

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der U-  
niversität Tübingen

Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

Die Hemmung der Dopaminsynthese verhindert die  
glomeruläre Hyperfiltration bei diabetischen Ratten

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrads  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard Karls Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
Karin Helen Pfeil

aus  
Reutlingen

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Luippold

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Brehm

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Gegenstand der Arbeit .....	1
1.2	Allgemeine Grundlagen.....	1
1.2.1	Die Niere: Nephron, Glomerulum, Glomeruläre Filtrationsrate.....	1
1.2.2	Diabetes mellitus.....	3
1.2.3	Zeitverlauf der diabetischen Nephropathie .....	5
1.2.4	Arterielle Hypertonie .....	7
1.3	Bisheriger Kenntnisstand .....	8
1.3.1	Struktur und Stoffwechsel des Dopamins .....	8
1.3.2	Wirkungen von Dopamin im Organismus.....	9
1.3.3	Dopaminrezeptoren .....	11
1.3.4	Dopamin D <sub>3</sub> -Rezeptor .....	13
1.3.4.1	Dopamin D <sub>3</sub> -Rezeptor und diabetische Hyperfiltration.....	14
1.3.4.2	Dopamin D <sub>3</sub> -Rezeptor und arterielle Hypertonie .....	15
1.4	Eigene Fragestellung .....	17
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
2.1	Versuchstiere .....	18
2.1.1	Haltungsbedingungen .....	18
2.1.2	Induktion des Diabetes mellitus .....	18
2.2	Versuchsgruppen .....	19
2.3	Versuchsdurchführung .....	21
2.3.1	Stoffwechselkäfigversuche mit wachen Ratten .....	21
2.3.1.1	Stoffwechselkäfige .....	21
2.3.1.2	Ablauf der Stoffwechselkäfigversuche .....	21
2.3.1.3	Probengewinnung und -behandlung .....	22
2.3.2	Schwanzdruckmessung an Ratten.....	22
2.3.3	Clearanceversuche an narkotisierten Ratten .....	23

2.3.3.1	Narkose .....	23
2.3.3.2	Präparation .....	23
2.3.3.3	Infusion .....	25
2.3.4	Ablauf der Experimente .....	25
2.3.4.1	Probenentnahme .....	26
2.3.4.2	Nierenentnahme .....	26
2.3.4.3	Probenbehandlung .....	27
2.4	Analytik .....	27
2.4.1	Analysierte Parameter .....	27
2.4.2	Bestimmung des Hämatokrits .....	28
2.4.3	Bestimmung der Urinvolumina .....	29
2.4.4	Bestimmung des Blutdruckes und der Herzfrequenz .....	29
2.4.5	Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen in Urin und Plasma .	29
2.4.6	Bestimmung der [ <sup>3</sup> H]-Inulin Konzentration in Urin und Plasma...	30
2.4.7	Bestimmung der Dopaminkonzentration in den Nieren.....	30
2.5	Berechnungen.....	32
2.5.1	Mittlerer arterieller Blutdruck .....	32
2.5.2	Urinzeitvolumen .....	32
2.5.3	Glomeruläre Filtrationsrate .....	32
2.5.4	Absolute renale Ausscheidung von Natrium und Kalium .....	33
2.5.5	Fraktionelle renale Natriumausscheidung.....	33
2.6	Statistik .....	33
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Dopamingehalt in der Niere .....	35
3.2	Untersuchungen an einem normotensiven Rattenmodell.....	36
3.2.1	Stoffwechselfäßigversuche bei wachen SD-Ratten.....	36
3.2.1.1	Tiergewicht .....	38
3.2.1.2	Blutglukose .....	38
3.2.1.3	Futteraufnahme und Trinkvolumen .....	39
3.2.1.4	Urinvolumina.....	39
3.2.1.5	Renale Natrium- und Kaliumausscheidung.....	40
3.2.2	Clearanceversuche an narkotisierten SD-Ratten .....	41

3.2.2.1	Mittlerer arterieller Blutdruck .....	43
3.2.2.2	Herzfrequenz .....	43
3.2.2.3	Hämatokrit .....	44
3.2.2.4	Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma .....	44
3.2.2.5	Urinvolumen.....	44
3.2.2.6	Renale Natrium- und Kaliumausscheidung.....	45
3.2.2.7	Fraktionelle renale Natriumausscheidung.....	46
3.2.2.8	Glomeruläre Filtrationsrate .....	47
3.3	Untersuchungen an einem hypertensiven Rattenmodell.....	48
3.3.1	Stoffwechselfähigkeitsversuche bei wachen SHR- und WKY-Ratten .	48
3.3.1.1	Tiergewicht .....	50
3.3.1.2	Blutglukose .....	50
3.3.1.3	Futtermittelaufnahme und Trinkvolumen .....	51
3.3.1.4	Urinvolumina.....	51
3.3.1.5	Renale Natrium- und Kaliumausscheidung.....	52
3.3.1.6	Systolischer Blutdruck .....	54
3.3.2	Clearanceversuche an narkotisierten SHR- und WKY- Ratten ...	54
3.3.2.1	Mittlerer arterieller Blutdruck .....	57
3.3.2.2	Herzfrequenz .....	58
3.3.2.3	Hämatokrit .....	58
3.3.2.4	Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma .....	58
3.3.2.5	Urinvolumen.....	59
3.3.2.6	Renale Natrium- und Kaliumausscheidung.....	60
3.3.2.7	Fraktionelle renale Natriumausscheidung.....	60
3.3.2.8	Glomeruläre Filtrationsrate .....	61
4.	<b>Diskussion .....</b>	<b>63</b>
4.1	Methodendiskussion .....	63
4.1.1	Modell des Diabetes mellitus .....	63
4.1.2	Benserazidbehandlung .....	64
4.1.3	Modell der spontan hypertensiven Ratten (SHR).....	66
4.2	Benserazid und Nierenfunktion in einem diabetischen normotensiven Rattenmodell.....	68

4.2.1	Basalbedingungen .....	68
4.2.2	Pharmakologische Stimulation von D <sub>3</sub> -Rezeptoren .....	75
4.3	Benserazid und Nierenfunktion in einem diabetischen hypertensiven Rattenmodell.....	77
4.3.1	Basalbedingungen .....	77
4.3.2	Pharmakologische Stimulation von D <sub>3</sub> -Rezeptoren .....	80
4.4	Klinische Implikation.....	82
5.	Zusammenfassung.....	84
6.	Literaturverzeichnis .....	86
7.	Anhang.....	95

# **1. Einleitung**

## **1.1 Gegenstand der Arbeit**

Frühere Untersuchungen zeigten, dass Dopamin bei der Ausbildung der diabetischen Hyperfiltration eine Rolle spielt. Die diabetische Hyperfiltration stellt einen entscheidenden Risikofaktor für die frühe Entwicklung einer diabetischen Nephropathie dar. In der vorliegenden Arbeit wird sowohl an einem diabetischen normotensiven, als auch hypertensiven Rattenmodell der Einfluss von Benserazid, einem Decarboxylasehemmer, der die Umwandlung von L-Dopa zu Dopamin verhindert, auf die Nierenfunktion hin überprüft. Weiterhin wird die Beteiligung des Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptors an der Ausbildung einer glomerulären Hyperfiltration, sowie der Regulation des renalen Salzhaushaltes, mittels des Einsatzes von 7-Hydroxy-DPAT, einem D<sub>3</sub>-Rezeptor-agonisten, untersucht. Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden sowohl an wachen, als auch narkotisierten Ratten durchgeführt.

## **1.2 Allgemeine Grundlagen**

### **1.2.1 Die Niere: Nephron, Glomerulum, Glomeruläre Filtrationsrate**

Die kleinste Funktionseinheit der Niere stellt das Nephron dar, welches aus einem Glomerulum mit Bowmanscher Kapsel und dem Tubulussystem besteht. Die Glomeruli setzen sich aus Kapillarkonvoluten zusammen, denen über das Vas afferens rund 1,2 Liter Blut pro Minute zugeführt wird. Der Abtransport des Blutes wird über das Vas efferens, eine postkapilläre Arteriole, gewährleistet. Die Regulation der Durchblutung erfolgt durch die dem Glomerulum vorbeziehungsweise nachgeschalteten Arteriolen, die sich durch Änderung ihres Gefäßwiderstandes dem aktuellen Blutdruck anpassen. Somit wird der renale Blutfluss bei systolischen Blutdruckwerten zwischen 90 und 180 mmHg

konstant gehalten. Dadurch bleiben der glomeruläre Perfusionsdruck konstant bei etwa 50 mmHg und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) weitgehend unabhängig von kurzfristig auftretenden Blutdruckschwankungen.

Die GFR ist definiert als das pro Zeiteinheit in der Niere gebildete Primärfiltrat und beträgt rund 180 Liter pro Tag. Die Bildung dieses Ultrafiltrates findet im Glomerulum statt, das aufgrund seines dreischichtigen Aufbaues eine Filterwirkung aufweist. Die drei Schichten setzen sich wie folgt von innen nach außen zusammen:

- Endothelschicht der Glomerulumkapillaren, die Poren mit einer Größe von 50-100 nm aufweisen
- Basalmembran
- Epithel der Bowmanschen Kapsel, wobei die Epithelzellen (Podozyten) mit ihren fußförmigen Zytoplasmaausläufern den Kapillarschlingen aufsitzen und miteinander interdigitierend verzahnt sind und damit Filtrationsschlitze bilden.

Neben der Filterfläche wird die glomeruläre Filtrationsrate außerdem von der hydraulischen Leitfähigkeit und dem effektiven Filtrationsdruck, der sich aus den hydrostatischen und onkotischen Druckunterschieden zwischen glomerulärer Kapillare und umgebenden Gewebe errechnet, mitbestimmt.

Nach der Abfiltration des Primärharns in die Bowmansche Kapsel gelangt dieser am Harnpol in den proximalen Tubulus, wo konstant etwa 65 % des Ultrafiltrates, darunter ungefähr 60 % Natrium und Wasser, gut die Hälfte des Chlorids und mehr als 90 % der Glukose, rückresorbiert werden. In der sich anschließenden Henleschen Schleife wird ca. 1/4 des filtrierte Wassers vor allem im absteigenden Ast reabsorbiert, wobei im relativ wasserundurchlässigen, dicken aufsteigenden Anteil der Schleife 20-25 % des filtrierte NaCl reabsorbiert wird. Ein Gegenstrommechanismus zwischen Henlescher Schleife und dem Interstitium erzeugt einen osmotischen Gradienten, der die Harnkonzentrierung im Sammelrohr ermöglicht. Im Anschluss an die Henlesche Schleife passiert der Harn den distalen Tubulus, in welchem die Wasser- und NaCl-Reabsorption, wie auch im sich anschließenden Sammelrohr, unter hormonaler Kontrolle (ADH für eine erhöhte Wasserrückresorption und

Aldosteron für eine Resorption von Natrium) steht. In der Wand des distalen Tubulus, in direktem Kontakt zu dem eigenen Glomerulum, liegt die zum juxtaglomerulären Apparat gehörende Macula densa. Diese spezialisierten Zellen spielen für die Regulation der glomerulären Durchblutung und des Filtrationsdruckes eine entscheidende Rolle, indem über sie die Natriumkonzentration im Tubulusharn ermittelt wird. So zieht die Registrierung geringer Mengen an Natrium an der Macula densa eine Vasodilatation des Vas afferens nach sich, was mit einer Durchblutungssteigerung des Glomerulum und somit einem GFR-Anstieg einhergeht. Weiterhin führt eine verminderte luminale NaCl-Konzentration zu einer Zunahme der in den epitheloiden Zellen des juxtaglomerulären Apparates produzierten Reninmenge. Eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems hat wiederum eine Widerstandserhöhung der efferenten Arteriole zur Folge, wobei die Filtrationsfraktion ansteigt. Bei einer Erhöhung der Natriumkonzentration kann der umgekehrte Effekt beobachtet werden.

### **1.2.2 Diabetes mellitus**

Der Diabetes mellitus, wörtlich übersetzt „honigsüßer Durchfluss“, stellt mit einer Prävalenz von etwa 1 % eine der häufigsten endokrinen Stoffwechselstörungen dar, die sich vordergründig vor allem durch einen erhöhten Blut- und Urinzucker auszeichnet. Dabei ist durch die unzureichende Insulinwirkung nicht nur der Kohlenhydratstoffwechsel, sondern auch der Fett- und Eiweißstoffwechsel gestört. Bedingt durch die unterschiedliche Entstehungsart des Insulinmangels ergeben sich pathogenetisch verschiedene Diabetesformen, wobei der Typ 1 Diabetes mit ca. 10 % und der Typ 2 Diabetes mit ca. 90 % die beiden häufigsten Formen darstellen. Der Typ 1 Diabetes, der vorwiegend im Kinder- und Jugendalter auftritt, geht mit einer autoimmunen B-Zellzerstörung des Pankreas einher, die gewöhnlich zu einem absoluten Insulinmangel führt. Dabei scheint für diese autoimmune Entgleisung eine genetische Prädisposition als sehr wahrscheinlich, die mit einem bestimmten HLA-Muster (HLA-DR 3 und HLA-DR 4) korreliert. Der Typ 2 Diabetes der meist erst im höheren Lebensalter auftritt, ist durch eine Insulinresistenz der peripheren Gewebe, sowie einer in-

adäquaten Insulinsekretion (relativer Insulinmangel) charakterisiert. Ursächlich dafür stehen wie auch beim Typ 1 Diabetes genetische Defekte, wobei darunter unter anderem der als MODY (maturity onset diabetes of the young) bezeichnete Diabetes (ca. 1 % der Diabetiker) fällt, sowie Umweltfaktoren wie Bewegungsmangel und Adipositas.

Unter dem Insulinmangel kommt es aufgrund der verminderten Glukoseaufnahme in die Zellen zu einer Steigerung der Glykogenolyse und Glukoneogenese in der Leber, die einen Blutzuckeranstieg begründen. Übersteigt die Glukosekonzentration im Serum die so genannte Nierenschwelle, die bei einem gesunden Erwachsenen zwischen 150-180 mg/dl liegt, so ist die Rückresorptionskapazität im proximalen Tubulus erschöpft, und es kommt zur Ausbildung einer Glukosurie. Diese bedingt durch ihre osmotische Wirkung eine Polyurie und damit auch eine ausgeprägte Polydipsie. Zum anderen kann bei anhaltendem Insulinmangel eine Zunahme der Lipolyse, die mit einer verstärkten Bildung von Azetyl-CoA und damit auch Ketonkörperproduktion in der Leber einhergeht, beobachtet werden. Da die Fähigkeit der Nieren zur Ketonkörperausscheidung limitiert ist, steigt die Konzentration dieser Säuren im Blut an, was zu einer metabolischen Azidose führt. Die metabolische Azidose kann zunächst respiratorisch kompensiert werden. Dabei korreliert die respiratorische Kompensation mit dem klinischen Bild der so genannten „Kussmaulatmung“. Bei einem schweren Insulinmangeln mit nicht kompensierbarer Azidose kann es jedoch zur Ausbildung eines lebensbedrohlichen ketoazidotischen Komas kommen. Weiterhin findet man zusätzlich eine gesteigerte Proteolyse, die mit einem Gewichtsverlust einhergeht.

Zu den Sekundärerkrankungen des Diabetes mellitus gehören zum einen makroangiographische Veränderungen (Arteriosklerose der großen und mittleren Gefäße) wie koronare Herzkrankheiten, zerebrale Durchblutungsstörungen (TIA, Schlaganfälle) und arterielle Verschlusskrankheiten (AVK). Zum anderen finden sich Mikroangiopathien, die durch verstärkte Glykosylierungsprozesse von Proteinen, Änderungen der Zusammensetzung der Basal-

membran und Anhäufung von Sorbit in bestimmten Zelltypen charakterisiert sind. Pathologische Veränderungen, die sich daraufhin ergeben, können am Auge (Retinopathie), am Nervensystem (Neuropathie) und an der Niere (Nephropathie) beobachtet werden. Dabei soll in der vorliegenden Arbeit der diabetischen Hyperfiltration, die nach Mogensen und Rudberg einen entscheidenden Risikofaktor für die frühe Entwicklung der diabetischen Nephropathie darstellt (Mogensen et al., 1986; Rudberg et al., 1992), besondere Beachtung geschenkt werden. Hierbei stellte die gemessene renale Albuminexkretionsrate das Maß für die diabetische Nephropathie dar. In einer weiteren Studie von Rudberg wurden morphologische Veränderungen an der Niere, wie eine Verdickung der Basalmembran und eine Erweiterung des Mesangiums, sowie Matrixraumes mit einer hohen glomerulären Filtrationsrate (GFR) in Verbindung gebracht (Rudberg et al., 1997). Andere Autoren jedoch messen der GFR eine geringere Rolle als Risikofaktor für die Ausbildung der diabetischen Nephropathie bei, wobei diese in der Albuminexkretionsrate und dem Blutdruck die Hauptrisikofaktoren sehen (Jones et al., 1996).

### **1.2.3 Zeitverlauf der diabetischen Nephropathie**

Unter die Bezeichnung der diabetischen Nephropathie (DN) fallen die Kimmelstiel-Wilson Glomerulosklerose als für den Diabetes mellitus charakteristische noduläre Glomerulosklerose, die bei Diabetikern 4- bis 5-mal häufiger auftretende Pyelonephritis und arteriosklerotische Veränderungen (Mertz et al., 1976). Dabei wird die DN als die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz angesehen. Nach O'Donnell entwickeln 35-40 % aller Typ 1 Diabetiker im Laufe ihres Lebens eine terminale Niereninsuffizienz (O'Donnell et al., 1988; Jones et al., 1995). Der immer häufiger auftretende nicht-insulinabhängige Diabetes (Typ 2 Diabetes) stellt mittlerweile die Hauptursache der terminalen Niereninsuffizienz und damit Dialysepflichtigkeit dar (Ismail et al., 1999). Ursächlich für den rapiden Anstieg der dialysepflichtigen Diabetiker in Deutschland steht zum einen die unzureichende medizinische Behandlung, wie antihypertensive Therapie mittels ACE-Inhibitoren und zum anderen die unzureichenden engmaschigen Kontrollen des HbA<sub>1c</sub>, Blutdruckes und LDL-

Cholesterinspiegels (Keller et al., 2000). Dabei konnte in einer prospektiven Studie gezeigt werden, dass durch eine optimale Einstellung des Blutzuckers die Mikroalbuminurie um 30 % verringert werden kann (UKPDSG, 1998). Laut der CODE-2 Studie (Costs of Diabetes in Europe-Type 2) lagen allein die Kosten im Jahre 1998, die durch den Typ 2 Diabetes in Deutschland verursacht wurden, um die 31.4 Milliarden DM (Liebl et al., 2001). Aus diesen Gründen sind Vorbeugungsmaßnahmen sowie eine Behandlungsoptimierung unabdingbar.

Die DN wird in 5 Stadien unterteilt:

Stadium 1: zum Zeitpunkt der Diagnosestellung besteht eine Hypertrophie der Nieren, sowie eine Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Plasmaflusses. Es kommt zur frühen diabetischen glomerulären Hyperfiltration.

Stadium 2: Während der klinisch stummen Phase, die ca. 2 bis 5 Jahre nach Diagnosestellung auftritt, kommt es zur Ausbildung von morphologischen Veränderungen an der Niere, beispielsweise zu einer Verdickung der glomerulären Basalmembran und zu einer Expansion des Mesangiums.

Stadium 3: Innerhalb des Stadiums der beginnenden Nephropathie ist neben der Mikroalbuminurie (Albuminausscheidung 20-200 µg/min) ein Blutdruckanstieg zu beobachten. Außerdem besteht nur noch eine leicht erhöhte GFR mit abnehmender Tendenz.

Stadium 4: Die klinisch manifeste Nephropathie ist gekennzeichnet durch eine persistierende Proteinurie (Albuminausscheidung >200 µg/min), sowie eine arterielle Hypertonie in 60 % der Fälle. Zusätzlich ist eine weitere stetige Abnahme der GFR zu erkennen.

Stadium 5: Nach einem Zeitintervall von ca. 15 bis 30 Jahren kommt es zur Ausbildung des Stadiums der terminalen Niereninsuffizienz. Diese zeichnet sich durch eine Erhöhung des Serumkreatinins und eine Abnahme der GFR auf weniger als 10 ml/min aus. Innerhalb dieses Stadiums kann auch die für den Diabetes mellitus charakteristische noduläre Glomerulosklerose vom Typ Kimmelstiel-Wilson festgestellt werden, die mit einer Basalmembranerweiterung sowie Mesangiumvergrößerung einhergeht (Ibrahim et al., 1997).

#### 1.2.4 Arterielle Hypertonie

Die Prävalenz des Hypertonus liegt in den Industrieländern bei 10-20 % der Gesamtbevölkerung und steigt mit zunehmendem Lebensalter. Dabei erfolgt die Einteilung der Hypertonie nach JNC (Joint National Committee on Detection, Education and Treatment of High Blood Pressure, 1984), in der eine milde Hypertonie im Stadium 1 systolische Werte zwischen 140-159 mmHg und diastolische zwischen 91-99 mmHg aufweist. Bei 90-95 % lässt sich keine Ursache für die Blutdruckerhöhung finden (essentielle, primäre Hypertonie). Dabei spielen für die Entstehung der essentiellen Hypertonie genetische Faktoren, sowie Umwelteinflüsse wie Kochsalzkonsum (Kochsalzkonsum in den westlichen Industrieländern liegt bei 10-15 g/d), Adipositas, fettreiche Kost mit einem hohen Anteil an Cholesterin und gesättigten Fettsäuren, psychischer Stress, Rauchen und Alkohol eine entscheidende Rolle. Die primäre Hypertonie wird häufig zusammen mit Adipositas und einem gestörten Glukose- und Fettstoffwechsel, wie es beim Typ-2-Diabetes zu beobachten ist, angetroffen. Dieser Symptomenkomplex wird als metabolisches Syndrom, oder auch „Wohlstands“-Syndrom zusammengefasst. Somit scheint die Insulinresistenz der Fett-, Muskel- und Leberzellen, die Folge einer chronischen Überernährung und damit Hyperinsulinämie darstellt, in dem Geschehen von zentraler Bedeutung zu sein. Insulin führt dabei über seinen antinatriuretischen Effekt zu einer gesteigerten Salz- und Wasserretention, was mit einer Erhöhung des intravasalen Volumens einhergeht. Die Volumenexpansion hat aufgrund der Autoregulation der arteriellen Widerstandsgefäße eine periphere Widerstandserhöhung und damit Steigerung des Blutdruckes zur Folge. Weiterhin wird dem Insulin ein zellproliferativer Effekt zugesprochen, der für die bei der Hypertonie zu beobachtenden Hypertrophie der Gefäßmuskelzellen verantwortlich gemacht werden könnte. Zum anderen unterstützt ein chronisch erhöhter Insulinspiegel die vermehrte Freisetzung von Triglyzeriden aus der Leber, was einen Risikofaktor für die Ausbildung von arteriosklerotischen Veränderungen des Gefäßsystems darstellt. Die Folgeschäden, die sich durch eine Hypertonie ergeben, betreffen zum einen das Gefäßsystem durch frühzeitige arteriosklerotische Veränderungen, die 50-60 % der Hypertoniker entwickeln. Dabei kommt es zur Ausbildung von

koronaren Herzkrankheiten, hypertensiven Retinopathien, zerebralen Ischämien und Hirninfarkten. Zum anderen führen strukturelle Umbauvorgänge zu Komplikationen einer Linksherzhypertrophie, Herzinsuffizienz, Herzrhythmusstörungen sowie Aortendissektionen. Bei Blutdruckwerten  $> 230/130$  mmHg liegt ein sogenannter hypertensiver Notfall vor, der durch eine vitale Gefährdung gekennzeichnet ist. Diese äußert sich in Organschädigungen mit Ausbildung eines Lungenödems, akutem Nierenversagens oder zerebralen Massenblutungen. Weiterhin stellt die chronisch arterielle Hypertonie die Ursache für 10-15 % aller chronisch dialysepflichtigen Patienten dar. Die hypertensive Nephropathie wird dabei in 3 Stadien unterteilt. Im ersten Stadium findet sich mit einer Albuminausscheidung zwischen 30-300 mg/d eine Mikroalbuminurie, wobei sich die benigne hypertensive Nephrosklerose (Stadium 2) mit einer Albuminurie ( $> 300$  mg/d) äußert. Im dritten Stadium trifft man auf eine Arterio-arteriosklerotische Schrumpfniere mit Niereninsuffizienz. Die Hypertonie kann jedoch auch das Fortschreiten anderer Nierenerkrankungen, wie die diabetischen Nephropathie, beschleunigen. Aus diesem Grund ist eine Optimierung des Blutdruckes bei Diabetikern auf Werte  $< 130/80$  mmHg erstrebenswert. Bei 5-10 % ist die Ursache der Hypertonie bekannt (sekundäre Hypertonie). Man unterscheidet zwischen einer renalen (Nierenarterienstenose, Nierentumoren), endokrinen (primärer Hyperaldosteronismus oder auch Conn-Syndrom, Phäochromozytom, Cushing-Syndrom) und kardiovaskulären (Aortenisthmusstenose) Hypertonie (Renz-Polster et al., 2004).

### 1.3 Bisheriger Kenntnisstand

#### 1.3.1 Struktur und Stoffwechsel des Dopamins

Die aromatische Aminosäure Tyrosin, die durch die Phenylalaninoxidase aus dem essentiellen Phenylalanin gebildet wird, stellt den Ausgangspunkt für die Biosynthese der Katecholamine Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin dar. Das erste an der Katecholaminbiosynthese beteiligte Enzym ist die Tyrosinhydroxylase, die die Bildung von L-Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) aus Tyrosin

bewerkstelligt. Im darauffolgenden Schritt wird diese über die aromatische L-Aminosäuredecarboxylase zu Dihydroxyphenylamin (Dopamin) decarboxyliert. Das für die Bildung von Noradrenalin benötigte Enzym ist eine Monoxygenase, die Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase. Mit Hilfe der Phenylethanolamin-N-methyltransferase erfolgt schließlich als letzte Reaktion die N-Methylierung von Noradrenalin zu Adrenalin. Die Katecholamine werden dabei in spezifischen Granula sowohl in sympathischen Nervenendigungen, als auch dem Nebennierenmark gespeichert. Die Katecholaminsekretion erfolgt mittels Exozytose, indem die Sekretgranula zur Zellmembran wandern, mit dieser verschmelzen und der Granulainhalt durch calciumvermittelte Depolarisation nach außen, in den synaptischen Spalt, abgegeben wird. Die Inaktivierung erfolgt entweder über eine präsynaptische Wiederaufnahme, oder aber durch einen kombinierten Oxidations- und Methylierungsprozess. Die am Abbau der Katecholamine zu biologisch inaktiven Produkten beteiligten Enzyme sind die Monoaminoxidase (MAO) und die Katechol-O-methyltransferase (COMT). Dabei entsteht das mit dem Harn ausgeschiedene Endprodukt, die 3-Methoxy-4-Hydroxymandelsäure (Vanillinmandelsäure) (Löffler und Petrides, 1997). Es wird davon ausgegangen, dass renales Dopamin mittels einer L-Aminosäuredecarboxylase (L-AADC), die in einer hohen Konzentration vor allem in den proximalen Tubuluszellen zu finden ist, aus L-Dopa gewonnen wird (Baines et al., 1980; Hayashi et al., 1990). L-Dopa wird dabei nach seiner glomerulären Filtration über apikale Natrium-abhängige Transporter in das Zytoplasma der proximalen Tubuluszellen aufgenommen (Baines et al., 1990).

### 1.3.2 Wirkungen von Dopamin im Organismus

Der Neurotransmitter Dopamin spielt über zentrale  $D_2$ -Rezeptoren im ZNS eine wichtige Rolle. Dabei kommt es durch eine Atrophie melaninhaltiger Zellen in der Substantia nigra zu einer Störung der nigrostriatalen Bahnen und in Folge dessen zu einem Dopaminmangel im Striatum. Das Striatum stellt zusammen mit dem Pallidum die Kerne der Basalganglien im Marklager des Großhirns dar, die in ihrem Zusammenspiel eine wichtige Funktion bei der zentralnervösen Regulation der Motorik übernehmen. Aus diesem Ungleichgewicht der

Neurotransmitter im Regelkreis ergibt sich das klinische Bild des Morbus Parkinson, der durch die Trias Tremor, Rigor und Akinese charakterisiert ist. Gegenteilig dazu wird dem psychiatrischen Krankheitsbild der Schizophrenie eine Überaktivität der in das limbische System projizierenden dopaminergen Systeme zugeschrieben. Auf diese Annahme basiert auch die effektive und gängige Therapie der Schizophrenie mittels Neuroleptika, die eine Blockade von Dopamin-Rezeptoren verursachen (Masuhr und Neumann, 1998; Trepel, 1999). Dem dopaminergen System wird ebenso eine Rolle im Brechzentrum, welches in der *Formatio reticularis* der *Medulla oblongata* lokalisiert ist, zugeschrieben. Weiterhin ist Dopamin an der Steuerung emotionaler, als auch kognitiver Funktionen sowie an der Hormonsynthese und -freisetzung (Hemmung der Prolactinausschüttung im Hypophysenvorderlappen) beteiligt (Jose et al., 1992; Missale et al., 1998).

In der Peripherie nimmt Dopamin über  $D_1$ -Rezeptoren und  $\alpha$ -Adrenozeptoren Einfluss sowohl auf die Darmmotilität, als auch die Nierendurchblutung. Das endogene Dopamin wird dabei unter anderem als natriuretisches Hormon diskutiert, wobei die vermehrte, Dopamin-induzierte Natriumausscheidung über den  $D_1$ -Rezeptorsubtyp angenommen wird (Baines et al. 1986). Am Herzen zeigt Dopamin eine positiv inotrope Wirkung, die auf einer Stimulierung von  $\beta_1$ -Rezeptoren beruht. Welcher Rezeptortyp vorwiegend auf Dopamin anspricht ist dabei dosisabhängig. Bei geringer Dosierung (1-3  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) kommt es zu einer Stimulation von  $D_1$ -Rezeptoren, die eine Verbesserung der Nieren- und Mesenterialdurchblutung und damit auch eine Steigerung der GFR und Diurese zur Folge hat. In mittlerer Dosierung (4-8  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) besteht eine direkte sympathomimetische Wirkung über eine Stimulation von  $\beta_1$ -Rezeptoren, die mit einer kardialen Wirkung, sowie auch mit einer vermehrten Reninfreisetzung aus der Niere und damit sekundär mit einer verstärkten Natriumrückresorption einhergeht. In hoher Dosierung (> 8-10  $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ ) findet man eine Wirkungsumkehr durch Stimulation von  $\alpha$ -Rezeptoren, die sich in einer Vasokonstriktion mit Blutdruckanstieg und einer Verminderung der Nieren- und Mesenterialdurchblutung und damit reduzierten Diurese bemerkbar macht. Die Rolle und

Wirkung des renalen Dopamins, welches in den proximalen Tubuluszellen synthetisiert wird (Hayashi et al., 1990) ist noch nicht vollständig geklärt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es durch eine systemische Protein- oder Aminosäureaufnahme zu einer Erhöhung des renalen Blutflusses (RPF) und der GFR kam (Meyer et al., 1983). In weiteren Arbeitsgruppen konnte zusätzlich neben einer GFR-Steigerung als Antwort auf eine erhöhte Proteinzufuhr, eine gleichsinnige Veränderung der Dopaminexkretionsrate beobachtet werden (Williams et al., 1986; Mühlbauer und Osswald, 1992). Einer Studie der Arbeitsgruppe Hayashi zufolge führt ebenfalls eine erhöhte systemische Salzzufuhr zu einer Steigerung der mit dem Urin ausgeschiedenen Dopamin- und Natriumkonzentration (Hayashi et al., 1992). Später wurde als Mechanismus für diesen natriuretischen Effekt eine Hemmung der  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$  über den  $\text{D}_1$ -Rezeptor angenommen (Ibarra et al., 2002). Entgegen dieser Beobachtung zeigten weitere tierexperimentelle Studien an Ratten keine Abhängigkeit der renalen Dopaminproduktion von der systemischen Salzzufuhr (Mühlbauer und Osswald, 1992; Luippold et al., 2000).

### **1.3.3 Dopaminrezeptoren**

Anfang der 70-iger Jahre konnte durch einige Studien festgestellt werden, dass die vom Dopamin übernommenen physiologischen Funktionen unmöglich über nur einen Rezeptortyp gesteuert werden könnten. Abhängig von der unterschiedlichen Wirkung der Dopaminrezeptoren auf die Adenylatcyclase, die zur Signaltransduktion dient, kam es schließlich zu einer Unterteilung in zentrale  $\text{D}_1$ - und  $\text{D}_2$ -Rezeptoren. Später konnten durch molekularbiologische Untersuchungen weitere zentrale Rezeptorsubtypen ermittelt werden, die abhängig von ihren pharmakologischen Eigenschaften in zwei Unterfamilien eingeteilt wurden (Sibley und Monsma, 1992; Seeman und Van-Tol, 1994). Der  $\text{D}_1$ -Rezeptor und der  $\text{D}_5$ -Rezeptor wurden dabei der  $\text{D}_1$ -Unterfamilie ( $\text{D}_1$ -ähnliche) zugeordnet. Weiterhin wurden in die  $\text{D}_2$ -Unterfamilie ( $\text{D}_2$ -ähnliche) die  $\text{D}_2$ -,  $\text{D}_3$ - und  $\text{D}_4$ -Rezeptoren mit eingeschlossen (Jose et al., 1992). Durch die Stimulation eines Rezeptors, der der  $\text{D}_1$ -Familie angehört kommt es zu einer, über ein heterotrimeres G-Protein vermittelten, Aktivitätszunahme der auf der Innenseite

der Zellmembran lokalisierten Adenylatcyclase (AC). Dieser Vorgang führt zu einer vermehrten Bildung von cAMP, einem second messenger, der ein extrazelluläres Signal in Stoffwechseländerungen der Zielzelle umsetzt. Das cAMP ist wiederum seinerseits für die Aktivierung der Proteinkinase A zuständig. Die Proteinkinase A ist an einer Reihe von Phosphorylierungsprozessen in der Zelle beteiligt. Weiterhin wird der dem Dopamin zugesprochene natriuretische Effekt über den D<sub>1</sub>-Rezeptor angenommen, über den es zu einer Aktivierung der Phospholipase C kommt, die wiederum ihrerseits spezifisch das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) hydrolysiert. Dabei kommt es zur Aktivierung von Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>), die einerseits die Freisetzung von Calcium begünstigt und andererseits eine Stimulierung der Proteinkinase C nach sich zieht. Die Proteinkinase C vermittelt eine Phosphorylierung der tubulär gelegenen basolateralen Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, die mit einer Hemmung der Natriumaufnahme einhergeht (Ibarra et al., 2002). Für die D<sub>2</sub>-Rezeptor-Familie wurde ein inhibitorischer Effekt auf die AC sowie Einflüsse auf weitere Signaltransduktionswege angenommen (Kebabian und Calne, 1979). Außerdem wird eine Stimulation von K<sup>+</sup>- und Ca<sup>2+</sup>-Kanälen diskutiert (Amenta et al., 2001). Später konnte dann unter Verwendung selektiver Dopaminagonisten und -antagonisten die Existenz von peripher gelegenen Rezeptoren festgestellt werden. Diese wurden, um sie von den zentralen Rezeptoren zu unterscheiden, als DA<sub>1</sub>- und DA<sub>2</sub>-Rezeptoren bezeichnet (Goldberg und Kohli, 1983). In weiteren Untersuchungen wurden die fünf, zunächst im ZNS aufgefundenen Dopaminrezeptorsubtypen (D<sub>1</sub>-D<sub>5</sub>), auch in der Niere ermittelt (Missale et al., 1998), so dass man mittlerweile auch hier zwischen D<sub>1</sub>-ähnlichen- und D<sub>2</sub>-ähnlichen-Rezeptoren unterscheidet. Die Lokalisationen der Dopaminrezeptorsubtypen im Organismus sind unterschiedlich. Rezeptoren der D<sub>1</sub>-Familie wurden im juxtaglomerulären Apparat, sowie an den apikalen als auch basolateralen Seiten der proximalen und distalen Tubuli aufgefunden. Auch in den Sammelrohren und der Tunica media der glatten Muskulatur der Nierengefäße konnten D<sub>1</sub>-Rezeptoren nachgewiesen werden (O'Connell et al. 1995). Der D<sub>2</sub>-Rezeptor wurde neben dem ZNS auch in den renalen Tubuli, in

den Glomeruli, sowie in der renalen Gefäßmuskulatur und in sympathischen Nervenendigungen gefunden (Hussain und Lokhandwala, 1998).

#### **1.3.4 Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor**

Um das Jahr 1990 wurde ein neuer Dopamin-Rezeptor aus dem Gehirn von Ratten kloniert. Da dieser sich möglicherweise in der Lokalisation, Sequenz und Pharmakologie von den D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoren unterscheidet, wurde er als Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor bezeichnet. Der D<sub>3</sub>-Rezeptor ist aus 7 transmembranären Domänen aufgebaut und könnte damit zu der Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehören. Dabei liegt die Gesamthomologie mit dem D<sub>2</sub>-Rezeptor bei 52 %, wobei sich diese bei alleiniger Betrachtung der transmembranären Domänen auf 78 % erhöht. Der humane D<sub>3</sub>-Rezeptor, bestehend aus 400 Aminosäuren, erwies sich als weitgehend homolog zu dem der Ratten, der sich aus 446 Aminosäuren zusammensetzt (Sokoloff et al., 1992). Weiterhin wurde das humane D<sub>3</sub>-Rezeptorgen der q13.3-Bande des Chromosoms 3 zugeordnet (Giros et al., 1990; Le Coniat et al., 1991), wohingegen die D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoren auf dem Chromosom 5 und 11 lokalisiert sind (Grandy et al., 1989; Zhou et al., 1990). Exprimiert wurde der D<sub>3</sub>-Rezeptor zum einen im ZNS, wobei sich eine besonders hohe Rezeptordichte in den Islands of Calleja und dem limbischen System, wie dem Hippocampus und dem Corpus amygdaloideum, zeigte. Zum anderen konnten D<sub>3</sub>-Rezeptoren in den Kernen der Basalganglien (Striatum und Substantia nigra) und im Tuberculum olfactorium aufgefunden werden (Gehlert et al., 1992; Suzuki et al., 1998). Weiterhin konnte durch Läsionsuntersuchungen mittels des neuronalen Toxins 6-Hydroxydopamin festgestellt werden, dass sowohl die D<sub>2</sub>- als auch D<sub>3</sub>-Rezeptoren von dopaminergen Neuronen exprimiert werden und demzufolge eine Funktion als Autorezeptor übernehmen. Somit wird eine Beteiligung des D<sub>3</sub>-Rezeptors an der Feedback-Kontrolle der dopaminergen Funktion, die mit einer Regulation der Dopaminsynthese und -freisetzung, sowie neuronalen Aktivität einhergeht, als sehr wahrscheinlich angesehen (Sokoloff et al., 1990). Auf diese Beobachtung hin wird dem D<sub>3</sub>-Rezeptor eine bedeutende Rolle bei der Entstehung und Behandlung von neuropsychiatrischen Erkrankungen, wie

der Schizophrenie und dem Morbus Parkinson zugeschrieben (Shafer et al., 1998). Peripher wurde der D<sub>3</sub>-Rezeptor unter anderem in der Niere lokalisiert. Dabei konnten D<sub>3</sub>-Rezeptoren an der apikalen Seite der proximalen und distalen Tubuli, sowie in den Podozyten der Glomeruli und der glatten Muskulatur der Nierenarterien gefunden werden (O'Connell et al., 1998). In anderen Arbeiten wurde der D<sub>3</sub>-Rezeptor weiterhin im juxtaglomerulären Apparat lokalisiert (Sanada et al., 1997). Versuche an Ratten zeigten unter Verwendung eines Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor Agonisten, dem 7-Hydroxy-DPAT, eine Steigerung der GFR sowie Natriumexkretion und eine Diurese (Luippold et al., 1998). Weiterhin konnte in darauffolgenden Arbeiten die postglomeruläre Vasokonstriktion als möglicher Mechanismus für die durch den D<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten ausgelöste Steigerung der GFR in Betracht gezogen werden. Diese renalen hämodynamischen Veränderungen konnten nicht durch eine Vorbehandlung mittels D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten (S(-)-Sulpirid) beeinflusst werden, wurden jedoch unter Inhibierung des D<sub>3</sub>-Rezeptors durch U-99194A unterdrückt (Luippold et al., 2000).

### 1.3.4.1 Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor und diabetische Hyperfiltration

Es wird davon ausgegangen, dass Dopamin an der Regulation der glomerulären Filtrationsrate beteiligt ist. Diese Annahme ist in Hinblick auf die zeitliche Entwicklung der diabetischen Nephropathie von besonderer Bedeutung, da für deren Ausbildung die frühe diabetische Hyperfiltration einen entscheidenden Risikofaktor darstellen soll (Mogensen et al., 1986). Unter Verabreichung von Aminosäurelösungen, die die Dopaminvorstufen L-Tyrosin und L-Phenylalanin enthielten, konnte sowohl eine Steigerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), als auch eine erhöhte renale Dopaminexkretionsrate beobachtet werden (Mühlbauer et al., 1997). In weiteren Studien wurde auch unter Einsatz von Quinpirol, einem Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten, ein Anstieg der GFR dokumentiert. Weiterhin konnte unter Verwendung eines sowohl peripher als auch zentral wirkenden D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten, dem S(-)-Sulpirid, und dem selektiv peripher wirkenden Domperidon eine Aufhebung der aminosäurebedingten Hyperfiltration erzielt werden (Luippold et al., 1998). Auch der De-

carboxylasehemmer Benserazid, der die Umwandlung von L-Dopa zu Dopamin unterdrückt, führte dazu, dass die Aminosäure-induzierte Hyperfiltration verhindert werden konnte (Mühlbauer et al., 1993). Weiterhin wurde in der eigenen Arbeitsgruppe der Effekt eines selektiven D<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten, dem BSF 135170, auf die diabetische Hyperfiltration hin untersucht. Dabei kam es zu einer Normalisierung der durch den Diabetes verursachten gesteigerten GFR (Luippold et al., 2005). In anderen Arbeiten wurde gegensätzlich dazu bei Hunden unter Verwendung eines hochspezifischen D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten, dem YM-09151, sowohl eine Diurese, Natriurese als auch Steigerung der GFR und des renalen Plasmaflusses (RBF) beobachtet (Siragy et al., 1990). Weiterhin zeigte sich in derselben Arbeitsgruppe kein Effekt des D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten Quinpirol auf die renale hämodynamische Funktion und auf die renale Elektrolytausscheidung (Siragy et al., 1992). Auf diese Beobachtungen hin stellte sich nun die für die vorliegende Arbeit zentrale Frage: Ist es möglich mittels des Einsatzes von Benserazid die diabetische Hyperfiltration zu verhindern?

### 1.3.4.2 Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor und arterielle Hypertonie

Wie schon in Kapitel 1.3.4 beschrieben, führt die arterielle Hypertonie zu einer Reihe von Folgeschädigungen wie koronaren Herzkrankheiten und zerebralen Ischämien. Dabei stellt die genetische Prädisposition nicht die einzige Ursache für die Ausbildung der essentiellen Hypertonie dar. Das Katecholamin Dopamin, welches über verschiedene Dopaminrezeptorsubtypen im zentralen als auch peripheren Nervensystem, sowie der glatten Gefäßmuskulatur, dem Herz und der Niere an der Regulation der kardiovaskulären Funktionen beteiligt ist, nimmt auch eine zentrale Stellung in der Entstehung der arteriellen Hypertonie ein. Dabei wird dem dopaminergen System im zentralen Nervensystem (ZNS) eine Mitbeteiligung an der systemischen Blutdruckregulation zugeschrieben, die über eine Aktivierung zentraler D<sub>2</sub>-Rezeptoren erfolgt (Jose et al., 1999). Weiterhin konnte in anderen Arbeiten eine erhöhte Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptorexpressionsrate im Rattengehirn von spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Vergleich zu ihrer normotensiven Kontrollgruppe (WKY-Ratten) festgestellt werden, was ebenfalls

für eine Beteiligung des dopaminergen Systems an der Pathogenese der Hypertonie spricht (Vaughan et al., 1999). Auch nimmt Dopamin direkten Einfluss auf den Natriumtransport in der Niere, indem es über eine Aktivierung von D<sub>1</sub>-Rezeptoren unter Aktivierung der Phospholipase C die Natriumreabsorption unterbindet (siehe Kapitel 1.3.3). Außerdem besteht die Annahme, dass Dopamin sowohl über D<sub>1</sub>- als auch D<sub>2</sub>-Rezeptoren die Bindung von Angiotensin II an den Angiotensin I-Rezeptor verhindert, über dessen direkte Stimulation eine verstärkte Natriumrückresorption erfolgt. Somit unterdrückt Dopamin den stimulierenden Effekt von Angiotensin II auf die renale Rückresorption von Natrium (Sheikh-Hamad et al., 1993). Zum anderen nimmt Dopamin jedoch auch indirekten Einfluss auf die Natriumrückresorption, indem es die Wirkung von Angiotensin II, welches den Hauptstimulus für die Aldosteronproduktion und -sekretion in den Zellen der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde darstellt, inhibiert. Dabei zeigten selektive D<sub>2</sub>-Rezeptoragonisten eine höhere Effektivität als Dopamin auf. Auch konnte die durch Dopamin hervorgerufene Unterdrückung der Aldosteronsekretion unter Verwendung von D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten, dem S(-)-Sulpirid und dem Domperidon, jedoch nicht durch den selektiven D<sub>1</sub>-Rezeptorantagonisten SCH 23390, aufgehoben werden (Missale et al., 1988). Weiterhin wird eine Beteiligung von Dopamin an der Reninfreisetzung aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparates diskutiert. Dabei konnte unter Anwesenheit eines Dopamin D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten, dem Fenoldopam, eine gesteigerte Reninsekretion beobachtet werden. Im Gegensatz dazu bewirkte der D<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist SCH 23390, nicht aber der D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist S(-)-Sulpirid eine Inhibierung der Reninsekretion (Kurtz et al., 1988; Antonipillai et al., 1989). Später konnte interessanterweise festgestellt werden, dass der D<sub>3</sub>-Rezeptor, der im Gegensatz zum D<sub>2</sub>-Rezeptor auch in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates exprimiert wird (Sanada et al., 1997), an der Unterdrückung der Reninfreisetzung beteiligt sein könnte. Asico und Mitarbeiter beobachteten dabei in D<sub>3</sub>-Rezeptor Knockout Mäusen einen gesteigerten Blutdruck, sowie einen Anstieg der renalen Reninproduktion, so dass die systolischen und diastolischen Blutdruckwerte der heterozygoten als auch

homozygoten Tiere deutlich über denen der Wildtypiere lagen (Asico et al., 1998).

#### 1.4 Eigene Fragestellung

Folgende Fragestellungen sollen durch Experimente an normotensiven, als auch hypertensiven Ratten im Stoffwechsellkäfig- und Clearanceversuch untersucht werden:

Welchen Einfluss hat der L-Dopadecarboxylase Hemmer Benserazid auf die Nierenfunktion in einem diabetischen, normotensiven Rattenmodell?

Kann mittels des Einsatzes von Benserazid die diabetische Hyperfiltration in einem diabetischen, normotensiven Rattenmodell aufgehoben werden?

Zeigt das diabetische, hypertensive SH-Rattenmodell Unterschiede bezüglich der Nierenfunktion im Vergleich zu seiner entsprechenden normotensiven Kontrollgruppe?

Kann mittels des Einsatzes von Benserazid die diabetische Hyperfiltration in einem diabetischen, hypertensiven Rattenmodell reduziert werden?

Welchen Einfluss hat eine pharmakologische Stimulation von D<sub>3</sub>-Rezeptoren auf die Nierenfunktion in einem normotensiven, wie auch einem hypertensiven, diabetischen Rattenmodell?

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Bei den Versuchstieren handelte es sich zum einen um männliche, normotensive Sprague-Dawley-Ratten (SD). Zum anderen wurden ebenfalls männliche, spontan hypertensive Ratten (SHR), die nach einer bestimmten Lebenszeit einen Hypertonus entwickelten, sowie Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) als dazugehörige normotensive Kontrollgruppe, verwendet.

#### **2.1.1 Haltungsbedingungen**

Die verwendeten Tiere wiesen zum Lieferungszeitpunkt ein Körpergewicht zwischen 225-250 g auf. Die Haltung der Ratten erfolgte in Standardkäfigen zu 4-5 Tieren auf Kleintierstreu (Tiereinstreu-Faser, Fa. Altromin, Lage) und bei einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus. Die Tiere erhielten freien Zugang zu Leitungswasser und Standardfutter (Standardfutter Altromin 1324 ad libitum, Fa. Altromin, Lage).

#### **2.1.2 Induktion des Diabetes mellitus**

Der Induktion des Diabetes mellitus mittels Streptozotocin (Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen) ging eine Gewichtsbestimmung des Tieres voraus. Im Anschluss daran erhielten die Tiere eine Einzeldosis Streptozotocin (STZ) in einer Konzentration von 60 mg/kg Körpergewicht (KG) in den rechten unteren Abdominalquadranten injiziert, wobei das STZ vor Verabreichung in Citratpuffer (0,210 g Citronensäure auf 10 ml Aqua bidest.; pH 4) gelöst wurde. Die Kontrollgruppen erhielten die entsprechende Citratpuffermenge ebenfalls i.p. injiziert. Mit einem Erfolg der Behandlung konnte nach 24-48 h gerechnet werden, welcher mittels einer Blutglukosemessung überprüft wurde. Diese erfolgte über Teststäbchen (Accu-Chek Sensor Comfort Teststreifen, Fa. Roche,

Mannheim) mit einem Blutzuckermessgerät (Accu-Chek Sensor, Fa. Roche, Mannheim). Dabei wurde das über die Schwanzvene des Tieres gewonnene Blut auf einen Teststreifen gegeben und nach einigen Sekunden der Blutglukosewert auf der Anzeige des oben benannten Messgerätes abgelesen. Lagen die Blutglukosewerte nach Ablauf dieses Zeitraumes nicht zwischen 280-600 mg/dl erfolgte eine Nachinjektion von ebenfalls 60 mg/kg KG STZ. Während der darauf folgenden 14 Tage, die bis zur Durchführung der Stoffwechselkäfigversuche eingehalten werden mussten, konnten die für den Diabetes mellitus typischen Veränderungen wie Gewichtsabnahme, Polydipsie, Polyurie und Polyphagie beobachtet werden. Im Gegensatz dazu wiesen die Tiere der Kontrollgruppen, wie zu erwarten war, keine dieser Veränderungen auf.

## 2.2 Versuchsgruppen

Insgesamt wurden in der Arbeit ein normotensives Rattenmodell, mit jeweils 4 Versuchsgruppen, und ein hypertensives Rattenmodell, mit jeweils 6 Versuchsgruppen, untersucht.

Anzahl n der Versuchstiere im Stoffwechsel- und Clearanceversuch (CL)

### Dem normotensiven Rattenmodell zugehörige Versuchsgruppen:

CON-SD-VHC (n=8): nicht diabetische (CON), während der Clearanceversuche mit Vehikel (VHC) infundierte Sprague-Dawley-Ratten (SD) als Kontrollgruppe

CON-SD-BZD (n=7): nicht diabetische (CON), während der Clearanceversuche mit Benserazid (BZD, 30 µg/kg KG/min) infundierte Sprague-Dawley-Ratten (SD) als Kontrollgruppe

DM-SD-VHC (n=8): diabetische (DM), während der Clearanceversuche mit Vehikel (VHC) infundierte Sprague-Dawley-Ratten (SD)

DM-SD-BZD (n=7): diabetische, während der Clearanceversuche mit Benserazid (BZD, 30 µg/kg KG/min) infundierte Sprague-Dawley-Ratten (SD)

Dem hypertensiven Rattenmodell zugehörige Versuchsgruppen:

CON-WKY-BZD (n=8): nicht diabetische (CON), während der Clearanceversuche mit Benserazid (BZD, 30 µg/kg KG/min) infundierte, normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) als Kontrollgruppe

CON-SHR-BZD (n=8): nicht diabetische (CON), während der Clearanceversuche mit Benserazid (BZD, 30 µg/kg KG/min) infundierte, spontan hypertensive Ratten (SHR) als Kontrollgruppe

DM-WKY-VHC (n=8): diabetische (DM), während der Clearanceversuche mit Vehikel (VHC) infundierte, normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY)

DM-SHR-VHC (n=7): diabetische (DM), während der Clearanceversuche mit Vehikel (VHC) infundierte, spontan hypertensive Ratten (SHR)

DM-WKY-BZD (n=8): diabetische (DM), während der Clearanceversuche mit Benserazid (BZD, 30 µg/kg KG/min) infundierte, normotensive Wistar-Kyoto-Ratten (WKY)

DM-SHR-BZD (n=7): diabetische (DM), während der Clearanceversuche mit Benserazid (BZD, 30 µg/kg KG/min) infundierte, spontan hypertensive Ratten (SHR)

## 2.3 Versuchsdurchführung

### 2.3.1 Stoffwechselkäfigversuche mit wachen Ratten

#### 2.3.1.1 Stoffwechselkäfige

Für die Stoffwechselkäfigversuche wurden Käfige verwendet, die eine getrennte Sammlung von Urin und Faeces erlaubten (Tecniplast, Hohenpeißenberg). Die Tiere hatten während des Stoffwechselkäfigversuches freien Zugang zu Trinkwasser und Futter (Fa. Altromin, Lage). Im oberen Teil des Käfigs konnten sich die Tiere frei auf einem Gitternetzrost bewegen, während im unteren Abteil ein konusförmiger Trichter die Trennung des Urins, in einen eigenen zum Käfig gehörenden Sammelbehälter, ermöglichte.

#### 2.3.1.2 Ablauf der Stoffwechselkäfigversuche

Die Stoffwechselkäfigversuche mit hyperglykämischen als auch normoglykämischen Tieren erfolgten 14 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus bzw. 14 Tage nach Injektion des Citratpuffers. Vor jedem Versuchsbeginn wurde das Gewicht des Tieres mittels einer Tierwaage (Tierwaage, Fa. Mettler, Zürich) bestimmt und der Blutzucker gemessen, wobei bei den Versuchsgruppen mit WKY- und SHR-Tieren zusätzlich der Blutdruck, mittels Schwanzdruckmessung (siehe Kapitel 2.3.2), bestimmt wurde. Die Stoffwechselkäfigversuche wurden über 24 h durchgeführt, nach deren Abschluss sich erst nach 1-2 Tagen die Clearanceversuche anschlossen.

### 2.3.1.3 Probengewinnung und -behandlung

Nach gravimetrischer Bestimmung der Urinvolumina, der Trink- und Futtermenge wurden mittels einer Pipette (alle verwendeten Pipetten: Fa. Eppendorf, Hamburg) jeweils 2-mal 500 µl Urin aus dem Überstand des Urinsammelgefäßes entnommen und bis zur Elektrolytbestimmung bei -20 °C eingefroren.

### 2.3.2 Schwanzdruckmessung an Ratten

Vor jedem Stoffwechselläufigversuch mit den Versuchstieren der Stämme WKY und SHR war eine Blutdruckmessung erforderlich. Um die Tiere an den Messvorgang zu gewöhnen und um nicht durch bestehende Stressreaktionen der Tiere unrealistische Blutdruckwerte zu erhalten, wurden die Tiere mehrmals vor dem eigentlichen Messvorgang in die aus Plexiglas bestehenden Restrainer gesetzt und die sich am proximalen Schwanzende des Tieres befindende Blutdruckmanschette aufgepumpt. Der Messung vorausgehend wurden die Tiere in die Restrainer gebracht und während einer Adaptationszeit von ungefähr 10 Minuten das Blutdruckmessgerät (Model 179 Blood pressure analyzer, Fa. Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) kalibriert, sowie darauf geachtet, dass der Plexiglaskasten, in dem die Blutdruckmessung durchgeführt werden sollte, eine Temperatur von 32 °C aufwies, um optimal registrierbare Blutdruckwerte zu erzielen. Kurz vor der Messung wurde der Schieber des größenverstellbaren Restrainers enger gestellt, um die Bewegungsfreiheit des Tieres zu begrenzen und somit Bewegungsartefakten, die den eigentlichen realen Blutdruckwert verfälschen könnten, entgegenzuwirken. Abhängig vom jeweiligen Versuchstier wurde die Staumanschette automatisch auf vorher festgelegte Maximaldruckwerte (bei WKY-Tieren 150 mmHg und bei SHR-Tieren zwischen 250-300 mmHg) aufgeblasen und anschließend langsam wieder abgelassen. Die erste vom Gerät registrierte und auch optisch aufgezeichnete Pulswelle wurde als systolischer Blutdruckwert registriert. Pro Versuchstier wurden bis zu fünf Messungen durchgeführt und im Anschluss daraus der Mittelwert bestimmt.

### 2.3.3 Clearanceversuche an narkotisierten Ratten

#### 2.3.3.1 Narkose

Die Tiere erhielten, nachdem ihr Gewicht mit einer Analogwaage bestimmt wurde, eine Thiopentalnarkose. Dazu wurde festes Thiopental (Trapanal, Fa. Altana, Konstanz) in Wasser gelöst und in einer Dosis von 80 mg/kg Körpergewicht (KG) intraperitoneal in den rechten unteren Abdominalquadranten injiziert. Im Anschluss daran wurde mittels Schmerzreizprüfung die Narkosetiefe ermittelt, wobei in manchen Fällen eine Nachinjektion von 15 mg/kg KG Thiopental erforderlich war.

Diabetische Tiere erhielten abhängig von ihrem körperlichen Allgemeinzustand, und dem somit unterschiedlich hohen Verteilungsvolumen des Narkotikums in Muskulatur und Fettgewebe, Dosen zwischen 60 und 70 mg/kg KG Thiopental. Bei den normoglykämischen SHR-Tieren war in den meisten Fällen eine Nachinjektion von mindestens 30 mg/kg KG Thiopental notwendig.

#### 2.3.3.2 Präparation

Die Tiere wurden unmittelbar nach Narkoseverabreichung in Rückenlage auf den vorgeheizten Präparationstisch (Fa. Effenberg, Pfaffing) platziert, wobei dort eine Fixation der Extremitäten und des Kopfes mittels Seidenfäden (alle Seidenfäden: Fa. Suprama, Berlin) vorgenommen wurde. Die Körpertemperatur wurde über ein Rektalthermometer registriert und über ein Temperatureinstellgerät (Fa. Effenberg, Pfaffing) konstant bei 37,0 °C gehalten. Der erste Operationsschritt bestand darin, über eine Tracheostomie die Atemwege freizuhalten und somit einer eventuell entstehenden Verschleimung vorzubeugen. Dazu erfolgte mit Hilfe einer Präparationsschere (verwendete Operationsinstrumente: Fa. Aesculap, Tuttlingen) ein medianer Hautschnitt im ventralen Halsbereich und mittels Pinzetten eine Durchtrennung der Halsfaszie. Weiterhin kam es zu einer stumpfen Spaltung der infrahyalen Muskulatur entlang der Medianlinie, wobei auf eine Schonung der paratrachealen Gefäße und Nerven geachtet werden musste. Um die freigelegte Trachea wurde ein Seidenfaden

zur Fixation des Trachealtubus (ID: 1,57 mm, OD: 2,08 mm) gelegt. Die Trachea wurde zwischen zwei Knorpelspangen mittels Federschere inzidiert und ein etwa 4 cm langer Polyethylenkatheter ungefähr 1 cm tief eingeführt, der anschließend durch den vorgelegten Faden fixiert wurde. Im Anschluss daran wurde die weit lateral und oberflächlich liegende Vena jugularis dextra aufgesucht und freipräpariert, wobei unter Einsatz des Mikroskops die erste Ligatur an der kranialen Seite der rechten V. jugularis angelegt wurde, um damit das Gefäß zu spannen. Zwei weitere kaudal gelegene Ligaturen wurden vorgelegt mit der Funktion, den anschließend eingeführten Venenkatheter (ID: 0,58 mm, OD: 0,96 mm) zu fixieren. Das Gefäß wurde so weit kranial wie möglich inzidiert und der Polyethylenkatheter mit Hilfe einer Führungspinzette unter Mikroskopkontrolle eingeführt. Ein Bolus von etwa 0,5 ml diente dazu, die richtige Position des Venenkatheters zu überprüfen. Daraufhin wurden die Infusionspumpen (verwendete Perfusionspumpen: TYP 871602/1, Fa. Braun, Melsungen) eingeschaltet. Im darauf folgenden Schritt wurde die in enger Nachbarschaft zur Trachea liegende A. carotis sinistra aufgesucht, vom umliegenden Bindegewebe befreit und der N. vagus vorsichtig abpräpariert. Vor allem dieser Präparationsschritt musste bei den diabetischen Tieren mit besonderer Sorgfalt durchgeführt werden, da diese außerordentlich sensibel auf eine übermäßige Reizung des N.vagus, die mit einem Atemstillstand einhergeht, reagierten. Danach erfolgte das Legen der ersten Ligatur an der kranialen Seite der Carotis, um diese zu spannen. Kaudal wurde das Gefäß mit einer gefäßchirurgischen Klemme abgeklemmt und zwischen dieser und der kranialen Ligatur eine weitere Ligatur zur Fixierung des Katheters vorgelegt. Nach Inzision des Gefäßes und Einführung des Carotiskatheters (ID: 0,58 mm, OD: 0,96 mm) wurde dieser mittels vorgelegter Ligatur leicht fixiert, die Klemme geöffnet und der Katheter weiter in das Gefäß vorgeschoben. Im Anschluss konnte die Puls- und Blutdruckregistrierung begonnen werden (WKK, 280R, Kaltbrunn, Schweiz).

Für die Katheterisierung der Harnblase wurde eine mediane suprapubische Inzision entlang der Linea alba durchgeführt, die Abdominalmuskulatur stumpf voneinander getrennt und die Blase herausluxiert. Um die Blase herum wurde

eine Schlinge vorgelegt, daraufhin der Harnblasenpol inzidiert, ein PE-Katheter (ID: 0,86 mm, OD: 1,27 mm) eingelegt und fixiert. Nach Reposition der Harnblase wurden die Wunden mit Nähten verschlossen. Im Anschluss daran wurde das Tier in seitliche Position gebracht und der Urin mittels PE-Gefäßen (2,0 ml) gesammelt.

### 2.3.3.3 Infusion

Das Tier erhielt seine Infusion über den Venenkatheter, der über ein T-Stück an zwei Perfusionspumpen angeschlossen war. Über die erste Präzisionspumpe erhielt das Tier, vom Zeitpunkt des Legens des Venenkatheters bis zum Abschluss der zweiten Vorperiode, eine physiologische, 0,85%ige Kochsalzlösung mit einem Infusionsvolumen von 2,4 ml/h infundiert. Innerhalb der sich anschließenden zwei Hauptperioden erfolgte eine Infundierung von 7-Hydroxy-(dipropyl-amino) tetralin hydrobromid (7-Hydroxy-DPAT; [1 µg/kg KG/min], Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen), gelöst in einer 0,85%igen NaCl-Lösung mit einem Infusionsvolumen von ebenfalls 2,4 ml/h. Die zweite, parallel geschaltete Perfusionspumpe förderte über den gesamten Versuchsablauf mit einer konstanten Flussrate von 0,6 ml/h das für die Bestimmung der GFR notwendige mit Tritium markierte Inulin (<sup>3</sup>H-Inulin). Innerhalb der BZD-Versuchsgruppen beinhaltete die zweite Perfusionspumpe zusätzlich das in physiologischer Kochsalzlösung gelöste Benserazid (BZD; [30 µg/kg KG/min], Fa. Sigma-Aldrich, Taufkirchen). Diese Infusionslösung wurde jeden Tag frisch hergestellt und mittels Alufolie vor Licht geschützt, um einem vorzeitigen Substanzverlust entgegenzuwirken. Das Gesamtinfusionsvolumen betrug somit kontinuierlich 3,0 ml/h, wobei die diabetischen Tiere innerhalb der ersten 15 min nach Operationsende eine zusätzliche Volumenzufuhr von 1/100 ihres Körpergewichtes in ml erhielten.

### 2.3.4 Ablauf der Experimente

Im Anschluss an die ungefähr 40-minütige Präparation schloss sich eine Äquilibrationsperiode von 60-90 Minuten an, um einen gleichmäßigen Harnfluss, sowie eine Stabilisierung des Blutdruckes und des Pulses zu erzielen. Es

folgten daraufhin die ersten beiden Vorperioden von je 20 Minuten und mit deren Abschluss die Auswechslung der bis dahin infundierten, physiologischen 0,85%igen NaCl-Lösung durch die 7-Hydroxy-DPAT-Infusionslösung. Nach einer Zwischenperiodendauer von 10 Minuten schlossen sich die zwei Hauptperioden von ebenfalls 20 Minuten an. Eine kontinuierliche Registrierung von Puls und Blutdruck wurde während des gesamten Versuchsablaufes durchgeführt. Zum Versuchsende erfolgten die Nierenentnahme und die Tötung des Tieres durch i.v. verabreichte gesättigte KCl-Lösung.

### 2.3.4.1 Probenentnahme

Jeweils nach der Hälfte und zum Ende jeder 20-minütigen Versuchsperiode erfolgte die Probenentnahme. Der Karotiskatheter diente in der Mitte jeder Periode der Blutabnahme, die mittels dreier heparinierter Glaskapillaren (Mikro-Hämatokrit-Kapillaren 75 µl, Fa. Brand GmbH & Co, Wertheim) vorgenommen wurde. Die in 2,0 ml PE-Gefäßen (Safe-Lock 2,0 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) gesammelte Urinmenge wurde zum Ende jeder Periode gravimetrisch bestimmt.

### 2.3.4.2 Nierenentnahme

Bevor das Tier zurück in Rückenlage gebracht wurde, erhielt es eine zusätzliche Narkosedosis von ca. 30 mg/kg KG Thiopental injiziert. Daraufhin wurde die Naht am Blasenkatheter eröffnet und der mediane Schnitt bis unter das Sternum des Tieres erweitert. Im Anschluss daran wurde zunächst die linke Bauchdeckenseite mittels einer Klemme zur Seite gespannt, der Dünndarm mobilisiert und die linke Niere aufgesucht. Im Folgenden wurde die A. renalis sinistra abgeklemmt, kaudal davon durchtrennt und die linke Niere entnommen. Nach Entfernung der Nierenkapsel wurde die Niere mittels einer Nierenklemme, die zuvor in Stickstoff gekühlt wurde, zusammengepresst, um eine optimale Kühlung und somit Wahrung der in der Niere enthaltenden Katecholamine zu sichern. Daraufhin schloss sich die gravimetrische Gewichtsbestimmung der Nieren an, die in eine dicke Alufolie gewickelt in flüssigen Stickstoff eingefroren

wurden. Die Entnahme der rechten Niere erfolgte nach demselben Schema. Die Nieren wurden im Anschluss daran bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

#### 2.3.4.3 Probenbehandlung

Die blutgefüllten Kapillaren wurden einseitig mit einer Knetmasse (Hämatokrit-Versiegelungskitt, Fa. Brand, Wertheim) verschlossen und zentrifugiert. Im Anschluss daran wurde der Hämatokrit bestimmt und das Plasma in PE-Gefäßen gesammelt. Außerdem wurde die in 2,0 ml Eppendorf-Cups gesammelte Urinmenge gravimetrisch bestimmt. Ein Teil der Versuchsproben wurde anschließend zur GFR-Bestimmung herangezogen, sowie der verbliebene Rest bei  $20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.4 Analytik

### 2.4.1 Analytierte Parameter

Bei den Stoffwechselläufigversuchen bestimmte Parameter:

Tiergewicht	TG	[g]
Gewichtsverlust während des Versuches	$\Delta\text{TG}$	[g]
Blutglukosekonzentration	[BZ]	[mg/dl]
Futteraufnahme	FA	[g]
Trinkvolumen	TV	[ml]
Urinvolumen	UV	[ml]
Urin- $\text{Na}^+$ -Konzentration	$[\text{Na}]_{\text{Urin}}$	[mmol/l]

Urin-K <sup>+</sup> -Konzentration	[K] <sub>Urin</sub>	[mmol/l]
------------------------------------	---------------------	----------

In den Clearanceversuchen bestimmte Parameter:

Systolischer und diastolischer Blutdruck	P <sub>Sys</sub> , P <sub>Dias</sub>	[mmHg]
--	--------------------------------------	--------

Herzfrequenz	HF	[1/min]
--------------	----	---------

Hämatokrit	Hkt	[%]
------------	-----	-----

[ <sup>3</sup> H]-Aktivität in Plasma und Urin	A <sub>Plasma</sub>	[1/min]
--	---------------------	---------

A <sub>Urin</sub>	[1/min]
-------------------	---------

Urinkonzentration von Na <sup>+</sup> und K <sup>+</sup>	[Na] <sub>Urin</sub>	[mmol/l]
--	----------------------	----------

[K] <sub>Urin</sub>	[mmol/l]
---------------------	----------

Plasmakonzentration von Na <sup>+</sup> und K <sup>+</sup>	[Na] <sub>Plasma</sub>	[mmol/l]
--	------------------------	----------

[K] <sub>Plasma</sub>	[mmol/l]
-----------------------	----------

Urinvolumina der Sammelperioden	UV	[ml]
---------------------------------	----	------

Nierenfeuchtgewicht	NFG	[g]
---------------------	-----	-----

#### 2.4.2 Bestimmung des Hämatokrits

Im Anschluss an die Zentrifugation der Blutproben, mittels einer speziellen Hämatokritzentrifuge (Hettich Hämatokrit, Fa. Hettich, Tuttlingen) bei 12000 U/min für 3 Minuten, erfolgte die Bestimmung des Hämatokritwertes mit Hilfe einer Hämatokritschablone. Der Hämatokrit repräsentiert den Anteil der zellulären Bestandteile am gesamten Blutvolumen und wird in Vol% angegeben. Im Folgenden wurde der nichtkorpuskuläre Überstand in die 0,5 ml PE-Gefäße

überführt, wovon ein Teil zur sich direkt an das Versuchsende anschließenden GFR-Bestimmung (siehe Kapitel 2.4.6) herangezogen wurde. Der verbliebene Rest wurde bis zur Elektrolytbestimmung bei  $-20^{\circ}$  eingefroren, sowie der korpuskuläre Anteil verworfen.

### **2.4.3 Bestimmung der Urinvolumina**

Vor Versuchsbeginn wurden die Leergewichte der Eppendorf-Cups (Safe-Lock 2,0 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg), die für die Urinsammlung verwendet wurden, auf einer Präzisionswaage (Precisa 100A-300M, Fa. Oerliko, Schweiz) bestimmt. Im Anschluß an jede abgeschlossene Versuchsperiode wurde das PE-Gefäß erneut gewogen und die Differenz in mg bestimmt. Dieser Differenzwert wurde mit dem Urinvolumen in  $\mu\text{l}$  gleichgesetzt.

### **2.4.4 Bestimmung des Blutdruckes und der Herzfrequenz**

Sowohl die kontinuierliche Registrierung des systolischen und diastolischen Blutdruckes als auch der Herzfrequenz erfolgte während des gesamten Versuchsablaufes mittels eines Schreibers (WKK, 280R, Kaltbrunn, Schweiz).

### **2.4.5 Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen in Urin und Plasma**

In die 2,0 ml PE-Gefäße wurden, nachdem 2,0 ml einer Lithiumlösung (Standard Lithiumlösung, Fa. Eppendorf, Hamburg) vorgelegt wurden, jeweils  $10 \mu\text{l}$  aus den Urinproben pipettiert. Von den Plasmaproben wurden jeweils  $10 \mu\text{l}$  mit nur 1,0 ml Lithiumlösung versetzt. Alle Proben mussten vor ihrer Verarbeitung gemischt und abzentrifugiert werden. Für jeden Wert wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt und die Elektrolytkonzentrationen mittels eines Flammenphotometers (Elex 6361, Fa. Eppendorf, Hamburg) bestimmt. Vor jeder Messung war eine Kalibrierung des Gerätes unter Verwendung von Standards, die ebenfalls im Verhältnis 1:200 (Urin) und 1:100 (Plasma) verdünnt wurden, erforderlich. Bei Werten, die sich nicht innerhalb des Messbereiches befanden, erfolgte zunächst eine Verdünnung der Proben im Ver-

hältnis 1:400. Zur Berechnung der Elektrolytkonzentrationen (mmol/l) wurde der Mittelwert aus den Werten der Doppelproben bestimmt.

#### **2.4.6 Bestimmung der [<sup>3</sup>H]-Inulin Konzentration in Urin und Plasma**

Aus den gewonnenen Urin- und Plasmaproben, die das für die Bestimmung der GFR notwendige mit Tritium markierte Inulin enthielten, wurden jeweils 10 µl in Szintillationsmessgefäße (Midi-Vial, Fa. Packard, Groningen, Niederlande) pipettiert, in welche zuvor 5,0 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Fa. Packard, Groningen, Niederlande) vorgelegt wurden. Die Szintillationsflüssigkeit diente der Umwandlung der Energie in Lichtblitze, die beim radioaktiven Zerfall von [<sup>3</sup>H] freigesetzt wurde. Dabei wurden für die Bestimmung der Aktivität in Urin und Plasma jeweils Doppelproben durchgeführt. Die Messgefäße wurden mit einem Deckel verschlossen, vorsichtig geschüttelt und zur automatischen Messung in den Szintillationszähler (2550TR, Fa. Packard) gestellt.

#### **2.4.7 Bestimmung der Dopaminkonzentration in den Nieren**

Für die Nierenextraktion wurden 12 ml Plastikröhrchen mit 2 ml 4 %iger Sulfo-salicylsäure befüllt und auf Eis gestellt. Im Anschluss daran wurden darin die bei -80 °C tiefgefrorenen Nieren mittels Ultra-Turrax T25 (Fa. Janke & Kunkel, Staufen), bei 24000 U/min zerkleinert und das Gewebe vollständig homogenisiert. Im Folgenden wurden die Proben mit 100 µl/g Niere 3,4-Dihydroxybenzylamin (DHBA) versetzt. Das DHBA diente als interner Standard bei der Katecholaminbestimmung und wies eine Konzentration von 1000 ng/ml auf. Parallel dazu wurden Katecholaminstandards mit einer Konzentration von 100 ng/ml angesetzt, wobei 2-mal je 500 µl Katecholaminstandard mit 25 µl DHBA und 25 µl Aqua bidest. versetzt wurden. Im Folgenden wurden alle Proben und Standards kurz gemischt (IKA-MS2 Minishaker, Fa. Janke & Kunkel, Staufen) und 1 h auf Eis gesetzt. Nach Abschluss dieser Zeit erfolgte erneut eine kurze Durchmischung und Zentrifugation für 10 min bei 4000 U/min (Hettich-Zentrifuge, Rotixa/K, Fa. Hettich, Tuttlingen). Es wurden Doppelproben herge-

stellt, indem 2-mal je 500 µl des Probenüberstandes abgenommen und in 2 ml Eppendorf-Cups gegeben wurden. Den Proben wurde 1 ml Tris-Puffer zugesetzt und der pH-Wert mit Hilfe eines geeichten pH-Meters (digital pH/ millivolt meter, Orion Research Inc. Cambridge, USA) bestimmt. Nachdem der pH-Wert mittels einer 2 molaren Natronlauge, oder 1 molaren HCl auf einen Wert von 8,6 eingestellt wurde, wurde den Proben jeweils ein Messlöffel getrocknetes, neutrales Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> als Adsorptionsmedium zugesetzt (ca. 90 mg) und die Proben im Anschluss daran 15 min geschüttelt (IKA-Vibrax Schüttler-1400, Fa. Janke & Kunkel, Staufen) und abzentrifugiert (Mikro Hettich Zentrifuge, Fa. Hettich, Tuttlingen). Nachdem der Überstand in den radioaktiven Abfall verworfen wurde, erfolgte der zweite Waschvorgang, indem dem Sediment 1 ml Aqua bidest zupipettiert wurde und eine erneute Durchmischung stattfand. Die Proben wurden daraufhin ein weiteres Mal abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mit 2-mal 500 µl A. bidest. in die Extraktionssäulen überführt. Die Säulen wurden kurz, für 30 sec, geschüttelt und unter Öffnen in Reagenzgläser gestellt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation (Hettich Zentrifuge, Rotixa/K, Fa. Hettich, Tuttlingen) für 10 min bei 2500 U/min und ein Verwerfen des Zentrifugats. Im Anschluss daran wurde den wieder verschlossenen Säulen je 300 µl 0,1 molare H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> zugegeben, um eine Desorption der Katecholamine vom Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> zu erreichen. Daraufhin erfolgte eine erneute Durchmischung (IKA-Vibrax Schüttler-1400, Fa. Janke & Kunkel, Staufen) für 10 min und das Hängen der geöffneten Säulen über die in saubere Reagenzgläser gestellten, beschrifteten Plastikvials. Nach erneuter Zentrifugation (Hettich Zentrifuge, Rotixa/K, Fa. Hettich, Tuttlingen) wurden diese anschließend mit Aludeckeln verschlossen und zur Messung in die HPLC (high pressure liquid chromatography) gestellt.

Die HPLC wurde zur quantitativen Bestimmung der Katecholamine herangezogen, indem die Katecholamine mit einem polaren Fließmittel über eine unpolare, stationäre Chromatographiesäule geschickt wurden. Die Katecholamine wiesen aufgrund ihrer unterschiedlichen Polarität, die für sie charakteristischen Retentionszeiten auf und wurden mittels eines elektrochemischen Detektors registriert. Das Chromatographiesystem bestand aus einem automatischen Probengeber (S 5200 Scample Injector, Fa. Sykam, Fürstenfeldbruck), einer

reversed phase C 18-Trennsäule (Nucleosil 5  $\mu\text{m}$ , 125x4mm, Fa. Grom, Herrenberg), einer Hochdruckpumpe (S 1100, Fa. Sykam, Fürstfeldbruck) und einem elektrochemischen Detektor (EP 30, Fa. Biometra, Göttingen). Die Steuerung und Auswertung erfolgte mittels eines Computers über eine spezielle Software, Axxi-Chrom 737 (Fa. Axxiom, Calabasas, USA).

## 2.5 Berechnungen

### 2.5.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) in [mmHg] wird aus den über den Schnellschreiber aufgezeichneten Werten des systolischen und diastolischen Blutdruckes ( $P_{\text{Sys}}$ ,  $P_{\text{Dias}}$ ) wie folgt ermittelt:

$$\text{MAP} = (P_{\text{Sys}} - P_{\text{Dias}} / 3) + P_{\text{Dias}}$$

### 2.5.2 Urinzeitvolumen

Das Urinzeitvolumen (UZV) in [ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  NFG] veranschaulicht das ausgeschiedene Urinvolumen (UV in [ml]) pro Dauer der Sammelperiode ( $D_S$  in [min]) und wird auf das Nierenfeuchtgewicht (NFG) bezogen.

$$\text{UZV} = (\text{UV} \times 1000) / (D_S \times \text{NFG})$$

### 2.5.3 Glomeruläre Filtrationsrate

Für die Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) in [ $\text{ml}/\text{min}/\text{g}$  NFG] wird die [ $^3\text{H}$ ]-Aktivität in Urin ( $A_{\text{Urin}}$ ) und Plasma ( $A_{\text{Plasma}}$ ), sowie das Urinzeitvolumen (UV) jeder Sammelperiode ( $D_S$ ) errechnet und auf das Nierenfeucht-

gewicht (NFG) bezogen. Somit ergibt sich für die GFR folgende Standardformel:

$$GFR = (A_{\text{Urin}} \times UV) / (A_{\text{Plasma}} \times D_S \times \text{NFG})$$

#### 2.5.4 Absolute renale Ausscheidung von Natrium und Kalium

Für die Bestimmung der absoluten renalen Natriumexkretion ( $U_{\text{Na}}V$  in  $[\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NFG}]$ ) im Clearanceversuch wird folgende Formel verwendet:

$$U_{\text{Na}}V = ([\text{Na}]_{\text{Urin}} \times UV) / \text{NFG}$$

Da es während der Stoffwechselkäfingversuche zu keinen Nierenentnahmen kam, bezieht sich das  $U_{\text{Na}}V$  dieser Versuche nicht auf das NFG, sondern auf 100 g Körpergewicht.

Ebenso gilt die oben stehende Formel für die Berechnung der renalen Exkretion von Kalium ( $U_{\text{K}}V$ ).

#### 2.5.5 Fraktionelle renale Natriumausscheidung

Die fraktionelle renale Natriumausscheidung ( $FE_{\text{Na}}$ ) stellt ein Maß für die tubuläre Resorptionsleistung der Niere dar und wird in Prozent (%) angegeben. Sie wird wie folgt berechnet:

$$FE_{\text{Na}} = (U_{\text{Na}}V \times 100) / ([\text{Na}]_{\text{Plasma}} \times GFR)$$

## 2.6 Statistik

Pro Versuchstier wurden zunächst die Daten berechnet und im Anschluss daran die Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of means) der jeweiligen Gruppen

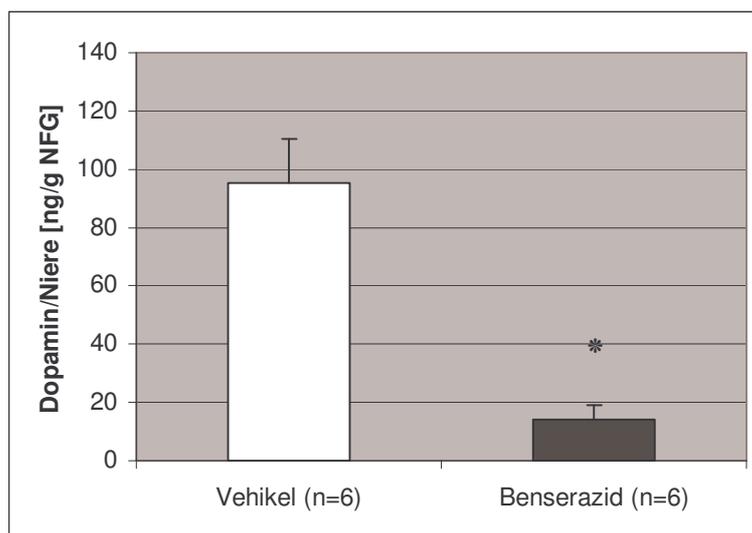
bestimmt. Hierfür wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Excel 98 Version (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) herangezogen. Für die statistische Beurteilung der ermittelten Ergebnisse, diente das Statistikprogramm In-Stat.V3.0 (Graph Pad Inc., USA), mit welchem eine Varianzanalyse mit dem Bonferroni post-test durchgeführt wurde. Dabei stellte der p-Wert, bei welchem ab einem Wert von  $<0,05$  die Nullhypothese verworfen wurde, das Maß für die statistische Signifikanz dar. Als Nullhypothese galt hierbei die Gleichheit der verglichenen Werte.

Es wurden jeweils die Kontrollgruppen (CON) und diabetischen Gruppen (DM) untereinander verglichen, sowie die hyperglykämischen Tiere (DM) mit den entsprechenden CON-Gruppen. Außerdem wurden die Ergebnisse der Vorperioden (VHC) denen der Hauptperioden (DPAT), mittels eines gepaarten t-Testes, gegenübergestellt.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Dopamingehalt in der Niere

In einer Vorversuchsreihe, in der geklärt werden sollte, ob Benserazid (BZD) tatsächlich den Dopamingehalt in der Niere (ng/g Nierenfeuchtgewicht (NFG)) reduziert, wurden zwei Tiergruppen, eine Vehikel und eine Benserazid-Gruppe mit einer jeweiligen Anzahl von sechs Tieren (n=6), unter den gleichen Bedingungen operiert wie die Tiere, die dann für die eigentlichen Clearanceversuche herangezogen wurden. Den Tieren wurden nach Beendigung der Clearanceversuche die Nieren, wie in Kapitel 2.3.3.2 beschrieben, entnommen und der Dopamingehalt mittels HPLC bestimmt. Dabei konnte gezeigt werden, dass es unter Einsatz von BZD zu einer signifikanten Reduktion des Dopamingehaltes in der Niere um den Faktor 10 kam ( $p < 0,05$  vs. Vehikel).



**Abbildung 3.1:** Dopamingehalt in der Niere. Es wurde eine Vehikel-Gruppe (n=6) mit einer Benserazid-Gruppe (n=6) verglichen. \* $p < 0,05$  vs. Vehikel.

## **3.2 Untersuchungen an einem normotensiven Rattenmodell**

### **3.2.1 Stoffwechselkäfigversuche bei wachen SD-Ratten**

Die Ergebnisse der Stoffwechselkäfigversuche sind in Tabelle 3.1 dargestellt. Dabei sei zu den Stoffwechselkäfigversuchen noch anzumerken, dass die BZD-Versuchsgruppen lediglich während der Clearanceversuche mit Benserazid behandelt wurden und nicht schon vor oder während der Stoffwechselkäfigversuche, so dass diese dazu dienten die Unterschiede zwischen den diabetischen und normoglykämischen Tieren deutlich zu machen (siehe Kapitel 2.3.2.3).

### 3. Ergebnisse

Gruppe	TG [g]	BZ [mg/dl]	FA [g/24h]	TV [ml/24h]
CON-SD-VHC (n=8)	279,7±14,4	102,0±5,3	23,8±2,2	28,2±2,6
CON-SD-BZD (n=8)	280,3±14,7	98,7±5,2	26,2±1,9	29,1±2,4
DM-SD-VHC (n=8)	278,9±9,3	450,3±38,6*	56,7±6,8*	168,9±30,0*
DM-SD-BZD (n=7)	286,6±10,4	448,7±17,5*	53,9±5,0*	192,6±29,9*

Gruppe	UV [ml/24h]	U <sub>NaV</sub> [mmol/24h/100g]	U <sub>NaV</sub> [μmol/min/100g]	U <sub>KV</sub> [mmol/24h/100g]	U <sub>KV</sub> [μmol/min/100g]
CON-SD-VHC (n=8)	12,44±0,66	0,76±0,08	0,53±0,05	1,83±0,18	1,27±0,12
CON-SD-BZD (n=8)	12,35±0,57	0,76±0,08	0,53±0,05	1,84±0,17	1,28±0,12
DM-SD-VHC (n=8)	163,67±23,01*	1,04±0,14	0,72±0,10	2,82±0,24*	1,96±0,17*
DM-SD-BZD (n=7)	186,09±26,43*	1,16±0,09*	0,80±0,07*	2,93±0,25*	2,04±0,17*

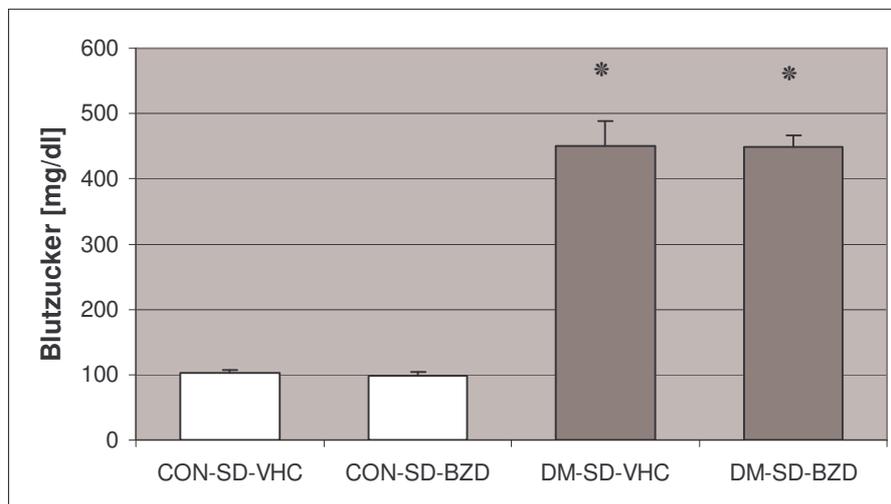
**Tabelle 3.1:** Die Ergebnisse der Stoffwechselläufigkeitsversuche mit wachen Ratten des Stammes Sprague-Dawley (SD). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM. Die Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2. \* p<0,05 vs. CON entsprechender Versuchsgruppen.

### 3.2.1.1 Tiergewicht

Zum Lieferungszeitpunkt und somit vor Injizierung des Streptozotocins bzw. Citratpuffers wiesen die Sprague-Dawley-Ratten ein Körpergewicht zwischen 225-250 g auf. Zum Zeitpunkt der Durchführung der Stoffwechselkäfigversuche, die 14 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus bzw. nach Citratgabe erfolgten, konnten bei den Sprague-Dawley-Ratten keine signifikanten Unterschiede der Tiergewichte zwischen den Kontrollgruppen und den diabetischen Tieren beobachtet werden. Dabei wiesen die Tiere aller Versuchsgruppen ein etwa identisches Gewicht, das im Mittel um die 280 g lag, auf.

### 3.2.1.2 Blutglukose

Innerhalb der normoglykämischen Kontrollgruppen der Sprague-Dawley-Ratten konnten nahezu identische Blutglukose-Werte festgestellt werden, die zwischen 99 und 102 mg/dl lagen. Der Effekt der Streptozotocin-Gabe bei den diabetischen Tieren spiegelte sich in einer signifikanten Zunahme der Blutglukosekonzentration auf Mittelwerte um die 450 mg/dl wider.



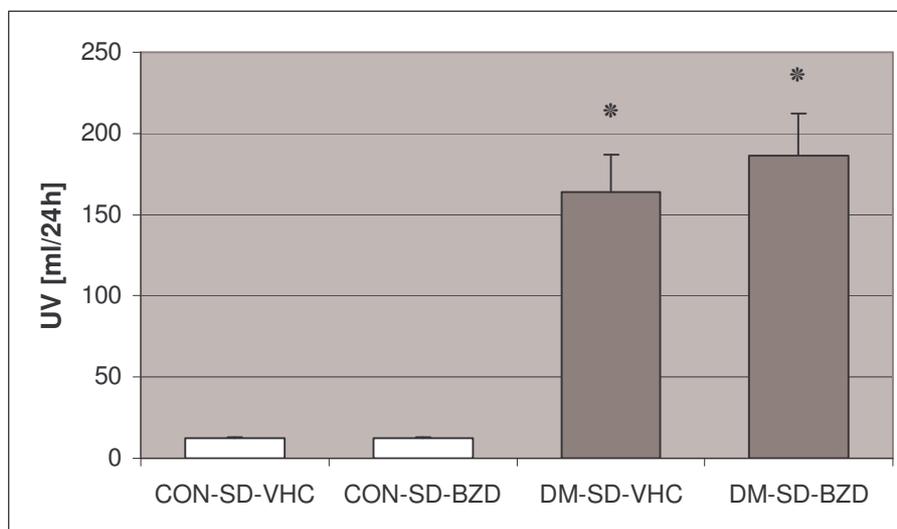
**Abbildung 3.2** Blutglukosewerte der normoglykämischen Kontrollgruppen (CON) und diabetischen Gruppen (DM) des Stammes Sprague-Dawley (SD) im Stoffwechselkäfigversuch. Es wurden jeweils die Kontrollgruppen (CON-SD-VHC, CON-SD-BZD) mit den entsprechenden hyperglykämischen Tieren verglichen (DM-SD-VHC, DM-SD-BZD). \* $p < 0,05$  vs. entspr. CON.

### 3.2.1.3 Futteraufnahme und Trinkvolumen

Wie zu erwarten war, wiesen die hyperglykämischen Tiergruppen die für den Diabetes mellitus typischen Parameter wie Polyphagie und Polydipsie auf. Dabei konnte bei den diabetischen Sprague-Dawley-Ratten eine signifikante Zunahme der Futteraufnahme um das 2- bis 2,5-fache im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrolltieren verzeichnet werden. Ebenfalls spiegelte sich die Polydipsie der diabetischen SD-Ratten in einer signifikanten Trinkvolumen-Steigerung um das ca. 6-fache der Kontrollgruppen wider.

### 3.2.1.4 Urinvolumina

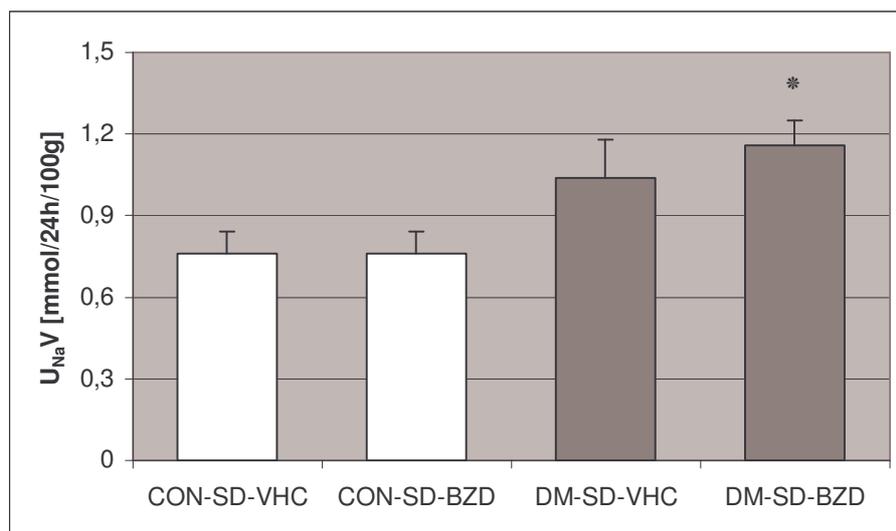
Während die Mittelwerte der Urinvolumina beider Kontrollgruppen in etwa identisch um die 12 ml/24 h lagen, wiesen die hyperglykämischen SD-Tiere ein um das ca. 14-fach gesteigertes Urinvolumen auf ( $p < 0,05$  vs. entsprechender CON-SD), welches das Signifikanzniveau erreichte.



**Abbildung 3.3:** Die Urinvolumina (UV) der Sprague-Dawley-Ratten (SD) im Stoffwechselkäfigversuch. Es wurden jeweils die Kontrollgruppen (CON-SD-VHC, CON-SD-BZD) mit den entsprechenden hyperglykämischen Tieren (DM-SD-VHC, DM-SD-BZD) verglichen. \* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON.

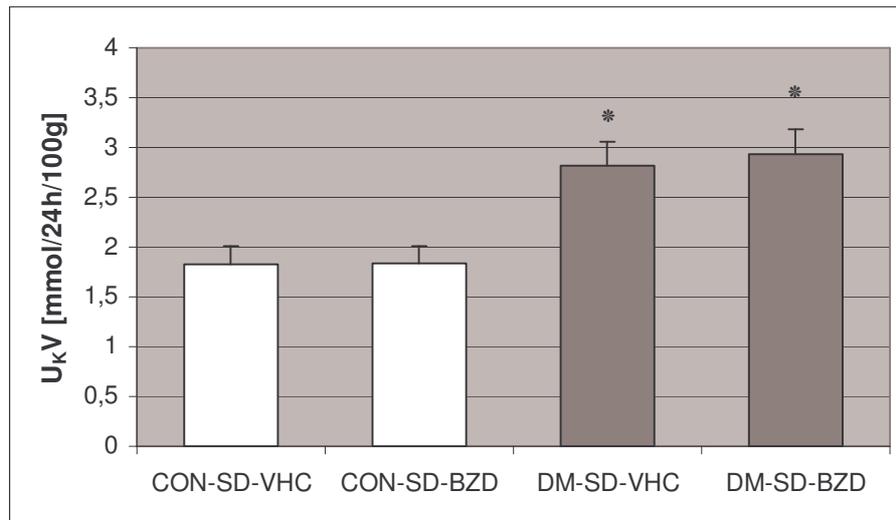
## 3.2.1.5 Renale Natrium- und Kaliumausscheidung

Innerhalb der jeweiligen Kontrollgruppen (CON-SD-VHC, CON-SD-BZD) und diabetischen Gruppen (DM-SD-VHC, DM-SD-BZD) konnten keine erheblichen Unterschiede bezüglich der Elektrolytausscheidung von Natrium und Kalium [mmol/24 h/100 g] im Urin beobachtet werden. Im Gegenzug dazu wiesen die diabetischen Sprague-Dawley-Ratten, im Vergleich zu ihren normoglykämischen Kontrolltieren eine signifikant erhöhte Ausscheidung der oben benannten Elektrolyte auf. Eine Ausnahme machte dabei die diabetische Vehikelgruppe, deren renale Natriumausscheidung knapp das Signifikanzniveau verfehlte.



**Abbildung 3.4:** Die Natriumausscheidung ( $U_{NaV}$ ) der Sprague-Dawley-Ratten (SD) im Stoffwechselkäfigversuch. Es wurden jeweils die Kontrollgruppen (CON-SD-VHC, CON-SD-BZD) mit den entsprechenden hyperglykämischen Gruppen (DM-SD-VHC, DM-SD-BZD) verglichen.

\* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON .



**Abbildung 3.5:** Die Kaliumausscheidung ( $U_K V$ ) der Sprague-Dawley-Ratten (SD) im Stoffwechselkäfigversuch. Es wurden die Kontrollgruppen (CON-SD-VHC, CON-SD-BZD) mit den entsprechenden hyperglykämischen Tieren (DM-SD-VHC, DM-SD-BZD) verglichen. \* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON.

### 3.2.2 Clearanceversuche an narkotisierten SD-Ratten

Die Ergebnisse der Clearanceversuche sind in der Tabelle 3.2 dargestellt.

### 3. Ergebnisse

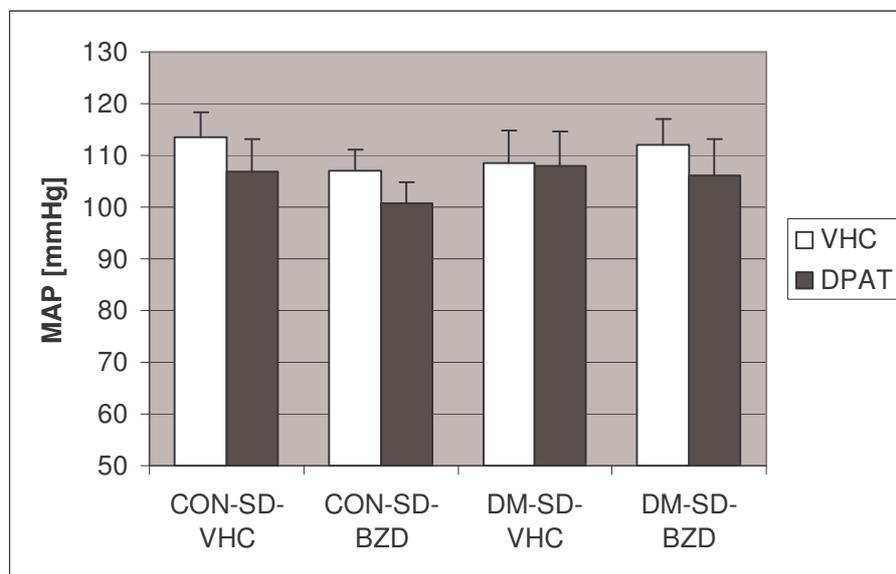
Gruppe	Perioden	Hkt [%]	MAP [mmHg]	HF [1/min]	Na Plasma [mmol/l]	K Plasma [mmol/l]
CON-SD-VHC (n=8)	VHC	43,5±0,7	113,5±4,9	397,5±9,4	142,4±0,9	4,90±0,12
	DPAT	41,4±1,0	106,9±6,2	386,3±6,1	140,7±0,7	4,43±0,10 <sup>Δ</sup>
CON-SD-BZD (n=8)	VHC	43,0±0,9	107,1±4,0	378,8±10,3	142,3±0,9	5,28±0,20
	DPAT	41,6±0,7	100,7±4,2	368,1±12,3	140,9±0,8	4,63±0,31
DM-SD-VHC (n=8)	VHC	45,9±0,7*	108,6±6,3	365,0±9,9*	140,3±1,1	4,70±0,13
	DPAT	44,6±0,7	107,9±6,7	340,6±10,2	137,1±1,8	4,50±0,19
DM-SD-BZD (n=7)	VHC	46,0±0,8*	112,1±5,0	331,4±11,2**	138,5±0,9*	4,48±0,20*
	DPAT	45,3±0,8	106,2±6,9	309,3±12,6	136,8±1,4	3,93±0,21

Gruppe	Perioden	GFR	UV	U <sub>Na</sub> V	FE <sub>Na</sub>	U <sub>K</sub> V
		[ml/min/100g]	[ml/min/100g]	[μmol/min/100g]	[%]	[μmol/min/100g]
CON-SD-VHC (n=8)	VHC	0,95±0,02	4,14±0,61	0,39±0,09	0,30±0,07	1,26±0,12
	DPAT	0,86±0,02 <sup>Δ</sup>	5,49±2,17	0,79±0,26	0,66±0,23	0,98±0,13
CON-SD-BZD (n=8)	VHC	0,92±0,06	4,14±0,85	0,47±0,17	0,33±0,11	1,13±0,16
	DPAT	0,91±0,04	8,10±2,66	1,03±0,34	0,73±0,24	1,00±0,05
DM-SD-VHC (n=8)	VHC	1,24±0,08*	9,75±2,65	0,77±0,25	0,40±0,09	0,93±0,15
	DPAT	1,18±0,06	11,01±2,66	1,56±0,38	0,91±0,18 <sup>Δ</sup>	1,03±0,11
DM-SD-BZD (n=7)	VHC	0,95±0,05 <sup>+</sup>	4,79±0,76	0,39±0,08	0,28±0,07	0,47±0,04**
	DPAT	0,97±0,09	5,82±0,51	1,17±0,26 <sup>Δ</sup>	0,82±0,14 <sup>Δ</sup>	0,63±0,10

**Tabelle 3.2:** Die Ergebnisse der Clearanceversuche mit narkotisierten SD-Ratten. Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM. Die Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2. \* p<0,05 vs. CON entsprechender Versuchsgruppen, + p<0,05 vs. DM-VHC, Δ p<0,05 vs. VHC.

### 3.2.2.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP in mmHg) lag bei den Sprague-Dawley-Ratten (SD) aller Versuchsgruppen, innerhalb der beiden Vorperioden, bei ähnlichen Mittelwerten zwischen 107-114 mmHg. In den beiden Hauptperioden, unter der Gabe von 7-Hydroxy-DPAT, konnte im Mittel ein Druckabfall um ca. 7 mmHg verzeichnet werden, der jedoch nicht signifikant war. Eine Ausnahme machte dabei die diabetische Vehikelgruppe, die nahezu keine Unterschiede bezüglich der MAP-Werte in den Vor- und Hauptperioden erkennen ließ.



**Abbildung 3.6:** Die mittleren arteriellen Blutdruckwerte (MAP) der Sprague-Dawley-Ratten (SD) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) innerhalb der gleichen Gruppe.

### 3.2.2.2 Herzfrequenz

Bezüglich der Herzfrequenz (HF), lagen die Kontrollgruppen im Mittel zwischen ca. 380-400 Schlägen pro Minute. Die entsprechenden, zu den Kontrollgruppen zugehörigen diabetischen Gruppen, wiesen signifikant niedrigere Pulsraten auf ( $p < 0,05$  vs. entsprechende CON). Weiterhin konnte wiederum eine signifikant geringere Herzfrequenz bei der diabetischen Benserazid-Gruppe im Vergleich

zur diabetischen Vehikel-Gruppe beobachtet werden. Auch unter DPAT-Gabe wurde eine Reduktion der Herzfrequenz um bis zu 20 Schläge pro Minute festgestellt. Die Unterschiede waren jedoch nicht signifikant.

#### 3.2.2.3 Hämatokrit

Innerhalb der SD-Kontrollgruppen lag der Hämatokrit (Hkt) identisch um die 43 %, wobei die entsprechenden hyperglykämischen SD-Versuchsgruppen einen signifikant höheren Hämatokrit mit Mittelwerten zwischen 45-46 % aufwiesen ( $p < 0,05$  vs. CON). Weiterhin konnte eine Reduktion des Hämatokrits von den Vorperioden auf die Hauptperioden beobachtet werden, die jedoch das Signifikanzniveau nicht erreichte.

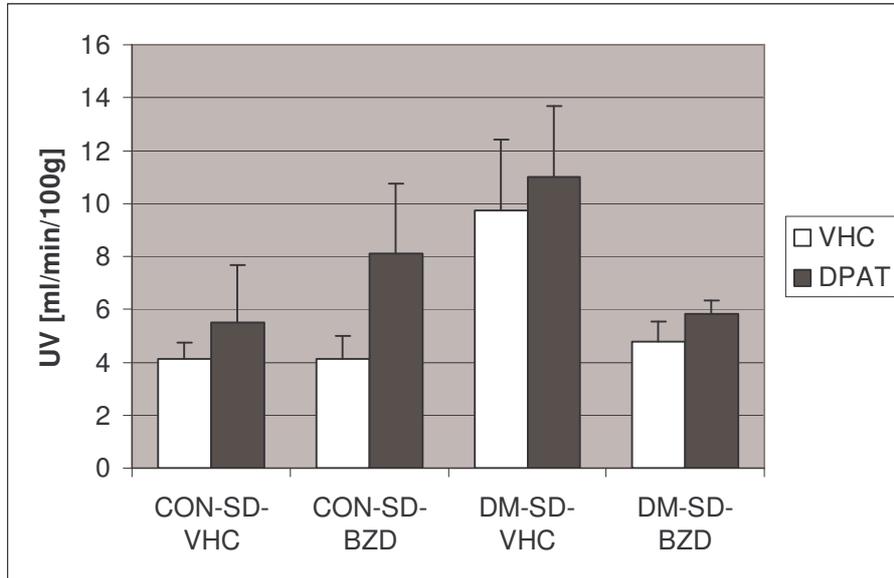
#### 3.2.2.4 Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma

Bezüglich der Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma zeigten sich bei den SD-Versuchstieren keine Unterschiede, mit Ausnahme der diabetischen Benserazid-Gruppe, die im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe signifikant geringere Elektrolytkonzentrationen aufwies ( $p < 0,05$  vs. CON). Zum anderen wurden in den Hauptperioden, unter DPAT-Gabe, geringere Konzentrationen der oben benannten Parameter im Vergleich zu den Vorperioden beobachtet. Dabei wurde innerhalb der CON-SD-VHC-Gruppe bezüglich der Kaliumkonzentration das Signifikanzniveau erreicht.

#### 3.2.2.5 Urinvolumen

Die beiden Kontrollgruppen (CON-SD-VHC, CON-SD-BZD) der Sprague-Dawley-Ratten und die zugehörige diabetische Benserazid-Versuchsgruppe (DM-SD-BZD) wiesen in den Vorperioden nahezu identische Urinvolumina, die im Mittel zwischen 4,14-4,79 ml/min/100 g lagen, auf. Bei den entsprechenden hyperglykämischen Vehikel-Tieren (DM-SD-VHC) konnte eine, etwa um das doppelte gesteigerte Urinausscheidung, die knapp das Signifikanzniveau verfehlte, beobachtet werden. Durch die DPAT-Gabe in den beiden Hauptperioden

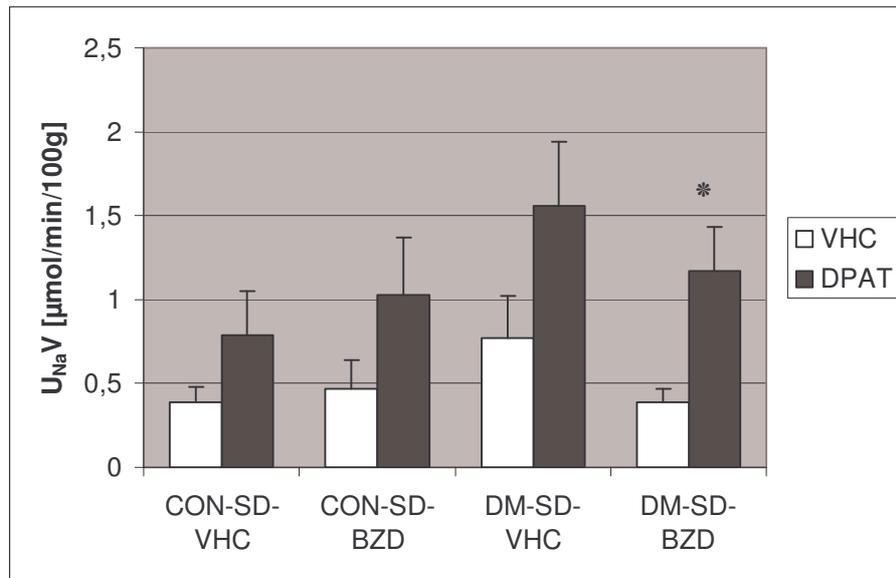
kam es zu einer Zunahme der Urinausscheidung in allen vier SD-Versuchsgruppen um Mittelwerte zwischen ca. 1-4 ml/min/100 g, die jedoch nicht das Signifikanzniveau erreichte.



**Abbildung 3.7:** Die Urinvolumina (UV) der Sprague-Dawley-Ratten (SD) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) der gleichen Gruppe.

### 3.2.2.6 Renale Natrium- und Kaliumausscheidung

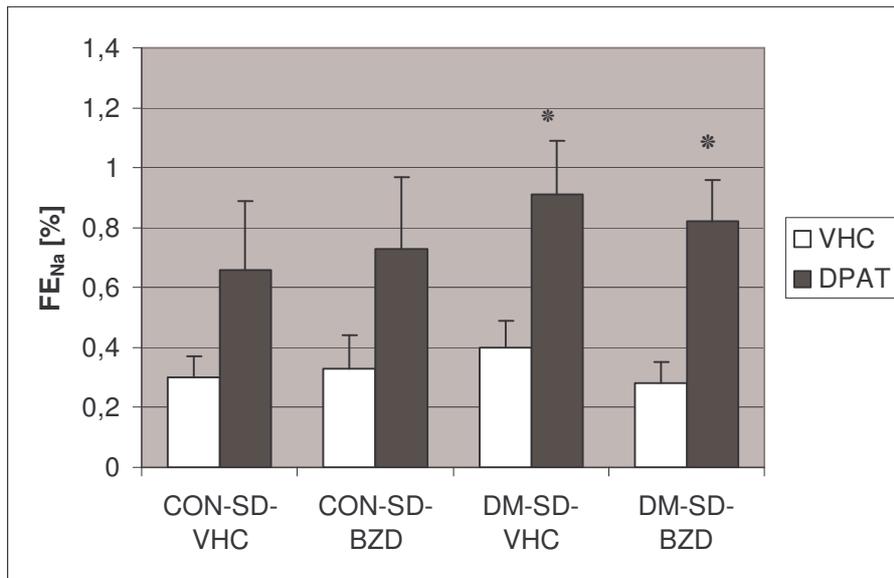
Wie schon beim Urinvolumen zu beobachten war, bestand innerhalb der Vorperioden der SD-Kontrollgruppen (CON-SD) und der diabetischen BZD-Gruppe annähernd eine gleiche Ausscheidungsmenge von Natrium (Mittelwerte zwischen 0,39-0,47  $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{ g}$ ), wohingegen die DM-SD-VHC-Gruppe eine etwa 1,5- bis 2-fach höhere Natriumausscheidung, die nicht signifikant war, aufwies. Bezüglich der Kaliumausscheidung konnte bei der DM-SD-BZD-Gruppe ein signifikant geringerer Mittelwert gegenüber den restlichen Gruppen beobachtet werden. Unter DPAT-Gabe erfolgte innerhalb der CON-SD-Gruppen und der DM-SD-VHC-Gruppe eine etwa 2-fach höhere, jedoch nicht signifikante Natriumausscheidung. Hingegen wurde bei der DM-SD-BZD-Gruppe, bei der eine 3-fach höhere Ausscheidungsmenge zu verzeichnen war, das Signifikanzniveau erreicht.



**Abbildung 3.8:** Die renale Natriumausscheidung ( $U_{NaV}$ ) der Sprague-Dawley-Ratten (SD) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) der gleichen Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. VHC.

### 3.2.2.7 Fraktionelle renale Natriumausscheidung

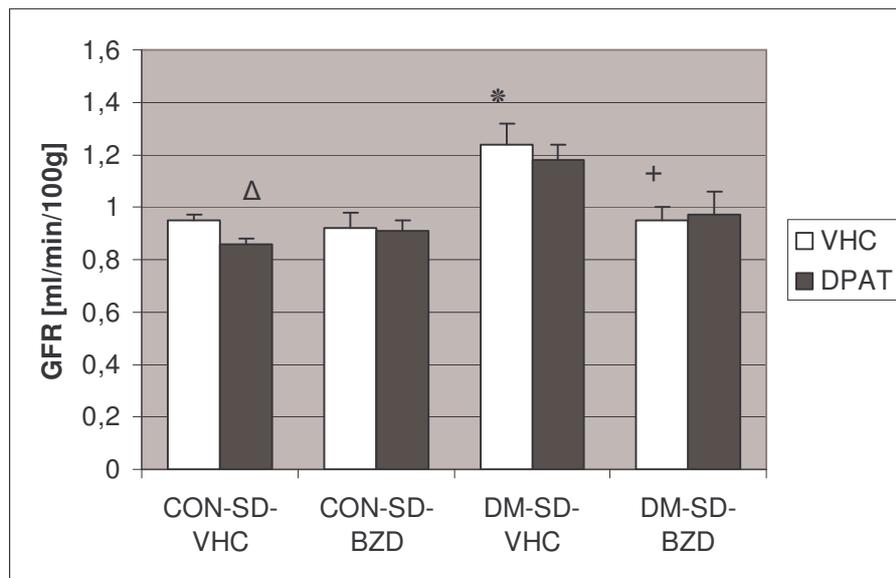
Die fraktionelle renale Natriumausscheidung ( $FE_{Na}$ ) unterschied sich in den Vorperioden der SD-Versuchsgruppen kaum, so dass die Mittelwerte nahezu gleich zwischen 0,28-0,40 % lagen. In den beiden Hauptperioden konnte eine Zunahme der  $FE_{Na}$  um das 2- bis 3-fache beobachtet werden, wobei dieser Anstieg innerhalb der diabetischen Gruppen das Signifikanzniveau erreichte ( $p < 0,05$  vs. VHC).



**Abbildung 3.9:** Die fraktionelle renale Natriumausscheidung ( $FE_{Na}$ ) der Sprague-Dawley-Ratten (SD) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) der gleichen Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. VHC.

### 3.2.2.8 Glomeruläre Filtrationsrate

Innerhalb der Kontrollgruppen der Spague-Dawley-Ratten (SD) wurde durch die Behandlung mit Benserazid keine Veränderung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) festgestellt, so dass die GFR-Werte in beiden Kontrollgruppen etwa identisch um die 0,9 ml/min/100 g lagen. Im Vergleich dazu kam es in der DM-SD-VHC-Gruppe zu einem signifikanten Anstieg der GFR um ca. 30 %, so dass diese Gruppe mit einem Mittelwert von 1,2 ml/min/100 g eine glomeruläre Hyperfiltration aufwies ( $p < 0,05$  vs. CON). Im Gegenzug dazu konnte in der DM-SD-BZD-Versuchsgruppe durch die Benserazidbehandlung eine signifikante Reduktion der GFR im Vergleich zur entsprechenden Vehikel-Gruppe erzielt werden ( $p < 0,05$  vs. DM-SD-VHC). Damit glichen sich die GFR-Werte dieser diabetischen Gruppe an die der Kontrolltiere an und lagen ebenfalls um die 0,9 ml/min/100 g. Durch die DPAT-Gabe in den beiden Hauptperioden kam es in allen vier Versuchsgruppen zu einer Abnahme der GFR, die sogar bei der CON-SD-VHC-Gruppe das Signifikanzniveau erreichte.



**Abbildung 3.10:** Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Sprague-Dawley-Ratten (SD) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) der gleichen Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON, +  $p < 0,05$  vs. DM-SD-VHC,  $\Delta$   $p < 0,05$  vs. VHC.

### 3.3 Untersuchungen an einem hypertensiven Rattenmodell

#### 3.3.1 Stoffwechsellkäfigversuche bei wachen SHR- und WKY-Ratten

Die Ergebnisse der Stoffwechsellkäfigversuche bei wachen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und ihrer normotensiven Kontrollgruppe (WKY) sind in der Tabelle 3.3. dargestellt.

### 3. Ergebnisse

Gruppe	TG [g]	BZ [mg/dl]	FA [g/24h]	TV [ml/24h]	RR <sub>Sys</sub> [mmHg]
CON-WKY-BZD (n=7)	255,6±4,6	95,1±1,8	26,2±1,7	22,6±2,9	109,2±6,3
CON-SHR-BZD (n=8)	263,2±6,0	96,1±3,2	25,5±1,5	24,3±3,2	159,5±2,8 <sup>#</sup>
DM-WKY-VHC (n=8)	239,7±8,3	453,5±13,1	53,1±4,4	134,9±9,1	116,2±9,4
DM-SHR-VHC (n=7)	215,7±5,3 <sup>+</sup>	458,1±24,5	38,7±5,4	124,2±22,0	175,7±3,2 <sup>+</sup>
DM-WKY-BZD (n=8)	233,2±5,9 <sup>*</sup>	454,0±14,7 <sup>*</sup>	54,6±3,6 <sup>*</sup>	142,0±10,7 <sup>*</sup>	115,3±4,8
DM-SHR-BZD (n=7)	231,4±6,2 <sup>*</sup>	451,5±22,5 <sup>*</sup>	45,4±4,5 <sup>*</sup>	119,4±9,8 <sup>*</sup>	147,8±7,9 <sup>oΔ</sup>

Gruppe	UV [ml/24h]	U <sub>Na</sub> V [mmol/24h/100g]	U <sub>Na</sub> V [μmol/min/100g]	U <sub>K</sub> V [mmol/24h/100g]	U <sub>K</sub> V [μmol/min/100g]
CON-WKY-BZD (n=7)	8,58±0,81	0,68±0,03	0,47±0,02	1,53±0,10	1,07±0,07
CON-SHR-BZD (n=8)	10,36±1,03	0,57±0,08	0,40±0,06	1,28±0,12	0,89±0,09
DM-WKY-VHC (n=8)	116,26±7,60	1,01±0,11	0,70±0,08	2,35±0,16	1,63±0,11
DM-SHR-VHC (n=7)	104,35±15,37	0,91±0,08	0,63±0,05	2,33±0,23	1,62±0,16
DM-WKY-BZD (n=8)	118,88±10,42 <sup>*</sup>	0,91±0,09 <sup>*</sup>	0,63±0,06 <sup>*</sup>	2,42±0,18 <sup>*</sup>	1,68±0,12 <sup>*</sup>
DM-SHR-BZD (n=7)	97,68±11,45 <sup>*</sup>	1,02±0,15 <sup>*</sup>	0,71±0,10 <sup>*</sup>	2,19±0,24 <sup>*</sup>	1,52±0,17 <sup>*</sup>

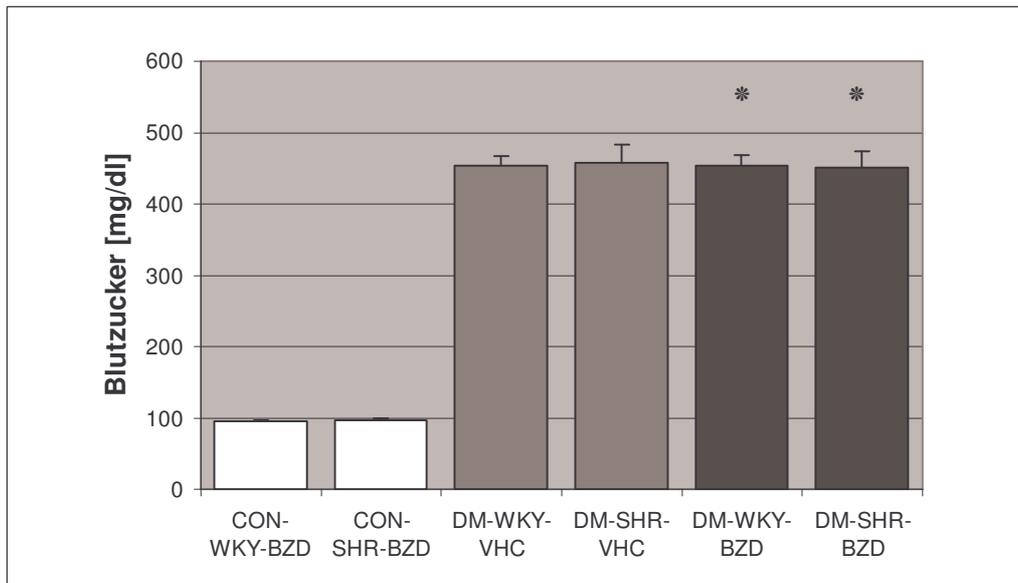
**Tabelle 3.3:** Die Ergebnisse der Stoffwechselkäfigversuche mit wachen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und ihren normotensiven Kontrolltieren (WKY). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM. Die Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2. \* p<0,05 vs. CON entsprechender Versuchsgruppen, # p<0,05 vs. CON-WKY-BZD, + p<0,05 vs. DM-WKY-VHC, ° p<0,05 vs. DM-WKY-BZD, Δ p<0,05 vs. DM-SHR-VHC

#### 3.3.1.1 Tiergewicht

Wie auch die SD-Tiere wiesen sowohl die spontan hypertensiven Ratten (SHR), als auch die normotensiven Kontrolltiere (WKY) ein Lieferungsgewicht zwischen 225-250 g auf. Dabei konnte zu Beginn der Stoffwechselkäfigversuche, die ebenfalls 14 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus bzw. nach Citratgabe erfolgten, bei den Kontrollgruppen der SHR- und WKY-Tiere eine Zunahme ihres Körpergewichtes um ca. 25-30 g im Vergleich zu ihrem Ausgangsgewicht beobachtet werden. Im Gegenzug dazu wiesen die entsprechenden diabetischen Tiere ein signifikant niedrigeres Gewicht auf, so dass bei diesen Tieren eine Konstanthaltung oder leichte Reduktion des Körpergewichtes im Vergleich zum Ausgangsgewicht festgestellt werden konnte.

#### 3.3.1.2 Blutglukose

Ähnlich wie bei den SD-Tieren lagen die Blutglukosewerte der normoglykämischen Kontrollgruppen der SHR- und WKY-Versuchsgruppen im Mittel um die 95 mg/dl. Dabei konnte durch die Streptozotocin-Gabe ebenfalls ein Diabetes mellitus induziert werden, der sich in einer signifikanten Zunahme der Blutglukosekonzentration um Werte zwischen 450 und 460 mg/dl widerspiegelte.



**Abbildung 3.11:** Blutglukosewerte der normoglykämischen Kontrollgruppen (CON) und diabetischen Gruppen (DM) der spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Kyoto-Ratten (WKY). Es wurden jeweils die Kontrollgruppen (CON-WKY-BZD, CON-SHR-BZD) mit den entsprechenden hyperglykämischen Tieren verglichen (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD). \* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON.

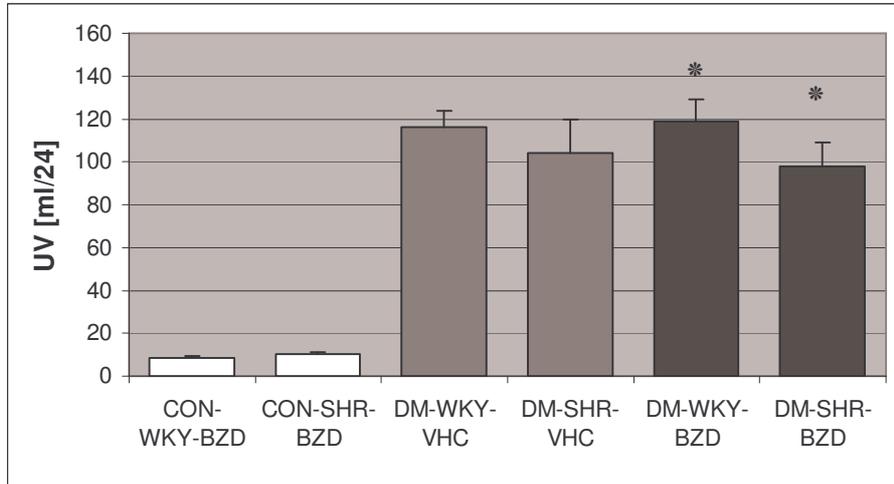
### 3.3.1.3 Futteraufnahme und Trinkvolumen

Während die Kontrollgruppen (CON-WKY-BZD, CON-SHR-BZD) keine Unterschiede bezüglich der Futteraufnahme (FA) und des Trinkvolumens (TV) aufwiesen, konnte bei den entsprechenden diabetischen Tieren (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD) eine signifikante Zunahme der Futteraufnahme um das 2- bis 2,5-fache festgestellt werden. Die Polydipsie der hyperglykämischen Tiere äußerte sich in einer signifikanten Trinkvolumen-Steigerung um das 5- bis 5,5-fache.

### 3.3.1.4 Urinvolumina

Hinsichtlich der Urinvolumina ergaben sich bei den Kontrollgruppen ähnliche Werte, die im Mittel zwischen 8,58 und 10,36 ml/24 h lagen. Dabei kam es bei den diabetischen WKY- und SHR-Tieren zu einem signifikanten Anstieg der Urinausscheidung um das 10- bis 11-fache, wobei die diabetischen SHR-Tiere

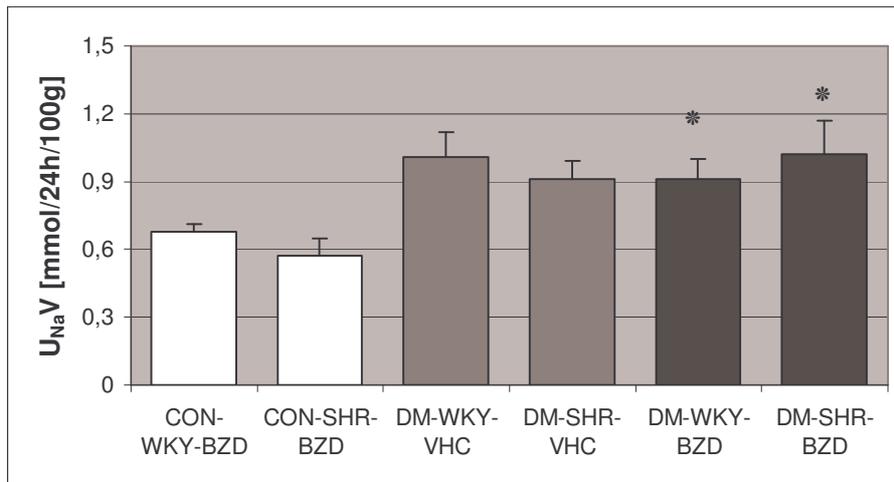
im Vergleich zu ihrer normotensiven Kontrollgruppe (WKY) eine auffallend geringere Ausscheidungstendenz aufwiesen, die jedoch nicht signifikant war.



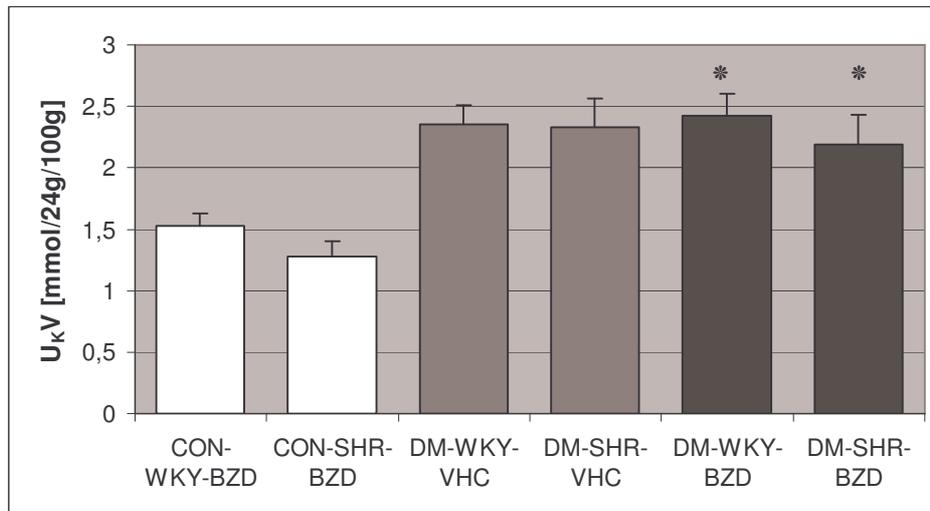
**Abbildung 3.12:** Die Urinvolumina (UV) der normoglykämischen Kontrollgruppen (CON) und diabetischen Gruppen (DM) der spontan hypertensiven Ratten (SHR) und Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) im Stoffwechselläufigversuch. Es wurden die Kontrollgruppen (CON-WKY-BZD, CON-SHR-BZD) mit den entsprechenden hyperglykämischen Tieren (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD) verglichen. \* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON.

### 3.3.1.5 Renale Natrium- und Kaliumausscheidung

Wie auch schon bei den SD-Tieren zu beobachten war, traten weder innerhalb der Kontrollgruppen (CON-WKY-BZD, CON-SHR-BZD) noch der entsprechenden diabetischen Gruppen (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD) erhebliche Unterschiede bezüglich der Natrium- wie auch Kaliumausscheidung im Urin ( $U_{NaV}$ ,  $U_{KV}$ ) auf. Im Gegenzug dazu konnte bei den diabetischen WKY- und SHR-Tieren eine signifikant höhere Ausscheidung der oben benannten Elektrolyte im Vergleich zu ihren normoglykämischen Kontrollgruppen verzeichnet werden.



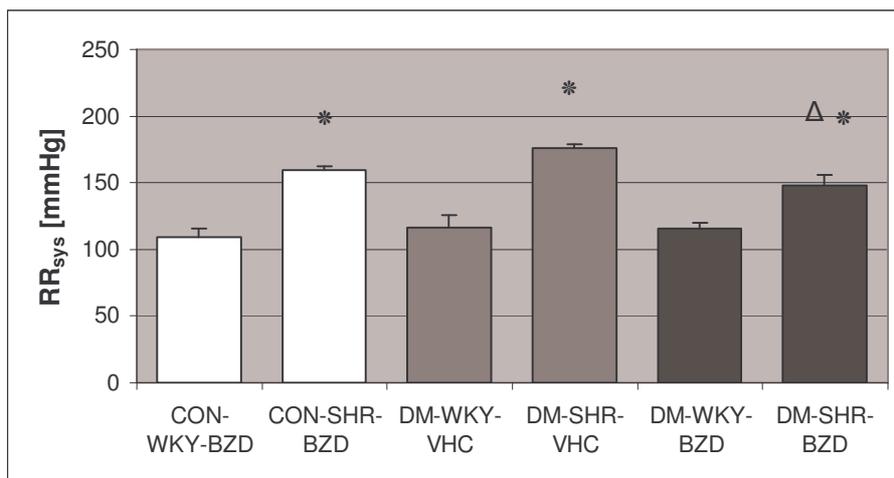
**Abbildung 3.13:** Die Natriumausscheidung ( $U_{NaV}$ ) der Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Stoffwechselkäfigversuch. Es wurden die Kontrollgruppen (CON-WKY-BZD, CON-SHR-BZD) mit den entsprechenden hyperglykämischen Tieren (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD) verglichen. \* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON.



**Abbildung 3.14:** Die Kaliumausscheidung ( $U_{KV}$ ) der Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Stoffwechselkäfigversuch. Es wurden die Kontrollgruppen (CON-WKY-BZD, CON-SHR-BZD) mit den entsprechenden hyperglykämischen Tieren (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD) verglichen. \* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON.

### 3.3.1.6 Systolischer Blutdruck

Bei den Tieren der Versuchsgruppen WKY und SHR wurde jeweils vor Durchführung der Stoffwechselläufigversuche der Blutdruck mittels Schwanzdruckmessung (siehe Kapitel 2.3.1.4) ermittelt. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede innerhalb der WKY-Versuchsgruppen (CON, DM), die Mittelwerte zwischen 109-116 mmHg aufwiesen, festgestellt werden. Lediglich zwischen den diabetischen SHR-Gruppen (DM-SHR-VHC, DM-SHR-BZD) wurden signifikant geringere systolische Blutdruckwerte der Gruppe DM-SHR-BZD im Vergleich zur entsprechenden Vehikelgruppe (DM-SHR-VHC) beobachtet. Weiterhin wiesen die SHR-Versuchsgruppen mit Mittelwerten zwischen 175-147 mmHg signifikant höhere Blutdruckwerte als die entsprechenden WKY-Versuchsgruppen auf.



**Abbildung 3.15:** Die systolischen Blutdruckwerte ( $RR_{sys}$ ) der Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR). Es wurden die normotensiven WKY-Tiere mit den jeweiligen hypertensiven SHR-Tieren verglichen. \* $p < 0,05$  vs. entsprechende WKY,  $\Delta$   $p < 0,05$  vs. DM-SHR-VHC.

### 3.3.2 Clearanceversuche an narkotisierten SHR- und WKY- Ratten

Die Ergebnisse der Clearanceversuche an spontan hypertensiven Ratten (SHR) und ihren normotensiven Kontrollgruppen (WKY) sind in den Tabellen 3.4 und 3.5 dargestellt.

### 3. Ergebnisse

Gruppe	Perioden	Hkt [%]	MAP [mmHg]	HF [1/min]	Na Plasma [mmol/l]	K Plasma [mmol/l]
CON-WKY-BZD (n=7)	VHC	47,3±1,2	110,2±7,5	380,4±13,0	143,7±1,9	4,64±0,22
	DPAT	45,6±1,0	101,1±7,9	350,0±19,7	144,4±1,9	4,19±0,12
CON-SHR-BZD (n=8)	VHC	49,7±0,8	133,1±6,8*	370,6±14,0	152,9±2,2*	5,60±0,30*
	DPAT	47,8±0,6	104,1±6,1 <sup>Δ</sup>	344,7±18,7	150,4±1,9	4,75±0,23 <sup>Δ</sup>
DM-WKY-VHC (n=8)	VHC	49,5±0,7	126,2±7,0	341,3±7,4*	138,6±1,4*	5,63±0,36*
	DPAT	48,1±0,8	115,2±6,8	322,5±7,1	136,4±1,2	4,56±0,24 <sup>Δ</sup>
DM-SHR-VHC (n=7)	VHC	49,1±0,9	118,7±5,7	328,6±14,8	142,2±1,3 <sup>□</sup>	5,26±0,32
	DPAT	47,4±0,9	108,0±7,8	303,6±16,8	140,0±1,6	5,42±0,25
DM-WKY-BZD (n=8)	VHC	45,7±0,9 <sup>X</sup>	97,2±6,7 <sup>X</sup>	320,3±8,8*	141,7±1,1	4,78±0,30
	DPAT	42,2±0,9 <sup>Δ</sup>	62,7±3,6 <sup>Δ</sup>	267,5±7,1 <sup>Δ</sup>	142,3±1,3	4,50±0,18
DM-SHR-BZD (n=7)	VHC	48,4±1,0	113,3±6,8	284,3±17,0 <sup>□</sup>	146,1±1,2 <sup>#□</sup>	5,29±0,24
	DPAT	44,6±0,7 <sup>Δ</sup>	72,9±3,8 <sup>Δ</sup>	251,4±16,0	144,6±1,1	4,50±0,27 <sup>Δ</sup>

**Tabelle 3.4:** Ergebnisse der Clearanceversuche mit narkotisierten Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM. Die Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2. \* p<0,05 vs. CON-WKY-BZD, □ p<0,05 vs. CON-SHR-BZD, Δ p<0,05 vs. VHC, # p<0,05 vs. DM-WKY-BZD, X p<0,05 vs. DM-WKY-VHC.

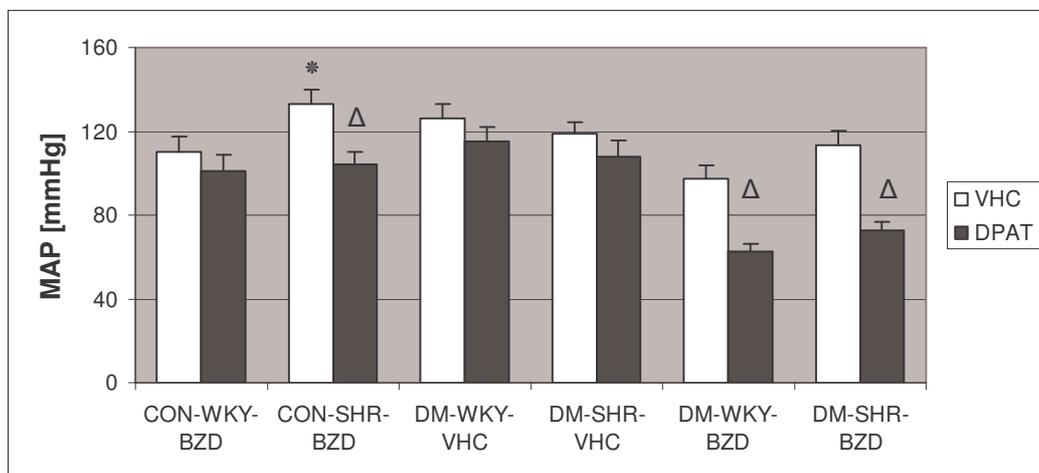
### 3. Ergebnisse

Gruppe	Perioden	GFR [ml/min/100g]	UV [ml/min/100g]	U <sub>Na</sub> V [μmol/min/100g]	FE <sub>Na</sub> [%]	U <sub>K</sub> V [μmol/min/100g]
CON-WKY-BZD (n=7)	VHC	0,95±0,03	2,64±0,54	0,44±0,17	0,32±0,12	0,38±0,08
	DPAT	1,00±0,04	6,83±1,97	1,16±0,38	0,79±0,26	0,43±0,11
CON-SHR-BZD (n=8)	VHC	0,84±0,07	4,92±1,81	0,80±0,32	0,57±0,20	0,46±0,07
	DPAT	0,82±0,08	8,83±5,50	1,10±0,51	0,71±0,28	0,41±0,12
DM-WKY-VHC (n=8)	VHC	1,14±0,07*	4,25±0,30*	0,38±0,10	0,22±0,05	0,34±0,08
	DPAT	1,04±0,05	4,77±0,51	0,60±0,16	0,42±0,11	0,46±0,10
DM-SHR-VHC (n=7)	VHC	1,07±0,06 <sup>□</sup>	4,87±0,50	0,41±0,18	0,27±0,11	0,40±0,11
	DPAT	1,00±0,08	5,41±0,63	0,81±0,04	0,49±0,23	0,60±0,14
DM-WKY-BZD (n=8)	VHC	0,99±0,09	4,07±0,55	0,24±0,11	0,14±0,06	0,26±0,05
	DPAT	0,71±0,09 <sup>Δ</sup>	2,24±0,28 <sup>Δ</sup>	0,19±0,08	0,16±0,06	0,19±0,04
DM-SHR-BZD (n=7)	VHC	0,89±0,06	3,53±0,54	0,63±0,02 <sup>#</sup>	0,48±0,02 <sup>#</sup>	0,21±0,06
	DPAT	0,81±0,08	2,98±0,69	0,82±0,03	0,70±0,03 <sup>Δ</sup>	0,25±0,10

**Tabelle 3.5:** Fortsetzung der Tabelle 3.4.

## 3.3.2.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Die normoglykämische Kontrollgruppe der spontan hypertensiven Ratten (SHR) wies während der Vorperioden signifikant höhere Blutdruckwerte auf als die zugehörige normotensive Kontrollgruppe ( $p < 0,05$  vs. CON-WKY-BZD). Innerhalb der diabetischen WKY-Gruppen kam es bei den Tieren unter Benserazid-Gabe zu einem signifikanten Blutdruckabfall ( $p < 0,05$  vs. DM-WKY-VHC), der innerhalb der diabetischen SHR-Gruppen nicht zu beobachten war, so dass diese nahezu identische Blutdruckwerte aufwiesen. Unter der Verabreichung des  $D_3$ -Rezeptoragonisten konnte bei allen Versuchsgruppen ein Blutdruckabfall bis zu 40 mmHg beobachtet werden. Bezüglich der Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks in den Hauptperioden erreichten die beiden diabetischen Benserazid-Gruppen (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD) und die SHR-Kontrolltiere (CON-SHR-BZD) das Signifikanzniveau.



**Abbildung 3.16:** Die mittleren arteriellen Blutdruckwerte (MAP) der Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) innerhalb der gleichen Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. CON-WKY-BZD,  $\Delta$   $p < 0,05$  vs. VHC.

#### 3.3.2.2 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz (HF) beider Kontrollgruppen, WKY, als auch SHR, lag im Mittel zwischen ca. 370-380 Schlägen pro Minute. Die entsprechend zu den Kontrollgruppen zugehörigen diabetischen Gruppen wiesen signifikant niedrigere Pulsraten auf ( $p < 0,05$  vs. entsprechende CON). Weiterhin konnte eine geringere Herzfrequenz bei den diabetischen mit Benserazid behandelten Tieren im Vergleich zu den diabetischen Vehikel-Gruppen beobachtet werden, die jedoch nicht signifikant war. Unter DPAT-Gabe zeigte sich wiederum in allen sechs Versuchsgruppen eine Reduktion der Herzfrequenz, die bei der diabetischen Benserazid-Gruppe der Wistar-Kyoto-Ratten das Signifikanzniveau erreichte.

#### 3.3.2.3 Hämatokrit

Die Hämatokritwerte der jeweiligen WKY- und SHR-Tiere lagen mit Ausnahme der DM-WKY-BZD-Gruppe, die einen signifikant niedrigeren Hämatokritwert als die zugehörige diabetische Vehikelgruppe aufwies ( $p < 0,05$  vs. DM-WKY-VHC), nahezu identisch zwischen 47-49 %. Weiterhin konnte eine Reduktion des Hämatokrits von den Vorperioden auf die Hauptperioden beobachtet werden, die innerhalb der diabetischen WKY- und SHR-BZD-Gruppen signifikant war.

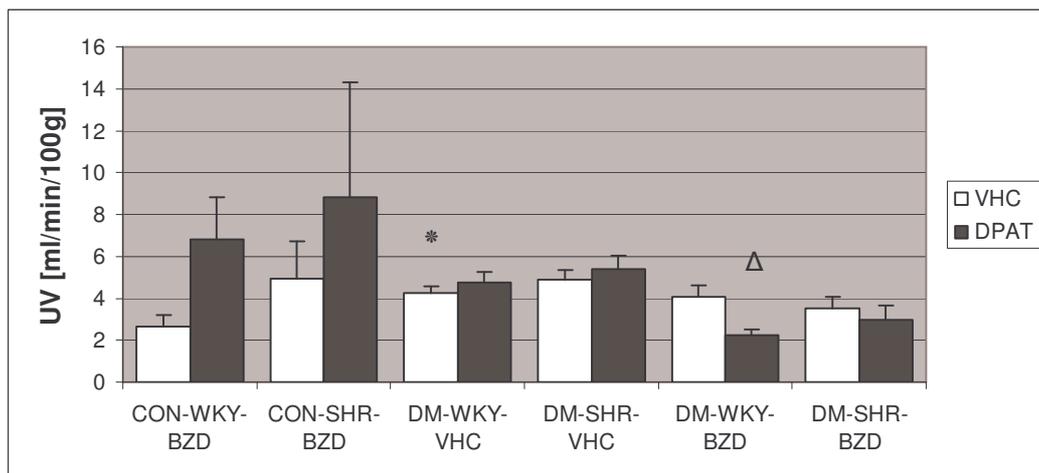
#### 3.3.2.4 Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma

Bezüglich der Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma wies die Kontrollgruppe der SHR-Tiere signifikant höhere Werte als ihre normotensive Kontrollgruppe auf ( $p < 0,05$  vs. CON-WKY-BZD). Weiterhin konnte innerhalb der diabetischen Gruppen eine ebenfalls signifikante Abnahme der Natriumkonzentration im Vergleich zu ihren entsprechenden Kontrollgruppen registriert werden. Dieser Effekt konnte bezüglich der Kaliumkonzentration im Plasma nicht beobachtet werden. Innerhalb der beiden Hauptperioden wurde tendenziell eine Reduktion der oben benannten Parameter festgestellt, die hinsichtlich des

Elektrolyts Kalium innerhalb der Gruppen CON-SHR-BZD, DM-WKY-VHC und DM-SHR-BZD signifikant war ( $p < 0,05$  vs. VHC).

### 3.3.2.5 Urinvolumen

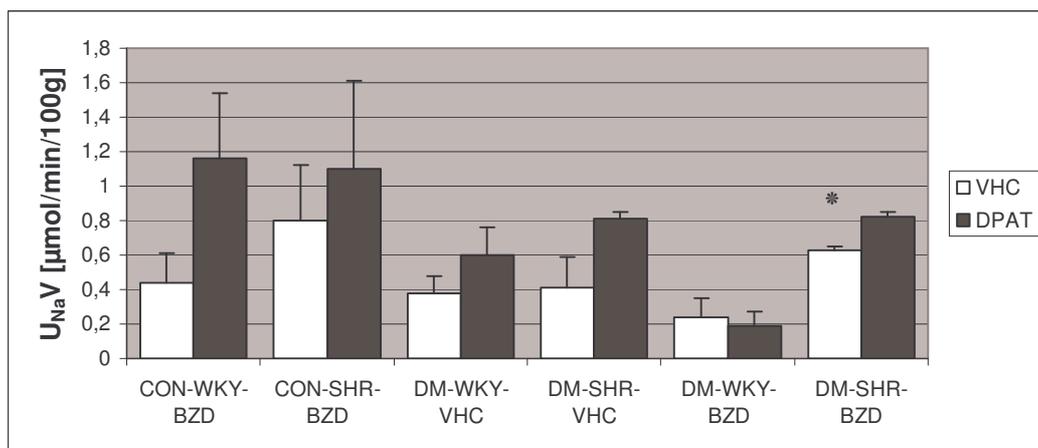
Innerhalb der Versuchsgruppen der spontan hypertensiven Ratten (SHR) traten nahezu keine Unterschiede bezüglich der Urinvolumina in den Vorperioden auf. Lediglich die diabetische Vehikel-Gruppe der Wistar-Kyoto-Ratten wies ein signifikant höheres Urinvolumen als die normotensive Kontrollgruppe auf ( $p < 0,05$  vs. CON-WKY-BZD). Im Vergleich zwischen den beiden Kontrollgruppen (CON-WKY-BZD, CON-SHR-BZD) konnte eine knapp doppelt so hohe, jedoch nicht signifikante Urinausscheidung der SHR-Tiere gegenüber der normotensiven Kontrollgruppe (WKY) festgestellt werden. In den beiden Hauptgruppen, unter DPAT-Gabe, zeigte sich bei den Kontrollgruppen der WKY- und SHR-Tiere eine nicht signifikante Urinvolumensteigerung um das 2- bis 2,5-fache. Gegenteilig dazu wiesen die diabetischen BZD-Gruppen eine Reduktion der Urinvolumina auf, die bei den WKY-Tieren das Signifikanzniveau erreichte ( $p < 0,05$  vs. VHC).



**Abbildung 3.17:** Die Urinvolumina (UV) der Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) der gleichen Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. CON-WKY-BZD,  $\Delta$   $p < 0,05$  vs. VHC.

### 3.3.2.6 Renale Natrium- und Kaliumausscheidung

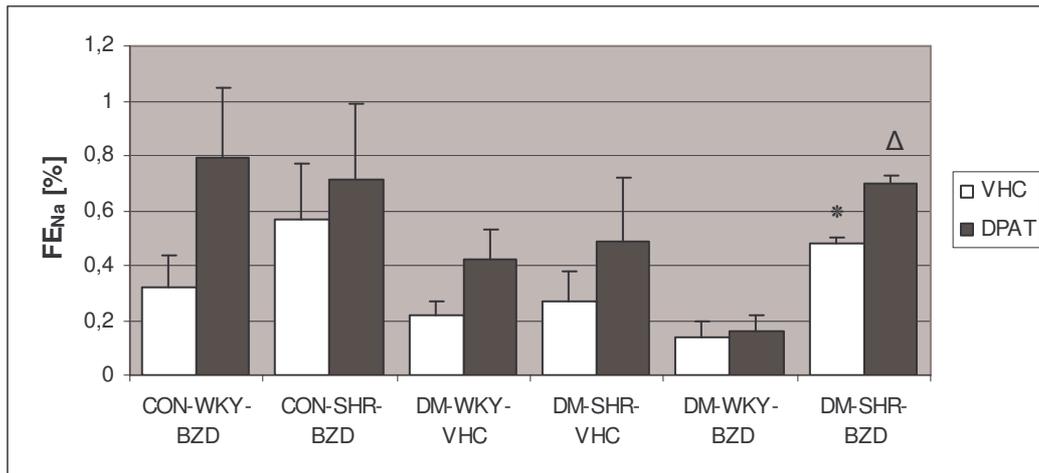
Hinsichtlich der Elektrolytausscheidung der WKY- und SHR-Versuchsgruppen konnte bei den SHR-Tieren eine höhere Urinnatriumausscheidung beobachtet werden. Diese erreichte innerhalb der DM-SHR-BZD-Gruppe das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$  vs. DM-WKY-BZD). In den Hauptperioden wurden mit Ausnahme der DM-WKY-BZD-Gruppe tendenziell höhere Ausscheidungswerte festgestellt, die jedoch nicht signifikant waren.



**Abbildung 3.18:** Die renale Natriumausscheidung ( $U_{NaV}$ ) der Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) der gleichen Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. DM-WKY-BZD.

### 3.3.2.7 Fraktionelle renale Natriumausscheidung

Bei den WKY- und SHR-Gruppen ergaben sich in den Vorperioden  $FE_{Na}$ -Werte im Mittel zwischen 0,14-0,57 %, wobei die Kontrollgruppen gegenüber ihrer entsprechenden diabetischen Gruppen höhere Werte aufwiesen. In den Hauptperioden konnte ebenfalls in allen Versuchsgruppen eine Zunahme der fraktionellen renalen Natriumausscheidung festgestellt werden. Dabei erreichte die DM-SHR-BZD-Gruppe das Signifikanzniveau und zeigte ebenfalls gegenüber der entsprechenden WKY-Gruppe (DM-WKY-BZD) signifikant höhere  $FE_{Na}$ -Werte auf.

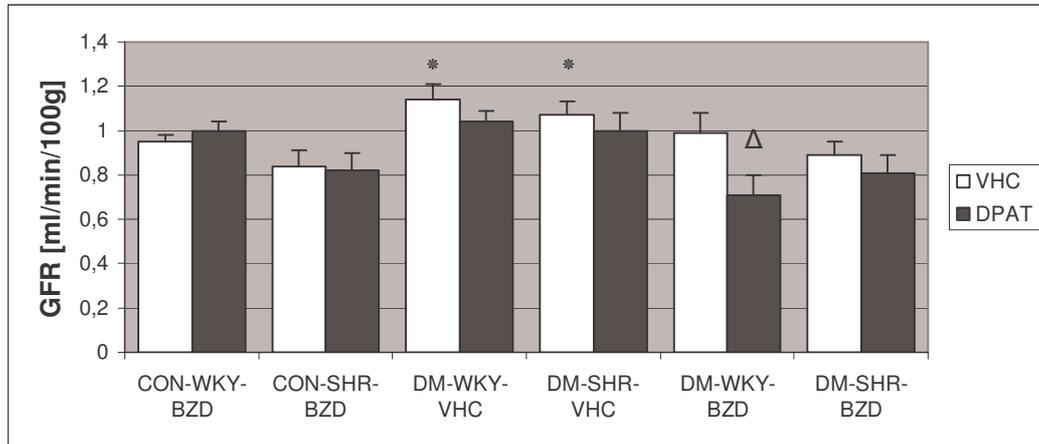


**Abbildung 3.19:** Die fraktionelle renale Natriumausscheidung ( $FE_{Na}$ ) der Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) der gleichen Gruppe. \*  $p < 0,05$  vs. DM-WKY-BZD,  $\Delta$   $p < 0,05$  vs. VHC.

### 3.3.2.8 Glomeruläre Filtrationsrate

Bezüglich der glomerulären Filtrationsrate (GFR) zeigten die Tiere der SHR-Versuchsgruppen im Vergleich zu den entsprechenden WKY-Gruppen geringere Werte auf. Damit lag die GFR der normotensiven Kontrollgruppe (CON-WKY-BZD) mit 0,1 ml/min/100 g über der der entsprechenden hypertensiven Kontrollgruppe (CON-SHR-BZD). Die durch den Diabetes mellitus induzierte glomeruläre Hyperfiltration konnte sowohl in der DM-WKY-VHC-Gruppe, als auch in der DM-SHR-VHC-Tiergruppe beobachtet werden. Diese spiegelte sich in einer signifikanten Steigerung der GFR um 20 % gegenüber den entsprechenden Kontrollgruppen wider ( $p < 0,05$  vs. entsprechende CON). Vergleichsweise dazu konnte dieser GFR-Anstieg bei den mit Benserazid behandelten diabetischen Tieren nicht aufgezeigt werden, weshalb innerhalb der DM-WKY-BZD- und DM-SHR-BZD-Gruppe ein Rückgang der GFR-Werte dokumentiert werden konnte. Die GFR-Werte der diabetischen Benserazid-Versuchsgruppen näherten sich dabei denen der entsprechenden Kontrollgruppen an und wiesen im Vergleich zu den diabetischen Vehikelgruppen keine diabetische Hyperfiltration auf. Wie schon bei den SD-Tieren zu beobachten war,

zeigten unter DPAT-Infusion alle Versuchsgruppen, mit Ausnahme der CON-WKY-BZD-Tiere, eine Abnahme der GFR. Diese erreichte innerhalb der DM-WKY-BZD-Gruppe das Signifikanzniveau.



**Abbildung 3.20:** Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) und spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Clearanceversuch. Es wurden die Versuchsgruppen (CON, DM) untereinander verglichen und die Vorperioden (VHC) mit den Hauptperioden (DPAT) der gleichen Gruppe. \* $p < 0,05$  vs. entsprechende CON,  $\Delta$   $p < 0,05$  vs. VHC.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Methodendiskussion**

#### **4.1.1 Modell des Diabetes mellitus**

Zur Untersuchung des Effektes von Benserazid auf die diabetische Hyperfiltration, wurde das Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus herangezogen. Streptozotocin (STZ) stellt ein aus *Streptomyces achromogenes* gewonnenes Antibiotikum dar. Dabei beobachtete erstmals Ratieken et al. die diabetogene Wirkung von i.v. verabreichtem STZ im Tierexperiment mit Ratten und Hunden (Ratieken et al., 1963). Später konnte durch histologische Untersuchungen gezeigt werden, dass STZ selektiv die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zerstört, so dass  $\alpha$ -Zellen und das exokrine Pankreasgewebe intakt blieben. Außerdem bestand kein Anhalt für eine nephrotoxische Wirkung, wobei lediglich 2 bis 36 h nach STZ-Verabreichung vereinzelte fokale Leberzellnekrosen sowie eine Hyperplasie der hepatischen Kupfferschen Zellen beobachtet werden konnten (Junod et al., 1967; Evan et al., 1984). Weiterhin konnten bereits eine Stunde nach Injektion des STZ histologische Veränderungen der  $\beta$ -Zellen registriert werden. Nach sieben bis zehn Stunden wurden massive Nekrosen und Degranulationen der  $\beta$ -Zellen nachgewiesen, die zunächst einen Anstieg des Seruminsulin-Spiegels, sowie eine Hypoglykämie zur Folge hatten. Der hypoglykämischen Zwischenperiode folgte dann 12 bis 24 h nach STZ-Applikation die für den unbehandelten Diabetes mellitus typische Hyperglykämie. Diese machte sich im Vergleich zu normoglykämischen Tieren in 3- bis 4-mal höheren Blutglukosewerten bemerkbar und war auf eine Reduktion des Insulinspiegels auf unter 5 % des Ausgangswertes zurückzuführen. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass der Effekt von STZ auf die Stoffwechsellage dosisabhängig ist (Junod et al., 1969). Bereits bei einer Dosis von 35 mg/kg Körpergewicht (KG) wurde eine leichte Hyperglykämie beobachtet. Bei

einer mittleren Dosis von 55-65 mg/kg KG wurde die gewünschte diabetogene Stoffwechsellage erzeugt, in der die Ratten ohne Insulinsubstitution überleben konnten und keine Ketonurie ausbildeten. Ab einer Verabreichung von STZ in Dosen um die 100 mg/kg KG verstarben die Tiere ohne Insulinbehandlung nach 2 bis 3 Tagen. Ausgehend von diesen Beobachtungen erhielten die Tiere in der vorliegenden Arbeit STZ-Dosen von 60 mg/kg KG intraperitoneal (i.p) injiziert. Wurden nach 48 h keine Blutglukosewerte zwischen 280-600 dl erreicht, war eine erneute i.p STZ-Applikation in Dosen zwischen 30-60 mg/kg KG erforderlich. Die diabetogene Stoffwechsellage spiegelte sich wider in der Hyperglykämie und in weiteren für den Diabetes mellitus typischen Parametern, wie einer Polyphagie, Polydipsie, Polyurie sowie einer fehlenden Gewichtszunahme. Auch bei anderen Autoren, die Tierexperimente am Modell des STZ-induzierten Diabetes mellitus durchführten, konnten oben benannte Symptome beobachtet werden (Hebden et al., 1986; O`Donnell et al., 1988; Tomlinson et al., 1989).

#### **4.1.2 Benserazidbehandlung**

Das Katecholamin Dopamin ist für Regulation der glomerulären Hyperfiltration, die nach Mogensen einen entscheidenden Risikofaktor für die frühe Ausbildung der diabetischen Nephropathie darstellt, von zentraler Bedeutung (Mogensen, 1986). In tierexperimentellen Arbeiten wurde sowohl unter exogen verabreichtem Dopamin, als auch unter Zufuhr von Aminosäurelösungen eine gesteigerte glomeruläre Filtrationsrate (GFR) beobachtet (Meyer et al., 1983; ter Wee et al., 1986; Mühlbauer et al., 1994). Daraufhin stellte sich nun die Frage, inwiefern die Dopaminsynthese und Dopaminrezeptorblockade Einfluss auf die aminosäurebedingte Hyperfiltration nimmt. Dabei kam es aufgrund der bekannten Präsenz zweier unterschiedlicher renaler Dopaminrezeptoren, D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptor (Jose et al., 1992), zum einen zum Einsatz eines selektiven Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten, dem S(-)-Sulpirid, welcher eine signifikante Aufhebung der aminosäurebedingten Hyperfiltration nach sich zog. Gegensinnig dazu konnte unter dem D<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist SCH 23390 keine Reduktion der Aminosäure-induzierten Hyperfiltration erzielt werden (Mühlbauer et al., 1994).

Eine Interaktion zwischen Rezeptoren der D<sub>2</sub>-Unterfamilie und dem autonome Nervensystem scheint dabei eine wichtige Rolle in der Ausbildung der physiologischen aminosäurebedingten Hyperfiltration zu spielen (Mühlbauer et al., 1997) (siehe auch Kapitel 4.2.1). Neben dem endogenen renalen Dopamin wird als weiterer möglicher Mechanismus für die erhöhte Filtrationsfraktion ein stimuliertes Kallikrein-Kinin-System diskutiert. In der Arbeitsgruppe Jaffa konnte unter systemischer Aminosäurezufuhr neben einer um 25- bis 40 % gesteigerten GFR, ein erhöhter renaler Plasmafluss (RPF), sowie eine Abnahme des renalen Gefäßwiderstandes festgestellt werden. Diese Beobachtungen waren assoziiert mit einer zwei- bis dreifach erhöhten renalen Kininexkretionsrate (Jaffa et al., 1992). Die renalen hämodynamischen Veränderungen könnten jedoch auch durch die Hormone Insulin und Glukagon verursacht sein (Tolins, 1992).

Unter Betrachtung des endogenen Dopamins als Mediator für die hämodynamische Antwort der Niere auf Aminosäuren wurde in der Arbeitsgruppe Mühlbauer eine Vorbehandlung von Ratten mit Benserazid, einem Inhibitor der L-Aminodecarboxylase (Da Prada et al., 1987), vorgenommen. Dabei wurde Benserazid in einer Konzentration von 30 µg/kg KG/min akut im Clearanceversuch intravenös (i.v) infundiert. Neben einer Normalisierung der durch die Aminosäurelösung bedingten Hyperfiltration, sanken unter der Benserazidbehandlung die Dopaminkonzentrationen im Urin auf nicht mehr messbare Werte (Mühlbauer et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit, in der aufgrund der vorangegangenen Beobachtungen untersucht werden sollte, ob auch eine Normalisierung der diabetischen Hyperfiltration unter peripherer Dopaminsynthesehemmung möglich ist, kam Benserazid ebenfalls mit einer Dosierung von 30 µg/kg KG/min akut im Clearanceversuch zum Einsatz. Dieses erhielten die Tiere nach Legen des Venenkatheters über eine Präzisionspumpe, die eine kontinuierliche Flussrate von 0,6 ml/h garantierte. Vor Beginn der eigentlichen Clearanceversuche wurde in einer Vorversuchsreihe überprüft, ob Benserazid den Dopamingehalt in der Niere reduziert. Dafür wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten auf zwei Tiergruppen, eine Vehikel-Gruppe und eine Benserazid-Gruppe, aufgeteilt. Die Präparation der Tiere und der Versuchsab-

lauf verliefen unter den gleichen Bedingungen wie im eigentlichen Clearanceversuch. Eine Entnahme der Nieren erfolgte nach Versuchsende, in denen mittels HPLC der Dopamingehalt bestimmt wurde. Dabei konnte festgestellt werden, dass unter Benserazidbehandlung die Dopaminkonzentration signifikant um den Faktor 10 abnahm. Im Vergleich zu der tierexperimentellen Studie der Arbeitsgruppe Mühlbauer wurde jedoch keine vollständige Unterdrückung der Dopaminsynthese erzielt, so dass ein Restgehalt an Dopamin von ca. 10 ng/g Nierenfeuchtgewicht (NFG) im Nierengewebe ermittelt wurde. Dies könnte auf die Verwendung unterschiedlicher Proben zur Bestimmung der Menge an synthetisiertem Dopamin in der Niere zurückzuführen sein (siehe auch Kapitel 4.2.1).

#### **4.1.3 Modell der spontan hypertensiven Ratten (SHR)**

In der vorliegenden Arbeit wurden zur Untersuchung der Nierenfunktion in einem hypertensiven Rattenmodell männliche spontan hypertensive Ratten (SHR), die nach wenigen Lebenswochen einen Hypertonus entwickeln (Seubert et al., 2005), verwendet. Männliche Wistar-Kyoto-Ratten (WKY) dienen als normotensive Kontrollgruppe. Die Mechanismen, die zur Pathogenese des Hypertonus beitragen, werden in zahlreichen Studien diskutiert und sind nicht vollständig geklärt. Unter anderem wird von einer abgeschwächten Interaktion zwischen D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptorsubtypen in der Niere von SHR-Tieren ausgegangen. Eine synergistische Aktivitätsminderung der an der basolateralen Membran der proximalen Tubuli lokalisierten Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase scheint dabei durch die Dopaminrezeptoren nicht mehr gewährleistet zu sein (Bertorello et al., 1990). So konnte in einem normotensiven Rattenmodell eine gemeinsame Aktivierung von D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptorsubtypen einen stärkeren natriuretischen Effekt als eine alleinige Stimulierung von D<sub>1</sub>-Rezeptoren hervorrufen (Jose et al., 1998). Obwohl alle zur Dopamin D<sub>2</sub>-Rezeptor Familie gehörenden Dopaminrezeptoren (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) in den proximalen Tubuluszellen exprimiert werden, macht der D<sub>3</sub>-Rezeptorsubtyp den größten dort exprimierten Anteil aus (O'Connell et al., 1998). Weiterhin wird dem zur Dopamin D<sub>1</sub>-Rezeptor Familie gehörenden D<sub>1</sub>-Rezeptor eine größere Rolle in der Stimulierung der Adenylat-

cyclase und somit dem Anstieg an cAMP zugeschrieben als dem D<sub>5</sub>-Rezeptor (Sanada et al., 2000). Genauere Untersuchungen auf eine Interaktion zwischen dem D<sub>1</sub>- und dem D<sub>3</sub>-Rezeptor fanden demzufolge statt. Dabei führte eine Stimulierung von D<sub>1</sub>-Rezeptoren unter Verwendung eines D<sub>1</sub>-Rezeptor-agonisten, dem Fenoldopam, zu einem Anstieg der Genexpressionsrate von D<sub>1</sub>-Rezeptoren in normotensiven WKY-Ratten. Diese Beobachtung konnte gegensätzlich dazu bei SHR-Tieren nicht gemacht werden (Zeng et al., 2003). In einer weiteren Studie derselben Arbeitsgruppe zeigte sich unter Einsatz von Fenoldopam ein Anstieg des D<sub>3</sub>-Rezeptorproteins in WKY-Tieren, der jedoch in SH-Ratten nicht registriert wurde (Zeng et al., 2004). Weiterhin konnten bei salz-sensitiven Dahl (DS) Ratten, die auf eine erhöhte systemische Salzzufuhr eine arterielle Hypertonie ausbilden, sowohl eine verminderte Expression als auch Funktion des Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptors festgestellt werden. Eine pharmakologische D<sub>3</sub>-Rezeptor-Aktivierung durch 7-Hydroxy-DPAT führte bei, unter kochsalzreicher Diät gehaltenen, DS Ratten zu keiner GFR-Steigerung sowie Natriuresis. Im Gegensatz dazu, zeigten salz-resistente Dahl (DR) Ratten auf eine Infusion von 7-Hydroxy-DPAT einen Anstieg der GFR und eine signifikante Diurese (Luippold et al., 2001). Auf diese Beobachtung hin, wurde in derselben Arbeitsgruppe der Effekt von 7-Hydroxy-DPAT auf SH-Ratten hin untersucht, die jedoch wie ihre normotensive Kontrollgruppe (WKY-Ratten) eine gesteigerte Urin- und Natriumausscheidung sowie GFR-Erhöhung aufwiesen. Auch konnten keine Unterschiede der D<sub>3</sub>-Rezeptorgenexpression zwischen SHR- und WKY-Tieren festgestellt werden. Ausgehend von diesen Resultaten zeigt der D<sub>3</sub>-Rezeptor keine Beteiligung an der Pathogenese des Hypertonus im SH-Rattenmodell (Luippold et al., 2003). Weiterhin wird sowohl dem D<sub>1</sub>-Rezeptor über eine Stimulierung der Proteinkinase A, als auch dem D<sub>3</sub>-Rezeptor über eine Aktivitätszunahme von K<sup>+</sup>-Kanälen (Liu et al., 1996) ein vasodilatativer Effekt zugeschrieben (Zeng et al., 2003). Dabei könnte es über eine Interaktion zwischen D<sub>1</sub>- und D<sub>3</sub>-Rezeptoren zu einer Addierung des über diese Rezeptoren vermittelten gefäßrelaxierenden Effektes kommen, der jedoch im SH-Rattenmodell nicht gegeben ist. Demnach könnte dieser fehlende Mechanismus an der Entwicklung der Hypertension mitbeteiligt sein. Um in der

vorliegenden Arbeit zu klären, ob die SHR-Tiere auch tatsächlich einen Hypertonus im Vergleich zu ihrer normotensiven Kontrollgruppe aufweisen, wurde vor Durchführung der Stoffwechselkäfigversuche der systolische Blutdruckwert mittels Schwanzdruckmessung (siehe Kapitel 2.3.2) sowohl bei wachen SHR- als auch WKY-Tieren bestimmt. Dem eigentlichen Messvorgang vorausgehend, wurden die Tiere beider Gruppen mehrmals in die Restrainer gesetzt und die Blutdruckmessung simuliert, um später realistische und nicht durch Stressreaktionen verfälschte Blutdruckwerte zu erhalten. Dabei wiesen die SHR-Tiere mit systolischen Mittelwerten zwischen 147-175 mmHg signifikant höhere Werte als ihre Kontrollgruppe auf.

## **4.2 Benserazid und Nierenfunktion in einem diabetischen normotensiven Rattenmodell**

### **4.2.1 Basalbedingungen**

Innerhalb der diabetischen Vehikelgruppe der Sprague-Dawley-Ratten (DM-SD-VHC) konnte im Vergleich zur entsprechenden normoglykämischen Kontrollgruppe (CON-SD-VHC) ein signifikanter Anstieg der glomerulären Filtrationsrate (GFR), eine Natriurese und auch eine Diurese dokumentiert werden. Schon Mogensen, als einer von vielen anderen Autoren, stellte dieses für den Diabetes mellitus typische Phänomen vor über 30 Jahren fest. Dabei machte er die Beobachtung, dass bei nahezu 40 % der neu diagnostizierten Typ 1 Diabetiker eine erhöhte GFR vorhanden war (Mogensen, 1971). Weiterhin zeigten 30-40 % der Diabetiker, die als Spätkomplikation eine diabetische Nephropathie aufwiesen, einen progressiven Anstieg der GFR wenige Jahre nach Erstdiagnose auf (Viberti et al., 1983). Die Faktoren, die zu dieser diabetischen Hyperfiltration beitragen, sind jedoch noch recht unklar. Mehrere Studien sahen einen Zusammenhang zwischen einem erhöhten Plasmaplankosespiegel und dem Anstieg der GFR. Dabei verursachte eine Hyperglykämie sowohl bei normoglykämischen als auch hyperglykämischen Testpersonen signifikant erhöhte GFR-Werte. In einer weiteren Studie konnte bei

Diabetikern mit vorhandener Hyperfiltration durch eine Zufuhr von Glukose-lösungen ein weiterer Anstieg der GFR dokumentiert werden, wobei jedoch Patienten mit normalen GFR-Werten nicht auf diese künstlich erzeugte Hyperglykämie reagierten (Wiseman et al., 1987). Weiterhin wurde sowohl bei diabetischen Patienten als auch bei Ratten, die einen STZ-induzierten Diabetes mellitus aufwiesen, eine erhöhte tubuläre Reabsorption von Elektrolyten und Wasser beobachtet (Hannedouche et al., 1990; Bank et al., 1990). Später konnte für diese Phänomene ein möglicher Mechanismus aufgezeigt werden. Mikroperfusions-Studien nahmen eine Beteiligung des  $\text{Na}^+$ -Glukose-Kotransportes an der verstärkten Absorption von Natrium im proximalen Tubulus an (Bank et al., 1990). Dabei führt eine Hyperglykämie und damit auch Glukosurie zu einer gesteigerten Aktivierung des  $\text{Na}^+$ -Glukose-Kotransportes im proximalen Tubulus, wobei Wasser aus osmotischen Gründen dem absorbierten Natrium passiv in das Interstitium folgt. Auch der Einsatz von Phlorizin, einem Inhibitor des  $\text{Na}^+$ -Glukose-Kotransportes, führte bei diabetischen Ratten zu einer Reduktion der Reabsorption von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{K}^+$  (Valion et al., 1999) und ließ damit dem  $\text{Na}^+$ -Glukose-Kotransport eine wichtige Rolle in der Antwort der Niere auf erhöhte tubuläre Glukosekonzentrationen zukommen. Somit resultiert aus der gesteigerten Elektrolyt- und Wasserrückresorption bei schlecht eingestelltem Diabetes eine Volumenexpansion und damit Hypertension sowie eine Hypertrophie der Nieren. Weiterhin kommt es durch die verringerten, an der Macula densa des distalen Tubulus registrierten Elektrolytkonzentrationen zu einer Abnahme des tubuloglomerulären Feedbacks (TGF) sowie zu einer Steigerung der Renin-Sekretion. Eine Abnahme des TGF-Signales führt seinerseits zu einer Vasodilatation des Vas afferens, wobei die durch das Renin stimulierte Angiotensin II-Bildung eine Vaso-  
konstriktion des Vas efferens zur Folge hat. Das Zusammenspiel dieser beiden Mechanismen lässt eine Steigerung der GFR, sowie eine weitere, über Aldosteron vermittelte Reabsorption von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Cl}^-$  erkennen. Die Zunahme des Gefäßtonus und ein weiterer Anstieg der Volumenexpansion könnten somit einen vorbestehenden Hypertonus und seine organischen Auswirkungen weiter verschlechtern.

Die Volumenexpansion, die zu einer Zunahme des enddiastolischen Füllungsdruckes beiträgt, könnte ein möglicher Grund für den bei Diabetikern beobachteten gesteigerten ANP-Plasmaspiegel (atrialess natriuretisches Peptid) sein. Dies ließe sich auch mit einer Studie, in der mit Insulin behandelte normoglykämische diabetische Ratten eine Normalisierung der ANP-Spiegel aufwiesen, vereinbaren (Benigni et al., 1990). Innerhalb dieser Studie wurde jedoch keine Korrelation zwischen ANP-Plasmaspiegel und Plasmavolumen aufgefunden, was wiederum der vorangegangenen Hypothese widerspricht. Auch in anderen Arbeiten wurden drei bis vier Wochen nach STZ-induziertem Diabetes mellitus in Ratten signifikant erhöhte ANP-Konzentrationen, sowie ein Anstieg der GFR und des renalen Plasmaflusses (RPF) beobachtet. Andere Autoren stellten jedoch keine Änderungen der ANP-Konzentrationen im Plasma fest (Jackson et al., 1988). Durch eine dosisabhängige intravenöse Injektion von HS-142-1, einem ANP-Antagonisten, konnte eine signifikante Reduktion der diabetischen Hyperfiltration nachgewiesen werden. Eine Vorbehandlung mit HS-142-1, mittels einer osmotischen Minipumpe, die zwei Tage nach STZ-Applikation den Ratten subkutan implantiert wurde, verhinderte einen Anstieg der GFR und des RPF (Sakamoto et al., 1995).

Weiterhin wird dem Stickoxid (NO), welches auch als Endothel-relaxierender Faktor bezeichnet wird, eine wichtige Rolle in der Ausbildung der diabetischen Hyperfiltration zugeschrieben. Dabei wird NO in den Endothelzellen über die NO-Synthetase aus der Vorstufe Arginin gebildet und führt über eine Aktivierung der Guanylatcyclase zu einer Gefäßrelaxation. In diabetischen Ratten konnte eine verstärkte Produktion von NO beobachtet werden, die eine Steigerung der GFR sowie Exkretion von Nitrit und Nitrat und eine Vergrößerung der afferenten Arterioldurchmesser nach sich zog. Sowohl unter einer Insulinbehandlung als auch dem Einsatz eines NO-Inhibitors, dem omega-nitro-L-arginin methyl ester (L-NAME), erfolgte eine Normalisierung der oben benannten Parameter. Weiterhin wurde eine erhöhte Expressionsrate der NO-Synthetase in den afferenten Arteriolen und Glomeruli, jedoch nicht in den ef-

ferenten Arteriolen von diabetischen Ratten nachgewiesen (Sugimoto et al., 1998). Wiederum konnte dabei eine Verbindung zu gesteigerten Plasma-glukosespiegeln hergestellt werden, da eine signifikante Korrelation zwischen erhöhten HBA<sub>1c</sub>-Serumkonzentrationen und Nitrit/Nitrat Konzentrationen festgestellt wurde (Chiarelli et al., 2000).

Außerdem wird eine Glukose-induzierte Aktivierung der glomerulären Protein-kinase C angenommen, die über eine Stimulierung der Phospholipase A<sub>2</sub> die Biosynthese von Eikosanoiden bewerkstelligt. Somit konnte in diabetischen Ratten ein Anstieg der Prostaglandin E- und Thromboxan A<sub>2</sub>-Konzentrationen beobachtet werden. Prostaglandin E, als Vasodilatator, steigert die GFR und den RPF. Thromboxan A<sub>2</sub>, welches einen vasokonstriktorischen Effekt auf das Gefäßsystem ausübt, müsste somit gegensätzlich dazu eine GFR- und RPF-Reduktion verursachen. Dies ist jedoch nicht der Fall, so dass auch unter hohen Thromboxan A<sub>2</sub>-Konzentrationen die diabetischen Tiere signifikant gesteigerte GFR- und RPF-Werte im Vergleich zu ihren Kontrollgruppen aufwiesen. Später konnte dieser gegensätzliche Effekt durch eine Reduktion der Anzahl an Thromboxan-Rezeptoren um 44 % in diabetische Ratten erklärt werden (Wilkes et al., 1992).

Weiterhin besteht die Annahme einer Beteiligung von Dopamin an der Ausbildung der diabetischen und Aminosäure-induzierten Hyperfiltration. In zahlreichen vorangegangenen Studien konnte dabei ein Zusammenhang zwischen systemischer Proteinzufuhr und renaler Dopaminausscheidung festgestellt werden. In tierexperimentellen Studien an Ratten führte eine erhöhte Proteinaufnahme zu einem Anstieg der renalen Dopaminexkretionsrate (Kaufman et al., 1989; Mühlbauer und Osswald, 1992). Dieser Einfluss der Nahrungsaufnahme auf die Dopaminproduktion in der Niere wurde auch in der Arbeitsgruppe Williams beim Menschen beobachtet. Innerhalb dieser Studie konnte bei Testpersonen zum einen durch eine proteinreiche Ernährung die Dopaminexkretion um 50 % gesteigert werden, wobei diese unter Vorbehandlung mit Carbidopa, einem Decarboxylasehemmer, um 70 % reduziert wurde (Williams

et al., 1986). Gegensätzlich dazu besteht für Thomas und Mitarbeiter keine Abhängigkeit der renalen Dopaminsynthese von der oralen Eiweißaufnahme, weshalb sie im Dopamin keinen Vermittler für die Antwort der Niere auf eine proteinreiche Ernährung vermuten (Thomas et al., 1994). Weiterhin führt ein erhöhtes systemisches Proteinangebot zu einer Steigerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (Dicker, 1949). Den Beobachtungen zufolge könnte somit eine Restriktion der Proteinaufnahme bei Patienten mit Typ 1 Diabetes mellitus die Ausbildung einer glomerulären Hyperfiltration und damit die Entstehung einer späteren diabetischen Nephropathie hinauszögern. Diese Überlegung konnte in einer Studie, in der sich diabetische Testpersonen einer protein- und phosphatarmen Ernährung unterzogen, bestätigt werden. 35 Typ 1 Diabetiker mit klinisch gesicherter Nephropathie erhielten täglich eine Dosis von 0,6 g/kg KG Eiweiß und Phosphor in einer Menge zwischen 500 und 1000 mg mit der Nahrung zugeführt. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte unter Einhaltung dieser vorgeschriebenen Diät nach einem Zeitraum von über drei Jahren eine signifikante Abnahme der Kreatininausscheidung festgestellt werden (Zeller et al., 1991).

Bezüglich des in der vorliegenden Arbeit untersuchten Einflusses von Dopamin auf die diabetische Hyperfiltration erhielten diabetische Ratten Benserazid akut im Clearanceversuch infundiert (DM-SD-BZD). Dabei wies die DM-SD-BZD-Gruppe im Vergleich zur entsprechenden diabetischen Vehikelgruppe (DM-SD-VHC) eine signifikante Reduktion der GFR auf. Damit glichen sich die GFR-Werte der DM-SD-BZD-Tiere denen der normoglykämischen Kontrollgruppen an (CON-SD-BZD, CON-SD-VHC). Eine Aufhebung der diabetischen Hyperfiltration war somit unter der Akutgabe von Benserazid im Clearanceversuch möglich. Interessanterweise konnte in der vorliegenden Arbeit trotz Restgehalt an Dopamin im Nierengewebe (10 ng/g NFG) eine vollständige Reduktion der diabetischen Hyperfiltration erzielt werden. Dies könnte wiederum darauf hindeuten, dass ein bestimmter Schwellenwert überschritten werden muss, um einen dopaminergen Effekt über die Dopaminrezeptoren zu erhalten. Neben den GFR-Werten konnte auch eine Angleichung der Urinausscheidung und der

renalen Natriumkonzentration der DM-SD-BZD-Gruppe an die entsprechende Kontrollgruppe beobachtet werden. Bezüglich der GFR zeigten die mit Benserazid behandelten normoglykämischen Kontrolltiere (CON-SD-BZD) im Vergleich zur entsprechenden Vehikelgruppe (CON-SD-VHC) keine Veränderungen auf, so dass Benserazid bei normaler Stoffwechsellage keinen Einfluss auf die Nierenfunktion zu nehmen scheint. Schon Mühlbauer und Mitarbeiter, deren Beobachtungen als Ansatzpunkt für die Fragestellung der vorliegenden Arbeit dienten, konnten unter Verwendung von Benserazid eine Aufhebung der aminosäurebedingten Hyperfiltration erzielen. Benserazid wurde dabei ebenfalls in einer Konzentration von 30 µg/kg KG/min akut im Clearanceversuch infundiert (Mühlbauer et al., 1994). Im Gegensatz zur Arbeitsgruppe Mühlbauer konnte jedoch in den durchgeführten Vorversuchen (siehe Kapitel 3.1) keine vollständige Blockierung der Dopaminsynthese erreicht werden, so dass ein Restgehalt von ca. 10 ng/g NFG in der Niere enthalten blieb. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die Arbeitsgruppe Mühlbauer die in der Niere synthetisierte Dopaminmenge direkt im Urin nachwies und in der vorliegenden Arbeit der Dopamingehalt im kompletten Nierengewebe ermittelt wurde. Auch konnte in einer weiteren Studie, in der Tyrosin-haltige Aminosäurenlösungen ( $AA_{Tyr}$ ) und solche, die kein Tyrosin enthielten ( $AA_o$ ), verwendet wurden, eine GFR-Steigerung beobachtet werden. Die  $AA_o$  führte jedoch im Gegensatz zur  $AA_{Tyr}$  zu keinem Anstieg der renalen Dopaminexkretionsrate, so dass das mit dem Urin ausgeschiedene Dopamin keine signifikante Rolle in der Regulation der Nierenfunktion zu spielen scheint (Mühlbauer et al., 1997). Diese Beobachtung konnte auch in der Arbeitsgruppe Luippold unter Einsatz eines Dopamin  $D_2$ -Rezeptoragonisten, dem Quinpirol, der eine GFR-Steigerung nach sich zog, und den beiden  $D_2$ -Rezeptorantagonisten S(-)-Sulpirid und Domperidon, die eine vollständige bzw. partielle Aufhebung der durch Quinpirol verursachten GFR-Erhöhung erzielten, gemacht werden. Dabei wurde kein Zusammenhang zwischen GFR-Änderung und Dopamingehalt im Urin festgestellt (Luippold et al., 1998). Weiterhin besteht die Annahme einer Interaktion von Dopamin mit dem autonomen Nervensystem über präsynaptische  $D_2$ -ähnliche Rezeptoren. Das ins Interstitium diffundierte Dopamin

könnte eine Abnahme der nervalen NoradrenalinKonzentration verursachen, was zu einer verminderten Kontraktilität des Vas afferens und somit zu einer GFR-Steigerung führen würde. Diese Hypothese konnte in einer Studie der Arbeitsgruppe Mühlbauer, in der eine renale Denervierung an Ratten mit einer Hemmung der Aminosäure-induzierte Hyperfiltration einherging, bestätigt werden (Mühlbauer et al., 1997). Auch bei Ratten, an denen drei Tage vor Induktion des Diabetes mellitus eine beidseitige chirurgische Denervierung der Nieren vorgenommen wurde, wiesen eine fast vollständige Aufhebung der diabetischen Hyperfiltration und des gesteigerten renalen Blutflusses auf (Luipold et al., 2004).

Im Vergleich zu den vorangegangenen Untersuchungsergebnissen berichten Barthelmebs und Mitarbeiter über einen gegensinnigen Effekt des Dopamins auf die Nierenfunktion. Eine Normalisierung der durch den Diabetes mellitus hervorgerufenen glomerulären Hyperfiltration ist dabei assoziiert mit der renalen Dopaminsynthese und der Stimulation von D<sub>1</sub>-Rezeptoren. Diabetische Wistar-Ratten erhielten eine Woche nach STZ-Induktion zweimal täglich die Dopaminvorstufe L-Dopa oder aber den Dopamin D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten, das Fenoldopam, subkutan verabreicht. Bereits nach einer Behandlungszeit von einer Woche konnte unter beiden Therapieformen ein Erfolg verzeichnet werden, der sich in einer Aufhebung der diabetischen Hyperfiltration widerspiegelte. Hingegen dazu führten der L-Dopadecarboxylase Hemmer Carbidopa und der selektive Dopamin D<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist SCH 23390 zu einer Unterdrückung dieses Effektes (Barthelmebs et al., 1991). Wesentliche Abweichungen bezüglich des Studiendesigns erschwerten den Vergleich dieser Beobachtungen mit denen der vorliegenden Arbeit. Die in der Arbeitsgruppe Barthelmebs durchgeführte Insulinsubstitution gewährleistete eine Stabilisierung der Hyperglykämie, weshalb die beiden Studien erhebliche Unterschiede in den Blutglukosekonzentrationen der diabetischen Tiere aufwiesen. Weiterhin unterschieden sich die Therapiedauer und die Verabreichungsform des Decarboxylase-Hemmers. Hyperglykämische Wistar-Ratten wurden über eine Woche subkutan mit Carbidopa behandelt, während den Tieren der vorliegenden Arbeit Benserazid akut intravenös infundiert wurde.

#### 4.2.2 Pharmakologische Stimulation von D<sub>3</sub>-Rezeptoren

Die glomeruläre Hyperfiltration in der Frühphase des Diabetes mellitus geht mit einer schlechten Prognose für die Nierenfunktion einher (Mogensen, 1986). Dabei könnte endogenes Dopamin an der Ausbildung der diabetischen Hyperfiltration eine entscheidende Rolle spielen. Bereits in früheren Studien konnte endogenes Dopamin mit der aminosäurebedingten Hyperfiltration in Zusammenhang gebracht werden (siehe auch Kapitel 4.1.2). S(-)-Sulpirid, ein spezifischer D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonist, führte dabei im Gegensatz zu dem D<sub>1</sub>-Rezeptorantagonist SCH 23390 zu einer vollständigen Aufhebung der aminosäurebedingten Hyperfiltration. Somit wird den Rezeptoren der D<sub>2</sub>-Unterfamilie eine bedeutende Beteiligung an der durch Aminosäuren hervorgerufenen GFR-Steigerung zugeschrieben (Mühlbauer et al., 1994). Auch in einer Studie der eigenen Arbeitsgruppe konnte die Aminosäure-induzierte Zunahme der GFR unter dem sowohl peripher als auch zentral wirkenden D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten S(-)-Sulpirid vollständig, unter dem ausschließlich peripher wirkenden D<sub>2</sub>-Rezeptorantagonisten Domperidon jedoch nur teilweise, gehemmt werden (Luippold und Mühlbauer, 1998). Spätere Untersuchungen ließen dem der D<sub>2</sub>-Unterfamilie zugeordneten D<sub>3</sub>-Rezeptor eine wichtige Rolle bei der Modulation der diabetischen Hyperfiltration zukommen. Studien an diabetischen Sprague-Dawley-Ratten, die kontinuierlich über einen Zeitraum von 14 Tagen einen oral verabreichten D<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten, das BSF 135170, erhielten, zeigten eine nahezu vollständige Aufhebung der diabetischen Hyperfiltration (Luippold et al., 2005). Gegensätzlich dazu führten Infusionen von 7-Hydroxy-DPAT, einem selektiven D<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten (Baldessarini et al., 1993), zu einer signifikanten, dosisabhängigen Steigerung der GFR in normoglykämischen Sprague-Dawley-Ratten. Außerdem wurde unter einer Dosierung von 1 µg/kg KG/min neben dem GFR-Anstieg eine Abnahme des renalen Plasmaflusses (RPF) sowie eine Zunahme des renalen Gefäßwiderstandes beobachtet. Durch Mikropunktionsuntersuchungen konnte als möglicher Mechanismus für die GFR-Steigerung eine über D<sub>3</sub>-Rezeptoren vermittelte Vasokonstriktion des Vas efferens angenommen werden. Eine Aufhebung dieser renalen hämodynamischen Veränderungen erfolgte dabei unter

Vorbehandlung mit dem D<sub>3</sub>-Rezeptorantagonisten U-99194A (Luippold et al., 2000). Auf diese Beobachtungen hin sollte in der vorliegenden Arbeit der Effekt von 7-Hydroxy-DPAT in einem diabetischen Rattenmodell untersucht werden. Dabei stellte sich die Frage, ob unter Verwendung des D<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten eine weitere Steigerung der diabetischen Hyperfiltration möglich ist. Weiterhin sollte die Wirkung von 7-Hydroxy-DPAT unter Benserazidbehandlung und damit ausgeschalteter peripherer Dopaminsynthese auf die Nierenfunktion hin untersucht werden. In den beiden Hauptperioden, in denen die Tiere den D<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten 7-Hydroxy-DPAT in einer Konzentration von 1 µg/kg KG/min infundiert bekamen, wiesen alle vier SD-Versuchsgruppen eine tendenziell erhöhte Urinausscheidung auf, die jedoch in keiner der Gruppen das Signifikanzniveau erreichte. Entgegen der Erwartungen konnte keine Steigerung der GFR in den Gruppen beobachtet werden. Mit Ausnahme der DM-SD-BZD-Gruppe lagen die GFR-Werte unter D<sub>3</sub>-Rezeptor-Aktivierung unter denen der beiden Vorperioden. Dabei zeigten jedoch die BZD-Tiergruppen (CON-SD-BZD, DM-SD-BZD) höhere GFR-Mittelwerte im Vergleich zu ihren entsprechenden Kontrollgruppen auf. Diese geringfügigen GFR-Abweichungen könnten wiederum auf eine D<sub>3</sub>-Rezeptorstimulation hindeuten. In einer weiteren Studie der eigenen Arbeitsgruppe erhielten normoglykämische Sprague-Dawley-Ratten 7-Hydroxy-DPAT akut im Clearanceversuch in Dosen von 0,01, 0,1 und 1,0 µg/kg KG/min intravenös verabreicht. Dabei konnte ein dosisabhängiger Anstieg der GFR dokumentiert werden, wobei der mittlere arterielle Blutdruck unverändert blieb. Lediglich die Dosis von 1 µg/kg KG/min ließ einen geringfügigen Abfall der Pulsrate erkennen. Weiterhin induzierte diese Dosis eine signifikante Diurese, sowie eine gesteigerte absolute, als auch fraktionelle Natriumexkretion. Ab einer Dosis von 3 µg/kg KG/min konnte eine Beeinflussung der systemischen hämodynamischen Funktionen beobachtet werden (Luippold et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit wurde somit ebenfalls eine Dosis von 1 µg/kg KG/min verwendet, auf die jedoch die Tiere aller vier Versuchsgruppen mit einem Blutdruckabfall und einer deutlichen Reduktion der Herzfrequenz reagierten. Diese systemischen hämodynamischen Veränderungen könnten dabei ursächlich für die GFR-Abnahme nach Verabreichung von 7-Hydroxy-

DPAT sein, weshalb die in der vorliegenden Arbeit mit 1 µg/kg KG/min verwendete Dosierung für eine Beurteilung der Nierenfunktion wenig geeignet erscheint. Der Grund für die erhöhte Sensitivität der Tiere gegenüber 7-Hydroxy-DPAT ist jedoch unklar. Weiterhin wird dem Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor, da er auch in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates exprimiert wird (Sanada et al., 1997), eine Unterdrückung der Reninsekretion zugeschrieben. Dies könnte wiederum, wie auch bereits oben benannte Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigten, die erhöhten absoluten als auch fraktionellen Natriumexkretionswerte, die in allen vier SD-Versuchsgruppen beobachtet wurden, erklären. Auch an einem anderen Tiermodell der Arbeitsgruppe Asico konnte eine Beteiligung des Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptors an der Reninsynthese und damit auch Blutdruckentwicklung gezeigt werden. Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor Knockout Mäuse wiesen eine erhöhte Reninproduktion und somit verminderte Elektrolytausscheidung, verbunden mit erhöhten Blutdruckwerten der heterozygoten als auch homozygoten Tiere, auf (Asico et al., 1998).

### **4.3 Benserazid und Nierenfunktion in einem diabetischen hypertensiven Rattenmodell**

#### **4.3.1 Basalbedingungen**

Da bei den spontan hypertensiven Ratten (SHR) eine Beteiligung des dopaminergen Systems an der Blutdruckentwicklung vermutet wird, sollten die durchgeführten Versuche weitere Erkenntnisse zur Nierenfunktion bei Vorliegen eines Diabetes mellitus und einer Hypertonie erbringen. Daraufhin stellte sich zum einen die Frage, ob eine vorbestehende Hypertonie bei diabetischen SHRatten die Nierenfunktion zusätzlich beeinträchtigen würde. Zum anderen sollte der Effekt von Benserazid darauf hingehend überprüft werden, ob auch hier eine Reduktion der durch den Hypertonus eventuell gesteigerten diabetischen Hyperfiltration möglich ist. Dopamin nimmt über die D<sub>1</sub>-Rezeptorunterfamilie eine physiologische Funktion in der Regulation der Natriumexkretion ein. Diese Regulation erfolgt überwiegend über den D<sub>1</sub>-Rezeptor, der in einem größeren

Ausmaß im proximalen Tubulus exprimiert wird als der D<sub>5</sub>-Rezeptor (Nash et al., 1993). Die Natriumexkretion wird dabei über zwei Mechanismen im proximalen Tubulus gesteuert. Über den einen Transduktionsweg kommt es durch D<sub>1</sub>-Rezeptoren zu einer Inhibierung sowohl des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Kotransportes wie auch der Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase, was eine verminderte Rückresorption von Natrium zur Folge hat (Aperia et al., 1987). Dieser Transduktionsweg scheint in spontan hypertensiven Ratten (SHR) gestört zu sein. SHR-Tiere zeigten auf eine exogene Dopaminverabreichung wie auch auf eine Zufuhr von D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten einen minimal inhibitorischen Effekt auf den tubulären Natriumtransport (Jose et al., 1996). Manche Autoren nahmen eine verminderte renale Dopaminproduktion als Ursache für den Hypertonus an (Kuchel et al., 1991). Andere konnten gegensätzlich dazu in SHR-Tieren sogar höhere Dopaminkonzentrationen im Vergleich zu ihrer normotensiven Kontrollgruppe feststellen. Dabei sahen sie in der fehlenden Interaktion zwischen D<sub>1</sub>-Rezeptor und dem G<sub>s</sub>-Protein im proximalen Tubulussystem eine weitere mögliche Ursache. Das G<sub>s</sub>-Protein führt zu einer Stimulierung der Adenylatcyclase, die wiederum einen Anstieg des Second messengers cAMP zur Folge hat. Eine darauf sich anschließende Aktivierung der Proteinkinase A führt über eine Phosphorylierung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase zu deren Inhibierung. Somit konnte unter Einsatz eines Dopamin D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten zwar ein Anstieg an cAMP in normotensiven Wistar-Kyoto-Tieren beobachtet werden, der jedoch in SH-Ratten merklich vermindert ausfiel (Jose et al., 1992). Innerhalb des Sammelrohres der Niere sowie dem Striatum im Gehirn zeigte sich sowohl bei normotensiven, als auch hypertensiven Ratten ein ähnlicher cAMP-Anstieg auf die Verabreichung eines D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten. Die verminderte Koppelung von D<sub>1</sub>-Rezeptor und seinem Effektorcomplex im SH-Rattenmodell scheint somit mit dem renalen proximalen Tubulus assoziiert zu sein (Jose et al., 1996). Weiterhin ist jedoch auch eine Interaktion zwischen dem D<sub>1</sub>-Rezeptor und der Phospholipase C bekannt, die zu einer Aktivierung von Diacylglycerin und Inositol-1,4,5-Triphosphat (IP<sub>3</sub>) führt, was ebenfalls mit einer Phosphorylierung und somit mit einer Inhibierung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase einhergeht. Dabei konnte in der Arbeitsgruppe Chen et al. in hypertensiven Ratten eine signifikant höhere Phospholipase C Aktivität als in

Wistar-Kyoto-Ratten festgestellt werden. Weiterhin zeigte der D<sub>1</sub>-Rezeptor-antagonist SCH 23390, welcher in Wistar-Kyoto-Ratten eine um 50 % reduzierte IP<sub>3</sub>-Produktion verursachte, keinen Effekt im hypertensiven SH-Rattenmodell (Chen et al., 1992). Auch die Rolle des D<sub>2</sub>-Rezeptors wurde bezüglich der Entwicklung der Hypertension untersucht. Im Gegensatz zum D<sub>1</sub>-Rezeptor weist der D<sub>2</sub>-Rezeptor einen inhibitorischen Effekt auf die Adenylatcyclase auf. Eine Interaktion von D<sub>1</sub>- und D<sub>2</sub>-Rezeptoren verursacht jedoch eine synergistische Aktivitätsminderung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase im proximalen Tubulus, die in den hypertensiven Tieren abgeschwächt zu sein scheint (siehe auch Kapitel 4.1.3). Der Hypertonus nimmt ebenfalls eine wichtige Rolle in der frühen Entwicklung der diabetischen Nephropathie ein. Diabetische SH-Ratten wiesen dabei nach 32 Wochen signifikant höhere Albuminexkretionswerte sowie eine ausgeprägtere Basalmembranerweiterung auf als ihre normotensive Kontrollgruppe (Cooper et al., 1988).

In der vorliegenden Arbeit konnten nahezu keine Unterschiede bezüglich der GFR-Werte und der renalen Natriumexkretion zwischen der DM-SHR-VHC und der DM-WKY-VHC-Tiergruppe gefunden werden. Dabei wiesen die beiden diabetischen Vehikelgruppen im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrolltieren signifikant höhere GFR-Werte und damit eine diabetische Hyperfiltration auf. Diese Beobachtung könnte darauf hindeuten, dass innerhalb des gewählten Zeitraumes von 14 Tagen die Hypertension keine weiteren Auswirkungen auf die Nierenfunktion im diabetischen Rattenmodell genommen hat. Für einen genaueren Vergleich der Nierenfunktion zwischen normotensivem und hypertensivem Rattenmodell müssten jedoch weitere Parameter wie Protein- und Albuminausscheidung sowie morphologische Veränderungen gemessen werden. Außerdem wiesen die diabetischen SHR-Tiere der DM-SHR-VHC-Gruppe im Clearanceversuch mittlere arterielle Blutdruckwerte auf, die unter denen im wachen Zustand lagen. Diese systemische Beeinflussung unter Narkose könnte eine weitere Ursache für fälschlich niedriger gemessene GFR-Werte sein, so dass in der vorliegenden Arbeit die Auswirkung des Hypertonus

auf die Nierenfunktion in diabetischen Ratten nicht eindeutig geklärt werden konnte.

Unter der Akutgabe von Benserazid näherten sich die GFR-Werte der diabetischen Tiere (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD) denen der normoglykämischen Kontrollgruppe (CON-WKY-BZD, CON-SHR-BZD) an. Somit konnte auch hier, wie schon bei den SD-Tieren, eine Reduktion der diabetischen Hyperfiltration durch Benserazid erzielt werden. Dies könnte wiederum darauf hindeuten, dass eine Inhibierung der peripheren Dopaminsynthese auch unter hypertensiven Bedingungen Einfluss auf die renale Hämodynamik nimmt.

#### **4.3.2 Pharmakologische Stimulation von D<sub>3</sub>-Rezeptoren**

Unter Verabreichung von 7-Hydroxy-DPAT in den beiden Hauptperioden konnte innerhalb der SHR- und WKY-Tiergruppen ein Blutdruckabfall sowie eine Abnahme der Herzfrequenz beobachtet werden. Diese hämodynamischen Veränderungen gingen, mit Ausnahme der CON-WKY-BZD-Tiere, mit einer GFR-Reduktion einher. In unterschiedlichen Studien konnte interessanterweise eine gegensätzliche Beobachtung bezüglich der Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptorgenexpression in spontan hypertensiven Ratten (SHR) gemacht werden. Dabei wies Zeng et al. unter dem Einsatz eines Dopamin D<sub>1</sub>-Rezeptoragonisten, dem Fenoldopam, eine erhöhte Genexpressionsrate von D<sub>1</sub>- und D<sub>3</sub>-Rezeptoren in Wistar-Kyoto-Ratten (WKY), jedoch nicht in SHR-Tieren, auf (Zeng et al., 2003 und 2004). Diese Untersuchungsergebnisse konnten jedoch in der eigenen Arbeitsgruppe nicht bestätigt werden. Die SHR- und WKY-Tiere erhielten den D<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten 7-Hydroxy-DPAT akut im Clearanceversuch in zwei unterschiedlichen Dosen von 0,01 und 0,1 µg/kg KG/min über den Venenkatheter infundiert. Bei einer verminderten renalen Expression des D<sub>3</sub>-Rezeptorgens müsste demzufolge ein Anstieg der GFR sowie eine Natriurese in den SHR-Tieren ausbleiben. In beiden Gruppen konnte jedoch auf die DPAT-Infusion eine dosisabhängige Steigerung der GFR und Urinausscheidung sowie eine Zunahme der Natriumexkretion beobachtet werden. Weiterhin wurden keine Unterschiede bezüglich der Genexpressionsrate von D<sub>3</sub>-Rezeptoren in WKY- und SHR-Tieren gefunden (Luippold et al., 2003). In der vorliegenden Arbeit

kann die im Vergleich zur normotensiven Kontrollgruppe (CON-WKY-BZD) beobachtete Reduktion der GFR-Werte in der CON-SHR-BZD-Gruppe auf die Verabreichung von 7-Hydroxy-DPAT jedoch nicht durch eine eventuell verminderte Anzahl an renalen Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptoren erklärt werden. Die CON-SHR-BZD-Gruppe wies dabei einen stärkeren Abfall der mittleren arteriellen Blutdruckwerte auf, als ihre normotensive Kontrollgruppe (CON-WKY-BZD). Die GFR-Reduktion ist somit, wie auch schon bei den SD-Tieren zu beobachten war, am ehesten auf die systemische Beeinflussung durch 7-Hydroxy-DPAT zurückzuführen. Möglicherweise könnte der Blutdruckabfall, der interessanterweise vor allem in den mit BZD-behandelten Gruppen stärker ausgeprägt ist, in Zusammenhang mit der Lokalisation des D<sub>3</sub>-Rezeptors in den Zellen des juxtaglomerulären Apparates stehen (Sanada et al., 1997). Dabei wird dem Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor eine Beteiligung an der Unterdrückung der Reninsekretion zugeschrieben (Worth et al., 1986), die eine Abnahme des Gefäßtonus und der Reabsorption von Elektrolyten zur Folge hat. Da 7-Hydroxy-DPAT jedoch akut über zwei Perioden im Clearanceversuch verabreicht wurde, scheint dieser über den D<sub>3</sub>-Rezeptor vermittelte hypotone Effekt eher unwahrscheinlich. Auch konnte weder bei den mit Benserazid behandelten diabetischen Tieren (DM-WKY-BZD, DM-SHR-BZD), noch bei den diabetischen Vehikelgruppen (DM-WKY-VHC, DM-SHR-VHC) eine weitere Steigerung der GFR-Werte erzielt werden, was ebenfalls durch den starken Abfall der mittleren arteriellen Blutdruckwerte erklärt werden könnte. Im Gegensatz zur GFR wurde jedoch in allen sechs Versuchsgruppen ein tendenzieller Anstieg der absoluten wie auch fraktionellen renalen Natriumausscheidung auf die 7-Hydroxy-DPAT-Infusion beobachtet, was auf eine mögliche D<sub>3</sub>-Rezeptorstimulation hindeuten würde. Aufgrund der systemischen Veränderungen durch die Gabe von 1 µg/kg KG/min 7-Hydroxy-DPAT konnte die Nierenfunktion nur unvollständig bewertet werden. Nachfolgende Versuche mit geringeren Dosen, die keine systemische Beeinflussung verursachen, sind dabei nötig.

#### 4.4 Klinische Implikation

Der Diabetes mellitus stellt die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz dar. In Europa und den USA sind ca. 35 % aller Dialysepatienten Diabetiker. Frühere Studien weisen darauf hin, dass die in der Frühphase des Diabetes mellitus zu beobachtende diabetische Hyperfiltration einen entscheidenden Risikofaktor für die Ausbildung der diabetischen Nephropathie darstellt. Das endogene Dopamin scheint dabei eine wichtige Rolle in der Entwicklung der diabetischen Hyperfiltration zu spielen. In der vorliegenden Arbeit konnte unter Akutgabe von Benserazid im Clearanceversuch eine Normalisierung der durch den Diabetes mellitus gesteigerten GFR sowohl in einem normotensiven, als auch hypertensiven Rattenmodell erzielt werden. Eine Aufhebung der diabetischen Hyperfiltration war somit, unabhängig von der Blutdrucklage, möglich. Auf diese Beobachtung hin stellt sich nun die weiterführende Frage, ob eine Langzeitbehandlung mit Benserazid die Progression einer diabetischen Nephropathie verzögern kann. Dies könnte in sich anschließenden Experimenten, mittels einer Langzeittherapie mit oral verabreichtem Benserazid bei diabetischen Ratten kurz nach Induktion der diabetogenen Stoffwechsellage untersucht werden. Weitere Parameter, wie renale Albuminausscheidung und morphologische Veränderungen der Niere, wie eine Mesangiumzellproliferation und eine homogen verbreiterte glomeruläre Basalmembran, als Zeichen einer diabetischen Nephropathie, müssten zusätzlich untersucht werden.

Weiterhin konnte ebenfalls unter einer frühzeitigen antihypertensiven Therapie eine Progressionsverzögerung der diabetischen Nephropathie zur terminalen Niereninsuffizienz festgestellt werden. Eine Einstellung der Blutdruckwerte auf < 130/80 mmHg bei Vorliegen einer diabetogenen Stoffwechsellage ist daher erstrebenswert. Therapie der Wahl stellen dabei insbesondere ACE-Inhibitoren dar, die über eine Verminderung der Proteinurie eine nephroprotektive Wirkung aufweisen. Die Effizienz der ACE-Hemmer ist jedoch abhängig von der Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, die sowohl unter chronisch erhöhtem Kochsalzkonsum, als auch in der schwarzen Bevölkerung signifikant supprimiert ist (He et al., 1998). Afrikaner sprechen demzufolge kaum auf eine

Monotherapie mit ACE-Inhibitoren an. Da dem dopaminergen System eine Beteiligung an der Blutdruckentwicklung, als auch der Ausbildung der diabetischen Hyperfiltration zugeschrieben wird, könnte die Inhibierung der peripheren Dopaminsynthese eine weitere Option für die Behandlung oder Progressionsverzögerung der diabetischen Nephropathie darstellen.

## 5. Zusammenfassung

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass Benserazid (BZD), ein Inhibitor der L-Aminodecarboxylase, die aminosäurebedingte Hyperfiltration verhindert, so dass endogenes Dopamin einen Mediator für die hämodynamische Antwort der Niere auf Aminosäurelösungen darstellt. Um die Beteiligung des dopaminergen Systems an der Regulation der diabetischen Hyperfiltration zu überprüfen, wurde in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von BZD (30 µg/kg KG/min) auf die Nierenfunktion bei normotensiven als auch hypertensiven Ratten, mit einem durch Streptozotocin-induzierten (60 mg/kg KG, i.p) Diabetes mellitus, untersucht. In einer Vorversuchsreihe konnte gezeigt werden, dass BZD signifikant den Dopamingehalt in der Niere verringert. Weiterhin sollte der Effekt des Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptors auf die Ausbildung einer glomerulären Hyperfiltration, mittels des Einsatzes von 7-Hydroxy-DPAT (DPAT; 1 µg/kg KG/min), einem D<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten, beurteilt werden.

Zunächst wurden an wachen normotensiven Sprague-Dawley-Ratten (SD), als auch wachen spontan hypertensiven Ratten (SHR) und ihrer normotensiven Kontrollgruppe (WKY) teilweise Schwanzblutdruckmessungen sowie Stoffwechselkäfversuche durchgeführt. Bei den diabetischen (DM) Tieren konnte gegenüber den normoglykämischen Kontrolltieren (CON) eine signifikante Polyphagie, Polydipsie und Polyurie beobachtet werden. Die bestimmten systolischen Blutdruckwerte der SHR-Tiere lagen unabhängig von der Stoffwechsellage signifikant über denen der WKY-Tiere. An narkotisierten Tieren wurde 14 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus im Clearanceversuch, unter Akutgabe von isotoner NaCl-Lösung, als Vehikel (VHC), bzw. BZD, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR), das Urinzeitvolumen, als auch die Natriumexkretionsrate bestimmt. Entsprechende Versuche erfolgten ebenfalls an normoglykämischen Tieren (CON). Diabetische mit Vehikel (DM-VHC) infundierte Tiere wiesen, wie zu erwarten war, eine signifikant gesteigerte GFR gegenüber ihrer CON-Gruppe auf. Eine diabetische Hyperfiltration konnte somit sowohl bei den SD-Tieren, als auch im Hypertoniemodell bei den SH-Ratten

und ihrer entsprechenden Kontrollgruppe festgestellt werden. Innerhalb der DM-SD-VHC-Gruppe zeigte sich zusätzlich eine Diurese und Natriurese. Als Hauptaussage der vorliegenden Arbeit konnte gefunden werden, dass unter akuter BZD-Gabe sowohl im normotensiven, als auch hypertensiven Rattenmodell die diabetische Hyperfiltration aufgehoben werden konnte. Die GFR-Werte der DM-BZD-Tiere glichen sich somit, unabhängig von der Blutdrucklage, denen der Kontrollgruppen an.

Die Verabreichung des D<sub>3</sub>-Rezeptoragonisten verursachte in allen Tierversuchsgruppen eine systemische Beeinflussung, die sich in einem Blutdruckabfall und einer Reduktion der Herzfrequenz bemerkbar machte. Als mögliche Folge der hämodynamischen Veränderungen trat eine Reduktion der GFR auf, so dass die in dieser Arbeit gewählte Dosierung für eine Beurteilung der Nierenfunktion wenig geeignet erscheint. Versuche mit geringeren Dosen und eine zusätzliche Betrachtung der renalen Albuminausscheidung sowie morphologischer Veränderungen erscheinen sinnvoll. Zusammengefasst scheint endogenes Dopamin, unabhängig vom Blutdruckniveau, an der Regulation der diabetischen Hyperfiltration beteiligt zu sein. Als weiterführende Frage ist zu klären, ob eine Progressionsverzögerung der diabetischen Nephropathie durch eine Langzeitbehandlung mit BZD möglich ist.

## 6. Literaturverzeichnis

Amenta F, Ricci A, Rossodivita I, Avola R, Tayebati SK. The dopaminergic system in hypertension. *Clin Exp Hypertens* 2001; 23(1-2): 15-24

Antonipillai I, Broers MI, Lang D. Evidence that specific dopamine-1 receptor activation is involved in dopamine-induced renin release. *Hypertension* 1989; 13: 463-468

Aperia A, Bertorello A, Seri I. Dopamine causes inhibition of Na, K-ATPase activity in rat proximal convoluted tubule segments. *Am J Physiol* 1987; 252: F39-F45

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

Baines AD, Chan W: Production of urine free dopamine from DOPA, a micropuncture study. *Life Sci* 1980; 26: 253-259

Baines AD. Functional effects of proximal tubular dopamine production. *Am J Hypertens* 1990; 3(6 Pt 2): 68S-71S

Baldessarini RJ, Kula NS, McGrath CR, Bakthavachalam V, Keabian JW, Neumeyer JL. Isomeric selectivity at dopamine D<sub>3</sub> receptors. *Eur J Pharmacol* 1993; 239: 269-270

Bank N, Aynedijian HS. Progressive increases in luminal glucose stimulate proximal sodium absorption in normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 1990; 86: 309-316

Barthelmebs M, Vailly B, Grima M, Velly J, Stephan D, Froehly S, Imbs JL. Effects of dopamine prodrugs and fenoldopam on glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18(2): 243-253

Benigni A, Perico N, Dadan J, Gabanelli M, Galbusera M, Boccardo P, Mennini T, Remuzzi G. Functional implications of decreased renal cortical atrial natriuretic peptide binding in experimental diabetes. *Circ Res* 1990; 66: 1453-1460

Bertorello A, Aperia A. Inhibition of proximal tubule Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity requires simultaneous activation of DA<sub>1</sub> and DA<sub>2</sub> receptors. *Am J Physiol* 1990; 259: F924-F928

Chen CJ, Vyas SJ, Eichberg J, Lokhandwala MF. Diminished phospholipase C activation by dopamine in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1992; 19(1): 102-108

Chiarelli F, Cipollone F, Romano F, Tumini S, Costantini F, di Ricco L, Pomilio M, Pierdomenico S.D, Marini M, Cuccurullo F, Mezzetti A. Increased circulating nitric oxide in young patients with type 1 diabetes and persistent microalbuminuria: relation to glomerular hyperfiltration. *Diabetes* 2000; 49(7): 1258-1263

Cooper ME, Allen TJ, O'Brien RC, Macmillan PA, Clarke , Jerums G, Doyle AE. Effects of genetic hypertension on diabetic nephropathy in the rat-functional and structural characteristics. *J Hypertens* 1988; 6(12): 1009-1016

Da Prada M, Kettler R, Zürcher G, Schaffner R, Haefely WE. Inhibition of decarboxylase and levels of Dopa and 3-O-Methyldopa: a comparative study of benserazid versus carbidopa in rodents and of Madopar standard versus Madopar HBS in volunteers. *Eur Neurol* 1987; 27(suppl 1): 9-20

Dicker SE. Effect of the protein content of the diet on the glomerular filtration rate of young and adult rats. *J Physiol (Lond.)* 1949; 108: 197-202

Evan AP, Mong SA, Gattone VH, Connors BA, Aronoff GR, Luft FC. The effect of streptocotozin-induced diabetes on the kidney. *Ren Physiol* 1984; 7(2): 78-89

Felder CC, Campbell T, Albrecht F, Jose PA. Dopamine inhibits Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger activity in renal BBMV by stimulation of adenylate cyclase. *Am J Physiol* 1990; 259: F297-F303

Gehlert DR, Gackenheim SL, Seeman P, Schaus J. Autoradiographic localization of [3H] quinpirole binding to dopamine D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptors in rat brain. *Eur J Pharmacol* 1992; 211(2): 189-194

Giros B, Martres MP, Sokoloff P, Schwartz JC. Gene cloning of human dopaminergic D<sub>3</sub> receptor and identification of its chromosome. *C R Acad Sci III* 1990; 311(13): 501-508

Goldberg LI, Kohli JD. Peripheral dopamine receptors: a classification based on potency series and specific antagonism. *Trends Pharmacol Sci* 1983; 4: 64-66

Grandy DK, Litt M, Allen L, Bunzow JR, Marchionni M, Makam H, Reed L, Magenis RE, Civelli O. The human dopamine D<sub>2</sub> receptor gene is located on chromosome 11 at q22-q23 and identifies a Taq I RFLP. *Am J Hum Genet* 1989; 45(5): 778-785

Hannedouche TP, Delgado AG, Gnoinsahe DA, Boitard C, Gruenfeld JP. Renal hemodynamics and segmental tubular sodium reabsorption in early type 1 diabetes. *Kidney Int* 1990; 37: 1126-1133

Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, Saruta T. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity along the rat nephron. *Am J Physiol* 1990; 258(1 Pt 2): F28-F33

Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, Saruta T. Effects of high salt intake on dopamine production in rat kidney. *Am J Physiol* 1991; 260: E675-E679

He FJ, Markandu ND, Sagnella GA, MacGregor GA. Importance of the renin system in determining blood pressure fall with salt restriction in black and white hypertensives. *Hypertension* 1998; 32(5): 820-824

Hebden RA, Gardiner SM, Bennett T, MacDonald IA. The influence of streptozotocin-induced diabetes mellitus on fluid and electrolyte handling in rats. *Clin Sci (Lond)* 1986; 70(1): 111-117

Hussain T, Lokhandwala MF. Renal Dopamine Receptor Function in Hypertension. *Hypertension* 1998; 32:187-197

Ibrahim HN, Hostetter I, Hostetter T. Diabetic Nephropathy. *J Am Nephrol* 1997; 8: 487-493

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

Jackson B, Franze L, Allen TJ, O'Brian R, Cooper M, Hodsmann GP, Jerums G. Effect of glycaemic control on glomerular filtration rate in the streptozotocin diabetic rat. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1988; 15: 361-365

Jaffa AA, Vio CP, Silva RH, Vavrek RJ, Stewart JM, Rust PF, Mayfield RK. Evidence for renal kinins as mediators of amino acid-induced hyperperfusion and hyperfiltration in the rat. *J Clin Invest* 1992; 89(5): 1460-1468

Jones SL, Viberti G. Renal functional reserve in subjects with diabetes mellitus. *Semin Nephrol* 1995; 15: 475-481

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

Jose PA, Eisner GM, Drago J, Carey RM, Felder RA. Dopamine receptor signaling defects in spontaneous hypertension. *Am J Hypertens* 1996; 9: 400-405

Jose PA, Asico LD, Eisner GM, Pocchiari F, Semeraro C, Felder RA. Effects of costimulation of dopamine D<sub>1</sub>- and D<sub>2</sub>-like receptors on renal function. *Am J Physiol* 1998; 275: R986-994

Jose PA, Eisner GM, Felder RA. Role of dopamine in the pathogenesis of hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1999; 26: S10-S13

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

Kaufman LN, Young JB, Landsberg L. Differential catecholamine responses to dietary intake : effects of macronutrients on dopamine and epinephrin excretion in the rat. *Metabolism* 1989; 38: 91-99

Keller C, Ritz E, Pommer W, Stein G, Frank J, Schwarzbeck A. The quality of the treatment of diabetics in kidney failure in Germany. *Dtsch Med Wochenschr* 2000; 3: 125

Kuchel OG, Kuchel GA. Peripheral dopamine in pathophysiology of hypertension: interaction with aging and lifestyle. *Hypertension* 1991; 18: 709-721

Kurtz A, Della Bruna R, Pratz J, Cavero I. Rat juxtaglomerular cells are endowed with DA-1 dopamine receptors mediating renin release. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12(6): 658-663

Le-Coniat M, Sokoloff P, Hillion J, Martres MP, Giros B, Pilon C, Schwartz JC, Berger R. Chromosomal localization of the human D<sub>3</sub> dopamine receptor gene. *Hum Genet* 1991; 87: 618-620

Liebl A, Neiß A, Spannheimer A, Reitberger U, Wagner T, Görtz A. Kosten des Typ-2-Diabetes in Deutschland. Ergebnisse der CODE-2<sup>®</sup>-Studie. *Dtsch Med Wschr* 2001; 126: 585-589

Liu LX, Monsma FJ Jr., Sibley DR, Chiodo LA. D2L, D2S, and D3 dopamine receptors stably transfected into NG 108-15 cells couple to a voltage-dependent potassium current via distinct G protein mechanisms. *Synapse* 1996; 24: 156-164

Luippold G, Küster E, Joos T, Mühlbauer B. Dopamine D<sub>3</sub>-receptor activation modulates renal function in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; 358: 690-693

Luippold G, Mühlbauer B. Dopamine D<sub>2</sub> receptors mediate glomerular hyperfiltration due to amino acids. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1248-1252

Luippold G, Schneider S, Vallon V, Osswald H, Mühlbauer B. Postglomerular vasoconstriction induced by dopamine D<sub>3</sub> receptor activation in anesthetized rats. *Am J Physiol* 2000; 278(4): F570-F575

Luippold G, Beilharz M und Mühlbauer B. Reduction of glomerular hyperfiltration by dopamine D<sub>2</sub>-like receptor blockade in experimental diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16: 1350-1356

Luippold G, Zimmermann C, Mai M, Kloor D, Starck D, Gross G, Mühlbauer B. Dopamine D<sub>3</sub>-receptors and salt-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2001; 12: 2272-2279

Luippold G, Piesch C, Osswald H, Mühlbauer B. Dopamine D<sub>3</sub> receptor mRNA and renal response to D<sub>3</sub> receptor activation in spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 2003; 26(10): 855-861

Luippold G, Beilharz M, Mühlbauer B. Chronic renal denervation prevents glomerular hyperfiltration in diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19(2): 342-347

Luippold G, Beilharz M, Wehrmann M, Unger L, Gross G, Mühlbauer B. Effect of dopamine D<sub>3</sub> receptor blockade on renal function and glomerular size in diabetic rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2005; 371: 420-427

Masuhr KF, Neumann M. *Neurologie*. 4. Auflage. Hippokrates, Stuttgart 1998; 189-197

Meyer TW, Ichikawa I, Zatz R, Brenner BM. The renal hemodynamic response to amino acid infusion in the rat. *Trans Assoc Am Physicians* 1983; 96: 76-83

Missale C, Memo M, Liberini P, Spano P. Dopamine selectively inhibits angiotensin II-induced aldosterone secretion by interacting with D<sub>2</sub> receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 246(3): 1137-1143

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

Mogensen CE. Glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term and long-term diabetes mellitus. *Scand J Clin Lab Invest* 1971; 28: 91

Mogensen CE. Early glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetics and late nephropathy. *Scan J Clin Lab Invest* 1986; 46: 201-206

Mühlbauer B, Osswald H. Feeding but not salt loading is the dominant factor controlling urinary dopamine excretion in conscious rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1992; 346: 469-471

Mühlbauer B, Hartenburg E, Osswald H. Renal response to amino acid infusion in rats: effect of dopamine receptor antagonists and benserazide. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1994; 349: 244-249

Mühlbauer B, Mickeler C, Schenk F. Protein-induced increase in urinary dopamine in normal and diabetic rats: role of catecholamine precursors. *Am J Physiol* 1997; 273 (1 Pt 2): R80-R85

Mühlbauer B, Spöhr F, Schmidt R, Osswald H. Role of renal nerves and endogenous dopamine in amino acid-induced glomerular hyperfiltration. *Am J Physiol* 1997; 273: F144-F149

Nash SR, Godinot N, Caron MG. Cloning and characterization of the opossum kidney cell D<sub>1</sub> dopamine receptor: expression of identical D<sub>1A</sub> and D<sub>1B</sub> dopamine receptor mRNAs in opossum kidney and brain. *Mol Pharmacol* 1993; 44: 918-925

O'Connell DP, Botkin SJ, Ramos SI, Sibley DR, Ariano MA, Felder RA, Carey RM. Localisation of D<sub>1A</sub> receptor protein in the rat kidneys. *Am J Physiol* 1995; 268: F1185-F1197

O'Connell DP, Vaughan CJ, Aherne AM; Botkin SJ, Wang ZQ, Felder RA, Carey RM. Expression of dopamine D<sub>3</sub> receptor protein in the rat kidney. *Hypertension* 1998; 32: 886-895

O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF. Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. *FASEB J* 1988; 2: 2339-2347

Petrides PE. Nervengewebe. In: Löffler G, Petrides P (Hrsg) *Physiologische Chemie*. 4. Aufl., Springer, Berlin Heidelberg New York 1990, Kap. 33, S. 909-926

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

Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. *Innere Medizin*. 3. Auflage. Urban&Fischer München; Jena 2004; 804-840

Rudberg S, Persson B, Dahlquist G. Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy- an 8-year prospective study. *Kidney Int* 1992; 41(4): 822-828

Rudberg S, Osterby R. Decreasing glomerular filtration rate- an indicator of more advanced diabetic glomerulopathy in the early course of microalbuminuria in IDDM adolescents? *Nephrol Dial Transplant* 1997; 12(6): 1149-1154

Sakamoto K, Kikkawa R, Haneda M, Shigeta Y. Prevention of glomerular hyperfiltration in rats with streptozotocin-induced diabetes by an atrial natriuretic peptide receptor antagonist. *Diabetologia* 1995; 38(5): 536-542

Sanada H, Yao L, Jose PA, Carey RM, Felder RA. Dopamine D<sub>3</sub> receptors in rat juxtaglomerular cells. *Clin Exp Hypertens* 1997; 19: 93-105

Sanada H, Xu J, Watanabe H, Jose PA, Felder RA. Differential expression and regulation of dopamine-1 (D-1) and dopamine-5 (D-5) receptor function in human kidney. *Am J Hypertens*. 2000; 13: 156A

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

Seri I, Aperia A. Contribution of dopamine 2 receptors to dopamine-induced increase in glomerular filtration rate. *Am J Physiol* 1988; 254: F196-F201

Seubert JM, Xu F, Graves JP, Collins JB, Sieber SO, Paules RS, Kroetz DL, Zeldin DC. Differential renal gene expression in pre-hypertensive and hypertensive spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 (eingereicht)

Shafer RA, Levant B. The D<sub>3</sub> dopamine receptor in cellular and organismal function. *Psychopharmacology (Berl)* 1998; 135(1): 1-16

Sheikh-Hamad D, Wang YP, Jo OD, Yanagawa N. Dopamine antagonizes the action of angiotensin II in the renal brush-border membrane. *Am J Physiol* 1993; 264(4 Pt 2): F737-F743

Sibley DR, Monsma FJ Jr. Molecular biology of dopamine receptors. *Trends Pharmacol Sci* 1992; 13(2): 61-69

Siragy HM, Felder RA, Howell NL, Chevalier RL, Peach MJ, Carey RM. Evidence that dopamine -2 mechanisms control renal function. *Am J Physiol* 1990; 259: F793-F800

Siragy HM, Felder RA, Peach MJ, Carey RM. Intrarenal DA<sub>2</sub> dopamine receptor stimulation in the conscious dog. *Am J Physiol* 1992; 262: F932-F938

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D<sub>3</sub>) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990; 347: 146-151

Sugimoto H, Shikata K, Matsuda M, Kushiro M, Hayashi Y, Hiragushi K, Wada J, Makino H. Increased expression of endothelial cell nitric oxide synthase (eNOS) in afferent and glomerular endothelial cells is involved in glomerular hyperfiltration of diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1998; 41(12): 1426-1434

Suzuki M, Hurd YL, Sokoloff P, Schwartz JC, Sedvall G. D<sub>3</sub> dopamine receptor mRNA is widely expressed in the human brain. *Brain Res* 1998; 779(1-2): 58-74

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(4): 870-874

Thomas DM, Coles GA, Williams JD. Dopamine does not mediate protein-induced hyperfiltration. *Exp Nephrol* 1994; 2(5): 294-298

Tolins JP. Mechanisms of glucagon-induced renal vasodilatation: role of prostaglandines and endothelium-derived relaxing factor. *J Lab Clin Med* 1992; 120(6): 941-948

Tomlinson KC, Gardiner SM, Bennett T. Diabetes mellitus in Brattleboro rats: cardiovascular, fluid, and electrolyte status. *Am J Physiol* 1989; 256: R1279-R1285

Trepel M. *Neuroanatomie*. 1. Auflage Urban&Schwarzenberg München; Wien; Baltimore 1995; 123-128

UK Prospective Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in type 2 diabetes. *Lancet* 1998; 352: 837-853

Vallon V, Richter K, Blantz RC, Thomson S, Osswald H. Glomerular hyperfiltration in experimental diabetes mellitus: Potential role of tubular reabsorption. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: 2569-2576

Vaughan CE, van den Buuse M, Roland BL. Brain dopamine D<sub>2</sub> receptor mRNA levels are elevated in young spontaneously hypertensive rats. *Neurosci Res* 1999; 34(4): 199-205

Viberti GC, Bilous RW, Mackintosh D, Keen H. Monitoring glomerular function in diabetic nephropathy. A prospective study. *Am J Med* 1983; 74(2): 256-264

Wilkes BM, Kaplan R, Mento PF, Aynedjian HS, Macica CM, Schlondorff D, Bank N. Reduced glomerular thromboxane receptor sites and vasoconstrictor responses in diabetic rats. *Kidney Int* 1992; 41(4): 992-999

Williams M, Young JB, Rosa RM, Gunn S, Epstein FH, Landsberg L. Effect of protein ingestion on urinary dopamine excretion: evidence for the functional importance of renal decarboxylation of circulating 3,4-dihydroxyphenylalanin in man. *J Clin Invest* 1986; 78: 1687-1693

Wiseman MJ, Mangili R, Alberetto M, Keen H, Viberti G. Glomerular response mechanisms to glycemic changes in insulin-dependent diabetics. *Kidney Int* 1987; 31(4): 1012-1018

Worth DP, Harvey JN, Brown J, Worrall A, Lee MR. Domperidon treatment in man inhibits the fall in plasma renin activity induced by intravenous  $\gamma$ -L-glutamyl-L-dopa. *Br J Clin Pharmacol* 1986; 21: 497-502

Zeller K, Whittaker E, Sullivan L, Raskin P, Jacobsen HR. Effect of restricting dietary protein on the progression of renal failure in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *N Eng J Med* 1991; 324: 78-84

Zeng C, Wang D, Yang Z, Asico LD, Wilcox CS, Eisner GM, Welch WJ, Felder RA, Jose PA. Dopamin D<sub>1</sub> receptor augmentation of D<sub>3</sub> receptor action in vascular smooth muscles. *Circulation* 2003; 108: 200-214

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(3): 654-660

Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA, Van-Tol HH, Cone R, Pribnow D, Salon J, Bunzow JR, Civelli O. Cloning and expression of human and rat D<sub>1</sub> dopamine receptors. *Nature* 1990; 347: 76-80

## 7. Anhang

### **Danksagung**

Ich danke Herrn Prof. Dr. H. Oßwald, der mir die Arbeit im Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen ermöglicht hat.

Mein grosser Dank gilt Herrn Priv. Doz. Dr. G. Luippold für die Überlassung der Doktorarbeit. Für anstehende Fragen und Probleme war es stets möglich seine Zeit in Anspruch zu nehmen. Seine hervorragende Betreuung und unablässige Unterstützung machten es mir möglich diese Arbeit zu einem positiven Abschluss zu bringen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn T. Staudacher, der mir mit einer ausgesprochenen Geduld das Präparieren der Tiere beibrachte. Viele anregende Diskussionen trugen dazu bei, dass die Arbeit viel Spass bereitete und Abwechslung mit sich brachte.

Bei Frau C. Piesch bedanke ich mich für ihre tatkräftige Mithilfe und aufmunternde Unterstützung bei der Durchführung oft hoffnungslos erscheinender Messvorgänge (insbesondere der HPLC).

Ein Dankeschön geht auch an die Tierpfleger, für die tägliche Pflege und Versorgung meiner Tiere im Tierstall.

## Lebenslauf

Katrin Helen Pfeil

1979	geboren in Reutlingen
1986-1991	Freie Evangelische Schule Reutlingen
1991-1997	Eichendorff-Realschule Reutlingen Abschluss: Mittlere Reife
1997-2000	Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Reutlingen Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
2000	Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
2001	Weiterführung des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
2002	Ärztliche Vorprüfung
2003	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2006	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04.05.2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung