

Einleitung

Der heutige Praktikumstag befasst sich mit dem Thema Harn. Als Harn bezeichnet man das Ausscheidungsprodukt der Niere. Es besteht aus verschiedenen Stoffen, die sich grob in anorganische Harnbestandteile (z.B. Ionen) und organische Harnbestandteile (z.B. Harnstoff, Kreatinin) einteilen lassen. Bei Erkrankungen kann sich die Harnzusammensetzung charakteristisch ändern – es können zudem pathologische Harnbestandteile auftreten.

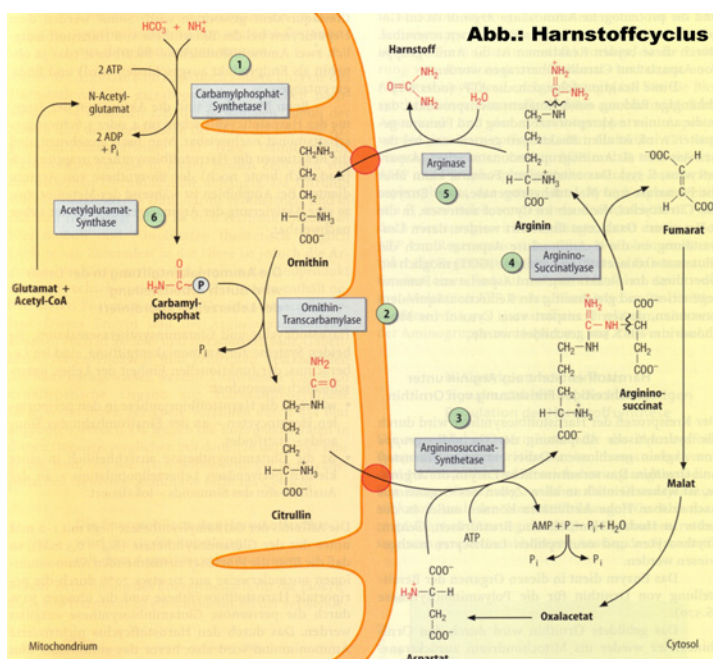
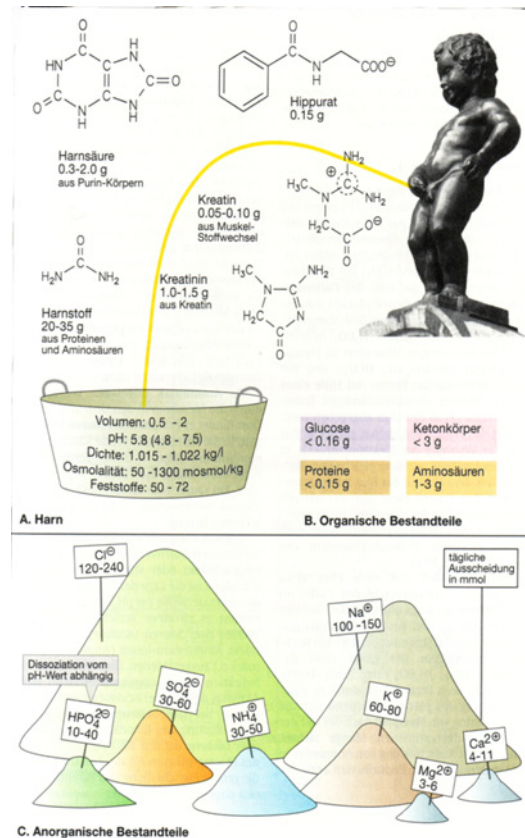
Über den Harn kann der Körper nicht verwertbare Stoffwechselendprodukte und giftige Substanzen ausscheiden sowie den Säure/Base- und Elektrolyt-Haushalt regulieren

Versuch 1: Harnstoff

Harnstoff stellt bei ureotelischen Lebewesen (Säugetiere, Amphibien) das Ausscheidungsprodukt des starken Zellgiftes Ammoniak dar, welches beim Abbau von Aminosäuren entsteht. Harnstoff ist ungiftig, gut wasserlöslich, ungeladen und wird in der Leber über eine cyclische Reaktionsfolge gebildet (→ Harnstoffcyclus).

Aminosäuren können vom Organismus nicht gespeichert werden und müssen folglich verstoffwechselt oder umgebaut bzw. ausgeschieden werden. Während das entstehende Kohlenstoffgerüst in Stoffwechselzwischenprodukte (z.B. Pyruvat, Acetyl-CoA) umgewandelt werden kann, wird die α -Aminogruppe entweder über Transaminierung auf eine Ketosäure übertragen (z.B. zum Zwecke des Transports, der Speicherung, des Aminosäure-Aufbaus) oder über oxidative Desaminierung als Ammonium-Ion abgekoppelt.

Das Ammonium-Ion wird nun in den Harnstoffcyclus eingeschleust: in einer ersten Reaktion (katalysiert durch die Carbamoylphosphat-Synthetase) entsteht unter ATP-Verbrauch aus Bicarbonat und Ammonium ein Molekül Carbamoylphosphat. Dieses wird durch die Ornithin-Carbamoyl-Transferase an Ornithin gekoppelt, wodurch Citrullin entsteht. Diese Reaktion ist notwendig, da Carbamoylphosphat die



Mitochondrien-Matrix nicht verlassen kann, Citrullin aber über einen Ornithin-Citrullin-Antiporter ins Cytosol gelangen kann. Dort wird es über die Argininosuccinat-Synthetase unter ATP-Verbrauch an Aspartat gekoppelt. Es entsteht Argininosuccinat, das durch die Argininosuccinat-Lyase zu Fumarat und Arginin gespalten wird. Fumarat stellt nun eine Verbindung zu anderen Stoffwechselwegen dar: über einen Umbau zu Malat und dann zu Oxalacetat kann Fumarat in die Gluconeogenese münden, zu Pyruvat umgewandelt und damit in den Citronensäurecyclus eingeschleust oder wieder zu Aspartat transaminiert werden. Das entstandene Arginin wird mit Wasser durch die Arginase zu Harnstoff (welcher im Urin ausgeschieden wird) und Ornithin (was wieder durch den Ornithin-Citrullin-Antiporter in die Mitochondrien-Matrix gelangen kann) gespalten. Hier schliesst der Cyclus.

Versuch:

Beim folgenden Versuch wird die Harnstoffbiosynthese in Abhängigkeit von dem Vorhandensein verschiedener Substrate untersucht.

8 Reagenzgläser werden nach Pipettierschema I gefüllt:

Pipettierschema I
(Angaben in ml)

	1	2	3	4	5	6	7	8
Inkubationspuffer	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
L-Citrullin	-	-	-	-	-	-	0,1	-
L-Arginin	-	-	-	-	-	-	-	0,1
L-Ornithin	-	0,1	-	0,1	0,1	0,1	-	-
Carbamoyl-phosphat	-	-	0,1	0,1	-	-	-	-
NH ₄ HCO ₃	-	-	-	-	0,1	0,1	-	-
N-Acetylglutamat	-	-	-	-	-	0,1	-	-
H ₂ O dest.	0,3	0,2	0,2	0,1	0,1	-	0,2	0,2

Der Inkubationspuffer besteht aus L-Aspartat und ATP, sowie 3-Phosphoglycerat, das verbrauchtes ATP im Pyruvatkinase-Schritt regenerieren kann (Reaktionsablauf siehe Abbildung). Die hierfür benötigten, aus der Glykolyse stammenden Enzyme (Phosphoglyceratmutase, Enolase, Pyruvatkinase) befinden sich ebenso im Leberextrakt.

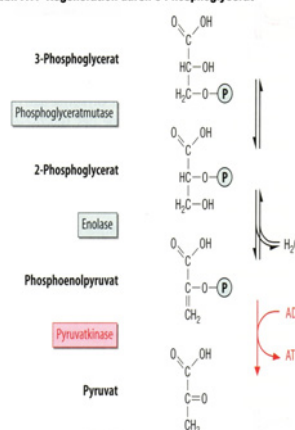
Nach dem Befüllen werden die Proben-Reagenzgläser sowie ein Reagenzglas mit Schweineleberextrakt fünf Minuten lang im Wasserbad bei 37°C vorinkubiert. Danach werden 0,9ml des Leberextrakts in Reagenzgläser 1 bis 8 pipettiert und wieder im Wasserbad 30 Minuten lang inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation – der Überstand wird nach Pipettierschema II übertragen:

Pipettierschema II

(Angaben in ml; Vorsicht! Das Säuregemisch enthält konzentrierte Schwefelsäure und Phosphorsäure! Schutzbrille tragen!)

Zugabe von:	Leerwert	1	2	3	4	5	6	7	8
Überstand der Zentrifugation	-	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0
H ₂ O dest.	4,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Säuregemisch	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Harnstoff-reagenz	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2

Abb.: ATP-Regeneration durch 3-Phosphoglycerat



Anschließend werden die Extinktionswerte der Proben bei 570nm gemessen (die Extinktion beruht auf einer Reaktion des entstandenen Harnstoffes mit beigegebenem Isonitrosopropiophenon → es entsteht eine rotgefärbte Verbindung).

Aus der Differenz der Probe und des Leerwerts kann man mittels Lambert-Beerschen Gesetz die entstandene Harnstoffmenge (Spalte "µmol Harnstoff pro Ansatz") berechnen.

$$E = \epsilon \times c \times d \times V / v \rightarrow c = E \times v / \epsilon \times d \times V$$

Werte:

$$\epsilon = 1,9 \times 10^3 \text{ l / mol} \times \text{cm}$$

$$d = 1 \text{ cm}$$

E = Extinktionsdifferenz des jeweiligen Proben-Reagenzglas

V = Testvolumen (Gesamtvolumen in ml)

v = Probenvolumen (Anteil der Probe in ml)

Für die Spalte „ $\mu\text{mol Harnstoff pro mg Protein und h}$ “ muss als erstes die Proteinkonzentration im Leberextrakt berechnet werden. Hierzu wird nach Pipettierschema III das restliche Leberextrakt einer Proteinbestimmung nach der Biuretmethode unterzogen:

Pipettierschema III
(Angaben in ml)

	Leerwert	Analyse
0,9% NaCl	0,5	0,4
Leberextrakt	-	0,1
Biuretreagenz	0,5	0,5

Danach wird die Extinktion ermittelt. Sie beträgt 0,168.

Daraus lässt sich über eine von einer Proteineichkurve abgeleiteten Formel die Proteinkonzentration bestimmen:

$$c = E_{546\text{nm}} \times 5,33 \text{ mg} / 100 \mu\text{l} \quad \text{für } E = 0,168$$

$$c = \mathbf{0,0089544 \text{ mg} / \mu\text{l}} \quad \text{entspricht } \rightarrow \mathbf{8,95 \text{ mg} / \text{ml}}$$

umgerechnet auf die Menge des eingesetzten Leberextrakts ($\rightarrow 0,9\text{ml}$):

$$8,95 \text{ mg} / \text{ml} \times 0,9 \text{ ml} = \mathbf{8,055 \text{ mg}}$$

Im zugegebenen Leberextrakt befinden sich also 8,055mg Protein. Um nun auf die Ergebnisse der Spalte „ $\mu\text{mol Harnstoff pro mg Protein und h}$ “ zu kommen muss folgende Rechenoperation durchgeführt werden:

$$\mathbf{„\mu\text{mol Harnstoff pro Ansatz}“ \times 2 / 8,055\text{mg} = „\mu\text{mol Harnstoff pro mg Protein und h}“}$$

Erläuterung:

x2 wegen der Inkubationszeit (in der ersten Spalte wurde das Gemisch 30 Minuten inkubiert, x2 rechnet auf eine Stunde)

/ 8,055mg um auf den Wert für 1 mg Protein zu kommen

Ergebnisse:

Glas-Nr.:	ΔE_{570}	$\Delta E_{570} - \Delta E_{570, \text{Glas 1}}$	$\mu\text{mol Harnstoff pro Ansatz}$	$\mu\text{mol Harnstoff pro mg Protein und h}$
1	0,040	---	---	---
2	0,044	0,004	7,58	1,88
3	0,064	0,024	45,47	11,28
4	0,157	0,117	221,68	55,01
5	0,041	0,001	1,9	0,47
6	0,048	0,008	15,16	3,76
7	0,524	0,484	917,05	227,59
8	1,089	1,049	1987,58	493,26

Auswertung:

Reagenzglas 1: „Leerwert“

Sollte den niedrigsten Wert liefern. Die äußerst geringe stattfindende Harnstoffbiosynthese beruht auf der Zugabe des Leberextrakts (darin finden sich neben den Enzymen auch geringe Mengen aller Substrate)

Reagenzglas 2: L-Ornithin

Wert sollte ähnlich dem des ersten Reagenzglas sein. Hier ist Ornithin zwar im Überschuss vorhanden, Carbamoylphosphat jedoch nicht, womit Carbaoylphosphat zum geschwindigkeitsbestimmenden Substrat wird.

Reagenzglas 3: Carbamoylphosphat

Wert sollte ähnlich dem des ersten und zweiten Reagenzglas liegen, da Carbamoylphosphat eine energiereiche und damit instabile Verbindung ist und schnell zerfällt.

Reagenzglas 4: L-Ornithin, Carbamoylphosphat

Sollte den dritthöchsten Wert liefern. Nun sind beide Reaktionspartner im Überschuss vorhanden, Citrullin wird hergestellt.

Reagenzglas 5: L-Ornithin, NH_4HCO_3

Sollte den fünfthöchsten Wert liefern. NH_4^+ und HCO_3^- stehen zur Synthese von Carbamoylphosphat zur Verfügung, Ornithin steht zur Ankoppelung bereit – allerdings benötigt die Carbamoylphosphat-Synthetase N-Acetylglutamat als Aktivator (liegt nur in kleiner Konzentration aus Leberextrakt vor).

Reagenzglas 6: L-Ornithin, NH_4HCO_3 , N-Acetylglutamat

Sollte den vierthöchsten Wert liefern. Wie Reagenzglas 5 – hier liegt jedoch N-Acetylglutamat vor, so dass Carbamoylphosphat gebildet werden kann, das im nächsten Schritt an Ornithin gekoppelt wird. Da Carbamoylphosphat erst hergestellt werden muss, ist die Reaktion etwas langsamer als Reagenzglas 4, in dem Carbamoylphosphat bereits zugegeben wird.

Reagenzglas 7: L-Citrullin

Sollte den zweithöchsten Wert liefern. Hier wird Citrullin zugegeben – es muss nicht erst Carbamoylphosphat oder Citrullin selbst hergestellt werden. Damit hat es einen kürzeren Weg zum Harnstoff als die anderen Gemische bisher.

Reagenzglas 8: L-Arginin

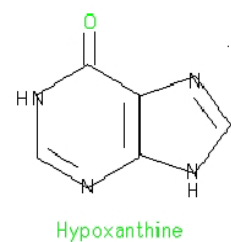
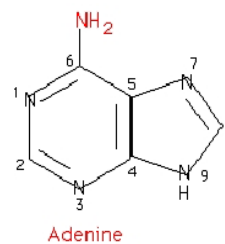
Sollte den höchsten Wert liefern. Arginin ist die unmittelbare Vorstufe des Harnstoff. Da es im Überschuss zugegeben wird beruht die Bildung von Harnstoff nun auf der Geschwindigkeit des Enzyms Arginase. Somit kann dieser Test als Aktivitätsbestimmung der Arginase benutzt werden.

Versuch 2: Harnsäure

Harnsäure stellt beim Menschen die Ausscheidungsform der Purine dar.

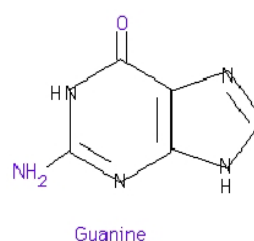
Chemische Strukturen

- Bausteine von **Nukleotiden** und **Coenzymen**
- Die chemischen Formeln der Purine



Stoffwechsel der Purine

- Aufnahme: Der Mensch nimmt zwar Purine aus der Nahrung im Darm auf, diese erreichen aber nur in minimalsten Mengen die Leber. Der grösste Teil wird im Darm in Harnsäure übergeführt und via Stuhl und Urin ausgeschieden. Die Aufnahme erfolgt in Form der freien Base oder des Nukleosids mittels membranärer Transportsysteme. In der Zelle werden Basen und Nukleoside in Nukleotide übergeführt.



Abbau der Purinbasen

Nicht wiederverwertetes Guanin wird durch Desaminierung in **Xanthin** übergeführt. Hypoxanthin und Xanthin werden in der Leber und (für mit der Nahrung aufgenommene Purinbasen) im Darmepithel durch

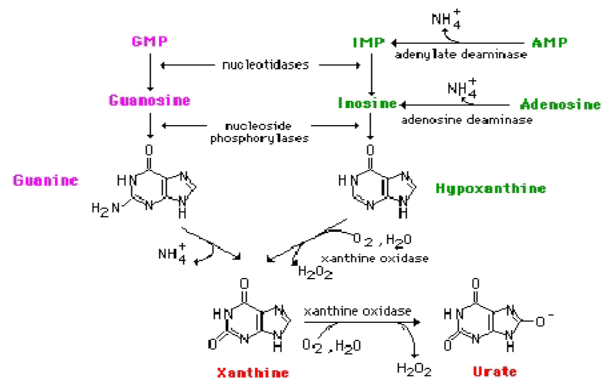
durch das Enzym **Xanthin-Oxidase** in Harnsäure überführt und diese im Harn und im Stuhl (als Allantoin) ausgeschieden.

Die Konzentration von Harnsäure im Blut ist 3,4-7,0 bzw. 2,4-5,7 mg/100ml (Frauen im unteren, Männer im oberen Bereich). Der Harnsäure-Pool liegt beim Gesunden in der Größenordnung von 1.5g.

Ausscheidung:

Normalerweise werden täglich etwa 250 mg Purine mit der Nahrung zugeführt und etwa 450 mg vom Körper neu synthetisiert. Von den 700 mg Harnsäure, welche pro Tag ausgeschieden werden, erscheinen etwa 500 mg im Urin und 200 mg als Allantoin

(Spaltung von Harnsäure durch das Enzym Uricase in Bakterien der Darmflora) im Stuhl.



In der Niere wird die Harnsäure im proximalen Tubulus zu fast 100% filtriert, darauf rückresorbiert und schliesslich (immer noch im proximalen Tubulus) durch einen organischen Anionen-Transporter sekretiert. Dieser Transporter sekretiert auch organische Säuren wie Laktat, und diese können mit der Harnsäure-Sekretion für die Ausscheidung konkurrieren.

Klinische Bedeutung der Purine und der Harnsäure

Harnsäure ist in Wasser schwer löslich, besonders im sauren pH-Bereich. Im Gegensatz zu den meisten Tieren, welche Harnsäure mittels des Enzyms Uricase zu Allantoin abbauen (gut wasserlöslich), kann der Mensch nur einen kleinen Teil der Harnsäure in Allantoin überführen (Uricase der Darmflora). Die normale Harnsäurekonzentration im Blut ist nahe der Löslichkeitsgrenze und Erhöhungen können leicht zu klinischen Manifestationen führen. Etwa 25% unserer Bevölkerung weisen eine **Hyperuricaemie** auf (Harnsäurekonzentration im Blut über 70 mg/l). Allerdings zeigen nur etwa 1-2% klinische Symptome. Die primäre Hyperuricaemie ist entweder auf eine zu hohe Syntheserate von Purinen oder (in den meisten Fällen) auf Störungen der Ausscheidung von Harnsäure in der Niere zurückzuführen. Die eher seltenen sekundären Hyperuricaemien sind Folge von erhöhtem Zellabbau, z.B. bei Tumoren und Anaemien oder gestörter Harnsäure-Ausscheidung infolge anderer Krankheiten.

Die wichtigsten klinischen Manifestationen

- Lesch-Nyhan-Syndrom: Diese Krankheit beruht auf einem genetisch bedingten Ausfall des Enzyms HGPRT. Das Gen liegt auf dem X-Chromosom, und somit entwickeln nur Knaben das volle Syndrom. Nachdem die Knaben bei der Geburt normal erscheinen, entwickeln sie bald schwere Störungen des Zentralnervensystems. Diese resultieren in Schwachsinn, Lähmungen und Tendenz zu Selbstverstümmelung von Lippen und Fingern.
- Gicht: Uebersättigung des Blut mit Harnsäure (erhöhte Synthese oder verminderte Ausscheidung) führt zum Ansteigen des Harnsäurepools und zum Ausfallen der Harnsäure in Form des Natriumsalzes in Gelenken und gewissen Geweben. Dies wiederum führt zu Entzündungen und in der Folge zu degenerativen Veränderungen von Gelenken.
- Kardiovaskuläres Risiko scheint mit Harnsäurekonzentration zu korrelieren.
- Nierensteine: Erhöhter Abbau von Purinen oder Störungen der Ausscheidung von Harnsäure in der Niere führen zur Ueberschreitung der Löslichkeitsgrenze und zum Ausfallen von Harnsäure in der Niere.
- Xanthinurie: Bei genetisch bedingtem Ausfall der Xanthinoxidase werden grössere Mengen von Hypoxanthin und Xanthin im Urin ausgeschieden. Da Hypoxanthin und Xanthin aber viel besser wasserlöslich sind als Harnsäure, kommt es gewöhnlich nicht zu klinischen Symptomen. In seltenen Fällen können in der Niere Xanthin-Steine entstehen.

- Adenosin-Deaminase-Mangel: Das Enzym Adenosin-Deaminase führt Adenosin in Inosin über. Inosin wird dann durch die Purinnukleosid-Phosphorylase in Hypoxanthin und Ribose-Phosphat gespalten. Das Fehlen der Adenosin-Deaminase führt zu erhöhten dATP-Spiegeln und damit zur Hemmung der Ribonukleotid-Reduktase. Das resultierende Ungleichgewicht in der Konzentration der Desoxyribonukleotid-Konzentrationen hemmt die Proliferation von T-Lymphozyten und führt damit zu schweren Immundefekten.
- Therapien: Bei Hyperuricaemie hat die Reduzierung der Harnsäureproduktion vorrangige Bedeutung. Dies kann durch Hemmung der Xanthinoxidase durch **Allopurinol** erreicht werden. Wenn Harnsäure bereits in der Niere ausgefallen ist, kann sie unter Umständen durch Anheben des Urin-pH's (Trinken von schwachen Säuren wie Na-Citrat)

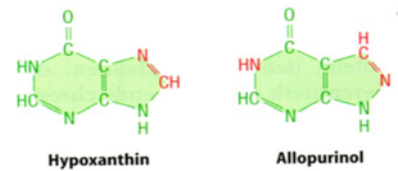


Abb. 20.19 Hypoxanthin und Allopurinol

Die Harnsäurekonzentration der Serumprobe wird ermittelt, indem sie mit Hilfe der Uricase zu Allantoin abgebaut wird. Das dabei entstehende Wasserstoffperoxid reagiert mit TOOS und 4-Aminophenazon zu einem Chinondiiminfarbstoff, der bei 557 nm photometrisch bestimmt werden kann. Die Messwerte E_0 bis E_5 dienen der Anfertigung einer Eichkurve. E_0 ist der aus der angefertigten Eichkurve zu bestimmende Serumwert. Der molare Extinktionskoeffizient wird mit Hilfe folgender Formel berechnet: $\epsilon = E / (c \cdot d)$. Für E und c werden die Durchschnittswerte der Messungen benötigt.

Versuch 3: Kreatinin

Stoffwechsel von Creatin:

- Biosynthese: Aus den Aminosäuren **Arginin** und **Glycin**, und der Methylgruppe des Methionins
- Syntheseweg :

In einer ersten Reaktion, welche vor allem in der **Niere** (proximaler Tubulus, innere mitochondriale Membran) und im **Pankreas** abläuft und durch das Enzym Arginin-Glycin-Amidino-transferase katalysiert wird, entstehen Ornithin und Guanidinoacetat. Guanidinoacetat wird nach seinem Transport zur **Leber** zu Creatin methyliert und via Blut an die Gewebe verteilt; grössere Mengen finden sich in **Muskelzellen** und Gehirn. Die Synthese von Creatin wird durch aus der Nahrung aufgenommenes Creatin inhibiert und durch Wachstumshormon stimuliert (auf Stufe Transkription des Gens der Arginin-Glycin-Amidino-transferase).

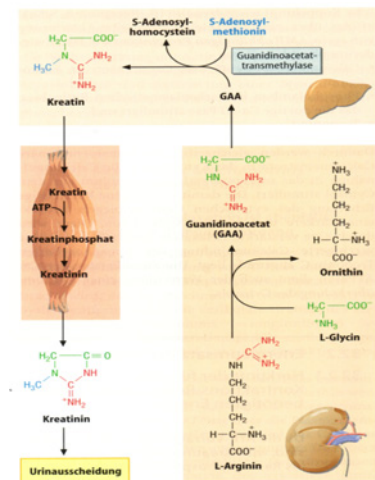


Abb. 32.15 Biosynthese von Creatin aus Glycin, der Guanidino-Gruppe von Arginin und der Methylgruppe von Methionin und Abbau von Creatinphosphat zu Creatinin (Lactambildung) durch Phosphatatspaltung

- Abbau: Phosphatatspaltung und Ringschluss, spontan, im Wesentlichen nur von der Creatinphosphatmenge abhängig (für eine gegebene Muskelmasse eine konstante Grösse).
- Creatinin-Plasmakonzentration: etwa 80 micromol/l (50-130 micromol/l, je nach Muskelmasse).
- Ausscheidung: Creatinin wird in der Niere total filtriert und mit dem Urin ausgeschieden (1,0-3,2 g pro Tag).

Funktion von Creatin:

- Energiespeicher: Creatin wird in Zellen mittels der **Creatinkinase** und ATP zu **Creatinphosphat** phosphoryliert

Diese reversible Reaktion erlaubt es, bei ATP-Mangel sehr schnell wieder ATP zu regenerieren. Dies ist im arbeitenden Muskel und im Gehirn von zentraler physiologischer Bedeutung.

- Creatin und Leistungssport: Zufuhr von Creatin mit der Nahrung fördert die Leistungsfähigkeit der Skelettmuskulatur

Klinische Bedeutung von Creatinkinase und Creatinin

- Erbkrankheiten: Ein genetisch bedingter Defekt der Creatin-Biosynthese wurde 1996 erstmals bei zwei Kindern beschrieben. Eine durch Mutation erniedrigte Aktivität der Guanidinoacetat-Methylase führt zur Erniedrigung der Creatinkonzentration und zur Anhäufung von Guanidinoacetat im Gehirn. Als Folge davon treten neurologische Symptome und allgemein verzögerte Entwicklung auf.
- Supplementation: Zufuhr von Creatin mit der Nahrung könnte sich positiv auf den Erhalt (Lebensdauer) von Neuronen auswirken. Dies besagt eine Studie, in welcher bei Mäusen mit ALS (amyotrophe laterale Sklerose, Absterben von Motor-Neuronen)-ähnlichen Symptomen durch Verfüttern von Creatin signifikante klinische Verbesserungen erreicht wurden.
- Creatinkinase: Bestimmung von Isoenzym-Konzentrationen im Blut.
- Creatinin: Da Creatinin in der Niere frei filtriert, nicht rückresorbiert und nur in kleinen Mengen sezerniert wird, wird es als endogene Substanz zur Bestimmung der **glomerulären Filtrationsrate** benutzt.

Versuch

Creatinin bildet mit Pikrinsäure in alkalischem Medium einen roten Farbkomplex, der bei 520 nm photometrisch bestimmt werden kann. Folgende drei Proben werden gemischt, die Extinktion der Analyse und des Standards werden gegen den Leerwert gemessen.

	Leerwert	Standard	Analyse
Aqua dest.	2 ml	2 ml	2 ml
Creatinin (1mg / 100ml)	1 ml	1 ml	1 ml
Verdünnter Harn	1 ml	1 ml	1 ml
Pikrat (17,5 mM, in 0,8 N NaOH)	-	-	-
E₅₂₀	1 ml	1 ml	1 ml

Die Konzentration des Creatinins in der Probe wird folgendermassen berechnet:

$$C_{\text{Analyse}} = 50 * \frac{E_{520\text{Analyse}}}{E_{520\text{Standard}}} * C_{\text{Standard}}$$

$$C_{\text{Standard}} = 1 \text{ mg} / 100 \text{ ml}$$

$$C_{\text{Analyse}} = 50 * 0,321 / 0,063 * 1 \text{ mg} / 100 \text{ ml} = \mathbf{2,548 \text{ g} / l}$$

$$2,548 \text{ g} / l * 1,5 l / 24 \text{ h} = \mathbf{3,821 \text{ g} / 24 \text{ h}}$$

Der Normwert liegt zwischen 1,0 und 3,2 g / 24 h..Der Proband zeigt also einen leicht erhöhte Kreatininwert, welcher vermutlich auf die grosse Muskelmasse zurückzuführen ist.

Versuch 4: Pathologische Harnbestandteile

Aufgrund von Funktionsstörungen der Niere (Erkrankungen, Entzündungen, Verletzungen etc.) kann es zum Auftreten von Harnbestandteilen kommen, die physiologischerweise entweder überhaupt nicht oder in viel geringeren Konzentrationen im Harn vorkommen.

Als Beispiele seien hier genannt: Proteine (Fieber, Schock, Nierenerkrankungen, Myelome), Glucose (Diabetes mellitus), Fructose (essentielle Fructosurie), Galactose (essentielle Galactosämie), Xylulose (essentielle Pentosurie), Ketonkörper (Diabetes mellitus, Fieber, Hunger), Gallenfarbstoff und Blut.

Im Praktikum wird der Harn eines Probanden mittels Teststäbchen untersucht. Es werden folgende Parameter erfasst: Dichte, pH, Leukocyten, Nitrite, Eiweiß, Glucose, Ketone, Urobilinogen, Bilirubin, Blut und Hämoglobin.

Teststäbchen gelten wegen Ungenauigkeiten nicht als absoluter Nachweis – sie liefern allerdings wertvolle Hinweise für weiter Untersuchungen und zeigen mögliche Probleme und Richtungen auf.

Ergebnisse der Harnuntersuchung eines Probanden der Gruppe:

Dichte	1,025
PH	6
Leukocyten	10-25 Leukocyten / μ l
Nitrite	negativ
Eiweiß	30 (0,3)
Glucose	negativ
Ketone	negativ
Urobilinogen	normal
Bilirubin	+
Blut	negativ
Hämoglobin	negativ

Fragen zu Versuch 2:

• **In welcher Form eliminieren andere Säugetiere (außer den Primaten) Purine?**

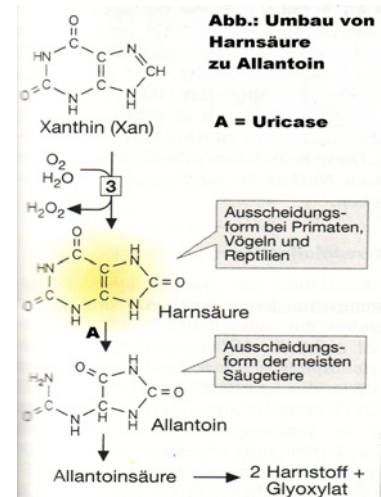
Säugetiere (außer Primaten) bauen Harnsäure mittels Uricase zu Allantoin (→ Ringöffnung) ab und scheiden es aus.

• **Welche Bedeutung besitzt der pH-Wert des Harns im Hinblick auf die Konkrementbildung (Nieren- und Blasensteine)?**

Der pH-Wert beeinflusst das Löslichkeitsverhalten von Salzen/ Ionen. Unter den verschiedenen Salzen findet man unterschiedliche Beeinflussungen des Löslichkeitsverhalten bei unterschiedlichen pH-Werten.

Zum Beispiel fördert ein saurer pH die Umwandlung von Ural zu Harnsäure → es kommt zu Harnsäuresteinen.

Ein alkalischer pH fördert die Bildung von CaHPO_4 -Steinen.



• **Was ist Allopurinol? Erklären sie in diesem Zusammenhang den Begriff „suicide inhibition“.**

Allopurinol ist ein Hemmstoff der Xanthin-Oxidase (OMP-Decarboxylase) – es hat eine sehr ähnliche Strukturformel wie Xanthin. Durch die Hemmung der Xanthin-Oxidase wird weniger Harnsäure gebildet, die Vorstufen Xanthin und Hypoxanthin sind besser wasserlöslich und können gut ausgeschieden werden. Allopurinol findet Anwendung als Gicht-Therapeutikum.

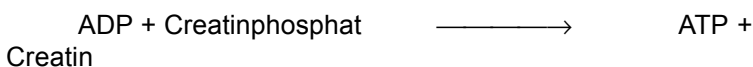
Suizidhemmung bezeichnet einen Vorgang, bei dem ein Substrat ein Enzym hemmt, dabei allerdings „vernichtet“ (sprich: umgesetzt) wird.

Allopurinol wirkt erst als Substrat, dann als Inhibitor. Es bindet an die Xanthin-Oxidase und wird zu Alloxanthin (Oxypurinol) umgesetzt. Das Alloxanthin bindet fest an das aktive Zentrum der Xanthin-Oxidase – damit behält das Molybdän-Atom den Oxidations-Status +4 anstatt – wie bei einem normalen Katalysezyklus – zu +6 zurückzukehren.

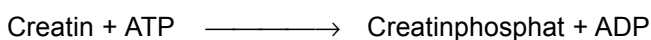
Fragen zu Versuch 3:

• **Welches ist die physiologische Funktion von Creatinphosphat?**

Creatinphosphat hat die Funktion eines Energiespeichers im Muskel. Es kann ATP regenerieren:



Im Muskel ist ATP notwendig, um die Myosinköpfchen vom Aktin zu lösen. ATP wird verbraucht – die Regeneration des entstandenen ADP zu ATP wird wie oben gezeigt durch das Creatinphosphat erreicht. Die Reaktion findet im Cytoplasma statt. Das entstandene Creatin wird von der mitochondrialen Creatinkinase (an der Außenseite der Innenmembran der Muskelmitochondrien) zu Creatinphosphat regeneriert:



Ein Teil der Creatin-Moleküle lagern sich spontan in Creatinin um. Creatinin ist ein Ausscheidungsprodukt des Skelettmuskels und kann

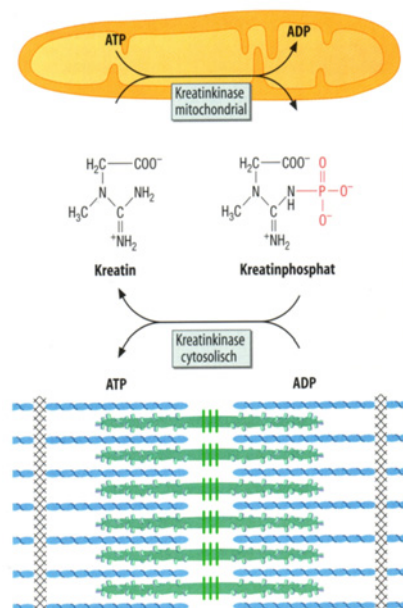


Abb. 32.14 Regeneration von ATP durch Creatinphosphat

im Harn nachgewiesen werden.

Creatin wird aus Arginin und Glycin über die Zwischenstufen Ornithin und Guanidinacetat gebildet.

• **Kreatin wird wie das Polysaccharid Inulin zur Bestimmung der Plasma-Clearance benutzt. Was versteht man unter diesem Begriff? Welchen Vorteil hat das Kreatinin gegenüber dem Inulin?**

Unter Plasma-Clearance versteht man die Ausscheidung einer Substanz durch die Nieren. Wichtig dabei ist der Begriff der glomerulären Filtrationsrate (GFR), die über die Plasma-Clearance einer Substanz, die frei filtriert wird bestimmt werden kann:

Substanzen, die frei filtriert werden, weisen im Filtrat praktisch die gleiche Konzentration wie im Plasma (P) auf:

$$\text{Filtrierte Menge} = P \times \text{GFR}$$

Werden sie weder resorbiert noch sezerniert, so ist ihre Ausscheidung (M_e) gleich der filtrierten Menge:

$$M_e = P \times \text{GFR}$$

$$U \times V_u = P \times \text{GFR}$$

$$\text{GFR} = U \times V_u / P$$

U = Konzentration der Substanz im Urin

V_u = Urinstromstärke

Anhand der Berechneten GFR kann die Plasma-Clearance einer Substanz bestimmt werden, wobei zu beachten ist :

Substanzen, die

- weder resorbiert noch sezerniert werden → Clearance gleich GFR
- resorbiert werden → Clearance kleiner als GFR
- sezerniert werden → Clearance größer als GFR

Somit benötigt man zur Bestimmung der

Inulin muß zur Bestimmung infundiert werden, während Creatinin physiologischerweise im Blut vorkommt, da es ständig vom Skelettmuskel abgegeben wird.

Fragen zu Versuch 4:

• **Wie ist die Entstehung von Ketonkörpern bei Diabetes mellitus und im Hunger zu erklären?**

Die Synthese der Ketonkörper hängt von Fettsäureangebot an die Leber ab. Werden der Leber zu viele Fettsäuren angeboten hat sie zwei Möglichkeiten: entweder können die Fettsäuren zu Triacylglyceriden, Phosphoglyceriden und Cholesterinestern synthetisiert werden oder über die β -Oxidation zu Acyl-CoA umgebaut werden, das seinerseits in den Citratcyclus eingeschleust werden kann oder im HMG-CoA-Cyclus zu Ketonkörpern umgebaut wird.

Über die Entstehung von Ketonkörpern entscheidet letztlich das Verhältnis der obengenannten Prozesse, da die Leber Triacylglyceride nur begrenzt speichern kann.

Nahrungskarenz:

Bei Nahrungskarenz werden gespeicherte Fettsäuren zur Energiegewinnung mobilisiert. Ein Problem stellt nun der Transport der Fettsäuren zu den extrahepatischen Wegen dar (Fettsäuren sind hydrophob!). Die Lösung stellt der Umbau zu Ketonkörpern dar, da diese leicht wasserlöslich sind (stellen damit die Transportform dar) und gut zur Energiegewinnung genutzt werden können (leicht oxidierbar, könnenextrahepatisch Glucose ersetzen – ZNS gewinnt allerdings erst nach einiger Zeit die Fähigkeit, Ketonkörper zu verwerten).

Diabetes mellitus – Coma diabeticum:

Insulin ist ein Antagonist zu lipolytischen Hormonen (Katecholamine, Gluckagon usw.). Aufgrund eines Insulinmangels kommt es nun zum Überwiegen der lipolytischen Hormone und damit der Lipolyse. Die Fettsäure-Mobilisierung und die Ketonkörpersynthese nehmen Ausmaße an, die über der Ketonkörperoxida-tions-Maximalkapazität liegen. Da nun auch die Fähigkeit der Niere zur Ketonkörperausscheidung begrenzt ist, steigt der Blut-Ketonkörper-Spiegel und überlastet das Puffersystem (Ketone sind Säuren!). Es kommt zur metabolischen Azidose und zum Coma diabeticum.

• Welche Verbindungen werden zu Ketonkörpern gerechnet?

- Aceton (ist ein Ketonkörper)
- β-Hydroxybutyrat (β-Hydroxybuttersäure)
- Acetessigsäure (Acetacetat)

Die beiden letztgenannten sind strukturell mit Aceton verwandt und werden zu den Ketonkörpern gerechnet.

• Können Ketonkörper vom Organismus verwertet werden?

Acetacetat und β-Hydroxybutyrat können von extrahepatischen Geweben zur Energiegewinnung verwertet werden.

Aceton stellt das Endprodukt dar und wird vorwiegend abgeatmet.

Zur Verwendung müssen die Ketonkörper mit Coenzym A aktiviert werden.

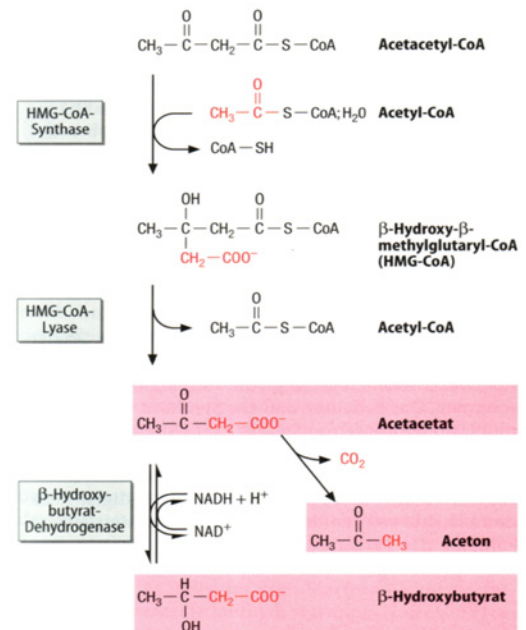


Abb. 16.10 Biosynthese von Acetacetat, β-Hydroxybutyrat und Aceton aus Acetacetyl-CoA und Acetyl-CoA