Tierärztliche Hochschule Hannover

Untersuchungen zur Analytik und diagnostischen Aussagekraft von IL-6 und TGF-ß1 beim Hund

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Grades einer

Doktorin der Veterinärmedizin

- Doctor medicinae veterinariae -

(Dr. med. vet.)

vorgelegt von

Sonja Gaedcke, geb. Scheulen

Köln

Hannover 2012

Wissenschaftliche Betreuung: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup,
Deutsches Primatenzentrum, Göttingen
Prof. Dr. S. Neumann,
Kleintierklinik des Tierärztlichen Institutes der
Georg-August-Universität, Göttingen

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. F.-J. Kaup

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. M. Fehr

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2012

Meiner Familie gewidmet

Teilergebnisse dieser Dissertation wurden bereits auf folgender Fachtagung veröffentlicht:

19. Jahrestagung der Fachgruppe „Innere Medizin & klinische Labordiagnostik“ der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (2011)

SCHEULEN, S. u. S. NEUMANN;
Untersuchungen zu Analytik und diagnostischem Nutzen von TGF-ß1 beim Hund

CHILLA, A., S. SCHEULEN u. S. NEUMANN
Untersuchungen zu Frühentzündungsmarkern nach chirurgischen Eingriffen

BORCHERT, J., S. SCHEULEN u. S. NEUMANN
Der diagnostische Nutzen von IL-6 bei internistischen Erkrankungen des Hundes

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 15

2 Stand der Literatur 17

2.1 Allgemeiner Überblick – die Zytokine 17

2.2 Spezieller Überblick – IL-6 18

2.2.1 IL-6 18

2.2.2 IL-6-Rezeptoren 19

2.2.3 IL-6-Signaltransduktion 21

2.2.4 IL-6-Wirkungsspektrum im Organismus 22

2.2.5 Klinische Bedeutung von IL-6 in der Humanmedizin 25

2.2.6 IL-6 in der veterinärmedizinischen Literatur 26

2.3 Spezieller Überblick – TGF-β 29

2.3.1 TGF-β 29

2.3.2 TGF-β-Rezeptoren 32

2.3.3 TGF-β Signaltransduktion 33

2.3.4 TGF-β1-Wirkungsspektrum im Organismus 34

2.3.5 Klinische Bedeutung von TGF-β1 in der Humanmedizin 39

2.3.6 TGF-β1 in der veterinärmedizinischen Literatur 40

3 Material und Methoden 46

3.1 Patienten 46

3.1.1 Patienten - Referenzgruppe 46

3.1.2 Patienten - erkrankte Tiere 47

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien 48

3.2.1 Geräte 48

3.2.2 Verbrauchsartikel 49

3.2.3 Reagenzien und Lösungen 49

3.3 Gewinnung und Verarbeitung der Proben 51

3.3.1 Blutgewinnung 51

3.3.2 Aufbereitung der Proben 52

3.4 ELISA 53
3.4.1 ELISA allgemein 53
3.4.2 Prinzip des ELISA zur Bestimmung von IL-6/TGF-β1 56
3.5 Haltbarkeit 56
3.6 Durchführung der ELISA 57
3.6.1 Testdurchführung „Quantikine Canine IL-6 Immunoassay“ 57
3.6.2 Testdurchführung des “Quantikine Human TGF-β1 Immunoassay“ 58
3.7 Auswertung 60
3.7.1 Auswertung der ELISA 60
3.7.2 Statistische Auswertung 60
4 Ergebnisse 62
4.1 IL-6 62
4.1.1 Haltbarkeit 62
4.1.2 Patienten 63
4.1.3 Rassenverteilung gesunder Hunde 63
4.1.4 Geschlechtsverteilung gesunder Hunde 63
4.1.5 Altersverteilung gesunder Hunde 64
4.1.6.1 Rassenverteilung kranker Hunde 64
4.1.6.2 Geschlechtsverteilung kranker Tiere 65
4.1.6.3 Altersverteilung kranker Tiere 65
4.1.6.4 Einteilung der Erkrankungen nach Organsystemen/Themenkomplexen 65
4.1.7 Blutkonzentrationen von IL-6 66
4.1.7.1 IL-6 Konzentration bei entzündlichen Erkrankungen 68
4.1.7.2 IL-6-Konzentrationen bei neoplastischen Erkrankungen 68
4.1.7.3 IL-6-Konzentrationen bei Hepatopathien 69
4.1.7.4 IL-6-Konzentrationen bei Niereninsuffizienz 69
4.1.7.5 IL-6-Konzentration bei Diabetes mellitus 70
4.1.7.6 IL-6-Konzentration anderer Erkrankungen 70
4.1.7.7 Perioperative IL-6-Konzentration 70
4.2 TGF-β1 72
4.2.1 Ausgangsmaterial 72

4.2.2 Haltbarkeit ... 74
4.2.3 Patienten ... 76
4.2.4 Rassenverteilung gesunder Hunde ... 77
4.2.5 Geschlechtsverteilung gesunder Hunde ... 77
4.2.6 Altersverteilung gesunder Hunde ... 77
4.2.7 Rassenverteilung kranker Hunde ... 77
4.2.8 Geschlechtsverteilung der kranken Hunde ... 78
4.2.9 Altersverteilung der kranken Hunde ... 78
4.2.10 Einteilung der Erkrankungen nach Organsystemen/Themenkomplexen. 78
4.2.11 Messwerte TGF-β1 ... 80
4.2.11.1 TGF-β1 und neoplastische Erkrankungen ... 81
4.2.11.2 TGF-β1 und entzündliche Erkrankungen ... 82
4.2.11.3 TGF-β1 und Hepatopathien ... 84
4.2.11.4 TGF-β1 und Niereninsuffizienzen ... 84
4.2.11.6 TGF-β1 und Erkrankungen, die mit Fibrosen einhergehen ... 85
4.2.11.7 TGF-β1 und andere Erkrankungen ... 86
5 Diskussion ... 87
5.1 IL-6 ... 88
5.1.1 Haltbarkeit ... 88
5.1.2 Referenzwerte ... 89
5.1.3 IL-6-Werte bei kranken Hunden ... 91
5.2 TGF-β1 ... 101
5.2.1 Haltbarkeit ... 103
5.2.2 Normalwerte ... 103
5.2.3 TGF-β1 bei erkrankten Hunden ... 103
6 Zusammenfassung ... 110
7 Summary ... 112
8 Literaturverzeichnis ... 114
9 Tabellen ... 136
10 Referenzwerte ... 149

Abkürzungsverzeichnis

ALT	Alanin-Amino-Transferase
APR	Akute-Phase-Reaktion
AST	Aspartat-Amino-Transferase
BASO	basophile Granulozyten
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BMP	Bone morphogenetic proteins
BSF-2	B-Zell-stimulierender-Faktor-2
Cbfas	Core binding factor familiy of transcriptional factors
CBM	zytokinbindendes Modul
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CRP	C-reaktives Protein
CT-1	Cardiotrophin-1
CTVT	Caniner transmissibler veneraler Tumor
Dpp	Decapentaplegic
EDRF	Endothelium-derived relaxing factors
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EOS	Eosinophile Granulozyten
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
fg/ml	Femtogramm/Milliliter
FUO	fever of unknown origin
GLDH	Glutamat-Dehydrogenase
HCT	Hämatokrit

HGB	Hämoglobin
HGF	Hepatocyte growth factor
Hrs	Hepatic growth factor-regulated tyrosine kinase substrate
HSF	Hepatozytenstimulierender Faktor
IBD	Inflammatory bowel disease
ICAM	intercellular adhesion molecule
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-6-R	Interleukin-6-Rezeptor
JAB	JAK-binding proteins
JAK	Januskinase
LAP	Latency-associated protein
LIF	Leukemia inhibitory factor
LPS	Lipopolysaccharide
L-TGF	latent TGF
LYM	Lymphozyten
M	Molarität
Mad	Mother against decapentaplegic protein genes
MAP-Kinase	mitogenaktivierte Proteinkinase
MCH	mean corpuscular hemoglobin
MCHC	mean corpuscular hemoglobin concentration
MCV	mean corpuscular volume
MHC	major histocompatibility complex
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MONO	Monozyten

N	Normalität
NES	nuclear export sequenz
NEU	neutrophile Granulozyten
NF-κB	Nuklearfaktor kappa-B
NGF	nerve growth factor
ng/ml	Nanogramm/Milliliter
NLS	nuclear localization signal
OD	optische Dichte
OSM	oncostatin M
PDGF	platelet-derived growth factor
pg/ml	Pikogramm/Milliliter
PIAS	protein inhibitors of activated STATs
PLT	platelets
PT	Thromboplastinzeit
PTHrP	Parathyroid Hormon related Protein
PTT	partielle Thromboplastinzeit
RBC	red blood cells
RIA	Radioimmunoassay
RUFO	recurrent fever of unknown origin
SARA	Smad anchor for receptor activation
SBE	Smad binding elements
sIL-6-R	löslicher Interleukin-6-Rezeptor
SIRS	Systemic inflammatory response syndrom
sma	Small body size genes
SNP	Single-nucleotide polymorphism

SOCS	Suppressors of cytokine signaling
SSIs	STAT-induced STAT inhibitors
STAT	Signal Transduktoren und Aktivatoren der Transkription
T-BIL	total bilirubin
TGF	Transforming growth factor
Th-Zellen	T-Helferzellen
TLRs	Toll-like-Rezeptoren
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TβR	TGF-β-Rezeptor
v. a.	vor allem
V. a.	Verdacht auf
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VEGF	Vascular endothelial cell growth factor
Vg-1	Vegetalising factor-1
WBC	white blood cells
z.B.	zum Beispiel

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: IL-6-Wirkungsspektrum 24

Tabelle 2: Beschreibungen von IL-6 in der Veterinärmedizin 29

Tabelle 3: TGF-β1 in der veterinärmedizinischen Literatur 44

Tabelle 4: Internistische Erkrankungen und Anzahl der jeweils betroffenen Hunde . 47

Tabelle 5: TGF-β1-Konzentrationen bei Hunden mit entzündlichen Erkrankungen .. 83

Tabelle 6: Diagnosen der Hunde mit IL-6-Konzentrationen 136

Tabelle 7: Demographische Daten der Hunde mit IL-6 Messungen 140

Tabelle 8: Rassenverteilung gesunder Hunde bei IL-6-Messung mit 3 und weniger Vertretern. 140

Tabelle 9: Rassenverteilung kranker Hunde mit IL-6-Messung mit 3 und weniger Vertretern 141

Tabelle 10: Erkrankungen, die nur bei 3 und weniger Hunden mit IL-6-Bestimmung aufgetreten sind 141

Tabelle 11: perioperative IL-6-Konzentrationen 142

Tabelle 12: Erkrankungen der Hunde mit TGF-β1-Konzentrationen 142

Tabelle 13: Demographische Daten der Hunde mit TGF-β1-Messung 147

Tabelle 14: Rassenverteilung gesunder Hunde mit TGF-ß1-Messung mit 3 oder weniger Vertretern 147

Tabelle 15: Rassenverteilung kranker Hunde mit TGF-ß1-Bestimmung mit 3 und weniger Vertretern 148

Tabelle 16: Erkrankungen von Hunden mit TGF-ß1-Bestimmung als Verschiedene zusammengefasst 148

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kristalline Struktur eines humanen IL-6 19

Abbildung 2: IL-6 Signaltransduktion 22

Abbildung 3: Erkrankungen im Zusammenhang mit IL-6 beim Tier 27

Abbildung 4: Dreidimensionale Struktur des humanen TGF-β1 31

Abbildung 5: Signaltransduktion durch TGF-β 34

Abbildung 6: TGF-β1 Wirkungsspektrum im Organismus 35

Abbildung 7: IL-6-Werte bei gesunden und kranken Hunden 66

Abbildung 8: IL6-Werte in Abhängigkeit von der Diagnose 67

Abbildung 9: Vergleich von Serum- und Plasma-TGF-β1 73

Abbildung 10: TGF-β1-Plasmakonzentrationen bei gesunden und kranken Hunden 74

Abbildung 11: nicht normalisierte Messwerte über den Verlauf von 4, 6, 8 und 10 Wochen 75

Abbildung 12: Messwerte übern den Verlauf von 4, 6, 8 und 10 Wochen nach Normalisierung auf die Eichgerade des ELISA 76

Abbildung 13: Vergleich der TGF-β1-Serumkonzentrationen zwischen gesunden und kranken Hunden. 79

Abbildung 14: TGF-Werte in Abhängigkeit der Erkrankungen 80

1 Einleitung

Physiologische und pathologische Abläufe im Körper werden wesentlich durch die Kommunikation zwischen Zellen oder Geweben gewährleistet. Neben dem Nervensystem können Körperzellen über das hormonelle System miteinander kommunizieren. Ein weiteres kommunikatives System, dessen Bedeutung in diesem Zusammenhang immer mehr erkannt wird, ist das Zytokinsystem.

Zytokine stellen eine Substanzgruppe von Proteinen dar, die wesentliche regulative Aufgaben für die Differenzierung und das Wachstum von Zellen übernehmen, aber auch immunmodulatorische Wirkungen besitzen. Ihre komplexe Wirkung, die sich autokrin, parakrin aber auch endokrin entfaltet, ist Teil eines komplexen regulativen Netzwerkes der Zell-Zell-Kommunikation. Wichtige Eigenschaften der Zytokine sind neben einer kurzen Halbwertszeit, die spezifische Bindung an spezielle Rezeptoren und ihre Produktion im Bedarfsfall. Diese Eigenschaften unterstützen ihre Fähigkeiten, rasch auf Stimuli reagieren und ihre Wirkung sehr gezielt ausüben zu können. Zahlreiche Zytokine sind im Blut nachweisbar und stehen damit der Diagnostik zur Verfügung.

In dieser Arbeit sollen die Möglichkeiten des diagnostischen Einsatzes von Zytokinen untersucht werden. Aus der Gesamtheit der vorhandenen Zytokine wurden beispielhaft Interleukin 6 (IL-6) und der Transforming Growth Faktor β 1 (TGF-β1) für diese Arbeit ausgewählt.

IL-6 ist ein von einer Vielzahl an Zellen (u. a. Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten, Endothelzellen) freigesetztes Zytokin, welches bei Traumata und Herzinsuffizienzen bereits als Prognosemarker in der Humanmedizin eingesetzt wird. Für die Sepsis konnte seine Bedeutung sowohl für den Menschen als auch den Hund nachgewiesen werden. Aufgrund der Beteiligung von IL-6 an entzündlichen Vorgängen wird aber auch seine Bedeutung bei chronisch entzündlichen Prozessen, Autoimmunerkrankungen sowie Leberschäden bzw. –veränderungen diskutiert.

TGF-β1 ist in einem sehr breiten Spektrum von Zellzyklusvorgängen wiederzufinden. Entsprechend spielt es eine zentrale Rolle bei Regeneration, Immunreaktion und Tumorgenese. Aufgrund dieser Einbindung in unterschiedliche Prozesse ist eine genaue Zuordnung pathologischer Werte zu einzelnen Krankheitsbildern schwierig. Erhöhte Konzentrationen sind aber wiederholt im Rahmen fibrotischer Umbauprozesse, wie z. B. der Lungenfibrose, gesehen worden. Auch erniedrigte Werte ließen sich z. B. beim Lungenemphysem finden, sodass die Messung von TGF-β1 einen Aufschluss über Umbauprozesse geben könnte, wie sie bei einer Vielzahl von Erkrankungen zu finden sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Bedeutung bzw. die Expression von IL-6 und TGF-β1 beim Hund im Rahmen internistischer Erkrankungen zu untersuchen. Da hierzu für den Hund kaum Daten vorliegen, mussten zunächst entsprechende Voruntersuchungen hinsichtlich der Aufarbeitung bzw. des zu verwendenden Ausgangsmaterials (Serum oder Plasma) durchgeführt werden. Weiterhin mussten die Lagerungsfähigkeit des Probenmaterials getestet sowie Referenzwerte für gesunde Hunde erstellt werden.

2 Stand der Literatur

2.1 Allgemeiner Überblick – die Zytokine

Immunologische Vorgänge, Entzündungs- und regenerative Prozesse werden durch Mediatoren, sogenannte Zytokine, vermittelt, zu denen sowohl IL-6 als auch TGF-β1 gehören. Die Zytokine werden in fünf Untergruppen unterschiedlichster Polypeptide differenziert: die Interleukine, Interferone, Tumornekrosefaktoren, Chemokine und Wachstumsfaktoren.

Obschon sie zahlreiche unterschiedliche Effekte vermitteln, weisen sie dennoch wesentliche Gemeinsamkeiten auf. Die Effektvermittlung erfolgt auf autokrinem, parakrinem und systemischem Weg über die Bindung an spezifische Rezeptoren ihrer Zielzellen, wobei die Effekte konzentrationsabhängig sein können. Identische Zytokine können von verschiedenen Zelltypen exprimiert werden. Dabei kann es zu pleiotropen Effekten kommen, welche das Auftreten unterschiedlicher Effekte durch ein und dasselbe Zytokin bezeichnen (z. B. in Abhängigkeit vom Zelltyp oder dem bindenden Rezeptor). Dagegen gibt es aber auch redundante Effekte. Verschiedene Zytokine bewirken dabei den gleichen Effekt an einer Zelle. Redundanz kann als Sicherheitsmechanismus gewertet werden, der beim Ausfallen eines Zytokins die Vermittlung von Effekten sicher stellt. Zytokine können zusammenwirken und so zu einer Wirkungsverstärkung führen. Im Gegensatz zu diesem Synergismus ist auch eine antagonistische Wirkung von Zytokinen, bei der das Zusammenspiel mehrerer Zytokine zu einer Wirkungsminderung oder Wirkungshemmung führt, möglich.

In der Regel findet keine Speicherung von Zytokinen statt, sondern es erfolgt deren Neusynthese unmittelbar als Antwort auf eine Zellaktivierung. Dabei werden Zytokine üblicherweise nur vorübergehend exprimiert, es wurden aber auch dauerhaft vorhandene Formen beobachtet. Sekretion und Freisetzung der Zytokine sind ebenfalls regulierte Prozesse. Sobald sie einmal freigesetzt sind, wird ihr Verhalten in

der Zirkulation – neben den spezifischen Oberflächenrezeptoren – auch von löslichen Rezeptoren und unspezifischen Bindungsproteinen beeinflusst.

Um ihre Wirkung zu vermitteln, müssen die Zytokine an spezifische Rezeptoren binden und eine Signaltransduktion auslösen. Dabei werden die Rezeptoren in fünf unterschiedliche Klassen eingeteilt. Klasse 1 umfasst die Hämatopoetin-Rezeptoren, Klasse 2 die Interferon- und IL-10-bindenden Rezeptoren, Klasse 3 die TNF-Rezeptoren, Klasse 4 die Chemokin-Rezeptoren und Klasse 5 die Rezeptorkinasen-Wachstumsfaktoren-Rezeptoren.

Die Namensgebung der Interleukine beruht auf den ersten Untersuchungen zur Interaktion von Leukozyten. Dabei konnten Botenstoffe isoliert werden, welche für das Zusammenspiel zwischen weißen Blutkörperchen verantwortlich gemacht wurden. Mittlerweile weiß man aber, dass diese Botenstoffe auch Effekte an anderen Zellen des Immunsystems vermitteln. Interleukine werden nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung in Untergruppen mit aufsteigender Zahl eingeteilt (IL-1 bis IL-35; Stand Oktober 2011).

2.2 Spezieller Überblick – IL-6

2.2.1 IL-6

IL-6 wurde ursprünglich als „B-Zell-stimulierender-Faktor-2“ (BSF-2) bezeichnet (HIRANO et al. 1985), ist aber auch unter zahlreichen anderen Synonyma bekannt: B-Zell-Stimulationsfaktor (BCSF), Hybridom-Wachstumsfaktor (HGF), Hepatozyten stimulierender Faktor (HSF) und zytolytischer Differenzierungsfaktor für T-Lymphozyten (CDF). Alle diese Faktoren zeigten sich in Klonierungsanalysen als homolog. Charakteristisch für Interleukine ist der Aufbau aus vier gebündelten α-Helices, die kurz- oder langkettig sein können. IL-6 ist langkettig. Humanes IL-6 ist ein Protein aus 184 Aminosäuren. Das canine IL-6 besteht aus 187 Aminosäuren und weist zum humanen Protein eine Homologie von 58 % auf. Die Bildung von IL-6 erfolgt durch aktivierte Makrophagen, T- und B-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Mesangiumzellen. Hauptlieferanten sind in der akuten Phase der

Entzündung ortsständige Monozyten und Makrophagen, bei chronischen Entzündungsprozessen die T-Zellen (NAUGLER u. KARIN 2008). Die Synthese und Freisetzung des Zytokins wird vor allem durch IL-1, TNF-α, TGF-β, bakterielle und virale Infekte, sowie Endotoxine und Liposaccharide (LPS) stimuliert.

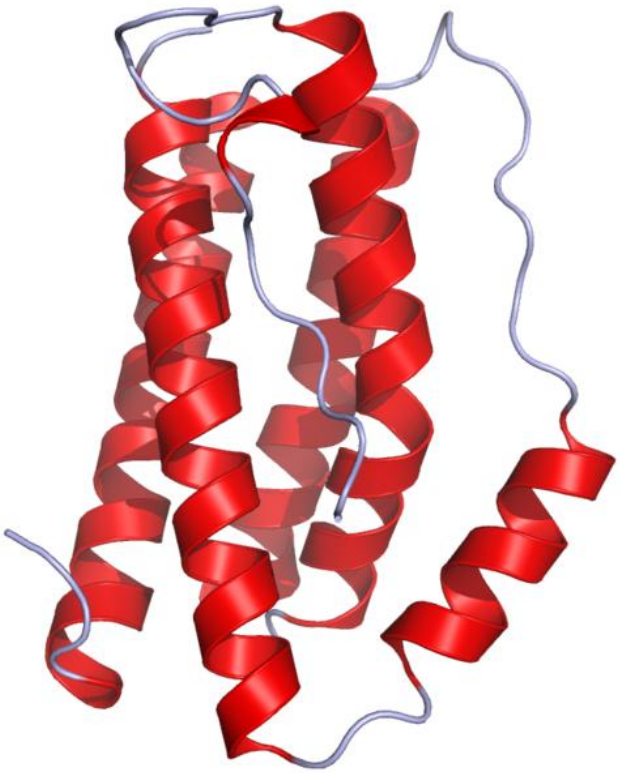

Abbildung 1: Kristalline Struktur eines humanen IL-6 (Quelle: www.wikipedia.org)

2.2.2 IL-6-Rezeptoren

Zur Effektvermittlung muss IL-6 entweder an einen membrangebundenen IL-6-Rezeptor (mIL-6-R) oder an einen löslichen IL-6-Rezeptor (sIL-6-R) binden.

Der membrangebundene IL-6-Rezeptor besteht aus einer α- und einer β-Untereinheit. Die α-Untereinheit, bekannt als CD126 (Cluster of Differentiation 126), ist ein 80 kDa schweres Glykoprotein. Sie besteht aus drei Extrazellulardomänen, welche sich wiederum in eine IgG-ähnliche Domäne und ein Zytokin bindendes

Modul (CBM) aufteilen. Die β-Untereinheit, auch CD130, besteht aus zwei 130 kDa schweren Glykoproteinen und ist für die Signalvermittlung unentbehrlich (YAMAMOTO et al. 1994). Der Rezeptor wird hauptsächlich auf Hepatozyten, neutrophilen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen und einigen Leukozyten exprimiert (ROSE-JOHN et al. 2006).

Kommt es zur Bindung von IL-6 an die α-Untereinheit des Rezeptors so folgt die Dimerisierung der beiden Glykoproteine (gp130) (YAMASAKI et al. 1988, TAGA et al. 1989, HIBI et al. 1990). Unter einer Dimerisierung versteht man die Bildung eines neuen Moleküls aus zwei gleichen oder ähnlichen Molekülen, den Monomeren. Erst durch diese Konformationsänderung kann IL-6 hochaffin an den Rezeptor binden. Es folgt die Bildung eines Signaltransduktionskomplexes, welcher eine Kaskade von weiteren Reaktionen, sogenannter downstream Effekte, im Zellinneren auslöst (DARNELL et al. 1994, HIRANO et al. 1994, KISHIMOTO et al. 1994, IHLE et al. 1995).

Der lösliche IL-6-Rezeptor (sIL-6R) kommt im Blut gelöst vor. Er entsteht durch eine limitierte Proteolyse (sog. shedding) im Bereich der extrazellulären Domäne des membranständigen Rezeptors (MULLBERG et al. 1993, ROSE-JOHN u. HEINRICH 1994, MACKIEWICZ et al. 1995, HEANEY u. GOLDE 1996). Sowohl die Bindungsaffinität als auch die Bindung des Rezeptors mit den gp130-Untereinheiten entsprechen denen des membrangebundenen Rezeptors (TAGA et al. 1989, STOYAN et al. 1993). Im Gegensatz zu der membrangebundenden Form, die fast ausschließlich auf Hepatozyten und auf Leukozyten exprimiert wird, hat der lösliche Rezeptor jedoch die Möglichkeit, Zellen der Wirkung von IL-6 zugänglich zu machen, die lediglich gp130, aber kein oder zu wenig IL-6R exprimieren (MARZ et al. 1997). Dies wird möglich, da gp130 ein ubiquitär vorkommendes Glykoprotein ist, welches in verschiedenen Organen – wie dem Herzen, den Nieren, der Milz, der Leber, der Lunge, der Plazenta und dem Gehirn – exprimiert wird (JONES et al. 2001). Im Gegensatz zu den meisten anderen löslichen Zytokinrezeptoren, die über die Bindung ihres spezifischen Liganden eine antagonistische Wirkung entfachen, indem sie eine Signaltransduktion über die Bindung des Liganden an den spezifischen

membrangebundenen Rezeptor verhindern, kommt es durch den löslichen IL-6-Rezeptor zu einem agonistischen Effekt. Ein Komplex aus IL-6 und dem löslichen IL-6-Rezeptor kann Zellen mit membrangebundenem gp130 aktivieren. Die Nutzung löslicher ungebundener Zytokinrezeptoren zur Vermittlung von Zytokineffekten an Zellen, die entsprechende Rezeptoren nicht exprimiert haben, wird von manchen Autoren auch als "trans-signalling" bezeichnet (ROSE-JOHN u. HEINRICH 1994).

2.2.3 IL-6-Signaltransduktion

Dem IL-6-Rezeptor fehlt, im Gegensatz zu anderen Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die intrinsische Kinase-Aktivität. Um die intrazelluläre Signalkaskade zu initiieren, interagiert der Rezeptor mit den Tyrosinkinasen der Janusfamilie (JAK) (DARNELL et al. 1994, LUTTICKEN et al. 1994, STAHL et al. 1994). Dabei nähern sich die anfangs katalytisch inaktiven JAKs der α-Rezeptor-Untereinheit und zwei gp130-Molekülen an. Im Folgenden findet eine Auto- bzw. Transphosphorylisierung eines Tyrosinrestes innerhalb der Kinasedomäne statt, sodass es zu einer schnellen und lang anhaltenden Aktivierung der JAK kommt, welche eine Transphosphorylisierung von gp130 zur Folge hat. Diese phosphorylierten Tyrosinreste stellen nun Bindungsstellen für die weiterführende Signaltransduktion dar, welche über sog. STATs (Signal Transduktoren und Aktivatoren der Transkription) abläuft und somit den Effekt der IL-6 Bindung vermittelt. Nach Bindung von STAT an den Rezeptorkomplex erfolgt deren Aktivierung durch Phosphorylisierung ihrer Tyrosinreste (SHUAI et al. 1993, IMPROTA et al. 1994, ROTHMAN et al. 1994). Das aktivierte STAT-Monomer ist nun in der Lage, sich mit einem weiteren STAT zu einem Homo- oder Heterodimer zusammen zu schließen. Dies sind Dimere, die im Falle des Homodimers aus gleichen Monomeren und im Falle des Heterodimers aus ähnlichen Monomeren entstehen. Die Dimerisation erfolgt durch Interaktion zwischen den SH2-Domänen und den phosphorylisierten Tyrosinresten. Nach einer Serinphosphorylierung der STAT-Dimere (LUTTICKEN et al. 1995) können diese in den Zellkern eindringen und dort an ihre Zielgene binden (Abbildung 2). Den

Faktoren JAK1 und STAT3 kommt im Zusammenhang mit IL-6 eine besondere Bedeutung zu. Es konnte nachgewiesen werden, dass in Abwesenheit von JAK1 der Transkriptionsfaktor von IL-6 nicht genügend aktiviert wird. STAT3 dagegen kann bei geringen Liganden-Konzentrationen eine Signaltransduktion vermitteln (LUTTICKEN et al. 1994, STAHL et al. 1994, ZHONG et al. 1994).

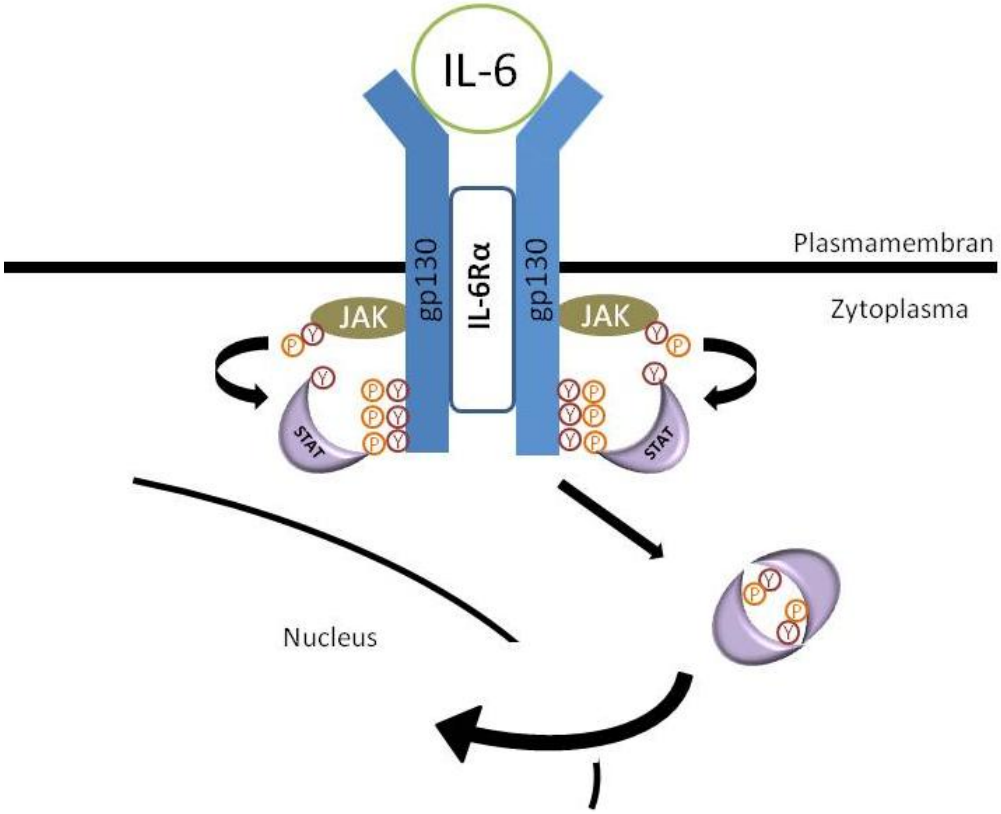

Abbildung 2: IL-6 Signaltransduktion
IL-6: Interleukin 6; IL-6Rα: α-Rezeptoreinheit des Interleukin-6-Rezeptors; gp130: β Rezeptoreinheit des Interleukin-6-Rezeptors ; JAK: Januskinase; STAT: Signal Transduktoren und Aktivatoren der Transkription; Y: Tyrosinrest; P: Phosphorylierung

2.2.4 IL-6-Wirkungsspektrum im Organismus

Für IL-6 ist bisher ein weites Wirkungsspektrum beschrieben. Dabei sind v. a. seine Effekte auf das Immunsystem sowie das Entzündungsgeschehen gut untersucht. Wesentliche Funktionen der B-Zellen werden über IL-6 beeinflusst – wie das Wachstum bestimmter B-Zellreihen – und zusammen mit IL-4 und -5 wird die B-Zell-Differenzierung zu Plasmazellen gesteuert. Im Zusammenspiel mit IL-2 bzw. IL-5 ist IL-6 darüber hinaus an der IgM- und IgA-Synthese beteiligt (TIZARD 2000). Neben

B-Zellen werden aber auch T-Zellen gesteuert. So werden diese durch IL-6 aktiviert und können in zytotoxische T-Zellen umgewandelt werden (LOTZ et al. 1988, OKADA et al. 1988, UYTTENHOVE et al. 1988). Dies erfolgt in Kostimulation mit IL-2, welches wiederum von IL-6 angeregt vermehrt exprimiert wird und die Induktion der Expression der IL-2-Rezeptoren auf aktivierte T-Zellen veranlasst (GARMAN et al. 1987, NOMA et al. 1987). IL-6 ist aber auch für die Proliferation von Thymozyten zuständig und spielt möglicherweise bereits bei der Entwicklung der T-Zellen des Thymus eine Rolle (IBELGAUFTS 2011).

Hinsichtlich der Entzündungsreaktion ist IL-6 einer der Hauptstimulatoren der Akute-Phase-Reaktion (TIZARD 2000). Die Akute-Phase-Reaktion ist eine systemische Reaktion des Immunsystems auf Infektionen, Traumata, Entzündungen und Gewebsverletzungen. Charakteristischerweise ist sie durch Fieber, erhöhte Gewebspermeabilität, Anstieg der peripheren Leukozytenzahl und Synthese der Akute-Phase-Proteine durch die Leber gekennzeichnet. Zu den Akute-Phase-Proteinen gehören beispielsweise Fibrinogen, Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-1-Chymotrypsin, Haptoglobulin und C-reaktives-Protein. In diesem Zusammenhang wurde IL-6 als wichtigster Mediator der peripheren Immunantwort in vitro bezeichnet (ANDUS et al. 1987, GAULDIE et al. 1987, ANDUS et al. 1988, CASTELL et al. 1988, CASTELL et al. 1990). 1988 konnte diese Aussage für In-vivo-Reaktionen bestätigt werden (GEIGER et al. 1988). Mit IL-1 und TNF-α bewirkt IL-6 neben der Akute-Phase-Reaktion auch die Fieberentstehung durch Anregung des thermoregulatorischen Zentrums im Gehirn und nachfolgender Sollwerterhöhung (TIZARD 2000).

Der Einfluss von IL-6 konnte aber auch in anderen funktionellen Systemen nachgewiesen werden. So konnten IKEBUCHI et al. (1987) erstmalig den Einfluss auf das hämatopoetische System zeigen. Zusammen mit IL-3 bewirkt es die Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zu pluripotenten Vorläuferzellen. IL-6 führt zur Reifung von Megakaryozyten und steigert die Thrombozytenzahl in vivo (IBELGAUFTS 2011).

Im Nervensystem spielt IL-6 als Signalvermittler eine entscheidende Rolle. Astrozyten werden durch IL-6 zur Synthese von Nervenwachstumsfaktor (NGF – „nerve growth factor“) angeregt (IBELGAUFTS 2011). Für PC12-Zellen konnte in vitro durch Stimulation mit IL-6 die Differenzierung der Phäochromozytomzellen in Neuronen (SATOH et al. 1988) gezeigt werden.

Tabelle 1: IL-6-Wirkungsspektrum

IL-6 als Immunmodulator	**IL-6 als Aktivator der Entzündungs-reaktion**	**Sonstige Eigenschaften von IL-6**
Wachstum von B-Zellen	Hauptstimulator der Akuten-Phase-Reaktion	Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen zu pluripotenten Vorläuferzellen
B-Zelldifferenzierung zu Plasmazellen	Fieberentstehung	Reifung von Megakaryozyten
IgA-/IgM-Synthese		Stimulation von Astrozyten
Aktivierung von T-Zellen		Steigerung der Osteoklastenaktivität
Umwandlung von T-Zellen zu zytotoxischen T-Zellen		Während der Leberregeneration: mitogen, zytoprotektiv und antiapoptotisch
Proliferation von Thymozyten		

Andere Effekte von IL-6 sind der vermehrte Abbau von Knochensubstanz durch eine gesteigerte Osteoklastenaktivität, ein negativ inotroper Effekt am Herzen sowie die Induktion von PDGF an Blutgefäßen und die Proliferation glatter Muskelzellen. Im

Rahmen der Leberregeneration hat IL-6 einen mitogenen, zytoprotektiven und antiapoptotischen Effekt (SAKAMOTO et al. 1999, SELZNER et al. 1999), sodass es beispielsweise nach Leberteilresektion zu erhöhten IL-6-Serumspiegeln kommt (RAMADORI u. ARMBRUST 2001). Auch besteht möglicherweise eine Beteiligung an der Steuerung des Übergangs von Leberzellen aus der G0- in die G1-Phase (STREETZ et al. 2000).

2.2.5 Klinische Bedeutung von IL-6 in der Humanmedizin

Prinzipiell sollte man hier zwischen der diagnostischen bzw. prognostischen und der therapeutischen Bedeutung von IL-6 unterscheiden, welche zum einen durch Interaktion mit IL-6 selbst und zum anderen durch Blockade seines potenziellen Rezeptors erfolgen kann.

Zu diagnostischen Zwecken wird der IL-6 Spiegel u. a. in der Neonatologie angewendet. Hier dient IL-6 als erster Indikator für das Auftreten einer neonatalen Sepsis: Im Vergleich zum CRP zeigt sich ein wesentlich früherer Anstieg (PRINSEN et al. 2008). Erhöhte IL-6-Konzentrationen finden sich außerdem beim Lennert-Syndrom, der Castleman‘s disease, beim kardialen Myxom, bei Patienten mit Leberzirrhose oder mit Glioblastom. Sehr hohe IL-6-Konzentrationen im Liquor cerebrospinalis werden häufig bei bakteriellen und viralen Meningitiden festgestellt. Eine ebenfalls exzessiv gesteigerte Produktion von IL-6 findet sich häufig bei Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises wie z. B. bei der rheumatoiden Arthritis oder der Polyarthritis, bei der erhöhte Konzentrationen von IL-6 in der Synovia nachgewiesen wurden (HOUSSIAU et al. 1988). Auch IL-6 im Urin ist von diagnostischer Bedeutung. So deuten hohe IL-6 Spiegel auf eine graft-versus-host-Reaktion bei transplantierten Patienten hin (WAISER et al. 1997).

Prognostische Bedeutung hat IL-6 bei Erkrankungen der B-Zell-Reihe. So werden bei monoklonalen Gammopathien oder Myelomen niedrige Serumspiegel beobachtet, während bei progressiven Krankheitsverläufen und bei Plasmazellleukämie erhöhte Werte gemessen werden konnten (BATAILLE et al. 1989, LUDWIG et al. 1991). Für

das Kawasaki-Syndrom kann die IL-6-Konzentration in Serum und Urin als prognostischer Faktor herangezogen werden (IBELGAUFTS 2011). Als weiterer Prognoseparameter kommt IL-6 für Traumen und Sepsis zur Anwendung, sodass für das postoperative Monitoring bereits die Überlegenheit der Serum-IL-6-Konzentration gegenüber dem C-reaktiven Protein untersucht wird. Das Ziel ist eine bessere Beurteilung möglicher entzündlicher Geschehen bzw. die frühere Erkennung einer Akute-Phase-Reaktion. Auch bei der Pankreatitis korreliert ein erhöhter IL-6-Spiegel mit einer ungünstigeren Prognose (MAYER et al. 2000). IL-6 scheint in diesem Zusammenhang auch eine Vorhersagekraft über die Möglichkeit des Auftretens eines Organversagens zu haben (MANSFIELD et al. 2008).

Therapeutisch kommen derzeit IL-6-Rezeptor-Blocker im Rahmen von kontrollierten klinischen Studien bzw. Untersuchungen bei den Arthritiden, hier besonders der rheumatoiden Arthritis, sowie bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (v. a. M. Crohn) und Tumoren zum Einsatz. Bisher nur im experimentellen Stadium untersucht ist die Verwendung von rekombinantem IL-6. Aufgrund seiner Effekte auf hämatopoetische Zellen scheint es möglich IL-6 therapeutisch bei bestimmten Anämieformen und Thrombozytopenien auszunutzen (MACVITTIE et al. 1994).

2.2.6 IL-6 in der veterinärmedizinischen Literatur

Erwartungsgemäß ist IL-6 in der Veterinärmedizin weitaus geringer untersucht als in der Humanmedizin. Jedoch zeigen sich zahlreiche Überschneidungen hinsichtlich seiner Bedeutung. Abbildung 3 gibt einen Überblick über Erkrankungen/Themenkreise, bei denen beim Tier bereits ein Zusammenhang mit IL-6 beschrieben wurde. IL-6 ist auch beim Hund ein Marker für schwere bakterielle systemische Infektionen. RAU et al. (2007) konnten bei Hunden mit Sepsis bzw. ihrer Vorstufe des SIRS (systemic inflammatory response syndrome) eine positive Korrelation zwischen der Höhe der IL-6-Plasma-Werte und der Schwere der Erkrankung bzw. einer erhöhten Mortalitätsrate oder einem früheren Todeseintritt belegen. Eine Korrelation bestand nur dann, wenn die Bestimmung von IL-6 direkt

bei Erstvorstellung der erkrankten Hunde vorgenommen wurde. Bei der Sepsis konnten allgemein höhere IL-6-Werte als bei dem SIRS gemessen werden.

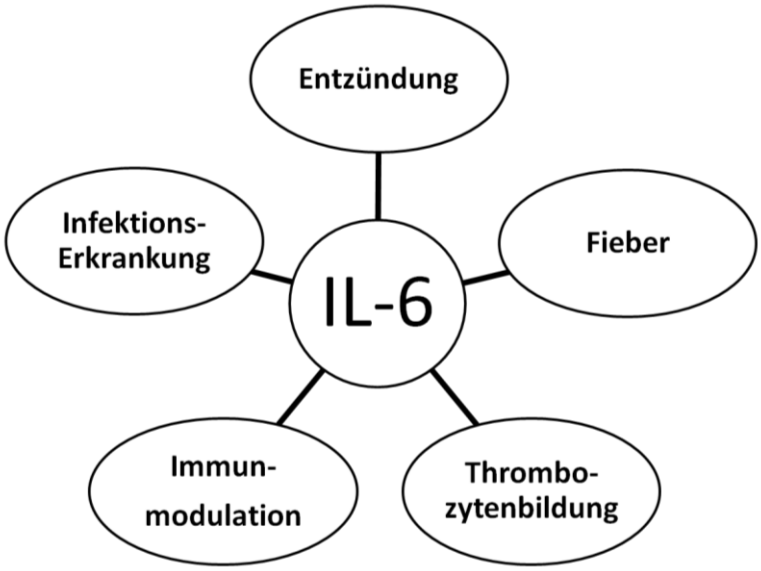

Abbildung 3: Erkrankungen im Zusammenhang mit IL-6 beim Tier

Für die Vermittlung pyrogener Effekte konnten LEMAY et al. bereits 1990 nachweisen, dass der Effekt erst ab Überschreiten eines IL-6-Schwellenwertes von ~10^4 U zum Tragen kommt. Dabei ließ sich die Körperinnentemperatur nicht durch eine größere Menge IL-6 steigern, sondern folgte dem Alles-oder-Nichts-Prinzip (LE MAY et al. 1990). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der IL-6-Höchstwert etwa zwei Stunden nach der Injektion von Endotoxinen (Lipopolysaccharid) erreicht wird (LE MAY et al. 1990). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen MIYAMOTO et al. (1996). Diese verzeichneten einen Anstieg von IL-6 nach einer Stunde, mit einem Peak nach eineinhalb Stunden. Eventuell lag der frühere IL-6-Peak an der genutzten über 10-fach höheren LPS-Dosis. Nach 24 Stunden war hier bereits wieder das Ausgangsniveau erreicht (MIYAMOTO et al. 1996). Aber auch bei nicht Endotoxin vermitteltem Fieber wie dem immunvermittelten Fieber oder dem Fieber unbekannter Ursache scheint IL-6 eine Rolle zu spielen. BOHNHORST et al. (2002) konnten zeigen, dass durch die Gaben von Cortison beim immunvermittelten Fieber der

erhöhte IL-6-Serumspiegel sinkt. Für das RUFO (Recurrent fever of unknown origin), welches vermehrt beim Shar Pei auftritt und häufig mit Amyloidose der Nieren und Gelenkschwellungen einhergeht, konnten RIVAS et al. (1992) ebenfalls einen erhöhten Serumspiegel nachweisen.

Auch bei Infektionskrankheiten von Hunden konnte die Beteiligung von IL-6 nachgewiesen werden. So kommt es in der Akutphase der Leishmaniose zu einer Erhöhung von IL-6 im Serum. Dabei korreliert die Höhe des Anstiegs mit der Schwere der Erkrankung (DE LIMA et al. 2007).
Als weitere Infektionskrankheit mit Beteiligung von IL-6 ist die canine sino-nasale Aspergillose bekannt, bei der es zu einer vermehrten mRNA-Expression von IL-6 in der Nasenschleimhaut von Hunden kommt (PEETERS et al. 2007).

Weitere Bedeutung erhält IL-6 im Zusammenhang mit immunmodulatorischen Erkrankungen. So konnte eine erhöhte Expression von IL-6 mRNA im Zusammenhang mit der immunmodulatorisch-responsiven lymphozytär-plasmatischen Pododermatitis festgestellt werden (BREATHNACH et al. 2006).

Auch bei der atopischen Dermatitis des Hundes kommt es zu einem Anstieg der IL-6-Expression. Besonders die frühen Hauteffloreszenzen waren mit einem starken Anstieg des proinflammatorischen Zytokins verbunden (MARSELLA et al. 2006).

Ähnlich wie beim Menschen steigert die Gabe von IL-6 auch bei Tieren die Thrombozytenzahl. Dabei wirkt IL-6 nicht direkt auf die Thrombozyten, sondern auf die Megakaryozyten, die daraufhin Thrombozyten produzieren, die sich mit der Hälfte des normalerweise dafür notwendigen Thrombins aktivieren lassen (PENG et al. 1994).

Es scheint desweiteren auch einen IL-6-vermittelten Effekt bei den Arthritiden zu geben. MACCOUX et al. (2007) konnten im Rahmen einer Osteoarthritis den Anstieg der IL-6-Expression in der Synovialis zeigen. Ähnliches gelang FUJITA et al. (2005), die eine positive Korrelation zwischen den IL-6-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit und der Schwere einer begleitenden Synovitis und Lahmheitsdauer bei Hüftgelenksdysplasie belegen konnten.

Tabelle 2: Beschreibungen von IL-6 in der Veterinärmedizin

IL-6 in der Veterinärmedizin im Zusammenhang mit:	Beschreibung durch:
Sepsis/SIRS	Rau et al. (2007)
Fieber	Le May et al. (1990) Rivas et al. (1992) Bohnhorst et al. (2002)
Endotoxinschock	Miyamoto et al. (1996)
Leishmaniose	de Lima et al. (2007)
Aspergillose	Peeters et al. (2007)
Immunmodulatorisch-responsiver lymphozytär-plasmatischer Pododermatitis	Breathnach et al. (2006)
Atopische Dermatitis	Marsella et al. (2006)
Thrombozytenbildung	Peng et al. (1994)
Arthritiden	Fujita et al. (2005) Maccoux et al. (2007)

2.3 Spezieller Überblick – TGF-β

2.3.1 TGF-β

Der Transforming Growth Factor ß wurde durch Anita Roberts und Kollegen erstmals 1981 beschrieben (ROBERTS et al. 1981). Dieser wurde aus einem Gemisch aus Wachstumsfaktoren isoliert, das aus dem Überstand Sarcomvirus transfomierter 3T3-Zellen gewonnen wurde. Die genaue Charakterisierung erfolgte bereits ein Jahr später, als das bis dahin als Sarkom-Wachstumsfaktor (SGF) bekannte Protein weiter entschlüsselt wurde. Dabei zeigten Anzano et al., dass es sich beim SGF eigentlich um zwei unterschiedliche Wachstumsfaktoren handelt, die konsekutiv als

Transforming Growth Factor α (TGF-α) und Transforming Growth Factor ß (TGF-β) bezeichnet wurden (ANZANO et al. 1982).

Innerhalb der Zytokine gehören die TGF-β zur großen, nach ihnen benannten Superfamilie von Proteinen (TGF-β-Superfamilie). In diese Familie gehören auch Inhibin, Aktivin A, das Anti-Müller-Hormon und das Bone Morphogenetic Protein (BMP).

Es existieren fünf Isoformen von TGF-β. TGF-β1-3 findet man bei Säugetieren, TGF-β4 beim Huhn und TGF-β5 beim Krallenfrosch (Xenopus) (LAWRENCE 1996). Die einzelnen Unterformen zeigen eine 70- bis 80-prozentige Homolgie (OZKAYNAK et al. 1991). Eine Sequenzhomologie zu TGF-α besteht jedoch nicht. TGF-β ist kaum speziesspezifisch, was sich aus der ausgesprochen großen evolutionären Konservierung seiner Gensequenzen erklärt. So zeigt das 1369 Basenpaare große canine TGF-β1 94-prozentige Homologie zum humanen TGF-β1 und 74-prozentige Homologie zum humanen TGF-β2. Zu humanem TGF-β3 beträgt sie 78 Prozent (LAWRENCE 1996).

Der entscheidende Unterschied zwischen den einzelnen Isoformen neben unterschiedlicher Genloci (LAWRENCE 1996) ist die unterschiedliche zeitliche und räumliche Expression ihrer mRNAs und Proteine in sich entwickelnden und regenerierenden Geweben sowie bei pathologischen Zuständen (TIZARD 2000, IBELGAUFTS 2011). So findet sich TGF-β1 vor allem in Endothelien, hämatopoetischen Zellen und im Bindegewebe. TGF-β2 dagegen wird hauptsächlich auf Epithelien und neuronalen Zellen exprimiert. TGF-β3 befindet sich zumeist in mesenchymalen Geweben (BLOBE et al. 2000).

An der Synthese von TGF-β1 sind fast alle Zellen des Körpers beteiligt (SPORN et al. 1990). Hauptproduzenten sind jedoch Thrombozyten, aktivierte T- und B-Zellen, aktivierte Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und vor allem Fibroblasten.

TGF-ß liegt unabhängig von seiner Isoform als Homodimer vor. Dabei sind die beiden Monomere über Disulfidbrücken miteinander verbunden (IBELGAUFTS

2011). Das TGF-β1-Homodimer ist 25 kDa schwer, seine identischen Untereinheiten bestehen aus je 112 Aminosäuren. Die Monomere von TGF-β1 werden als C-terminales Ende eines 390 Aminosäuren enthaltenden Vorläufermoleküls synthetisiert, dessen N-terminale Prodomäne aus einer definierten Signalsequenz und einem β1-LAP (Latency-Associated Protein) besteht. Nach der Sekretion in den Interzellularspalt und der Abtrennung der Signalsequenz wird das 55 kDa schwere Vorläufermolekül dimerisiert und das LAP proteolytisch abgespalten. Nun liegt das L-TGF (latent TGF) vor, eine noch inaktive Verbindung aus reifen TGF und dem LAP, welches über ein 205 kDa (125 - 160 kDa bei Thrombozyten) schweres spezifisches Bindungsprotein verbunden bleibt. Das L-TGF befindet sich auf den Zelloberflächen, wo es über ein Mannose-6-Phosphat-haltiges Kohlenhydrat an einen Mannose-6-Phosphat/IGF-2-Rezeptor und über eine weitere Interaktion mit einem spezifischen Bindungsprotein gebunden ist. Im Serum ist die Hauptfraktion des TGF kovalent an Alpha-2-Makroglobulin, ein Akute-Phase-Protein, gebunden.

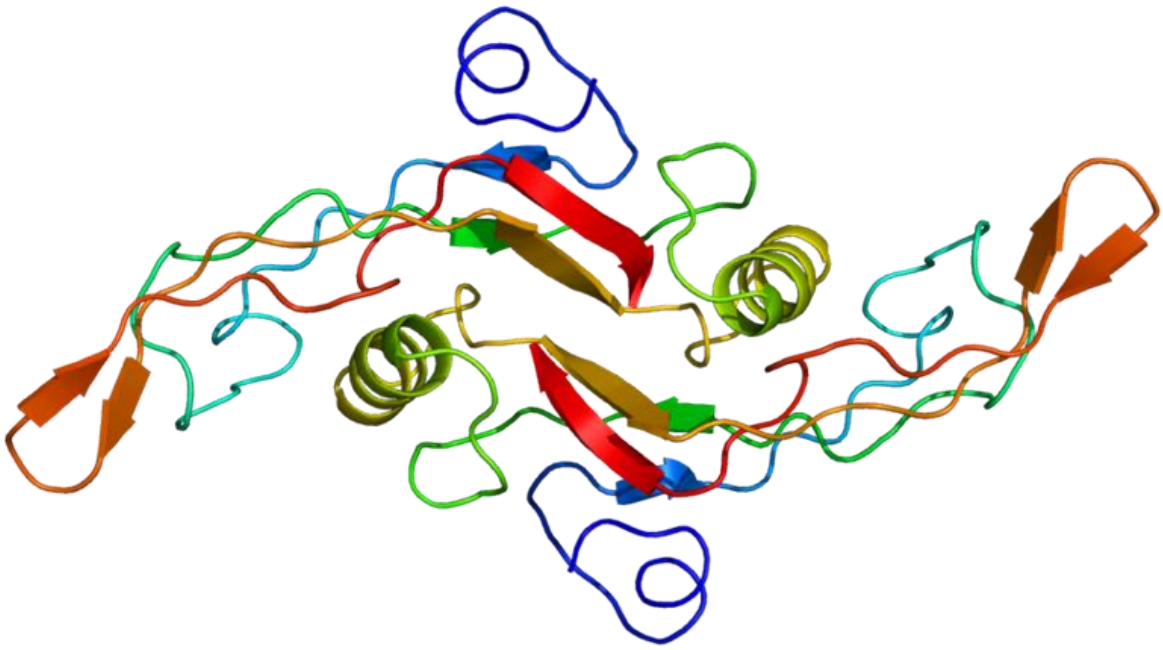

Abbildung 4: Dreidimensionale Struktur des humanen TGF-β1 (Quelle: www.wikipedia.org)

Der Aktivierungsmechanismus des L-TGF in die biologisch aktive Form TGF-β1 in vivo ist bis heute noch unklar. Beteiligt sein könnten Zell-Zell-Kontakt, Proteasen, spezifisches Plasmin, Transglutaminasen und auch Thrombospondin-1 (IBELGAUFTS 2011). Gängige Aktivierungsmethoden in vitro sind das Einwirken einer Säure mit einem pH-Wert von 3,0 (Azidifikation) oder die proteolytische Spaltung, z. B. durch Plasmin. Weiterhin ist es möglich, eine Aktivierung über eine Alkalisierung, eine Erhitzung auf 100°C oder durch die Zugabe von Harnstoff herbeizuführen (MASSAGUE 1990, MASSAGUE et al. 1994, LAWRENCE 1996). Die Vielzahl der Aktivierungsmöglichkeiten lässt vermuten, dass die Art der Aktivierung eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der biologischen Aktivität des Zytokins spielt (PIRCHER et al. 1986).

Latentes TGF-β1 besitzt in vivo eine Halbwertszeit von 90 Minuten. Seine aktivierte Form hingegen wird innerhalb von zwei bis drei Minuten von Leber, Niere, Lunge und Milz aus der Zirkulation entfernt. Die längere Halbwertszeit des inaktiven TGF-β führt dazu, dass stets schnell aktivierbares TGF-β zur Verfügung steht und sichert somit stabile TGF-β-Spiegel.

2.3.2 TGF-β-Rezeptoren

Für TGF-β gibt es drei Hauptrezeptoren. Diese werden als Typ-I- (TGFBR1), Typ-II- (TGFBR2) und Typ-III-Rezeptor (TGFBR3) bezeichnet. An der Signaltransduktion von TGF-β1 sind die Rezeptortypen I und II beteiligt, die ein Gewicht von 53 kDa und 75 kDa aufweisen. Um ein Signal auszulösen, ist die Bildung eines heterodimeren Komplexes zwischen beiden Rezeptortypen notwendig. Zwar bindet TGFBR2 den Liganden auch als Homodimer, ist aber in Abwesenheit von TGFBR1 nicht in der Lage, ein Signal zu erzeugen. Der Typ-III-Rezeptor (Betaglycan) scheint für die Signalbildung keine direkte Notwendigkeit zu haben (DERYNCK u. FENG 1997, PADGETT et al. 1998). Vielmehr hat er eine modellierende Wirkung, z. B. für die Bindung an Typ-I- und Typ-II-Rezeptoren. So steigt in ihrer Anwesenheit die Affinität des Typ-II-Rezeptors (DERYNCK u. FENG 1997) und es kommt zu einer

gesteigerten Sensibilität der Zelle gegenüber TGF-β, zur Elimination biologischer Unterschiede verschiedener TGF-Isoformen (IBELGAUFTS 2011) und eventuell zu einer Komplexstabilisierung des TGFBR1-/TGFBR2-Tetramers (MITTL et al. 1996).

2.3.3 TGF-β Signaltransduktion

TGF-β bindet zunächst an den Typ-III-Rezeptor, der TGF-β daraufhin dem Typ-II-Rezeptor präsentiert, oder direkt an den Typ-II-Rezeptor. Nach der Aktivierung durch TGF-β bindet der Typ-II-Rezeptor den Typ-I-Rezeptor (BLOBE et al. 2000). Im Anschluss phosphorylisiert die aktive Serin/Threonin-Kinase des Typ-II-Rezeptors die Glycin/Serin-reiche Region des Typ-I-Rezeptors (VUKICEVIC u. SAMPATH 2002), woraufhin ein an den Typ-I-Rezeptor gebundenes inhibitorisch wirkendes Protein dissoziiert und der Rezeptorkomplex seine bis dorthin unterdrückte Serin/Threonin-Kinaseaktivität wieder erlangt. Die folgende Signalübermittlung zum Nukleus geschieht auf direktem Weg (ALBERTS et al. 2002). Der aktivierte Typ-I-Rezeptor bindet im Zytoplasma vorhandene transkriptionssteuernde Proteine der SMAD-Familie und aktiviert diese durch Phosphorylierung (PIEK et al. 1999, VUKICEVIC u. SAMPATH 2002). Die Transkriptionsfaktoren der SMAD-Familie wurden nach den beiden zuerst identifizierten Faktoren: sma (small body size genes) in *Caenorhabditis elegans* (SEKELSKY et al. 1995) und Mad (mother against decapentaplegic protein genes) in *Drosophila* (ALBERTS et al. 2002) benannt.

Die Aktivierung der einzelnen SMADs folgt einem komplexen Mechanismus, der letztlich das Eindringen in den Zellkern ermöglicht, sodass die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen möglich wird (DENNLER et al. 1998). Eine hohe Affinität besteht hier für GTCT-Sequenzen, die auch als „Smad Binding Elements“ (SBE) bezeichnet werden (ZAWEL et al. 1998). Eine geringere Affinität (YOSHIDA et al. 2000) besteht zu GCAT- (HENNINGFELD et al. 2000) und GC-reichen Regionen (ISHIDA et al. 2000). Das Binden der SMADs erfolgt in den Promotorregionen der Zielgene und führt somit unmittelbar zu deren Transkriptionssteigerung (DENNLER et al. 1998, ZAWEL et al. 1998, TEN DIJKE et al. 2000).

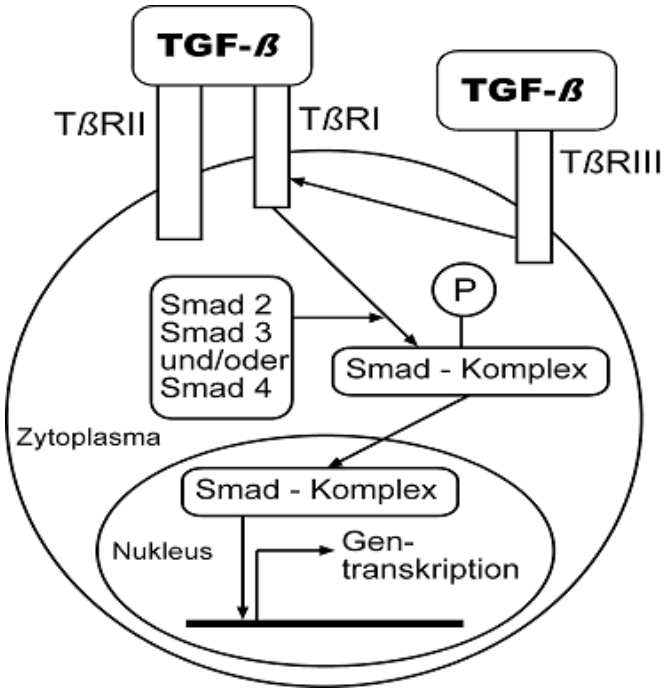

Abbildung 5: Signaltransduktion durch TGF-β (modifiziert aus USUI et al. 1998)
TGF-β: Transforming growth factor β; TβRI-III: Transforming growth factor β Typ-I bis Typ-III-Rezeptor; SMAD: transkriptionssteuernde Proteine; SMAD 2 und 3: rezeptoraktivierende SMAD`s; SMAD 4: kooperatives SMAD; P:Phosphorylierung

2.3.4 TGF-β1-Wirkungsspektrum im Organismus

TGF-β1 ist ein Wachstumsfaktor mit sowohl stimulierender, als auch inhibierender Wirkung auf die Zellproliferation. So ist er einer der potentesten Proliferationsinhibitoren für epitheliale, endotheliale, neuronale, lymphoide und hämatopoetische Zellen sowie für Hepatozyten und Keratinozyten (IBELGAUFTS 2011). Die Proliferation von Zellen mesenchymalen Ursprungs wird dagegen stimuliert (LAWRENCE 1996, ALEVIZOPOULOS u. MERMOD 1997). Der Effekt als Wachstumsfaktor wird dabei über einen reversiblen Arrest der Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus vermittelt (DERYNCK u. FENG 1997). In manchen Zellen ist sogar das Auslösen des programmierten Zelltodes, der Apoptose, möglich (ALEVIZOPOULOS u. MERMOD 1997).

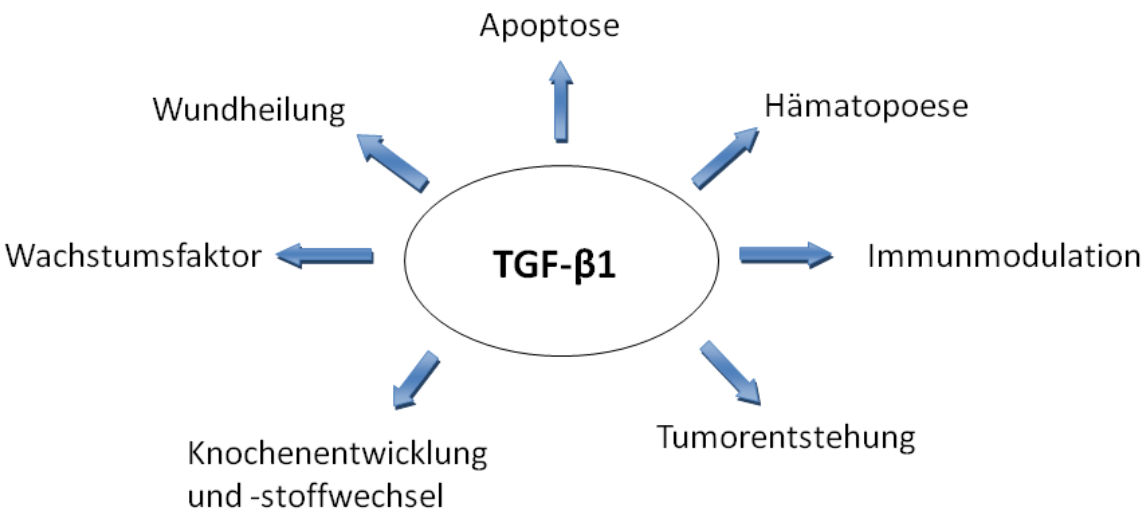

Abbildung 6: TGF-β1 Wirkungsspektrum im Organismus

Das Ausmaß der Hemmung hängt mit dem Zelltyp, der TGF-Konzentration und der Anwesenheit von anderen Faktoren ab. So kann TGF-β1 in einigen wenigen Fällen sowohl eine hemmende, als auch eine stimulierende Wirkung auf ein und dieselbe Zelle haben. Grund für diese bifunktionelle Aktivität ist dann die TGF-β-Konzentration. So hemmt TGF-β in einer Konzentration von 1-2fg/Zelle das Wachstum von glatten Muskelzellen, Fibroblasten und Chondrozyten. In höheren Konzentrationen wird das Wachstum dieser Zellen stimuliert. Dieser Effekt wird dann zum Teil durch PDGF (Platelet Derived Growth Factor) vermittelt, dessen Synthese und Sekretion durch niedrige TGF-β-Konzentrationen angeregt wird, während hohe Konzentrationen die PDGF-Rezeptor-Expression vermindern und daher die biologischen Effekte von PDGF reduzieren (IBELGAUFTS 2011).

Während der Embryogenese und im postfetalen Stadium koordinieren die Proteine der TGF-Superfamilie Morphogenese, Homöostase und Heilung verschiedener Gewebe und Organe wie z. B. Knochen, Zähne, Knorpel und Muskulatur sowie Herz,

Nieren, Haut und Reproduktionstrakt (SPORN et al. 1990, COX u. MAURER 1997, ALBERTS et al. 2002, VUKICEVIC u. SAMPATH 2002).

TGF-β1 stimuliert die FSH vermittelte Synthese von Östrogen, die Synthese von Progesteron in den Granulosazellen des Ovars und hemmt die Testosteronbildung in den Leydigzellen (IBELGAUFTS 2011) sowie die Steroidsynthese in den adrenokortikalen Zellen.

Im Immunsystem liegt die Hauptbedeutung von TGF-β in der hemmenden Wirkung auf einige Lymphozyten-Reaktionen (ABUL et al. 1996). So verhindert es die IL-2-bedingte Proliferation von T- und B-Lymphozyten, die IL-1-vermittelte Thymozytenproliferation und die B-Lymphozytenreifung. Auch die von Interferon (IFN) ausgelöste zytotoxische Aktivität der natürlichen Killerzellen, die Aktivität von zytotoxischen T-Lymphozyten und die Proliferation der Vorläuferzellen der Lymphokin-aktivierten Killerzellen werden gehemmt. TGF-β supprimiert weiterhin die Antwort von T-Zellen auf andere Zytokine und die TH1-Zell-Aktivität. B-Lymphozyten werden in der Sekretion von Immunglobulinen beeinflusst, sodass die Synthese von IgM und IgG gehemmt wird und ein Isotypenswitch von IgM zu IgA erfolgt (DUBOIS et al. 1995, ABUL et al. 1996, TIZARD 2000, IBELGAUFTS 2011). TGF-β übt aber auch auf Makrophagen einen Effekt aus, sodass je nach Anwesenheit anderer Zytokine diese stimuliert oder gehemmt werden. Desweiteren wird die Phagozytose von Blutmonozyten gesteigert, wohingegen die Aktivität von Gewebsmakrophagen und die Bildung von Stickstoffmonoxid sowie die Monozytendifferenzierung vermindert werden (TIZARD 2000). Für neutrophile Granulozyten stellt TGF-β1 den potentesten chemotaktischen Faktor dar (IBELGAUFTS 2011).

Eine weitere besondere Bedeutung kommt TGF-β bei der Wundheilung zu. Es stimuliert die Synthese von Collagen, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen, Fibronektin, Integrinen, Thrombospondin, Osteonektin und Osteopontin. Außerdem hemmt es den Abbau der selbigen durch die gehemmte Synthese von neutralen Metalloproteinasen und die gesteigerte Synthese von Proteinaseinhibitoren (IBELGAUFTS 2011). So wirkt sich TGF-β gleich zweifach positiv auf Wundheilung und Gewebereparation aus.

Nach Verletzungen kommt es zu einer Autoinduktion von TGF-β und zu einer vermehrten Zytokinproduktion durch Thrombozyten (COX u. MAURER 1997). Für Monozyten, Makrophagen und Fibroblasten fördert TGF-β1 dabei die Chemotaxis (OSSEGE et al. 1994, TIZARD 2000). Im Rahmen der die Wundheilung begleitenden Entzündungen werden endogen vermehrt Glukokortikoide gebildet. Diese hemmen die meisten Zytokine. Nicht aber TGF-β1 und PDGF, deren Synthese wird stimuliert (BRATTSAND u. LINDEN 1996). Auf diesem Weg kommt es zu einer Förderung von Heilung und fibrotischen Prozessen (SPORN et al. 1990, LAWRENCE 1996, COX u. MAURER 1997).

Dabei hat TGF-β sogar einen zusätzlichen antiinflammatorischen Effekt. Es antagonisiert die Interleukine 1, 2, 3 und 12, die Tumornekrosefaktoren α und ß (TNF-α/-ß), sowie die Interferone α und γ (IFN-α/-γ) (SPORN et al. 1990, DUBOIS et al. 1995, TIZARD 2000). Aufgrund seines Antagonismus gegenüber proinflammatorischen Zytokinen wird TGF-β1 auch als „Anti-Zytokin“ bezeichnet. Möglicherweise hat es die Aufgabe, die Immunantwort zu beenden, wie ABUL et al. vermuten (1996).

Weiterhin moduliert TGF-β die Synthese der Akute-Phase-Proteine durch die Hepatozyten und hemmt die ACTH bedingte Synthese von Cortisol (ABUL et al. 1996, IBELGAUFTS 2011).

TGF nimmt auch Einfluss auf die Hämatopoese. Hier kontrolliert der Mediator das Wachstum der Vorläuferzellen. Weiterhin hemmt er die Proliferation von primitiven Knochenmarksvorläuferzellen und Megakaryozyten (SPORN et al. 1990, DUBOIS et al. 1995).

Knochen sind die größte TGF-β-Quelle des Körpers. Hier spielt TGF-β eine zentrale Rolle in Stoffwechsel und Entwicklung (ALBERTS et al. 2002, VUKICEVIC u. SAMPATH 2002). Die Synthese von TGF-β wird von Faktoren, wie IL-1, Vitamin-D3 und Parathormon vermittelt. Calcitonin dagegen reduziert die TGF-β-Synthese (IBELGAUFTS 2011). Osteoblasten und ihre Vorläuferzellen werden von TGF-β in ihrem Wachstum, ihrer biologischen Aktivität (CENTRELLA et al. 1988) und ihrer

Proliferation (LILIENFELD-TOAL 1992) angeregt. Zur gleichen Zeit findet eine Hemmung der Bildung von Osteoklastenvorläuferzellen, der Osteoklastenreifung (LILIENFELD-TOAL 1992) und der Osteoklastenaktivität (PFEILSCHIFTER et al. 1989) statt, sodass am Ende das Verhältnis zwischen Osteoblasten und Osteoklasten von den Osteoblasten dominiert wird. Somit überwiegen die knochenaufbauenden Prozesse gegenüber den knochenabbauenden (PFEILSCHIFTER et al. 1988).

Im zentralen Nervensystem stimuliert TGF-ß die Aktivität der Mikroglia (KREUTZBERG 1995) und die Proliferation von Astrozyten (JOHNS et al. 1992). Bei Enzephalitiden antagonisiert es proinflammatorische Zytokine wie TNF-α, IL-1ß, IL-6 sowie INF-γ und führt so zu einer Entzündungshemmung. Desweiteren fördert TGF-β die neuronale Regeneration (CHAO et al. 1994).

Neben den physiologischen Effekten spielt TGF-β auch bei pathologischen Prozessen eine große Rolle. So exprimieren eine Vielzahl von Tumorzellen TGF-β und sezernieren häufig größere Mengen des Mediators als ihre nicht entarteten Ursprungszellen (SPORN et al. 1990). Die meisten Tumorzellen sind anfangs nach ihrer Entartung noch sensibel für den proliferationshemmenden Effekt von TGF-β (HELDIN et al. 1997). Erst in einem späteren Stadium entwickeln sie durch Veränderungen der Rezeptoren oder Ihrer Downstreamtargets (SMADs) eine Toleranz gegen diesen Effekt bzw. TGF-β erlangt eine stimulierende Wirkung (DERYNCK u. FENG 1997, HELDIN et al. 1997). TGF-β bewirkt darüber hinaus eine Neovaskularisation und fördert somit die Tumorentwicklung (HELDIN et al. 1997, TIZARD 2000, FUJITA et al. 2005, IBELGAUFTS 2011). TGF-β1 moduliert desweiteren die Interaktion von Tumorzellen mit der umliegenden extrazellulären Matrix. Dadurch ist es – in Kombination mit anderen Faktoren – in Metastasierungsprozesse involviert (IBELGAUFTS 2011). Seine immunmodulatorische Funktion trägt zusätzlich zur Karzinogenese und Metastasierung bei (ABUL et al. 1996, LAWRENCE 1996).

2.3.5 Klinische Bedeutung von TGF-β1 in der Humanmedizin

Die klinische Bedeutung von TGF-β1 beruht im Wesentlichen auf dessen Hemmung. Eine Ausnahme ist der Effekt als potenter Regulator der Wund- und Frakturheilung. Eine lokale Applikation von TGF-β1 beschleunigt die Wundheilung. Zusammen mit BMP spielt TGF-β1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Ossifikation des Ligamentum longitudinale posterior der Halswirbelsäule, sodass der Einsatz von TGF-β1 bei der Behandlung von traumatischen Gewebeverletzungen und in der Osteoporosebehandlung untersucht wird. Es führt aber auch zur Bildung hypertropher Narben, was bei deutlicher Überproduktion zum klinischen Bild des Keloids führt (LAWRENCE 1996, COX u. MAURER 1997). Im Ratten-Modell konnte bereits gezeigt werden, dass lokal an der Wunde verabreichte TGF-β-Antikörper die Bildung von Narben bei der Wundheilung unterbinden konnten (SHAH et al. 1995).

Weiterhin ist ein Einsatz von TGF-β1-Antikörpern bzw. deren TGF-β1-Rezeptor-Antikörpern bei entzündlichen oder immunmodulatorischen Erkrankungen denkbar. Auch die fibrotischen Eigenschaften von TGF-β1 ließen sich beeinflussen. Ein mögliches Einsatzgebiet wäre z. B. die Lungenfibrose (ARAYA u. NISHIMURA 2010).

Für den Bereich der Arthritis bzw. die Knorpelbildung, an welcher TGF-β ebenfalls maßgeblich beteiligt ist, konnten beispielsweise BLANEY DAVIDSON et al. (2006) zeigen, dass die Hochregulation von TGF-β1 zu einer vermehrten Synthese von Proteoglycan im Knorpel führen kann, wohingegen die gleichzeitige Gabe seines natürlichen Inhibitors SMAD7 die Fibroseinduktion verhindert. Die Fibrose, ein typisches Merkmal der rheumatoiden Arthritis, ist auch Gegenstand zahlreicher Untersuchungen. Wenngleich die pathophysiologische Rolle von TGF-β1 bei der rheumatoiden Arthritis noch nicht abschließend geklärt ist, so wird die Blockade als therapeutische Option derzeit kontrovers diskutiert (SAKUMA et al. 2007). Ein anderes Beispiel der erfolgreichen Hemmung des Fibrose fördernden Effekts von TGF-β1 ist der Einsatz im Rahmen sklerosierender Nierenerkrankungen (FUKASAWA et al. 2004).

Ein bisher kaum beachteter Aspekt von TGF-β ist sein möglicher kardioprotektiver Effekt. So konnte gezeigt werden, dass das von neonatalen Rattenherzmuskelzellen produzierte TGF-β stabilisierend auf die Herzfrequenz wirkt und einen spontan-rhythmischen Herzschlag in serumfreien Medien erhält (ROBERTS et al. 1992). Dieser Effekt kann durch IL-1ß, einem von Immunzellen im Rahmen von myokardialen Schäden freigesetzten Entzündungsmediator, gehemmt werden. TGF-β kann diese Hemmung jedoch überwinden, sodass TGF-β eine wichtige Rolle in der Regulation der kontraktilen Herzfunktion spielen könnte. Im Tierversuch konnten darüber hinaus auch die kardioprotektiven Eigenschaften nach Ischämien gezeigt werden, welche am ehesten auf der Hemmung des Anhaftens von neutrophilen Granulozyten am Endothel beruhen (LEFER et al. 1993).

Das Engelmann-Syndrom entsteht durch eine Mutation im TGF-β1-Gen. Betroffen ist die β-1-Kette von TGF-β1. Hier kommt es zu einer generellen Knochenhypertrophie mit verminderter Belastbarkeit. Bei Mutation im TGF-β-R1 oder TGF-β-R2 kommt es zur Ausbildung des Ehlers-Danlos- oder des Loeys-Dietz-Syndroms, welche ebenso wie beim Marfan-Syndrom (betroffen ist Fibrillin, das Bindungsprotein von TGF-β) durch eine Bindegewebsanomalie imponieren.

2.3.6 TGF-β1 in der veterinärmedizinischen Literatur

Entsprechend seiner Eigenschaften als Wachstumsfaktor, Apoptoseauslöser, Immunmodulator, Vermittler von Wundheilung und als ein auf den Knochenstoffwechsel Einfluss nehmender Faktor, wurden auch in der Veterinärmedizin bereits einige Aspekte rund um TGF-β1 untersucht.

Besonders die verschiedenen Aspekte der fibrotisierenden Eigenschaften von TGF-β1 sind hier bisher untersucht worden. So zeigten SPEE et al. (2006), dass es beim Hund nach dem vorrübergehenden Anstieg von TGF-β1 im Lebergewebe zur Ausbildung einer Leberfibrose kommt. Während die Autoren bei Hunden mit akuter Hepatitis kaum Veränderungen im TGF-β1-mRNA-Level feststellen konnten, wiesen

sie bei der chronischen Hepatitis und der Leberzirrhose einen Anstieg um das bis zu Zweifache nach. Ein Anstieg um das Vierfache war bei der Lobular Dissecting Hepatitis, einer Sonderform der Zirrhose, die mit schwerer Fibrose und kompletter Zerstörung der lobularen Architektur einhergeht, zu beobachten (SPEE et al. 2006). NEUMANN et al. (2008) wiesen zwei Jahre später erhöhte TGF-β1-Konzentrationen bei Hunden mit Leberfibrose im Blut nach.

Ein weiterer Aspekt der fibrotischen Wirkung von TGF-β1 ist im Rahmen von Prostataerkrankungen zu finden. Die benigne Prostatahyperplasie ist ein häufiges Problem bei älteren intakten Rüden. Bei der Entstehung der benignen Prostatahyperplasie gehen die Veränderungen des Organs zunächst im Wesentlichen vom Bindegewebe der Prostata aus. Einige Wachstumsfaktoren, darunter TGF-β1, werden von den Bindegewebszellen produziert, reichern sich an und fördern das Fortschreiten der benignen Prostatahyperplasie. TGF-β1 und basic fibroblast growth factor (bFGF) wirken auf das prostatische Bindegewebe als Gegenspieler und sind an seiner Homöostase beteiligt. Während TGF-β1 das Wachstum der Bindegewebszellen in der exponentiellen Phase dosisabhängig hemmt (mit steigender Konzentration steigt auch die Hemmung des Wachstums), kommt es unter dem alleinigen Einsatz von bFGF zwar nicht zu einer Stimulation des Wachstums, aber unter dem Einsatz von TGF-β1 und bFGF zu einer teilweisen Antagonisierung der TGF-β1-Wirkung. Die Synthese von bFGF wird durch TGF-β1 hochreguliert. Auch dies zeigt den engen Zusammenhang zwischen den beiden Wachstumsfaktoren. Man geht davon aus, dass das TGF-β1-/bFGF-Verhältnis die Proliferation und Differenzierung des Bindegewebes beeinflusst. Es zeigte sich des Weiteren, dass die Expression von TGF-β1 durch die Kastration der Hunde hochreguliert wurde, während die Expression von bFGF durch den Eingriff vermindert wird. Wenn die Bindegewebszellen der Prostata einer hohen Exposition an Androgen ausgesetzt oder sehr androgensensitiv sind, führt jeder signifikante Abfall des TGF-β1-Levels oder jeder signifikante Anstieg des bFGF-Levels zu einer Proliferation des Bindegewebes (NIU et al. 2001).

Bei der Golden Retriever-Muskeldystrophie kommt es durch TGF-β1 zu einer Ablagerung von extrazellulärer Matrix in der Muskulatur. Diese Erkrankung dient als Tiermodel der Duchenne‘schen Muskeldystrophie des Menschen. Hier kommt es zu einer Defizienz des Zytoskelettproteins Dystrophin. Beiden Erkrankungen ist gemein, dass es im Verlauf zu schweren Fibrosen in der Muskulatur kommt. Bei erkrankten Hunden konnte am 15. und 30. Lebenstag ein erhöhter TGF-β1-mRNA-Level festgestellt werden, was am 30. Lebenstag einen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe darstellte. Dieser war im weiteren Verlauf nicht mehr zu messen, sodass davon ausgegangen werden kann, dass TGF-β1 mit seinen hohen mRNA-Spiegeln in der neonatalen Phase eine Rolle bei der frühen Proliferation der extrazellulären Matrix spielt (PASSERINI et al. 2002). Bestätigt wurde dieses Ergebnis durch immunhistochemische Untersuchungen. Während es in der Kontrollgruppe nur selten TGF-β1-positive Bereiche zu finden gab, fanden sich bei den erkrankten Hunden stark positive Anfärbungen im Peri- und Endomysium, die sich zwischen den einzelnen Tieren in Ausmaß und Lokalisation unterschieden. Bei einer etwas anderen Myopathie, der idiopathisch inflammatorischen Myopathie des Hundes, treten durch starke Entzündungsreaktionen Muskelnekrosen und Fibrosen auf. Sowohl bei der caninen Polymyositis als auch bei der caninen Myositis der Kaumuskulatur konnten erhöhte TGF-β1-mRNA-Level nachgewiesen werden (SALVADORI et al. 2005).

Weiterhin hat TGF-β1 einen großen Einfluss auf den Knochenstoffwechsel und den Knorpel. So wirkt die Verfütterung von unverseifbaren Extrakten aus Avocado und Sojabohnen durch einen Anstieg der TGF-Produktion in den Chondrozyten und Osteoblasten antiarthritisch. Das in die Synovia abgegebene TGF-β zeigte dabei seinen maximalen Anstieg zwei Monate nach Beginn der Verfütterung, wobei der Wert bereits nach drei Monaten wieder absank (ALTINEL et al. 2007). Für den Fall des intraartikulär verabreichten TGFs ist dabei die Dauer der Applikation von großer Bedeutung. Während Injektionen über einen kurzen Zeitraum zu einem verbesserten Knorpelmetabolismus führen, kommt es bei Langzeitapplikation zur Bildung von Osteophyten (VAN BEUNINGEN et al. 1994).

Eine ähnliche Abhängigkeit zeigt sich für die lokale Applikation von exogenem TGF-β hinsichtlich der Knochenregeneration, welche um fast das Zweifache gesteigert werden kann. Zu hohe Dosen von TGF-β verzögern oder hemmen dabei die Mineralisierung des neuen Osteoids (BRODERICK et al. 2005).

Ein weiterer ossärer Effekt von TGF zeigt sich bei Knochenmetastasen, die von Prostatakarzinomen ausgehen und überwiegend osteoblastischer Natur sind. Für den Hund konnte gezeigt werden, dass TGF-β1 zu einer zeit- und dosisabhängigen Regulation der mRNA des Parathyroid Hormone-related Proteins (PTHrP) führt. Diese ist darüber hinaus maßgeblich von den beteiligten Zellen (gesunde Epithelien, Stroma- oder Karzinomzellen) abhängig (SELLERS et al. 2004).

TGF-β1 hat auch immunmodulatorische Eigenschaften. Bei der caninen viszeralen Leishmaniose ist es ein wichtiges regulatorisches Zytokin. Sowohl bei symptomatischen als auch bei asymtomatischen Hunden wird vermehrt TGF-β produziert. Während TGF-β in erhöhtem Maße produziert wurde, ging die INF-γ-Konzentration zurück. Es scheint so, als würde TGF-β die INF-γ-Produktion hemmen und so auch zu einer Vorherrschaft der TH2-Immunantwort führen. Dagegen führt aber nur die TH1-Immunantwort zu einer Immunität gegen den Parasiten (CORREA et al. 2007).

Im Rahmen der generalisierten Demodikose des Hundes kommt es im Vergleich zur lokalisierten Form und zur Kontrollgruppe zu einem signifikanten Anstieg der TGF-β-mRNA Expression. Es ist möglich, dass die TGF-β-mRNA-Expression mit einer Immunsuppression in Verbindung steht. Nach dem Abklingen der Symptome fielen auch die Werte wieder ab. Als Verlaufsparameter eignet sich TGF-ß-mRNA dennoch nicht, da die Werte nicht vollständig in den Normbereich zurückgekehrt sind (TANI et al. 2002).

Die Beeinflussung des Zellwachstums ist eine weitere Eigenschaft von TGF-β1. Auch hier finden sich veterinärmedizinische Untersuchungen, die einen Zusammenhang von TGF-β1 und der Pathophysiologie von Erkrankungen herstellen.

So befinden sich bei vielen Hunden mit Katarakt auf der inneren Oberfläche der anterioren und posterioren Linsenkapsel multifokale weiße Plaques. Bei immunhistochemischen Untersuchungen lässt sich dort vor allem TGF-β anfärben. Zusammen mit der Tatsache, dass bei Hunden mit erblichem Katarakt vermehrt TGF-β im Kammerwasser gefunden wurde, lässt diese Beobachtung darauf schließen, dass die Kataraktgenese mit einem Anstieg der TGF-β-Konzentration einhergeht. TGF-β bedingt die Metaplasie der epithelialen Zellen der Linse, womit die Grundvoraussetzung für die Plaquebildung geschaffen ist (COLITZ et al. 2000).

Tabelle 3: TGF-β1 in der veterinärmedizinischen Literatur

TGF-β1 in der Veterinärmedizin bei	**Beschreibung durch:**
Lebererkrankungen	Spee et al. (2006)
Leberfibrose	Neumann et al. (2008)
Benigne Prostatathyperplasie	Niu et al. (2001)
Muskeldystrophie	Passerini et al. (2002)
Entzündliche Myopathie	Salvadori et al. (2005)
Synovia	Altinel et al. (2007)
Knorpelmetabolismus	van Beuningen et al. (1994)
Knochenregeneration	Broderick et al. (2005)
Knochenmetastasen beim Prostatakarzinom	Sellers et al. (2004)
Leishmaniose	Correa et al. (2007)
Demodikose	Tani et al. (2002)
Katarakt	Colitz et al. (2000)
Prostataentwicklung	Shidaifat et al. (2007)

Therapeutisch scheint die Proliferation der Bindegewebszellen durch Testosteron beeinflussbar zu sein. Nach Applikation von Testosteron an juvenile Rüden kam es zu einer verminderten Proliferation der Bindegewebszellen der Prostata, während es an den epithelialen Zellen zu keinen erkennbaren Veränderungen der Proliferation kam. Diese Veränderungen gingen mit einem zweifachen Abfall der TGF-β-mRNA-Expression einher. Das Expressionsmuster von TGF-β verschiebt sich von einem verstärkten Auftreten im Bereich der epithelialen Zellen bei den nichtbehandelten Tieren zu einer verstärkten Expression im Bereich der Bindegewebszellen bei den mit Testosteron behandelten Rüden. Damit scheint es, dass Testosteron die Proliferation und Differenzierung der Prostatazellen koordiniert und an der Regulation der TGF-β-Gen-Expression in der Prostata beteiligt ist (SHIDAIFAT et al. 2007).

3 Material und Methoden

3.1 Patienten

3.1.1 Patienten - Referenzgruppe

Zur Erstellung der Referenzwerte von IL-6 und TGF-β1 wurde Blut von Hunden aus dem Klientel der Kleintierklinik des Tierärztlichen Instituts der Georg-August-Universität Göttingen untersucht. Die Hunde der Referenzgruppe wurden einer klinischen Allgemeinuntersuchung unterzogen, welche die klinische Anamnese, die Untersuchung von Atmungsapparat, Herzkreislaufsystem, Verdauungstrakt, Harn- und Geschlechtsapparat und der Lymphknoten mittels Adspektion, Palpation und Auskultation umfasste. Die Körperinnentemperatur wurde durch rektale Messung mit einem Fieberthermometer bestimmt. Laborchemisch wurden zusätzlich eine Hämatologie (Leukozyten, neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten, eosinophile Granulozyten, basophile Granulozyten, Erythrozyten, Hämoglobin, Hämatokrit, mean corpuscular volume, mean corpuscular hemoglobin, mean corpuscular hemoglobin concentration, Thrombozyten) und eine klinische Chemie (Glucose, Fructosamin, Gallensäuren, Glutamatdehydrogenase, Alaninaminotransferase, Aspartataminotransferase, Gesamtbilirubin, alkalische Phosphatase, Gesamteiweiß, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, Calcium, Phosphor, alpha-Amylase, Cholesterin, Lipase, Kreatinkinase, Kalium, Natrium, C-reaktives Protein, Globuline) angefertigt. In die Referenzgruppe sind nur klinisch gesunde Hunde aufgenommen worden. Insgesamt waren 88 Hunde in dieser Gruppe. Aufgrund der venösen Stauung über 60 Sekunden, unzureichendem Blutfluss und vorzeitigem Koagulieren des Blutes standen für die Bestimmung des Referenzbereiches von TGF-β1 und IL-6 letztlich 67 bzw. 45 Proben zu Verfügung. Bei 19 Hunden konnten sowohl TGF-β1 als auch IL-6 bestimmt werden. Zur Etablierung der Methode wurde von 34 Hunden neben Serum auch Blut für die Plasmabestimmung von TGF-β1 entnommen.

3.1.2 Patienten - erkrankte Tiere

Für die Bestimmung von IL-6 und TGF-β1 wurde das Blut von Patienten der Kleintierklinik des Tierärztlichen Instituts der Georg-August-Universität Göttingen zwischen dem 24.04.2008 und dem 12.05.2010 untersucht. Einschlussbedingung war das Vorliegen einer internistischen Erkrankung. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die zugrunde liegenden Erkrankungen sowie die Anzahl der Hunde, die daran erkrankt waren.

Tabelle 4: Internistische Erkrankungen und Anzahl der jeweils betroffenen Hunde

Erkrankung	Anzahl betroffener Hunde
Neoplasien	37
Entzündliche Erkrankungen	35
Diabetes mellitus	8
Hepatopathien	13
Niereninsuffizienz	8
Fibrose	6
Sonstige	37

Insgesamt konnte Blut von 146 kranken Hunden gewonnen werden. Für 75 Hunde konnten IL-6 und TGF-β1 aus Serum bestimmt werden. Von 42 Hunden wurde nur IL-6 untersucht, von 27 Hunden nur TGF-β1. Plasma-TGF-β1-Werte wurden von 21 Hunden bestimmt. Bei einer Gruppe von 11 Hunden wurde IL-6 im Verlauf eines chirurgischen Eingriffs bestimmt.

3.2 Geräte und Verbrauchsmaterialien

3.2.1 Geräte

- Zentrifuge: Eppendorf Centrifuge 5424 (Fa. Eppendorf AG, Hamburg)
- Zentrifuge: Hettich EBA 20 (Fa. Hettich, Bäch, Schweiz)
- Kühlzentrifuge: Heraeus Fresco 17 (Fa. Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich)
- Analyseautomat klinische Chemie: Konelab 20i (Fa. Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich)
- Vortexer: Vortex-Genie 2 (Fa. Scientific Industries, New York)
- Schüttelplatte: Titertek® (Fa. Flow Laboratories, Irvine, Schottland)
- Analyseautomat Hämatologie: Abbott Cell-Dyn®3500R (Fa. Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden)
- Analyseautomat Hämatologie: Abbott Cell-Dyn®3700 (Fa. Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden)
- Gerinnungsanalysegerät: SCA 2000 (Fa. Synbiotics, San Diego, Californien)
- Waschvorrichtung für Mikrotiterplatten: Nunc-Immuno ™wash 8 (Fa. NUNC, Wiesbaden)
- Multifunktionslesegerät: TECAN GENios Pro (Fa. TECAN Austria GmbH, Grödig, Österreich)
- Pipettierhilfe: pipetus®-akku (Fa. Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt)
- Pipetten: Pipetman P20/P100/P200/P1000 (Fa. Gilson, Villers Le Bel/Frankreich)
- Mehrkanalpipette: Pipetman Ultra Multichannel (20-300µl, Fa. Gilson, Villers Le Bel/Frankreich)
- Multipipette: Eppendorf Multipipette® plus mit Combitips® plus in den Volumengroßen 2,5 und 5ml (Fa. Eppendorf AG, Hamburg)

3.2.2 Verbrauchsartikel

- Serumröhrchen: Microtube 1,3 ml mit Serum-Gerinnungsaktivator (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) zur Blutabnahme für die klinische Chemie sowie für die Bestimmung von IL-6 und TGF-β1 aus Serum
- EDTA K-Röhrchen: mit 1,6 mg EDTA/ml Blut angereichertem 2 ml Polypropylenröhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) zur Blutabnahme für die Hämatologie sowie für die Bestimmung von TGF-β1 aus Plasma
- Citrat-Röhrchen: mit Citrat angereichertes 1,3 ml Röhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) zur Blutabnahme für die Messung der Gerinnungsparameter PT und aPTT
- Reagiergefäße: Sarstedt-Reagiergefäß 1,5 ml (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht)

3.2.3 Reagenzien und Lösungen

Reagenzien und Lösungen des „Quantikine Canine IL-6 Immunoassay“ CA6000 (Fa. R & D Systems, Minneapolis, USA):

- Mikrotiterplatte, beschichtet mit einem polyklonalen, für canines IL-6 spezifischen Antikörper
- Canine IL-6-Konjugat
  Polyklonaler, canine-spezifischer Antikörper gegen IL-6, an Meerrettichperoxidase konjugiert
- Canine IL-6-Standard
  Rekombinantes canines IL-6 in einer gepufferten Proteinbasis
- Canine IL-6-Kontrolle
  Rekombinantes canines IL-6 in einer gepufferten Proteinbasis
- Calibrator Diluent RD5T
  Gepufferte Proteinlösung zum Auflösen von Standard und Positivkontrolle, zur Herstellung der Verdünnungsreihe und als Negativkontrolle

- Assay Diluent RD1-75
  Gepufferte Proteinlösung zur Blockierung unspezifischer Bindungen und zur Herstellung eines äquimolaren Milieus
- Waschpufferkonzentrat
- Farbreagenz A
  Stabilisiertes Wasserstoffperoxid
- Farbreagenz B
  Stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidin)
- Stoplösung
  Verdünnte Salzsäurelösung

Reagenzien und Lösungen des “Quantikine Human TGF-β1 Immunoassay“ DB100B (Fa. R & D Systems, Minneapolis, USA):

- Mikrotiterplatte, beschichtet mit einem monoklonalen, für TGF-β1 spezifischen Antikörper
- TGF-β1-Konjugat
  Polyklonaler Antikörper gegen TGF-β1, an Meerrettichperoxidase konjugiert
- TGF-β1-Standard
  Rekombinantes humanes TGF-β1 in einer gepufferten Proteinbasis
- Assay Diluent RD1-73
  Gepufferte Proteinlösung zur Blockierung unspezifischer Bindungen und zur Herstellung eines äquimolaren Milieus
- Calibrator Diluent RD5-53 Konzentrat
  Gepufferte Proteinlösung zum Auflösen des Standards, zur Herstellung der Verdünnungsreihe und zur Verwendung als Negativkontrolle
- Waschpufferkonzentrat
- Farbreagenz A
  Stabilisiertes Wasserstoffperoxid
- Farbreagenz B
  Stabilisiertes Chromogen (Tetramethylbenzidin)

- Stoplösung
  Verdünnte Salzsäurelösung
- Salzsäure 1N
  Zum Aktivieren der TGF-β1-Proben
- Natronlauge 1,2N
  Zur Herstellung einer Lösung zum Abstoppen der Aktivierungsreaktion
- HEPES 0,5M
  Zur Herstellung einer Lösung zum Abstoppen der Aktivierungsreaktion

3.3 Gewinnung und Verarbeitung der Proben

3.3.1 Blutgewinnung

Die Blutabnahme erfolgte bei allen Hunden im Rahmen diagnostischer Maßnahmen. Nach dem Scheren und Desinfizieren der entsprechenden Hautstelle wurde den Hunden aus der V. cephalica antebrachii mittels Punktion mit einer sterilen Einmalkanüle 20G 0,9 x 40 mm (Fa. Terumo, Leuven, Belgien) Blut entnommen. Die Blutstauung durfte dabei nicht länger als 60 Sekunden betragen.

Zur Anfertigung der Hämatologie wurde Blut in ein mit 1,6 mg EDTA/ml Blut angereichertem Polypropylenröhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen und mittels eines automatischen Auszählverfahrens ausgewertet. Bis zum 23.09.09 wurde dazu das Abbott Cell-Dyn®3500R (Fa. Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden) verwendet, welches ab dem 24.09.09 durch das Abbott Cell-Dyn®3700 ersetzt wurde.

Das für die klinische Chemie benötigte Blut wurde in Serumröhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen und im Anschluss in einer Eppendorf Centrifuge 5424 (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) bei 3000 Umdrehungen/min für 5 Minuten zentrifugiert. Um Verunreinigungen zu vermeiden wurden nur die obersten 4/5 des Überstandes mit einem Pipetman P1000 (Fa. Gilson, Villers Le Bel/Frankreich) abpipettiert und im Konlab 20i (Fa. Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich) photometrisch bestimmt.

Zur Bestimmung der Gerinnungsparameter partielle Thromboplastinzeit (PTT) und Thromboplastinzeit (PT) wurde Blut in mit Tri-Natriumcitrat (0,106 mol/l) bestückten Citratröhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Die beiden Werte wurden mit Hilfe des SCA 2000 (Fa. Synbiotics, San Diego, California) bestimmt.

Die Blutproben für die Bestimmung von IL-6 und TGF-β1 aus Serum wurden jeweils in Serumröhrchen (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) aufgefangen. Für die Bestimmung von TGF-β1 aus Plasma wurden mit 1,6 mg EDTA/ml Blut angereichertem Polypropylenröhrchen genutzt. Alle Blutproben wurden im Anschluss weiter bearbeitet.

3.3.2 Aufbereitung der Proben

Das zur IL-6-Bestimmung vorgesehene Blut darf über Nacht bei 2 - 8°C gerinnen. Am Morgen nach der Gewinnung wurde das Blut für 20 Minuten bei 1000 x g mit der Eppendorf Centrifuge 5424 (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) zentrifugiert. Im Anschluss wurde zur Vermeidung von Kontamination 4/5 Serum mit einem Pipetman P200 (Fa. Gilson, Villers Le Bel/Frankreich) abpipettiert. Es wurden Aliquote hergestellt und bei ≤ - 20°C eingefroren.

TGF-β1 wurde sowohl aus Serum als auch aus Plasma bestimmt. Für die Messung aus Serum muss das Blut 30 Minuten bei Raumtemperatur gerinnen. Daraufhin wurde es über Nacht in den Kühlschrank bei 2 - 8°C verbracht, um eine vollständige Freisetzung des TGF-β1 sicherzustellen. Am Folgetag wurde das Blut mit der Eppendorf Centrifuge 5424 (Fa. Eppendorf AG, Hamburg) für 15 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Das Serum wurde daraufhin mit einem Pipetman P200 (Fa. Gilson, Villers Le Bel/Frankreich) abpipettiert. Das Serum wurde aliquotiert und bei ≤ -70°C eingefroren, um eine Proteindegradation zu vermeiden.

Für die Gewinnung von Plasma wurde EDTA-Blut herangezogen. Dieses wurde auf Eis gewonnen und innerhalb von 30 Minuten nach Gewinnung 15 Minuten bei 1000 x g in der Zentrifuge Hettich EBA 20 (Fa. Hettich, Bäch, Schweiz) zentrifugiert. Danach

wurde 4/5 des Überstandes in ein Reagiergefäß pipettiert und erneut in der Zentrifuge Heraeus Fresco 17 (Fa. Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich) für 10 Minuten bei 10.000 x g und 2 - 8°C zentrifugiert. Auch hier wurde 4/5 Überstand abpipettiert, aliquotiert und bei ≤ -70°C eingefroren.

3.4 ELISA

3.4.1 ELISA allgemein

Der enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) gehört zusammen mit dem Radioimmunoassay (RIA) zu den Immunoassays. Er dient dem Nachweis und der quantitativen Bestimmung von Antigenen oder Antikörpern durch ihre spezifischen Antikörper oder Antigene. Beide gehören zu den Festphasenassays, deren Charakteristikum die Bindung einer Komponente an einer Kunststoffoberfläche ist, und die fast gleichzeitig und unabhängig voneinander von ENGVALL u. PERLMANN (1971) sowie von VAN WEEMEN u. SCHUURS (1971) beschrieben wurden. Dem ELISA vorausgegangen ist der RIA, der erstmalig 1960 von YALOW und BERSON beschrieben worden war. Nachteil des RIA gegenüber dem ELISA ist die potentiell hohe Gesundheitsbelastung, da hier eine bekannte Menge des nachzuweisenden Antigens radioaktiv markiert und an ihre spezifischen Antikörper gebunden wird. Im Folgeschritt wird die Probe mit der zu bestimmenden unbekannten Menge an Antigen dazu gegeben, welches nun mit dem radioaktiv markierten Antigen um die gleichen Bindungsstellen konkurriert und zu einer teilweisen Verdrängung derselbigen führt. Die gemessene Radioaktivität im Überstand ist nun proportional mit der Menge des nachzuweisenden Antigens. Für den Anwender besteht beim ELISA – durch den Verzicht auf radioaktiv markierte Antigene und die Nutzung einer enzymgekoppelten Farbreaktion – eine geringere Gesundheitsbelastung. Weiterhin ist das Verfahren preiswerter und die Detektion der Farbreaktion einfacher.

Das ELISA-Prinzip funktioniert wie folgt: Ein Markermolekül, das heißt in diesem Fall ein Enzym, bindet über einen spezifischen Antikörper das nachzuweisende Antigen.

Ein zugegebenes Substrat wird durch das Enzym umgesetzt und zeigt eine sichtbare Farbreaktion.

Dieses Grundprinzip wurde den jeweiligen Bedingungen angepasst, sodass es verschiedene ELISA-Systeme zu unterscheiden gibt. So gibt es direkte und indirekte ELISA. Beim direkten ELISA ist schon der das Antigen bindende spezifische Antikörper enzymgekoppelt, während beim indirekten ELISA das Enzym mit einem Sekundärantikörper verbunden ist, welcher gegen den primären Antikörper gerichtet ist, der das zu detektierende Antigen bindet. Beide Systeme haben gewisse Vorteile: Während es beim direkten ELISA durch den Wegfall eines weiteren Inkubationsschritts zu einer deutlichen Zeitersparnis kommt, hat der indirekte ELISA den Vorteil, dass hier eine Signalverstärkung über die Bindung mehrerer enzymgekoppelter Sekundärantikörper an den Primärantikörper möglich ist.

Weiterhin gibt es kompetitive und nichtkompetitive ELISA-Systeme. Beim kompetitiven ELISA konkurrieren der zu messende Analyt und eine bekannte Menge eines enzymgekoppelten Antigens um die gleiche Bindungsstelle eines spezifischen Antikörpers, der an die Festphase gebunden ist. Je mehr Analyt in der Probe vorliegt, desto weniger enzymgekoppeltes Antigen kann binden und Substrat umsetzten. Die gemessene Farbintensität ist also umgekehrt proportional zur Menge des Analyten. Der sogenannte Sandwich-ELISA stellt den sehr häufig genutzten nichtkompetitiven ELISA dar. Bei diesem ELISA ist das zu detektierende Antigen von zwei spezifischen Antikörpern eingerahmt. Der Fängerantikörper ist hier an die Festphase gebunden und bindet als erstes das zu messende Antigen. Im Folgeschritt bindet ein enzymgekoppelter Detektorantikörper das Antigen an einen anderen Epitop. Somit ist diese Form des ELISAs erst ab einer bestimmten Größe des Analyten und beim Vorhandensein unterschiedlicher Epitope möglich. Beim nicht kompetitiven ELISA ist die gemessene Farbreaktion proportional zur gebundenen Menge an Antigen.

Im Folgenden soll beispielhaft auf die einzelnen Teilschritte des Sandwich-ELISA‘s eingegangen werden. Im ersten Schritt wird ein spezifischer Antikörper auf einer Festphase gebunden. Die Bindung kommt durch physikalische Wechselwirkungen des Antikörpers mit der Kunststoffoberfläche, meistens einer Polystyren-

Mikrotiterplatte, zustande. Nach der Inkubationszeit ist es wichtig den Inhalt der einzelnen Wells zu entfernen und die Wells mit einer Waschlösung von nicht gebundenen Antikörpern zu befreien. Da es häufig auch nach dem Waschen noch Bereiche auf der Mikrotiterplatte gibt, die weitere Proteine binden können, werden diese durch die Zugabe eines unspezifischen Proteins, z. B. bovines Serumalbumin, geblockt. Bei den meisten kommerziellen ELISA-Systemen erhält man die Mikrotiterplatten bereits beschichtet und geblockt. Somit ist das Aufbringen der Proben in der Regel der erste Schritt. Die in der Probe beinhalteten Antigene binden über Wasserstoffbrückenbindung, Ionenbindung, hydrophobe Interaktionen und van-der-Waals-Kräfte an die an der Mikrotiterplatte immobilisierten Antikörper. Nach der Inkubationszeit werden überschüssige Reaktionspartner mittels einer Waschlösung aus den Kavitäten entfernt. Danach werden enzymgekoppelte Detektorantikörper in die Wells pipettiert. Diese binden an ein anderes Epitop als der Fängerantikörper. Als Enzym wird häufig eine Peroxidase, z. B. eine Meerrettichperoxidase, eingesetzt. Es schließen eine Inkubationspause sowie ein Waschschritt zur Beseitigung überschüssiger Antikörper an. Abhängig vom gewählten Enzym muss das passende Substrat und Chromogen gewählt werden. Wasserstoffperoxid wird der Meerrettichperoxidase als Substrat angeboten. Die bei der Reaktion freiwerdenden Protonen oxidieren nun das bisher fast farblose Chromogen Tetramethylbenzidin zu einem blauen Endprodukt. Durch die Zugabe von Säure lässt sich die Reaktion beenden und das Blau in ein stabiles Gelb umschlagen. Diese Farbreaktion, die proportional zur Menge des gebundenen Antigens erfolgt, lässt sich nun photometrisch in einer Optischen Dichte ausdrücken. Die Wellenlänge, bei welcher gemessen wird, hängt vom Chromogen ab. Bei Tetramethylbenzidin liegt sie bei 450 nm (RAEM u. RAUCH 2007).

Die genutzten Antikörper sind entweder monoklonaler oder polyklonaler Natur. Das Charakteristikum der monoklonalen Antikörper ist, dass sie alle von einer Zellpopulation gebildet wurden, die von einem einzigen B-Lymphozyten stammt. Monoklonale Antikörper richten sich gegen ein einziges Epitop eines Proteins. Polyklonale Antikörper dagegen leiten sich von verschiedenen B-Lymphozyten ab.

Sie richten sich alle gegen das gleiche Protein, binden aber an verschiedene Epitope.

3.4.2 Prinzip des ELISA zur Bestimmung von IL-6/TGF-β1

Bei den Testsystemen „Quantikine Canine IL-6 Immunoassay“ (Fa. R & D systems, Minneapolis) und “Quantikine Human TGF-β1 Immunoassay“ (Fa. R & D systems, Minneapolis) handelt es sich um Sandwich-ELISA. Beide folgen dem gleichen Prinzip. Eine Mikrotiterplatte ist mit Antikörpern beschichtet. Im Falle des „Quantikine Canine IL-6 Immunoassay“ handelt es sich um einen polyklonalen Antikörper, der spezifisch für canines IL-6 ist und beim “Quantikine Human TGF-β1 Immunoassay“ um einen monoklonalen Antikörper der spezifisch für TGF-β1 ist. Im ersten Schritt werden Standards, Kontrollen und Proben in die Wells pipettiert. Vorhandenes IL-6 bzw. TGF-β1 wird nun im entsprechenden Testsystem an die immobilisierten Antikörper gebunden. Es folgt ein Waschschritt, bei dem alles ungebundene Material entfernt wird. In der Folge wird ein jeweils enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper, der spezifisch für das bereits im ersten Schritt immobilisierte IL-6 bzw. TGF-β1 ist, hinzugegeben. Der nachzuweisende Analyt wird nun von beiden Seiten von Antikörpern eingerahmt. Nach einem weiteren Waschschritt, bei dem nicht gebundene enzymgekoppelte Antiköper entfernt werden, wird eine Substrat-Lösung in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Die an den Antikörper gekoppelte Meerrettichperoxidase reagiert mit dem Substrat. Es entsteht der blaue Farbstoff Tetramethylbenzidin. Seine Menge ist proportional zur Menge des im ersten Schritt gebundenen Analyten. Die Farbentstehung wird durch Zugabe von Salzsäure gestoppt. Die blaue Farbe schlägt dabei nach Gelb um.

3.5 Haltbarkeit

Um eine Aussage darüber treffen zu können, in wie weit sich die Dauer der Lagerung auf die ermittelten Messergebnisse auswirkt und ob es eventuell zu lagerungsbedingten Verfälschungen der Messergebnisse kommt, wurden die

gleichen Blutproben mehrmals untersucht – jeweils im Abstand von zwei Wochen. Dazu wurden aus jeder Blutprobe sechs Aliquote hergestellt. Die erste Bestimmung der Zytokine erfolgte unmittelbar nach Aufarbeitung der Blutproben. Die restlichen Aliquote wurden im Falle der Serumproben für die IL-6 Bestimmung bei ≤ -20°C und im Falle der Serumproben für die TGF-β1 Bestimmung bei ≤ -70°C tiefgefroren. Im Zwei-Wochen-Rhythmus wurde nun ein weiteres Aliquot untersucht.

3.6 Durchführung der ELISA

3.6.1 Testdurchführung „Quantikine Canine IL-6 Immunoassay“

Zunächst werden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Daraufhin werden die Positivkontrolle, die Waschlösung, die Substratlösung sowie der Standard vorbereitet. Die lyophilisierte Kontrolle wird mit 1 ml deionisiertem Wasser rekonstituiert. 25 ml des Waschlösungskonzentrates werden mit 600 ml deionisiertem Wasser vermischt. Der lyophilisierte Standard wird mit 5 ml Calibrator Diluent RD5T rekonstituiert. Es entsteht eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2000 mg/ml. Aus dieser Stammlösung wird eine 2-fache Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu werden in 6 Reagiergefäßen jeweils 300 µl Calibrator Diluent RD5T vorgelegt. In das erste Reagiergefäß werden 300 µl der Stammlösung gegeben und gründlich vermischt. Aus diesem Gemisch werden wiederum 300 µl Lösung in das nächste Gefäß pipettiert usw. So entsteht eine Verdünnungsreihe mit den Konzentrationen 1000/500/250/125/62,5/31,25 pg/ml. Der unverdünnte canine IL-6-Standard dient als höchster Standard mit 2000 pg/ml, der Calibrator Diluent RD5T dient als Nullprobe mit 0 pg/ml.

Nach der Beendigung der Vorbereitungen kann mit dem eigentlichen Test begonnen werden. In jedes Well der Mikrotiterplatte werden 50 µl des Assay Diluenten RD1-75 vorgelegt. Im folgendem werden jeweils 100 µl Standard, Kontrolle und Proben in die Wells pipettiert und die Platte mit einer selbstklebenden Folie abgedeckt. Es folgt eine zweistündige Inkubationsphase bei Raumtemperatur auf einer Rüttelplatte Titertek® (Fa. Flow Laboratories, Irvine, Schottland) bei 500±50 rpm. Anschließend

folgt ein Waschschritt. Der Inhalt der Wells wird ausgeschüttet und die Wells mit 400 µl Waschlösung befüllt. Die Befüllung erfolgt mittels des Nunc-Immuno ™wash 8 (Fa. NUNC, Wiesbaden). Dabei ist besonders darauf zu achten, dass nach jedem Waschschritt die Waschlösung gut entfernt wird. Dazu wird die Mikrotiterplatte nach dem Entfernen der Waschlösung auf ein sauberes Papiertuch geklopft. Der Waschschritt wird insgesamt vier Mal wiederholt. Im Anschluss werden in jedes Well 200 µl canines IL-6-Konjugat pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit einer neuen selbstklebenden Folie abgedeckt und erneut für zwei Stunden auf die Rüttelplatte verbracht. Es folgen wieder fünf Waschschritte. Daraufhin werden 120 µl Substratlösung in jedes Well verbracht. Die Substratlösung besteht aus zwei Komponenten, die zu gleichen Teilen vermischt werden. Die Anwendung der Substratlösung muss innerhalb von 15 Minuten nach deren Ansatz erfolgen. Die Mikrotiterplatte wird erneut mit einer frischen selbstklebenden Folie abgedichtet. Die folgende 45-minütige Inkubationszeit muss vor Licht geschützt stattfinden. Nach Ablauf der 45 Minuten wird die Farbreaktion durch die Zugabe von 120 µl Stopplösung je Well unterbrochen. Die Messung der optischen Dichte soll innerhalb von 30 Minuten nach Abstoppen der Farbreaktion erfolgen. Die Messung erfolgte mit dem TECAN GENios Pro (Fa. TECAN Austria GmbH, Grödig, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 570 nm.

3.6.2 Testdurchführung des “Quantikine Human TGF-β1 Immunoassay“

Zunächst müssen einige Reagenzien vorbereitet werden. Dazu werden alle Reagenzien auf Raumtemperatur erwärmt. 25 ml der Waschpufferlösung werden mit 600 ml deionisiertem Wasser angesetzt. Die einsatzfertige Mischung des Calibrator Diluent RD5-53 entsteht durch die Zugabe von 20 ml Calibrator Diluent RD5-53-Konzentrat zu 60 ml deionisiertem Wasser. Als nächstes müssen der Standard und die Verdünnungsreihe angesetzt werden. Der lyophilisierte Standard wird mit 2 ml Calibrator Diluent RD5-53 rekonstituiert. So entsteht eine Stammlösung mit einer Konzentration von 2000 pg/ml. Nachdem der Standard fünf Minuten geruht und nochmal gut mit dem Vortexer Vortex-Genie 2 (Fa. Scientific Industries, New York)

durchgemischt wurde, wird die 2-fache Verdünnungsreihe hergestellt. Dazu werden sechs 1,5 ml Reagiergefäße (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) mit jeweils 200 µl Calibrator Diluent RD5-53 bestückt. Nun werden 200 µl des TGF-β1-Standards mit 2000 pg/ml in das erste Reagiergefäß gegeben und gut durchmischt. Aus dieser ersten Mischung werden nun wieder 200 µl entnommen, in das zweite Reagiergefäß gegeben und gut durchmischt. Diese Schritte werden mit den übrigen Reagiergefäßen genauso wiederholt. So entsteht eine Verdünnungsreihe mit den TGF-β1-Konzentrationen 1000/500/250/125/62,5/31,25 pg/ml. Der unverdünnte TGF-β1-Standard mit 2000 pg/ml dient als höchster Standard, der Calibrator Diluent RD5-53 wird als Negativkontrolle mit 0 pg/ml genutzt.

Um das immunoreaktive TGF-β1 zu messen ist es notwendig, das latente TGF-β1 zu aktivieren. Dazu werden die Proben auf Raumtemperatur gebracht und 40 µl Serum oder Plasma in ein 1,5 ml Reagiergefäß (Fa. Sarstedt AG & Co, Nümbrecht) verbracht. Im Anschluss werden 20 µl 1 N HCl dazugegeben, mittels eines Vortexers Vortex-Genie 2 (Fa. Scientific Industries, New York) gut gemischt und zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wird die Probe durch die Zugabe von 20 µl 1.2 N NaOH/ 0,5M HEPES neutralisiert und wieder gevortextet. Es folgt für die Serumproben eine 20-fache Verdünnung. Dazu werden 10 µl aktivierte Probe mit 190 µl Calibrator Diluent RD5-53 vermischt. Die Plasmaproben dagegen werden nur einer 2-fachen Verdünnung unterzogen. In diesem Fall werden 80 µl aktivierte Probe mit 80 µl Calibrator Diluent RD5-53 verdünnt. Nun können die Serum- und Plasmaproben gemessen werden.

Für die Messung werden 50 µl Assay Diluent RD1-73 in alle Wells pipettiert. Im Anschluss werden die Standards, die Negativkontrolle und die aktivierten und verdünnten Proben in die Wells pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit einer selbstklebenden Folie bedeckt, sanft geschwenkt, um eine Durchmischung der Lösungen zu gewährleisten, und anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nun folgt ein Waschschritt. Dabei wird zunächst der Inhalt der Wells entfernt und im Anschluss durch 400 µl Waschpufferlösung aus dem Nunc-Immuno ™wash 8 (Fa. NUNC, Wiesbaden) ersetzt. Die Waschlösung wird wieder

ausgeschüttet und die Mikrotiterplatte durch sanftes Schlagen auf ein sauberes Papierhandtuch von Resten der Waschlösung befreit. Dieser Schritt wird dreimal wiederholt. Im Anschluss werden 100 µl TGF-β1-Konjugat in jedes Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wird mit einer neuen selbstklebenden Folie versehen. Es folgt eine zweistündige Inkubationszeit bei Raumtemperatur. Nach Ablauf der zwei Stunden wird die Platte wieder viermal mit Waschpuffer-Lösung gewaschen. Daraufhin werden 100 µl Substratlösung in jedes Well pipettiert, die zu gleichen Teilen diese Lösung bilden. Sie soll innerhalb von 15 Minuten nach Mischung beider Komponenten verbraucht werden. Nach dem Bekleben der Mikrotiterplatte mit der Folie folgt eine 45-minütige Inkubationszeit, in der die Mikrotiterplatte vor Lichteinfall geschützt werden muss. Nach Ablauf dieser Zeit werden 100 µl Stopplösung in alle Wells pipettiert, um die Farbreaktion zu beenden. Es folgt das Ablesen der optischen Dichte durch den ELISA-Reader innerhalb von 30 Minuten nach Abstoppen der Farbreaktion. Dies erfolgte mit dem TECAN GENios Pro (Fa. TECAN Austria GmbH, Grödig, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 570 nm.

3.7 Auswertung

3.7.1 Auswertung der ELISA

Die Auswertung der detektierbaren Farbreaktion erfolgte photometrisch mit Hilfe des TECAN GENios Pro (Fa. TECAN Austria GmbH, Grödig, Österreich) bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Korrekturwellenlänge von 570 nm. Aus der sich hier ergebenden optische Dichte wurde die Konzentration von IL-6 bzw. TGF-β1 rechnerisch ermittelt.

3.7.2 Statistische Auswertung

Unterschiede zwischen den Gruppen „krank“ bzw. „gesund“ wurden für IL-6 mit dem Fisher´s Exact Test untersucht, einem Signifikanztest auf Unabhängigkeit, der auch

bei geringer Fallzahl zuverlässige Ergebnisse liefert. Für TGF-β1 bzw. für den paarweisen Vergleich der Untergruppen wurde der Mann-Whitney-U-Test verwendet, ein Signifikanztest welcher die Unterschiede zweier Verteilungen durch Rangbildung untersucht. Dieser Test setzt keine Normalverteilung voraus. Das Signifikanzniveau wurden auf $\alpha = 5\,\%$ gesetzt. Zur Beurteilung von Korrelationen wurde der Korrelationstest mit Rangkorrelation nach Kendall angewendet. Verlaufsanalysen der TGF-β1-Analysen wurden als hierarchische Cluster-Analyse dargestellt. Die Normalisierung erfolgte auf Standard Normal (Mittelwert = 0, Standardabweichung = 1). Alle Analysen wurden mit der frei erhältlichen Software R (Version 2.8, www.r-project.org) durchgeführt.

4 Ergebnisse

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob IL-6 und TGF-β1 als labordiagnostische Parameter für den Hund etabliert werden können.

Hierzu musste zunächst die Lagerfähigkeit der Proben untersucht werden. Im Gegensatz zu IL-6, das in aller Regel im Blutserum gemessen wird (YOUNG et al. 1999, BORAZAN et al. 2004, AVRAMESCU et al. 2008), ist für TGF-β1 sowohl eine Bestimmung aus Serum als auch aus thrombozytenarmem Plasma möglich. Da eine große Menge von TGF-β1 in den Granula der Thrombozyten vorhanden ist und durch deren Aktivierung freigesetzt wird, stellt die im Serum vorhandene Menge an TGF-β1 die gesamte vorhandene Menge an TGF-β1 dar. Wird dagegen ein Aufbereitungsverfahren gewählt, bei dem der größtmögliche Anteil der Thrombozyten aus dem Plasma entfernt wird, erhält man thrombozytenarmes Plasma. Die darin durchgeführten Messungen stellen die zirkulierende Menge an TGF-β1 dar. Dementsprechend führten wir im Vorfeld der Untersuchungen Vergleichsmessungen durch, bei denen wir die Serum- und Plasmakonzentrationen einzelner Hunde miteinander verglichen. Im zweiten Schritt erfolgte dann die Untersuchung gesunder und kranker Tiere, um Normalwerte für IL-6 und TGF-β1 zu etablieren und um die krankheitsspezifischen Veränderungen zu untersuchen.

4.1 IL-6

4.1.1 Haltbarkeit

Für die Messung von IL-6 in praxi ist eine Messmethode erforderlich, die eine möglichst einfache Handhabung der Probe erlaubt. Während die Messung aus Blutplasma eine umgehende Weiterverarbeitung der Probe verlangt und somit für den Routinebetrieb schwer zu realisieren ist, erlaubt die Verwendung von Serum eine Lagerung im Kühlschrank. Entscheidend hierbei ist, ob sich die Blutkonzentrationen im Laufe der Zeit durch die Lagerung verändern und somit ebenfalls eine zügige Verarbeitung nötig ist. Entsprechend wurde die Serumkonzentration von IL-6 bei 19 Hunden direkt nach der Verarbeitung der Proben

sowie nach einer Lagerung bei ≤ -20°C gemessen. Es war vorgesehen, die Proben in einem jeweils zweiwöchigen Abstand über einen Zeitraum von zehn Wochen auf ihren Gehalt an IL-6 zu untersuchen. Da nach der ersten Messung bei keinem der gesunden Hunde eine detektierbare IL-6 Konzentration zu verzeichnen war, verzichteten wir auf die Messungen in Woche 2, 4, 6 und 8. In der abschließenden Messung in der zehnten Woche nach Einlagerung der Serumproben war ebenfalls bei keinem der Hunde eine messbare IL-6-Konzentration zu ermitteln.

4.1.2 Patienten

In die IL-6-Studie wurden insgesamt 163 Hunde aufgenommen, wobei 45 Hunde aufgrund der klinischen Allgemeinuntersuchung, der Hämatologie und Klinischen Chemie sowie evtl. zusätzlich durchgeführten Untersuchungen als gesund und 118 Hunde als krank eingestuft wurden (s. Anhang Tabelle 6).

4.1.3 Rassenverteilung gesunder Hunde

In der Gruppe gesunder Hunde (n = 45) stellten Mischlinge (n = 17) mit 37,8 % die größte Gruppe dar. Retriever waren mit 7 Hunden (15,6 %) vertreten, wobei 5 Hunde der Rasse Labrador Retriever und 2 Hunde der Rasse Golden Retriever angehörten. Die dritte Gruppe mit 5 Hunden (11,1 %) waren Terrier, die sich wiederum aus zwei Jack Russel Terriern und je einem Irish Terrier, einem Staffordshire Bullterrier und einem West Highland White Terrier zusammen setzten (s. Anhang Tabelle 7). Weitere Rassen (n = 16; 35,6 %) mit 3 oder weniger Hunden finden sich im Anhang in Tabelle 8.

4.1.4 Geschlechtsverteilung gesunder Hunde

24 der 45 Hunde (53,3 %) waren weiblich. Davon waren 17 Tiere (70,8 %) weiblich-intakt und 7 Tiere (29,2 %) weiblich-kastriert. 46,7 % der Tiere (n = 21) waren Rüden.

Davon waren 71,4 % (n = 15) männlich-intakt und 28,6 % (n = 6) männlich-kastriert (s. Anhang Tabelle 7).

4.1.5 Altersverteilung gesunder Hunde

Die gesunden Hunde waren zwischen 5 und 120 Monaten alt, was einem mittleren Alter von 3 Jahren und einem Monat entsprach. Die mit Abstand größte Gruppe stellten die jungen Hunde unter 4 Jahren mit 32 von 45 Tieren (71,1 %) dar. 22,2 % der Tiere (n = 10) gehörten zur Gruppe mittelalter Hunde von 4 bis 7 Jahren. Die mit 6,7 % kleinste Gruppe (n = 3) bildeten alte Hunde zwischen 8 und 11 Jahren (s. Anhang Tabelle 7).

4.1.6.1 Rassenverteilung kranker Hunde

Bei den kranken Hunden (n = 118) stellten die Mischlinge mit 38 Hunden (32,2 %) ebenfalls die größte Gruppe dar. Die zweitgrößte Gruppe wurde von Terriern mit 14 Hunden (11,9 %) gebildet und setzt sich aus 4 West Highland White Terriern, 3 Deutschen Jagdterriern, jeweils 2 Jack Russel Terriern und 2 Yorkshire Terriern sowie jeweils einem Airedale Terrier, einem Kerry Blue Terrier und einem Tibet Terrier zusammen. Die drittgrößte Gruppe war die der Retriever mit 11 Hunden (9,3 %), davon 6 Golden Retriever und 5 Labrador Retriever. 8 Hunde (6,8 %) bildeten die Gruppe der Vorstehhunde, die sich aus 2 Weimaranern und jeweils einem Deutsch Drahthaar, einem Deutsch Kurzhaar, einem Kleinen Münsterländer, einem Magyar Viszla, einem Pointer und einem Irish Setter zusammensetzte. Die Gruppe der Teckel machte mit 6 Hunden 5,1 % der Studienpopulation aus. Sie wurde aus 4 Rauhaarteckeln und 2 Langhaarteckeln gebildet. Der Deutsche Schäferhund war mit ebenfalls 6 Hunden (5,1 %) vertreten. 2 Border Collies, 2 Shelties und ein Australian Shepherd bildeten die Gruppe der Hütehunde, die 4,2 % an der Gesamtstudienpopulation ausmachten. Seltenere Rassen (n = 30, 25,4 %) mit 3 und weniger Hunden sind im Anhang in Tabelle 9 aufgeführt.

4.1.6.2 Geschlechtsverteilung kranker Tiere

57 der Hunde waren weiblichen und 61 Tiere männlichen Geschlechts. 42,1 % der Hündinnen waren kastriert (n = 24) und 57,9 % weiblich-intakt (n = 33). Bei den Rüden waren 29,5 % kastriert (n = 18) und 70,5 % intakt (n = 43) (s. Anhang Tabelle 7).

4.1.6.3 Altersverteilung kranker Tiere

Die kranken Hunde waren zwischen 13 und 210 Monaten alt (Mittelwert: 9 Jahre und 1 Monat). 14 Hunde (11,9 %) waren jünger als 4 Jahre. Die Gruppe der Hunde mit einem Alter zwischen 4 und 7 Jahren machte 16,1 % der Gesamtstudienpopulation aus (n = 19). Die größte Gruppe mit n = 51 Hunden (43,2 %) stellten die Hunde mit einem Alter zwischen 8 und 11 Jahren. 34 Hunde (28,8 %) waren über 11 Jahre alt (s. Anhang Tabelle 7).

4.1.6.4 Einteilung der Erkrankungen nach Organsystemen/Themenkomplexen

Die verschiedenen internistischen Erkrankungen wurden entsprechend ihrer Ätiologie bzw. nach Organsystemen differenziert. Die mit 26,3 % (n = 31) größten Gruppen bestanden aus Hunden mit entzündlichen Erkrankungen, dicht gefolgt von 30 Hunden mit neoplastische Erkrankungen (25,4%). 8 Hunde (n = 6,8 %) litten an einer Hepatopathie, weitere 8 Hunde (n = 6,8 %) an einer Niereninsuffizienz und 7 (n = 5,9 %) an einem Diabetes mellitus. 34 der 118 untersuchten Hunde (n = 28,8 %) wiesen Erkrankungen auf, die keiner der Krankheitsgruppen zugeordnet werden konnten (s. Anhang Tabelle 10). Dazu gehörten z. B. ein Hund mit Fieber unbekannter Genese sowie 2 Hunde mit Krampfanfällen; ein Mal aufgrund einer idiopathischen Epilepsie und ein Mal verursacht durch eine Canine Ceroid Lipofuszinose.

4.1.7 Blutkonzentrationen von IL-6

Bei gesunden Hunden konnte bis auf eine Ausnahme (2 %) kein IL-6 im Serum detektiert werden. Die Serumkonzentration lag hier bei 27 pg/ml, also noch unter dem kleinsten Standard und damit in einem nur wenig sensitiven Bereich. Entsprechend konnte bei gesunden Hunden keine Korrelation von IL-6-Konzentration und Rasse, Alter oder Geschlecht der Hunde hergestellt werden.

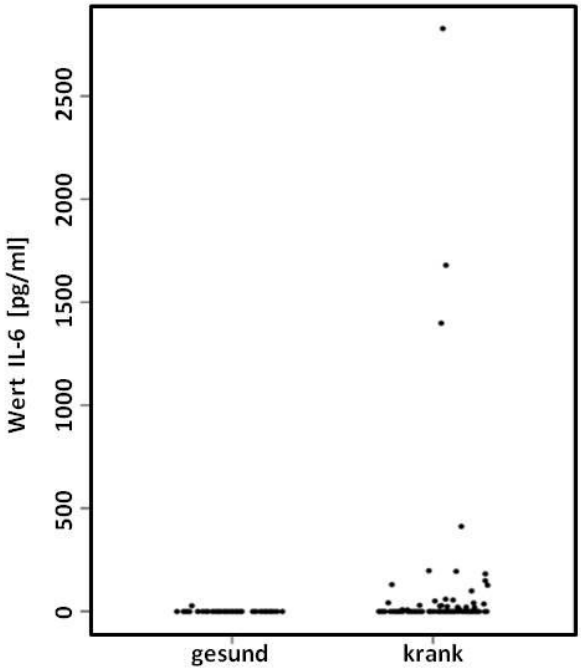

Abbildung 7: IL-6-Werte bei gesunden und kranken Hunden

Bei den kranken Hunden (n = 118) zeigten sich IL-6-Serumkonzentrationen zwischen 0 und 2828 pg/ml, wobei der positive Nachweis von IL-6 im Serum nur bei 27 der 118 Hunde (22,9 %) gelang (Abbildung 7). Trotz zahlreicher kranker Tiere ohne Nachweis von IL-6 im Serum zeigte sich ein signifikanter Unterschied beider Gruppen ($p < 0,001$) mit einer Odds ratio von 12,8 [95 % Confidence interval: 2-540]. Somit zeigte sich ein positiver Messwert sehr spezifisch für die Erkrankung eines Hundes; im positiven Fall war die Wahrscheinlichkeit einer zugrunde liegenden

Pathologie 12,8 Mal höher als die Wahrscheinlichkeit, dass es sich um einen gesunden Hund mit erhöhtem Wert handelte.

Hinsichtlich der Erkrankungen zeigte sich bei neun der 31 Hunde (29 %) mit einer Entzündung eine Erhöhung von IL-6, in der Gruppe der Neoplasien fanden sich 6 Fälle (20 %) mit erhöhten Werten. Bei den Hepatopathien und Niereninsuffizienzen waren es 2 (25 %) bzw. 3 Fälle (37,5 %). Hunde mit einem Diabetes mellitus oder einer Leberfibrose zeigten keine erhöhten IL-6-Werte, wohingegen 7 Tiere mit unterschiedlichsten Erkrankungen ebenfalls eine Erhöhung für IL-6 hatten. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen fand sich nicht (Abbildung 8).

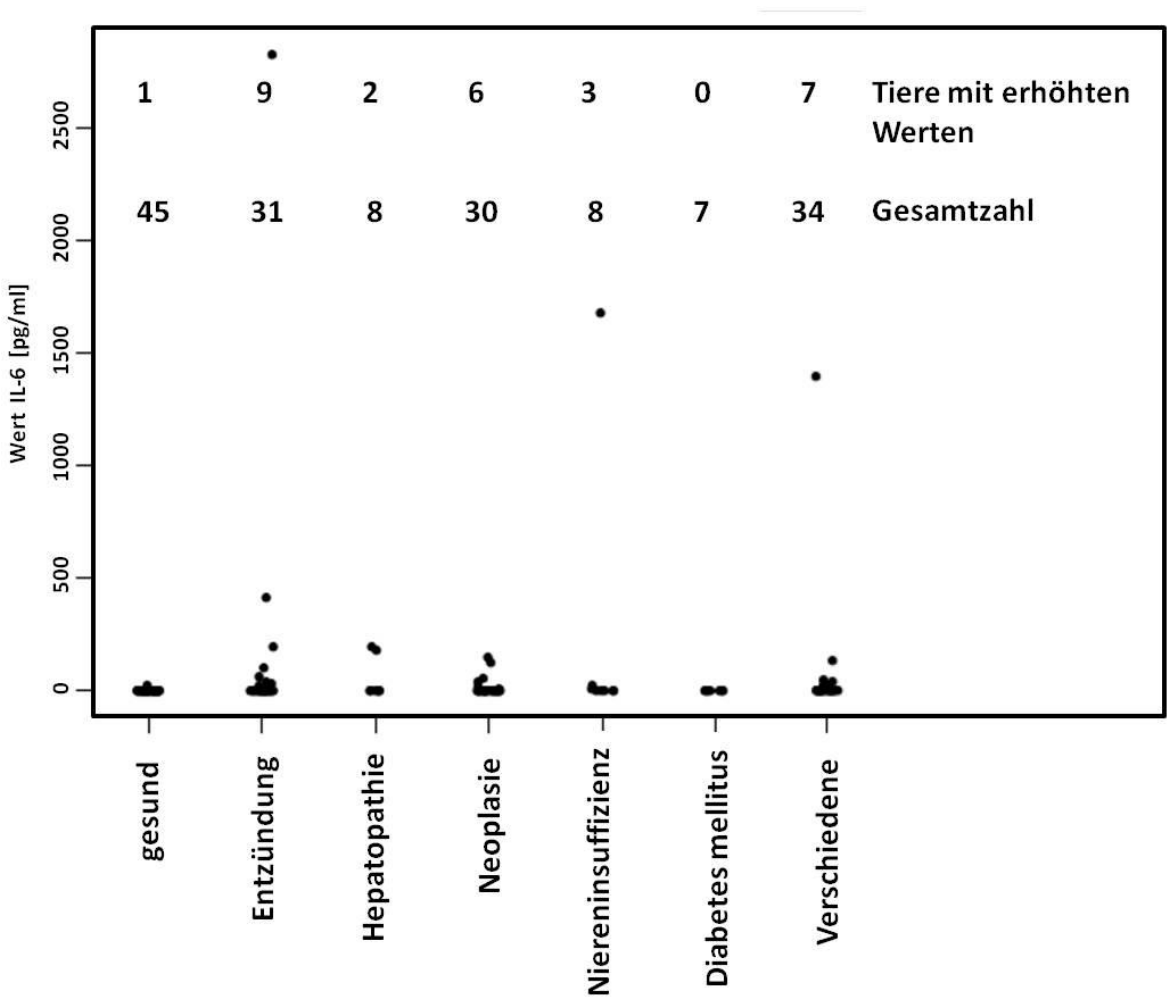

Abbildung 8: IL6-Werte in Abhängigkeit von der Diagnose

4.1.7.1 IL-6 Konzentration bei entzündlichen Erkrankungen

Bei 31 Hunden wurde eine Entzündung diagnostiziert. 8 Hunde (25,8 %) litten an einer chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, 6 (19,4 %) an einer Pyometra, 4 Hunde (12,9 %) waren an einer Pankreatitis erkrankt, 2 Hunde litten an einer Enteritis, 2 weitere an einer durch Blasensteine verursachten Harnwegsentzündung. Bei 2 Hunden wurde eine Aspirationspneumonie diagnostiziert. Je ein Hund litt an einer Peritonitis nach Fremdkörper bedingter Perforation des Darms, an einem Prostataabszess, an einer ulzerativen Gastritis, an einer Wundheilungsstörung nach Ovariohysterektomie bei Pyometra sowie an einer rezidivierenden Tonsilitis oder an einer eitrigen Zahnwurzelentzündung. Bei einem Hund lag eine Osteomyelitis vor.

Bei insgesamt 9 Hunden (29 %) mit entzündlichen Erkrankungen konnte IL-6 gemessen werden. Bei 7 Hunden (22,6 %) lag der IL-6-Serumspiegel oberhalb des kleinsten Standards von 31,25 pg/ml. Die Untergruppe mit den am häufigsten erhöhten IL-6-Werten waren Hunde mit Pyometra (n = 3, 50 %). In der Gruppe der an Pankreatitis leidenden Hunde wurde bei einem von 4 Hunden eine messbare IL-6-Konzentration von 412 pg/ml festgestellt. Weiterhin konnten bei dem Hund mit Peritonitis (29 pg/ml), dem Hund mit der ulzerativen Gastritis (41 pg/ml), dem Hund mit der rezidivierenden Tonsilitis (197 pg/ml), dem Hund mit Prostataabszess (26 pg/ml) und einem der Hunde mit Aspirationspneumonie (2828 pg/ml) messbare IL-6-Serumkonzentrationen festgestellt werden. Keiner der Hunde mit IBD hatte eine IL-6-Konzentration innerhalb des Nachweisbereichs (s. Anhang Tabelle 6).

4.1.7.2 IL-6-Konzentrationen bei neoplastischen Erkrankungen

30 untersuchte Hunde (25,4 %) hatten eine neoplastische Erkrankung. Solide Tumoren lagen bei 23 Hunden vor, die sieben anderen Erkrankungen waren hämatopoetischen Ursprungs. Die am häufigsten gestellten Diagnosen mit jeweils 5 betroffenen Tieren (4,2 %) waren die des malignen Lymphoms und die des Mammatumors. 3 Hunde litten an Mastozytomen unterschiedlicher Grade, 3 an einem Hämangiosarkom der Milz, jeweils 2 Hunde an einem nicht weiter

differenzierten Lungentumor und an einer Leukämie. Es waren zwei Hunde mit Sarkomen vertreten, davon ein Rhabdomyosarkom und ein niedrig differenziertes Sarkom der Milz. Bei 2 Hunden wurde post mortem ein Übergangsepithelkarzinom der Urethra festgestellt. Jeweils ein Hund hatte ein Gallengangskarzinom, ein Hämangioperizytom, ein Herzbasistumor, ein Leydig-Zelltumor und ein Inselzellkarzinom des Pankreas.

6 von 30 Hunden mit neoplastischen Erkrankungen hatten nachweisbare IL-6-Serumkonzentrationen. Diese lagen in einem Bereich von 7 bis 127 pg/ml und waren in allen Fällen bei den soliden Tumoren zu finden. 2 der 6 Hunde mit messbaren IL-6-Serumkonzentrationen hatten ein komplexes Adenokazinom der Mamma (55 pg/ml und 127 pg/ml). Die restlichen 4 verteilten sich auf ein Mastozytom des Grades II bis III (7 pg/ml), ein Hämangiosarkom der Milz (13 pg/ml), einen Herzbasistumor (24 pg/ml) sowie ein Übergangsepithelkarzinom der Urethra (36 pg/ml) (s. Anhang Tabelle 6).

4.1.7.3 IL-6-Konzentrationen bei Hepatopathien

8 der 118 Studienhunde (6,8 %) litten an einer Hepatopathie. Eine Leberdegeneration konnte bei 7 Hunden diagnostiziert werden. 2 dieser Hunde hatten zusätzlich eine geringgradige Hepatitis. Chronische Hepatitis als Hauptdiagnose wurde bei einem weiteren Hund befundet. Messbare IL-6-Serumkonzentrationen von 182 pg/ml und 194 pg/ml fanden sich bei 2 Hunden mit Leberzelldegeneration (s. Anhang Tabelle 5).

4.1.7.4 IL-6-Konzentrationen bei Niereninsuffizienz

Die Niereninsuffizienz war bei 6,8 % der Studienteilnehmer (n = 8) der Grund der Behandlung in der Tierklinik. Bei 3 von 8 Hunden konnten IL-6-Serumkonzentrationen im messbaren Bereich gefunden werden. Die

Konzentrationen lagen zwischen 8 und 1680 pg/ml. Alle 3 Hunde litten an einer akuten Episode der Erkrankung (s. Anhang Tabelle 5).

4.1.7.5 IL-6-Konzentration bei Diabetes mellitus

Bei 7 Hunden wurde ein Diabetes mellitus diagnostiziert. 2 Hunde hatten kein Insulin erhalten, 4 Hunde befanden sich in der Phase der Insulineinstellung, 1 Hund war auf Insulin eingestellt. Bei keinem dieser Hunde konnte eine messbare IL-6-Serumkonzentration festgestellt werden (s. Anhang Tabelle 5).

4.1.7.6 IL-6-Konzentration anderer Erkrankungen

34 Hunde und damit 28,8 % der gesamten Studienpopulation hatten eine Erkrankung, die sich keiner der oben genannten Gruppen zuordnen ließ und deren Gruppengröße aus 3 und weniger Hunden bestand. 6 dieser Hunde hatten eine messbare IL-6-Serumkonzentration. Ein Hund litt unter einer Caninen Ceroid Lipofuszinose mit einer IL-6-Serumkonzentration von 1398 pg/ml, ein weiterer litt an Fieber unbekannter Genese (130 pg/ml) und ein Hund war wegen Morbus Addison in Behandlung (50 pg/ml). Die Diagnose einer benignen Milzhyperplasie konnte aufgrund der histopathologischen Untersuchung bei einem Hund gestellt werden (42 pg/ml), bei einem Hund mit Krampfanfällen im Rahmen einer idiopathischen Epilepsie konnte eine Konzentration von 21 pg/ml gemessen werden. Eine Serumkonzentration von 19 pg/ml wurde bei einem Hund mit Sialozele gemessen (s. Anhang Tabelle 6).

4.1.7.7 Perioperative IL-6-Konzentration

Bei 11 Hunden wurde perioperativ IL-6 bestimmt. Die Blutabnahmen erfolgten jeweils direkt vor der Operation, direkt nach der Operation, 2 Stunden nach der Extubation sowie entweder 4 oder 24 Stunden postoperativ (s. Anhang Tabelle 11).

Bei den Hunden handelte es sich um 7 Hündinnen, bei denen aus Gründen der Fertilitätskontrolle eine Ovarhysterektomie durchgeführt wurde. Eine weitere Hündin wurde wegen einer Pyometra ebenfalls ovarhysterektomiert. Drei weitere Eingriffe verteilten sich auf eine Splenektomie bei Zubildung an der Milz, eine Enterotomie bei Fremdkörper im Jejunum und eine Zystotomie bei Blasenstein.

Vor der perioperativen IL-6-Verlaufsuntersuchung wurden zwei Hypothesen aufgestellt. Zum einen wurde postuliert, dass ein operativer Eingriff immer mit einer gewissen entzündlichen Reaktion einhergeht, von der nicht klar ist, ob sie zu einer messbaren Veränderung des IL-6-Wertes führt. Zum anderen war davon auszugehen, dass in den Fällen, in denen bereits ein entzündlicher Prozess und damit eine messbare IL-6-Konzentration vorliegt, eine Sanierung des Entzündungsherdes zu einem Abfall der IL-6-Konzentration führen sollte.

Bei 8 der 11 Hunde konnte weder vor noch nach der Operation eine messbare IL-6-Konzentration ermittelt werden. Unter den 3 Hunden mit erhöhten IL-6-Konzentrationen befand sich eine Hündin (Patientennummer 157), die kastriert wurde, mit prä- und direkt postoperativ nicht messbaren IL-6-Serumkonzentration. 2 Stunden postoperativ lag die IL-6-Serumkonzentration bei 7 pg/ml, war aber 24 Stunden nach Extubation wieder in den nicht messbaren Bereich gefallen. Eine weitere Hündin (Patientennummer 174), bei der eine Pyometra diagnostiziert wurde, hatte direkt präoperativ einen IL-6-Wert von 28 pg/ml. Dieser fiel 24 Stunden nach Extubation auf 7 pg/ml. Bei dem dritten Hund musste eine Enterotomie durchgeführt werden (Patientennummer 166). Präoperativ war die IL-6-Konzentration ebenfalls nicht detektierbar. Innerhalb der Operation und in der Aufwachphase erbrach sich der Hund mehrmals, aspirierte und entwickelte das klinische Bild einer Aspirationspneumonie. 24 Stunden nach diesem Ereignis war eine IL-6-Serumkonzentration von 426 pg/m zu messen. Um den Verlauf weiter zu verfolgen, wurde eine Zusatzmessung nach 12 Stunden durchgeführt (in der Tabelle nicht dargestellt), welche den Abfall der Serumkonzentration in den nicht detektierbaren Bereich zeigte. Dies ging mit dem klinischen Bild eines ansonsten unauffälligen

postoperativen Heilungsverlaufes und mit abklingenden Symptomen der Aspirationspneumonie einher.

Aufgrund unserer Ergebnisse zeigt sich, dass sich die perioperative IL-6-Serumkonzentration bei unauffälligem Verlauf nicht ändert. Bei primär erhöhten Werten oder Komplikationen spiegelten die Folgemessungen den therapeutischen Erfolg wieder.

4.2 TGF-β1

4.2.1 Ausgangsmaterial

Für die Untersuchung von TGF-β1 im Blut bei Hunden steht ein etablierter und kommerziell erhältlicher ELISA Kit zur Verfügung. Zum einen lässt sich TGF-β1 aus Blutplasma, zum anderen aus Serum bestimmen. In Analogie zu IL-6 stellt aufgrund der umgehenden und länger dauernden Prozessierung auch bei TGF-β1 die Bestimmung aus Plasma eine hohe Anforderung an die Verfügbarkeit personeller und gerätetechnischer (Kühlzentrifugen) Ressourcen dar. Die somit praxisuntaugliche Applikation wurde dennoch getestet, da bei Serum und Plasma prinzipiell mit unterschiedlichen TGF-β1-Konzentrationen zu rechnen war. Während Serum den flüssigen Anteil des Blutes nach abgeschlossener Blutgerinnung darstellt, ist in Plasma die Gerinnungskaskade noch nicht abgelaufen. Somit ist im Serum der überwiegende Teil des in der Granula der Thrombozyten enthaltenen TGF-β1 bereits freigesetzt. Für Plasma muss – basierend auf der Präparationstechnik – ein thrombozytenarmes Plasma hergestellt werden. Durch den Wegfall des Thrombozyten-TGF-β1 präsentiert dieses Ergebnis den Anteil des frei zirkulierenden TGF-β1 im Blut. Entsprechend wurde für den Vergleich aus Serum und Plasma die TGF-β1-Konzentration von 55 Hunden gemessen (34 gesunde; 21 kranke). Von den Plasmaproben ergaben nur 19 der 55 einen messbaren Wert – im Gegensatz zu den Serumproben, die sämtlich messbar waren. Die messbaren Plasmakonzentrationen fanden sich bei 11 gesunden (32 %) und 8 kranken (28 %) Hunde. Die TGF-β1-

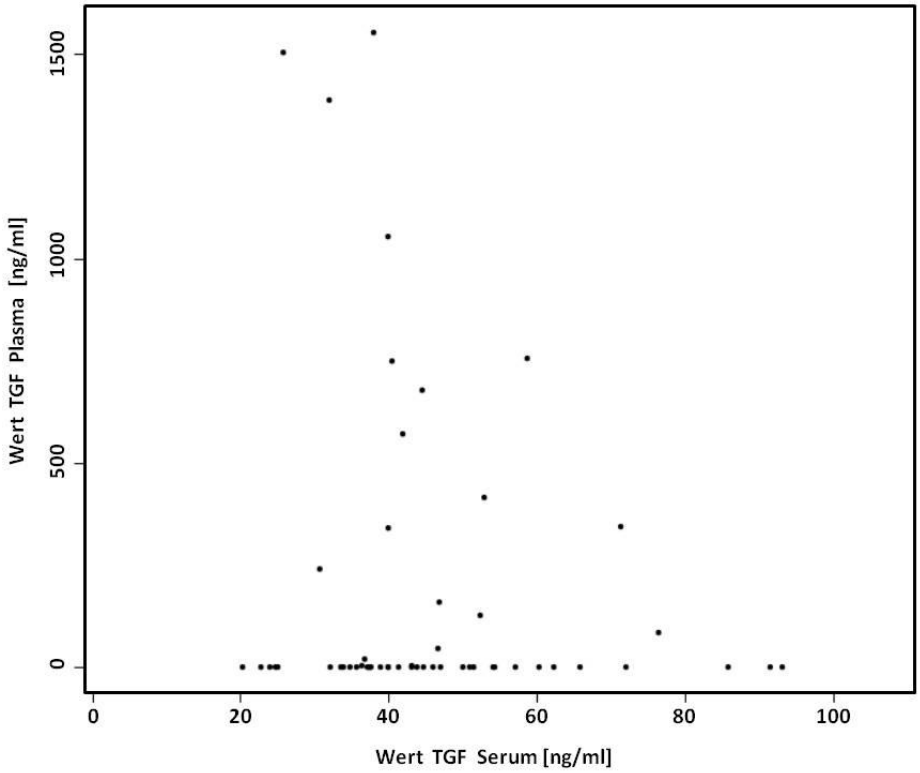

Abbildung 9: Vergleich von Serum- und Plasma-TGF-β1

Konzentration lag dabei zwischen 2 und 1555 pg/ml (Mittelwert 164 pg/ml) bzw. zwischen 2 und 1505 pg/ml (Mittelwert 213 pg/ml). Ein signifikanter Unterschied der Plasmakonzentrationen zwischen gesunden und kranken Hunden zeigte sich trotz abweichender Mittelwerte jedoch nicht (p = 0,66). Zudem zeigte sich, dass die Werte im Serum nicht mit denen im Plasma korrelieren (p = 0,83; tau = -0,02) (Abbildung 9). Die TGF-β1-Differenzierung zwischen gesunden und kranken Hunden aus Plasmaproben geht aus der Abbildung 10 hervor. Ein Vergleich aller messbaren Werte, also nach Ausschluss der nicht messbaren Werte, ist aufgrund der geringen Fallzahl statistisch nicht aussagekräftig. Insbesondere aufgrund der vielen nicht messbaren Werte, sowohl bei gesunden als auch bei kranken Hunden, war kein Unterschied zwischen gesund und krank zu erkennen. Unter Berücksichtigung der sehr zeitaufwendigen Plasmaaufbereitung, der höheren Variation des Gesamt-TGF-β1, der zahlreichen Publikationen in der Humanmedizin, die sich mit ähnlichen

Fragestellungen beschäftigten und Serum verwendeten, sowie dem Ziel des Screenings, wurden die weiteren Analysen der TGF-β1-Bestimmungen im Serum durchgeführt.

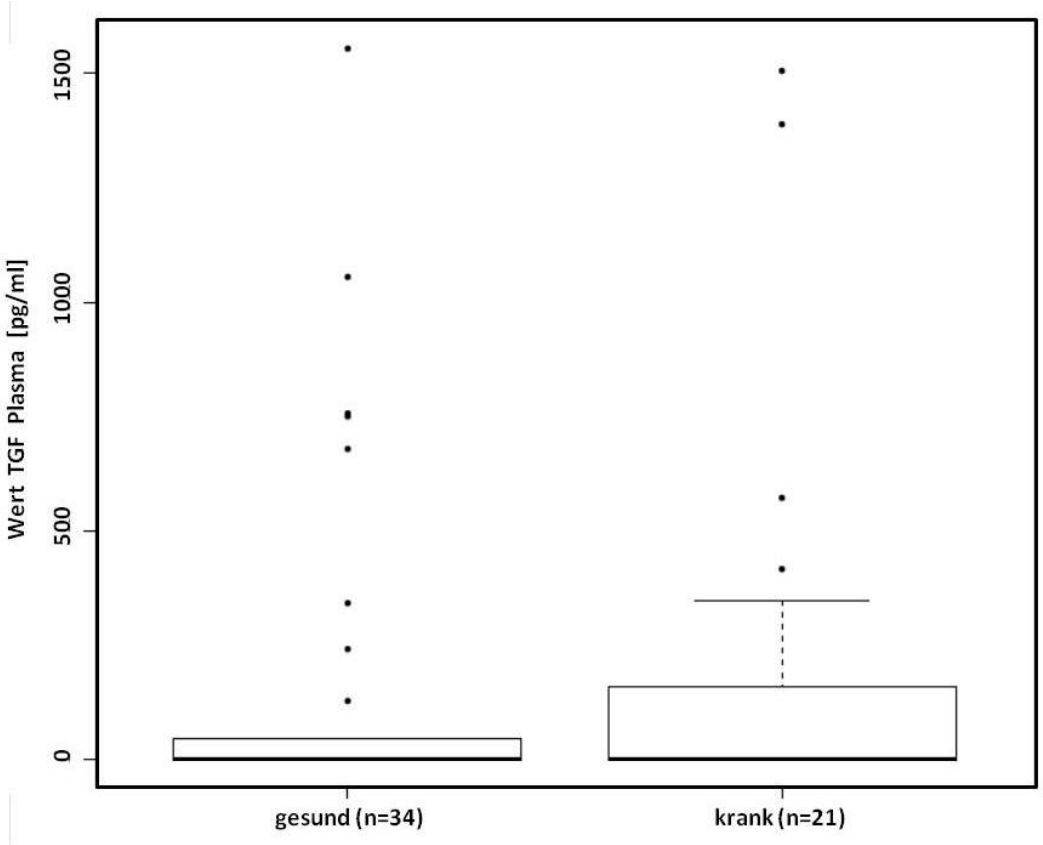

Abbildung 10: TGF-β1-Plasmakonzentrationen bei gesunden und kranken Hunden

4.2.2 Haltbarkeit

Ziel der Untersuchung war festzustellen ob es durch die Lagerung der Proben zu einer Veränderung der TGF-β1-Konzentration kommt. Hierzu wurde von 19 gesunden Hunden Blut abgenommen, welches nach Isolation des Serums für eine Wiederholung der Messung an vier aufeinander folgenden Zeitpunkten (nach 4, 6, 8 und 10 Wochen) ausreichte (Abbildung 11). Auffallend bei den Messungen war, dass die Werte nach 4 und 8 Wochen deutlich von den zuvor und anschließend erhobenen Werten abwichen. Nach Normalisierung auf den Standard des ELISA-Versuches zeigt sich jedoch kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den

unterschiedlichen Zeitpunkten. Somit war kein Effekt der Lagerung über mehrere Wochen zu sehen, wenn die Serumproben gemäß der Empfehlung des Kit-Manuals verarbeitet und bei ≤ -70°C eingelagert wurden.

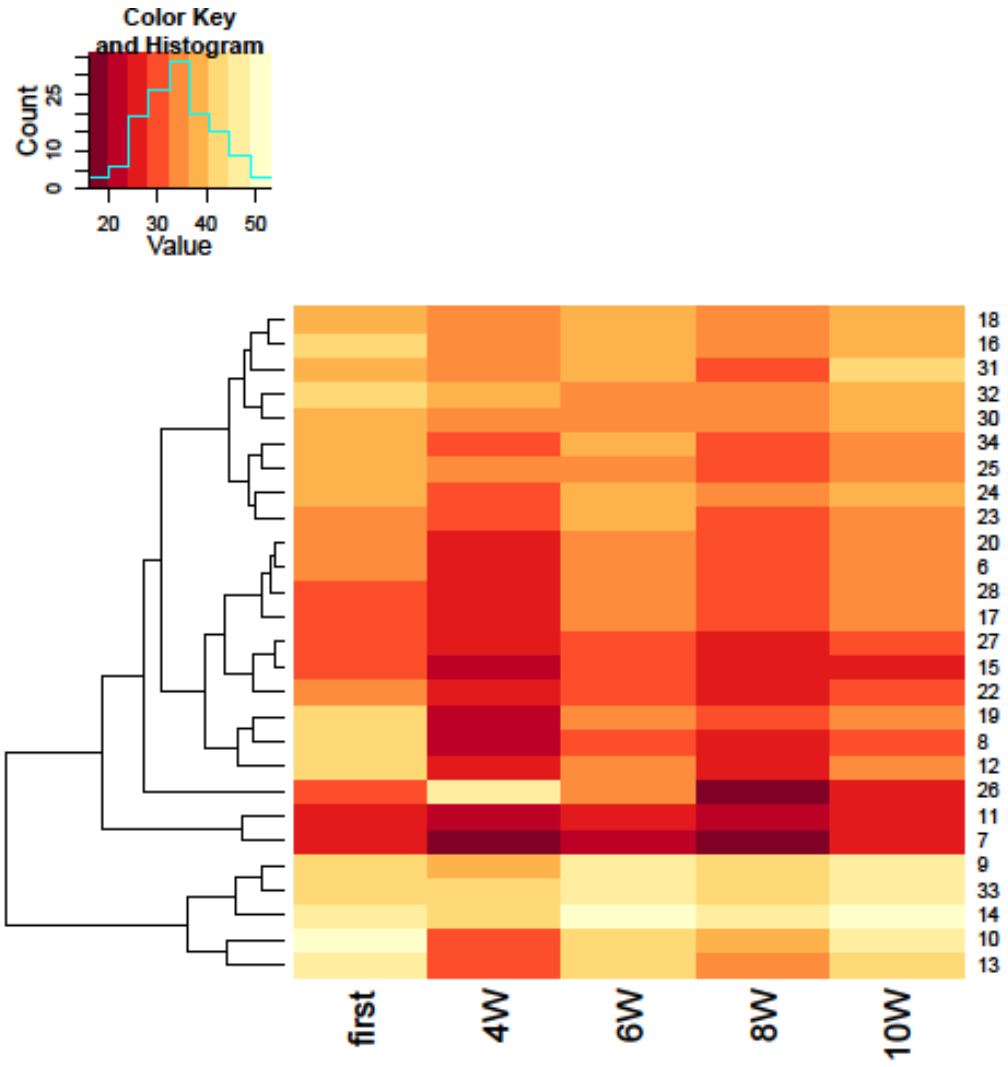

Abbildung 11: nicht normalisierte Messwerte über den Verlauf von 4, 6, 8 und 10 Wochen (W – Wochen).

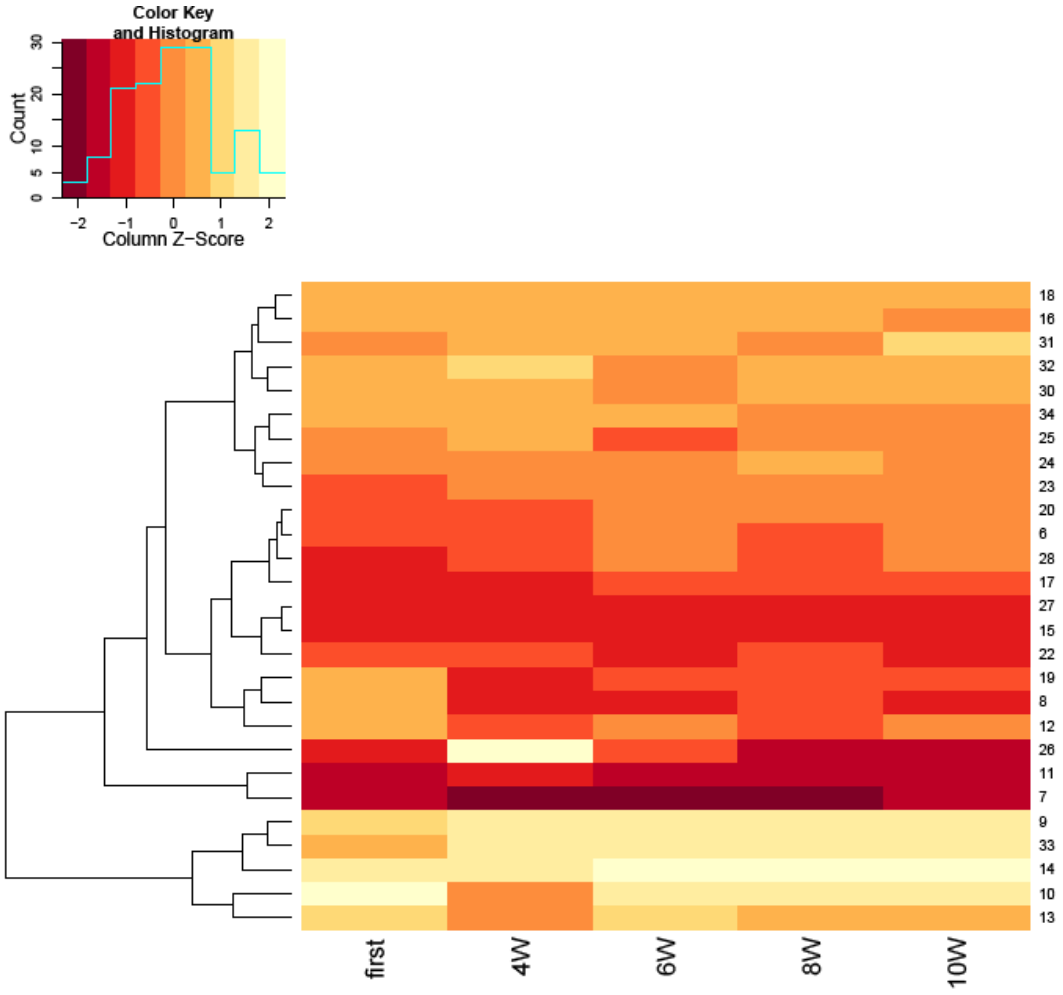

Abbildung 12: Messwerte übern den Verlauf von 4, 6, 8 und 10 Wochen (W - Wochen) nach Normalisierung auf die Eichgerade des ELISA

4.2.3 Patienten

In die TGF-β1-Untersuchung wurden insgesamt 169 Hunde aufgenommen. 67 Hunde waren aufgrund der klinischen Allgemeinuntersuchung, der Hämatologie und klinischen Chemie sowie evtl. zusätzlich durchgeführten Untersuchungen als gesund und 102 Hunde als krank eingestuft. Bei 94 Hunden (19 gesunde und 75 kranke) bei denen zuvor IL-6 gemessen wurde, konnte auch TGF-β1 bestimmt werden (s. Anhang Tabelle 12).

4.2.4 Rassenverteilung gesunder Hunde

Unter den gesunden Hunden stellten die Mischlinge mit 35,8 % (n = 24) die größte Gruppe dar. Retriever mit 16,4 % (n = 11) und Deutsche Schäferhunde bzw. Deutsche Wachtelhunde mit jeweils 5 Hunden (7,5 %) stellten weitere Gruppen dar. Terrier waren zu 6 % (n = 4) vertreten und setzen sich aus 2 Jack Russel Terriern, einem Irish Terrier und einem West Highland White Terrier zusammen. Ein Deutsch Kurzhaar, ein Deutsch Langhaar, ein Deutsch Drahthaar und ein Weimaraner bildeten die Gruppe der Vorstehhunde (6 %). Die übrigen Hunde (21,9 %, n = 14) zählten zu Rassen mit 3 oder weniger Vertretern (s. Anhang Tabelle 14).

4.2.5 Geschlechtsverteilung gesunder Hunde

55,2 % der gesunden Hunde (n = 37) waren Hündinnen. 12 (32,4 %) davon waren kastriert, die restlichen 25 Tiere (67,6 %) waren intakt. Rüden machten einen Anteil von 44,8 % (n = 30) aus und waren zu 2/3 intakt (66,7 %; n = 20). Die übrigen waren kastriert worden (33,3 %, n = 10) (s. Anhang Tabelle 13).

4.2.6 Altersverteilung gesunder Hunde

Junge Hunde mit einem Alter unter 4 Jahren stellten die zahlenmäßig stärkste Gruppe mit 43 von 67 Tieren (64,2 %) dar. Mit zunehmendem Alter wurden die Gruppen kleiner. In der Gruppe der mittelalten Hunde zwischen 4 und 7 Jahren befanden sich 12 Hunde (17,9 %). 9 Tiere (13,4 %) bildeten die Gruppe der alten Hunde mit einem Alter zwischen 8 und 11 Jahren. Die sehr alten Hunde mit über 11 Jahren waren nur noch mit 3 Tieren (4,5 %) vertreten (s. Anhang Tabelle 13).

4.2.7 Rassenverteilung kranker Hunde

Mit 29 Hunden (28,4 %) hatten Mischlinge den größten Anteil an den kranken Tieren (n = 102). Ihnen folgten die Terrier mit insgesamt 18 Hunden (17,6 %), die im

einzelnen 6 West Highland White Terrier, 3 Jack Russel Terrier, 2 Deutsche Jagdterrier, 2 Yorkshire Terrier sowie jeweils einen Airedale Terrier, einen Kerry Blue Terrier, einen Norwich Terrier, einen Scottish Terrier und einen Tibet Terrier beinhalteten. Mit jeweils 8 Tieren (7,8 %) waren die Teckel und die Retriever sowie die Deutschen Schäferhunde mit 7 Hunden (6,9 %) am dritt- bzw. vierthäufigsten vertreten. In der Folge fanden sich Vorstehhunde (6,8 %, n = 6) und Hütehunde (3,9 %, n = 4) (s. Anhang Tabelle 13). Die weiteren Rassen wiesen nur 3 oder weniger Vertreter auf (s. Anhang Tabelle 15).

4.2.8 Geschlechtsverteilung der kranken Hunde

Die Studienpopulation setzte sich aus 57 männlichen Tieren (55,9 %) und 45 weiblichen Tieren (44,1 %) zusammen. Von den Rüden waren 19 Tiere (33,3 %) kastriert, die restlichen 38 Hunde (66,7 %) waren fertil. Bei den Hündinnen waren 64,4 % (n = 29) intakt, 35,6 % (n = 16) waren kastriert (s. Anhang Tabelle 13).

4.2.9 Altersverteilung der kranken Hunde

Das Alter der kranken Hunde bewegte sich zwischen 13 Monaten und 17,5 Jahren. Der Altersdurchschnitt betrug 9 Jahre und 5 Monate. Am häufigsten waren Hunde im Alter von 8 bis 11 Jahren (41,2 %, n = 42) vertreten. Hunde mit einem Alter von über 11 Jahren kamen zu 32,4 % (n = 33) vor. 17 Hunde waren zwischen 4 und 7 Jahren (16,7 %) und 10 Hunde unter 4 Jahren (9,8 %) alt (s. Anhang Tabelle 13).

4.2.10 Einteilung der Erkrankungen nach Organsystemen/Themenkomplexen

Die Einteilung der Erkrankungen in Themenkomplexe fand nach ätiologischen Gesichtspunkten statt. Neoplastische Erkrankungen waren am häufigsten vertreten (n = 27; 26,5 %). Unwesentlich kleiner war die Gruppe der Hunde mit primär entzündlichen Erkrankungen (n = 23; 22,5 %). 11 Hunde (10,8 %) waren an einer

epatopathie und jeweils 7 Hunde (6,9 %) an einer Niereninsuffizienz bzw. einem Diabetes mellitus erkrankt. 6 Hunde (5,9 %) litten an einer Erkrankung, die mit einer Fibrose einherging. 21 weitere Hunde (20,6 %) konnten keiner der oben genannten Gruppe zugeordnet werden und wurden deshalb unter „Verschiedene“ zusammen aufgeführt.

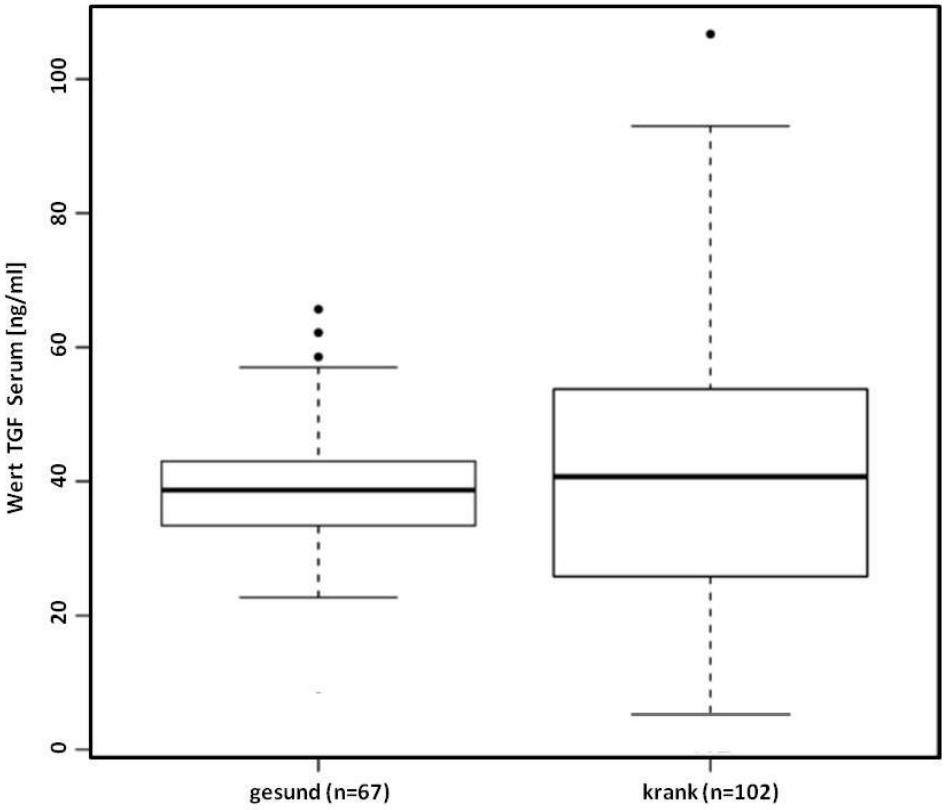

Abbildung 13: Vergleich der TGF-β1-Serumkonzentrationen zwischen gesunden und kranken Hunden.

Hier fanden sich z. B. ein Hund mit hochgradig nekrotischem Milzgewebe sowie ein Hund bei dem sich in Leber und abdominalem Gekröse Nekrosen mit dystrophischen Verkalkungen fanden. Alle diese Veränderungen waren aus Sicht des Pathologen mit einem Trauma in Einklang zu bringen.

4.2.11 Messwerte TGF-β1

Aufgrund der Ergebnisse aus dem Vergleich von Serum und Plasma wurden alle weiteren Messungen im Serum durchgeführt. Entsprechend konnten bei den 67 gesunden Hunden der Vergleichsgruppe TGF-β1-Serumkonzentrationen von 7,8 ng/ml bis 65,7 ng/ml gemessen werden. Der Mittelwert lag bei 38,8 ng/ml, die Standardabweichung bei 9,75 ng/ml. Entsprechend wurde der Normalbereich bei Werten zwischen 29,1 ng/ml und 48,6 ng/ml angesehen (Mittelwert +/- Standardabweichung). Bei den 102 erkrankten Hunden wurden Werte zwischen 3,1 ng/ml und 106,7 ng/ml gemessen (Abbildung 12). Der Mittelwert lag hier bei 43,1 ng/ml. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Populationen fand sich nicht (p =0,46).

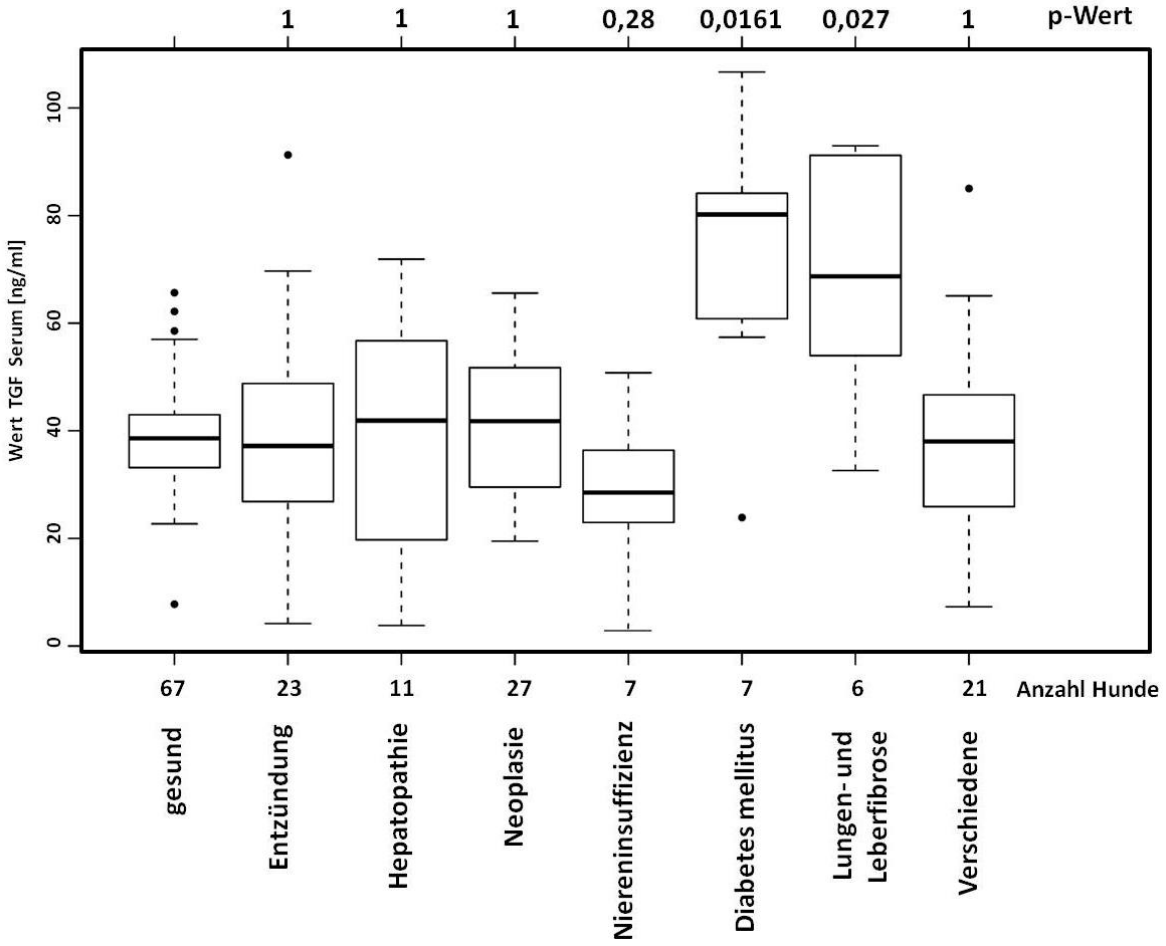

Abbildung 14: TGF-Werte in Abhängigkeit der Erkrankungen; Testung auf Unabhängigkeit der einzelnen Erkrankungen.

Für die TGF-Konzentrationen in Abhängigkeit von der zugrunde liegenden Erkrankung zeigte sich für Entzündungen, Hepatopathien, Neoplasien und Niereninsuffizienz kein signifikanter Unterschied. Für Hunde mit Diabetes mellitus ($p = 0,016$) oder einer Lungen- bzw. Leberfibrose ($p = 0,027$) zeigte sich jedoch eine signifikant höhere TGF-β1-Konzentration im Serum. Dieser Unterschied ist insbesondere im Hinblick auf die kleinen Fallzahlen der Gruppen sowie durch die Korrektur auf multiples Testen als relevant anzusehen (Abbildung 13). Letzteres ist aufgrund der Vielzahl von Gruppen nötig, um die Wahrscheinlichkeit abzubilden, dass allein durch Zufall ein signifikantes Ergebnis auftritt. Hierbei wird der p-Wert durch die Anzahl der Gruppen bzw. der Analysen geteilt und bedarf eines von vorne herein kleineren p-Wertes, um nach der Korrektur signifikant zu bleiben.

Auf eine Korrelation zwischen TGF-β1 und sämtlichen ebenfalls gemessenen Laborparametern wurde absichtlich verzichtet, um dem Problem des multiplen Testens zu entgehen. Einzige Ausnahme war die Konzentration der Thrombozyten von denen bekannt ist, dass sie TGF-β1 transportieren, welches im Rahmen der Gerinnungskaskade freigesetzt wird. Interessanterweise zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen der TGF-β1- und der Thrombozytenzahl ($p < 0,00001$). Ebenfalls signifikant korreliert zeigt sich die Zahl der Thrombozyten mit Lungen- und Leberfibrosen ($p = 0,0144$) bzw. mit Diabetes mellitus ($p = 0,0133$).

4.2.11.1 TGF-β1 und neoplastische Erkrankungen

Bei 27 Hunden (26,5 %) wurde eine neoplastische Erkrankung diagnostiziert. Bei 4 Fällen wurde die Diagnose eines Mammatumors gestellt, wobei drei Tumoren histopathologisch untersucht und als Adenokarzinom identifiziert wurden. Je 3 Hunde (11,1 %) wurden aufgrund eines malignen Lymphoms, eines Hämangiosarkoms in der Milz oder eines Lebertumors in der Tierklinik des Tierärztlichen Institutes der Universität Göttingen vorgestellt. Bei einem Hund mit Lebertumor konnte im Rahmen einer Probelaparatomie eine Leberbiopsie gewonnen werden. Die anschließende histopathologische Untersuchung ergab das Vorliegen eines hepatozellulären Karzinoms. Bei 2 Hunden (7,4 %) wurde eine Leukämie diagnostiziert, ein Hund mit

myeloischer Form und einer mit lymphatischer Form. Ein Mastozytom Grad II und ein Mastozytom Grad II-III wurde bei 2 weiteren Hunden (7,4%) befundet. Bei 2 Rüden wurden Tumoren der Keimdrüsen operativ entfernt, zum einen ein Seminom, zum anderen ein Leydig-Zelltumor. Zwei weitere Hunde wiesen je ein Rhabdomyosarkom bzw. histiozytäres Sarkom auf. Jeweils ein Hund (3,7 %) hatte ein Übergangsepithelkarzinom der Urethra, ein Gallengangskarzinom, ein Hämangioperizytom und ein Adenokarzinom im Colon. Bei 2 weiteren Hunden wurde der Tumorbefund aufgrund der Tumorlokalisation nicht weiter differenziert. Dabei handelte es sich um einen sonographisch festgestellten Herzbasistumor und einen computertomographisch diagnostizierten Hirntumor.

Die TGF-β1-Serumkonzentrationen der Hunde mit neoplastischen Erkrankungen lagen zwischen 19,5 ng/ml und 65,6 ng/ml. Der Mittelwert von 41,4 ng/ml lag deutlich über dem Mittelwert gesunder Hunde. Wenngleich sich die Gesamtgruppe neoplastischer Erkrankungen nicht signifikant von den gesunden Patienten unterscheidet, so zeigten mehrere Tumore eine deutliche Erhöhung. So zeigten alle drei Lebertumore massiv erhöhte TGF-β1-Werte (52,5 – 64,2 ng/ml). Uneinheitlich mit zum Teil deutlich erhöhten Werten zeigten sich Mammatumore, Sarkome sowie Mastozytome. Der höchste Wert fand sich bei einem Hund mit Herzbasistumor. Auffallend niedrige Werte (niedriger als eine Standardabweichung gesunder Hunde) boten 2 der 3 Hunde mit Hämangiosarkom der Milz sowie die Hunde mit Hirntumor, Seminom bzw. Übergangsepithelkarzinom (s. Anhang Tabelle 12).

4.2.11.2 TGF-β1 und entzündliche Erkrankungen

Insgesamt 23 Hunde (22,5 %) hatten eine entzündliche Erkrankung. Die häufigste Erkrankung waren in dieser Gruppe die entzündlichen Darmerkrankungen (n = 7, 30,4 %). Fünf Hunde (21,7 %) hatten die Diagnose einer Pankreatitis. Drei Hunde (13 %) waren an einer Pyometra erkrankt. In diese Gruppe wurde weiterhin ein Hund mit Aspirationspneumonie, einer mit hochgradig akuter Enteritis sowie einer mit Peritonitis nach Darmperforation aufgenommen. Auch ein Hund mit Osteomyelitis,

einer mit Tracheitis/Bronchitis, einer mit rezidivierender Dermatitis des Skrotums sowie einer mit eitriger Zahnwurzelentzündung und einer mit Wundheilungsstörung nach Ovarhysterektomie bei Pyometra gehörten in die Gruppe der entzündlichen Erkrankungen.

Tabelle 5: TGF-β1-Konzentrationen [ng/ml] bei Hunden mit entzündlichen Erkrankungen im Serum

Patient	**Diagnose**	**TGF-β1**
51	IBD - lymphoplasmazelluläre Gastritis und Jejunitis	16,3
65	IBD - eosinophile und lymphoplasmazelluläre Enteritis	24,0
74	IBD - lymphoplasmazelluläre und follikuläre Gastritis	29,5
92	IBD - protein-loosing-enteropathy	31,9
112	IBD - lymphoplasmazelluläre Enteritis	66,5
114	IBD - lymphoplasmazelluläre Enteritis	55,4
124	IBD - eosinophile Enteritis	55,5
72	Pankreatitis	28,3
76	Pankreatitis	38,3
82	Pankreatitis	37,4
96	Pankreatitis	49,3
214	Pankreatitis	91,3
46	Pyometra	22,0
50	Pyometra	4,2
251	Pyometra	37,2
42	Osteomyelitis	25,4
56	Zahnwurzelentzündung	36,5
63	Aspirationspneumonie	24,2

73	Wundheilungsstörung	69,7
89	Peritonitis	48,3
106	Enteritis	37,9
228	Dermatitis	46,9
246	Tracheitis/Bronchitis	36,3

Die ermittelten TGF-β1-Serumkonzentrationen der Hunde mit entzündlichen Erkrankungen lagen zwischen 4,2 ng/ml und 91,3 ng/ml. Der Mittelwert lag bei 39,7 ng/ml. Angelehnt an die Standardabweichung gesunder Hunde zeigte sich für den Hund mit Wundheilungsstörung eine deutliche Erhöhung, während die Hunde mit Aspirationspneumonie oder Osteomyelitis einen auffallend niedrigen Wert boten. Uneinheitlich, mit deutlich erhöhten, aber auch erniedrigten Werten zeigten sich Hunde mit IBD bzw. Pankreatitis (s. Anhang Tabelle 12).

4.2.11.3 TGF-β1 und Hepatopathien

An Hepatopathien waren 11 von 102 Hunden (10,8 %) erkrankt. Bei 9 dieser Hunde (81,8 %) wurde histopathologisch eine Leberzelldegeneration nachgewiesen. Zwei Hunde (18,2 %) litten an einer Hepatitis.

Die TGF-β1-Serumkonzentrationen der Hunde mit Hepatopathien befanden sich zwischen 3,8 ng/ml und 71,9 ng/ml. Der Mittelwert lag bei 40,8 ng/ml. Auch diese Krankheitsuntergruppe zeigte keinen signifikanten Unterschied zu gesunden Hunden.

4.2.11.4 TGF-β1 und Niereninsuffizienzen

Sieben Hunde (6,9 %) waren an einer Niereninsuffizienz erkrankt. Dabei zeigten 4 der Hunde (57,1 %) einen chronischen Krankheitsverlauf. Bei den restlichen 3 Hunden (42,9 %) lag eine akute Niereninsuffizienz vor. Die gemessenen TGF-β1-

Serumkonzentrationen liegen bei den Patienten mit Niereninsuffizienz zwischen 3,1 ng/ml und 50,8 ng/ml, der Mittelwert bei 28,7 ng/ml. Einen signifikanten Unterschied zwischen den TGF-β1-Serumkonzentrationen von gesunden und niereninsuffizienten Hunden fand sich nicht, ebenso bot sich kein deutlicher Unterschied zwischen akuter bzw. chronischer Niereninsuffizienz, wobei die Werte der 3 Patienten mit akuter Niereninsuffizienz (3,1 ng/ml, 43,2 ng/ml und 50,8 ng/ml) auffallend unterschiedlich waren (s. Anhang Tabelle 12).

4.2.11.5 TGF-β1 und Diabetes mellitus

Bei insgesamt 7 Hunden (6,9 %) lag ein Diabetes mellitus vor. 4 von 7 Hunden befanden sich in der Insulineinstellungsphase. 2 Hunde hatten zum Zeitpunkt der Bestimmung von TGF-β1 noch kein Insulin erhalten. Ein weiterer Hund war bereits eingestellt. Die ermittelten TGF-β1-Serumkonzentrationen bei Patienten mit Diabetes mellitus lagen zwischen 23,9 ng/ml und 106,7 ng/ml, der Mittelwert lag bei 71,5 ng/ml (s. Anhang Tabelle 12). Im Vergleich zu den gesunden Hunden zeigte sich hier eine signifikant erhöhte TGF-β1-Konzentration im Serum ($p = 0,016$).

4.2.11.6 TGF-β1 und Erkrankungen, die mit Fibrosen einhergehen

In dieser Gruppe wurden Hunde mit Lungen- oder Leberfibrosen zusammengefasst. Bei 4 West Highland White Terriern bestand der Verdacht einer Lungenfibrose. Die postmortale histopathologische Verifizierung erfolgte jedoch bei nur einem Hund. Insgesamt boten sie eine TGF-β1-Serumkonzentration von 32,6 ng/ml bis 91,2 ng/ml. Bei einem Deutscher Jagdterrier und einem Scottish Terrier wurde nach histopathologischer Untersuchung eine Leberfibrose diagnostiziert. Ihre TGF-β1-Serumkonzentrationen lagen bei 54,0 ng/ml und 93,0 ng/ml. Somit ergibt sich für die Fibrosen allgemein ein Mittelwert von 68,0 ng/ml (s. Anhang Tabelle 12). Im Vergleich zu der Gruppe gesunder Hunde zeigten sich die Fibrosen mit signifikant erhöhter TGF-β1-Serumkonzentrationen ($p = 0,027$).

4.2.11.7 TGF-β1 und andere Erkrankungen

21 Hunde (20,6 %) ließen sich in keine der vorgenannten Gruppen einordnen. Bei 4 Hunden wurde eine benigne Milzhyperpasie diagnostiziert. 2 Hunde dieser Gruppe litten an einer Myasthenia gravis. Bei 2 anderen Hunden wurde die Diagnose einer exokrinen Pankreasinsuffizienz gestellt. Ein Hund wurde aufgrund eines Morbus Cushing, ein anderer wegen eines Morbus Addison behandelt. Die vollständige Aufzählung der Erkrankungen befindet sich im Anhang in Tabelle 16, die dabei gemessenen TGF-β1-Serumkonzentrationen sind im Anhang in Tabelle 12 aufgeführt. Auffallend hohe Werte boten sich hier bei einem Hund mit immunhämolytischer Anämie, mit Morbus Cushing und bei je einem Hund mit Lebezellnekrose bzw. Milznekrose. Niedrige Werte konnten bei Hunden mit Magendrehung, Perikarderguss, Sialozele und Anaplasmose gemessen werden. Sämtliche Diagnosen waren jedoch nur ein Mal in der Gruppe erkrankter Hunde vertreten.

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen von IL-6 und TGF-β1 beim Hund gemessen. Die zugrunde liegende Idee war die Identifikation neuer, leicht messbarer Parameter, welche im Rahmen internistischer Erkrankungen im Vergleich zu einer Gruppe gesunder Hunde verändert waren. Aufgrund der leichten Zugänglichkeit wurde daher Blut als Ausgangsmaterial herangezogen, da es im Gegensatz zu Gewebeproben wesentlich leichter zugänglich ist. Darüber hinaus werden Hunde keinem wesentlichen Risiko ausgesetzt, da eine Blutabnahme in der Regel im Rahmen der klinischen Untersuchung erfolgte.

Obwohl eine Orientierung an Ergebnissen der Humanmedizin für (Bio-)Marker bezüglich Funktion und Auftreten im Rahmen von Krankheiten möglich ist, muss für die Veterinärmedizin immer berücksichtigt werden, dass nur ein sehr geringer Teil an Krankheiten in vergleichbarer Form bei Mensch und Hund vorkommen und ihre physiologische bzw. pathophysiologische Mechanismen von einander abweichen. Krankheitsrelevante Proteine treten in beiden Spezies mit hoher Penetranz auf. Dadurch tritt jedoch das Problem auf, dass feine Unterschiede in der Codierung der Proteinstrukturen besondere Anforderungen an die Messung stellen – insbesondere bei antikörperbasierten Verfahren, wie dem hier verwendeten ELISA, welcher nicht zwangsläufig eine Kreuzreaktivität zulässt. Nichtsdestoweniger ist die Identifikation neuer Marker in der Veterinärmedizin eine dringende Notwendigkeit, um Krankheitsausprägungen, Therapieindikationen oder Verläufe zu untersuchen. Darüber hinaus ermöglicht das Verständnis von biologischen Zusammenhängen die Entwicklung neuer Therapieansätze.

Die Wahl canines IL-6 bzw. TGF-β1 zu messen, lag zum einen in deren breitem Wirkspektrum begründet. Zum anderen waren aber für beide Zytokine kommerzielle ELISA-Kits erhältlich. Das konkrete Ziel der Arbeit war nach Etablierung eines praxisnahen Testverfahrens die Erstellung von Normwerten. Ein Referenzbereich bei gesunden Tieren für die zu untersuchenden Parameter war bisher für Hunde nicht aufgestellt worden. In einem zweiten Schritt wurden dann zahlreiche Hunde mit den unterschiedlichsten Erkrankungen untersucht. Das zugrunde liegende Kollektiv

wurde dabei aus dem Patientenklientel der Kleintierklinik des Tierärztlichen Instituts der Universität Göttingen rekrutiert. Basierend auf einem möglichst breiten Spektrum unterschiedlicher Erkrankungen sollte eine Einschätzung darüber gewonnen werden, bei welchen caninen Erkrankungen IL-6 bzw. TGF-β1 eine Rolle spielen könnten. Problematisch dabei war, dass gemäß der Suchkriterien zum einen sehr unterschiedliche Stadien an Erkrankungen zusammengefasst wurden, zum anderen Tiere untersucht wurden, die sich bereits in einer Behandlung befanden. Diese Faktoren konnten zwar bei der Auswertung berücksichtigt werden, brachten aber eine Reduktion der Fallzahlen mit sich. Ein weiteres Problem dieses Screeningansatzes war, dass die Tiere öfter zwei oder mehr Diagnosen aufwiesen. Wenngleich eine Diagnose im Vordergrund stand und als Hauptdiagnose definiert wurde, so ist die Bedeutung der Nebendiagnosen für die Auswirkung auf die Messparameter nicht sicher zu klären.

Entsprechend ihres unterschiedlichen Charakters werden im Folgenden die Zytokine IL-6 und TGF-β1 getrennt diskutiert. Wenngleich für beide zwar wiederholt ein funktioneller Zusammenhang beschrieben wurde, so war aufgrund der o. g. Einflüsse auf das Kollektiv eine entsprechende Korrelation nicht möglich.

5.1 IL-6

5.1.1 Haltbarkeit

Grundvoraussetzung für die Untersuchung von Biomarkern, sowohl in der Implementierungsphase als auch in einer möglichen Anwendungsphase, ist deren Haltbarkeit. Entsprechend war das Ziel für IL-6, die Messungen in möglichst großen Gruppen durchzuführen, um mögliche methodische Unterschiede (Batch-Effekte) klein zu halten. Gemäß dem Manual des Herstellers ist IL-6, das aus Serum gewonnen wurde, bei -20°C über einen längeren Zeitraum haltbar. Für Plasmaproben aus der Humanmedizin konnten SANDBERG und BORGSTROM (2002) nachweisen, dass sogar eine Lagerung für bis zu sechs Monaten bei -20°C möglich ist. Um dies vorab zu kontrollieren, sollten Proben gesammelt und bis zu 10

Wochen aufbewahrt werden. In der Ausgangsmessung zeigten sich dann keine positiven Werte, sodass lediglich eine Kontrollmessung nach Ablauf der 10 Wochen durchgeführt wurde. Auch hier zeigten sich alle Werte unterhalb der Nachweisgrenze, sodass ein unspezifischer Anstieg über die Lagerungszeit ausgeschlossen werden konnte.

Einschränkend ist für diesen Versuch natürlich anzumerken, dass eine mögliche Veränderung bzw. der Abbau von IL-6 über die Zeit nicht untersucht wurde. Aufgrund des Versuchsaufbaus ist diese Untersuchung jedoch auch nur schwer durchführbar, da lediglich 1/5 aller kranken Hunde ein nachweisbares IL-6 besitzen (s. u.). Dies bedeutet, dass entweder diese Messungen jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten wiederholt oder all jene Hunde zum gleichen Zeitpunkt einbestellt werden müssen. Diese Vorgehensweisen sind jedoch sehr praxisfern, da der erstgenannte Versuchsaufbau die Gefahr des methodischen Fehlers beinhaltet (aus diesem Grund wurde der Lagerungsversuch überhaupt auch nur durchgeführt) und der zweite Versuchsaufbau nur schwer und kostenintensiv durchzuführen wäre. Erschwerend kommt hinzu, dass Tiere, die ein erhöhtes IL-6 hatten, häufig einen schlechten bis kritischen Allgemeinzustand aufwiesen. Da die weiteren Analysen ergaben, dass nur erkrankte Tiere ein erhöhtes IL-6 aufwiesen (s. u.), wurde auf eine Wiederholung des Versuches verzichtet, die Möglichkeit eines zu geringen Wertes nach Lagerung aber berücksichtigt.

5.1.2 Referenzwerte

Zur Berechnung des Referenzbereichs für IL-6 führten wir die Messung an 45 gesunden Hunden durch. Nur bei einem Hund fand sich eine erhöhte IL-6-Serumkonzentration von 27 pg/ml. Dieser Wert lag noch unterhalb des kleinsten Standards von 31,25 pg/ml des verwendeten ELISAs und bringt somit eine gewisse Ungenauigkeit mit sich. Bei diesem Hund handelte es sich um einen nach Allgemeinuntersuchung und präoperativem Blutbild gesunden jungen Hund, der kastriert werden sollte. Auch wenn der WBC und das CRP bei diesem Hund

normwertig waren, war eine zugrunde liegende Pathologie nicht auszuschließen. Entsprechend wurde der Hund über den Verlauf dieser Arbeit nachbeobachtet, eine entsprechende Erkrankung war jedoch klinisch nicht festzustellen. Eine Kontrolle des Blutes im Verlauf war leider nicht möglich, sodass – wenngleich selten – eine IL-6-Erhöhung möglich zu sein scheint, ohne dass sich eine konkrete Krankheit manifestiert. Aufgrund des Pathomechanismus wäre hier sicherlich in erster Linie an einen stressbedingten IL-6-Anstieg zu denken. Da somit bei gesunden Tieren – im Gegensatz zu den in der Folge gemessenen kranken Tieren - kein IL-6 nachweisbar war, wurde eine Erhöhung von IL-6 als pathologisch angesehen. Untersuchungen von caninen IL-6 im Serum eines größeren Kollektivs wurden bisher nicht veröffentlicht. Zwar liegen Untersuchungen vor, die sich mit IL-6 im Zusammenhang mit pathologischen Zuständen befassten, hier wurden jedoch nur vergleichende Analysen mit sehr kleinen Gruppen gesunder Hunde durchgeführt. Eine entsprechende Veröffentlichung dieser Werte wurde allerdings, vermutlich wegen der geringen Fallzahlen, bisher unterlassen. Insgesamt sind die nicht messbaren IL-6-Serumwerte jedoch nicht überraschend, da sehr niedrige Ergebnisse bereits aus der Humanmedizin bekannt sind. YOUNG et al. (1999) untersuchten das Serum von insgesamt 376 gesunden Männern und 359 gesunden Frauen im Alter zwischen 17 und 69 Jahren. Die IL-6-Serumspiegel lagen hier bei den Männern zwischen nicht detektierbar und 41,4 pg/ml und bei den Frauen zwischen nicht detektierbar und 48,5 pg/ml. Bei etwa 60 % der Blutproben der Männer und bei etwa 65 % der Blutproben der Frauen lag die zu messende IL-6-Serumkonzentration unterhalb des kleinsten Standards von 2 pg/ml, sodass man sich in dieser Studie dazu entschied, in einem zweiten Schritt einige der Proben mittels eines High Sensitivity-ELISA mit einer IL-6-Nachweisgrenze von 0,1 pg/ml nachzumessen. Dabei konnten bei jeweils 67 Männern und Frauen IL-6-Serumwerte zwischen 0,52 und 11,08 pg/ml bzw. 0,43 und 20,92 pg/ml gemessen werden (YOUNG et al. 1999). Andere Autoren haben IL-6 aus dem Serum gesunder zum Vergleich mit einer Gruppe kranker Patienten gemessen. AVRAMESCU et al. (2008) erhielten für die gesunde Vergleichsgruppe eine IL-6-Serumkonzentration von unter 11 pg/ml, AKDENIZ et al. (2004) von 22,8±13 und BORAZAN et al. (2004) von 3,5±1,4 pg/ml. Alle Werte sind somit noch unter dem von

uns genutzten kleinsten Standard angesiedelt und bedürften daher für die genaue Messung eine sensitivere Methode, die jedoch für canines IL-6 im Gegensatz zum humanen („Quantikine HS Human IL-6 Immunoassay“ HS600B [Fa. R & D Systems, Minneapolis, USA]) bisher nicht angeboten wird. In Anbetracht des zu erwartenden Nutzens und des Screeningansatzes dieser Arbeit führten wir die Analysen erkrankter Patienten fort und werteten entsprechend alle nachweisbaren IL-6 Serumkonzentrationen als pathologisch.

5.1.3 IL-6-Werte bei kranken Hunden

Im Verlauf der Arbeit wurde von 118 kranken Hunden die Serumkonzentration von IL-6 bestimmt. Insgesamt fanden sich nur bei 22,9 % der Hunde ein nachweisbares IL-6. Dennoch unterschied sich die Gruppe der gesunden Hunde von der der kranken Hunde signifikant ($p < 0,001$). Entsprechend der Odds ratio war somit die Wahrscheinlichkeit, dass bei positivem IL-6-Nachweis eine internistische Erkrankung vorlag, 12,8-fach höher als die Wahrscheinlichkeit, dass der Hund gesund ist. Somit ist insgesamt das Auftreten von IL-6 als Marker für eine zugrunde liegende Erkrankung anzusehen. Dies ist insbesondere deshalb von großem Interesse, weil das Auftreten von IL-6-Erhöhungen häufig mit einem reduzierten Allgemeinzustand bzw. einer schlechten Prognose, die zur Euthanasie des Hundes führte, einherging.

Für die weiteren Untersuchungen der IL-6-Konzentrationen wurden die Krankheiten in unterschiedliche Gruppen, entsprechend ihres Auftretens und ihrer Ätiologie, zusammengefasst: entzündlich bedingte Erkrankungen, Neoplasien, Hepatopathien, Diabetes mellitus, Niereninsuffizienzen und verschiedene Erkrankungen – jene, die nur selten vorkamen und nicht entsprechend zuordenbar waren. Die damit entstandenen kleinen Fallzahlen schränkten die statistische Aussage der Daten ein. Dies wurde akzeptiert, da die Arbeit zunächst den Charakter einer Screeninguntersuchung haben sollte.

In der Gruppe der Hunde mit entzündlichen Erkrankungen wiesen 29 % aller Hunde einen messbaren IL-6-Serumspiegel auf, was der Erwartung, dass IL-6 allgemein als Entzündungsmarker angesehen werden kann, entsprach (GAULDIE et al. 1987). Unterstützung erhielt diese Hypothese für den Hund durch die Arbeit von YAMASHITA et al. (1994), die nach intramuskulärer Injektion von Terpentinöl einen dramatischen Anstieg von IL-6 mit nachfolgendem Anstieg der Akuten-Phase-Proteine CRP und saurem alpha1-Glykoprotein sowie einem Abfall des negativen Akute-Phase-Proteins Albumin verzeichnen konnten. Diese Reaktionen wurden auf lokale Entzündungen nach muskulärer Injektion zurückgeführt (YAMASHITA et al. 1994). Weiterhin gilt IL-6 auch als endogenes Pyrogen (LE MAY et al. 1990) und wird für entzündungsbegleitende Umstände wie Thrombozytose (ZEIDLER et al. 1992) und Anämie (JONGEN-LAVRENCIC et al. 1996) mitverantwortlich gemacht.

Die Gründe für die nicht messbaren IL-6-Serumspiegel bei 71 % der Hunde mit entzündlichen Erkrankungen können vielfältig sein. In erster Linie ist daran zu denken, dass der Entzündungsreiz bei diesen Hunden nicht ausreichend war, um eine mit dem verwendeten Kit messbare IL-6-Ausschüttung zu bewirken. Dies würde auch erklären, warum Hunde, die kastriert wurden, keinen IL-6-Anstieg aufwiesen. Weiterhin muss man sich fragen, ob das systemisch im Blut zirkulierende IL-6 zum Zeitpunkt der Blutabnahme eventuell schon wieder abgefallen war bzw. der akute Reiz der Entzündung bereits vorüber war.

In der weiteren Analyse des Entzündungskollektivs zeigten 3 der 6 Hündinnen mit Pyometra einen IL-6-Nachweis im Serum. Bei einer dieser Hündinnen (Patientennummer 174) wurde IL-6 prä- und postoperativ der Ovarhysterektomie bestimmt. Sie zeigte direkt vor, direkt nach und zwei Stunden nach der Operation eine IL-6-Serumkonzentration von 28 pg/ml. 24 Stunden nach der Operation war der Wert auf 7 pg/ml abgefallen. Dieser Fall unterstützt die anfangs aufgestellte Vermutung, dass die Beseitigung einer entzündlichen Komponente mit dem Abklingen einer Entzündungsreaktion und somit einem Abfall von IL-6 im Serum einhergeht. Sie zeigt auch, dass nach Entfernung des Entzündungsfokus der Abfall rasch erfolgt. Unter einem anderen Gesichtspunkt wurde der Zusammenhang von IL-

6 und Pyometra bereits von FRANSSON et al. (2007) untersucht. Hier wurde der Frage nachgegangen, mit welcher Häufigkeit die Pyometra der Hündin mit einem „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) einhergeht. Die ermittelten Werte für die Pyometra-Gruppe lagen dabei im Bereich zwischen 1,1 und 847,7 pg/ml, die der gesunden Referenzgruppe zwischen 1,9 und 458,6 pg/ml. Eine SIRS konnte in 57 % der untersuchten Fälle festgestellt werden und die unterschiedlichen Konzentrationen von IL-6 konnten gut mit einem unterschiedlich weit fortgeschrittenen Entzündungsprozess erklärt werden (FRANSSON et al. 2007). Die Unterschiede hinsichtlich der nachgewiesenen IL-6-Werte der gesunden Referenzgruppe sind möglicherweise zum einen darin zu sehen, dass Blutplasma verwendet wurde und nicht, wie in der vorliegenden Arbeit, Serum. Zum anderen ist aber sicherlich die Nachweismethode in Hybridomzelllinien anzuführen, die nicht spezifisch für IL-6 ist, sondern auch andere Zytokine erfasst und so wesentlich unspezifischere Ergebnisse erbringt.

Einen weiteren Hinweis für die Nutzbarkeit von IL-6 als Entzündungs- und Prognosemarker gibt ein Hund (Patientennummer 166), dessen IL-6-Verlauf während einer Enterotomie aufgrund eines Fremdkörpers im Jejunum bestimmt wurde. Der Hund erbrach sich mehrfach in der Aufwachphase und zeigte in der Folge röntgenologisch das Bild einer Aspirationspneumonie. Während sich IL-6 bei diesem Hund prä- und postoperativ im nicht detektierbaren Bereich befand, stieg der Wert 24 Stunden post operationem auf 426 pg/ml. Nach weiteren 12 Stunden war der Wert wieder in den nicht detektierbaren Bereich gesunken. Hier zeigt IL-6 eine mit einer Entzündungskomponente einhergehende Komplikation an, wobei der schnelle Anstieg und Abfall von IL-6 die eingangs diskutierte Begründung für den fehlenden Nachweis von IL-6 trotz Diagnose einer Entzündung untermauert. Dies konnte bereits von MIYAMOTO et al. (1996) und LEMAY et al. (1990) gezeigt werden, die einen Anstieg von IL-6 im Blut 1,5 bis 2 Stunden nach Verabreichung von Endotoxin beschrieben.

Fraglich bleibt in diesem Zusammenhang, warum eine der 7 Hündinnen, die kastriert wurden, eine detektierbare IL-6-Konzentration aufwies. Alle 7 Hündinnen waren in den Voruntersuchungen unauffällig. Die Operationsverläufe waren jeweils frei von Komplikationen. In der 2 Stunden post OP-Kontrolle zeigte die Hündin mit der Patientennummer 157 einen Anstieg von IL-6 auf 7 pg/ml, der bis zum nächsten Kontrollpunkt 4 Stunden nach Extubation wieder in den nicht detektierbaren Bereich sank. Sicherlich ist in diesem Zusammenhang wieder die Sensitivität des Kits zu diskutieren, es bleibt aber auch weiterhin die Möglichkeit, dass IL-6 im Rahmen einer postoperativen Kreislaufregulation ansteigt.

IL-6 nimmt bei der Pankreatitis ebenfalls eine Rolle als Entzündungsmarker ein. Aus der Humanmedizin ist bekannt, dass die mit der Pankreatitis einhergehende nekrotische Gewebszerstörung zur Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF-α, IL-1, IL-8 sowie IL-6 führt. (DIMAGNO u. CHARI 2002). Während bei leichten Krankheitsverläufen meist kein nachweisbarer Anstieg von IL-6 möglich ist, spricht eine messbare Konzentration für eine gewisse Schwere des Entzündungsgeschehens (FORMELA et al. 1995). Entsprechend sind die IL-6-Werte der 4 Hunde zu interpretieren, die mit der klinischen Diagnose einer Pankreatitis aufgenommen wurden. Während die Hunde ohne messbare IL-6-Konzentration eine sehr milde Form der Pankreatitis aufwiesen und keiner stationären Aufnahme bedurften bzw. in einem Fall zügig mit gutem Allgemeinbefinden wieder entlassen werden konnten, bot der vierte Hund mit einer IL-6-Konzentration von 142 pg/ml bereits bei Erstvorstellung ein mittel- bis hochgradig gestörtes Allgemeinbefinden. Trotz stationärer Aufnahme und intensiver Therapie verschlechterte sich sein Zustand innerhalb von vier Tagen derart, dass der Hund euthanasiert werden musste. Diese Untersuchungen entsprechen exemplarisch den Daten von LESER et al. (1991), RAU et al. (2007) und MAYER et al. (2000), die eine Korrelation zwischen der Höhe des IL-6-Serumspiegels und der Wahrscheinlichkeit von Komplikationen sowie einen letalen Krankheitsverlauf zeigten. Eine zukünftige Untersuchung dieses Krankenguts wird durch die Untersuchungen von PEZZILLI et al. (1995) gestärkt, die

zeigen konnten, dass IL-6, wenn es innerhalb der ersten 24 Stunden der Erkrankung gemessen wird, eine bessere Aussagekraft über die Schwere einer akuten Pankreatitis hat als das bisher dazu herangezogene CRP. LESER et al. (1991) geben IL-6 auch noch an Tag 2 den Vorzug, da sie zeigen konnten, dass der CRP-Anstieg dem Anstieg seines Initiators IL-6 mit etwa einem Tag Abstand folgt, was wiederum bei der Behandlung der akuten Pankreatitis entscheidend sein kann.

Eine dritte große Untergruppe der Entzündungen sind die entzündlichen Darmerkrankungen (IBD – inflammatory bowel disease). Auch hier sind die Daten in der Veterinärmedizin spärlich und in der Humanmedizin in Bezug auf IL-6 noch widersprüchlich. Gemeinsam haben die Untersuchungen jedoch, dass in einem therapierten, nicht aktiven bzw. chronischen Stadium der Erkrankungen die IL-6-Konzentration niedrig bzw. nicht nachweisbar ist (SUZUKI et al. 1990, UMEHARA et al. 2006, SAKUMA et al. 2007). Entsprechend lassen sich auch die nicht detektierbaren IL-6-Werte der Hunde mit IBD interpretieren. Fast alle Hunde hatten zum Zeitpunkt der Messung bereits eine Vorbehandlung mit Antibiotika (6 von 8 Hunden) oder Cortison (1 von 8 Hunden) erhalten. Hier sind weitere Untersuchungen an noch nicht therapierten Hunden nötig, um die Bedeutung von IL-6 zu klären.

Die übrigen Hunde mit erhöhten IL-6-Konzentrationen litten an Erkrankungen, die nicht anhand ihrer Ätiologie in eine Gruppe eingeordnet werden konnten. Gemeinsam war den Diagnosen (Peritonitis, ulzerative Gastritis, Tonsilitis, Prostataabszess und Aspirationspneumonie) die entzündliche Komponente. Insbesondere die hohe Konzentration von IL-6 (2828 pg/ml) bei dem Hund Nr. 191 mit Aspirationspneumonie ist hier zu beachten, der mit erhöhten Leber-, Nieren- und Pankreaswerten einherging, sodass laborchemisch von einem beginnenden Multiorganversagen im Rahmen einer Sepsis auszugehen war. Der Hund wurde im weiteren Verlauf aufgrund des sehr schlechten Allgemeinzustandes letztlich euthanasiert. Dieser Wert entspricht erneut einer IL-6-Konzentrationserhöhung im Rahmen einer Sepsis, wobei die Höhe der Konzentration in der Humanmedizin bereits als Verlaufsparameter eingesetzt wird. In der Humanmedizin wird IL-6 im

Zusammenhang mit Entzündungsgeschehen auch für eine prognostische Aussage genutzt. So korreliert IL-6 mit der Erkrankungsstärke und der Mortalität im Rahmen einer Sepsis (NASRAWAY 2003). Weiterhin zeigt IL-6 bei polytraumatisierten Patienten ein beginnendes Multiorganversagen an und korreliert mit der Mortalitätsrate solcher Patienten (FRINK et al. 2009). Auch wenn sich aus unseren Daten keine Korrelation zwischen den Serum-IL-6-Konzentrationen der Hunde mit entzündlichen Erkrankungen und der Mortalität der Hunde herstellen ließ, scheinen diese Hunde retrospektiv eine schlechtere Prognose zu haben.

Die Gruppe der Hunde mit Hepatopathien setzte sich im Wesentlichen aus Fällen mit Leberzelldegeneration (n = 7) und einer chronischen Hepatitis zusammen. Interessant in dieser Gruppe ist, dass nur die beiden Hunde mit nachweisbaren IL-6-Konzentrationen einen Ikterus mit Gesamt-Bilirubinwerten von 17,22 und 19,99 mg/dl aufwiesen. Die übrigen Hunde mit Leberschaden zeigten weder ein erhöhtes Bilirubin noch ein nachweisbares IL-6 im Serum. Ursächlich für den Anstieg von IL-6 könnte eine Endotoxämie sein, wie sie in der Humanmedizin im Vorfeld einer Cholestase auftritt (TRAUNER et al. 1999). Entsprechend lässt sich auch der IL-6 Abfall nach Drainage der Gallenblasenobstruktion erklären (KIMURA et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse konnten am Mausmodell gezeigt werden. Nach experimentellem Verschluss des Gallenganges kam es zu einer IL-6-Produktion in der Leber, jedoch ohne cholestatische Leberschädigung (SEWNATH et al. 2004). Von klinischem Interesse ist, dass sich der Hund Nr. 54 mit der höchsten IL-6 Konzentration in der Gruppe der Hepatopathien während seines stationären Aufenthalts drastisch klinisch verschlechterte und letztlich verstarb. Dies ist insbesondere von Interesse, da sich keine Korrelation mit anderen Laborparametern, insbesondere CRP zeigte.

Bereits im 19. Jahrhundert äußerte Virchow die Vermutung, dass neoplastische Erkrankungen aus einer Entzündung hervorgehen können. So zeigt sich beispielsweise beim Magenkarzinom in der Humanmedizin, dass in vielen Fällen eine Helicobacter pylori-Infektion vorausgegangen war. Auch treten bei der Colitis

ulcerosa Colonkarzinome als Folge der Entzündung auf, hepatozelluläre Karzinome entstehen auf dem Boden einer Hepatitis assoziierten Zirrhose oder das Pankreaskarzinom entwickelt sich nach einer vorausgegangenen Pankreatitis (COUSSENS u. WERB 2002). IL-6 hat, wie oben beschrieben, einen Einfluss auf Entzündungsprozesse, sodass auch ein Zusammenhang mit Neoplasien zu diskutieren ist. HONG et al. (2007) konnten zeigen, dass IL-6 bei fast jeder der bis heute untersuchten Arten von Neoplasien eine Rolle spielt. Darüber hinaus scheint IL-6 eine Bedeutung bei der Entstehung Tumor assoziierter Symptome wie Gewichtsverlust, Fieber und anderen paraneoplastischen Symptomen zu haben (KURZROCK et al. 1993). Der genaue Mechanismus ist noch unklar.

In die vorliegende Arbeit konnten 31 Hunde mit neoplastischen Erkrankungen eingeschlossen werden. 5 dieser Hunde hatten dabei entweder ein Lymphom oder eine Leukämie. Für keinen dieser Hunde konnte eine IL-6-Konzentration nachgewiesen werden, auch wenn für diese Art von Neoplasie eine Assoziation mit IL-6 in der Humanmedizin beschrieben wurde (SUGIYAMA et al. 1996, NACINOVIC-DULETIC et al. 2008). So zeigen z. B. Patienten mit diffusem großzelligem Lymphom eine erhöhte IL-6-Serumkonzentration (SEYMOUR et al. 1995, PRETI et al. 1997). Auch KURZROCK et al. (1993) haben IL-6-Serumkonzentrationen von gesunden und Non-Hodgkin-Patienten verglichen. Signifikante Unterschiede lagen hier zwischen den IL-6-Werten von erkrankten und denen von gesunden Probanden sowie zwischen den IL-6-Werten von Lymphom-Patienten mit und ohne B-Symptomatik (Trias aus Fieber, Nachtscheiß und Gewichtsverlust) vor. Anzumerken ist aber, dass die gemessenen Werte der Non-Hodgkin-Patienten mit B-Symptomen mit 25 pg/ml nur knapp über der Nachweisgrenze von 22 pg/ml lagen. Bei den gesunden Probanden und bei Non-Hodgkin-Patienten ohne B-Symptomatik waren hier keine IL-6-Konzentrationen detektierbar. In einer Folgeuntersuchung konnten dann an einem wesentlich größeren Kollektiv die Daten bestätigt werden, es wurde jedoch ein wesentlich sensitiverer ELISA verwendet, um die insgesamt nur sehr geringen Konzentrationen von IL-6 besser zu detektieren (KURZROCK 1997). Mögliche Gründe für den fehlenden Nachweis von IL-6 im Serum unserer Patienten könnten daher in der Vielfalt der unterschiedlichen Diagnosen von Leukämien und

Lymphomen liegen. Zum anderen scheinen aber die IL-6-Konzentrationen im Serum sehr gering zu sein, sodass sie möglichweise erneut durch das verwendete Testverfahren nicht aufgenommen wurden.

Zwei der sechs detektierten IL-6-Konzentrationen fanden sich bei Hündinnen mit einem Tumor in der Gesäugeleiste. Beide konnten in der Histologie als Mammakarzinome identifiziert werden. Dies ist insbesondere deshalb von großem Interesse, weil aus der Humanmedizin das Vorhandensein einer entzündlichen Umgebungsreaktion beim Mammakarzinom als prognostischer Marker herangezogen werden kann. VAN DER AUWERA et al. (2004) beispielsweise zeigten, dass Karzinome, die von einer Entzündungsreaktion begleitet werden, eine höhere Metastasierungstendenz haben. Für den Nachweis im Serum konnten BENOY et al. (2002) zeigen, dass Frauen mit metastasierten Mammatumoren etwa zehnfach höhere Serum-IL-6-Konzentrationen haben als Frauen mit Lokalrezidiven. SALGADO et al. (2003) stellten ebenfalls eine Korrelation zwischen Serum-IL-6-Konzentration und einer ungünstigen Prognose bei Patientinnen mit metastasiertem Brustkrebs auf. Für Hündinnen beschrieben KIM et al. (2010) ebenfalls eine Korrelation zwischen IL-6 und dem Vorhandensein von Metastasen.

Eine weitere Erkrankungsgruppe waren Hunde mit Diabetes mellitus, eine Entität, die in der Veterinärmedizin in Zusammenhang mit IL-6 bisher nur einmal untersucht wurde. SHORT et al. (2007) führten eine Assoziationsstudie mit single-nucleotide polymorphisms (SNP) verschiedener Gene durch, darunter auch das IL-6-Gen. Die Autoren kommen zum Schluss, dass das Auftreten einiger SNP im IL-6-Gen bei einigen Rassen eine protektive Wirkung hat, während es bei anderen Rassen das Risiko des Auftretens eines Diabetes mellitus erhöht. Somit scheint es bei den verschiedenen Rassen für Diabetes mellitus durchaus unterschiedliche pathogenetische Wege zu geben, die durch die genetische Rassenvielfalt begünstigt werden. In der Humanmedizin wird der Diabetes mellitus Typ 1, der am ehesten mit dem Diabetes beim Hund verglichen werden kann, auch als entzündliche Erkrankung der Langerhans-Inseln angesehen. Dabei kommt es durch aktivierte T-Zellen und

proinflammatorische Zytokine zur Apoptose der β-Zellen (EIZIRIK u. MANDRUP-POULSEN 2001). Nachdem man verschiedenste Aspekte der Möglichkeit eines Einflusses von IL-6 auf die Pathogenese des Diabetes mellitus untersucht hat, ist man derzeit der Meinung, dass IL-6, wenn überhaupt, nur eine Nebenrolle in der Entstehung eines Diabetes mellitus spielt (KRISTIANSEN u. MANDRUP-POULSEN 2005). In unseren eigenen Untersuchungen detektierten wir das Blut von 7 an Diabetes mellitus erkrankten Hunden auf das Vorhandensein von IL-6. Keiner der Hunde zeigte eine messbare IL-6-Serumkonzentration. Somit findet sich auch in unserer Untersuchung kein Hinweis auf eine Beteiligung von IL-6 an einem Diabetes mellitus.

Auch wenn der Unterschied zu den gesunden Hunden keine Signifikanz aufweist, zeigten sich in der Gruppe der niereninsuffizienten Hunde 3 der 8 Hunde mit einer nachweisbaren IL-6-Konzentration. Interessant hierbei war, dass alle 3 Hunde mit akuter Niereninsuffizienz IL-6 positiv waren. Zum einen könnte dies auf eine plötzlich verminderte Clearance zurückzuführen sein, wie es in der Humanmedizin bereits beschrieben wurde (PECOITS-FILHO et al. 2003, LIU et al. 2009). Zum anderen wäre aber auch hier wieder an eine entzündliche Komponente zu denken. Am Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass es beim frühen akuten Nierenschaden zu einer verstärkten renalen Produktion von IL-6 kommt (HOKE et al. 2007). In der Humanmedizin identifizierten LIU et al. (2009) IL-6 als frühen Marker eines Nierenschadens bei Kindern nach herzchirurgischen Eingriffen.

Insgesamt 31 kranke Hunde konnten keiner der bisher genannten Gruppen zugeordnet werden. Entsprechend vielfältig waren die Diagnosen. Sechs dieser Hunde zeigten eine erhöhte IL-6-Konzentration, deren Zustandekommen teilweise erklärt werden kann bzw. bereits beschrieben wurde. Ihre Bedeutung im klinischen Kontext kann jedoch nicht beurteilt werden.

Eine erhöhte IL-6-Konzentration (130 pg/ml) bei dem Hund mit Fieber unklarer Ursache ist nicht überraschend, da IL-6 widerholt als Pyrogen identifiziert werden

konnte (DINARELLO et al. 1991, CHAI et al. 1996, BOHNHORST et al. 2002). Zwei Hunde hatten einen Krampfanfall, wobei diese unterschiedliche Ätiologien aufwiesen. Der Hund mit der Patientennummer 52 litt an einer Caninen Ceroid Lipofuszinose und wies eine IL-6-Serumkonzentration von 1398 pg/ml auf. 21 pg/ml IL-6 im Serum wurden bei Hund Nr. 88 gemessen, der an einer idiopathischen Epilepsie litt. Eine Erhöhung der Serum-IL-6-Konzentration könnte hier durch die sich kontrahierende Skelettmuskulatur zustande kommen. Kontrahierende Skelettmuskulatur sezerniert IL-6 und setzt es in die Zirkulation frei (FISCHER 2006). PELTOLA et al. (2002) erklärten den Anstieg von IL-6 im Plasma nach tonisch-klonischen Krampfanfällen mit dem Auftreten einer Akuten-Phase-Reaktion. Hinweisend dafür waren nach Meinung der Autoren signifikant höhere Plasma-Fibrinogen-Konzentrationen sowie ein Anstieg des CRP, der keine Signifikanz aufwies (PELTOLA et al. 2002). Auch ein unspezifischer Ausdruck eines Aktivierungszustandes oder die zugrunde liegende Erkrankung wären natürlich zu diskutieren. Bei einem weiteren Hund war ein Morbus Addison diagnostiziert worden. Eine erhöhte IL-6-Konzentration war in diesem Zusammenhang schon einmal beschrieben worden und wurde entsprechend der Pathophysiologie der Erkrankung als Ursache der Dysregulation der Hypophysen-Hypothalamus-Nebennieren-Achse interpretiert (PAPANICOLAOU et al. 1998).

Zusammenfassend lässt sich daher sagen, dass mit dem „Quantikine Canine IL-6 Immunoassay“ CA6000 (Fa. R & D Systems, Minneapolis, USA) ein ELISA zur Verfügung steht, mit dem ein praxistaugliches Messen von IL-6 aus dem Serum von Hunden möglich ist. Problematisch für die Untersuchung gesunder Hunde und somit für die Etablierung von Normalwerten ist die fehlende Sensitivität bei niedrigen IL-6-Konzentrationen. Messungen im Bereich unter 31,25 pg/ml sind daher sehr ungenau. Assays für diesen Bereich stehen aktuell nur für humanes IL-6 zur Verfügung. Somit wurde, basierend auf einem Kollektiv von 45 gesunden Hunden, mit nur einem messbaren IL-6-Wert jeder messbare Wert als pathologisch angesehen.

Auf dieser Grundlage zeigten 22 % aller Hunde mit definierten Erkrankungen ein positives Ergebnis. Aufgrund der Abwesenheit relevanter positiver Werte in der

Gesundgruppe war der Unterschied zwischen gesunden und kranken Hunden hoch signifikant (p = 0,001). Für die Auswertung der Subgruppen einschränkend war, dass die Einteilung gemäß der unterschiedlichen Erkrankungen zu so kleinen Gruppen führte, dass sie statistisch nicht zuverlässig auszuwerten waren. Es zeigte sich aber ein deutlicher Trend zu erhöhten bzw. messbaren Werten für Hunde mit entzündlichen Erkrankungen. Eine Bestätigung der Bedeutung von IL-6 im Zusammenhang mit entzündlichen Prozessen zeigen die perioperativ erhobenen Messungen. So kam es nach Ovarhysterektomie bei Pyometra zu einem Abfall des initial deutlich erhöhten IL-6. Im Rahmen einer Aspirationspneumonie stieg das IL-6 deutlich an, fiel aber im weiteren Verlauf auch entsprechend wieder ab. Weitere Auffälligkeiten fanden sich bei neoplastischen Erkrankungen, die insbesondere für Mammatumore einen erhöhten IL-6-Wert zeigten. Ebenso auffällig stellten sich Hunde mit Ikterus bei Hepatopathie dar. Insgesamt waren diese Veränderungen jedoch am ehesten wieder auf eine Entzündungsreaktion im Rahmen der Grunderkrankung zurückzuführen. Auffällig, wenngleich aber nicht signifikant, zeigten Hunde mit hohem IL-6 vielfach einen klinisch schlechten Allgemeinzustand und verstarben häufig bzw. wurden entsprechend euthanasiert. Somit scheint sich insgesamt der Trend zu bestätigen, dass IL-6 ebenso wie beim Menschen als Prognose- oder Verlaufsparameter für entzündliche Erkrankungen herangezogen werden könnte. Dies und der sich daraus ergebende klinische Nutzen muss noch in weiteren Analysen an größeren Kollektiven untersucht werden. Dabei ist zum einen die Fokussierung auf nur wenige Krankheitsbilder nötig. Zum anderen sollte die Möglichkeit eines sensitiveren Testverfahrens geprüft werden, um eine definitive Aussage über den Grenzwert für IL-6 festlegen zu können.

5.2 TGF-β1

Für die Untersuchung von TGF-β1 galten die gleichen Voraussetzungen wie für IL-6. Bevor jedoch die Stabilität des Faktors überprüft werden konnte, um dann Normwerte zu etablieren, musste das optimale Ausgangsmaterial – Serum oder Plasma – gefunden werden. Im Gegensatz zu IL-6, für dessen Messung in aller

Regel Serum herangezogen wird, wird TGF-β1 sowohl aus Serum als auch aus Plasma bestimmt. Während man bei der Messung im Serum vom Gesamt-TGF-β1 ausgeht, wird versucht, bei der Messung im Plasma im Vorfeld die Thrombozyten zu entfernen. Diese enthalten Vesikel mit TGF-β1, die bei der Gerinnung freigesetzt werden und somit bei der Serummessung miterfasst werden. Wenngleich bei der Plasmamessung keine Gerinnung und somit auch keine direkte TGF-β1 Freisetzung stattfindet, muss das Verfahren der Plasmagewinnung sehr schonend verlaufen. Dieses kann eine Verunreinigung des Plasmas mit TGF-β1, z. B. durch mechanische Thrombozytolyse, verhindern.

Entsprechend wurde zunächst von insgesamt 55 Hunden die TGF-β1-Konzentration im Serum und im Plasma gemessen. Es handelte sich dabei um 34 gesunde und 21 kranke Hunde. Aus dem Serum aller Hunde ließ sich TGF-β1 detektieren. Die Serumkonzentrationen lagen bei den gesunden Hunden zwischen 22,7 ng/ml und 65,7 ng/ml und bei den kranken Hunden zwischen 20,2 ng/ml und 93,0 ng/ml. Plasma-TGF-β1-Konzentrationen ließen sich nur bei 34,5 % der Hunde (n = 19) bestimmen. Der Anteil der Hunde mit nicht detektierbaren Ergebnissen lag mit 67,6 % bei den gesunden (n = 23) ähnlich hoch wie mit 62,0 % bei den kranken Hunden (n = 13). Nach Auftragen der Plasma- und Serumwerte gegeneinander zeigte sich keine Korrelation beider Messungen, sodass sie als unabhängig voneinander einzuschätzen waren. Problematisch für die weiteren Analysen schien, dass sich aus den Plasmaproben, zumindest an der kleineren Fallzahl, keine Normalwerte im Gegensatz zu den Kranken aufstellen ließen. Ausschlaggebend waren in diesem Zusammenhang die zahlreichen nicht messbaren Fälle, die in beiden Gruppen auftauchten. Zusätzlich war die Aufbereitung von Plasma sehr aufwendig, sodass die Messung im Plasma für den Praxisalltag zunächst keine Anwendung finden würde. Weitere Aspekte, die für die Verwendung von Serum als Untersuchungsmedium sprachen, waren die höhere Variation der Messwerte bei Untersuchung des Gesamt-TGF-ß1, sowie die zahlreichen Publikationen in der Humanmedizin, die sich mit ähnlichen Fragestellungen beschäftigten. Auch das Ziel ein Screeningverfahren zu finden, wird durch die Nutzung von Serum zur TGF-β1-Bestimmungen erreicht.

5.2.1 Haltbarkeit

Zur Untersuchung der Haltbarkeit wurden die Proben von 19 gesunden Hunden an einem Tag entnommen. Die initiale Messung, welche im Gegensatz zu IL-6 positive Werte erbrachte, wurde nach 4, 6, 8 und 10 Wochen wiederholt. Dabei zeigte sich im direkten Vergleich ein auffallender Unterschied zwischen der 4. und 8. Woche. Nach Normalisierung der Daten hinsichtlich der Standardkurve zeigt sich dieser Effekt nicht mehr, sodass der in den unnormalisierten Werten beobachtete Konzentrationsunterschied auf eine abweichende Standardkurve zurückzuführen war. Da bis dato die Messung der Standardkurve nicht als Triplikat erfolgt war, dessen Analyse jedoch von großer Bedeutung für die Auswertung war, wurde in den weiteren Untersuchungen diese ebenfalls als Triplikat aufgetragen. Letztlich war aber festzuhalten, dass auch TGF-β1, das gemäß den Herstellervorschriften bei unter -70°C gelagert wird, über einen längeren Zeitraum stabil ist und in größeren Gruppen zusammen gemessen werden kann.

5.2.2 Normalwerte

Für die Erstellung des Referenzbereiches wurden wegen der vorliegenden Normalverteilung die einfache Standardabweichung und der Mittelwert herangezogen, sodass der Normalwertbereich von 29,1 bis 48,6 ng/ml festgelegt werden konnte.

5.2.3 TGF-β1 bei erkrankten Hunden

Nach Aufstellung des Normalwertes wurden zunächst die Werte gesunder Hunde mit den Werten kranker Hunde verglichen. Das Fehlen eines signifikanten Unterschiedes zwischen den beiden Gruppen führten wir jedoch auf die Regulationsmechanismen von TGF-β1 zurück. In Abhängigkeit der zugrunde liegenden Krankheit ist sowohl eine Hoch- als auch eine Runterregulation möglich (PRUD'HOMME 2007), sodass im Weiteren die Werte der einzelnen Krankheitsgruppen mit der Gruppe gesunder

Hunde verglichen wurden. Die Einteilung erfolgte in Analogie zu IL-6 in große Gruppen bzw. einer Zusammenfassung verschiedener Krankheiten.

In der Gruppe der neoplastischen Erkrankungen nimmt TGF-β1 funktionell eine gesonderte Stellung ein, da es sowohl Suppressor- als auch Promotor-Eigenschaften hat. In der Frühphase von Tumorerkrankungen steht meist die suppressive Eigenschaft im Vordergrund. Hier wirkt TGF-β1 als Inhibitor der Zellproliferation in den meisten epithelialen, endothelialen und hämatopoetischen Zellen. Diese Tumorzell-suppressive Eigenschaft kann z. B. durch Mutationen im TGF-β-Pathway oder durch Veränderungen in den Tumorzellen selbst verloren gehen. Daraufhin kann es zu einer unkontrollierten Zellproliferation kommen, sodass TGF-β1 in der Spätphase häufig zu einem Fortschreiten der Erkrankung mit Metastasierung beiträgt.

Insbesondere die Tumore der weiblichen Brust sind beim Menschen intensiv hinsichtlich der unterschiedlichen Wirkungsmechanismen von TGF-β untersucht worden (REISS u. BARCELLOS-HOFF 1997, DUMONT u. ARTEAGA 2000). SERRA und CROWLEY (2005) wiesen die biphasische Wirkungsweise von TGF-β1 auch am Mausmodell nach.

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Wirkmechanismen von TGF-β1 bei Neoplasien war die Gruppe der untersuchten Tumore selbst sehr heterogen (Sarkome, Mastozytome und Mammatumore). Entsprechend unterschiedlich war die Konzentration von TGF-β1. Auffallend in der untersuchten Gruppe waren jedoch Hunde mit einem Hämangiosarkom der Milz und mit Tumoren der Leber, die jeweils auffallend niedrige bzw. hohe Werte aufwiesen. Hinsichtlich der Hämangiosarkome sind weder in der Veterinär- noch in der Humanmedizin Daten über den Zusammenhang mit TGF-β1 bekannt. Interessant ist jedoch, dass die Konzentration deutlich erniedrigt ist, obwohl TGF-β1 als Stimulator von Erkrankungen des Gefäßsystems bekannt ist (PARDALI et al. 2010).

Um eine eindeutigere Aussage über das Verhalten von TGF-β1 im Rahmen von tumorösen Erkrankungen treffen zu können, ist es zwingend notwendig, die

verschiedenen Tumore nicht nur nach Lokalisation, sondern auch nach histo-pathologischer Diagnose zu differenzieren. Eine mögliche biphasische Wirkungsweise von TGF-β1 in Abhängigkeit von z. B. dem Tumorstadium scheint bei den Neoplasien die Auswertung der Ergebnisse noch zu erschweren. Die vorliegenden Ergebnisse lassen daher nur die Feststellung zu, dass bei einzelnen Tieren mit neoplastischer Veränderung ein erhöhter bzw. erniedrigter TGF-β1-Serumwert messbar ist.

Im Vergleich zu der Gruppe gesunder Hunde zeigten die Hunde mit Diabetes mellitus eine signifikant erhöhte TGF-β1-Serumkonzentration ($p = 0,016$). Sechs der 7 Hunde hatten erhöhte TGF-β1-Serumkonzentrationen im Bereich zwischen 57,4 ng/ml und 106,7 ng/ml. Der siebte Hund hatte eine verringerte TGF-β1-Serumkonzentration von 23,9 ng/ml. In der Veterinärmedizin liegen keine Daten zu TGF-β1 und Diabetes mellitus beim Hund vor. Aus der Humanmedizin ist aber bekannt, dass das im Serum gemessene TGF-β1 von Patienten mit diabetischer Nephropathie im Vergleich zu gesunden Patienten deutlich erhöht ist und nach Gabe von ACE-Hemmern sinkt (SHARMA et al. 1999). Dabei wird TGF-β eine wichtige Rolle als profibrotischer Faktor in der Entstehung der diabetischen Nephropathie zugeschrieben (ZIYADEH et al. 1994). BUSH (1991) beschreibt eine Glomerulosklerose als Spätfolge eines über zwei Jahre anhaltenden Diabetes mellitus.

Eine ähnliche profibrotische Wirkung von TGF-β1 wäre auch bei anderen Nephropathien denkbar. Auch PHILLIPS (2007) stellt in seiner Übersichtsarbeit fest, dass es beim Menschen im Endstadium der chronischen Niereninsuffizienz, z. B. bedingt durch Nephrititiden oder Diabetes mellitus, zu einer interstitiellen Nierenfibrose kommt. Dabei besteht eine sehr gute Korrelation zwischen dem Grad der Fibrose und dem Ausmaß der renalen Dysfunktion (PHILLIPS 2007).

In der Gruppe der Hunde mit Niereninsuffizienzen lag aber nur der Serum-TGF-β1-Wert eines Hundes (50,8 ng/ml) knapp oberhalb des aufgestellten Referenzwertes. Vier Hunde zeigten dagegen verminderte TGF-β1-Serumkonzentrationen im Bereich

zwischen 3,1 ng/ml und 28,5 ng/ml. Aufgrund einer fehlenden Korrelation sowohl in die eine als auch in die andere Richtung (p = 0,28) und einer Fallzahl von nur 4 Patienten, wäre eine weitere Interpretation der Daten sehr spekulativ. Insbesondere, da vermehrt ein erniedrigter TGF-β1-Spiegel vorlag und ein pathophysiologischer Beleg dafür bisher nicht vorhanden ist.

Die zweite Gruppe, die sich hinsichtlich der TGF-β1-Konzentration im Serum signifikant (p = 0,027) von der Gruppe Gesunder unterscheidet, sind Hunde mit Lungen- oder Leberfibrose. Die Beteiligung von TGF-β1 an der Fibroseentstehung konnte schon wiederholt gezeigt werden, beispielsweise im Tiermodell, in welchem die Überexpression von TGF-β zur Fibrose in Leber, Lunge und Niere führte. Dabei regt ein Gewebeschaden zu einer verstärkten Produktion und Aktivierung von TGF-β1 und nachfolgend zu einer vermehrten Ablagerung von extrazellulärer Matrix an. Auch die Gabe von exogenem TGF-β kann ohne Gewebsschaden eine solche Reaktion auslösen (SANDERSON et al. 1995, KOPP et al. 1996). Für die Ausbildung der „Idiopathischen Lungenfibrose“ beim Menschen machten BROEKELMANN et al. (1991) das Vorhandensein der Wachstumsfaktoren TGF-β1 und „connective-tissue growth factor“ verantwortlich. NORRIS et al. (2005) untersuchten Lungengewebe von West Highland White Terriern, welche besonders zu Lungenfibrosen neigen. Dabei beherrschten die Typ-III-Kollagene das Bild deutlich, für dessen Synthese die Autoren das Vorhandensein von TGF-β1 verantwortlich machen. Die vermehrte Ablagerung von Typ-III-Kollagenen im frühen Stadium von Lungenerkrankungen mit interstitieller Fibrose wurde bereits 1985 von RAGHU et al. beim Menschen beschrieben.

Für die Entstehung einer Leberfibrose wird ein chronischer Leberschaden in Verbindung mit einer Ablagerung von extrazellulärer Matrix verantwortlich gemacht. Der Hauptproduzent von extrazellulärer Matrix in der Leber sind Ito-Zellen (GABELE et al. 2003), welche unter dem Einfluss von TGF-β1 aktiviert und in Myofibroblasten umgewandelt werden (GRESSNER 1994). Mit ihrer Umwandlung exprimieren sie in der Folge selbst eine Vielzahl von wichtigen Zytokinen, darunter TGF-β1 und

sezernieren „tissue inhibitor of metalloproteinases 1“, sodass der Abbau der neu produzierten extrazellulären Matrix verlangsamt wird (IREDALE et al. 1992). Der Anstieg von TGF-β1 bei Hunden mit Leberfibrose wurde bereits von NEUMANN et al. (2008) beschrieben.

In der klinischen Diagnostik könnte TGF-β1 somit als Fibrose-Marker eingesetzt werden. Bisher ist die definitive Diagnose einer Lungen- oder Leberfibrose nur über die histopathologische Untersuchung einer entsprechenden Gewebeprobe möglich. Für die Leberfibrose gilt die Biopsieentnahme immer noch als Goldstandard (AFDHAL u. NUNES 2004). Die histopathologische Untersuchung hat den Vorteil, dass mit ihrer Hilfe weiterhin die Ursache des Leberschadens sowie der Grad der Fibrose eingeschätzt werden kann (BATALLER u. BRENNER 2005). Die Biopsie muss jedoch in einem invasiven Verfahren, entweder im Rahmen einer Thorakotomie/Laparatomie oder MRT-/CT-/Ultraschall-gestützt mittels Trucut-Biopsie entnommen werden, welche zusätzlich noch einer Narkose bedarf, die bei eingeschränkter Funktion der Zielorgane Lungen und Leber ein erhöhtes Risiko darstellt. Zum anderen stellt eine mittels Trucut-Biopsie gewonnene Gewebeprobe nur einen kleinen Ausschnitt des bioptierten Organs dar. Somit ist für die Zukunft zu prüfen, ob die Untersuchung von TGF-β1 aus dem Serum den invasiven Eingriff ersetzen kann oder ergänzend zum Abschätzen des Grades einer Fibrose herangezogen werden kann. Zusätzlich ist auch der Einsatz des TGF-β1-Spiegels als Verlaufsparameter einer antifibrotischen Therapie zu überprüfen. Hier ist beispielsweise an den Einsatz von ACE-Hemmern zu denken.

Uneinheitlich in ihrer Ausprägung zeigten sich die Werte der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, der Pankreatitiden sowie der Hepatopathien. Während einzelne Hunde deutlich erhöhte Werte zeigten, kamen bei anderen auch Werte weit unter denen von Gesunden vor. Diese Schwankungen stellen möglicherweise die Aktivität der Erkrankung dar, können aber auch Ausdruck des zugrunde liegenden Pathomechanismus sein. Insbesondere bei den entzündlichen Darmerkrankungen ist eine autoimmune Genese bekannt, von welcher in der Humanmedizin gezeigt werden konnte, dass sie mit einer Erniedrigung von TGF-β1 einhergeht

(PRUD'HOMME 2007). Entscheidend für die vorliegende Arbeit ist, dass exemplarisch die differentielle Regulation von TGF-β1 im Serum gezeigt werden konnte. Die Bedeutung des unterschiedlichen Vorkommens muss jedoch an wesentlich größeren, gut charakterisierten Kollektiven überprüft werden.

Interessanterweise zeigte sich eine enge Korrelation zwischen TGF-β1 und der Thrombozytenzahl (τ = 0,39). Dies wirft natürlich die Frage auf, ob die gefundenen Korrelationen zwischen den Erkrankungen und dem gemessenen TGF-β1 auf der Zahl der Thrombozyten beruht. Bisher gibt es keine publizieten Daten, die das TGF-β1 aus Thrombozyten in einen funktionellen Zusammenhang mit einer Erkrankung stellen. Einzig im Rahmen des metabolischen Syndroms werden Thrombozyten immer wieder in Zusammenhang mit Diabetes mellitus erwähnt.

Auch über eine prognostische Bedeutung der Thrombozytenzahl ist nichts bekannt. Somit sind weiterer Untersuchungen zur Validierung dieser Daten notwendig. Letztlich müsste für die Etablierung eines Biomarkers auch nicht zwingend ein funktioneller Zusammenhang vorliegen. Entscheidend wäre der prädiktive Wert der Thrombozytenzahl.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der verwendete ELISA DB100B “Quantikine Human TGF-β1 Immunoassay“ (Fa. R & D Systems, Minneapolis, USA) gut zum Nachweis von caninem TGF-β1 aus Serum geeignet ist. Eine Bestimmung im Plasma ist ebenfalls möglich. Aufgrund der zahlreichen negativen Werte ist die Verwendung wahrscheinlich nur in Untergruppen sinnvoll, die im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter eingegrenzt wurden. Die nachgewiesene Stabilität der Messungen über einen Zeitraum von 10 Wochen bei ca. -80°C ermöglicht das Sammeln von Proben und würde somit auch den Einsatz in nur seltenen Fällen rechtfertigen.

Anhand des vorliegenden Kollektivs gesunder Hunde wurde der Referenzwert für TGF-β1 im Serum auf 29,1–48,6 ng/ml festgelegt. Ein genereller Unterschied zwischen gesunden und kranken Hunden (mit internistischer Grunderkrankung) ließ sich nicht finden. Dies war jedoch aufgrund der möglichen Über- aber auch

Unterexpression von TGF-β1 nicht weiter verwunderlich. Signifikant erhöhte Werte zeigten sich für Hunde mit Diabetes mellitus (p = 0,0161) oder Leber- und Lungenfibrosen (p = 0,027). Dieser aus der Humanmedizin bekannte Unterschied konnte somit erstmals bei Hunden nachgewiesen werden und ist am ehesten auf die profibrotischen Effekte von TGF-β1 zurückzuführen. In den weiteren von uns untersuchten größeren Krankheitsgruppen wie Niereninsuffizienzen, entzündlichen Erkrankungen, Hepathopathien und Neoplasien fanden sich keine signifikanten Korrelationen. Ein prinzipieller Ausschluss hinsichtlich eines Zusammenhanges mit TGF-β1 und diesen Erkrankungsgruppen kann hier jedoch nicht erfolgen, da aufgrund der geringen Fallzahlen einzelne Krankheitsbilder zusammengefasst wurden. Interessanterweise findet sich neben dem TGF-β1-Spiegel auch die Thrombozytenzahl signifikant mit Diabetes mellitus bzw. Lungen- und Leberfibrosen korreliert. Da TGF-β1 in den Granula von Thrombozyten vorkommt, bleibt im Rahmen dieser Arbeit offen, ob diese Korrelation die Freisetzung im Rahmen der Gerinnung widerspiegelt und mögliche funktionelle Zusammenhänge zwischen den Thrombozyten und den jeweiligen Krankheitsbildern darstellt.

Die Beantwortung der Bedeutung der Thrombozyten sowie die Validierung dieser Daten müssen nun im Rahmen anschließender Validierungsstudien erfolgen.

6 Zusammenfassung

Sonja Gaedcke

Untersuchungen zur Analytik und diagnostischen Aussagekraft von IL-6 und TGF-ß1 beim Hund

Zytokine sind regulative Proteine, die für den Zellzyklus und die Differenzierung sowie die Immunantwort verantwortlich sind. Ihre Beteiligung an zahlreichen Erkrankungen ist wiederholt gezeigt worden. Die Gewinnung regulativer Zytokine aus dem Blut von Hunden würde somit einen leicht zugänglichen Biomarker darstellen. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, die Bedeutung von IL-6 und TGF-β1 bei internistischen Erkrankungen des Hundes zu untersuchen und ihre mögliche Bedeutung für den veterinärmedizinischen Alltag zu prüfen.

Zwischen April 2008 und Mai 2010 wurden in der Kleintierklinik des Tierärztlichen Instituts der Universität Göttingen insgesamt 227 Hunde mit kommerziell erwerblichen ELISA Kits hinsichtlich IL-6 bzw. TGF-β1 im Blut untersucht. Im Vorfeld wurde zunächst die Lagerungsstabilität über einen Zeitraum von 10 Wochen bei -20°C bzw. -80°C untersucht und unterschiedliche Messergebnisse hinsichtlich Plasma und Serum als Ausgangsmaterial ausgewertet. Anhand der Untersuchung einer Gesundgruppe wurden Referenzwerte festgelegt und Unterschiede der IL-6- und TGF-β1-Konzentration in Abhängigkeit der verschiedenen Krankheiten ausgewertet.

IL-6 wurde bei 163 Hunden untersucht, von denen 45 als gesund und 118 als krank eingestuft wurden. IL-6 zeigte unter Lagerung über einen Zeitraum von 10 Wochen bei -20°C keinen Konzentrationsanstieg. Der Nachweis von IL-6 gelang bei nur 27 der 118 kranken (22,9 %) und einem gesunden Hund. Entsprechend signifikant war die Messung von IL-6 mit dem Vorliegen einer Erkrankung assoziiert. Wenngleich aufgrund der geringen Zahl positiver IL-6-Fälle statistische Aussagen nur eingeschränkt möglich sind, so zeigten sich erhöhte IL-6-Werte dennoch vermehrt bei Entzündungen und Erkrankungen mit Begleitentzündungen.

Die TGF-β1-Konzentration wurden bei 169 Hunden untersucht, 67 waren gesund und 102 krank. Die Werte zeigten sich unabhängig von der Dauer der Lagerung konstant. Anhand der Serummessungen konnte ein Referenzbereich von 29,1 - 48,6 ng/ml aufgestellt werden. Hunde mit entzündlichen oder neoplastischen Erkrankungen sowie Hepatopathien ohne erkennbare Fibrosen wiesen keine signifikant veränderten TGF-β1-Serumkonzentrationen im Vergleich zur Referenzgruppe auf. Dagegen zeigte sich bei Tieren mit fibrotischen Erkrankungen, wie Leberfibrosen oder Lungenfibrosen ($p = 0,027$), sowie Hunden mit Diabetes mellitus ($p = 0,016$) ein signifikanter Anstieg von TGF-β1 im Serum. Ebenfalls hoch signifikant bot sich die Korrelation zwischen TGF-β1-Expression und der Thrombozytenzahl.

TGF-β1 und IL-6 stellen beide interessante Zytokine bei internistischen Erkrankungen des Hundes dar. Während TGF-β1 überwiegend bei fibrotischen Prozessen und dem Diabetes mellitus eine Rolle zu spielen scheint, ist die IL-6-Konzentration im Rahmen entzündlicher Erkrankungen bzw. im Rahmen entzündlicher Begleitprozesse erhöht. In den weiterführenden Untersuchungen bedarf es einer gesonderten Betrachtung der Rolle der Thrombozyten im Zusammenhang mit TGF-β1. Für IL-6 ist die anscheinend rasche Regulation zu berücksichtigen. Der eingesetzte ELISA ist im klinischen Alltag leicht anzuwenden. Die Validierung des zusätzlichen Nutzens bzw. der Überlegenheit dieser Parameter gegenüber herkömmlichen Parametern, wie z. B. dem CRP, muss jedoch noch in weiteren Studien belegt werden.

7 Summary

Sonja Gaedcke

Investigation of analytic and diagnostic utility in canine IL-6 and TGF-ß1

Cytokines are regulatory proteins that are involved in cell-cycle, differentiation as well as the modulation of the immune system. They have repeatedly been shown to be involved in several malignancies. Analyzing these cytokines in canine blood would represent well and easy accessible biomarkers. Aim of this work was to elucidate the importance of IL-6 and TGF-β1 in canine internal diseases and to analyze its possible influence on routine veterinary work.

Between April 2008 and May 2010 a total of 277 dogs were screened at the Institute of Veterinary Medicine of the University of Goettingen. A commercial available ELISA Kit for IL-6 or TGF-β1 was used to assess the blood concentration. Prior to these analyzes their stability for long-term storage was assessed and concentrations in serum and plasma were compared. Based on a group of healthy dogs the normal expression values were determined. Finally differences between these and dogs that were treated for internal diseases were compared.

IL-6 was assessed in 163 dogs, 45 were considered as healthy. Stored at -20°C the concentrations remained stable for at least 10 weeks. Only 27 of 118 (22.9 %) dogs with an internal disease showed a positive IL-6 measurement as well as one healthy dog. According to these differences the positive measurement of IL-6 was highly significant associated with the presence of an internal disease. Although a profound statistical analyses of the different disease was not possible, due to the low number of affected dogs, a certain overlap between inflammatory diseases or disease that were accompanied by inflammatory processes and increased IL-6 were seen.

TGF-β1 concentration was assessed in 169 dogs, 102 were considered to have an internal disease. Independently form the time of storage the concentrations remained constant at -80°C. Based on serum measurements of 67 healthy dogs a concentration between 29.1- 48.6 ng/ml was considered as normal. Dogs with an

inflammatory, neoplastic or hepatic disease (without fibrosis) did not show elevated or decreased levels of TGF-β1. However, in the group of fibrotic diseases ($p = 0.027$) and diabetes mellitus ($p = 0.016$) a significant increase of TGF-β1 in the serum was detected. Interestingly a correlation of TGF-β1 and platelet count was found.

TGF-β1 and IL-6 are both interesting cytokines concerning canine internal diseases. While an increase of TGF-β1 was primarily found in fibrotic diseases and diabetes mellitus, IL-6 were detected along with inflammatory processes. Along with the validation of these findings the advantage of both markers, especially with respect to existing markers need to be validated. Furthermore the importance of the platelets needs to be further assessed in the context of TGF-β1. For IL-6 its regulation needs to be further analyzed. With respect for the routine assessment of IL-6 and TGF-β1 both assays performed well.

8 Literaturverzeichnis

ABUL, K. A., H. LICHTMANN u. J. S. POBERT (1996):
Immunologie.
Verlag Huber, Bern

AFDHAL, N. H. u. D. NUNES (2004):
Evaluation of liver fibrosis: a concise review.
Am J Gastroenterol 99, 1160-1174

AKDENIZ, N., M. ESREFOGLU, M. S. KELES, A. KARAKUZU u. M. ATASOY (2004):
Serum interleukin-2, interleukin-6, tumour necrosis factor-alpha and nitric oxide levels in patients with Behcet's disease.
Ann Acad Med Singapore 33, 596-599

ALBERTS, B., D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS u. P. WALTER (2002):
Molecular Biology of the cell.
Garland Science, New York, USA

ALEVIZOPOULOS, A. u. N. MERMOD (1997):
Transforming growth factor-beta: the breaking open of a black box.
Bioessays 19, 581-591

ALTINEL, L., Z. K. SARITAS, K. C. KOSE, K. PAMUK, Y. AKSOY u. M. SERTESER (2007):
Treatment with unsaponifiable extracts of avocado and soybean increases TGF-beta1 and TGF-beta2 levels in canine joint fluid.
Tohoku J Exp Med 211, 181-186

ANDUS, T., T. GEIGER, T. HIRANO, T. KISHIMOTO, T. A. TRAN-THI, K. DECKER u. P. C. HEINRICH (1988):
Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures.
Eur J Biochem 173, 287-293

ANDUS, T., T. GEIGER, T. HIRANO, H. NORTHOFF, U. GANTER, J. BAUER, T. KISHIMOTO u. P. C. HEINRICH (1987):
Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells.
FEBS Lett 221, 18-22

ANZANO, M. A., A. B. ROBERTS, C. A. MEYERS, A. KOMORIYA, L. C. LAMB, J. M. SMITH u. M. B. SPORN (1982):
Synergistic interaction of two classes of transforming growth factors from murine sarcoma cells.
Cancer Res 42, 4776-4778

ARAYA, J. u. S. L. NISHIMURA (2010):
Fibrogenic reactions in lung disease.
Annu Rev Pathol 5, 77-98

AVRAMESCU, C. S., V. COMANESCU, S. N. POPESCU, A. TURCULEANU, M. BALASOIU, C. F. POPESCU u. M. LUNGULESCU (2008):
Correlations among the serum levels of some interleukins and the histopathological aspects in chronic viral hepatitis C.
Rom J Morphol Embryol 49, 57-62

BATAILLE, R., M. JOURDAN, X. G. ZHANG u. B. KLEIN (1989):
Serum levels of interleukin 6, a potent myeloma cell growth factor, as a reflect of disease severity in plasma cell dyscrasias.
J Clin Invest 84, 2008-2011

BATALLER, R. u. D. A. BRENNER (2005):
Liver fibrosis.
J Clin Invest 115, 209-218

BENOY, I., R. SALGADO, C. COLPAERT, R. WEYTJENS, P. B. VERMEULEN u. L. Y. DIRIX (2002):
Serum interleukin 6, plasma VEGF, serum VEGF, and VEGF platelet load in breast cancer patients.
Clin Breast Cancer 2, 311-315

BLANEY DAVIDSON, E. N., E. L. VITTERS, W. B. VAN DEN BERG u. P. M. VAN DER KRAAN (2006):
TGF beta-induced cartilage repair is maintained but fibrosis is blocked in the presence of Smad7.
Arthritis Res Ther 8, R65

BLOBE, G. C., W. P. SCHIEMANN u. H. F. LODISH (2000):
Role of transforming growth factor beta in human disease.
N Engl J Med 342, 1350-1358

BOHNHORST, J. O., I. HANSSEN u. T. MOEN (2002):
Immune-mediated fever in the dog. Occurrence of antinuclear antibodies, rheumatoid factor, tumor necrosis factor and interleukin-6 in serum.
Acta Vet Scand 43, 165-171

BORAZAN, A., H. USTUN, Y. USTUNDAG, S. AYDEMIR, T. BAYRAKTAROGLU, M. SERT u. A. YILMAZ (2004):
The effects of peritoneal dialysis and hemodialysis on serum tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-10 and C-reactive-protein levels.
Mediators Inflamm 13, 201-204

BRATTSAND, R. u. M. LINDEN (1996):
Cytokine modulation by glucocorticoids: mechanisms and actions in cellular studies.
Aliment Pharmacol Ther 10 Suppl 2, 81-90

BREATHNACH, R. M., S. FANNING, G. MULCAHY, H. F. BASSETT, B. R. JONES u. P. DALY (2006):
Evaluation of Th1-like, Th2-like and immunomodulatory cytokine mRNA expression in the skin of dogs with immunomodulatory-responsive lymphocytic-plasmacytic pododermatitis.
Vet Dermatol 17, 313-321

BRODERICK, E., S. INFANGER, T. M. TURNER u. D. R. SUMNER (2005):
Depressed bone mineralization following high dose TGF-beta1 application in an orthopedic implant model.
Calcif Tissue Int 76, 379-384

BROEKELMANN, T. J., A. H. LIMPER, T. V. COLBY u. J. A. MCDONALD (1991):
Transforming growth factor beta 1 is present at sites of extracellular matrix gene expression in human pulmonary fibrosis.
Proc Natl Acad Sci USA 88, 6642-6646

BUSH, B. M. (1991):
Interpretation of laboratory results for small animal clinicans.
Blackwell Science, Oxford, UK

CASTELL, J. V., M. J. GOMEZ-LECHON, M. DAVID, R. FABRA, R. TRULLENQUE u. P. C. HEINRICH (1990):
Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6.
Hepatology 12, 1179-1186

CASTELL, J. V., M. J. GOMEZ-LECHON, M. DAVID, T. HIRANO, T. KISHIMOTO u. P. C. HEINRICH (1988):
Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes.
FEBS Lett 232, 347-350

CENTRELLA, M., T. L. MCCARTHY u. E. CANALIS (1988):
Skeletal tissue and transforming growth factor beta.
Faseb J 2, 3066-3073

CHAI, Z., S. GATTI, C. TONIATTI, V. POLI u. T. BARTFAI (1996):
Interleukin (IL)-6 gene expression in the central nervous system is necessary for fever response to lipopolysaccharide or IL-1 beta: a study on IL-6-deficient mice.
J Exp Med 183, 311-316

CHAO, C. C., T. A. ALA, S. HU, K. B. CROSSLEY, R. E. SHERMAN, P. K. PETERSON u. W. H. FREY, 2ND (1994):
Serum cytokine levels in patients with Alzheimer's disease.
Clin Diagn Lab Immunol 1, 433-436

COLITZ, C. M., D. MALARKEY, M. J. DYKSTRA, M. C. MCGAHAN u. M. G. DAVIDSON (2000):
Histologic and immunohistochemical characterization of lens capsular plaques in dogs with cataracts.
Am J Vet Res 61, 139-143

CORREA, A. P., A. C. DOSSI, R. DE OLIVEIRA VASCONCELOS, D. P. MUNARI u. V. M. DE LIMA (2007):
Evaluation of transformation growth factor beta1, interleukin-10, and interferon-gamma in male symptomatic and asymptomatic dogs naturally infected by Leishmania (Leishmania) chagasi.
Vet Parasitol 143, 267-274

COUSSENS, L. M. u. Z. WERB (2002):
Inflammation and cancer.
Nature 420, 860-867

COX, D. A. u. T. MAURER (1997):
Transforming growth factor-beta.
Clin Immunol Immunopathol 83, 25-30

DARNELL, J. E., JR., I. M. KERR u. G. R. STARK (1994):
Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins.
Science 264, 1415-1421

DE LIMA, V. M., J. R. PEIRO u. R. DE OLIVEIRA VASCONCELOS (2007):
IL-6 and TNF-alpha production during active canine visceral leishmaniasis.
Vet Immunol Immunopathol 115, 189-193

DENNLER, S., S. ITOH, D. VIVIEN, P. TEN DIJKE, S. HUET u. J. M. GAUTHIER (1998):
Direct binding of Smad3 and Smad4 to critical TGF beta-inducible elements in the promoter of human plasminogen activator inhibitor-type 1 gene.
Embo J 17, 3091-3100

DERYNCK, R. u. X. H. FENG (1997):
TGF-beta receptor signaling.
Biochim Biophys Acta 1333, F105-150

DIMAGNO, E. u. S. CHARI (2002):
Acute pancreatitis.
In: Sleisenger and Fordrans Gastrointestinal and Liver disease; Ed: Feldmann, M., L. Friedmann, u. M., Sleisenge
Saunders, Philadelphia, S. 913-941

DINARELLO, C. A., J. G. CANNON, J. MANCILLA, I. BISHAI, J. LEES u. F. COCEANI (1991):
Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells.
Brain Res 562, 199-206

DUBOIS, C. M., M. H. LAPRISE, F. BLANCHETTE, L. E. GENTRY u. R. LEDUC (1995):
Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase.
J Biol Chem 270, 10618-10624

DUMONT, N. u. C. L. ARTEAGA (2000):
Transforming growth factor-beta and breast cancer: Tumor promoting effects of transforming growth factor-beta.
Breast Cancer Res 2, 125-132

EIZIRIK, D. L. u. T. MANDRUP-POULSEN (2001):
A choice of death--the signal-transduction of immune-mediated beta-cell apoptosis.
Diabetologia 44, 2115-2133

ENGVALL, E. u. P. PERLMANN (1971):
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Quantitative assay of immunoglobulin G.
Immunochemistry 8, 871-874

FISCHER, C. P. (2006):
Interleukin-6 in acute exercise and training: what is the biological relevance?
Exerc Immunol Rev 12, 6-33

FORMELA, L. J., S. W. GALLOWAY u. A. N. KINGSNORTH (1995):
Inflammatory mediators in acute pancreatitis.
Br J Surg 82, 6-13

FRANSSON, B., A. LAGERSTEDT, A. BERGSTROM, R. HAGMAN, J. PARK, B. CHEW, M. EVANS u. C. RAGLE (2007):
C-reative protein, tumor, necrosis factor alpha, and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS.
J Vet Emerg Crit Care 17, 373-381

FRINK, M., M. VAN GRIENSVEN, P. KOBBE, T. BRIN, C. ZECKEY, B. VASKE, C. KRETTEK u. F. HILDEBRAND (2009):
IL-6 predicts organ dysfunction and mortality in patients with multiple injuries.
Scand J Trauma Resusc Emerg Med 17, 49

FUJITA, Y., Y. HARA, Y. NEZU, S. YAMAGUCHI, K. S. SCHULZ u. M. TAGAWA (2005):
Direct and indirect markers of cartilage metabolism in synovial fluid obtained from dogs with hip dysplasia and correlation with clinical and radiographic variables.
Am J Vet Res 66, 2028-2033

FUKASAWA, H., T. YAMAMOTO, H. SUZUKI, A. TOGAWA, N. OHASHI, Y. FUJIGAKI, C. UCHIDA, M. AOKI, M. HOSONO, M. KITAGAWA u. A. HISHIDA (2004):
Treatment with anti-TGF-beta antibody ameliorates chronic progressive nephritis by inhibiting Smad/TGF-beta signaling.
Kidney Int 65, 63-74

GABELE, E., D. A. BRENNER u. R. A. RIPPE (2003):
Liver fibrosis: signals leading to the amplification of the fibrogenic hepatic stellate cell.
Front Biosci 8, d69-77

GARMAN, R. D., K. A. JACOBS, S. C. CLARK u. D. H. RAULET (1987):
B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells.
Proc Natl Acad Sci USA 84, 7629-7633

GAULDIE, J., C. RICHARDS, D. HARNISH, P. LANSDORP u. H. BAUMANN (1987):
Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells.
Proc Natl Acad Sci USA 84, 7251-7255

GEIGER, T., T. ANDUS, J. KLAPPROTH, T. HIRANO, T. KISHIMOTO u. P. C. HEINRICH (1988):
Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo.
Eur J Immunol 18, 717-721

GRESSNER, A. M. (1994):
Perisinusoidal lipocytes and fibrogenesis.
Gut 35, 1331-1333

HEANEY, M. L. u. D. W. GOLDE (1996):
Soluble cytokine receptors.
Blood 87, 847-857

HELDIN, C. H., K. MIYAZONO u. P. TEN DIJKE (1997):
TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins.
Nature 390, 465-471

HENNINGFELD, K. A., S. RASTEGAR, G. ADLER u. W. KNOCHEL (2000):
Smad1 and Smad4 are components of the bone morphogenetic protein-4 (BMP-4)-induced transcription complex of the Xvent-2B promoter.
J Biol Chem 275, 21827-21835

HIBI, M., M. MURAKAMI, M. SAITO, T. HIRANO, T. TAGA u. T. KISHIMOTO (1990):
Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130.
Cell 63, 1149-1157

HIRANO, T., T. MATSUDA u. K. NAKAJIMA (1994):
Signal transduction through gp130 that is shared among the receptors for the interleukin 6 related cytokine subfamily.
Stem Cells 12, 262-277

HIRANO, T., T. TAGA, N. NAKANO, K. YASUKAWA, S. KASHIWAMURA, K. SHIMIZU, K. NAKAJIMA, K. H. PYUN u. T. KISHIMOTO (1985):
Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2).
Proc Natl Acad Sci U S A 82, 5490-5494

HOKE, T. S., I. S. DOUGLAS, C. L. KLEIN, Z. HE, W. FANG, J. M. THURMAN, Y. TAO, B. DURSUN, N. F. VOELKEL, C. L. EDELSTEIN u. S. FAUBEL (2007):
Acute renal failure after bilateral nephrectomy is associated with cytokine-mediated pulmonary injury.
J Am Soc Nephrol 18, 155-164

HONG, L. S. ANGELO u. R. KURZROCK (2007):
Interleukin-6 and its receptor in cancer: implications for Translational Therapeutics.
Cancer 110, 1911-1928

HOUSSIAU, F. A., J. P. DEVOGELAER, J. VAN DAMME, C. N. DE DEUXCHAISNES u. J. VAN SNICK (1988):
Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides.
Arthritis Rheum 31, 784-788

IBELGAUFTS, H. (2011):
Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopedia
(htttp://www.copewithcytokines.de).

IHLE, J. N., B. A. WITTHUHN, F. W. QUELLE, K. YAMAMOTO u. O. SILVENNOINEN (1995):
Signaling through the hematopoietic cytokine receptors.
Annu Rev Immunol 13, 369-398

IKEBUCHI, K., G. G. WONG, S. C. CLARK, J. N. IHLE, Y. HIRAI u. M. OGAWA (1987):
Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hemopoietic progenitors.
Proc Natl Acad Sci USA 84, 9035-9039

IMPROTA, T., C. SCHINDLER, C. M. HORVATH, I. M. KERR, G. R. STARK u. J. E. DARNELL, JR. (1994):
Transcription factor ISGF-3 formation requires phosphorylated Stat91 protein, but Stat113 protein is phosphorylated independently of Stat91 protein.
Proc Natl Acad Sci USA 91, 4776-4780

IREDALE, J. P., G. MURPHY, R. M. HEMBRY, S. L. FRIEDMAN u. M. J. ARTHUR (1992):
Human hepatic lipocytes synthesize tissue inhibitor of metalloproteinases-1. Implications for regulation of matrix degradation in liver.
J Clin Invest 90, 282-287

ISHIDA, W., T. HAMAMOTO, K. KUSANAGI, K. YAGI, M. KAWABATA, K. TAKEHARA, T. K. SAMPATH, M. KATO u. K. MIYAZONO (2000):
Smad6 is a Smad1/5-induced smad inhibitor. Characterization of bone morphogenetic protein-responsive element in the mouse Smad6 promoter.
J Biol Chem 275, 6075-6079

JOHNS, L. D., G. BABCOCK, D. GREEN, M. FREEDMAN, S. SRIRAM u. R. M. RANSOHOFF (1992):
Transforming growth factor-beta 1 differentially regulates proliferation and MHC class-II antigen expression in forebrain and brainstem astrocyte primary cultures.
Brain Res 585, 229-236

JONES, S. A., S. HORIUCHI, N. TOPLEY, N. YAMAMOTO u. G. M. FULLER (2001):
The soluble interleukin 6 receptor: mechanisms of production and implications in disease.
Faseb J 15, 43-58

JONGEN-LAVRENCIC, M., H. R. PEETERS, H. ROZEMULLER, W. J. ROMBOUTS, A. C. MARTENS, G. VREUGDENHIL, M. PILLAY, P. H. COX, M. BIJSER, G. BRUTEL, F. C. BREEDVELD u. A. J. SWAAK (1996):
IL-6-induced anaemia in rats: possible pathogenetic implications for anemia observed in chronic inflammations.
Clin Exp Immunol 103, 328-334

KIM, J. H., C. H. YU, J. Y. YHEE, K. S. IM u. J. H. SUR (2010):
Lymphocyte infiltration, expression of interleukin (IL) -1, IL-6 and expression of mutated breast cancer susceptibility gene-1 correlate with malignancy of canine mammary tumours.
J Comp Pathol 142, 177-186

KIMURA, F., M. MIYAZAKI, T. SUWA, T. SUGIURA, T. SHINODA, H. ITOH, S. AMBIRU, H. SHIMIZU u. K. NAKAGAWA (1999):
Serum interleukin-6 levels in patients with biliary obstruction.
Hepatogastroenterology 46, 1613-1617

KISHIMOTO, T., T. TAGA u. S. AKIRA (1994):
Cytokine signal transduction.
Cell 76, 253-262

KOPP, J. B., V. M. FACTOR, M. MOZES, P. NAGY, N. SANDERSON, E. P. BOTTINGER, P. E. KLOTMAN u. S. S. THORGEIRSSON (1996):
Transgenic mice with increased plasma levels of TGF-beta 1 develop progressive renal disease.
Lab Invest 74, 991-1003

KREUTZBERG, G. W. (1995):
Microglia, the first line of defence in brain pathologies.
Arzneimittelforschung 45, 357-360

KRISTIANSEN, O. P. u. T. MANDRUP-POULSEN (2005):
Interleukin-6 and diabetes: the good, the bad, or the indifferent?
Diabetes 54 Suppl 2, S114-124

KURZROCK, R. (1997):
Cytokine deregulation in hematological malignancies: clinical and biological implications.
Clin Cancer Res 3, 2581-2584

KURZROCK, R., J. REDMAN, F. CABANILLAS, D. JONES, J. ROTHBERG u. M. TALPAZ (1993):
Serum interleukin 6 levels are elevated in lymphoma patients and correlate with survival in advanced Hodgkin's disease and with B symptoms.
Cancer Res 53, 2118-2122

LAWRENCE, D. A. (1996):
Transforming growth factor-beta: a general review.
Eur Cytokine Netw 7, 363-374

LE MAY, L. G., A. J. VANDER u. M. J. KLUGER (1990):
Role of interleukin 6 in fever in rats.
Am J Physiol 258, R798-803

LEFER, A. M., X. L. MA, A. S. WEYRICH u. R. SCALIA (1993):
Mechanism of the cardioprotective effect of transforming growth factor beta 1 in feline myocardial ischemia and reperfusion.
Proc Natl Acad Sci U S A 90, 1018-1022

LESER, H. G., V. GROSS, C. SCHEIBENBOGEN, A. HEINISCH, R. SALM, M. LAUSEN, K. RUCKAUER, R. ANDREESEN, E. H. FARTHMANN u. J. SCHOLMERICH (1991):
Elevation of serum interleukin-6 concentration precedes acute-phase response and reflects severity in acute pancreatitis.
Gastroenterology 101, 782-785

LILIENFELD-TOAL, H. V. (1992):
Aktuelle Aspekte der Osteologie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg

LIU, K. D., C. ALTMANN, G. SMITS, C. D. KRAWCZESKI, C. L. EDELSTEIN, P. DEVARAJAN u. S. FAUBEL (2009):
Serum interleukin-6 and interleukin-8 are early biomarkers of acute kidney injury and predict prolonged mechanical ventilation in children undergoing cardiac surgery: a case-control study.
Crit Care 13, R104

LOTZ, M., F. JIRIK, P. KABOURIDIS, C. TSOUKAS, T. HIRANO, T. KISHIMOTO u. D. A. CARSON (1988):
B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes.
J Exp Med 167, 1253-1258

LUDWIG, H., D. M. NACHBAUR, E. FRITZ, M. KRAINER u. H. HUBER (1991):
Interleukin-6 is a prognostic factor in multiple myeloma.
Blood 77, 2794-2795

LUTTICKEN, C., P. COFFER, J. YUAN, C. SCHWARTZ, E. CALDENHOVEN, C. SCHINDLER, W. KRUIJER, P. C. HEINRICH u. F. HORN (1995):
Interleukin-6-induced serine phosphorylation of transcription factor APRF: evidence for a role in interleukin-6 target gene induction.
FEBS Lett 360, 137-143

LUTTICKEN, C., U. M. WEGENKA, J. YUAN, J. BUSCHMANN, C. SCHINDLER, A. ZIEMIECKI, A. G. HARPUR, A. F. WILKS, K. YASUKAWA, T. TAGA u. ET AL. (1994):
Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130.
Science 263, 89-92

MACCOUX, L. J., F. SALWAY, P. J. DAY u. D. N. CLEMENTS (2007):
Expression profiling of select cytokines in canine osteoarthritis tissues.
Vet Immunol Immunopathol 118, 59-67

MACKIEWICZ, A., M. WIZNEROWICZ, E. ROEB, A. KARCZEWSKA, J. NOWAK, P. C. HEINRICH u. S. ROSE-JOHN (1995):
Soluble interleukin 6 receptor is biologically active in vivo.
Cytokine 7, 142-149

MACVITTIE, T. J., A. M. FARESE, M. L. PATCHEN u. L. A. MYERS (1994):
Therapeutic efficacy of recombinant interleukin-6 (IL-6) alone and combined with recombinant human IL-3 in a nonhuman primate model of high-dose, sublethal radiation-induced marrow aplasia.
Blood 84, 2515-2522

MANSFIELD, C. S., F. E. JAMES u. I. D. ROBERTSON (2008):
Development of a clinical severity index for dogs with acute pancreatitis.
J Am Vet Med Assoc 233, 936-944

MARSELLA, R., T. OLIVRY u. S. MAEDA (2006):
Cellular and cytokine kinetics after epicutaneous allergen challenge (atopy patch testing) with house dust mites in high-IgE beagles.
Vet Dermatol 17, 111-120

MARZ, P., T. HERGET, E. LANG, U. OTTEN u. S. ROSE-JOHN (1997):
Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation.
Eur J Neurosci 9, 2765-2773

MASSAGUE, J. (1990):
The transforming growth factor-beta family.
Annu Rev Cell Biol 6, 597-641

MASSAGUE, J., L. ATTISANO u. J. L. WRANA (1994):
The TGF-beta family and its composite receptors.
Trends Cell Biol 4, 172-178

MAYER, J., B. RAU, F. GANSAUGE u. H. G. BEGER (2000):
Inflammatory mediators in human acute pancreatitis: clinical and pathophysiological implications.
Gut 47, 546-552

MITTL, P. R., J. P. PRIESTLE, D. A. COX, G. MCMASTER, N. CERLETTI u. M. G. GRUTTER (1996):
The crystal structure of TGF-beta 3 and comparison to TGF-beta 2: implications for receptor binding.
Protein Sci 5, 1261-1271

MIYAMOTO, T., T. FUJINAGA, K. YAMASHITA u. M. HAGIO (1996):
Changes of serum cytokine activities and other parameters in dogs with experimentally induced endotoxic shock.
Jpn J Vet Res 44, 107-118

MULLBERG, J., H. SCHOOLTINK, T. STOYAN, M. GUNTHER, L. GRAEVE, G. BUSE, A. MACKIEWICZ, P. C. HEINRICH u. S. ROSE-JOHN (1993):
The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding.
Eur J Immunol 23, 473-480

NACINOVIC-DULETIC, A., S. STIFTER, S. DVORNIK, Z. SKUNCA u. N. JONJIC (2008):
Correlation of serum IL-6, IL-8 and IL-10 levels with clinicopathological features and prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma.
Int J Lab Hematol 30, 230-239

NASRAWAY, S. A. (2003):
The problems and challenges of immunotherapy in sepsis.
Chest 123, 451S-459S

NAUGLER, W. E. u. M. KARIN (2008):
The wolf in sheep's clothing: the role of interleukin-6 in immunity, inflammation and cancer.
Trends Mol Med 14, 109-119

NEUMANN, S., F. J. KAUP u. B. BEARDI (2008):
Plasma concentration of transforming growth factor-beta1 and hepatic fibrosis in dogs.
Can J Vet Res 72, 428-431

NIU, Y., Y. XU, J. ZHANG, J. BAI, H. YANG u. T. MA (2001):
Proliferation and differentiation of prostatic stromal cells.
BJU Int 87, 386-393

NOMA, T., T. MIZUTA, A. ROSEN, T. HIRANO, T. KISHIMOTO u. T. HONJO (1987):
Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines.
Immunol Lett 15, 249-253

NORRIS, A. J., D. K. NAYDAN u. D. W. WILSON (2005):
Interstitial lung disease in West Highland White Terriers.
Vet Pathol 42, 35-41

OKADA, M., M. KITAHARA, S. KISHIMOTO, T. MATSUDA, T. HIRANO u. T. KISHIMOTO (1988):
IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells.
J Immunol 141, 1543-1549

OSSEGE, L. M., B. VOSS, T. WIETHEGE, E. SINDERN u. J. P. MALIN (1994):
Detection of transforming growth factor beta 1 mRNA in cerebrospinal fluid cells of patients with meningitis by non-radioactive in situ hybridization.
J Neurol 242, 14-19

OZKAYNAK, E., P. N. SCHNEGELSBERG u. H. OPPERMANN (1991):
Murine osteogenic protein (OP-1): high levels of mRNA in kidney.
Biochem Biophys Res Commun 179, 116-123

PADGETT, R. W., P. DAS u. S. KRISHNA (1998):
TGF-beta signaling, Smads, and tumor suppressors.
Bioessays 20, 382-390

PAPANICOLAOU, D. A., R. L. WILDER, S. C. MANOLAGAS u. G. P. CHROUSOS (1998):
The pathophysiologic roles of interleukin-6 in human disease.
Ann Intern Med 128, 127-137

PARDALI, E., M. J. GOUMANS u. P. TEN DIJKE (2010):
Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease.
Trends Cell Biol 20, 556-567

PASSERINI, L., P. BERNASCONI, F. BAGGI, P. CONFALONIERI, F. COZZI, F. CORNELIO u. R. MANTEGAZZA (2002):
Fibrogenic cytokines and extent of fibrosis in muscle of dogs with X-linked golden retriever muscular dystrophy.
Neuromuscul Disord 12, 828-835

PECOITS-FILHO, R., O. HEIMBURGER, P. BARANY, M. SULIMAN, I. FEHRMAN-EKHOLM, B. LINDHOLM u. P. STENVINKEL (2003):
Associations between circulating inflammatory markers and residual renal function in CRF patients.
Am J Kidney Dis 41, 1212-1218

PEETERS, D., I. R. PETERS, C. R. HELPS, A. GABRIEL, M. J. DAY u. C. CLERCX (2007):
Distinct tissue cytokine and chemokine mRNA expression in canine sino-nasal aspergillosis and idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis.
Vet Immunol Immunopathol 117, 95-105

PELTOLA, J., J. LAAKSONEN, A. M. HAAPALA, M. HURME, S. RAINESALO u. T. KERANEN (2002):
Indicators of inflammation after recent tonic-clonic epileptic seizures correlate with plasma interleukin-6 levels.
Seizure 11, 44-46

PENG, J., P. FRIESE, J. N. GEORGE, G. L. DALE u. S. A. BURSTEIN (1994):
Alteration of platelet function in dogs mediated by interleukin-6.
Blood 83, 398-403

PEZZILLI, R., P. BILLI, R. MINIERO, M. FIOCCHI, O. CAPPELLETTI, A. M. MORSELLI-LABATE, B. BARAKAT, G. SPROVIERI u. M. MIGLIOLI (1995):
Serum interleukin-6, interleukin-8, and beta 2-microglobulin in early assessment of severity of acute pancreatitis. Comparison with serum C-reactive protein.
Dig Dis Sci 40, 2341-2348

PFEILSCHIFTER, J., W. PIGNAT, K. VOSBECK u. F. MARKI (1989):
Interleukin 1 and tumor necrosis factor synergistically stimulate prostaglandin synthesis and phospholipase A2 release from rat renal mesangial cells.
Biochem Biophys Res Commun 159, 385-394

PFEILSCHIFTER, J., S. M. SEYEDIN u. G. R. MUNDY (1988):
Transforming growth factor beta inhibits bone resorption in fetal rat long bone cultures.
J Clin Invest 82, 680-685

PHILLIPS, A. (2007):
The role of proximal tubular cells in interstitial fibrosis: understanding TGF-beta1.
Chang Gung Med J 30, 2-6

PIEK, E., C. H. HELDIN u. P. TEN DIJKE (1999):
Specificity, diversity, and regulation in TGF-beta superfamily signaling.
Faseb J 13, 2105-2124

PIRCHER, R., P. JULLIEN u. D. A. LAWRENCE (1986):
Beta-transforming growth factor is stored in human blood platelets as a latent high molecular weight complex.
Biochem Biophys Res Commun 136, 30-37

PRETI, H. A., F. CABANILLAS, M. TALPAZ, S. L. TUCKER, J. F. SEYMOUR u. R. KURZROCK (1997):
Prognostic value of serum interleukin-6 in diffuse large-cell lymphoma.
Ann Intern Med 127, 186-194

PRINSEN, J. H., E. BARANSKI, H. POSCH, K. TOBER u. A. GERSTMEYER (2008):
Interleukin-6 as diagnostic marker for neonatal sepsis: determination of Access IL-6 cutoff for newborns.
Clin Lab 54, 179-183

PRUD'HOMME, G. J. (2007):
Pathobiology of transforming growth factor beta in cancer, fibrosis and immunologic disease, and therapeutic considerations.
Lab Invest 87, 1077-1091

RAEM, A. M. u. P. RAUCH (2007):
Immunoassays.
Elsevier, München

RAGHU, G., L. J. STRIKER, L. D. HUDSON u. G. E. STRIKER (1985):
Extracellular matrix in normal and fibrotic human lungs.
Am Rev Respir Dis 131, 281-289

RAMADORI, G. u. T. ARMBRUST (2001):
Cytokines in the liver.
Eur J Gastroenterol Hepatol 13, 777-784

RAU, S., B. KOHN, C. RICHTER, N. FENSKE, H. KUCHENHOFF, K. HARTMANN, S. HARTLE, B. KASPERS u. J. HIRSCHBERGER (2007):
Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis.
Vet Clin Pathol 36, 253-260

REISS, M. u. M. H. BARCELLOS-HOFF (1997):
Transforming growth factor-beta in breast cancer: a working hypothesis.
Breast Cancer Res Treat 45, 81-95

RIVAS, A. L., L. TINTLE, E. S. KIMBALL, J. SCARLETT u. F. W. QUIMBY (1992):
A canine febrile disorder associated with elevated interleukin-6.
Clin Immunol Immunopathol 64, 36-45

ROBERTS, A. B., M. A. ANZANO, L. C. LAMB, J. M. SMITH u. M. B. SPORN (1981):
New class of transforming growth factors potentiated by epidermal growth factor: isolation from non-neoplastic tissues.
Proc Natl Acad Sci USA 78, 5339-5343

ROBERTS, A. B., N. S. ROCHE, T. S. WINOKUR, J. K. BURMESTER u. M. B. SPORN (1992):
Role of transforming growth factor-beta in maintenance of function of cultured neonatal cardiac myocytes. Autocrine action and reversal of damaging effects of interleukin-1.
J Clin Invest 90, 2056-2062

ROSE-JOHN, S. u. P. C. HEINRICH (1994):
Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function.
Biochem J 300, 281-290

ROSE-JOHN, S., J. SCHELLER, G. ELSON u. S. A. JONES (2006):
Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer.
J Leukoc Biol 80, 227-236

ROTHMAN, P., B. KREIDER, M. AZAM, D. LEVY, U. WEGENKA, A. EILERS, T. DECKER, F. HORN, H. KASHLEVA u. J. IHLE (1994):
Cytokines and growth factors signal through tyrosine phosphorylation of a family of related transcription factors.
Immunity 1, 457-468

SAKAMOTO, T., Z. LIU, N. MURASE, T. EZURE, S. YOKOMURO, V. POLI u. A. J. DEMETRIS (1999):
Mitosis and apoptosis in the liver of interleukin-6-deficient mice after partial hepatectomy.
Hepatology 29, 403-411

SAKUMA, M., K. HATSUSHIKA, K. KOYAMA, R. KATOH, T. ANDO, Y. WATANABE, M. WAKO, M. KANZAKI, S. TAKANO, H. SUGIYAMA, Y. HAMADA, H. OGAWA, K. OKUMURA u. A. NAKAO (2007):
TGF-beta type I receptor kinase inhibitor down-regulates rheumatoid synoviocytes and prevents the arthritis induced by type II collagen antibody.
Int Immunol 19, 117-126

SALGADO, R., S. JUNIUS, I. BENOY, P. VAN DAM, P. VERMEULEN, E. VAN MARCK, P. HUGET u. L. Y. DIRIX (2003):
Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer.
Int J Cancer 103, 642-646

SALVADORI, C., I. R. PETERS, M. J. DAY, E. ENGVALL u. G. D. SHELTON (2005):
Muscle regeneration, inflammation, and connective tissue expansion in canine inflammatory myopathy.
Muscle Nerve 31, 192-198

SANDBERG, A. A. u. A. BORGSTROM (2002):
Early prediction of severity in acute pancreatitis. Is this possible?
JOP 3, 116-125

SANDERSON, N., V. FACTOR, P. NAGY, J. KOPP, P. KONDAIAH, L. WAKEFIELD, A. B. ROBERTS, M. B. SPORN u. S. S. THORGEIRSSON (1995):
Hepatic expression of mature transforming growth factor beta 1 in transgenic mice results in multiple tissue lesions.
Proc Natl Acad Sci USA 92, 2572-2576

SATOH, T., S. NAKAMURA, T. TAGA, T. MATSUDA, T. HIRANO, T. KISHIMOTO u. Y. KAZIRO (1988):
Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6.
Mol Cell Biol 8, 3546-3549

SEKELSKY, J. J., S. J. NEWFELD, L. A. RAFTERY, E. H. CHARTOFF u. W. M. GELBART (1995):
Genetic characterization and cloning of mothers against dpp, a gene required for decapentaplegic function in *Drosophila melanogaster*.
Genetics 139, 1347-1358

SELLERS, R. S., B. E. LEROY, E. A. BLOMME, S. TANNEHILL-GREGG, S. CORN u. T. J. ROSOL (2004):
Effects of transforming growth factor-beta1 on parathyroid hormone-related protein mRNA expression and protein secretion in canine prostate epithelial, stromal, and carcinoma cells.
Prostate 58, 366-373

SELZNER, M., C. A. CAMARGO u. P. A. CLAVIEN (1999):
Ischemia impairs liver regeneration after major tissue loss in rodents: protective effects of interleukin-6.
Hepatology 30, 469-475

SERRA, R. u. M. R. CROWLEY (2005):
Mouse models of transforming growth factor beta impact in breast development and cancer.
Endocr Relat Cancer 12, 749-760

SEWNATH, M. E., T. VAN DER POLL, C. J. VAN NOORDEN, F. J. TEN KATE u. D. J. GOUMA (2004):
Cholestatic interleukin-6-deficient mice succumb to endotoxin-induced liver injury and pulmonary inflammation.
Am J Respir Crit Care Med 169, 413-420

SEYMOUR, J. F., M. TALPAZ, F. CABANILLAS, M. WETZLER u. R. KURZROCK (1995):
Serum interleukin-6 levels correlate with prognosis in diffuse large-cell lymphoma.
J Clin Oncol 13, 575-582

SHAH, M., D. M. FOREMAN u. M. W. FERGUSON (1995):
Neutralisation of TGF-beta 1 and TGF-beta 2 or exogenous addition of TGF-beta 3 to cutaneous rat wounds reduces scarring.
J Cell Sci 108, 985-1002

SHARMA, K., B. O. ELTAYEB, T. A. MCGOWAN, S. R. DUNN, B. ALZAHABI, R. ROHDE, F. N. ZIYADEH u. E. J. LEWIS (1999):
Captopril-induced reduction of serum levels of transforming growth factor-beta1 correlates with long-term renoprotection in insulin-dependent diabetic patients.
Am J Kidney Dis 34, 818-823

SHIDAIFAT, F., B. AL-TRAD u. R. AL-OMARI (2007):
Testosterone effect on immature prostate gland development associated with suppression of transforming growth factor-beta.
Life Sci 80, 829-834

SHORT, A. D., B. CATCHPOLE, L. J. KENNEDY, A. BARNES, N. FRETWELL, C. JONES, W. THOMSON u. W. E. OLLIER (2007):
Analysis of candidate susceptibility genes in canine diabetes.
J Hered 98, 518-525

SHUAI, K., A. ZIEMIECKI, A. F. WILKS, A. G. HARPUR, H. B. SADOWSKI, M. Z. GILMAN u. J. E. DARNELL (1993):
Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins.
Nature 366, 580-583

SPEE, B., B. ARENDS, T. S. VAN DEN INGH, B. BRINKHOF, H. NEDERBRAGT, J. IJZER, T. ROSKAMS, L. C. PENNING u. J. ROTHUIZEN (2006):
Transforming growth factor beta-1 signalling in canine hepatic diseases: new models for human fibrotic liver pathologies.
Liver Int 26, 716-725

SPORN, M. B., A. B. ROBERTS, G. V. BORN, P. CUATRECASAS u. H. HERKEN (1990):
Handbook of experimental pharmacology: Peptide growth factors and their receptors.
Springer Verlag, Berlin, New York

STAHL, N., T. G. BOULTON, T. FARRUGGELLA, N. Y. IP, S. DAVIS, B. A. WITTHUHN, F. W. QUELLE, O. SILVENNOINEN, G. BARBIERI, S. PELLEGRINI u. ET AL. (1994):
Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components.
Science 263, 92-95

STOYAN, T., U. MICHAELIS, H. SCHOOLTINK, M. VAN DAM, R. RUDOLPH, P. C. HEINRICH u. S. ROSE-JOHN (1993):
Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in Escherichia coli, renaturation and purification.
Eur J Biochem 216, 239-245

STREETZ, K. L., T. LUEDDE, M. P. MANNS u. C. TRAUTWEIN (2000):
Interleukin 6 and liver regeneration.
Gut 47, 309-312

SUGIYAMA, H., K. INOUE, H. OGAWA, T. YAMAGAMI, T. SOMA, S. MIYAKE, M. HIRATA u. T. KISHIMOTO (1996):
The expression of IL-6 and its related genes in acute leukemia.
Leuk Lymphoma 21, 49-52

SUZUKI, Y., H. SAITO, J. KASANUKI, T. KISHIMOTO, Y. TAMURA u. S. YOSHIDA (1990):
Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease.
Life Sci 47, 2193-2197

TAGA, T., M. HIBI, Y. HIRATA, K. YAMASAKI, K. YASUKAWA, T. MATSUDA, T. HIRANO u. T. KISHIMOTO (1989):
Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130.
Cell 58, 573-581

TANI, K., M. MORIMOTO, T. HAYASHI, H. INOKUMA, T. OHNISHI, S. HAYASHIYA, T. NOMURA, S. UNE, M. NAKAICHI u. Y. TAURA (2002):
Evaluation of cytokine messenger RNA expression in peripheral blood mononuclear cells from dogs with canine demodicosis.
J Vet Med Sci 64, 513-518

TEN DIJKE, P., K. MIYAZONO u. C. H. HELDIN (2000):
Signaling inputs converge on nuclear effectors in TGF-beta signaling.
Trends Biochem Sci 25, 64-70

TIZARD, I. R. (2000):
Veterinary Immunology - An Introduction.
Verlag Saunders Company, Philadelphia, London

TRAUNER, M., P. FICKERT u. R. E. STAUBER (1999):
Inflammation-induced cholestasis.
J Gastroenterol Hepatol 14, 946-959

UMEHARA, Y., M. KUDO, R. NAKAOKA, T. KAWASAKI u. M. SHIOMI (2006):
Serum proinflammatory cytokines and adhesion molecules in ulcerative colitis.
Hepatogastroenterology 53, 879-882

USUI, T., M. TAKASE, Y. KAJI, K. SUZUKI, K. ISHIDA, T. TSURU, K. MIYATA, M. KAWABATA u. H. YAMASHITA (1998):
Extracellular matrix production regulation by TGF-beta in corneal endothelial cells.
Invest Ophthalmol Vis Sci 39, 1981-1989

UYTTENHOVE, C., P. G. COULIE u. J. VAN SNICK (1988):
T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor.
J Exp Med 167, 1417-1427

VAN BEUNINGEN, H. M., P. M. VAN DER KRAAN, O. J. ARNTZ u. W. B. VAN DEN BERG (1994):
Transforming growth factor-beta 1 stimulates articular chondrocyte proteoglycan synthesis and induces osteophyte formation in the murine knee joint.
Lab Invest 71, 279-290

VAN DER AUWERA, I., S. J. VAN LAERE, G. G. VAN DEN EYNDEN, I. BENOY, P. VAN DAM, C. G. COLPAERT, S. B. FOX, H. TURLEY, A. L. HARRIS, E. A. VAN MARCK, P. B. VERMEULEN u. L. Y. DIRIX (2004):
Increased angiogenesis and lymphangiogenesis in inflammatory versus noninflammatory breast cancer by real-time reverse transcriptase-PCR gene expression quantification.
Clin Cancer Res 10, 7965-7971

VAN WEEMEN, B. K. u. A. H. SCHUURS (1971):
Immunoassay using antigen-enzyme conjugates.
FEBS Lett 15, 232-236

VUKICEVIC, S. u. K. T. SAMPATH (2002):
Bone Morphogenetic Proteins.
Birkenhäuser Verlag, Basel, Boston

WAISER, J., K. BUDDE, A. KATALINIC, M. KUERZDORFER, R. RIESS u. H. H. NEUMAYER (1997):
Interleukin-6 expression after renal transplantation.
Nephrol Dial Transplant 12, 753-759

YALOW, R. S. u. S. A. BERSON (1960):
Immunoassay of endogenous plasma insulin in man.
J Clin Invest 39, 1157-1175

YAMAMOTO, K., F. W. QUELLE, W. E. THIERFELDER, B. L. KREIDER, D. J. GILBERT, N. A. JENKINS, N. G. COPELAND, O. SILVENNOINEN u. J. N. IHLE (1994):
Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation.
Mol Cell Biol 14, 4342-4349

YAMASAKI, K., T. TAGA, Y. HIRATA, H. YAWATA, Y. KAWANISHI, B. SEED, T. TANIGUCHI, T. HIRANO u. T. KISHIMOTO (1988):
Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor.
Science 241, 825-828

YAMASHITA, K., T. FUJINAGA, T. MIYAMOTO, M. HAGIO, Y. IZUMISAWA u. T. KOTANI (1994):
Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs.
J Vet Med Sci 56, 487-492

YOSHIDA, Y., S. TANAKA, H. UMEMORI, O. MINOWA, M. USUI, N. IKEMATSU, E. HOSODA, T. IMAMURA, J. KUNO, T. YAMASHITA, K. MIYAZONO, M. NODA, T. NODA u. T. YAMAMOTO (2000):
Negative regulation of BMP/Smad signaling by Tob in osteoblasts.
Cell 103, 1085-1097

YOUNG, D. G., G. SKIBINSKI, J. I. MASON u. K. JAMES (1999):
The influence of age and gender on serum dehydroepiandrosterone sulphate (DHEA-S), IL-6, IL-6 soluble receptor (IL-6 sR) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta1) levels in normal healthy blood donors.
Clin Exp Immunol 117, 476-481

ZAWEL, L., J. L. DAI, P. BUCKHAULTS, S. ZHOU, K. W. KINZLER, B. VOGELSTEIN u. S. E. KERN (1998):
Human Smad3 and Smad4 are sequence-specific transcription activators.
Mol Cell 1, 611-617

ZEIDLER, C., L. KANZ, F. HURKUCK, K. L. RITTMANN, I. WILDFANG, T. KADOYA, T. MIKAYAMA, L. SOUZA u. K. WELTE (1992):
In vivo effects of interleukin-6 on thrombopoiesis in healthy and irradiated primates.
Blood 80, 2740-2745

ZHONG, Z., Z. WEN u. J. E. DARNELL, JR. (1994):
Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6.
Science 264, 95-98

ZIYADEH, F. N., K. SHARMA, M. ERICKSEN u. G. WOLF (1994):
Stimulation of collagen gene expression and protein synthesis in murine mesangial cells by high glucose is mediated by autocrine activation of transforming growth factor-beta.
J Clin Invest 93, 536-542

9 Tabellen

Tabelle 6: Diagnosen der Hunde mit IL-6-Konzentrationen [pg/ml]

Tier Nr.	IL-6	Diagnose
3	0	Diabetes mellitus
18	0	Gesund
19	0	Gesund
20	0	Gesund
21	0	Gesund
22	0	Gesund
23	0	Gesund
32	0	Gesund
34	0	Gesund
36	50	Morbus Addison
37	0	Malignes Lymphom
39	0	Leydig-Zelltumor
40	149	Hämangiosarkom
42	0	Osteomyelitis
43	0	Exokrine Pankreasinsuffizienz
45	0	Niereninsuffizienz
46	0	Pyometra
47	0	Leberzelldegeneration
48	0	Gesund
49	0	Malignes Lymphom
50	59	Pyometra
51	0	Lymphoplasmazelluläre Gastritis und Jejunitis
52	1398	Canine Ceroid Lipofuszinose
53	182	Leberzelldegeneration
54	194	Leberzelldegeneration
55	0	Anaplasmose
56	0	Eitrige Zahnwurzelentzündung
58	19	Sialozele
59	0	Perikarderguss
60	13	Hämangiosarkom
61	0	V. a. Lungenfibrose
62	0	Gallengangskarzinom
63	0	Aspirationspneumonie
64	0	Nekrosen im Gekröse und Leberparenchym
65	0	Eosinophile und lymphoplasmazelluläre Enteritis
66	0	Niereninsuffizienz
67	0	Benigne Milzhyperplasie

68	0	Rhabdomyosarkom
69	0	Leberkarzinom
70	0	V. a. Lungenfibrose
71	0	Diabetes mellitus
72	0	Pankreatitis
73	0	Wundheilungsstörung nach OHE
74	0	Lymphoplasmazelluläre und follikuläre Gastritis
76	0	Pankreatitis
78	0	Niereninsuffizienz
81	0	Morbus Cushing
82	0	Pankreatitis
83	0	Anämie
84	0	Übergangsepithelkarzinom der Urethra
85	0	Anämie
86	0	Myasthenia gravis
87	0	Diabetes mellitus
88	21	Idiopathische Epilepsie
89	29	Peritonitis
90	0	Diabetes mellitus
91	0	Lymphatische Leukämie
92	0	Protein-loosing-enteropathy
94	7	Mastozytom, Grad II-III
95	0	Mastozytom, Grad II
96	412	Pankreatitis
97	0	Torsio Ventriculi
98	0	Niereninsuffizienz
100	1680	Niereninsuffizienz
101	8	Niereninsuffizienz
102	0	Diabetes mellitus
103	0	Mammatumor, nicht näher differenziert
104	0	Sarkoptesräude
105	130	Fieber unbekannter Genese
106	0	Enteritis
107	55	Adenokarzinom der Mamma
108	0	Malignes Lymphom
110	0	Myelotische Leukämie
111	0	Chronische Hepatitis
112	0	Lymphoplasmazelluläre Enteritis
113	127	Adenokarzinom der Mamma
114	0	Lymphoplasmazelluläre Enteritis
115	0	Malignes Lymphom
116	0	Leberzelldegeneration

117	0	Gesund
118	0	Leberzelldegeneration
119	0	Gesund
120	0	Gesund
121	0	Herzbasistumor
122	0	Gesund
123	0	Niereninsuffizienz
124	0	Eosinophile Enteritis
125	0	Gesund
126	0	Gesund
127	0	Gesund
128	0	Gesund
129	0	Gesund
130	0	Gesund
131	0	Gesund
132	0	Gesund
133	0	Gesund
134	0	Infektion, nicht näher differenziert
135	0	Gesund
136	0	Anämie
137	0	Gesund
139	0	Hypothyreose
140	0	Diabetes mellitus
141	0	Leberzelldegeneration
142	0	Neuropathie
143	0	Gesund
144	0	Morbus Cushing
145	0	Vomitus
146	197	Rezidivierende Tonsilitis
147	0	Gesund
148	0	Gesund
149	0	Leberzelldegeneration
150	0	Gesund
151	0	Gesund
152	0	Gesund
153	0	Torsio Ventriculi
154	0	Inselzellkarzinom
155	0	Harnwegsentzündung
156	0	Benigne Milzhyperplasie
157	0	Gesund (Verlaufsmessung OHE)
158	36	Übergangsepithelkarzinom der Urethra
159	0	Torsio Ventriculi

160	21	Niereninsuffizienz
161	0	Lungentumor, nicht weiter differenziert
162	42	Benigne Milzhyperplasie
163	0	Morbus Cushing
164	0	Ductales Papillom der Mamma
165	0	Portocavaler Shunt
166	0	Enteritis
167	0	Malignes Lymphom
169	0	Harnwegsentzündung
171	0	Hämangioperizytom
172	26	Prostataabszess
173	99	Pyometra
174	28	Pyometra
176	0	Gesund
177	0	Gesund
178	0	Gesund
179	0	Gesund
180	0	Harnblasenpolyp
181	0	Gesund
182	0	Gesund
183	0	Niedrig differenziertes Sarkom der Milz
184	0	Gesund
185	0	Gesund
186	0	Gesund
187	0	Pyometra
188	0	Adenokarzinom der Mamma
189	27	Gesund
190	41	Ulzerative Gastritis
191	2828	Aspirationspneumonie
192	0	Gesund
193	0	Gesund
194	0	Lymphoplasmazelluläre Enteritis
195	0	Lungentumor, nicht weiter differenziert
196	0	Gesund
197	0	Diabetes mellitus
198	0	Gesund
199	0	Mastozytom, Grad I
200	24	Perikarderguss
201	0	Pyometra
202	0	Hämangiosarkom
203	0	Leberfibrose
204	0	Nekrotisches Milzgewebe

Tabelle 7: Demographische Daten der Hunde mit IL-6 Messungen

Eigenschaften	gesund (n = 45)	krank (n = 118)
Hunderassen		
Mischlinge	17 (37,8 %)	38 (32,2 %)
Retriever	7 (15,6 %)	11 (9,3 %)
Terrier	5 (11,1 %)	14 (11,9 %)
Vorstehhunde	0	8 (6,8 %)
Teckel	0	6 (5,1 %)
Deutsche Schäferhunde	0	6 (5,1 %)
Hütehunde	0	5 (4,2 %)
andere (≤ 3 Hunde pro Rasse)	16 (35,6 %)	30 (25,4 %)
Geschlecht		
Männlich	21 (46,7 %)	61 (51,7 %)
Intakt	15 (71,4 %)	43 (70,5 %)
Kastriert	6 (28,6 %)	18 (29,5 %)
Weiblich	24 (53,3 %)	57 (48,3 %)
Intakt	17 (70,8 %)	24 (42,1 %)
Kastriert	7 (29,2 %)	33 (57,9 %)
Alter		
< 4 Jahre	32 (71,1 %)	14 (11,9 %)
4 - 7 Jahre	10 (22,2 %)	19 (16,1 %)
8 - 11 Jahre	3 (6,7 %)	51(43,2 %)
> 11 Jahre	0 (0 %)	34 (28,8 %)

Tabelle 8: Rassenverteilung gesunder Hunde bei IL-6-Messung mit 3 und weniger Vertretern.

Rasse	Anzahl je Rasse (%)	gesamt
Bracken, Hütehunde, Schäferhunde	3 (6,7 %)	6,7
Molosser	2 (4,4 %)	4,4
Großpudel, Hannoverscher Schweißhund, Lhasa Apso, Appenzeller Sennenhund, Langhaarteckel	1 (2,2 %)	11,1

Tabelle 9: Rassenverteilung kranker Hunde mit IL-6-Messung mit 3 und weniger Vertretern

Rasse	Anzahl je Rasse (%)	gesamt
Boxer, Briard, Pudel	3 (2,5 %)	9
Beagle, Deutscher Wachtelhund, Molosser, Sennehund	2 (1,7 %)	8
Beauceron, Bernhardiner, Dachsbracke, Chow Chow, Deutsche Dogge, Dobermann, Hovawart, Kaukasischer Owtscharka, Mops, Neufundländer, Puggle, Rhodesian Ridgeback und Rottweiler	1 (0,85 %)	13

Tabelle 10: Erkrankungen, die nur bei 3 und weniger Hunden mit IL-6-Bestimmung aufgetreten sind

Erkrankung	Anzahl je Erkrankung (n)	gesamt
Morbus Cushing, Torsio ventriculi, Anämie, benigne Milzhyperplasie	3	12
Lungenfibrose, Krampfanfall	2	4
Perikarderguss, Fieber unklaren Ursprungs, Morbus Addison, exokrine Pankreasinsuffizienz, portocavaler Shunt, hochgradig nekrotisches Milzgewebe, Milzhyperplasie durch Ausweitung der extramedullären Hämatopoese, Leberfibrose, Myasthenia gravis, Sarkoptesräude, Husten, unklare Infektionskrankheit (V. a. Anaplasmose), Hypothyreose, Neuropathie, Lebernekrosen, Sialozele, Harnblasenpolyp, Vomitus	1	18

Tabelle 11: perioperative IL-6-Konzentrationen

Patient	**Art der Operation**	**IL-6 Konzentration [pg/ml]**				
		vor OP	Ende OP	2 h nach OP	4 h nach OP	24 h nach OP
117	OHE	0	0	0	k. W.	k. W.
119	OHE	0	0	0	k. W.	k. W.
120	OHE	0	0	0	k. W.	k. W.
122	OHE	0	0	0	0	k. W.
143	OHE	0	0	0	0	k. W.
156	Splenektomie	0	0	0	0	k. W.
157	OHE	0	0	7	k. W.	0
166	Enterotomie	0	0	0	k. W.	426
169	Zystotomie	0	0	0	k. W.	0
174	OHE bei Pyometra	28	28	28	k. W.	0
181	OHE	0	0	0	0	0

(OP – Operation, OHE- Ovarhyster-ektomie [zur Fertilitätskontrolle, wenn nicht anders angegeben], k. W. – keine Werte)

Tabelle 12: Erkrankungen der Hunde mit TGF-β1-Konzentrationen [ng/ml]

Tier Nr.	TGF-β1	Diagnose
1	25,9	Benigne Milzhyperplasie
2	38,0	Benigne Milzhyperplasie
3	23,9	Diabetes mellitus
4	28,8	Gesund
6	32,9	Gesund
7	27,2	Gesund
8	41,2	Gesund
9	44,8	Gesund
10	53,1	Gesund
11	26,4	Gesund

12	41,5	Gesund
13	46,0	Myasthenia gravis
14	48,5	Gesund
15	29,2	Gesund
16	40,8	Gesund
17	30,9	Gesund
18	40,6	Gesund
19	40,8	Gesund
20	33,5	Gesund
22	33,8	Gesund
23	34,6	Gesund
24	37,0	Lungenproblematik
25	39,2	Gesund
26	31,5	Gesund
27	29,3	Gesund
28	32,4	Gesund
29	38,6	Gesund
30	39,8	Gesund
31	37,5	Gesund
32	41,4	Gesund
33	41,9	Leberzelldegeneration
34	40,2	Gesund
35	38,2	Gesund
36	37,8	Morbus Addison
37	33,5	Malignes Lymphom
38	52,5	Lebertumor, nicht weiter differenziert
39	50,3	Leydig-Zelltumor
40	21,0	Hämangiosarkom
41	44,7	Karzinom der Mamma
42	25,4	Osteomyelitis
43	29,5	Exokrine Pankreasinsuffizienz
45	28,5	Niereninsuffizienz
46	22,0	Pyometra
47	19,6	Leberzelldegeneration
48	7,8	Gesund
49	23,2	Malignes Lymphom
50	4,2	Pyometra
51	16,3	Lymphoplasmazelluläre Gastritis und Jejunitis
52	7,3	Canine Ceroid Lipofuszinose
53	3,8	Leberzelldegeneration

54	19,9	Leberzelldegeneration
55	16,5	Anaplasmose
56	36,5	Eitrige Zahnwurzelentzündung
57	18,8	Leberzelldegeneration
58	14,3	Sialozele
59	13,8	Pericarderguss
60	19,5	Hämangiosarkom
61	32,6	V. a. Lungenfibrose
62	48,5	Gallengangskarzinom
63	24,2	Aspirationspneumonie
64	85,1	Nekrosen im Gekröse und Leberparenchym
65	24,0	Eosinophile und lymphoplasmazelluläre Enteritis
66	29,6	Niereninsuffizienz
67	65,1	Benigne Milzhyperplasie
68	40,5	Rhabdomyosarkom
69	61,9	Leberkarzinom
70	91,2	V. a. Lungenfibrose
71	82,6	Diabetes mellitus
72	28,3	Pankreatitis
73	69,7	Wundheilungsstörung nach OHE
74	29,5	Lymphoplasmazelluläre und follikuläre Gastritis
75	61,1	V. a. Lungenfibrose
76	38,3	Pankreatitis
78	24,9	Niereninsuffizienz
79	64,3	Lebertumor, nicht weiter differenziert
81	65,1	Morbus Cushing
82	37,4	Pankreatitis
84	23,9	Übergangsepithelkarzinom in der Urethra
85	50,5	Anämie
86	41,5	Myasthenia gravis
87	57,4	Diabetes mellitus
89	48,3	Peritonitis
90	80,2	Diabetes mellitus
91	37,0	Lymphatische Leukämie
92	31,9	Protein-loosing-enteropathy
94	40,7	Mastozytom, Grad II-III
95	53,5	Mastozytom, Grad II
96	49,3	Pankreatitis
97	18,3	Torsio ventriculi
98	50,8	Niereninsuffizienz

100	43,2	Niereninsuffizienz
101	3,1	Niereninsuffizienz
102	64,3	Diabetes mellitus
103	43,3	Mammatumor, nicht weiter differenziert
104	42,8	Sarkoptesräude
106	37,9	Enteritis
107	58,9	Adenokarzinom der Mamma
110	28,1	Myelotische Leukämie
111	41,1	Chronische Hepatitis
112	66,5	Lymphoplasmazelluläre Enteritis
113	51,0	Adenokarzinom der Mamma
114	55,4	Lymphoplasmazelluläre Enteritis
115	31,0	Malignes Lymphom
116	47,6	Leberzelldegeneration
118	53,3	Leberzelldegeneration
119	36,3	Gesund
121	65,6	Herzbasistumor
123	21,0	Niereninsuffizienz
124	55,5	Eosinophile Enteritis
129	57,0	Gesund
131	51,4	Gesund
148	37,4	Gesund
156	31,9	Benigne Milzhyperplasie
185	37,7	Gesund
186	39,5	Gesund
189	32,7	Gesund
192	22,7	Gesund
193	39,9	Gesund
196	44,4	Gesund
197	106,7	Diabetes mellitus
198	50,9	Gesund
202	41,8	Hämangiosarkom
203	54,0	Leberfibrose
204	51,6	Nekrotisches Milzgewebe
206	23,9	Seminom
207	76,3	Lungenfibrose
208	71,2	Hepatitis
209	54,2	Gesund
210	40,3	Gesund
211	24,7	Gesund

212	52,3	Gesund
213	58,6	Gesund
214	91,3	Pankreatitis
215	32,0	Gesund
216	33,4	Gesund
217	30,6	Gesund
218	37,9	Gesund
220	25,7	Gesund
221	85,7	Diabetes mellitus
223	43,7	Gesund
224	36,7	Gesund
225	24,9	Gesund
226	44,6	Gesund
227	93,0	Leberfibrose
228	46,9	Dermatitis
229	65,7	Gesund
230	46,5	Gesund
231	20,2	Hirntumor, nicht weiter differenziert
232	60,2	Leberzelldegeneration
233	39,9	Vomitus
235	39,8	Adenokarzinom des Colons
236	46,7	Exokrine Pankreasinsuffizienz
237	37,1	Gesund
239	41,2	Gesund
240	35,6	Gesund
241	52,8	histiozytäres Sarkom
242	38,8	Gesund
243	43,0	Gesund
244	37,5	Gesund
245	45,9	Hämangioperizytom
246	36,3	Tracheitis/Bronchitis
247	49,9	Gesund
248	33,8	Gesund
249	71,9	Leberzelldegeneration
250	43,0	Gesund
251	37,2	Pyometra
252	34,7	Gesund
253	62,2	Gesund
254	39,8	Gesund

Tabelle 13: Demographische Daten der Hunde mit TGF-β1-Messung

Eigenschaften	gesund (n = 67)	krank (n = 102)
Hunderassen		
Mischlinge	24 (35,8 %)	29 (28,4 %)
Retriever	11 (16,4 %)	8 (7,8 %)
Terrier	4 (6 %)	18 (17,6 %)
Vorstehhunde	4 (6 %)	6 (5,9 %)
Teckel	0	8 (7,8 %)
Deutsche Schäferhunde	5 (7,5 %)	7 (6,5 %)
Wachtelhunde	5 (7,5 %)	0
Hütehunde	0	4 (3,9 %)
andere (≤ 3 Hunde pro Rasse)	14 (21,9 %)	22 (21,6 %)
Geschlecht		
männlich	30 (44,8 %)	57 (55,9 %)
intakt	20 (66,7 %)	38 (66,7 %)
kastriert	10 (33,3 %)	19 (33,3 %)
weiblich	37 (55,2 %)	45 (44,1 %)
intakt	25 (67,6 %)	29 (64,4 %)
kastriert	12 (32,4 %)	16 (35,6 %)
Alter		
< 4 Jahre	43 (64,2 %)	10 (9,8 %)
4 - 7 Jahre	12 (17,9 %)	17 (16,7 %)
8 - 11 Jahre	9 (13,4 %)	42 (41,2 %)
> 11 Jahre	3 (4,5 %)	33 (32,4 %)

Tabelle 14: Rassenverteilung gesunder Hunde mit TGF-ß1-Messung mit 3 oder weniger Vertretern

Rasse	Anzahl je Rasse (%)	gesamt
Beagle, Molosser	2	4
Tiroler Bracke, Dalmatiner, Dobermann, Hovawart, Schapendoes, Landseer, Rhodesian Ridgeback, Rottweiler, Cavalier King Charles Spaniel, Rauhaarteckel	1	10

Tabelle 15: Rassenverteilung kranker Hunde mit TGF-ß1-Bestimmung mit 3 und weniger Vertretern

Rasse	Anzahl je Rasse (%)	gesamt
Boxer, Pudel	3 (2,9 %)	6
Briard, Deutscher Wachtelhund, Berner Sennenhund	2 (2,0 %)	6
Beagle, Beauceron, Bernhardiner, Dachsbracke, Deutsche Dogge, Dobermann, Englische Bulldogge, Neufundländer, Puggel, Whippet	1 (1,0 %)	10

Tabelle 16: Erkrankungen von Hunden mit TGF-ß1-Bestimmung als Verschiedene zusammengefasst

Erkrankung	Anzahl je Erkrankung (%)	gesamt
Milzhyperplasie	4	4
Myasthenia gravis, exokrine Pankreasinsuffizienz	2	4
Morbus Cushing, immunhämolytische Anämie, Anaplasmose, unspezifische Lungenerkrankung, Torsio ventriculi, Morbus Addison, Lebernekrosen, Perikarderguss, Sarkoptesräude, Sialozele, chronisches Erbrechen, zerebrales Anfallsleiden, nekrotisches Milzgewebe	1	13

10 Referenzwerte

Referenzwerte Hämatologie Abbott Cell-Dyn®3500R/Abbott Cell-Dyn®3700 (Fa. Abbott GmbH & Co KG, Wiesbaden)

Messwert	Referenzwert
WBC	6 - 12 K/µl
NEU	55 - 75 %
LYM	13 - 33 %
MONO	0 - 5 %
EOS	0 - 4 %
BASO	0 - 1 %

Messwert	Referenzwert
RBC	5,5 - 8,5 M/µl
HGB	15 - 19 g/dl
HCT	44 - 52 %
MCV	60 - 77 fL
MCH	17 - 23 pg
MCHC	31 - 34 g/dl
PLT	200 - 400 K/µl

Referenzwerte Klinische Chemie Konelab 20i (Fa. Thermo Fischer Scientific Inc., Dreieich)

Messwert	Referenzwert
Glucose	70 - 120 mg/dl
Fructosamin	0 - 370 µmol/l
Gallensäuren	0 - 20 µmol/l
GLDH	0 - 9,5 U/l
ALT	0 - 55 U/l
AST	0 - 41 U/l

T-BIL	0 - 0,4 mg/dl
alkalische Phosphatase	0 - 150 U/l
Gesamteiweiß	5,4 - 7,5 g/dl
Albumin	2,5 - 4,4 g/dl
Kreatinin	0,4 - 1,4 mg/dl
Harnstoff	20 - 50 mg/dl
Calcium	2,3 - 3,0 mmol/l
Phosphor	0,7 - 1,6 mmol/l
Alpha-Amylase	0 - 1056 U/l
Cholesterin	120 - 390 mg/dl
Lipase	0 - 300 U/l
Kreatinkinase	0 - 100 U/l
Kalium	3,5 - 5,1 mmol/l
Natrium	140 - 155 mmol/l
CRP	0 - 15 mg/l
Globulin	2,51 - 4,51 g/dl

Referenzwerte SCA 2000 (Fa. Synbiotics, San Diego, California)

Messwert	**Referenzwert**
PT	12 - 17 sec
PPT	71 - 102 sec

Danksagung

Mein Dank gilt Prof. Dr. Franz-Josef Kaup für die Überlassung des Themas und seinen freundlichen, kollegialen und aufmunternden Zuspruch.

Prof. Dr. Stephan Neumann danke ich für die stetige und andauernde Unterstützung bei der Umsetzung der Fragestellung. Die kollegialen und freundschaftlichen Diskussionen werden mir in Erinnerung bleiben und mir Vorbild für die Zukunft sein.

Diese Arbeit wäre nicht mögliche gewesen ohne die Unterstützung aller Mitarbeiter der Kleintierklinik des Tierärztlichen Institutes der Georg-August-Universität Göttingen.
Besonderer Dank gilt meinen Mitdoktoranden Almuth, Wendy und Julia, sowie meiner Kollegin Uta, die mich während dieser Arbeit tatkräftig unterstützten. Eure Freundschaft ist ein Geschenk, das mir hoffentlich lebenslang erhalten bleibt.

Thomas Kinder aus der Rinderhygiene danke ich für die überaus freundliche Aufnahme in sein Labor. Große Unterstützung bekam ich dort von Sebastian Schimkowiak, der es immer schaffte gute Laune zu verbreiten, sowie alle möglichen, sowie unmöglichen Arbeitsmaterialien zu besorgen.

Dr. Claudia Goldmann danke ich für die Einführung in die Welt der ELISA, sowie die Unterstützung bei der Auswertung meiner ersten Versuche.

Ein großes Dankeschön geht an Prof. Dr. Tim Beißbarth, der die statistische Auswertung dieser Arbeit übernahm.

Petra Schnüll danke ich sehr herzlich für das Korrigieren dieser Arbeit.

Meinen Eltern, Barbara und Willibert Scheulen, danke ich von Herzen, dass Sie uns Kinder immer haben wissen lassen, dass sie hinter uns stehen. Sie haben mein Studium und diese Arbeit erst möglich gemacht.

Meiner Tante Ulli Mattern danke ich dafür, dass sie mir mitgegeben hat, dass es sich lohnt für Ziele zu kämpfen. Auch wenn es manchmal hart ist. Weiterhin danke ich ihr sehr für die finanzielle Unterstützung während des Studiums und der Promotionszeit.

Jochen - ich bin Dir unendlich dankbar, dass Du mich auf diesem Weg begleitet hast.