Aus dem Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Friedrich Boege

Laborchemische Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Berndt Zur

2005

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang H. M. Raab

Referent: Univ.-Prof. Dr. Fritz Boege

Koreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. Kai Zacharowski

Meinen Eltern Katharina und Helmut Zur in Dankbarkeit gewidmet

Inhalt

1	Einleitung	5
2	Literatur	8
2.1	Elektrolyte	8
2.1.1	Natrium	8
2.1.2	Kalium	9
2.1.3	Kalzium	10
2.2	Substrate und Metabolite	11
2.2.1	Kreatinin	11
2.2.2	Harnstoff	12
2.2.3	Harnsäure	12
2.2.4	Gesamtbilirubin	13
2.2.5	Gesamteiweiß	14
2.2.6	Laktat	14
2.2.7	Cholesterin	15
2.2.8	Triglyceride	16
2.2.9	Glukose	16
2.2.10	Cystatin C	17
2.3	Enzyme	17
2.3.1	CK	18
2.3.2	ALT	18
2.3.3	AST	19
2.3.4	GGT	19
2.3.5	α-Amylase	20
2.3.6	LDH	20
2.3.7	AP	21
3	Material und Methoden	22
3.1	Tiere	22
3.1.1	Herkunft	22
3.1.2	Präanalytik	22
3.2	Geräte	22
3.2.1	Cobas Mira S	22
3.2.2	Eppendorf Efox 5053	23
3.2.3	Behring Nephelometer II (BN II)	24
3.3	Methoden	26
3.3.1	Parameter	26
3.3.1.1	Natrium, Kalium, Kalzium	26
3.3.1.2	Kreatinin	27
3.3.1.3	Harnstoff	28
3.3.1.4	Harnsäure	29
3.3.1.5	Gesamtbilirubin	30
3.3.1.6	Gesamteiweiß	31
3.3.1.7	Laktat	32
3.3.1.8	Cholesterin	33
3.3.1.9	Triglyceride	34
3.3.1.10	Glukose	35
3.3.1.11	Cystatin C	36
3.3.1.12	CK	37
3.3.1.13	ALT	38
3.3.1.14	AST	39

3.3.1.15	GGT	41
3.3.1.16	α-Amylase	41
3.3.1.17	LDH	43
3.3.1.18	AP	43
3.4	Kalibration	44
3.5	Qualitätskontrolle	45
3.6	Statistische Auswertung	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Wistarratten	47
4.1.1	Männlich	47
4.1.2	Weiblich	56
4.2	C57BL/6-Mäuse	65
4.2.1	Männlich	65
4.2.2	Weiblich	75
4.3	Tabellarische Darstellung der Mittelwerte	85
5	Diskussion	86
5.1	Normalbereiche	86
5.2	Referenzbereiche der einzelnen Parameter	86
5.2.1	Elektrolyte	87
5.2.1.1	Natrium	87
5.2.1.2	Kalium	87
5.2.1.3	Kalzium	88
5.2.2	Substrate und Metabolite	88
5.2.2.1	Kreatinin	88
5.2.2.2	Harnstoff	88
5.2.2.3	Harnsäure	88
5.2.2.4	Gesamtbilirubin	88
5.2.2.5	Gesamteiweiß	89
5.2.2.6	Laktat	89
5.2.2.7	Cholesterin	89
5.2.2.8	Triglyceride	89
5.2.2.9	Glukose	89
5.2.2.10	Cystatin C	90
5.2.3	Enzyme	90
5.2.3.1	CK	90
5.2.3.2	ALT	91
5.2.3.3	AST	91
5.2.3.4	GGT	91
5.2.3.5	α-Amylase	92
5.2.3.6	LDH	92
5.2.3.7	AP	92
5.3	Vergleichstabellen	94
5.4	Ausblick	95
6	Zusammenfassung	96
7	Literaturverzeichnis	98
9	Danksagung	104

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADH	Antidiuretisches Hormon
ALT	Alanin-Amino-Transferase
AP	Alkalische Phosphatase
AST	Aspartat-Amino-Transferase
ATP	Adenosintriphosphat
Ca	Kalzium
CHOD	Cholesterinoxidase
CK	Kreatinkinase
D	Dalton
DGKL	Deutsche Gesellschaft für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin
DPD	Dichlorophenyl Diazonium
ECCLS	European Committee for Clinical Laboratory Standards
EZR	Extrazellularraum
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
GGT	Gamma-Glutamyl-Transferase
GOT	Glutamat-Oxalat-Transaminase
GPO	Glycerinphosphatoxidase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
H	Wasserstoff
HDL	High Density Lipoprotein
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry
IZR	Intrazellularraum
K	Kalium
KD	Kilo-Dalton
LDH	Laktat-Dehydrogenase
LDL	Low Density Lipoprotein
MDH	Malat-Dehydrogenase
Na	Natrium
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat

NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
PAP	Phenolaminophenazon
PNP	p-Nitrophenol
SCE	Committee of Enzymes, Scandinavian Society for Clinical Chemistry and Clinical Physiology
STH	Somatotropes Hormon
TSH	Thyreoideastimulierendes Hormon
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1 Einleitung

Die Kenntnisse von laborchemischen Referenzbereichen für Versuchsmäuse und -ratten ist für die humanmedizinische Forschung von großer Bedeutung. Die Daten hierüber sind im Hinblick auf die enorm große Verwendung von Versuchstieren nicht sehr ergiebig, insbesondere nicht für Enzymbestimmungen bei 37 Grad Celsius. Bei Sichtung der Literatur stellte sich heraus, dass oft nur sehr kleine Populationen untersucht wurden, zudem meist ohne Angaben der verwendeten Methoden und Geräte (SHARP, 1998)(SUCKOW, 2000)(WAYNFORTH, 1992)(WOLFENSOHN, 1996)(LOEW, 2003). Andere Normwertermittlungen bei Mäusen und Ratten sind schon sehr alt, auch wurden sie entweder teilweise mit anderen Methoden und Geräten bei 25 Grad Celsius durchgeführt (HARRISON, 1978)(HIRANO, 1976), oder die Anzahl der ausgewählten Parameter war relativ gering (ZHOU, 2004) und die Auswahl der Population war nicht generell gültig (LIBERATI, 2004). Die Benutzung von Analysatoren der klinisch-chemischen Routinediagnostik für die Analysen von Tierplasmen ist mit dem Problem verbunden, dass wegen des großen Totraumvolumens der meisten Geräte relativ große Mengen an Plasma benötigt werden. Das führt dazu, dass Mäuseplasmen häufig gepoolt werden, um noch ausreichende Mengen für die Analytik zu erhalten. Mit dem COBAS MIRA S ist es möglich, auch geringe Plasmamengen laborchemisch zu messen.

Des Weiteren sind Informationen zur Elektrolytbestimmung häufig nicht vorhanden. Um möglichst genaue Daten zu bekommen, wurde die Analytik mit einem Flammenphotometer durchgeführt (EFOX 5053). Eine Standardisierung von Referenzbereichen ermöglicht eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse verschiedener Forschungseinrichtungen, sowohl intern als auch extern.

Die Maus als Tiermodell hat eine große Bedeutung für die medizinische Grundlagenforschung. Aufgrund der detaillierten Charakterisierung des Mäusegenoms und der Möglichkeit, durch gezielte Genmanipulationen Tiere mit Genüberexpression, -mutation und -deletion zu schaffen, können die direkten Auswirkungen genetischer Veränderungen auf Morphologie und Funktion untersucht werden. Beispielsweise beim Phänotyp der Mäuse ist dies von großer Bedeutung, da man bei erzeugten Genveränderungen bestimmter Genabschnitte nicht schon vorher auf etwaige Defekte schließen kann. Dies macht sich unter Umständen auch in

laborchemischen Parametern bemerkbar, und ein Vergleich zu den jeweiligen Wildtypen ist unerlässlich. Schlussfolgerungen können so bei Abwesenheit bestimmter Faktoren besser gezogen und ggf. neue Theorien daraus postuliert werden.

Neben den Vorteilen der Genmanipulationen bietet die Spezies Maus noch weitere: Durch die kurzen Generationszeit, ca. 5 - 6 Generationen pro Jahr, können große Tierzahlen unter standardisierten Bedingungen gezüchtet und untersucht werden. Je nach Fragestellung können darüber hinaus unterschiedliche Züchtungsstrategien mit verschiedenen Maus-Inzuchtstämmen durchgeführt werden. Insgesamt sind mehr als 500 Inzuchtstämme beschrieben, die sich aus Bruder-Schwester-Verpaarungen über mindestens 20 Generationen ableiten und genetisch als homogen zu betrachten sind (FESTING, 1995). Die Ratte als Tiermodell hat den Vorteil gegenüber der Maus, dass sie größer ist und dadurch beispielsweise chirurgische Maßnahmen einfacher durchzuführen sind als bei Mäusen. Genmanipulationen sind bisher schlecht realisierbar gewesen. Die ersten Knock-out-Ratten sind erst kürzlich gezüchtet worden (ZAN, 2003). Analog zu den Mäusen haben auch Ratten die Vorteile kurzer Generationszeiten und vieler Inzuchtstämme durch Brüder-Schwester-Verpaarungen. Die Ermittlung der „Normbereiche“ für Ratten und Mäuse ist notwendig, um Abweichungen zu erkennen und Rückschlüsse z.B. auf die Funktionen bestimmter Gene oder Genabschnitte zu ermöglichen oder bei vorbehandelten Ratten pathophysiologische Mechanismen genauer zu analysieren. Dabei ist es aber immer wichtig zu wissen, dass sich Mensch und Ratte/Maus hinsichtlich der Normwerte unterscheiden, damit es nicht zu falschen Deutungen der Ergebnisse kommt. Genauere Kenntnisse über die stammspezifischen Normwerte bei Ratten und Mäusen könnten in Anbetracht der vielfältigen Inzuchtstämme Anlass geben, für jeden Stamm eigene Referenzbereiche zu erstellen. Es sind bei den verschiedenen Rattenstämmen zwar unterschiedliche Wertlagen beschrieben worden (CHARLES RIVER, 1982, 1993), hier war allerdings die Standardisierung nicht vollständig angegeben (TACONIC TECHNICAL LIBRARY) und in der Annahme unterschiedlicher Methoden ein direkter Vergleich ohnehin nicht erlaubt, zumal die Streuung der Referenzbereiche innerhalb eines Stammes und einer Population recht groß ist. Ob auch signifikante Unterschiede bei verschiedenen Mäusestämmen in den laborchemischen Parametern zu erwarten sind, scheint zumindest unsicher zu

sein (HOUGH et al., 2002). Daher wurden Stämme für diese Arbeit ausgewählt, die weltweit sehr häufig verwendet werden, die Wistarratten und die C57BL/6-Mäuse. Die Erstellung von Referenzbereichen für Cystatin C soll einer besseren Diagnostik der glomerulären Funktion bei C57BL/6-Mäusen und Wistarratten dienen. Die bisherigen Daten wurden entweder bei nephrektomierten Sprague-Dawley-Ratten in geringer Population mit einem anderen Kit erhoben (BOKENKAMP, 2001), oder es wurden Studien mit Kontrollgruppen geringer Anzahl von gesunden männlichen Wistarratten durchgeführt (TAES et al., 2003).

2. Literatur

2.1 Elektrolyte

Elektrolyte sind im Wasser gelöste Salze, sie liegen als Anionen und Kationen vor. Sie werden selektiv angereichert, extrazellulär Natrium, Kalzium und Chlorid, intrazellulär Kalium, geringgradig Magnesium. Etwa 60 bis 70 % der Körperflüssigkeit verteilen sich auf den Intrazellularraum, der Rest auf den Extrazellularraum. Die Gesamtkonzentration ist in beiden Flüssigkeitsräumen gleich, daher besteht bei beiden ein osmotisches Gleichgewicht. Aktive Transportmechanismen erhalten den Konzentrationsunterschied - neben dem hohen intrazellulären Proteingehalt - zwischen Extra- und Intrazellularraum aufrecht. Desweiteren spielen die Elektrolyte bei der Erstellung von Potentialdifferenzen für die Reizleitung, den Puffersystemen, der Hemmung und Förderung von Enzymsystemen und dem Knochen-Metabolismus eine wichtige Rolle.
Die Elektrolytanalytik erfasst den extravasalen Raum. Elektrolyte werden vorwiegend über die Nahrung aufgenommen, über den Magen-Darm-Trakt absorbiert und über die Niere ausgeschieden.

2.1.1 Natrium

Natrium ist das wichtigste extrazelluläre Kation, es dient der Aufrechterhaltung der Flüssigkeitsverteilung und des osmotischen Drucks. Kalium ist das wesentliche intrazelluläre Kation (LAYBOLD, 1976). Diese asymmetrische Verteilung der Elektrolyte durch die Zellmembran erfordert einen aktiven Austausch beider Kationen durch die Na-K-ATPase. Für Wasser ist die Zellmembran permeabel, daher sind die Körperflüssigkeiten im osmotischen Gleichgewicht. Da Natrium das vorwiegende Elektrolyt des Extrazellularraums ist, bestimmt es aufgrund des freien Wasserflusses durch die Zellmembran nicht nur die Osmolalität des Extrazellularraums, sondern auch die des Intrazellularraums. Das Verhältnis von Natrium im Plasma zum Gesamtkörperwasser wird durch die Osmolalität reflektiert. Die Tonizität, d.h. die Wasserverteilung des EZR und IZR, ist konstant, und die Schwankungen betragen normalerweise lediglich 1 bis 2 %. Akute Änderungen bei Natriummangel bewirken Permeation von Wasser aus dem EZR in den IZR, es entsteht ein zelluläres Ödem (SELDIN, GIEBISCH, 1990, 1993).
Hyponatriämien kommen zustande durch renalen Verlust, z.B. bei Diuretikaabusus,

Mineralkortikoidmangel, osmotischer Diurese, oder auch durch extrarenalen Verlust bei Erbrechen, Durchfall, Verbrennungen, Pankreatitis und schwerer Muskelschädigung. Hierbei ist das Gesamtkörpernatrium stärker erniedriegt als das Gesamtkörperwasser. Hypothyreose, Glukokortikoidmangel, Stress und verschiedene Medikamente können eine moderate Hyponatriämie bei leicht erhöhtem Gesamtkörperwasser bewirken. Ist das Gesamtkörperwasser stärker erhöht als das Gesamtkörpernatrium, ist dies häufig in einem nephrotischen Syndrom, akuter und chronischer Niereninsuffizienz, Leberzirrhose und Herzinsuffizienz begründet.
Hypernatriämien entwickeln sich, wenn der Organismus hypotone Flüssigkeit verliert und die Wasseraufnahme vermindert ist. Daher wird die Einteilung anhand des Gesamtkörpernatriums vorgenommen. Bei vermindertem Gesamtkörpernatrium (Wasser- und Natriumverlust) wird eine Hypernatriämie renal durch osmotische Diurese, Glukose, Harnstoff und Mannitol verursacht, extrarenal durch exzessives Schwitzen und Durchfall. Bei normalem Gesamtkörpernatrium (Wasserverlust) sind die renalen Ursachen Diabetes insipidus (ADH-Mangel), die extrarenalen Wasserverlust über die Haut und Atemwege. Hypernatriämie bei erhöhtem Gesamtkörpernatrium wird z.B. durch primären Hyperaldosteronismus, Cushing Syndrom und hypertone Dialyse verursacht (LONG, MARIN, BAYER, SHETTY, PATHY, 1991).

2.1.2 Kalium

Kalium ist das wichtigste intrazelluläre Kation und für die Nerven- und Muskelzellaktivität notwendig (LAYBOLD, 1976). Änderungen der Kaliumaufnahme werden bei Gesunden durch gegenläufige Veränderungen der renalen Kaliumausscheidung ausgeglichen. Das Gesamtkörperkalium bleibt konstant. Erhöhung und Erniedrigung der Kaliumkonzentration im Plasma sind Folge einer Störung der internen oder externen Kaliumbilanz. Die externe Kaliumbilanz wird über die Kaliumsekretion in den Nieren geregelt. Die Adaption an die orale Zufuhr setzt allerdings verzögert ein. Die renale Kaliumausscheidung wird beeinflusst durch:
a) die Kaliumzufuhr durch Nahrungsaufnahme und Resorption im Dünndarm;
b) den Natriumgehalt, hier führt die Volumenvermehrung des EZR zur Erhöhung der GFR und einer erhöhten Kaliumausscheidung. Eine Verminderung des EZR führt zu gegenteiligem Effekt.

c) den Säure-Base-Status, es kommt bei pH-Wert-Verschiebung durch Austausch von H-Ionen mit Kaliumionen zu intra- und extrazelluläre Kaliumverschiebung;
d) Mineral- und Glukokortikoide, sie stimulieren die renale Kaliumausscheidung;
e) Ansprechbarkeit der Mineralkortikoide im distalen Tubulus, d.h., Schädigungen im distalen Tubulus bewirken eine verminderte Kaliumausscheidung (THOMAS, 1999)(SELDIN, GIEBISCH, 1989).
Zudem spielen Art und Verfügbarkeit von Anionen eine wichtige Rolle. Interne Bilanzstörungen ändern zwar die Plasmakonzentration von Kalium, nicht aber die Gesamtkörperkonzentration z.B. durch Insulin oder Katecholamine.
Ursachen von Hypokaliämien sind z.B. Erbrechen, Diarrhö, kaliumarme Ernährung oder erhöhte Ausscheidung über die Nieren, diabetische und alkoholische Ketoazidose sowie primärer und sekundärer Hyperaldosteronismus.
Hyperkaliämien entstehen beispielsweise durch Dehydratation, schwere Verbrennungen, Niereninsuffizienz, diabetische Ketoazidose, Medikamente, Rhabdomyolyse und Hypoaldosteronismus.

2.1.3 Kalzium

Der Kalziumstoffwechsel stellt ein komplexes Geschehen dar. Die hormonelle Regulation ist eng mit dem Phosphatstoffwechsel verknüpft und hat Wechselbeziehungen zwischen Dünndarm, Skelett, Niere und endokrinem System, insbesondere den Nebenschilddrüsen. Das Gesamtkalzium besteht aus 3 Fraktionen, freies (ionisiertes) Kalzium (50 % des Gesamt-Ca), proteingebundenes (vorwiegend an Albumin) Kalzium (45 % des Gesamt-Ca) und an Anionen (vorwiegend Phosphat) gebundenes Kalzium (5 % des Gesamt-Ca). Im Knochen liegt Kalzium in Form komplexer Salze aus Hydroxyapatit oder Carbonatapatit und Kalziumphosphat vor. Das Knochenkalzium wird zu einem Teil ständig mit der extrazellulären Flüssigkeit ausgetauscht. Ausgeschieden wird es größtenteils über die Nieren, teilweise über den Darm und geringfügig über die Haut. Außer für den Knochenmetabolismus hat Kalzium noch zahlreiche andere bedeutsame physiologische Funktionen: bei der Blutgerinnung, der neuromuskulären Übertragung, der Enzymsekretion und bei Enzymreaktionen, der Muskelkontraktion und für die Permeabilität von Zellmembranen (LAYBOLD, 1976). Biologisch wirksam ist das ionisierte Kalzium, das unmittelbar durch den Säure-Base-Status beeinflusst wird. Es sinkt bei steigendem pH-Wert und umgekehrt. Die Resorption wird durch

1,25-Hydroxycholecalciferol der Niere stimuliert. Oxalsäure und Phytinsäure beeinträchtigen die Kalziumresorption durch Bildung unlöslicher Salze. Der Kalziumspiegel des Plasmas wird durch das Parathormon der Nebenschilddrüsen und von seinem Antagonisten Calcitonin aus der Schilddrüse reguliert. Parathormon bewirkt eine Erhöhung des Kalziumspiegels durch Mobilisierung der Reserven und Verminderung der Ausscheidung über die Nieren, Calcitonin senkt den Kalziumspiegel durch verstärkte Einlagerung von Kalzium in den Knochen (KARLSON, 1978).
Hyperkalziämie ist meist durch übermäßige Mobilisierung aus dem Knochen bedingt. Ursache ist häufig eine primäre Überfunktion der Nebenschilddrüse zum Teil auch durch ektope Parathormonproduktion. Übermäßige Kalziumzufuhr und Vitamin D-Überdosierung führen auch zu einer Erhöhung des Kalziums im Plasma.
Hypokalziämien beruhen auf einer Unterfunktion der Nebenschilddrüsen, verminderter Kalziumaufnahme und Vitamin-D-Mangel oder verminderter Umwandlung von Vitamin D in die aktive Form. Dies ist insbesondere bei Niereninsuffizienz der Fall (THOMAS, 1999).

2.2 Substrate und Metabolite

Die Bezeichnung Substrate im Zusammenhang mit Plasmauntersuchungen bedeutet keine einheitliche chemische oder biologische Funktionseinheit. Sie dient eher der klinisch-chemischen Klassifikation. Substrate sind auch am Stoffwechsel beteiligt, sind aber im Plasma stets in gewissen Konzentrationen vorhanden. Schon eine geringe Schädigung eines Organs bedingt häufig einen Enzymaktivitätsanstieg, der im Plasma messbar ist. Organabhängige Substrate oder Metabolite hingegen sind in ihrer Plasmakonzentration häufig erst dann beeinflusst, wenn die Organfunktion oder Stoffwechselvorgänge schon deutlich beeinträchtigt sind.
Subtrat- und Metabolitkonzentrationen ändern sich in der Regel langsamer als Enzymaktivitäten. Sie bestehen aber über einen längeren Zeitraum (KARLSON, 1994).

2.2.1 Kreatinin

Kreatinin entsteht endogen im Muskelstoffwechsel aus Kreatin und Kreatinphosphat. Kreatin wird in der Leber synthetisiert und gelangt über das Blut in die Muskulatur.

Als Kreatinphosphat dient es dort als schnell verfügbare Energiereserve. Durch nichtenzymatische irreversible Bildung eines ß-Laktamrings wird Kreatinphosphat nach Übertragung des anorganischen Phosphats auf ATP zu Kreatinin (BUDDECKE, 1983). Es wird bei normaler Nierenfunktion glomerulär filtriert und tubulär nicht rückresorbiert, bei hohen Plasmawerten tubulär sezerniert. Ansteigende Kreatininspiegel über den Referenzbereich sind zu erwarten, wenn die glomeruläre Filtration über 50 % eingeschränkt ist. Der Kreatininpool wird maßgebend bestimmt durch die Muskelmasse. Kreatininbestimmungen werden zur Diagnose und Verlaufskontrolle von akuten und chronischen Nierenerkrankungen sowie zur Überwachung der Nierendialyse durchgeführt (GREILING, GRESSNER, 1995).

2.2.2 Harnstoff

Harnstoff ist das Endprodukt des Eiweiß- und Aminosäurestoffwechsels und wird zu 90 % renal ausgeschieden. Beim Eiweißabbau werden die Proteine in Aminosäuren zerlegt und desaminiert. Das dabei gebildete Ammoniak wird in der Leber zu Harnstoff synthetisiert. Dies stellt den wichtigsten Abbauweg für überschüssigen Stickstoff im Körper dar. Der Harnstoffspiegel im Serum hängt von der Eiweißzufuhr, dem Eiweißabbau, der glomerulären Nierenfunktion und der Diurese ab. Die Harnstoffausscheidung durch die Niere ist im Wesentlichen ein passiver Vorgang, abhängig von der Fließgeschwindigkeit im Tubulussystem. Die Blutkonzentration ist somit abhängig von der renalen Perfusion, von der Harnstoffbildung und von der glomerulären Filtrationsrate (KARLSON, 1978).
Die Bestimmung des Harnstoffs wird häufig zusammen mit der Kreatinin-bestimmung angewendet und dient zur Differentialdiagnose von prärenaler (Herzinsuffizienz, Wasserausscheidung, erhöhter Proteinkatabolismus), renaler (Glomerulonephritis, chronische Nephritis, polyzystische Niere, Nephrosklerose, tubuläre Nekrose) und postrenaler (Abflussbehinderung der Harnwege) Hyperurämie.
Erniedrigte Harnstoffkonzentrationen kommen bei proteinarmer Ernährung oder schweren Lebererkrankungen vor.

2.2.3 Harnsäure

Harnsäure ist das Endprodukt des Purinstoffwechsels im Organismus. Die Höhe des Harnsäurepools ist die Bilanz aus Bildung und Elimination. Synthese und Verstoffwechselung von Purinen findet in allen Geweben statt, aber die

Harnsäuresynthese läuft vorwiegend in der Leber und im Dünndarm ab, da sie die größten Konzentrationen des Enzyms Xanthinoxidase, das Xanthin in Harnsäure umwandelt, enthalten (THOMAS, 1999). Die Elimination erfolgt zu über 80 % über die Nieren, der Rest wird im Darm abgebaut.
Hyperurikämie ist der Spiegel eines vergrößerten Harnsäurepools, d.h. eine übermäßige Produktion von Harnsäure oder Anfall durch Zellzerfall, eine verminderte Ausscheidung oder eine Kombination aus beidem. Bei Gicht wird Harnsäure im Wesentlichen in Form von Mononatriumurat im Gewebe abgelagert (LAYBOLD, 1976). Die Harnsäurebestimmungen werden zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Gicht, zahlreicher Nieren- und Stoffwechselstörungen durchgeführt. Hyperurikämie wird auch bei Leukämie, Psoriasis, bei Hungerzuständen und Ernährungsstörungen sowie bei zytostatischer Therapie beobachtet.

2.2.4 Gesamtbilirubin

Bilirubin entsteht beim Abbau der hämhaltigen Proteine Hämoglobin, Myoglobin, Katalasen und Cytochromen. Das retikuloendotheliale System in Milz, Kupfferschen Zellen und Knochenmark entfernt überalterte Erythrozyten aus der Blutbahn. Nach Aufspaltung des Hämrings entsteht zunächst Biliverdin und nach dessen Reduktion Bilirubin. Unkonjugiertes (indirektes), wasserunlösliches Bilirubin wird an Albumin gebunden und gelangt über die Blutbahn in die Leber. In den Hepatozyten wird es mit Glukuronsäure konjugiert. Das konjugierte (direkte) Bilirubin oder Bilirubindiglucuronid ist wasserlöslich und wird biliär in den Darm ausgeschieden. Hier erfolgt der Abbau durch Bakterien zu Urobilinogen, das teilweise durch Rückresorption in die Blutbahn auch im Urin ausgeschieden wird. Hauptsächlich wird das Urobilinogen jedoch zu den Stuhlfarbstoffen Sterkobilinogen und Sterkobilin abgebaut (LAYBOLD, 1976). Die Bestimmung von Bilirubin wird zur Diagnose von Lebererkrankungen, zum Nachweis hämolytischer Anämien und zur Bewertung des Schweregrades bei Ikterus eingesetzt.
Prähepatischer Ikterus: Bei Hämolysen kommt es durch vermehrten Hämoglobinanfall und folgenden gesteigerten Abbau dazu, dass vermehrt unkonjugiertes Bilirubin anfällt, da die Konjugationsfähigkeit der Leber überschritten wird. Im Plasma finden sich erhöhte indirekte Bilirubinkonzentrationen.
Hepatischer Ikterus: Der Transport von unkonjugiertem Bilirubin, die Konjugation oder die Sekretion in die Gallenkanälchen ist gestört. Häufig kommt es zur

intrahepatischen Cholestase und damit zum Übertritt von konjugiertem Bilirubin ins Blut, das teilweise dekonjugiert wird. Im Plasma erscheint sowohl direktes als auch indirektes Bilirubin.
Posthepatischer Ikterus (Verschlussikterus): Durch die Gallenabflussbehinderung kommt es zur Regurgitation von konjugiertem Bilirubin. Im Plasma steigt die Konzentration des direkten Bilirubins (GREILING, GRESSNER, 1995).

2.2.5 Gesamteiweiß

Plasmaproteine werden vorrangig in der Leber, den Plasmazellen, den Lymphknoten und der Milz synthetisiert. Das Gesamteiweiß des Plasmas besteht aus über 100 verschiedenen Proteinen. Den größten Anteil hat das Albumin, gefolgt von den Globulinen. Die Funktion der Plasmaproteine sind vielfältig. Albumin ist wichtig für die Aufrechterhaltung der Konzentrationsgradienten für den Intra- und Extrazellularraum sowie den Transport im Blut. Die Bestimmung des Gesamtproteins erfasst zusätzlich Globuline, Enzyme, Hormone, plasmatische Gerinnungsfaktoren und das Komplementsystem. Die Proteinkonzentration im Blut ist immer im Verhältnis zum Wasserhaushalt zu bewerten, da eine Unterscheidung von relativen und absoluten Hypo- oder Hyperproteinämien getroffen werden muss. Es kann sowohl die Gesamtproteinkonzentration als auch der Anteil der einzelnen Fraktionen erheblich von den Normalwerten abweichen.
Hypoproteinämien können durch nephrotisches Syndrom, starken Blutverlust, Proteinabsorptionsstörungen, Verbrennungen, Salzretentionssyndrome und schwerer Leberschädigung entstehen (BUDDECKE, 1983).
Hyperproteinämien kommen bei Leberzirrhose, schwerer Dehydratation und beim multiplen Myelom vor. Veränderungen im Anteil der Plasmaproteine sind oft auf eine der mannigfaltigen Plasmaproteinfraktionen zurückzuführen. Dabei ändert sich die Gesamtproteinkonzentration oft nicht, sondern das Verhältnis der Proteine zueinander (THOMAS, 1999). Starke Veränderungen sind bei Leberzirrhose, Glomerulonephritis, nephrotischem Syndrom, akuter Hepatitis, Lupus erythematodes und bei akuten und chronischen Entzündungen zu beobachten.

2.2.6 Laktat

Laktat ist das Endprodukt des anaeroben Glukosemetabolismus. Es wird sauerstoffabhängig durch Oxidation im Zitratzyklus oder durch Glukoneogenese im

Cori-Zyklus weiterverwertet. Laktat wird durch die Laktat-Dehydrogenase zu Pyruvat umgesetzt (JUNGERMANN, MÖHLER, 1980). Erhöhte Werte im Blut sind bei inadäquat hohem Anfall oder gestörter Verwertung zu finden, d.h., die Laktatkonzentration ist erhöht aufgrund mangelnder Sauerstoffversorgung der Gewebe oder durch metabolische Ursachen bei verminderter Laktatelimination (KARLSON, 1978).
Ursachen erhöhter Laktatkonzentrationen im Plasma können akute Lungenerkrankung, Herzinsuffizienz, extreme körperliche Belastung, Nierenversagen oder Leukämie sein. Selten treten erhöhte Werte bei Therapie mit Biguaniden auf. Mit erhöhten Laktat- und Pyruvatkonzentrationen gehen auch Thiaminmangel und diabetische Ketoazidose einher. Laktatmessungen zur Bewertung des Säure-Base-Status werden bei der Diagnose und Behandlung von Laktatazidosen durchgeführt.

2.2.7 Cholesterin

Cholesterin ist ein Steroid mit einer sekundären Hydroxylgruppe in C_3-Stellung. Es wird in vielen Geweben, besonders aber in der Leber und Darmwand synthetisiert. Es ist Zellmembranbestandteil, Vorläufer von Steroidhormonen und Gallensäuren (BUDDECKE, 1974). Etwa 80 % des Cholesterins enteht durch Neusynthese und ca. 20 % durch Nahrungsaufnahme. Triglycerid-, Kohlenhydratzufuhr und Insulinmangel stimulieren, Schilddrüsenhormone und Estrogene hemmen die endogene Synthese. Cholesterin kommt im Organismus sowohl in freier als auch in veresteter Form vor. Plasmacholesterin wird aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit in den Lipoproteinen transportiert, vorwiegend in der LDL-Fraktion, geringfügiger in den HDL, VLDL und Chylomikronen. Die Ausscheidungen erfolgen hauptsächlich über die Galle als Gallensäuren und -salze (BUDDECKE, 1983). Die Gallensäuren werden aus dem Darmlumen resorbiert und über die Pfortaber der Leber erneut zugeführt, sie unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf. Das Cholesterin wird teilweise auch von Darmbakterien zu Koprosterin reduziert und über die Faeces ausgeschieden.
Die Cholesterinbestimmung dient als Screening auf atherogenes Risiko und zur Diagnose und Behandlung von Lipid-Stoffwechselstörungen.
Hypercholesterinämien findet man auch bei zahlreichen Erkrankungen, wie z.B. bei Hypothyreose, Diabetes mellitus, nephrotischem Syndrom, Morbus Cushing und Cholestase.

In seltenen Fällen kommen Hypocholesterinämien bei Lipoproteindefekten, konsumierenden Erkrankungen, Operationen, Polytraumen und Hyperthyreose vor.

2.2.8 Triglyceride

Triglyceride sind Ester des dreiwertigen Alkohols Glycerin mit 3 langkettigen Fettsäuren. Es sind die wichtigsten Energieträger der Nahrung und Energiespeicher im Fettgewebe. Bei Bedarf werden sie durch die Lipase hydrolytisch in Fettsäuren und Glycerin gespalten. Fettsäuren werden vor allem in der Leber, im Skelett- und Herzmuskel und im Fettgewebe auf dem Weg der Beta-Oxidation verstoffwechselt (BUDDECKE, 1983). In den Mitochondrien der Körperzellen werden zwei C-Atome durch einen Multienzymkomplex abgespalten. Das hieraus entstehende Acetyl-CoA wird zum Endabbau in den Citratzyklus eingeschleust. Abbau und Synthese der Triglyceride sind hormonell gesteuert. Adrenalin, Noradrenalin, ACTH, Glukokortikoide, Glukagon und STH steigern die Lipolyse, Insulin und TSH steigern die Liponeogenese. Alimentär zugeführte Triglyceride werden in Chylomikronen, endogen gebildete vorwiegend in den VLDL im Plasma transportiert.
Die Triglyceridbestimmung dient zur Diagnose und Behandlung von Patienten mit Lipid-Stoffwechselstörung, Klassifikation von Hyperlipoproteinämien, Beurteilung des Arteriosklerose-Risikos, von Pankreatitis und zahlreichen endokrinologischen Erkrankungen (THOMAS, 1999).

2.2.9 Glukose

Glukose ist das wesentliche Monosaccharid im Blut mit einer postprandialen Konzentration von 5 mmol/l, dient als unentbehrliches Ernergie lieferndes Substrat für zelluläre Funktionen. Der Glukosespiegel wird vorwiegend durch die Inselzellhormone Insulin und Glukagon reguliert. Insulin senkt die Blutglukose, indem es die Glukoseaufnahme in der Leber, im Fettgewebe und in der Muskulatur fördert und die Lipolyse und Glukoneogenese hemmt. Der Antagonist Glukagon steigert die Glykogenolyse, Lipolyse und Glukoneogenese. Cortisol, Adrenalin, STH und Thyroxin erhöhen die Blutglukose (GREILING, GRESSNER, 1995).
Die Glukosebestimmung wird zur Diagnose und Verlaufskontrolle von Stoffwechselerkrankungen genutzt, die mit Hyper- und Hypoglykämien einhergehen. Hierbei steht der Diabetes mellitus an erster Stelle. Hyperglykämien kommen aber

auch z.B. bei verstärkter Glukoneogenese infolge von Glukokortikosteroiderhöhung bei Nebennierenrindentumoren vor.
Hypoglykämien werden häufig bei Insulinomen, schweren Hepatopathien, Hyperthyreose, Nebenniereninsuffizienz und längerer Nahrungskarenz beaobachtet.

2.2.10 Cystatin C

Cystatin C ist ein Cystein-Proteinase-Inhibitor mit einem relativen Molekulargewicht von 13.250 kD, es wird von allen kernhaltigen Zellen gebildet. Cystatin C ist für die Regulation von Proteasen, die aus lädierten oder zerfallen Lysosomen freigesetzt werden, verantwortlich. Es ist kein Akut-Phase-Protein, wird im Plasma nicht glykosyliert. Cystatin C ist unbeeinflusst von Geschlecht, Proteinaufnahme, Alter und Muskelmasse. Die konstante Bildungsrate, die genetisch determiniert ist, und die Tatsache, dass es von der gesunden Niere frei filtriert wird, macht dieses Protein zu einem sehr guten Marker der Nierenfunktion. Die Serumkonzentration von Cystatin C hängt ausschließlich von der glomerulären Filtrationsleistung ab. Eine Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate führt zu einem Anstieg des Cystatin C im Plasma (RANDERS, ERLANDSEN, 1999)(THOMAS, 1999).

2.3 Enzyme

Enzyme sind Proteine, die in allen lebenden Organismen vorkommen und als Biokatalysatoren durch Herabsetzen der Aktivierungsenergie chemische Reaktionen beschleunigen. Enzyme sind reaktions- und substratspezifisch. Man unterscheidet Zellenzyme, die intrazellulär am Intermediärstoffwechsel beteiligt sind und Sekretionsenzyme, die im Plasma oder Verdauungstrakt liegen. Die Enzyme sind in der Zelle im Zytoplasma gelöst oder an Zellstrukturen gebunden, z.B. an Membranen oder Mitochondrien. Die Konzentration der Enzyme ist intrazellulär 1000 bis 10000-mal höher als im extrazellulären Raum (THOMAS, 1999). Die Enzymfreisetzung beruht meist auf Läsionen der Zellmembran, ausgelöst durch Viren, chemische Substanzen, Hypoxie, Anoxie und Ischämie. Enzymerhöhungen im Plasma können auch durch vermehrte Synthese entstehen, physiologisch im Wachstum oder durch Enzyminduktion (SCHMIDT, SCHMIDT, 1987). Enzymaktivitätsbestimmungen werden bevorzugt im kinetischen Test bestimmt. Die photometrisch gemessene Absorptionsänderung eines Indikators pro Zeiteinheit dient als Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit und ist proportional der Enzymaktivität, wenn das Enzym

mit maximaler Umsatzrate arbeitet. Dazu muss ein ausreichender Substrat- und Coenzymüberschuss vorhanden sein. Als Coenzyme dienen häufig $NADH_2$ und $NADPH_2$ als Indikatoren. Enzymaktivitäten müssen unter gleichen Bedingungen gemessen werden, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Hierbei spielt im Besonderen die Reaktionstemperatur eine Rolle, die bei unseren Messungen bei 37 Grad Celsius erfolgte. Durch Referenz- und Standardmethoden, die von nationalen und internationalen Gremien (IFCC, ECCLS, NCCLS, DGKL, SCE) erarbeitet wurden, versucht man größtmögliche Vergleichbarkeit zu erreichen. Als Maßeinheit gilt U (Unit) (THOMAS, 1999). 1 U katalysiert den Substratumsatz von 1 µmol pro Minute. Die Indikationen der Enzymdiagnostik im Plasma oder Serum liegen in Feststellung eines Gewebeschadens, der Lokalisation durch so genannte Leitenzyme, der Ausdehnung und der Schwere der Schädigung. Dabei ist das Wissen über die Lokalisation der Enzyme innerhalb der Zelle (zytoplasmatisch, mitochondrial, mikrosomal oder bilokulär) hinweisgebend.

2.3.1 CK

Die Kreatinkinase ist ein dimeres, zytoplasmatisches Enzym, welches in vier unterschiedlichen Formen auftritt: dem mitochondrialen Isoenzym sowie den zytosolischen Isoenzymen CK-MM (Muskel-Typ), CK-BB (Hirn-Typ) und CK-MB (Myokard-Typ). Die CK gewährleistet eine rasche Resynthese von ATP, der einzigen direkten Energiequelle der Muskulatur, indem sie bei niedrigem pH-Wert die Übertragung des Phosphatrestes von Kreatinphosphat auf ADP katalysiert. Das Gleichgewicht der reversiblen Reaktion wird bei pH-Anstieg zugunsten der Kreatinphosphat-Synthese aus ATP und Kreatin verschoben. Dadurch entsteht ein schnell verfügbarer Energiespeicher (THOMAS, 1999)(BUDDECKE, 1983).
Die CK- und CK-Isoenzym-Aktivitätsbestimmungen dienen zur Diagnose und Verlaufskontrolle des Myokardinfarktes sowie von Muskelerkrankungen und -schädigungen. Ihr Molekulargewicht beträgt ca. 84000 D, die Halbwertszeit beträgt etwa 2 Stunden.

2.3.2 ALT (GPT)

Die ALT gehört zur Gruppe der Transaminasen, die durch Transfer von Aminogruppen die Umwandlung von Aminosäuren zu den entsprechenden

α-Ketosäuren und umgekehrt katalysieren. ALT ist im Zytoplasma gelöst. Obwohl die höchste Konzentration der ALT in der Leber auftreten, kommen geringere Aktivitäten auch in Nieren, Herz, Skelettmuskel, Pankreas, Milz und im Lungengewebe vor. ALT-Bestimmungen werden vor allem zur Diagnostik und Beurteilung bei Leberparenchymschäden eingesetzt. Geringe Erhöhungen können auch bei Schädigungen der oben aufgeführten Organe auftreten. Die Halbwertszeit beträgt ca. 47 Stunden (THOMAS, 1999).

2.3.3 AST (GOT)

Die AST gehört zur Gruppe der Transaminasen, die wie die ALT durch Transfer von Aminogruppen die Umwandlung von Aminosäuren zu den entsprechenden α-Ketosäuren und umgekehrt katalysieren. AST ist zellulär zu 70 % mitochondrial gebunden und zu 30 % im Zytoplasma gelöst. Bei schwachen Zellschädigungen wird vorwiegend der zytoplasmatische Anteil im Plasma erscheinen. Bei schweren Schäden werden zusätzlich mehr mitochondrial gebundene Enzyme ins Plasma freigesetzt.
Die AST ist im Körper weit verbreitet. Erhöhte Werte finden sich vor allem bei Leber-, Herz- und Skelettmuskelschädigungen sowie bei Hämolyse. Die AST-Konzentration in den Erythrozyten ist etwa 40fach höher als im Plasma. Die Halbwertszeit beträgt ca. 17 Stunden (THOMAS, 1999).

2.3.4 GGT (γ-GT)

Die GGT gehört zu einer Gruppe Transferasen, die den Transfer von Aminosäuren von einem Peptid zum anderen katalysieren. Das Enzym reagiert nur mit Peptiden, die am carboxyterminalen Ende ein Glutamatrest tragen, der mit dem Peptid über eine γ-ständige Carboxylgruppe verbunden ist (THOMAS, 1999). Die GGT ist auf der Zytoplasmamembran vieler Körperzellen lokalisiert. Die im Serum messbaren Konzentrationen stammen fast ausschließlich aus den Hepatozyten und Gallengängen (GREILING, GRESSNER, 1995). Im Plasma ist die GGT vorwiegend an Lipoproteinen gebunden, besonders an das HDL (THOMAS, 1999). Da das Enzym an der Zellmembran angelagert ist, wird es relativ leicht freigesetzt.

Erhöhungen sind zu beobachten bei Hepathopathien, Cholestase, Alkoholabusus und durch Enzyminduktion. Das Molekulargewicht beträgt 84000 D, die Halbwertszeit wird mit 3 bis 4 Tagen angegeben.

2.3.5 α-Amylase

Die α-Amylasen katalysieren den hydrolytischen Abbau von polymeren Kohlenhydraten wie Amylose, Amylopektin und Glykogen durch Spaltung der 1,4-α-glukosidischen Bindung. Bei Poly- und Oligosacchariden werden immer mehrere glykosidische Bindungen gleichzeitig hydrolysiert. Als kleinste Einheit wird die Maltriose in sehr geringer Geschwindigkeit zu Maltose und Glukose gespalten (KARLSON, 1978). Man unterscheidet zwei Typen von α-Amylasen, den Pankreas-Typ (P-Typ) und den Speicheldrüsen-Typ (S-Typ). Der P-Typ ist organspezifisch und wird in den Pankreas-Acini gebildet. Der-S-Typ ist unspezifisch und wird größtenteils in den sekretorischen Epithelien der Mundspeicheldrüsen gebildet. Zusätzlich kommt er noch geringfügig in Tränen- und Schweißdrüsen vor sowie in der Muttermilch, Amnion-Flüssigkeit, Lungen, Hoden und im Epithel der Eileiter (THOMAS, 1999). Von Bedeutung ist die α-Amylase-Bestimmung für die Diagnose und Verlaufskontrolle von Pankreatitiden. Aber auch bei Speicheldrüsenerkrankungen, Tumoren der Lunge und Ovarien, Pneumonie, diabetischer Ketoazidose und bei eingeschränkter Nierenfunktion kann die α-Amylase erhöht sein. Sie hat ein geringes Molekulargewicht von 40000 bis 50000 D und eine geringe Halbwertszeit von 3 bis 6 Stunden im Plasma.

2.3.6 LDH

Die LDH ist ein zytosolisches Enzym und gehört zur Gruppe der Oxidoreduktasen. LDH katalysiert in den Zellen den letzten Schritt der anaeroben Glykolyse, die Umsetzung von Pyruvat zu Laktat unter Mithilfe des Coenzyms NAD. Man unterscheidet 5 Isoenzyme, die durch die Kombination der Untereinheiten H (Herz) und M (Muskel) zusammengesetzt sind (JUNGERMANN, MÖHLER, 1980). Sie bilden jeweils ein Tetramer (4H – 3H1M – 2H2M – 1H3M – 4M) und werden nach ihrer elektrophoretischen Wanderungsgeschwindigkeit geordnet, LDH 1 bis LDH 5. LDH 1 und LDH 2 kommen vorwiegend in Herzmuskelzellen, Nieren und Erythrozyten vor, LDH 3 in Granulozyten, LDH 4 und LDH 5 in Leber, Skelettmuskel,

Milz und Lunge (GREILING; GRESSNER, 1995). Die Messung der LDH-Gesamtaktivität lässt aufgrund der verschiedenen Isoenzyme keine Organzuordnung zu. Daher ist die LDH-Gesamtaktivitäts-Bestimmung äußerst unspezifisch. Die LDH hat ein Molekulargewicht von ca. 135000 D und eine Halbwertszeit von 8 bis 12 (LDH 5) und 53 bis 173 (LDH 1) Stunden.

2.3.7 AP

Die Isoenzyme der alkalischen Phosphatase werden von bisher 4 bekannten Genen codiert. 3 Gene auf einem Chromosom (2q 34-37) regulieren die Synthese der gewebespezifischen Isoenzyme von Dünndarm-AP, Keimzell-AP und Plazenta-AP. Das 4. Gen, auf einem anderen Chromosom (1p 36.1-34), kodiert das gewebeunspezifische Isoenzym. Dieses gewebeunspezifische Enzym kommt in hoher Konzentration in Leber, Knochen und Nieren vor. Das humane Plasma enthält etwa gleiche Teile der Leber- und Knochenisoformen. Die AP wird in den Hepatozyten gebildet. Bei hepatobiliären Erkrankungen wird vermehrt AP auf der Zellmembran verankert und durch die Phospholipase D des Plasmas von dieser abgelöst. Es kommt zu einer Erhöhung der AP im Plasma. Allerdings wird bei Cholestase die membrangebundene AP durch Komplexbildung mit Lipoprotein X abgelöst und gelangt so ins Plasma. Die HWZ der Leber-AP beträgt ca. 16 bis 60 Stunden. Die Dünndarm-AP hat eine wesentlich kürzere HWZ von 6 Stunden und gelangt nur in sehr geringen Mengen ins Plasma, da sie über den Ductus thoracicus geklärt wird. Der Anstieg der Knochen-AP wird durch eine erhöhte Osteoblastenaktivität verursacht. Die Freisetzung der AP von Osteoblasten unterliegt einem ähnlichen Mechanismus wie der der Leber-AP. Eine Erhöhung der Knochen-AP ist nur zu erwarten, wenn das Verhältnis Osteoblastenaktivität zu Osteoklastenaktivität nicht vermindert ist. Bei Erkrankungen mit erhöhter Osteoblastentätigkeit ist daher die AP erhöht (z.B. Tumoren), bei Erkrankungen wie Osteoporose ist die AP meist niedrig, da aufgrund eines ungleichen Verhältnisses Osteoblasten - Osteoklasten entweder die Knochenresorption erhöht oder die Knochenbildung erniedrigt ist (THOMAS, 1998).
Zu einer Erhöhung der AP kommt es bei hepatobiliären und Skeletterkrankungen, z.B. Verschlussikterus, hepatozellulären Leberschaden, Lebermetastasen, primären und sekundären Osteopathien. Erniedrigungen der AP sind bei Dialysepatienten, Hypothyreose, chronische Strahlenkrankheit und Unterernährung zu beobachten.

3 Material und Methoden

3.1 Tiere

In der Zeit vom 12. Januar 2005 bis zum 10. Juni 2005 wurden jeweils 30 männliche und 30 weibliche Wistarratten sowie C57BL/6-Mäuse zur Erstellung der Referenzbereiche untersucht. Die Tiere wurden nicht medikamentös behandelt und erfüllten die Voraussetzungen einer Normalpopulation für die Ermittlung von Referenzbereichen. Es handelte sich um erwachsene Tiere mit einem Gewicht von 250-300 Gramm für die Wistarratten und 20 bis 30 Gramm für die C57BL/6-Mäuse. Die Wistarratte ist ein Auszuchtstamm, der besonders fruchtbar ist und ein schnelles Wachstum besitzt. Sie dient häufig als Ausgangsmodell zur Züchtung von Inzuchtstämmen durch Brüder-Schwester-Verpaarung. Die C57BL/6-Maus ist der meistverwendete Inzuchtstamm zur Züchtung von transgenen Mäusen. Sie hat ein dunkles Fell und lebt sehr lang. Von C57BL/6-Mäusen existieren unterschiedliche Inzuchtstämme, die erhöhte Prävalenzen haben bestimmte, Erkrankungen zu bekommen (FESTING, 1999).

3.1.1 Herkunft

Die Tiere waren Eigenzüchtungen der Tierversuchsanstalt der Universität Düsseldorf und wurden von dort bezogen.

3.1.2 Präanalytik

Die Blutgewinnung erfolgte nach Anästhesie der Tiere mit einem Barbiturat durch Punktion der Aorta oder einer großen Beckenarterie. Vor Entnahme wurde die Spritze für die Blutentnahme einmal mit Heparin ausgespült, anschließend wurde das Blut in Reagenzröhrchen umgefüllt und sofort bei 3400 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde das Plasma in Eppendorf-Cups einpipettiert, bei –20 Grad Celsius tiefgefroren und nach Auftauen unmittelbar analysiert.

3.2 Geräte

3.2.1 COBAS MIRA S

Absorptionsphotometer

Der COBAS MIRA S ist ein vollselektiver Analysator mit Reagenzienkühlung und automatischem Küvettenaustausch. Er besteht aus einem Filterphotometer mit 5

Interferenzfiltern, die auf einem Rad angeordnet sind. Die Analysenkammer ist durch ein „Luftstrom-Prinzip“ temperaturkontrolliert, dadurch wird ein schneller Hitzetransfer und eine Equilibrierung der Reaktionsmischung sichergestellt. Die schwenkbare Plattform wird mit 6 Segmenten à 12 Küvetten beladen. Im COBAS MIRA S wird ein Racksystem mit einem binären Code zum Aufnehmen von Proben, Reagenzien, Kalibratoren und Kontrollen verwendet. Durch das Pipettiersystem werden Reagenz, Probe und Verdünnungsmittel entsprechend dem jeweiligen Testprogramm in die Küvetten pipettiert. Kontamination oder Übertragen wird durch ein automatisches Spülverfahren der Reagenzspitze und Probennadel verhindert. Zwei Glasspritzen kontrollieren die Reagenz- und Probenvolumina und gewährleisten somit die Präzision. Die Lichtquelle besteht aus einer Xenon-Blitzlichtlampe, mit der die Lichtintensität für jede Wellenlänge eingestellt werden kann. Ein Filterrad mit 5 Interferenzfiltern für Messungen bei 340, 405, 500 und 600 nm rotiert vor der Lichtquelle und ermöglicht, dass innerhalb desselben Zyklus bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessen werden kann. Die Küvetten werden in einem Zyklus durch den optischen Weg gedreht. Die optischen Ablesewerte werden von der Photodiode in Absorptionseinheiten umgerechnet und später für die Berechnung verwendet. Die Analysatorkammer wird durch einen Luftstrom erwärmt und die Temperatur über einen Thermostat kontrolliert, um einen gleichmäßigen Wärmetransfer und ein Gleichgewicht der Reaktionsmischung zu gewährleisten. Messprinzip: Das Photometer dient zur Messung der Transmission und der Extinktion. Die im Photometer enthaltene Lichtquelle erzeugt polychromatisches Licht, aus dem eine bestimmte Wellenlänge oder ein Wellenlängenbereich durch ein Filter vorselektiert wird. Das monochromatische Licht strahlt in Form eines parallelen Bündels durch eine Küvette mit der entsprechenden Probe, und das austretende Licht, die Extinktion, wird gemessen.

3.2.2 Eppendorf EFOX 5053

Emissionsflammenphotometer

Der Eppendorf EFOX 5053 ist ein 4-kanaliger Elektrolytautomat mit integrierter Probenvorbereitung und automatischer Pipettierung. Er ist geeignet für die Simultanbestimmung von Na, K, Ca aus Serum oder Plasma, von Na, K und Ca aus Urin und Li aus Serum oder Plasma. Die Erzeugung der Flamme erfolgt durch das Brenngas Acetylen.

Funktions- und Messprinzip: Die Messsubstanz wird in gelöster Form fein verteilt in eine nichtleuchtende Flamme gebracht. Durch Anregung der einzelnen Atome kommt es dabei zu einem Aufleuchten der Flamme. Je mehr Atome vorhanden sind, umso stärker ist die ausgestrahlte Lichtmenge, so dass aus der Messung der Leuchtdichte der Flamme die Konzentration der Messlösung errechnet werden kann. Jedes Element hat seine charakteristische Lichtfarbe, d.h., der Aufbau des Atoms bestimmt die jeweilige Wellenlänge. Für Natrium beträgt sie 589 nm, für Kalium 768 nm und für Kalzium 622 nm. In der Probe sind mehrere Elemente gleichzeitig vorhanden, und die Flamme sendet ein Lichtgemisch aus. Mithilfe optischer Filter wird das Licht des gewünschten Elementes isoliert und gelangt auf jeweils eine Photodiode, die das Licht in ein elektrisches Signal umwandelt. Das Signal wird verstärkt, digitalisiert und mit Hilfe des nachgeschalteten Rechners in Konzentration berechnet. Die Flammenphotometrie ist ein Relativmessverfahren. Das Messsignal der unbekannten Probe wird mit dem Signal einer bekannten Standardlösung verglichen und die Probenkonzentration berechnet. Alle Proben werden automatisch 1 + 50 verdünnt, da die Konzentration von Na, K und Ca im Plasma für die direkte Bestimmung zu hoch ist. Der EFOX 5053 arbeitet nach dem Leitlinienprinzip. Es werden alle Proben mit einer Lösung verdünnt, die Lithium als Leitelement enthält. Alle Veränderungen der Zerstäubung, des Luft- und Gasdrucks wirken sich auf das Messelement (Na, K, Ca) und das Leitelement (Li) annähernd gleich aus. Während des Standardabgleichs wird die Lithiumkonzentration gemessen und „auf 1 gesetzt“. Aus jeder Lithiumänderung wird ein Korrekturfaktor berechnet, um den die jeweilige Probe korrigiert wird. Die im Rechner gespeicherte Eichkurven-Krümmung für jedes Element wird bei jedem Messwert entsprechend der Kennlinie korrigiert.

3.2.3 Behring Nephelometer II (BN II)

Nephelometer

Das BN II ist ein vollautomatisches Analysengerät zur Bestimmung von Proteinen aus Serum, Plasma, Urin, Liquor und anderen Körperflüssigkeiten mittels Nephelometrie. Die Funktionseinheiten des Analysengerätes bestehen aus der Kassettenstation, der Dispensiereinheit, zwei Transferarmen, dem Reaktionsteil und der Nasseinheit. Die Kassettenstation nimmt die Proben, Standardseren, Kontrollen und Reagenzien sowie Zusatzreagenzien auf. Sie besteht aus 15 Bahnen, die jeweils für Reagenzien, Zusatzreagenzien, Proben, Kontrollseren und Standardseren feste

Zuordnungen haben. Die Dispensiereinheit besteht aus Reagenz-Dilutor und Probendilutor, die automatisch mit Diluens, Puffer oder Waschlösung spülen. Der Analysator besitzt zwei Transferarme. Ein Transferarm ist für die Proben, der andere für die Reagenzien zuständig. Eine automatische Volumenkontrolle wird durch das Gerät vorgenommen. Während des Transfervorgangs wird die Pipettornadel auf 37 Grad Celsius vorgeheizt, damit diese Temperatur konstant in der Reaktionsküvette gewährleistet ist. Verschleppung und Kontamination werden dadurch verhindert, dass jeder Transferarm über eine eigene Waschstation verfügt. Der Reaktionsteil besteht aus der Verdünnungsstation, dem Rotor, der Optik und der Küvettenwaschstation. In der Verdünnungsstation werden die Proben, Kontrollen und Standards gemäß den Assayprotokolls verdünnt. Der Küvettenrotor ist mit 60 Küvetten, die in 5er-Segmente gegliedert sind, bestückt. Die Messungen erfolgen bei drehendem Rotor. Aus den Werten wird eine Messkurve ermittelt, an der der Messwert zu einem genauen Zeitpunkt abgelesen wird. Die Küvetten werden anschließend automatisch gereinigt. Der Nassteil besteht aus dem Vakuumtank, für die Absaugvorgänge, dem Abwassertank und den Vorratsflaschen.
Funktion der Optik und Messprinzip: Bei der Nephelometrie wird das Licht gemessen, das an den Antigen-Antikörper-Komplexen gestreut wird. Die Intensität des Streulichtes ist unter bestimmten Bedingungen proportional der Menge der Antigen-Antikörper-Komplexe in der Probe. Wird die Antikörpermenge konstant gehalten, ist das Signal proportional der Antigenmenge. Durch einen Standard mit bekanntem Antigengehalt wird eine Referenzkurve erzeugt, an der Streulichtsignale der Proben ausgewertet und als Antigenkonzentration berechnet werden können. Gibt man in eine Küvette eine antigenhaltige Probe und das korrespondierende Antiserum, bilden sich Antigen-Antikörper-Komplexe. Mit einer Leuchtdiode wird ein Lichtstrahl erzeugt, der durch die Küvette geschickt wird. Das Licht wird an den vorhandenen Immunkomplexen gestreut.
Eingangsmessung: Antigen und Antikörper sind gemischt, es liegt aber noch keine Komplexbildung vor.
Endmessung: Antigen-Antikörper-Komplex ist gebildet. Das Ergebnis errechnet sich aus derDifferenz von Endmessung und Eingangsmessung. Die Intensivitätsverteilung des Streulichtes ist von dem Verhältnis der Partikelgröße der Antigen-Antikörper-Komplexe zur eingestrahlten Wellenlänge abhängig. Beim BN II wird eine Lichtquelle verwendet, die elektromagnetische Wellen mit einer Wellenlänge von 840 nm

aussendet. Der Lichtstrahl ist nahezu parallel und trifft auf die Küvette, hier wird er durch ein Linsensystem gestreut und in einem Raumwinkel zwischen 13 und 24 Grad mit einer Hybriddiode (Detektor) gemessen. Der Detektor wandelt das Streulicht in ein elektrisches Signal um, das der Proteinkonzentration der Probe proportional ist. Die Signale werden digitalisiert, mit den entsprechenden Messwerten der Referenzkurve verglichen und in Proteinkonzentration umgerechnet.

3.3 Methoden

3.3.1 Parameter

Natrium
Kalium
Kalzium
Kreatinin
Harnstoff
Harnsäure
Gesamtbilirubin
Gesamteiweiß
Laktat
Cholesterin
Triglyceride
Glukose
Cystatin C
CK
ALT (GPT)
AST (GOT)
GGT (γ-GT)
α-Amylase
LDH
AP

3.3.1.1 Natrium, Kalium und Kalzium

Testprinzip:
Die Emissionen von Natrium erfolgten bei 589 nm, von Kalium bei 768 nm und von Kalzium bei 622 nm; sie wurden am Emissionsflammenphotometer Eppendorf EFOX

5053 bestimmt. Dieses Messverfahren ermöglicht, wie oben beschrieben, die quantitative Bestimmung von Alkali- bzw. Erdalkalimetallen in einer Lösung aufgrund der Emission von Strahlung charakteristischer Wellenlänge nach thermischer Anregung.

Messbereich:
Na: 80,0 – 180,0 mmol/l
K: 1,00 – 9,99 mmol/l
Ca: 1,00 – 5,00 mmol/l

Analytische Sensitivität:
Na: 80,0 mmol/l
K: 1,00 mmol/l
Ca: 1,00 mmol/l

3.3.1.2 Kreatinin

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
CREA. Kinetischer Farbtest, modifizierte Jaffé-Reaktion (POPPER, 1937)(SEELIG, 1969)(BARTHELS, 1972).
Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrat einen gelborange gefärbten Komplex. Dessen Farbintensität wird direkt proportional der Kreatininkonzentration photometrisch bei 505 nm gemessen. Um richtige Werte zu erhalten, wird die Messung in einem Zeitfenster durchgeführt. Um die Messung von Pseudokreatininen weitestgehend zu verhindern, geht die Anfangs- und Endreaktion nicht in die Messung ein.

Kreatinin + Pikrinsäure $\xrightarrow{\text{alkalische Lösung}}$ Kreatinin-Pikrinsäure-Komplex

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung innerhalb +/-10 % der anfänglichen Kreatininkonzentration von 1 mg/dl in Serum.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index von 10 (ca. 10 mg/dl konjugiertes Bilirubin).

Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 750 (ca. 750 mg/dl Hämoglobin).
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen dem L-Index (entspricht der Trübung) und der Triglyceridkonzentration. Keine wesentliche Beeinflussung von Aceton bis 50 mg/dl, Acetacetat bis 20 mmol/l und Beta-Hydroxybutyrat bis 25 mmol/l. Antibiotika mit Cephalosporin führen zu signifikant falsch positiven Werten. Es wird über negativ abweichende Werte durch zeitweilig auftretende Trübungen während der Anfangsreaktion berichtet. Dieser Effekt korreliert mit den erhöhten Triglyceriden in der Serumprobe. Der Effekt verschwindet, wenn man die Probe über Nacht stehen lässt.

Messbereich:
0,2 – 25 mg/dl

Analytische Sensitivität:
0,2 mg/dl

3.3.1.3 Harnstoff

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
UREA/BUN. Kinetischer UV-Test (TALKE, 1965).
Vollenzymatische Methode zur Bestimmung von Harnstoff unter Verwendung des gekoppelten Enzymsystems Urease/Glutamat-Dehydrogenase (GLDH). Harnstoff wird durch Urease zu CO_2 und Ammoniak hydrolysiert. Das gebildete Ammoniak reagiert anschließend mit α-Ketoglutarat und NADH in Gegenwart von GLDH und NAD^+. Die Extinktionsabnahme durch den Verbrauch von NADH wird anschließend kinetisch bei 340 nm gemessen.

$$\text{Harnstoff} + H_2O \xrightarrow{\text{Urease}} 2\ NH_4 + CO_2$$

$$\alpha\text{-Ketoglutarat} + NH_4^+ + \text{NADH} \xrightarrow{\text{GLDH}} \text{L-Glutamat} + NAD^+ + H_2O$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 60 (ca. 60 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).
Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 1000 (ca. 1000 mg/dl Hämoglobin).
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen dem L-Index (entspricht der Trübung) und der Triglyceridkonzentration.
Ammoniak stört die Harnstoff-Bestimmung. Monoklonale Gammopathien können in seltenen Fällen zu falschen Ergebnissen führen.

Messbereich:
5 – 400 mg/dl

Analytische Sensitivität:
5 mg/dl Harnstoff

3.3.1.4 Harnsäure

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
UA plus. Enzymatischer Farbtest (TOWN, 1985).
Eingesetzt wird das Enzym Uricase zur Oxidation von Harnsäure. Harnsäure wird mit Uricase zu Allantoin umgesetzt, wobei neben Kohlendioxid auch Wasserstoffperoxid entsteht. Wasserstoffperoxid bildet unter der katalytischen Wirkung von Peroxidase mit Phenolderivaten wie TOOS und PAP einen roten Chinonfarbstoff, der bei 546 nm photometrisch gemessen werden kann.

$$\text{Harnsäure} + 2\,H_2O + O_2 \xrightarrow{\text{Uricase}} \text{Allantoin} + CO_2 + H_2O_2$$

$$2\,H_2O_2 + H^+ + \text{TOOS} + \text{4-Aminophenazon} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Chinondiimin-Farbstoff} + 4\,H_2O$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I 40
(ca. 40 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).
Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 1000
(ca. 1000 mg/dl Hämoglobin).
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 1000
(ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.
Ascorbinsäure < 30 mg/dl stört nicht. Von den in vitro untersuchten Medikamenten wurden im therapeutischen Bereich α-Methyldopa, Desferoxamin und Calciumdobesilat zu niedrige Harnsäurewerte gefunden. Uricase reagiert spezifisch mit Harnsäure. Andere Purinabkömmlinge können die Harnsäurereaktion hemmen.

Messbereich:
0,2 – 25 mg/dl

Analytische Sensitivität:
0,2 mg/dl

3.3.1.5 Gesamtbilirubin

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
BIL-T. Farbtest. Bestimmung der Gesamtbilirubin Konzentration nach der DPD-Methode in Serum und Plasma (WAHLEFELD, 1972).
Gesamtbilirubin wird mit einer Diazoniumverbindung zu Azobilirubin umgewandelt. Indirektes Bilirubin in der Probe wird durch ein Detergenz freigesetzt. Die Extinktion des entstandenen Azobilirubins wird bei 570 nm gemessen.

$$\text{Bilirubin} + \text{Diazonium} \xrightarrow{\text{pH 1-2}} \text{Azobilirubin}$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert. Lipämie stört. Hämolyse stört bei Proben von Erwachsenen. Hämolyse (bis ca. 350 mg/dl) stört nicht in

neonatalen Proben.
Indikan: keine wesentliche Beeinflussung durch Indikan bis zu Konzentrationen von 0,2 mmol/l. Bei höheren Indikankonzentrationen, die bei Niereninsuffizienz auftreten können, werden falsch erhöhte Bilirubinwerte gemessen. Bei 18 häufig verwendeten, in vitro getesteten Pharmaka führte nur Cyclosporin in therapeutischen Konzentrationen zu erniedrigten Wiederfindungen (ca. 10 %).

Messbereich:
0,1 – 30 mg/dl

Analytische Sensitivität:
0,1 mg/dl

3.3.1.6 Gesamteiweiß

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
TP. Farbtest, Biuretmethode.
Zweiwertiges Kupfer reagiert in alkalischer Lösung mit der Peptidbindung der Eiweiße zum charakteristischen purpurfarbenen Biuretkomplex. Mit Natrium-Kalium-Tartrat wird die Ausfällung des Kupfers verhindert. Die Farbintensität ist direkt proportional zur Eiweißkonzentration, die photometrisch bei 546 nm gemessen wird.

$$\text{Eiweiß} + Cu^{2} \xrightarrow{\text{alkalische Lösung}} \text{Cu-Eiweiß-Komplex}$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung innerhalb +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 21 (ca. 21 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).
Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 650 (650 mg/dl Hämoglobin). Diese Störung beruht darauf, dass Hämoglobin als Protein in der Gesamteiweiß-Bestimmung miterfasst wird.
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.

Keine Störung bis 30 mg/dl Dextran.

Messbereich:
0,2 – 15 g/dl

Analytische Sensitivität:
0,2 g/dl

3.3.1.7 Laktat

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma ABX Pentra.
Lactic Acid. Enzymatisch-kolorimetrische Methode. Trinder-Methode.
Laktatoxidase bewirkt die Freisetzung von Wasserstoffperoxid, das bei Vorhandensein von Peroxidase mit Amino-4-Antipyrin und N-Ethyl-N-Sulfopropyl-m-Anisidin zu einem Farbkomplex reagiert. Die Intensität der Färbung ist proportional zum Laktatgehalt der Probe.

$$\text{L-Laktat} + O_2 \xrightarrow{\text{Laktatoxidase}} \text{Pyruvat} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{Amino-4-Antipyrin} + \text{N-Ethyl-N-Sulfopropyl-m-Anisidin} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{Chinonimin} + 4\ H_2O_2$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung durch Gesamtbilirubin bis 26 mg/dl und direktem Bilirubin von 36 mg/dl.
Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung durch Hämoglobin bis zu einer Konzentration von 290 µmol/l Hämoglobin.
Lipämie: keine wesentliche Beeinflussung durch Triglyceride bis zu einer Konzentration unter 612,5 mg/dl.

Messbereich:
0,03 – 13 mmol/l

Analytische Sensitivität:
0,03 mmol/l

3.3.1.8 Cholesterin

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
CHOL. Enzymatischer Farbtest. Cholesterin CHOD-PAP (ALLAIN, 1974)(ROESCHLAU, 1974).
Die Cholesterinester werden unter der Einwirkung von Cholesterinesterase in freies Cholesterin und Fettsäuren hydrolysiert. Das Cholesterin wird von Sauerstoff unter Katalyse mittels Cholesterinoxidase zu Δ4-Cholestenon und Wasserstoffperoxid umgesetzt.
Das Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und Phenol einen roten Farbstoff, dessen Farbintensität der Cholesterinkonzentration direkt proportional ist und bei 505 nm photometrisch gemessen wird.

$$\text{Cholesterinester} + H_2O \xrightarrow{\text{Cholesterinesterase}} \text{Cholesterin} + \text{RCOOH}$$

$$\text{Cholesterin} + O_2 \xrightarrow{\text{Cholesterinoxidase}} \Delta^4\text{-Cholestenon}$$

$$2\ H_2O_2 + \text{4-Aminophenazon} + \text{Phenol} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{4-p-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon} + 4\ H_2O$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 25 konjugiertes Bilirubin (ca. 25 mg/dl) und Index I von 10 unkonjugiertes Bilirubin (ca. 10 mg/dl).
Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 700 (ca. 700 mg/dl Hämoglobin).
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 1250 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.

Messbereich:
3 – 800 mg/dl

Analytische Sensitivität:
3 mg/dl

3.3.1.9 Triglyceride

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
TG. Enzymatischer Farbtest. Triglyceride GPO-PAP (WAHLEFELD, BERGMEYER, 1974).
Triglyceride werden mittels Lipoproteinlipase (LPL) zu Glycerin und Fettsäuren (RCOOH) hydrolysiert. Katalysiert durch Glycerokinase (GK) wird das Glycerin unter ATP-Verbrauch zu Glycerin-3-phosphat phosphoryliert und Letzteres unter Einwirkung von GPO oxidiert. Dabei entsteht neben Dihydroxyacetonphosphat Wasserstoffperoxid. Das Wasserstoffperoxid bildet mit 4-Aminophenazon und Phenol einen roten Farbstoff, dessen Farbintensität der Triglyceridkonzentration direkt proportional ist und bei 505 nm photometrisch gemessen wird.

$$\text{Triglyceride} + 3\ H_2O \xrightarrow{\text{Lipoproteinlipase}} \text{Glycerin} + 3\ \text{RCOOH}$$

$$\text{Glycerin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Glycerokinase}} \text{Glycerin-3-Phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glycerin-3-Phosphat} + O_2 \xrightarrow{\text{Glycerinphosphatoxidase}} \text{Dihydroxyacetonphosphat} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + \text{4-Aminophenazon} + \text{4-Chlorphenol} \xrightarrow{\text{Peroxidase}} \text{4-p-(p-Benzochinon-monoimino)-phenazon} + 2\ H_2O + HCl$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 12 konjugiertes Bilirubin (ca. 12 mg/dl) und Index I von 27 unkonjugiertes Bilirubin (ca. 27 mg/dl).

Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 600 (ca. 600 mg/dl Hämoglobin).
Lipämie: Der L-Index korreliert mit der Trübung der Probe nicht jedoch mit den Triglyceridwerten.

Messbereich:
4 – 1000 mg/dl

Analytische Sensitivität:
4 mg/dl

3.3.1.10 Glukose

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
GLU. UV-Test. Gluco-quant, Hexokinase-Methode (SCHMIDT, 1961)(PETERSON, 1958).
Glukose wird durch ATP und Hexokinase zu Glukose-6-Phosphat phosphoryliert. Glukose-6-Phophat wird in Gegenwart von NADP durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase zur Glukonat-6-Phosphat oxidiert. Andere Kohlenhydrate werden nicht oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADPH-Zunahme ist direkt proportional der Glukosekonzentration und wird photometrisch bei 340 nm gemessen.

$$\text{Glukose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glukose-6-Phosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{Glukose-6-Phosphat} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase}} \text{Glukonat-6-Phosphat} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 60
(ca. 60 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).
Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 1000
(ca. 1000 mg/dl Hämoglobin).

Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zu einem Index L von 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.

Messbereich:
2 – 750 mg/dl
Analytische Sensitivität:
2 mg/dl

3.3.1.11 Cystatin C

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Dade Behring.
N Latex Cystatin C. Immunnephelometrie.
Polystyrol-Partikeln, die mit spezifischen Antikörpern gegen Cystatin C beladen sind, bilden bei Kontakt mit Cystatin C Aggregate, an denen eingestrahltes Licht gestreut wird. Die Intensität des Streulichtes ist abhängig von der Konzentration des Cystatin C. Die Auswertung erfolgt durch Vergleich mit einem Standard bekannter Konzentration.

Einschränkungen des Verfahrens:
Trübungen und Partikeln können die Bestimmung stören. Deshalb müssen Proben, die Partikeln enthalten, vor der Bestimmung zentrifugiert werden. Stark lipämische Proben müssen zentrifugiert werden.

Der Messbereich hängt von den Verdünnungsstufen ab. Eine maximale Verdünnung von 1 : 160000 am BN II ist möglich.
Bei einer Verdünnung von 1 : 100 liegt der Messbereich bei 0,26 bis 8,25 mg/l.

Analytische Sensitivität:
Die Nachweisgrenze ist von der Verdünnungsstufe abhängig. Eine maximale Verdünnung von 1 : 160000 ist am BN II möglich.

3.3.1.12 CK

Testprinzip:

Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.

CK. UV-Test. Kreatinkinase, gemäß IFCC (OLIVER, 1955)(ROSALKI, 1967)(SZASZ, 1976).

Die CK katalysiert die reversible Übertragung der Phosphatgruppe von Kreatinphosphat auf ADP. Das entstehende ATP wird im kombinierten optischen Test mit Hexokinase als Hilfsenzym und Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase als Indikatorenzym bestimmt. Messgröße ist die Zunahme der Konzentration von $NADPH_2$, deren Geschwindigkeit bei 340 nm photometrisch gemessen wird und die der Aktivität der Gesamt-CK direkt proportional ist.

Das durch Oxidation von SH-Gruppen deaktivierte CK der Probe wird durch Zusatz von NAC reaktiviert. Bezogen auf die äquimolaren Mengen verläuft die Bildung von NADPH und Kreatin mit der gleichen Geschwindigkeit. Die Geschwindigkeit der photometrisch gemessenen NADPH-Bildung ist der CK-Aktivität proportional.

$$\text{Kreatinphosphat} + \text{ADP} \xrightarrow{\text{CK}} \text{Kreatin} + \text{ATP}$$

$$\text{Glukose} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{Hexokinase}} \text{Glukose-6-P} + \text{ADP}$$

$$\text{Glukose-6-P} + \text{NADP}^+ \xrightarrow{\text{Glukose-6-P-Dehydrogenase}} \text{Glukonat-6-P} + \text{NADPH} + \text{H}^+$$

Einschränkungen des Verfahrens:

Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.

Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 60
(ca. 60 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).

Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 100
(ca. 100 mg/dl Hämoglobin).

Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zu einem Index L von 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.

Messbereich:
3 – 2300 U/l

Analytische Sensitivität:
3 U/l

3.3.1.13 ALT (GPT)

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
ALT (ALAT/GPT). Gekoppelter UV-Test mit LDH (nach IFCC, mit Pyridoxalphosphat); Substratstart (WROBLEWSKI, 1956)(BERGMEYER, 1985).

L-Alanin + Pyridoxalphosphat-Enzymkomplex $\rightarrow$
Pyruvat + Pyridoxaminphosphat-Enzymkomplex

α-Ketoglutarat + Pyridoxaminphosphat-Enzymkomplex $\rightarrow$
L-Glutamat + Pyridoxalphosphat-Enzymkomplex

Pyridoxalphosphat dient als Coenzym für den Transfer der Aminogruppe von einer Aminosäure (Alanin) über die entsprechende α-Ketosäure (α-Ketoglutarat), die dadurch in eine Aminosäure (L-Glutaminsäure) umgewandelt wird. Dabei entsteht aus Alanin das Pyruvat. Das Zufügen von Pyridoxalphosphat zum Reaktionsgemisch sichert die maximale katalytische Enzymaktivität. Die Zugabe von α-Ketoglutarat sichert die Wiederfreisetzung von Pyridoxalphosphat, so dass die Transaminasenreaktion erneut in Gang gesetzt werden kann. Die Pyruvatzunahme wird in der gekoppelten, durch Laktat-Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion bestimmt.

Indikatorreaktion:
Pyruvat + NADH + H^+ $\xrightarrow{\text{Laktat-Dehydrogenase}}$ L-Laktat + NAD^+

Die Geschwindigkeit der photometrisch bei 340 nm gemessenen Extinktionsabnahme durch NADH-Verbrauch ist direkt proportional der Bildungsgeschwindigkeit von Pyruvat und damit der ALT-Aktivität.

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 60 (ca. 60 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).
Hämolyse: Hämolyse stört aufgrund der ALT-Aktivität in den Erythrozyten.
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zu einem Index L von 500 (ca. 1000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.

Messbereich:
4 – 600 U/l

Analytische Sensitivität:
4 U/l

3.3.1.14 AST (GOT)

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
AST (ASAT/GOT). Gekoppelter UV-Test mit MDH (nach IFCC, mit Pyridoxalphosphat); Substratstart (BERGMEYER, 1985).

L-Aspartat + Pyridoxalphosphat-Enzymkomplex $\rightarrow$
Oxalacetat + Pyridoxaminphosphat-Enzymkomplex

α-Ketoglutarat + Pyridoxaminphosphat-Enzymkomplex $\rightarrow$
L-Glutamat + Pyridoxalphosphat-Enzymkomplex

Pyridoxalphosphat dient als Coenzym für den Transfer der Aminogruppe von einer

Aminosäure (Aspartat) über die entsprechende α-Ketosäure zu einer anderen Aminosäure (Glutamat). Dabei entsteht aus Apartat das Oxalacetat. Das Zufügen von Pyridoxalphosphat zum Reaktionsgemisch sichert die maximale katalytische Enzymaktivität. Durch die Zugabe von α-Ketoglutarat wird Pyridoxalphosphat wieder freigesetzt, so dass die Transaminasenreaktion erneut in Gang gesetzt werden kann. Die Oxalacetatzunahme wird in der gekoppelten, durch Malat-Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion bestimmt.

Indikatorreaktion:

$$\text{Oxalacetat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \xrightarrow{\text{Malat-Dehydrogenase}} \text{L-Malat} + \text{NAD}^+$$

Die Geschwindigkeit der photometrisch bei 340 nm gemessenen Extinktionsabnahme durch NADH-Verbrauch ist direkt proportional der Bildungsgeschwindigkeit von Oxalacetat und damit der AST-Aktivität.

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 60
(ca. 60 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin).
Hämolyse: Hämolyse stört aufgrund der AST-Aktivität in den Erythrozyten.
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zu einem Index L von 500 (ca. 1000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.
In sehr seltenen Fällen kann eine monoklonale Gammopathie zu falschen Testergebnissen führen.

Messbereich:
4 – 800 U/l

Analytische Sensitivität:
4 U/l

3.3.1.15 GGT (γ-GT)

Testprinzip:

Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.

GGT. Enzymatischer Farbtest, modifiziert von Roche (SZASZ, 1969).

Die Gamma-Glutamyl-Transferase überträgt den γ-Glutamylrest von L-γ-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid auf Glycylglycin. Das dabei freigesetzte 5-Amino-2-nitrobenzoat ist proportional der GGT-Aktivität und wird photometrisch bei 405 nm gemessen.

L-γ-Glutamyl-3-carboxy-4-nitroanilid + Glycylglycin $\xrightarrow{GGT}$

L-γ-Glutamyl-glycylglycin + 5-Amino-2-nitrobenzoat

Einschränkungen des Verfahrens:

Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.

Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 40 unkonjugiertes Bilirubin (ca. 40 mg/dl) und Index I von 50 konjugiertes Bilirubin (ca. 50 mg/dl).

Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 200 (ca. 200 mg/dl Hämoglobin).

Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zu einem Index L von 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.

Messbereich:

3 – 1200 U/l

Analytische Sensitivität:

3 U/l

3.3.1.16 α-Amylase

Testprinzip:

Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.

AMYL. Enzymatischer Farbtest. α-Amylase nach IFCC (KRUSE-JARRES, 1989).

$$5\ \text{Ethyliden-}G_7\text{PNP} + 5\ H_2O \xrightarrow{\alpha\text{-Amylase}}$$
$$2\ \text{Ethyliden-}G_5 + 2\ G_2\text{PNP} + 2\ \text{Ethyliden-}G_4 + 2\ G_3\text{PNP} + \text{Ethyliden-}G_3 + G_4\text{PNP}$$

Definierte Oligosaccharide wie 4,6-Ethyliden-(G_7) p-nitrophenyl-(G_1)- α,D-maltoheptaosid (Ethyliden-G_7PNP) werden unter katalytischer Einwirkung von α-Amylasen gespalten. Die gebildeten Fragmente G_2PNP, G_3PNP und G_4PNP werden durch α-Glukosidase vollständig zu p-Nitrophenol und Glukose hydrolysiert.

$$2\ G_2\text{PNP} + 2\ G_3\text{PNP} + 2\ G_4\text{PNP} + 14\ H_2O \xrightarrow{\alpha\text{-Glukose-Oxidase}} 5\ \text{PNP} + 14\ G$$

(PNP = p-Nitrophenol; G = Glukose)

Die Farbintensität des gebildeten p-Nitrophenols ist direkt proportional der α-Amylase-Aktivität und wird photometrisch bei 415 nm gemessen.

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 60 (ca. 60 mg/dl unkonjugiertes Bilirubin).
Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index H von 500 (ca. 500 mg/dl Hämoglobin).
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zu einem Index L von 1500 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.
Antikoagulantien: Citrat und Fluorid stören den Test.
Glukose: Keine Störung bis 2000 mg/dl Glukose. Bei Glukosekonzentrationen von 4500 mg/dl wird ca. 10 % weniger α-Amylase gefunden.
Ascorbinsäure: Keine Störung bis 100 mg/dl. Bei Ascorbinsäurekonzentrationen von 880 mg/dl wird ca. 10 % weniger α-Amylase gefunden.

Messbereich:
3 – 1500 U/l

Analytische Sensitivität:
3 U/l

3.3.1.17 LDH

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma Roche.
LDH. UV-Test. Laktatdehydrogenase nach IFCC (VAN DER HEIDEN, 1994).
Die Laktatdehydrogenase katalysiert die Umwandlung von L-Laktat zu Pyruvat, dabei wird NAD zu NADH reduziert. Die Bildungsgeschwindigkeit von NADH ist direkt proportional zu der katalytischen LDH-Aktivität. Die Extinktionszunahme wird photometrisch bei 340 nm gemessen.

$$\text{L-Laktat} + NAD^+ \xrightarrow{LDH} \text{Pyruvat} + NADH + H^+$$

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 60 (ca. 60 mg/dl unkonjugiertes Bilirubin).
Hämolyse: Hämolyse stört aufgrund der LDH-Aktivität in den Erythrozyten.
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zu einem Index L von 1000 (ca. 2000 mg/dl Triglyceride). Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen Trübung und Triglyceridkonzentration.
In sehr seltenen Fällen kann eine monoklonale Gammopathie zu falschen Testergebnissen führen, insbesondere vom Typ IgM.

Messbereich:
5 – 1000 U/l

Analytische Sensitivität:
5 U/l

3.3.1.18 AP

Testprinzip:
Angewendet wurde ein Test der Firma ABX Pentra.

ALP. Farbtest nach IFCC (HAUSAMEN, 1967).
p-Nitrophenyl-Phosphat wird in Gegenwart von Magnesium- und Zinkionen durch Phosphatasen in Phosphat und p-Nitrophenol gespalten. Das dabei freigesetzte p-Nitrophenol wird bei 450 nm gemessen und ist proportional der AP-Aktivität.

p-Nitrophenylphosphat + $H_2O \xrightarrow{AP}$ Phosphat + p-Nitrophenol

Einschränkungen des Verfahrens:
Bewertung: Wiederfindung +/- 10 % vom Ausgangswert.
Ikterus: keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index I von 70 (konjugiertes Bilirubin und unkonjugiertes Bilirubin) entsprechend ca. jeweils 70 mg/dl konjugiertes und unkonjugiertes Bilirubin.
Hämolyse: keine wesentliche Beeinflussung bis zu einem Index H von 500 (ca. 500 mg/dl Hämoglobin).
Lipämie (Intralipid): keine wesentliche Beeinflussung bis zum Index L von 2000.
Es besteht keine zufriedenstellende Übereinstimmung zwischen dem Index L (entspricht der Trübung) und der Triglyceridkonzentration.

Messbereich:
1-1200 U/l

Analytische Sensitivität:
0,67 U/l

3.4 Kalibration

COBAS MIRA S: Die Kalibration erfolgte mit dem Multikalibrator C.f.a.s. (Calibrator for automated systems, Fa. Roche) mittels 2-Punkt-Kalibration für alle gemessenen Parameter.
EFOX 5053: Die Kalibration erfolgt automatisch beim Starten des Gerätes. Bei längerer Inbetriebnahme erfolgt nach 15 Minuten eine Autokalibration bei entsprechender Eingabe in der Applikation. Bei einer fehlerhaften Kalibration ertönt ein Warnsignal und die Kalibration muss mit neu abgefülltem Standard wiederholt werden.

BN II: Der Kalibrator von Dade Behring Protein Standard UY 049839 wurde in einer 6-Punkt-Kalibration eingesetzt. Eine Abweichung von maximal 5 % ist zulässig.

3.5 Qualitätskontrolle

COBAS MIRA S: Die Kontrollen erfolgten mit Precinorm U (Fa. Roche) für normale Bereiche und Precipath U für hohe Bereiche. Die Kontrollintervalle wurden bei Beginn einer Messreihe durchgeführt und waren innerhalb der definierten Grenzen.
EFOX 5053: Es wurden die Kontrollen Lyphochek (Fa. Bio-Rad) Level 1 Assayed Chemistry Control für den normalen Bereich und Lyphochek Level 2 Assayed Chemistry Control für den abnormalen Bereich eingesetzt. Die Kontrollintervalle erfolgten zu Beginn einer Messreihe und waren innerhalb der definierten Grenzen.
BNII: Spezielle im Testkid enthaltene Cystatin C Kontrollen (Fa. Dade Behring) wurden eingesetzt, jeweils mit einem Zielwert im normalen Bereich (1,1 mg/l) und im hohen Bereich (2,13 mg/l). Die Kontrollintervalle erfolgten zu Beginn einer Messreihe und waren innerhalb der definierten Grenzen.

3.6 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde durch das Programm SPSS ausgeführt. Es wurden Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und angegeben. Die Darstellung erfolgte mittels Boxplots mit Kennzeichnung des Medians, des Interquartilbereiches, Minimum und Maximum und Extremfällen. Aufgrund der Anzahl der Individuen und der Tatsache, dass viele klinisch-chemischen Parameter keiner Normalverteilung unterliegen, wurde diese Darstellung gewählt. Ausreißer, z.B. durch präanalytische Fehler, Messfehler oder wirkliche Extremwerte, wurden durch Wiederholungsmessungen kontrolliert und nach Überprüfung nicht in die Statistik mit einbezogen.

4 Ergebnisse

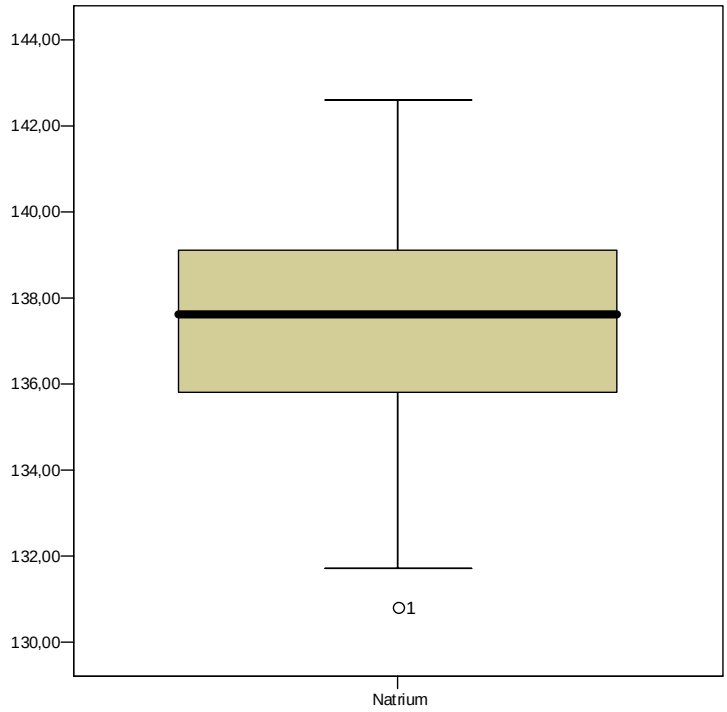
Die ermittelten Ergebnisse sind jeweils als Boxplots dargestellt. Keine Boxplots wurden für das Bilirubin bei den Wistarratten und für die GGT bei den Wistarratten und C57BL/6-Mäusen erstellt, da die Werte größtenteils unter der Nachweisgrenze lagen.

4.1 Wistarratten

4.1.1 Männlich

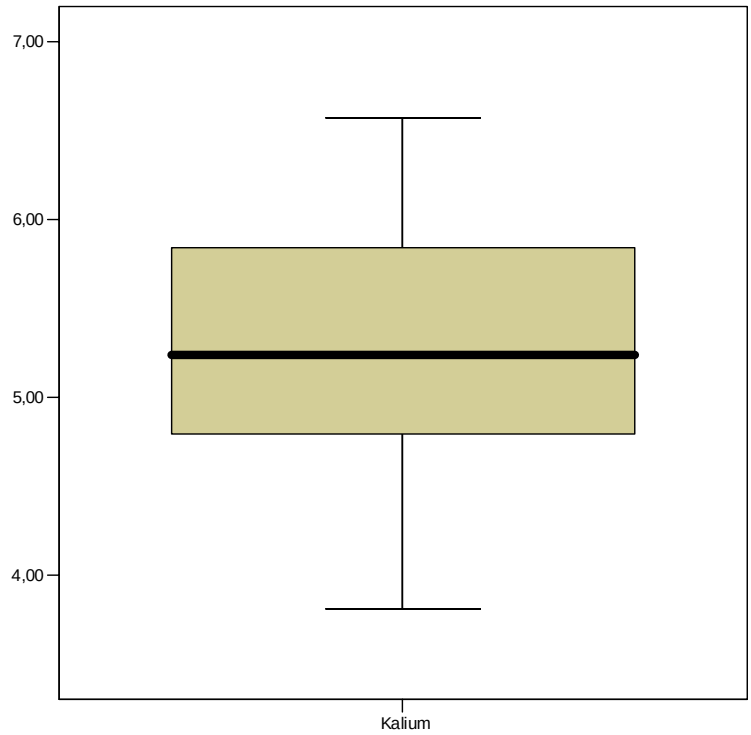
Natrium

Mittelwert 137,2mmol/l, Standardabweichung 2,6 mmol/l



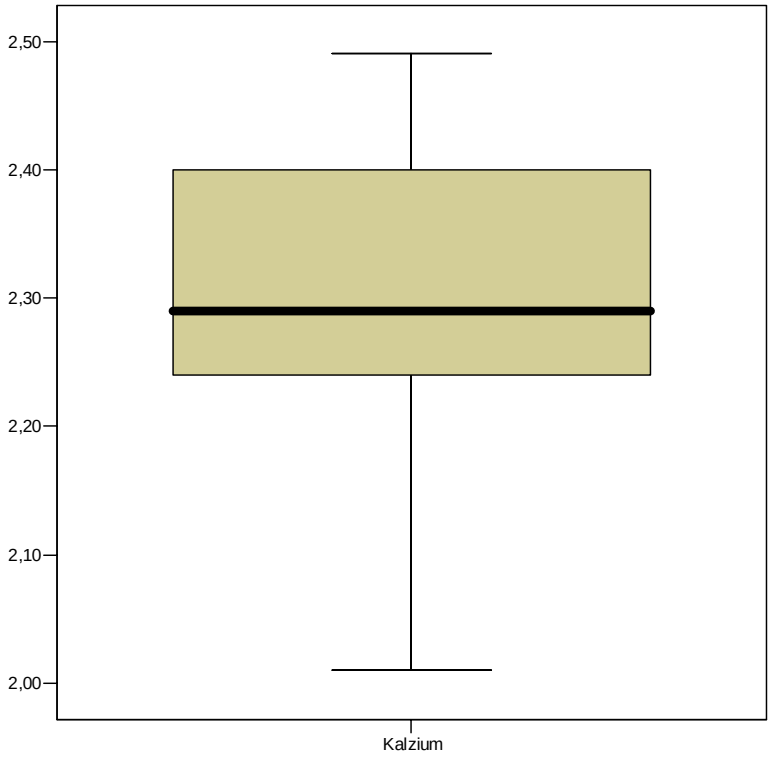
Kalium

Mittelwert 5,31 mmol/l, Standardabweichung 0,71 mmol/l



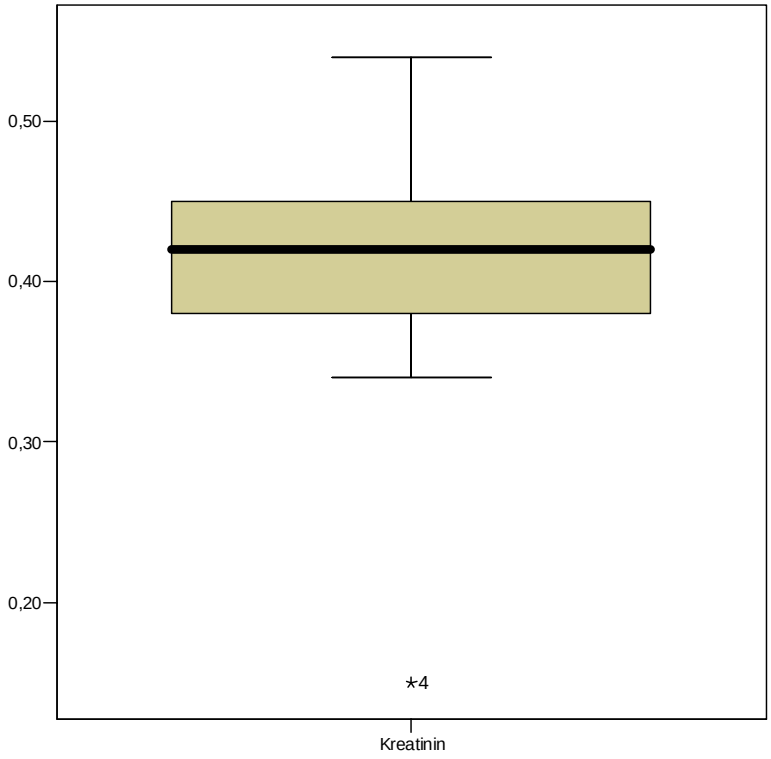
Kalzium

Mittelwert 2,30 mmol/l, Standardabweichung 0,11 mmol/l



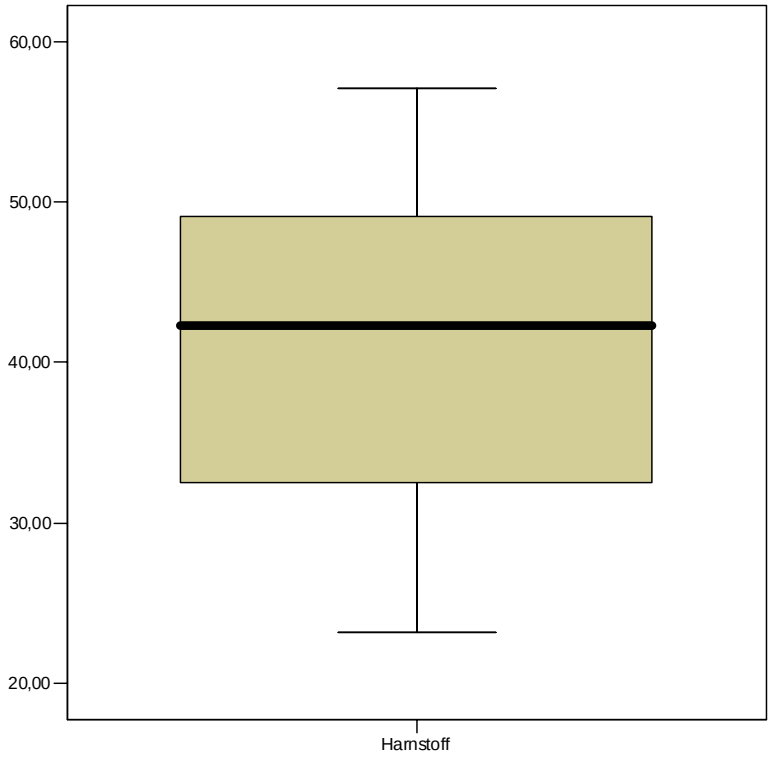
Kreatinin

Mittelwert 0,42mg/dl, Standardabweichung 0,73 mg/dl



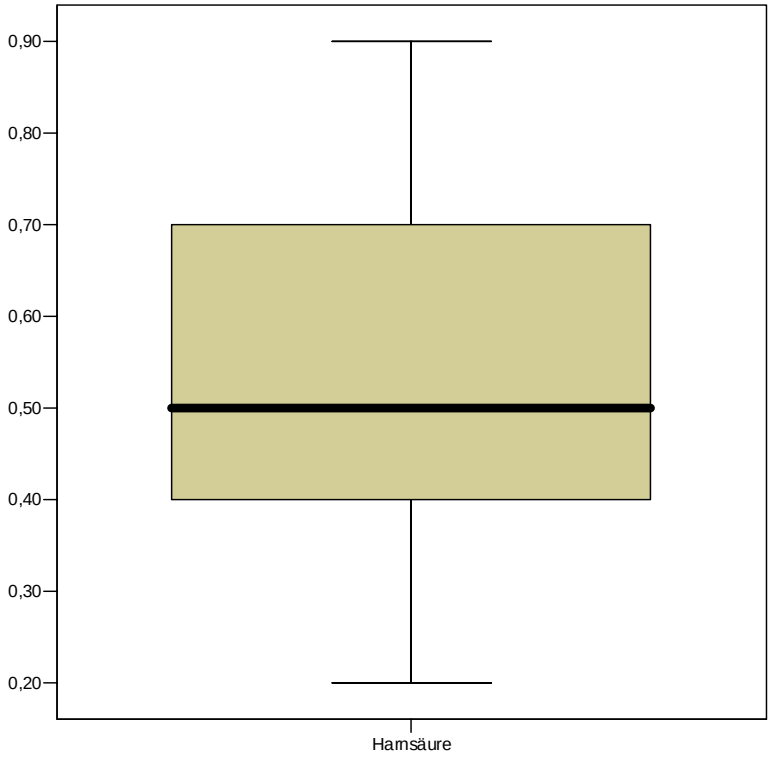
Harnstoff

Mittelwert 40,5 mg/dl, Standardabweichung 9,8 mg/dl



Harnsäure

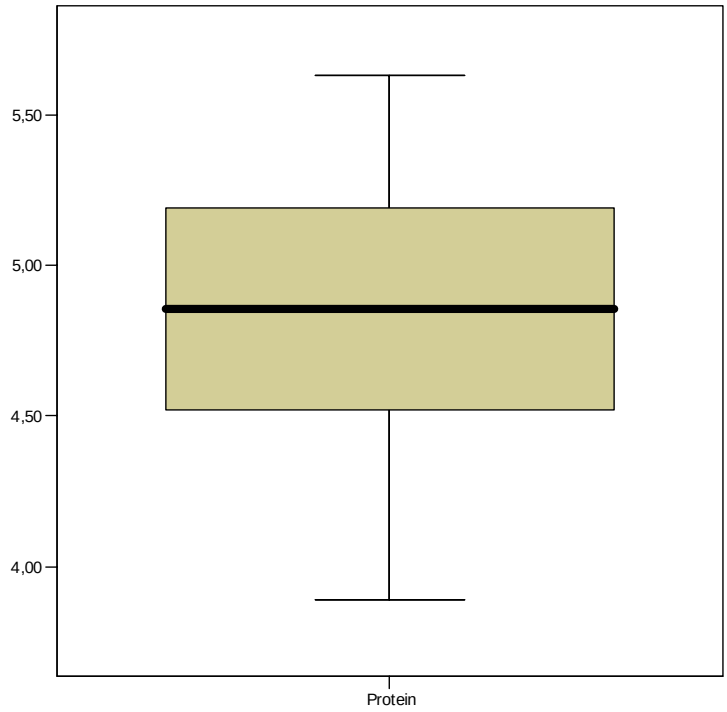
Mittelwert 0,52mg/dl, Standardabweichung 0,19 mg/dl



Bilirubin gesamt: < 0,1 mg/dl

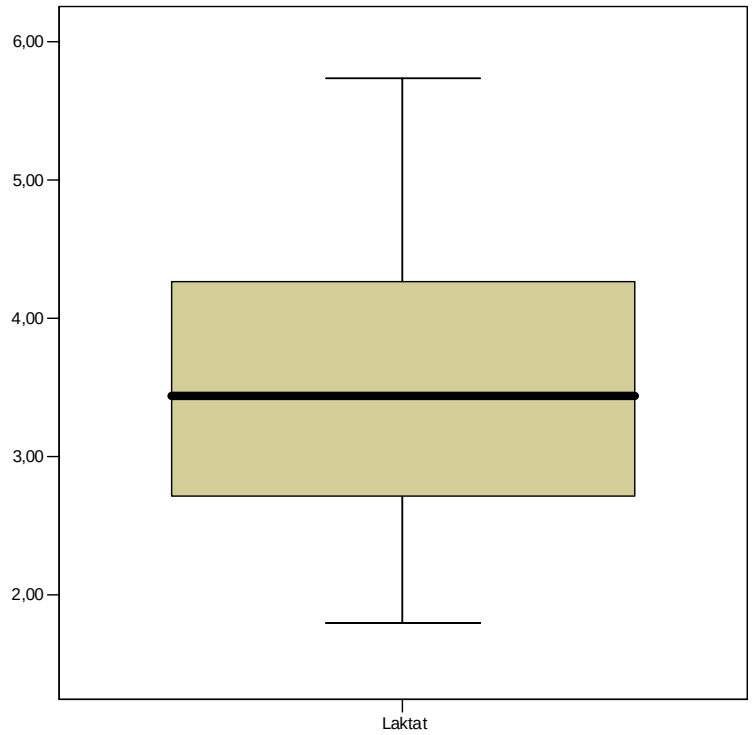
Gesamteiweiß

Mittelwert 4,81 g/dl, Standardabweichung 0,48 g/dl



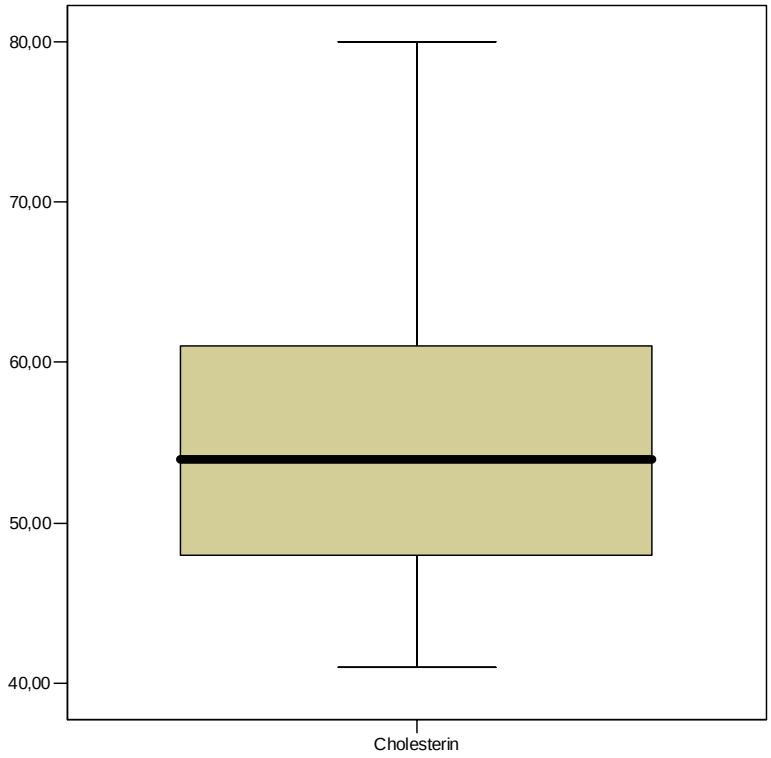
Laktat

Mittelwert 3,54 mmol/l, Standardabweichung 1,07 mmol/ll



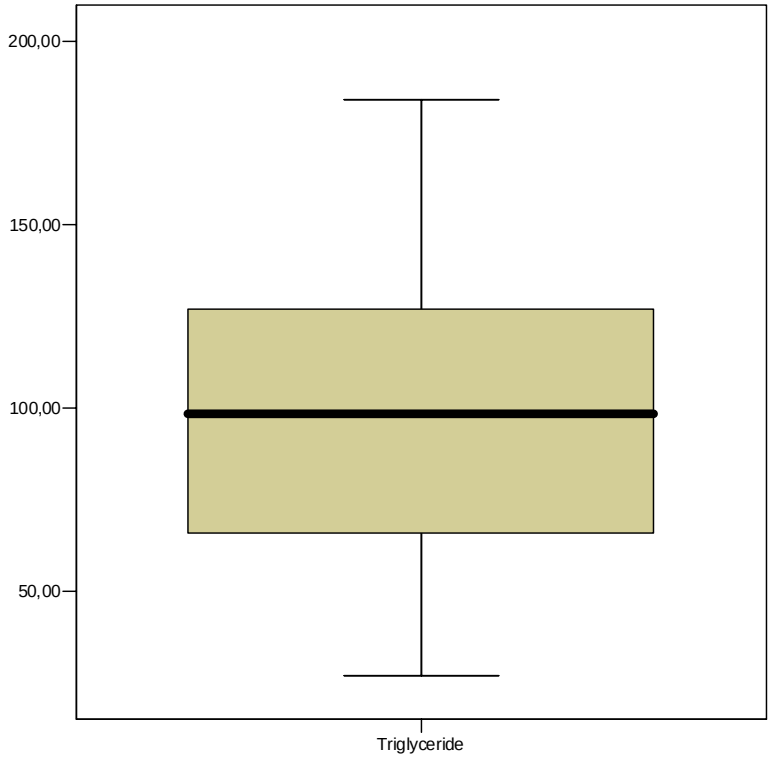
Cholesterin

Mittelwert 56 mg/dl, Standardabweichung 10 mg/dl



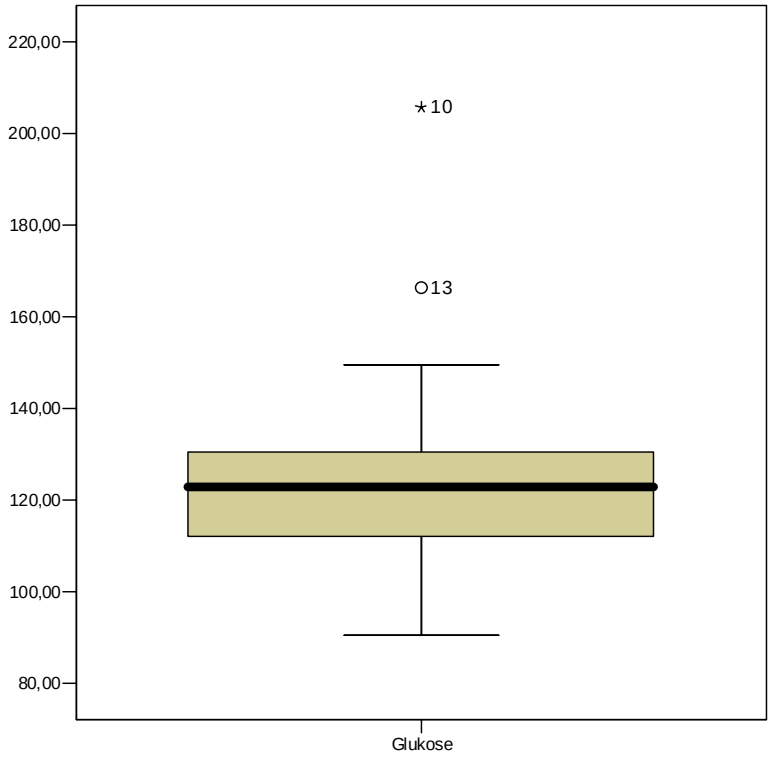
Triglyceride

Mittelwert 102 mg/dl, Standardabweichung 43 mg/dl



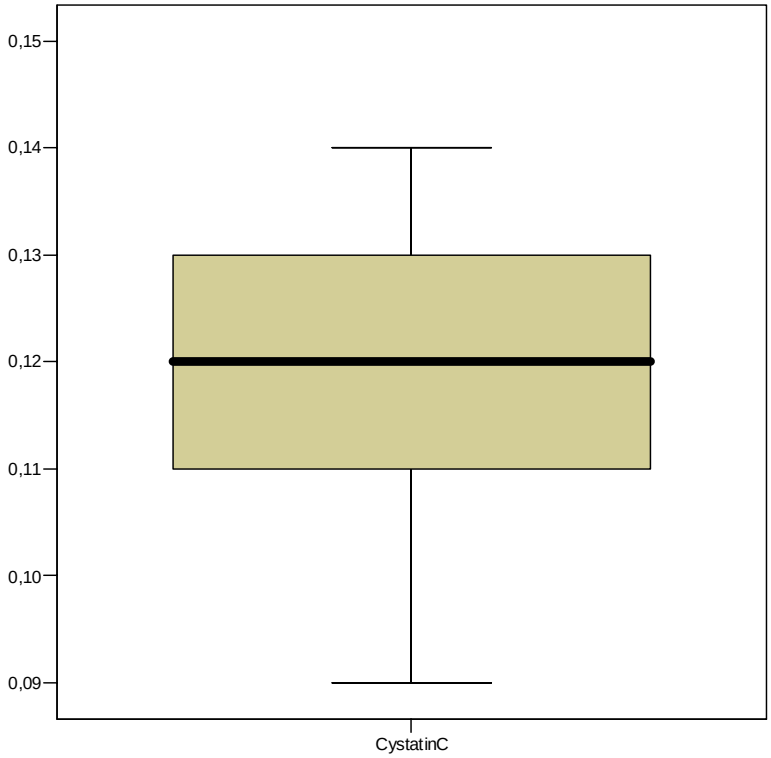
Glukose

Mittelwert 125mg/dl, Standardabweichung 23 mg/dl



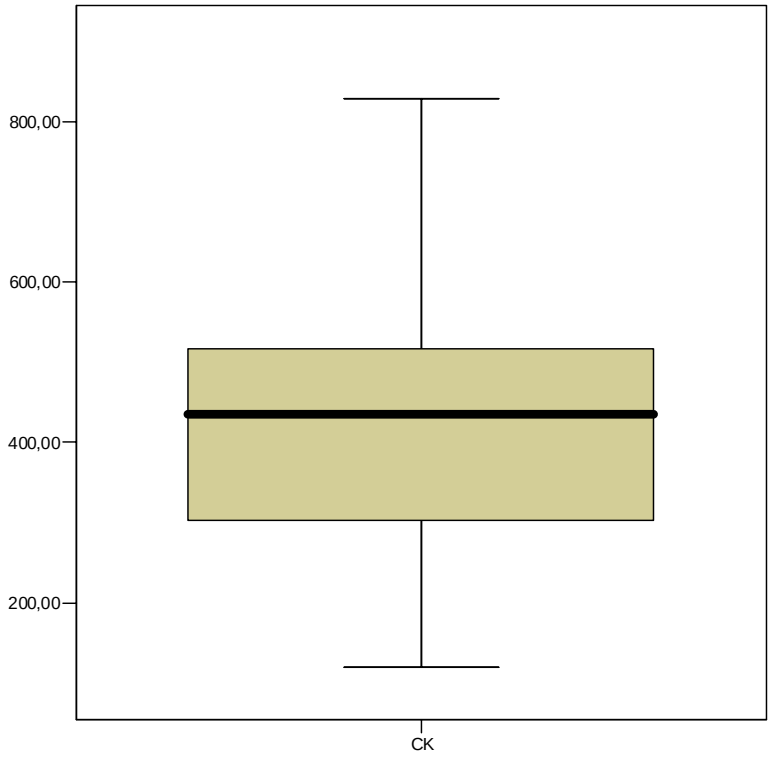
Cystatin C

Mittelwert 0,12 mg/dl, Standardabweichung 0,014 mg/dl



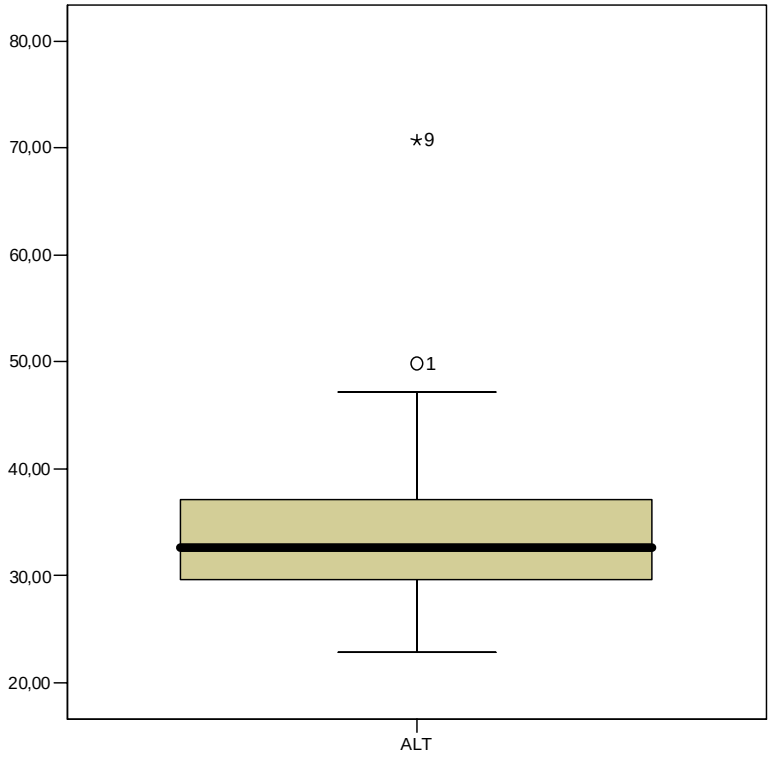
CK

Mittelwert 444 U/l, Standardabweichung 164 U/l



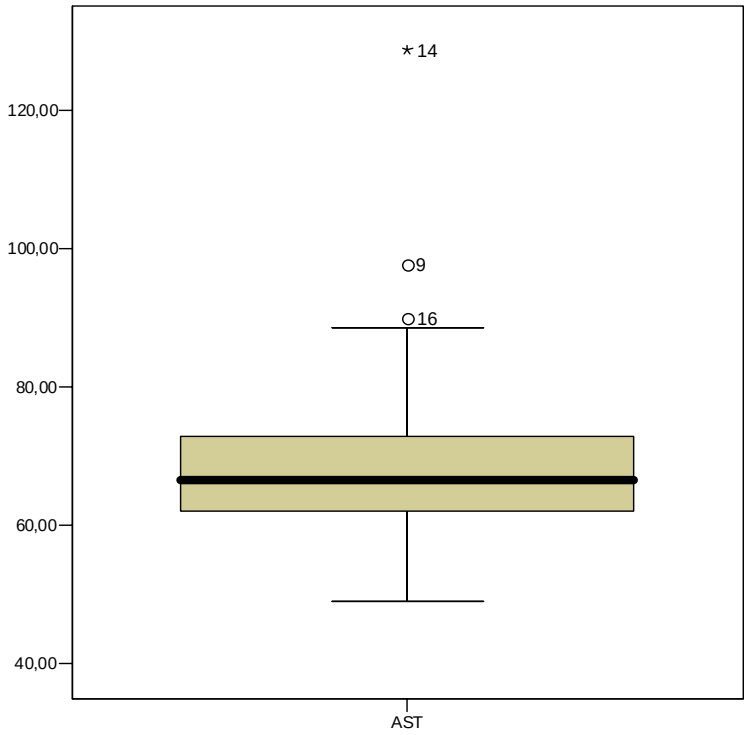
ALT

Mittelwert 35 U/l, Standardabweichung 10 U/l



AST

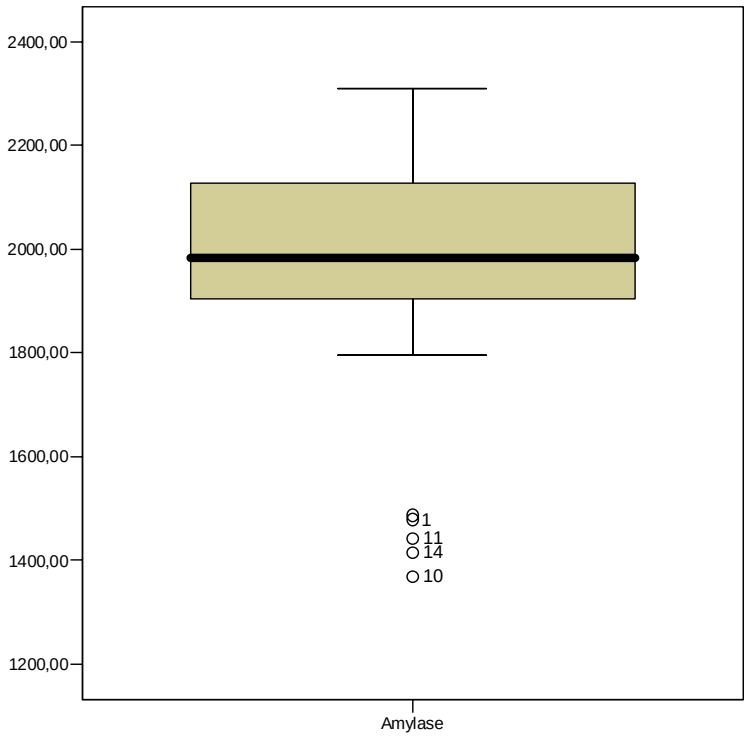
Mittelwert 70 U/l, Standardabweichung 16 U/l



GGT: < 3U/l

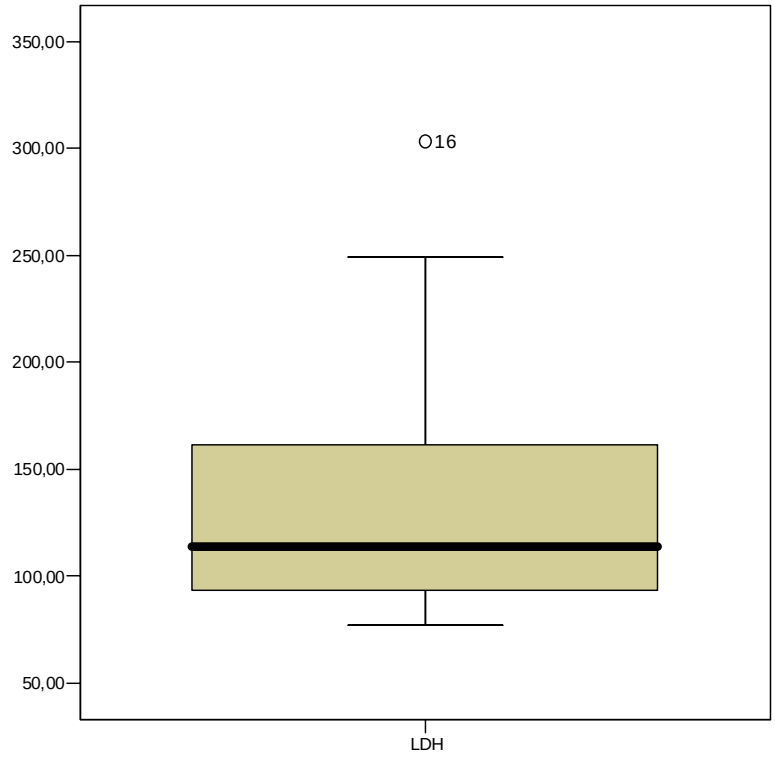
α-Amylase

Mittelwert 1942 U/l, Standardabweichung 269 U/l



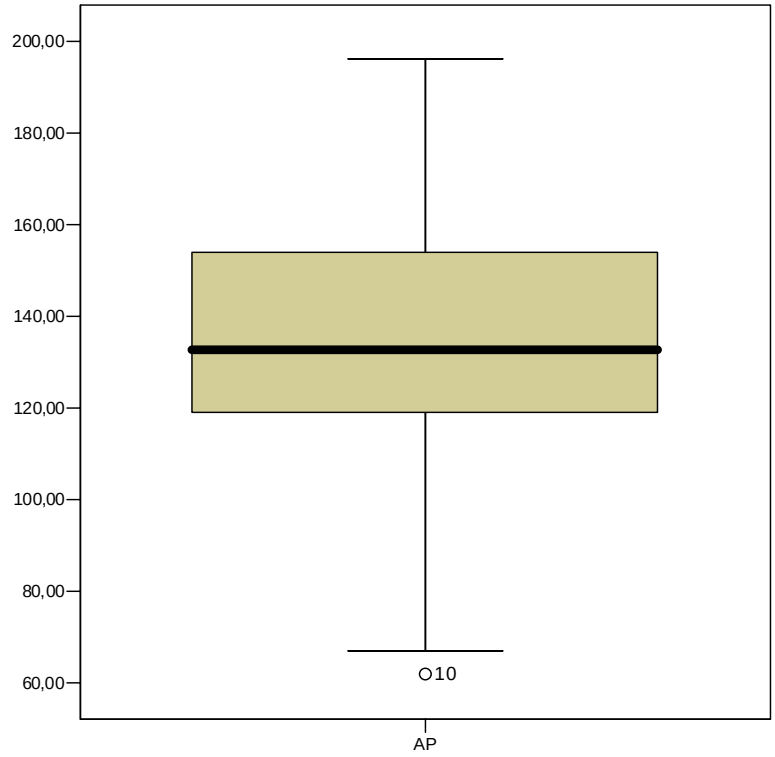
LDH

Mittelwert 135 U/l, Standardabweichung 58 U/l



AP

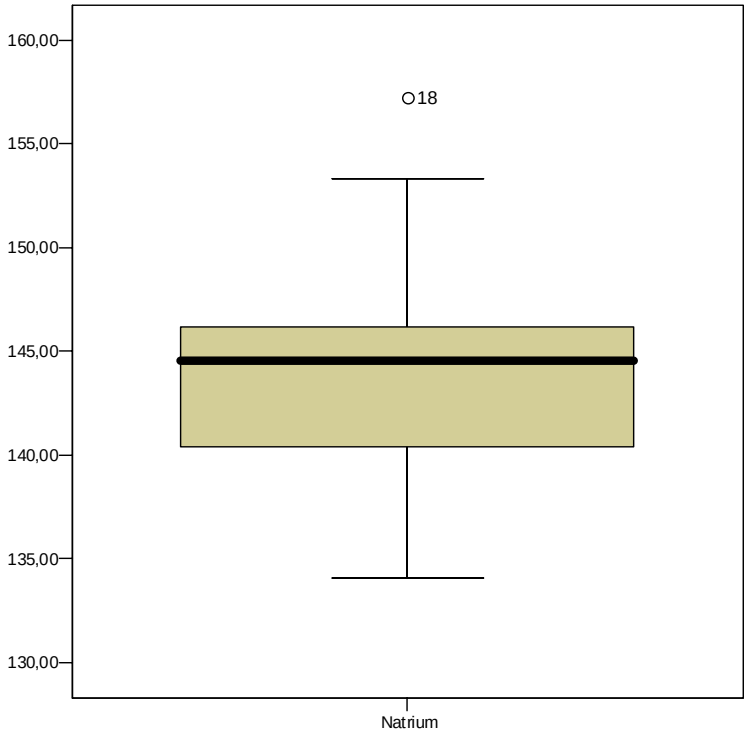
Mittelwert 130 U/l, Standardabweichung 34 U/l



4.1.2 Weiblich

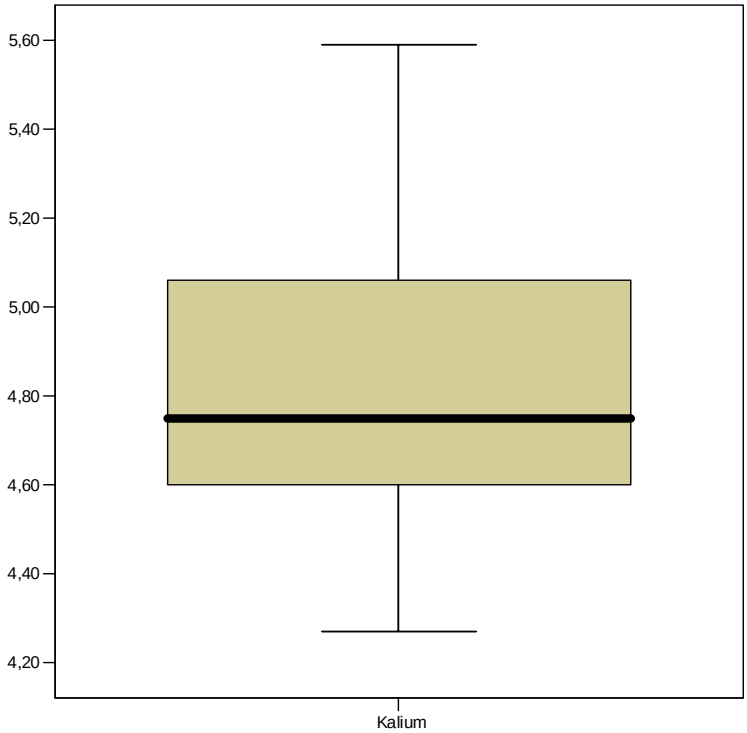
Natrium

Mittelwert 143,8 mmol/l, Standardabweichung 4,98 mmol/l



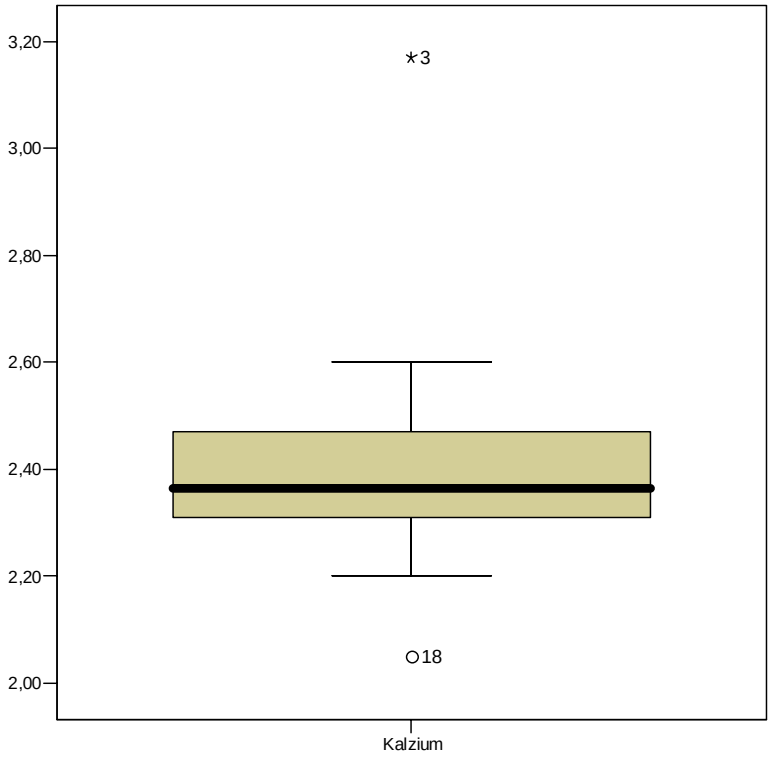
Kalium

Mittelwert 4,85 mmol/l, Standardabweichung 0,35 mmol/l



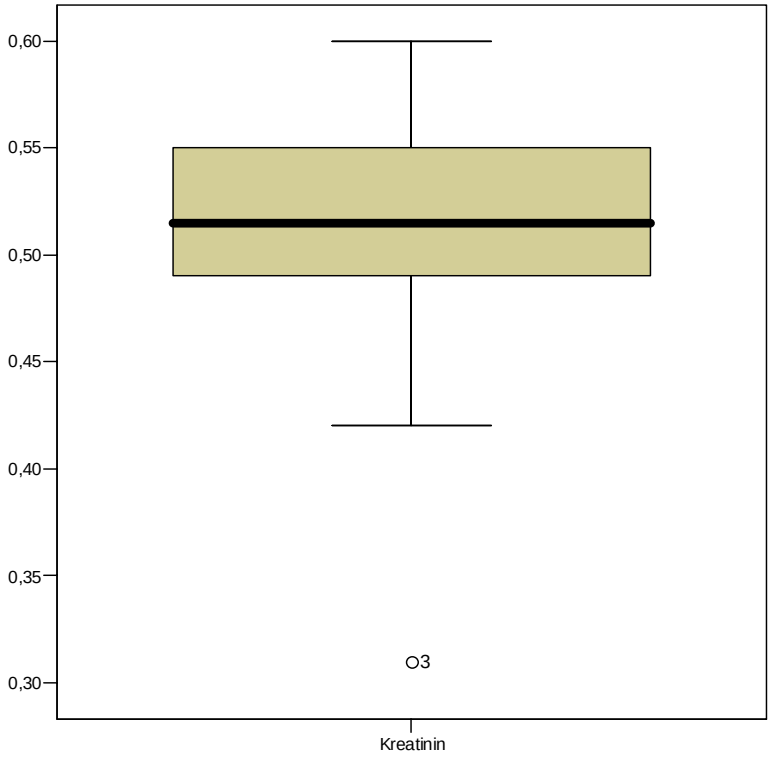
Kalzium

Mittelwert 2,39 mmol/l, Standardabweichung 0,19 mmol/l



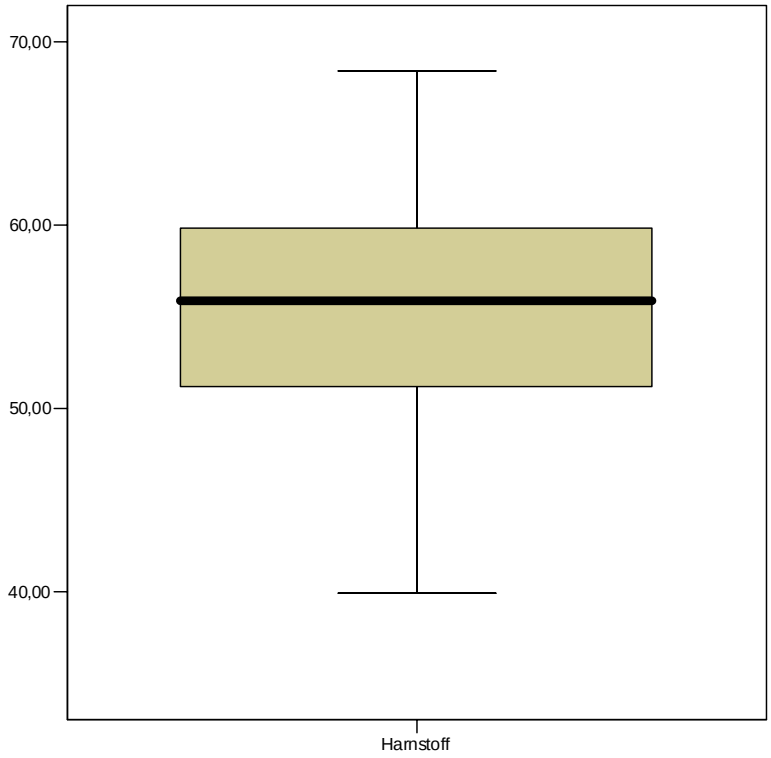
Kreatinin

Mittelwert 0,52 mg/dl, Standardabweichung 0,58 mg/dl



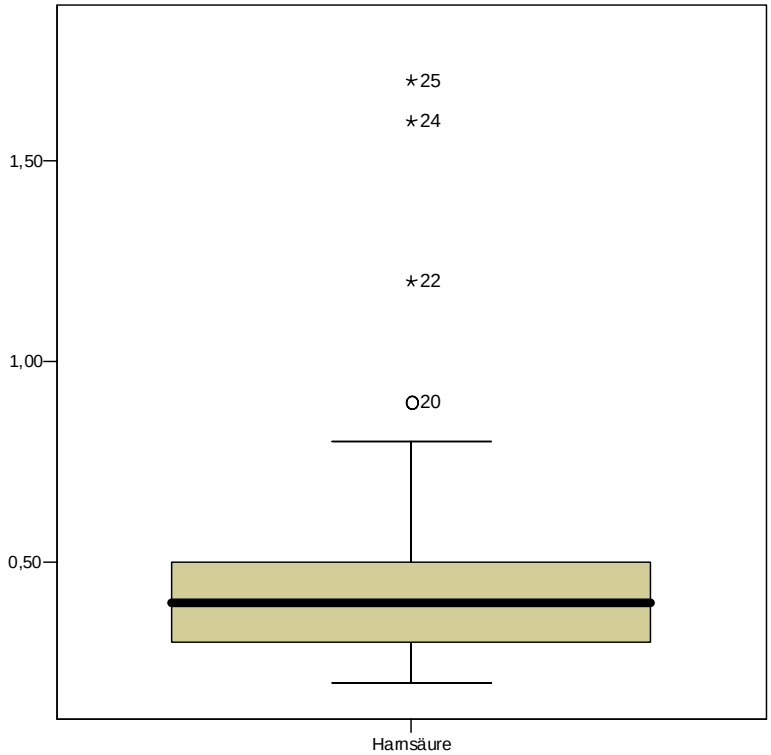
Harnstoff

Mittelwert 55,7 mg/dl, Standardabweichung 6,8 mg/dl



Harnsäure

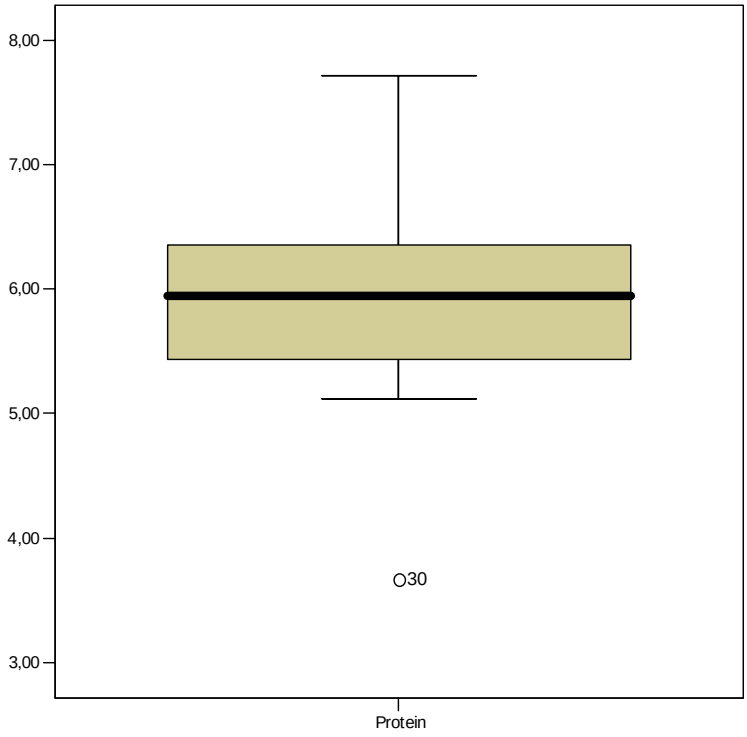
Mittelwert 0,54 mg/dl, Standardabweichung 0,37 mg/dl



Bilirubin gesamt: < 0,10 mg/dl

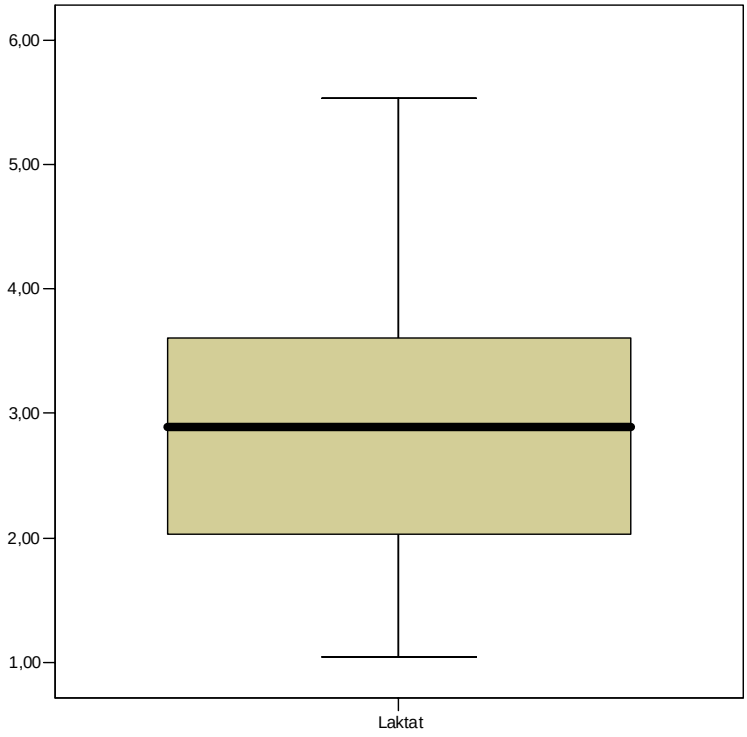
Gesamteiweiß

Mittelwert 5,91g/dl, Standardabweichung 0,73 g/dl



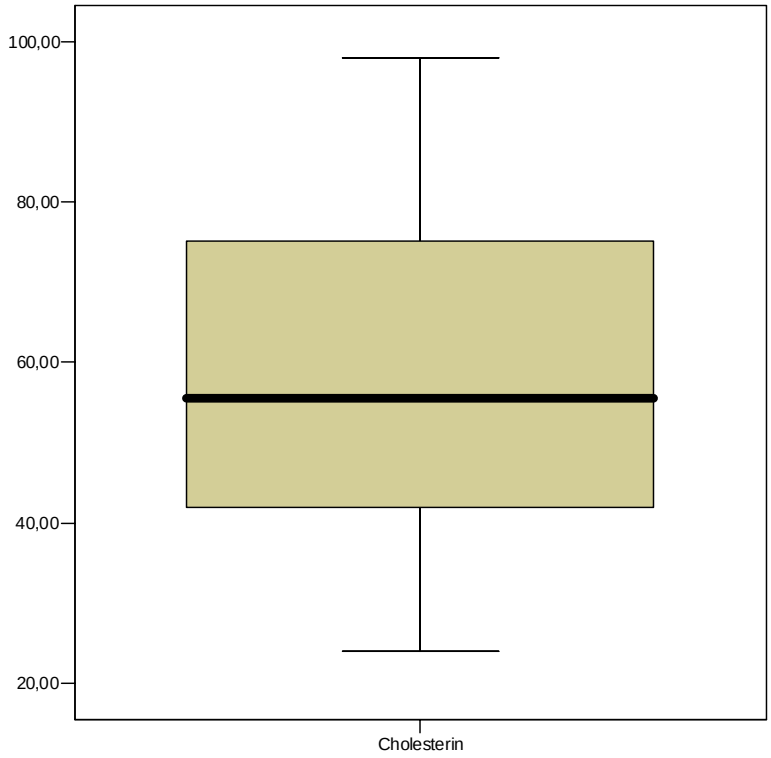
Laktat

Mittelwert 2,85 mmol/l, Standardabweichung 1,08 mmol/l



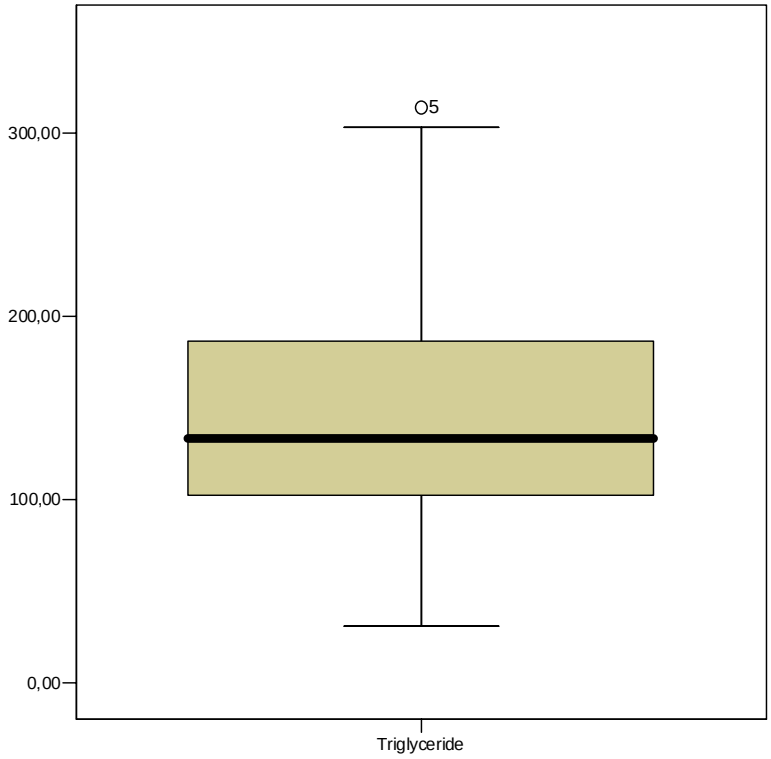
Cholesterin

Mittelwert 58 mg/dl, Standardabweichung 20 mg/dl



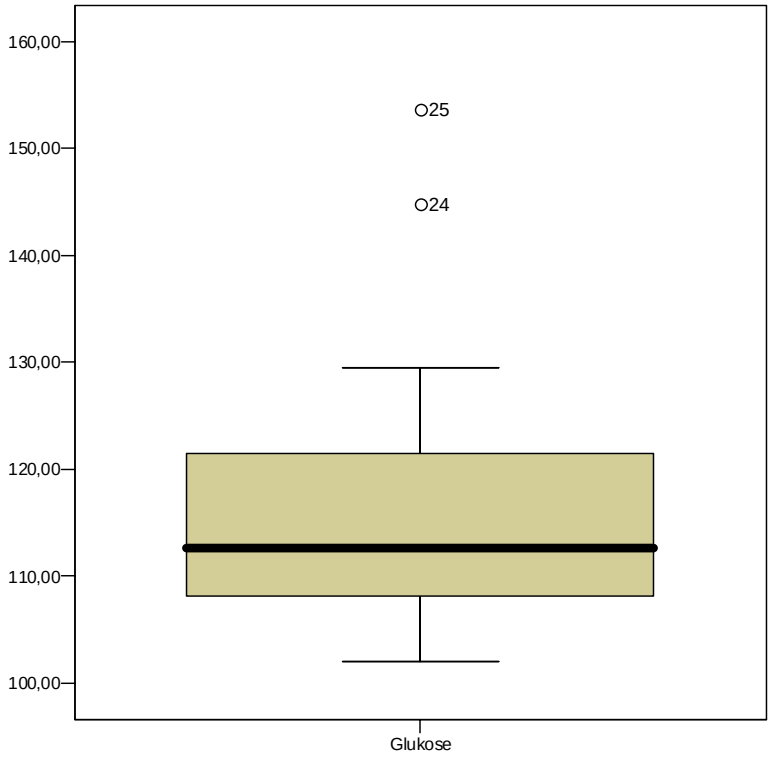
Triglyceride

Mittelwert 150 mg/dl, Standardabweichung 71 mg/dl



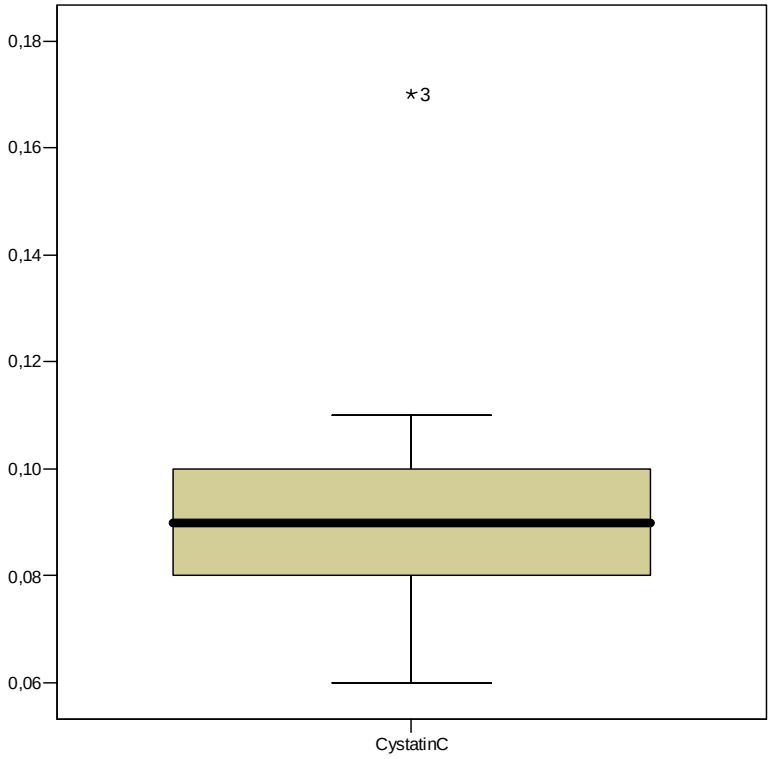
Glukose

Mittelwert 115 mg/dl, Standardabweichung 12 mg/dl



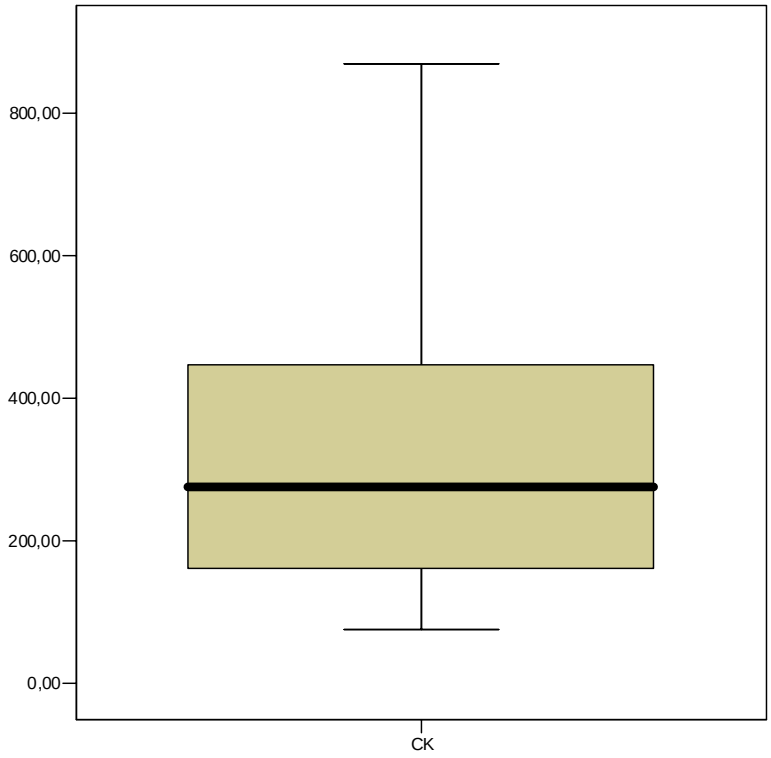
Cystatin C

Mittelwert 0,09 mg/dl, Standardabweichung 0,019 mg/dl



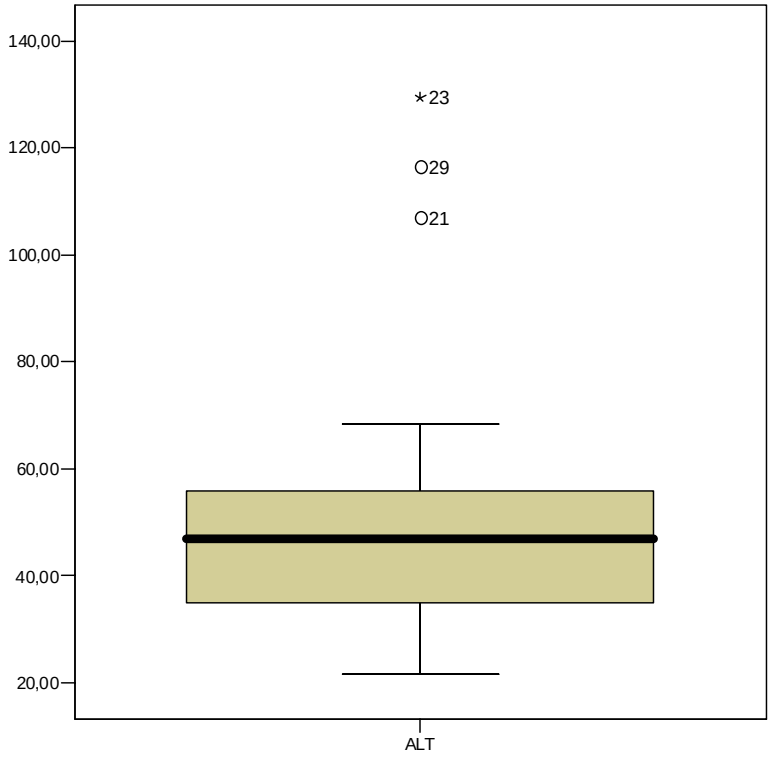
CK

Mittelwert 347 U/l, Standardabweichung 232 U/l



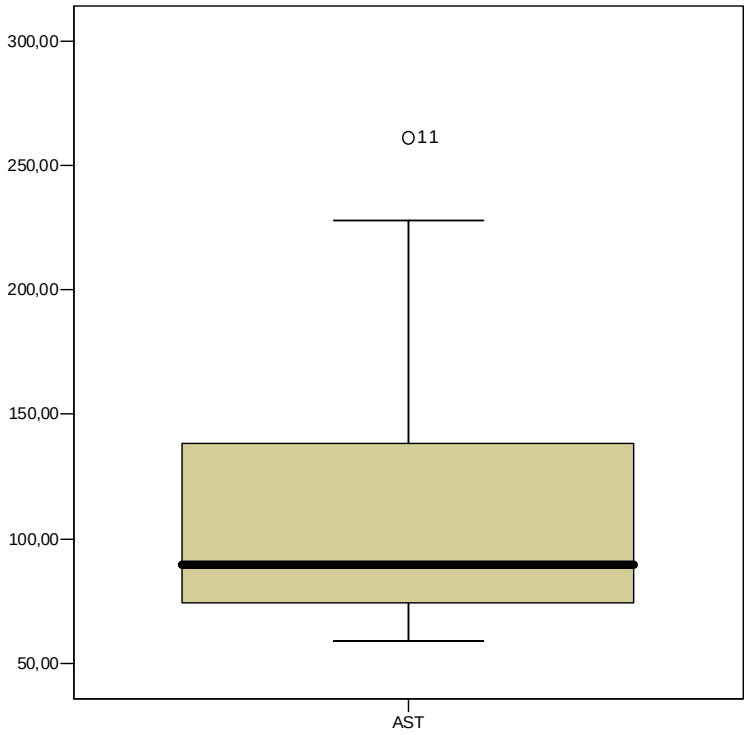
ALT

Mittelwert 51 U/l, Standardabweichung 26 U/l



AST

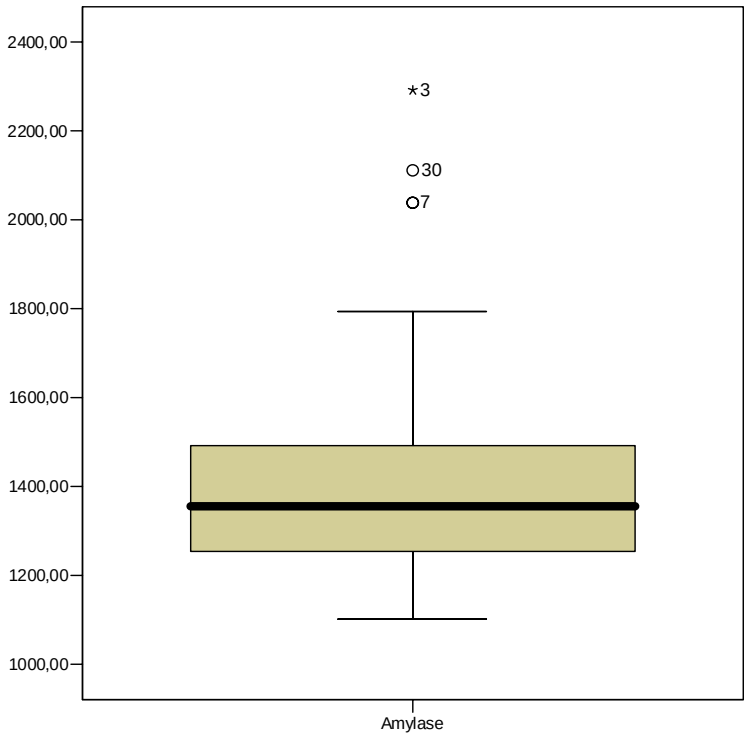
Mittelwert 113 U/l, Standardabweichung 53 U/l



GGT: < 3 U/l

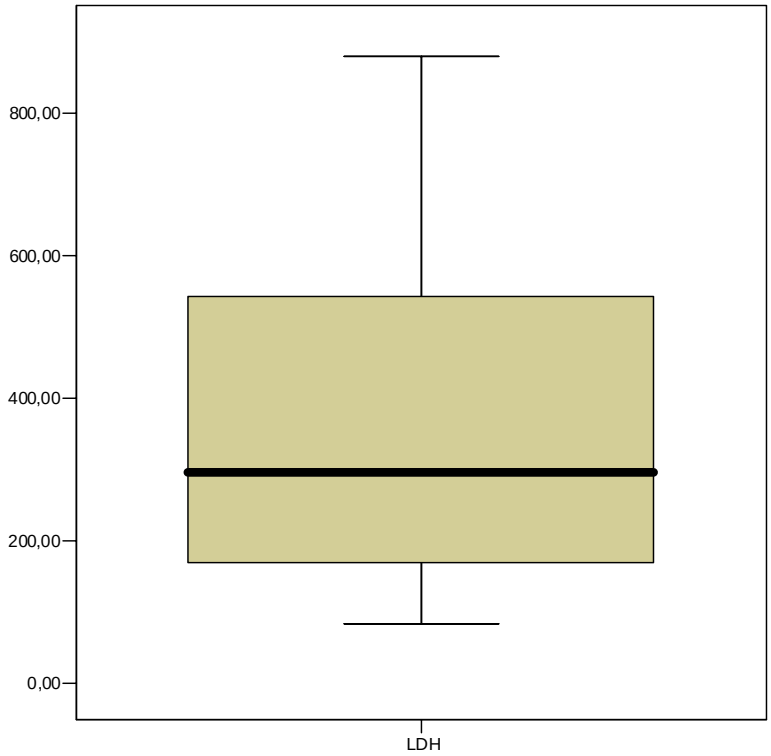
α-Amylase

Mittelwert 1465 U/l, Standardabweichung 313 U/l



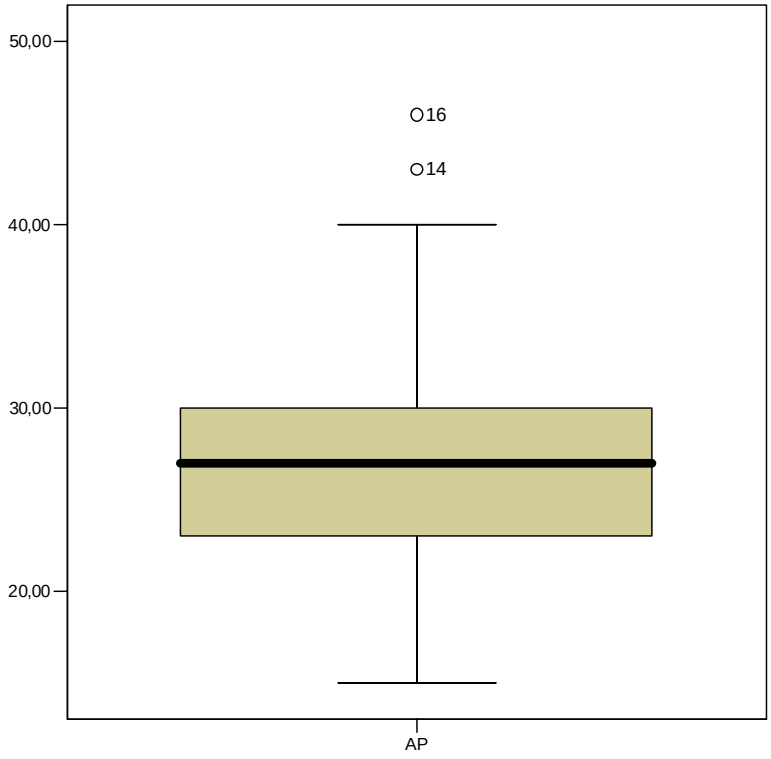
LDH

Mittelwert 369 U/l, Standardabweichung 241 U/l



AP

Mittelwert 27 U/l, Standardabweichung 7 U/l

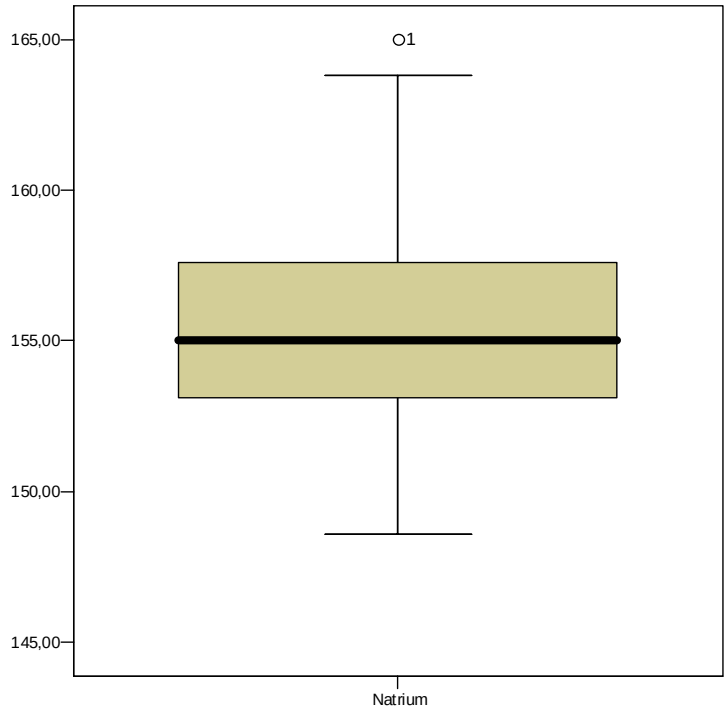


4.2 C57BL/6-Mäuse

4.2.1 Männlich

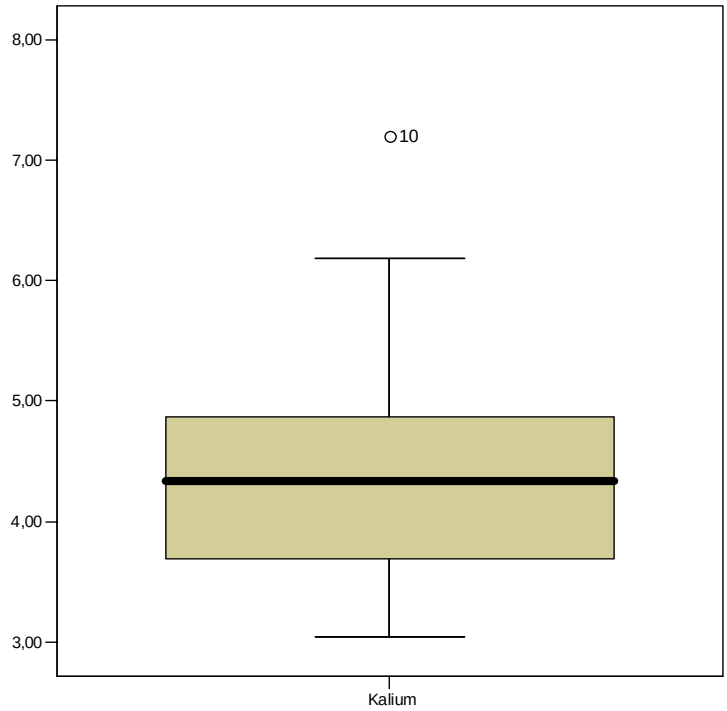
Natrium

Mittelwert 155,5 mmol/l, Standardabweichung 3,96 mmol/l



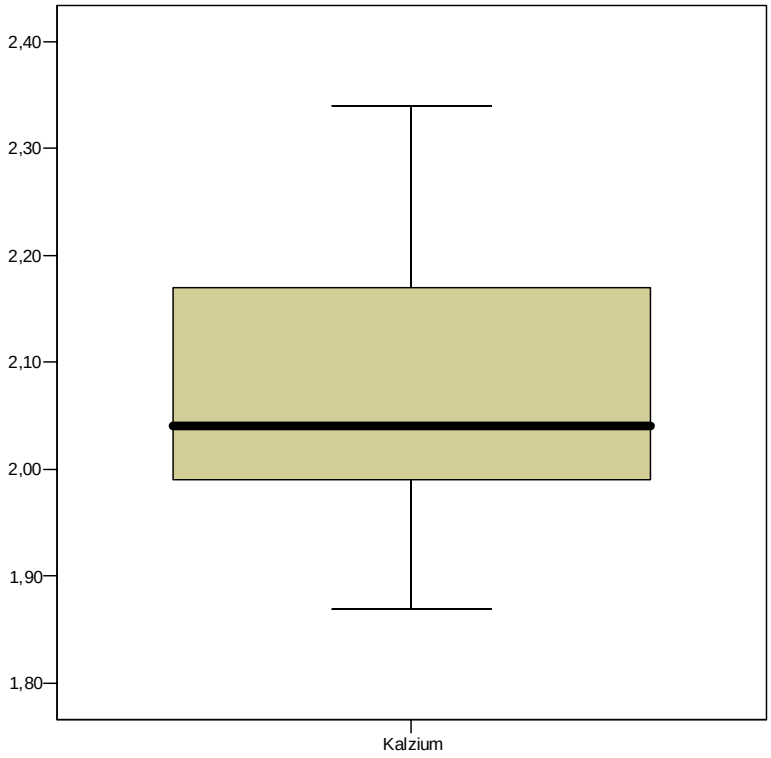
Kalium

Mittelwert 4,40 mmol/l, Standardabweichung 0,96 mmol/l



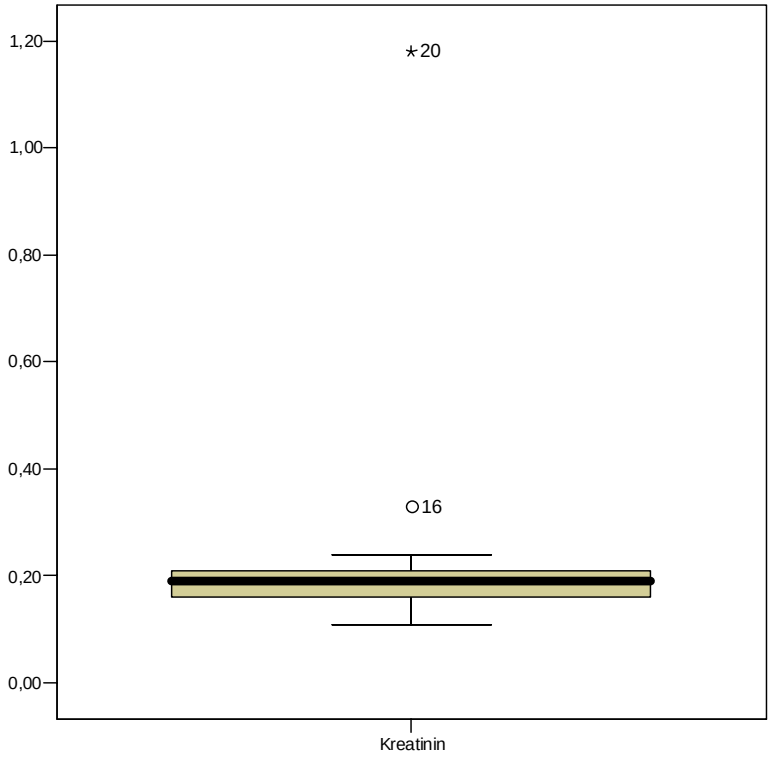
Kalzium

Mittelwert 2,08 mmol/l, Standardabweichung 0,12 mmol/l



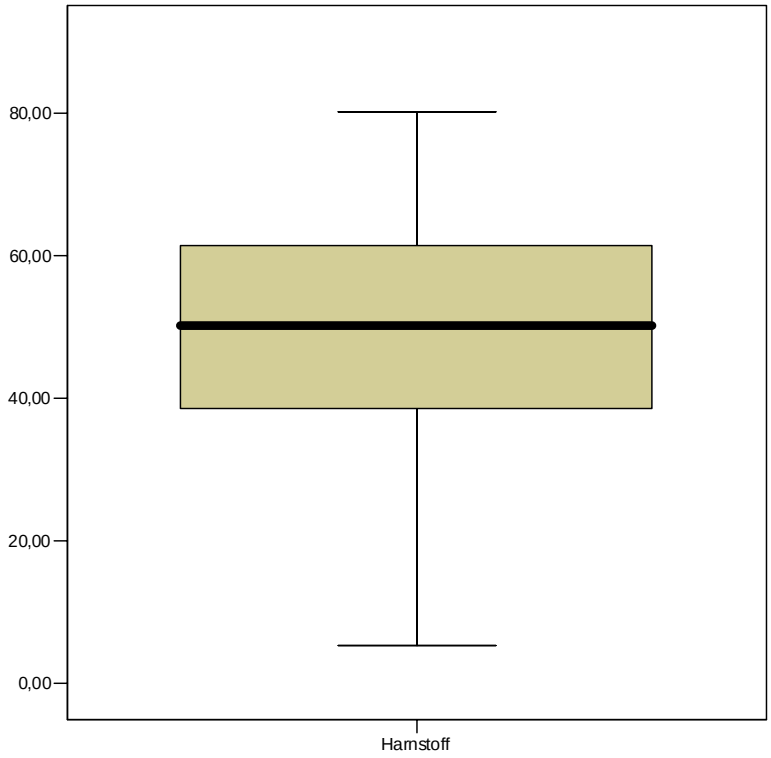
Kreatinin

Mittelwert 0,22 mg/dl, Standardabweichung 0,19 mg/dl



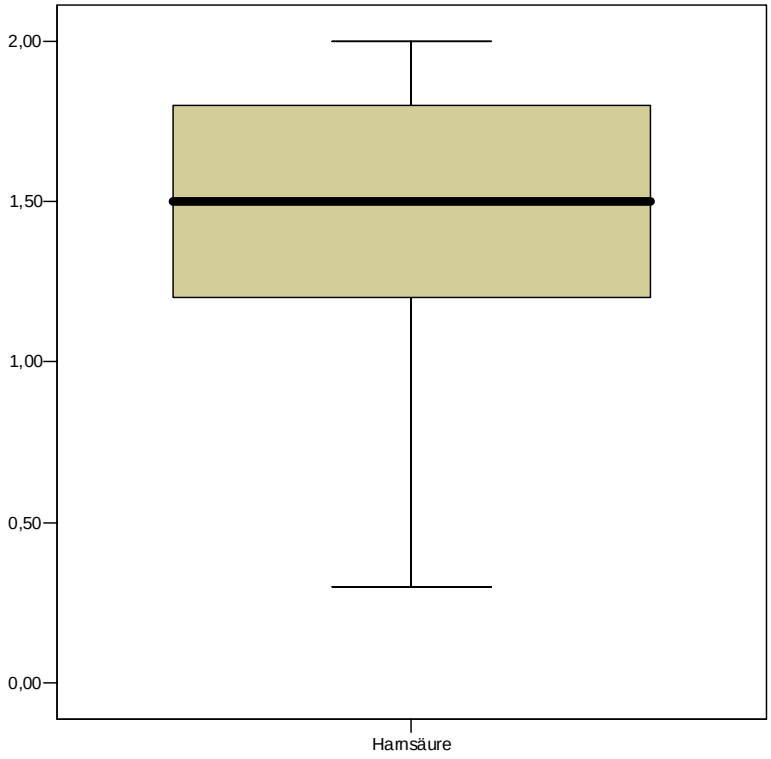
Harnstoff

Mittelwert 47,4 mg/dl, Standardabweichung 20,4 mg/dl



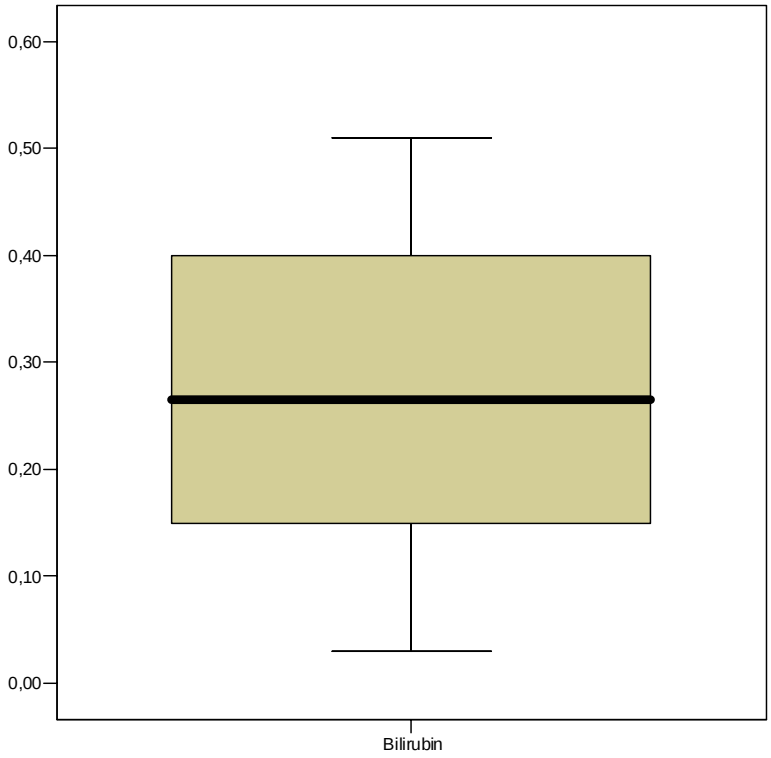
Harnsäure

Mittelwert 1,44 mg/dl, Standardabweichung 0,39 mg/dl



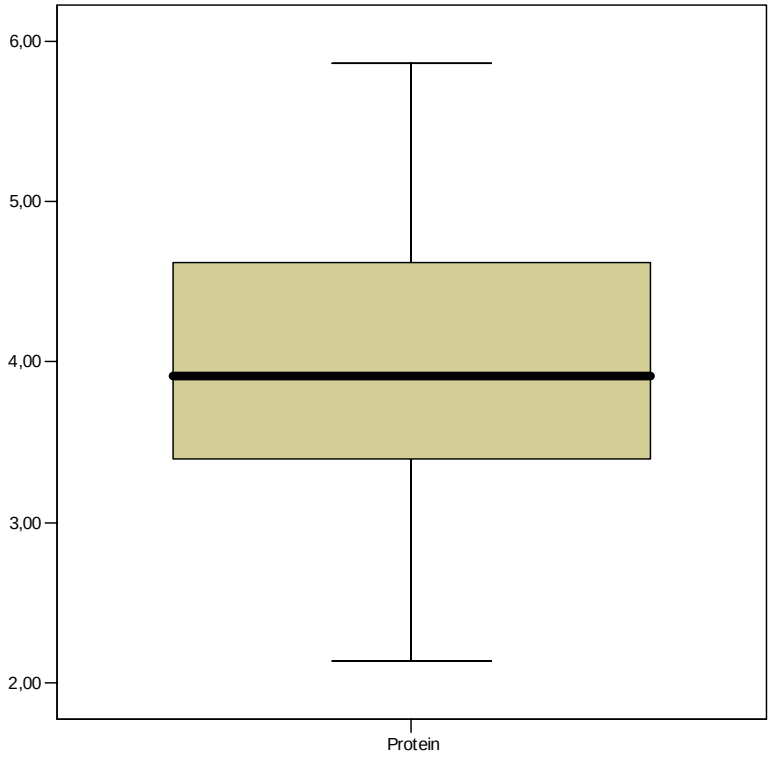
Bilirubin gesamt

Mittelwert 0,35 mg/dl, Standardabweichung 0,13 mg/dl



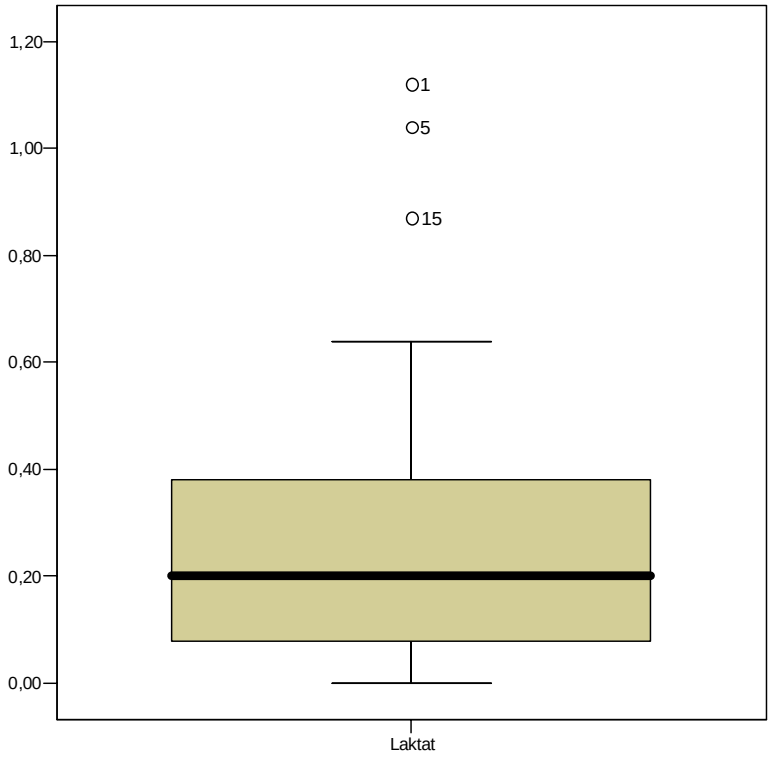
Gesamteiweiß

Mittelwert 4,01 g/dl, Standardabweichung 0,89 g/dl



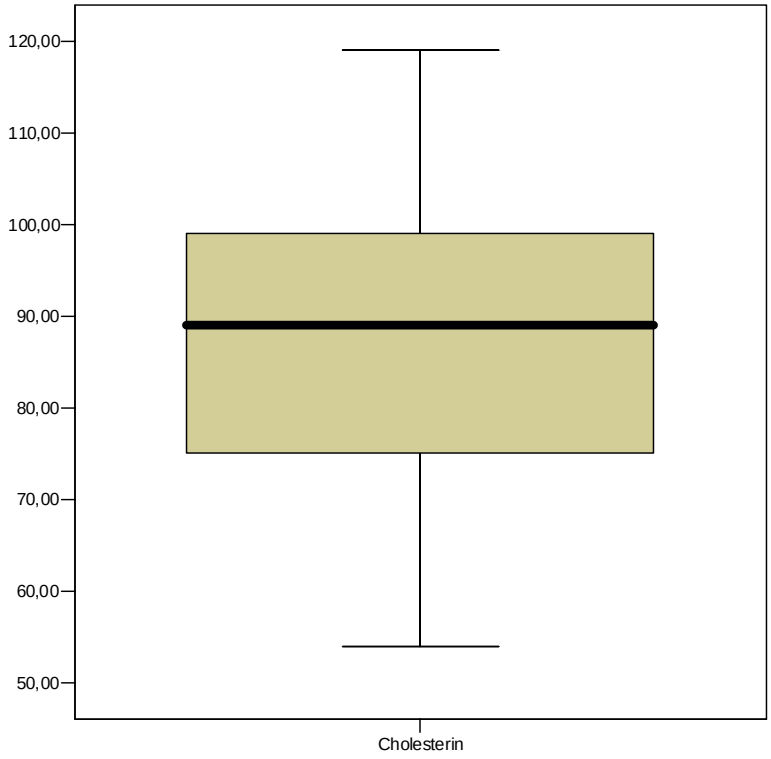
Laktat

Mittelwert 0,28 mmol/l, Standardabweichung 0,30 mmol/l



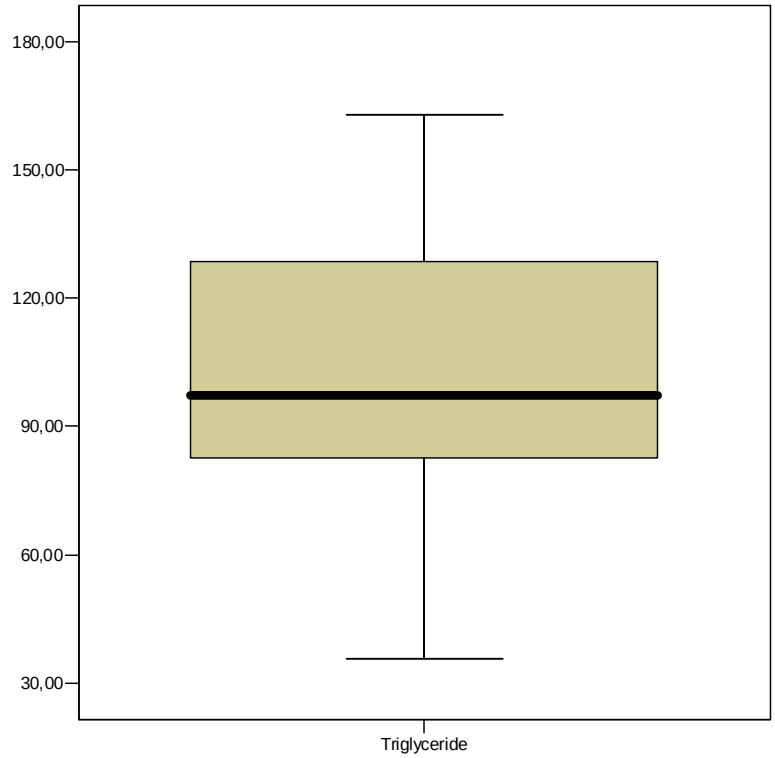
Cholesterin

Mittelwert 89 mg/dl, Standardabweichung 16 mg/dl



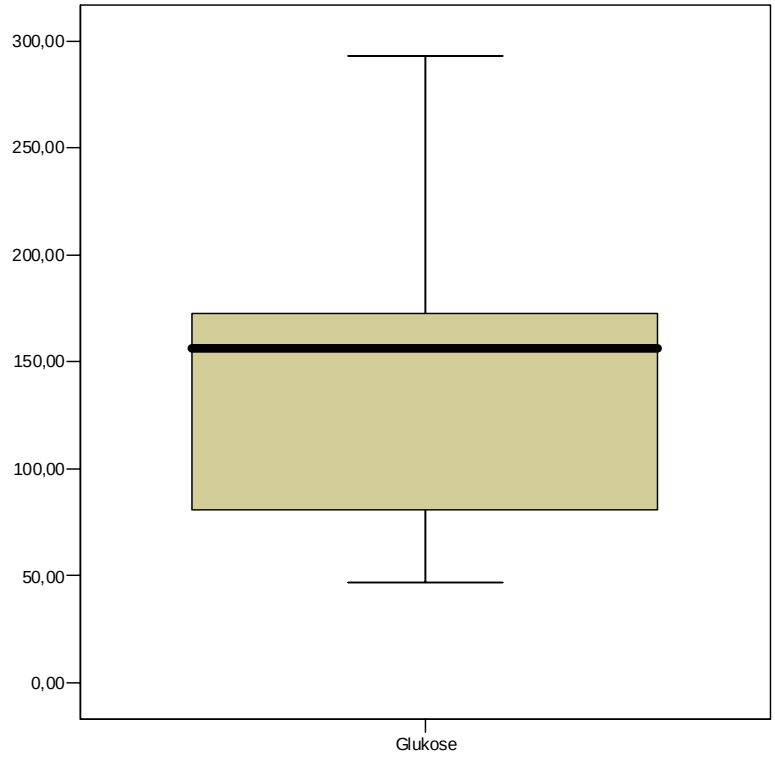
Triglyceride

Mittelwert 102 mg/dl, Standardabweichung 35 mg/dl



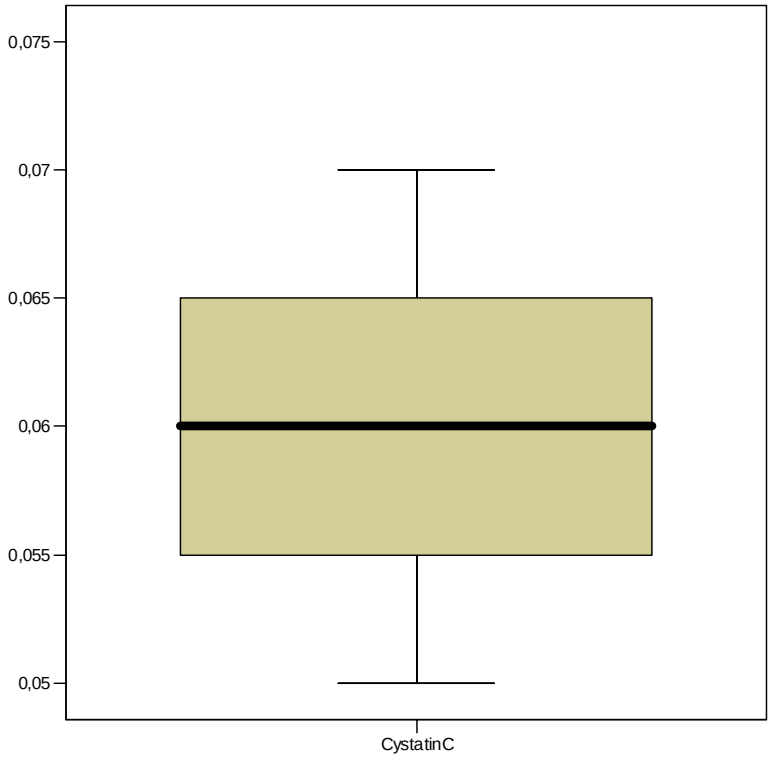
Glukose

Mittelwert 140 mg/dl, Standardabweichung 58 mg/dl



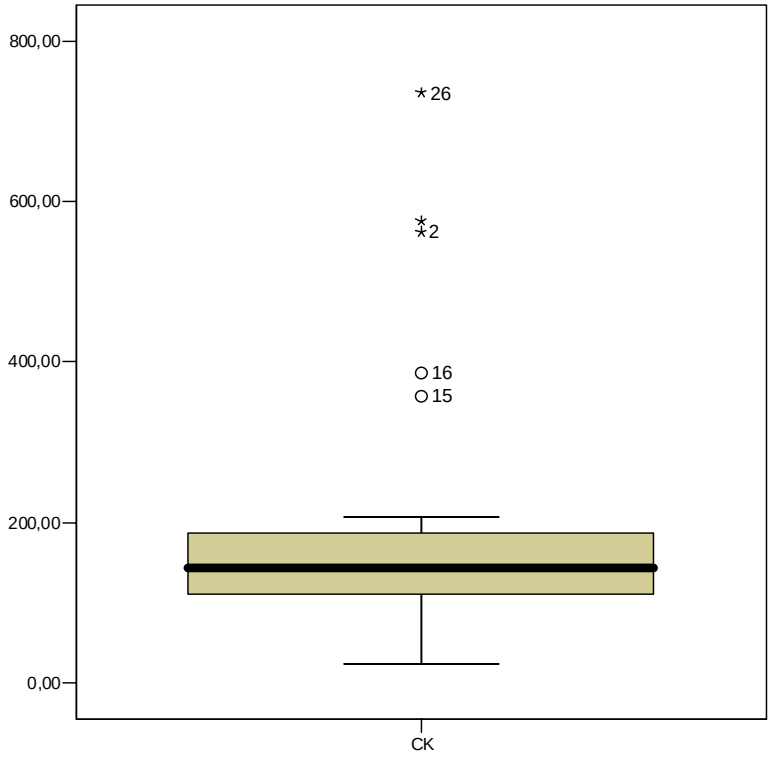
Cystatin C

Mittelwert 0,06 mg/dl, Standardabweichung 0,008 mg/dl



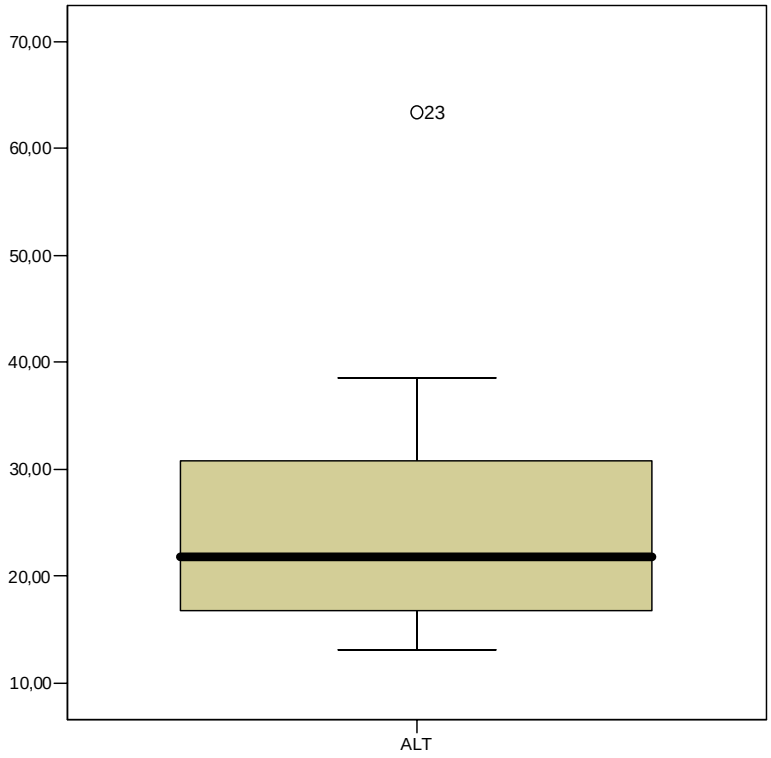
CK

Mittelwert 199 U/l, Standardabweichung 167 U/l



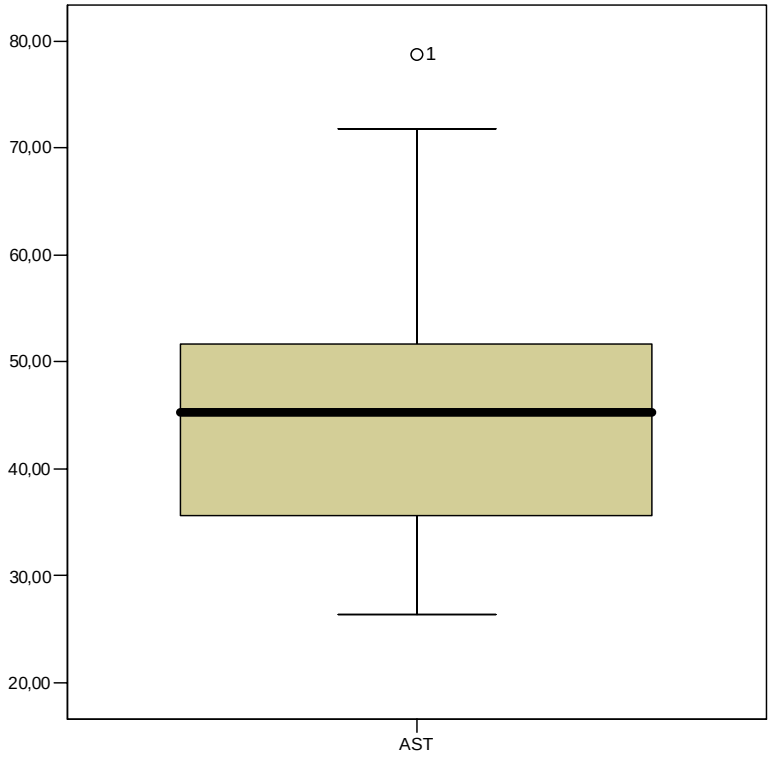
ALT

Mittelwert 24 U/l, Standardabweichung 10 U/l



AST

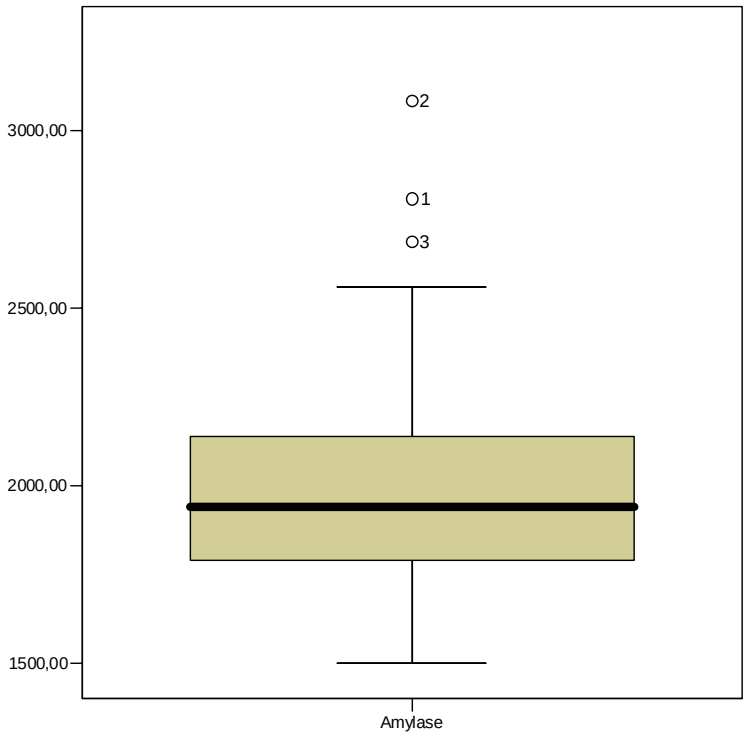
Mittelwert 47 U/l, Standardabweichung 13 U/l



GGT: < 3 U/l

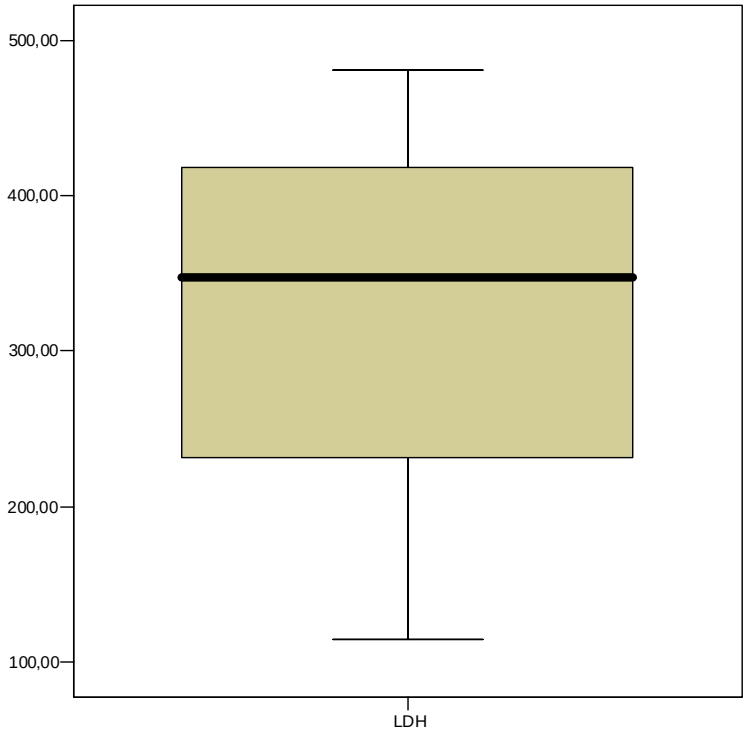
α-Amylase

Mittelwert 2035 U/l, Standardabweichung 355 U/l



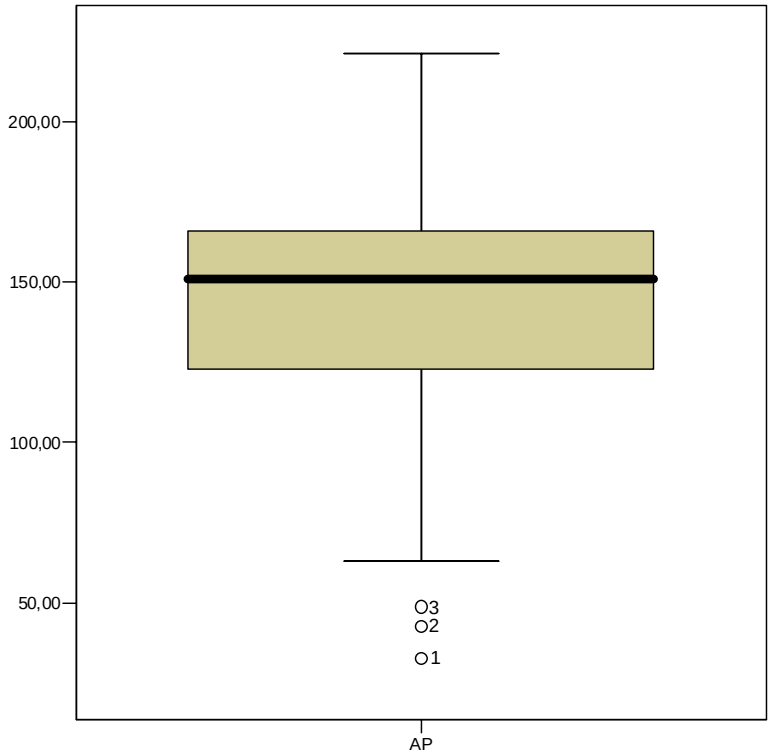
LDH

Mittelwert 318 U/l, Standardabweichung 222U/l



AP

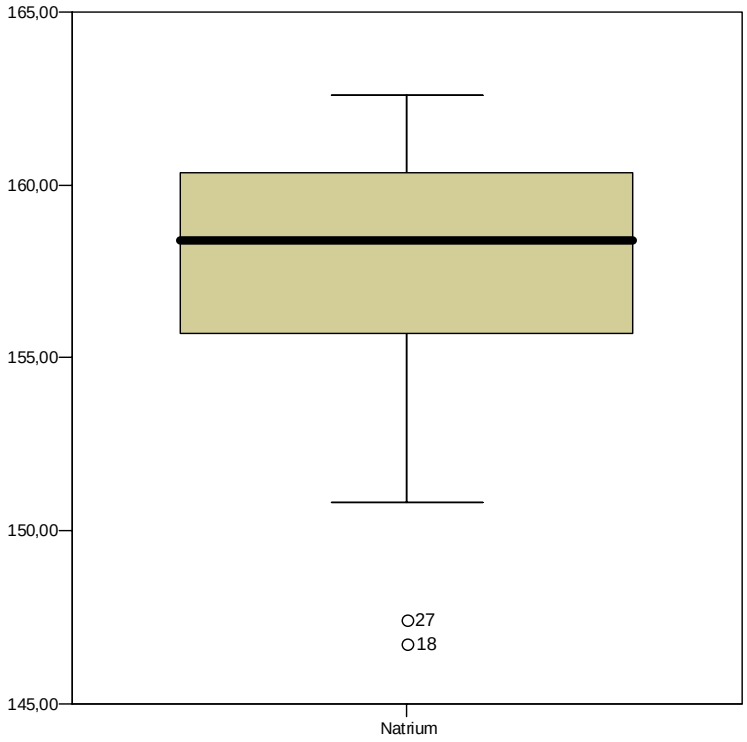
Mittelwert 139 U/l, Standardabweichung 43 U/l



4.2.2 Weiblich

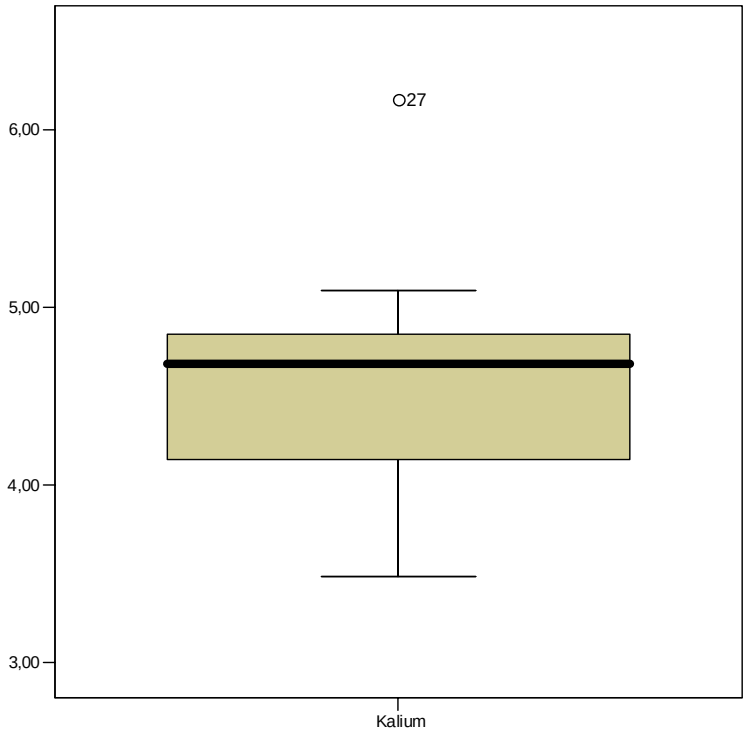
Natrium

Mittelwert 157,5 mmol/l, Standardabweichung 4,47 mmol/l



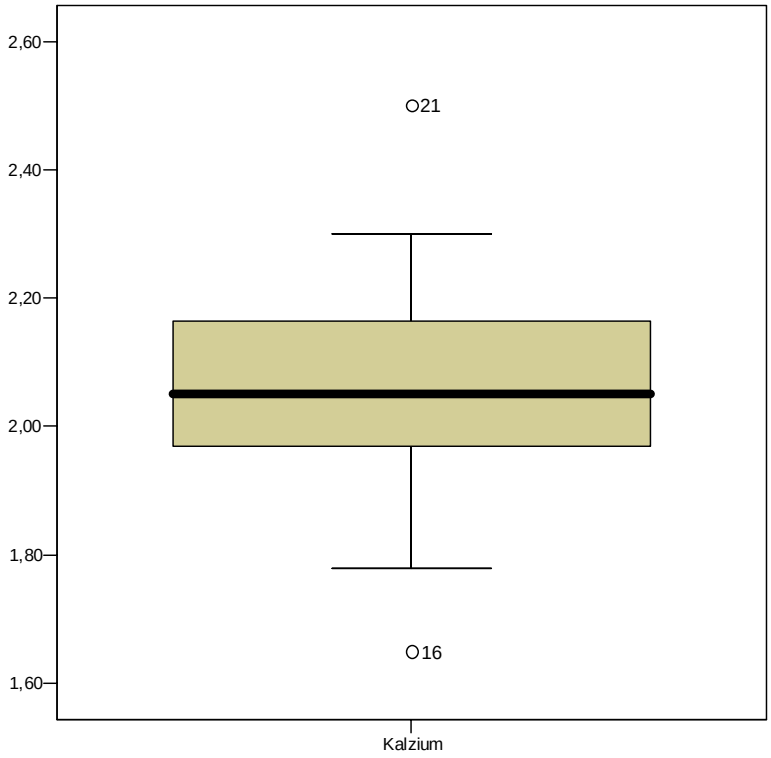
Kalium

Mittelwert 4,58 mmol/l, Standardabweichung 0,52 mmol/l



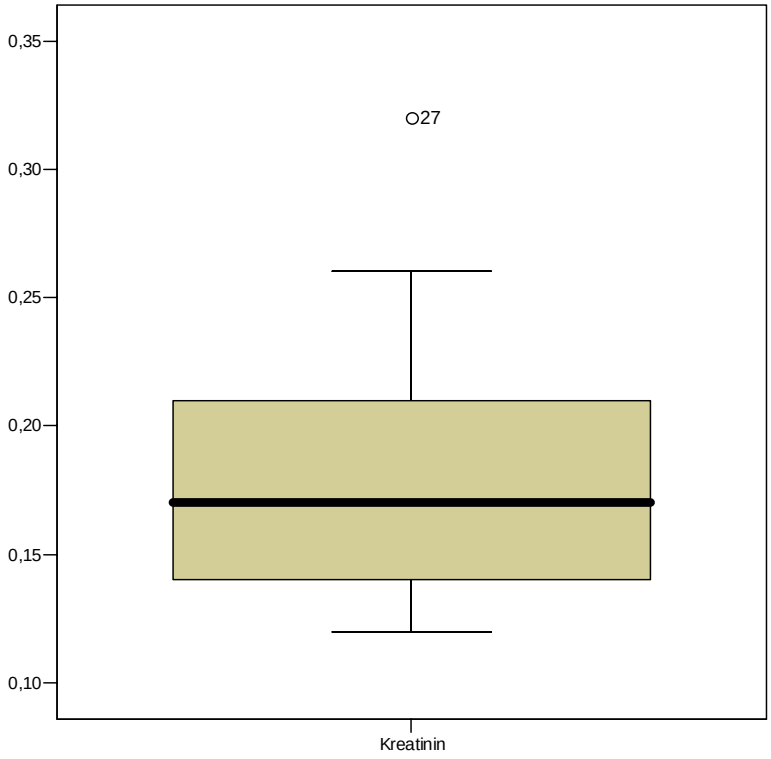
Kalzium

Mittelwert 2,06 mmol/l, Standardabweichung 0,17 mmol/l



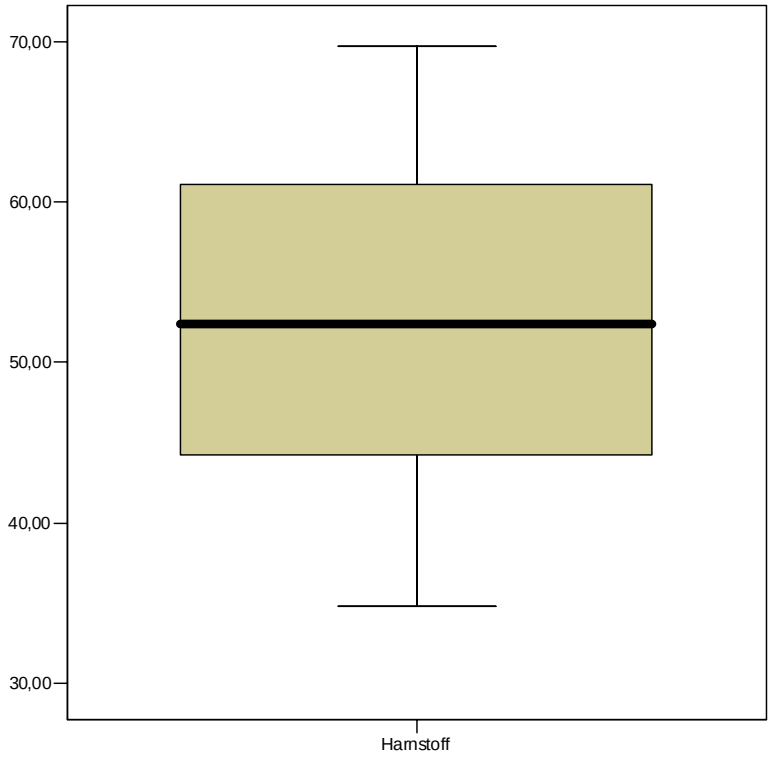
Kreatinin

Mittelwert 0,18 mg/dl, Standardabweichung 0,05 mg/dl



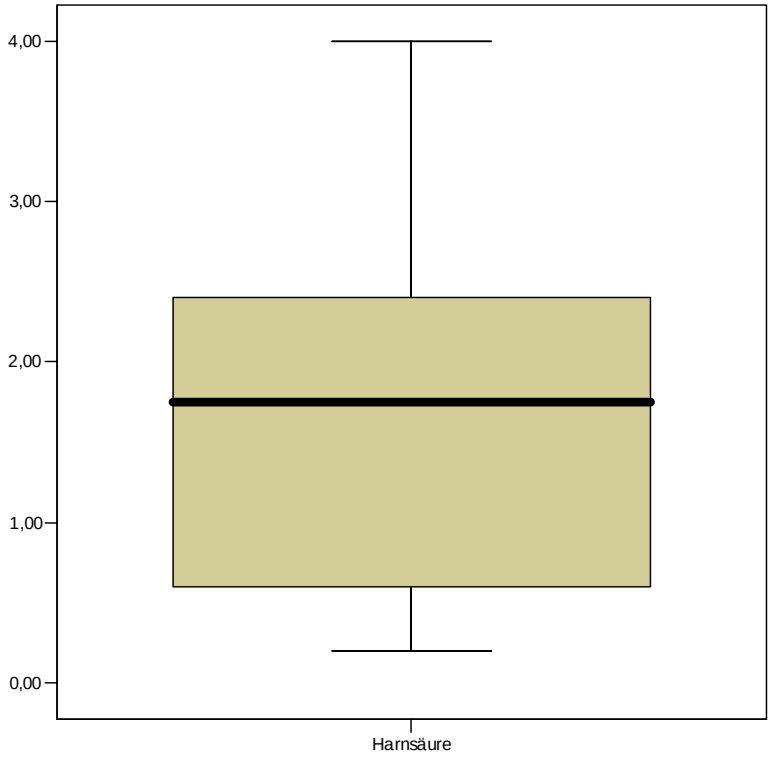
Harnstoff

Mittelwert 52,4mg/dl, Standardabweichung 10,4 mg/dl



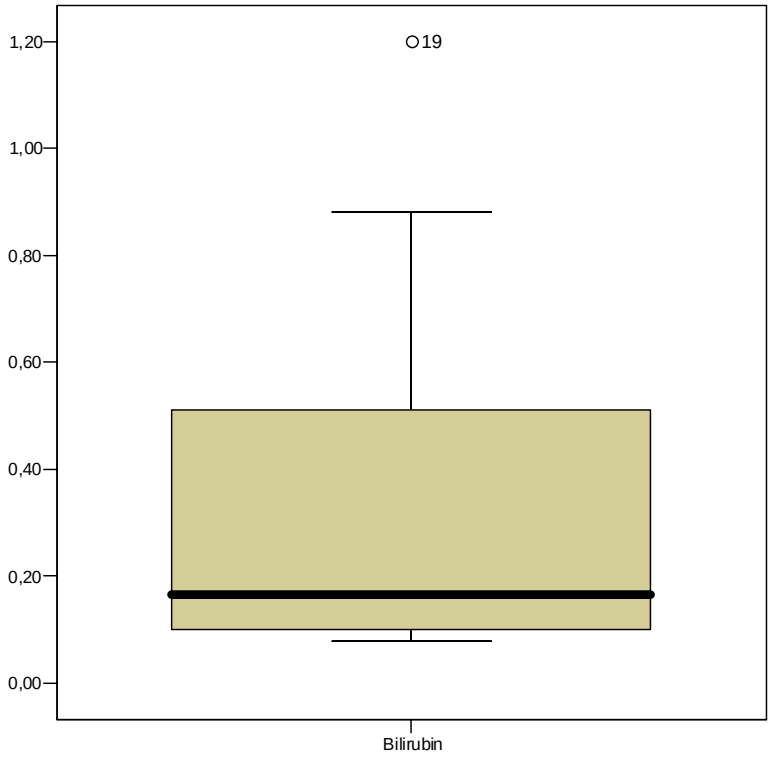
Harnsäure

Mittelwert 1,68 mg/dl, Standardabweichung 0,95 mg/dl



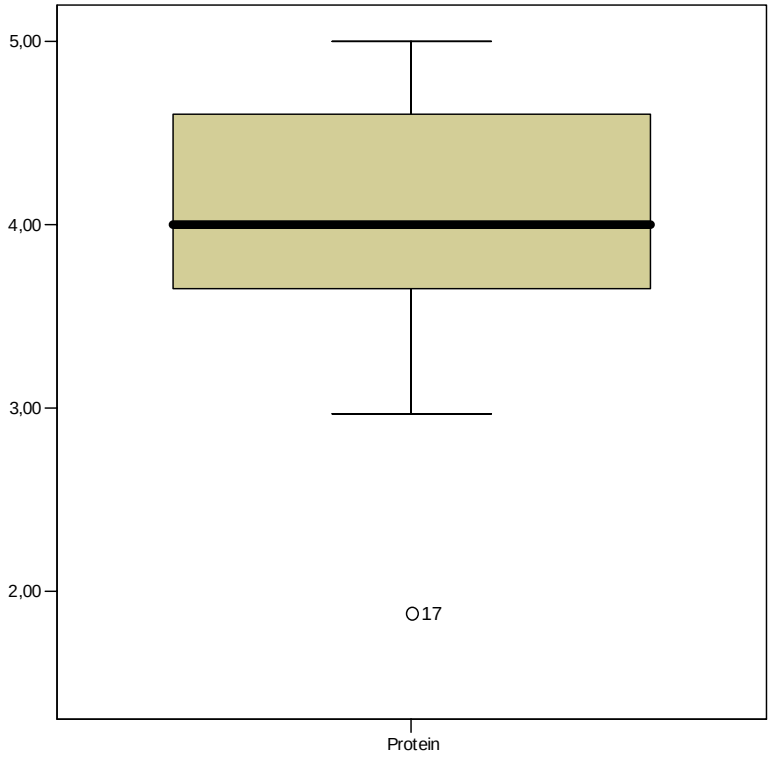
Bilirubin gesamt

Mittelwert 0,30 mg/dl, Standardabweichung 0,28 mg/dl



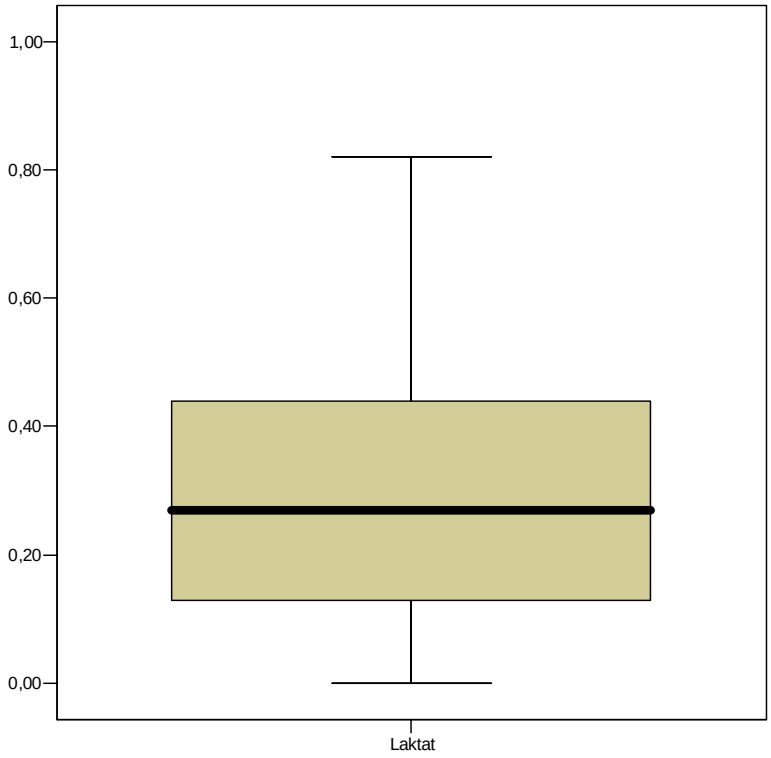
Gesamteiweiß

Mittelwert 3,99 g/dl, Standardabweichung 0,66 g/dl



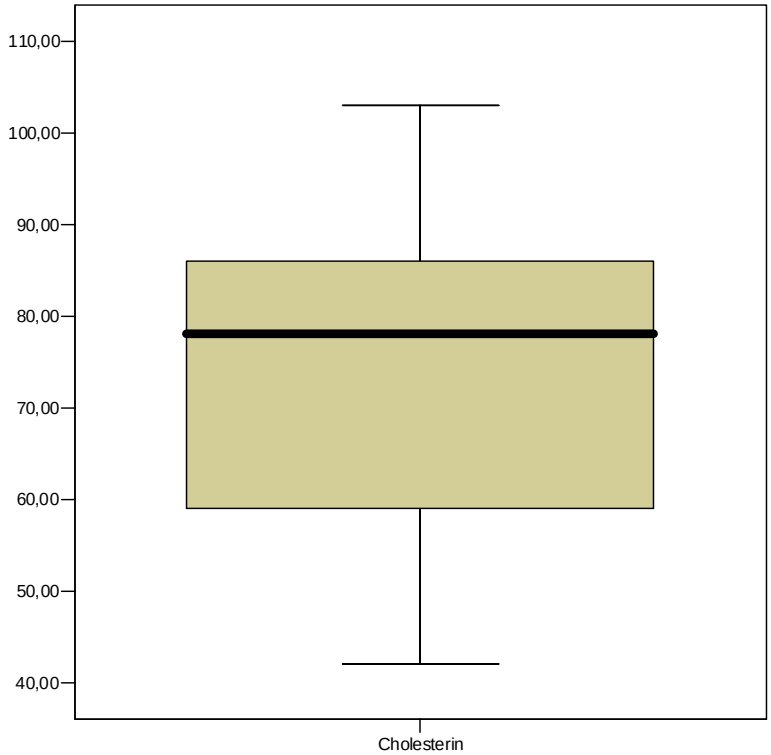
Laktat

Mittelwert 0,31 mmol/l, Standardabweichung 0,21 mmol/l



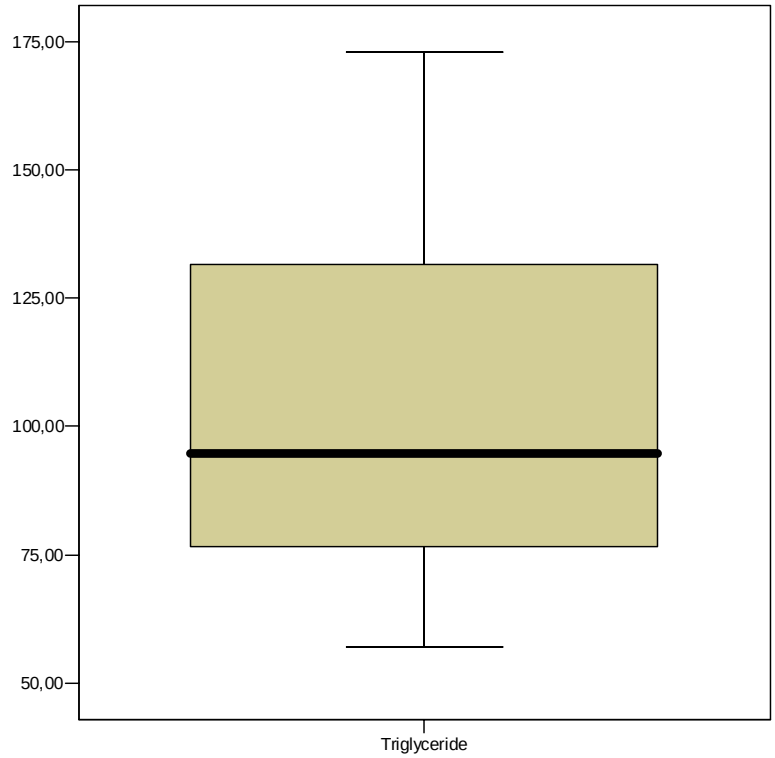
Cholesterin

Mittelwert 75 mg/dl, Standardabweichung 16 mg/dl



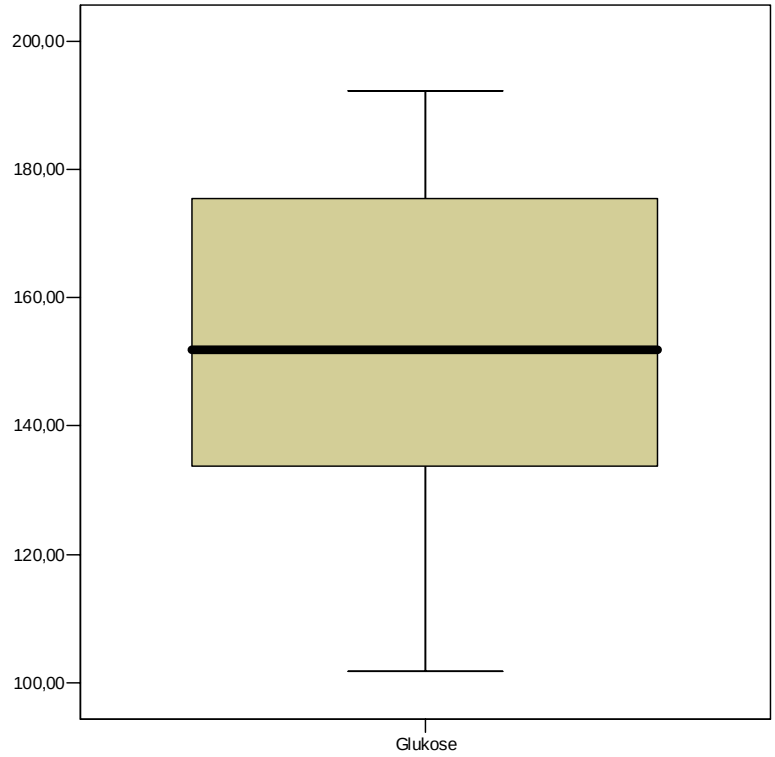
Triglyceride

Mittelwert 102 mg/dl, Standardabweichung 33 mg/dl



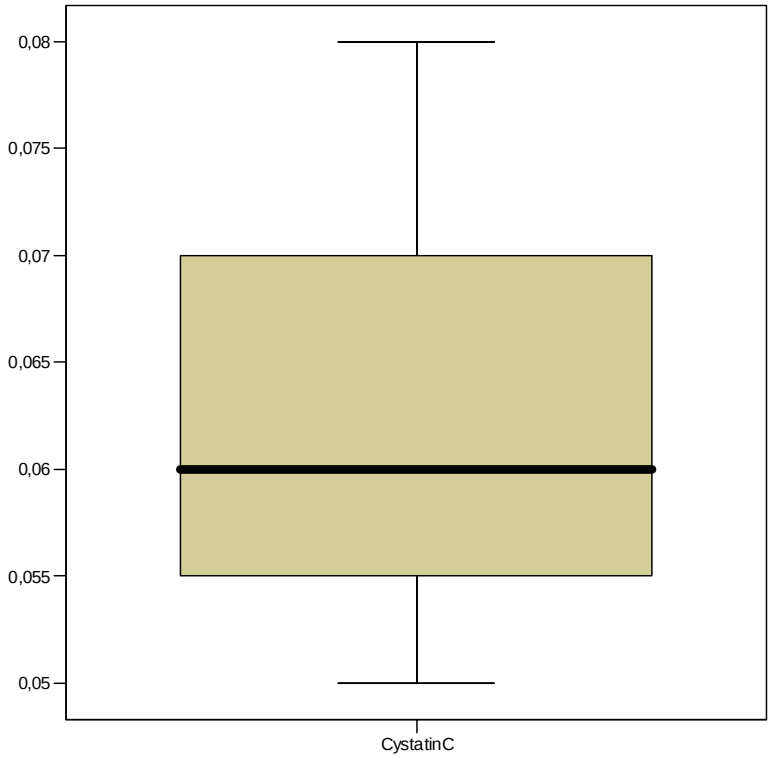
Glukose

Mittelwert 153 mg/dl, Standardabweichung 25,8 mg/dl



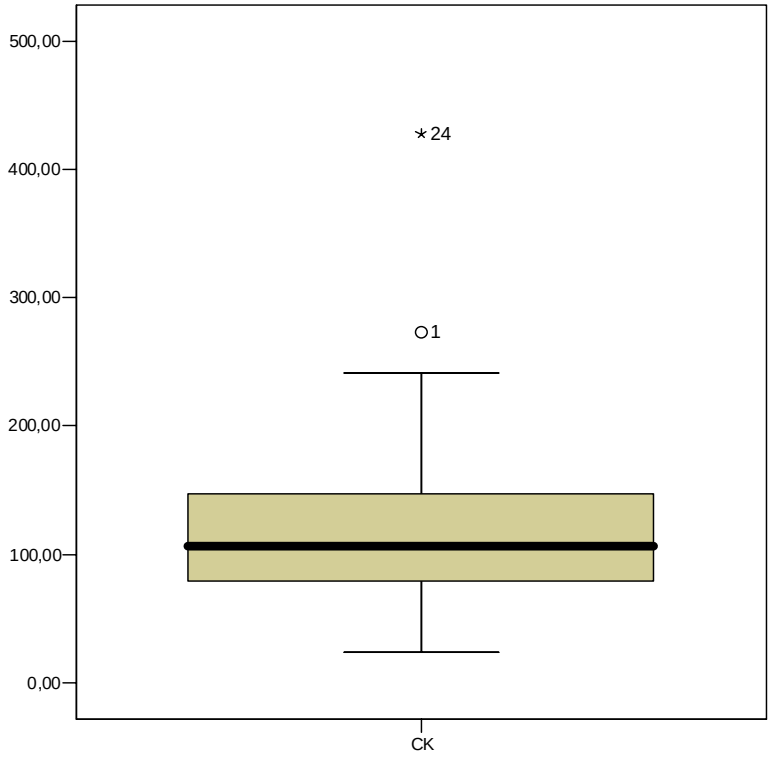
Cystatin C

Mittelwert 0,06 mg/dl, Standardabweichung 0,013 mg/dl



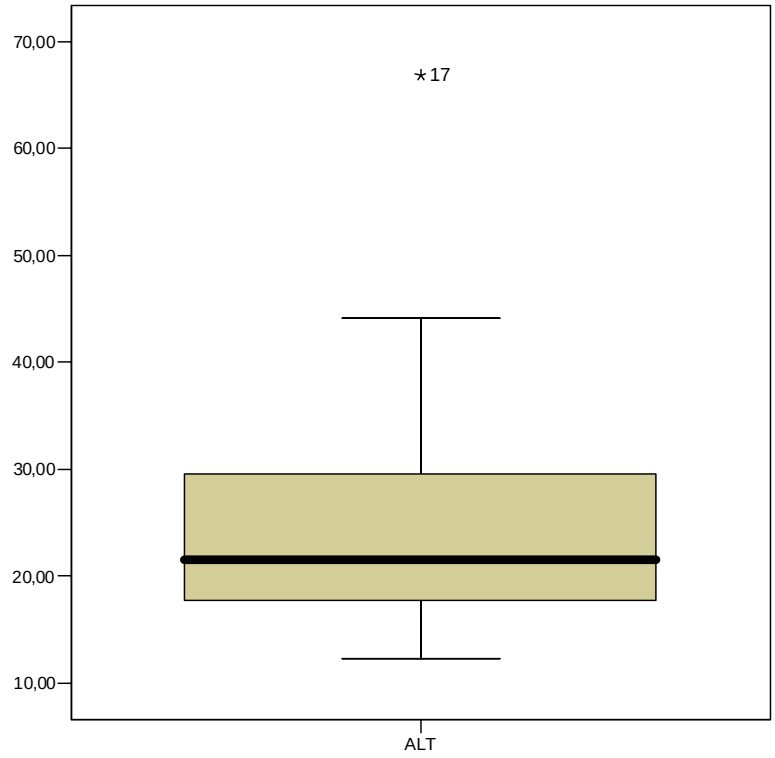
CK

Mittelwert126 U/l, Standardabweichung 84 U/l



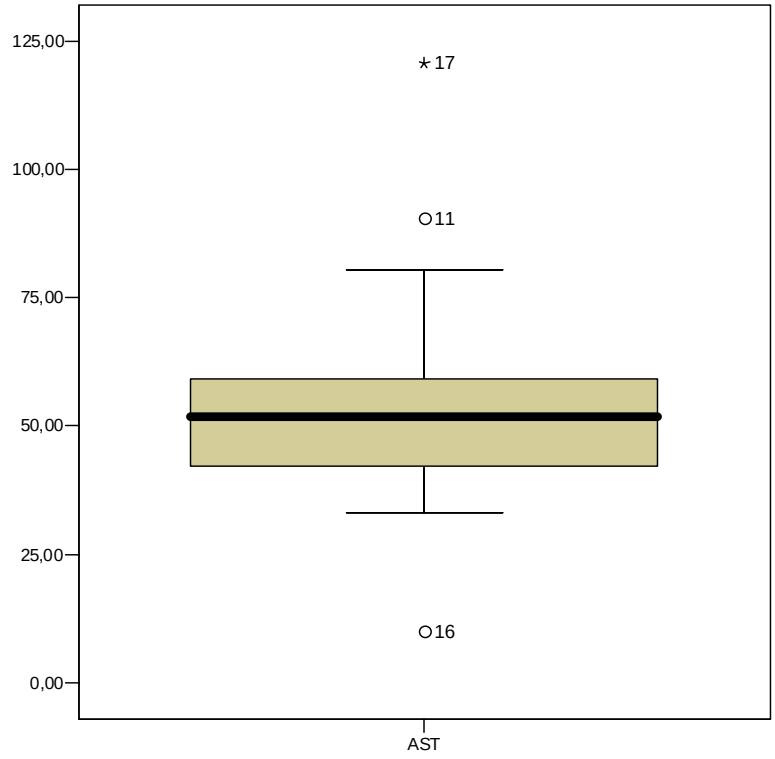
ALT

Mittelwert 25 U/l, Standardabweichung 11 U/l



AST

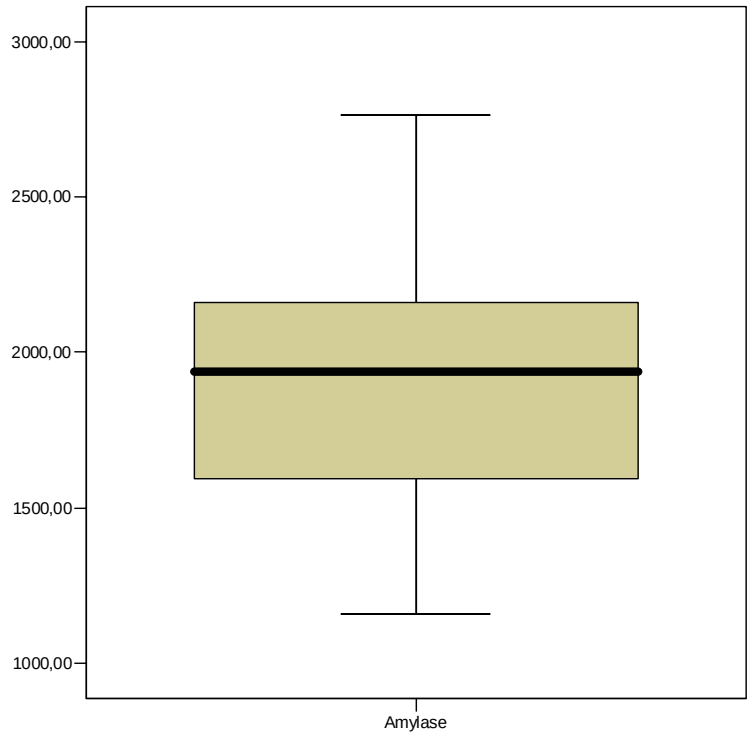
Mittelwert 55 U/l, Standardabweichung 20 U/l



GGT: < 3 U/l

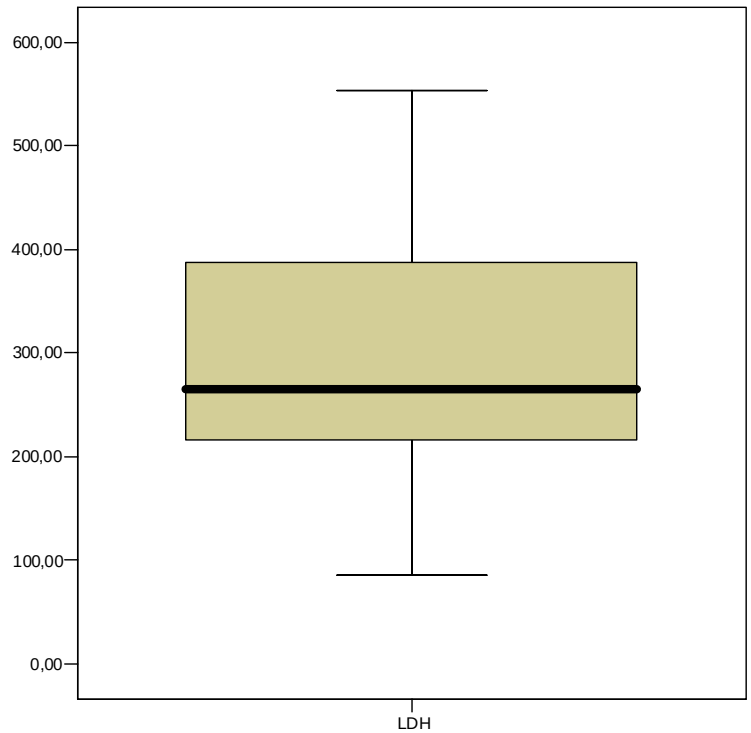
α-Amylase

Mittelwert 1924 U/l, Standardabweichung 384 U/l



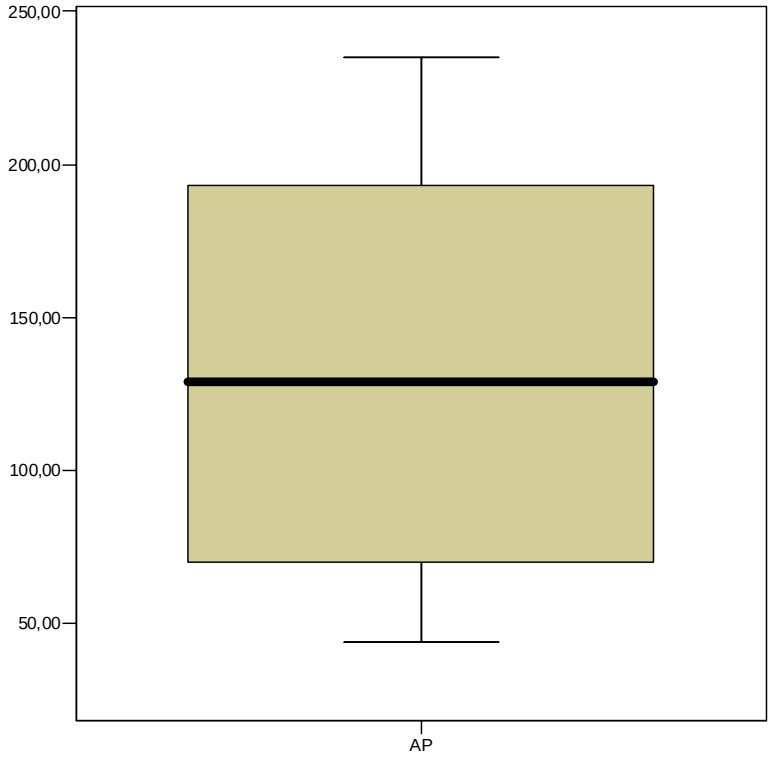
LDH

Mittelwert 296 U/l, Standardabweichung 121 U/l



AP

Mittelwert 133 U/l, Standardabweichung 66 U/l



4.3 Tabellarische Darstellung der Mittelwerte mit Standardabweichung

	Wistarratten		C57BL/6-Mäuse	
	männlich	weiblich	männlich	weiblich
Natrium mmol/l	137,2 (2,6)	143,8 (4,98)	155,5 (3,96)	157,5 (4,47)
Kalium mmol/l	5,31 (0,71)	4,85 (0,35)	4,40 (0,96)	4,58 (0,52)
Kalzium mmol/l	2,30 (0,11)	2,39 (0,19)	2,08 (0,12)	2,06 (0,17)
Kreatinin mg/dl	0,42 (0,73)	0,52 (0,58)	0,22 (0,19)	0,18 (0,05)
Harnstoff mg/dl	40,5 (9,8)	55,7 (6,8)	47,4 (20,4)	52,4 (10,4)
Harnsäure mg/dl	0,52 (0,19)	0,54 (0,37)	1,44 (0,39)	1,68 (0,95)
Bilirubin mg/dl	< 0,1	< 0,1	0,27 (0,13)	0,30 (0,28)
Eiweiß g/dl	4,81 (0,48)	5,91 (0,73)	4,01 (0,89)	3,99 (0,66)
Laktat mmol/l	3,54 (1,07)	2,85 (1,08)	0,28 (0,30)	0,31 (0,21)
Cholesterin mg/dl	56 (10)	58 (20)	89 (16)	75 (16)
Triglyceride mg/dl	102 (43)	150 (71)	102 (35)	102 (33)
Glukose mg/dl	125 (23)	115 (12)	140 (58)	153 (26)
Cystatin C mg/dl	0,12 (0,014)	0,09 (0,019)	0,06 (0,008)	0,06 (0,013)
CK U/l	444 (164)	347 (232)	199 (167)	126 (84)
ALT U/l	35 (10)	51 (26)	24 (10)	25 (11)
AST U/l	70 (16)	113 (53)	47 (13)	55 (20)
GGT U/l	< 3	< 3	< 3	< 3
α-Amylase U/l	1942 (269)	1465 (313)	2035 (355)	1924 (384)
LDH U/l	135 (58)	369 (241)	318 (122)	296 (121)
AP U/l	130 (34)	27 (7)	139 (43)	133 (66)

5 Diskussion

5.1 Normalbereiche

Der Begriff Normalbereich oder auch Normbereich wird ständig benutzt, aber er ist nicht eindeutig definiert. In der Klinischen Chemie ist er beschrieben als der Konzentrationsbereich, in dem die Analysenergebnisse „normaler“ Individuen zu erwarten sind. Der Normalwertbereich ist ein Bereich von Werten, die bei „Normalen“, also gesunden Personen vorkommen können und dem eine vorgegebene Wahrscheinlichkeit zukommt (GREILING, GRESSNER, 1995). Die Voraussetzung für die Erstellung von Normbereichen sind zum einen gebunden an die Verwendung eines statistischen Modells. Zum anderen benötigt man eine repräsentative Stichprobe (ausreichende Anzahl nichtmanipulierter, gesunder Mäuse und Ratten), eine Standardisierung der Randbedingungen (Geräte, Methoden, Präanalytik, Qualitätskontrolle und Messbedingungen) und eine bekannte und ausreichende Zuverlässigkeit der Analyse (Photometrie, Nephelometrie). Diese Bedingungen wurden in der vorliegenden Arbeit erfüllt.
Normbereiche für Wistarratten wurden zwar schon veröffentlicht, doch fehlt oftmals entweder eine genaue Methodenbeschreibung, oder die Auswahl der Population (LIBERATI, SANSONE, FEUSTON, 2004) ist nicht repräsentativ, oder die Messbedingungen sind unterschiedlich; teilweise findet man keine genauen Angaben zur Methodik (SHARP, LARENGINA, 1998).

5.2 Referenzbereiche der einzelnen Parameter

Die ermittelten Referenzbereiche sind, wie es im Allgemeinen in der klinischen Chemie üblich ist, methoden- und gerätespezifisch. Das heißt, eine Übernahme der Normbereiche ist bei Messungen mit anderen Methoden und an anderen Analysengeräten ohne Vergleichsmessungen nicht voll übertragbar. Der COBAS MIRA S ist ein Analysegerät, das aufgrund seines geringen Totraumvolumens Messungen von sehr geringen Probenmengen erlaubt und daher sehr gut geeignet ist Ratten- und Mäuseplasmen zu messen. Die Elektrolytbestimmungen am EFOX 5053 sind aufgrund des Prinzips der Emissionsflammenphotometrie sehr genau und wurde daher ausgewählt. Normbereiche für Cystatin C bei Wistarratten und Mäusen wurden bisher noch nicht bestimmt. Die Analyse von Cystatin C ist nephelometrisch am Behring Nephelometer II durchgeführt worden. Bei allen Tieren wurde darauf

geachtet, dass die Präanalytik strikt so eingehalten wurde, wie im Kapitel 3.1.2 beschrieben und Messfehler durch Qualitätskontrollmaßnahmen weitestgehend ausgeschlossen werden konnten. Unterschiede durch Haltung und Ernährung kann man ausschließen, da die Tiere unter gleichen Bedingungen gehalten wurden. Die Proben der Ratten wurden nicht gepoolt, d.h. es wurden Einzelmessungen durchgeführt. Bei den C57BL/6-Mäusen wurde für die Cystatin C-Bestimmung Plasmen von 3 bis 6 Mäusen gepoolt, da das Material für eine Einzelbestimmung nicht mehr ausreichte. Extreme Ausreißer wurden aus der statistischen Berechnung ausgeschlossen. Da der Gesundheitszustand nicht zu verifizieren war, wurden so vermutlich kranke Tiere, wie es sich beispielsweise bei der Glukosemessung herausstellte, aus der Population ausgeschlossen. In einigen Publikationen führte man eine Unterteilung nach Altersgruppen durch (ZHOU, 2004)(CHARLES RIVER LABORATORIES), aber die Abweichungen sind innerhalb der Gruppen bei den meisten Parametern nicht sehr stark, so dass in dieser Arbeit darauf verzichtet wurde. Der Vergleich zu schon veröffentlichten Normbereichen bezieht sich meistens auf Daten, die speziell für die Stämme der Wistarratten und C57BL/6-Mäuse erhoben wurden. Eine separate Darstellung findet sich im Kapitel 5.3.

5.2.1 Elektrolyte

5.2.1.1 Natrium

Der Mittelwert für männliche Wistarratten (137,2 mmol/l) ist signifikant niedriger als für weibliche (143,8 mmol/l). Die Plasma-Natrium-Konzentration bei den C57BL/6-Mäusen ist für beide Geschlechter mit Werten zwischen 155,5 bis 157,5 mmol/l sehr hoch und liegt deutlich über dem Normbereich für Menschen.

5.2.1.2 Kalium

Die Kalium-Mittelwerte bei den männlichen und weiblichen Ratten (gesamt 5,31 bis 4,85 mmol/l) sind im Vergleich zum Menschen deutlich höher. Eine weibliche Ratte musste aus der Berechnung ausgeschlossen werden, da sie auch nach Kontrolle einen Kaliumwert von 21,33 mmol/l hatte. Ähnlich verhält es sich bei den C57BL/6-Mäusen mit Kalium-Mittelwerten von 4,40 bis 4,58 mmol/l.

5.2.1.3 Kalzium

Der Referenzbereich liegt bei den männlichen und weiblichen Wistarratten, sowie bei den C57BL/6-Mäusen zwischen 2 bis 2,5 mmol/l und entspricht damit dem menschlichen Referenzbereich.

5.2.2 Substrate und Metabolite

5.2.2.1 Kreatinin

Im Gegensatz zum Menschen sind die Kreatininwerte bei Ratten und Mäusen deutlich niedriger. Die Mittelwerte liegen bei 0,42 und 0,52 mg/dl bei männlichen und weiblichen Tieren. Noch niedriger sind die Kreatininwerte der C57BL/6-Mäuse mit 0,18 bis 0,22 mg/dl. Dies liegt u.a. an der vegetarischen Ernährung der Tiere (DELANGHE et al., 1989).

5.2.2.2 Harnstoff

Die Harnstoffwerte männlicher Ratten sind niedriger als die der weiblichen; ebenso verhält es sich bei den Mäusen. Jedoch ist der Unterschied nicht signifikant.
Im Vergleich zum Menschen sind die Mittelwerte mit bis zu 55,7 mg/dl geringfügig höher.

5.2.2.3 Harnsäure

Die Harnsäure liegt bei männlichen und weiblichen Ratten bei 0,52 bzw. 0,54 mg/dl. Ein Wert von 2,2 mg/dl wurde bei der männlichen Population aus der statistischen Berechnung herausgenommen. Im Vergleich zum Menschen ist der Referenzbereich deutlich niedriger. Bei den Mäusen waren die Mittelwerte zwischen 1,44 und 1,68 mg/dl und damit etwas höher. Obwohl Ratten und Mäuse Omnivore (Allesfresser) sind, ernähren sie sich jedoch überwiegend vegetarisch. Dies wird auch bei der Fütterung der Versuchstiere berücksichtigt (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1995). Damit ist die purinarme Kost u.a. auch eine Erklärung für die niedrigen Harnsäurewerte.

5.2.2.4 Gesamtbilirubin

Bilirubin lag bei sämtlichen Rattenplasmen unter der Nachweisgrenze. Bei den C57BL/6-Mäusen konnte man bis zu 0,35/0,44 mg/dl Bilirubin nachweisen. Bei den

weiblichen Mäusen sind teilweise Bilirubinwerte über 5 mg/dl gemessen worden. Diese wurden aus der statistischen Berechnung herausgenommen, da hier ein pathologischer Prozess angenommen werden konnte.

5.2.2.5 Gesamteiweiß

Die männlichen Wistarratten haben ein deutlich geringeren Plasmaproteingehalt als die weiblichen (Mittelwerte: 4,81 g/dl männlich; 5,91 g/dl weiblich). Geschlechtliche Unterschiede stellten sich bei den Mäusen nicht heraus. Allerdings lag hier die Proteinkonzentration mit 4 g/dl noch niedriger als bei den Ratten. Eine Differenzierung der Proteinfraktionen könnte in zukünftigen Untersuchungen hilfreich sein, die Diskrepanz zwischen der niedrigen Plasmaproteinkonzentration von Ratten und Mäusen im Vergleich zum Menschen zu erklären.

5.2.2.6 Laktat

Die Laktatwerte sind bei den männlichen Wistarratten mit einem Mittelwert von 3,54 mmol/l höher als der weiblichen (Mittelwert 2,85 mmol/l). Ein Wert von über 11 mmol/l bei der männlichen Population und 2 Werte mit über 8 mmol/l bei der weiblichen wurden nicht in die statistische Berechnung miteinbezogen. Bei den C57BL/6-Mäusen sind die Laktatwerte für die männliche und weibliche Population mit Mittelwerten unter 0,3 mmol/l sehr niedrig.

5.2.2.7 Cholesterin

Der Mittelwert des Gesamtcholesterins von männlichen und weiblichen Ratten ist mit 56 bis 58 mg/dl deutlich niedriger als beim Menschen. Die Cholesterinkonzentration der Mäuse waren mit 75 und 89 mg/dl geringfügig höher.

5.2.2.8 Triglyceride

Die Triglyceride der männlichen Ratten sind mit einem Mittelwert von 102 mg/dl signifikant niedriger als die der weiblichen (150 mg/dl). Geschlechtliche Unterschiede sind bei den C57BL/6-Mäusen nicht vorhanden (Mittelwert 102 mg/dl).

5.2.2.9 Glukose

Im Heparinplasma ohne Glykolysehemmer wird eine fortschreitende Glykolyse nicht verhindert. Daher sind die wahren Glukosewerte geringfügig höher anzunehmen. Die

Wistarratten und C57BL/6-Mäuse haben gegenüber dem Menschen deutlich höhere Glukosekonzentrationen im Plasma (Mittelwerte für Ratten: männlich 125 mg/dl; weiblich 115 mg/dl, Mittelwerte für Mäuse: männlich 140 mg/dl; weiblich: 153 mg/dl) Ein Wert im Wistarrattenkollektiv wurde nicht in die statistische Bewertung einbezogen, da der Glukosewert nach Kontrolle über 500 mg/dl betrug.

5.2.2.10 Cystatin C

Die Cystatin C-Werte der Ratten von 0,08 bis 0,12 mg/dl und der Mäuse von 0,05 bis 0,08 mg/dl (männlich/weiblich) sind deutlich niedriger als die von Menschen (0,5 bis 1 mg/dl). Das Cystatin C weist, wie aus der NCBI-Genomdatenbank hervorgeht, unterschiedliche Proteinsequenzen beim Menschen, bei der Ratte und bei der Maus auf, so dass die im Test verwendeten polyklonalen Antikörper der Firma Dade Behring, die spezifisch für das menschliche Cystatin C entwickelt wurden, mit ihren verschiedenen Epitopen das Cystatin C der Nagetier wohl nicht vollständig erfasst. Leider war es mir nicht möglich weitere Informationen zu den Antikörpern zu bekommen. Die Größe des Proteins ist in etwa gleich. Der wahre Wert wird sehr wahrscheinlich nicht wiedergegeben; allerdings sind die ermittelten Ergebnisse verwertbar: Das Protein wird zwar nicht vollständig erfasst, aber in Relation zu den angenommenen wahren Werten liefert es brauchbare Normbereiche. Aussagen über die Nierenfunktion können so trotzdem getroffen werden. Ein Vergleich der Inulin-Clearence und der Cystatin C-Werte bei Ratten und Mäusen mit dem hier angewendeten Test wurde schon beschrieben (TAES et al., 2003), es zeigte sich eine gute Korrelation zwischen dem Cystatin-C-Serum-Anstieg und der Abnahme der Inulin- und Kreatinin-Clearence.

5.2.3 Enzyme

5.2.3.1 CK

Die CK ist bei männlichen und weiblichen Ratten mit Mittelwerten von 444 U/l und 347 U/l wesentlich höher als beim Menschen. Es wurde jeweils ein Ausreißer von 1388 U/l und 1112 U/l aus der statistischen Berechnung ausgeschlossen. Die Gesamt-CK bei den C57BL/6-Mäusen mit Mittelwerten von 199 und 126 U/l ist im Vergleich zu den Ratten niedriger, jedoch gegenüber dem Menschen auch signifikant höher. Ein Ausreißer-Wert mit über 1000 U/l wurde aus der Berechnung für die männliche Population herausgenommen.

5.2.3.2 ALT (GPT)

Zwei hohe Werte wurden aus der Messung bei den weiblichen Ratten ausgeschlossen, ein hoher Wert bei den männlichen. Die ALT-Aktivität ist bei der weiblichen Population mit einem Mittelwert von 51 U/l höher als bei der männlichen (Mittelwert 35 U/l). Im Vergleich zum Menschen sind die Mittelwerte geringfügig höher. Die Mäuse wiesen keine geschlechtlichen Unterschiede auf. Die GPT-Aktivitäten waren mit Werten von 24/25 U/l etwas niedriger. Allerdings ist die ALT-Aktivität insgesamt höher als beim Menschen.

5.2.3.3 AST (GOT)

Wie bei der ALT ist die Aktivität bei den weiblichen Wistarratten im Mittel mit 113 U/l deutlich höher als bei den männlichen 70 U/l. Ein hoher Wert wurde aus der statistischen Berechnung für männliche Ratten ausgeschlossen. Da die AST ein organunspezifisches Enzym ist, ist die Ursache des Unterschiedes schwer zu eruieren. Es scheint eine Korrelation zur ebenso höheren leberspezifischen ALT-Aktivität der weiblichen Ratten vorhanden zu sein, hypothetisch könnte die höhere AST-Aktivität von der Leber stammen.
Die Aktivität ist im Vergleich zum Menschen höher. Bei den männlichen und weiblichen Mäusen ist die AST-Aktivität mit Mittelwerten um ca. 50 U/l niedriger als bei den Ratten, allerdings sind auch hier die Werte höher als beim Menschen.

5.2.3.4 GGT (γ-GT)

Wistarratten und C57BL/6-Mäuse besitzen kaum messbare GGT-Aktivitäten. Vereinzelt wurden Werte von 4, 5 und 6 U/l gemessen. Doch über 90 % der Messungen lagen unter der Nachweisgrenze von 3 U/l. Da Ratten keine Gallenblase zur Speicherung der Gallenflüssigkeit haben, scheint es so zu sein, dass die GGT-Aktivität bei den Tieren geringer ist als beim Menschen und nur in sehr marginalen Mengen im Plasma zu messen ist.

5.2.3.5 α-Amylase

Die Aktivität der α-Amylase ist bei den Ratten im Vergleich zum Menschen sehr hoch. Bei den männlichen Ratten ist die im Mittel mit 1942 U/l deutlich höher als bei den weiblichen mit 1465 U/l. Die Mäuse hatten kaum unterschiedliche α-Amylase-Aktivitäten; diese waren ebenso wie bei den Ratten mit Mittelwerten für männliche Mäuse von 2034 U/l und weibliche Mäuse von 1924 U/l sehr hoch. Das Verdauungssystem bei Nagetieren ist aufgrund des unterschiedlichen Ernährungsverhaltens anders als das des Menschen. Nagetiere nehmen große Mengen rohfaser- und zellulosereiche Kost zu sich. Die α-Amylase-Aktivität ist schon im Speichel sehr hoch. Nagetiere haben „Vormägen“ in denen der Speichel die Nahrung weiterverarbeitet bevor er sie den Magen passiert (SCHMIDT-NIELSEN, 1999). Dies erklärt wahrscheinlich die wesentlich höhere α-Amylase-Aktivität. Außerdem wird die zellulosehaltige Kost im Blinddarm, der mit Bakterien besiedelt ist, zersetzt. Zudem sind Nagetiere sogenannte Koprophagen, d.h. sie fressen ihren eigenen Kot um dem Körper wichtige Stoffwechselprodukte und Bakterien zurückzuführen (SCHMIDT-NIELSEN, 1999).

5.2.3.6 LDH

Die LDH-Aktivität ist bei männlichen Wistarratten (Mittelwert 135 U/l) deutlich niedriger als bei weiblichen (Mittelwert 369 U/l). 2 Werte bei der männlichen und 6 Werte bei der weiblichen Population wurden nicht in die statistische Berechnung miteinbezogen, da sie mit einer Aktivität von weit über 1000 U/l deutlich als Ausreißer zu erkennen waren.
Der Unterschied zwischen männlicher und weiblicher Population ist bei den Mäusen (Mittelwerte um 300 U/l) nicht vorhanden, wobei 3 weibliche Tiere mit Werten über 700 U/l aus der Berechnung herausgenommen wurden. Hier würde eine Analyse über die Isoenzymverteilung weitere Erkenntnisse bringen.

5.2.3.7 AP

Der Mittelwert der männlichen Ratten ist mit 130 U/l deutlich höher als der Mittelwert der weiblichen (27 U/l). Bei den weiblichen Ratten schwankte die Messung kaum.
Die C57BL/6-Mäuse zeigten keine geschlechtlichen Unterschiede bei insgesamt höhren Werten (mittel 130 – 140 U/l). Da hier die Aktivität der gesamten Isoenzyme

gemessen wurde, wäre es darüber hinaus wichtig eine Isoenzym-Elektrophorese zur Unterscheidung des AP-Verteilungsmusters durchzuführen.
Im Vergleich zum Menschen ist die AP-Aktivität bei den Wistarratten niedriger, insbesondere bei der weiblichen Population, bei den C57BL/6-Mäusen ist der Unterschied gering.

5.3 Vergleichstabellen

Wistarratten

		Universität Düsseldorf				Charles River				Taconic				Waynforth	
Analyt	*Einh.*	*n*	*männl.*	*n*	*weibl.*	*n*	*männl.**	*n*	*weibl**	*n*	*männl.*	*n*	*weibl*	*n*	*männl*
Natrium	mmol/l	30	137,2	30	143,8	30	145	28	145	10	137,7	10	138,4	?	135
Kalium	mmol/l	30	5,31	29	4,85	29	6,5	29	6,0	10	5,02	10	5,23	?	4,9
Kalzium	mmol/l	30	2,3	30	2,39	-	-	-	-	10	2,42	10	2,60	?	2,6
Kreatinin	mg/dl	30	0,42	30	0,52	-	-	-	-	10	0,92	10	0,95	?	0,48
Harnstoff	mg/dl	30	40,5	30	55,7	30	19	29	22	10	19,8	10	19	?	19,4
Harnsäure	mg/dl	29	0,52	30	0,54	-	-	-	-	10	4,37	10	2,92	-	-
Bilirubin	mg/dl	30	< 0,1	30	< 0,1	-	-	-	-	10	0,38	10	0,142	?	0,12
Eiweiß	g/dl	30	4,81	30	5,91	29	7,2	29	7,5	10	6,4	10	6,38	?	6,3
Laktat	mmol/l	29	3,54	28	2,85	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cholesterin	mg/dl	30	56,1	30	57,6	-	-	-	-	10	82,1	10	92,90	?	73,5
Triglyceride	mg/dl	30	102,3	30	150,5	-	-	-	-	10	94,3	10	105,2	?	80
Glukose	mg/dl	30	124,7	29	115,7	28	115	29	109	10	203,1	10	165,1	?	182
Cystatin C	mg/dl	30	0,118	30	0,092	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CK	U/l	29	444,2	29	347,2	-	-	-	-	-	-	-	-	?	368**
ALT	U/l	29	35	28	51,5	29	31**	28	33**	10	38,5**	10	162,8**	-	-
AST	U/l	29	70,3	30	112,7	30	62**	28	66**	10	155,1**	10	39,7**	?	82**
GGT	U/l	30	< 0,3	30	< 0,3	-	-	-	-	10	6,9**	10	4,41**	?	10**
α-Amylase	U/l	29	1942,1	30	1464,7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LDH	U/l	28	134,8	24	368,8	-	-	-	-	10	460,3**	10	567,8**	-	-
AP	U/l	30	130,3	30	27,2	29	137**	28	108**	10	39,8**	10	38,7**	?	200

* Alter 19 bis 21 Wochen ** Messtemperatur unbekannt

C57BL/6-Mäuse

		Universität Düsseldorf				Taconic			
Analyt	*Einh.*	*n*	*männl.*	*n*	*weibl.*	*n*	*männl.*	*n*	*weibl*
Natrium	mmol/l	29	155,5	23	157,5	-	-	-	-
Kalium	mmol/l	29	4,40	23	4,58	-	-	-	-
Kalzium	mmol/l	29	2,08	23	2,06	10	2,59	-	2,57
Kreatinin	mg/dl	30	0,22	30	0,18	-	-	-	-
Harnstoff	mg/dl	28	47,4	30	52,4	10	25	10	25
Harnsäure	mg/dl	30	1,44	30	1,68	-	-	-	-
Bilirubin	mg/dl	30	0,27	30	0,30	-	-	-	-
Eiweiß	g/dl	30	4,01	30	3,99	-	-	-	-
Laktat	mmol/l	30	0,28	28	0,31	-	-	-	-
Cholesterin	mg/dl	30	89	29	75	-	-	-	-
Triglyceride	mg/dl	30	102	29	102	-	-	-	-
Glukose	mg/dl	29	140	30	153	10	167	10	155
Cystatin C	mg/dl	30	0,06	30	0,06	-	-	-	-
CK	U/l	29	199	30	126	-	-	-	-
ALT	U/l	30	24	30	25	10	86**	28	90**
AST	U/l	30	47	30	55	-	-	-	-
GGT	U/l	30	< 3	30	< 3	-	-	-	-
α-Amylase	U/l	30	2035	30	1924	-	-	-	-
LDH	U/l	30	318	25	296	-	-	-	-
AP	U/l	30	139	29	133	10	165**	10	259**

** Messtemperatur unbekannt

5.4 Ausblick

Die Referenzbereiche für Wistarratten und C57BL/6-Mäuse sind abhängig von den Methoden und Geräten. Die Tests wurden ausschließlich mit kommerziell erhältlichen Kits vorgenommen, die im Allgemeinen in den meisten Laboratorien benutzt werden. Dies gilt auch für die Analysengeräte. Da bei den bisherigen Normbereichen der untersuchten Tiere oft eine Beschreibung der Methoden und Geräte und ebenfalls der Messtemperatur fehlte, soll mit dieser Arbeit die Möglichkeit einer besseren Standardisierung gegeben werden um laborchemische Parameter für Forschende an Wistarratten und C57BL/6-Mäusen nachvollziehbar und vergleichbar zu machen. Auffallend ist, dass sich einige Normbereiche der Ratten und Mäuse, erheblich von den menschlichen unterscheiden. Beispielsweise ist es, in Kenntnis davon, dass der Normbereich der α-Amylase-Aktivität (ZHOU, 2004) von Ratten und Mäusen deutlich höher ist, bei manipulierten Tieren nicht auf Schädigungen des Pankreas zurückzu führen. Unterschiede der Normbereiche zwischen Mensch und Ratte/Maus für andere Parameter wie AST, CK, Kalium, Glukose, LDH, Harnsäure etc. müssen berücksichtigt werden, um nicht irrtümlich pathologische Prozesse bei manipulierten Tieren anzunehmen. Bei den Normbereichen für Natrium, Kalium, Glukose, CK, LDH und den Transaminasen ist eine große Variabilität vorhanden. Daher ist es schwierig, zu definieren, wann ein Wert als pathologisch beurteilt werden kann. Weitere Untersuchung, z.B. Isoenzymbestimmungen für die AP oder LDH würden weitere Erkenntnisse über die im Vergleich zum Menschen hohe Aktivität bringen.

6 Zusammenfassung

Die Erstellung der Referenzbereiche wurden in einem Zeitraum von 6 Monaten durchgeführt. Dafür wurden jeweils 30 männliche und 30 weibliche Wistarratten sowie C57BL/6-Mäuse untersucht. Die Tiere waren noch nie medikamentös behandelt worden und erfüllten die Anforderungen für die Definition „gesund“, somit eine ideale Populationen zu Erstellung von Normbereichen. Die Ratten und Mäuse waren zum Zeitpunkt der Blutentnahme erwachsen mit einem Gewicht von 250 bis 300 Gramm (Wistarratten) und 20 bis 30 Gramm (C57BL/6-Mäuse). Nach Anästhesie der Tiere wurde aus der Aorta oder den großen Becken-Arterien mit einer mit Heparin durchgespülten Spritze Blut entnommen und in Reagenzröhrchen gefüllt. Anschließend wurde das Blut 10 Minuten bei 3400 U/Min zentrifugiert, in Eppendorf-Cups einpippetiert und bei –20 Grad Celsius tiefgefroren. Die Analysen erfolgten bei 37 Grad Celsius. Für die Substrate, Metabolite und Enzyme wurde der COBAS MIRA S aufgrund des gering benötigten Plasmavolumens eingesetzt. Die Elektrolytbestimmungen wurden am EFOX 5053 wegen der größeren Genauigkeit im Vergleich zu den ionenselektiven Elektroden durchgeführt. Cystatin C ist am Behring Nephelometer II bestimmt worden. Qualitätskontrollen für die Richtigkeit und Genauigkeit sind vor jeder Messreihe erfolgreich durchgeführt worden. Mithilfe des SPSS-Programms wurden die Ergebnisse als Mittelwerte mit Standardabweichungen berechnet und als Boxplots dargestellt. Die Referenzbereiche der Wistarratten weisen zum Teil deutliche Unterschiede zwischen der männlichen und weiblichen Population auf. Vor allem die Werte von Natrium, Gesamteiweiß, Harnstoff, Triglyceride, ALT, AST und LDH sind bei den weiblichen Ratten signifikant höher. Hingegen Laktat, CK, α-Amylase und AP dagegen deutlich niedriger. Die Werte sind im Vergleich zum Menschen in vielen Parametern unterschiedlich. Kalium, Glukose, CK, ALT, AST, LDH und vor allem die α-Amylase mit Mittelwerten von 1465 und 1942 U/l sind deutlich höher, wobei Gesamtcholesterin, Kreatinin und Gesamteiweiß geringfügig niedriger sind, Harnsäure deutlich niedriger ist und Bilirubin und GGT unter der Nachweisgrenze liegen. Die Wertlage des Cystatin C bei den Wistarratten mit etwa 0,1 mg/dl ist ebenfalls signifikant niedriger und entspricht wahrscheinlich nicht dem wahren Wert. Dies beruht eventuell auf der unterschiedlichen Proteinstruktur des Cystatin C zwischen den Spezies und der Epitope der im Test eingesetzten Antikörper. Allerdings ist der Normbereich als „Relativ-Normbereich“

brauchbar und wurde in Studien bestätigt (TAES et al. 2003). Gleiches gilt auch für die Cystatin C-Werte bei den C57BL/6-Mäusen. Besonders signifikant ist der ermittelte Referenzbereich für die Natrium-Plasma-Konzentration, die bei den C57BL/6-Mäusen zwischen 154 und 162 mmol/l liegt. Geschlechtliche Unterschiede sind bei den C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu den Wistarratten nicht so ausgeprägt. Die Normbereiche für die C57BL/6-Mäuse liegen für Natrium, Kalium, Harnstoff, Glukose, Gesamt-CK, AST, ALT, LDH und vor allem für die α-Amylase höher als beim Menschen, für Kreatinin, Harnsäure, Laktat, Cholesterin, Triglyceride, Cystatin C und AP darunter. Die GGT lag, wie bei den Wistarratten unterhalb der Nachweisgrenze. Extreme Ausreißer wurden aus der statistischen Berechnung herausgenommen, da man einen pathologischen Prozess im Organismus annehmen musste. Bei einigen Analyten (LDH, CK) ist der Normbereich von niedrigen und hohen Messwerten ziemlich breit. Daher ist es schwierig festzulegen, wann ein Messwert als pathologisch zu beurteilen ist.

7 Literaturverzeichnis

ALLAIN, C.C. et al. (1974) : Clin Chem ; 20 :470.

BARTHELS, H. et al. (1972): Clin Chim Acta; 37:193.

BERGMEYER, H.U., HORDER, M., REJ, R. (1986): Approved recommendation (1985) in IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC Method for alanine aminotransferase. J Clin Chem Clin Biochem; 24:481-489.

BOKENKAMP, A., CIARIMBOLI, G., DIETRICH, C. (2001): Cystatin C in a rat model of end-stage renal failure. Ren Fail, May-Jul;23(3-4):431-8.

BUDDECKE, E. (1974): Grundriss der Biochemie. $. Auflage, De Gruyter & Co., Berlin.

BUDDECKE, E. (1983): Pathobiochemie. 2. Auflage, De Gruyter & Co., Berlin.

CHARLES RIVER LABORATORIES (1982): Baseline Hematology and Clinical Chemistry Values for Charles River Wistar Rats, Wilmington.

CHARLES RIVER LABORATORIES (1993): Clinical Laboratory Parameters for Crl:CD (SD) BR, Charles River Laboratories, Wilmington.

DELANGHE, J., DE SLYPERE, J.P., DE BUYZERE, M. et al. (1989) : Normal reference values for creatine, creatinine, and carnitine are lower in vegetarians. Clin Chem; 35:1802-1803.

FESTING, M.F. (1999) Inbred strains of mice. Mouse Genome Informatics, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine.

FESTING, M.F., WOLFF, G.L. (1995): Inbred strains of laboratory animals: superior to outbred mice? J Natl Cancer Inst., Nov 15;87(22):1715-6.

GREILING H., GRESSNER, A.M. (1995): Lehrbuch der klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3. Auflage, Schattauer, Stuttgart.

HARRISON, S.D. Jr, BURDESHAW, J.A., CROSBY, R.G., CUSIC, A.M., DENINE, E.P. (1978): Hematology and clinical chemistry reference values for C57BL/6 X DBA/2 F1 mice. Cancer Res., Aug;38(8):2636-9

HAUSAMEN, T.U. et al. (1967): Clin Chem Acta; 15:241.

HIRANO, T., TAKAGAKI, Y. (1976): Clinical blood chemistry values in normal Wistar-Imamichi rats using the RaBA-System (autor's transl), Jikken Dobutsu, Oct;25(4):303-6.

HOUGH, T.A., NOLAN, P.M., TSIPOURI, V., TOYE, A.A., GRAY, I.C., GOLDSWORTHY, M., MOIR, L. COX, R.D., CLEMENTS, S., GLENISTER, P.H., WOOD, J., SELLEY, R.L., STRIVENS, M.A., VIZOR, L., McCORMACK, S.L., PETERS, J., FISHER, E.M., SPURR, N., RASTAN, S., MARTIN, J.E., BROWN, S.D.M., HUNTER, A.J. (2002): Novel phenotypes identified by plasma biochemical screening in the mouse. Mammalian Genome 13, 595-602. Springer-Verlag, New York.

JUNGERMANN, K., MÖHLER, H. (1980): Biochemie. 1. Auflage, Springer-Verlag, Heidelberg.

KARLSON, P. (1994): Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 14. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart.

KARLSON, P., GEROK, W., GROSS, W. (1978): Pathobiochemie. 1. Auflage, Thieme-Verlag, Stuttgart.

KRUSE-JARRES, J.D., HAFKENSCHEID, J.C.M., HOHENWALLNER, W. et al. (1989): Evaluation of a New α-Amylase ASSAY Using 4.6-Ethylidene-(G_7)-1-4-nitrophenyl-(G_1)-α-D-maltoheptaoside as Substrate. J Clin Chem Clin Biochem; 27:103-113.

LAYBOLD, K., GRABENER, E. (1976): Praxis-Laboratorium: Grundlagen der Laboratoriumsdiagnostik, Thieme-Verlag, Stuttgart.

LIBERATI, T.A., SANSONE, S.R., FEUSTON, M.H. (2004): Hematology and clinical chemistry values in pregnant Wistar Hannover rats compared with nonmated controls. Vet Clin Pathol.; 33(2): 68-73.

LOEB, W.F., QUIMBY, F.W., eds. (1999): The Clinical Chemistry of Laboratory Animals. Pergamon Press, Oxford.

LONG, C.A., MARIN, P., BAYER, A.J., SHETTY H.G.M., PATHY, M.J.S. (1991): Hypernatriämia in an adult in-patient population. Postgrad Med J; 67:643-5.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1995): Nutrient Requirements of Laboratory Animals, furth revised edition, The Nutrient Requirement of the Mouse: 80-102.

OLIVER, I.T. (1955): Biochem J; 61:116

PETERSON, J.I., YOUNG, D.S. (1958) : Anal Biochemistry, 23 :301.

POPPER, H. et al. (1937): Biochem Z ; 291:354.

RANDERS, E., ERLANDSEN, E.J (1999): Serum cystatin C an endogenous marker of the renal function – a review. Clin Chem Lab Med; 37:389-95.

ROESCHLAU, P. et al. (1974): Z Klin Chem Klin Biochem; 12 :226.

ROSALKI, S.B. (1967): J Lab Clin Med; 69:696.

SCHMIDT, E., SCHMIDT, F.W. (1987): Enzyme Release. J Clin Chem Clin Biochem; 25:525-40.

SCHMIDT, F.H. (1961): Klin Wschr; 39:1244.

SCHMIDT-NIELSEN, K. (1999): Physiologie der Tiere. 1. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

SEELIG, H.P., WÜST, H. (1969): Ärztl. Labor; 15:34.

SELDIN, D.W., GIEBISCH, G. (1989): The regulation of potassium balance. Raven, New York; 177-205.

SELDIN, D.W., GIEBISCH, G. (1990): The regulation of sodium and chloride balance. Raven, New York; 237-59.

SELDIN, D.W., GIEBISCH, G. (1993): Clinical disturbance of watermetabolism. Raven, New York; 1-9.

SHARP, P.E., LAREGINA, M.C. (1998): The Laboratory Rat. 1. Auflage, CRC Press, Boca Taton, Florida.

SUCKOW, M.A., DANNEMAN, P., BRAYTON, C. (2000): The Laboratory Mouse, 1. Auflage, CRC Press, Boca Taton, Florida.

SZASZ, G. et al. (1976) : Clin Chem ; 22 :650.

SZASZ, G., PERSIJN, J.P. et al. (1974): Z Klin Chem Klin Biochem ; 12:228.

TACONIC TECHNICAL LIBRARY: Taconic B6 Phenotyping, Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research, Germantown, USA.

TACONIC TECHNICAL LIBRARY: Hematological and Clinical Chemistry Values Wistar-Kyoto Rats, Taconic Quality Laboratory Animals and Services for Research, Germantown, USA.

TAES, Y.E.C., DELANGHE, J.R., WUYTS, B., VAN DE VOORDE, J., LAMEIRE, N.H. (2003): Creatine supplementation does not affect kidney function in an animal model with pre-existing renal failure. Nephro Dial Transplant; 18:258-264.

TALKE, H. SCHUBERT, G.E. (1965): Enzymatische Harnstoffbestimmung im Blut und Serum im optischen Test nach Warburg. Klin Wschr; 43:174-175.

THOMAS, L. (1998): Labor und Diagnose. 5. Auflage, TH-Books-Verlagsgesellschaft, Frankfurt.

TOWN, M.H., GEHM, S., HAMMER, B., ZIEGENHORN, J. (1985): Clin Chem Clin Biochem; 23:591.

VAN DERHEIDEN, C., BAIS, R., GERHARDT, W., LORENTZ, K., ROSALKI, S. (1994): Approved recommendation on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 8. IFCC method for lactate dehydrogenase. Eur J Clin Chem Clin Biochem; 32:639-655.

WAHLEFELD, A.W., HERZ, G., BERNT, E. (1972): Modification of the Mallory-Evelyn method for a simple, reliable determination of total bilirubin in serum. Scand J clin Lab Invest; 29 Supplement 126:Abstract 11.12.

WAHLEFELD, A.W., BERGMEYER, H.U. (1974) : Methods of Enzymatic Analysis. 2nd English ed. New York, NY: Academic Press Inc, 1974:1831.

WAYNFORTH, H.B., FLECKNELL, P.A. (1992): Experimental and Surgical Technique in the Rat, 2nd Edition; Academic Press.

WOLFENSOHN, S., Lloyd, M. (1996): Handbook of Laboratory Animal Management and Welfare, Oxford University Press, Oxford.

WROBLEWSKI, F., LADUE, J.S. (1956): Proc Soc Exp Biol Med; 91:569.

ZAN, Y., HAAG, J.D., CHEN, K.S., SHEPEL, L.A., WIGINGTON, D., WANG, Y.R., HU, R., LOPEZ-GUJARDO, C.C., BROSE H.L., PORTER, K.I., LEONARD, R.A., HITT, A.A., SCHOMMER, S.L., ELEGBEDE, A.F., GOULD, M.N. (2003): Production of knockout rats using ENU mutagenesis and a yeast-based screening assay. Nat Biotechnol., Jun;21(6):645-51.

ZHOU, X., HANSSON, G.K. (2004): Effect of sex and age on serum biochemical reference ranges C57BL/6J mice, Comp Med Apr;54(2):176-8.

8 Danksagung

Vielen Dank an Prof. F. Boege für die Überlassung des Themas und die Betreuung, Prof. K. Zacharowski für die Unterstützung und die Betreuung. Lieben Dank an Frau Reiners-Hüggenberg für die praktischen Tätigkeiten und Hilfestellungen. Mein Dank gilt ebenso Frau Antje Nebert.

Lebenslauf

Name:	Zur
Vorname:	Berndt
Geburtsdatum/-ort:	06.11.1963, Köln
Anschrift:	Zülpicher Wall 40 50674 Köln
Familienstand:	geschieden, 1 Kind

Schulbildung:

08/1970 – 06/1974	Grundschule in Köln Bocklemünd
08/1974 – 06/1979	Montessori Gymnasium
08/1979 – 06/1981	Gesamtschule, Köln-Chorweiler
02/1990 – 12/1992	Köln-Kolleg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

09/1981 – 04/1985	Ausbildung zum Schriftsetzer, Deutscher Ärzte-Verlag in Köln

Hochschulausbildung:

04/1993 – 11/1999	Studium der Humanmedizin, Medizinische Fakultät der Universität Köln
02.07.2001	Approbation als Arzt

Beruflicher Werdegang:

1986 – 1993	Tätigkeit als Schriftsetzer
01/2000 – 12/2000	Arzt im Praktikum, Innere Medizin Reha-Zentrum Reuterstraße, Bergisch Gladbach
01/2001 – 06/2005	Wissenschaftlicher Mitarbeiter und Weiterbildungsassistent im Fach Laboratoriumsmedizin, Institut für Klinische Chemie und Laboratoriumsdiagnostik, Universitätsklinik Düsseldorf
22.06.2005	Facharzt für Laboratoriumsmedizin
seit 01.07.2005	Tätigkeit als Facharzt für Laboratoriumsmedizin, Institut für Klinische Biochemie, Universitätsklinik Bonn