

Aus der
Medizinischen Kleintierklinik der Tierärztlichen Fakultät
Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. vet. Dr. med.vet. habil. Katrin Hartmann

Angefertigt unter der Leitung von
Prof. Dr. med.vet. Dr. med.vet. habil. Johannes Hirschberger

Cystatin C als klinischer Parameter zur Erfassung der Nierenfunktion beim Hund

Inauguraldissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität München

von Astrid Carmen Christina Wehner
aus Darmstadt

München 2008

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun
Referent: Univ.-Prof. Dr. Hirschberger
Korreferent: Univ.-Prof. Dr. Poulsen Nautrup

Tag der Promotion: 8. Februar 2008

Meiner Mutter und meiner Tante Lieselotte

Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
Aa	Arteriae
ADH	antidiuretisches Hormon
ANV	akutes Nierenversagen
AUC	area-under-the-plasma-concentration-versus-time-curve
CNV	chronisches Nierenversagen
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
IFN	Interferon
l/l	latero-lateral
LPS	Lipopolysaccharide
PD	Polydipsie
PENIA	particle-enhanced-nephelometric-immunoassay
PETIA	particle-enhanced-turbidimetric-immunoassay
PU	Polyurie
ROC	receiver-operating-characteristic
TGF	transforming-growth-factor
UP/C	Urin-Protein-Kreatinin-Quotient
V	Vena
v/d	ventro-dorsal
Vv	Venae
ZNS	zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung und Zielsetzung	1
II	Literaturübersicht	2
1.	Anatomie und Physiologie der Nieren	2
2.	Nierenerkrankungen beim Hund	9
2.1.	Unterscheidung akutes und chronisches Nierenversagen	10
2.2.	Labordiagnostische Evaluation der Nierenfunktion	11
2.2.1.	Harnstoff	12
2.2.2.	Kreatinin	12
2.2.3.	Clearance-Methoden	13
2.2.4.	Cystatin C	20
2.2.5.	Urin-spezifisches-Gewicht	34
III	Publikation	36
1.	Abstract	37
2.	Introduction	38
3.	Material and Methods	39
4.	Results	41
5.	Discussion	45
6.	Conclusion	48
7.	Foodnotes	49
8.	References	50
9.	Figure Legends	54
10.	Tables	55
11.	Figures	56
12.	Acknowledgement	61
13.	Letter of Acceptance	62
IV	Diskussion	64

V	Zusammenfassung	70
VI	Summary	71
VII	Literaturverzeichnis	72
VIII	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	82
IX	Danksagung	83
X	Lebenslauf	84

I Einleitung und Zielsetzung

Die Bestimmung der glomerulären Funktion ist ein essentieller Bestandteil in der diagnostischen Herangehensweise bei Patienten mit einer möglichen Nierenerkrankung. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) steht im direkten Zusammenhang mit der funktionsfähigen Nierenmasse. Indikationen zur Bestimmung der glomerulären Funktion sind die Diagnostik einer Niereninsuffizienz, das Krankheitsmonitoring und die Einschätzung der Nierenfunktion vor Applikation potentiell nephrotoxischer Substanzen.

Geeignete Marker zur Bestimmung der GFR sollten exklusiv glomerulär filtriert und nicht tubulär rückresorbiert oder sezerniert werden. Sie sollten idealerweise endogen im Körper vorkommen. Daher war die Forschung über niedermolekulare Proteine, die in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten vorkommen, in den letzten 20 Jahren Schwerpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Studien in der Humanmedizin.

Cystatin C, ein Protease-Inhibitor, ist ein solches niedermolekulares Protein. Es wird von allen kernhaltigen Zellen im Körper gebildet. Seine Hauptfunktion ist das Eingrenzen von Entzündungsreaktionen. Seine Syntheserate ist konstant, unabhängig von Alter, Geschlecht und Krankheiten. Cystatin C scheint ein idealer Marker zu Erfassung der GFR zu sein, da es rein glomerulär filtriert wird. Im proximalen Tubulus wird es resorbiert und komplett katabolisiert. In humanmedizinischen Studien korreliert dieser Parameter besser mit Clearance-Methoden als Serum-Kreatinin. Bisher gibt es nur wenige Studien, die Cystatin C beim Hund untersucht haben.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren, ein in der Humanmedizin gebräuchliches Testkit für die Cystatin-C-Bestimmung beim Hund zu validieren, einen Referenzbereich zu etablieren und Cystatin C mit einer Clearance-Referenzmethode zu vergleichen, um seine Eignung als Nierenfunktionsparameter beim Hund zu untersuchen.

II Literaturübersicht

1. Anatomie und Physiologie der Nieren

Die Nieren liegen retroperitoneal und ventral der inneren Rückenmuskulatur. Beim Hund liegt die rechte Niere zwischen 12. Brustwirbel und 1. Lendenwirbel, in unmittelbarem Kontakt mit der Fossa renalis des Lobus caudatus der Leber. Die linke Niere liegt weiter kaudal und ventral, etwa im Bereich des 1. – 3. Lendenwirbels. Sie sind bohnenförmig und weisen röntgenologisch in der l/l und v/d Projektion eine Größe zwischen 2,5 – 3,5 x die Länge des 2. Lendenwirbels auf. Je nach Blutgehalt sind sie hell bis dunkelbraun. Entwicklungsgeschichtlich stammen Nierengewebe und abführende Harnwege von zwei verschiedenen Anlagen ab. Niere und Sammelrohre entwickeln sich aus dem Metanephros. Ureter, Nierenbecken und Papille sind Aussackungen des Wolffschen Ganges. Makroskopisch unterscheiden sich die Nieren der verschiedenen Haustierarten durch den Grad der Verschmelzung der einzelnen Renculi (Oberflächenbeschaffenheit) und die Anzahl der Pyramiden, die ins Nierenbecken münden. Der Hund besitzt wie der Mensch eine glatte, einwarzige Niere. Das heißt, dass die Renculi der Nierenoberfläche und die Spitzen der Markpyramiden im Nierenmark vollständig verschmolzen sind (VOLLMERHAUS, 2004).

Die mediale Seite jeder Niere enthält eine Region, den Hilus, in der die renale Arterie und Vene, die lymphatischen Gefäße, Nerven und der Ureter liegen. Wenn die Niere längs durchgeschnitten wird, können die zwei großen Regionen, der äußere Kortex und die innere Medulla dargestellt werden. Die Medulla setzt sich aus vielen Gewebesäulen zusammen, den renalen Pyramiden. Die Basis jeder Pyramide entspringt dem Übergang zwischen Kortex und Medulla und mündet in der Papille. Die Papille wiederum mündet in das Nierenbecken (Pelvis renalis), eine trichterförmige Verbindung des oberen Endes des Ureters. Die äußere Grenze des Nierenbeckens bilden die Calices majores, offen endende taschenartige Gebilde, die sich zu den Calices minores verjüngen, die den Urin von den Tubuli jeder Papille sammeln. Die Wände der Calices, des Nierenbeckens und des Ureters enthalten kontraktile Elemente, die den Urin in Richtung der Harnblase

befördern, wo der Urin aufbewahrt wird bis er durch Harnabsatz aus dem Körper eliminiert wird (GUYTON & HALL, 2000d; VOLLMERHAUS, 2004).

Der Blutfluss zu den Nieren macht ca. 22 % des kardialen Auswurfes aus. Die Zuführung des Blutes erfolgt über das Nierenmark an die Nierenrinde, dort werden zuerst die kortikalen und dann die medullären Nephronen versorgt. Bei Mangel durchblutung wird dementsprechend zuerst die Rindenzone geschädigt. Die A. renalis betritt die Niere durch den Hilus und zweigt sich dann progressiv weiter in die Aa. interlobulares, Aa. subcorticales (arcuatae), Aa. corticales radiatae und Arteriolen (Vasa) afferentes auf, welche in die glomerulären Kapillaren münden, wo große Mengen Flüssigkeit und lösliche Substanzen im Rahmen der Urinbildung gefiltert werden. Das distale Ende der Kapillaren von jedem Glomerulum formen die Arteriolen efferentes, die in einem zweiten kapillären Netzwerk enden, das die renalen Tubuli umgibt. Die renale Zirkulation ist in der Hinsicht einmalig, als dass sie über zwei Kapillarnetze verfügt, die glomerulären und peritubulären Kapillaren. Durch Anpassung des Widerstandes in der afferenten und efferenten Arteriole können die Nieren den hydrostatischen Druck in beiden, den glomerulären und den peritubulären Kapillaren anpassen, und hierbei die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und die tubuläre Reabsorption den Bedürfnissen des Körpers anpassen. Die peritubulären Kapillaren münden in die Blutgefäße des venösen Systems, die parallel zu den arteriellen Gefäßen verlaufen und progressiv die Vv. corticales superficiales, Vv. corticales radiatae, Vv. subcorticales (arcuatae), Vv. interlobulares und V. renalis formen. Die V. renalis verlässt die Niere neben der renalen Arterie und dem Ureter (GUYTON & HALL, 2000d; WAIBL & WILKENS, 2004a, 2004b).

Histologisch wird eine funktionelle Einheit der Niere als Nephron bezeichnet. Die Anzahl der Nephronen ist vom Zeitpunkt der Geburt an festgelegt und wird beim Hund auf 400 000 geschätzt. Die Nieren können Nephronen nicht regenerieren. Deshalb wird bei renalem Insult, Krankheit oder durch normalen Alterungsprozess eine graduelle Verminderung der Nephronen beobachtet. Dieser Verlust ist in der Regel nicht lebensbedrohlich, da adaptive Prozesse in den verbliebenen Nephronen diesen erlauben, die angemessene Menge Wasser,

Elektrolyte und Ausscheidungsprodukte zu eliminieren. Jedes Nephron besteht aus einer Ansammlung von glomerulären Kapillaren, dem sogenannten Glomerulum, durch welches große Mengen Flüssigkeit aus dem Blut gefiltert werden und dem Tubulussystem, in welchem die filtrierte Flüssigkeit zu Urin umgesetzt wird. Die glomerulären Kapillaren sind mit epithelialen Zellen bedeckt und das ganze Glomerulum ist in die Bowmansche Kapsel eingehüllt. Filtrierte Flüssigkeit aus den glomerulären Kapillaren fließt in die Bowmansche Kapsel und von dort in den proximalen Tubulus, der im Nierenkortex liegt. Vom proximalen Tubulus fließt das Ultrafiltrat in die Henlesche Schleife, die in das Nierenmark hineinreicht. Jede Schleife besteht aus einem absteigenden und einem aufsteigenden Schenkel. Die Wand des absteigenden Schenkels und des unteren Endes des aufsteigenden Schenkels sind sehr dünn und werden als das dünne Segment der Henleschen Schleife bezeichnet. Nachdem der aufsteigende Schenkel teilweise zum Kortex zurückgekehrt ist, wird seine Wand wieder so dick wie an anderen Stellen des tubulären Systems und wird deshalb als dickes Segment des aufsteigenden Schenkels bezeichnet. Am Ende des dicken aufsteigenden Schenkels liegt ein kurzes Segment als eine Art Plaque in der Wand, die Macula densa. Die Maculae densae spielen eine wichtige Rolle in der Kontrolle der Nephronfunktion. Im Anschluss an die Macula densa reihen sich der distale Tubulus, der Verbindungstubulus und das kortikale Sammelrohr an. Acht bis zehn kortikale Verbindungsrohre bilden ein größeres kortikales Sammelrohr, das in die Medulla reicht und das medulläre Sammelrohr bildet. Die Sammelrohre münden zusammen und formieren zunehmend größere Rohre, die schließlich im Nierenbecken in die Spitzen der renalen Papillen münden. Jede Niere hat ca. 250 der großen Sammelrohre. Jedes dieser Sammelrohre sammelt Urin von ca. 4000 Nephronen. Die Nephronen im äußeren Kortex werden als kortikale Nephronen bezeichnet. Diese haben kurze Henle-Schleifen, die nur wenig in die Medulla reichen. Ca. 20 - 30 % der Nephronen haben Glomerula, die tief im Kortex nahe der Medulla liegen. Diese werden als juxtamedulläre Nephronen bezeichnet. Juxtamedulläre Nephronen haben lange Henle-Schleifen, die tief in die Medulla reichen; in einigen Fällen sogar bis zur Papillenspitze. Die Henle-Schleifen der juxtamedullären Nephronen werden von spezialisierten peritubulären Kapillaren,

den Vasa recta, begleitet. Die Vasa recta entspringen aus den efferenten Arteriolen. Wie die Henle-Schleife kehren die Vasa recta zum Kortex zurück und münden in die kortikalen Venen. Dieses spezialisierte Netzwerk in der Medulla spielt eine wichtige Rolle in der Urinkonzentration (GUYTON & HALL, 2000d).

Zentrale Funktion der Niere ist die Aufrechterhaltung des Säure-Basen-, Wasser- und Elektrolythaushaltes, die Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und körperfremden Substanzen sowie die Bildung von Hormonen wie Erythropoetin, Renin, Angiotensin, Prostaglandinen und Vitamin-D-Metabolismus.

Voraussetzung für die normale Nierenfunktion ist eine ausreichende Blutversorgung auf der Basis eines vollständig entwickelten Gefäßsystems. Der Blutdruck muss 60 mm Hg übersteigen, damit die benötigten 25 % des Herzminutenvolumens die Niere durchströmen können. Davon entfallen 90 % auf die Nierenrinde und 10 % auf das Nierenmark. Sinkt der Blutdruck unter diesen Schwellenwert ab, versucht der Organismus über Konstriktion von Arteriolen den Blutdruck in der Niere aufrechtzuerhalten, damit die glomeruläre Filtration weiterhin gewährleistet wird. Die sog. glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beschreibt die Flüssigkeitsbewegung durch die glomerulären Kapillarwände in den Bowmanschen Raum und ist durch die effektive Permeabilität und den jeweiligen hydrostatischen und kolloidosmotischen Druck im Kapillarlumen sowie im Bowmanschen Raum definiert. Der Nettofiltrationsdruck beträgt 6 - 14 mm Hg. Jeder Faktor, der einen der genannten Parameter verändert, beeinflusst die glomeruläre Filtrationsrate und damit die Nierenfunktion. Bei renaler Mangeldurchblutung treten sehr schnell funktionelle und strukturelle Schäden ein.

Die Harnbereitung entsteht über glomeruläre Filtration, tubuläre Rückresorption und tubuläre Sekretion. Die Filtrationsschranke im Glomerulum besteht aus dem Gefäßendothel, der Basalmembran und den zytoplasmatischen Fortsätzen der Podozyten. Hydrostatischer Druck, elektrische Ladung und Porengröße der Basalmembran bestimmen im wesentlichen die Zusammensetzung des Primärharnes bzw. des Ultrafiltrates, eines proteinfreien Plasmafiltrates, welches

isoosmotisch zum Plasma ist (pH 7,4). Das Primärfiltrat beträgt 20 – 25 % der Blutmenge, die die Glomerula durchströmt. Die sog. Filtrationsfraktion ist der Quotient aus GFR und renalem Blutfluss. Die glomeruläre Filtrationsmembran ist durchlässig für Wasser und kleinmolekulare gelöste Substanzen (Zucker, Aminosäuren, Harnstoff, Kreatinin und Mineralien). Die obere Filtrationsgrenze liegt bei einem Molekulargewicht von 60 kDa. Proteine mit einem Molekulargewicht über 60 kDa können demzufolge aufgrund ihrer Größe die Membran nicht passieren. Niedermolekulare Proteine werden zwar glomerulär filtriert unterliegen aber größtenteils einer tubulären Rückresorption. In den Tubuluszellen werden sie in Aminosäuren zerlegt und als solche wieder ins Plasma freigesetzt. Die effektive Permeabilität der glomerulären Membran hängt von der Größe ihrer Oberfläche sowie den Eigenschaften der Poren ab. Die glomeruläre Oberfläche kann durch Kontraktion der Mesangiumzellen unter Einfluss von Angiotensin II und antidiuretischem Hormon (ADH) variiert werden. Neben der Größe und dem Molekulargewicht spielt die elektrische Ladung von Blutbestandteilen eine Rolle; so werden Anionen wie Albumin, obwohl nur 45 kDa schwer, durch die negative Ladung von Teilen der glomerulären Basalmembran und des Endothels an der Filtration gehindert.

Die tubuläre Rückresorption ist eine der Hauptaufgaben der verschiedenen Tubulusabschnitte. Ca. 99 % des in den Glomerula filtrierten Wassers werden rückresorbiert. Nach den Prinzipien des transepithelialen Transportes geschieht dies passiv in Richtung eines Konzentrationsgefälles oder aktiv unter Energieverbrauch gegen ein solches.

Bisher sind 12 funktionell und anatomisch unterschiedliche Systeme zur Rückresorption verschiedener Substanzen bekannt (z. B. für Glukose, Aminosäuren, Kalzium, Phosphat, Harnsäure und Proteine). Einzelne dieser Substanzen können nur bis zu einer gewissen Konzentrationsschwelle rückresorbiert werden (z. B. Glukose). Um die Transportkapazität der Tubulusepithelien zu verbessern, sind die Epithelzellen der proximalen Tubulusabschnitte an der luminalen Seite mit Mikrovilli ausgestattet und im

Zytoplasma sind reichlich Mitochondrien vorhanden, die die Energie für die resorptiven Vorgänge zur Verfügung stellen. Der Natriumtransport, der zu 2/3 bereits im proximalen Tubulusbereich erfolgt, benötigt 75 % des gesamten Sauerstoffverbrauches der Niere. Im Falle einer Ischämie werden daher die proximalen Tubulusabschnitte besonders rasch geschädigt. Eng mit dem Natriumtransport gekoppelt ist die passive Resorption von Glukose, Aminosäuren, Harnstoff, Phosphat- und Sulfationen.

Die proximalen Tubulusabschnitte werden von der Henleschen Schleife und den Sammelrohren funktionell bei der Konzentration des Harnes unterstützt. Funktionelles Prinzip ist das Gegenstromprinzip in den juxtamedullären Nephronen. Durch aktiven Natriumtransport aus dem aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife ins Interstitium folgt passiv Chlorid und Wasser nach. Gesteuert wird dies durch den Einfluss von ADH aus der Neurohypophyse, das die Wasserdurchlässigkeit der betroffenen Tubulusabschnitte steigert oder vermindert. Sobald ein Wassermangel vorliegt, wird ADH ausgeschüttet, das die Epithelien der Sammelrohre für Wasser und zum Teil für Harnstoff durchlässig macht. Harnstoff wird zum Teil proximal resorbiert, zum Teil während der Schleifenpassage sezerniert und zum Teil zwischen distalem Tubulusabschnitt und Papille in enger Beziehung zur Wasserresorption wieder resorbiert. Die Harnstoffrückresorption macht aber in keinem Fall mehr als 50 % des glomerulär filtrierten Harnstoffes aus. Damit sind diese Nierenabschnitte die einzigen Körperbereiche, in denen ein hypertones Milieu vorliegen kann. Kreatinin als Abbauprodukt des Muskelstoffwechsel wird bei den Haustieren nicht rückresorbiert und nur in geringer Menge sezerniert (GUYTON & HALL, 2000d).

Das Säure-Basen-Gleichgewicht im gesamten Körper wird durch die chemikalische Pufferkapazität des Blutes, die Kohlendioxidausscheidung der Lunge und die Nieren aufrecht erhalten, die sauren oder alkalischen Urin ausscheiden. Ein Puffer ist eine Substanz, die reversibel Wasserstoffionen binden kann. Der Puffer des Blutes reagiert in sekundschnell, indem Wasserstoffionen über die Bikarbonat- und Phosphatpuffer oder Proteine gebunden werden, bis ein

Ausgleich erfolgt ist. Die Lunge reagiert minutenschnell und eliminiert Kohlendioxid aus dem Organismus über eine schnellere Ventilation. Die Nieren reagieren langsam, indem sie überschüssige Säure oder Base über den Urin ausscheiden, sind aber über einen Zeitabschnitt von Stunden oder Tagen das effektivste Regulationssystem. Der Ausgleich erfolgt über Sekretion bzw. Reabsorption von Wasserstoff- und Bikarbonationen im renalen Tubulussystem. Im Fall einer metabolischen Alkalose scheiden die Nieren alkalischen Urin aus, der einen Überschuss an Bikarbonat enthält. Liegt hingegen eine metabolische Azidose vor, resorbieren die Nieren aus dem Primärharn vermehrt Bikarbonat und scheiden Wasserstoffionen aus (GUYTON & HALL, 2000b).

Die Regulation der Nierenfunktion erfolgt endokrin durch ADH, Aldosteron, Angiotensin und Renin. Wenn die Plasmaosmolalität ansteigt, wird mehr ADH aus dem hinteren Hypophysenlappen sezerniert. Dadurch steigt die Permeabilität des distalen Tubulus und der Sammelrohre. Damit können große Wassermengen absorbiert werden und das Urinvolumen wird verringert. Sobald überschüssiges Wasser im Körper vorhanden ist und die extrazelluläre Flüssigkeitsosmolalität abfällt, verringert sich die ADH-Ausschüttung und vermindert somit die Permeabilität des unteren Tubulus und der Sammelrohre. Somit wird ein verdünnter Urin ausgeschieden (GUYTON & HALL, 2000c). Angiotensin II ist einer der potentesten Regulatoren der Natriumexkretion. Veränderungen der Natrium- und Flüssigkeitszufuhr sind von einer reziproken Veränderungen in der Angiotensin-II-Bildung begleitet. Hyponatriämie, Hypovolämie, Hypotonie oder Sympathikusreiz führen zur Freisetzung von Renin aus dem juxtaglomerulären Apparat. Renin löst die Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II im Verlauf der Lungenpassage aus. Angiotensin II stimuliert die Freisetzung von Aldosteron aus der Nebennierenrinde. Unter Aldosteroneinfluss kommt es zur Steigerung der tubulären Natriumresorption in den kortikalen Sammelröhrchen. Die Natriumresorption wird von einer erhöhten Wasserresorption und Kaliumsekretion begleitet. Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System spielt zusammen mit dem Körper-Natrium-Blutvolumenstatus auch eine wichtige Rolle in der Regulation des Blutdruckes (GUYTON & HALL, 2000a).

2. Nierenerkrankungen beim Hund

Nierenerkrankungen sind gekennzeichnet durch funktionelle oder strukturelle Abnormalitäten in einer oder beiden Nieren. Die Schwere der Nierenerkrankungen und damit auch die klinische Präsentation sind abhängig vom Ausmaß der Läsion.

Der Ausdruck *Nierenerkrankung* sollte nicht synonym mit dem Ausdruck *Nierenversagen* verwendet werden. Abhängig vom Ausmaß und Zeitdauer einer Nierenschädigung, kann eine Nierenerkrankung zum Nierenversagen führen. Der Begriff Nierenversagen bezeichnet ein klinisches Syndrom, das auftritt, wenn die Nieren nicht länger ihren regulatorischen, exkretorischen und endokrinen Funktionen nachkommen können. Eine Retention von harnpflichtigen Substanzen und Störungen im Wasser-, Elektrolyt- und Säure-Basenhaushalt sind die Folge. Nierenversagen tritt ein, wenn 75 % oder mehr der ursprünglichen Nephronpopulation funktionsunfähig sind.

Definitionsgemäß ist eine Nierenerkrankung dann chronisch, wenn entweder die Erkrankung für mindestens 3 Monate persistiert mit oder ohne reduzierter GFR oder wenn eine Verminderung der GFR von mehr als 50 % des Normalwertes für mindestens 3 Monate vorliegt. Chronische Nierenerkrankungen sind die häufigsten Nierenerkrankungen beim Hund. Ungeachtet der Ursache, die zum Nephronverlust geführt hat, zeichnen sich chronische Nierenerkrankungen durch irreversible strukturelle Läsionen aus. Abhängig vom Ausmaß der ursprünglichen Schädigung und adaptiver und kompensatorischer Prozesse kann die Nierenfunktion stabil bleiben oder sich langsam über einen Zeitraum von Monaten oder Jahren verschlechtern. Die ursächliche Erkrankung kann zum Zeitpunkt der Progression bereits überwunden sein. Patienten mit chronischer Nierenerkrankung können oft für viele Monate oder Jahre mit guter Lebensqualität überleben. Obwohl keine Behandlung die irreversiblen Nierenveränderungen aufheben kann, können die klinischen und biochemischen Konsequenzen einer reduzierten Nierenfunktion durch unterstützende und

symptomatische Behandlung verbessert werden. Zusätzlich können bestimmte Therapieformen die Mechanismen, die zur Progredienz der Erkrankung führen, unterbrechen (POLZIN et al., 2005).

Akutes Nierenversagen ist eine klinische Kondition, in der die Nieren plötzlich den exkretorischen, metabolischen und endokrinen Aufgaben des Körpers nicht mehr nachkommen können. Dies kann durch hämodynamische, tubulointerstitielle oder exkretorische Läsionen an den Nieren verursacht werden. Akutes Nierenversagen bezeichnet ein schnell einsetzendes Krankheitsbild bei zuvor normaler Nierenfunktion. Jedoch können auch Tiere mit einer chronischen Nierenerkrankung durch prä-, renale oder postrenale Komplikationen ein akutes Nierenversagen erleiden (COWGILL & FRANCEY, 2005).

2.1. Unterscheidung akutes und chronisches Nierenversagen

Die Unterscheidung zwischen akutem Nierenversagen (ANV) und chronischem Nierenversagen (CNV) ist manchmal schwierig. Jedoch ist gerade diese Klassifizierung wichtig, da ANV im Gegensatz zu CNV potentiell reversibel ist. Krankheitsgeschichte, Befunde der klinischen Untersuchung, Nierengröße und Hämatokrit sind bei der Unterscheidung wichtig. Bei Patienten mit einem akuten Prozess ist das Allgemeinbefinden oft schwer gestört. Im Unterschied zu Tieren mit einer chronischen Erkrankung machen sie jedoch keinen chronisch kranken Eindruck (kein Gewichtsverlust oder schlechte Fellqualität). Die Erkrankung setzt plötzlich ein und schreitet schnell fort. Eine vorhergehende Polyurie (PU) und Polydipsie (PD) wie bei der chronischen Verlaufsform fehlt in der Regel. Die Nierengröße ist bei CNV häufig verkleinert, bei ANV jedoch normal oder geringgradig vergrößert. Eine nicht-regenerative Anämie wird sehr oft bei Patienten mit CNV festgestellt.

Durch die Entwicklung eines renalen sekundären Hyperparathyroidismus bei CNV kann die ultrasonographische Darstellung der Nebenschilddrüse zur Unterscheidung herangezogen werden. Bei Hunden mit CNV sind die

Nebenschilddrüsen in der Regel vergrößert. Jedoch ist die Größe der Nebenschilddrüsen auch vom Körpergewicht abhängig. Carbamyliertes Hämoglobin kann auch zur Unterscheidung herangezogen werden. Harnstoff kann zu Isocyanidsäure dissoziieren, welches wiederum in einer nicht-enzymatischen Reaktion mit dem terminalen Valinende von Hämoglobin reagiert und carbamyliertes Hämoglobin formt. Die Menge an carbamylierten Hämoglobin ist somit abhängig vom Schweregrad und Dauer der Azotämie (DIBARTOLA, 2005).

2.2 Labordiagnostische Evaluation der Nierenfunktion

Azotämie ist definiert als eine erhöhte Konzentration von Harnstoff und Kreatinin im Blut. Eine prärenale Azotämie ist die Konsequenz einer reduzierten renalen Perfusion (z. B. schwere Dehydratation, Herzversagen). Eine postrenale Azotämie resultiert von einer Störung der Urinausscheidung (z. B. Obstruktion, Uroabdomen). Eine primäre renale Azotämie wird durch eine Erkrankung des Nierenparenchyms verursacht. Der Begriff Urämie bezeichnet eine Konstellation von klinischen Symptomen und biochemischen Veränderungen, die mit dem kritischen Verlust funktionsfähiger Nephrone assoziiert sind. Hierzu zählen auch extrarenale Manifestationen eines Nierenversagens (z. B. urämische Gastroenteritis, Hyperparathyroidismus) (DIBARTOLA, 2005).

Die Bestimmung der glomerulären Funktion ist ein essentieller Bestandteil in der diagnostischen Herangehensweise bei Patienten mit einer möglichen Nierenerkrankung, da die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) im direkten Zusammenhang mit funktionsfähiger Nierenmasse steht. Messung von Serum-Kreatinin und Serum-Harnstoff werden üblicherweise als Screening-Tests verwendet. Clearance-Bestimmungen sind sinnvoll bei Patienten mit möglicher Nierenerkrankung, bei denen Harnstoff und Kreatinin im Referenzbereich liegen. Die Messung des Urin-Protein-Kreatinin-Quotienten (UPC) ist wichtig in der Beurteilung von primär glomerulären Erkrankungen (z. B. Glomerulonephritis, glomeruläre Amyloidose) (DAVIES & SHOCK, 1950; DIBARTOLA, 2005).

Im fortgeschrittenem Alter kann ein Abfall der GFR beobachtet werden (DAVIES & SHOCK, 1950).

2.2.1. Harnstoff

Harnstoff wird in der Leber aus Ammoniak synthetisiert. Ammoniak ist ein Endprodukt des Proteinstoffwechsels. Die Aminosäuren, die zur Produktion von Harnstoff verwendet werden, stammen von exogenen (z. B. aus der Nahrung) und endogenen Proteinen ab. Harnstoff ist eine niedermolekulare Substanz und wird glomerulär filtriert. Die Ausscheidung erfolgt ausschließlich über die Nieren und ist invers proportional zur GFR. Im Normalfall werden bis zu 60 % des Harnstoffs aus dem Primärharn resorbiert. Die Flussrate des Harns beeinflusst die Rückresorptionsrate. Ein verminderter Harnfluss (z. B. bei Dehydratation) führt zu einer vermehrten Harnstoffrückresorption. Darum ist Harnstoff kein zuverlässiger Marker der GFR. Auch die Bildung variiert stark. Eine proteinreiche Mahlzeit oder Magen-Darmblutungen führen zur Erhöhung des Serum-Harnstoffes. Klinische Konditionen oder Medikamente, die zu einem erhöhten Katabolismus führen (z. B. Infektionen, Fieber oder Hungerzustände, Glukokortikoide), können ebenfalls zu erhöhten Serum-Harnstoffkonzentrationen führen. Auf der anderen Seite führen Erkrankungen wie Leberversagen und portosystemischer Shunt oder eine proteinarme Diät zu erniedrigten Serumspiegeln (SWAN, 1997; DIBARTOLA, 2005).

2.2.2. Kreatinin

Kreatinin entsteht im Muskel durch nicht-enzymatischen Abbau von Kreatin und Kreatinphosphat. Der tägliche Anfall an Kreatinin wird daher weitestgehend durch die Muskelmasse bestimmt. Große und gut bemuskelte Hunde haben höhere Serumgehalte. So haben auch Männer höhere Kreatinin-Werte als Frauen. Beim Hund spielt nur die Körpergröße und die Bemuskelung eine Rolle, nicht aber das Geschlecht. Junge Tiere haben höhere Konzentrationen als ältere Tiere. Die Serum-Konzentration ist weitestgehend unbeeinflusst von der Nahrungsaufnahme, jedoch kann es postprandial zu einem Kreatinin-Abfall kommen. Dehydratation

kann die Serum-Konzentration erhöhen. Kreatinin wird nicht metabolisiert und wird komplett glomerulär filtriert. Die Kreatinin-Konzentration korreliert invers mit der GFR. Kreatinin wird beim Hund (bes. Rüden) zu einem klinisch geringen Prozentsatz tubulär sezerniert. Die tubuläre Sekretion nimmt geringfügig zu, wenn die GFR abnimmt (BRAUN et al., 2003; DIBARTOLA, 2005). Methodische Probleme bei der sehr verbreiteten Jaffe-Nachweismethode mittels Pikrinsäure sind zu berücksichtigen, da zahlreiche sog. nicht-kreatininartige chromogene Substanzen, wie z. B. Plasmaproteine, Glukose, Harnsäure und Ketonkörper in die Bestimmung eingehen können und so zu falsch hohen Werten führen. Neuere Bestimmungsmethoden, die die Kreatinin-Konzentration über einen enzymatischen Abbau, der an eine Indikatorreaktion gekoppelt ist, messen, umgehen dieses Problem. Die Nachweismethode ist schnell, akkurat und billig (PERRONE et al., 1992). Humanmedizinische Studien belegen, dass aufgrund der weiten Spannbreite des Referenzbereiches (große inter-individuelle Variation), der Parameter sehr schlecht geeignet ist, geringe Nierenfunktionsstörungen zuverlässig zu detektieren. Da jedoch eine kleine intra-individuelle Variation vorliegt, ist der Parameter gut geeignet, um Verschlechterungen der Nierenfunktion zu erfassen (CIMERMAN et al., 2000). Eine Altersabhängigkeit des Parameters kann nicht festgestellt werden, obwohl es im Alter zu einem Abfall der GFR kommt (NORLUND et al., 1997; ERLANDESEN et al., 1998). Im fortgeschrittenen Alter kommt es eher zu einem Kreatininabfall, was damit erklärbar ist, dass die Muskelmasse im Alter abnimmt (PERRONE et al., 1992). Unter Bedingungen, in denen nicht-renale Variablen keine Rolle spielen, bedeutet ein erhöhter Kreatinin- und Harnstoff-Gehalt, dass mindestens 75 % der Nephrone funktionsunfähig sind. Weder der Grund noch die Möglichkeit zur Wiederherstellung der Nierenfunktion wird durch diese Parameter angezeigt. Auch zeigen die Serum-Konzentrationen der beiden Parameter nicht an, ob eine Azotämie prärenal, primär renal oder postrenal ist (BRAUN et al., 2003; DIBARTOLA, 2005).

2.2.3 Clearance-Methoden

Die renale Clearance eines bestimmten Stoffes wird als das Plasmavolumen

angegeben, das pro Zeiteinheit komplett von den Glomerula gefiltert wird und im Urin erscheint. Geeignete Marker-Substanzen sollten exklusiv glomerulär filtriert und nicht tubular rückresorbiert oder sezerniert werden. Sie können endogen im Körper vorkommen (z. B. Kreatinin) oder exogen zugeführt werden (z. B. Inulin, Radiokontrastmittel, Radioisotopen und Kreatinin) (KERL & COOK, 2005). Die renale Clearance von Inulin ist die akzeptierte Referenzmethode zur Abschätzung der GFR (SWAN, 1997; HEIENE & MOE, 1998).

Die GFR wird durch folgende Formel ausgedrückt:

$$\text{GFR} = U_x V / P_x$$

P_x = Plasma-Konzentration der Substanz

U_x = Urin-Konzentration der Substanz

V = produziertes Urin-Volumen

Die GFR wird in der Tiermedizin in der Regel mit ml/min/kg wiedergegeben. Jedoch wäre eine Angabe in ml/min/m² wünschenswerter, da die GFR mehr mit der Körperoberfläche als mit dem Körpergewicht korreliert. Allerdings kann das Körpergewicht exakt gemessen werden; die Körperoberfläche hingegen wird errechnet (BRAUN et al., 2003). Indikationen zur GFR-Bestimmung sind die Diagnostik einer Niereninsuffizienz, wenn noch keine Azotämie vorliegt, das Krankheitsmonitoring, die Errechnung der Nierenfunktion vor Applikation potentiell nephrotoxischer Substanzen, und zur kontralateralen Nierenfunktionbestimmung vor Nephrotomie oder Nephrektomie (KERL & COOK, 2005). Einige Methoden benötigen das Sammeln von Urin während der Testperiode, während andere Blutproben oder radiographische Bilder verwenden (KERL & COOK, 2005). Der Vorteil von Urin-Sammelmethoden liegt in der einfachen Errechnung der GFR in ml/min/kg. Der Nachteil besteht darin, dass der Urin während des Testintervalls gesammelt werden muss. Zusätzlich muss bei vielen Methoden eine Dauertropfinfusion mit der entsprechenden Markersubstanz durchgeführt werden. Das Erreichen eines Equilibriums, in dem sich Infusion und Exkretion im Gleichgewicht finden, kann jedoch schwierig sein. Clearance-Methoden werden an nüchternen und normal hydrierten Hunden durchgeführt.

Postprandial kann eine Erhöhung der GFR festgestellt werden (O'CONNOR & SUMMERILL, 1976; BROWN & FINCO, 1992). Dehydratation kann die GFR erniedrigen (TABARU et al., 1993).

Plasma-Clearance-Methoden (sog. single-injection-methods), bei denen pharmakokinetisch die Plasma-Konzentration gegen die Zeit errechnet wird, bieten den Vorteil, dass auf das Urin-Sammeln verzichtet werden kann. Der Nachteil besteht darin, dass Blutproben zu exakten Zeitpunkten entnommen werden müssen. Die Clearance wird errechnet, indem die applizierte Dosis der Markersubstanz durch die area-under-the-plasma-concentration-versus-time-curve (AUC) dividiert wird. Die Genauigkeit dieses Verfahren hängt von dem pharmakokinetischen Modell ab, mit dem die AUC errechnet wird. Pharmakokinetische Methoden zur Errechnung der AUC sind das 1-Kompartimenten-, 2-Kompartimenten-, 3-Kompartimenten- oder ein Nicht-Kompartimenten-Modell (WATSON et al., 2002).

Szintigraphische Methoden sind bildgebende Studien, die das zeitliche Verschwinden von renal ausgeschiedenen Radioisotopen wiedergeben. Spezielles Instrumentarium, Erfahrung und die Lizenz zur Verwendung dieser Substanzen limitieren die Einsetzbarkeit dieses Verfahrens (KERL & COOK, 2005).

Die Inulin-Clearance-Methoden stellen traditionell den Goldstandard dar. Inulin ist nicht an Plasmaproteine gebunden und wird nur durch glomeruläre Filtration eliminiert. Herkömmlicherweise wurde eine Dauertropfinfusion von Inulin verabreicht mit zeitlich abgestimmter Urin- und Plasmakollektion. Auch radioaktiv markiertes Inulin (¹⁴-Inulin) kann als Bolus-Injektion oder Dauertropfinfusion verabreicht wird. Single-injection-methods wie die Plasma-Clearance-Methoden haben sich in der Zwischenzeit auch hier durchgesetzt (BROWN, 1994). Die erschwerte Erhältlichkeit der Substanz und die Schwierigkeit der Nachweismethode limitieren die Einsatzfähigkeit dieses Verfahrens (HEIENE & MOE, 1998; KERL & COOK, 2005).

Da die endogene Kreatinin-Produktion in der Regel stabil ist und die Elimination über glomeruläre Filtration geschieht, setzen sich Kreatinin-Clearance-Methoden immer mehr durch. Die endogene Kreatinin-Clearance setzt das Sammeln von 24-h-Urin voraus und ist dadurch nicht immer durchführbar. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass keine exogene Substanz verabreicht werden muss. Die exogene Urin-Kreatinin-Clearance beinhaltet die Applikation (z. B. intravenös, intramuskulär oder subkutan) von exogenem Kreatinin, gefolgt von zeitlich abgestimmter Urinsammlung. Auch hier liegt der Nachteil in der Sammlung von Urin über eine Testperiode von 20 – 30 Minuten (min) (FINCO et al., 1991; FINCO et al., 1993). Die exogene Kreatinin-Plasma-Clearance wurde beim Hund in den letzten Jahren intensiv erforscht (LABATO & ROSS, 1991). Bei dieser Methode entfällt das Urinsammeln. Nach intravenöser Applikation von exogenem Kreatinin werden Blutproben über einen bestimmten Zeitraum entnommen. In der Regel beträgt der Untersuchungszeitraum weniger als 10 h. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, dass die zu verabreichende Kreatinin-Lösung selbst hergestellt werden muss. Es wird empfohlen, kommerziell erhältliches Kreatinin mit sterilem Wasser zu einer 5 %igen Lösung anzumischen und diese Lösung vor Applikation zu sterilisieren. Diese Clearance-Methode zeigt eine gute Korrelation zu anderen etablierten Verfahren wie der Inulin-Urin- und Plasma-Clearance, der Iothalamate-Plasma-Clearance und der endogenen und exogenen Kreatinin-Urin-Clearance. Basierend auf neuen Studien resultiert ein Fehler von $< 6\%$, wenn über einen Zeitraum von 10 h mehr als 4 Blutproben entnommen werden und die AUC mit einem Nicht-Kompartimenten-Modell errechnet wird. Reaktionen auf das exogen zugeführte Kreatinin wurden nicht beobachtet. Zusätzlich reicht ein kleines Blutvolumen (1 ml Vollblut) pro Entnahme aus. Die Kreatinin-Bestimmung aus dem Blut ist einfach, schnell und preiswert. Sie kann fast in jedem Labor durchgeführt werden. Jedoch sollte auch hier die enzymatische Kreatininbestimmung bevorzugt werden (WATSON et al., 2002; KERL & COOK, 2005).

Da jodhaltige Radiokontrastmittel wie Iohexol und Iothalamate renal ausgeschieden werden, eignen sie sich ebenfalls zur Ermittlung der GFR. Die

Ergebnisse korrelieren bei Hund und Katze gut mit anderen Verfahren wie der exogenen Urin-Kreatinin-Clearance. In der Regel wird eine Plasma-Clearance über einen Zeitraum von 4 h nach Injektion von Iohexol (300 mg/kg) mit Entnahme von 3 Blutproben durchgeführt. Die AUC wird mit einem 1-Kompartimenten-Modell errechnet. Nachteilig wirkt sich das große Probenvolumen (2 – 3 ml) aus. Da die Messung mit Hilfe von Flüssigchromatographie erfolgt, ist diese Analyse wenigen Speziallaboren vorbehalten (BROWN et al., 1996; HEIENE & MOE, 1999; FINCO et al., 2001). Das Radioisotop Technetium-99m-Diethylaminopentoacetat-Säure (Tc99m DTPA) eignet sich auch zur Durchführung einer Plasma-Clearance. Die Plasma-Radioaktivität wird mit einem Gamma-Counter erfasst (MOE & HEIENE, 1995; BARTHEZ et al., 1998; HEIENE & MOE, 1998; BARTHEZ et al., 2000; KERL & COOK, 2005).

Die Nierenzintigraphie ist eine nicht-invasive Methode, um GFR, effektiven renalen Plasmafluss und effektiven renalen Blutfluss zu erfassen. Der große Vorteil dieser Methode ist, dass sowohl die globale wie auch die individuelle Nierenfunktion berechnet werden kann. Darüber hinaus können obstruktive Prozesse, Nierenmorphologie sowie Blutversorgung erfasst werden. Der Untersuchungszeitraum ist sehr kurz. Das Sammeln von Urin und Plasma entfällt. In Bezug auf die GFR korreliert diese Methode allerdings nur mäßig mit anderen Referenzmethoden wie der Urin-Inulin-Clearance (BARTHEZ et al., 1998). Die GFR wird bestimmt durch die Aufnahme des Isotopes Tc99m DTPA in den Nieren und dessen Elimination aus dem Plasma. Die Substanz wird weder tubulär resorbiert noch sezerniert. Die Aufnahme des Isotops in den Nieren wird mit Hilfe eines Computersystems quantifiziert, um prozentuale, individuelle und globale GFR zu errechnen. Die Dosis von Tc99m DTPA beträgt 3 – 4 mCi (111 – 148 Mbq), die intravenös injiziert werden. Zunächst wird ein 30 Sekunden (s) langer Precount (in counts per minute) des Isotopes in der Spritze bestimmt. Die Aufnahme beginnt mit der Injektion des Radioisotopes. Bilder werden im 6-Sekundenintervall für mindestens 3 min aufgenommen. Anschließend wird ein Postcount der Spritze aufgenommen. Precount minus Postcount ergeben die

injizierte Dosis des Radioisotopes. Leider impliziert Szintigraphie die Benutzung von radioaktiven Isotopen, die Isolierung des Patienten nach Durchführung der Studie und Spezialausrüstung (BARTHEZ et al., 1999; KERL & COOK, 2005).

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die verschiedenen Clearance-Methoden.

Tab 1: Übersicht über verschiedene Clearance Methoden

Urin-Sammelmethoden	Inulin-Clearance
	Endogene-Kreatinin-Clearance
	Exogene-Kreatinin-Clearance
Plasma-Methoden	¹⁴ C-Inulin-Clearance
	Iohexol-Clearance
	Exogene-Kreatinin-Clearance
	Tc-99m-DTPA ^a -Clearance
Renale Szintigraphie	Tc-99m-DTPA ^a -Clearance

^aTc-99m-DTPA = Technetium-99m-Diethylaminopentoacetat-Säure

Tabelle 2 gibt einen Überblick für die Referenzbereiche verschiedenen Clearance-Methoden.

Tab 2: Referenzwerte für verschiedene Clearance-Methoden

Markersubstanz	Clearance-Methode	Referenzbereich (ml/min/kg)	Autor
Inulin	Renal	1,77 +/- 0,27	Brown 1996
		2,64 +/- 1,12	Uribe 1992
	Plasma	3,63 +/- 0,67	Miyamoto 1997
Exogenes Kreatinin	Renal	1,7 +/- 0,29	Brown 1996
		2,56 +/- 0,6	Rogers 1991
	Plasma	4,24 +/- 0,99	Miyamoto 1997
		2,1 +/- 0,76	Le Garreres 2001
Iohexol	Plasma	1,6 +/- 0,5	Le Garreres 2001
		3,45 +/- 1,0	Meyer-Lindenberg 1996

2.2.4. Cystatin C

Historie:

Die Forschung über niedermolekulare Proteine, die in verschiedenen biologischen Flüssigkeiten vorkommen, war in den letzten 20 Jahren Schwerpunkt zahlreicher wissenschaftlicher Studien. Sekine beschrieb 1982 die Gewebsverteilung und physikochemischen Charakteristika des post-gamma-Globulins (p- γ -Globulin) beim Hund (SEKINE & POULIK, 1982). Es handelt sich hierbei um ein 11 kDa großes Protein, das erstmalig von Clausen (CLAUSEN, 1961) unter dem Namen γ -CSF in humaner Cerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen wurde. Im gleichen Jahr konnte post- γ -Protein im Urin von Patienten mit tubulärer und glomerulärer Proteinurie nachgewiesen werden (BUTLER & FLYNN, 1961). Es wurde post- γ -Protein genannt, da es in der Urinelektrophorese langsamer als das langsamste bisher bekannte γ -Globulin wanderte. Im Jahr 1962 konnte ein Protein mit γ -elektrophoretischer Mobilität in Liquor, Blut, Urin, Aszites und Pleuraerguss nachgewiesen werden. Die Konzentration im Liquor schien am höchsten zu sein (HOCHWALD & THORBECKE, 1962). Poulik und Mitarbeiter konnten 1981 zeigen, dass das humane und canine p- γ -Globulin sich sehr homolog verhalten. Die geringfügigen Unterschiede lassen sich mit einem einfachen Basenpaar-Austausch erklären (POULIK et al., 1981). Im Jahr 1983 wurde ein Radio-Immuno-Assay zur Quantifizierung von post- γ -Protein entwickelt (POULIK et al., 1983). Sekine und Poulik konnten 1982 p- γ -Globulin in allen Körperflüssigkeiten und Geweben beim Hund nachweisen. Hohe Konzentrationen wurden in Parotis, Niere, Serum, und zentralem Nervensystem gefunden (SEKINE & POULIK, 1982). Sie konnten außerdem eine molekulare und eine freie Form des Proteins nachweisen, was sie zu der Vermutung veranlasste, dass es sich hierbei um einen Teil eines viel größeren Proteins handeln könnte.

Bei Menschen mit vererbter zerebraler Amyloidangiopathie konnte p- γ -Globulin in den Amyloidfibrillen nachgewiesen werden (GHISO et al., 1986). Im Jahr 1995 zeigten Grubb und Lofberg auf, dass es sich bei γ -CSF, post- γ -Protein und γ -trace

um das gleiche Protein handelt (GRUBB & LOFBERG, 1985). Brizin und Mitarbeiter isolierten 1984 erstmalig einen Cystein-Proteinase-Inhibitor aus dem Serum von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, der identisch mit dem humanen γ -trace-Protein war. Es wurde als Cystatin bezeichnet (BRZIN et al., 1984). Das humane Cystatin wurde 1994 Cystatin C genannt, da es in Struktur und Aktivität denen aus Säugetieren isolierten Cystatinen A und B und dem aus Hühnereiweiß isoliertem Cystatin ähnlich war (BARRETT et al., 1984). Im Jahr 1991 beschrieben Turk und Bode erneut, dass die Aminosäuresequenz des caninen p- γ -Globulin identisch mit einer Sequenz des humanen Cystatin C ist (TURK & BODE, 1991).

Struktur:

Das Charakteristikum der Cystatin-Familie sind zwei Disulfidbrücken, die am Carboxyl-Rest lokalisiert sind. Sie bestehen aus 115 Aminosäureresten und haben ein Molekulargewicht von 13 kda. Das bisher am besten erforschte Mitglied der Cystatin-Familie ist Cystatin C. Es besteht aus 120 Aminosäureresten in einer Polypeptidkette. Es ist nicht-glykolysiert und hat seinen isoelektrischen Punkt bei 9,3 (GRUBB & LOFBERG, 1982). Es ist auf dem Chromosom 20 lokalisiert. Sein Molekulargewicht beträgt 13,359 kda (TURK & BODE, 1991). Cystatin C konnte vollständig sequenziert und geklont werden. Das rekombinante Protein zeigt volle biologische Aktivität gegen seine Zielenzyme (ABRAHAMSON et al., 1990). Cystatin C wird als Präprotein mit einem Signalpeptid synthetisiert, das darauf schließen lässt, dass seine inhibitorische Funktion vorwiegend intrazellulär ist. Die Struktur des Gens lässt auf die eines housekeeping-types schließen, welche durch eine stabile Produktionsrate von kernhaltigen Zellen gekennzeichnet ist. Cystatin C kann intra- wie auch extrazellulär nachgewiesen werden (ABRAHAMSON et al., 1987). Seine Aminosäuresequenz ist in Abbildung 1 dargestellt. Eine Punktmutation des Gens ist verantwortlich für die vererbte Form der humanen Amyloidangiopathie (SHIMODE et al., 1991).

und Peptiden, im proteolytischen Aufspalten von Prohormonen, im extrazellulären Abbau von Kollagen und in der Invasion von Tumorzellen oder Mikroorganismen ins Gewebe beteiligt (BARRETT et al., 1984; TURK & BODE, 1991; HALL et al., 1995). Insbesondere inhibiert Cystatin C Cathepsin B, ein Enzym, das vor allem in Lysosomen enthalten ist und während Phagozytose und Entzündung freigesetzt wird. Cystatin C grenzt dadurch akute entzündliche Reaktionen ein (WARFEL et al., 1987). Cystatin C inhibiert Cystein-Proteinasen humanen und nicht-humanen Ursprungs (BRZIN et al., 1984). Zusätzlich wird eine gewisse antimikrobielle und antivirale Funktion angenommen. Cystatin C kann das zelluläre Zytoplasma penetrieren und die Wirkung von viralen Proteasen (Poliovirus) oder Viren selbst (Coronaviren) hemmen (KORANT et al., 1985; BJORCK et al., 1990; COLLINS & GRUBB, 1991). Cystatin C inhibiert die Cystein-Proteasen des Protozoon *Leishmania mexicana* und hat damit auch eine gewisse antiparasitäre Wirkung (BARRETT et al., 1984). Cystatin C besitzt letztendlich sowohl intra- wie auch extrazelluläre Funktionen (ABRAHAMSON et al., 1987).

Konzentrationen in Körperflüssigkeiten:

Cystatin C wird, wie schon erwähnt, von nahezu allen kernhaltigen Zellen gebildet und wird in fast allen Körpergeweben exprimiert. Im Blut ist es vor allem in den Monozyten nachzuweisen, wohingegen es in Lymphozyten nicht vorhanden ist (WARFEL et al., 1987). Es konnte in Niere, Leber, Pankreas, Darm, Magen, Lunge, Seminalplasma, Liquor, Serum und Plazenta gefunden werden. Die Cystatin-C-Konzentration beträgt im Plasma durchschnittlich 1,0 mg/l mit einer Spanne von 0,6 - 2,5 mg/l. Im Liquor beträgt die Konzentration im Durchschnitt 5,8 mg/l mit einer Spanne von 3,2 - 12,5 mg/l. Löfberg und Grubb konnten 1979 zeigen, dass der Choroidplexus im zentralen Nervensystem (ZNS) Cystatin C nicht nur ultrafiltriert, sondern auch aktiv sezerniert (LOFBERG & GRUBB, 1979). Die höchste Konzentration konnten Grubb und Mitarbeiter im Seminalplasma finden. Sie betrug im Durchschnitt 51 mg/l mit einer Spanne von 41 - 62 mg/l (GRUBB et al., 1983). Da Cystatin C im proximalen Tubulus fast komplett katabolisiert wird, beträgt seine Konzentration im Urin nur 0,03 - 0,3

mg/l (LOFBERG & GRUBB, 1979).

Katabolismus:

Aufgrund seines geringen Molekulargewichtes und seiner positiven Ladung bei physiologischem pH kann Cystatin C sehr leicht den glomerulären Filter passieren. Es wird dann von den proximalen Tubuluszellen resorbiert und komplett katabolisiert, so dass die Konzentration im Urin, wie schon erwähnt, sehr gering ist (LOFBERG & GRUBB, 1979; GRUBB & LOFBERG, 1985; GRUBB et al., 1985). Tenstad konnte beweisen, dass Cystatin C nur renal ausgeschieden wird. Am Modell der Rate konnte er zeigen, dass rekombinantes humanes radioaktiv markiertes Cystatin C im Glomerulum filtriert und im Bürstensaum des proximalen Tubulus katabolisiert wird. Filtriertes radioaktiv markiertes Cystatin C wird für ca. 6 Minuten in den Nieren zurückgehalten und dann katabolisiert. Anschließend kehren die Aminosäuren und die freie radioaktive Markersubstanz in das peritubuläre Plasma zurück. Zusätzlich konnte er zeigen, dass die renale Clearance von Cystatin C zu 94 % mit der GFR korreliert, die durch eine Cr-EDTA-Clearance bestimmt wurde (TENSTAD et al., 1996).

Stabilität:

Serum kann im Kühlschrank bis zu 7 Tage aufgehoben werden, ohne dass es zum Abbau von Cystatin C kommt. Tiefgekühlt kann Serum für mindestens 6 Monate bei -80 °C gelagert werden (ERLANDSEN et al., 1999). Als Grund für seine gute Stabilität werden die im Blut befindlichen hohen Konzentrationen an Proteinase-Inhibitoren wie α 2-Makroglobulin, α 1-Antitrypsin und Kinogen und natürliche Konservierungsstoffe wie Transferrin diskutiert (GRUBB & LOFBERG, 1985). Dahingegen wird es im Liquor schnell abgebaut, wahrscheinlich durch Serin-Proteasen, die lokal durch Granulozyten gebildet werden. Im Urin wird es ebenfalls sehr schnell durch proteolytische Enzyme abgebaut, die entweder aus geschädigtem Nierengewebe oder aus in der Harnblase befindlichen Mikroorganismen stammen (LOFBERG & GRUBB, 1979).

Diagnostischer Einsatz der Cystatin-C-Bestimmung:

In der Humanmedizin hat Cystatin C eine Schlüsselrolle bei der Entstehung von Hirnblutungen bei Patienten mit vererbter Amyloid-Angiopathie, bei welcher Amyloid an den Wänden rupturierter zerebraler Arterien deponiert wird. Die Erkrankung äußert sich durch Schlaganfälle, die Lähmungen und Demenz verursachen. Betroffene Patienten versterben in der Regel vor dem 40. Lebensjahr (GRUBB et al., 1984). Bei dieser Erkrankung kommt zu einer Punktmutation im Cystatin-C-Genom. Die Aminosäure Leucin wird durch Glycin ersetzt. Diagnostisch fällt im Liquor ein niedriger Cystatin-C-Spiegel auf (SHIMODE et al., 1991).

Eine Unterexprimierung von Cystein-Proteinase-Inhibitoren und die daraus folgende reduzierte inhibitorische Kapazität ist verantwortlich für eine erhöhte proteolytische Aktivität von Cystein-Proteinasen während der Progression von tumoralen Erkrankungen. Deshalb können niedrige Cystatin-C-Serumspiegel als diagnostischer und prognostischer Parameter dienen (LAH et al., 1992).

Cystatin C als Parameter der Nierenfunktion:

Simonsen und Mitarbeiter beschrieben 1985 erstmals die Verwendung von Cystatin C als Marker der Nierenfunktion, aufgrund seiner konstanten Bildungsrate und komplett glomerulären Filtration. Sie verglichen die reziproken Werte des Proteins mit einer Cr-Ethylendiamintetraacetat (EDTA)-Clearance bei einer Gruppe von Patienten mit verschiedenen Nierenkrankheiten und unterschiedlichen Stadien an Nierenfunktionsstörungen. Die Ergebnisse zeigten, dass Cystatin C besser mit der GFR korrelierte als Serum-Kreatinin (SIMONSEN et al., 1985). Ebenfalls 1985 veröffentlichten Grubb und Mitarbeiter eine Studie, in der Patienten mit verschiedenen Graden an Nierenfunktionsstörungen untersucht wurden. Cystatin C und Serum-Kreatinin waren als Marker zur Bestimmung der Nierenfunktion gleich gut geeignet. Cystatin C war im Gegensatz zu Kreatinin geschlechtsunabhängig (GRUBB et al., 1985). Einige neuere Studien, bei denen die GFR anhand einer Isotopen-Technik gemessen

wurde, belegen, dass Serum-Cystatin-C als Nierenparameter eine höhere Sensitivität und Spezifität besitzt als Serum-Kreatinin (PERGANDE & JUNG, 1993; KYHSE-ANDERSEN et al., 1994; NEWMAN et al., 1995). Randers und Mitarbeiter konnten 1998 zeigen, dass Cystatin C bei nierenkranken Patienten gut mit der ^{99m}Tc -DTPA-Clearance korrelierte. In dieser Studie wurden 76 Patienten mit unterschiedlichen Nierenerkrankungen und 61 Dialysepatienten untersucht. Die Korrelation von Cystatin C zur ^{99m}Tc -DTPA-Clearance war geringfügig besser ($r = 0,91$) als die von Serum-Kreatinin ($r = 0,89$) (RANDERS et al., 1998).

Bei Kindern konnte die Überlegenheit von Cystatin C im Vergleich zu Serum-Kreatinin ebenfalls belegt werden. Es wurde eine Inulin-Clearance oder Cr-EDTA-Clearance als Referenzmethode durchgeführt (BOKENKAMP et al., 1998b; HELIN et al., 1998). Bei Kindern älter als 1 Jahr besitzt Cystatin C zudem den Vorteil, alters-, geschlechts- und größenunabhängig zu sein (BOKENKAMP et al., 1998a; BOKENKAMP et al., 1998b).

In einer vorläufigen publizierten Studie, die Cystatin C als Marker der Nierenfunktion bei nierentransplantierten Patienten untersuchte, konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit einer reduzierten endogenen Kreatinin-Clearance, Cystatin C signifikant erhöht war. Cystatin C korrelierte besser mit der Referenzmethode als Serum-Kreatinin (PLEBANI et al., 1998).

Bei Patienten mit Erkrankungen des Tubulussystems kann es zu einem Anstieg der Cystatin-C-Urinkonzentration kommen. Durch seine Instabilität im Urin ist Cystatin C aber als Indikator von Erkrankungen des Tubulussystems unbrauchbar (LOFBERG & GRUBB, 1979).

Herget-Rosenthal und Mitarbeiter publizierten 2000 eine Untersuchung, in der bei 226 Patienten mit unterschiedlichen Graden einer Nierenfunktionseinschränkung eine GFR-Bestimmung anhand einer Kreatinin-Clearance durchgeführt wurde und im Serum endogenes Kreatinin und Cystatin C gemessen wurde. Zusätzlich untersuchten sie bei 53 Patienten mit Glomerulonephritis und bei 26 Patienten mit

Tubulus-Erkrankungen die Serum-Cystatin-C-Konzentration. Cystatin C erkannte eine reduzierte Kreatinin-Clearance mit einer höheren Sensitivität (97 vs. 83 %) und einem höheren negativen prädiktivem Wert (96 vs. 87 %) als Kreatinin. Zugleich waren die Receiver-operating-characteristics (ROCs) von Cystatin C signifikant höher als die von Kreatinin ($p < 0,05$), so dass Cystatin C als Screening-Test der Kreatinin Bestimmung überlegen ist. Bei den Patienten mit glomerulären oder tubulären Erkrankungen ergab sich kein Unterschied hinsichtlich der Sensitivität oder dem negativen prädiktiven Wert (HERGET-ROSENTHAL et al., 2000). Coll und Mitarbeiter veröffentlichten ähnliche Ergebnisse. Serum-Cystatin-C zeigte die beste diagnostische Genauigkeit unter den gestesteten Nierenparameter. Als Goldstandard wurde eine ^{125}I -Iothalamate-Clearance durchgeführt. Die Sensitivität betrug 93,4 % und die Spezifität 100 %. Bei der gleichen Spezifität konnte Serum-Kreatinin nur eine Sensitivität von 86,8 % erreichen. Serum-Cystatin-C-Werte stiegen an, wenn die GFR 88 ml/min/1,73 m² oder weniger betrug, dahingegen stieg Serum-Kreatinin erst bei einer GFR von 75 ml/min/1,73 m² oder weniger an (COLL et al., 2000).

Einflussnehmende Faktoren:

Es bestehen Hinweise darauf, dass die Cystatine in vielen pathologischen Vorgängen wie Entzündung, Muskeldystrophie, multiple Sklerose, Viruserkrankungen, Erbkrankheiten und Tumorerkrankungen beteiligt sind (TURK & BODE, 1991). Grubb und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie zeigen, dass Entzündungen nicht zu einer Erhöhung des Cystatin-C-Spiegels führen, da es kein Akute-Phase-Protein ist (GRUBB, 1992). Dahingegen berichteten Colle und Mitarbeiter, dass bei Infektionen mit dem humanen Immundefizienzvirus gleichzeitig ein erhöhter Cystatin-C-Spiegel vorlag. Bei diesen Patienten befand sich Serum-Kreatinin im Referenzbereich. Allerdings wurde bei dieser Studie keine Clearance-Methode zur exakten Bestimmung der Nierenfunktion durchgeführt (COLLE et al., 1992).

Tumorzellinvasion und Metastasierung werden durch die proteolytische Aktion von verschiedenen Proteasen ermöglicht, was eine Imbalanz zwischen Cystein-

Proteasen und ihren Inhibitoren zur Folge hat. Die Aktivität aller Proteasen ist für den Abbau von extrazellulären Matrixproteinen nötig, um letztendlich die Verteilung, Invasion und Metastasierung von Tumorzellen zu ermöglichen (SLOANE, 1996). Kos und Mitarbeiter publizierten, dass hohe Serumkonzentrationen der Cystein-Proteasen Cathepsin B und H eine diagnostische Aussagekraft bezüglich der Überlebenszeit bei Melanomen und Kolorektaltumoren besitzen. Diese hohen Serumkonzentrationen der Cystein-Proteasen gingen mit erhöhten Serum-Cystatin-C-Werten einher. Bei den Melanom-Patienten mit Metastasen, waren höhere Cystatin-C-Konzentrationen nachweisbar als bei den Patienten ohne Metastasen. Dies zeigt eine erhöhte Cystatin-C-Expression im fortgeschrittenen Krankheitsstadium an. Bei den Patienten mit Kolorektaltumoren war Cystatin C erhöht, wenn sich die Patienten bereits im Duke-Stadium befanden. Bei allen Tumorpatienten zeigte sich eine schlechte Korrelation zwischen Serum-Kreatinin und Cystatin C, so dass ein Einfluss von nierenunabhängigen Faktoren auf die Cystatin-C-Konzentration diskutiert werden muss (KOS et al., 1997; KOS et al., 1998). Kritisch muss hier jedoch angemerkt werden, dass bei allen untersuchten Patienten keine anerkannte Referenzmethode zur Bestimmung der GFR durchgeführt wurde, so dass nicht geklärt werden kann, ob die erhöhten Cystatin-C-Werte auf eine erhöhte Produktion oder reduzierte glomeruläre Filtration zurückzuführen sind (NEWMAN, 1999). Andere Autoren beschreiben, dass Cystatin C im Gegensatz zu anderen Mikroproteinen wie beispielsweise β 2-Mikroglobulin, von lymphoproliferativen oder tumorösen Erkrankungen nicht beeinflusst wird (GRUBB et al., 1985; RANDERS et al., 1998).

In vivo konnte bisher nicht gezeigt werden, dass Medikamente Einfluss auf die Cystatin-C-Konzentration haben. In einer in vitro-Studie zeigte sich jedoch, dass Zellen nach Dexamethason-Behandlung mit einem dosisabhängigen Cystatin-C-Anstieg reagierten (BJARNADOTTIR et al., 1995). Transforming-growth-factor-beta (TGF- β) stimulierte in vitro die Sekretion von Cystatin C in embryonalen Zellen von Mäusen (CHAPMAN et al., 1990; SOLEM et al., 1990).

In vitro konnte gezeigt werden, dass chronisch entzündliche Konditionen, die

durch mononukleäre Phagozytose dominiert werden, die lokale Cystatin-C-Produktion vermindern. Dieser Vorgang verstärkt wiederum die Gewebepathologie, da proteolytische Vorgänge persistieren. Der Einfluss von Lipopolysacchariden (LPS) und Interferon-gamma (IFN- γ) wurde untersucht und es konnte festgestellt werden, dass diese Substanzen die Cystatin-C-Sekretion hemmen (WARFEL et al., 1987). Raucher haben eine geringere Cystatin-C-Konzentration und eine geringere Cystatin-C-Aktivität in den Alveolar-Makrophagen als Nicht-Raucher (CHAPMAN et al., 1990).

Zirkadiane Rhythmik:

In humanmedizinischen Studien blieb bei gesunden Individuen die Cystatin-C-Konzentration während eines 24-h-Intervalls annähernd konstant. Ein zirkadianer Rhythmus oder eine Veränderung nach Nahrungsaufnahme konnte nicht festgestellt werden (CIMERMAN et al., 2000).

Geschlechtsverteilung und Altersabhängigkeit:

Beim Menschen ist Cystatin C geschlechtsunabhängig, d. h. es liegt keine Beeinflussung durch Muskelmasse vor (NORLUND et al., 1997; ERLANDSEN et al., 1998; CIMERMAN et al., 2000). Jedoch kann eine Altersabhängigkeit festgestellt werden. Dies repräsentiert möglicherweise den bekannten altersabhängigen Abfall der GFR (NORLUND et al., 1997; ERLANDSEN et al., 1998). Der Referenzbereich ist relativ eng und damit liegt eine kleine interindividuelle Variationsbreite vor. Diese Tatsache macht Cystatin C zu einem guten Screening-Parameter, da bereits kleine Abweichungen im Ausscheidungsverhalten zu einem Überschreiten des oberen Referenzbereiches führen (CIMERMAN et al., 2000). Keevil und Mitarbeiter stellten allerdings eine gewisse intra-individuelle Schwankung in der Cystatin-C-Serumkonzentration während eines 12-tägigen Beobachtungszeitraumes fest. Dies könnte ein Nachteil beim Weiterverfolgen eines etablierten Krankheitsbildes sein (KEEVIL et al., 1998). Der Referenzbereich für Kinder (> 1 Jahr) liegt bei 0,7 – 1,38 mg/l. Die Cystatin-C-Konzentration im Serum ist am höchsten nach der Geburt. Nach

einigen Wochen kommt es dann zu einem rapiden Abfall. Da Cystatin C die Plazentarschranke nicht überqueren kann, reflektieren die hohen Konzentrationen nach der Geburt die noch stattfindende Ausreifung der glomerulären Filtrationskapazität. Die Cystatin-C-Konzentration stabilisiert sich nach dem ersten Lebensjahr. Ab dem 1. Lebensjahr bleiben die Werte bis ins Erwachsenenalter stabil (BOKENKAMP et al., 1998a). In der Literatur finden sich recht unterschiedliche Angaben für Referenzwerte bei Erwachsenen. Die unterschiedlichen Angaben zu den Referenzbereichen sind hauptsächlich auf unterschiedliche Testmethoden zurückzuführen. Erlandsen und Mitarbeiter dokumentierten einen Referenzbereich von 0,54 – 1,21 mg/l (ERLANDSEN et al., 1998). Finney und Mitarbeiter veröffentlichten einen Bereich von 0,51 – 0,98 mg/l (FINNEY et al., 2000). Norlund und Mitarbeiter ermittelten eine Altersabhängigkeit von Cystatin C. Die Dichotomie liegt bei 50 Jahren. Geschlechtsspezifische Unterschiede liegen weiterhin nicht vor (NORLUND et al., 1997).

Nachweismethoden:

Frühere Methoden zur Bestimmung von Cystatin C wie die enzyme-amplified-single-radial-immunodiffusion (SRID) waren langsam, ungeeignet zur Einfachbestimmung und konnten nicht automatisiert werden. Neuere Nachweismethoden wie den particle-enhanced-nephelometric-immunoassay (PENIA) und particle-enhanced-turbidimetric-immunoassay (PETIA) umgehen diese Probleme.

Im Jahr 1979 entwickelten Löfberg und Grubb eine enzyme-amplified-single-radial-immunodiffusion (SRID) zur Bestimmung von Cystatin C (LOFBERG & GRUBB, 1979). Dieser Test war aber zu langsam, um eine Automatisierung zu erlauben und hatte eine schwache Erkennungsgrenze bei niedrigen Cystatin-C-Konzentrationen (NEWMAN et al., 1995). Mittlerweile entwickelten andere Arbeitsgruppen Analysemethoden, die mit einem radio-immunoassay (RIA) (POULIK et al., 1983), einem fluoro-immunoassay (FIA) (JORONEN et al., 1986) oder einem enzyme-linked-immunosorbentassay (ELISA) arbeiteten

(COLLE et al., 1992; PERGANDE & JUNG, 1993). Diese Testsysteme waren präzise, aber ebenfalls zu zeitaufwendig, um routinemäßig eingesetzt zu werden (NEWMAN et al., 1995).

Im Jahre 1994 entwickelten Kyhse-Andersen und Mitarbeiter einen latex-particle-enhanced-turbidimetric-immunoassay (PETIA) (KYHSE-ANDERSEN et al., 1994) und 1997 beschrieb Finney und Mitarbeiter einen particle-enhanced-nephelometric-immunoassay (PENIA) (FINNEY et al., 1997). Beide Testsysteme arbeiten akkurat, schnell und sind für die Routinediagnostik gut geeignet, da sie einfach zu benutzen und kommerziell erhältlich sind (KYHSE-ANDERSEN et al., 1994; NEWMAN et al., 1995; FINNEY et al., 1997). Bei beiden Methoden wird ein Kalibrator aus purifiziertem humanen Cystatin C nach den Angaben des Herstellers benutzt. Der Variationskoeffizient des PETIA wird mit 1,3 - 3,2 % und die analytische Spanne mit 0,4 - 14,1 mg/l angegeben (KYHSE-ANDERSEN et al., 1994). Der Variationskoeffizient bei dem PENIA beträgt 3 - 5 % und die analytische Spanne 0,23 - 7,25 mg/l. Hämoglobin, Bilirubin, Triglyzeride und Rheumafaktoren interferieren nicht mit dem Test (FINNEY et al., 1997). Beim PETIA wird hingegen von Bilirubininterferenzen berichtet (KYHSE-ANDERSEN et al., 1994). Beim ersten Vergleich der beiden Methoden mit Hilfe der Bland-Altman-Analyse fiel eine Abweichung von 1,73 +/- 2,1 mg/l auf (KYHSE-ANDERSEN et al., 1994; FINNEY et al., 1997). Neuere Studien belegen allerdings eine sehr viel bessere Korrelation der beiden Methoden (MUSSAP et al., 1998; ERLANDSEN et al., 1999). Als Erklärung könnte die Tatsache dienen, dass der Dade-Behring-Kalibrator an das Dako-Kalibrator-Set angepasst wurde. Um jedoch eine Standardisierung von Cystatin C zu erhalten, wäre eine internationale Übereinkunft über den Referenzbereich Voraussetzung, um beide Methoden direkt miteinander vergleichen zu können (KYHSE-ANDERSEN et al., 1994).

Stand der Cystatin-C-Forschung beim Hund:

Wie schon oben erwähnt, zeigten Poulik und Mitarbeiter 1981, dass das humane und canine p- γ -Globulin sich sehr homolog verhalten. Die geringfügigen

Unterschiede lassen sich mit einem einfachen Basenpaar-Austausch erklären (POULIK et al., 1981). Sekine und Poulik wiesen 1982 p- γ -Globulin in allen Körperflüssigkeiten und Geweben beim Hund nach. Hohe Konzentrationen wurden in Parotis, Niere, Serum, und zentralem Nervensystem gefunden (SEKINE & POULIK, 1982).

Im Jahre 2002 wurde Cystatin C erstmals als Parameter der Nierenfunktion beim Hund beschrieben. Braun und Mitarbeiter etablierten einen Referenzbereich und untersuchten den Einfluss von Geschlecht, Alter und Gewicht auf die Cystatin-C-Serumkonzentration. Zudem bestimmten sie Cystatin C bei nierenkranken Hunden. Cystatin C wurde mit einem kommerziellen particle-enhanced-turbidimetric-immunoassay gemessen. Der obere Referenzbereich wurde mit 1,3 mg/l festgelegt. Es wurde festgestellt, dass der Parameter geschlechtsunabhängig war. Alter und Gewicht schienen einen gewissen Einfluss zu haben. Hunde zwischen 1 – 8 Jahren hatten niedrigere Cystatin-C-Werte als jüngere oder ältere Tiere. Hunde mit einem Körpergewicht unter 15 kg hatten ebenfalls niedrigere Cystatin-C-Werte als schwerere Tiere. Cystatin C verhielt sich stabil über eine Zeitspanne von 24 Stunden (h) bei nüchternen Hunden. Eine Stunde nach Nahrungsaufnahme wurde ein dramatischer Abfall festgestellt, der bis zu 9 h anhielt. Serum-Kreatinin und Serum-Cystatin C hatten eine sehr gute Korrelation bei Hunden mit Nierenversagen ($r = 0,88$) (BRAUN et al., 2002). Aufgrund des Abfalls von Cystatin C nach Nahrungsaufnahme, empfehlen auch Pechereau und Mitarbeiter, Cystatin C nur bei nüchternen Hunden zu bestimmen (PECHEREAU et al., 2000).

Im Jahr 2001 haben Jensen und Mitarbeiter den humanen particle-enhanced-turbidimetric-immunoassay (PETIA) zur Cystatin-C-Bestimmung beim Hund validiert. Das Testprinzip basiert auf der Bindung von Cystatin C an humane Cystatin-C-Autoantikörper, die von Kaninchen gewonnen werden. Die Cystatin-C-Autoantikörper sind an Polystyren-Partikel gebunden. Die daraus resultierende veränderte Turbidität der Probe wird gemessen. Es wurden Präzisions- und Linearitätsmessung aus verschiedenen Serumpools mit unterschiedlichen

Cystatin-C-Konzentration durchgeführt. Der Variationskoeffizient betrug zwischen 1,7 – 9,6 %. Der höchste Wert wurde in dem Serumpool mit der niedrigsten Cystatin-C-Konzentration gefunden. In verschiedenen Verdünnungsstufen des Serumpools nahm Cystatin C linear ab. Damit wurde bewiesen, dass die PETIA-Methode canines Cystatin C linear und proportional misst. In dieser Studie wurde Cystatin C bei gesunden Hunden, bei Hunden mit nicht-renalen Erkrankungen und bei Hunden mit Niereninsuffizienz gemessen. Hunde mit Niereninsuffizienz hatten die höchsten medianen Cystatin-Werte. Hunde mit nicht-renalen Erkrankungen hatten höhere mediane Cystatin-C-Werte als gesunde Hunde und niedrigere als die Gruppe mit Niereninsuffizienz. Da in dieser Studie keine Clearance-Messung durchgeführt wurde, bleibt offen, ob die erhöhten Cystatin-C-Serumwerte bei Hunden mit nicht-renalen Krankheiten auf einer reduzierten GFR beruhen oder ob Cystatin C durch andere Erkrankungen beeinflusst wird. Der mediane Cystatin-C-Wert bei gesunden Hunden betrug 1,06 mg/l (JENSEN et al., 2001).

Almy und Mitarbeiter validierten 2002 erneut die PETIA-Methode. Zusätzlich versuchten sie canines Cystatin C und rekombinantes humanes Cystatin C mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen humanen Cystatin-C-Autoantikörper zu erfassen. Sie testeten Cystatin C bei gesunden Hunden, um Normalwerte zu erhalten. Zudem wurde Cystatin C bei einer Gruppe von Hunden mit induzierter Niereninsuffizienz gemessen, für die eine exogene Kreatinin-Plasma-Clearance als Referenzmethode vorlag. Um prärenale Ursachen für eine reduzierte GFR zu imitieren, wurde bei einer dritten Gruppe nach Furosemid-Injektion eine exogene Kreatinin-Plasma-Clearance durchgeführt und Cystatin C gemessen. Die Arbeitsgruppe stellte fest, dass der von Kaninchen gewonnene humane Cystatin-C-Autoantikörper sowohl canines als auch humanes Serum in der Region von 14 kDa bindet. Dies war auch die Region, in der der Antikörper rekombinantes humanes Cystatin bindet. Intra- und inter-assay-Variationskoeffizienten waren < 5 %. In Verdünnungsproben wurde eine lineare Abnahme der Cystatin-C-Konzentration beobachtet. Die mediane Cystatin-C-Konzentration von 25 gesunden Hunden lag bei $1,08 \pm 0,16$ mg/l und der vorläufige Referenzbereich

wurde zwischen 0,76 – 1,44 mg/l festgesetzt. Unmittelbar nach Nephrektomie und partieller Niereninfarzierung korrelierte Cystatin C besser mit der exogenen Kreatinin-Plasma-Clearance ($r = 0,79$) als Serum-Kreatinin ($r = 0,54$). Zwei Wochen später jedoch korrelierten Cystatin C ($r = 0,891$) und Serum-Kreatinin ($r = 0,894$) gleich gut. Bei den Hunden mit artifiziell herbeigeführter Dehydratation korrelierte Serum-Kreatinin bedeutend besser mit der exogenen Kreatinin-Plasma-Clearance ($r = 0,95$) als Serum-Cystatin-C ($r = 0,54$). Diese Ergebnisse belegen, dass die humane PETIA-Methode geeignet ist, Cystatin C beim Hund zu messen, obwohl keine Wiederfindung durchgeführt werden konnte, da noch kein purifiziertes canines Cystatin C zur Verfügung steht. Cystatin C ist besser oder gleich gut wie Serum-Kreatinin geeignet, um eine reduzierte GFR bei Hunden mit CNV zu erfassen. Jedoch scheint dieser Parameter nicht geeignet zu sein, um eine reduzierte GFR zu erfassen, die auf prärenalen Ursachen beruht (ALMY et al., 2002).

2.2.5. Spezifisches Gewicht des Urins (USG)

Abhängig von den Bedürfnissen des Organismus, können die Nieren einen konzentrierten oder einen verdünnten Urin produzieren. Die Urin-Konzentration hängt von der Fähigkeit der hypothalamischen Osmorezeptoren ab, Veränderungen in der Plasma-Osmolalität zu erfassen sowie von der ADH-Sekretion aus der Neurohypophyse und der Effektivität von ADH am distalen Nephron. Zusätzlich dazu muss die medulläre Hypertonizität generiert und aufrechterhalten werden. Dies geschieht durch verschiedene Austauschsysteme in der Niere. Eine ausreichende Anzahl an Nephronen muss vorhanden sein, um adäquat auf ADH reagieren zu können (DIBARTOLA, 2005).

Die Beurteilung des spezifischen Gewichts ermöglicht eine Überprüfung der Tubulusfunktion. Das spezifische Gewicht ist ein Schlüsselparameter zur Lokalisierung der Ursache einer Azotämie. Definitionsgemäß wird die Dichte des Urins im Vergleich zu Wasser gemessen. Rechnerisch handelt es sich um den Quotienten aus dem Gewicht eines definierten Urinvolumens zu dem eines gleich

großen Volumen Wassers, gemessen bei der selben Temperatur. Das spezifische Gewicht von Wasser ist 1,000. Harn ist dichter als Wasser, da zahlreiche Stoffe darin gelöst sind. Das spezifische Gewicht ist nur ein indirekter Parameter zur Schätzung der Anzahl der gelösten Teilchen, da es auch von deren Molekulargewicht und Größe beeinflusst wird. Daher variiert das spezifische Gewicht nicht nur mit der Zahl, sondern auch der Art der gelösten Teilchen, während die Osmolalität nur von der Anzahl der gelösten Teilchen bestimmt wird. Das spezifische Gewicht ist temperaturabhängig. Die Dichte nimmt bei steigender Temperatur ab. Daher sollte das Refraktometer entsprechend eingestellt sein.

Das spezifische Gewicht des Urins weist eine extreme Schwankungsbreite von 1,001-1,065 auf. Es wird vom Wasser- und Elektrolythaushalt, dem Stickstoffgehalt der Nahrung und körperlicher Aktivität beeinflusst. Eine einzelne Messung ohne Berücksichtigung des Hydratationszustandes des Individuums ist daher nicht aussagekräftig. Das USG im Morgenurin ist höher als abends. Um konzentrierten Urin auszuscheiden, ist eine bestimmte Anzahl funktionsfähiger Nephrone nötig. Es müssen mindestens 33 % aller Nephrone funktionsfähig sein. Das Urin-spezifische-Gewicht sollte beim Hund $> 1,030$ betragen (GUYTON & HALL, 2000d; DIBARTOLA, 2005).

III Publikation

Utility of serum cystatin c as a clinical measure of canine renal function

A. Wehner, K. Hartmann, J. Hirschberger

A. Wehner, DVM

K. Hartmann, Dr. med. vet., Dr. habil., DECVIM-CA

J. Hirschberger, Dr. med. vet., Dr. habil., DECVIM-CA (Internal Medicine and Oncology)

Department of Small Animal Internal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine,
Ludwig Maximilians University Munich, Veterinaerstr. 13, 80539 Munich,
Germany.

1. Abstract

A human kit for cystatin c determination was evaluated for the use in canine sera. A reference range was established. To determine the correlation of cystatin c with glomerular filtration rate (GFR), an exogenous creatinine plasma clearance (ECPC) was performed in 60 dogs with various diseases. Cystatin c was better correlated with ECPC ($r = -0.630$; $p < 0.001$) than serum creatinine ($r = -0.572$; $p < 0.001$). Non-renal diseases (e.g. neoplasia, infection) did not influence serum cystatin c concentrations. Sensitivities of creatinine and cystatin c for reduced GFR were 65% and 76% ($p < 0.001$), respectively. Specificity was 91% and 87% ($p < 0.001$), respectively.

2. Introduction

Glomerular filtration rate (GFR) is widely accepted as the most accurate measure of renal excretory function. Renal clearance is defined as the volume of plasma that has been cleared of a particular substance per unit time and GFR may be estimated by measuring the renal clearance of an appropriate filtration marker utilizing urine and plasma concentrations or by measuring only plasma concentrations¹. However, available methods for estimating GFR are impractical for widespread clinical use, and the test that currently is most often used to assess renal excretory function is serum creatinine concentration. Creatinine originates from the skeletal muscle and to a lesser extent food; its blood level is therefore influenced by muscle mass and to a lesser extent by food intake². It is reasonably specific but somewhat insensitive for detecting reduced GFR^{2,3}.

Cystatin c is a protease inhibitor and belongs to the family of cystatins. Together with the stefines and kinogenes they form the super-family of cysteine proteinase inhibitors⁴. Cystatin c has a single polypeptide chain with 120 amino acids having a molecular weight of 13.359 kda. It is not glycosylated, and its isoelectric point is 9.3⁵. It is produced by all nucleated cells within the body and is released during phagocytosis and inflammation. Cystatin c's major function is to control inflammation by inhibiting lysosomal proteases⁶. It helps to regulate intra- and extracellular protein- and peptide catabolism and the penetration of cancer cells into tissues⁷. Recent studies have demonstrated antimicrobial properties^{4,8-10}. Its rate of synthesis is constant (housekeeping type)^{11,12}, independent of age and gender¹³ and unaltered by inflammatory processes and neoplasia¹¹. High concentrations are found in serum, seminal fluid, CSF and synovia¹⁴.

Cystatin c fulfills many criteria of an ideal GFR marker because it is filtered by the glomeruli without any tubular secretion. It passes through the glomeruli easily because of its low molecular weight, and positive charge at physiologic pH. Cystatin c is catabolized completely within the proximal tubular cells; therefore, its urine concentration is typically low^{13,15}. Diseases of the proximal tubules do not alter its degradation¹⁶. Cystatin c is eliminated

exclusively by the kidneys¹⁷ and in humans it correlates better with GFR determination than serum creatinine concentrations^{13,18-21}. There are few published studies that analyze the diagnostic utility of cystatin c in dogs^{22,23}.

The aim of the present study was first to evaluate a human test kit for determining serum concentration of cystatin c in canine serum. The next goal was to establish a reference range. The third goal was to compare serum cystatin c concentrations to exogenous creatinine plasma clearance (ECPC) in order to assess its usefulness as a measure of renal function.

3. Material and Methods

Validation of the test kit

A particle-enhanced turbidimetric (PET) assay^a designed to quantify human cystatin c in serum and plasma was used. In this technique, cystatin c binds to rabbit anti-human cystatin c antibody coupled to polystyrene particles. The resulting change in turbidity is proportional to the cystatin c concentration in the sample. The assay was set up on an Automatic Analyzer^b according to the manufacture's instructions. Two serum pools were created, one from dogs with increased serum creatinine concentrations and one from dogs with normal values. Eight canine serum samples were included in each pool. Intra-assay variability was assessed in 10 serial measurements. Inter-assay variability was assessed by freezing 11 serum samples (-80 °C) and then measuring them daily for 10 consecutive days. The last sample was thawed after 365 days to determine if cystatin c could still be measured. Dilutional parallelism was determined in serial dilutions (75%, 50% and 25%) using physiologic saline. Unfortunately a purified source of canine cystatin c was not available, making it impossible to assess recovery. The research facilities at the Department of Veterinary Medicine were not equipped to allow purification of canine cystatin c. Therefore determination of recovery was not performed.

Blood samples were obtained at 0 minutes (min), 360 min and 720 min from 27 dogs with various degrees of kidney function that had been fasted for 12

hours (h). This was done to look for intra-individual variations.

Informed consent

Owners gave informed consent before any blood and urine samples were obtained from dogs. This was done in accordance with the published law and the policy of the university.

Establishment of reference ranges

Ninety-nine dogs that presented for annual check up examination were used. The dogs were normal on physical examination, CBC, chemistry profile, and urinalysis (stick, urine specific gravity, sediment). The dogs were fasted 12 h. Blood was collected by jugular veinpuncture and urine by cystocenteses. Serum samples for cystatin c measurement were frozen (-80 °C) until analyzed.

Inclusion criteria

An exogenous creatinine plasma clearance (ECPC) was performed in 60 dogs with various renal and non-renal diseases. GFR determination was warranted in these patients as a confirmatory test in some dogs where chronic kidney disease (CKD) was suspected (n = 27) and in others to assess renal function prior to treatment with potential nephrotoxic substances (n = 33). ECPC is a sometimes crude but accepted estimate of GFR²⁴. Ideally, GFR should be assessed with a urinary inulin clearance since this is the considered gold standard. Because a urinary clearance was considered impractical in a hospital facility, GFR was assessed by ECPC. Final diagnoses were based on histopathology/cytology (n = 24), serology (n = 11), exogenous creatinine plasma clearance (n = 17) and other methods (endocrine testing, echo) (n = 8).

Patients, measurement of ECPC, creatinine and cystatin c

Dogs were fasted 12 h prior to the examination. All were clinically well-hydrated. First, serum creatinine concentration was determined, and then a 5% creatinine solution^c was injected intravenously. A concentration between 60 – 125 mg/kg was chosen depending on the body mass of the patient. The lower concentration

was applied to larger dogs. Twelve to 15 blood samples were obtained over the next 10 h and the serum creatinine concentration was measured enzymatically^b. The area under the curve (AUC) was calculated with a trapezoidal approach (non-compartmental-model)¹. ECPC was calculated as follows: amount of injected creatinine/AUC * 100²⁴⁻²⁶. Exogenous creatinine plasma clearance ≥ 3 ml/min/kg was considered normal. Values 2.00 - 2.99 ml/min/kg were considered to indicate slight reduction. Values ≤ 1.99 ml/min/kg were considered to indicate marked reduction. The upper limit of the reference range for serum creatinine was 106 $\mu\text{mol/l}$ (1.2 mg/dl). The reference range for cystatin c was 0.68 – 1.6 mg/l.

Statistics

SPSS 13.0^d was used for statistical analysis. Descriptive statistics were applied for the cystatin c test kit validation and calculation of reference range. Kolmogorov-Smirnov analysis was performed to determine if age and gender of dogs used in the cystatin c reference group were normally distributed and if the reference range itself was normally distributed. Pearson's correlation analysis was used to assess correlation for cystatin c and age, weight and gender. This analysis was also applied to determine correlation between ECPC and serum creatinine; between ECPC and cystatin c; and to determine whether serum cystatin c was influenced by non-renal diseases. Sensitivity, specificity, positive and negative predictive values of serum cystatin c and serum creatinine for diminished GFR were calculated using ROC analysis. Significance was defined as $p < 0.05$.

4. Results

Validation of the test kit

Intra-assay variability after 10 measurements was 1.76% (pooled serum with high values) and 3.85% (pooled serum with low values). The inter-assay variability was 2.95% and 3.64%, respectively (Table 1). Both pools were frozen (-80 °C), and values were 8% and 11% higher, respectively, after 365 days. An almost

linear decrease of cystatin c was observed in two canine serum pools after serial dilutions (75%, 50%, 25%). Correlation analysis was $r = 0.992$ ($p < 0.01$) and $r = 0.989$ ($p < 0.05$) for serum pool with high values and sera with low values, respectively (Figure 1a and 1b).

Intra-individual variations

Serum cystatin c concentrations remained stable in 27 dogs when sampling at 0 min, 360 min and 720 min ($r = 0.964, 0.954, 0.972$; $p < 0.001$).

Establishment of reference values

Dogs were 0.4 – 13 years old (median = 4). Twenty-five dogs were intact females, 27 were female spayed, 26 were male and 21 were neutered males. Body weight ranged from 5 – 42 kg (median = 25). Breeds that were represented by more than one case in the reference group were German Shepherd Dog (18 cases); Golden Retriever (8 cases); Labrador Retriever (6 cases); Dachshund (4 cases); Magyar Vizsla, Border Collie, Belgian Tervueren, Dalmation, Siberian Husky (3 cases each), and Bernese Mountain Dog, Irish Wolfhound, Schapendoes, Boxer, Rottweiler (2 cases each), with other breeds (12 cases) or mixed breed dogs (22 cases) accounting for the remainder. Kolmogorov-Smirnov analysis indicated that age and weight were normally distributed. Serum cystatin c concentrations were 0.49 – 1.81 mg/l (mean = 1.144, SD = 0.231). The 0.975 quantile, determined as mean \pm 2 SD, was 0.682 mg/l and 1.606 mg/l, respectively. Therefore the reference range of serum cystatin c was set at 0.68 – 1.6 mg/l. Kolmogorov-Smirnov analysis showed that the cystatin c values were normally distributed. The upper limit of the in-house reference range for serum creatinine was 106 μ mol/l (1.2 mg/dl). Serum creatinine concentrations ranged from 56 – 103 μ mol/l (0.63 – 1.17 mg/dl) (mean = 81.90 μ mol/l, SD = 13.29). If the serum creatinine reference range was calculated from these 99 dogs, the reference range would have been set at 55.31 - 108.5 μ mol/l (0.63 – 1.23 mg/dl) (0.975 quantile determined as mean \pm 2 SD). This almost matched the reference range mentioned above. Therefore the upper limit of the serum creatinine reference range was left at 106 μ mol/l (1.2 mg/dl).

Influence of age, weight and gender

There was no correlation between serum cystatin c and age ($r = 0.022$; $p > 0.05$) or weight ($r = 0.036$; $p > 0.05$). Serum cystatin c concentrations were similar in female and male dogs with 1.13 ± 0.24 mg/l (mean + SD) in 52 female dogs and 1.15 ± 0.21 mg/l in 47 males (Figure 2). The Mann-Whitney-U-test and Wilcoxon test confirmed that the distribution of cystatin c was similar in males and females.

Patients, measurement of ECPC, creatinine and cystatin c

Patients were 0.5 – 15 years old (median = 5). Nine were female, 16 were spayed females, 27 were male and eight neutered males. Body weight ranged from 7 – 51.8 kg (median = 27.2). Breeds that were represented by more than one case in the patient group were Bernese Mountain Dog (6 cases), Boxer (4 cases), Beagle (3 cases), German Shepherd Dog (3 cases), and West Highland White Terrier (2 cases), with other breeds (15 cases) or mixed breed dogs (27 cases) accounting for the remainder. Values for serum creatinine ranged from 42 – 590 $\mu\text{mol/l}$ (0.46 – 6.67 mg/dl) (median = 91 $\mu\text{mol/l}$). Forty-three percent of these values were above the reference range ($> 106 \mu\text{mol/l}$) (> 1.2 mg/dl). Cystatin c values ranged from 0.79 – 5.97 mg/l (median = 1.65). Fifty-two percent of dogs tested, had elevated serum cystatin c concentrations (> 1.6 mg/l). Results for the ECPC were 0.3 – 5 ml/min/kg (median = 2.6). Thirty-eight percent (23/60) of dogs had normal values (≥ 3 ml/min/kg), and 62% (37/60) had a reduced ECPC. Twenty-two dogs (22/37) had a slightly decreased ECPC (2.00 - 2.99 ml/min/kg) and fifteen dogs (15/37) had a marked reduction (≤ 1.99 ml/min/kg). Final diagnoses were as follows: neoplasia ($n = 7$), chronic kidney disease (CKD) ($n = 24$), neoplasia and concurrent CKD ($n = 15$), infection ($n = 10$), and other diseases ($n = 4$) (endocrinopathy = 2, psychogenic drinker = 1, mitral insufficiency = 1).

Correlation between ECPC, creatinine, and cystatin c

There was a significant inverse correlation between ECPC and serum creatinine in all patients ($n = 60$) which was not linear ($r = -0.572$; $p < 0.001$) (Figure 3a). There was a significant inverse correlation between ECPC and serum cystatin c in all patients which was not linear. However it was more linear than creatinine ($r = -$

0.630; $p < 0.001$) (Figure 3b). Correlation in the 60 dogs between serum creatinine and serum cystatin c was significant and linear ($r = 0.886$; $p < 0.001$) (Figure 4).

Correlation of creatinine and cystatin c to the degree of renal function

Patients were assigned to 3 groups according to the results of the ECPC. Group 1 had normal results (≥ 3 ml/min/kg; $n = 23$), group 2 had slightly reduced ECPC (2.00 - 2.99 ml/min/kg; $n = 22$) and group 3 had a marked reduction (≤ 1.99 ml/min/kg; $n = 15$). Serum creatinine and cystatin c concentrations were compared within these groups (Figure 5a and 5b). The median serum concentration of cystatin c in dogs with slightly reduced ECPC (Group 2) was already outside the reference range while the median serum creatinine concentration was within the reference range. All dogs with a marked reduction in ECPC (Group 3) had elevated serum cystatin c concentrations while some had normal serum creatinine values.

Correlation of cystatin c to the final diagnosis

Patients were assigned to 5 groups according to their final diagnosis. Cystatin c concentrations in the different groups were compared to detect the influence of non-renal diseases on cystatin c. Almost all dogs with non-renal diseases and normal GFR had cystatin c values within the reference range (Figure 6). All of these dogs had normal creatinine values.

Sensitivity, Specificity, positive and negative predictive values, ROC analysis

Sensitivity [true positives/(true positives + false negatives)] of serum cystatin c for detection of decreased ECPC (< 3.0 ml/min/kg) was 76%, whereas for serum creatinine it was 65% ($p < 0.001$). Specificity [true negatives/(false positives + true negatives)] of serum cystatin c for decreased ECPC was 87% while for serum creatinine it was 91% ($p < 0.001$). Receiver-operating-characteristics (ROC) for reduced ECPC showed better results for cystatin c compared to serum creatinine. This result was significant ($p < 0.001$) (Figure 7). Positive [true positives/(true positives + false positives)] and negative [true negatives/(true negatives + false

negatives)] predictive values of cystatin c for detecting decreased ECPC were 90% and 69%, respectively. For serum creatinine they were 92% and 62%, respectively.

5. Discussion

Renal disease is important in canine medicine, but early diagnosis remains difficult in some cases. Serum creatinine concentration rises as GFR falls. Azotemia does not typically prevail in dogs until the reduction of GFR exceeds 75%. Therefore, mildly decreased renal excretory function may not be detected by using serum creatinine as a screening test. Currently, mild kidney disease can be reliably diagnosed by performing time consuming clearance techniques such as ECPC or iohexol plasma clearance. Therefore human studies have focused on endogenous, low molecular weight proteins as a way to detect early renal dysfunction¹⁸. Multiple studies have demonstrated serum cystatin c concentrations as having better sensitivity and negative predictive values for decreased GFR in people than serum creatinine^{16,27-30}.

Our study showed that the human particle-enhanced turbidimetric assay^a can be considered valid for serum cystatin c measurements in dogs although measurement of recovery was not performed. It was rapid, precise and inexpensive. The PET method measures cystatin c in a linear and proportional manner, which is in agreement with other veterinary studies^{22,23}. Although the exact genetic structure of canine cystatin c is unknown, there is a high degree of homology between people, cattle, mice and rats. One genetic sequence (i.e. the so called μ -trace) has a high degree of homology between people and dogs³¹⁻³⁵. Because of this homology and the high degree of correlation to renal function, we extrapolated that the above assay could reliably detect canine cystatin c. Unfortunately a purified source of canine cystatin c was not available, making it impossible at our facility to determine percent recovery. This is most certainly a limitation of the study.

This study demonstrated that serum cystatin c is stable and can be reliably measured after 365 days of freezing at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. This has also been shown in people³⁶. High concentrations of proteinase inhibitors such as α 2-macroglobulin, α 1-protease inhibitor, kinogenes and natural preservatives such as transferrin aid to its stability in the blood¹⁸.

The reference range of cystatin c for dogs in our study was 0.68 - 1.6 mg/l and is slightly higher compared to other veterinary and human studies^{22,23,37-39}. Slight variations in the assay principle, in the programming of the instrument, and the reagents or different analyzers may have lead to the different results. Ideally a GFR measurement should have been performed in the population used to establish the cystatin c reference range, to assure that these dogs truly have had normal renal excretory function. Because these dogs had no medical complaints and were considered healthy based on physical and laboratory examinations, a petition for animal experimentation should have been proposed to the government in order to perform further procedures such as GFR measurement. Therefore no simultaneous assessment of GFR was performed. Conventional standards to calculate reference ranges were used, where 2.5% of the low and high extreme values were excluded to decrease the likelihood that some dogs in the reference population might have had early undetected CKD.

Age, body weight and gender did not influence cystatin c concentration; therefore, there is no need to establish age, weight or gender dependent reference ranges. This is in accordance with human studies⁴⁰⁻⁴² but contrary to one veterinary study³⁹. Because no GFR measurement was performed in their study³⁹, differences between our and their study might be explained by unsuspected early kidney disease.

We found low intra-individual variation for cystatin c; therefore, there is no reason to request a blood sample at a specific time. Such low intra-individual variation is advantageous.

We did not investigate the effects of meals in this study. The effect of a meal upon GFR has been investigated in dogs, and GFR increases significantly after protein ingestion⁴³. In a human study cystatin c remained almost stable despite eating⁴¹. A study in dogs has demonstrated a significant decrease of

cystatin c after feeding³⁹. This discrepancy might be explained by a different protein concentration in human meal compared to dog food. Still, more data are needed that examine the impact of feeding upon the serum cystatin c concentration in dogs.

None of the patients in this study suffered from acute kidney disease. There are no published veterinary studies that analyze serum cystatin c in acute kidney disease. Serum cystatin c rises earlier than serum creatinine in people with acute kidney disease and correlates better with GFR^{44,45,46}. Volume depletion might mimic acute kidney disease. Almy et al²³ documented that volume depleted dogs had cystatin c concentrations within the reference range despite a mildly reduced GFR. It is not known if volume depletion can actually reflect acute kidney disease. More studies are needed that investigate the influence of acute kidney disease, volume depletion, and post-renal azotemia upon serum cystatin c concentration.

Serum cystatin c correlated better with exogenous creatinine plasma clearance ($r = -0.630$; $p < 0.001$) than did serum creatinine ($r = -0.572$; $p < 0.001$), suggesting it is probably the more sensitive test for reduced GFR. Dogs with early renal impairment will more likely have an elevated cystatin c concentration than an elevated serum creatinine concentration. Sensitivity of serum cystatin c to detect reduced GFR was 76% which is 11% higher than the sensitivity of serum creatinine. Although a sensitivity of 80 or 90% would be more desirable, there is currently no better test available to diagnose early renal excretory dysfunction that just utilizes a single blood sample. Both parameters have an equally high positive predictive value. The higher negative predictive value of serum cystatin c (69%) compared to serum creatinine (62%) will give less false negative results and aids to its potential as a better screening test to diagnose early canine kidney disease. The slightly better specificity of serum creatinine (91%) over serum cystatin c (87%) makes us reluctant to recommend replacing serum creatinine, if kidney disease has to be excluded. Using both tests simultaneously should enhance the accuracy of diagnosing or excluding canine kidney disease. But overall, the specificity for both parameters in our study was very close. More studies need to be done that demonstrate that serum creatinine truly has a superior specificity over

serum cystatin c.

Our study demonstrated that serum cystatin c was not influenced by neoplasia or infection. Although cystatin c is involved in inflammation and spread of cancer cells, studies in people have not found that these conditions alter its serum concentration^{11,12}. This is in accordance with the results of this study. Still, because the number of dogs with neoplastic and infectious diseases was low, more data are needed to better assess the impact of these diseases upon serum cystatin c concentration.

6. Conclusion

Endogenous, low molecular weight proteins could serve as a practicle way to rapidly detect early kidney disease. Canine cystatin c can be reliably measured with the human particle-enhanced turbidimetric assay^a. Cystatin c is independent of age, body weight and gender. Serum cystatin c correlated slightly better with exogenous creatinine plasma clearance than serum creatinine. Cystatin c has a higher sensitivity and negative predictive value than serum creatinine making it a better screening test to diagnose early canine kidney disease. Because of the slightly better specificity of serum creatinine over serum cystatin c both tests should be used simultaneously to enhance the accuracy of diagnosing or excluding canine renal excretory dysfunction. Serum cystatin c was not influenced by neoplastic or infectious diseases.

7. Footnotes

- a. Particle-enhanced turbidimetric (PET) assay; Dako, Denmark.
- b. Hitachi 911 automatic analyzer; Roche, Germany.
- c. Creatinine anhydrous 5 % solution; Sigma-Aldrich, Germany.
- d. SPSS 13.0; Chicago, Illinois.

8. References

1. Heiene R, Moe L. Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog: a review. *J Vet Intern Med* 1998;12:401-414.
2. Braun JP, Lefebvre HP, Watson AD. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol* 2003;32:162-179.
3. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992;38:1933-1953.
4. Barrett AJ, Davies ME, Grubb A. The place of human gamma-trace (cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120:631-636.
5. Grubb A, Lofberg H. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79:3024-3027.
6. Warfel AH, Zucker-Franklin D, Frangione B, *et al.* Constitutive secretion of cystatin C (gamma-trace) by monocytes and macrophages and its downregulation after stimulation. *J Exp Med* 1987;166:1912-1917.
7. Hall A, Hakansson K, Mason RW, *et al.* Structural basis for the biological specificity of cystatin C. Identification of leucine 9 in the N-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases. *J Biol Chem* 1995;270:5115-5121.
8. Korant BD, Brzin J, Turk V. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteases alters viral protein cleavages in infected human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;127:1072-1076.
9. Bjorck L, Grubb A, Kjellen L. Cystatin C, a human proteinase inhibitor, blocks replication of herpes simplex virus. *J Virol* 1990;64:941-943.
10. Collins AR, Grubb A. Inhibitory effects of recombinant human cystatin C on human coronaviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35:2444-2446.
11. Randers E, Kornerup K, Erlandsen EJ, *et al.* Cystatin C levels in sera of patients with acute infectious diseases with high C-reactive protein levels. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61:333-335.
12. Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Strukelj B, *et al.* Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. *Int J Cancer*

- 1992;50:36-44.
13. Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate. *Scand J Clin Lab Invest* 1985;45:97-101.
 14. Brzin J, Popovic T, Turk V, *et al.* Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;118:103-109.
 15. Grubb A, Lofberg H. Human gamma-trace. Structure, function and clinical use of concentration measurements. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1985;177:7-13.
 16. Herget-Rosenthal S, Trabold S, Pietruck F, *et al.* Cystatin C: efficacy as screening test for reduced glomerular filtration rate. *Am J Nephrol* 2000;20:97-102.
 17. Tenstad O, Roald AB, Grubb A, *et al.* Renal handling of radiolabelled human cystatin C in the rat. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56:409-414.
 18. Grubb A, Simonsen O, Sturfelt G, *et al.* Serum concentration of cystatin C, factor D and beta 2-microglobulin as a measure of glomerular filtration rate. *Acta Med Scand* 1985;218:499-503.
 19. Pergande M, Jung K. Sandwich enzyme immunoassay of cystatin C in serum with commercially available antibodies. *Clin Chem* 1993;39:1885-1890.
 20. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, *et al.* Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int* 1995;47:312-318.
 21. Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, *et al.* Serum cystatin C, determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem* 1994;40:1921-1926.
 22. Jensen AL, Bomholt M, Moe L. Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-like immunoreactivity in dogs. *Vet Clin Pathol* 2001;30:86-90.
 23. Almy FS, Christopher MM, King DP, *et al.* Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med*

- 2002;16:45-51.
24. Watson AD, Lefebvre HP, Concordet D, *et al.* Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *J Vet Intern Med* 2002;16:22-33.
 25. Hochel J, Finnah A, Velde K, *et al.* [Evaluation of a modified exogenous creatinine clearance as a suitable renal function test for the small animal practice]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 2004;117:420-427.
 26. Kerl ME, Cook CR. Glomerular filtration rate and renal scintigraphy. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005;20:31-38.
 27. Christensson A, Ekberg J, Grubb A, *et al.* Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation. *Nephron Physiol* 2003;94:p19-27.
 28. Helin I, Axenram M, Grubb A. Serum cystatin C as a determinant of glomerular filtration rate in children. *Clin Nephrol* 1998;49:221-225.
 29. Nitta K, Hayashi T, Uchida K, *et al.* Serum cystatin C concentration as a marker of glomerular filtration rate in patients with various renal diseases. *Intern Med* 2002;41:931-935.
 30. Wasen E, Isoaho R, Mattila K, *et al.* Estimation of glomerular filtration rate in the elderly: a comparison of creatinine-based formulae with serum cystatin C. *J Intern Med* 2004;256:70-78.
 31. Poulik MD, Shinnick CS, Smithies O. Partial amino acid sequences of human and dog post-gamma globulins. *Mol Immunol* 1981;18:569-572.
 32. Colle A, Tonnelle C, Jarry T, *et al.* Isolation and characterization of post gamma globulin in mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122:111-115.
 33. Esnard A, Esnard F, Faucher D, *et al.* Two rat homologues of human cystatin C. *FEBS Lett* 1988;236:475-478.
 34. Hirado M, Tsunasawa S, Sakiyama F, *et al.* Complete amino acid sequence of bovine colostrum low-Mr cysteine proteinase inhibitor. *FEBS Lett* 1985;186:41-45.
 35. Sekine T, Poulik MD. Post-gamma globulin : tissue distribution and

- physicochemical characteristics of dog post-gamma globulin. *Clin Chim Acta* 1982;120:225-235.
36. Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH. Evaluation of the Dade Behring N Latex Cystatin C assay on the Dade Behring Nephelometer II System. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59:1-8.
 37. Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, *et al.* Reference values for cystatin C serum concentrations in children. *Pediatr Nephrol* 1998;12:125-129.
 38. Finney H, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem* 2000;37 (Pt 1):49-59.
 39. Braun JP, Perxachs A, Pechereau D, *et al.* Plasma Cystatin C in the dog: reference values and variations with renal failure. *Vet Clin Path* 2002;11:44-49.
 40. Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, *et al.* Cystatin C--a new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height. *Pediatrics* 1998;101:875-881.
 41. Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, *et al.* Twenty-four hour variations of cystatin C and total cysteine proteinase inhibitory activity in sera from healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2000;291:89-95.
 42. Norlund L, Fex G, Lanke J, *et al.* Reference intervals for the glomerular filtration rate and cell-proliferation markers: serum cystatin C and serum beta 2-microglobulin/cystatin C-ratio. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:463-470.
 43. Brown SA, Finco DR. Characterization of the renal response to protein ingestion in dogs with experimentally induced renal failure. *Am J Vet Res* 1992;53:569-573.
 44. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, *et al.* Early detection of acute renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* 2004;66:1115-1122.
 45. Villa P, Jimenez M, Soriano MC, *et al.* Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. *Crit Care* 2005;9:R139-143.
 46. Coll E, Botey A, Alvarez L, *et al.* Serum cystatin C as a new marker for

noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *Am J Kidney Dis* 2000;36:29-34.

9. Figure Legends

Figure 1a and 1b—Linearity of the cystatin c PET kit. Correlation analysis between the observed and calculated cystatin c concentration of different dilutions of pooled canine sera (1a = pool with higher concentrations, n = 8; 1b = pool with lower concentrations, n = 8).

Figure 2—Cystatin c concentration (mean \pm SD) of 99 clinically normal dogs (52 female und 47 male) used to establish a reference range.

Figure 3a and 3b—Correlation between serum creatinine and serum cystatin c concentrations and exogenous creatinine plasma clearance (ECPC) in 60 dogs with various diseases. The area between the vertical black lines indicates mild kidney disease. The dashed line indicates the upper reference range for serum creatinine and serum cystatin c.

Figure 4—Correlation between serum creatinine and serum cystatin c concentrations in 60 dogs with various diseases.

Figure 5a and 5b—Serum creatinine and serum cystatin c concentration in 60 dogs with various diseases according to their renal function as defined by exogenous creatinine plasma clearance (ECPC) measurement. The dashed line indicates the upper reference range for creatinine and cystatin c. Normal renal function is defined as $ECPC \geq 3$ ml/min/kg, slightly impaired renal function is defined as $ECPC 2.00 - 2.99$ ml/min/kg. Markedly impaired renal function indicates $ECPC \leq 1.99$ ml/min/kg.

Figure 6—Serum cystatin c concentrations in 60 dogs in different disease groups. The dashed line indicates the upper reference range for cystatin c. CKD = chronic

kidney disease.

Figure 7—Nonparametric ROC plots of sensitivity and specificity of serum cystatin c and serum creatinine in percent discriminating between normal and reduced exogenous creatinine plasma clearance (ECPC) in 60 dogs with various diseases ($p < 0.001$).

10. Tables

Table 1

Intra- and inter-assay variability for the cystatin c PET kit when using 2 pools of canine sera, one from dogs with high serum creatinine concentrations ($n = 8$) and one from dogs with low serum creatinine concentrations ($n = 8$).

Pooled sera used	Cystatin c concentration			
	Intra-assay variability		Inter-assay variability	
	High	Low	High	Low
Mean (mg/L)	2.177	1.607	1.967	1.461
Standard Deviation	0.038	0.061	0.057	0.053
Coefficient of variation (%)	1.759	3.847	2.945	3.642
Number of replicates	10	10	10	10

11. Figures

Figure 1a

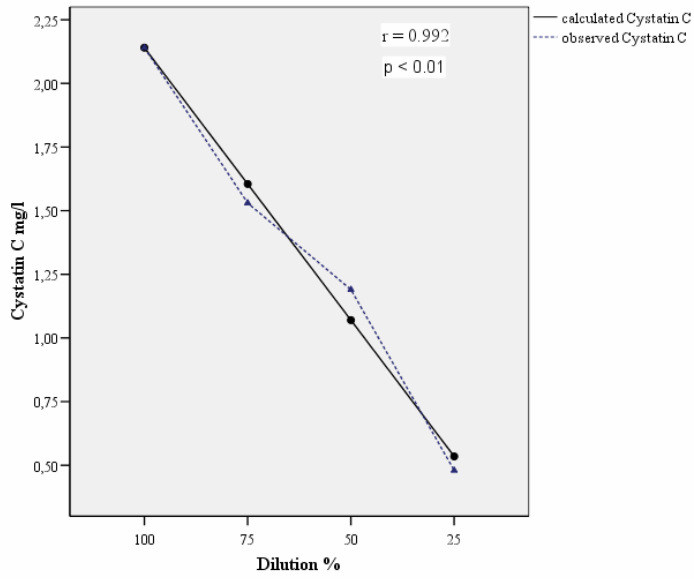


Figure 1b

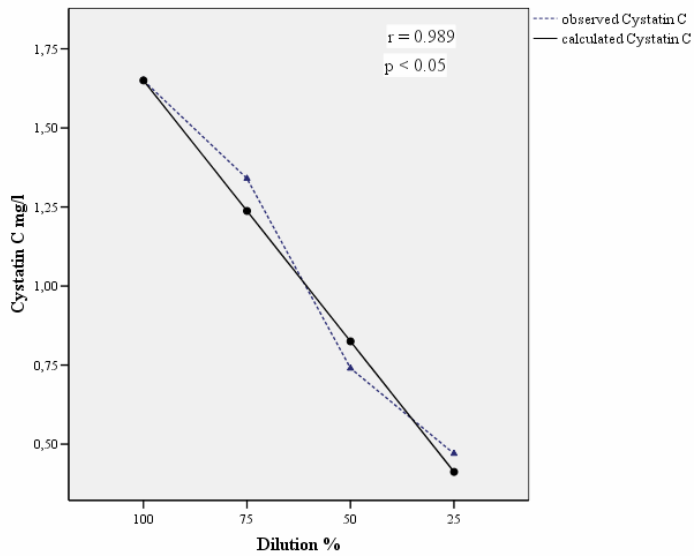


Figure 2

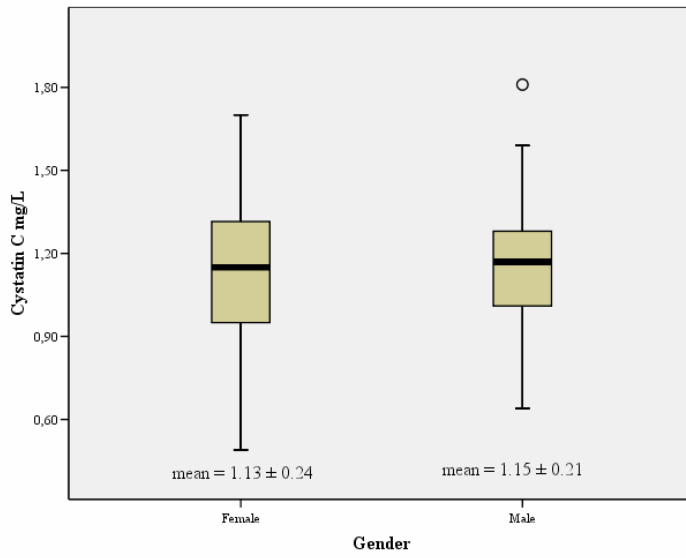


Figure 3a

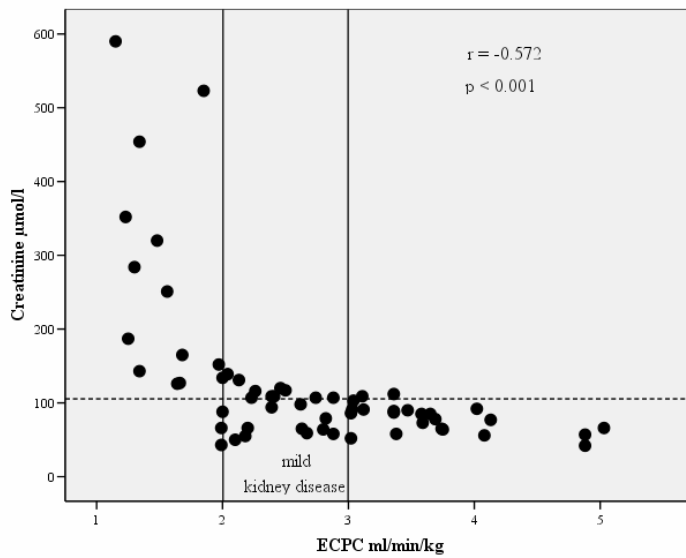


Figure 3b

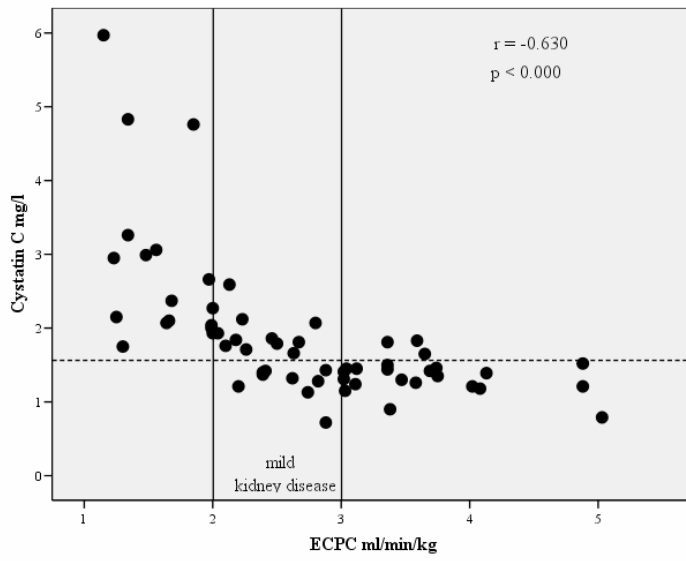


Figure 4

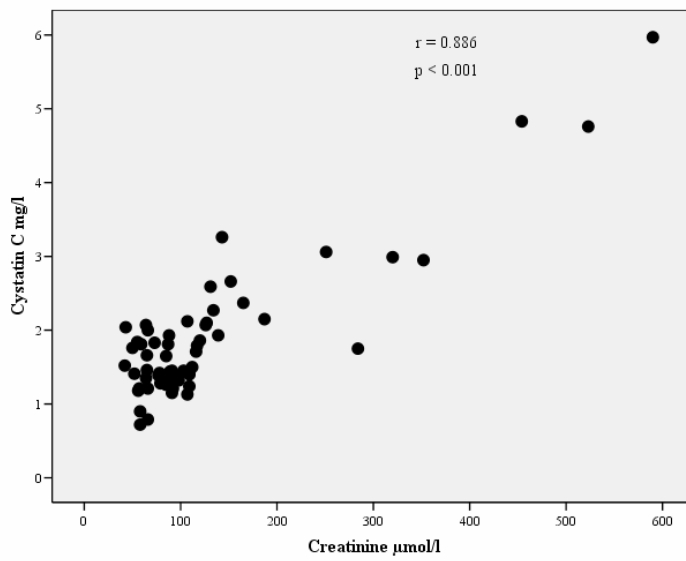


Figure 5a

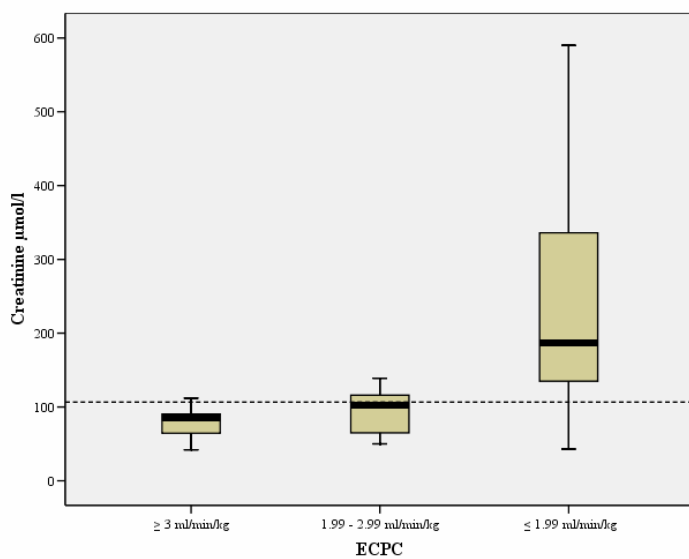


Figure 5b

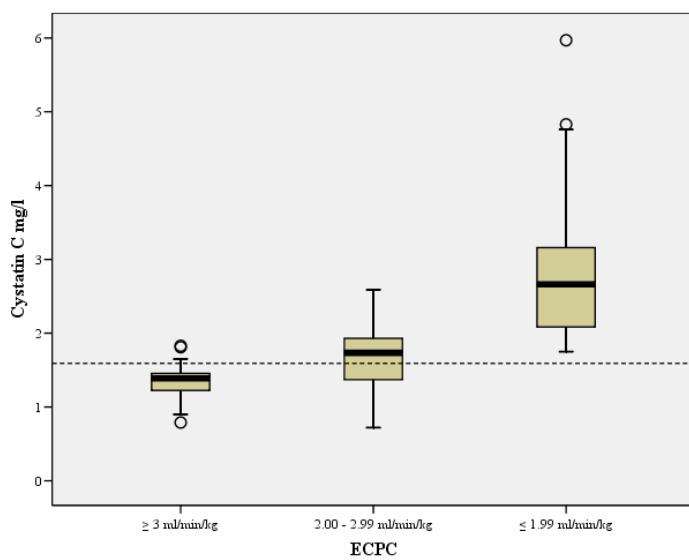


Figure 6

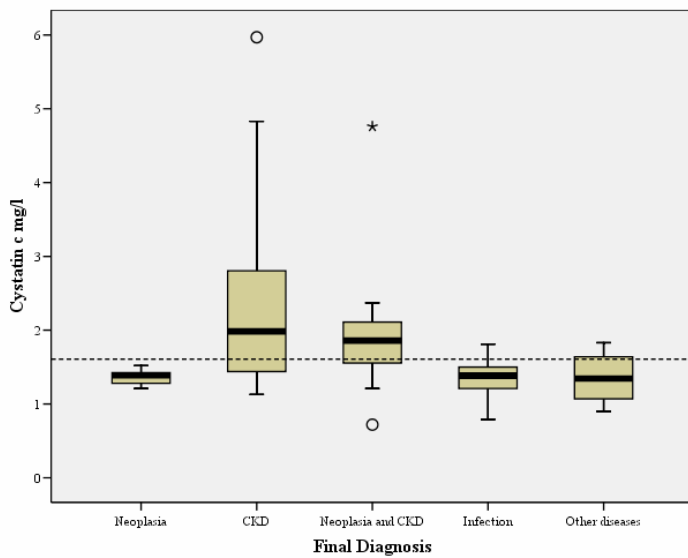
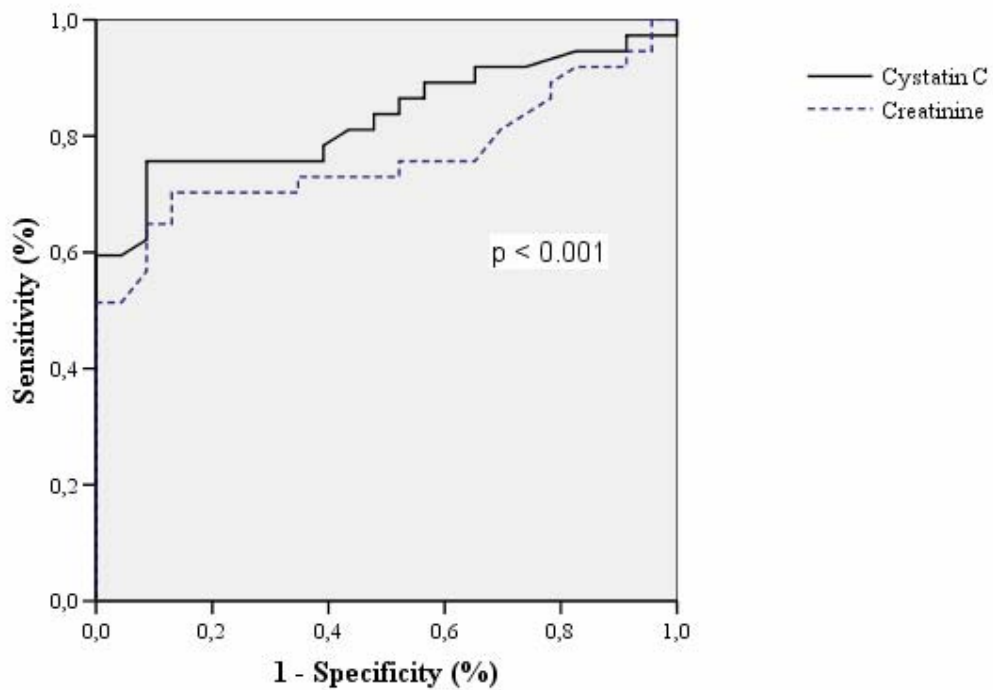


Figure 7



12. Acknowledgement

The author would like to thank Drs. Michael D. Willard and George E. Less for their contribution to the manuscript.

13. Letter of Acceptance



12575 W. Bayaud Ave.
Lakewood, Colorado USA 80228

Mailing Address: PO Box 150899
Denver, Colorado USA 80215-0899

303/986-2800 800/252-2242

Fax: 303/986-1700

www.aahanet.org

May 25, 2007

Astrid Wehner, DVM
Faculty of Veterinary Medicine
Ludwig Maximilians University Munich
Department for Small Animal Internal Medicine
Veterinaerstrasse 13
Munich 80539
GERMANY

Dear Dr. Wehner,

I am pleased to inform you that your paper titled "Utility of Serum Cystatin C as a Clinical Measure of Canine Renal Function" has completed the review process and is proceeding to an initial edit. It has been accepted for publication in the *Journal of the American Animal Hospital Association*, provided you review the forthcoming edit and respond to any remaining queries. Your paper was accepted for publication on May 22, 2007.

The editing will take several weeks. When it is complete, I will email the edited version of your manuscript with notes on the tables and figures, if relevant. You will review the manuscript and answer the editor's queries.

Although the editorial calendar has not been finalized, we expect your article to appear within the next twelve months or six issues of JAAHA. I will provide a specific publication date and manuscript proofs in later email correspondence (approximately 8 to

12 weeks prior to publication).

If any changes in your address, phone number, fax number, or email address occur, please be sure to log on to the peer-review website (<http://jaaha.editorialmanager.com>) and update your contact information.

Thank you for submitting to JAAHA. We appreciate the work you have done thus far and look forward to working through the final steps with you.

Sincerely,

Erin Sprague

Managing Editor

Journal of the American Animal Hospital Association

IV Diskussion

Nierenerkrankungen spielen beim Hund eine sehr wichtige Rolle. Die frühzeitige Diagnosestellung ist aber in vielen Fällen schwierig. Die Serum-Kreatinin-Konzentration steigt an, wenn die GFR abfällt. Zur Azotämie kommt es jedoch erst, wenn die GFR auf 25 % abfällt. Deshalb werden milde Einschränkungen der exkretorischen Nierenfunktion nicht erkannt, wenn nur Serum-Kreatinin als Screening-Test verwendet wird. Geringgradige Nierenerkrankungen können derzeit nur mit sehr zeitaufwendigen Clearance-Verfahren zuverlässig erfasst werden. Deshalb wird in der Humanmedizin die Eignung von endogenen niedermolekularen Proteinen zur Nierenfunktionsdiagnostik intensiv erforscht (GRUBB et al., 1985). Viele Studien konnten belegen, dass Serum-Cystatin-C eine bessere Sensitivität und negativen prädiktiven Wert hat, eine erniedrigte GFR beim Menschen zu erfassen als Serum-Kreatinin (HELIN et al., 1998; HERGET-ROSENTHAL et al., 2000; NITTA et al., 2002; CHRISTENSSON et al., 2003; WASEN et al., 2004).

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass ein particle-enhanced-turbidimetric-immunoassay aus der Humanmedizin zur Cystatin-C-Messung beim Hund geeignet ist. Der Test ist schnell, präzise und relativ preiswert. Die PETIA-Methode misst canines Cystatin C linear und proportional. Dies ist im Einklang mit anderen veterinärmedizinischen Studien (JENSEN et al., 2001; ALMY et al., 2002). Die exakte genetische Struktur des caninen Cystatin C ist noch unbekannt; es existiert jedoch ein hohes Maß an Homologie zwischen Mensch, Rind, Maus und Ratte. Eine genetische Teil-Sequenz, das sog. μ -Trace, ist zwischen Mensch und Hund sehr homolog (POULIK et al., 1981; SEKINE & POULIK, 1982; COLLE et al., 1984; HIRADO et al., 1985; ESNARD et al., 1988). Aufgrund dieser Homologie und der sehr guten Korrelation zur exkretorischen Nierenfunktion, kann davon ausgegangen werden, dass der PETIA zuverlässig canines Cystatin C misst. Da purifiziertes canines Cystatin C nicht erhältlich ist, war es im Rahmen dieser Studie nicht möglich, eine Wiederfindungsmessung durchzuführen, um die Validierung dieses Testsystems zu vervollständigen. Dies ist sicherlich eine Limitation der Studie. Der PETIA kann ohne Probleme auf den

meisten gängigen Analysegeräten einprogrammiert werden. Dadurch ist kein spezielles Equipment zur Durchführung des Tests nötig (DAKO, 2002). Bisher gibt es keine Veröffentlichungen in der Tiermedizin, die sich mit der Eignung der PENIA-Methode beschäftigen. Diese Testmethode ist in der Humanmedizin geeignet, Cystatin C zu messen (FINNEY et al., 1997). Allerdings hat sich auch hier der PETIA durchgesetzt.

Die Ergebnisse dieser Studie belegen, dass Serum-Cystatin-C stabil ist und tiefgefroren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ noch nach 365 Tagen akkurat gemessen werden kann. Dies ist auch für die Humanmedizin dokumentiert worden (ERLANDSEN et al., 1999). Hohe Konzentrationen an Proteinase-Inhibitoren wie $\alpha 2$ -Macroglobulin, $\alpha 1$ -Protease-Inhibitor, Kinogenen und natürlichen Konservierungsstoffen wie Transferrin tragen zu seiner Stabilität im Blut bei (GRUBB et al., 1985).

In dieser Studie ergab sich für Cystatin C ein Referenzbereich von 0,68 – 1,6 mg/l für den Hund. Dieser Bereich ist geringfügig höher als in anderen tier- oder humanmedizinischen Studien (BOKENKAMP et al., 1998a; FINNEY et al., 2000; JENSEN et al., 2001; ALMY et al., 2002; BRAUN et al., 2002). Geringe Variationen im Assay-Prinzip, der Reagenzien, im Programmieren des Analyse-Gerätes oder unterschiedlichen Analyse-Geräten können als Erklärung hierfür dienen. Sicherlich wäre es auch wünschenswert gewesen, bei der Population, die zur Etablierung der Referenzwerte herangezogen wurde, eine GFR-Messung durchzuführen, um sicherzustellen, dass diese Hunde eine normale exkretorische Nierenfunktion haben. Da es sich jedoch bei dieser Population um gesunde Hunde handelte, hätte ein Tierversuchsantrag bei der zuständigen Behörde gestellt werden müssen, um eine Clearance-Messung zu erlauben. Da Vorbericht, klinische Untersuchung und Labordiagnostik keine Auffälligkeiten gezeigt hatten, kann jedoch mit großer Sicherheit davon ausgegangen werden, dass diese Hunde nierengesund waren. Daher wurde auf eine gleichzeitige GFR-Bestimmung verzichtet. Da konventionelle Richtlinien zur Berechnung des Referenzbereiches benutzt wurden, bei denen 2,5 % der höchsten und niedrigsten Werte ausgeschlossen werden, verringert sich die Wahrscheinlichkeit zusätzlich,

nierenkranke Tiere in den Referenzbereich einzuschließen. Cystatin C ist laut unseren Ergebnissen unbeeinflusst von Alter, Körpergewicht und Geschlecht; daher ergibt sich keine Notwendigkeit, alters-, gewicht- oder geschlechtsabhängige Referenzwerte zu etablieren. In humanmedizinischen Studien wurde ebenfalls erwiesen, dass Cystatin C gewichts- und geschlechtsunabhängig ist. Eine geringgradige Altersabhängigkeit wurde bei Patienten über 50 Jahren festgestellt, bei denen höhere Serumkonzentrationen gemessen wurden. Dies ist wahrscheinlich durch den bekannten altersabhängigen Abfall der GFR begründet (NORLUND et al., 1997; BOKENKAMP et al., 1998b; CIMERMAN et al., 2000). Eine tiermedizinische Studie konnte einen gewissen gewichts- und geschlechtsabhängigen Anstieg von Cystatin C nachweisen (BRAUN et al., 2002). Die Unterschiede zwischen der von Braun und Mitarbeiter durchgeführten und dieser Studie könnten dadurch begründet werden, dass etwas ältere und schwere Hunde in der Studie von Braun und Mitarbeiter verwendet wurden. Insgesamt waren die alters- und gewichtsabhängigen Veränderungen jedoch geringfügig. Aufgrund dieser Ergebnisse kann also nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass es bei Hunden, die älter als 13 Jahre und schwerer als 42 kg sind, zu einem gewissen Anstieg der Serum-Cystatin-C-Konzentration kommen kann. In dieser Studie wurde eine sehr geringe intra-individuelle Variation für Cystatin C festgestellt; daher besteht keine Notwendigkeit, eine Blutprobe zu einem bestimmten Zeitpunkt anzufordern. Geringe intra-individuelle Schwankungen sind vorteilhaft für Verlaufskontrollen der Nierenfunktion, da geringgradige Veränderungen schnell erfasst werden.

In Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss von Nahrungsaufnahme nicht untersucht. Es ist bekannt, dass die GFR nach Proteinaufnahme signifikant steigt (BROWN & FINCO, 1992). In einer Studie aus der Humanmedizin wurde postprandial kein Anstieg von Cystatin C festgestellt (CIMERMAN et al., 2000). Beim Hund konnte aber ein signifikanter Anstieg nach Fütterung beobachtet werden (BRAUN et al., 2002). Dieser Unterschied kann durch unterschiedliche Proteinkonzentrationen in menschlichem Essen und Hundefutter erklärt werden. Sicherlich sind hier mehr Studien nötig, die den Einfluss von Nahrungsaufnahme

auf die Serum-Cystatin-C-Konzentration untersuchen.

In dieser Studie korrelierten Cystatin C und Serum-Kreatinin negativ mit der exogenen Kreatinin-Plasma-Clearance. Eine negative Korrelation ist zu erwarten, da eine Erniedrigung der GFR eine reduzierte glomeruläre Filtration von Cystatin C und Kreatinin zur Folge hat, was in einem Anstieg von deren Serumkonzentrationen deutlich wird. Serum-Cystatin-C korrelierte besser ($r = -0,630$; $p < 0,001$) mit der exogenen Kreatinin-Plasma-Clearance als Serum-Kreatinin ($r = -0,572$; $p < 0,001$). Dieses Ergebnis belegt, dass Cystatin C beim Hund der sensitivere Test zur Erfassung einer reduzierten GFR ist. Hunde mit einer beginnenden Nierenerkrankung haben eher eine erhöhte Serum-Cystatin-C-Konzentration als ein erhöhtes Serum-Kreatinin. Die Sensitivität von Serum-Cystatin-C, eine reduzierte GFR zu entdecken, betrug 76 % und war damit 11 % höher als die von Serum-Kreatinin. Obwohl eine Sensitivität von mindestens 80 % oder 90 % wünschenswert wäre, gibt es momentan keinen besseren Test, um eine frühe Nierenerkrankung zu erkennen, der lediglich aus einer Blutprobenentnahme besteht. Der höhere negative prädiktive Wert von Serum-Cystatin-C (69 %) im Vergleich zu dem von Serum-Kreatinin (62 %) gibt weniger falsch negative Ergebnisse und trägt dazu bei, ihn zu einem besseren Screening-Test zur Diagnose einer Nierenerkrankung zu machen. Dadurch, dass Serum-Kreatinin jedoch eine geringfügig höhere Spezifität (91 %) als Serum-Cystatin-C (87 %) besitzt, sollte Kreatinin nicht durch Cystatin C ersetzt werden, wenn eine Nierenerkrankung ausgeschlossen werden sollte. Die Kombination beider Tests bringt eine bessere Genauigkeit, eine Nierenerkrankung zu diagnostizieren oder auszuschließen. Da die Spezifität für beide Parameter jedoch relativ ähnlich ist, sind mehr Studien nötig, die untersuchen, ob Serum-Kreatinin wirklich die höhere Spezifität als Serum-Cystatin-C besitzt.

Unsere Studie belegte, dass Serum-Cystatin-C unbeeinflusst ist von Neoplasien oder Infektionen. Obwohl Proteasen und Proteasen-Inhibitoren in entzündlichen Reaktion und in der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt sind, haben auch Studien in der Humanmedizin belegt, dass die Cystatin-C-Serum-Konzentration

dadurch nicht verändert wird (LAH et al., 1992; RANDERS et al., 2001). Dies ist in Übereinstimmung mit den Resultaten dieser Studie. Da jedoch die Anzahl der Hunde mit Neoplasien und Infektionserkrankungen niedrig war, sind mehr Untersuchungen nötig, um den Einfluss dieser Erkrankungen auf die Serum-Cystatin-C-Konzentration zu untersuchen.

Die Patienten mit einer eingeschränkten Nierenfunktion litten alle unter einer chronischen Nierenerkrankung. Keiner der Patienten in dieser Studie war im akuten Nierenversagen. Zur Zeit gibt es keine tiermedizinischen Studien, die Cystatin C bei Patienten mit akutem Nierenversagen analysieren. Bei Menschen im akuten Nierenversagen, steigt Serum-Cystatin-C frühzeitiger als Serum-Kreatinin im Blut an und korreliert besser mit der GFR (COLL et al., 2000; HERGET-ROSENTHAL et al., 2004; VILLA et al., 2005). Hochgradiger Volumenmangel könnte unter Umständen den Zustand eines akuten Nierenversagens imitieren. Almy und Mitarbeiter konnten dokumentieren, dass bei Hunden, bei denen ein Volumenmangel mittels Furosemid-Injektionen herbeigeführt wurde, es zu keinem nennenswerten Serum-Cystatin-C-Anstieg kam, obwohl eine gleichzeitig durchgeführte GFR-Messung belegte, dass eine geringgradig reduzierte GFR vorlag (ALMY et al., 2002). Allerdings ist unbekannt, ob und ab welchem Schweregrad eine Verminderung des Blutvolumens tatsächlich die Situation einer akuten Niereninsuffizienz imitieren kann. Mehr Studien sind sicherlich nötig, um den Einfluss von akutem Nierenversagen, Dehydratation und postrenaler Azotämie auf die Serum-Cystatin-C-Konzentration zu untersuchen.

Cystatin C ist ebenso wenig wie Kreatinin geeignet, zwischen glomerulären und tubulären Erkrankungen zu unterscheiden. Eine Verminderung der glomerulären Filtrationsleistung führt zum Anstieg der Serum-Konzentration. Bei Menschen mit Erkrankungen des Tubulussystems kann es zu einem Anstieg der Cystatin-C-Urinkonzentration kommen. Durch seine Instabilität im Urin ist Cystatin C aber als Indikator für Erkrankungen des Tubulussystems unbrauchbar (LOFBERG & GRUBB, 1979). Auch ergab sich kein Unterschied bei Menschen mit

glomerulärem oder tubulärem Schaden hinsichtlich der Sensitivität oder dem negativen prädiktiven Wert von Serum-Cystatin-C, so dass schlussgefolgert werden kann, dass Cystatin C weder von glomerulären noch von tubulären Erkrankungen beeinflusst wird (HERGET-ROSENTHAL et al., 2000).

Der Preis für eine Cystatin C-Messung hängt stark davon ab, wie intensiv die Nachfrage ist. Die Kosten für ein Testkit betragen ca. 400 Euro. Es können bis zu 80 Serumproben pro Kit gemessen werden, was einen Nettopreis von 5 Euro bedingt. Nach Kalibration kann für 48 h gemessen werden (DAKO, 2002). Die Bestimmung von Serum-Kreatinin kann für deutlich unter 5 Euro durchgeführt werden. Der höhere Preis wird sicherlich dazu führen, dass in der Routinediagnostik noch größtenteils auf Cystatin C verzichtet wird.

Das Etablieren von gewichts- oder rassespezifischen Referenzbereichen für Serum-Kreatinin könnte eine Möglichkeit darstellen, die Sensitivität des preiswerten Markers Serum-Kreatinin zu verbessern. Weitere Studien sind nötig, die darüber Klarheit bringen, ob damit eine höhere Sensitivität von Serum-Kreatinin erzielt werden kann.

V. Zusammenfassung

Cystatin C als klinischer Parameter zur Erfassung der Nierenfunktion beim Hund

Endogene niedermolekulare Proteine könnten einen praktischen Weg darstellen, frühzeitig und einfach eine Nierenerkrankung zu diagnostizieren. Ein humanmedizinisches Testkit wurde zur Serum-Cystatin-C-Bestimmung beim Hund validiert und ein Referenzbereich wurde etabliert. Canines Cystatin C kann zuverlässig mit der PETIA-Methode gemessen werden. Cystatin C ist unabhängig von Alter, Körpergewicht und Geschlecht. Um die Korrelation von Cystatin C zur glomerulären Filtrationsrate (GFR) zu bestimmen, wurde eine exogene Kreatinin-Plasma-Clearance (ECPC) bei 60 Hunden mit verschiedenen Krankheiten durchgeführt. Cystatin C korrelierte besser mit der ECPC ($r = -0,630$; $p < 0,001$) als Serum-Kreatinin ($r = -0,572$; $p < 0,001$). Nicht-renale Krankheiten (z. B. Neoplasien, Infektionen) beeinflussten die Cystatin-C-Serumkonzentration nicht. Cystatin C hat eine höhere Sensitivität (76 % bzw. 65 %; $p < 0,001$) und einen höheren negativen prädiktiven Wert (69 % bzw. 62 %) eine reduzierte GFR zu erkennen als Serum-Kreatinin. Dadurch ist Cystatin C der geeignetere Screening-Test zur Diagnose einer frühen Nierenerkrankung beim Hund. Aufgrund der höheren Spezifität von Serum-Kreatinin über Serum-Cystatin C (91 % bzw. 87 %; $p < 0,001$) sollten beide Parameter gleichzeitig verwendet werden, um die Genauigkeit zu verbessern, eine Einschränkung der exkretorischen Nierenfunktion zu erfassen oder auszuschließen. Serum-Cystatin C ist unbeeinflusst von neoplastischen oder infektiösen Erkrankungen.

VI Summary

Utility of serum cystatin as a clinical measure of canine renal function

Endogenous, low molecular weight proteins could serve as a practicle way to rapidly detect early kidney disease. A human kit for cystatin c determination was evaluated for the use in canine sera and a reference range was established. Canine cystatin c can be reliably measured with the PETIA method. Cystatin c is independent of age, body weight and gender. To determine the correlation of cystatin c with glomerular filtration rate (GFR), an exogenous creatinine plasma clearance (ECPC) was performed in 60 dogs with various diseases. Cystatin c was better correlated with ECPC ($r = -0.630$; $p < 0.001$) than serum creatinine ($r = -0.572$; $p < 0.001$). Non-renal diseases (e.g. neoplasia, infection) did not influence serum cystatin c concentrations. Cystatin c has a higher sensitivity (76% and 65%; $p < 0,001$, respectively) and negative predictive value (69% bzw. 62%, respectively) than serum creatinine. Therefore is cystatin c the better screening test to diagnose early canine kidney disease. Because of the slightly better specificity of serum creatinine over serum cystatin c (91% and 87%; $p < 0,001$, respectively) both tests should be used simultaneously to enhance the accuracy of diagnosing or excluding canine renal excretory dysfunction. Serum cystatin c was not influenced by neoplastic or infectious diseases.

VII Literaturverzeichnis

1. Abrahamson M, Grubb A, Olafsson I, Lundwall A. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA coding for the precursor of the human cysteine proteinase inhibitor cystatin C. *FEBS Lett* 1987;216(2): 229-33.
2. Abrahamson M, Olafsson I, Palsdottir A, et al. Structure and expression of the human cystatin C gene. *Biochem J* 1990;268(2): 287-94.
3. Almy FS, Christopher MM, King DP, Brown SA. Evaluation of cystatin C as an endogenous marker of glomerular filtration rate in dogs. *J Vet Intern Med* 2002;16(1): 45-51.
4. Barrett AJ, Davies ME, Grubb A. The place of human gamma-trace (cystatin C) amongst the cysteine proteinase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;120(2): 631-6.
5. Barthez PY, Chew DJ, DiBartola SP. Effect of sample number and time on determination of plasma clearance of technetium Tc 99m pentetate and orthoiodohippurate sodium I 131 in dogs and cats. *Am J Vet Res* 2000;61(3): 280-5.
6. Barthez PY, Hornof WJ, Cowgill LD, et al. Comparison between the scintigraphic uptake and plasma clearance of 99mTc-diethylenetriaminepentacetic acid (DTPA) for the evaluation of the glomerular filtration rate in dogs. *Vet Radiol Ultrasound* 1998;39(5): 470-4.
7. Barthez PY, Smeak DD, Wisner ER, et al. Effect of partial ureteral obstruction on results of renal scintigraphy in dogs. *Am J Vet Res* 1999;60(11): 1383-9.
8. Bjarnadottir M, Grubb A, Olafsson I. Promoter-mediated, dexamethasone-induced increase in cystatin C production by HeLa cells. *Scand J Clin Lab Invest* 1995;55(7): 617-23.
9. Bjorck L, Grubb A, Kjellen L. Cystatin C, a human proteinase inhibitor, blocks replication of herpes simplex virus. *J Virol* 1990;64(2): 941-3.
10. Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, et al. Reference values for cystatin C serum concentrations in children. *Pediatr Nephrol* 1998a;12(2):

- 125-9.
11. Bokenkamp A, Domanetzki M, Zinck R, et al. Cystatin C--a new marker of glomerular filtration rate in children independent of age and height. *Pediatrics* 1998b;101(5): 875-81.
 12. Braun JP, Lefebvre HP, Watson AD. Creatinine in the dog: a review. *Vet Clin Pathol* 2003;32(4): 162-79.
 13. Braun JP, Perxachs A, Pechereau D, De La Farge F. Plasma Cystatin C in the dog: reference values and variations with renal failure. *Vet Clin Path* 2002;11: 44-49.
 14. Brown SA. Evaluation of a single-injection method for estimating glomerular filtration rate in dogs with reduced renal function. *Am J Vet Res* 1994;55(10): 1470-3.
 15. Brown SA, Finco DR. Characterization of the renal response to protein ingestion in dogs with experimentally induced renal failure. *Am J Vet Res* 1992;53(4): 569-73.
 16. Brown SA, Finco DR, Boudinot FD, et al. Evaluation of a single injection method, using iohexol, for estimating glomerular filtration rate in cats and dogs. *Am J Vet Res* 1996;57(1): 105-10.
 17. Brzin J, Popovic T, Turk V, et al. Human cystatin, a new protein inhibitor of cysteine proteinases. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;118(1): 103-9.
 18. Butler EA, Flynn FV. The occurrence of post-gamma protein in urine: a new protein abnormality. *J Clin Pathol* 1961;14: 172-8.
 19. Chapman HA, Jr., Reilly JJ, Jr., Yee R, Grubb A. Identification of cystatin C, a cysteine proteinase inhibitor, as a major secretory product of human alveolar macrophages in vitro. *Am Rev Respir Dis* 1990;141(3): 698-705.
 20. Christensson A, Ekberg J, Grubb A, et al. Serum cystatin C is a more sensitive and more accurate marker of glomerular filtration rate than enzymatic measurements of creatinine in renal transplantation. *Nephron Physiol* 2003;94(2): p19-27.
 21. Cimerman N, Brguljan PM, Krasovec M, et al. Twenty-four hour variations of cystatin C and total cysteine proteinase inhibitory activity in

- sera from healthy subjects. *Clin Chim Acta* 2000;291(1): 89-95.
22. Clausen J. Proteins in normal cerebrospinal fluid not found in serum. *Proc Soc Exp Biol Med* 1961;107: 170-2.
 23. Coll E, Botey A, Alvarez L, et al. Serum cystatin C as a new marker for noninvasive estimation of glomerular filtration rate and as a marker for early renal impairment. *Am J Kidney Dis* 2000;36(1): 29-34.
 24. Colle A, Tavera C, Prevot D, et al. Cystatin C levels in sera of patients with human immunodeficiency virus infection. A new avidin-biotin ELISA assay for its measurement. *J Immunoassay* 1992;13(1): 47-60.
 25. Colle A, Tonnelle C, Jarry T, et al. Isolation and characterization of post gamma globulin in mouse. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;122(1): 111-5.
 26. Collins AR, Grubb A. Inhibitory effects of recombinant human cystatin C on human coronaviruses. *Antimicrob Agents Chemother* 1991;35(11): 2444-6.
 27. Cowgill LD, Francey T. Acute uremia. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis: Saunders Elsevier 2005: 1731-51.
 28. Dako. DAKO Cystatin C Pet Kit. In. Fourth Edition ed. Glostrup: Dako A/S; 2002.
 29. Davies DF, Shock NW. Age changes in glomerular filtration rate, effective renal plasma flow, and tubular excretory capacity in adult males. *J Clin Invest* 1950;29(5): 496-507.
 30. DiBartola SP. Renal disease: clinical approach and laboratory evaluation. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis: Saunders Elsevier 2005: 1716-30.
 31. Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH. Reference intervals for serum cystatin C and serum creatinine in adults. *Clin Chem Lab Med* 1998;36(6): 393-7.
 32. Erlandsen EJ, Randers E, Kristensen JH. Evaluation of the Dade Behring N Latex Cystatin C assay on the Dade Behring Nephelometer II System. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(1): 1-8.

33. Esnard A, Esnard F, Faucher D, Gauthier F. Two rat homologues of human cystatin C. *FEBS Lett* 1988;236(2): 475-8.
34. Finco DR, Braselton WE, Cooper TA. Relationship between plasma iohexol clearance and urinary exogenous creatinine clearance in dogs. *J Vet Intern Med* 2001;15(4): 368-73.
35. Finco DR, Brown SA, Crowell WA, Barsanti JA. Exogenous creatinine clearance as a measure of glomerular filtration rate in dogs with reduced renal mass. *Am J Vet Res* 1991;52(7): 1029-32.
36. Finco DR, Tabaru H, Brown SA, Barsanti JA. Endogenous creatinine clearance measurement of glomerular filtration rate in dogs. *Am J Vet Res* 1993;54(10): 1575-8.
37. Finney H, Newman DJ, Gruber W, et al. Initial evaluation of cystatin C measurement by particle-enhanced immunonephelometry on the Behring nephelometer systems (BNA, BN II). *Clin Chem* 1997;43(6 Pt 1): 1016-22.
38. Finney H, Newman DJ, Price CP. Adult reference ranges for serum cystatin C, creatinine and predicted creatinine clearance. *Ann Clin Biochem* 2000;37 (Pt 1): 49-59.
39. Ghiso J, Jansson O, Frangione B. Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (cystatin C). *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986;83(9): 2974-8.
40. Grubb A. Diagnostic value of analysis of cystatin C and protein HC in biological fluids. *Clin Nephrol* 1992;38 Suppl 1: S20-7.
41. Grubb A, Jansson O, Gudmundsson G, et al. Abnormal metabolism of gamma-trace alkaline microprotein. The basic defect in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *N Engl J Med* 1984;311(24): 1547-9.
42. Grubb A, Lofberg H. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1982;79(9): 3024-7.
43. Grubb A, Lofberg H. Human gamma-trace. Structure, function and clinical use of concentration measurements. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1985;177: 7-13.

44. Grubb A, Simonsen O, Sturfelt G, et al. Serum concentration of cystatin C, factor D and beta 2-microglobulin as a measure of glomerular filtration rate. *Acta Med Scand* 1985;218(5): 499-503.
45. Grubb AO, Weiber H, Lofberg H. The gamma-trace concentration of normal human seminal plasma is thirty-six times that of normal human blood plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 1983;43(5): 421-5.
46. Guyton AC, Hall JE. Integration of renal mechanism for control of blood volume and extracellular fluid volume; and renal regulation of potassium, calcium, phosphate, and magnesium. In: *Textbook of Medical Physiology*. Guyton AC, Hall JE, eds. Philadelphia: Saunders Elsevier 2000a: 329-45.
47. Guyton AC, Hall JE. Regulation of acid-base balance. In: *Textbook of Medical Physiology*. Guyton AC, Hall JE, eds. Philadelphia: Saunders Elsevier 2000b: 346-63.
48. Guyton AC, Hall JE. Regulation of extracellular fluid osmolarity and sodium concentration. In: *Textbook of Medical Physiology*. Guyton AC, Hall JE, eds. Philadelphia: Saunders Elsevier 2000c: 313-28.
49. Guyton AC, Hall JE. Urine formation by the kidneys: I. glomerular filtration, renal blood flow, and their control. In: *Textbook of Medical Physiology*. Guyton AC, Hall JE, eds. Philadelphia: Saunders Elsevier 2000d: 279-93.
50. Hall A, Hakansson K, Mason RW, et al. Structural basis for the biological specificity of cystatin C. Identification of leucine 9 in the N-terminal binding region as a selectivity-conferring residue in the inhibition of mammalian cysteine peptidases. *J Biol Chem* 1995;270(10): 5115-21.
51. Heiene R, Moe L. Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog: a review. *J Vet Intern Med* 1998;12(6): 401-14.
52. Heiene R, Moe L. The relationship between some plasma clearance methods for estimation of glomerular filtration rate in dogs with pyometra. *J Vet Intern Med* 1999;13(6): 587-96.
53. Helin I, Axenram M, Grubb A. Serum cystatin C as a determinant of glomerular filtration rate in children. *Clin Nephrol* 1998;49(4): 221-5.
54. Herget-Rosenthal S, Marggraf G, Husing J, et al. Early detection of acute

- renal failure by serum cystatin C. *Kidney Int* 2004;66(3): 1115-22.
55. Herget-Rosenthal S, Trabold S, Pietruck F, et al. Cystatin C: efficacy as screening test for reduced glomerular filtration rate. *Am J Nephrol* 2000;20(2): 97-102.
56. Hirado M, Tsunasawa S, Sakiyama F, et al. Complete amino acid sequence of bovine colostrum low-Mr cysteine proteinase inhibitor. *FEBS Lett* 1985;186(1): 41-5.
57. Hochwald GM, Thorbecke GJ. Use of an antiserum against cerebrospinal fluid in demonstration of trace proteins in biological fluids. *Proc Soc Exp Biol Med* 1962;109: 91-5.
58. Jensen AL, Bomholt M, Moe L. Preliminary evaluation of a particle-enhanced turbidimetric immunoassay (PETIA) for the determination of serum cystatin C-like immunoreactivity in dogs. *Vet Clin Pathol* 2001;30(2): 86-90.
59. Joronen I, Hopsu-Havu VK, Manninen M, et al. Detection of low molecular weight cysteine proteinase inhibitors by time-resolved fluoroimmunoassay. *J Immunol Methods* 1986;86(2): 243-7.
60. Keevil BG, Kilpatrick ES, Nichols SP, Maylor PW. Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate. *Clin Chem* 1998;44(7): 1535-9.
61. Kerl ME, Cook CR. Glomerular filtration rate and renal scintigraphy. *Clin Tech Small Anim Pract* 2005;20(1): 31-8.
62. Korant BD, Brzin J, Turk V. Cystatin, a protein inhibitor of cysteine proteases alters viral protein cleavages in infected human cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1985;127(3): 1072-6.
63. Kos J, Nielsen HJ, Krasovec M, et al. Prognostic values of cathepsin B and carcinoembryonic antigen in sera of patients with colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1998;4(6): 1511-6.
64. Kos J, Stabuc B, Schweiger A, et al. Cathepsins B, H, and L and their inhibitors stefin A and cystatin C in sera of melanoma patients. *Clin Cancer Res* 1997;3(10): 1815-22.
65. Kyhse-Andersen J, Schmidt C, Nordin G, et al. Serum cystatin C,

- determined by a rapid, automated particle-enhanced turbidimetric method, is a better marker than serum creatinine for glomerular filtration rate. *Clin Chem* 1994;40(10): 1921-6.
66. Labato MA, Ross LA. Plasma disappearance of creatinine as a renal function test in the dog. *Res Vet Sci* 1991;50(3): 253-8.
67. Lah TT, Kokalj-Kunovar M, Strukelj B, et al. Stefins and lysosomal cathepsins B, L and D in human breast carcinoma. *Int J Cancer* 1992;50(1): 36-44.
68. Lofberg H, Grubb AO. Quantitation of gamma-trace in human biological fluids: indications for production in the central nervous system. *Scand J Clin Lab Invest* 1979;39(7): 619-26.
69. Moe L, Heiene R. Estimation of glomerular filtration rate in dogs with ^{99m}Tc-DTPA and iohexol. *Res Vet Sci* 1995;58(2): 138-43.
70. Mussap M, Ruzzante N, Varagnolo M, Plebani M. Quantitative automated particle-enhanced immunonephelometric assay for the routinary measurement of human cystatin C. *Clin Chem Lab Med* 1998;36(11): 859-65.
71. Newman D. More on cystatin C. *Clin Chem* 1999;45(5): 718-9.
72. Newman DJ, Thakkar H, Edwards RG, et al. Serum cystatin C measured by automated immunoassay: a more sensitive marker of changes in GFR than serum creatinine. *Kidney Int* 1995;47(1): 312-8.
73. Nitta K, Hayashi T, Uchida K, et al. Serum cystatin C concentration as a marker of glomerular filtration rate in patients with various renal diseases. *Intern Med* 2002;41(11): 931-5.
74. Norlund L, Fex G, Lanke J, et al. Reference intervals for the glomerular filtration rate and cell-proliferation markers: serum cystatin C and serum beta 2-microglobulin/cystatin C-ratio. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57(6): 463-70.
75. O'Connor WJ, Summerill RA. The effect of a meal of meat on glomerular filtration rate in dogs at normal urine flows. *J Physiol* 1976;256(1): 81-91.
76. Pechereau D, Perxachs A, De La Farge F, Braun JP. Circadian variations of plasma cystatin c in the dog. In: *ECVIM-CA Congress 2000; 2000*;

- Neuchatel, Switzerland; 2000. p. 121.
77. Pergande M, Jung K. Sandwich enzyme immunoassay of cystatin C in serum with commercially available antibodies. *Clin Chem* 1993;39(9): 1885-90.
78. Perrone RD, Madias NE, Levey AS. Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts. *Clin Chem* 1992;38(10): 1933-53.
79. Plebani M, Dall'Amico R, Mussap M, et al. Is serum cystatin C a sensitive marker of glomerular filtration rate (GFR)? A preliminary study on renal transplant patients. *Ren Fail* 1998;20(2): 303-9.
80. Polzin DJ, Osborne CA, Ross S. Chronic kidney disease. In: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Ettinger SJ, Feldman EC, eds. St. Louis: Saunders Elsevier 2005: 1756-85.
81. Poulik MD, Perry DJ, Vokac E, Sekine T. Post-gamma globulin. II. Radioimmunoassay determination of levels of post-gamma globulin and beta 2-microglobulin. *Clin Chim Acta* 1983;128(2-3): 249-60.
82. Poulik MD, Shinnick CS, Smithies O. Partial amino acid sequences of human and dog post-gamma globulins. *Mol Immunol* 1981;18(6): 569-72.
83. Randers E, Kornerup K, Erlandsen EJ, et al. Cystatin C levels in sera of patients with acute infectious diseases with high C-reactive protein levels. *Scand J Clin Lab Invest* 2001;61(4): 333-5.
84. Randers E, Kristensen JH, Erlandsen EJ, Danielsen H. Serum cystatin C as a marker of the renal function. *Scand J Clin Lab Invest* 1998;58(7): 585-92.
85. Sekine T, Poulik MD. Post-gamma globulin : tissue distribution and physicochemical characteristics of dog post-gamma globulin. *Clin Chim Acta* 1982;120(2): 225-35.
86. Shimode K, Fujihara S, Nakamura M, et al. Diagnosis of cerebral amyloid angiopathy by enzyme-linked immunosorbent assay of cystatin C in cerebrospinal fluid. *Stroke* 1991;22(7): 860-6.
87. Simonsen O, Grubb A, Thysell H. The blood serum concentration of cystatin C (gamma-trace) as a measure of the glomerular filtration rate.

- Scand J Clin Lab Invest 1985;45(2): 97-101.
88. Sloane BF. Suicidal tumor proteases. *Nat Biotechnol* 1996;14(7): 826-7.
89. Solem M, Rawson C, Lindburg K, Barnes D. Transforming growth factor beta regulates cystatin C in serum-free mouse embryo (SFME) cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990;172(2): 945-51.
90. Swan SK. The search continues--an ideal marker of GFR. *Clin Chem* 1997;43(6 Pt 1): 913-4.
91. Tabaru H, Finco DR, Brown SA, Cooper T. Influence of hydration state on renal functions of dogs. *Am J Vet Res* 1993;54(10): 1758-64.
92. Tenstad O, Roald AB, Grubb A, Aukland K. Renal handling of radiolabelled human cystatin C in the rat. *Scand J Clin Lab Invest* 1996;56(5): 409-14.
93. Turk V, Bode W. The cystatins: protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991;285(2): 213-9.
94. Villa P, Jimenez M, Soriano MC, et al. Serum cystatin C concentration as a marker of acute renal dysfunction in critically ill patients. *Crit Care* 2005;9(2): R139-43.
95. Vollmerhaus B. Harn- und Geschlechtsapparat. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Eingeweide*. Nickel R, Schummer A, Seiferle E, eds. Stuttgart: Parey Verlag 2004: 300-368.
96. Waibl H, Wilkens H. Arterien, Arteriae. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane*. Nickel R, Schummer A, Seiferle E, eds. Stuttgart: Parey Verlag 2004a: 76-183.
97. Waibl H, Wilkens H. Venen, Venae. In: *Lehrbuch der Anatomie der Haustiere: Kreislaufsystem, Haut und Hautorgane*. Nickel R, Schummer A, Seiferle E, eds. Stuttgart: Parey Verlag 2004b: 190-273.
98. Warfel AH, Zucker-Franklin D, Frangione B, Ghiso J. Constitutive secretion of cystatin C (gamma-trace) by monocytes and macrophages and its downregulation after stimulation. *J Exp Med* 1987;166(6): 1912-7.
99. Wasen E, Isoaho R, Mattila K, et al. Estimation of glomerular filtration rate in the elderly: a comparison of creatinine-based formulae with serum cystatin C. *J Intern Med* 2004;256(1): 70-8.

100. Watson AD, Lefebvre HP, Concordet D, et al. Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *J Vet Intern Med* 2002;16(1): 22-33.

VIII Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht über verschiedene Clearance Methoden	18
Tab. 2: Referenzwerte für verschieden Clearance-Methoden	19
Abb. 1: Aminosäuresequenz von Cystatin C	22

Abbildungen und Tabellen in der Publikation

Tab. 1: Intra- and inter-assay variability for the cystatin c PET kit	55
Fig. 1a: Linearity of the cystatin c PET kit (pool with high concentrations)	56
Fig. 1b: Linearity of the cystatin c PET kit (pool with low concentrations)	56
Fig. 2: Cystatin c concentration of 99 clinically normal dogs	57
Fig. 3a: Correlation between serum creatinine and ECPC in 60 dogs	57
Fig. 3b: Correlation between serum cystatin c and ECPC in 60 dogs	58
Fig. 4: Correlation between serum creatinine and serum cystatin c	58
Fig. 5a: Serum creatinine concentration in 60 dogs according to their renal function as defined by ECPC	59
Fig. 5b: Serum cystatin c concentration in 60 dogs according to their renal function as defined by ECPC	59
Fig. 6: Serum cystatin c concentrations in different disease groups	60
Fig. 7: Sensitivity and specificity of serum cystatin c and creatinine	60

IX Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Wilfried Kraft und bei Frau Prof. Dr. Katrin Hartmann bedanken, die mir die Möglichkeit zur Promotion an der Medizinischen Kleintierklinik gegeben und mir alle erforderlichen Mittel zur Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung gestellt haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Johannes Hirschberger, der mich über die Jahre meiner Doktorarbeit und anschließenden Residency fachlich und menschlich betreut hat. Ich danke ihm für seine unermüdlichen Korrekturen und Verbesserungsvorschläge an der Publikation, der gesamten Dissertation und an der Vielzahl der mit der Publikation in Verbindung gestandenen Abstracts und Vorträgen. Ohne seine Unterstützung und Hilfe hätte diese Arbeit nicht erstellt werden können.

Ich möchte allen Mitarbeitern des Labors der Medizinischen Kleintierklinik für ihre technische Unterstützung danken. Den Pflegern und Auszubildenden der Medizinischen Kleintierklinik danke ich für das fachlich kompetente Versorgen und Fixieren der Patienten während der Untersuchungen. Allen Besitzern danke ich für das mir entgegengebrachte Vertrauen. Natürlich möchte ich auch allen Hunden, die an dieser Studie beteiligt waren, herzlich danken.

X Curriculum vitae

Astrid Carmen Christina Wehner
Wilderoosstraat 1
9000 Gent
Belgium
astridwehner@web.de

Geboren: 14. September 1974
Geburtsort: Darmstadt
Nationalität: deutsch

Schulausbildung:
1980 – 1984 Melibokus Grundschule, Zwingenberg
1990 – 1991 Perry High School, Perry, Michigan, USA
1984 – 1994 Altes Kurfürstliches Gymnasium, Bensheim
1994 Abitur

Studium:
1995 – 2000 Veterinärmedizin,
Veterinärmedizinische Fakultät der Ludwig-
Maximilians-Universität München

Akademische Ausbildung:
seit 03/2001 Doktorarbeit,
Medizinische Kleintierklinik, LMU München
07/2002 – 06/2003 Internship,
Medizinische Kleintierklinik, LMU München
07/2003 – 12/2006 Residency ECVIM-CA,
Medizinische Kleintierklinik, LMU München
07/2004 – 06/2005 Externship,
Department for Small Animal Internal Medicine,
University of Georgia, Athens, USA
seit 01/2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter,
Department of Small Animal Internal Medicine,
Ghent-University, Belgium

Sonstige Aktivitäten:
07 – 10/1994 Voluntariat,
„Sea Turtle Protection Society of Greece“,
Zakynthos, Greece
01/1995 – 04/1997 Saison-Flugbegleiter,
Condor Flugdienst GmbH, Kelsterbach
10/1999 – 06/2002 Studentische Hilfskraft,
Unternehmensberatung Bain & Company, München