

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Tübingen**

Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie

Abteilungsleiter: Professor Dr. H. Oßwald

**Bedeutung der pharmakologischen Blockade von
Dopamin D₃ Rezeptoren für die Entstehung einer
diabetischen Nephropathie im Tiermodell**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
André Martin Kuohn
aus
Neustetten**

2005

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Luippold

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Brehm

1	EINLEITUNG.....	4
1.1	Gegenstand der Arbeit.....	4
1.2	Allgemeine Grundlagen.....	4
1.2.1	Anatomie und Funktionsweise des Nephrons.....	4
1.2.2	Diabetes mellitus.....	7
1.3	Spezielle Grundlagen.....	9
1.3.1	Diabetische Nephropathie.....	9
1.3.2	Diabetische Nephropathie und glomeruläre Hyperfiltration.....	11
1.3.3	Diabetische Nephropathie, Blutdruck und ACE-Inhibition.....	12
1.3.4	Dopamin und renale Dopaminsynthese.....	15
1.3.5	Dopaminrezeptoren.....	16
1.3.6	Lokalisation des Dopamin D ₃ Rezeptors in der Niere.....	16
1.3.7	Dopamin D ₃ Rezeptor und diabetische Nephropathie.....	17
1.4	Eigene Fragestellung.....	19
2	MATERIAL UND METHODEN.....	20
2.1	Versuchstiere.....	20
2.1.1	Haltungsbedingungen.....	20
2.1.2	Induktion des Diabetes mellitus.....	20
2.1.3	Implantation von Insulinstäbchen.....	21
2.2	Pharmaka.....	22
2.2.1	Trandolapril.....	22
2.2.2	BSF 201640.....	22
2.3	Versuchsgruppen.....	23
2.4	Experimenteller Ablauf.....	24
2.4.1	Studiendesign.....	24
2.4.2	Glucosemessung.....	24
2.4.3	Bestimmung des Körpergewichtes.....	25
2.4.4	Schwanzdruckmessung.....	25
2.4.5	Stoffwechselläufigversuche.....	26
2.4.6	Urinvolumenbestimmung und Urinprobengewinnung.....	26
2.5	Analytik.....	27
2.5.1	Konzentration von Natrium und Kalium im Urin.....	27

2.5.2	Konzentration von Chlorid im Urin	27
2.5.3	Urinosmolalität	28
2.5.4	Proteinbestimmung im Urin.....	28
2.5.5	Albuminbestimmung im Urin	28
2.5.6	Kreatininbestimmung im Urin	29
2.5.7	Glucosemessung im Urin.....	29
2.6	Berechnungen.....	30
2.6.1	Absolute Ausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid	30
2.6.2	Absolute Ausscheidung von Albumin, Protein und Glucose	30
2.6.3	Kreatinin-Clearance und glomeruläre Filtrationsrate.....	31
2.7	Statistik	32
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	Stoffwechselfäufigversuche.....	33
3.1.1	Blutglucose	33
3.1.2	Körpergewicht.....	34
3.1.3	Urinvolumen.....	35
3.1.4	Trinkmenge	35
3.1.5	Futtermenge.....	36
3.1.6	Renale Natrium-, Kalium-, und Chloridausscheidung	36
3.1.7	Urinosmolalität	37
3.1.8	Glucoseausscheidung im Urin	37
3.1.9	Kreatinin-Clearance	37
3.1.10	Albuminurie	39
3.1.11	Proteinurie	40
3.2	Schwanzdruckmessung	42
3.3	Nebenbefund Diabetische Katarakt	42
4	DISKUSSION	44
4.1	Modell des Diabetes mellitus	44
4.2	Glomeruläre Hyperfiltration	46
4.3	Albumin- und Proteinurie.....	52
4.4	Blutdruckverhalten	54
4.5	Diabetische Katarakt und ACE-Inhibition	56

4.6	Klinische Implikation.....	57
5	ZUSAMMENFASSUNG	59
6	LITERATURVERZEICHNIS	61
7	ANHANG.....	68
7.1	Tabellen und Abbildungen	68
7.1.1	Blutglucose	69
7.1.2	Körpergewicht.....	70
7.1.3	Urinvolumen.....	71
7.1.4	Trinkmenge.....	72
7.1.5	Futtermenge.....	73
7.1.6	Natriumausscheidung	74
7.1.7	Kaliumausscheidung.....	75
7.1.8	Chloridausscheidung	76
7.1.9	Urinosmolalität.....	77
7.1.10	Glucoseausscheidung.....	78
7.1.11	Kreatinin-Clearance	79
7.1.12	Albuminurie	80
7.1.13	Proteinurie	81
7.1.14	Systolischer Blutdruck.....	82
7.2	Danksagung.....	83
7.3	Lebenslauf	84

1 EINLEITUNG

1.1 Gegenstand der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wird an einem Rattenmodell des Diabetes mellitus untersucht, in wie weit Dopamin D₃ Rezeptoren für die Entwicklung der pathologischen Hyperfiltration bei der diabetischen Nephropathie eine Rolle spielen. In diesem Zusammenhang soll geprüft werden, ob die Behandlung mit einem Dopamin D₃ Rezeptorantagonisten eine nephroprotektive Wirkung aufweist.

1.2 Allgemeine Grundlagen

1.2.1 Anatomie und Funktionsweise des Nephrons

Ein Nephron besteht aus einem Nierenkörperchen und einem Tubulusapparat (Abb. 1). Beide menschlichen Nieren zusammen enthalten etwa 2 Millionen dieser kleinsten Funktionseinheiten. Die Nierenkörperchen, bestehend aus der Bowmankapsel und dem in diese eingestülpten Glomerulus (Abb. 2a, b), liegen in der Nierenrinde. Oberflächlich dicht unter der Kapsel gelegene kortikale Nephronen bilden kurze, die juxtamedullären Nephronen dagegen lange Schleifen der Tubuli. Im Vas afferens wird der Blutdruck in den nachgeschalteten Glomeruluskapillaren autoregulatorisch auf etwa 50 mmHg eingestellt. Dadurch wird der renale Blutfluss bei systolischen Blutdruckwerten zwischen 90 und 180 mmHg konstant gehalten. Im Glomerulus wird Blutplasma in den Bowman-Kapselraum filtriert. Blutzellen und großmolekulare Bestandteile werden dabei vom Glomerulusfilter zurückgehalten. Das Blut verlässt den Glomerulus über das Vas efferens, welches in die ins Nierenmark ziehenden Vasa recta mündet.

Der Glomerulusfilter ist dreischichtig und besteht aus der Endothelschicht der Kapillaren, der Basalmembran und dem Epithel der Bowman-Kapsel mit ineinander verzahnten Podozyten und einer, die entstehenden Kontaktschlitzspannenden, Membran. Am Harnpol gelangt das Ultrafiltrat, der Primärharn, in das nachgeschaltete Tubulussystem. Dort werden ca. 99% des Primärharns wieder rückresorbiert und dem zirkulierenden Blut zugeführt. Der in den Sammelrohren gebildete Endharn gelangt über das Nierenbeckenkelchsystem in die ableitenden Harnwege und wird ausgeschieden. Das Tubulussystem wird in proximalen Tubulus, Henle-Schleife und distalen Tubulus unterteilt. Im proximalen Tubulus werden bereits zwei Drittel des filtrierte Wassers und NaCl rückresorbiert. In der nachfolgenden Henle-Schleife erfolgt der Aufbau eines osmotischen Gradienten in der Nierenmark über die NaCl-Resorption im für Wasser nicht permeablen aufsteigenden Teil, was vor allem durch den luminalen Na^+ , K^+ , 2Cl^- Cotransport bewerkstelligt wird. Die Henle-Schleife endet im distalen Tubulus der stets zum ursprünglichen Glomerulus zurückkehrt und dort eine Zone sehr engen Kontaktes mit dem Gefäßpol bildet. In diesem Bereich, auch juxtaglomerulärer Apparat genannt, produzieren Epitheloidzellen Renin und die Macula densa registriert die Natriumkonzentration im Tubulusharn um gegebenenfalls gegenregulatorische Maßnahmen, wie z.B. die Kontraktion des Vas afferens, auszulösen. Auch kann das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System aktiviert werden um durch Vasokonstriktion, Verminderung der glomerulären Filtrationsrate und vermehrte Natriumrückresorption zur Konstanthaltung bzw. Normalisierung von Plasmavolumen, -osmolarität und Blutdruck beizutragen. Der distale Tubulus mündet in das Sammelrohr. Dort werden unter der Wirkung von Adiuretin (ADH) Wasserkanäle eingebaut. Während der Passage durch das zunehmend hypertone Nierenmark wird nochmals Wasser entzogen. Wenn wenig ADH vorhanden ist (z.B. bei Hyperhydratation) sind die Sammelrohre relativ undurchlässig für Wasser und es kommt zur konsekutiven Wasserdiurese.

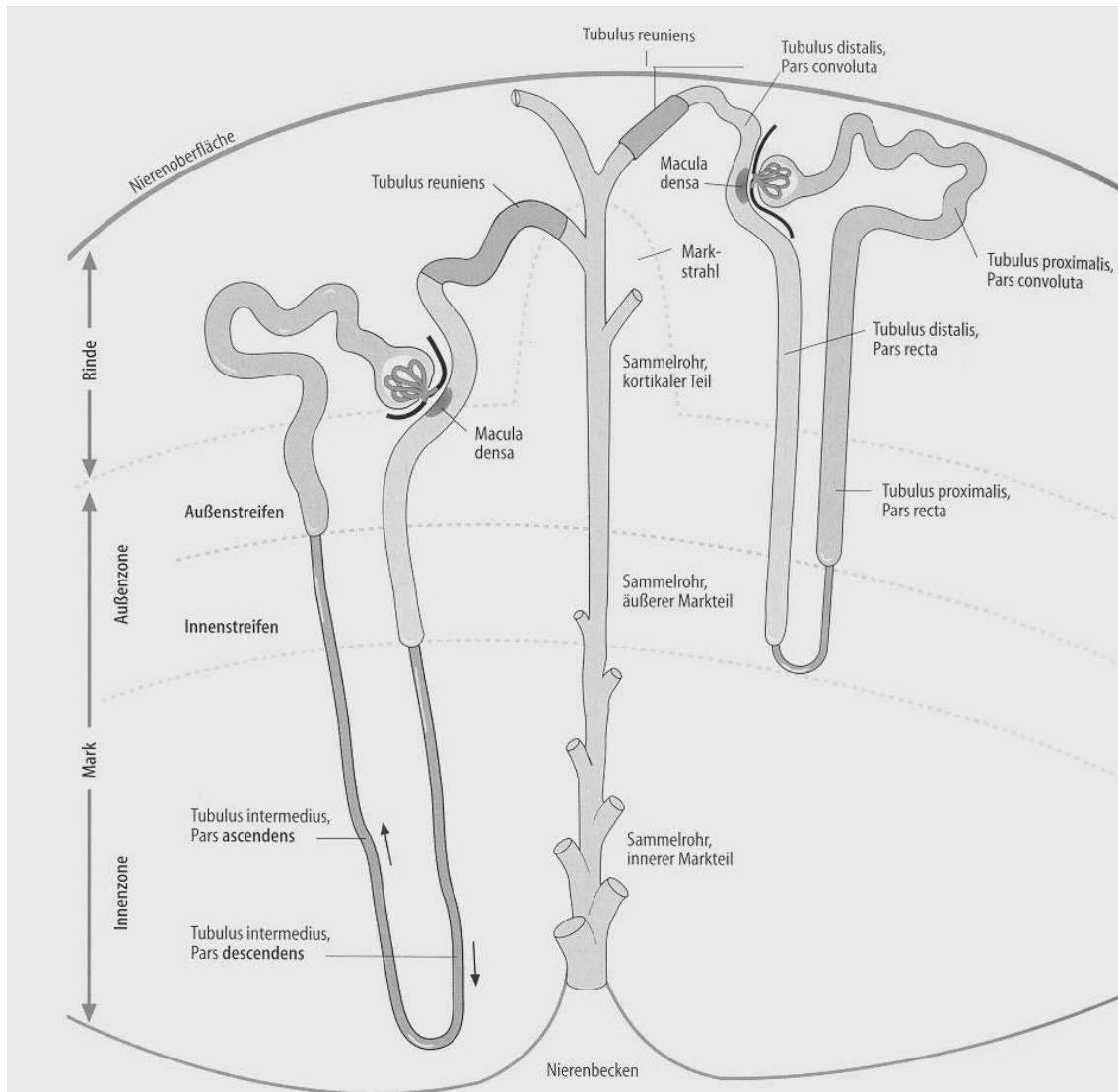


Abb. 1: Juxtamedulläres (links) und kortikales (rechts) Nephron mit jeweils langer, bzw. kurzer Henleschen Schleife in der schematischen Darstellung. Die Grenzen von Mark und Rinde, bzw. die Zonen des Marks sind gestrichelt eingezeichnet. Das Sammelrohr und die geraden Abschnitte des proximalen und distalen Tubulus des kortikalen Nephrons liegen in einem Markstrahl, der gleichfalls durch eine gestrichelte Linie abgegrenzt ist. (aus Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Histologie 5. Auflage)

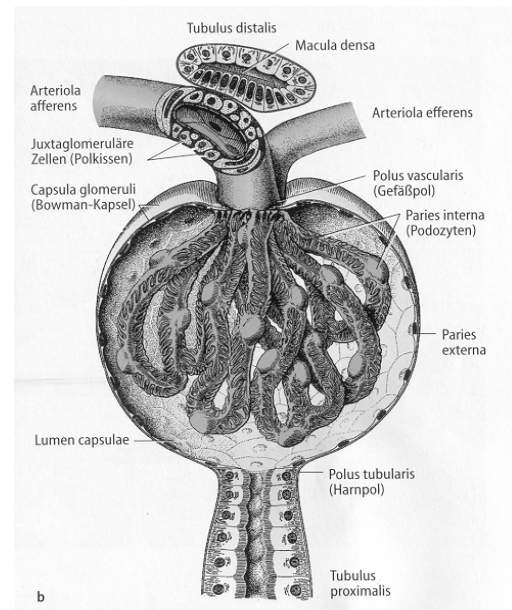
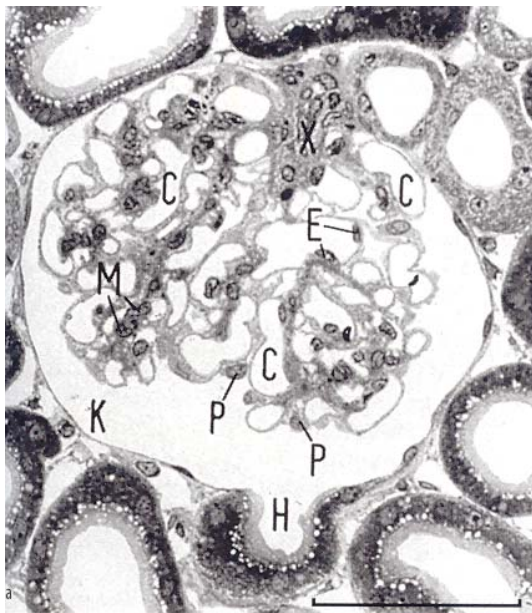


Abb. 2a (links) und Abb. 2b (rechts): Aufbau eines Glomerulus. a: Der juxtaglomeruläre Apparat X markiert den Gefäßpol. Gegenüber der mit H gekennzeichnete Harnpol. C Glomeruluskapillaren, E Kapillarendothelien, K Bowman-Kapselraum, M Mesangiumzellen, P Podozyten. Balken = 100µm. (aus Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. Histologie 5. Auflage)

1.2.2 Diabetes mellitus

Weltweit gibt es aktuell ca. 150 Millionen Diabetiker. In Deutschland sind es etwa 4 Millionen, was einem Bevölkerungsanteil von ungefähr 5% entspricht. Es wird von einer genau so großen Dunkelziffer ausgegangen. Die Zahl der Erkrankten ist weiterhin zunehmend.

Diabetes mellitus fasst eine Gruppe metabolischer Störungen zusammen, die durch eine Hyperglykämie charakterisiert sind. Neben den beiden häufigsten Formen, dem insulinabhängigen Typ 1 Diabetes und dem primär insulinunabhängigen Typ 2 Diabetes, gibt es noch den Gestationsdiabetes und

verschiedene Sonderformen. Dem meist in jungen Jahren auftretenden Typ 1 Diabetes liegt eine Autoimmunreaktion zugrunde, die zum Teil genetisch determiniert ist. Es konnten Antikörper gegen die Inselzelloberfläche sowie Inselzellproteine und das Insulin selbst identifiziert werden. Dabei kann das Auftreten dieser Antikörper dem manifesten Diabetes Monate bis Jahre vorausgehen. Der auch Altersdiabetes genannte Typ 2 Diabetes tritt meist erst nach dem 35. Lebensjahr auf. Insulinresistenz und Insulinsekretionsstörung stehen dabei im Vordergrund. Auch hier liegt eine genetische Disposition vor, jedoch spielen üppige Ernährung, Übergewicht und Bewegungsmangel eine große Rolle. Absoluter und relativer Insulinmangel beeinträchtigen den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel. Daraus resultieren Hyperglykämie, Hyperlipidämie sowie gesteigerter Protein- und Lipidabbau. Überschreitet die Glucosekonzentration die renale Schwelle kommt es zur Glucosurie und durch die osmotische Wirkung auch zur Polyurie. Neben Polyurie gehören Polydipsie, Polyphagie, Müdigkeit und Gewichtsverlust zur klinischen Symptomatik.

Die Therapie beim Typ 1 Diabetes ist die Insulinsubstitution. Wichtig sind auch eine intensive Schulung der Patienten sowie das Einhalten einer Diät und die regelmäßige körperliche Aktivität. Beim Typ 2 Diabetiker sollte zunächst eine Gewichtsnormalisierung angestrebt werden. Schulung, körperliche Betätigung und Diät sind auch hier angezeigt. Sollte das zur Blutzuckernormalisierung nicht genügen können orale Antidiabetika verabreicht werden. Ist auf diese Weise keine Normoglykämie zu erzeugen, muss Insulin zum Einsatz kommen.

Durch eine gute Blutzuckereinstellung können mögliche Folgeschäden des Diabetes zum Teil verhindert oder wenigstens hinausgezögert werden. Zu den typischen Folgeschäden zählen Retinopathie, Neuropathie, Makro- und Mikroangiopathien, und Nephropathie.

1.3 Spezielle Grundlagen

1.3.1 Diabetische Nephropathie

Unter den Begriff „Diabetische Nephropathie“ fallen sämtliche renale Läsionen, die bei Patienten mit Diabetes mellitus auftreten können. Dazu zählen die diffuse oder noduläre Glomerulosklerose, die chronisch interstitielle Nephritis, Papillennekrosen sowie diverse tubuläre Läsionen. Dabei tritt die diffuse diabetische Glomerulosklerose am häufigsten auf. Unabhängig von einer klinisch manifesten Nephropathie, kommt sie bei den meisten Diabetikern mit Nephropathie vor. Die noduläre Glomerulosklerose Typ Kimmelstiel-Wilson ist charakteristisch beim Diabetes mellitus. Eine Einteilung der diabetischen Nephropathie in 5 Stadien zeigt Tabelle 1.

Tab. 1: Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie (nach Mogensen)

	Zeitintervall	Leitsymptome	Prognose
Stadium I -Hypertrophie -Hyperfunktion	Bei Diabetesdiagnose	Große Nieren, GFR und renaler Plasmafluß erhöht	Reversibel
Stadium II -Klinische Latenz	2-5 Jahre	Verdickung der glomerulären Basalmembran u. Expansion des Mesangiums	Bedingt reversibel
Stadium III -Beginnende Nephropathie	5-15 Jahre	Mikroalbuminurie, Blutdruckanstieg	Progredienz kann verhindert werden
Stadium IV -Klinisch manifeste Nephropathie	10-15 Jahre	Persistierende Proteinurie, Abnahme der GFR, Hypertonie in 60%	Progredienz kann verzögert werden
Stadium V -Niereninsuffizienz	15-30 Jahre	Serumkreatinin erhöht, Hypertonie in 80%	Irreversibel, weitere Progredienz kann verlangsamt werden

Bei Typ 1 Diabetikern und Typ 2 Diabetikern deren Diabetes sich bis zum mittleren Alter manifestiert, entwickelt sich in 30-40 % eine diabetische Nephropathie (Andersen et al. 1983, Hasslacher et al. 1989, Ritz und Orth 1999). Von den Typ 1 Diabetikern mit Mikroalbuminurie erreichen ohne adäquate Therapie 75 % nach 10-15 Jahren das Stadium der manifesten Proteinurie. Bei ansteigender Zahl dialysepflichtiger Typ 2 Diabetiker ist die renale Komplikation des Diabetes mellitus mittlerweile die häufigste Ursache einer terminalen Niereninsuffizienz (Ismail et al. 1999). So berichten einige Dialysezentren von über 50 % Diabetikern unter den Dialysepatienten (Ritz et al. 1996). Nach Daten des QuaSi-Niere Projektes (Frei und Schober-Halstenberg 1998) beträgt der Diabetikeranteil zu Beginn der Nierenersatztherapie in Deutschland 31 % (7 % Typ 1 und 24 % Typ 2) insgesamt aber nur 21 %, was auf eine hohe Absterbequote zurückzuführen ist. Die 5-Jahresüberlebensrate beträgt ab Start der Dialysebehandlung 33 % bei Typ 1 Diabetikern und 5 % bei Typ 2 Diabetikern (Koch et al. 1997).

Bei Patienten mit diabetischer Nephropathie finden sich histologisch typischerweise eine mesangiale Proliferation, eine glomeruläre Basalmembranverdickung und eine glomeruläre Sklerose. Ursächlich für diesen progressiv verlaufenden Prozess spielen u.a. „Advanced Glycosylation End Products“, Aktivierung der Proteinkinase C, vermehrte Expression von TGF- β als Wachstumsfaktor und genetische Faktoren eine Rolle (Singh et al. 1998, Wolf und Ziyadeh 1999). Die „Advanced Glycosylation End Products“ entstehen durch kovalente Bindung der Glucose an Proteine und wirken über eine Verdickung der Basalmembran mit Einbau von Plasmaproteinen sowie über eine Steigerung der Kollagensynthese. Eine gute Blutzuckerkontrolle kann mit dazu beitragen diese Prozesse aufzuhalten, so verschlechtert sich die Nierenfunktion bei Patienten mit erhöhtem HbA_{1c}-Wert schneller als bei Patienten mit niedrigerem HbA_{1c} (Bojestic et al. 1994). Das trifft vor allem bei Typ 1 Diabetikern zu. Für die Vermutung, dass auch genetische Faktoren für das Entstehen und Voranschreiten der Nephropathie prädisponierend sind, spricht, dass in Amerika die Inzidenz und Schwere der diabetischen

Nephropathie unter der schwarzen Bevölkerung um den Faktor 3-6 gegenüber den Weißen erhöht ist (Smith et al. 1991).

1.3.2 Diabetische Nephropathie und glomeruläre Hyperfiltration

Obwohl alle Diabetiker im Laufe weniger Jahre morphologische Läsionen an den Glomeruli entwickeln (Österby 1983), leiden viele Diabetiker auch nach jahrelangem Diabetes nicht an einer klinisch relevanten Nephropathie (Andersen et al. 1983). Es war von großem Interesse, frühzeitig zu erkennen, welche Patienten betroffen sein werden. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte glomeruläre Filtrationsrate für die Entstehung einer diabetischen Nephropathie ein Risikofaktor darstellt (Mogensen und Christensen 1984). Wenn die Hyperfiltration eingetreten ist, so ist der Weg zur Nephropathie gebahnt, unabhängig von der Qualität der Stoffwechselkontrolle (Rudberg et al. 1992). Diese Veränderungen in der renalen Hämodynamik treten sowohl beim klinischen als auch beim experimentellen Diabetes mellitus auf. Man wusste schon vorher, dass bei schlechterer Blutzuckerkontrolle die GFR mit der Hyperglykämie ansteigt (Mogensen und Andersen 1975). Wenn jedoch der Blutglucosespiegel extrem erhöht ist, wie z. B. bei der diabetischen Keto-Azidose, bleibt die Hyperfiltration aus (Reubi 1953). Veränderungen in der GFR hängen aber nicht nur von der Blutglucosekonzentration ab. So führt eine durch Zuckerüberladung herbeigeführte Hyperglykämie beim Gesunden zwar zu einer Steigerung der GFR, jedoch längst nicht so stark wie beim Diabetiker mit vergleichbarer Hyperglykämie (Brochner-Mortensen 1973). Es wird vermutet, dass Insulin unabhängig von seiner Wirkung auf den Blutzucker in die Regulation der renalen Hämodynamik eingreift. Insulin ist nämlich in der Lage die glomeruläre Filtrationsrate bei unkontrolliertem Diabetes akut zu senken (Mogensen et al. 1978) und fähig direkt an spezifischen Rezeptoren isolierter Glomeruli zu binden (Kurokawa et al. 1978).

1.3.3 Diabetische Nephropathie, Blutdruck und ACE-Inhibition

Einführend sollen zunächst die physiologischen Grundlagen des Renin-Angiotensin-System (RAS), welches neben dem Sympathikus das wichtigste Regulationssystem für Blutdruck, Salz- und Wasserhaushalt ist, dargelegt werden. Renin ist eine Protease, die von den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet und von dort ans Blut abgegeben wird. Es spaltet aus dem hauptsächlich in der Leber und im Fettgewebe gebildeten Angiotensinogen das Dekapeptid Angiotensin I ab. Von diesem wird durch das Angiotensin Converting Enzyme (ACE) ein Dipeptid abgespalten und so in das Oktapeptid Angiotensin II umgewandelt. Das menschliche ACE ist an Zellmembranen, vor allem von Endothelzellen und glatten Muskelzellen gebunden. Im Plasma ist ACE nur in geringer Aktivität nachweisbar. Der eigentliche Effektor, das Angiotensin II stimuliert im proximalen Tubulus direkt die Natriumreabsorption. Es bewirkt über eine Erhöhung der Aldosteronproduktion in der Nebennierenrinde indirekt die Natrium- und Wasserreabsorption in den Sammelrohren. Außerdem fördert es Durstgefühl und Salzappetit. Neben der Zunahme des Extrazellulärvolumens induziert Angiotensin II auch direkt eine Vasokonstriktion. Durch diese Mechanismen wirkt Angiotensin II blutdrucksteigernd. Alle diese Wirkungen werden über Angiotensin II AT_1 -Rezeptoren vermittelt. Daneben existiert noch ein AT_2 -Rezeptor, der hauptsächlich im fetalen Gewebe exprimiert wird. Es wird vermutet, dass dieser Rezeptor den Wirkungen des AT_1 -Rezeptors auf den Blutdruck gegensteuert.

Dieses System kann pharmakologisch auf verschiedene Weise beeinflusst werden. Dabei wird die größte praktische Bedeutung den ACE-Hemmern zugeschrieben. Aufgrund des oben gesagten, ist es nachvollziehbar, dass ACE-Hemmer zur Blutdrucksenkung genutzt werden können. Da das ACE auch als Kininase II Bradykinin inaktiviert, wird dessen indirekte vasodilatierende Wirkung unter ACE-Inhibition verstärkt, wodurch der Blutdruck zusätzlich

gesenkt wird. Eine weitere Therapieoption bieten die neueren Angiotensin-II-Antagonisten, die selektiv den AT₁-Subtyp blockieren.

Diabetes und arterielle Hypertonie treten häufig gemeinsam auf (Simonson 1988). Die Hypertonie wird als Ursache (Mogensen und Christensen 1984) und Folge (Christensen et al 1987) der diabetischen Nephropathie angesehen. Schon lange ist bekannt, dass eine antihypertensive Therapie das Fortschreiten der diabetischen Nephropathie verzögern kann (Mogensen 1982, Parving et al 1983). Es wurde angenommen, dass die diabetische Nephrosklerose durch den erhöhten glomerulären Druck, der auch unabhängig von einer systemischen Hypertension auftreten kann und die Passage von Proteinen durch die Basalmembran bedingt, verursacht wird (Hostetter et al. 1982). Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse einer tierexperimentellen Studie an normotensiven und hypertensiven diabetischen Wistar Kyoto Ratten (Bank et al. 1987). Dabei war der glomeruläre Druck bei normotensiven diabetischen Ratten im Vergleich zu nicht-diabetischen normotensiven Ratten erhöht und bei diabetischen hypertensiven Tieren sogar weiter gesteigert. Trotz des unterschiedlichen glomerulären Druckes bei den diabetischen Tieren waren Unterschiede in der GFR und Proteinurie genau so wenig festzustellen wie nach 6 Monaten in der histologischen Einstufung. Wurden jedoch ursprünglich hypertone diabetische Tiere medikamentös in einen hypotensiven Zustand überführt, entwickelten sie nur geringe Veränderungen wie sie auch normotensive nicht-diabetische Ratten zeigten, was wiederum den protektiven Effekt einer antihypertensiven Therapie bestätigt.

Weiter wurden den ACE-Hemmern nephroprotektive Eigenschaften unabhängig von ihrer antihypertensiven Wirkung zugesprochen (Lewis et al. 1993). Das gilt vornehmlich für Typ 1 Diabetiker. Beim Typ 2 Diabetes konnte ein Vorteil gegenüber anderen Antihypertensiva nicht einheitlich nachgewiesen werden. Zum Beispiel konnte in der UKPDS-Studie (1998) ein spezieller nephroprotektiver Effekt von Captopril nicht belegt werden. In tierexperimentellen Studien an diabetischen Ratten wurde unter ACE-Inhibition

(Anderson et al 1989) und unter Angiotensin II Rezeptor-Blockade (Remuzzi et al. 1993) jeweils eine nephrotektive Wirkung beobachtet, die sogar über die Begrenzung der diabetischen Schäden hinaus ging. So stieg unter Captopril die Albuminausscheidung nach 68 Wochen Diabetes so gut wie nicht an, während sie bei der gesunden Kontrollgruppe ab der 44. Woche deutlich zunahm. Auch war bei diesen Tieren der glomeruläre Sklerose Score signifikant kleiner als bei den Kontrolltieren. Im Vergleich dazu zeigte eine, der ACE-Inhibition bezüglich des Blutdrucks gleichwertige, antihypertensive Therapie zwar eine Verbesserung gegenüber der reinen Insulintherapie, jedoch waren gegenüber der Kontrollgruppe deutliche Zeichen der Nierenschädigung nachzuweisen. In Experimenten, bei denen der AT₁-Antagonist Losartan zum Einsatz kam, zeigten sich nach einer Diabetesdauer von 12 Monaten ebenfalls in diese Richtung weisende Ergebnisse. Die Proteinurie die sich auch bei den Kontrolltieren einstellte, war in der Diabetesgruppe mit Losartan etwas leichter ausgeprägt. Ebenso war das Ausmaß der glomerulären Sklerose signifikant gesenkt (Remuzzi et al. 1993).

Worauf die nephroprotektiven Wirkungen einer Blockade des Renin-Angiotensin-Systems letztendlich beruhen kann noch nicht mit Sicherheit gesagt werden. Dem Angiotensin II kommt dabei eine große Bedeutung zu. Ob es aber die Schlüsselrolle spielt ist nicht unbestritten. So konnte durch eine Angiotensin II-Infusion die durch eine Langzeit-ACE-Inhibition hervorgerufene Reduktion einer Proteinurie nicht aufgehoben werden (Heeg et al. 1991). Der antiproteinurische Effekt könnte durch einen Podozyten-erhaltenden Mechanismus verursacht sein. So bewahrte Trandolapril diabetische Ratten über 6 Monate vor Podozytenverlust und -hypertrophie (Gross et al. 2003).

Auf Grund des vielfach nachgewiesenen protektiven Nutzens, stellt die Blockade des Renin-Angiotensin-Systems neben der optimierten Blutzuckereinstellung, der Proteinrestriktion und der Blutdrucksenkung eine tragende Säule bei der Behandlung der diabetischen Nephropathie dar.

1.3.4 Dopamin und renale Dopaminsynthese

Dopamin ist ein endogener zu den Katecholaminen zählender Neurotransmitter. Das biogene Amin wird aus der Vorstufe L-Tyrosin, welches mit der Nahrung aufgenommen wird oder durch Hydroxylierung von L-Phenylalanin entsteht, gebildet. Dopamin selbst ist wiederum Ausgangspunkt für die zwei anderen natürlichen Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin, die in dieser Reihenfolge enzymatisch gebildet werden. Abhängig vom Vorhandensein der benötigten Enzyme, kommt es zur Bildung des jeweiligen Neurotransmitters. Hohe Dopaminkonzentrationen finden sich in den Kernarealen (Putamen, Nucleus caudatus) des extrapyramidalen Systems.

Dopamin wird auch in der Niere gebildet. Die dopaminergen Nerven die es in der Niere gibt (Dinnerstein et al 1979), leisten aber weniger als 10 % der renalen Dopaminproduktion (Baines 1982, Adam und Adams 1985). Allerdings kann die Dopaminfreisetzung in der Niere durch vagale Impulse gesteigert werden (Hedge und Lokhandwala 1992). Die Hauptquelle des renalen Dopamins bildet frei filtriertes L-Dopa, welches über einen Na^+ /L-Dopa-Symport von den Tubuluszellen aufgenommen und durch die L-AADC (aromatic amino acid decarboxylase) in Dopamin umgewandelt wird (Suzuki et al. 1984). So korreliert die Dopaminausscheidung im Urin mit der Menge von zuvor verabreichtem L-Dopa (Mühlbauer et al. 1997). Die Umwandlung findet hauptsächlich in den proximalen Tubuli statt, wo auch die höchste Aktivität der L-AADC gemessen werden konnte (Hayashi et al. 1990). Die Konzentration von L-AADC nimmt entlang des Nephrons kontinuierlich ab, so dass 75 % der renalen L-AADC im Kortex und nur 25 % in der Medulla lokalisiert sind. Dopamin wird in der Niere weder von den dopaminergen Nerven noch von den Tubuluszellen zu Noradrenalin weiterverarbeitet, da dort keine Dopamin β -Hydroxylase vorhanden ist (Bell et al. 1988). Die renal ausgeschüttete Dopaminmenge spiegelt sich in der Dopaminmenge im Urin wieder, da die aus dem Plasma filtrierte Dopaminmenge vernachlässigbar klein ist (Van Loon und Sole 1980).

1.3.5 Dopaminrezeptoren

Dopamin verfügt über ein eigenes Rezeptorsystem. Zum Beispiel kann die blutdrucksenkende Wirkung von niedrig dosiertem Dopamin durch adrenerge Rezeptorblockade nicht gehemmt werden (Goldberg 1972). Die Dopaminrezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, die im Allgemeinen aus 7 transmembranären Domänen bestehen (Schwartz 1996). Die pharmakologische Einteilung in D₁ und D₂ Rezeptor (Kebabian und Calne 1979), wonach die Adenylatzyklase stimuliert bzw. gehemmt wird, wurde zu D₁-like und D₂-like Subtypen ausgebaut, nachdem durch molekulare Klonierung weitere Rezeptoren, die sich nach ihrer Pharmakologie einer der beiden Klassen zuordnen ließen (Seeman und Van Tol 1994), identifiziert wurden. Zur D₁ Subgruppe gehören der D₁ Rezeptor (Deary et al. 1990) und der D₅-Rezeptor (Sunahara et al. 1991), die bei den Nagetieren auch mit D_{1A} und D_{1B} bezeichnet werden. Die D₂ Subgruppe beinhaltet den D₂ Rezeptor (Chio et al. 1990), den D₃ Rezeptor (Sokoloff et al. 1990) und den D₄ Rezeptor (Van Tol et al. 1991). Ihre Affinität zu Dopamin nimmt dabei in der Reihenfolge D₃>D₅>D₂>D₄>D₁ ab (Jose et al. 1992). Diese 5 Rezeptoren wurden auch in der Niere nachgewiesen (Missale et al. 1998).

1.3.6 Lokalisation des Dopamin D₃ Rezeptors in der Niere

Im ZNS konnte der D₃ Rezeptor in hoher Dichte im Bereich des Tuberculum olfactorium, der Stria terminalis und des Nucleus accumbens, sowie vereinzelt im Striatum nachgewiesen werden (Sokoloff et al. 1992).

Im Gegensatz zu einer Vielzahl an Studien zur Funktion des renalen D₃ Rezeptors existieren nur wenige Arbeiten über seine Lokalisation. O'Connell et al. (1998) konnten ihn in einer immunhistochemischen Arbeit mit Hilfe eines Antikörpers markieren. Er war innerhalb der Glomeruli, dort vor allem an den

Podozyten, im proximalen und distalen Tubulus und den Sammelrohren nachzuweisen. Media und Adventitia der renalen Arterien waren ebenso angefärbt. Im Tubulus waren ausschließlich die apikalen Anteile markiert. Bahnbrechende Untersuchungsergebnisse zur D₃ Rezeptorlokalisierung liefert ein aktuelle Arbeit von Nürnberger et al. (2004). Wie bei O'Connell et al. wurden keine D₃ Rezeptoren in der Markregion lokalisiert. Der Rezeptor wurde in verschiedenen Strukturen des proximalen Tubulus detektiert, besonders in Abschnitten nahe oder mit Verbindung zum Harnpol des Glomerulus. Anders als O'Connell et al. konnten Nürnberger et al. das D₃ Rezeptorprotein nicht an anderen Orten wie distale Tubuli, Sammelrohre, Glomeruli oder Nierengefäße, nachweisen. Wobei die Autoren die Möglichkeit einer Maskierung von Rezeptoren durch die Fixation einräumen. Erstmals gelang es Nürnberger et al., die D₃ Rezeptoren subapikal im Zytoplasma nachzuweisen, was nach ihren Überlegungen auf internalisierte apikale oder neu synthetisierte Rezeptoren hindeuten könnte. Nürnberger et al. halten es für möglich, dass die von O'Connell in der Zellmembran liegenden Rezeptoren neben den intrazellulären Rezeptoren existieren könnten, weisen aber gleichzeitig darauf hin, dass nur der von ihnen verwendete Antikörper nachgewiesen spezifisch für D₃ Rezeptoren ist. Über die funktionelle Bedeutung der intrazellulären Rezeptoren, und in wie weit diese neue Erkenntnis für künftige Experimente und deren Interpretation richtungweisend sein wird, kann zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

1.3.7 Dopamin D₃ Rezeptor und diabetische Nephropathie

Dopamin und Dopaminrezeptoren sind an zahlreichen Regulationsvorgängen im Organismus, auf die an dieser Stelle nicht näher eingegangen werden kann, beteiligt. So beeinflusst das Dopaminsystem auch die renale Hämodynamik und Exkretionsfunktion (Lee 1993). Auch bei der Vermittlung der diabetischen Nephropathie wird eine Beteiligung vermutet.

Wie bereits in 1.3.1 erörtert, ist die glomeruläre Hyperfiltration prädestinierend für die Entwicklung des Vollbildes einer diabetischen Nephropathie. An genau dieser Stelle dürfte der Angriffspunkt der unterschiedlichen Dopaminwirkungen liegen. Barthelmebs et al. gelang es durch Stimulation von renalen Dopaminrezeptoren mit den Dopaminvorstufen L-Dopa und Gludopa die glomeruläre Hyperfiltration im Frühstadium des Streptozotocin induzierten Diabetes bei Ratten aufzuheben. Dabei zeigte die Gabe von L-Dopa keinen Effekt wenn zusätzlich der Dopa-Decarboxylase-Hemmer Carbidopa verabreicht wurde. Die Wirkung von L-Dopa konnte ebenso mit dem selektiven D₁ Antagonisten SCH 23390 aufgehoben werden. Da auch mit dem selektiven D₁ Agonisten Fenoldopam die Hyperfiltration reduziert werden konnte, wurde abgeleitet, dass die Normalisierung der glomerulären Filtration durch die Stimulation von D₁ Rezeptoren vermittelt werden kann (Barthelmebs et al. 1991).

Was die D₂-ähnlichen Rezeptoren betrifft, lies sich durch eine gezielte Stimulation dieser Rezeptoren mit Quinpirol gleiche Veränderungen in der renalen Hämodynamik wie bei der Aminosäuren induzierten Hyperfiltration hervorrufen. In beiden Fällen konnte die Hyperfiltration mit dem nur peripher wirkenden D₂-like Antagonisten Domperidon teilweise und mit S(-)-Sulpirid, einem peripher und zentral wirksamen Antagonisten, komplett aufgehoben werden. Daraus wurde gefolgert, dass die Steigerung der GFR über D₂-ähnliche Rezeptoren vermittelt wird, wobei zentrale und periphere Rezeptoren beteiligt sind (Luippold und Mühlbauer 1998). Da die Affinität von Quinpirol besonders auf die D₃ Rezeptoren ausgerichtet ist (Seeman und Schaus 1991), konzentrierten sich weitere Untersuchungen vornehmlich auf diesen Rezeptor.

In einem Versuch mit dem selektiven D₃ Rezeptor Agonisten 7-OH-DPAT induzierte dieser dosisabhängig eine Steigerung der GFR. Wenn mit dem selektiven D₃ Antagonisten U-99194A vorbehandelt wurde, bewirkte 7-OH-DPAT keine Veränderungen der renalen Hämodynamik (Luippold et al. 1998). Nachdem bereits eine diabetesbedingte Hyperfiltration durch eine D₂-like

Antagonisierung normalisiert werden konnte (Luippold et al. 2001a), liegt nun eine Studie vor, bei der ein selektiver D₃ Rezeptor Antagonist eingesetzt wurde (Luippold et al 2005). Es gelang, 14 Tage nach Diabetesinduktion und Behandlung mit dem peripher wirkenden Antagonisten BSF 135170 eine signifikante Korrektur der GFR in Bereiche der gesunden Kontrolltiere zu erzielen.

Diese Datenlage lässt den Schluss zu, dass durch eine D₃ Rezeptor-Blockade die diabetische Hyperfiltration unterdrückt werden kann. Sie fordert im gleichen Zug auf, Untersuchungen, nach einem möglichen Benefit in der Entwicklung der diabetischen Nephropathie durch eine Langzeittherapie, anzustellen.

1.4 Eigene Fragestellung

In dieser Langzeitstudie an diabetischen, hyperglykämischen Ratten sollen durch Stoffwechsellängversuche folgende Fragen näher geklärt werden:

- Verzögert oder verhindert die Dopamin D₃ Rezeptor-Blockade das Eintreten der diabetischen Hyperfiltration?
- Wird durch eine Dopamin D₃ Rezeptor-Blockade die Protein- und Albuminausscheidung bei diabetischer Stoffwechsellage vermindert?
- Wirkt der ACE-Hemmer Trandolapril nephroprotektiv? Bietet der D₃ Rezeptorantagonist BSF 201640 Vorteile gegenüber Trandolapril? Ist die Kombinationstherapie der jeweiligen Monotherapie überlegen?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Für die Studie wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten (Charles River, Sulzfeld) verwendet. Das Körpergewicht der Tiere betrug bei Studienbeginn 250-275 g.

2.1.1 Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden im Tierstall des Institutes bei einer Temperatur von 24°C und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Die Gruppen CON-A und CON-BSF waren jeweils zu viert, die anderen Gruppen jeweils zu dritt in einem Käfig untergebracht. Je nach Gruppenzugehörigkeit hatten die Ratten jederzeit freien Zugang zu Standardfutter (Altromin 1320[®], Altromin, Lage) bzw. zu BSF 201640 (Knoll AG, Ludwigshafen) haltigem Futter und zu Leitungswasser bzw. zu Leitungswasser in dem Trandolapril gelöst war.

2.1.2 Induktion des Diabetes mellitus

Nach einem basalen Stoffwechselkäfigversuch wurden die Ratten, die den diabetischen Gruppen zugeteilt wurden, mit Streptozotocin (STZ, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim) behandelt. Dabei wurde STZ in Zitratpuffer (0,210 g Zitronensäure auf 10 ml Aqua bidest., pH 4) gelöst und den Tieren in einer Dosierung von 55 mg/kg KG intraperitoneal injiziert. Die Tiere, bei denen nach Ablauf von 48 Stunden die Blutglucosewerte noch im Normbereich (80-120 mg/dl) lagen, erhielten eine weitere Injektion von STZ (40-45mg/kg KG).

2.1.3 Implantation von Insulinstäbchen

Zur Steuerung der Blutglucosekonzentration wurde bei den diabetischen Tieren 4 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus eine Insulintherapie begonnen um Blutglucosewerte von ca. 350-400 mg/ dl zu erzielen. Dazu wurden den Ratten Insulinstäbchen (Linplant[®], LinShin, Kanada) im Nackenbereich subkutan implantiert. Bei den Implantaten handelt es sich um ein Insulin-Palmetinsäuremikrokristallgemisch. Ein Stäbchen wiegt 26 ± 2 mg und misst im Durchmesser 2 und 7 mm in der Länge. Laut Hersteller werden für eine Dauer von über 40 Tagen gleichmäßig ca. 2 IE Insulin pro 24 Stunden freigesetzt.

Die Implantation der Insulinstäbchen erfolgte in einer kurzzeitigen Äthernarkose. Dabei wurden die Tiere in ein Glasgefäß gesetzt, in dem, durch ein mit Äther getränktes Zellstofftuch, Ätherdampf erzeugt wurde. Sobald die Bewusstlosigkeit eintrat wurden die Tiere heraus genommen, auf den Arbeitstisch gelegt und eine Hautfalte im Nackenbereich angehoben. Dann wurde ein Trokar durch die Haut bis ins Subkutangewebe eingeführt um anschließend durch diesen die Insulinstäbchen mittels eines Stabes einzuschieben. Die Dosis wurde nach Tiergewicht und Blutglucose bestimmt, so dass Mengen von 0,25 bis 1 Stäbchen gegeben wurden. Nach Entfernen des Trokars schloss sich die Wunde von selbst und die Tiere erwachten nach weiteren ca. 1-2 Minuten aus der Kurznarkose.

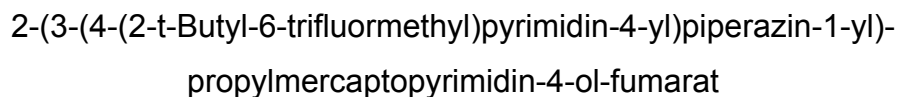
2.2 Pharmaka

2.2.1 Trandolapril

Bei Trandolapril (Knoll AG, Ludwigshafen) handelt es sich um einen ACE-Hemmer, der, da er auch hepatisch eliminiert wird, bei nachlassender Nierenfunktion unter Beibehaltung der Dosierung ohne Kumulationsgefahr weiter gegeben werden kann. Trandolapril wurde in einer Dosierung von 0,3 mg/kg KG pro Tag über das Trinkwasser verabreicht. Der Berechnung wurden das durchschnittliche Gewicht und die durchschnittliche Trinkmenge der Tiere zu Grunde gelegt.

2.2.2 BSF 201640

BSF 201640 (Knoll AG, Ludwigshafen) ist ein selektiver, zentral und peripher wirksamer, Dopamin D₃-Rezeptor-Antagonist. Die chemische Bezeichnung lautet:



Die Ratten erhielten diesen Wirkstoff über das Futter in einer Dosierung von 10 mg/kg KG pro Tag. Für die Berechnung wurden die durchschnittliche Futtermenge und das durchschnittliche Körpergewicht berücksichtigt.

2.3 Versuchsgruppen

Die insgesamt 56 Tiere wurden auf 6 Versuchsgruppen wie folgt verteilt:

CON-A (n = 4)	nicht diabetische, mit Standardfutter und Leitungswasser versorgte Ratten als Kontrollgruppe
CON-BSF (n = 4)	nicht diabetische, mit BSF 201640 im Futter behandelte Ratten als Kontrollgruppe
DM-VHC (n = 12)	diabetische, nur mit Insulin behandelte Ratten als hyperglykämische Diabetes-Gruppe
DM-BSF (n = 12)	diabetische, mit Insulin und BSF 201640 im Futter behandelte Ratten
DM-ACE (n = 12)	diabetische, mit Insulin und Trandolapril im Trinkwasser behandelte Ratten
DM-BSF-ACE (n = 12)	diabetische, mit Insulin, BSF 201640 und Trandolapril behandelte Ratten

Da BSF 201640 per se keinen Einfluss auf die untersuchten Parameter hatte, wurden die Gruppen CON-A und CON-BSF zur Gruppe CON-VHC zusammengefasst und werden in der vorliegenden Arbeit nicht mehr gesondert besprochen. Bei der jeweiligen Anzahl n handelt es sich um die zu Beginn der Studie eingesetzten Tiere. Im Verlauf der Studie reduzierte sich die Tierzahl insgesamt auf 45. Davon verstarben 2 Ratten in der Narkose und 3 während der Blutdruckmessung. Bei einem Tier wurde bei der Obduktion ein Lebertumor gefunden. Die weiteren Todesfälle konnten nicht auf eine konkrete Ursache zurückgeführt werden. Als wahrscheinlich kommen Folgen des Diabetes mellitus in Betracht.

2.4 Experimenteller Ablauf

2.4.1 Studiendesign

Die Studie war als Langzeitstudie für die Dauer von 22 Wochen geplant. Nach Ablauf dieser Zeit wurde auf Grund der Ergebnislage beschlossen die Studie auf 38 Wochen zu verlängern.

Zu Beginn der Studie wurden die Ratten in die o. g. Versuchsgruppen eingeteilt und, nach einem basalen Stoffwechselkäfigversuch, entsprechende Gruppen diabetisch gemacht. Es wurden wöchentlich Körpergewicht und Blutglucose bei den diabetischen Tieren bestimmt. Ggf. wurde durch zusätzliche Insulinsubstitution oder bei rückläufiger diabetischer Stoffwechsellage durch erneute STZ-Applikation der Blutglucosespiegel korrigiert. Nach 2 Wochen wurde der erste Stoffwechselkäfigversuch bei diabetischer Stoffwechsellage durchgeführt. Die weiteren Stoffwechselkäfigversuche wurden bis zur 22. Woche in vierwöchigen und weiter bis zur 38. Woche in achtwöchigen Abständen durchgeführt. Außerdem wurde im Verlauf einmal in vier bzw. acht Wochen der systolische Blutdruck gemessen.

Nach 46 Wochen erfolgten noch Perfusionsversuche, Feucht- und Trockengewichtbestimmungen und Morphometrie der Nieren. Jedoch sind diese Untersuchungen nicht mehr Gegenstand dieser Arbeit.

2.4.2 Glucosemessung

Die Blutglucose wurde mit einem modernen Blutzuckermessgerät (Accu-Check[®] Sensor, Fa. Roche, Mannheim). Durch Abschneiden von 1-2 mm des Schwanzendes und Auspressen des Schwanzes wurde Blut gewonnen, das auf

ein zum o.g. Gerät passenden Teststreifen (Accu-Check® Sensor Comfort Teststreifen, Fa. Roche, Mannheim) gebracht wurde. Nach ca. 30 Sekunden wurde die Blutglucosekonzentration vom Gerät angezeigt und abgelesen.

2.4.3 Bestimmung des Körpergewichtes

Zur Bestimmung des Körpergewichtes wurden die Ratten mit einer Tierwaage (Fa. Mettler, Zürich) gewogen.

2.4.4 Schwanzdruckmessung

Zur Bestimmung des systolischen Blutdruckes wurden die Ratten in ein Filztuch eingewickelt und in einen von der Institutswerkstatt aus Metallgitter gefertigten Restraîner gebracht. Nun wurden die Tiere in einen auf 38°C geheizten Plexiglaskasten gesetzt und bekamen eine Staumanschette proximal und einen Piezosensor distal am Rattenschwanz angelegt. Nach ungefähr zehnminütiger Verweildauer wurde mit der Messung begonnen. Zunächst wurde die Staumanschette bis zum vorher eingestellten Maximaldruck (180 mmHg) aufgepumpt. Aus der beim Ablassen des Druckes ersten vom Piezosensor detektierten Pulswelle wurde vom Gerät der systolische Blutdruck ermittelt und ausgedruckt. Die Messung wurde dreimal hintereinander durchgeführt und daraus der Mittelwert errechnet.

2.4.5 Stoffwechselkäfigversuche

Hierbei wurden die Ratten für 24 Stunden in Stoffwechselkäfige (Tecniplast 600[®], Fa. Ehret, Freiburg) verbracht. Diese speziellen Käfige ermöglichen das getrennte Sammeln von Kot und Urin. Es wurden Blutglucose zu Beginn, Körpergewicht zu Beginn und Ende, die aufgenommene Futter- und Trinkmenge sowie das Urinvolumen nach 6 Stunden und nach 24 Stunden dokumentiert. Im 24-Stunden-Sammelurin wurden Natrium, Kalium, Chlorid, Kreatinin, Osmolalität und Albumin bestimmt. Desweiteren wurde nach der 1. Phase von 6 Stunden Urin aus dem Sammelbehältnis zur Proteinbestimmung abpipettiert. Während dieser 1. Phase bekamen die Tiere kein Futter, da eine Verfälschung der Proteinwerte durch, in den Urin gelangte, Nahrungspartikel nicht ausgeschlossen werden konnte. Für die restliche Zeit erhielten die Tiere Futter und über die gesamte Zeit Trinkwasser.

2.4.6 Urinvolumenbestimmung und Urinprobengewinnung

Die Urinsammelgefäße wurden jeweils leer und nach der Sammelperiode auf einer Feinwaage (Fa. Oerlikon, Zürich) gewogen. Aus der Gewichts Differenz wurde das Urinvolumen abgeleitet, wobei für ein g ein ml angenommen wurde. Vom 6-Stunden-Urin wurden nach Abwiegen je 1 ml in 2 PE-Gefäße (Safe-Lock[®] 2,0 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert (alle verwendeten Pipetten Fa. Eppendorf, Hamburg). Zum Teil waren nach 6 Stunden noch keine 2 ml Urin vorhanden, so dass dann nur eine kleinere Menge gewonnen werden konnte. Vom 24-Stunden-Urin wurden nach Abwiegen zunächst 3 PE-Gefäße mit je 2 ml gefüllt, dann zentrifugiert, schließlich der Überstand abpipettiert und auf 2 PE-Gefäße verteilt. Alle Proben wurden bis zur Analyse bei -20°C eingefroren.

2.5 Analytik

2.5.1 Konzentration von Natrium und Kalium im Urin

Für die Bestimmung der Na- und K-Konzentration wurde ein Flammenphotometer (Elex 6361[®], Fa. Eppendorf, Hamburg) verwendet. Der Urin wurde hierfür mit Aqua bidest. verdünnt und mit einer Lithiumlösung (Standard Lithiumlösung, Fa. Eppendorf, Hamburg) vermischt. Es wurden jeweils Doppelproben gemessen aus denen der Mittelwert gebildet und in mmol/l angegeben wurde. Vor Beginn und jeweils nach 20 durchgeführten Messungen wurde der Flammenphotometer mit einer Standardlösung kalibriert.

2.5.2 Konzentration von Chlorid im Urin

Die Cl-Konzentration im Urin wurde mit einem Chloridmeter (6610[®], Fa. Eppendorf, Hamburg) nach einem coulometrischen Verfahren ermittelt. Dabei gehen von einer Silberanode Silberionen in Lösung. Bei Zugabe von Chloridionen fällt Silberchlorid aus und die Silberionenkonzentration in der Lösung nimmt ab. Aus dem Ladungsfluss zwischen Anode und Kathode, der die ursprüngliche Silberionenkonzentration wieder aufbaut, wird die Chloridmenge ermittelt. Ladungsfluss und Chloridmenge verhalten sich dabei proportional zueinander.

Zur Durchführung wurde der Urin in ein Gemisch aus einer Basislösung (Essigsäurelösung), einer Salpetersäurelösung und einer Gelatinelösung pipettiert. Die Chloridkonzentration konnte dann von der Anzeige des Gerätes in mmol/l abgelesen werden. Vor den Messungen erfolgte eine Kalibrierung des Gerätes mit einer Kontrolllösung.

2.5.3 Urinosmolalität

Die Urinosmolalität wurde mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 030[®], Fa. Gonotec, Berlin) nach einem Verfahren, welches die Abhängigkeit der Gefrierpunktniedrigung von der Osmolalität ausnutzt, bestimmt. Vor und während den Messungen wurden Kalibrierungen durchgeführt. Auch hier wurden Doppelproben gemessen aus denen der Mittelwert errechnet wurde.

2.5.4 Proteinbestimmung im Urin

Die Proteinkonzentration im Urin wurde nach Bradford bestimmt. Dazu wurde ein kommerzieller Kit (Bio-Rad protein assay, Bio-Rad Laboratories, München) verwendet. Dabei wechselt das Absorptionsmaximum einer Coomassieblau-Lösung, in welche die Probe gegeben wird, bei Proteinbindung von 465 nm nach 595 nm. Die Extinktionsmessung bei 595 nm fand mit einem Photometer Modell Sunrise (Tecan, Salzburg) statt. Aus dem Extinktionswert wurde mit einer, jeweils vor der Messreihe erstellten, Standardkurve die Proteinkonzentration ermittelt.

2.5.5 Albuminbestimmung im Urin

Die quantitative Albuminbestimmung im Urin erfolgte mit einem Ratten-spezifischen ELISA (CellTrend GmbH, Luckenwalde). Bei diesem Test werden Mikrotiterplatten verwendet, an deren Kavitäten Rattenalbumin gebunden ist. Während einer Inkubationsphase wird durch das in der Probe befindliche Albumin die Bindung eines anti-Ratten-Albumin-Antikörpers kompetitiv gehemmt. Nach Abschluss der Immunreaktion wird der nicht an der Platte gebundene Anteil des anti-Ratten-Albumin-Antikörpers abgespült. Der

gebundene Anteil, des mit Peroxidase markierten Antikörpers kann mittels einer Substrat-Chromogen-Lösung quantifiziert werden. Durch Zugabe einer Säure wird die Reaktion gestoppt und ein Farbumschlag von blau nach gelb herbeigeführt. Die bei 450 nm gemessene Absorption ist zur Albuminkonzentration in der Probe umgekehrt proportional. Dieser Wert wird letztlich durch den Vergleich mit einer zuvor erstellten Standardkurve ermittelt. Die Durchführung des Tests erfolgte nach der Anleitung des Herstellers. Für die Extinktionsmessung wurde der selbe Photometer wie bei der Proteinbestimmung verwendet.

2.5.6 Kreatininbestimmung im Urin

Die Kreatininbestimmung erfolgte am Kreatinin-Analysator 2[®] (Beckmann, München), unter Anwendung einer kinetischer Messtechnik auf der Basis der photometrischen Jaffé-Reaktion. Hierbei wird eine dosierte Probenmenge in ein Reaktionsgefäß in dem sich ein modifiziertes Jaffé-Reagenz befindet pipettiert. Die Bildung des roten Kreatinin-Pikratkomplexes wird durch Messung des Extinktionsabstiegs bei 520 nm verfolgt. Der Signalablauf wird elektronisch fortlaufend differenziert und so die Bildungsgeschwindigkeit gemessen. Daraus wird die bei 25,6 s nach Reaktionsbeginn konzentrationsproportionale Reaktionsgeschwindigkeit ermittelt. Die Proben wurden jeweils so mit Aqua bidest. verdünnt, dass sie im Messbereich (0,2 mg/dl - 25 mg/dl) des Analysators lagen. Das vom Gerät in mg/dl angezeigte Ergebnis wurde entsprechend der Verdünnung umgerechnet.

2.5.7 Glucosemessung im Urin

Für die Glucosemessung im Urin wurde ein Spektrophotometer (U-300[®], Hitachi Ltd., JP) herangezogen. Es wurden jeweils 3 µl Urin in 300 µl Reagenz

(Infinity[®], Fa. Sigma, Steinheim) pipettiert und drei Minuten bei 37°C inkubiert, womit der Pentosephosphatweg in Gang gesetzt wurde. Die dadurch gebildete Menge an NADH, die vom Gerät photometrisch bei einer Wellenlänge von 340 nm über die Extinktion gemessen wird, ist der Glucosekonzentration in der Probe proportional. Die Messung von Doppelproben erfolgte nachdem zuvor eine Kalibriergerade erstellt wurde. Die Werte, die in mmol/l ausgegeben wurden, wurden in mg/dl umgerechnet.

2.6 Berechnungen

2.6.1 Absolute Ausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid

Die Ermittlung der absoluten renalen Elektrolytexkretion pro Tier erfolgte aus dem über 24 Stunden gesammelten Urinvolumen. Die Berechnung ist am Beispiel des Natriums dargestellt:

$$\text{Na}_{\text{Urin}} = [\text{Na}]_{\text{Urin}} \times \text{UV} \text{ [mmol/24h/Tier]}$$

Die renale Exkretion von Kalium (K_{Urin}) und Chlorid (Cl_{Urin}) wird analog berechnet.

2.6.2 Absolute Ausscheidung von Albumin, Protein und Glucose

Die absolute Exkretion von Albumin, Protein und Glucose wird wie die Elektrolytausscheidung berechnet, indem die jeweilige Konzentration mit dem Urinvolumen multipliziert wird.

2.6.3 Kreatinin-Clearance und glomeruläre Filtrationsrate

Zur Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) wurde endogenes Kreatinin aus dem 24 Stunden Urin herangezogen, wobei gilt: Die GFR ist gleich der Clearance von Kreatinin. Berechnung:

$$GFR = C_{Krea} = \frac{[Krea]_{Urin} \times UV}{[Krea]_{Serum} \times 1440 \text{ min}} \text{ [ml/min/Tier]}$$

Für die Kreatininkonzentration im Serum wurde ein Sollwert von 0,38 mg/dl angenommen.

Zur besseren Vergleichbarkeit der Kreatinin-Clearance (C_{Krea}) wurde diese auf 100 g Körpergewicht (KG) umgerechnet:

$$C_{Krea} = \frac{C_{Krea} \text{ [ml/min/Tier]} \times 100 \text{ g}}{\text{KG}} \text{ [ml/min/100 g KG]}$$

2.7 Statistik

Aus den pro Tier gemessenen und berechneten Daten wurden für die Gruppen die Mittelwerte mit Standardfehlern (SEM, standard error of the mean) errechnet. Dazu, sowie für die graphische Darstellung der Ergebnisse, diente das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 98[®] (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA).

Zur statistischen Beurteilung der beobachteten Ergebnisse wurde mit dem Statistikprogramm InStat V3.0[®] (Graph Pad Inc., USA) eine Varianzanalyse mit dem Bonferroni post-test durchgeführt. Hierbei wurde für p-Werte < 0,05 die Nullhypothese H_0 , nach welcher der beobachtete Effekt in der Grundgesamtheit nicht existiert und das Ergebnis der Stichprobe lediglich auf die zufallsabhängige Streuung zurückzuführen ist, verworfen.

Es wurden alle diabetischen Gruppen mit der nichtdiabetischen Gruppe CON-VHC und die Gruppen DM-BSF, DM-ACE und DM-BSF-ACE mit der diabetischen Kontrollgruppe DM-VHC verglichen. Außerdem wurden die Gruppen DM-BSF, DM-ACE und DM-BSF-ACE jeweils gegenüber gestellt.

3 ERGEBNISSE

3.1 Stoffwechselkäfigversuche

3.1.1 Blutglucose

Vor Induktion des Diabetes lagen die Blutglucosewerte aller Gruppen zwischen 90 ± 3 und 97 ± 2 mg/dl (Abb. 7, Tab. 2). Die Gruppen unterschieden sich statistisch nicht. Zwei Wochen nach STZ-Applikation zeigte sich eine deutliche und signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der Blutglucosekonzentration in allen diabetischen Gruppen (238 ± 34 bis 425 ± 27 mg/dl) vs. CON-VHC (85 ± 3 mg/dl). Trotz einer starken Streuung in den einzelnen diabetischen Gruppen (z.B. lag der Variationskoeffizient in der DM-ACE-Gruppe bei 49%), waren die Blutzuckerwerte bei der DM-ACE-Gruppe und der DM-BSF-ACE-Gruppe signifikant niedriger als bei DM-VHC und DM-BSF ($p < 0,05$).

Zu allen weiteren Messzeitpunkten (Abb. 7, Tab. 2) waren die diabetischen Gruppen untereinander statistisch gleich und hoben sich vs. CON-VHC signifikant ab. Die Streuung in den einzelnen diabetischen Gruppen, die vor allem in den mit Trandolapril behandelten Gruppen hoch war, entsprach über die gesamte Studiendauer etwa der Streuung der 1. Messreihe nach STZ-Injektion.

Auffällig war der Verlauf der Blutglucosekonzentration in der DM-ACE-Gruppe. Nach einem Maximum von 446 ± 25 mg/dl (18. Woche), fiel diese auf 278 ± 47 mg/dl (38. Woche) ab.

Die Mittelwerte (Abb. 3), aus den seit Diabetesinduktion erfolgten Messungen, erstreckten sich von 351 ± 25 mg/dl (DM-ACE) über 364 ± 17 mg/dl (DM-BSF-ACE) und 375 ± 7 mg/dl (DM-VHC) bis 403 ± 7 mg/dl (DM-BSF).

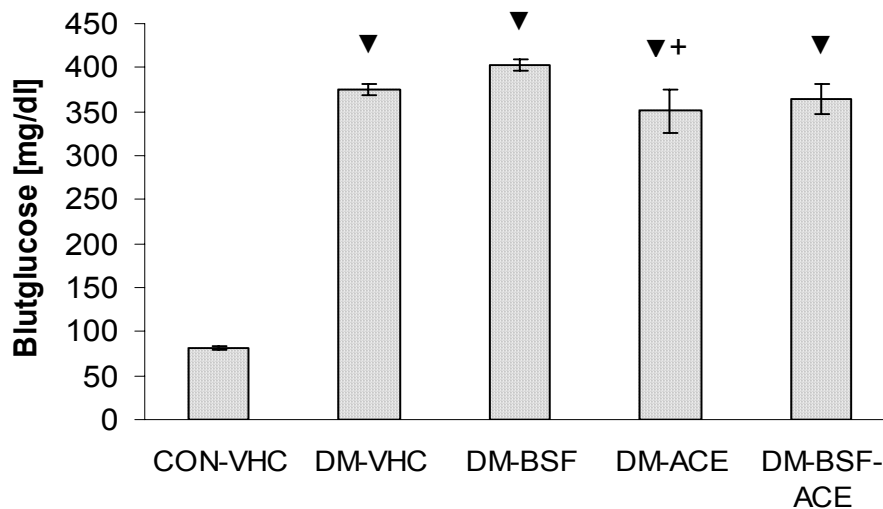


Abb. 3: Über die Zeit gemittelte Blutglucosekonzentrationen \pm SEM nach Diabetesinduktion. Gruppeneinteilung siehe 2.3. Gegenüber CON-VHC wurde das Signifikanzniveau von allen diabetischen Gruppen erreicht (▼ $p < 0,05$ vs. CON-VHC). Zwischen den diabetischen Gruppen unterschieden sich DM-ACE und DM-BSF signifikant (+ $p < 0,05$ vs. DM-BSF).

3.1.2 Körpergewicht

Bei Studienbeginn war das Körpergewicht in allen Gruppen statistisch gleich. Es betrug im Mittel 260 ± 6 g bis 262 ± 8 g. Bei allen Gruppen konnte eine kontinuierliche Zunahme des Körpergewichts beobachtet werden (Abb. 8, Tab. 3). Ein signifikanter Rückstand der Zunahme des Körpergewichtes im Vergleich zur CON-VHC-Gruppe zeichnete sich bei den ACE-Gruppen bereits 2 Wochen nach Diabetesinduktion ab. Von der 6. Woche an lagen alle diabetischen Gruppen körpergewichtsbezogen signifikant unter der CON-VHC-Gruppe. Untereinander unterschieden sich die diabetischen Gruppen statistisch zu keinem Zeitpunkt. In der 38. Woche lag das durchschnittliche Körpergewicht der diabetischen Gruppen (492 ± 16 g bis 513 ± 27 g) etwa 22% unter dem der Kontrollgruppe (647 ± 29 g).

3.1.3 Urinvolumen

Im basalen Stoffwechselkäfigversuch war das Urinvolumen in allen Gruppen statistisch gleich. Es lag zwischen 9 ± 1 ml/24h und 12 ± 1 ml/24h. Bei diabetischer Stoffwechsellage war das Urinvolumen auf das 5- bis 8-fache im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe signifikant angestiegen. Die Urinausscheidung war in allen diabetischen Gruppen im zeitlichen Verlauf deutlichen Schwankungen unterworfen (Abb. 9, Tab. 4). Die Urinmenge korrelierte meist mit dem aktuellen Blutzucker und der jeweiligen Trinkmenge der Tiere. Die über die Zeit gemittelten Werte reichten von 90 ± 13 ml/24 h (DM-ACE) über 115 ± 8 ml/24 h (DM-BSF-ACE) und 128 ± 8 ml/24 h (DM-VHC) zu 143 ± 7 ml/24 h (DM-BSF).

Setzt man diese Werte mit den für die Blutglucosekonzentration gemittelten Werten in Beziehung, so ergibt dies einen Korrelationskoeffizienten von 0,95.

3.1.4 Trinkmenge

Die Trinkmengen unterschieden sich bereits vor Diabetesinduktion deutlich. Die DM-ACE Gruppe erreichte mit 36 ± 3 ml sogar das Signifikanzniveau gegenüber DM-VHC mit 24 ± 3 ml und DM-BSF mit 23 ± 4 ml. Obwohl zu diesem Zeitpunkt die Behandlung aller Tiere noch gleich war, kam es zu diesen abweichenden Werten, die sich so ähnlich auch bei der Futtermenge fanden. Erklärbar wäre dies durch die Reaktion (extrem viel trinken bzw. nichts trinken) einzelner Tiere auf die ungewohnte Umgebung des Stoffwechselkäfigs im ersten Durchgang. Das Trinkvolumen in der gesunden Kontrollgruppe blieb über die Zeit nahezu konstant. In den diabetischen Gruppen stieg die Trinkmenge signifikant an (Abb. 10, Tab. 5). Bei diabetischer Stoffwechsellage wurden Werte zwischen 88 ± 12 ml und 185 ± 22 ml gemessen. Der Verlauf der Trinkmenge war, wie zu erwarten, dem des Urinvolumens, jeweils annähernd parallel.

3.1.5 Futtermenge

Bei noch normalem Blutglucosestoffwechsel war die aufgenommene Futtermenge in den verschiedenen Gruppen statistisch nicht unterschiedlich. Es wurden Mengen zwischen 23 ± 4 g und 30 ± 2 g gemessen (vgl. Trinkmenge). Die Futtermenge in der gesunden Kontrollgruppe schwankte über die gesamte Zeit nur wenig. In allen diabetischen Gruppen wurde sichtbar mehr Futter verbraucht als in der Kontrollgruppe (Abb. 11, Tab 6). Statistisch signifikant war die Polyphagie aber nur in den Gruppen DM-VHC und DM-BSF-VHC. Die über die Zeit gemittelten Futtermengen waren in allen diabetischen Gruppen signifikant größer als bei der Kontrollgruppe, in den ACE-Gruppen wiederum signifikant kleiner als in der DM-VHC- und DM-BSF-Gruppe. Im Schnitt fraßen die Tiere der Gruppen DM-VHC und DM-BSF um die 65 % mehr als die Kontrolltiere. Die Tiere der ACE-Gruppen dagegen lediglich 42 % mehr.

3.1.6 Renale Natrium-, Kalium-, und Chloridausscheidung

Die diabetischen Tiere haben im Mittel signifikant höhere Elektrolytmengen ausgeschieden als die Gesunden. Die DM-BSF-ACE-Tiere schieden von den diabetischen Tieren die geringste Menge an Elektrolyten aus und lagen nur bezüglich der Kaliumausscheidung signifikant über den Kontrolltieren. Insgesamt änderten sich die Ausscheidungsmengen der verschiedenen Elektrolyte eher unsystematisch. Auffallend war ein Höhepunkt in allen Gruppen, einschließlich der Kontrollgruppe, in der 14. Versuchswoche (Abb. 12-14, Tab. 7-9).

3.1.7 Urinosmolalität

Zwei Wochen nach Diabetesinduktion war die Urinosmolalität in allen diabetischen Gruppen gleichermaßen auf Werte zwischen 998 ± 47 mosm/kg und 1052 ± 58 mosm/kg gegenüber 1634 ± 89 mosm/kg bei der Kontrollgruppe abgefallen (Abb. 15, Tab. 10). Von diesem Niveau aus nahm die Osmolalität in allen diabetischen Gruppen stetig weiter ab, zeigte damit aber einen zur Kontrollgruppe parallelen Verlauf. Die Werte der diabetischen Gruppen lagen über den gesamten Beobachtungszeitraum sehr eng beieinander und signifikant unter den Kontrollwerten.

3.1.8 Glucoseausscheidung im Urin

Nahezu keine nachweisbare Glucoseausscheidung über den kompletten Verlauf zeigten die euglykämischen Tiere. Dem gegenüber war die Glucoseausscheidung in allen diabetischen Gruppen stets signifikant erhöht (Abb. 16, Tab. 11). Die durchschnittlichen Werte bewegten sich insgesamt zwischen $30\pm 7,6$ mmol/24 h/Tier und $74,3\pm 9,9$ mmol/24 h/Tier. Über die Zeit gemittelt korrelierte die renale Glucoseausscheidung mit der über die Zeit gemittelten Blutglucosekonzentration.

3.1.9 Kreatinin-Clearance

Die Ausgangswerte für die Kreatinin-Clearance lagen von allen Gruppen nahe zusammen. Sie bewegten sich zwischen $0,66\pm 0,04$ ml/min/100 g KG und $0,75\pm 0,04$ ml/min/100 g KG. Im Verlauf schwankten die Werte der Kontrollgruppe grob zwischen den Grenzen von $0,6$ ml/min/100 g KG und $0,8$ ml/min/100 g KG.

Bei allen diabetischen Gruppen kam es zu einem deutlichen und vs. CON-VHC signifikanten Anstieg der Kreatinin-Clearance. Das Maximum wurde von der DM-VHC-Gruppe in der 10. und von den anderen Gruppen jeweils in der 14. Woche erreicht (Abb. 17, Tab. 12). Den mit $1,29 \pm 0,06$ ml/min/100 g KG höchsten Wert nahm die DM-ACE-Gruppe ein (Abb. 4). Nach Durchlaufen der Maximalwerte nahm die Kreatinin-Clearance in allen diabetischen Gruppen wieder ab. In der 30. und 38. Woche bestand kein signifikanter Unterschied mehr gegenüber der Kontrollgruppe. Den flachsten Kurvenverlauf zeigte die DM-BSF-ACE-Gruppe. Deren Maximalwert lag bei $1,02 \pm 0,04$ ml/min/100 g KG.

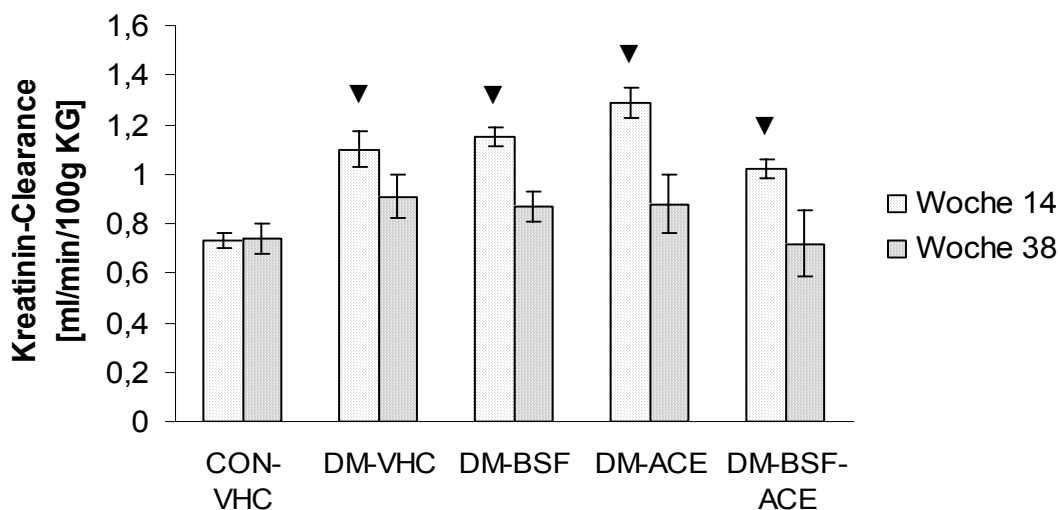


Abb. 4: Die Kreatinin-Clearance war in der 14. Woche bei den diabetischen Gruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht (\blacktriangledown $p < 0,05$ vs. CON-VHC). Der Maximalwert wurde in der DM-VHC-Gruppe bereits in der 10. Woche durchlaufen, bei den anderen diabetischen Gruppen wurde das Maximum in der dargestellten 14. Woche erreicht. Bis zur 38. Woche waren die Werte in allen diabetischen Gruppen deutlich rückläufig. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, Gruppeneinteilung siehe 2.3.

3.1.10 Albuminurie

Mit der Zeit stieg auch bei den normoglykämisch gehaltenen Tiere die Albuminausscheidung leicht an, wobei der größte Teil dieser geringen Steigerung erst in den letzten 8 Wochen auftrat. Fast identische Werte nahm die Gruppe DM-BSF-ACE an. Bei den DM-ACE-Tieren war die Albuminausscheidung stets noch geringer.

Ab der 10. Versuchswoche konnte eine, jedoch nicht signifikante und auch nicht relevante, Steigerung der renalen Albuminausscheidung in den Gruppen DM-VHC ($0,38 \pm 0,14$ mg/24 h/Tier) und DM-BSF ($0,25 \pm 0,04$ mg/24 h/Tier) gegenüber der Kontrollgruppe ($0,15 \pm 0,02$ mg/24 h/Tier) verzeichnet werden.

Von der 22. Woche an kam es zu einer drastischen und kontinuierlichen Steigerung der Albuminausscheidung in den Gruppen DM-BSF und DM-VHC (Abb. 18, Tab. 13). So war die Albuminausscheidung nach 38 Wochen in den Gruppen DM-VHC ($18,52 \pm 14,69$ mg/24 h/Tier) und DM-BSF ($5,87 \pm 2,48$ mg/24 h/Tier) im Vergleich zur CON-VHC-Gruppe ($1,27 \pm 0,43$ mg/24 h/Tier) um ein Vielfaches erhöht (Abb. 5). Bei einer sehr ausgeprägten Streuung, wurde trotz der deutlich voneinander distanzieren Mittelwerte das Signifikanzniveau nicht erreicht. Es konnte bei einigen Tieren eine deutlich ausgeprägte Albuminurie beobachtet werden.

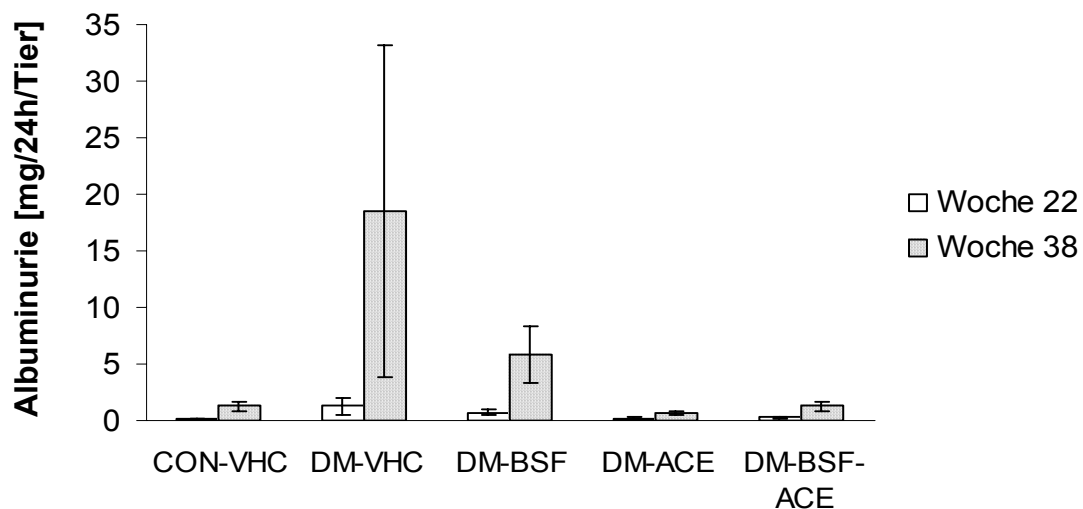


Abb. 5: Bis zur 22. Woche waren noch in keiner Gruppe Zeichen für eine Albuminurie erkennbar. Das änderte sich sprunghaft bis zur 38. Woche. Die ausgeschiedenen Albuminmengen von DM-VHC und DM-BSF betragen nun ein Vielfaches der anderen Gruppen. Bei einer starken Streuung wurde jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, Gruppeneinteilung siehe 2.3.

3.1.11 Proteinurie

Mit zwei kleinen Höhepunkten in der 6. und 18. Woche stieg die Proteinausscheidung bei der gesunden Kontrollgruppe von einem Ausgangswert von $2,56 \pm 0,31$ mg/6 h/Tier insgesamt an, um in der 38. Woche $4,30 \pm 0,88$ mg/6 h/Tier zu erreichen. Die Werte der mit Trandolapril behandelten Gruppen bewegten sich in etwa dem gleichen Bereich, wobei über die Zeit gemittelt die DM-ACE-Tiere etwas niedriger und die DM-BSF-ACE-Tiere etwas darüber lagen. Auch die Gruppen DM-BSF und DM-VHC bewegten sich bis zur 30. Woche in etwa im höheren Bereich dieses Rahmens (Abb. 19, Tab. 14)

Bis zur 38. Woche stieg die Proteinausscheidung in der DM-VHC-Gruppe sprunghaft auf $16,97 \pm 10,57$ mg/6 h/Tier und in der DM-BSF-Gruppe auf $7,88 \pm 1,53$ mg/6h/Tier an. Die DM-VHC-Tiere lagen damit signifikant höher als die Kontrolltiere (Abb. 6). Die DM-BSF-Tiere erreichten jedoch das Signifikanzniveau vs. CON-VHC nicht. Dafür lagen sie aber wie die anderen diabetischen Gruppen signifikant unter der DM-VHC-Gruppe.

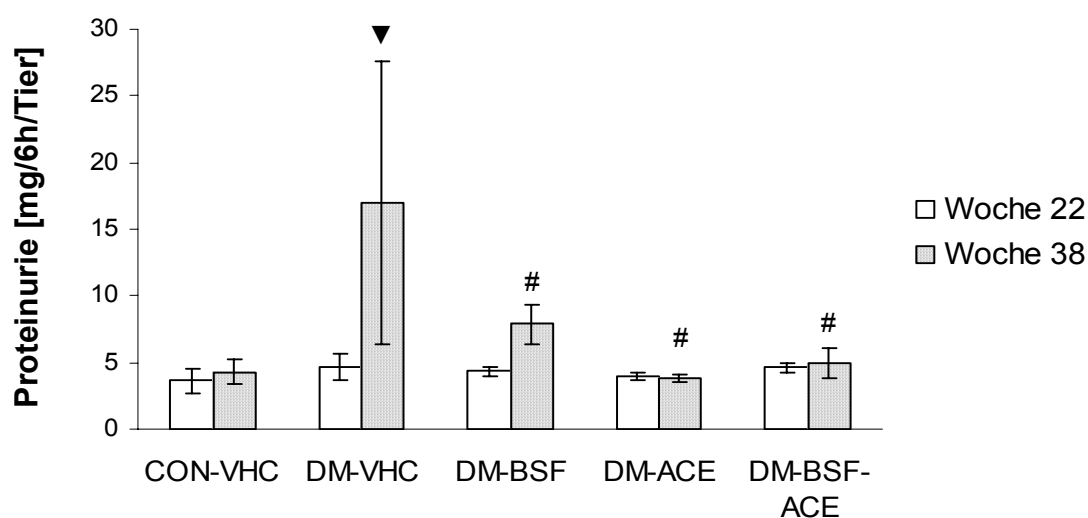


Abb. 6: Noch in der 22. Woche war die Proteinausscheidung in allen Gruppen etwa gleich. Bis zur 38. Woche stiegen im Mittel die DM-BSF-Tiere und besonders die DM-VHC-Tiere deutlich an. Das Signifikanzniveau gegenüber CON-VHC wurde nur in der DM-VHC-Gruppe erreicht (\blacktriangledown $p < 0,05$ vs. CON-VHC). Die anderen diabetischen Gruppen lagen signifikant unter DM-VHC ($\#$ $p < 0,05$ vs. DM-VHC). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SEM, Gruppeneinteilung siehe 2.3.

3.2 Schwanzdruckmessung

Im Verlauf betrachtet kam es bei allen Gruppen zu einem leichten aber nicht relevanten Blutdruckanstieg, bis zur 10. Woche, gefolgt von einem Abfall bis zur 38. Woche (Abb. 20, Tab. 15). Am stärksten war der initiale Blutdruckanstieg bei der DM-VHC-Gruppe ausgeprägt. Es wurden aber auch da nur systolische Werte bis 142 ± 8 mmHg erreicht. Besonderheiten waren aus den Gruppenvergleichen nicht zu erschließen, obwohl zu den einzelnen Zeitpunkten oft statistisch signifikante Unterschiede gemessen wurden (Tab. 15). Insgesamt konnten keine Effekte von BSF 201640 oder Trandolapril auf den Blutdruck nachgewiesen werden.

3.3 Nebenbefund Diabetische Katarakt

Obwohl ursprünglich nicht als Gegenstand der Studie gedacht, war die Entwicklung einer Katarakt unter den diabetischen Tieren nicht zu übersehen, die dann auch protokolliert wurde.

Bei keinem Tier der gesunden Kontrollgruppe wurde bis zum Studienende eine Katarakt festgestellt. 14 Wochen nach Diabetesinduktion fiel bei insgesamt 7 von 45 diabetischen Tieren eine beidseitige Katarakt auf. In der DM-VHC-Gruppe waren 5 von 12, in der DM-BSF-Gruppe 4 von 12, in der DM-ACE-Gruppe 2 von 12, und in der DM-BSF-ACE-Gruppe 1 von 9 Tieren betroffen. Die mit Trandolapril behandelten Gruppen zeigten damit eine deutlich geringere Kataraktrate im Vergleich zu den anderen diabetischen Gruppen. Nach 38 Wochen erhöhte sich die Zahl der an einer Katarakt leidenden Tiere auf 30 von insgesamt 40 Tieren. Das waren in der DM-VHC-Gruppe 10 von 10, in der DM-BSF-Gruppe 9 von 11, in der DM-ACE-Gruppe 6 von 11, und in der DM-BSF-ACE-Gruppe 5 von 8 Tieren. Somit konnte die Kataraktrate durch die ACE-

Inhibition von 90 % auf 58 % reduziert werden. Ein Effekt der D₃ Rezeptor-Blockade wurde in diesem Zusammenhang nicht beobachtet.

4 DISKUSSION

4.1 *Modell des Diabetes mellitus*

Zur Untersuchung des nephroprotektiven Nutzens der ACE-Inhibition und der D₃ Rezeptor-Blockade wurde in der vorliegenden Langzeitstudie das Modell des Streptozotocin (STZ)-induzierten Diabetes mellitus bei männlichen Sprague-Dawley-Ratten verwendet. Streptozotocin ist ein aus *Streptomyces achromogenes* gewonnenes Antibiotikum. Seine diabetogene Wirkung wurde bereits vor über 40 Jahren an Ratten und Hunden, bei denen sich durch eine i.v.-Injektion von STZ eine diabetische Stoffwechsellage erzeugen lies, erforscht (Ratieken et al. 1963). Weiter wurde gezeigt, dass STZ selektiv die β -Zellen des Pankreas zerstört und selbst keine nephrotoxischen Wirkungen aufweist (Junod et al. 1967). Eine Stunde nach STZ-Injektion konnten histologische Veränderungen der β -Zellen nachgewiesen werden. Nach weiteren 7-10 Stunden kam es zu massiven Degranulationen und Nekrosen der Zellen. Dabei sank der Insulinspiegel auf unter 5 % seines Ausgangswertes. Eine Hyperglykämie stellte sich 12-24 Stunden post injectionem ein. Der Effekt von STZ auf die Stoffwechsellage ist dabei dosisabhängig (Junod et al. 1969). Mit einer Dosis von 35 mg/kg KG kann eine leichte Hyperglykämie ausgelöst werden. Nach einer Injektion von 100 mg/kg KG versterben die Ratten nach 2-3 Tagen. Bei einer mittleren Dosierung von 55-65 mg/kg KG wird eine diabetische Stoffwechsellage erzeugt, bei der die Tiere noch ohne Insulin auskommen. Diese Dosis wurde auch in unserer Studie verabreicht. Um gleiche und auch in sich homogene Diabetesgruppen mit moderaten Blutzuckerwerten von 350-400 mg/dl zu erhalten, wurden die Tiere mit Insulinimplantaten behandelt.

In der vorliegenden Studie erhielten alle Ratten nach der Diabetesinduktion initial die gleiche Insulinmenge. Zwei Wochen nach Diabetesinduktion konnte bei allen diabetischen Gruppen eine gegenüber der gesunden Kontrollgruppe

deutlich und signifikant erhöhte Blutglucosekonzentration aufgezeichnet werden. Auch stellten sich die typischen klinischen Zeichen eines Diabetes mellitus wie Polyurie, Polydipsie, Polyphagie und reduzierte Gewichtszunahme ein. Andere Autoren (O' Donnell et al. 1988), die am Streptozotocinmodell Experimente durchführten, berichten ebenfalls über diese Symptomatik. Jedoch wurden bei den mit Trandolapril behandelten Gruppen deutlich und signifikant niedrigere Glucosekonzentrationen als in den anderen diabetischen Gruppen gemessen. Als mögliche Ursachen sind neben einer zufälligen Erscheinung eine verstärkte Insulinwirkung unter ACE-Inhibition oder eine eigene antihyperglykämische Wirkung von Trandolapril zu diskutieren.

An Wistar Ratten, die mit den gleichen Dosen STZ und Trandolapril behandelt wurden, konnte innerhalb eines Zeitraums von 6 Monaten zu keinem Moment ein Effekt auf die Blutglucosekonzentration beobachtet werden (Dhein et al. 2000). Allerdings wurde bei dieser Studie kein Insulin substituiert. Die Blutzuckerwerte lagen mit und ohne Trandolapril etwas über 700 mg/dl. In einer anderen tierexperimentellen Studie (Anderson et al. 1989), ebenfalls an diabetischen Wistar Ratten, kam Insulin täglich zum Einsatz. Dabei war in der mit Captopril behandelten Gruppe bei vergleichbarer Hyperglykämie der Insulinbedarf gegenüber der sonst unbehandelten Gruppe nicht reduziert. Hingegen konnte durch eine 7-tägige Therapie mit dem ACE-Hemmer Ramipril die Blutglucosekonzentration bei Wistar-Kyoto-Ratten deutlich und signifikant gegenüber diabetischen Kontrollen gesenkt werden (Ittner et al. 1999). Bei diesem Effekt war kein exogenes Insulin beteiligt.

Auch bei Studien am Patienten konnten diese gegensätzlichen Beobachtungen gemacht werden. In einer viel zitierten Arbeit (Lewis et al. 1993) wurden Typ 1 Diabetiker mit Captopril versus Placebo behandelt. Das glycosylierte Hämoglobin war mit 11,8 % und 11,6 % in beiden Gruppen zu Beginn gleich und stieg während der Studiendauer von 4 Jahren in beiden Gruppen um weitere 0,5 % an. Der ACE-Hemmer zeigte bei den insulinpflichtigen Typ 1 Diabetikern keinen Einfluss auf die Blutglucosekonzentration. Auffallend sind in

dieser Studie die extrem hohen HbA_{1C}-Werte, was für eine ungenügende Blutzuckerkontrolle spricht. In der UKPDS-Studie Nr. 39 (UKPDS-Group 1998) wiederum mussten bei hypertensiven Typ 2 Diabetikern die Captopril erhalten signifikant weniger zusätzliche Antidiabetika als bei der Vergleichsgruppe mit Atenolol gegeben werden. Auch kam es während des Captopril Präventions Projekts bei bislang nicht diabetischen Hypertonikern unter Captopril zu signifikant weniger Neuerkrankungen an einem Diabetes mellitus als unter Diuretika oder Beta-Rezeptorantagonisten (Hansson 1999).

Erklärbar wäre die günstige Wirkung auf die Hyperglykämie dadurch, dass ACE-Hemmer den systemischen Kininspiegel anheben und Kinine an der Modulation der Insulinsensitivität des Skelettmuskelgewebes beteiligt sind (Donnelly 1992). ACE-Hemmer, die eine Sulfhydryl-Gruppe enthalten, verbessern die Insulinsensitivität mehr als andere (Uehara et al. 1994). Die in unserer Studie signifikant verminderte Hyperglykämie bei den ACE-Tieren, könnte also durchaus auf die spezifische ACE-Inhibition zurückzuführen sein.

Diese anfänglichen Unterschiede des Blutzuckers konnten im Verlauf der Studie durch individuell angepasste Insulindosierungen ausgeglichen werden. So wichen die über die Zeit gemittelten Blutglucosewerte nur von DM-ACE und DM-BSF statistisch voneinander ab.

4.2 Glomeruläre Hyperfiltration

In unserem Modell zeigte sich nach Diabetesinduktion in allen diabetischen Gruppen eine signifikante glomeruläre Hyperfiltration. Die glomeruläre Filtrationsrate wurde weder durch Trandolapril noch durch BSF 201640 deutlich gemindert oder gar normalisiert. Allenfalls in der DM-BSF-ACE-Gruppe war eine leichte Reduktion der Hyperfiltration zu beobachten.

In früheren Studien hingegen, konnte die diabetische Hyperfiltration durch die Gabe eines ACE-Hemmers deutlich reduziert werden (Anderson et al 1989). Durch die Behandlung mit dem AT₁ Rezeptorantagonisten Losartan konnte die Hyperfiltration sogar komplett aufgehoben werden (Remuzzi et al. 1993). Ansonsten ist die Studie von Remuzzi et al. sehr gut mit der unseren vergleichbar. Verwendet wurden auch männliche Sprague-Dawley Ratten gleichen Körpergewichtes. Die diabetischen Tiere wurden ebenso mit Insulin auf ähnliche Blutglucosewerte eingestellt, allerdings erfolgte die Insulinsubstitution täglich. Nach einer Zeit von 4-6 Wochen nach Diabetesinduktion war die GFR bei den gesunden Kontrolltieren (0,74±0,07 ml/min/100g KG) mit der von unserer CON-VHC-Gruppe (0,73±0,03 ml/min/100g KG) identisch. Das trifft auch für die diabetischen Kontrollen zu (1,13±0,11 ml/min/100g KG gegenüber 1,13±0,08 ml/min/100g KG). Während nun bei den diabetischen Tieren von Remuzzi et al. die GFR durch AT₁-Blockade an die der gesunden Tiere angeglichen werden konnte, war die GFR unserer DM-ACE-Gruppe sogar noch gegenüber der GFR von DM-VHC erhöht. Allein durch die unterschiedliche Art der Blockade des Renin-Angiotensin-Systems - einerseits wurde das Angiotensin-Converting-Enzyme gehemmt, andererseits die Angiotensin II AT₁ Rezeptoren blockiert - lässt sich die gegensätzliche Wirkung nicht erklären. Es gilt zwar als erwiesen, dass der Effekt der ACE-Hemmer auf die Nierenfunktion nicht allein über den Mechanismus der gehemmten A II Synthese erklärbar ist (Heeg et al. 1991), jedoch vermindern auch die ACE-Hemmer bekanntermaßen die GFR und steigern sie nicht noch zusätzlich.

In der schon erwähnten Studie von Anderson et al. (1989) wurden diabetische Wistar Ratten, die durch tägliche Insulingaben auf eine moderate Hyperglykämie eingestellt waren, in 3 Gruppen unterteilt. Die Tiere erhielten keine weitere Behandlung, den ACE-Hemmer Captopril oder eine Dreifachkombination aus Reserpin, Hydralazin und Hydrochlorothiazid. Durch die antihypertensive Therapie konnte die Hyperfiltration deutlich, jedoch nicht signifikant gesenkt werden, was aber mit der ACE-Inhibition erreicht werden

konnte. Dieses Ergebnis zeigt einmal mehr die blutdruckunabhängige Wirkung der ACE-Hemmer auf die renale Hämodynamik. Durch die Captopril-Behandlung konnte die GFR allerdings nicht vollständig normalisiert werden. Die GFR wurde in einem Verhältnis gesenkt, wie es ähnlich auch bei unserer Studie durch die Kombinationstherapie aus Trandolapril und BSF 201640 der Fall war. Die Monotherapie mit dem D₃ Rezeptor Antagonisten verminderte die Hyperfiltration so gut wie nicht, so dass in der Kombinationstherapie kaum die Begründung für die Abweichung vom völlig unerwarteten Verlauf der GFR in der DM-ACE-Gruppe liegen dürfte. Abgesehen davon, wurde auch mit einem stärkeren Effekt der D₃ Rezeptorblockade auf die diabetische Hyperfiltration gerechnet.

Zwei bereits in der Einleitung angesprochene Arbeiten, der eigenen Arbeitsgruppe, sollen als Kontrast zu den vorliegenden Resultaten, bezüglich der Rolle einer Dopamin D₃ Rezeptorblockade bei der Hyperfiltration, betrachtet werden. Beide Studien wurden am selben, wie dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Rattenmodell des Diabetes mellitus durchgeführt. Der einzige Unterschied lag in der fehlenden Insulinsubstitution, wobei die Blutglucosewerte 2 Wochen nach Diabetesinduktion jeweils mit denen der vorliegenden Studie vergleichbar waren.

In der einen Studie konnte durch den peripher wirkenden Dopamin D₂-like Rezeptorantagonisten die glomeruläre Hyperfiltration vollständig aufgehoben werden. Gleichzeitig blieb dadurch auch die renale Filtrationsreserve erhalten, was durch die physiologische Steigerung der GFR als Antwort auf eine Aminosäureinfusion zum Ausdruck kam. Diese Filtrationsreserve war bei den unbehandelten diabetischen Tieren nur noch in geringem Maße vorhanden (Luippold et al. 2001a). Dem zufolge unterscheiden sich die Mechanismen, über welche die Vermittlung der physiologischen Hyperfiltration und der pathologischen Hyperfiltration des Diabetes erfolgt, zumindest teilweise. Luippold et al. verweisen auch auf zwei Publikationen von ter Wee et al. (1986 und 1987). Nach einer Untersuchung an gesunden Menschen wurde vermutet,

dass auch die Dopamin induzierte Hyperfiltration von einem anderen Mechanismus als die durch Aminosäuren induzierte abhängt (ter Wee et al. 1986). So bleibt auch bei Patienten mit Typ 1 Diabetes die renale hämodynamische Antwort auf exogenes Dopamin erhalten, wo hingegen sie auf eine infundierte Aminosäurenlösung abnahm (ter Wee et al. 1987).

In der anderen Studie (Luippold et al. 2005), wurde die Wirkung des peripher wirkenden, selektiven D₃ Antagonisten BSF 135170 untersucht. Der Wirkstoff wurde dabei ab Diabetesinduktion für 14 Tage verabreicht. Nach dieser Zeit trat in den diabetischen Kontrollen eine signifikante Hyperfiltration auf, während in der behandelten diabetischen Gruppe nahezu Normalwerte für die GFR gemessen wurden.

Eine ganz andere Rolle des Dopamins bei der Vermittlung der diabetischen Hyperfiltration zeigte die Untersuchung von Barthelmebs et al. (1991). Durch Stimulation von renalen Dopaminrezeptoren mit den Dopaminvorstufen L-Dopa und Gludopa gelang es, die glomeruläre Hyperfiltration im Frühstadium des Streptozotocininduzierten Diabetes bei Ratten aufzuheben. Diese Wirkung wurde mit dem selektiven D₁ Antagonisten SCH 23390 neutralisiert. Da auch mit dem selektiven D₁ Agonisten Fenoldopam die Hyperfiltration reduziert werden konnte, wurde abgeleitet, dass durch die Stimulation von D₁ Rezeptoren eine Normalisierung der glomerulären Filtration erreicht werden kann (Barthelmebs et al. 1991). Das scheint noch verwirrender, wenn man bedenkt, dass eine Stimulation mit Fenoldopam die Expression des D₃ Rezeptor Proteins steigert (Zeng et al. 2004) und gleichzeitig durch D₃ Rezeptorstimulation die glomeruläre Filtrationsrate ansteigt (Luippold et al. 1998). Außerdem bestehen Hinweise, dass Dopamin die Podozytenfunktion beeinflusst. Über D₁ Rezeptorstimulation soll es zu einer Ansammlung von cAMP und, vermutlich durch Aktivierung von Cl⁻ und Hemmung von K⁺-Kanälen, zu einer Depolarisation von Podozyten kommen (Bek et al. 1999). Dadurch wäre die Ladungsbarriere gestört. Auch größere Proteine wie das Albumin müssten dann in erhöhtem Ausmaß den Filter passieren können. Dass

die D₃ Rezeptorenzahl durch D₁ Stimulation ansteigt, gilt allerdings nur für normotensive Ratten, bei hypertensiven Ratten ist es gerade umgekehrt. Diese unterschiedliche Interaktion zwischen den D₁ und D₃ Rezeptoren dürfte auch bei der Pathogenese des Bluthochdrucks eine Rolle spielen (Zeng et al. 2004). Bezüglich der diabetischen Hyperfiltration könnten sowohl D₁-like als auch D₂-like Rezeptoren beteiligt sein. Die D₁ Rezeptoren zum Beispiel sind beim streptozotocininduzierten Diabetes mellitus in ihrer Anzahl vermindert und in ihrer Funktion durch fehlerhafte G-Proteinkopplung gestört (Marwaha et al. 2004). Weiterhin ist eine gegensätzliche Funktion der beiden Rezeptortypen bekannt und eine Interaktion von D₁-like und D₂-like Rezeptoren wird angenommen (Jose et al. 1998).

Warum es in der vorliegenden Studie, anders als in der aufgezählten Literatur berichtet, weder durch die ACE-Inhibition noch durch die D₃ Rezeptor-Blockade möglich war, die diabetische Hyperfiltration zu verringern oder gar zu normalisieren, konnte nicht geklärt werden. Eine Ursache für den nicht erwarteten zeitlichen Verlauf der GFR in der DM-ACE-Gruppe konnte ebenfalls nicht gefunden werden. Auch die vergleichende Analyse der anderen Parameter wie Blutglucosekonzentration, Nahrungsaufnahme, Trinkwasserverbrauch usw. konnte keine Antwort für die offen gebliebene Frage bieten.

Ein möglicher Unterschied zwischen unseren diabetischen Tieren und denen der anderen Arbeiten könnte in den Insulinspiegeln, die jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt wurden, liegen. Die Tiere von Luippold et al. (2005) zeigten etwa gleiche hyperglykämische Werte ohne exogenes Insulin. Es ist also davon auszugehen, dass noch ein Rest der physiologischen Insulinausschüttung vorhanden war. Den Ratten von Anderson et al. (1989) und Remuzzi et al. (1993) wurden täglich angepasste Insulininjektionen verabreicht. In diesen Experimenten ist jeweils eine sich zeitlich ändernde Insulinkonzentration anzunehmen. In unserer Studie jedoch wurden Insulinstäbchen implantiert, welche nach Herstellerangaben bis zu einer Dauer von 40 Tagen eine zeitlich konstante Insulinmenge abgeben. Die Richtigkeit

dieser Angaben über die Insulinimplantate und deren praktische Anwendbarkeit im Langzeittierversuch wurde in der eigenen Arbeitsgruppe (Schneider et al. 2004) geprüft. Über einen Zeitraum von 30 Tagen wurde die Zuverlässigkeit dieser Präparate bei Ratten und Mäusen bestätigt. Die Insulinkonzentrationen unserer Tiere dürften folglich relativ konstant gewesen sein. Da Insulin eine, bei entgleister Stoffwechsellage eingetretene, Hyperfiltration akut normalisieren kann, wurde vermutet, dass Insulin unabhängig von seiner Wirkung auf den Blutzucker in die Regulation der renalen Hämodynamik eingreift (Mogensen et al. 1978). Diese Vermutung konnte mit der Entdeckung von Insulinrezeptoren an isolierten Glomeruli gestützt werden (Kurokawa et al. 1978). In diesem Zusammenhang ist vorstellbar, dass die GFR senkende Wirkung der ACE-Hemmer und der Dopaminantagonisten von diesen Rezeptoren abhängig ist. Genauso käme eine Desensibilisierung dieser Insulinrezeptoren durch die über längere Zeit konstanten Insulinkonzentrationen in Betracht. Die Reaktion der renalen Insulinrezeptoren auf die zeitlich unveränderten Insulinkonzentrationen, könnte somit den Grund für die nicht eingetretene medikamentöse Senkung der GFR darstellen.

Letztendlich muss noch in Betracht gezogen werden, dass die der Diskussion zu Grunde liegenden Resultate für die GFR nicht die wirklichen Werte der GFR widerspiegeln. Wie in 2.6.3. eingeräumt, basieren die GFR-Werte auf einer Berechnung, bei der für die Kreatininkonzentration im Serum ein Sollwert von 0,38 mg/dl eingesetzt wurde. Dieser Sollwert wurde herangezogen, da die in 2.5.6 beschriebene Methode für die Ermittlung der Kreatininkonzentration im Serum zu ungenau ist. Auf eine präzisere Bestimmung wurde verzichtet, da der Mehraufwand unverhältnismäßig hoch gewesen wäre. Weiterhin stehen in der vorliegenden Arbeit weniger die Auswirkung auf die GFR, als vielmehr die Frage nach einem tatsächlichen nephroprotektiven Nutzen der untersuchten Wirkstoffe im Mittelpunkt des Interesses.

4.3 Albumin- und Proteinurie

Albumin- und Proteinurie werden sowohl beim experimentellen als auch beim klinischen Diabetes mellitus als Indikatoren für eine diabetische Nephropathie herangezogen. Zum Beispiel galt in einer Studie von Mathiesen et al. (1999) bei diabetischen Patienten eine anhaltende Albuminurie >300 mg/24 h als Marker für eine diabetische Nephropathie. Für die Entstehung der Albumin- und Proteinurie könnten verschiedene Mechanismen verantwortlich sein. Zum einen könnte die Einlagerung von Glucose in Membranen zu einer Funktionsbeeinträchtigung von Endothelzellen, Basalmembran und Podozyten mit resultierender Albuminurie führen (Verbeke et al. 1997). Weiter könnte der allmähliche Verlust der Filterfunktion für Proteine durch den erhöhten Perfusionsdruck der Nieren verursacht sein (Keane und Shapiro 1990).

Bis zur 22. Woche entwickelten die diabetischen Kontrolltiere keine Albumin- oder Proteinurie. Erst ab diesem Zeitpunkt war bis zur 38. Woche bei den diabetischen Kontrolltieren eine Albumin- und eine Proteinurie zu beobachten. Albumin- und Proteinurie waren in der Gruppe die den Dopamin D₃ Rezeptor Antagonisten BSF 201640 deutlich schwächer ausgeprägt als in der diabetischen Kontrollgruppe. In den beiden Gruppen, die Trandolapril als Monotherapie oder in der Kombinationstherapie erhielten, war keine erhöhte Albumin- oder Proteinurie nachzuweisen. Ob nun die Kombinationstherapie (Trandolapril + BSF 201640) der Monotherapie (nur Trandolapril) in ihrer Schutzfunktion überlegen ist, konnte folglich nicht geprüft werden. In diesem Zusammenhang konnte ein der ACE-Inhibition gleichwertiger nephroprotektiver Nutzen einer D₃ Rezeptorblockade an Ratten mit Typ 2 Diabetes beobachtet werden. Nach einer Versuchsdauer von 6 Monaten waren die, in der histologischen Untersuchung festgestellten, Nierenschädigungen gleichermaßen durch die ACE-Inhibition und die D₃ Rezeptorblockade vermindert. Ebenso war in beiden behandelten Gruppen die Albuminurie gegenüber den diabetischen Kontrollen deutlich reduziert (Gross et al. 2004).

Interessant dürfte auch die Tatsache sein, dass selbst die diabetischen Kontrolltiere über einen viel längeren Zeitraum hinweg als erwartet von der Albumin- und der Proteinurie verschont blieben. Die im vorigen Kapitel beschriebene Studie von Anderson et al. liefert für die diabetischen Kontrolltiere bereits in der 20. Woche nach Diabetesinduktion eine deutlich stärker ausgeprägte Albuminurie als unsere Tiere in der 30. Woche. Allerdings wurden dort Wistar Ratten eingesetzt, worin auch die Erklärung für das frühzeitigere Auftreten der Albuminurie liegen könnte. Wie in unserer Studie konnte die Albuminurie bei den diabetischen Tieren unter ACE-Inhibition verhindert werden, obwohl die glomeruläre Hyperfiltration auch nur zum Teil reduziert werden konnte. Während auch bei den gesunden Kontrolltieren ab der 44. Woche eine ansteigende Albuminurie einsetzte, war es in der diabetischen Captopril-Gruppe selbst bis zur 70. Woche noch zu keiner Steigerung der Albuminurie gekommen. Das spiegelte sich auch im erhobenen Glomerulus Sklerose Score wieder (Anderson et al 1989).

In der ebenfalls im vorherigen Kapitel beschriebenen Studie von Remuzzi et al. (1993), erreichten die gesunden Kontrolltiere eine mehrfach höhere Proteinurie als unsere nicht behandelten diabetischen Tiere. Jedoch entwickelten dort die diabetischen Tiere eine noch stärkere gegenüber der Kontrollgruppe signifikante Proteinurie, wobei die unter Losartan stehenden Ratten sogar eine etwas mildere Proteinurie als die Kontrolltiere zeigten. Dabei muss bedacht werden, dass die Proteinbestimmung aus einer Urinprobe erfolgte, die lediglich über 6 Stunden am Vormittag gesammelt wurde. Außerdem erhielten die Tiere in dieser Phase kein Futter. (Auf die Gabe von Futter wurde verzichtet, da eine Verunreinigung des Urins durch herabgefallene Futterpartikel nicht ausgeschlossen werden konnte. Dies hätte wiederum eine nicht vorhandene Proteinurie vortäuschen können.) Aufgrund dieser Eigenheit bei der Uringewinnung für die Proteinmessung, ist ein Vergleich mit anderen Studien, bei denen gewöhnlicher 24 Stunden Urin verwendet wurde, jedoch in seiner Aussagekraft schwer eingeschränkt. Ansonsten gilt für die Wirkung der

verwendeten Pharmaka auf die Proteinurie das, was bereits zu deren Wirkung auf die Albuminurie berichtet wurde.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich die bereits bekannten nephroprotektiven Eigenschaften der ACE-Inhibitoren bestätigten und das eine Dopamin D₃ Rezeptor Blockade tendenziell die Aufrechterhaltung der Nierenfunktion unterstützt. Ob die Kombinationstherapie noch weitere Vorteile gegenüber der ACE-Hemmung alleine gebracht hätte, bleibt fraglich. Innerhalb unseres Beobachtungszeitraumes wäre die Wirkung von Trandolapril bezüglich Albumin- und Proteinurie nicht zu überbieten gewesen.

4.4 Blutdruckverhalten

Heute weiß man, dass für das Voranschreiten der diabetischen Nephropathie ein Bluthochdruck eine wesentliche Rolle spielt und somit eine konsequente Blutdruckkontrolle derzeit mit die wichtigste therapeutische Maßnahme darstellt (Ismail et al.). Normotonie nach Definition der WHO, also unter 140/90 mmHg, wird zumindest für den Typ 2 Diabetiker nicht mehr als optimal betrachtet. Es sollten auf jeden Fall Werte im mittleren Normbereich angestrebt werden, d.h. unter 135/85 mmHg. Ist die Nephropathie bereits manifest, sollte er sogar auf unter 130/80 mmHg gesenkt werden (Schäfers et al. 1999). Aufgrund der großen Bedeutung des Bluthochdruckes bei der Entstehung und beim Fortschreiten der diabetischen Nephropathie soll daher noch etwas konkreter auf die Blutdruckverläufe in unserer Studie eingegangen werden.

Weder die diabetische Stoffwechsellage noch die ACE-Inhibition oder die Dopamin D₃ Rezeptorblockade bewirkten in der vorliegenden Studie eine Veränderung des systolischen Blutdruckes. Stattdessen wurden hypertensive Blutdruckwerte bei den diabetischen Kontrollen und eine Normalisierung des Hypertonus durch den ACE-Hemmer erwartet. Aufgrund der Ergebnisse aus

Studien (Asico et al. 1998, Luippold et al 2001b), die das Blutdruckverhalten beim ausgeschalteten D₃ Rezeptorsystem untersuchten, wurde auch mit erhöhten Blutdruckwerten unter BSF 201640 gerechnet.

Bei Remuzzi et al. (1993) zeigten gesunde Ratten über ein Jahr einen ähnlichen Blutdruckkurvenverlauf wie unsere Kontrolltiere. Die diabetische Gruppe wies jedoch über die gesamte Zeit gleichmäßig signifikant höhere systolische Werte auf, die in der diabetischen Losartan-Gruppe komplett normalisiert werden konnten. Anderson et al. (1989) haben bei ihren diabetischen Tieren ebenfalls erhöhte systolische Blutdruckwerte gemessen. Auch hier wurden die hypertonen Werte durch den ACE-Hemmer Captopril normalisiert. Dem widersprechen jedoch die Ergebnisse aus einer Studie, bei der die chronischen Komplikationen im STZ-Rattenmodell mit denen des menschlichen Diabetes mellitus verglichen wurden. Über die gesamte Versuchsdauer von 24 Wochen blieben diabetische Wistar Ratten normotensiv. Eine Arteriosklerose entwickelte sich in diesem Zeitraum nicht. Das sollte erlauben die diabetischen Folgeschäden als unabhängig von einer Hypertonie oder von einer Arteriosklerose zu betrachten und zu untersuchen (Wei et al. 2003).

Schließlich gibt es noch Hinweise, dass ein defektes oder gestörtes Dopamin D₃ Rezeptorsystem zur Entstehung einer Hypertonie beitragen kann. An D₃ Rezeptor Knockout Mäusen wurden gegenüber Wildtypmäusen ca. um 20 mmHg erhöhte Blutdruckwerte gemessen. Als Antwort auf eine akute Salzbelastung stiegen bei Wildtyptieren der Urinfluss und die Natriumausscheidung deutlich stärker an als bei den D₃ defizienten Tieren (Asico et al. 1998). Außerdem wurde über eine 10- bis 20-fach niedrigere Bindung des Agonisten [³H]-7-OH-DPAT an die renalen D₃ Rezeptoren salzsensitiver Dahl Ratten berichtet (Barili et al. 1997). Dem widersprechen allerdings Versuchsergebnisse laut denen dieses Bindungsverhalten bei salzsensitiven Tieren nicht verändert ist, wohl aber die Rezeptordichte in der Niere vermindert ist (Luippold et al. 2001b). In der gleichen Arbeit wurde auch

durch eine D₃ Rezeptor-Blockade mit BSF 135170 bei genetisch salz-resistenten Ratten ein salz-abhängiger Hypertonus induziert. Ohne die Hochsalz-Diät veränderte der D₃ Antagonist den Blutdruck nicht. Da die Tiere in der vorliegenden Arbeit alle eine Normalsalz-Diät erhielten, könnte darin auch der Grund liegen, warum unter der Langzeit D₃ Rezeptor-Blockade keine erhöhten Blutdruckwerte gemessen wurden. In einer Studie an Ratten mit Typ 2 Diabetes wurden jedoch gegensätzliche Feststellungen bezüglich des Blutdrucks gemacht. Durch eine D₃ Rezeptorblockade konnte der systolische Blutdruck in gleicher Weise wie durch den ACE-Hemmer Trandolapril signifikant gegenüber den diabetischen Kontrolltieren, deren Blutdruck erhöht war, gesenkt werden (Gross et al. 2004).

4.5 Diabetische Katarakt und ACE-Inhibition

Als Nebenbefund wurde die Entwicklung einer diabetischen Katarakt protokolliert. Bei unbehandelten diabetischen Wistar Ratten, die also auch kein Insulin erhielten, manifestierte sich eine Linsentrübung ab der 4. Woche nach Diabetesinduktion. Nach 16 Woche hatten alle Versuchstiere eine beidseitige Katarakt (Wei et al. 2003). Glucosebelastete Linsen sind einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt oder nur eingeschränkt in der Lage reaktive Sauerstoffverbindungen umzusetzen oder beides. Verursacht durch eine Membranundurchlässigkeit, ist die Sorbitolkonzentration in den Linsen auf das 10- bis 20- fache gesteigert. Die erhöhte Sorbitolkonzentration und zusätzlich die langsame Umwandlung in Fructose, könnten die osmotische Belastung steigern oder die Komponenten schädigen, die der osmotischen Belastung normalerweise entgegenwirken (Mitton et al. 1993).

In unserer Studie zeigte sich eine Reduktion der Kataraktrate auf 58 % gegenüber 90 % durch die ACE-Inhibition mit Trandolapril. Dieser Nebeneffekt wurde auch bei einer sechs-monatigen Langzeitstudie an männlichen Wistar-Ratten mit streptozotozininduziertem Diabetes mellitus beobachtet. Die Behandlung mit Trandolapril in der gleichen Dosierung senkte die Kataraktrate auf 57 % gegenüber 67 % bei den nicht behandelten Tieren (Dhein et al. 2000). In einer speziellen Katarakt-Präventionsstudie an diabetischen Sprague-Dawley Ratten konnte durch Behandlung mit Pyrazinoylguanidin die Entwicklung einer Katarakt vollständig unterdrückt werden. Mit der Vergleichsgruppe, die den ACE-Hemmer Captopril erhielt, konnte nach 16 Wochen mit 22 % eine deutlich geringere Kataraktrate als in der unbehandelten Kontrollgruppe mit 89 % erzielt werden (Follansbee et al. 1997). Auf Grund dieser Daten kann den ACE-Inhibitoren eine positive Wirkung bezüglich der Verhinderung einer diabetischen Katarakt zugesprochen werden. Der Dopamin D₃ Rezeptorblocker BSF 201640 schien keinen Einfluss auf die Kataraktentwicklung zu haben.

4.6 Klinische Implikation

Die diabetische Nephropathie ist ein Krankheitsbild, das heutzutage eine steigende Zahl von Patienten gefährdet. Das liegt nicht zuletzt daran, dass Diabetiker dank der modernen Medizin nicht mehr so häufig vor Eintreten der Niereninsuffizienz an anderen Folgeschäden, insbesondere Herz-Kreislaufkrankungen, versterben. Zwar kann der diabetischen Nephropathie teilweise vorgebeugt werden, jedoch gelingt es selbst mit großem Aufwand und mehrstufigem Behandlungsansatz (optimale Blutzuckereinstellung, anti-hypertensive Therapie, Proteinrestriktion, Inhibition des Renin-Angiotensin-Systems etc.), nicht immer ihre Entstehung bzw. ihr Fortschreiten zu verhindern.

Bei der Suche nach neuen Therapieoptionen wurde die glomeruläre Hyperfiltration im Frühstadium des Diabetes zu einem wichtigen Angriffspunkt. In zahlreichen klinischen und experimentellen Studien konnte eine Beteiligung der Hyperfiltration an der Entstehung der diabetischen Nephropathie belegt werden. Ein Regulationssystem des Organismus, welches nachweislich, neben anderen verschiedenen Faktoren, auf die renale Hämodynamik einwirkt, stellt das Dopamin mit seinen unterschiedlichen Rezeptoren, vornehmlich dem D₃ Rezeptor, dar.

Frühere Studien zeigten, dass durch eine Dopamin D₃ Rezeptorblockade die Hyperfiltration vermindert oder sogar vollständig normalisiert werden kann. Obwohl das in der vorliegenden Studie so nicht zu beobachten war, konnte der Langzeit D₃ Rezeptorblockade eine tendenziell nephroprotektive Rolle zugesprochen werden. Wenn sich die Dopamin D₃ Rezeptorblockade in weiteren Untersuchungen als zuverlässiges Instrument zur Erhaltung der Nierenfunktion herausstellen sollte, ohne dabei erhebliche unerwünschte Nebenwirkungen auszulösen, so könnten in der Zukunft entsprechende Medikamente als sinnvolle Ergänzung in der Prophylaxe und in der Therapie der diabetischen Nephropathie zum Einsatz kommen. Insbesondere könnten Patienten mit verminderter Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-System von einer solchen Therapieform profitieren, da die derzeitigen Therapiealternativen vornehmlich über die Beeinflussung dieses Regulationssystem ihre nephroprotektive Wirkung entfalten.

Der Faktor Hypertonie könnte für den Einsatz dieser Medikamente limitierend sein. Es ist daher wichtig über die Ursachen und Begleitumstände, die unter einer solchen Behandlung mit zur Hypertonie beitragen können, Bescheid zu wissen. Nach unseren Ergebnissen scheint die Langzeit Dopamin D₃ Rezeptor-Blockade bei Normalsalz-Ernährung in diesem Zusammenhang nicht kontraindiziert zu sein.

5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Langzeitstudie wurde an einem Rattenmodell des Diabetes mellitus untersucht, ob eine Dopamin D₃ Rezeptorblockade die diabetische Hyperfiltration beeinflusst und die Entstehung einer diabetischen Nephropathie verhindern oder hinauszögern kann. Außerdem wurde diese Therapie im Vergleich zur etablierten nephroprotektiven ACE-Inhibitor Therapie betrachtet.

Dazu wurde bei allen Versuchstieren, mit Ausnahme derer, die die gesunde Kontrollgruppe (CON-VHC) darstellten, mit einer intraperitonealen Streptozotocin-Injektion ein Diabetes induziert. Mit Insulinimplantaten wurde die Blutglucosekonzentration bei allen diabetischen Tieren auf einen moderaten Wert um 400 mg/dl eingestellt. Die Tiere erhielten ansonsten keine weitere Medikation (DM-VHC), den Dopamin D₃ Antagonisten BSF 201640 (DM-BSF), den ACE-Hemmer Trandolapril (DM-ACE) oder beide Wirkstoffe in Kombination (DM-BSF-ACE). Vor und 2 Wochen nach Diabetesinduktion, dann in vierwöchigen, und ab der 22. Woche achtwöchigen Abständen, wurden über einen Zeitraum von 38 Wochen Stoffwechselläufigversuche und Blutdruckmessungen durchgeführt.

Die gemessenen systolischen Blutdruckwerte ergaben keine relevanten Unterschiede zwischen diabetischen und nicht diabetischen Tieren sowie unter den verschiedenen therapierten diabetischen Ratten. Bei allen diabetischen Gruppen war eine deutliche und gegenüber CON-VHC signifikante Polydipsie, Polyphagie, Polyurie und Glucosurie sowie ein signifikanter Wachstumsrückstand zu beobachten. Eine signifikante glomeruläre Hyperfiltration war in allen diabetischen Gruppen bereits in der ersten Untersuchung nach Diabetesinduktion festzustellen. Diese durchlief in den Wochen 10 bis 18 ihr Maximum und fiel danach wieder ab. Interessanterweise war die Hyperfiltration bei DM-ACE am stärksten und bei DM-BSF-ACE am geringsten ausgeprägt. DM-VHC und DM-BSF lagen mit ungefähr gleichen

Werten dazwischen. Weder die ACE-Inhibition, noch die D₃ Rezeptorblockade vermochten die Hyperfiltration zu unterdrücken. Die Ausprägung einer Albumin- und einer Proteinurie, beides Indikatoren für eine beginnende Nephropathie, hielt sich im verwendeten Modell in Grenzen. Im Durchschnitt stiegen bei den DM-BSF-Tieren die Albumin- und die Proteinurie verglichen mit den DM-VHC-Tieren deutlich, die Proteinurie auch signifikant geringer an. Bezüglich der ACE-Inhibition konnte gezeigt werden, dass kein Tier, welches Trandolapril erhielt, innerhalb von 38 Wochen Zeichen einer Nephropathie entwickelte.

Damit besteht tendenziell ein nephroprotektiver Nutzen einer D₃-Rezeptorblockade. Wie erwartet konnte ein protektiver Nutzen durch die ACE-Inhibition klar gezeigt werden. Die Kombinationstherapie erbrachte keine weiteren Vorteile gegenüber der Monotherapie mit Trandolapril. Eine zeitliche Ausdehnung der Versuche oder ein anderes Modell könnten zu einer valideren Aussage bezüglich des nephroprotektiven Nutzens der D₃ Rezeptorantagonisten führen.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Adam WR, Adams BA. Production and excretion of dopamine by isolated perfused rat kidney. *Renal Physiol* 1985; 8: 150-158

Andersen AR, Christiansen JS, Andersen JK, Kreiner S, Deckert T. Diabetic nephropathy in Type 1 (insulin-dependent) diabetes: an epidemiological study. *Diabetologia* 1983; 25: 496-501

Anderson S, Rennke HG, Garcia DL, Brenner BM. Short and long term effects of antihypertensive therapy in the diabetic rat. *Kidney Int* 1989; 36: 526-536

Asico LD, Ladines C, Fuchs S, Accili D, Carney RM, Semeraro C, Pocchiari F, Felder RA, Eisner GM, Jose PA. Disruption of the Dopamin D₃-Rezeptor gene produces renin-dependent hypertension. *J Clin Invest* 1998; 3: 493-498

Baines AD. Effects of salt intake and renal denervation on catecholamine catabolism and excretion. *Kidney Int* 1982; 21: 316-322

Bank N, Klose R, Aynedjian HS, Nguyen D, Sablay LB. Evidence against increased glomerular pressure initiating diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1987; 31: 898-905

Barili P, Ricci A, Baldoni E, Mignini F, Amenta F. Pharmacological characterisation and autoradiographic localisation of a putative dopamine D₃-receptor in the rat kidney. *Eur J Pharmacol* 1997; 338: 89-95

Barthelmebs M, Vailly B, Grima M, Velly J, Stephan D, Froehly S, Imbs J-L. Effects of Dopamine Prodrugs and Fenoldopam on Glomerular Hyperfiltration in Streptozotocin-Induced Diabetes in Rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18: 243-253

Bek M, Fischer KG, Greiber S, Hupfer C, Mundel P, Pavenstädt H. Dopamin depolarizes podocytes via a D1-like receptor. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14: 581-587

Bell C, Ferguson M, Petrovic T.- Neurochemistry of dopaminergic nerves. In: *Peripheral Actions of Dopamine*. The MacMillan Press 1988; 41-45

Bojestic M, Harnqvist HJ, Hermansson G. Declining incidence of nephropathy in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1994; 15: 330

Brochner-Mortensen J. Glomerular filtration rate and extrazellular fluid volumes during normoglycemia and moderate hyperglycemia in diabetes. *Scand J Clin Lab Invest* 1973; 32: 311-316

Chio CL, Hess GF, Graham RS, Huff RM. A second molecular form of D₂ dopamin receptor in rat and bovine caudate nucleus. *Nature* 1990; 343: 266-269

Christensen CK, Krusell LR, Mogensen CE. Increased blood pressure in diabetes: essential hypertension or diabetic nephropathy? *Scand J Clin Lab Invest* 1987; 47: 363-370

Dearry A, Gingrich JA, Falardeau P, Fremeau RT Jr, Bates MD, Caron MG. Molecular cloning and expression of the gene for a human D₁ dopamine receptor. *Nature* 1990; 347: 72-76

Dhein S, Hochreuther S, Aus dem Spring C, Bollig K, Hufnagel C, Raschack M. Long-Term Effects of the Endothelin A Receptor Antagonist LU 135252 and the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor Trandolapril on Diabetic Angiopathy and Nephropathy in a Chronic Type I Diabetes Mellitus Rat Model. *JPET* 2000 Vol. 293: 351-359

Dinnerstein RJ, Vannice J, Henderson RC, Roth LJ, Goldberg LI, Hoffmann PC. Histofluorescence techniques provide evidence for dopamine containing neuronal elements in the canine kidney. *Science* 1979; 205: 497-499

Donnelly R. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and insulin sensitivity: metabolic effects in Hypertension, diabetes, and heart failure. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20 (Suppl 11): 38-44

Follansbee MH, Beye KH Jr, Vesell ES. Studies on pyrazinoylguanidine. 6. Prevention of cataracts in STZ-diabetic rats. *Pharmacology* 1997; 54 (5): 256-260

Frei U, Schober-Halstenberg HJ and the QUASI Niere Task Group for Quality Assurance in Renal Replacement Therapy. Annual Report of the German Renal Registry 1998. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14 (5): 1085-90

Goldberg LI. Cardiovascular and renal actions of dopamine. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 1-29

Gross ML, El-Shakmak A, Szábó A, Koch A, Kuhlmann A, Münter K, Ritz E, Amann K. ACE-Inhibitors but not endothelin receptor blockers prevent podocyte loss in early diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2003; 46(6): 856-68

Gross ML, Harbi N, Adamczak A, Gross G, Drescher K, Tulp O, Ritz E, Amann K, Mühlbauer B. Beneficial Renal Effects of Dopamine D₃ Receptor Inhibition in a Type 2 Diabetes Model in Rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2004; 369 Suppl. 1 (Abstract)

Hansson I. The captopril prevention project (CAPP). *Am J Hypert.* 1999; 7 (Suppl): 82-83

Hasslacher C, Ritz E, Wahl P, Michael C. Similar risks of nephropathy in patients with type I or type II diabetes mellitus. *Nephrol.Dial.Transplant* 1989; 4: 859-863

Hayashi M, Yasuyoshi Y, Kitajima W, Saruta T. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity along the rat nephron. *Am J Physiol* 1990; 258: F28-F33

Hedge SS, Lokhandwala MF. Stimulation of renal dopamin production during acute volume expansion requires the presence of intact vagi but not renal nerves. *Clin Exp Hypertens* 1992; 14: 1169-1187

Heeg JE, de Jong PE, van der Hem GK, de Zeeuw D. Angiotensin II does not acutely reverse the reduction of proteinuria by long-term ACE inhibition. *Kidney Int* 1991; 40: 734-741

Hostetter TH, Rennke HG, Brenner BM. The case for intrarenal hypertension in the initiation and progression of diabetic and other glomerulopathies. *Am J Med* 1982; 72: 375-380

Ismail N, Becker B, Strzelczyk P, Ritz E. Renal disease and hypertension in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1999; 55: 1-28

Ittner KP, Zimmermann M, Bucher M, Gessele W, Kees F, Krämer BK, Grobecker HF. The effect of urapidil and ramipril on hyperglycemia in streptozotocin diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 361: 92-97

Jose PA, Raymond JR, Bates MD, Aperia A, Felder RA. The renal dopamine receptors. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 1265-1278

Jose PA, Asico LD, Eisner GM, Pocchiari F, Semeraro C, Felder RA. Effects of costimulation of dopamine D₁- and D₂-like receptors on renal function. *Am J Physiol* 1998; 275: R986-994

Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 126: 201-205

Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129-2139

Keane WF, Shapiro PE. Renal protective effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *The American Journal of cardiology* 1990; 65: 491-531

Kebabian JW, Calne D. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 1979; 277: 93-96

Koch M, Kutkuhn B, Grabensee B, Ritz E. Apolipoprotein A, fibrinogen age and history of stroke are predictors of death in dialysed diabetic patients: A prospective study in 412 subjects. *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12: 2603-2611

Kurokawa K, Silverblatt FJ, Klein KL. Insulin receptors of isolated glomeruli. *Int J Biochem* 1980; 12: 185

Lee MR. Dopamine and the kidney: 10 years on. *Clin Sci* 1993; 84: 357-375

Lewis EJ, Hunsicker LG, Bain RP, Rohde RD. The effect of angiotensin-converting enzyme inhibition on diabetic nephropathy. *N Engl J Med* 1993; 329: 1456-1462

Luippold G und Mühlbauer B. Dopamine D₂ receptors mediate glomerular hyperfiltration due to amino acids. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1248-1252

Luippold G, Beilharz M, Mühlbauer B. Reduction of glomerular hyperfiltration by dopamine D₂-like receptor blockade in experimental diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2001a; 16: 1350-1356

Luippold G, Zimmermann C, Mai M, Kloor D, Starck D, Gross G, Mühlbauer B. Dopamine D₃ -receptors and salt-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2001b; 12: 2272-2279

Luippold G, Beilharz M, Wehrmann M, Unger L, Gross G, Mühlbauer B. Effect of dopamine d₃ receptor blockade on renal function and glomerular size in diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005; wird demnächst erscheinen.

Marwaha A, Bandy AA, Lokhandwala MF. Reduced renal dopamin D₁ receptor function in streptozotocin-induced diabetic rats. *Am J Physiol* 2004; 286: F 451-457

Mathiesen ER, Hommel E, Hansen HP, Smidt UM, Parving H-P. Randomised controlled trial of long term efficacy of captopril on preservation of kidney function in normotensive patients with insulin dependent diabetes and microalbuminuria. *BMJ* 1999; 319: 24-25

Missale C, Russel Nash S, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine receptors: From structure to function. *Physiol Rev* 1998; 78: 189-222

Mitton KP, Dean PA, Dzialoszynski T, Xiong H, Sanford SE, Trevithick JR. Modelling cortical cataractogenesis. 13. Early effects on lens ATP/ADP and glutathione in the streptozotocin rat model of the diabetic cataract. *Exper. Eye Res.* 1993; 56: 187-98

Mogensen CE, Andersen MJF. Increased kidney size and glomerular filtration rate in untreated juvenile diabetes: normalization by insulin treatment. *Diabetologia* 1975; 11: 221-224

Mogensen CE, Christensen NJ, Gundersen HJG. The acute effect of insulin on renal hemodynamics and protein excretion in diabetes. *Diabetologia* 1978; 15: 153-157

Mogensen CE. Long-term antihypertensive treatment inhibiting progression of diabetic nephropathy. *Br Med J* 1982; 285: 685-688

Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984; 311: 89-93

Mühlbauer B, Gleiter CH, Gies C, Luippold G, Löschmann PA. Renal response to infusion of dopamin precursors in anaesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997; 356: 838-845

Nürnberg A, Rübiger M, Mack A, Diaz J, Sokoloff P, Mühlbauer B, Luippold G. Subabical Localization of the Dopamine D₃ Receptor in Proximal Tubules of the Rat Kidney. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(12): 1647-1655

O'Connell DP, Vaughan CJ, Aherne AM; Botkin SJ, Wang ZQ, Felder RA, Carey RM. Expression of dopamine D₃ receptor protein in the rat kidney. *Hypertension* 1998; 32: 886-895

Österby R. Basement membrane morphology in diabetes mellitus. In: Ellenberg M, Rifkin H, eds. *Diabetes mellitus: theory and practice*. 3rd ed. New York: Medical Examination Publishing. 1983; 323-41

Parving H-H, Andersen AR, Smidt UM, Svendsen PAA. Early aggressive antihypertensive treatment reduces rate of decline in kidney function in diabetic nephropathy. *Lancet* 1983; 1: 1175-9

Ratieken N, Ratieken ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37917). *Cancer Chemother* 1963; 29: 91-98

Remuzzi A, Perico N, Amuchastegui CS, Malanchi B, Mazerska M, Battaglia C, Bertani T, Remuzzi G. Short- and Long-Term Effect of Angiotensin II Receptor Blockade in Rats with Experimental Diabetes. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1993; 4:40-49

Reubi FC. Glomerular filtration rate, renal blood flow and blood viscosity during and after diabetic coma. *Circ Res* 1953; 1: 410-413

Ritz E, Lippert J, Keller C. Rapider Anstieg der Zahl niereninsuffizienter Typ-II-Diabetiker. *Dtsch Med Wschr* 1996; 121: 1247

Ritz E, Orth SR. Nephropathy in patients with Type 2 diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1999; 341: 1127-1133

Rudberg S, Persson B, Dahlquist G. Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy – An 8-year prospective study

Schäfers RF, Lütkes P, Ritz E, Philipp T. Leitlinie zur Behandlung der arteriellen Hypertonie bei Diabetes mellitus. *Dtsch. med. Wschr.* 1999; 124: 1356-1372

Schneider S, Weber R, Luippold G. Blood Glucose Profiles in Diabetic Rodents Using Different Insulin Preparations. *Arzneim.-Forsch./Drug Res.* 2004; 54: 842-844

Schwartz TW, Molecular structure of G-protein-coupled receptors. In: *Textbook of Receptor Pharmacology.* CRC Press 1996; 65-84

Seeman P, Schaus JM. Dopamine receptors labelled by [³H] quinpirole. *Eur J Pharmacol* 1991; 203: 105-109

Seeman P, Van Tol HHM. Dopamine receptor pharmacology. *Trends Pharmacol Sci* 1994; 15: 264-270

Simonson DC. Etiology and prevalence of hypertension in diabetic patients. *Diabetes Care* 1988; 11: 821-827

Singh AK, Mo W, Dunea G. Effect of glycated proteins on the matrix of glomerular epithelial cells. *J Am Soc Nephrol* 1998; 9: 908

Smith ST, Svetkey LP, Dennis VW. Racial differences in the incidence and progression of renal diseases. *Kidney Int* 1991; 40: 815

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990; 347: 146-151

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Bouthenet ML, Souil E, Schwartz JC. Localization and function of the D₃ dopamine receptor. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 224-230

Sunahara RK, Guan H-C, O'Dowd BF, Seeman P, Laurier LG, Ng G, George SR, Torchia J, Van Tol HHM, Niznik HB. Cloning of the gene for a human dopamine D₅ receptor with higher affinity for dopamine than D₁. *Nature* 1991; 350: 614-619

Suzuki H, Nakane H, Kawamura M, Yoshizawa M, Takeshita E, Saruta T. Excretion and metabolism of dopa and dopamine by isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1984; 247: E285-E290

ter Wee PM, Rosman JB, van der Geest S, Sluiter WJ, Donker AJ. Renal hemodynamics during separate and combined infusion of amino acids and dopamine. *Kidney Int* 1986; 29: 870-874

ter Wee PM, van Ballegooie E, Rosman JB, Meijer S, Donker AJ. Renal reserve filtration capacity in patients with type 1 (insulin-dependent) diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 1987; 2: 504-509

Uehara M, Kishikawa H, Isami S, Kisanuki K, Ohkubo Y, Miyamura N, Miyata T, Yano T, Shichiri M. Effect on insulin sensitivity of angiotensin converting enzyme inhibitors with or without a sulphhydryl group: bradykinin may improve insulin resistance in dogs and humans. *Diabetologia* 1994; 37: 300-307

UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group. Efficacy of atenolol and captopril in reducing risk of macrovascular and microvascular complications in type 2 diabetes: UKPDS 39. UK Prospective Diabetes Study Group. *BMJ*. 1998; 317 (7160): 713-720.

Van Loon GR, Sole MJ. Plasma dopamine: source, regulation and significance. *Metabolism* 1980; 29(Suppl. 1): 1119-1123

Van Tol HHM, Bunzow JR, Guan HC, Sunahara RK, Seeman P, Niznik HB, Civelli O. Cloning of the gene for a human dopamine D₄ receptor with high affinity for the antipsychotic clozapine. *Natur* 1991; 350: 610-614

Verbeke P, Perichon M, Borot, Laloi C, Schaefferbeke J, Bakala H. Accumulation of advanced glycosylation endproducts in the rat nephron: link with circulation AGE's during aging. *J. Histochem Cytochem* 1997; 45(8): 1059-1068

Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, Burstow D, Brown L. The Streptozotocin-Diabetic Rat as a Model of the Chronic Complications of Human Diabetes. *Heart, Lung and Circulation* 2003; 12: 44-50

Wolf G, Ziyadeh FN. Molecular mechanism of diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1999; 56: 393

Zeng C, Wang D, Asico LD, Welch WJ, Wilcox CS, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Aberrant D₁ and D₃ Dopamine Receptor Transregulation in Hypertension. *Hypertension* 2004; 43: 654-660

7 ANHANG

7.1 Tabellen und Abbildungen

Von allen im Ergebnisteil beschriebenen Parametern werden hier die zugrunde liegenden Wertetabellen dargestellt. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm SEM (standard error of the mean) angegeben. In den Spalten kann der jeweilige Verlauf der in der obersten Tabellenzeile genannten Gruppe verfolgt werden. In den Zeilen können die Werte der verschiedenen Gruppen zu einem bestimmten Zeitpunkt (Spalte ganz links, Wochenangabe) miteinander verglichen werden. Die zum jeweiligen Zeitpunkt aktuelle Anzahl n der Tiere ist in Klammern angegeben.

Zur graphischen Veranschaulichung wird jede Tabelle von einer Abbildung begleitet. Die Abbildungen zeigen jeweils den zeitlichen Verlauf. Um die Abbildungen übersichtlich zu halten, wurde auf eine Darstellung der SEM-Werte verzichtet.

Die Gruppeneinteilung ist in Kapitel 2.3 aufgeführt.

7.1.1 Blutglucose

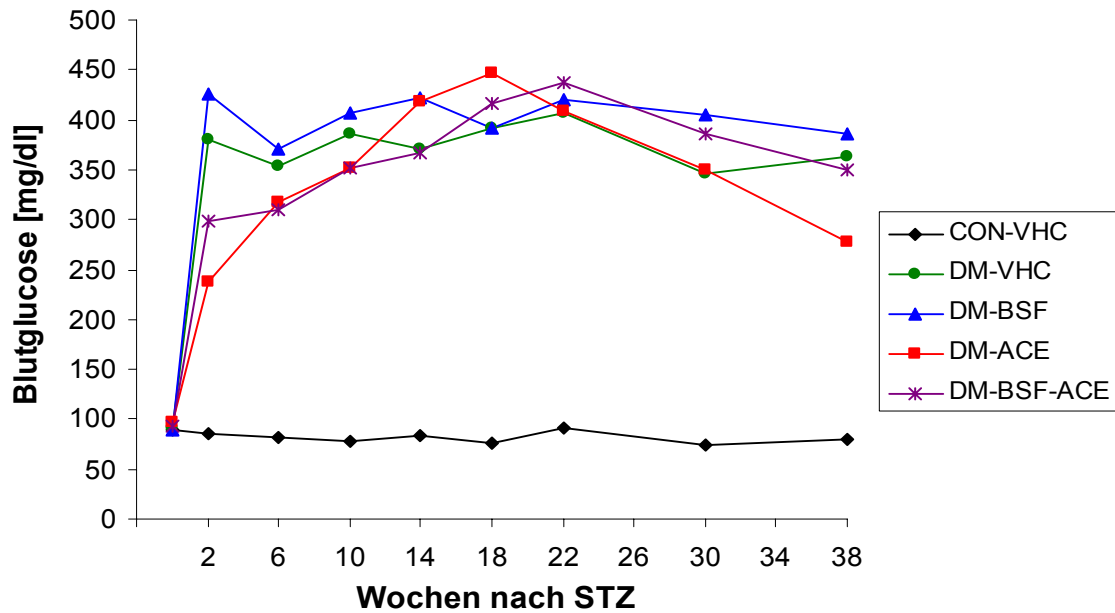


Abb. 5: Nach STZ-Applikation kam es zu einem deutlichen und signifikanten Blutglucoseanstieg in allen diabetischen Gruppen. Das Ziel die Blutglucosekonzentration durch Insulinsubstitution und STZ-Nachinjektionen über die Zeit konstant und in den verschiedenen Gruppen möglichst gleich zu halten gestaltete sich vor allem in den ACE-Gruppen schwierig.

Tab. 2: Blutglucose [mg/dl]. ∇, #, + $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	90±36 (n=8)	92±3 (n=12)	90±24 (n=12)	97±2 (n=12)	94±1 (n=12)
Woche 2	85±3 (n=8)	381±16 (n=12) ∇	425±27 (n=12) ∇	238±34 (n=12) ∇ # +	298±18 (n=12) ∇ # +
Woche 6	81±5 (n=8)	354±34 (n=12) ∇	371±15 (n=12) ∇	318±32 (n=12) ∇	309±22 (n=12) ∇
Woche 10	77±2 (n=8)	386±16 (n=12) ∇	406±27 (n=12) ∇	351±22 (n=12) ∇	351±37 (n=12) ∇
Woche 14	84±2 (n=8)	370±17 (n=12) ∇	422±25 (n=12) ∇	418±22 (n=12) ∇	367±43 (n=9) ∇
Woche 18	76±3 (n=7)	391±16 (n=11) ∇	392±27 (n=12) ∇	446±25 (n=12) ∇	417±33 (n=9) ∇
Woche 22	91±4 (n=7)	406±27 (n=11) ∇	420±15 (n=12) ∇	409±36 (n=12) ∇	438±40 (n=9) ∇
Woche 30	75±2 (n=7)	346±17 (n=11) ∇	404±17 (n=12) ∇	349±36 (n=11) ∇	386±41 (n=8) ∇
Woche 38	79±3 (n=7)	364±35 (n=10) ∇	386±19 (n=11) ∇	278±47 (n=11) ∇	350±35 (n=8) ∇

7.1.2 Körpergewicht

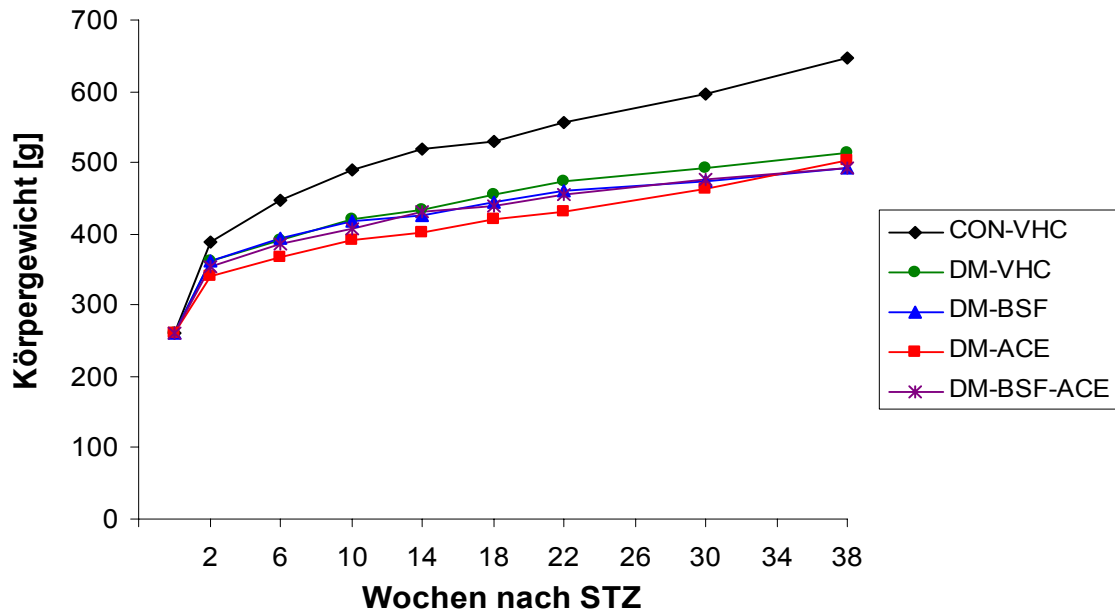


Abb. 6: Alle diabetischen Gruppen zeigten bezüglich der Gewichtszunahme einen deutlichen Rückstand gegenüber der gesunden Kontrollgruppe. Bei den ACE-Gruppen war das Gewichtsdefizit vs. CON-VHC bereits ab der 2. Woche signifikant. Bei den anderen Gruppen ab der 6. Woche.

Tab. 3: Körpergewicht [g]. ∇ $p < 0,05$ vs. CON-VHC.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	262±8 (n=8)	260±5 (n=12)	262±5 (n=12)	261±5 (n=12)	260±6 (n=12)
Woche 2	388±13 (n=8)	363±9 (n=12)	361±5 (n=12)	342±7 (n=12) ∇	353±6 (n=12) ∇
Woche 6	447±20 (n=8)	390±11 (n=12) ∇	394±7 (n=12) ∇	367±10 (n=12) ∇	387±5 (n=12) ∇
Woche 10	489±24 (n=8)	420±12 (n=12) ∇	417±8 (n=12) ∇	390±8 (n=12) ∇	407±7 (n=12) ∇
Woche 14	520±25 (n=8)	434±13 (n=12) ∇	427±8 (n=12) ∇	403±8 (n=12) ∇	432±9 (n=9) ∇
Woche 18	530±29 (n=7)	454±15 (n=11) ∇	444±8 (n=12) ∇	420±9 (n=12) ∇	438±10 (n=9) ∇
Woche 22	556±29 (n=7)	474±17 (n=11) ∇	460±12 (n=12) ∇	430±9 (n=12) ∇	455±11 (n=9) ∇
Woche 30	597±32 (n=7)	492±14 (n=11) ∇	475±11 (n=12) ∇	464±11 (n=11) ∇	477±10 (n=8) ∇
Woche 38	647±29 (n=7)	513±27 (n=10) ∇	492±9 (n=11) ∇	502±13 (n=11) ∇	492±16 (n=8) ∇

7.1.3 Urinvolumen

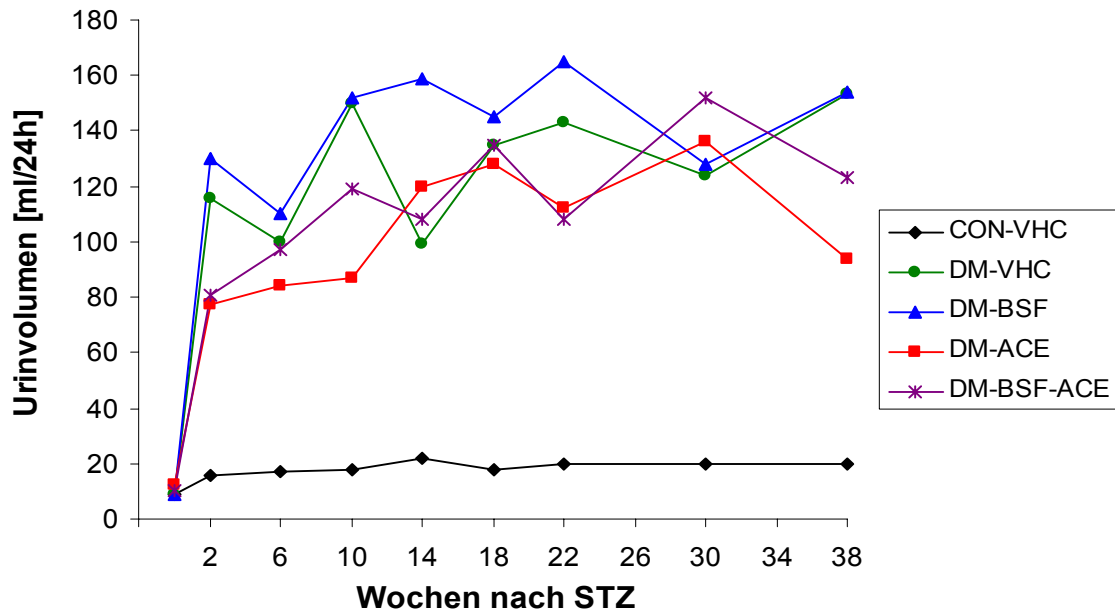


Abb. 7: Deutliche Polyurie bei diabetischer Stoffwechsellaage bei allen diabetischen Gruppen. Die Urinmengen zeigten eine Korrelation zur Blutglucosekonzentration und zur Trinkmenge.

Tab. 4: Urinvolumen [ml/24h]. ∇, #, + $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	9±1 (n=8)	9±1 (n=12)	9±1 (n=12)	12±1 (n=12)	10±1 (n=12)
Woche 2	16±2 (n=8)	116±15 (n=12) ∇	130±14 (n=12) ∇	77±14 (n=12) ∇ +	81±10 (n=12) ∇ +
Woche 6	17±1 (n=8)	100±13 (n=12) ∇	110±16 (n=12) ∇	84±14 (n=12) ∇	97±13 (n=12) ∇
Woche 10	18±1 (n=8)	150±15 (n=12) ∇	152±20 (n=12) ∇	87±11 (n=12) ∇ # +	119±20 (n=12) ∇
Woche 14	22±2 (n=8)	99±14 (n=12) ∇	159±21 (n=12) ∇ #	120±14 (n=12) ∇	108±17 (n=9) ∇
Woche 18	18±1 (n=7)	135±19 (n=11) ∇	145±22 (n=12) ∇	128±12 (n=12) ∇	135±21 (n=9) ∇
Woche 22	20±2 (n=7)	143±24 (n=11) ∇	165±21 (n=12) ∇	112±16 (n=12) ∇	108±20 (n=9) ∇
Woche 30	20±2 (n=7)	124±21 (n=11) ∇	128±20 (n=12) ∇	136±21 (n=11) ∇	152±33 (n=8) ∇
Woche 38	20±2 (n=7)	153±28 (n=10) ∇	154±23 (n=11) ∇	94±23 (n=11) ∇	123±21 (n=8) ∇

7.1.4 Trinkmenge

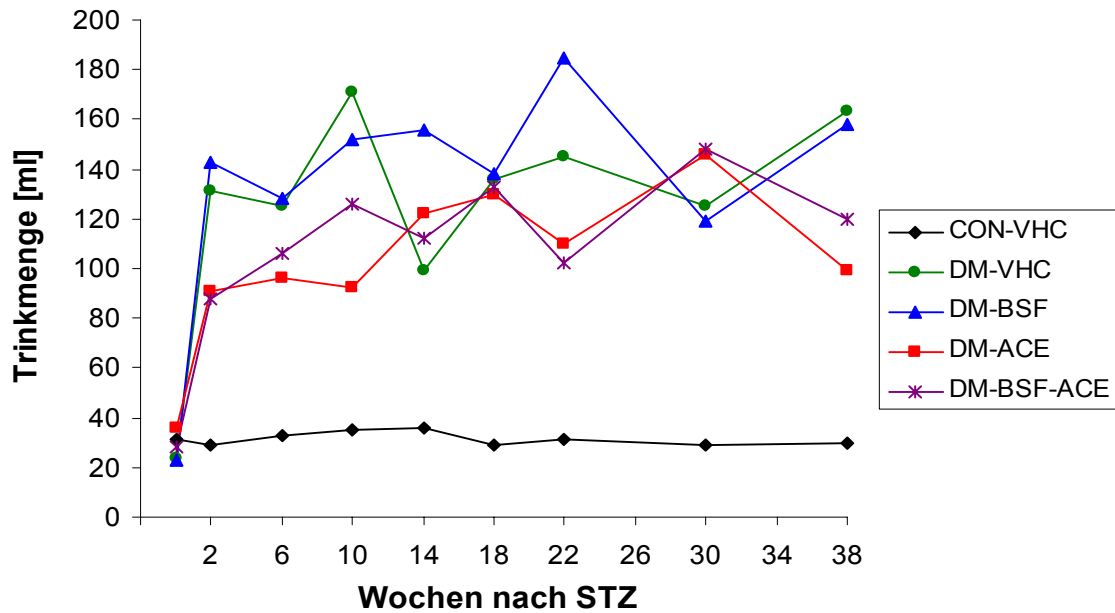


Abb. 8: Deutlich erhöhter Trinkwasserbedarf bei diabetischer Stoffwechsellaage bei allen diabetischen Gruppen. Die Kurvenverläufe sind denen der Urinvolumina annähernd parallel.

Tab. 5: Trinkmenge [ml]. ∇, #, + $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	31±4 (n=8)	24±3 (n=12)	23±4 (n=12)	^{# +} 36±3 (n=12)	28±3 (n=12)
Woche 2	29±2 (n=8)	[∇] 131±16 (n=12)	[∇] 143±17 (n=12)	^{∇ +} 91±14 (n=12)	^{∇ +} 88±12 (n=12)
Woche 6	33±2 (n=8)	[∇] 125±15 (n=12)	[∇] 128±19 (n=12)	[∇] 96±14 (n=12)	[∇] 106±13 (n=12)
Woche 10	35±2 (n=8)	[∇] 171±14 (n=12)	[∇] 152±20 (n=12)	^{# +} 92±12 (n=12)	[∇] 126±18 (n=12)
Woche 14	36±3 (n=8)	[∇] 99±21 (n=12)	[∇] 156±21 (n=12)	[∇] 122±16 (n=12)	[∇] 112±16 (n=9)
Woche 18	29±4 (n=7)	[∇] 136±22 (n=11)	[∇] 138±24 (n=12)	[∇] 130±12 (n=12)	[∇] 133±19 (n=9)
Woche 22	31±5 (n=7)	[∇] 145±26 (n=11)	[∇] 185±22 (n=12)	⁺ 110±19 (n=12)	⁺ 102±21 (n=9)
Woche 30	29±6 (n=7)	[∇] 125±24 (n=11)	[∇] 119±23 (n=12)	[∇] 146±20 (n=11)	[∇] 148±36 (n=8)
Woche 38	30±5 (n=7)	[∇] 163±29 (n=10)	[∇] 158±24 (n=11)	[∇] 99±25 (n=11)	[∇] 120±22 (n=8)

7.1.5 Futtermenge

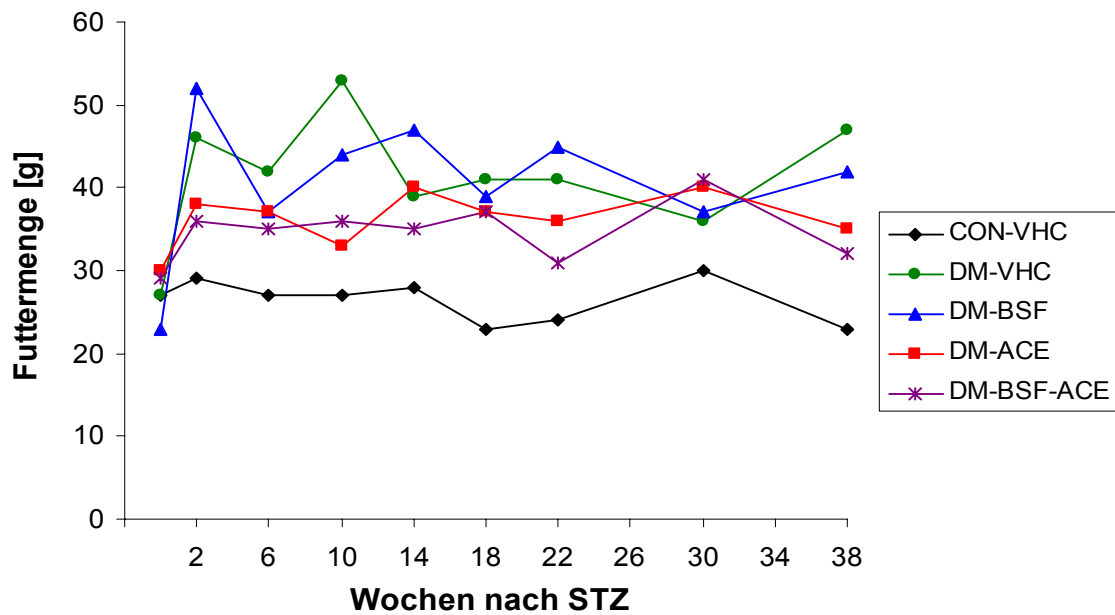


Abb. 9: Polyphagie bei allen diabetischen Gruppen. Bei den ACE-Gruppen weniger Futtermittelverbrauch als bei DM-VHC und DM-BSF. Bei der Kontrollgruppe nahezu konstante Nahrungsaufnahme.

Tab. 6: Futtermenge [g].] . ∇ , #, + $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	27±2 (n=8)	27±1 (n=12)	23±4 (n=12)	30±2 (n=12)	29±2 (n=12)
Woche 2	29±1 (n=8)	46±3 (n=12) ∇	52±3 (n=12) ∇	38±2 (n=12) +	36±2 (n=12) # +
Woche 6	27±1 (n=8)	42±3 (n=12) ∇	37±4 (n=12)	37±2 (n=12)	35±2 (n=12)
Woche 10	27±1 (n=8)	53±4 (n=12) ∇	44±3 (n=12) ∇	33±3 (n=12) # +	36±3 (n=12) #
Woche 14	28±1 (n=8)	39±3 (n=12) ∇	47±3 (n=12) ∇	40±3 (n=12) ∇	35±2 (n=9) +
Woche 18	23±3 (n=7)	41±4 (n=11) ∇	39±5 (n=12) ∇	37±3 (n=12)	37±3 (n=9)
Woche 22	24±1 (n=7)	41±5 (n=11) ∇	45±4 (n=12) ∇	36±4 (n=12)	31±3 (n=9)
Woche 30	30±2 (n=7)	36±4 (n=11)	37±4 (n=12)	40±3 (n=11)	41±6 (n=8)
Woche 38	23±3 (n=7)	47±5 (n=10) ∇	42±3 (n=11) ∇	35±4 (n=11)	32±3 (n=8) #

7.1.6 Natriumausscheidung

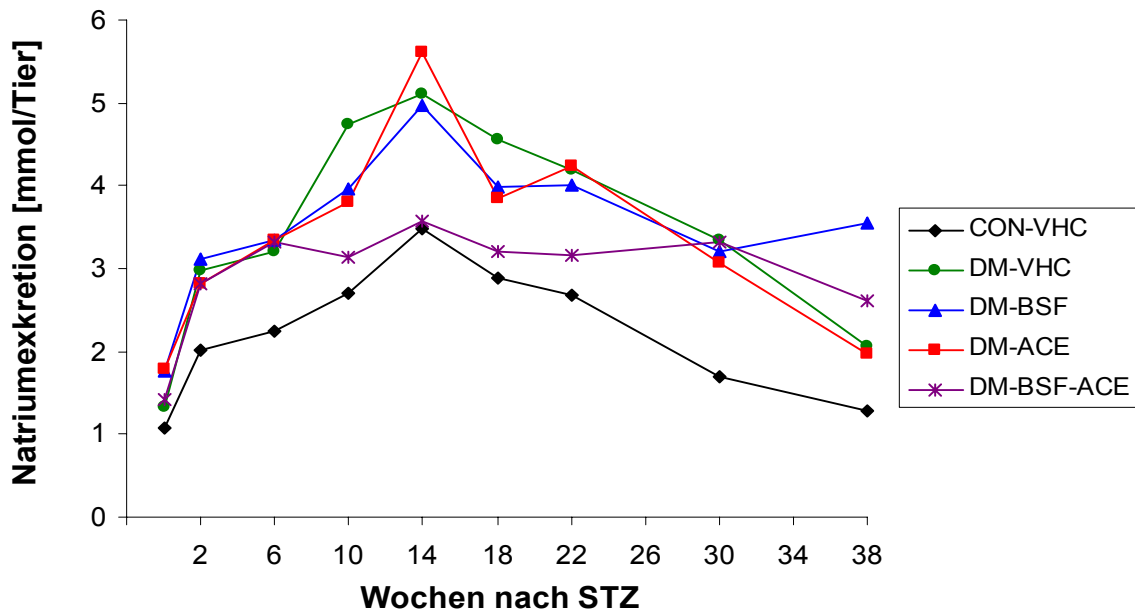


Abb. 10: Bei diabetischer Stoffwechsellaage wurde deutlich mehr Natrium renal ausgeschieden. Unter den diabetischen Gruppen wurde von DM-BSF-ACE am wenigsten Natrium ausgeschieden. Auffallend war ein Maximum bei allen Gruppen in der 14. Woche.

Tab. 7: Natriumausscheidung [mmol/24h/Tier]. ∇ , #, +, \blacktriangle $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF, DM-ACE.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	1.08±0.20 (n=8)	1.32±0.08 (n=12)	1.76±0.12 (n=12)	1.79±0.18 (n=12)	1.41±0.14 (n=12)
Woche 2	2.02±0.10 (n=8)	2.97±0.19 (n=12)	3.11±0.26 (n=12)	2.82±0.24 (n=12)	2.82±0.18 (n=12)
Woche 6	2.24±0.12 (n=8)	3.20±0.19 (n=12)	3.34±0.23 (n=12)	3.35±0.27 (n=12)	3.32±0.20 (n=12)
Woche 10	2.71±0.15 (n=8)	4.74±0.32 (n=12)	3.96±0.22 (n=12)	3.80±0.27 (n=12)	3.13±0.21 (n=12)
Woche 14	3.49±0.28 (n=8)	5.11±0.45 (n=12)	4.96±0.34 (n=12)	5.60±0.32 (n=12)	3.58±0.25 (n=9)
Woche 18	2.88±0.22 (n=7)	4.55±0.30 (n=11)	3.98±0.20 (n=12)	3.84±0.28 (n=12)	3.21±0.27 (n=9)
Woche 22	2.67±0.24 (n=7)	4.18±0.37 (n=11)	4.01±0.25 (n=12)	4.24±0.25 (n=12)	3.15±0.37 (n=9)
Woche 30	1.69±0.25 (n=7)	3.34±0.29 (n=11)	3.21±0.16 (n=12)	3.08±0.37 (n=11)	3.32±0.35 (n=8)
Woche 38	1.29±0.16 (n=7)	2.07±0.24 (n=10)	3.54±0.24 (n=11)	1.97±0.23 (n=11)	2.64±0.37 (n=8)

7.1.7 Kaliumausscheidung

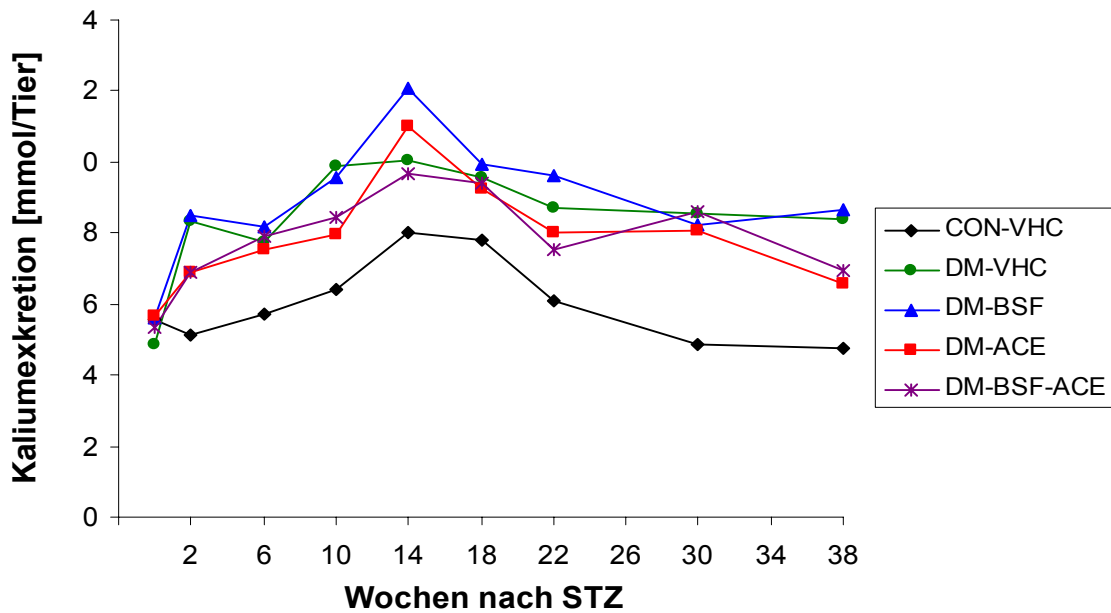


Abb. 11: Deutlich erhöhte Kaliumausscheidung bei diabetischer Stoffwechsellage. Wie bei der Natriumausscheidung zeigt sich auch hier ein Maximum in der 14. Woche.

Tab. 8: Kaliumausscheidung [mmol/24h/Tier]. ∇, #, + $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	5.58±0.30 (n=8)	4.88±0.22 (n=12)	5.60±0.28 (n=12)	5.66±0.35 (n=12)	5.36±0.11 (n=12)
Woche 2	5.15±0.16 (n=8)	8.32±0.44 (n=12) [∇]	8.47±0.44 (n=12) [∇]	6.90±0.30 (n=12) ^{∇ # +}	6.88±0.36 (n=12) ^{∇ # +}
Woche 6	5.72±0.30 (n=8)	7.75±0.43 (n=12) [∇]	8.16±0.52 (n=12) [∇]	7.56±0.47 (n=12) [∇]	7.89±0.39 (n=12) [∇]
Woche 10	6.42±0.29 (n=8)	9.91±0.52 (n=12) [∇]	9.54±0.56 (n=12) [∇]	7.98±0.54 (n=12) [#]	8.45±0.62 (n=12)
Woche 14	8.00±0.51 (n=8)	10.02±0.85 (n=12) [∇]	12.07±0.71 (n=12) [∇]	11.02±0.59 (n=12) [∇]	9.66±0.58 (n=9)
Woche 18	7.78±0.41 (n=7)	9.55±0.61 (n=11)	9.94±0.70 (n=12)	9.27±0.57 (n=12)	9.42±0.65 (n=9)
Woche 22	6.11±0.26 (n=7)	8.73±0.62 (n=11) [∇]	9.63±0.58 (n=12) [∇]	7.99±0.52 (n=12)	7.56±0.49 (n=9) ⁺
Woche 30	4.86±0.33 (n=7)	8.53±0.66 (n=11) [∇]	8.24±0.55 (n=12) [∇]	8.08±0.61 (n=11) [∇]	8.62±0.90 (n=8) [∇]
Woche 38	4.77±0.29 (n=7)	8.37±0.65 (n=10) [∇]	8.65±0.50 (n=11) [∇]	6.58±0.63 (n=11) ⁺	6.93±0.57 (n=8)

7.1.8 Chloridausscheidung

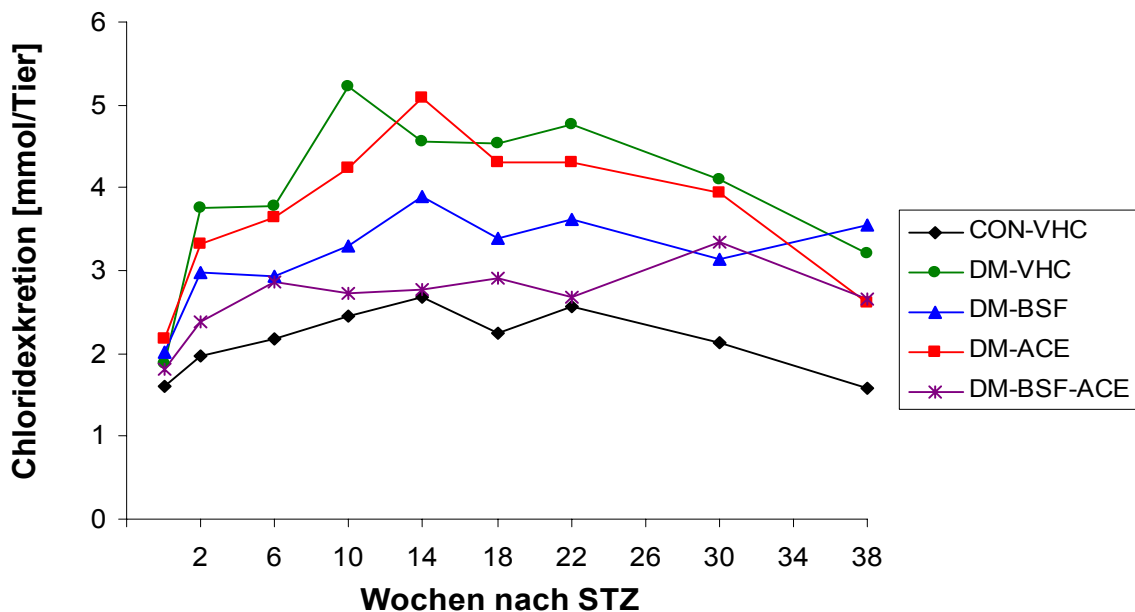


Abb. 12: Erhöhte Chloridausscheidung in den diabetischen Gruppen. Die Gruppen die BSF erhielten, schieden meist signifikant weniger Chlorid renal aus als die anderen diabetischen Gruppen. Die DM-BSF-ACE-Tiere schieden gegenüber der Kontrollgruppe statistisch zu keinem Zeitpunkt mehr Chlorid aus.

Tab. 9: Chloridausscheidung [mmol/24h/Tier]. ∇ , #, +, \blacktriangle $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF, DM-ACE.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	1.61±0.11 (n=8)	1.88±0.06 (n=12)	2.02±0.10 (n=12) ∇	2.18±0.13 (n=12) ∇	1.82±0.09 (n=12) \blacktriangle
Woche 2	1.96±0.10 (n=8)	3.76±0.20 (n=12) ∇	2.97±0.24 (n=12) ∇ #	3.32±0.25 (n=12) ∇	2.39±0.17 (n=12) # \blacktriangle
Woche 6	2.17±0.14 (n=8)	3.79±0.22 (n=12) ∇	2.92±0.22 (n=12) #	3.65±0.25 (n=12) ∇ +	2.87±0.18 (n=12) # \blacktriangle
Woche 10	2.45±0.21 (n=8)	5.22±0.33 (n=12) ∇	3.29±0.22 (n=12) #	4.23±0.32 (n=12) ∇ # +	2.72±0.22 (n=12) # \blacktriangle
Woche 14	2.67±0.23 (n=8)	4.55±0.33 (n=12) ∇	3.89±0.20 (n=12) ∇	5.08±0.26 (n=12) ∇ +	2.77±0.20 (n=9) # + \blacktriangle
Woche 18	2.25±0.15 (n=7)	4.53±0.31 (n=11) ∇	3.40±0.20 (n=12) ∇ #	4.30±0.29 (n=12) ∇ +	2.91±0.30 (n=9) # \blacktriangle
Woche 22	2.56±0.22 (n=7)	4.77±0.41 (n=11) ∇	3.62±0.22 (n=12) #	4.31±0.32 (n=12) ∇	2.68±0.27 (n=9) # \blacktriangle
Woche 30	2.13±0.20 (n=7)	4.09±0.35 (n=11) ∇	3.14±0.23 (n=12) ∇	3.94±0.42 (n=11) ∇	3.35±0.41 (n=8)
Woche 38	1.59±0.10 (n=7)	3.20±0.32 (n=10) ∇	3.54±0.25 (n=11) ∇	2.61±0.28 (n=11) +	2.66±0.35 (n=8)

7.1.9 Urinosmolalität

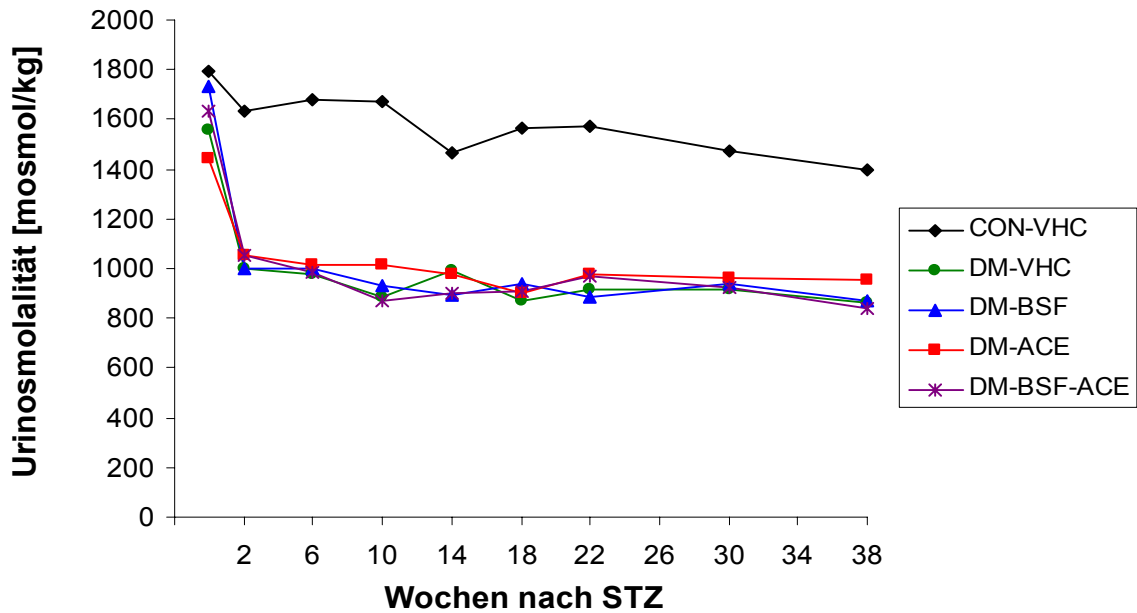


Abb. 13: Gleichmäßiger Abfall der Urinosmolalität in allen diabetischen Gruppen. Über die gesamte Zeit lagen alle diabetischen Gruppen signifikant unter der Kontrollgruppe. Im Verlauf kam es auch bei der Kontrollgruppe zu einem leichten Abfall der Urinosmolalität.

Tab. 10: Urinosmolalität [mosmol/kg]. ∇ $p < 0,05$ vs. CON-VHC

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	1795±56 (n=8)	1559±155 (n=12)	1733±85 (n=12)	1444±69 (n=12)	1633±101 (n=12)
Woche 2	1634±89 (n=8)	1001±43 (n=12) ∇	998±47 (n=12) ∇	1050±99 (n=12) ∇	1052±58 (n=12) ∇
Woche 6	1680±86 (n=8)	976±50 (n=12) ∇	998±39 (n=12) ∇	1012±49 (n=12) ∇	985±55 (n=12) ∇
Woche 10	1669±102 (n=8)	887±24 (n=12) ∇	931±48 (n=12) ∇	1013±40 (n=12) ∇	874±42 (n=12) ∇
Woche 14	1462±93 (n=8)	992±65 (n=12) ∇	896±45 (n=12) ∇	980±47 (n=12) ∇	897±44 (n=9) ∇
Woche 18	1565±100 (n=7)	870±93 (n=11) ∇	941±70 (n=12) ∇	898±35 (n=12) ∇	906±43 (n=9) ∇
Woche 22	1576±143 (n=7)	918±53 (n=11) ∇	886±38 (n=12) ∇	978±50 (n=12) ∇	968±65 (n=9) ∇
Woche 30	1471±158 (n=7)	915±52 (n=11) ∇	938±57 (n=12) ∇	962±94 (n=11) ∇	920±86 (n=8) ∇
Woche 38	1396±99 (n=7)	862±66 (n=10) ∇	874±61 (n=11) ∇	956±64 (n=11) ∇	841±89 (n=8) ∇

7.1.10 Glucoseausscheidung

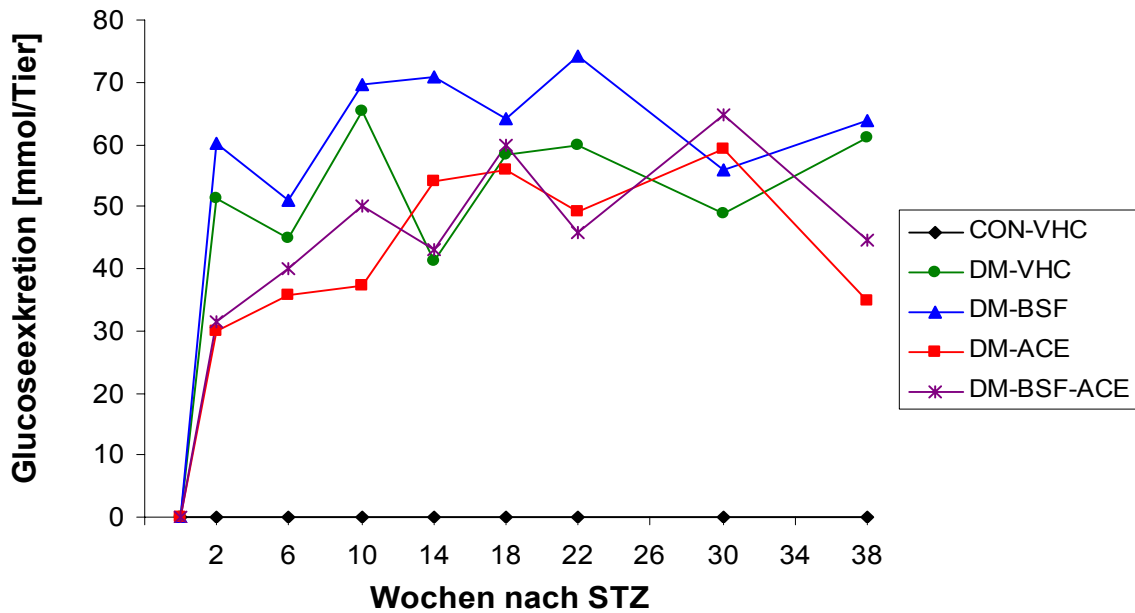


Abb. 14: Praktisch keine renale Glucoseausscheidung bei Normoglykämie. In allen diabetischen Gruppen ausgeprägte und signifikante Glucosurie gegenüber der Kontrollgruppe.

Tab. 11: Glucoseausscheidung [mmol/Tier]. ∇, #, + $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	0.04±0.01 (n=8)	0.05±0.01 (n=12)	0.04±0.00 (n=12)	0.05±0.00 (n=12)	0.05±0.00 (n=12)
Woche 2	0.04±0.01 (n=8)	∇ 51.3±6.8 (n=12)	∇ 60.2±6.7 (n=12)	∇ 30.0±7.6 (n=12)	31.6±4.5 (n=12)
Woche 6	0.06±0.01 (n=8)	∇ 44.8±6.8 (n=12)	∇ 50.9±7.5 (n=12)	∇ 35.8± 7.8 (n=12)	∇ 39.9±6.7 (n=12)
Woche 10	0.05±0.01 (n=8)	∇ 65.3±6.0 (n=12)	∇ 69.7±8.3 (n=12)	∇ # + 37.1±6.2 (n=12)	∇ 50.2±9.3 (n=12)
Woche 14	0.06±0.01 (n=8)	∇ 41.3±6.4 (n=12)	∇ # 70.8±9.6 (n=12)	∇ 54.0±6.7 (n=12)	∇ + 43.0±6.9 (n=9)
Woche 18	0.05±0.01 (n=7)	∇ 58.2±7.8 (n=11)	∇ 64.2±8.9 (n=12)	∇ 55.9±5.3 (n=12)	∇ 59.7±7.6 (n=9)
Woche 22	0.06±0.01 (n=7)	∇ 59.8±10.2 (n=11)	∇ 74.3±9.9 (n=12)	∇ 49.2±7.8 (n=12)	∇ 45.9±8.7 (n=9)
Woche 30	0.08±0.01 (n=7)	∇ 48.9± 7.7 (n=11)	∇ 56.0±8.2 (n=12)	∇ 59.3±10.2 (n=11)	∇ 64.8±12.8 (n=8)
Woche 38	0.05±0.01 (n=7)	∇ 61.0±12.1 (n=10)	∇ 63.7±9.1 (n=11)	∇ 34.9±10.7 (n=11)	∇ 44.5±9.12(n=8)

7.1.11 Kreatinin-Clearance

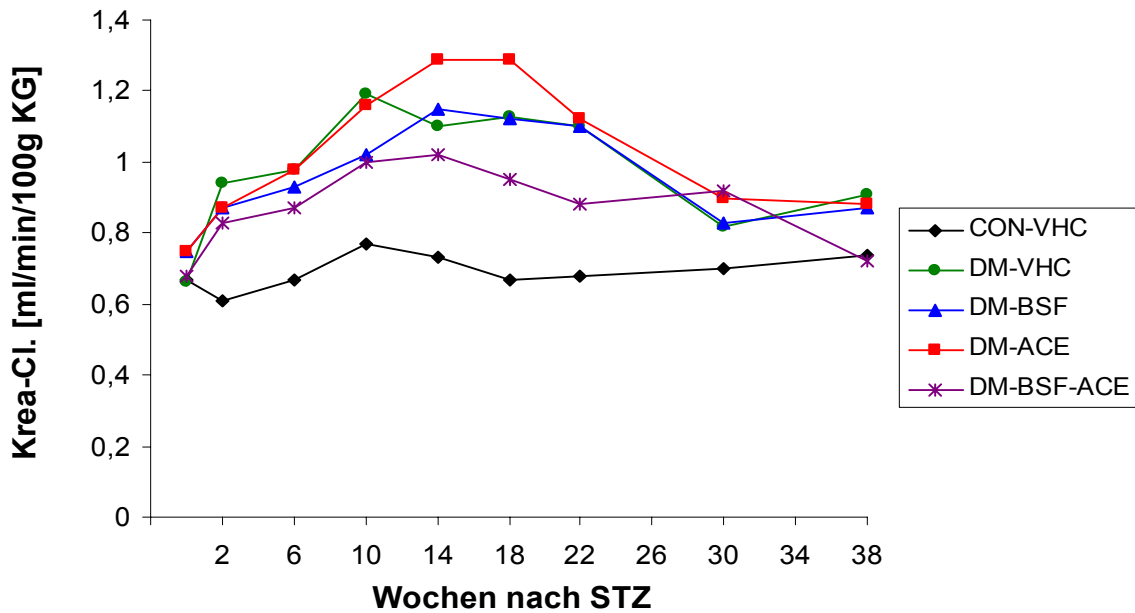


Abb. 15: Signifikanter Anstieg der Kreatinin-Clearance bei allen diabetischen Gruppen. Nach Maximalwerten während der 10. bis 18. Woche war die Kreatinin-Clearance wieder rückläufig. Dieser Verlauf ist im Sinne einer glomerulären Hyperfiltration mit anschließender, beginnender Niereninsuffizienz zu interpretieren.

Tab. 12: Kreatinin-Clearance [ml/min/100g KG]. ∇, #, +, ▲ $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF, DM-ACE.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	0.67±0.03 (n=8)	0.66±0.02 (n=12)	0.75±0.04 (n=12)	0.75±0.04 (n=12)	0.68±0.02 (n=12)
Woche 2	0.61±0.01 (n=8)	0.94±0.02 (n=12)	0.87±0.03 (n=12)	0.87±0.06 (n=12)	0.83±0.03 (n=12)
Woche 6	0.67±0.02 (n=8)	0.98±0.03 (n=12)	0.93±0.04 (n=12)	0.98±0.05 (n=12)	0.87±0.04 (n=12)
Woche 10	0.77±0.02 (n=8)	1.19±0.06 (n=12)	1.02±0.02 (n=12)	1.16±0.07 (n=12)	1.00±0.06 (n=12)
Woche 14	0.73±0.03 (n=8)	1.10±0.07 (n=12)	1.15±0.04 (n=12)	1.29±0.06 (n=12)	1.02±0.04 (n=9)
Woche 18	0.67±0.01 (n=7)	1.13±0.08 (n=11)	1.12±0.07 (n=12)	1.29±0.07 (n=12)	0.95±0.04 (n=9)
Woche 22	0.68±0.02 (n=7)	1.10±0.07 (n=11)	1.10±0.05 (n=12)	1.12±0.06 (n=12)	0.88±0.06 (n=9)
Woche 30	0.70±0.04 (n=7)	0.82±0.06 (n=11)	0.83±0.03 (n=12)	0.90±0.04 (n=11)	0.92±0.04 (n=8)
Woche 38	0.74±0.06 (n=7)	0.91±0.09 (n=10)	0.87±0.06 (n=11)	0.88±0.12 (n=11)	0.72±0.13 (n=8)

7.1.12 Albuminurie

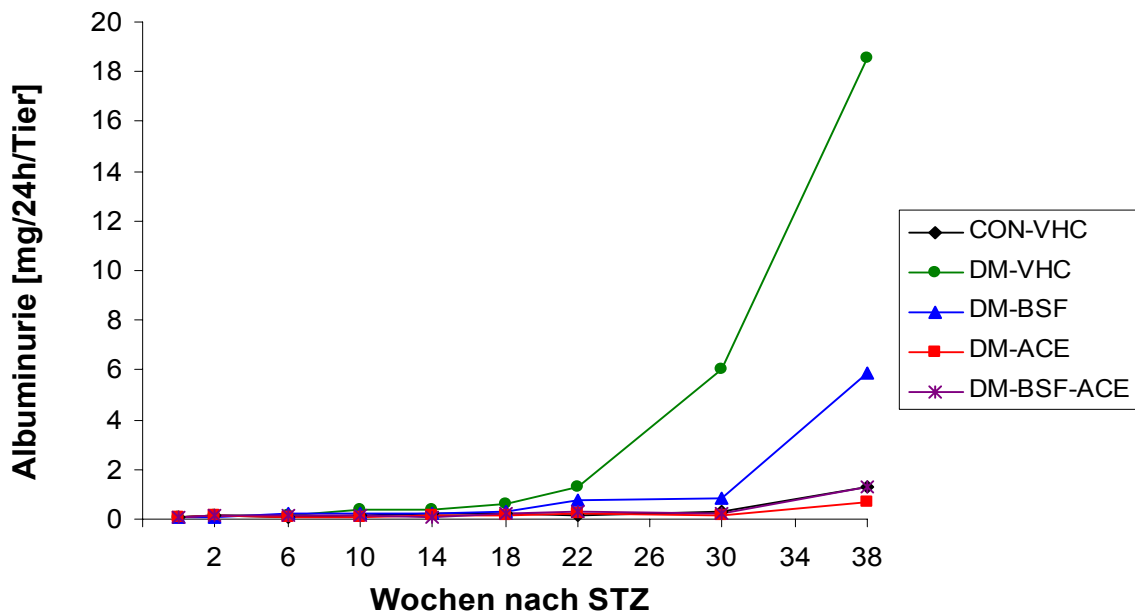


Abb. 16: Eine Albuminurie als Zeichen einer glomerulären Schädigung manifestierte sich ab der 30. Woche bei DM-VHC und ab der 38. Woche auch bei DM-BSF. Bei einer sehr starken Streuung in diesen Gruppen wurde jedoch das Signifikanzniveau vs. CON-VHC nicht erreicht.

Tab. 13: Albuminurie [mg/24h/Tier]. # $p < 0,05$ vs. DM-VHC.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	0.09±0.02 (n=8)	0.11±0.04 (n=12)	0.09±0.03 (n=12)	0.07±0.01 (n=12)	0.07±0.02 (n=12)
Woche 2	0.17±0.05 (n=8)	0.18±0.02 (n=12)	0.10±0.03 (n=12)	0.13±0.02 (n=12)	0.15±0.02 (n=12)
Woche 6	0.08±0.02 (n=8)	0.18±0.08 (n=12)	0.20±0.07 (n=12)	0.07±0.01 (n=12)	0.19±0.06 (n=12)
Woche 10	0.15±0.02 (n=8)	0.38±0.14 (n=12)	0.25±0.04 (n=12)	# 0.11±0.01 (n=12)	# 0.12±0.01 (n=12)
Woche 14	0.22±0.03 (n=8)	0.39±0.22 (n=12)	0.26±0.07 (n=12)	0.12±0.03 (n=12)	0.11±0.01 (n=9)
Woche 18	0.22±0.05 (n=7)	0.63±0.30 (n=11)	0.28±0.04 (n=12)	0.18±0.02 (n=12)	0.25±0.04 (n=9)
Woche 22	0.16±0.03 (n=7)	1.26±0.72 (n=11)	0.73±0.25 (n=12)	0.21±0.06 (n=12)	0.28±0.10 (n=9)
Woche 30	0.30±0.08 (n=7)	6.03±4.37 (n=11)	0.87±0.29 (n=12)	0.15±0.03 (n=11)	0.24±0.06 (n=8)
Woche 38	1.27±0.43 (n=7)	18.52±14.7 (n=10)	5.87±2.48 (n=11)	0.66±0.13 (n=11)	1.29±0.45 (n=8)

7.1.13 Proteinurie

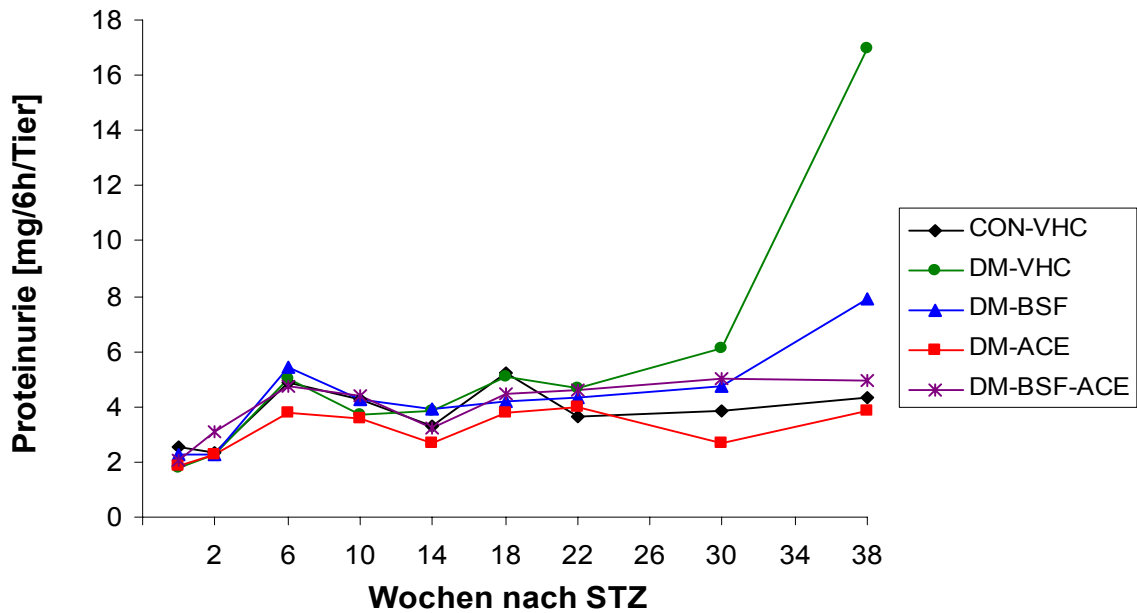


Abb. 17: Eine eindeutige Proteinurie zeigte sich erst in der 38. Woche bei DM-VHC und DM-BSF, wobei nur von DM-VHC das Signifikanzniveau vs. CON-VHC erreicht wurde.

Tab. 14: Proteinurie [mg/6h/Tier]. ∇, #, +, ▲ $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF, DM-ACE.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	2.56±0.31 (n=8)	1.81±0.30 (n=12) ∇	2.30±0.17 (n=12) #	1.88±0.08 (n=12) ∇ +	2.06±0.40 (n=12) ∇
Woche 2	2.35±0.20 (n=8)	2.27±0.24 (n=12)	2.29±0.20 (n=12)	2.29±0.17 (n=12)	3.07±0.45 (n=12) ∇ # + ▲
Woche 6	4.86±0.46 (n=8)	5.01±0.56 (n=12)	5.40±0.34 (n=12)	3.76±0.49 (n=12) ∇ # +	4.77±0.49 (n=12) + ▲
Woche 10	4.24±0.44 (n=8)	3.74±0.48 (n=12) ∇	4.24±0.39 (n=12) #	3.54±0.33 (n=12) ∇ +	4.39±0.43 (n=12) # ▲
Woche 14	3.33±0.72 (n=8)	3.84±0.47 (n=12)	3.93±0.26 (n=12) ∇	2.68±0.26 (n=12) ∇ # +	3.24±0.46 (n=9) # + ▲
Woche 18	5.21±0.43 (n=7)	5.08±0.67 (n=11)	4.22±0.49 (n=12) ∇ #	3.81±0.39 (n=12) ∇ #	4.45±0.68 (n=9) ∇ # ▲
Woche 22	3.62±0.87 (n=7)	4.66±1.04 (n=11) ∇	4.36±0.38 (n=12)	3.99±0.30 (n=12) #	4.61±0.36 (n=9) ∇
Woche 30	3.85±0.44 (n=7)	6.13±1.91 (n=11) ∇	4.76±0.79 (n=12) #	2.67±0.45 (n=11) # +	5.00±0.56 (n=8) # ▲
Woche 38	4.30±0.88 (n=7)	16.97±10.6 (n=10) ∇	7.88±1.53 (n=11) #	3.82±0.32 (n=11) #	4.94±1.13 (n=8) #

7.1.14 Systolischer Blutdruck

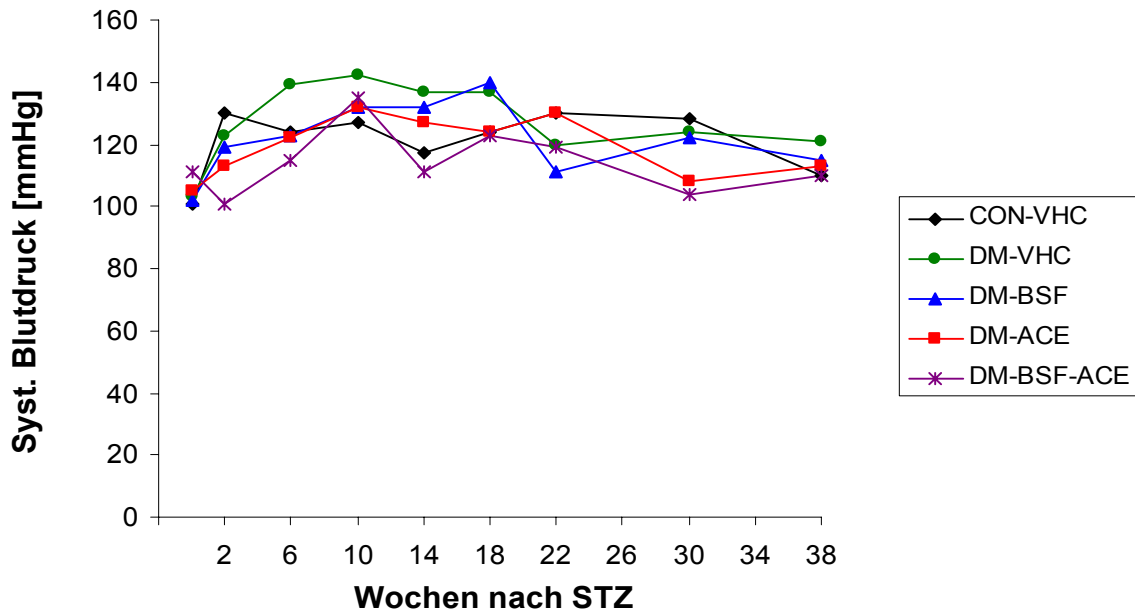


Abb. 18: Leichter Blutdruckanstieg bis zur 10. Woche in allen Gruppen, dann bis zur 38. Woche wieder leichter Abfall. Insgesamt kristallisierten sich keine unterschiedlichen Tendenzen im Gruppenvergleich heraus.

Tab. 15: Systolischer Blutdruck [mmHg]. ∇ , #, + \blacktriangle $p < 0,05$ vs. CON-VHC, DM-VHC, DM-BSF, DM-ACE.

	CON-VHC	DM-VHC	DM-BSF	DM-ACE	DM-BSF-ACE
Woche 0	101±4 (n=8)	103±4 (n=12)	102±3 (n=12)	105±2 (n=12)	111±4 (n=12) ∇ # + \blacktriangle
Woche 2	130±6 (n=8)	123±5 (n=12) ∇	119±4 (n=12) ∇	113±5 (n=12) ∇ # +	101±5 (n=12) ∇ # + \blacktriangle
Woche 6	124±6 (n=8)	139±4 (n=12) ∇	123±6 (n=12) #	122±5 (n=12) #	115±4 (n=12) ∇ # + \blacktriangle
Woche 10	127±7 (n=8)	142±8 (n=12) ∇	132±6 (n=12) #	132±6 (n=12) #	135±7 (n=12) #
Woche 14	117±7 (n=8)	137±7 (n=12) ∇	132±4 (n=12) ∇	127±5 (n=12) ∇ #	111±6 (n=9) # + \blacktriangle
Woche 18	124±5 (n=7)	137±5 (n=11) ∇	140±4 (n=12) ∇	124±5 (n=12) # +	123±6 (n=9) # +
Woche 22	130±9 (n=7)	120±5 (n=11) ∇	111±4 (n=12) ∇ #	130±8 (n=12) # +	119±8 (n=9) ∇ + \blacktriangle
Woche 30	128±4 (n=7)	124±4 (n=11)	122±6 (n=12) ∇	108±5 (n=11) ∇ # +	104±4 (n=8) ∇ # +
Woche 38	110±5 (n=7)	121±6 (n=10) ∇	115±5 (n=11) #	113±6 (n=11) #	110±4 (n=8) #

7.2 Danksagung

Für die Möglichkeit, am Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen zu promovieren, gebührt der Dank dem Institutsdirektor Herrn Prof. Dr. H. Osswald.

Mein großer Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. G. Luippold, der mir trotz einer Phase des Unmutes, unvoreingenommen seine Unterstützung zukommen ließ. Es war stets möglich seine Zeit in Anspruch zu nehmen, was sicherlich keine Selbstverständlichkeit ist. Durch seine Fach- und Sozialkompetenz war er mir ein echter Doktorvater.

Bei Frau Dr. S. Schneider bedanke ich mich für die Betreuung und Einweisung in meine gesamten experimentellen Tätigkeitsbereiche und für die Überlassung der Daten aus 3 Stoffwechselkäfigversuchen.

Für die Mithilfe bei einigen Messungen möchte ich mich bei Frau C. Piesch stellvertretend für die beteiligten MTAs bedanken.

Ein Dankeschön gilt auch den Tierpflegern, die sieben Tage in der Woche die Ratten versorgten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Heiko Richter und Holger Langhans, die mir bei Schwierigkeiten mit Microsoft Word als Ansprechpartner zur Seite standen.

7.3 Lebenslauf

André Martin Kuohn

1978	geboren in Tübingen, 1 Kind (1999)
1984-1988	Grundschule Neustetten
1988-1997	Eugen-Bolz-Gymnasium, Rottenburg am Neckar Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
1997-1998	Grundwehrdienst Musiksoldat im Luftwaffenmusikkorps 2, Karlsruhe
1998	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
2000	Ärztliche Vorprüfung
2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
25.11.2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung