dass zwei Patienten (AKI und CKD) mit der gleichen GFR stark unterschiedliche NGAL-Konzentrationen aufweisen.

Eine signifikante, schwache Korrelation zwischen der Plasma-NGAL-Konzentration aller Hunde (gesunde Hunde, AKI, CKD) bzw. der Hunde mit einer renalen Azotämie und der Plasma-Kreatininkonzentration konnte auch in der vorliegenden Studie festgestellt werden.

Weitere Untersuchungen sind hier notwendig um das Verhältnis von NGAL und der GFR bei Hunden mit unterschiedlichen Schweregraden und Ursachen einer Azotämie zu evaluieren.

Humanmedizinische Studien (DECAVELE et al. 2011, YILMAZ et al. 2009) und Untersuchungen an Hunden (DAURE et al. 2013, SEGEV et al. 2013) haben gezeigt, dass die Urin-NGAL-Konzentration bzw. der UNKQ signifikant erhöht sind bei Harnwegsinfektionen. Nierenerkrankungen begünstigen das Auftreten von Harnwegsinfektionen und aufsteigende Harnwegsinfektionen (Pyelonephritis) können Auslöser einer AKI sein (SMEE et al. 2013). Die Urin-NGAL-Konzentration ist aber auch bei Hunden mit Nierenerkrankung (AKI, CKD) erhöht, auch bei Fehlen einer Azotämie (KAI et al. 2013, LEE et al. 2012, NABITY et al. 2012). Somit ist es möglich, dass Hunde mit erhöhten Urin-NGAL-Konzentrationen als nierenerkrankt fehldiagnostiziert werden, obwohl eine Harnwegsinfektion vorliegt. Die meisten Harnwegsinfektionen sind bakteriell bedingt (BARTGES & PRESSLER 2010). NGAL wurde erstmals in den Granula aktivierter neutrophiler Granulozyten nachgewiesen und ist Bestandteil des angeborenen Immunsystems (KJELDSEN et al. 1993). Während Infektionen benötigen Bakterien für Stoffwechsel und Wachstum Eisen. NGAL wirkt bakteriostatisch, indem es nach der Freisetzung aus Granula aktivierter neutrophiler Granulozyten die bakterielle Eisenaufnahme hemmt (SCHMIDT-OTT et

al. 2007). Ein Anstieg der Urin-NGAL-Konzentration in Zusammenhang mit einer Harnwegsinfektion lässt sich somit durch das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten im Urin erklären. Beim Menschen wurden zwei verschiedene molekulare Formen von uNGAL beschrieben (XU et al. 1994, CAI et al. 2010). Die dimere Form wird aus neutrophilen Granulozyten freigesetzt, während die monomere Form überwiegend den Tubulusepithelzellen entstammt (CAI et al. 2010). Es ist daher anzunehmen, dass bei Patienten mit einer AKI die Monomere dominieren, während es bei einer Harnwegsinfektion die Dimere sind. Entsprechende Untersuchungen müssen beim Hund folgen, da eine Unterscheidung der molekularen Form diagnostisch wertvoll erscheint.

Der Einfluss einer Harnwegsinfektion auf die Serum-NGAL-Konzentration wurde bisher nicht untersucht. Die meisten Harnwegsinfektionen (mit Ausnahme von Infektionen der oberen Harnwege) führen nicht zu einer systemischen Entzündungsreaktion (BARTGES & PRESSLER 2010).

In der vorliegenden Studie wurden zwei Hunde aus der gesunden Studienpopulation mit einer subklinischen, bakteriellen Zystitis von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. Inwiefern die Harnwegsinfektion hier einen Einfluss auf die Urin-NGAL-Konzentration, aber vor allem auch auf die Plasma-NGAL-Konzentration ausübt, wäre sicherlich interessant gewesen.

Auch bei den Hunden mit einer renalen Azotämie wurden sieben aufgrund einer bakteriellen Harnwegsinfektion von der Studie ausgeschlossen. Statistisch konnte hier im vorher-nachher-Vergleich jedoch keine signifikante Veränderung der NGAL-Werte (Plasma- und Urin-NGAL) festgestellt werden. Es ist jedoch möglich dass die geringe Fallzahl von nur 7 Patienten eine statistisch signifikante Auswertung nicht zulässt.

Es ist bekannt, dass die humane Plasma-NGAL-Konzentration von verschiedenen nicht-renalen oder koexistierenden Faktoren, wie systemischen Infektionen, entzündlichen Erkrankungen, einer chronischen Hypertension oder Tumorerkrankungen, beeinflusst werden kann. Jedoch liegen die gemessenen Werte gewöhnlich deutlich unter jenen im Rahmen einer AKI (DEVARAJAN 2010). Eine Limitation dieser Studie ist daher sicherlich die fehlende Korrelation zu Leukozytenzahlen und Blutdruckwerten. Es konnte jedoch kein signifikanter Einfluss einer Leptospireninfektion (53% der Hunde mit AKI, davon 14 Hunde mit

Symptomen einer sekundären Lungenblutung) auf die Plasma-NGAL-Konzentration festgestellt werden. Hsu und Mitarbeiter (2014) stellten keine Korrelation zwischen der Serum-NGAL-Konzentration und der Leukozytenzahl fest. Hunde mit induzierter Sepsis wiesen jedoch signifikant höhere Serum-NGAL-Konzentrationen auf als Hunde aus der gesunden Kontrollgruppe (COBRIN et al. 2013).

Cobrin und Mitarbeiter (2013) fanden keinen signifikanten Unterschied in den Serum- und Urin-NGAL-Konzentrationen bei Hunden mit CKD, Lymphosarkom und Karzinom. Obwohl bei den meisten Hunden der vorliegenden Studie eine vollständige sonographische Untersuchung des Abdomens durchgeführt wurde und von einigen auch Röntgenaufnahmen des Thorax vorliegen, wurden die Hunde keinem speziellen Tumor-Screening unterzogen.

Es ist unklar, inwiefern die Ergebnisse dieser Studie durch andere Faktoren beeinflusst wurden. Der Einfluss von nicht-renalen Erkrankungen und koexistierenden Faktoren auf die Plasma- und Urin-NGAL-Konzentration beim Hund muss in weiteren Untersuchungen geklärt werden.

Kritisch zu betrachten ist auch die ausschließlich auf anamnestischen, klinischen und labordiagnostischen Befunden basierende retrospektive Einteilung der erkrankten Studienpopulation in Hunde mit einer AKI oder CKD. Histopathologische Untersuchungen von Nierenbiopsien für eine definitive Diagnosestellung wurden nicht durchgeführt. Bei 53 % der Hunde mit einer AKI wurde jedoch eine Leptospirose diagnostiziert und diese ist eine beschriebene Ursache der AKI (LANGSTON 2010). Nur 4 der insgesamt 83 Studienpatienten mit einer Nierenerkrankung konnten nicht bis zum Studienendpunkt (30 Tage nach Entlassung) verfolgt werden. Von den übrigen 79 Hunden liegen die Daten zum klinischen und labordiagnostischen Verlauf vollständig vor, was eine fehlerhafte Einteilung unwahrscheinlich macht.

Auch wurden die Patienten der CKD Gruppe nicht weiter nach IRIS (International Renal Interest Society) unterteilt. Die Stadieneinteilung nach IRIS basiert auf der Serum-Kreatininkonzentration (Stadium I bis IV), dem Grad der Proteinurie (Unterkategorie nicht proteinurisch, grenzwertige Proteinurie, Proteinurie) und dem gemessenen Blutdruck (Unterkategorie minimales/ geringes/ moderates/ hohes Risiko für Endorganschäden). Eine Einteilung in das jeweilige Stadium darf nur an

stabilen, normal hydrierten, gefasteten Patienten vorgenommen werden und Serum-Kreatinin, Urin-Protein/-Kreatinin-Quotient sowie Blutdruck sollten durch mehrere Messungen über einen längeren Zeitraum verifiziert werden (ELLIOTT & WATSON 2009). Aufgrund des Studiendesigns ist eine CKD Stadieneinteilung nach IRIS somit in der vorliegenden Studie nicht zulässig. Mit einem Follow-up von 30 Tagen ist es unwahrscheinlich, aber nicht gesichert, dass Patienten mit einer akut-auf-chronischen Nierenerkrankung nicht erkannt wurden. Es wäre daher günstiger gewesen, bereits seit einiger Zeit diagnostizierte, stabile und IRIS klassifizierte Hunde für die CKD Gruppe heranzuziehen.

Die Patienten der AKI Gruppe wurden nicht weiter nach IRIS klassifiziert, da die Richtlinien zur Stadieneinteilung einer akuten Nierenschädigung zum Zeitpunkt von Studiendesign und Studiendurchführung noch nicht existierten.

Lediglich die Erkrankung selbst (AKI) übte einen Einfluss auf die Plasma-NGAL-Konzentration aus.

Etwa 70 % der Patienten mit einer AKI wurden in der Kleintierklinik der Vetsuisse-Fakultät der Universität Bern vorgestellt. Eine Erklärung hierfür ist das gehäufte Vorkommen von Leptospiroseinfektionen in dieser Region. Obwohl zu erwarten gewesen wäre, dass der Vorstellungsort einen Einfluss auf die NGAL-Werte ausübt, war dies nicht der Fall.

Die Notwendigkeit einer Dialyse zeigte keinen Einfluss auf die gemessenen NGAL-Werte. Laut unseren Studienergebnissen scheint NGAL daher beim Hund nicht als Prädiktor für die Notwendigkeit einer Dialyse geeignet zu sein. Die Höhe der Urin-NGAL-Konzentration korreliert in der Humanmedizin jedoch eng mit der Notwendigkeit einer Dialyse (BENETT et al. 2008). Weitere Untersuchungen mit größeren Fallzahlen sind hier jedoch notwendig, um eine zu geringe statistische Power auszuschließen.

Auch sind die Plasma-NGAL-Konzentration und der UNKQ laut unseren Ergebnissen unbeeinflusst von Alter, Geschlecht und Körpergewicht. Auch Ahn und Hyun (2014) konnten keinen signifikanten Einfluss von Alter oder Körpergewicht auf die Serum-NGAL-Konzentration feststellen. Der UNKQ korrelierte auch bei Daure und Mitarbeitern (2013) nicht mit dem Körpergewicht, jedoch konnte eine schwach positive Korrelation ( $p = 0,02$ ;  $r = 0,4$ ) mit dem Alter beobachtet werden. Auch Tomonaga und Mitarbeiter (2012) stellten bei älteren Menschen tendenziell höhere

Urin-NGAL-Werte fest. Die Relevanz einer so geringen Korrelation ist fraglich, so dass die Notwendigkeit alters-, geschlechts- oder gewichtsabhängige Referenzwerte zu definieren nicht zu bestehen scheint.

Auch beim Hund kann die NGAL-Konzentration einfach und in engen Grenzen aus Plasma und Urin bestimmt werden, wie dies beim Menschen schon oft gezeigt wurde (MISHRA et al. 2005, WAGENER et al. 2006, TULADHAR et al. 2009), jedoch steht aktuell nur ein ELISA mit ELISA Titerplatten zur Testdurchführung zur Verfügung und somit ist die Untersuchung selbst recht zeit- und kostenaufwendig. Um NGAL bei vielen Individuen zeitnah und cageside bestimmen zu können, ist die Entwicklung zuverlässiger und kostengünstiger Nachweissysteme notwendig. Obwohl eine Normierung von uNGAL auf die Urin-Kreatininkonzentration aufgrund des ausgeprägten Anstiegs im Urin in der Humanmedizin nicht notwendig erscheint (MISHRA et al. 2005) und in vielen humanmedizinischen Studien lediglich die absolute Urin-NGAL-Konzentration herangezogen wird (WAGENER et al. 2006, BENNETT et al. 2008), wurde in der vorliegenden Studie mit dem UNKQ gearbeitet, da es fraglich ist, inwiefern die Harnkonzentration, der Hydratationsstatus, eine Infusionstherapie oder der Einsatz von Diuretika einen Einfluss auf die Urin-NGAL-Konzentration ausüben. Cavalier und Mitarbeiter (2010) stellten eine geringere intra-individuelle Variation bei Verwendung des UNKQ fest.

Kritisch zu betrachten ist, dass bei der vorliegenden Studie zur Bestimmung der GFR die Inulin-Plasma-Clearance-Methode (single-injection-method) angewendet wurde, obwohl die renale Clearance von Inulin die akzeptierte Referenzmethode darstellt. Auf die Goldstandard-Methode wurde jedoch aufgrund einer gesteigerten Infektionsgefahr im Rahmen der längerfristigen Katheterisierung, sowie der zu erwartenden eingeschränkten Besitzer-Compliance verzichtet.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass NGAL auch beim Hund ein vielversprechender renaler Biomarker zur Unterscheidung einer AKI von einer CKD zu sein scheint, der viele Anforderungen an einen optimalen renalen Biomarker erfüllt. Weitere Studien müssen nun folgen, um das gesamte Potential von NGAL als Nierenparameter beim Hund zu klären (Differenzierung einer prärenalen von einer

## Diskussion

renalen Azotämie, Prädiktor einer AKI, prognostischer Indikator einer Nierenerkrankung, Parameter zur Verlaufskontrolle).



## **VI. ZUSAMMENFASSUNG**

Die akute Nierenschädigung (AKI) ist eine bei Hunden häufig vorkommende und oft tödlich endende Erkrankung. Prärenale, intrinsisch renale und postrenale Ursachen werden unterschieden. Infektionskrankheiten (Leptospirose, bakterielle Pyelonephritis) und Intoxikationen (Medikamente, Pflanzen, Trauben, Frostschutzmittel) sind die häufigsten Ursachen einer AKI beim Hund. Die aufgrund der herkömmlichen Diagnostik zeitverzögerte Diagnosestellung trägt stark zur hohen Mortalitätsrate der AKI beim Hund (> 50 %) bei. Ihre Diagnose beruht überwiegend auf einem abrupten Anstieg der Serum-Kreatininkonzentration über den Referenzbereich. Kreatinin steigt jedoch erst an, wenn bereits 75 % oder mehr der ursprünglichen Nephronenpopulation funktionsunfähig sind. Kreatinin ist somit kein Echtzeit-Indikator einer Nierenschädigung. Außerdem wird Kreatinin durch verschiedene nicht-renale Faktoren beeinflusst und lässt keine Unterscheidung in akut und chronisch zu. Die frühe Diagnose einer AKI sowie die Differenzierung einer AKI von einer CKD sind aber von großer therapeutischer und prognostischer Relevanz, da bei der akuten Nierenerkrankung, im Gegensatz zur chronischen Nierenerkrankung, eine vollständige Erholung des Patienten ohne bleibende signifikante Nierenfunktionsstörung möglich ist. Hieraus resultiert die Notwendigkeit neuer und prädiktiver Biomarker für die Frühdiagnose einer akuten Nierenschädigung. In der Humanmedizin ist das Neutrophilen Gelatinase-assoziierte Lipocalin (NGAL) aktuell der vielversprechendste renale Biomarker zur Früherkennung einer AKI. Auch für den Hund wird ein NGAL ELISA Test Kit angeboten, es liegen jedoch nur wenige Daten zur labordiagnostischen Beurteilung beim Hund vor.

Ziel dieser Studie war daher eine erste Evaluation von NGAL als renalen Biomarker bei gesunden Hunden sowie Hunden mit einer renalen Azotämie (AKI oder CKD).

Insgesamt wurden zwischen November 2010 und November 2011 18 gesunde Hunde sowie 53 Hunde mit AKI und 30 Hunde mit CKD untersucht. Bei 28 Hunden wurde eine Leptospirose als Ursache der AKI diagnostiziert. Die Messung des NGAL

erfolgte aus Heparin-Plasma- und Urinproben unter Verwendung eines kommerziell erhältlichen Sandwich Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) - Kit (Dog NGAL ELISA Kit, BioPorto® Diagnostics A/S, Gentofte Dänemark).

Die gesunde Kontrollgruppe wies statistisch signifikant niedrigere Plasma-NGAL-Konzentrationen und UNKQ-Werte auf als die Hunde mit einer renalen Azotämie. Die Plasma-NGAL-Konzentration der AKI-Gruppe war verglichen mit der CKD-Gruppe signifikant erhöht. Für den UNKQ konnte innerhalb beider Gruppen kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Diagnose einer Leptospirose übte keinen Einfluss auf NGAL-Werte aus. Die Plasma-Kreatininkonzentration korrelierte signifikant mit der Plasma-NGAL-Konzentration aller Hunde (gesunde Hunde, AKI, CKD) bzw. der Hunde mit einer renalen Azotämie, nicht jedoch mit der Plasma-NGAL-Konzentration der gesunden Studienpopulation. Für die im Doppelansatz gemessenen Plasma-NGAL-Konzentrationen wurde eine Intra-Assay-Varianz von 3,1 % errechnet, für die Urin-NGAL-Konzentrationen von 4,8 %. Es bestand kein Einfluss von Alter, Geschlecht und Körpergewicht auf die Plasma-NGAL-Konzentration und den UNKQ.

Auch beim Hund kann die NGAL-Konzentration einfach und in engen Grenzen aus Plasma und Urin bestimmt werden. NGAL erfüllt viele Anforderungen an einen optimalen renalen Biomarker und kann auch beim Hund zur Differenzierung von gesunden Hunden und Hunden mit einer Nierenerkrankung hilfreich sein. Die Plasma-NGAL-Konzentration kann außerdem zur Differenzierung einer AKI von einer CKD bei Hunden mit einer renalen Azotämie beitragen.

## **VII. SUMMARY**

Acute kidney injury (AKI) is a common and often fatal disorder in dogs. Causes include prerenal, intrinsic renal and postrenal conditions. Infectious disease (leptospirosis, bacterial pyelonephritis) and toxicity (medications, plants, grapes, antifreeze) are the most common causes of AKI in dogs. One of the reasons for the high mortality is the late recognition of AKI using traditional clinical diagnostic tests. At present, AKI is mainly diagnosed based on a rapid elevation in serum creatinine. However, serum creatinine only rises after a loss of renal function greater than 75 %. Therefore the increase in serum creatinine cannot be a real time indicator of renal injury since days are needed to reach a steady state between the production of serum creatinine and the decrease in excretion of serum creatinine. In addition, serum creatinine can be affected by multiple non-renal factors and is not helpful in distinguish AKI from CKD. Early recognition of AKI and differentiation of AKI from CKD is important for therapeutic and prognostic reasons and should be established as soon as possible because AKI potentially is reversible, whereas CKD is not. Therefore, there is a need for sensitive and specific markers for early detection of AKI, not only in human but also in veterinary medicine. Recently, a number of studies have indicated that serum and urine NGAL are sensitive and specific biomarkers for the prediction of AKI in human patients. There is now also a specific ELISA test for canine NGAL available, but NGAL results in dogs are sparse.

The aim of this study was to evaluate serum and urinary NGAL in healthy dogs and dogs with renal azotemia (AKI or CKD).

Between November 2010 and November 2011 NGAL measurements of 18 healthy dogs, 53 AKI dogs and 30 CKD dogs were performed. Plasma and urine NGAL concentrations were measured with commercially available sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (Dog NGAL ELISA Kit, BioPorto® Diagnostics A/S, Gentofte Denmark).

## Summary

Plasma NGAL and UNCR were significantly lower in the healthy dogs compared to dogs with renal azotemia. Plasma NGAL concentration, but not UNCR, was significantly higher in dogs with AKI compared to dogs with CKD. Within the AKI group, no difference was detected in NGAL between dogs with and without leptospirosis. Creatinine was significantly correlated with plasma NGAL in the entire cohort and in dogs with renal azotemia, but not in healthy dogs. Plasma and urine NGAL concentration for the duplicate measurements showed an intra-assay variability of 3,1 % and 4,8 %, respectively. There was no significant correlation between NGAL and age, sex or bodyweight.

Neutrophil gelatinase-associated lipocalin can be measured easily and within narrow limits in both blood and urine also from dogs. NGAL fulfills many requirements for an ideal renal biomarker and might be useful for the differentiation between healthy dogs and dogs with kidney disease. Furthermore, the plasma NGAL concentration might be helpful to differentiate AKI from CKD in dogs with renal azotemia.

## VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Ahn, H - J.; Hyun, C. (2013): Evaluation of serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) activity in dogs with chronic kidney disease. In: *Veterinary Record* 173 (18), S. 452.

Almy, F. S.; Christopher, M. M.; King, D. P.; Brown, S. A. (2002): Evaluation of Cystatin C as an Endogenous Marker of Glomerular Filtration Rate in Dogs. In: *J Vet Int Med* 16 (1), S. 45.

Anonymus (2014): Grading of acute kidney injury (2013). [Online im Internet:] URL: [http://www.iris-kidney.com/\\_downloads/IRIS GRADING OF ACUTE KIDNEY INJURY \(final\).pdf](http://www.iris-kidney.com/_downloads/IRIS_GRADING_OF_ACUTE_KIDNEY_INJURY_(final).pdf), S. 1-5 [Stand 29.04.2014, 10:28]

Bazzi, C.; Petrini, C.; Rizza, V.; Arrigo, G.; Napodano, P.; Paparella, M.; D'Amico, G. (2002): Urinary N-acetyl-beta-glucosaminidase excretion is a marker of tubular cell dysfunction and a predictor of outcome in primary glomerulonephritis. In: *Nephrol. Dial. Transplant.* 17 (11), S. 1890–1896.

Bellomo, R.; Ronco, C.; Kellum, J. A.; Mehta, R. L.; Palevsky, P. (2004): Acute renal failure-definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group. In: *Crit Care* 8 (4), S. R204.

Bennett, M.; Dent, C. L.; Ma, Q.; Dastrala, S.; Grenier, F.; Workman, R. et al. (2008): Urine NGAL Predicts Severity of Acute Kidney Injury After Cardiac Surgery: A Prospective Study. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 3 (3), S. 665–673.

Biomarkers Definitions Working Group (2001): Biomarkers and surrogate endpoints: Preferred definitions and conceptual framework. In: *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 69 (3), S. 89–95.

Bolignano, D.; Lacquaniti, A.; Coppolino, G.; Donato, V.; Campo, S.; Fazio, M. R. et al. (2009): Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) and Progression of Chronic Kidney Disease. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 4 (2), S. 337–344.

Bolignano, D.; Lacquaniti, A.; Coppolino, G.; Campo, S.; Arena, A.; Buemi, M. (2008): Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Reflects the Severity of Renal Impairment in Subjects Affected by Chronic Kidney Disease. In: *Kidney Blood Press Res* 31 (4), S. 255–258.

Borregaard, N.; Sehested, M.; Nielsen, B. S.; Sengeløv, H.; Kjeldsen, L. (1995): Biosynthesis of granule proteins in normal human bone marrow cells. Gelatinase is a marker of terminal neutrophil differentiation. In: *Blood* 85 (3), S. 812–817.

Braun, J - P.; Perxachs, A.; Pe´CHEREAU, D.; De La Farge, F. (2002): Plasma Cystatin C in the Dog: Reference Values and Variations with Renal Failure. In: *Comparative Clinical Pathology* 11 (1), S. 44–49.

Brown, S.; Atkins, C.; Bagley, R.; Carr, A.; Cowgill, L.; Davidson, M. et al. (2007): Guidelines for the Identification, Evaluation, and Management of Systemic Hypertension in Dogs and Cats. In: *J Vet Int Med* 21 (3), S. 542.

Cai, L.; Rubin, J.; Han, W.; Venge, P.; Xu, S. (2010): The Origin of Multiple Molecular Forms in Urine of HNL/NGAL. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 5 (12), S. 2229–2235.

Capuano, F.; Goracci, M.; Luciani, R.; Gentile, G.; Roscitano, A.; Benedetto, U.; Sinatra, R. (2009): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin levels after use of mini-cardiopulmonary bypass system. In: *Interactive CardioVascular and Thoracic Surgery* 9 (5), S. 797–801.

Cavalier, E.; Bekaert, A.; Legrand, D.; Rozet, E.; Krzesinski, J.; Delanaye, P. (2010): Urinary NGAL: Use of absolute value or ratio to creatinine? (abstract). Abstracts presented at the 2010 annual meeting of the belgien society of nephrology (BVN – SBN) 29 April 2010, Brussels University Hospital. In: *Acta Clinica Belgica* 65 (3), S. 13.

Chew, D. J.; DiBartola, S. P.; Schenck, P. A. (2011): Chronic Renal Failure. In: *Canine and feline nephrology and urology*. 2. Aufl. St. Louis, Mo: Elsevier/Saunders, S. 145-196.

Choi, E - W.; Shin, I - S.; Bhang, D - H.; Lee, D - H.; Bae, B - K.; Kang, M - S. et al. (2006): Hormonal change and cytokine mRNA expression in peripheral blood mononuclear cells during the development of canine autoimmune thyroiditis. In: *Clin Exp Immunol* 146 (1), S. 101–108.

Cobrin, A. (2013): Measurement of serum and urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in dogs with chronic kidney disease, lymphosarcoma, carcinoma and induced endotoxemia to assess diagnostic utility of NGAL in dogs with chronic kidney disease. Dissertation. University of Guelph. [Online im Internet:] URL: [https://dspace.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/7534/Cobrin\\_Allison\\_201309\\_DVSc.pdf?sequence=3](https://dspace.lib.uoguelph.ca/xmlui/bitstream/handle/10214/7534/Cobrin_Allison_201309_DVSc.pdf?sequence=3) [Stand 06.05.2014, 09:53].

Cobrin, A. R.; Blois, S. L.; Kruth, S. A.; Abrams - Ogg, A. C. G.; Dewey, C. (2013a): Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. In: *J Small Anim Pract* 54 (12), S. 647–655.

Conti, M.; Moutereau, S.; Zater, M.; Lallali, K.; Durrbach, A.; Manivet, P. et al. (2006): Urinary cystatin C as a specific marker of tubular dysfunction. In: *Clinical Chemical Laboratory Medicine* 44 (3).

Cook, A. K.; Cowgill L. D. (1996): Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: a review of 137 cases (1985-1992). In: *J Am Anim Hosp Assoc (Journal of the American Animal Hospital Association)* 32 (4), S. 313–322.

Cowland, J. B.; Borregaard, N. (1997): Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil gelatinase-associated lipocalin from humans. In: *Genomics* 45 (1), S. 17–23.

Cowland, J. B.; Sørensen, O. E.; Sehested, M.; Borregaard, N. (2003): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin is up-regulated in human epithelial cells by IL-1 beta, but not by TNF-alpha. In: *J. Immunol.* 171 (12), S. 6630–6639.

Daure, E.; Belanger, M. C.; Beauchamp, G.; Lapointe, C. (2013): Elevation of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in non-azotemic dogs with urinary tract infection. In: *Research in Veterinary Science* 95 (3), S. 1181–1185.

Decavele, A - S. C.; Dhondt, L.; De Buyzere, M. L.; Delanghe, J. R. (2011): Increased urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin in urinary tract infections and leukocyturia. In: *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 49 (6).

De Loor, J.; Daminet, S.; Smets, P.; Maddens, B.; Meyer, E. (2013): Urinary Biomarkers for Acute Kidney Injury in Dogs. In: *J Vet Intern Med* 27 (5), S. 998–1010.

Devarajan, P. (2007): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: new paths for an old shuttle. In: *Cancer Ther* 5 (B), S. 463–470.



Devarajan, P. (2010): Review: Neutrophil gelatinase-associated lipocalin: A troponin-like biomarker for human acute kidney injury. In: *Nephrology* 15 (4), S. 419–428.

DiBartola, S. P. (2010): Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease. In: *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and the cat*. Ettinger, S. J.; Feldman, E. C.; 7. Aufl. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier, S. 1955-1969.

Elliott; J.; Watson, A. D. J. (2009): Chronic Kidney disease: Staging and Management. In: *Kirk's current veterinary therapy*. Bonagura, J. D.; Twedt, D. C.; Kirk, R. W.; 14. Aufl. St. Louis, Miss, London: Elsevier Saunders, S. 883-892.

Flo, T. H.; Smith, K. D.; Sato, S.; Rodriguez, D. J.; Holmes, M. A.; Strong, R. K. et al. (2004): Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. In: *Nature* 432 (7019), S. 917–921.

Friedl, A.; Stoesz, S. P.; Buckley, P.; Gould, M. N. (1999): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin in normal and neoplastic human tissues. Cell type-specific pattern of expression. In: *Histochem. J.* 31 (7), S. 433–441.

Gaspari, F.; Cravedi, P.; Mandalà, M.; Perico, N.; De Leon, F. R.; Stucchi, N. et al. (2010): Predicting Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury by Urinary Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin Excretion: A Pilot Prospective Case-Control Study. In: *Nephron Clin Pract* 115 (2), S. c154.

Gauer, S.; Sichler, O.; Obermüller, N.; Holzmann, Y.; Kiss, E.; Sobkowiak, E. et al. (2007): IL-18 is expressed in the intercalated cell of human kidney. In: *Kidney Int* 72 (9), S. 1081–1087.

Geigy, C. A.; Schweighauser, A.; Doherr, M.; Francey, T. (2011): Occurrence of systemic hypertension in dogs with acute kidney injury and treatment with amlodipine besylate. In: *Journal of Small Animal Practice* 52 (7), S. 340–346.

Gerber, B.; Glaus, T. M.; Unterer, S.; Reusch, C. E. (2004): Beurteilung von Parametern zur Unterscheidung von akuter und chronischer Niereninsuffizienz beim Hund. In: *Schweizer Archiv für Tierheilkunde* 146 (8), S. 365–373.

Ginevri, F.; Piccotti, E.; Alinovi, R.; DeToni, T.; Biagini, C.; Chiggeri, G. M.; Gusmano, R. (1993): Reversible tubular proteinuria precedes microalbuminuria and correlates with the metabolic status in diabetic children. In: *Pediatr Nephrol* 7 (1), S. 23–26.

Gosling, P. (1995): Microalbuminuria: a marker of systemic disease. In: *Br J Hosp Med* 54 (6), S. 285–290.

Grauer, G. F.; Oberhauser, E. B.; Basaraba, R. J.; Lappin, M. R.; Simpson, D. F.; Jensen, W. A. (2002): Development of microalbuminuria in dogs with heartworm disease (abstract 103). Research Abstract Program of the 20 th Annual ACVIM Forum Dallas, TX, May 29-June 1, 2002. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16 (3), S. 352.

Grauer, G. F. (2011): Proteinuria: Measurement and Interpretation. In: *Topics in Companion Animal Medicine* 26 (3), S. 121–127.

Grigoryev, D. N.; Liu, M.; Hassoun, H. T.; Cheadle, C.; Barnes, K. C.; Rabb, H. (2008): The Local and Systemic Inflammatory Transcriptome after Acute Kidney Injury. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 19 (3), S. 547–558.

Haase, M.; Haase - Fielitz, A. (2011): Akute Nierenschädigung nach Herzchirurgie. In: *Intensivmed* 48 (6), S. 474–479.

Haase, M.; Bellomo, R.; Devarajan, P.; Schlattmann, P.; Haase-Fielitz, A. (2009): Accuracy of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin (NGAL) in Diagnosis and Prognosis in Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-analysis. In: *American Journal of Kidney Diseases* 54 (6), S. 1012–1024.

Haase, M.; Haase-Fielitz, A.; Bellomo, R.; Devarajan, P.; Story, D.; Matalanis, G. et al. (2009a): Sodium bicarbonate to prevent increases in serum creatinine after cardiac surgery: A pilot double-blind, randomized controlled trial\*. In: *Critical Care Medicine* 37 (1), S. 39–47.

Haase, M.; Haase-Fielitz, A.; Bellomo, R.; Mertens, P. R. (2011a): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute renal disease. In: *Current Opinion in Hematology* 18 (1), S. 11–18.

Hall, I. E.; Yarlagadda, S. G.; Coca, S. G.; Wang, Z.; Doshi, M.; Devarajan, P. et al. (2010): IL-18 and Urinary NGAL Predict Dialysis and Graft Recovery after Kidney Transplantation. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 21 (1), S. 189–197.

Haller, M.; Müller, W.; Binder, H.; Estelberger, W.; Arnold, P. (1998): Single-injection inulin clearance--a simple method for measuring glomerular filtration rate in dogs. In: *Res. Vet. Sci.* 64 (2), S. 151–156.

Hanai, J-i.; Mammoto, T.; Seth, P.; Mori, K.; Karumanchi, S. A.; Barasch, J.; Sukhatme, V. P. (2005): Lipocalin 2 Diminishes Invasiveness and Metastasis of Ras-transformed Cells. In: *Journal of Biological Chemistry* 280 (14), S. 13641–13647.

Heiene R.; Lefebvre H. P. (2007): Assesment of renal function: In: *BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology*. Elliot J., Grauer G. F.; 2. Aufl. Quedgeley, Gloucester: British Small Animal Veterinary Association (BSAVA manual series), S. 117-125.

Heiene, R.; Moe, L. (1998): Pharmacokineatic Aspects of Measurement of Glomerular Filtration Rate in the Dog: A Review. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 12 (6), S. 401–414.

Herget-Rosenthal, S.; Marggraf, G.; Husing, J.; Goring, F.; Pietruck, F.; Janssen, O. et al. (2004): Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. In: *Kidney Int* 66 (3), S. 1115–1122.

Hirsch, R.; Dent, C.; Pfriem, H.; Allen, J.; Beekman, R. H.; Ma, Q. et al. (2007): NGAL is an early predictive biomarker of contrast-induced nephropathy in children. In: *Pediatr Nephrol* 22 (12), S. 2089–2095.

Hsieh, O. F.; Lees, G. E.; Clark, S. E.; Jensen, W. A.; Kashtan, C. E. (2005): Development of Albuminuria and overt Proteinuria in heterozygous (carrier) female dogs with X-linked hereditary nephropathy (XLHN) (abstract 118). ACVIM Abstracts. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19 (3), S. 432.

Hsu, W - L.; Lin, Y - S.; Hu, Y - Y.; Wong, M - L.; Lin, F - Y.; Lee, Y - J. (2014): Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin in Dogs with Naturally Occurring Renal Diseases. In: *J Vet Intern Med* 28 (2), S. 437–442.

Ichimura, T.; Bonventre, J. V.; Bailly, V.; Wei, H.; Hession, C. A.; Cate, R. L.; Sanicula, M. (1998): Kidney Injury Molecule-1 (KIM-1), a Putative Epithelial Cell Adhesion Molecule Containing a Novel Immunoglobulin Domain, Is Up-regulated in Renal Cells after Injury. In: *Journal of Biological Chemistry* 273 (7), S. 4135–4142.

Kai, K.; Yamaguchi, T.; Yoshimatsu, Y.; Kinoshita, J.; Teranishi, M.; Takasaki, W. (2013): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a sensitive urinary biomarker of acute kidney injury in dogs receiving gentamicin. In: *J. Toxicol. Sci.* 38 (2), S. 269–277.

Kaufman, J.; Dhakal, M.; Patel, B.; Hamburger, R. (1991): Community-acquired acute renal failure. In: *Am. J. Kidney Dis.* 17 (2), S. 191–198.

Kjeldsen, L.; Johnsen, A. H.; Sengeløv, H.; Borregaard, N. (1993): Isolation and primary structure of NGAL, a novel protein associated with human neutrophil gelatinase. In: *J. Biol. Chem.* 268 (14), S. 10425–10432.

Kjelgaard -Hansen, M.; Goggs, R.; Wiinberg, B.; Chan, D.L (2011): Use of Serum Concentrations of Interleukin-18 and Monocyte Chemoattractant Protein-1 as Prognostic Indicators in Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia in Dogs. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25 (1), S. 76–82.

Koyner, J. L.; Parikh, C. R. (2013): Clinical Utility of Biomarkers of AKI in Cardiac Surgery and Critical Illness. In: *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 8 (6), S. 1034–1042.

Kyhse - Andersen J.; Schmidt C.; Nordin G.; Andersson B.; Nilsson -Ehle P.; Lindström V.; Grubb A. (1994): Serum Cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. In: *Clinical Chemistry* 40 (10), S. 1921–1926.

Lassnigg, A.; Schmid, E. R.; Hiesmayr, M.; Falk, C.; Druml, W.; Bauer, P.; Schmidlin, D. (2008): Impact of minimal increases in serum creatinine on outcome in patients after cardiothoracic surgery: do we have to revise current definitions of acute renal failure? In: *Crit. Care Med.* 36 (4), S. 1129–1137.

Langston, C. (2010): Acute Uremia. In: *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and the cat*. Ettinger, S. J.; Feldman, E. C.; 7. Aufl. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier, S. 1969-1985.

Lee, Y - J.; Hu, Y - Y.; Lin, Y - S.; Chang, C - T.; Lin, F - Y.; Wong, M - L. et al. (2012): Urine neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute canine kidney injury. In: *BMC Vet Res* 8 (1), S. 248.

Lees, G. E.; Brown, S. A.; Elliott, J.; Grauer, G. F.; Vaden, S. L. (2005): Assessment and Management of Proteinuria in Dogs and Cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). In: *J Vet Int Med* 19 (3), S. 377.

Lefebvre, H. P. (2011): Renal function testing. In: *Nephrology and urology of small animals*. Bartges, J.; Polzin, D. J.; Chichester, West Sussex, UK, Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, S. 91-96.

Lefebvre, H. P.; Dossin, O.; Trumel, C.; Braun, J - P. (2008): Fractional excretion tests: a critical review of methods and applications in domestic animals. In: *Veterinary Clinical Pathology* 37 (1), S. 4–20.

Liangos, O.; Perianayagam, M. C.; Vaidya, V. S.; Han, W. K.; Wald, R.; Tighiouart, H. et al. (2007): Urinary N-acetyl-beta-(D)-glucosaminidase activity and kidney injury molecule-1 level are associated with adverse outcomes in acute renal failure. In: *J. Am. Soc. Nephrol.* 18 (3), S. 904–912.

Ling, W.; Zhaohui, N.; Ben, H.; Leyi, G.; Jianping, L.; Huili, D.; Jiaqi, Q. (2008): Urinary IL-18 and NGAL as Early Predictive Biomarkers in Contrast-Induced Nephropathy after Coronary Angiography. In: *Nephron Clin Pract* 108 (3), S. c176.

Mastroianni Kirsztajn, G.; Nishida, S. K.; Silva, M. S.; Ajzen, H.; Moura, L. A.; Pereira, A. B. (2002): Urinary Retinol-Binding Protein as a Prognostic Marker in Glomerulopathies. In: *Nephron* 90 (4), S. 424–431.

McDuffie, J. E.; Sablad, M.; Ma, JY.; Snook, S. (2010): Urinary parameters predictive of cisplatin-induced acute renal injury in dogs. In: *Cytokine* 52 (3), S. 156–162.

Melnikov, V. Y.; Ecdler, T.; Fantuzzi, G.; Siegmund, B.; Lucia, M. S.; Dinarello, C. A. et al. (2001): Impaired IL-18 processing protects caspase-1–deficient mice from ischemic acute renal failure. In: *J. Clin. Invest.* 107 (9), S. 1145–1152.

Melnikov, V. Y.; Faubel, S.; Siegmund, B.; Lucia, M. S.; Ljubanovic, D.; Edelstein, C. L. (2002): Neutrophil-independent mechanisms of caspase-1– and IL-18–mediated ischemic acute tubular necrosis in mice. In: *J. Clin. Invest.* 110 (8), S. 1083–1091.

Mishra, J. (2004): Amelioration of Ischemic Acute Renal Injury by Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 15 (12), S. 3073–3082.

Mishra, J.; Quing, M.; Prada, A.; Mitsnefes, M.; Zahedi, K.; Yang J. et al. (2003): Identification of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Novel Early Urinary Biomarker for Ischemic Renal Injury. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 14 (10), S. 2534–2543.

Mishra, J.; Dent, C.; Tarabishi, R.; Mitsnefes, M. M.; Ma, Q.; Kelly, C. et al. (2005): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) as a biomarker for acute renal injury after cardiac surgery. In: *The Lancet* 365 (9466), S. 1231–1238.

Mishra, J.; Mori, K.; Ma, Q.; Kelly, C.; Barasch, J.; Devarajan, P. (2004): Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin: A Novel Early Urinary Biomarker for Cisplatin Nephrotoxicity. In: *Am J Nephrol* 24 (3), S. 307–315.

Mishra, O. P.; Jain, P.; Srivastava, P.; Prasad, R. (2012): Urinary N-acetyl-beta-D glucosaminidase (NAG) level in idiopathic nephrotic syndrome. In: *Pediatr Nephrol* 27 (4), S. 589–596.

Mitsnefes, M. M.; Kathman, T. S.; Mishra, J.; Kartal, J.; Khoury, P. R.; Nickolas, T. L. et al. (2007): Serum neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of renal function in children with chronic kidney disease. In: *Pediatr Nephrol* 22 (1), S. 101–108.

Miyagawa, Y.; Takemura, N.; Hirose, H. (2009): Evaluation of the Measurement of Serum Cystatin C by an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Humans as a Marker of the Glomerular Filtration Rate in Dogs. In: *J. Vet. Med. Sci.* 71 (9), S. 1169–1176.

Mogensen C. E.; Chachati A.; Christensen C. K.; Close C. F.; Deckert T.; Hommel E. et al. (1985-1986): Microalbuminuria: an early marker of renal involvement in diabetes. In: *Uremia Invest (Uremia Investigation)* 9 (2), S. 85–95.

Monti, P.; Benchekroun, G.; Berlato, D.; Archer, J. (2012): Initial evaluation of canine urinary cystatin C as a marker of renal tubular function. In: *Journal of Small Animal Practice* 53 (5), S. 254–259.

Mori, K.; Nakao, K. (2007): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin as the real-time indicator of active kidney damage. In: *Kidney Int* 71 (10), S. 967–970.



Mori, K.; Lee, H. T.; Rapoport, D.; Drexler, I. R.; Foster, K.; Yang, J. et al. (2005): Endocytic delivery of lipocalin-siderophore-iron complex rescues the kidney from ischemia-reperfusion injury. In: *J. Clin. Invest.* 115 (3), S. 610–621.

Nabity, M. B; Lees, G. E; Cianciolo, R.; Boggess, M. M; Steiner, J. M; Suchodolski, J. S (2012): Urinary Biomarkers of Renal Disease in Dogs with X-Linked Hereditary Nephropathy. In: *J Vet Intern Med* 26 (2), S. 282–293.

Nash, K.; Hafeez, A.; Hou, S. (2002): Hospital-acquired renal insufficiency. In: *American Journal of Kidney Diseases* 39 (5), S. 930–936.

Nguyen, M. T.; Devarajan, P. (2008): Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. In: *Pediatr Nephrol* 23 (12), S. 2151–2157.

Nickolas, T. L.; O'Rourke, M. J.; Yang, Y.; Sise, M. E.; Canetta P. A.; Barasch N. et al. (2008): Sensitivity and Specificity of a Single Emergency Department Measurement of Urinary Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin for Diagnosing Acute Kidney Injury. In: *Ann Intern Med* 148 (11), S. 810.

Nielsen, B. S.; Borregaard, N.; Bundgaard, J. R.; Timshel, S.; Sehested, M.; Kjeldsen, L. (1996): Induction of NGAL synthesis in epithelial cells of human colorectal neoplasia and inflammatory bowel diseases. In: *Gut* 38 (3), S. 414–420.

Pagitz, M.; Frommlet, F.; Schwendenwein, I. (2007): Evaluation of Biological Variance of Cystatin C in Comparison With Other Endogenous Markers of Glomerular Filtration Rate in Healthy Dogs. In: *J Vet Int Med* 21 (5), S. 936.

Palacio, J.; Liste, F.; Gascón, M. (1997): Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. In: *Vet. Rec.* 140 (18), S. 477–480.

Palm, C. A.; Westropp, J. L.; LeRoy, B.; Segev, G.; Cowgill, L. D. (2012): Urinary NGAL: a biomarker for early identification of acute kidney injury in dogs (abstract NU-10). 2012 ACVIM Forum Research Abstracts Program. In: *J Vet Intern Med* 26 (3), S. 690–822.

Parikh, C. R.; Abraham, E.; Ancukiewicz, M.; Edelstein, C. L. (2005): Urine IL-18 Is an Early Diagnostic Marker for Acute Kidney Injury and Predicts Mortality in the Intensive Care Unit. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 16 (10), S. 3046–3052.

Parikh, C. R.; Jani, A.; Mishra, J.; Ma, Q.; Kelly, C.; Barasch, J. et al. (2006a): Urine NGAL and IL-18 are Predictive Biomarkers for Delayed Graft Function Following Kidney Transplantation. In: *Am J Transplant* 6 (7), S. 1639–1645.

Parikh, C. R.; Lu, J. C.; Coca, S. G.; Devarajan, P. (2010): Tubular proteinuria in acute kidney injury: a critical evaluation of current status and future promise. In: *Annals of Clinical Biochemistry* 47 (4), S. 301–312.

Parikh, C. R.; Mishra, J.; Thiessen - Philbrook, H.; Dursun, B.; Ma, Q.; Kelly, C. et al. (2006): Urinary IL-18 is an early predictive biomarker of acute kidney injury after cardiac surgery. In: *Kidney Int* 70 (1), S. 199–203.

Parikh, C. R.; Jani, A.; Melnikov, V. Y.; Faubel, S.; Edelstein, C. L. (2004): Urinary interleukin-18 is a marker of human acute tubular necrosis. In: *American Journal of Kidney Diseases* 43 (3), S. 405–414.

Peeters, D.; Peters, I.; Clercx, C.; Day, M. (2006): Quantification of mRNA encoding cytokines and chemokines in nasal biopsies from dogs with sino-nasal aspergillosis. In: *Veterinary Microbiology* 114 (3-4), S. 318–326.

Playford, R. J.; Belo, A.; Poulsom, R.; Fitzgerald, A. J.; Harris, K.; Pawluczyk, I. et al. (2006): Effects of Mouse and Human Lipocalin Homologues 24p3/lcn2 and Neutrophil Gelatinase–Associated Lipocalin on Gastrointestinal Mucosal Integrity and Repair. In: *Gastroenterology* 131 (3), S. 809–817.

Plumb, D. C. (1995): *Veterinary drug handbook*. 2. Aufl. Ames, Iowa: Distributed by Iowa State University Press, S. 1052.

Polzin, D. J. (2010): Chronic Kidney Disease. In: *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and the cat*. Ettinger, S. J.; Feldman, E. C.; 7. Aufl. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier, S. 1990-2021.

Pressler, B. M. (2013): Clinical Approach to Advanced Renal Function Testing in Dogs and Cats. In: *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* 43 (6), S. 1193–1208.

Pressler, B.; Bartges, J. W. (2010): Urinary Tract Infections. In: *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and the cat*. Ettinger, S. J.; Feldman, E. C.; 7. Aufl. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier, S. 2036-2047.

Pressler, B. M.; Proulx, D. A.; Jensen, W. A.; Vaden S. L. (2003): Urine albumin concentration is increased in dogs with lymphoma and osteosarcoma (abstract 101). Research Abstract Program of the 21st Annual ACVIM Forum Charlotte, NC, June 4-7, 2003. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17 (3), S. 404.

Pressler, B. M.; Vaden, S. L.; Jensen, W. A.; Simpson, D. (2002): Detection of Canine Microalbuminuria Using Semiquantitative Test Strips Designed for Use with Human Urine. In: *Veterinary Clinical Pathology* 31 (2), S. 56–60.

Radecki S.; Donnelly R.; Jensen W. A.; Stinchcomb D. T. (2003): Effect of age and breed on the prevalence of microalbuminuria in dogs (abstract 110). Research Abstract Program of the 21st Annual ACVIM Forum Charlotte, NC, June 4-7, 2003. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17 (3), S. 406.

Raila, .J.; Brunnberg, L.; Schweigert, F. J.; Kohn, B. (2010): Influence of kidney function on urinary excretion of albumin and retinol-binding protein in dogs with naturally occurring renal disease. In: *American Journal of Veterinary Research* 71 (11), S. 1387–1394.

Ross, L. (2009): Acute Renal Failure. In: *Kirk's current veterinary therapy*. Bonagura, J. D.; Twedt, D. C.; Kirk, R. W.; 14. Aufl. St. Louis, Miss, London: Elsevier Saunders, S. 879-882.

Royakkers, A. A. N. M.; Korevaar, J. C.; Suijlen, J. D. E.; Hofstra, L. S.; Kuiper, M. A.; Spronk, P. E. et al. (2011): Serum and urine cystatin C are poor biomarkers for acute kidney injury and renal replacement therapy. In: *Intensive Care Med* 37 (3), S. 493–501.

Sanderson; S. L. (2009): Measuring Glomerular Filtration Rate: Practical Use of Clearance Tests. In: *Kirk's current veterinary therapy*. Bonagura, J. D.; Twedt, D. C.; 14. Aufl. St. Louis, Miss, London: Elsevier Saunders, S. 868-871.

Schmidt - Ott, K. M.; Mori, K.; Li, J. Y.; Kalandadze, A.; Cohen, D. J.; Devarajan, P.; Barasch, J. (2007): Dual Action of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin. In: *Journal of the American Society of Nephrology* 18 (2), S. 407–413.

Schmidt - Ott, K. M.; Mori, K.; Kalandadze, A.; Li, J - Y.; Paragas, N.; Nicholas, T. et al. (2006): Neutrophil gelatinase-associated lipocalin-mediated iron traffic in kidney epithelia. In: *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 15 (4), S. 442–449.

Segev, G.; Palm, C.; LeRoy, B.; Cowgill, L.D; Westropp, J.L (2013): Evaluation of Neutrophil Gelatinase-Associated Lipocalin as a Marker of Kidney Injury in Dogs. In: *J Vet Intern Med* 27 (6), S. 1362–1367.

Skálová, S. (2005): The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-D-glucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. In: *Acta Medica (Hradec Kralove)* 48 (2), S. 75–80.

Smee, N.; Loyd, K.; Grauer, G. (2013): UTIs in Small Animal Patients: Part 1: Etiology and Pathogenesis. In: *Journal of the American Animal Hospital Association* 49 (1), S. 1–7.

Smets, P. M. Y.; Meyer, E.; Maddens, B. E. J.; Duchateau, L.; Daminet, S. (2010): Urinary Markers in Healthy Young and Aged Dogs and Dogs with Chronic Kidney Disease. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 24 (1), S. 65–72.

Stepien, R. L. (2010): Diagnostic Blood Pressure Measurement. In: *Textbook of veterinary internal medicine. Diseases of the dog and the cat.* Ettinger, S. J.; Feldman, E. C.; 7. Aufl. St. Louis, Mo: Saunders Elsevier, S. 398-402.

Stepien, R. L.; Rapoport, G. S. (1999): Clinical comparison of three methods to measure blood pressure in nonsedated dogs. In: *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 215 (11), S. 1623–1628.

Stokes, J. E. (2009): Diagnostic Approach to Acute Azotemia. In: *Kirk's current veterinary therapy.* Bonagura, J. D.; Twedt, D. C.; Kirk, R. W.; 14. Aufl. St. Louis, Miss, London: Elsevier Saunders, S. 855-860.

Stokes, J. E.; Bartges J. W. (2006): Causes of acute renal failure. In: *Comp Cont Educ Pract (Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian)* 28 (5), S. 387–396.

Supavekin, S.; Zhang, W.; Kucherlapati, R.; Kaskel, F. J.; Moore, L. C.; Devarajan, P. (2003): Differential gene expression following early renal ischemia/reperfusion. In: *Kidney Int* 63 (5), S. 1714–1724.

Tomonaga, Y.; Szucs, T.; Ambühl, P.; Nock, S.; Risch, M.; Risch, L. (2012): Insights on urinary NGAL obtained in a primary care setting. In: *Clinica Chimica Acta* 413 (7-8), S. 733–739.

Tuladhar, S. M.; Püntmann, V. O.; Soni, M.; Punjabi, P. P.; Bogle, R. G. (2009): Rapid Detection of Acute Kidney Injury by Plasma and Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin After Cardiopulmonary Bypass. In: *Journal of Cardiovascular Pharmacology* 53 (3), S. 261–266.

Uchino, S. (2005): Acute Renal Failure in Critically Ill Patients A Multinational, Multicenter Study. In: *JAMA* 294 (7), S. 813.

Urbschat, A.; Obermüller, N.; Haferkamp, A. (2011): Biomarkers of kidney injury. In: *Biomarkers* 16 (S1), S. S22.

Vaden, S. L.; Jensen, W.; Longhofer, S.; Simpson, D. (2001): Longitudinal study of microalbuminuria in soft-coated wheaten terriers (abstract 115). American College of Veterinary Internal Medicine. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15 (3), S. 300.

Viberti, G.C; Jarrett, R.J; Mahmud, U.; Hill, R.D; Argyropoulos, A.; Keen, H. (1982): Microalbuminuria as a predictor of clinical nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. In: *The Lancet* 319 (8287), S. 1430–1432.

Vonderen, I. K.; Kooistra, H. S.; Rijnberk, A. (1997): Intra- and Interindividual Variation in Urine Osmolality and Urine Specific Gravity in Healthy Pet Dogs of Various Ages. In: *Journal of Veterinary Internal Medicine* 11 (1), S. 30–35.

Wagener, G.; Minhaz, M.; Mattis, F. A.; Kim, M.; Emond, J. C.; Lee, H. T. (2011): Urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin as a marker of acute kidney injury after orthotopic liver transplantation. In: *Nephrology Dialysis Transplantation* 26 (5), S. 1717–1723.

Wagener, G.; Jan, M.; Kim, M.; Mori, K.; Barasch, J. M.; Sladen, R. N.; Lee, H. T. (2006): Association between Increases in Urinary Neutrophil Gelatinase-associated Lipocalin and Acute Renal Dysfunction after Adult Cardiac Surgery. In: *Anesthesiology* 105 (3), S. 485–491.

Wehner, A. (2008): Cystatin C als klinischer Parameter zur Erfassung der Nierenfunktion beim Hund. Dissertation. Medizinische Kleintierklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München. [Online im Internet:] URL: [http://edoc.ub.uni-muenchen.de/8838/1/Wehner\\_Astrid.pdf](http://edoc.ub.uni-muenchen.de/8838/1/Wehner_Astrid.pdf) [Stand 16.05.2014, 13:21].

Whittemore, J. C.; Gill, V. L.; Jensen, W. A.; Radecki, S. V.; Lappin, M. R. (2006): Evaluation of the association between microalbuminuria and the urine albumin-creatinine ratio and systemic disease in dogs. In: *Journal of the American Veterinary Medical Association* 229 (6), S. 958–963.

Xu, S. Y; Petersson, C. G. B.; Carlson, M.; Venge, P. (1994): The development of an assay for human neutrophil lipocalin (HNL) — to be used as a specific marker of

neutrophil activity in vivo and vitro. In: *Journal of Immunological Methods* 171 (2), S. 245–252.

Yang, J.; Goetz, D.; Li, J - Y.; Wang, W.; Mori, K.; Setlik, D. et al. (2002): An Iron Delivery Pathway Mediated by a Lipocalin. In: *Molecular Cell* 10 (5), S. 1045–1056.

Yilmaz, A.; Sevketoglu, E.; Gedikbasi, A.; Karyagar, S.; Kiyak, A.; Mulazimoglu, M. et al. (2009): Early prediction of urinary tract infection with urinary neutrophil gelatinase associated lipocalin. In: *Pediatr Nephrol* 24 (12), S. 2387–2392



## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen meiner Doktorarbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank geht an

Herrn Prof. Dr. Reto Neiger, meinen Doktorvater, der mir die Anfertigung dieser Doktorarbeit überhaupt erst ermöglicht hat und mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Danke Reto, ich habe mich bestens betreut gefühlt!

Dr. Sarah Steinbach. Mit ihr ist die Doktorarbeit in Kooperation gelaufen. Danke für die gute Zusammenarbeit und Deine fortwährende Hilfsbereitschaft. Ich hätte mir keine bessere Partnerin vorstellen können!

alle, die mir Ihre Hunde für die gesunde Studienpopulation zur Verfügung gestellt haben. Danke für die große Unterstützung!

alle Mitarbeiter des Zentrallabors. Danke für die gute Zusammenarbeit!

alle meine Freunde. Danke für die unermüdliche Unterstützung. Ich habe die besten Freunde, die man sich nur wünschen kann! Danke Janina und Toni, dass ich Eure Freundin werden durfte. Ihr seid ganz wundervolle Menschen, ein Leben ohne Euch ist nicht mehr vorstellbar für mich!

meinen Freund Steffen, der seit vielen Jahren mein Fels in der Brandung ist. Danke für Deine unglaubliche Geduld und dafür, dass Du immer wusstest, wann ich eine Pause brauche!

die besten Eltern der Welt! Ohne Euren Rückhalt und Eure bedingungslose Liebe wäre das alles nicht möglich gewesen. Danke, dass Ihr immer an mich glaubt!



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6282-8



9 783835 196282 8