

(19)



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 409 192 B**

(12)

PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 5/2000
(22) Anmeldetag: 04.01.2000
(42) Beginn der Patentdauer: 15.10.2001
(45) Ausgabetag: 25.06.2002

(51) Int. Cl.⁷: **G01N 33/68**

(56) Entgegenhaltungen:
C.A. 100(23) 1984:1897934,
C.A. 101(23) 1984:206719D,
C.A. 103(19) 1985:156204A
ISAACS, W.B. NEW APPROACHES TO THE STUDY
OF BENIGN PROSTATIC HYPERPLASIA,
PP. 307-331
ISAACS, W.B. J. BIOL.CHEM. 258(10) 1983,
PP. 6610-6615
ISAACS, W.B. J. BIOL.CHEM. 259(18) 1984,
PP. 11520-1152

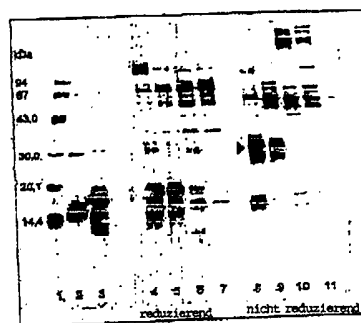
(73) Patentinhaber:
GEMEINER MANFRED DIPL.ING. DR.
A-1080 WIEN (AT).
TEINFALT MONIKA DR.
A-1210 WIEN (AT).

(54) VERFAHREN ZUR DETEKTION VON VERÄNDERUNGEN IN DER PROSTATA VON RÜDEN

(57) Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion von Veränderungen in der Prostata von Rüden, welches durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- Entnahme einer Harnprobe,
 - Bestimmen des Gehaltes an Prostata-spezifischem Protein (PSP) in der Harnprobe und
 - Vergleichen des bestimmten PSP-Gehaltes mit zumindest einem PSP-Referenzwert,
- sowie ein Kit zur Durchführung dieses Verfahrens.

FIG. 2



SDS-PAGE, Harn von Rüden mit Prostataerkrankung: im reduzierenden und nicht reduzierenden Gel. 1: Marker; 2: Hämoglobin; 3: Ejakulat; 4,8: Prostatahyperplasie; 5,9: akute Prostatitis; 6,10: nekrotisierende Prostatitis; 7,11: chronische Prostatitis; ►: PSP.

AT 409 192 B

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion von Veränderungen in der Prostata von Rüden.

Hunde sind die einzigen Haustiere, für die Prostata-Erkrankungen veterinärmedizinisch relevant sind. So kommt es beispielsweise mit zunehmendem Alter häufig zur Entwicklung von Prostata-Hyperplasien in Rüden, nicht jedoch in Katzen. Dies ist wahrscheinlich auf die höhere Anfälligkeit des Urogenitaltraktes von Rüden gegenüber bakteriellen Infektionen zurückzuführen.

Da Prostata-Erkrankungen in Rüden relativ häufig auftreten und oft äußerst schmerzhaft sein können, kommt ihnen große veterinärmedizinische Bedeutung zu. Neben akuter und chronischer Prostatitis sind vor allem die benigne Hyperplasie, die squamöse Metaplasie, paraprostatistische Zysten, die prostatistische Neoplasie sowie nekrotische und bakterielle Prostatiden die am häufigsten beschriebenen Prostata-Erkrankungen beim Rüden.

Diese Erkrankungen sind häufig verbunden mit Fieber, Schmerzzuständen, Depression, Leukozytose und Inkontinenz.

Die bekannten Methoden zur Diagnose von Prostata-Erkrankungen beim Rüden, wie rectale Palpation, Ultraschall- oder Röntgenuntersuchungen sowie histologische Untersuchungen sind mit erheblichem Aufwand verbunden und werden in der Regel erst angewendet, wenn die typischen Symptome einer pathologischen Prostata gegeben sind. Vorbeugende Diagnoseverfahren, bei welchen Norm-abweichende Prostataparameter in einem frühen Stadium erkannt und somit behandelt werden können, bevor möglicherweise irreversible pathologische Zustände eintreten, sind bislang nicht bekannt.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist daher die Bereitstellung eines Verfahrens zur Detektion von Veränderungen in der Prostata von Rüden, welches einfach durchzuführen ist, eine hohe Aussagekraft hat und geeignet ist, Prostataveränderungen in einem möglichst frühen Stadium, vorzugsweise bevor klinische Symptome auftreten, anzuzeigen.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Verfahren zur Detektion von Veränderungen in der Prostata, welches durch die folgenden Schritte gekennzeichnet ist:

- Entnahme einer Harnprobe,
- Bestimmen des Gehaltes an Prostata-spezifischem Protein (PSP) in der Harnprobe und
- Vergleichen des bestimmten PSP-Gehaltes mit zumindest einem PSP-Referenzwert.

PSP erscheint als Hauptbande bei der SDS-PAGE-Untersuchung von caninem Prostatasekret mit einem Anteil von über 90 % des Gesamtproteins. PSP besteht aus zwei unterschiedlichen Polypeptid-Untereinheiten, die über zwei Disulfidbrücken kovalent aneinander gebunden sind. Mit isoelektrischer Fokussierung konnten 10 bis 13 geladene Varianten mit pI-Werten im Bereich zwischen 6,5 und 8,4 nachgewiesen werden (Isaacs et al., Journal of Biological Chemistry 258 (10) (1983), S. 6610-6615). Die PSP-Biosynthese steht unter Androgenkontrolle, Kastration führt zum allmählichen Verschwinden dieses Proteins. Die Zuführung von exogenem Androgen führt jedoch auch in kastrierten Tieren zur Bildung von PSP in der Prostata.

PSP verfügt über eine hochspezifische enzymatische Aktivität, die auf die Hydrolyse von Arginin und Lysin enthaltenden Amid- und Esterproteasesubstraten beschränkt ist. Es wurde zwar vorgeschlagen, dieses Glykoprotein als Marker für die Prostatafunktion unter sich ändernden hormonellen Bedingungen zu verwenden, indem Prostatapräparate mit spezifischen PSP-Antisera untersucht werden (Isaacs et al., Endocrinology 117(4) (1985), S. 1512-1520); ein Zusammenhang zwischen sich ändernden PSP-Gehalten und pathologischen Veränderungen in der Prostata wurde bislang nicht beschrieben. Auch wurden bislang Veränderungen des PSP-Gehaltes im Harn nicht beschrieben oder dessen pathologische Relevanz erkannt.

Das entsprechende Protein beim Menschen (das Prostata-spezifische Antigen (PSA)) ist in der Humanmedizin als Marker für Prostatatumoren bekannt (s. z.B. Magklara et al., Clin. Chem. 45(11) (1999), S. 1960-1966). Dabei wird auf Grund eines erhöhten Gehaltes von PSA im Serum Prostatakrebs diagnostiziert. Diese Markerfunktion ist beim Menschen jedoch streng auf Tumorerkrankungen beschränkt. Andere Prostataveränderungen resultieren beim Menschen nicht in einer wesentlichen Veränderung des PSA-Gehaltes im Serum. Bemerkenswerterweise kommt PSP im Rüdenserum überhaupt nicht vor. PSP ist im Prostatagewebe und in der Prostataflüssigkeit sowie im Harn und Ejakulaten von Rüden nachweisbar (wobei PSP in Spermien aus Nebenhoden nicht detektiert werden kann (Isaacs et al., Journal of Biological Chemistry 259(18) (1984), S. 11520-11526)).

Überraschenderweise hat sich erfindungsgemäß gezeigt, dass PSP im Harn von Rüden einen ausgezeichneten Marker für viele pathologische Veränderungen in der Prostata darstellt. Diese Abweichungen sind demgemäß nicht nur auf Tumorerkrankungen beschränkt, sondern ergeben für eine Vielzahl der im Rüden beschriebenen pathologischen Veränderungen der Prostata relevante Diagnoseinformationen.

Im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens wird dem Rüden zunächst eine Harnprobe entnommen. Die Art der Entnahme ist nicht kritisch. Üblicherweise wird entweder Spontanharn oder Katheterharn gewonnen. Andere Arten, wie die Gewinnung von Zystozenteseharn, sind ebenfalls geeignet.

Anschließend wird der PSP-Gehalt in der Harnprobe bestimmt. Die Art der Bestimmungsmethode ist hierbei ebenfalls nicht kritisch, vorzugsweise sollte aber eine gleiche oder zumindest eine ähnliche Bestimmung angewendet werden, wie sie bei der Bestimmung des PSP-Referenzwertes herangezogen wurde.

Im Stand der Technik sind verschiedenste Methoden zur Bestimmung von PSP beschrieben worden, darunter immunologische und enzymatische Methoden (s. z.B. Isaacs et al., J.B.C. 258(10), S. 6610-6615). Diese eignen sich besonders gut zur schnellen diagnostischen Bestimmung von PSP, da einerseits Antiserum gegen PSP leicht und spezifisch erhältlich ist und andererseits die enzymatische Aktivität von PSP sehr spezifisch ist. Daher ist PSP in der Lage, synthetische Estersubstrate sehr spezifisch umzuwandeln, wodurch die Kombination derartiger enzymatischer Umwandlungen mit colorimetrischen Detektionsmethoden möglich ist. Beispielsweise wurde gezeigt, dass N^α-Benzoyl-L-argininethylester und N^α-Tosyl-L-argininmethylester mit einer maximalen spezifischen Aktivität bei 25°C von 105 μMol/min/mg und 33 μMol/min/mg und K_m-Werten von 7,4 und 9,1 mM hydrolysiert werden. PSP besitzt ein pH-Optimum bei 8,0 und kann durch Cu²⁺, Zn²⁺, Cd²⁺ und Cu²⁺ reversibel sowie durch Diisopropylfluorophosphat und Phenylmethansulfonylfluorid irreversibel inhibiert werden. Eine geeignete enzymatische colorimetrische Methode ist in Isaacs et al. (Journal of Biological Chemistry 259(18) (1984), 11520-11526) beschrieben.

Für die Reihentestung, insbesondere auch zur ständigen Überwachung von Rüden, die anfällig für Prostata-Erkrankungen sind, haben sich immunologische Methoden besonders bewährt. Beispielsweise kann PSP mit Hilfe von polyklonalen oder monoklonalen Antikörpern erkannt und quantifiziert werden. Hierbei können sowohl klassische Immunoassays, wie ELISA's, aber auch moderne Methoden, wie z.B. Chip-unterstützte Methoden, Immunoassays in Kapillarröhrchen (WO 98/04920), verwendet werden.

Vorzugsweise können auch die beim Menschen für PSA beschriebenen Testmethoden für Serumproben (s. z.B. EP 0 904 397-A und EP 0 914 155-A) an die erfindungsgemäße PSP-Testung für Harnproben adaptiert werden.

Die Bestimmung des PSP-Gehaltes kann dabei bevorzugterweise in Reihenuntersuchungen mittels Mikrotiterplatten, Mikroassays oder Teststreifen durchgeführt werden.

Der ermittelte PSP-Gehalt in der Probe des jeweiligen Patienten wird dann mit einem Referenzwert verglichen. Dieser Referenzwert kann durch Anwendung der Testmethode an einer Standard-Harnprobe vorgenommen werden, wobei diese Bestimmung dann bevorzugterweise im gleichen Ansatz erfolgt wie die Bestimmung der Patientenprobe. Dieser Referenzharn kann dabei aus gesunden Rüden (oder einer Population von Rüden) entnommen worden sein. Als Standardprobe kann auch eine wässrige PSP-Lösung mit bekanntem PSP-Gehalt, die gegebenenfalls mit Puffer-, Konservierungs- oder Hilfsstoffen versetzt worden ist, dienen.

Andererseits kann als Referenzwert auch eine Tabelle oder eine Eichgerade bzw. eine Vergleichsskala dienen. Auch hierbei empfiehlt es sich, die Vergleichswerte oder die Vergleichsskala mit derselben Nachweismethode zu ermitteln, wie bei der Ermittlung des PSP-Gehaltes in der Patientenprobe. Es ist auch möglich, für die verschiedenen PSP-Bestimmungsmethoden jeweils eigene Eichwerte oder Eichgeraden zur Verfügung zu stellen, die den Laborspezifischen Voraussetzungen Rechnung tragen. Beispielsweise kann aber auch einfach ein Referenzwert (oder mehrere Referenzwerte) bzw. eine Referenzdetektion auf einem Teststreifen gemeinsam mit der Probe gemessen werden.

Es hat sich gezeigt, dass im Regelfall ein Wert zwischen 20 und 300, in manchen Fällen bis 800, μg PSP pro ml Harn als physiologisch angesehen werden kann. Abweichungen hiervon können auf Grund des Alters oder der Rasse des Tieres vorkommen. Idealerweise wird als physiologi-

scher Referenzwert der Normalwert des gleichen Rüden herangezogen. Dies ist vor allem bei ständiger Überwachung des Rüden möglich. Dadurch können auch Veränderungen der Prostatafunktion sehr früh erkannt werden, weil es dann auch möglich ist, einen sehr viel schmaleren physiologischen Referenzbereich (als z.B. zwischen 20 und 300 µg PSP pro ml Harn) zu etablieren.

Abweichungen der Probe von diesem Referenzwert nach oben oder nach unten können auf eine (pathologische) Veränderung in der Prostata hindeuten. Insbesondere gelten Werte von über 800 bzw. unter 15 µg/ml Harn als pathologisch. Ein pathologischer Referenzwert enthält daher vorzugsweise 800 bis 3000, insbesondere 1000 bis 2000 µg, PSP/ml. Pathologische Referenzwerte unterhalb des physiologischen Wertes enthalten vorzugsweise von 2 bis 15, insbesondere 5 bis 10, µg PSP/ml.

Es zeigte sich, dass erhöhte PSP-Gehalte mit einer akuten Entzündung der Prostata korrelieren. Besonders gut eignet sich das erfindungsgemäße Detektionssystem zur Diagnose von akuter Prostatitis, wobei im allgemeinen davon ausgegangen wird, dass bei PSP-Werten von 1000 bis 2500 µg/ml Harn eine akute Prostatitis vorliegen kann.

Andererseits zeigen Werte unterhalb des physiologischen Bereiches eine nekrotisierende Entzündung der Prostata auf. So kann ein PSP-Gehalt von 5 bis 10 µg/ml eine nekrotische Prostatitis indizieren.

Wie erwähnt, zeigt das erfindungsgemäße System vor allem bei akuter und nekrotisierender Prostatitis seine Vorzüge, da diese Zustände eindeutig und im Bedarfsfall ohne Kombination mit weiteren Untersuchungsmethoden alleine aufgrund des PSP-Gehaltes im Harn diagnostiziert werden können. Bei der Diagnose von anderen Prostata-Erkrankungen ist zwar das erfindungsgemäße Verfahren ebenfalls gut anwendbar, von einer Kombination mit anderen Diagnosemethoden sollte aber nur in den Fällen abgesehen werden, in denen die PSP-Werte des Rüden ständig gemessen werden und somit Abweichungen von physiologischen Zuständen viel genauer erfasst werden können als bei einmaligen Untersuchungen (z.B. erst nach Auftreten von Symptomen).

Aber selbst bei Erkrankungen, bei welchen die PSP-Konzentration im Harn alleine keine eindeutige Diagnose ergibt, wie es beispielsweise bei Hyperplasie oder bei chronischer Prostatitis der Fall sein kann, kann die erfindungsgemäße Untersuchungsmethode herangezogen und bevorzugterweise mit weiteren Untersuchungsmethoden kombiniert werden, um so zu einer sicheren Diagnose zu kommen. Diese weiteren Untersuchungsmethoden können selbstverständlich auch zur Verifizierung, beispielsweise einer akuten oder einer nekrotischen Prostatitis, herangezogen werden. Besonders bevorzugt bei weiteren Untersuchungsmethoden sind dabei bildgebende Verfahren wie Ultraschall- oder Röntgenuntersuchungen sowie Blutuntersuchungen oder histologische und zytologische Untersuchungen.

Bei der Bestimmung des Gehaltes an PSP kann auch das Vorliegen und/oder die Verteilung der Proteinvarianten, z.B. durch isoelektrische Fokussierung oder das Vorliegen und/oder die Verteilung von PSP-Fragmenten, insbesondere nicht physiologischen PSP-Fragmenten, ermittelt werden. Auch bei einer derartigen qualitativen PSP-Analyse können Abweichungen vom physiologischen Zustand bzw. von der physiologischen Verteilung, insbesondere im jeweiligen Rüden, auf pathologische Zustände oder das Risiko von pathologischen Zuständen hindeuten. Erfindungsgemäß ist daher auch diese qualitative Analyse von PSP unter "Bestimmen des PSP-Gehaltes" anzusehen.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Detektion von Veränderungen in der Prostata von Rüden, bei welchem eine Probe aus Prostatagewebe entnommen wird, darin der PSP-Gehalt bestimmt wird und mit einem Referenzwert verglichen wird. Als Prostatagewebe können dabei punktiertes Material sowie operativ entnommenes Material, aber auch Prostatasekret oder Prostatalavagen herangezogen werden. Auch hierbei beruht die Erfindung darauf, dass bei pathologischen Veränderungen in der Prostata der Gehalt an PSP gegenüber einem gesunden Wert verändert ist.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Detektion von Veränderungen in der Prostata von Rüden, bei welchem eine Spermaprobe entnommen wird, der Gehalt an PSP in der Spermaprobe bestimmt und mit einem PSP-Gehalt eines Referenzwertes verglichen wird.

Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Kit zur Durchführung der erfindungsgemäßen Detektionsverfahren, welcher die folgenden Komponenten umfasst:

- einen oder mehrere Behälter zur Aufnahme von Proben,
- Mittel zur Bestimmung des PSP-Gehaltes in der Probe und
- einen oder mehrere Referenzwert(e).

Wie bereits zuvor erwähnt, können die Proben-Aufnahmebehälter auf beliebige Art verwirklicht werden. Es hat sich bewährt, hierfür bereits für andere Zwecke etablierte Systeme zu verwenden, insbesondere die bereits für die PSA-Analytik beim Menschen bekannte Methode auch für die erfindungsgemäßen Anwendungen zu adaptieren. Dies ist für den Fachmann ohne weiteres möglich (wobei den Unterschieden in der Detektion von Proben aus Serum (bei PSA) und von den erfindungsgemäß zu bestimmenden Proben, insbesondere von Harnproben (bei PSP), für den Fachmann ohne weiteres Rechnung getragen werden kann).

Als Referenzwert kann im erfindungsgemäßen Kit z.B. eine schriftliche bzw. tabellarische Form gewählt werden, etwa eine Referenzkurve oder eine Vergleichstabelle, oder aber eine Vergleichsprobe zur Verfügung gestellt werden. Auch die Verwendung von Barcodes oder Farbtabelle ist vorteilhaft.

Beispielsweise kann eine PSP enthaltende Vergleichsprobe im Kit enthalten sein, vorzugsweise in einer lagerstabilen (lyophilisierten) Form, die bei Bedarf rekonstituiert werden kann.

Als Mittel zur Detektion von PSP können sämtliche in der Diagnostik bewährte Methoden zum Einsatz kommen, insbesondere diejenigen, die bereits in der Analyse von Harnproben bei Mensch und Tier Anwendung gefunden haben. Aus Gründen der einfacheren Handhabung können Referenzwerte gleichzeitig mit der Probenbestimmung ermittelt werden oder aber auf sonstige Weise unmittelbar bereitgestellt werden (z.B. bei Teststreifen mit Farbindikatoren durch Bereitstellung von Mustern (z.B. auf einer Vergleichsabbildung)).

Die Erfindung wird anhand der nachfolgenden Beispiele sowie der Zeichnungsfiguren, auf die sie selbstverständlich nicht eingeschränkt sein soll, näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1: SDS-PAGE gesunder Hunde;

Fig. 2: SDS-PAGE von Rüden mit Prostata-Erkrankung; und

Fig. 3: mit Anti-PSP immungefärbte Prostata in 60-facher Vergrößerung.

Beispiele:

Untersuchte Tiere:

Es standen insgesamt 46 Hunde zur Verfügung. Als Kontrollgruppe dienten 22 reinrassige Beagles (16 Rüden, davon 2 kastriert, und 6 Hündinnen, alle im Alter von 2 bis 4 Jahren). Bei diesen Rüden wurden, ausser hämatologischen und klinisch-chemischen Blutuntersuchungen regelmäßig klinische Untersuchungen durchgeführt. Von allen Tieren wurde Katheterharn, bei den Rüden mehrmals in der Früh Spontanharn und von zwei Rüden auch Zystozenteseharn gewonnen. Sämtliche Rüden wurden auch einer einmaligen Ultraschalluntersuchung der Prostata unterzogen.

Weiters standen Harnproben von 24 nicht kastrierten Rüden verschiedener Rassen, unterschiedlichen Alters, mit klinischer Symptomatik einer Prostataerkrankung ("Patienten") zur Verfügung. Diese Tiere wurden ebenfalls alle klinisch untersucht und ein bildgebendes Verfahren (Ultraschall, Röntgen) zur Abklärung der Diagnose angeschlossen.

Harnuntersuchungen:

Zur Harnuntersuchung wurden sämtliche Harnproben mittels Teststreifen (Combur-Test®) und das Sediment mikroskopisch untersucht. Die verbleibenden Proben wurden portioniert und bei -20°C für die weiteren Untersuchungen tiefgefroren. Bei den gesunden Tieren zeigte sich gegenüber den Patienten ein wesentlich unauffälliger Befund. Bei der Untersuchung der Harnprobe der Patienten mittels Teststreifen konnten keine einheitlichen Ergebnisse, die Hinweise auf pathologische Veränderung der Prostata gegeben hätten, gewonnen werden.

Die in der Literatur beschriebenen Veränderungen im Harn (Hämaturie, Leukozyturie) konnten zwar in einzelnen Fällen beobachtet werden, jedoch konnten diese Befunde nicht in Einklang mit einer bestimmten Krankheit gebracht werden.

Proteinbestimmung:

In den Harnproben wurde Eiweiß nach der Methode von Bradford (Anal. Biochem. 72 (1976), 248-254); modifiziert für Mikrotiterplatten) durchgeführt. Dabei lag die Gesamteiweißkonzentration im Harn der gesunden Rüden im Bereich bis 700 µg/ml. Die Gesamtproteinkonzentration im Harn der kranken Tiere war in den meisten Fällen deutlich höher als die der gesunden Vergleichsgruppe. Die Proteinwerte der kastrierten Rüden und der Hündinnen bewegten sich im gleichen Konzentrationsbereich wie die der Rüden.

Im Harn intakter Rüden stellte sich PSP als Hauptprotein dar (Fig. 1; 1: Marker; 2,3,6,7: Rüde; 4,8: Rüde, kastriert; 5,9: Hündin; ◀, ▶: PSP). Die anderen Proteinbanden stammten von physiologisch im Harn vorkommenden Proteinen, vor allem Albumin, Transferrin und IgG. Bei Prostataerkrankungen war vor allem eine Veränderung in der Bandenstärke von PSP zu bemerken (Fig. 2; 1: Marker; 2: Hämoglobin; 3: Ejakulat; 4,8: Prostatahyperplasie; 5,9: akute Prostatitis; 6,10: nekrotisierende Prostatitis; 7,11: chronische Prostatitis; ▶: PSP).

Das Proteinverteilungsmuster im Harn zeigt, dass bei gesunden Rüden PSP meist den größten Anteil des ausgeschiedenen Proteins darstellt. Es liess sich auch im Katheterharn und in jenen Harnprodukten, die mittels Zystozentese gewonnen wurden, nachweisen. Das lässt sich durch den Reflux von Harn aus dem Bereich der proximalen Urethra in die Harnblase erklären. Außerdem fand man Proteinbanden anderer physiologisch im Harn vorkommender Proteine. Bei unterschiedlichen Erkrankungen ändert sich das Proteinverteilungsmuster generell, bei Erkrankungen der Prostata kam es in erster Linie zu Veränderungen in der Bandenstärke des PSP.

Elektrophorese:

Bei der Durchführung der SDS-PAGE wurde die Methode nach Laemmli leicht modifiziert. Die anschließende Silberfärbung wurde in modifizierter Form durchgeführt. Als Markerproteine/Rein-substanzen wurden verwendet: Rüde-Hämoglobin, Rüde-Myoglobin, Rüde-IgG, Rüde-Transferrin (alle erhalten von der Fa. Sigma).

Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine in einer Semi-dry-Blot-Apparatur bei 0,8 mA/cm² aus dem Gel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Dazu wurden 3 Blatt Filterpapier, Nitrocellulose (auf der anodischen Seite des Gels) das zu blottende Gel und zwei weitere Lagen von puffergetränktem Filterpapier übereinander geschichtet. Es wurde dabei ein Blotpuffer mit 48 mM Tris, 39 mM Glycin und 1,3 mM SDS verwendet. Methanol wurde nicht zugesetzt. Nach erfolgter Proteinübertragung (1,5 Stunden Blotzeit) wurden die Proteine auf der Membran entsprechend lokalisiert, das geblottete Gel durch Silberfärbung auf Effizienz der Proteinübertragung überprüft.

Nach der Elektrophorese wurden die Blots 30 min mit 1 % Gelatine in TBS (20 mM Tris, 0,5 M NaCl, pH 7,5) inkubiert, um freie Bindungsstellen an der Membran zu blockieren. Diese und alle weiteren Inkubationen wurden unter leichtem Schütteln und bei Raumtemperatur durchgeführt. Anschließend wurde die Membran 2 h mit einer PSP-Antikörperlösung (20 µl Antiserum/20-50 ml 1 % Gelatine in TTBS (TBS + 0,05 % Tween®20) inkubiert. Darauf folgte ein dreimaliges Waschen von je 5 min in TTBS und die Reaktion mit der Konjugatlösung (20 µl Konjugat/20-50 ml 1 % Gelatine in TTBS). Nach 2 h wurde unspezifisch anhaftendes Konjugat durch Waschen in TTBS (2 x 5 min) und TBS (1 x 5 min) entfernt und die frisch zubereitete Substratlösung zugesetzt. Nach etwa 5 bis 10 min wird die Reaktion durch Abgießen der Lösung und zweimaliges Waschen der Membran mit Aqua Bidest. abgestoppt.

Immunhistochemie:

Paraffinpräparate der Prostata von vier Patienten dieser Studie und diverse archivierte Paraffinpräparate von normalen und veränderten Prostatae sowie von Leber, Lunge, Hoden, Harnblase, Urethra, Pankreas, Speicheldrüse und frisches Ejakulat von Rüden wurden mit dem Antiserum gegen PSP immunhistochemisch untersucht (Avidin-Biotin-Complex-Technik).

Durchführung:

Die Paraffinschnitte werden entparaffiniert und für 5 min in Aqua Bidest. gelegt.

Zur Demaskierung der Antigene werden die Schnitte 2 x 5 min in der Mikrowelle mit Citratpuffer erhitzt und anschließend mit PBS gespült. Die Hemmung der endogenen Peroxidase erfolgt durch Inkubation über 30 min mit 1,5 % H₂O₂ in Methanol und anschließender Spülung mit PBS für 20 min. Daraufhin werden die Präparate 1 h mit Ziegennormalserum 1:10 mit Albuminzusatz in der feuchten Kammer überschichtet. Das Normalserum wird abgeschüttelt und die Präparate über Nacht mit dem Antikörper inkubiert. Der Antikörper wird in der Verdünnung 1:8000 eingesetzt, die Inkubation erfolgt in der feuchten Kammer im Kühlschrank. Daran anschließend wird ein neuerlicher Spülvorgang über 4 x 5 min mit PBS durchgeführt. Die Präparate werden für 30 min mit dem zweiten Antikörper - Biotin anti rabbit IgG - in der Verdünnung 1:400 in der feuchten Kammer überschichtet und anschließend 10 min mit PBS gewaschen. Die Inkubation mit ABC-Peroxidase-Reagens dauert 1 h und wird von einem weiteren 10-minütigen Spülvorgang abgelöst. Daraufhin werden die Schnitte 1,5 h mit DAB (Diaminobenzidin)-Substrat inkubiert und die Reaktion mit H₂O gestoppt. Die Gegenfärbung erfolgt mit Hämalaun.

Das frisch gewonnene Ejakulat wurde dreimal mit PBS gewaschen und mit 1000 U/min (91 g) zentrifugiert. Das Sediment wurde auf Objektträgern ausgestrichen und luftgetrocknet. Die Färbung erfolgt wie für Gewebeschnitte beschrieben.

In den immunhistochemischen Untersuchungen zeigte sich, dass mit Hilfe des Antikörpers Drüsenzellen der Prostata spezifisch angefärbt werden können (Fig. 3). Dies traf auch für pathologisch veränderte Prostatae zu, unabhängig von der Art der Läsion. Die einzige Ausnahme bildeten schlecht differenzierte Karzinomzellen der Prostata, in denen PSP immunhistochemisch nicht nachzuweisen war. In den untersuchten anderen Organen und in den Ausstrichen der gewaschenen Samenzellen konnte keinerlei positive Reaktion nachgewiesen werden.

Diese immunhistochemischen Untersuchungen der verschiedenen Organe zeigten, dass sich PSP nur in der Prostata lokalisieren liess. Eine Anfärbung der Spermien sowie eine schwach positive Reaktion in Pankreas und Speicheldrüse, wie sie in der Literatur schon beschrieben worden ist, konnte nicht nachvollzogen werden.

Ultraschalluntersuchungen:

Die Tiere wurden in Seitenlage fixiert. Die Prostata wurde im Transversalschnitt und im Sagittalschnitt dargestellt, vermessen und die Parenchymdichte und die Homogenität beurteilt.

Die Ultraschalluntersuchungen der Beaglerüden ergab ein physiologisches Bild der Prostata mit der der Rasse entsprechenden Größe und mit homogenem Parenchym. Die Prostata der kastrierten Rüden stellte sich entsprechend verkleinert dar und zeigte ebenfalls keinerlei Parenchymveränderungen. Bei allen Patienten konnte eine Prostatavergrößerung festgestellt werden. Bei Patienten, die neben der Vergrößerung mäßig inhomogenes Parenchym aufwiesen, wurde die Diagnose Hyperplasie gestellt. Patienten, die deutliche Parenchymhomogenitäten mit Verkalkungsherden und ebenfalls intraprostatistische Zysten zeigten, wurden der Gruppe mit chronischer Prostatitis zugeordnet.

ELISA:

Zur quantitativen Bestimmung des PSP wurde ein indirekter, kompetitiver ELISA herangezogen. Der eingesetzte Antikörper wurde mit gereinigtem PSP in Kaninchen gewonnen. Die Optimierung des Systems erfolgte nach der Methode von Crowther (Crowther "Competitive ELISA" in: The Protein Protocols, Walker M., ed. CD-ROM (1998), Sect. 12.7 und 12.9). Die Harnen der gesunden Rüden wurden anfangs in den Verdünnungen 1:500, 1:1000, 1:2000 und 1:4000 gemessen. Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, dass die Verdünnungen 1:1000 und 1:2000 ausreichend waren. Die Harnproben der kastrierten Rüden und der Hündinnen wurden zusätzlich unverdünnt eingesetzt.

Zur Kontrolle der Sensitivität wurden je eine Harnprobe und eine Spermaprobe in einer Verdünnungsreihe sowie eine additive Mischung der beiden Proben eingesetzt. Im linearen Bereich der Messkurve liess sich die Addition der Gehalte an PSP beider Proben über die Konzentrationsberechnung mit Hilfe der Eichkurve sowie im Kurvenverlauf eindeutig nachvollziehen. Die Kontrolle

der Spezifität diente dazu zu überprüfen, inwieweit Fremdprotein (Serum) bzw. Eigenfärbung der Probe (Blut) einen Einfluss auf die Ergebnisse des ELISA zeigten. Dazu wurde die PSP-Konzentration einer Harnprobe sowohl "nativ" als auch nach Zusatz von definierten Mengen an Serum und Blut bestimmt. Es zeigte sich, dass weder unterschiedliche Konzentrationen an Protein noch Farbstoff einen Einfluss auf die Ergebnisse der PSP-Bestimmung im Harn hatten.

Die mit dem ELISA ermittelten Ergebnisse zeigen, dass PSP als Marker für Veränderungen der Prostata verwendet werden kann. Es zeigte sich, dass ein PSP-Konzentrationsbereich für gesunde Rüden bei dieser Gruppe etwa im Bereich zwischen 20 und 300 µg PSP pro ml Harn vorliegt (siehe Tabelle 1 mit den gesunden Vergleichstieren). Eindeutig nicht nachweisbar war das Protein bei Hündinnen und kastrierten Rüden. Kurz nach der Kastration Hessen sich jedoch noch Spuren an PSP nachweisen.

Im Harn der Tiere mit Prostata-Hyperplasie und chronischer Prostatitis lagen die PSP-Konzentrationen größtenteils in einem Bereich, der mit jenem der gesunden Tiere überlappt, nicht jedoch einen physiologischen Wert für den jeweiligen Rüden darstellen muss (siehe Tabelle 2 mit den PSP-Konzentrationen in Harnen von Patienten). Jene Tiere mit akuter und nekrotisierender Prostatitis ließen sich alleine durch die Bestimmung von PSP im Harn eindeutig abgrenzen. Die Diagnose der Prostataerkrankung wurde durch Ultraschall und klinische Untersuchung gestellt, bei den Fällen mit nekrotisierender Prostatitis durch pathohistologische Untersuchungen. Bei akuter Prostatitis kam es zu sehr hohen PSP-Konzentrationen (1077 bis 2085 µg PSP/ml Harn), während bei Patienten mit nachgewiesener nekrotisierender Prostatitis sehr niedrige PSP-Konzentrationen (5,8 bis 7,7 µg PSP/ml) gemessen wurden.

Es zeigte sich, dass sich sogar trotz der geringen Anzahl an untersuchten Einzeltieren akute und nekrotisierende Prostatitiden alleine durch Bestimmung der PSP-Konzentration im Harn eindeutig diagnostizieren lassen.

Es zeigte sich aber auch, dass bereits stattfindende Veränderungen der Prostata auf zellulärer Ebene sich auch auf die PSP-Konzentration auswirken können, insbesondere, wenn Referenzwerte vom selben Tier herangezogen werden. Demgemäß bietet sich mit der vorliegenden Erfindung eine breitgestreute Untersuchung gesunder junger, geschlechtsreifer Rüden an, dass durch regelmäßige Messungen auch differenzierte Aussagen bei Erkrankungen, wie Hyperplasien und chronischen Prostatitiden, möglich sind. Das erfindungsgemäße System eignet sich daher speziell auch für die Früherkennung von Organveränderungen (z.B. in erster Linie Hyperplasien). Die Vorteile der erfindungsgemäßen Methode gegenüber herkömmlichen diagnostischen Verfahren liegt vor allem in der relativ einfachen und nichtinvasiven Technik. Durch die Früherkennung der Veränderungen in der Prostata bietet sich demgemäß die Möglichkeit der rechtzeitigen Therapie und somit wesentlich günstigere prognostische Aussichten.

Tabelle 1
PSP-Konzentration in Harnen gesunder Beagles

Rasse		Alter (Jahre)	Geschlecht	Erkrankung	Konzentration µg/ml
Beagle	1	4	m.	1	99
Beagle	2	4	m.	1	82
Beagle	3	4	m.	1	33
Beagle	4	4	m.	1	95
Beagle	5	4	m.	1	205
Beagle	6	4	m.	1	116
Beagle	1	4	m.	1	125
Beagle	2	4	m.	1	49
Beagle	3	4	m.	1	132
Beagle	4	4	m.	1	99
Beagle	5	4	m.	1	310
Beagle	6	4	m.	1	530
Beagle	2	4	m.	1	25

AT 409 192 B

Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Erkrankung	Konzentration µg/ml
Beagle	3	m.	1	164
Beagle	7	m.	1	100
Beagle	8	m.	1	129
Beagle	9	m.	1	244
Beagle	10	m.	1	114
Beagle	11	m.	1	79
Beagle	12	m.	1	133
Beagle	13	m.	1	428
Beagle	14	m.	1	81
Beagle	15	m.k.	1	0,051
Beagle	16	m.k.	1	0,065
Beagle	17	w.	1	0,011
Beagle	18	w.	1	0,016
Beagle	19	w.	1	0,051
Beagle	20	w.	1	0,050
Beagle	21	w.	1	0,012
Beagle	22	w.	1	0,037

Tabelle 2
PSP-Konzentrationen in Harnen von Patienten

Rasse	Alter (Jahre)	Geschlecht	Erkrankung	Konzentration µg/ml
Mischling	10	m.	2	34
Mischling	10	m.	2	258
Schäfer	6	m.	2	130
kl. Münsterländer	6	m.	2	293
Dobermann	8	m.	2	75
Schäfer	10	m.	2	21
Irish Setter	7	m.	2	917
Hirtentrüde	14	m.	2	662
Schäfer	9	m.	2	111
Spaniel	11	m.	2	475
Mischling	7	m.	2	403
Spaniel	4	m.	3	1970
Mischling	10	m.	3	1077
Rottweiler	6	m.	3	2085
Spaniel	14	m.	4	52
WHW-Terrier	11	m.	4	28
Mischling	15	m.	4	73
Mischling	12	m.	4	33
Dobermann	7	m.	4	190
Mischling	8	m.	4	36
Sheltie	9	m.	4	49
Alask. Malamute	11	m.	4	41
Mischling	13	m.	5	6
Mischling	12	m.	5	8

m. = männlich; w. = weiblich; m.k. = männlich/kastriert

Art der Erkrankung (Zuordnung zur Erkrankungsform erfolgte aufgrund der klin. Untersuchung und des Ultraschallbefundes):

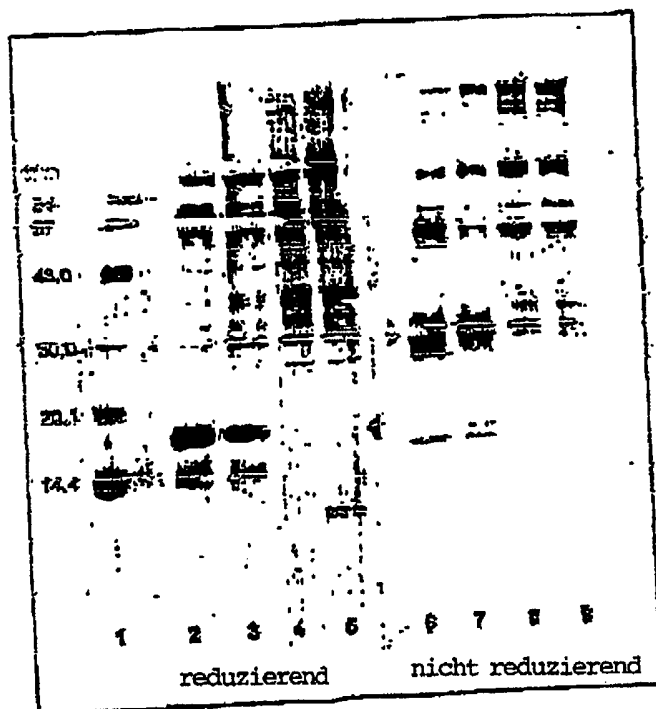
- 1 = gesund
- 2 = Hyperplasie
- 3 = akute Prostatitis
- 4 = chronische Prostatitis
- 5 = nekrotische Prostatitis

PATENTANSPRÜCHE:

1. Verfahren zur Detektion von Veränderungen in der Prostata von Rüden, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - Entnahme einer Harnprobe,
 - Bestimmen des Gehaltes an Prostata-spezifischem Protein (PSP) in der Harnprobe und
 - Vergleichen des bestimmten PSP-Gehaltes mit zumindest einem PSP-Referenzwert.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Bestimmung des PSP-Gehaltes mit immunologischen Mitteln durchgeführt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Referenzwert eine Referenzprobe aus einem gesunden Rüden oder einer gesunden Rüdenpopulation verwendet wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass ein physiologischer Referenzwert von 20 bis 300 µg PSP pro ml Harn als Referenzwert verwendet, und eine Harnprobe, die in diesem Bereich von 20 bis 300 µg PSP pro ml Harn liegt, als gesund detektiert wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass ein pathologischer Referenzwert von 800 bis 3000, insbesondere 1000 bis 2000, µg PSP pro ml Harn als Referenzwert verwendet und für eine Harnprobe, die in diesem Bereich von 800 bis 3000, insbesondere 1000 bis 2000 µg PSP pro ml Harn liegt, eine akute Prostatitis detektiert wird.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass ein pathologischer Referenzwert von 3 bis 15, insbesondere 5 bis 10, µg PSP pro ml Harn als Referenzwert verwendet und für eine Harnprobe, die in diesem Bereich von 3 bis 15, insbesondere 5 bis 10, µg PSP pro ml Harn liegt, eine nekrotische Prostatitis detektiert wird.
7. Verfahren zur Detektion von Veränderungen in der Prostata von Rüden, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - Bestimmen des Gehaltes an Prostata-spezifischem Protein (PSP) in einer Probe aus Prostatagewebe, und
 - Vergleichen des bestimmten PSP-Gehaltes mit zumindest einem PSP-Referenzwert.
8. Verfahren zur Detektion von Veränderungen in der Prostata von Rüden, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:
 - Bestimmen des Gehaltes an Prostata-spezifischem Protein (PSP) in einer Spermaprobe und
 - Vergleichen des bestimmten PSP-Gehaltes mit zumindest einem PSP-Referenzwert.
9. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 8, enthaltend die folgenden Komponenten:
 - Behälter zur Aufnahme einer Probe,
 - Mittel zur Bestimmung des PSP-Gehaltes in der Probe, und
 - Referenzwert.

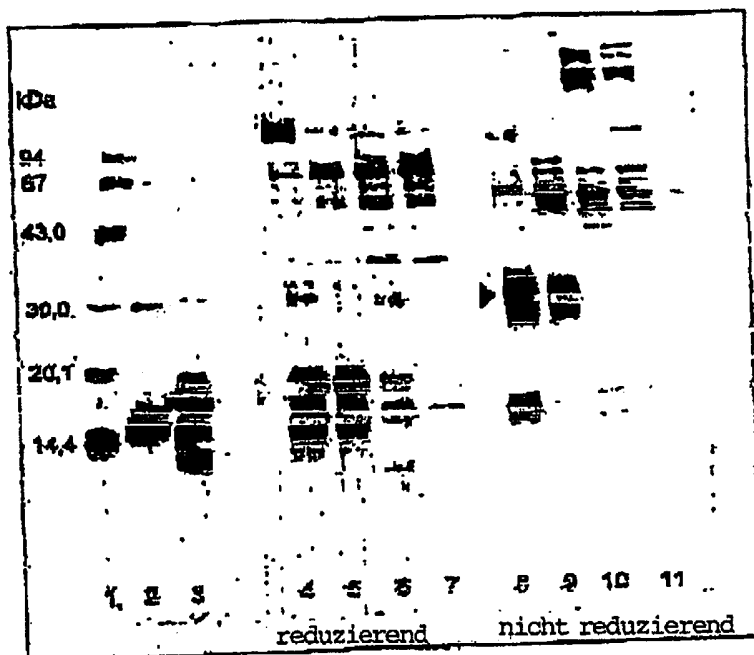
HIEZU 3 BLATT ZEICHNUNGEN

FIG. 1



SDS-PAGE, Harne gesunder Rüden; Im reduzierenden und nicht reduzierenden Gel, 1: Marker, 2,3,6,7: Rüde, 4 6: Rüde, kastriert; 5,9: Hündin; ◀, ▶: PSP.

FIG. 2



SDS-PAGE, Harne von Rüden mit Prostataerkrankung: im reduzierenden und nicht reduzierenden Gel. 1: Marker; 2: Hämoglobin; 3: Ejakulat; 4,8: Prostatahyperplasie; 5,9: akute Prostatitis; 6,10: nekrotisierende Prostatitis; 7,11: chronische Prostatitis; ►: PSP.

FIG. 3

