

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Osswald

**Untersuchung der Nierenfunktion von Mäusen
im Hinblick auf
Altersabhängigkeit
und
Dopamin D₃-Rezeptorfunktion**

INAUGURAL-DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhardt-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
BÄRBEL SUSANNE PECH
aus Pfullingen

2003

Dekan: Professor Dr. med. C. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. B. Mühlbauer

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. T. Risler

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1 Gegenstand der Arbeit.....	1
1.2 Bisheriger Kenntnisstand.....	1
1.2.1 Grundlagen.....	1
1.2.1.1 Nephron & renale Hämodynamik	1
1.2.1.2 Dopamin & seine Wirkungen.....	2
1.2.2 Dopaminrezeptoren	4
1.2.3 Altersabhängige renale Veränderungen	7
1.2.3.1 Physiologische Basalparameter der Maus	7
1.2.3.2 Renale funktionelle Reserve.....	8
1.2.4 D ₃ -Rezeptor Funktion.....	11
1.2.4.1 Hyperfiltration nach Aminosäureinfusion	11
1.2.4.2 Antwort der Niere auf NaCl-Beladung	13
1.2.4.3 Hypertonus	14
1.3 Eigene Fragestellung	17

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	18
2.2 Erzeugung von D₃(-/-) Tieren	18
2.3 Versuchsgruppen und Experimenteller Ablauf.....	23
2.3.1 Stoffwechselkäfigversuche an wachen Mäusen	23
2.3.1.1 Versuchsgruppen der Stoffwechselkäfigversuche	23
2.3.1.2 Stoffwechselkäfige	23
2.3.1.3 Versuchsaufbau bei Stoffwechselkäfigexperimenten.....	24
2.3.1.4 Probengewinnung und –behandlung	24

2.3.2 Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen.....	24
2.3.2.1 Versuchsgruppen der Clearanceversuche.....	24
2.3.2.2 Narkose.....	25
2.3.2.3 Präparation	26
2.3.2.4 Verwendete Infusionslösungen.....	27
2.3.2.5 Ablauf des Experiments	29
2.3.2.6 Probengewinnung	30
2.4 Analytik	30
2.4.1 Analytierte Parameter.....	30
2.4.2 Hämatokrit.....	31
2.4.3 Elektrolyte in Plasma und Urin	31
2.4.4 Osmolalität des Urins	32
2.4.5 [³ H]-Aktivität in Plasma und Urin.....	32
2.4.6 Urin- und Trinkvolumina.....	33
2.4.7 Nierengewicht.....	33
2.5 Berechnungen und Statistik.....	33
2.5.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP).....	33
2.5.2 Urinzeitvolumen (UV)	34
2.5.3 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	34
2.5.4 Nierenindex (NI).....	34
2.5.5 Elektrolytausscheidung	34
2.5.6 Fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na})	35
2.5.7 Statistische Methoden.....	35
3. ERGEBNISSE	
3.1 Stoffwechselkäfigversuche an wachen Mäusen	36
3.1.1 Stoffwechselkäfigversuche ohne NaCl-Beladung.....	36

3.1.1.1 Junge und ältere CD-1-Mäuse	36
3.1.1.2 Wildtypmäuse (C57/Bl6) und D ₃ (-/-) Mäuse	37
3.1.2 Stoffwechsellkäfigversuche mit 1%-iger und 4%-iger NaCl-Beladung	39
3.1.2.1 Vergleich von Wildtypmäusen (C57/Bl6) und D ₃ (-/-) Mäusen unter 1%-iger NaCl-Beladung	39
3.1.2.2 Vergleich von Wildtypmäusen (C57/Bl6) und D ₃ (-/-) Mäusen unter 4%-iger NaCl-Beladung	40
3.1.2.3 Vergleich von Wildtypmäusen (C57/Bl6) unter 1%-iger und 4%-iger NaCl-Beladung	40
3.1.2.4 Vergleich von D ₃ (-/-) Mäusen unter 1%-iger und 4%-iger NaCl-Beladung	41
3.2 Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen.....	46
3.2.1 Junge und ältere CD-1-Mäuse	46
3.2.1.1 Zeitkontrollen	46
3.2.1.2 Aminosäureninfusion 10%.....	47
3.2.2 Wildtypmäuse (C57/Bl6) und D ₃ (-/-) Mäuse	51
3.2.2.1 Zeitkontrollen	51
3.2.2.2 Aminosäureninfusion 10%.....	52
 4. DISKUSSION	
4.1 Altersabhängige renale Veränderungen.....	58
4.2 D₃-Rezeptor Funktion	66
 5. ZUSAMMENFASSUNG	75
 6. ANHANG	
6.1 Literaturverzeichnis.....	77

1. EINLEITUNG

1.1 Gegenstand der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Nierenfunktion von Mäusen. Im ersten Abschnitt der Arbeit wurden Experimente an jungen und älteren CD-1-Mäusen durchgeführt, um altersabhängige Veränderungen der Niere an wachen Tieren im Stoffwechsellkäfig und an narkotisierten Tieren im Clearanceversuch beurteilen zu können. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde an D₃-Rezeptor knock-out Mäusen mittels einer aminosäurehaltigen Infusionslösung die Funktion des D₃-Rezeptors für die renale Hämodynamik untersucht. Darüber hinaus wurde die tubuläre Funktion mit Hilfe einer akuten, oralen Salzbelastung geprüft.

1.2 Bisheriger Kenntnisstand

1.2.1 Grundlagen

1.2.1.1 Nephron & renale Hämodynamik

Die kleinste Funktionseinheit der Niere ist das Nephron. Es gliedert sich in das Glomerulum mit den dazu gehörigen Kapillarschlingen, die Bowman-Kapsel, den proximalen Tubulus, die Henle-Schleife, den distalen Tubulus und das Sammelrohr. Der Filtrationsvorgang findet im Glomerulum statt, wobei das Blut dem Glomerulum über das *Vas afferens* zugeführt wird. Hier wird ein Teil als Primärfiltrat in die Bowman-Kapsel abfiltriert, während der nicht filtrierte Anteil des Blutes das Glomerulum über das *Vas efferens* verlässt. Der intraglomeruläre Druck und somit die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird über den Gefäßwiderstand des *Vas afferens* und vor allem das *Vas efferens*

reguliert. Die GFR stellt das auf die Zeit bezogene Filtrationsvolumen der Niere dar [Madox *et al.*, 1996]. In den dem Glomerulum nachgeschalteten Tubulusabschnitten findet der komplexe Transport von Elektrolyten, gelösten Substanzen und Wasser statt. Der größte Anteil des Primärfiltrats (circa 99%) wird entlang des Tubulussystems wieder rückresorbiert und dem zirkulierenden Blut zugeführt [Berry, 1996].

Die physiologischen Mechanismen der Autoregulation zur Konstanthaltung des renalen Blutflusses (RBF) und der GFR bei Änderungen des systemischen Blutdrucks sind bisher nicht vollständig verstanden. Dem druckpassiven Dehnungsverhalten und der myogenen Antwort der Nierengefäße, insbesondere der *Arteriae interlobulares* und der *Vasa afferentia* auf Blutdruckänderungen, wird grundsätzliche Bedeutung beigemessen [Busse, 1995]. Darüber hinaus wird der tubuloglomeruläre Feedback (TGF) als wichtiger Regulationsmechanismus angesehen, der die Filtrationsleistung des einzelnen Nephrons tubulären Veränderungen anpasst. Dabei wird in einer im distalen Nephron lokalisierten Region (*Macula densa*) ein erhöhter Volumenfluß, dessen Chloridkonzentration möglicherweise von entscheidender Bedeutung ist, registriert. Hierauf werden der präglomeruläre Gefäßwiderstand erhöht und der glomeruläre Druck erniedrigt, so dass die GFR des einzelnen Nephrons (SNGFR) sinkt. Die GFR kann auf diese Weise unterschiedlichen Volumenbelastungen angepasst werden [Dworkin *et al.*, 1996].

1.2.1.2 Dopamin & seine Wirkungen

Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylethylamin) ist eine im Organismus vorkommende organische Verbindung aus der Gruppe der Katecholamine. Es entsteht als biogenes Amin durch Decarboxylierung des 3,4-Dihydroxyphenylalanins (L-DOPA), das seinerseits durch Hydroxylierung der mit der Nahrung aufgenommenen Aminosäure L-Tyrosin gebildet wird. Dopamin ist der direkte biochemische Vorläufer des Katecholamins Noradrenalin, aus dem in einem

weiteren Schritt der Biosynthese Adrenalin hervorgeht [Petrides, 1990]. Die Wirkungen von Dopamin werden über ein eigenes Rezeptorsystem vermittelt (siehe 1.2.2). Die Synthese der Katecholamine findet an verschiedenen Orten statt. Dopamin wird von Neuronen im zentralen Nervensystem sowie in peripherem Nervengewebe gebildet, des weiteren wird Dopamin von nicht-neuronalem Gewebe u.a. in der Niere freigesetzt. Die Inaktivierung des Dopamins geschieht durch einen enzymatische Abbau oder durch die Wiederaufnahme in präsynaptische Nervenendigungen. Beim enzymatischen Abbau wird Dopamin durch die Monoaminoxidase (MAO) und die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) über die Zwischenprodukte 3,4-Dihydroxymandelsäure und 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure-aldehyd zu dem Hauptendprodukt 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure abgebaut [Petrides, 1990].

Um die Wirkungen **exogenen** Dopamins näher zu charakterisieren, wurden eine Reihe von Studien durchgeführt, die jedoch zu keinem einheitlichen Ergebnis geführt haben. So wurde einerseits postuliert, dass exogenes Dopamin die GFR und den RBF steigert [Olsen *et al.*, 1990; Hoffman *et al.*, 1996]. Andere Arbeitsgruppen konnten diese Hypothese jedoch nicht bestätigen [Wheeler *et al.*, 1987; Drieman *et al.*, 1994]. Klinischen Einsatz findet das Dopamin auf Grund seiner positiv inotropen und die periphere Durchblutung fördernden Potenz. Begründet durch die Hypothese, dass es sowohl das Herzzeitvolumen ohne eine gleichzeitige Herzfrequenzzunahme erhöht, als auch die renale Durchblutung verbessert, wird Dopamin im klinischen Alltag bei der schockbedingten Niereninsuffizienz eingesetzt [Hoffman *et al.*, 1996]. Die therapeutische Wirksamkeit dieser Maßnahme bleibt jedoch umstritten, da die wenigen kontrollierten Studien zum Einsatz von Dopamin bei dieser Indikation keinen günstigen Einfluss zeigten [Bellomo *et al.*, 2000; Lassnigg *et al.*, 2000; Kellum *et al.*, 2001]. Darüber hinaus wurde bei Hunden eine intestinale Ischämie und Hypoxie nach exogener Zufuhr von Dopamin beobachtet [Pawlik *et al.*, 1976; Mühlbauer, 1996]. Eine weitere häufig beschriebene renale Wirkung exogenen Dopamins ist die Steigerung der Natriurese [Meyer *et al.*, 1967; Olsen *et al.*, 1990; Puschett *et al.*, 1992]. Diese Natriurese soll

hauptsächlich über die D₁-Rezeptorfamilie vermittelt werden [Baines *et. al.*, 1986].

Endogenes Dopamin, welches von den Neuronen im ZNS gebildet wird, wirkt vor allem im nigrostriatalen Dopaminsystem auf extrapyramidal-mototrische Vorgänge, sowie im tubuloinfundibulären Dopaminsystem auf die Freisetzung von Prolactin und GRF (growth hormone releasing factor). Die physiologische Bedeutung von endogenem Dopamin in der Niere ist noch nicht hinreichend verstanden. Dopamin wurde wiederholt als natriuretisches Hormon beschrieben [Aperia *et. al.*, 1987; Bertorello *et. al.*, 1988; Seri *et. al.*, 1990], nachdem Alexander *et. al.*, [1974] eine gleichzeitige Veränderung der Dopamin- und Natriumausscheidung beobachtet hatten. *In vitro* wurden diese Ergebnisse durch eine Hemmung der Na⁺/K⁺-ATPase und die nachfolgende Natriuresis begründet. In späteren *in vivo* Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass eine natriuretische Wirkung des Dopamins nur bei vorheriger Natriumretention zu beobachten war und nicht bei einem normalen Natriumhaushalt [Aperia *et. al.*, 1994]. Des Weiteren konnte durch Studien an Ratten [Mühlbauer *et. al.*, 1993] und am Menschen [Barendregt *et. al.*, 1993] nicht bestätigt werden, dass die Salzaufnahme in der Nahrung einen Einfluss auf die Dopaminausscheidung im Urin hat. Endogenes Dopamin könnte nach Aussage von Nowicki *et. al.*, [1993] auch Mediator der forcierten Diuresis durch Furosemid sein.

1.2.2 Dopaminrezeptoren

Dopamin entfaltet seine Wirkung durch Bindung an membranständige Rezeptoren. Die Besonderheit dieser Substanz ist, dass sie an Dopaminrezeptoren und in höherer Konzentration auch an α - und β -Adrenorezeptoren bindet [Goldberg, 1972; Goldberg *et. al.*, 1983]. In den vergangenen Jahren konnten verschiedene Typen des Dopaminrezeptors im ZNS und der Peripherie charakterisiert werden. Sie werden in zwei Subfamilien

unterteilt, die D₁-Familie und die D₂-Familie [Amenta, 1990; Lokhandwala und Amenta 1991; Seeman *et. al.*, 1994]. Die Unterscheidung in die beiden Subfamilien liegt unter anderem in ihrer unterschiedlichen Koppelung an intrazelluläre Effektorsysteme begründet. Während die Rezeptoren der D₁-Familie stimulierend auf die Adenylatcyclase und Phospholipase C wirken [Gingrich and Caron 1993], vermitteln die Rezeptoren der D₂-Familie ihre Wirkung durch Hemmung der Adenylatcyclase, Interaktion mit Calcium- und Kaliumkanälen und den Phosphatidylinositol Metabolismus [Sibley and Monsma 1992; Gingrich and Caron 1993; Robinson and Caron 1997]. Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden wurden die Rezeptoren in der Niere genauer charakterisiert. Dabei wurden D₁- und D₅-Rezeptoren als Vertreter der D₁-Rezeptorfamilie gefunden, sowie D₂-, D₃- und D₄-Rezeptoren als Vertreter der D₂-Rezeptorfamilie [Gao *et. al.*, 1994; Matsumoto *et. al.*, 1995; O'Connell *et. al.*, 1995; Barili *et. al.*, 1997].

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich unter anderem mit dem 1990 aus dem Rattengehirn klonierten und charakterisierten Dopamin D₃-Rezeptor [Sokoloff *et. al.*, 1990]. Sokoloff *et. al.* [1990] beobachteten eine Homologie von 75% der transmembranären Anteile des D₂- und D₃-Rezeptors. Darüber hinaus fanden sie, dass der D₃-Rezeptor, wie der D₂-Rezeptor, als postsynaptischer Rezeptor sowie möglicherweise als Autorezeptor seine Wirkung vermittelt. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Dopamin eine 20-fach höhere Affinität für den D₃-Rezeptor als für den D₂-Rezeptor besitzt [Sokoloff *et. al.*, 1992]. Die anatomische Lokalisation des D₃-Rezeptors in der Niere wurde mit Hilfe der Immunohistochemie und Immunocytochemie ermittelt. D₃-Rezeptoren fanden sich im renalen Cortex, der apikalen Seite von proximalem und distalem Tubulus, im Sammelrohr, den Glomeruli, den Podocyten und den glatten Muskelzellen der Arteriolen [O'Connell *et. al.*, 1998]. In funktionellen Untersuchungen unter Verwendung des D₃-Rezeptor Agonisten R(+)-7-hydroxy-dipropylaminotetralin (7-OH-DPAT) [Levesque, 1996] konnte an Ratten eine dosisabhängige GFR-Steigerung mit einhergehender Diurese Natriurese beobachtet werden [Mühlbauer *et. al.*, 2000]. Der renale Blutfluss (RBF) fiel

hingegen unter 7-OH-DPAT Gabe ab [Luippold *et. al.*, 1998]. Durch Mikropunktionsexperimente wurde die Hypothese aufgestellt, dass eine 7-OH-DPAT Infusion eine postglomeruläre Vasokonstriktion hervorruft, die für den RBF Abfall verantwortlich sein könnte. Diese Effekte konnten durch den selektiven D₃-Rezeptor Antagonist 5,6-dimethoxy-2-(di-*n*-propylamino)-indane (U-99194A) [Waters *et. al.*, 1993] gehemmt werden, nicht jedoch durch den D₂-Rezeptor Antagonisten S(-)-Sulpirid. Des weiteren wurden die 7-OH-DPAT bedingten renalen Veränderungen durch eine chronische renale Denervierung zum Großteil verhindert, was dafür spricht, dass die renale Innervierung eine Bedingung für die Vermittlung der D₃-Rezeptorwirkung ist [Luippold *et. al.*, 1999]. Zusammengefasst legen diese Studien nahe, dass der D₃-Rezeptor regulierend auf die glomeruläre und tubuläre Funktion der Niere einwirkt.

1.2.3 Altersabhängige renale Veränderungen

1.2.3.1 Physiologische Basalparameter der Maus

Die Maus gewinnt als Labortier zunehmend an Bedeutung, nachdem sie über die letzten drei Jahrzehnte zugunsten von Ratten verlassen worden war, die sich als weniger anfällig auf exogene Faktoren zeigten. Grund für diese Entwicklung sind die neuen Techniken zur Erzeugung von transgenen und knock-out Tieren aus embryonalen Stammzellen, die bisher nur bei der Maus als etablierte Methoden verfügbar sind. Diese Tiere bieten unter anderem ein neues Medium zur Erforschung des kardiovaskulären Systems und der Nierenphysiologie.

Bei der Verwendung der Maus als Versuchstier sollte immer in Betracht gezogen werden, dass große Unterschiede in der renalen Basalfunktion zwischen den einzelnen Mäusestämmen vorliegen können. Das Nierengewicht, der Nierenindex (Verhältnis Nierengewicht zu Körpergewicht) und der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) differierten zwischen verschiedenen Mäusestämmen [Schlager, 1966; Schlager, 1968; Hackbarth und Harrison 1982b]. Eine weitere Studie untersuchte die renale Funktion bei 24 unterschiedlichen Mäusestämmen und fand keinen Unterschied für die Natrium-, die Kaliumausscheidung, die Osmolalität und das Urinvolumen zwischen den weiblichen und männlichen Mäusen eines Stammes. Eine 6-10-fache Differenz der erhobenen Parameter wurde jedoch zwischen den unterschiedlichen Mäusestämmen sichtbar [Hackbarth 1982a]. Es wird vermutet, dass diese Unterschiede in den Nahrungsgewohnheiten aber auch in der Struktur und Funktion der Niere begründet liegen. Auf Grund dieser Beobachtung sollten Untersuchungen mit genmanipulierten Mäusen (z.B. knock-out Mäuse) an verschiedenen Mäusestämmen durchgeführt werden um die Funktion des ausgeschalteten Gens eindeutig charakterisieren zu können [Meneton *et. al.*, 2000].

Ein weiterer wichtiger Faktor bei der Verwendung von Mäusen als Versuchstiere stellt der zirkadiane Wach-Schlaf-Rhythmus dar. Mäuse sind wie Ratten nachtaktive Tiere. Es wurde beobachtet, dass sie nachts eine im Vergleich zum Tag bis um das 40-fache gesteigerte Menge an Urinelektrolyten ausscheiden [Cambar *et. al.*, 1981].

Für die physiologischen Basalwerte der Maus in wachem und narkotisiertem Zustand findet sich eine gute Zusammenfassung der bisher veröffentlichten Daten in einer Übersicht von Meneton *et. al.* [2000]. Für Stoffwechselkäfigversuche zeigte sich eine Trinkmenge von 0,83-1,08 ml/(h*100gKG) und eine Urinausscheidung von 0,14-0,56 ml/(h*100gKG). Die Elektrolytausscheidung im Urin wurde für Natrium mit 20,8-79,2 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot 100\text{gKG})$, für Kalium mit 25-104,2 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot 100\text{gKG})$ und für Chlorid mit 12,5-62,5 $\mu\text{mol}/(\text{h} \cdot 100\text{gKG})$ angegeben. Bei narkotisierten Mäusen im Clearanceversuch wurden für die Elektrolytkonzentrationen im Plasma folgende Daten ermittelt: Für die Natriumkonzentration 142-164 mmol/l, für die Kaliumkonzentration 3,0-8,3 mmol/l und für die Chloridkonzentration 109-124 mmol/l. Die beobachtete GFR betrug 0,36-1,7 ml/(min*gNiere) und der RBF 4-8 ml/(min*gNiere).

1.2.3.2 Renale funktionelle Reserve

Die renale funktionelle Reserve stellt die Differenz zwischen der basalen GFR und der maximalen GFR nach Stimulation z. B. Aminosäurebelastung dar. Die Niere besitzt eine Reservekapazität, die in Stresssituationen oder bei Nierenerkrankungen zum Tragen kommt. Die Untersuchung der renalen funktionellen Reserve mittels Aminosäureinfusion stellt eine der Methoden dar, mit der altersabhängige Veränderungen der Niere untersucht werden können. Zu den vermutlichen Mechanismen siehe 1.2.4.1.

Der Alterungsprozess bringt eine Reihe von funktionellen und strukturellen Veränderungen im Organismus mit sich. Neben dem kardiovaskulären und respiratorischen System finden sich solche Vorgänge auch in der Niere [Epstein 1996]. Auf anatomischer Ebene werden im Zuge des Alterungsvorganges eine Reihe von Veränderungen beobachtet; so tritt eine Abnahme an Gesamtnierengewebe ein, die hauptsächlich den renalen Rindbereich und weniger das Nierenmark betrifft [Tauchi *et. al.*, 1971]. Die Anzahl funktionierender Glomeruli scheint abzunehmen, während bei den verbleibenden eine Hypertrophie beobachtet werden kann [McLachlan 1978; Goyal 1982]. An den afferenten und efferenten Arteriolen des Cortex kann zusätzlich eine Atrophie festgestellt werden, die teilweise in eine globale Sklerose der Niere mündet [Takazakura *et. al.*, 1972]. Bei Mäusen lässt sich mit zunehmendem Lebensalter eine Vergrößerung der gesamten Niere beobachten, die vermutlich die verminderte Filtrationsleistung kompensieren soll [Verár und Hügin 1957; Hackbarth und Harrison 1982b].

Altersbedingte funktionelle Veränderungen betreffen die renale Hämodynamik und die tubuläre Funktion der Niere. Hämodynamisch wurde ein Abfall des renalen Blutflusses [Fliser *et. al.*, 1993] und der glomerulären Filtrationsrate [Lewis und Alving 1938] mit zunehmendem Lebensalter beschrieben. Entsprechend dieser Befunde scheint auch die renale funktionelle Reserve, welche mittels einer Aminosäureinfusion geprüft wird, in höherem Alter reduziert zu sein [Baylis *et. al.*, 1990; Fliser *et. al.*, 1993]. Baylis *et. al.* [1990] konnten an Ratten die Korrelation zwischen der Anzahl noch funktionierender Glomeruli, die mit höherem Alter abnimmt, und der Filtrationssteigerung auf eine Glycininfusion zeigen. Sie beobachteten bei senilen Ratten (22-24 Monate alt) neben einer Reduktion der basalen GFR keinen Anstieg auf die Glycininfusion mehr, wie sie bei jüngeren Tieren vorhanden war. Im Gegensatz dazu zeigten Studien bei älteren Menschen (61-82 Jahre), dass von einer signifikant niedrigeren basalen GFR noch eine Steigerung nach Infusion einer Aminosäurelösung möglich war, wenn auch nicht so ausgeprägt wie bei jungen Probanden [Fliser *et. al.*, 1993]. Was die tubuläre Funktion betrifft, konnte

gezeigt werden, dass mit zunehmendem Lebensalter die Rückresorption von Natrium in der Niere reduziert ist [Hollenberg 1976]. Ursächlich für diese Beobachtung könnte die zunehmende Belastung der einzelnen Nephren durch ihre reduzierte Gesamtanzahl sein. Des weiteren zeigten Studien eine verzögerte Antwort des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems im Alter, was ebenfalls zu Natriumverlusten führen könnte [Weidmann *et. al.*, 1975; Crane *et. al.*, 1976]. Bisher sind diese Fragen jedoch noch nicht hinreichend geklärt.

1.2.4 Renale D₃-Rezeptor Funktion

1.2.4.1 Hyperfiltration nach Aminosäureinfusion

Der physiologische Sinn einer Hyperfiltration nach Aminosäureinfusion und die beteiligten Mechanismen sind bisher unzureichend verstanden. Es gibt Studien, die darauf hindeuten, dass humorale Mediatoren eine Rolle spielen könnten. Während endogenes Adenosin für die durch Glycin herbeigeführte Hyperfiltration eine entscheidende Funktion haben soll [Wang und Brooks, 1992], wird das Renin-Angiotensin-System als weniger bedeutend für die hämodynamische Antwort auf Aminosäurebelastung angesehen [Woods, 1993b]. Glucagon als Mediator der GFR Steigerung nach Proteinzufuhr [Premen *et. al.*, 1985] wurde nicht allgemein akzeptiert [Woods, 1993a; Castellino *et.al.*,1988]. Des weiteren wird diskutiert, ob Prostaglandine [Vanrenterghen *et. al.*, 1988] oder vom Endothel gebildetes Stickstoffmonoxid [Murakami *et. al.*, 1991; Tolins und Raij, 1991] eine Rolle bei der GFR-Antwort spielen könnten. Zusätzlich zu all diesen Faktoren könnte der tubuloglomeruläre Feedback (TGF) eine regulatorische Bedeutung bei der amionsäurebedingten Hyperfiltration haben [Brown und Navar, 1990; Kallskog und Marsh, 1990].

In einer von der Arbeitsgruppe Woods *et. al.* [1993a] veröffentlichten Übersicht (siehe *Abb.1*) wurden einige der oben aufgeführten Faktoren in eine Gesamttheorie integriert. Bei der Aminosäureinfusion soll es zu einer vermehrten Rückresorption mit Kotransport von Aminosäuren und Natrium im proximalen Tubulus kommen, was dann von der *Macula densa* als Abfall der Natrium- und Chloridkonzentration registriert wird. Daraufgehend sollen Mediatoren freigesetzt werden, die zu einer Dilatation des *Vas afferens* und somit sekundär zu einem Anstieg der GFR und des RBF führen. Aus dieser Hypothese folgt, dass die Natriumausscheidung im Urin während einer Aminosäureinfusion kompensatorisch abfallen müsste, um den oben beschriebene Kotransport zu bewerkstelligen. Diese Beobachtung konnte durch

einige Autoren [Mühlbauer *et. al.*, 1994; Ruilope *et. al.*, 1987], nicht bestätigt werden. Die Tatsache, dass keine Veränderungen bzw. eher eine Zunahme der Natriumausscheidung unter Aminosäureinfusion beobachtet wurde, könnte durch regulatorische Mechanismen bedingt sein, die erst distal der *Macula densa* in den nachfolgenden Tubulusabschnitten wirksam werden. Da diesen Nephronabschnitten bisher nur eine sehr geringe regulatorische Kapazität zugesprochen wurde, scheint dies jedoch eher unwahrscheinlich.

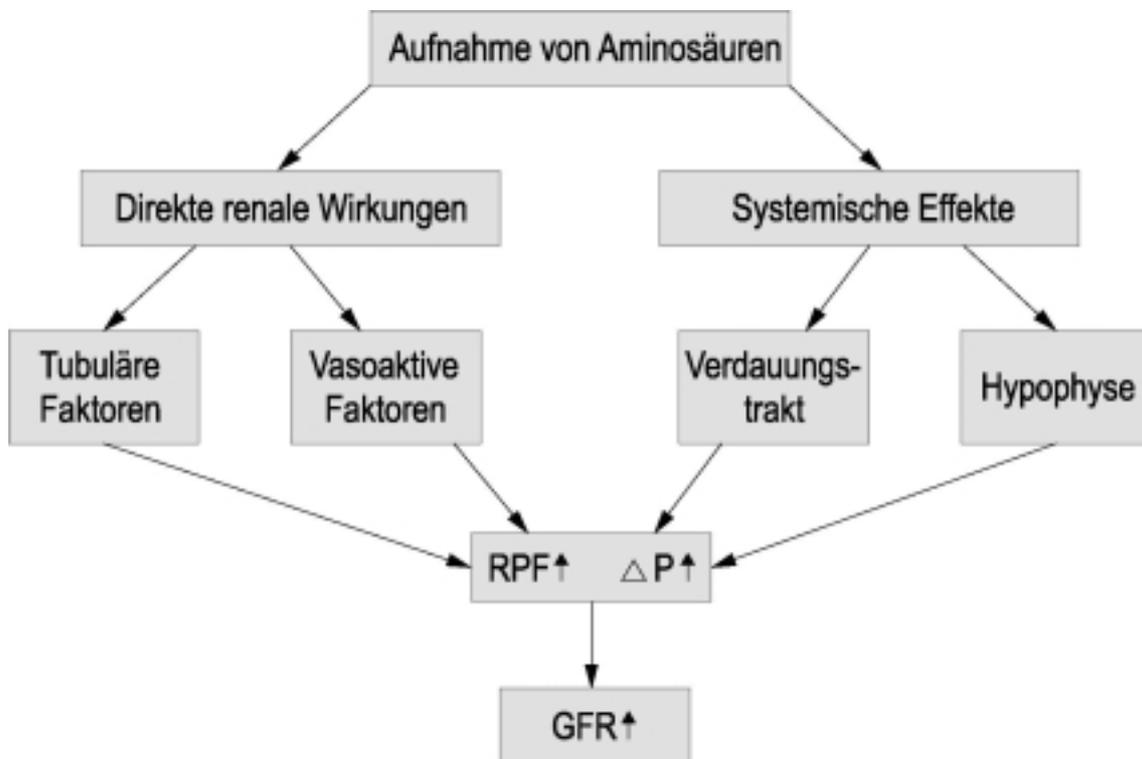


Abbildung 1: Mechanismen der Aminosäure-bedingten Hyperfiltration (Modifiziert nach King und Levey, *J Am Soc Nephrol*, 1993)

Neben den diskutierten Faktoren könnte auch Dopamin an der Vermittlung der Hyperfiltration durch Aminosäureinfusion beteiligt sein. Bisher durchgeführte Studien zeigten, dass eine Dopamininfusion bei Probanden vergleichbare Veränderungen der renalen Hämodynamik hervorruft wie eine Aminosäurebelastung [ter Wee *et. al.*, 1986]. Bei der genaueren Untersuchung des D₂-Rezeptors an Ratten konnte beobachtet werden, dass der D₂-Rezeptor Agonist Quinpirol [Brodde, 1989] eine vergleichbare GFR Steigerung hervorruft

wie eine Aminosäureinfusion. [Luippold und Mühlbauer 1998]. Die Aminosäure- wie Quinpirol-bedingte Hyperfiltration konnte durch Gabe von Sulpirid, einem peripher und zentral wirkenden D₂-Rezeptor Antagonist, aufgehoben werden [Mendez *et. al.*, 1991; Mühlbauer *et. al.*, 1994]. Durch die Verabreichung des selektiv in der Peripherie wirkenden D₂-Rezeptor Antagonisten Domperidon wurde die GFR-Steigerung nur leicht abgeschwächt, aber nicht vollständig aufgehoben [Luippold und Mühlbauer 1998]. Die Aufhebung der aminosäurebedingten GFR Zunahme durch Sulpirid und die nur teilweise beobachtbare Reduktion durch Domperidon zeigte sich bereits in einer Probandenstudie [Luippold *et. al.*, 2001]. Da Quinpirol ebenfalls eine Affinität zum D₃-Rezeptor aufweist [Seeman *et. al.*, 1991] und Untersuchungen mit dem selektiven D₃-Rezeptor Agonist 7-OH-DPAT eine GFR-Steigerung, Diurese und Natriuresis, vergleichbar mit der Reaktion auf eine Aminosäureinfusion zeigten [Mühlbauer *et. al.*, 2000], wäre es denkbar, dass der D₃-Rezeptor bei der aminosäurebedingten Hyperfiltration eine Rolle spielt. Diese Fragestellung wurde in der vorliegenden Arbeit an D₃ knock-out Mäusen näher untersucht.

1.2.4.2 Antwort der Niere auf NaCl-Beladung

Natrium ist das wichtigste Kation des extrazellulären Raumes. Der größte Teil des Natriums wird durch die Nahrung aufgenommen und im Ileum resorbiert. Die Ausscheidung von Natrium erfolgt zu über 95% durch die Niere [Jockenhövel, 1997]. Es existieren eine Reihe von regulatorisch eingreifenden Botenstoffen, wobei Dopamin einen solchen darstellen könnte.

Die natriuretische Wirkung von Dopamin ist schon lange bekannt. Lee [1982] postulierte, Dopamin als intrarenales natriuretische Hormon zu betrachten. Der Hauptbildungsort von Dopamin in der Niere befindet sich in proximalen Tubuluszellen [Baines und Chan 1980], wobei auch Zellen des distalen Tubulus an der renalen Dopaminproduktion beteiligt sein könnten [Goldstein *et. al.*, 1972]. Der größte Anteil an im Urin ausgeschiedenem Dopamin stammt aus der

Niere selbst [Baines and Drangova 1986; Bell *et. al.*, 1988]. Die Hemmung der Flüssigkeits- und Elektrolytrückresorption im Tubulussystem scheint hauptsächlich über Rezeptoren der D₁-Rezeptorfamilie vermittelt zu sein [Felder *et. al.*, 1989]. Mögliche Mechanismen der Natriurese sind die Hemmung des Na⁺-H⁺-Antiports an der luminalen Seite [Felder *et. al.*, 1989b], sowie die Inhibierung der Na⁺-K⁺-ATPase an der basolateralen Seite des proximalen Tubulus [Aperia *et. al.*, 1987]. An Ratten wurde beobachtet, dass neben einer D₁-Rezeptor Aktivierung auch die Stimulation der D₂-Rezeptorfamilie zur Hemmung der Na⁺-K⁺-ATPase nötig ist [Aperia, 1994]. Bei Volumenexpansionsversuchen wurde beobachtet, dass das dopaminerge System für die Natriurese und Diurese bei moderater Volumenexpansion (2% des KG/h) verantwortlich ist, während bei starker Volumengabe (10% des KG/h) andere physiologische Faktoren für die Ausscheidung ins Gewicht fallen. Da Dopamin durch eine sekundäre Einflussnahme in viele den Wasser- und Salzhaushalt regulierende Systeme eingreift, könnten diese weiteren Faktoren auch durch Dopamin moduliert werden [Hansell und Fasching 1990]. Es wurde gezeigt, dass Dopamin die durch Angiotensin II vermittelte Aldosteronsynthese [Whitfield *et. al.*, 1989] und die Ausschüttung des antidiuretischen Hormons aus der Hypophyse hemmt [Pittman *et. al.*, 1983]. Darüber hinaus wird vermutet, dass ein intaktes Dopaminsystem für die natriuretische Wirkung des atrionatriuretischen Faktors (ANF) nötig ist [Hansell *et. al.*, 1987]. Insgesamt scheint Dopamin auf natriuretische und Natrium-retinierende Mechanismen Einfluss zu nehmen und somit einen entscheidenden Faktor für die Balance des Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalts darzustellen [Kuchel und Kuchel 1991].

1.2.4.3 Hypertonus

Dopamin greift über seine unterschiedlichen Rezeptoren regulatorisch in das kardiovaskuläre System ein. Es vermittelt seine Wirkung im zentralen Nervensystem, an glatten Muskelzellen der Gefäße, am Herz und in der Niere [Jose *et. al.*, 1992]. Im zentralen Nervensystem scheint vor allem die D₂-

Rezeptorfamilie (D_2 , D_3 , und D_4) bei Ratten eine Rolle für die Blutdruckregulation zu spielen [Lin und Yang 1994]. Rezeptoren der D_1 - und der D_2 -Familie wurden in Widerstandsgefäßen im renalen, mesenterialen, koronaren, pulmonalen und zerebralen Stromgebiet gefunden, in dem sie primär eine Vasodilatation bewirken [Jose *et. al.*, 1999].

Dopamin könnte den Blutdruck indirekt durch die Regulation von sekundären Botenstoffen wie Renin-Angiotensin, ADH (antidiuretisches Hormon), ANF (atrialer natriuretischer Faktor) und Aldosteron beeinflussen (siehe 1.2.4.2). Diese Faktoren sind an der Langzeitregulierung der Gesamtkörperflüssigkeit beteiligt [Guyton, 1980]. Die ADH-Ausschüttung wird bei Ratten durch Rezeptoren der D_2 -Rezeptorfamilie stimuliert und durch Rezeptoren der D_1 -Familie inhibiert [Nagahama *et. al.*, 1986; Racke *et. al.*, 1986]. Über Rezeptoren der D_2 -Rezeptorfamilie (vermutlich den D_3 -Rezeptor) wird die Sekretion von Aldosteron aus der Nebenniere inhibiert, sowohl durch direkte Wirkung an den Zellen der Zona glomerulosa als auch indirekt über das ZNS. Welcher Mechanismus vorliegt, scheint speziesabhängig zu sein [Carey und Sen 1986]. Welche Rolle die Rezeptoren der D_1 -Rezeptorfamilie bei der Regulation der Aldosteronausschüttung haben, ist noch nicht vollständig geklärt [Aherne *et. al.*, 1997]. Die Reninausschüttung scheint in gleicher Weise an D_1 - und D_2 -Rezeptoreffekte gekoppelt zu sein wie die Aldosteronsekretion. Die Stimulation der Rezeptoren der D_1 -Rezeptorfamilie (D_1 , D_5) steigert die Reninfreisetzung, vermutlich mitbedingt durch natriuretische und hypotone Effekte [Yamaguchi *et. al.*, 1997], während die Stimulation der Rezeptoren der D_2 -Rezeptorfamilie (D_2 , D_3 , D_4) hemmend auf die Reninausschüttung wirken [Sanada *et. al.*, 1997; Jose *et. al.*, 1997]. Die Rezeptorfunktionen sind bei der Reninausschüttung abhängig vom Zustand des Natriumhaushaltes [Williams *et. al.*, 1985; Bertorello *et. al.*, 1988].

Im Hinblick auf die Hypertonieentstehung wurde die Funktion des D_1 - und des D_3 -Rezeptors mit Hilfe von knock-out Mäusen untersucht. Albrecht *et. al.*, [1996] verwendeten D_1 -Rezeptor knock-out Mäuse und konnten einen erhöhten

diastolischen und systolischen Blutdruck beobachten, wobei die für das D₁ Gen homozygot negativen Mäuse die höchsten Werte aufwiesen, gefolgt von den heterozygoten Mäusen und den normotensiven Wildtyptieren. Radioligandenstudien zeigten, dass der D₁-Rezeptor in der Niere die größte Dichte im proximalen Tubulus aufweist [Burgess *et. al.*, 1993]. Jose *et. al.* [1992] postulierte, dass dieser Rezeptor in enger Verbindung mit der durch Dopamin beobachteten Natriurese stehe. Der zugrundeliegende Mechanismus für die Hypertonieentstehung und den möglichen Zusammenhang mit der Natriumausscheidung sind noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise besteht eine ähnliche Ursache für die bei den D₁-Rezeptor knock-out Mäusen beobachtete Hypertonie wie bei spontan hypertensiven Ratten im Modell des Hypertonus bei Ratten [Albrecht *et. al.*, 1996].

Bei D₃ knock-out Mäusen (D₃(-/-)) wurde ebenfalls eine Hypertonie beobachtet [Asico *et. al.*, 1998]. Die für das D₃-Rezeptorgen homozygot negativen und die heterozygoten Mäuse wiesen die in gleichem Maße erhöhten diastolischen und systolischen Blutdruckwerte gegenüber den normotensiven Wildtypmäusen auf. Da der D₃-Rezeptor in juxtaglomerulären Zellen nachweisbar ist und die Stimulation der D₂-Rezeptorfamilie eine Reduktion der Reninsekretion hervorruft [Sanada *et. al.*, 1997], wurde die renale Reninaktivität bei den Versuchstieren bestimmt. Es zeigte sich, dass die D₃(-/-) Mäuse die höchste Reninaktivität aufwiesen, gefolgt von den heterozygoten Mäusen und den Wildtypmäusen mit der niedrigsten Aktivität. In Folge einer akuten NaCl-Beladung ließ sich sofort nach der Beladung eine gesteigerte Na⁺-Ausscheidung bei den D₃(-/-) und heterozygoten Mäusen beobachten. Nach einer Stunde schieden die D₃(-/-) Mäuse jedoch eine Na⁺-Menge aus, die unter ihrem ermittelten Basalwert lag, während die heterozygoten Mäuse eine noch anhaltend erhöhte Na⁺-Ausscheidungen aufwiesen. Wie bereits im Hypertoniemodell mit D₁ knock-out Mäusen erläutert, scheint die D₁-Rezeptorfamilie besonders wichtig für die Inhibierung des Na⁺-Rücktransportes im Tubulussystem zu sein. Es gibt jedoch zunehmend Anhalte aus Versuchen an Ratten, dass ein Synergismus der D₁- und D₂-Rezeptorfamilie für die volle

Funktion verantwortlich sein könnte [Bertorello *et. al.*, 1990]. Eine Untersuchung der drei Versuchsgruppen ($D_3(+/+)$, $D_3(+/-)$, $D_3(-/-)$) mit einem Angiotensin-II-Rezeptor-Antagonisten [Asico *et. al.* 1998] zeigte den gleichen Blutdruckabfall in allen Gruppen, jedoch erholten sich die Wildtyptiere am schnellsten und die heterozygoten und $D_3(-/-)$ Mäuse erreichten erst mit einer zeitlichen Verzögerung ihre Blutdruckausgangswerte. Die beobachtete Hypertonie bei den $D_3(-/-)$ Mäusen wird hauptsächlich auf die hohe Reninaktivität zurückgeführt. Darüber hinaus könnte die verminderte Fähigkeit der $D_3(-/-)$ Mäuse eine akute NaCl-Beladung auszuschcheiden, die Entwicklung einer Hypertonie begünstigen.

1.3 Eigene Fragestellung

Als zentrale Fragestellung wurde die D_3 -Rezeptorfunktion mit Hilfe von D_3 knock-out Mäusen untersucht. Die glomeruläre Reserve wurde mit Hilfe der Infusion einer 10%-igen Aminosäurelösung im Clearanceversuch an narkotisierten Mäusen bestimmt. Die Experimente sollten zeigen, in wieweit die D_3 -knock-out Mäuse die physiologischer Weise bei Wildtyptieren auftretende Hyperfiltration besitzen. Zur Beurteilung der tubulären Aufgaben des D_3 -Rezeptors wurde eine akute Salzbeladung an wachen Tieren im Stoffwechselkäfig durchgeführt. Der Grund dieser Untersuchungen war die Frage, ob die $D_3(-/-)$ Mäuse gegenüber den Wildtypmäusen eine defiziente Natriumausscheidung besitzen. In der Vorbereitung dieser Experimente wurde die Altersabhängigkeit der Nierenfunktion bei Mäusen (CD-1-Mäuse) untersucht.

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden männliche Tiere der folgenden Mausstämme verwendet:

- **CD-1 (Fa. Charles River, Sulzfeld)**
- **C57/Bl6 (Fa. Charles River, Sulzfeld)**
- **D₃(-/-) (Knoll AG, Ludwigshafen)**

Die verwendeten Versuchstiere wurden mit unterschiedlichem Alter und Gewicht geliefert. Die jungen CD-1-Mäuse und die C57/Bl6 Mäuse wurden im Alter von 1-2 Monaten und einem Körpergewicht von 20-30 g geliefert. Eine Gruppe der jungen CD-1-Mäuse wurde im institutseigenen Tierstall bis zum Alter von ca. 20 Wochen und einem Gewicht von 35-40 g gehalten, um als Gruppe der alten CD-1-Mäuse zu dienen. Die verwendeten D₃(-/-) Mäuse wurden im Alter von 10 Wochen und einem Gewicht von 25-30 g geliefert. Vor den Versuchen wurden die Tiere über wenigstens 4 Tage in MacroDEX[®]-Standardkäfigen im institutseigenen Tierstall gehalten, um sich vom Transport zu erholen. Während dieser Zeit wurde der Tag/Nachtrhythmus durch 12-stündige Hell/Dunkelzyklen simuliert, wobei die nächtliche Phase zwischen 18.30 – 6.30 Uhr lag. In den Tierställen wurde die Raumtemperatur bei 21°C und die Luftfeuchtigkeit bei 57% konstant gehalten. Die Mäuse hatten bis Versuchsbeginn freien Zugang zu Leitungswasser und Standardnahrung (Altromin C 1320[®], Altromin, Lage).

2.2 Erzeugung von D₃(-/-) Tieren

Die molekularbiologischen Arbeiten, sowie die Aufzucht der hier verwendeten D₃(-/-) Mäuse wurden von der Knoll AG Ludwigshafen durchgeführt [Höger T und Lemaire HG, Knoll AG, Ludwigshafen, persönliche Mitteilung].

Die Erzeugung von Mutanten mit einer zielgerichteten genetischen Veränderung in einem bestimmten Genlocus (D₃-Rezeptor-Gen) basiert auf deren Einführung durch homologe Rekombination in embryonale Stammzellen (ES-Zellen) im Sinne eines „gene-targeting“. Diese Methode beruht auf zwei grundlegenden technischen Voraussetzungen. Die erste Voraussetzung war die Kultivierung embryonaler Stammzellen (ES) und deren Etablierung als stabile Zelllinie. ES-Zellen stammen ursprünglich aus der inneren Zellmasse von 3,5 Tage alten Mausembryonen („Blastozysten“), sind vollständig undifferenziert und können daher den Aufbau aller Gewebe eines sich entwickelnden Organismus vermitteln („Omnipotenz“), auch nachdem sie in Kultur gehalten wurden. Die zweite technische Voraussetzung für die Generierung von knock-out und knock-in Mäusen ist die Möglichkeit der homologen Rekombination der genomischen Sequenzen mit exogener DNA unter geeigneten Bedingungen.

Der erste Schritt bei dieser Technik ist die Elektrotransfektion (Elektroporation) exogener DNA in ES-Zellen. Die exogene DNA enthält die beabsichtigte Mutation und jeweils benachbarte homologe (genomische) Sequenzen zum relevanten Genlocus (targeting Vektor). Durch den Prozess der homologen Rekombination wird die mutierte exogene Sequenz an der beabsichtigten Stelle im Genlocus gegen die genomische Sequenz ausgetauscht. Die Fähigkeit der homologen Rekombination ist hierbei eine natürliche Eigenschaft auch von ES-Zellen, die durch Enzyme des DNA-Reparatursystems vermittelt wird. Typischerweise wird zur Generierung einer knock-out Maus ein wichtiger Bestandteil des endogenen Gens, D₃-Rezeptorgen, durch ein Antibiotika-Resistenzgen ersetzt. Dadurch geht die Funktion des endogenen Gens verloren und die Zelle gewinnt die Antibiotikaresistenz. Kommt es zu einer unspezifischen, nicht-homologen Integration der exogenen DNA, so wird auch der außerhalb der Homologiearme liegende negative Selektionsmarker des Konstrukts mitübertragen (*tk* siehe Abb. 2), so dass diese unerwünschten Klone grundsätzlich von denen mit einem homologen Rekombinationsereignis unterschieden werden können. Hiermit gelingt es also, die relativ seltenen homologen Integrationsereignisse aus der Masse der ungerichteten

Integrationen herauszuselektieren. Als positive Selektionsmarkergene verwendet man solche, deren Anwesenheit unter bestimmten Kulturbedingungen essentiell für das Überleben der Zelle ist. Bei den D₃ knock-out Mäusen ist dies das *neo* Gen, das für ein Enzym kodiert, welches das Überleben der Zellen in Anwesenheit eines Antibiotikums der Neomycin-Klasse ermöglicht. Für die Erzeugung von knock-out Mäusen wird meist das Zielgen (D₃-Rezeptorgen) durch ein Selektionsmarkergen (*neo* Gen) ersetzt (replacement type Vektor siehe Abb. 2).

Nach der Transfektion der DNA in die ES-Zellen und antibiotische Selektion werden die Klone der überlebenden Zellen mit molekularbiologischen Methoden (PCR, Southern Plot-Analyse) auf die Anwesenheit der Mutation am gewünschten Genort hin untersucht. Hat man einen homolog rekombinierten ES-Zellklon identifiziert, werden diese Zellen in Kultur vermehrt und in Embryonen mittels Mikroinjektion zurückverpflanzt. Hierbei wählt man das Stadium der Blastozyste, aus dem die ES-Zellen ursprünglich präpariert wurden. 18 bis 25 ES-Zellen werden mit Hilfe feiner Glaskapillaren unter hohem technischem Aufwand in den Hohlraum einer Blastocyste mikroinjiziert (siehe Abb. 3). Nach der Injektion kollabiert die Blastozyste und die injizierten ES-Zellen bilden mit den Zellen der inneren Zellmasse eine gemeinsame Struktur. Nach kurzer Inkubationszeit werden die Embryonen in den Uterus scheinchwangerer Empfängertiere (C57/Bl6 Mäuse) übertragen. Mit Hilfe von molekularbiologischen Methoden (PCR) werden die Chimären identifiziert, die die gewünschte Mutation tragen und darauffolgend die Heterozygoten Genträger miteinander verpaart um homozygote Mutanten zu erhalten [Kulozik *et. al.*, 2000]. (siehe Abb. 3)

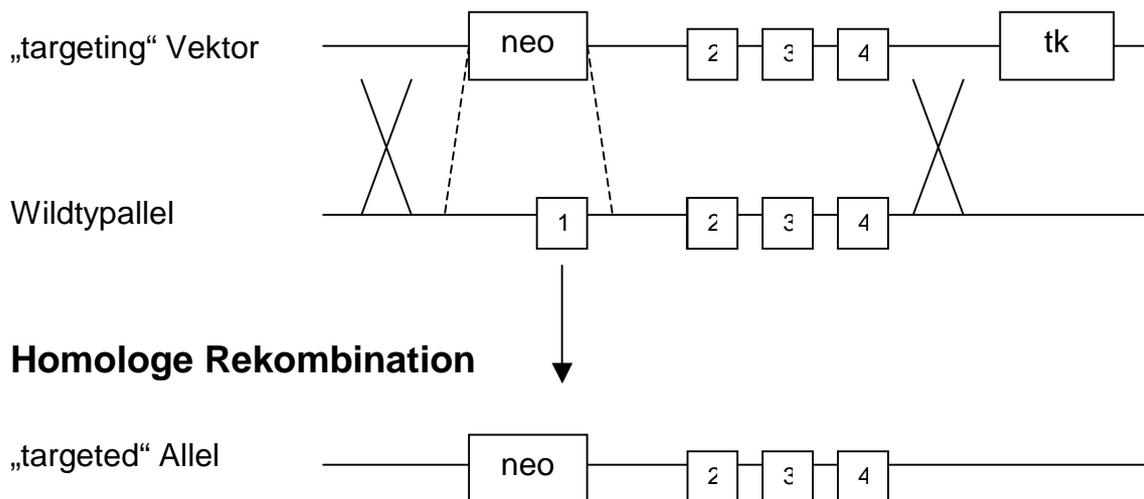


Abbildung 2: Homologe Rekombination. Gezielte Geninaktivierung durch eine „replacement“ Strategie. Der Promotor und das erste Exon im genomischen Locus werden nach homologer Rekombination durch das positive Selektionsmarkergen (*neo*) des targeting-Vektors ersetzt. Durchgehende Linien repräsentieren homologe Sequenzen im Vektor, Wildtypallel und rekombiniertem Allel. Exons sind als offene Rechtecke dargestellt und nummeriert, die Selektionsmarkergene als flache Rechtecke mit einer Abkürzung für das betreffende Gen (*Neo* = Neomycinresistenz; *tk* = Thymidinkinase, negatives Selektionsgen). Die Bruchstellen für die homologe Rekombination sind als schwarze Kreuze dargestellt, dünne gestrichelte Linien zwischen Vektoren und Wildtypallel (genomischer Locus) repräsentieren die Insertionsstellen des Selektionsmarkergens und anderer heterologer Sequenzen.

(Modifiziert nach Kulozik et. al., Molekulare Medizin, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 2000)

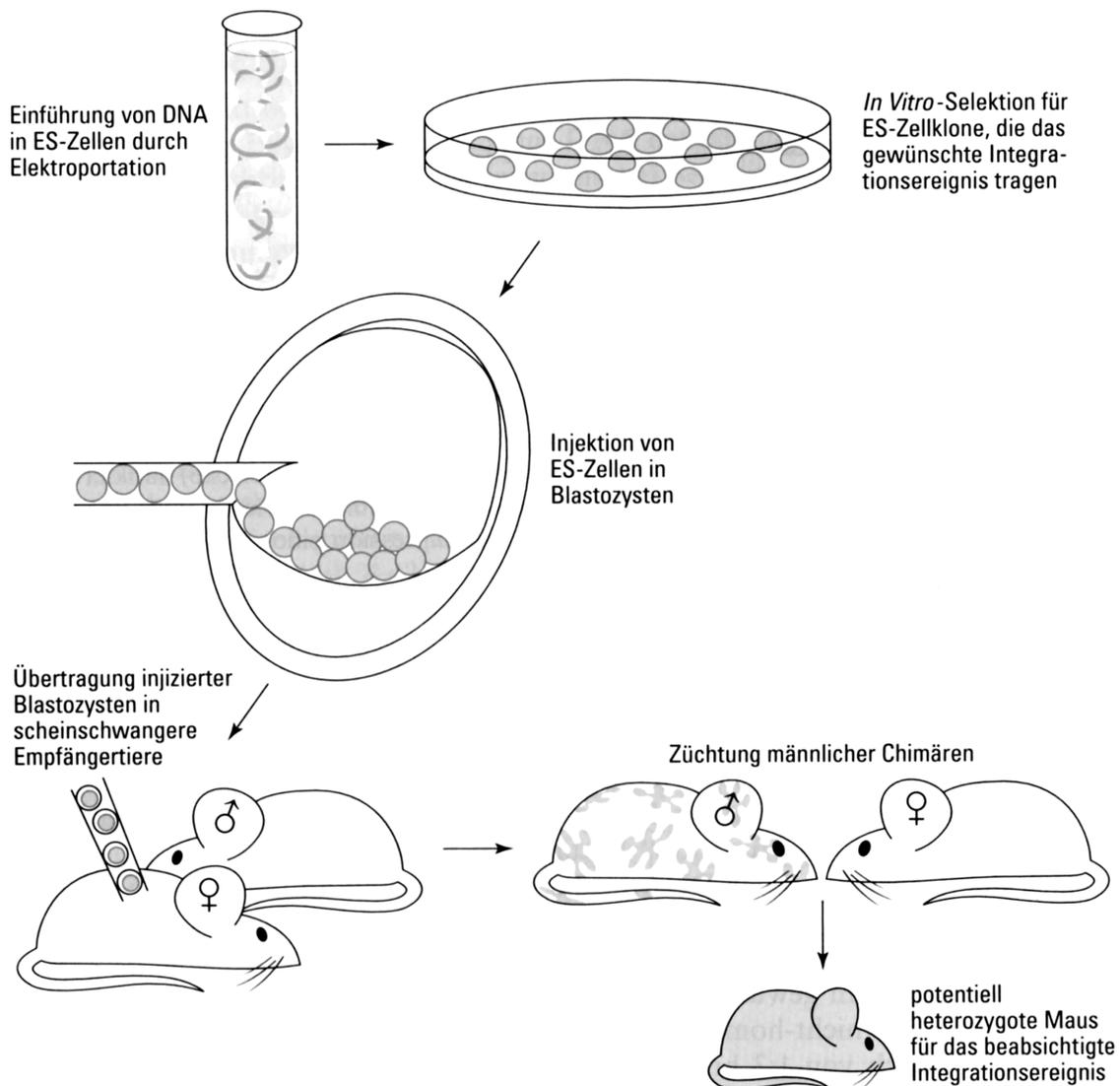


Abbildung 3: Schematische Darstellung des experimentellen Ablaufs zur Erzeugung von knock-out Mäusen durch Mikroinjektion von gezielt veränderten ES-Zellen in Blastocysten. Die DNA (graue Symbole) wird durch Transfektion in den Kern von ES-Zellen eingeführt. Zellklone, die das Selektionsmarkergens **neo** tragen und in der anschließenden molekularbiologischen Analyse das gewünschte Rekombinationsmuster zeigen, werden in Zellkultur vermehrt und in Blastocysten injiziert. Die injizierten Blastozysten werden in den Uterus scheinchwangerer Empfängertiere übertragen und chimäre Mäuse, deren Gewebe sich aus Zellen der Blastozyste und der veränderten ES-Zellen zusammensetzt, werden geboren. Durch Kreuzung der chimären Mäuse erhält man die knock-out Mäuse und die dazugehörige Wildtypkontrolle, welche homozygoter Träger des entsprechenden Gens ist. (Modifiziert nach Kulozik et. al., Molekulare Medizin, Walter de Gruyter Verlag, Berlin, 2000)

2.3 Versuchsgruppen und Experimenteller Ablauf

2.3.1 Stoffwechselkäfigversuche an wachen Mäusen

2.3.1.1 Versuchsgruppen der Stoffwechselkäfigversuche

Für die Stoffwechselkäfigversuche wurden folgende Versuchsgruppen gebildet:

CD-1-Mäuse (ALT) (basal 8h SWK)

CD-1-Mäuse (JNG) (basal 8h SWK)

C57/Bl6 Mäuse (basal 8h SWK)

C57/Bl6 Mäuse (1% NaCl 4h SWK)

C57/Bl6 Mäuse (4% NaCl 4h SWK)

D3 (-/-) Mäuse (basal 8h SWK)

D3 (-/-) Mäuse (1% NaCl 4h SWK)

D3 (-/-) Mäuse (4% NaCl 4h SWK)

2.3.1.2 Stoffwechselkäfige

Für die Stoffwechselkäfigversuche wurden Käfige (Techniplast[®], Fa. Ehret, Freiburg i. Br.) verwendet, die eine getrennte Sammlung von Urin und Faeces ermöglichen. Während des Versuches hatten die Mäuse freien Zugang zum Trinkwasser, wurden jedoch nüchtern gehalten. Im oberen Teil des Käfigs konnten sich die Tiere frei auf einem Gitternetzrost bewegen, durch den die Exkremete auf ein darunterliegendes Gitter durchfielen. Im unteren Teil des Käfigs sorgte ein konusförmig zulaufender Trichter dafür, dass der Urin in einem Sammelgefäß aufgefangen werden konnte. Dem Urinsammelgefäß wurden vor Versuchsbeginn 1 ml wassergesättigtes Paraffinöl (Paraffin, dünnflüssig, Merck, Darmstadt) zugesetzt, um die Verdunstung des Urins aus dem Sammelgefäß so gering wie möglich zu halten. Die Phasengrenze zwischen Urin und Paraffinöl war deutlich erkennbar.

2.3.1.3 Versuchsaufbau bei Stoffwechselkäfigexperimenten

Beim Standardversuch wurden die Tiere für 8 Stunden, von 7.30 bis 15.30 Uhr in die Stoffwechselkäfige gesetzt, mit freiem Zugang zum Trinkwasser. Für die Versuchsvariante mit Kochsalzbeladung wurden die Tiere um 9.00 Uhr mit 1%-iger bzw. 4%-iger NaCl-Lösung oral sondiert und anschließend der Urin und die Trinkmenge nach 1 Stunde sowie nach 3 weiteren Stunden erfasst. Nach dem Versuch verblieben die Tiere für mindestens 4 weitere Tage in den Standardkäfigen, bevor sie für Clearanceexperimente verwendet wurden.

2.3.1.4 Probengewinnung und -behandlung

Nach der Bestimmung des Urinvolumens und der Trinkmenge (siehe 2.4.7) wurde das vorhandene Urinvolumen unter Zurücklassen des Paraffinöls mit einer Pipette (alle verwendeten Pipetten: Fa. Eppendorf, Hamburg) entnommen und bis zur Analyse von Elektrolyten und Osmolalität bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

2.3.2 Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen

2.3.2.1 Versuchsgruppen der Clearanceversuche

Die Versuchstiere erhielten für die Clearanceexperimente eine der folgenden Infusionslösungen:

- **Ringer:** Zeitkontrollversuche, die während der gesamten Versuchsdauer Ringerlösung (111 mmol/l NaCl, 30 mmol/l NaHCO_3 , 4,7 mmol/l KCl) mit 2.25% bovinem Serumalbumin (BSA) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) erhielten (siehe 2.3.2.5)

-
- **AS10:** Versuchstiere, die zunächst eine Infusionen mit Ringerlösung plus BSA erhielten und im Anschluss daran eine 10%-ige, BSA-haltige Aminosäurelösung (siehe 2.3.2.5)

Somit waren die Tiere wie folgt in Versuchsgruppen unterteilt:

- **CD-1- Ringer** - **C57/BL6- Ringer** - **D₃(-/-)- Ringer**
- **CD-1- AS10jung** - **C57/BL6- AS10** - **D₃(-/-)- AS10**
- **CD-1- AS10alt**

2.3.2.2 Narkose

Zunächst wurde ein Narkoseschema verwendet wie von anderen Arbeitsgruppen [Trayor und Schnermann 1999]. Hierbei erhielten die Tiere eine intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht Thiobutabarbital (Inaktin, Sigma-Aldrich-Pharma GmbH, Deisenhofen) und eine zusätzlichen intramuskulären Applikation von 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin (Ketamin, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe). Die Dauer bis zum notwendigen Eintreten der Narkosetiefe, erkennbar durch abgeschwächten Muskeltonus und das Fehlen des Cornealreflexes, betrug ca. 30 min.

Nachdem bei diesem Narkoseschema zusätzlich zur langen initialen Wartezeit noch häufige Nachinjektionen nötig waren und auch die i.v. Gabe von Inactin wie Ketamin keine ausreichende Narkosetiefe garantieren konnte, wurde ein anderes Narkoseschema mit Pentobarbital angewendet. Hierbei erfolgte eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium (Pentobarbital, Sigma St. Louis, USA) [Asico et al.,1998]. Der Wirkungseintritt der Narkose erfolgte nach 5-10 Minuten. Zur Erhaltung der Narkosetiefe wurde, falls erforderlich, intravenös nachinjiziert mit Pentobarbital (20 mg/kg Körpergewicht). Mit diesem Schema war die Narkosetiefe und -dauer gut zu

steuern, so dass dieses Verfahren für die folgenden Versuche Anwendung fand.

2.3.2.3. Präparation

Die narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage auf den vorgeheizten Präparationstisch (Fa. Effenberg, Pfaffing) gelagert. Die Körperkerntemperatur registrierte eine rektale Temperatursonde. Die Messsonde war mit einem Temperaturregelgerät (Fa. Effenberg, Pfaffing) verbunden, das die Körpertemperatur auf 37,2 °C konstant hielt. Zu Beginn der Operation wurde die freie Atmung durch rasches Anlegen eines Tracheostomas sichergestellt. Dazu wurde die Haut am Hals in der Medianlinie mit einer Präparationsschere eröffnet, die Halsfaszie durchtrennt, die Speicheldrüsen stumpf zur Seite luxiert und schließlich die infrahyale Muskulatur gespalten. Die frei präparierte Trachea wurde, unter Schonung der Gefäße und Nerven, etwas angehoben und dann mit einer feinen Mikro-Federschere (alle verwendeten Operationsinstrumente: Fa. Aesculap, Tuttlingen), zwischen den Knorpelspangen, die Membran eingeschnitten. In das Lumen wurde der vorbereitete, 1,5 cm lange, Polyethylen(PE)-Katheter (alle verwendeten Katheter: Portex tubing[®], Fa. Portex, Hythe Kent, Großbritannien) ca. 0,5 cm eingeführt und mit einer vorgelegten Schlinge (Seide Schwarz USP: 5/0, Bercat GmbH, Berlin) fixiert. Anschließend wurde rechts lateral, nach dem Herausluxieren der rechten die Speicheldrüse, die oberflächlich liegende V. jugularis präpariert. Unter Mikroskopkontrolle (VMT 10x[®], Fa. Olympus, Japan) wurde eine erste Ligatur an der kranialen Seite der V. jugularis angelegt, um das Gefäß zu spannen, und eine zweite Ligatur an der kaudalen Seite der V. jugularis vorgelegt, um anschließend den Katheter fixieren zu können. Im folgenden wurde das Gefäß inzidiert und der leicht gezogene Katheter ca. 0,3 cm eingeführt. Nach einer Bolusgabe von 40 µl, zur Überprüfung der richtigen Lage des Katheters, wurden

die Infusionspumpen (Typ 871642[®], Fa. Braun-Melsungen, Melsungen; WPI Sp101i, Berlin) gestartet.

Im Anschluß wurde die linke Arteria carotis von umliegendem Bindegewebe befreit und vom danebenliegenden Nervus vagus getrennt. Dann wurde die Arteria carotis weit kranial ligiert, das Gefäß gespannt, sowie zwei Ligaturen an der kaudalen Seite vorgelegt um den Katheter später zu befestigen. Im folgenden wurde eine gefäßchirurgische Arterienklemme, zwischen die kraniale und die vorgelegten kaudalen Ligaturen, auf das Gefäß gesetzt. Unter mikroskopischer Kontrolle wurde das Gefäß an der kranial Seite inzidiert, der Katheter eingeführt und mit dem vorgelegten Faden fixiert. Nach dem Abnehmen der Arterienklemme wurde der Katheter weiter in das Lumen vorgeschoben und mit dem zweiten vorgelegten Faden befestigt. An den arteriellen Katheter war ein Druckaufnehmer und ein Blutdruck- und Pulsmeßgerät mit Schreiber (Linear Corder Mark VII[®], Fa. Watanabe, Japan) gekoppelt. Für den Blasen Katheter erfolgte eine Hautinzision ca. 0,5 cm oberhalb der Peniswurzel. Die Muskelfaszien wurden entlang der Linea alba durchtrennt und die Muskulatur stumpf auseinander geschoben. Die Blase wurde herausluxiert und mit einem vorgelegten Faden umlegt, eingeschnitten, der Blasen Katheter eingeführt und mit der Ligatur fixiert. Anschließend wurde die Blase wieder in die Bauchhöhle reponiert. Die entstandenen Operationswunden wurden mit einem Faden (Perma-Hand 4-0[®], Fa. Ethicon, Norderstedt) verschlossen und anschließend die Maus auf die Seite gelagert und der Urin in PE-Gefäßen (Fa. Eppendorf) gesammelt.

2.3.2.4 Verwendete Infusionslösungen

Über den ersten venösen Katheter wurde während aller Versuche Ringerlösung (NaCl 111 mmol/l, NaHCO₃ 30 mmol/l, KCl 4,7 mmol/l), die 2,25% boviner Serumalbumin enthielt, infundiert. Die Lösung enthielt zusätzlich noch Tritium

[³H] markiertes Inulin (Aktivität: 10 µCi/ml). Die Infusion wurde mit Hilfe einer elektrischen Präzisionsinfusionspumpe (Pumpe Sp101i, WPI, Berlin), mit einer Geschwindigkeit von 180 µl/h kontinuierlich infundiert.

Über den zweiten venösen Katheter wurde in den Vorperioden, sowie bei den Zeitkontrollen, Ringerlösung mit bovinem Serumalbumin, in gleicher Zusammensetzung wie bei der ersten Lösung, infundiert. In den Hauptperioden wurde 10%-ige Aminosäurelösung gegeben, welche durch Verdünnung aus einer 15%-igen Aminosäurestandardlösung (Thomaeamin[®]n 15%, Delta-Pharma GmbH, Pfullingen) mit folgender Zusammensetzung hergestellt wurde (Angaben jeweils in Gewichtprozent): L-Isoleucin 0,57%, L-Leucin 0,99%, L-Lysinmonoacetat 1,39%, L-Methionin 0,42%, L-Phenylalanin 0,615%, L-Theonin 0,69%, L-Tryptophan 0,18%, L-Valin 0,615%, L-Arginin 1,38%, L-Histidin 0,66%, L-Aminoessigsäure 1,155%, L-Alanin 2,145%, L-Prolin 1,38%, L-Cystein 0,105%, L-Gentaminsäure 1,485%, L-Ornithinaspartat 0,538%, L-Ornithinacetat 0,155%, L-Serin 0,885%, L-Tyrosin 0,03%, L-Acetyltyrosin 0,03%, L-Pyridoxinhydrochlorid 0,00155%, L-Edetinsäure 0,0117%. Die Aminosäuren wurden in Ringerlösung mit 2,25% bovinem Serumalbumin (BSA) gelöst. Die Osmolarität der 15%-igen Aminosäurestandardlösung betrug etwa 1440 mosm/l, der pH Wert der AS-Lösung wurde mit 6,1 angegeben. Die 10%-ige Aminosäurelösung wurde durch Verdünnung der 15%-igen Aminosäurelösung mit Ringerlösung plus BSA hergestellt. Durch den zweiten Katheter wurde mit Hilfe einer weiteren Präzisionsinfusionspumpe (Perfusor[®], Braun, Melsungen), das konstante Volumen von 150 µl/h zugeführt. Das Gesamtinfusionsvolumen betrug somit 180 µl/h + 150 µl/h = 330 µl/h, was etwa 1% des Körpergewichts einer Maus entspricht.

2.3.2.5 Ablauf des Experiments

Der Präparation schloss sich eine ca. 60-minütige Äquilibrationszeit an. Diese galt als abgeschlossen, wenn der Blutdruck und die Herzfrequenz konstant waren, und die Urinmenge ca. 20 µl pro 30 Minuten betrug. Es schlossen sich nun die fünf 30-minütigen Versuchsperioden an, je nach Versuchsdesign, 5 gleiche Kontrollperioden oder 2 Vorperioden und 3 Hauptperioden. Während der Vorperioden sowie bei Zeitkontrollen, wurde Ringerlösung mit 2,25% bovinem Serumalbumin (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA), in den Hauptperioden wurde 10%-ige Aminosäurelösung infundiert. Während der Auswechslung der Infusionslösungen, zwischen der zweiten Vorperiode und der ersten Hauptperiode, gab es eine 15-minütige Zwischenperiode, in der keine Probensammlung stattfand. (siehe Abb. 4)

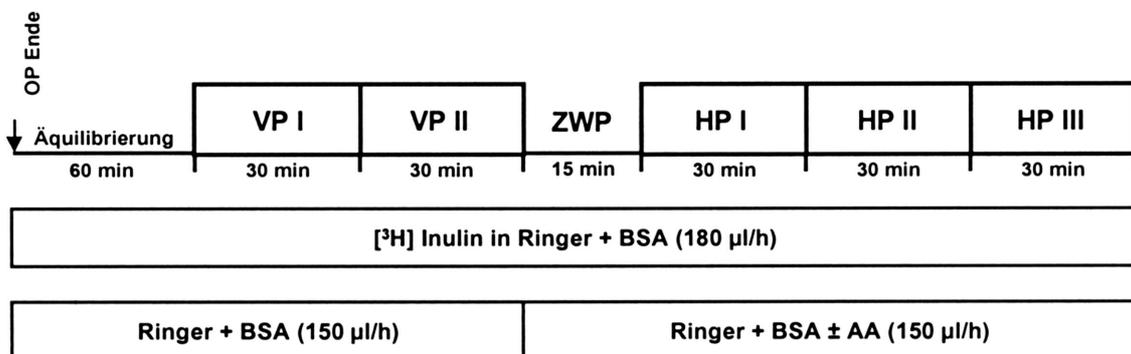


Abbildung 4: Design der Clearance Experimente

Während der Äquilibrationsperiode und den Vorperioden 1 und 2 (VPI+VP II) wurde Ringerlösung infundiert. Diese wurde bei den Kontrolltieren beibehalten bzw. gegen eine Aminosäurelösung eingetauscht. Bei Wechsel der Infusionslösung wurde vor Beginn der Sammelperioden 3-5 (HPI-HP III) eine Zwischenperiode (ZWP) von 15 min durchgeführt, bei den Zeitkontrollversuchen wurden die Sammelperioden 3-5 (HPI-HP III) direkt an die vorausgegangenen Vorperioden (VPI+VP II) angeschlossen. Während des gesamten Versuches wurde über einen 1. Katheter [3H] Inulin in Ringer+BSA infundiert und über einen 2. Katheter die versuchsentsprechenden Infusionslösungen verabreicht.

2.3.2.6 Probengewinnung

Die Probenentnahmen erfolgten in der Mitte und zum Ende jeder 30-minütigen Sammelperiode:

- Über den in der A. carotis liegenden Katheter wurden in der Mitte jeder Urinsammelperiode ca. 40 µl Blut mit einer heparinisierten Glaskapillare (Mikrohämatokritröhrchen[®], Fa. Hilgenberg, Malsfeld), entnommen und weiterverarbeitet (siehe 2.4).
- Am Ende jeder Urinsammelperiode wurde das P.E.-Urinsammelgefäß gewechselt und gravimetrisch die Urinmenge bestimmt.
- Die in der Äquilibrationszeit und den Zwischenperioden gewonnenen Urinvolumina wurden ebenfalls gravimetrisch bestimmt und in die Berechnung der Volumenbilanz einbezogen.

2.4 Analytik

2.4.1 Analytierte Parameter

Folgende Parameter wurden bei den Stoffwechselläufigversuchen mit wachen Mäusen bestimmt:

- Tiergewicht (g)
- Trinkmenge (ml)
- Urinvolumen (ml)
- Natrium-, Kalium-, und Chloridkonzentration im Urin (mmol/l)
- Osmolalität (osmol/kg)

In den Clearanceversuchen wurden folgende Werte bestimmt:

- Systolischer und diastolischer Blutdruck (mmHg)
- Herzfrequenz (1/min)
- Hämatokrit (%)

-
- [³H]-Aktivität in Plasma und Urin
 - Natriumkonzentration im Plasma (P_{Na}) (mmol/l)
 - Natrium- (U_{Na}) und Kaliumkonzentration (U_K) im Urin (mmol/l)
 - Urinvolumen (ml)
 - Nierengewicht (g)

2.4.2 Hämatokrit

In der Mitte jeder Urinsammelperiode wurde Blut aus dem arteriellen Katheter in Glaskapillaren gesammelt. Diese wurden einseitig mit Kitt (Hämatokrit-Versiegelungskitt, Fa. Brand, Wertheim) verschlossen und für 5 min in einer Hämatokrit-Zentrifuge (Hettich Hämatokrit, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. In der Auswertung wurde das Verhältnis der zellulären Bestandteile zum Plasma im prozentualen Wert des Hämatokrits (Hkt) bestimmt. Nach der Bestimmung wurde das Plasma aus den Kapillaren für weitere Analysen gewonnen und die festen Bestandteile verworfen.

2.4.3 Elektrolyte in Plasma und Urin

Zur Elektrolytbestimmung (Natrium und Kalium) im Plasma wurden 5 µl Plasma mit 15 µl bidestilliertem Wasser verdünnt und in 1 ml Lithiumlösung pipettiert (Standard Lithiumlösung, Eppendorf, Hamburg). Für die Elektrolyte (Natrium und Kalium) im Urin wurden 10 µl Urin in 2 ml Lithiumlösung gegeben. Von allen Proben wurden Doppelproben pipettiert. Vor der Probenmessung wurde das Flammenphotometer (ELEX 6361[®], Eppendorf, Hamburg) mit einer Standardlösung definierten Elektrolytgehalts (150 mmol/l Na; 150 mmol/l K) kalibriert und von den gewonnenen Einzelwerten jeder Doppelprobe Mittelwerte gebildet. Bei den Urinproben aus den Stoffwechselkäfigversuchen wurde die Chloridkonzentration mit Hilfe des Chloridmeters (Chloridmeter 6610, Eppendorf, Hamburg) bestimmt und nach der Kalibrierung des Gerätes mit

einer Standardlösung bekannten Chloridgehalts (100 mmol/l) 50 µl Urin in die Messlösung (1 ml Gelatine Lösung Eppendorf, 10 ml Essigsäure 1,02 mol/l, 5 ml Salpetersäure 0,92 mmol/l) gegeben. Von allen Proben wurden Doppelproben pipettiert. Die ermittelten Elektrolytkonzentrationen wurden zur Berechnung der Elektrolytausscheidung und der fraktionellen Natriumausscheidung verwendet.

2.4.4 Osmolalität des Urins der Stoffwechsellängversuche

Die Osmolalität des Urins wurde mit Hilfe des Osmometers (osmomat 030, gonotec GmbH, Berlin) bestimmt. Die Messmethode dieses Gerätes beruht auf der Gefrierpunktniedrigung von Lösungen mit einer höheren Osmolalität als Wasser. Das Gerät wurde zunächst kalibriert mit Lösungen bekannter Osmolalität (H₂O, Eichlösung 300 mosmol/l und 600 mosmol/l). Nachfolgend wurden die Proben bestimmt und aus den Doppelproben die Mittelwerte ermittelt.

2.4.5 [³H]-Aktivität in Plasma und Urin

Zur Bestimmung der GFR wurden je 5 µl Plasma und Urin in spezielle Meßgefäße (Midi-Vial[®], Fa. Packard, Groningen, Niederlande) pipettiert und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold[®], Fa. Packard) gemischt. In der Szintillationsflüssigkeit wird die bei Zerfall des ³H-markierten Inulins freiwerdende Energie in Lichtblitze umgewandelt, die durch ein Szintillationsmeßgerät (2550 TR[®], Fa. Packard) erfaßt wurden. Nachfolgend wurde aus den bestimmten Werten die GFR berechnet. Die Berechnung der GFR ist in Punkt 2.5.3 angegeben.

2.4.6 Urin- und Trinkvolumina

Die Volumina wurden gravimetrisch mit Hilfe einer Präzisionswaage (Percisa 100A-300M[®], PAG Oerlikon, Zürich/Schweiz) bestimmt. Das Leergewicht der Gefäße wurde zuvor bestimmt und dann vom Gesamtgewicht nach Versuchsende abgezogen. Die Gewichts Differenz in mg diente als direktes Maß für das Urinvolumen in µl. Die Trinkvolumina der Stoffwechselläufigversuche wurde durch wiegen des mit Wasser gefüllten Trinkgefäßes vor und nach dem Versuch ermittelt, die Volumendifferenz wurde als das vom Tier getrunkene Volumen registriert.

2.4.7 Nierengewicht

Die entnommenen Nieren wurden von der Nierenkapsel befreit und mit einer Präzisionswaage das Feuchtgewicht bestimmt. Dann wurden die Nieren für 16 Stunden bei 70 °C im Trockenschrank (Memmert, Schwabach) getrocknet und nachfolgend das Trockengewicht ermittelt.

2.5 Berechnungen und Statistik

2.5.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der systolische (P_{systol}) und diastolische (P_{diastol}) Blutdruck wurden den Aufzeichnungen des Schnellschreibers entnommen. Die Berechnung des mittleren arteriellen Blutdrucks erfolgte mit Hilfe der Formel:

$$\text{MAP} = P_{\text{diastol}} + 1/3(P_{\text{systol}} - P_{\text{diastol}})$$

2.5.2 Urinzeitvolumen (UV)

Das Urinzeitvolumen pro Minute (UV) wurde berechnet mit Hilfe des Urinvolumens einer Sammelperiode (UV_S) und der Dauer der Sammelperiode (D_S), mit der folgenden Formel:

$$UV = (UV_S) / (D_S)$$

2.5.3 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die GFR wurde aus den gemessenen ^3H -Aktivitäten für Plasma (A_{Plasma}) und Urin (A_{Urin}) sowie dem Urinzeitvolumen (UV) berechnet, auf Nierengewicht und Urinsammelzeit bezogen und nach folgender Formel berechnet:

$$GFR = A_{\text{Urin}} / A_{\text{Plasma}} * UV$$

2.5.4 Nierenindex (NI)

Der Nierenindex (NI) gibt das Verhältnis des Nierenfeuchtgewichts zu 100 g Körpergewicht an. Er wird aus dem Nierengewicht (NG) und dem absoluten Körpergewicht (KG), wie folgend errechnet:

$$NI = NG / KG * 100$$

2.5.5 Elektrolytausscheidung

Nach Bestimmung der Urinkonzentrationen der Elektrolyte Na^+ , K^+ und Cl^- erfolgte die Berechnung der Elektrolytausscheidung entsprechend

$$U_{\text{Na}} V = [\text{Na}] * UV$$

$$U_{\text{K}} V = [\text{K}] * UV$$

$$U_{\text{Cl}} V = [\text{Cl}] * UV$$

Wobei $[\text{Na}]$ und $[\text{K}]$ die flammenphotometrisch bestimmten Konzentrationen von Natrium bzw. Kalium und $[\text{Cl}]$ die Chloridkonzentration mit dem

Chloridmeter gemessen darstellen. UV bezeichnet den Urinfluß (ml/min). Die Parameter beziehen sich auf 1 g Nierengewicht.

2.5.6 Fraktionelle Natriumausscheidung

Die FE_{Na} gibt die Natriumausscheidung in Prozent der Gesamtmenge des filtrierten Natriums an:

$$FE_{Na} = (100 * U_{Na}V) / (P_{Na} * GFR)$$

Wobei $U_{Na}V$ die Natriumausscheidung und P_{Na} die Natriumkonzentration im Plasma angibt.

2.5.7 Statistische Methoden

Die statistische Beurteilung der Versuchsdaten der Stoffwechselkäfigversuche erfolgte mit Hilfe des ungepaarten t-Tests zwischen den einzelnen Versuchsgruppen.

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten der Clearanceversuche erfolgte innerhalb der Versuchsgruppen mit Hilfe des zweiseitigen, gepaarten t-Tests. Dabei wurden die Mittelwerte der Vorperioden gegenüber den Mittelwerten der Hauptperioden getestet. Als Maß für die statistische Signifikanz diente der p-Wert, der die Überschreitungswahrscheinlichkeit gegenüber der Nullhypothese angibt. Der Unterschied wurde als signifikant betrachtet, wenn $p < 0.05$ war und als hoch signifikant, wenn $p < 0,01$ war.

Für die Beurteilung der Parameter von drei und mehr Gruppen untereinander wurde eine Varianzanalyse mit dem ANOVA-Test mit Korrektur durch den Bonferroni Nachtest durchgeführt.

3. ERGEBNISSE

3.1 Stoffwechselkäfigversuche an wachen Mäusen

Bei den Stoffwechselkäfigversuchen herrschte in den Räumen eine konstante Raumtemperatur von 21 °C, wobei die Tiere während des gesamten Verlaufs freien Zugang zum Trinkwasser hatten, jedoch kein Futter erhielten. Alle Tiergruppen hatten ein durchschnittliches Gewicht von 25-30 g und ein Lebensalter von 5-6 Wochen mit Ausnahme der älteren CD-1-Mäuse, die entsprechend ihres Alters von ca. 20 Wochen ein Gewicht von 35-40 g aufwiesen.

3.1.1 Stoffwechselkäfigversuche ohne NaCl-Beladung

Die Stoffwechselkäfigversuche ohne NaCl-Beladung dauerte 8 Stunden. Während dieser Zeit wurde das Trink- und Urinvolumen erfasst und im Anschluss der Na-, K-, und Cl-Gehalt des Urins bestimmt.

3.1.1.1 Junge und ältere CD-1-Mäuse

Die Übersicht über diese Ergebnisse findet sich in *Tabelle 1*. Bei diesen Versuchen zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Urin- und Trinkvolumens zwischen den jungen CD-1-Mäusen (5-6 Wochen alt) und den älteren CD-1-Mäusen (ca. 20 Wochen alt). Die älteren CD-1-Mäusen schieden 53% mehr Urin ($p < 0,05$) aus und tranken 59% mehr Flüssigkeit ($p < 0,05$), als die Vergleichsgruppe der jungen CD-1-Mäuse. Bei der K-Ausscheidung fand sich eine signifikant erhöhte Ausscheidung der älteren CD-1-Mäuse gegenüber den jungen CD-1-Mäusen ($p < 0,05$). Ebenso wiesen die älteren CD-1-Mäuse eine um 40% höhere Na-Ausscheidung im Vergleich mit den jungen CD-Mäuse

auf, die Unterschiede erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau ($p=0,09$). Die anderen erhobenen Parameter zeigten keine signifikanten Unterschiede der beiden Gruppen (siehe *Tabelle 1*).

3.1.1.2 D_3 (-/-) Mäuse und Wildtypmäuse (C57/Bl6)

Die Zusammenfassung der Ergebnisse dieser Versuche findet sich in *Tabelle 2*. Bei den über 8 Stunden, an nüchternen Tieren durchgeführten Stoffwechselläufigversuchen zeigte sich, dass die D_3 (-/-) Mäuse eine signifikant höhere Urinausscheidung pro Stunde gegenüber der Vergleichsgruppe von Wildtypmäusen ($p<0,05$) aufwiesen. Das Urinvolumen der D_3 (-/-) Mäuse lag 25% über dem der Wildtypmäuse. Bei der Na-Ausscheidung ließ sich eine 39% höhere Na-Ausscheidung der D_3 (-/-) Mäuse gegenüber den Wildtypmäusen beobachten, die jedoch nicht signifikant war ($p=0,06$). Für die übrigen Untersuchungsparameter fanden sich keine grösseren Unterschiede der D_3 (-/-) Mäuse mit der Vergleichsgruppe der Wildtypmäuse.

Tabelle 1: Trinkvolumen, Urinvolumen, Na-Ausscheidung, K-Ausscheidung, Cl-Ausscheidung und Osmolalität wacher Mäuse, die über 8 Stunden, nüchtern in Stoffwechsellkäfigen gehalten wurden. Die Gruppen bestanden aus jungen CD-1-Mäusen (5-6 Wochen alt) und aus älteren CD-1-Mäusen (ca. 20 Wochen alt). Alle Werte, ausser der Osmolalität, sind auf 100 g Körpergewicht bezogen und als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe (CD-1-jung)

GRUPPE (n)	CD-1-jung (n=10)	CD-1-alt (n=10)
Trinkvolumen (ml/(8h*100g))	1,34 \pm 0,12	3,29 \pm 0,78*
Urinvolumen (ml/(8h*100g))	1,15 \pm 0,19	2,42 \pm 0,35*
Natriumausscheidung (μ mol/(8h*100g))	11,5 \pm 2,8	19,1 \pm 3,1
Kaliumausscheidung (μ mol/(8h*100g))	19,6 \pm 5,9	39,8 \pm 6,1*
Chloridausscheidung (μ mol/(8h*100g))	17,1 \pm 3,9	20,7 \pm 3,7
Osmolalität (osmol/kg)	1,57 \pm 0,25	1,09 \pm 0,17

Tabelle 2: Trinkvolumen, Urinvolumen, Na-Ausscheidung, K-Ausscheidung, Cl-Ausscheidung und Osmolalität wacher Mäuse, die nüchtern über 8 Stunden in Stoffwechsellkäfigen gehalten wurden. Die Gruppen bestanden aus D₃(-/-) Mäusen und der zugehörigen Vergleichsgruppe von Wildtypmäusen (C57/Bl6). Alle Werte, ausser der Osmolalität, sind auf 100 g Körpergewicht bezogen und als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0,05$ versus Kontrollgruppe (WT)

GRUPPE (n)	WT (n=10)	D ₃ (-/-) (n=10)
Trinkvolumen (ml/(8h*100g))	4,52 \pm 1,11	4,75 \pm 1,05
Urinvolumen (ml/(8h*100g))	2,95 \pm 0,27	3,92 \pm 0,29*
Natriumausscheidung (μ mol/(8h*100g))	25,5 \pm 3,9	41,8 \pm 7,3
Kaliumausscheidung (μ mol/(8h*100g))	44,9 \pm 14,6	43,9 \pm 5,0
Chloridausscheidung (μ mol/(8h*100g))	22,7 \pm 5,6	35,4 \pm 5,7
Osmolalität (osmol/kg)	0,78 \pm 0,14	0,75 \pm 0,07

3.1.2 Stoffwechselkäfigversuche mit 1% und 4% NaCl-Beladung

Bei diesen Versuchen wurden die Tiere vor dem Stoffwechselkäfigversuch mit 1%-iger oder 4%-iger NaCl-Lösung mittels oraler Sondierung beladen und dann das Urin- und Trinkvolumen über die erste Stunde (1 Sammelperiode (SP1)) und die folgenden drei Stunden (2 Sammelperiode (SP2)) registriert. Die Bestimmung der Urinelektrolyte (Na^+ , K^+ , Cl^-) erfolgte für die beiden Perioden getrennt. Die NaCl-Gabe wurde dem Körpergewicht entsprechend dosiert, die Tiere erhielten 5% ihres Körpergewichts der 1%- bzw. 4%-igen NaCl-Lösung. Wie zu erwarten, stieg das Trink- und Urinvolumen bei der 4%-igen NaCl-Beladung in beiden Versuchgruppen an ($\text{D}_3(-/-)$ Mäuse und Wildtypmäuse (C57/Bl6)). Bei 1%-iger NaCl-Beladung waren die Werte vergleichbar mit den Basalwerten im Stoffwechselkäfigversuch ohne NaCl-Beladung (siehe *Tabelle 3* und *Abbildungen 5–9*).

3.1.2.1 Vergleich von $\text{D}_3(-/-)$ Mäusen und Wildtypmäusen (C57/Bl6) unter 1%-iger NaCl-Beladung

Beim Vergleich der Daten der $\text{D}_3(-/-)$ Mäuse mit den Wildtypmäusen bei 1%-iger NaCl-Beladung fielen keine signifikanten Unterschiede auf. Mögliche Unterschiede beim Trinkvolumen in der SP2 von 3 Stunden erreichten durch die große Streuung der Mittelwerte nicht das Signifikanzniveau (siehe *Tabelle 3* und *Abbildungen 5–9*).

3.1.2.2 Vergleich von D₃(-/-) Mäusen und Wildtypmäusen (C57/Bl6)

unter 4%-iger NaCl-Beladung

Es war ein signifikanter Unterschied der Trinkmenge in der SP2 ($p < 0,05$) zu beobachten. Die D₃ (-/-) Mäuse tranken 52% weniger als die Wildtypmäuse. Neben dieser Beobachtung zeigte sich eine signifikant niedrigere Kaliumausscheidung ($p < 0,05$) der D₃ (-/-) Mäuse in der SP2 gegenüber den Wildtypmäusen. Bei der Ausscheidung der übrigen Elektrolyte sowie der Osmolalität fanden sich keine Unterschiede zwischen den Vergleichsgruppen (siehe *Tabelle 3* und *Abbildungen 5–9*).

3.1.2.3 Vergleich von Wildtypmäusen (C57/Bl6)

unter 1%-iger und 4%-iger NaCl-Beladung

Beim Vergleich der Werte der Wildtypmäuse unter 1%-iger NaCl-Beladung mit den Werten der Wildtypmäuse unter 4%-iger NaCl-Beladung fanden sich eine Reihe von signifikanten Unterschieden. Das Trinkvolumen der SP1 ($p < 0,05$) stieg um das 1,8fach an, die selbe Steigerung zeigte sich beim Urinvolumen der SP1 ($p < 0,05$). Während das Urinvolumen der SP2 ($p < 0,05$) nur eine 1,6fache Zunahme beobachten liess. Bei der Na-Ausscheidung gab es die stärksten Zunahmen mit einer Vervierfachung in der SP1 ($p < 0,0001$) und einer knappen Verdreifachung in der SP2 ($p < 0,0001$). Die K-Ausscheidung, bei Beladung mit 4%-iger NaCl-Lösung belief sich in der SP1 auf das 1,8fach der Parameter bei 1%-iger NaCl-Beladung ($p < 0,05$). Die Cl-Ausscheidung wies eine Verdreifachung in der SP1 ($p < 0,0001$), wie der SP2 ($p < 0,0001$) auf. Die Osmolalität in der SP2 ($p < 0,0001$) war um 30% gesteigert.

Bei der Betrachtung der Na-Bilanz der Wildtyptiere unter 1%-iger und 4%-iger NaCl-Beladung fiel auf, dass die Wildtyptiere mit 4%-iger NaCl-Beladung ein Drittel weniger ihrer NaCl-Menge ausschieden, als die Wildtyptiere unter 1%-iger NaCl-Beladung das Signifikanzniveau ($p = 0,07$) wurde jedoch nicht

erreichte. Die Tiere mit 4%-iger NaCl-Beladung schieden tendenziell einen geringeren Teil der Beladung wieder aus, als die mit 1%-iger NaCl-Beladung. (siehe *Tabelle 3* und *Abbildungen 5–9*).

3.1.2.4 Vergleich von D₃ (-/-) Mäusen unter 1%-iger und 4%-iger NaCl-Beladung

Beim Vergleich zwischen 1%-iger und 4%-iger NaCl-Beladung bei D₃ (-/-) Mäusen ergab sich folgendes: Beim Trinkvolumen der SP1 ($p < 0,05$) war eine Zunahme um das 2,3fache, in der SP2 um das 1,4fache zu beobachten, wobei in der SP2 das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde ($p = 0,21$). Das Urinvolumen in der SP1 ($p < 0,05$) war um 43% und in der SP2 ($p < 0,05$) um 47% des Ausgangswertes bei 1%-iger NaCl-Beladung gesteigert. Die Na-Ausscheidung war um das 2,8-fach in der SP1 ($p < 0,0001$) und um das 4,1-fache in der SP2 ($p < 0,0001$) erhöht. Die K-Ausscheidung wies eine Steigerung von 65% in der SP1 ($p < 0,05$) und von 163% in der SP2 ($p < 0,0001$) auf. Bei der Cl-Ausscheidung zeigte sich in der SP1 ($p < 0,0001$) eine um das 3-fache und in der SP2 ($p < 0,0001$) um das 4-fache gesteigerte Konzentration gegenüber den Parametern bei 1%-iger NaCl-Beladung. Die Osmolalität in der SP2 ($p < 0,0001$) ließ eine Zunahme von 87% erkennen.

Bei der Na-Bilanz ließ sich bei den D₃(-/-) Mäusen kein Unterschied feststellen, die Tiere schieden bei 1%-iger wie bei 4%-iger NaCl-Beladung 60% der Na-Beladung wieder aus. (siehe *Tabelle 3* und *Abbildungen 5–9*).

Tabelle 3: Trinkvolumen, Urinvolumen, Na-Ausscheidung (U_{NaV} 1 bzw. U_{NaV} 2), K-Ausscheidung (U_{KV} 1 bzw. U_{KV} 2), Cl-Ausscheidung (U_{ClV} 1 bzw. U_{ClV} 2), Osmolalität und die Na-Bilanz, sie zeigt an wieviel Prozent der Na-Beladung ausgeschieden wurden. Die Ziffern 1 und 2 kennzeichnen die zwei Registrierungsperioden, von 1h und 3h. Die Daten wurden in Stoffwechselläufigversuchen an wachen D_3 (-/-) Mäusen (KO) und Wildtypmäusen (WT) erhoben, die zuvor mit NaCl-Lösungen unterschiedlicher Konzentration beladen wurden. Alle Werte, ausser Osmolalität und Na-Bilanz, sind auf 100 g Körpergewicht bezogen und als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

GRUPPE (n)	WT 1% (n=9)	KO 1% (n=9)	WT 4% (n=8)	KO 4% (n=9)
Trinkvolumen 1 (ml/(1h*100g))	1,09 \pm 0,19	0,87 \pm 0,16	2,01 \pm 0,19*	2,05 \pm 0,19°
Trinkvolumen 2 (ml/(3h*100g))	2,11 \pm 0,61	1,00 \pm 0,35	2,95 \pm 0,45	1,43 \pm 0,37 [#]
Urinvolumen 1 (ml/(1h*100g))	1,19 \pm 0,13	1,48 \pm 0,19	2,20 \pm 0,22*	2,18 \pm 0,18°
Urinvolumen 2 (ml/(3h*100g))	2,72 \pm 0,26	2,89 \pm 0,35	4,44 \pm 0,44*	4,81 \pm 0,57°
U_{NaV} 1 (μ mol/(min*100g))	3,13 \pm 0,39	4,40 \pm 0,51	13,47 \pm 1,42*	12,26 \pm 1,26°
U_{NaV} 2 (μ mol/(min*100g))	2,51 \pm 0,32	1,83 \pm 0,19	6,62 \pm 0,54*	7,52 \pm 0,65°
U_{KV} 1 (μ mol/(min*100g))	1,16 \pm 0,21	1,41 \pm 0,30	2,11 \pm 0,18*	2,33 \pm 0,25°
U_{KV} 2 (μ mol/(min*100g))	0,53 \pm 0,07	0,40 \pm 0,05	0,76 \pm 0,10	1,06 \pm 0,07 ^{# / °}
U_{ClV} 1 (μ mol/min*100g))	3,16 \pm 0,56	4,4 \pm 0,49	11,15 \pm 1,43*	13,32 \pm 0,98°
U_{ClV} 2 (μ mol/min*100g))	2,39 \pm 0,34	2,0 \pm 0,22	6,63 \pm 0,59*	7,74 \pm 0,61°
Osmolalität 1 (osmol/(1h*kg))	0,87 \pm 0,10	0,89 \pm 0,12	1,03 \pm 0,06	0,97 \pm 0,02
Osmolalität 2 (osmol/(3h*kg))	0,51 \pm 0,05	0,40 \pm 0,02	0,67 \pm 0,02*	0,75 \pm 0,05°
Na-Bilanz (% der Beladung)	73,9 \pm 7,9	66,2 \pm 6,1	58,0 \pm 1,6	60,6 \pm 4,2

[#] p < 0,05 versus Kontrollgruppe WT4%

[°] p < 0,05 versus Kontrollgruppe KO1%

* p < 0,05 versus Kontrollgruppe WT1%

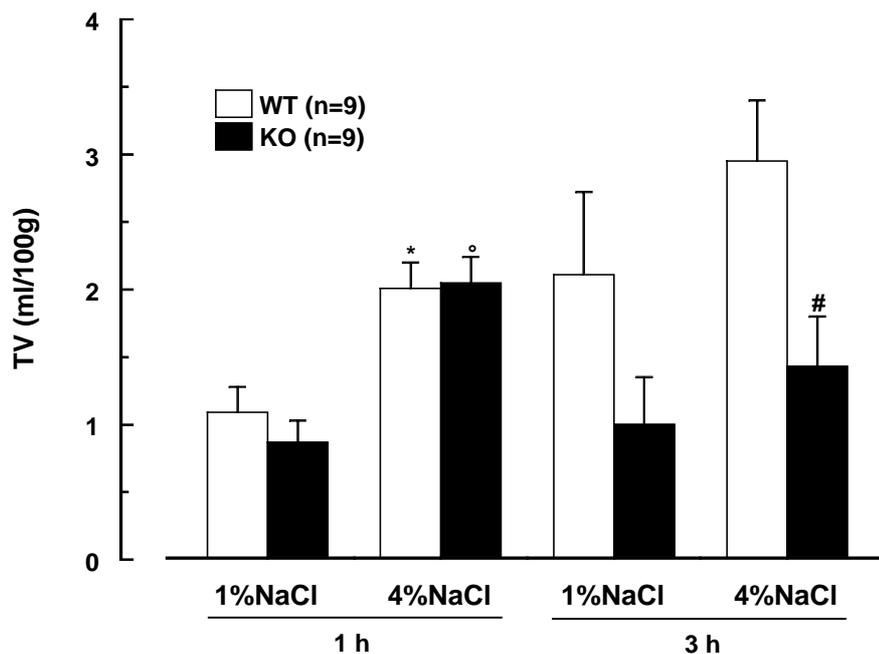


Abbildung 5: Trinkvolumen (TV) der Stoffwechselkäfigversuche an Wildtyp (WT) (offene Balken) und D₃ knock-out (KO) (schwarze Balken) Mäusen mit oraler Beladung von 1%-iger bzw. 4%-iger NaCl-Lösung. Einteilung des 4-stündigen Versuchs in zwei Perioden (1h, erste Stunde nach NaCl-Beladung; 3h, 2-4h nach NaCl-Beladung).

$p < 0,05$ WT4% versus KO4%; * $p < 0,05$ WT1% versus WT4%;

° $p < 0,05$ KO1% versus KO4%

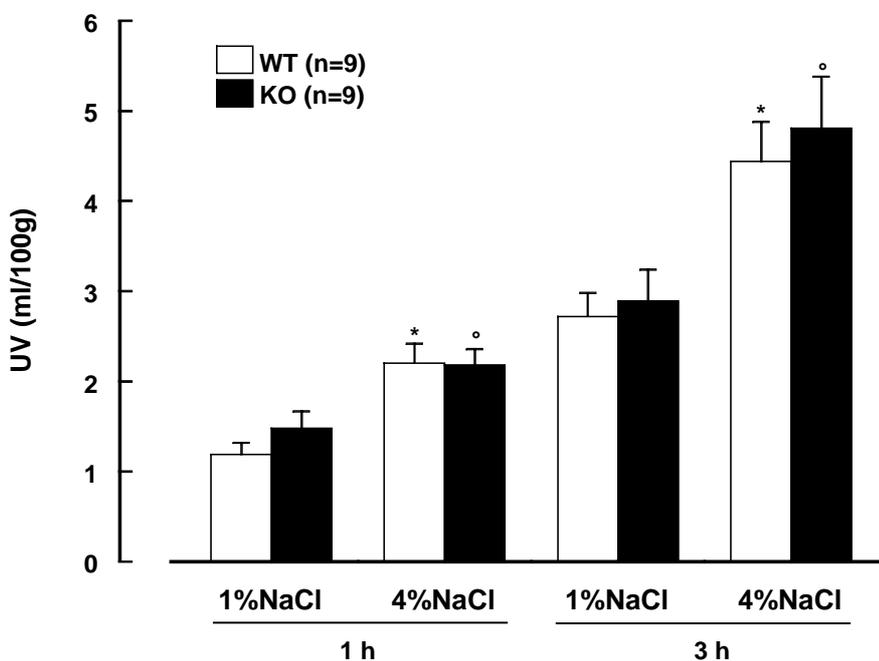


Abbildung 6: Urinvolumen (UV) der Stoffwechselkäfigversuche an Wildtyp (WT) (offene Balken) und D₃ knock-out (KO) (schwarze Balken) Mäusen mit oraler Beladung von 1%-iger bzw. 4%-iger NaCl-Lösung. Einteilung des 4-stündigen Versuchs in zwei Perioden (1h, erste Stunde nach NaCl-Beladung; 3h, 2-4h nach NaCl-Beladung).

$p < 0,05$ WT4% versus KO4%; * $p < 0,05$ WT1% versus WT4%;

° $p < 0,05$ KO1% versus KO4%

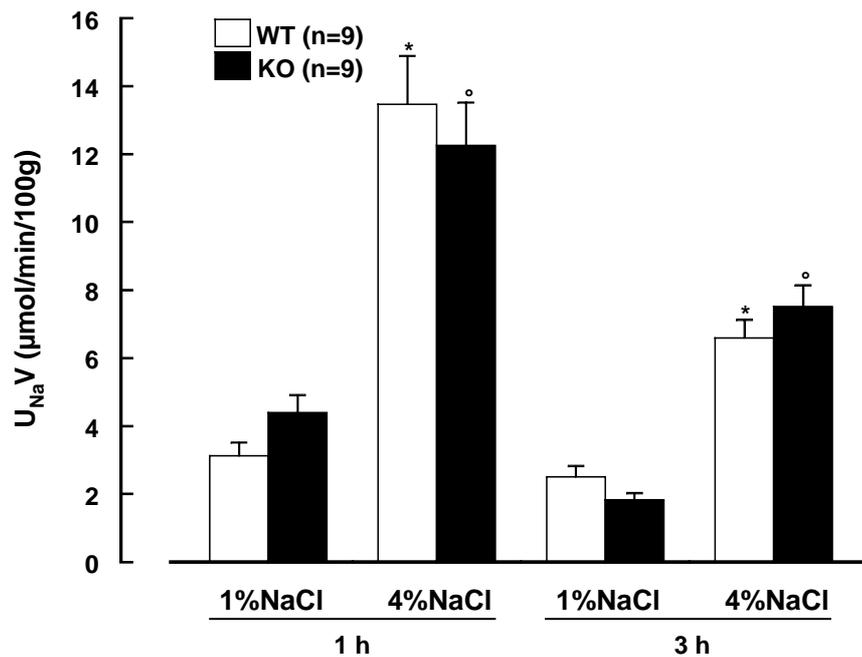


Abbildung 7: Natriumausscheidung (U_{NaV}) der Stoffwechselkäfigversuche an Wildtyp (WT) (offene Balken) und D_3 knock-out (KO) (schwarze Balken) Mäusen mit oraler Beladung von 1%-iger bzw. 4%-iger NaCl-Lösung. Einteilung des 4-stündigen Versuchs in zwei Perioden (1h, erste Stunde nach NaCl-Beladung; 3h, 2-4h nach NaCl-Beladung). # $p < 0,05$ WT4% versus KO4%; * $p < 0,05$ WT1% versus WT4%; ° $p < 0,05$ KO1% versus KO4%

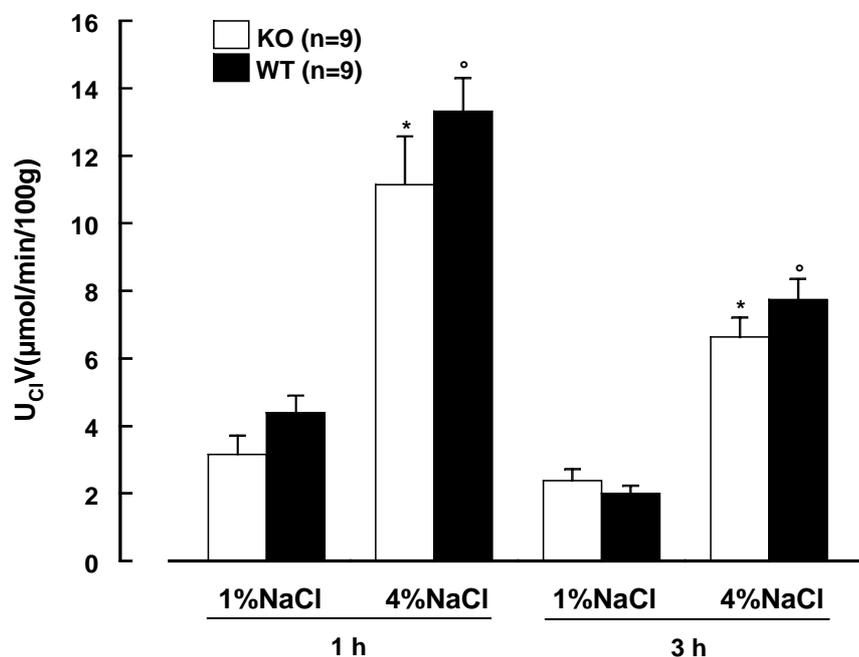


Abbildung 8: Chloridausscheidung (U_{ClV}) der Stoffwechselkäfigversuche an Wildtyp (WT) (offene Balken) und D_3 knock-out (KO) (schwarze Balken) Mäusen mit oraler Beladung von 1%-iger bzw. 4%-iger NaCl-Lösung. Einteilung des 4-stündigen Versuchs in zwei Perioden (1h, erste Stunde nach NaCl-Beladung, 3h, 2-4h nach NaCl-Beladung). # $p < 0,05$ WT4% versus KO4%; * $p < 0,05$ WT1% versus WT4%, ° $p < 0,05$ KO1% versus KO4%

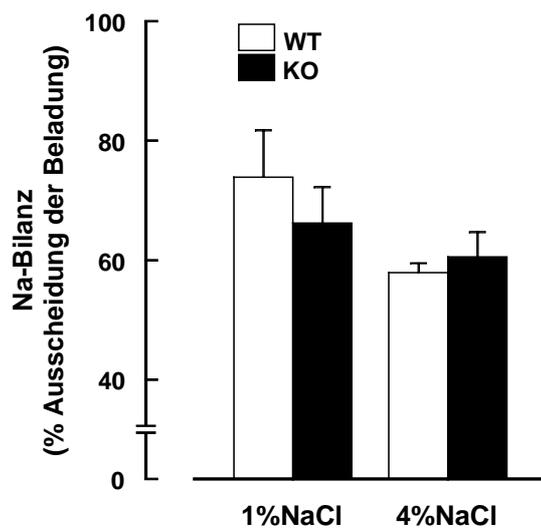


Abbildung 9: Natriumbilanz (Anteil der NaCl-Beladung in Prozent der im Verlauf des Versuchs wieder ausgeschieden wurde) der Stoffwechselläufigversuche an Wildtyp (WT) (offene Balken) und D₃ knock-out (KO) (schwarze Balken) Mäusen mit oraler Beladung von 1%-iger bzw. 4%-iger NaCl-Lösung.

3.2 Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen

3.2.1 Junge und ältere CD-1-Mäuse

Diese Clearance-Untersuchungen wurden im Anschluss an die Stoffwechselläufigversuche durchgeführt. Die jungen CD-1-Mäuse waren 5-6 Wochen alt und wogen 25-30 g, während die älteren CD-1-Mäuse ca. 20 Wochen alt waren und ca. 35-40 g wogen.

Der Nierenindex (NI), welcher als das Verhältnis des Nierenfeuchtgewichtes zu 100 g Körpergewicht angibt, lag bei den älteren CD-1-Mäusen bei $1,59 \pm 0,11$ und somit signifikant höher als bei den jungen CD-1-Mäusen mit $1,36 \pm 0,04$. Die älteren CD-1-Mäusen hatten somit ein höheres Nierengewicht in Beziehung zu ihrem Gesamtkörpergewicht.

3.2.1.1 Zeitkontrollen

Die Ergebnisse der Zeitkontrollversuche finden sich in *Tabelle 4 und Abb. 10-15*. Hier wurde den jungen CD-1-Mäusen über die gesamte Versuchsdauer eine mit BSA versetzte Ringerlösung infundiert. Es zeigten sich konstante Werte über den gesamten Versuchsverlauf für die GFR (im Mittel $0,47 \text{ ml}/(\text{min} \cdot \text{gNiere})$) und die Urinausscheidung ($2,2 \text{ } \mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{gNiere})$). Die Natriumausscheidung im Urin steigerte sich um minimale $0,05 \text{ } \mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{gNiere})$ während des Versuchs. Die fraktionelle Natriumausscheidung stieg hingegen stärker an ohne jedoch das Signifikanzniveau zu erreichen. Für den mittleren arteriellen Blutdruck und die Herzfrequenz fanden sich signifikante Zunahmen von 9% und 8%. Die Hämatokritwerte fielen über den Versuchsverlauf signifikant von 44,8% auf 41,4% ab.

3.2.1.2 Aminosäureinfusion 10%

Die Ergebnisse finden sich in *Tabelle 4* und in den *Abb.10-15*.

Bei der Betrachtung der glomerulären Filtrationsrate der jungen und der älteren CD-1-Mäuse unter 10%-iger Aminosäureinfusion fiel auf, dass die älteren Tiere einen, wenn auch nicht signifikant niedrigeren ($p=0,25$) Basalwert aufwiesen, als die jungen CD-1-Mäuse. Im Verlauf des Versuches zeigte sich eine geringer ausgeprägte GFR-Steigerung auf Aminosäuren bei den älteren Tieren, als bei den jungen CD-1-Mäusen. Diese geringe GFR-Steigerung bei den älteren Mäusen war jedoch nicht signifikant ($p=0,08$). Bei den jungen Tieren steigerte sich die GFR durch Aminosäureinfusion um 51% ($p<0,05$), bei den älteren Tieren um 25% ($p=0,08$). Bei der Urinausscheidung war zu beobachten, dass die älteren CD-1-Mäuse eine um 33% niedrigere Ausscheidung während der Basalperiode hatten. Sie schieden dann jedoch in den Hauptperioden 48% ($p<0,05$) mehr aus. Die jungen CD-1-Mäuse zeigten von dem höheren Basalwert eine vergleichbare Steigerung des Urinvolumens von 69%, die das Signifikanzniveau knapp verfehlte ($p=0,05$). Bei der basalen Natriumausscheidung waren die beiden Gruppen nahezu identisch, die jungen CD-1-Mäuse steigerten ihre Natriumausscheidung unter der Aminosäureinfusion um ca. das Dreifache ($p=0,17$), während die älteren Mäuse nur eine Verdoppelung der Natriumausscheidung aufwiesen ($p=0,05$), beide Werte erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau. Bei der fraktionellen Natriumausscheidung ließen sich keine Unterschiede in der Wirkung der Aminosäuren zwischen den zwei Gruppen erkennen, ebenso waren die Basalwerte in ihrer Höhe vergleichbar. Bei beiden Gruppen gab es im Versuchsverlauf einen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks und einen Abfall des Hämatokrits, die Herzfrequenz blieb über die Dauer des Versuches konstant. In beiden Gruppen trat ein signifikanter Anstieg des MAP auf, so dass der RR-Anstieg für die unterschiedliche Wirkung der Aminosäureinfusion auf die GFR ausscheidet.

Tabelle 4: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zeitkontrolle (CD-CON) und der Versuche mit Infusion von 10%-iger Aminosäurelösung bei jungen CD-Mäusen (CD-JNG-AS10) und bei älteren CD-Mäusen (CD-ALT-AS10). Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), die Herzfrequenz (HF), der Hämatokrit (Hkt), die Natriumkonzentration im Plasma (Na_{Plasma}), das Urinvolumen (UV), die Natriumausscheidung ($U_{Na}V$), die fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

GRUPPE (n)	Periode	CD-CON n=8	CD-JNG-AS10 n=8	CD-ALT-AS10 n=6
MAP (mmHg)	BAS	83,2 \pm 7,2	86,8 \pm 3,3	88,8 \pm 5,4
	HP I	91,2 \pm 7,2*	95,4 \pm 4,5*	97,2 \pm 5,7
	HP II	92,8 \pm 6,8*	96,2 \pm 4,6*	99,8 \pm 2,1*
	HP III	91,4 \pm 7,0*	92,7 \pm 5,4	100,7 \pm 2,2*
HF (1/min)	BAS	513,1 \pm 23,3	525 \pm 26,5	529,2 \pm 34,6
	HP I	543,8 \pm 18,6*	550 \pm 17,7	542,5 \pm 27,6
	HP II	568,1 \pm 16,0*	543,8 \pm 22,4	541,7 \pm 27,4
	HP III	568,8 \pm 14,6*	566,7 \pm 22,6	543,4 \pm 26,8
Hkt (%)	BAS	45,0 \pm 0,9	46,1 \pm 0,7	47,6 \pm 1,1
	HP I	44,4 \pm 0,9	43,8 \pm 0,8*	45,3 \pm 1,1*
	HP II	43,9 \pm 1,0	42,1 \pm 0,8*	44,0 \pm 1,2*
	HP III	42,3 \pm 1,1*	40,8 \pm 1,1*	43,2 \pm 1,0*
Na_{Plasma} (mmol/l)	BAS	155,1 \pm 4,5	148,9 \pm 2,3	152,2 \pm 2,6
	HP I	155,9 \pm 5,0	145,2 \pm 2,3	153,2 \pm 2,4
	HP II	157,6 \pm 4,4	146,0 \pm 3,1	150,3 \pm 2,2
	HP III	153,1 \pm 9,1	143,2 \pm 4,2	153,1 \pm 2,5
UV (μ l/(min*gN))	BAS	1,95 \pm 0,4	3,13 \pm 0,8	2,35 \pm 0,2
	HP I	2,48 \pm 0,5	5,21 \pm 1,3	3,93 \pm 0,4*
	HP II	2,18 \pm 0,4	4,92 \pm 1,4	3,48 \pm 0,16*
	HP III	2,16 \pm 0,2	5,44 \pm 0,1	3,35 \pm 0,5
$U_{Na}V$ (μ mol/(min*gN))	BAS	0,13 \pm 0,04	0,20 \pm 0,06	0,19 \pm 0,06
	HP I	0,12 \pm 0,04	0,57 \pm 0,29	0,35 \pm 0,12
	HP II	0,17 \pm 0,08	0,68 \pm 0,42	0,37 \pm 0,13
	HP III	0,18 \pm 0,03	0,42 \pm 0,19	0,33 \pm 0,10
FE_{Na} (%)	BAS	0,21 \pm 0,06	0,29 \pm 0,09	0,33 \pm 0,10
	HP I	0,18 \pm 0,08	0,64 \pm 0,37	0,61 \pm 0,28
	HP II	0,30 \pm 0,14	0,70 \pm 0,39	0,73 \pm 0,27
	HP III	0,17 \pm 0,03	0,49 \pm 0,26	0,75 \pm 0,33
GFR (ml/(min*gN))	BAS	0,41 \pm 0,06	0,39 \pm 0,04	0,32 \pm 0,04
	HP I	0,49 \pm 0,04	0,54 \pm 0,04*	0,36 \pm 0,04
	HP II	0,47 \pm 0,09	0,66 \pm 0,15	0,40 \pm 0,04
	HP III	0,49 \pm 0,08	0,54 \pm 0,11	0,34 \pm 0,05

* $p < 0,05$ versus BAS

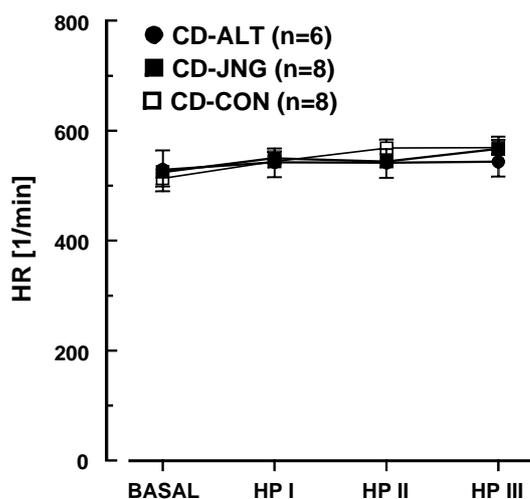


Abbildung 10: Herzfrequenz (HF) bei narkotisierten jungen (CD-JNG, CD- CON) und älteren (CD-ALT) CD-1-Mäusen. Die CD-JNG und CD-ALT Gruppe bekam zunächst Ringerlösung infundiert (BASAL), die in HPI–HPIII durch Aminosäurelösung ersetzt wurde. Die Zeitkontrollgruppe (CD-CON) wurde über die gesamte Versuchsdauer (BASAL+HPI-HPIII) mit Ringerlösung infundiert.

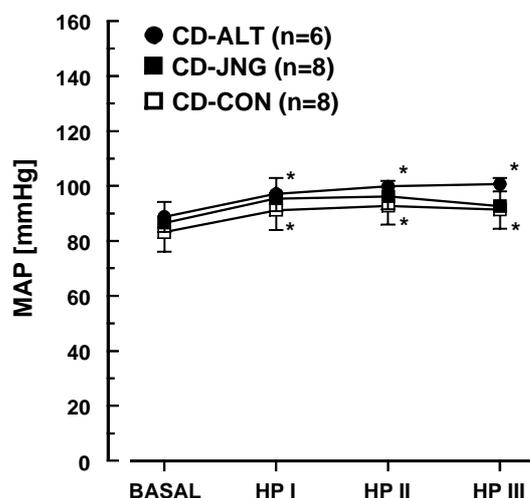


Abbildung 11: mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) bei narkotisierten jungen (CD-JNG, CD- CON) und älteren (CD-ALT) CD-1-Mäusen. Die CD-JNG und CD-ALT Gruppe bekam zunächst Ringerlösung infundiert (BASAL), die in HPI–HPIII durch Aminosäurelösung ersetzt wurde. Die Zeitkontrollgruppe (CD-CON) wurde über die gesamte Versuchsdauer (BASAL+HPI-HPIII) mit Ringerlösung infundiert. * $p < 0,05$ versus BASAL

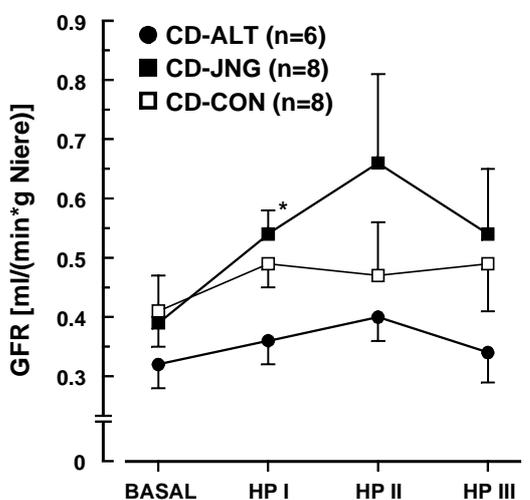


Abbildung 12: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei narkotisierten jungen (CD-JNG, CD- CON) und älteren (CD-ALT) CD-1-Mäusen. Die CD-JNG und CD-ALT Gruppe bekam zunächst Ringerlösung infundiert (BASAL), die in HPI–HPIII durch Aminosäurelösung ersetzt wurde. Die Zeitkontrollgruppe (CD-CON) wurde über die gesamte Versuchsdauer (BASAL+HPI-HPIII) mit Ringerlösung infundiert. * $p < 0,05$ versus BASAL

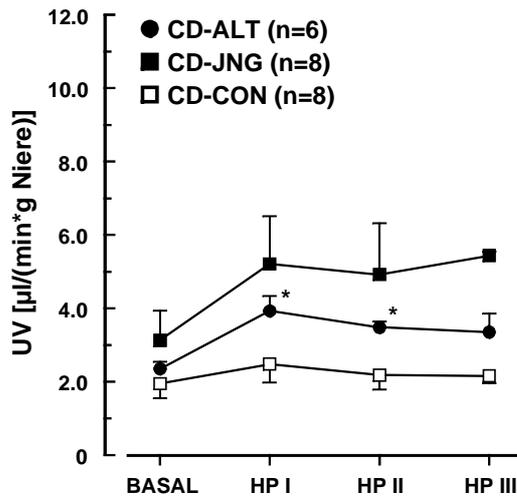


Abbildung 13: Urinvolumen (UV) bei narkotisierten jungen (CD-JNG, CD-CON und älteren (CD-ALT) CD-1-Mäusen. Die CD-JNG und CD-ALT Gruppe bekam zunächst Ringerlösung infundiert (BASAL), die in HPI–HPIII durch Aminosäurelösung ersetzt wurde. Die Zeitkontrollgruppe (CD-CON) wurde über die gesamte Versuchsdauer (BASAL+HPI-HPIII) mit Ringerlösung infundiert. * $p < 0,05$ versus BASAL

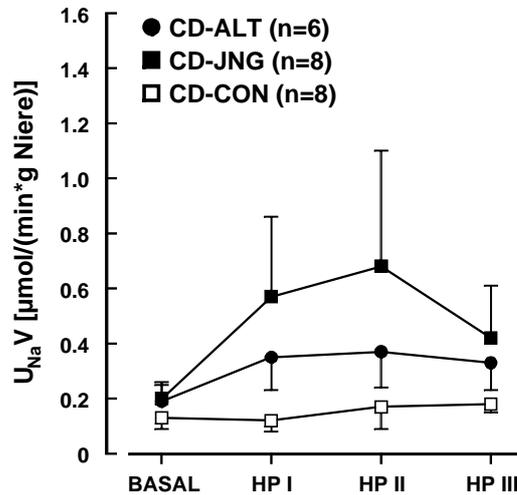


Abbildung 14: Natriumausscheidung im Urin ($U_{Na}V$) bei narkotisierten jungen (CD-JNG, CD-CON und älteren (CD-ALT) CD-1-Mäusen. Die CD-JNG und CD-ALT Gruppe bekam zunächst Ringerlösung infundiert (BASAL), die in HPI–HPIII durch Aminosäurelösung ersetzt wurde. Die Zeitkontrollgruppe (CD-CON) wurde über die gesamte Versuchsdauer (BASAL+HPI-HPIII) mit Ringerlösung infundiert.

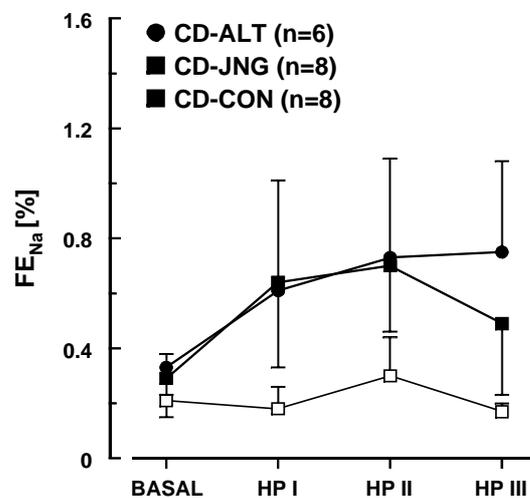


Abbildung 15: Fraktionellen Natrium-ausscheidung (FE_{Na}) bei narkotisierten jungen (CD-JNG, CD-CON und älteren (CD-ALT) CD-1-Mäusen. Die CD-JNG und CD-ALT Gruppe bekam zunächst Ringerlösung infundiert (BASAL), die in HPI–HPIII durch Aminosäurelösung ersetzt wurde. Die Zeitkontrollgruppe (CD-CON) wurde über die gesamte Versuchsdauer (BASAL+HPI-HPIII) mit Ringerlösung infundiert.

3.2.2 D₃ (-/-) Mäuse und Wildtypmäuse (C57/Bl6)

Bei den hier verwendeten Tieren handelt es sich um die Tiere aus den Stoffwechsellkäfigversuchen, wobei zwischen den Stoffwechsellkäfigversuchen und den Clearanceversuchen wenigstens 4 Tage lagen. Die beiden Tiergruppen waren ca. 5-6 Wochen alt und wogen 25-30 g. Es fand sich kein signifikanter Unterschied im Nierenindex dieser beiden Tiergruppen, er lag bei $1,35 \pm 0,12$ für die Wildtyptiere und bei $1,16 \pm 0,09$ für die D₃ knock-out Tiere.

3.2.2.1 Zeitkontrollen

Für die Zeitkontrollgruppen wurden C57/Bl6 und D₃(-/-) Mäuse verwendet, die über die gesamte Versuchsdauer mit BSA versetzte Ringerlösung infundiert bekamen (siehe Material und Methoden 2.3.2.1). In den zwei Zeitkontrollgruppen (C57/Bl6, D₃(-/-)) ergaben sich im Verlauf des Versuches teilweise signifikante Veränderungen (siehe *Tabelle 5*). Bei der Betrachtung der Entwicklung der einzelnen Gruppen über den Versuchszeitraum fiel auf, dass der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) bei den Wildtyptieren um 6% und bei den D₃(-/-) Mäusen um 10% anstieg. Ebenso war ein Abfall des Hämatokrits von 7% bei den Wildtyptieren und den D₃(-/-) Mäusen zu beobachten. Die Kontrollgruppe der D₃(-/-) Tiere zeigte eine signifikant erhöhte Natriumausscheidung ($p < 0,05$) und fraktionelle Natriumausscheidung ($p < 0,05$) in der 2. Versuchsperiode, während die Wildtyptiere eine signifikante erhöhte Natriumausscheidung in der 4. Versuchsperiode ($p < 0,05$) aufwiesen.

Das Urinvolumen über die 5 Versuchsperioden lag in der Wildtypgruppe bei einem Mittelwert von $3,15 \pm 0,6$ $\mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{gNiere})$ und in der D₃(-/-) Gruppe bei $4,09 \pm 0,7$ $\mu\text{l}/(\text{min} \cdot \text{gNiere})$. Die Na-Konzentration im Plasma hatte einen Mittelwert von $153,1 \pm 3,3$ mmol/l bei den Wildtyptieren und $148,3 \pm 3,3$ mmol/l bei den D₃(-/-) Tieren. Der Mittelwert der GFR, während der Dauer der 5

Versuchsperioden, lag bei den Wildtyptiere bei $0,52 \pm 0,04$ ml/(min*g)Niere und bei den $D_3(-/-)$ Tiere bei $0,53 \pm 0,06$ ml/(min*g)Niere. Die Unterschiede zwischen den Wildtyptieren und den $D_3(-/-)$ Mäusen beim Urinvolumen, der Na-Konzentration im Plasma, sowie der GFR erreichten nicht das Signifikanzniveau von $p < 0,05$.

3.2.2.2 Aminosäureinfusion 10%

Die Zusammenfassung dieser Ergebnisse findet sich in *Tabelle 5* und den *Abbildungen 16–21*. Hierbei zeigte sich, dass die Wildtyptiere eine signifikante GFR-Steigerung von 47% in der 1. Hauptperiode ($p < 0,05$) und von 71% in der 2. Hauptperiode ($p < 0,05$) hatten, während die $D_3(-/-)$ Tiere keine GFR-Steigerung aufwiesen und bei einer mittleren GFR von $0,48 \pm 0,06$ ml/(min*gNiere) in allen drei Hauptperioden blieben. Bei den Wildtyptieren war ebenfalls eine Zunahme des Urinvolumens gegenüber dem Basalwert zu beobachten: Um das 1,4-fach ($p < 0,05$) in der 1. Hauptperiode und um das 2,3-fache ($p < 0,05$) in der 3. Hauptperiode. Die $D_3(-/-)$ Tiere schieden während der Versuchsperioden im Mittel $4,18 \pm 0,9$ μ l/(min*gNiere) aus und zeigten keine signifikanten Steigerungen auf die Aminosäureinfusion in den drei Hauptperioden. Bei der Natriumausscheidung im Urin fand sich bei den Wildtyptieren in der 2. Hauptperiode eine Vervielfachung der Ausscheidung der Basalperioden ($p < 0,05$), während in der 1. und 3. Hauptperiode das Signifikanzniveau gerade eben nicht erreicht wurde, mit einem p-Wert von 0,05. Der Mittelwert der Hauptperioden lag gegen über dem Basalwert jedoch um das 2,9-fache höher ($p < 0,05$). In der Gruppe der $D_3(-/-)$ Tiere fiel eine Steigerung von 29% in der ersten Hauptperiode auf ($p < 0,05$), bei der Betrachtung der Steigerung des Mittelwertes der drei Hauptperioden gegenüber dem Basalwert gab es keine signifikante Steigerung der Natriumausscheidung im Urin mehr ($p = 0,29$). Weder bei den Wildtyptieren, noch bei den $D_3(-/-)$ Tieren fiel bei der fraktionellen Natriumausscheidung eine signifikante Steigerung auf. Jedoch nahmen die Zahlenwerte der Wildtypgruppe stärker zwischen der Basalperiode

und den Hauptperioden zu. als die der D₃(-/-) Tiere. Diese waren bedingt durch die große Streuung der Versuchswerte nicht signifikant (p=0,05). In Folge der Versuchsbedingungen wurde in beiden Gruppen ein Anstieg des MAP in den Hauptperioden, sowie ein Abfall des Hämatokritwertes beobachtet. Die Natriumkonzentration im Plasma blieb in beiden Gruppen über den gesamten Versuch konstant.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Zeitkontrollen (WT-CON und KO-CON) und der Versuche mit Infusion von 10%-iger Aminosäurelösung (WT-AS10 und KO-AS10). Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP), die Herzfrequenz (HF), der Hämatokrit (Hkt), die Natriumkonzentration im Plasma (Na_{Plasma}), das Urinvolumen (UV), die Natriumausscheidung (U_{NaV}), die fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sind als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

GRUPPE (n)	Periode	WT-CON n=8	KO-CON n=8	WT-AS10 n=10	KO-AS10 n=8
MAP (mmHg)	BAS	91,9 \pm 5,7	90,1 \pm 4,9	85,5 \pm 2,9	93,1 \pm 3,8
	HP I	95,6 \pm 6,4*	98,3 \pm 6,2*	95,5 \pm 4,4*	100,6 \pm 3,1*
	HP II	94,3 \pm 6,0*	98,7 \pm 6,1*	96,5 \pm 4,3*	99,2 \pm 3,7
	HP III	97,8 \pm 6,2*	100,7 \pm 6,8*	86,7 \pm 4,2	98,8 \pm 5,0
HF (1/min)	BAS	507,8 \pm 19,4	531,3 \pm 14,5	511,1 \pm 23,3	534,4 \pm 14,5
	HP I	525,0 \pm 19,8	550,0 \pm 12,5	530,0 \pm 16,1	568,8 \pm 21,5
	HP II	465,6 \pm 59,8	562,5 \pm 17,1	535,0 \pm 20,1	556,3 \pm 13,8
	HP III	535,7 \pm 21,9	578,6 \pm 17,1	543,8 \pm 18,6	564,3 \pm 21,9
Hkt (%)	BAS	44,8 \pm 0,9	48,3 \pm 0,5	46,1 \pm 0,6	45,9 \pm 2,5
	HP I	43,5 \pm 1,0*	46,5 \pm 0,6*	43,4 \pm 0,7*	44,3 \pm 2,4*
	HP II	41,8 \pm 1,1*	45,0 \pm 0,6*	41,8 \pm 0,7*	43,3 \pm 2,2*
	HP III	41,4 \pm 1,1*	44,7 \pm 0,7*	40,4 \pm 0,9*	44,0 \pm 1,1*
Na_{Plasma} (mmol/l)	BAS	154,5 \pm 2,9	146,8 \pm 2,8	143,4 \pm 3,5	151,7 \pm 4,2
	HP I	152,7 \pm 3,4	150,3 \pm 3,3	142,0 \pm 1,8	150,4 \pm 5,1
	HP II	154,3 \pm 2,4	149,2 \pm 3,3	144,2 \pm 2,8	152,3 \pm 5,0
	HP III	150,7 \pm 4,8	146,9 \pm 3,9	139,9 \pm 2,3	153,5 \pm 5,0
UV (μ l/(min*gN))	BAS	2,58 \pm 0,4	3,58 \pm 0,6	2,87 \pm 0,7	4,23 \pm 1,7
	HP I	2,69 \pm 0,3	3,59 \pm 0,3	6,88 \pm 2,0*	5,01 \pm 1,1
	HP II	2,95 \pm 0,6	4,41 \pm 0,9	9,27 \pm 3,1	3,48 \pm 0,3
	HP III	4,39 \pm 1,2	4,76 \pm 1,2	9,33 \pm 2,9*	3,94 \pm 0,6
U_{NaV} (μ mol/(min*gN))	BAS	0,19 \pm 0,05	0,23 \pm 0,07	0,27 \pm 0,08	0,42 \pm 0,11
	HP I	0,23 \pm 0,05	0,42 \pm 0,10*	0,81 \pm 0,29	0,59 \pm 0,11*
	HP II	0,30 \pm 0,09	0,46 \pm 0,15	1,33 \pm 0,44*	0,47 \pm 0,16
	HP III	0,46 \pm 0,14*	0,55 \pm 0,32	1,19 \pm 0,43	0,70 \pm 0,25
FE_{Na} (%)	BAS	0,26 \pm 0,08	0,32 \pm 0,10	0,39 \pm 0,09	0,54 \pm 0,14
	HP I	0,35 \pm 0,09	0,54 \pm 0,13*	0,79 \pm 0,28	0,52 \pm 0,14
	HP II	0,39 \pm 0,16	0,53 \pm 0,14	1,08 \pm 0,37	0,58 \pm 0,10
	HP III	0,59 \pm 0,22	0,52 \pm 0,26	1,11 \pm 0,49	0,53 \pm 0,33
GFR (ml/(min*gN))	BAS	0,52 \pm 0,03	0,56 \pm 0,03	0,45 \pm 0,05	0,45 \pm 0,05
	HP I	0,50 \pm 0,03	0,54 \pm 0,05	0,66 \pm 0,09*	0,48 \pm 0,04
	HP II	0,57 \pm 0,05	0,53 \pm 0,07	0,77 \pm 0,12*	0,49 \pm 0,08
	HP III	0,48 \pm 0,06	0,50 \pm 0,09	0,81 \pm 0,09*	0,48 \pm 0,05

* $p < 0,05$ versus BAS

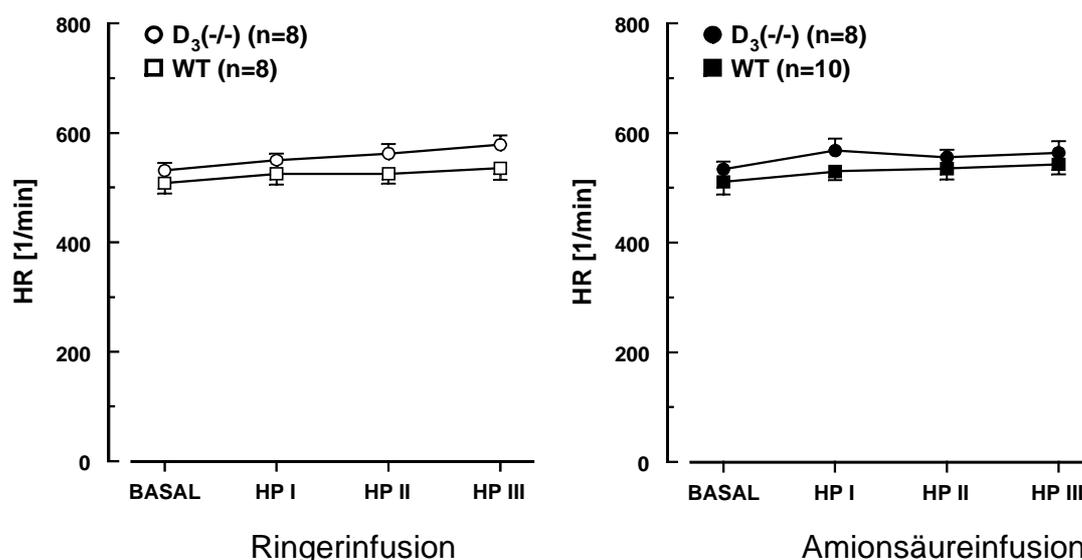


Abbildung 16: Herzfrequenz (HF) bei narkotisierten Wildtyp (WT) und D_3 knock-out ($D_3(-/-)$) Mäusen (Mittelwert \pm SEM). Bei den Zeitkontrollen (links dargestellt) Infusion von Ringerlösung über den gesamten Versuch (BASAL+HPI+HP II+HP III). Bei den Versuchen mit Aminosäureinfusion (rechts dargestellt), Basalwert mit Infusion von Ringerlösung (BASAL) und anschließend drei Hauptperioden (HPI+HP II+HP III) mit Aminosäureinfusion.
* $p < 0,05$ versus BASAL

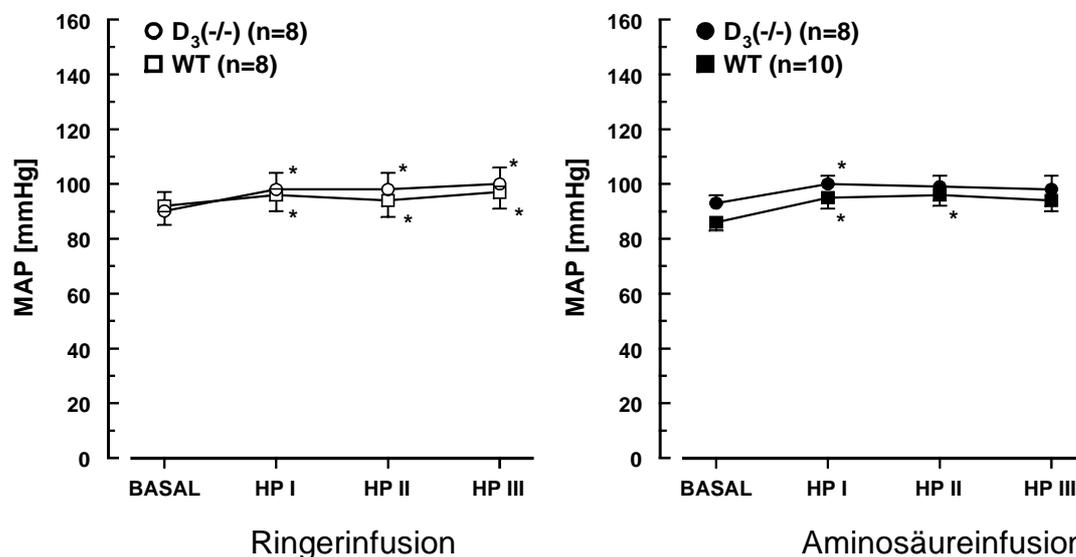


Abbildung 17: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) bei narkotisierten Wildtyp (WT) und D_3 knock-out ($D_3(-/-)$) Mäusen (Mittelwert \pm SEM). Bei den Zeitkontrollen (links dargestellt) Infusion von Ringerlösung über den gesamten Versuch (BASAL+HPI+HP II+HP III). Bei den Versuchen mit Aminosäureinfusion (rechts dargestellt), Basalwert mit Infusion von Ringerlösung (BASAL) und anschließend drei Hauptperioden (HPI+HP II+HP III) mit Aminosäureinfusion.
* $p < 0,05$ versus BASAL

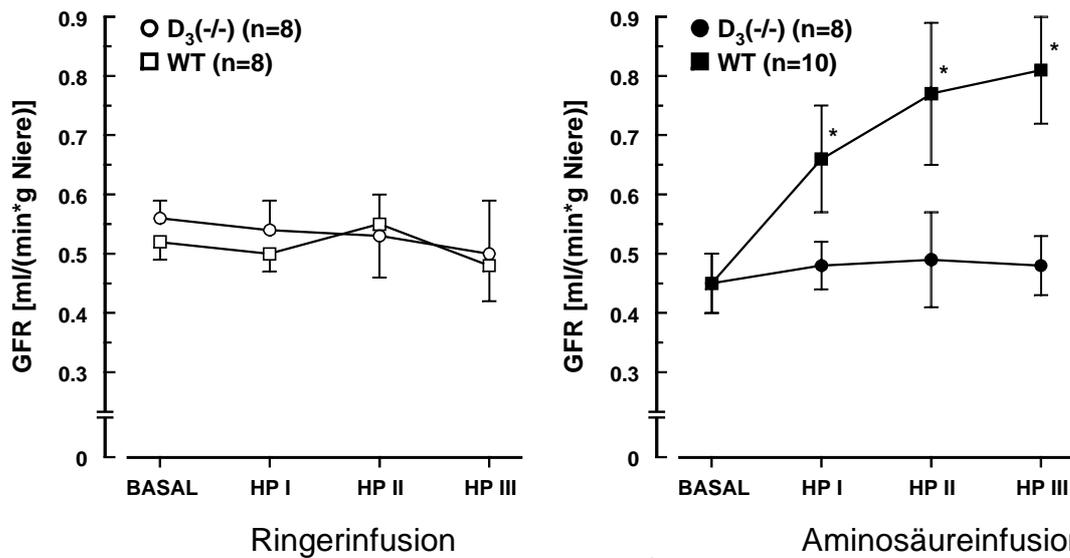


Abbildung 18: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bei narkotisierten Wildtyp (WT) und D_3 knock-out ($D_3(-/-)$) Mäusen (Mittelwert \pm SEM). Bei den Zeitkontrollen (links dargestellt) Infusion von Ringerlösung über den gesamten Versuch (BASAL+HPI+HP II+HP III). Bei den Versuchen mit Aminosäureinfusion (rechts dargestellt), Basalwert mit Infusion von Ringerlösung (BASAL) und anschließend drei Hauptperioden (HPI+HP II+HP III) mit Aminosäureinfusion.
* $p < 0,05$ versus BASAL

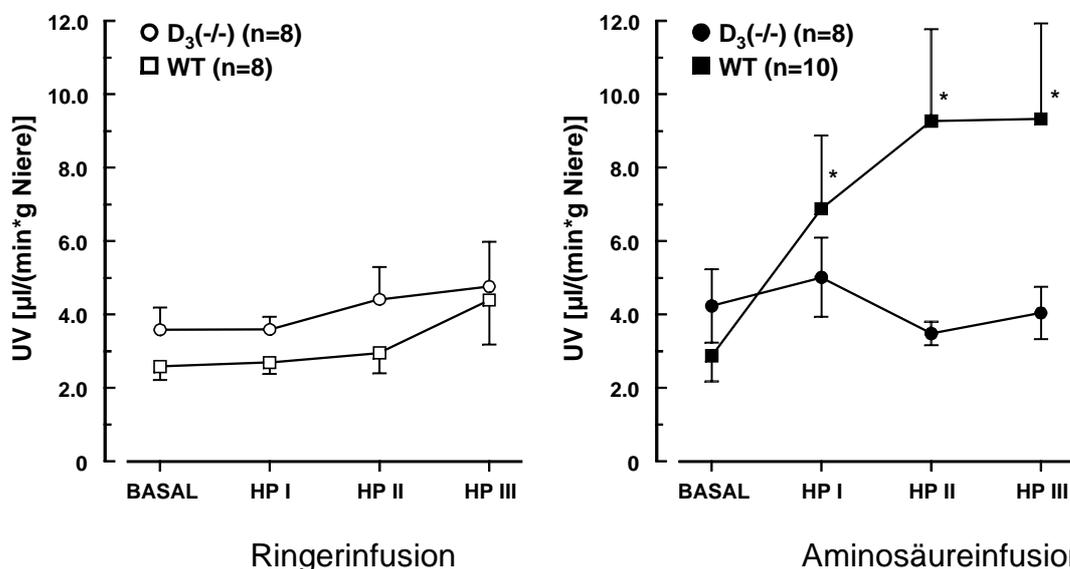


Abbildung 19: Urinvolumen (UV) bei narkotisierten Wildtyp (WT) und D_3 knock-out ($D_3(-/-)$) Mäusen (Mittelwert \pm SEM). Bei den Zeitkontrollen (links dargestellt) Infusion von Ringerlösung über den gesamten Versuch (BASAL+HPI+HP II+HP III). Bei den Versuchen mit Aminosäureinfusion (rechts dargestellt), Basalwert mit Infusion von Ringerlösung (BASAL) und anschließend drei Hauptperioden (HPI+HP II+HP III) mit Aminosäureinfusion.
* $p < 0,05$ versus BASAL

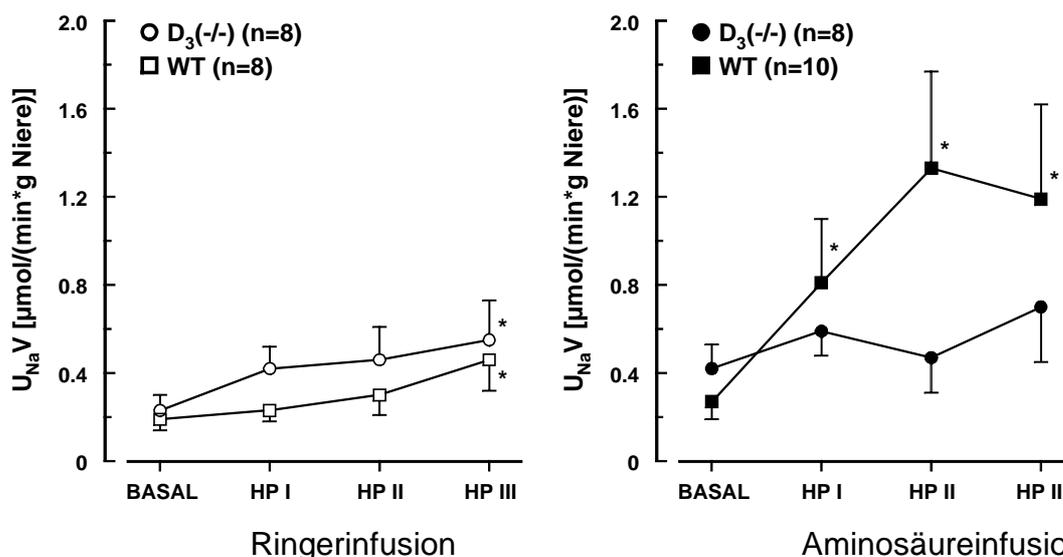


Abbildung 20: Natriumausscheidung im Urin (U_{NaV}) bei narkotisierten Wildtyp (WT) und D_3 knock-out ($D_3(-/-)$) Mäusen (Mittelwert \pm SEM). Bei den Zeitkontrollen (links dargestellt) Infusion von Ringerlösung über den gesamten Versuch (BASAL+HPI+HP II+HP III). Bei den Versuchen mit Aminosäureinfusion (rechts dargestellt), Basalwert mit Infusion von Ringerlösung (BASAL) und anschließend drei Hauptperioden (HPI+HP II+HP III) mit Aminosäureinfusion. * $p < 0,05$ versus BASAL

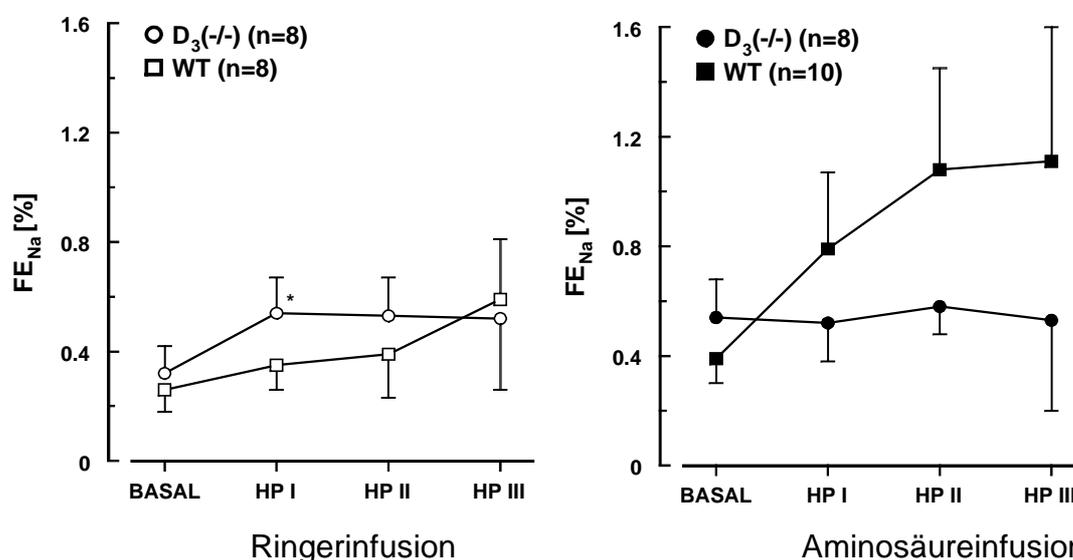


Abbildung 21: Fraktionellen Natriumausscheidung (FE_{Na}) bei narkotisierten Wildtyp (WT) und D_3 knock-out ($D_3(-/-)$) Mäusen (Mittelwert \pm SEM). Bei den Zeitkontrollen (links dargestellt) Infusion von Ringerlösung über den gesamten Versuch (BASAL+HPI+HP II+HP III). Bei den Versuchen mit Aminosäureinfusion (rechts dargestellt), Basalwert mit Infusion von Ringerlösung (BASAL) und anschließend drei Hauptperioden (HPI+HP II+HP III) mit Aminosäureinfusion. * $p < 0,05$ versus BASAL

4. DISKUSSION

4.1 Altersabhängige renale Veränderungen

In der vorliegenden Arbeit wurde ein deutlicher Unterschied in der Nierenfunktion von jungen und älteren CD-1-Mäusen (5-6 und 20 Wochen) gefunden. Er zeigte sich in wachem und narkotisiertem Zustand. Zu Beginn wurde die renale Ausscheidungsfunktion in Stoffwechselkäfigen an wachen CD-1-Mäusen untersucht. Es kann davon ausgegangen werden, dass diese Beobachtungen den Basalparametern wacher CD-1-Mäuse entsprachen, da keinerlei invasive Maßnahmen an den Mäusen, durchgeführt wurden. In weiteren Untersuchungen wurde die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) an narkotisierten jungen und älteren CD-1-Mäusen untersucht.

In den Stoffwechselkäfigversuchen mit jungen (5-6 Wochen) und älteren (20 Wochen) CD-1-Mäusen zeigte sich ein signifikant niedrigeres Trink- und Urinvolumen bei den jungen gegenüber den älteren Tieren. Diese Beobachtung könnte dafür sprechen, dass die Niere der älteren Mäuse eine reduzierte Konzentrationsfähigkeit aufweist. Hierfür würde auch die geringere Osmolalität des Urins dieser Tiere sprechen. Um den größeren Verlust an Flüssigkeit zu kompensieren, nehmen diese Tiere mehr Trinkwasser auf. Der Verlust der Konzentrationsfähigkeit der Niere im Alter konnte bereits bei C57/Bl6 Mäusen, Ratten und beim Menschen beobachtet werden [Burich, 1975; Rowe *et. al.*, 1976]. Welche Mechanismen für dieses Phänomen verantwortlich sind, ist noch nicht hinreichend verstanden. Einige Autoren sehen im altersbedingten Abfall der GFR die Hauptursache, während andere annehmen, dass durch die relative Zunahme der medullären Durchblutung der Niere der Konzentrationsgradient abnimmt und somit das Gegenstromprinzip der Henle-Schleife an Effektivität verliert und weniger stark konzentrierter Urin ausgeschieden wird. Darüber hinaus werden Defizite im tubulären Ionentransport diskutiert.

Bei der Betrachtung altersabhängiger renaler Veränderungen bei Nagetieren, insbesondere bei Mäusen stellt der verwendete Tierstamm eine wichtige Grundlage dar. Dieser Faktor scheint entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß und die Geschwindigkeit renaler Veränderungen bei Mäusen im Alter zu haben [Hackbarth und Harrison 1982b]. In einer Studie wurden drei unterschiedliche Mäusestämme (C57/Bl6, CBA/HT6, B6CBAF₁) hinsichtlich morphologischer und funktioneller Veränderungen der Niere im Alterungsprozess untersucht. Hierbei fand sich, dass die altersabhängigen morphologischen Veränderungen, z.B. glomeruläre Sklerose und Stauung, mit einer abnehmenden Nierenfunktion korrelierten. Bei den C57/Bl6 Mäusen konnten bereits bei 29 Wochen alten Tieren pathologische Veränderungen der Glomeruli beobachtet werden, die mit einem Abfall der GFR einhergingen. Die CBA/HT6 zeigten dieses Phänomen erst im Alter von 66-101 Wochen während die B6CBAF₁ Mäuse im Alter von 101 Wochen immer noch eine nahezu unauffällig Nierenfunktion aufwiesen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass die in der vorliegenden Arbeit untersuchten CD-1-Mäuse den C57/Bl6 Mäusen, was den altersabhängigen Verlauf der Nierenfunktion betrifft, am ähnlichsten sind, da bei den CD-1-Mäusen bereits nach 20 Wochen funktionelle renale Veränderungen festgestellt werden konnten.

Bei der Elektrolytausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid war ebenfalls eine erhöhte Ausscheidung bei älteren CD-1-Mäusen zu beobachten, insbesondere die Kaliumausscheidung im Urin der älteren Tiere war stark gesteigert. Hintergrund dieser Beobachtung könnte die Aldosteron bedingte Rückresorption von Natrium im distalen Tubulussystem sein, bei welcher Natrium im Austausch mit Kalium und Wasserstoffionen aus dem Tubuluslumen aufgenommen und somit mehr Kalium im Urin ausgeschieden wird. Hiergegen spricht jedoch die Tatsache, dass im Alter die Plasmareninaktivität und der basale Aldosteronspiegel im Plasma reduziert sein sollen [Weidmann *et. al.*, 1975; Crane *et. al.*, 1976], sowie die parallele Zunahme der Natriumkonzentration im Urin, welche im Rahmen dieses Regulationsvorganges abnehmen sollte. Die Untersuchungen von Hackbarth und Harrison [1982b]

konnten auch für die altersbedingten tubulären Veränderungen Unterschiede zwischen den Mäusestämmen zeigen. Hierbei ist interessant, dass beim C57/Bl6 Mäusen die Natriumausscheidung zuerst abnahm und erst im Alter von 101 Wochen stark anstieg, während die CBA/HT6 Mäuse eine kontinuierliche Zunahme der Natriumausscheidung im Urin mit dem Alter aufwiesen. Die gesteigerte Natriumausscheidung war positiv mit einer Hypertrophie der Niere korreliert. Generell kann gesagt werden, dass bei allen drei Mäusestämmen die Natriumausscheidung (für die anderen Urinelektrolyte fanden sich keine Angaben) altersabhängig zugenommen hat, dass der Zeitpunkt dieser Veränderung im Lebensverlauf jedoch vom Mäusestamm abhing. Das Phänomen der altersabhängig gesteigerten Elektrolytausscheidung im Urin konnte von Alt et. al. [1980] in ähnlichem Maße bei alten Ratten beobachtet werden. Hingegen wurde in einer Studie an gesunden Probanden keine Zunahme der Natriumausscheidung im Urin gefunden, die jungen und alten Probanden schieden die selbe tägliche Menge an Natrium aus [Fliser *et. al.*, 1993]. Im Gegensatz dazu trat in einer anderen Studie von Epstein und Hollenberg [1976] eine gesteigerte Natriumausscheidung bei älteren Probanden gegenüber jungen Probanden nach einer Natriumrestriktion auf. Für diese unterschiedlichen Beobachtungen könnte ursächlich sein, dass bei der Untersuchung von Fliser *et. al.* [1993] keine Probanden mit renalen und kardiovaskulären Vorerkrankungen in die Studie aufgenommen wurden, während die Probanden bei Epstein und Hollenberg [1976] weniger restriktiv ausgewählt wurden. Bei den zitierten Untersuchungen mit Mäusen und Ratten wurden teilweise Tiere mit bereits bestehenden renalen Veränderungen, die bei Nagetieren in höherem Alter ohnehin sehr häufig sind [Dunn, 1967], in die Experimente eingeschlossen, was die auftretenden Unterschiede erklären könnte. Da die beim Menschen sicher zu erwartenden renalen und kardiovaskulären Vorerkrankungen bei den Experimenten nicht berücksichtigt wurden, könnten diese Bedingungen die Beobachtungen beeinflusst haben.

Die von den meisten Autoren [Epstein und Hollenberg, 1976; Alt *et. al.*, 1980; Hackbarth und Harrison, 1982b] und in dieser Arbeit beobachtete gesteigerte

Natriumausscheidung der älteren Individuen könnte auch auf einen Verlust der Konzentrationsfähigkeit der Niere zurückgeführt werden. Welche pathophysiologischen Mechanismen diesem Konzentrierungsverlust zugrunde liegen ist noch nicht hinreichend verstanden. Neben der beobachteten reduzierten GFR bei älteren Individuen scheinen auch Defekte in tubulären Transportsystemen eine plausible Erklärung für den Verlust der Konzentrationsfähigkeit zu sein.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Basalparameter für CD-1-Mäuse sind in Übereinstimmung mit den von Meneton et. al. [2000] veröffentlichten Daten. Sie befinden sich jedoch eher am unteren Ende der dort beschriebenen Varianzbreite. Die Ursache hier könnte sein, dass die Daten der Stoffwechselläufigversuche an CD-1-Mäusen während des Tages über 8h erhoben wurden, in denen sich die eher nachtaktiven Mäuse in einer Ruhephase befanden. In einer Studie zeigten Mäuse nachts im Vergleich zum Tag eine bis um 40-fache gesteigerte Elektrolyt- und Volumenausscheidung [Cambar et. al., 1981]. Dass die erhobenen Parameter im physiologischen Bereich der CD-1-Mäuse liegen, beweist die weitgehend ausgeglichene Flüssigkeitsbalance.

In den Clearanceversuchen konnte bei den jungen und älteren CD-1-Mäusen im Versuchverlauf ein Anstieg des MAP und ein Abfall des Hämatokrits beobachtet werden. Da der MAP Anstieg in beiden Gruppen und der Kontrollgruppe in gleichem Masse auftrat und maximal 10% über dem Basalwert lag, dürften die Veränderungen nicht physiologisch relevant sein. Der Hämatokritabfall trat durch die einmal pro Periode durchgeführte Blutabnahme auf, wobei der Blutverlust bei maximal 8% des Gesamtblutvolumens lag. Weil sich der MAP und der Hämatokrit in beiden untersuchten Tiergruppen in gleichem Maße veränderten, sollten diese Phänomene keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

Zwischen den jungen und älteren CD-1-Mäusen fand sich im Clearanceversuch kein Unterschied für folgende Parameter: MAP, Herzfrequenz, Urinvolumen, Natriumkonzentration im Plasma und der Natriumausscheidung im Urin. Die erhobenen Daten stimmten mit den von Meneton et. al. [2000] veröffentlichten Daten zu unterschiedlichen Mäusestämmen in narkotisiertem Zustand gut überein. In den Stoffwechsellkäfigversuchen wiesen die älteren CD-1-Mäuse eine höhere Urin- und Natriumausscheidung auf als die jungen CD-1-Mäuse. Diese Beobachtung konnte in den Clearanceversuchen nicht bestätigt werden. Die Ursache hierfür könnte in der verabreichten Infusion (1%/(KG*h)) liegen, welche eher eine Hyperhydrierung und positive Flüssigkeitsbilanz verursachte. Möglicherweise reichte der freie Zugang zur Trinkflasche bei den jungen CD-1-Mäusen im Stoffwechsellkäfig nicht aus, um diese Hydrierung zu gewährleisten.

Ein entscheidender Unterschied zwischen älteren und jungen Tieren zeigte sich beim Nierenindex. Die älteren CD-1-Mäuse hatten im Verhältnis zu ihrem Körpergewicht größere Nieren als die jungen CD-1-Mäuse. Diese Beobachtung machten auch Hackbarth und Harrison [1982b] bei ihrer Untersuchung an drei unterschiedlichen Mäusestämmen. Bei allen stieg der Nierenindex mit zunehmendem Lebensalter an. Der Zeitpunkt des Anstiegs variierte zwischen den Stämmen, was genetisch bedingt sein könnte. Diese Hypertrophie der Niere während des Alterungsprozesses kann als Kompensationsversuch des Funktionsverlustes verstanden werden.

Im Clearanceversuch besaßen die älteren Tiere eine etwas niedrigere basale GFR als die jungen Tiere. Dieses Phänomen konnte schon an Ratten [Alt et. al., 1980] und am Menschen [Lewis und Alving 1938; Fliser et. al., 1993] beobachtet werden. Die Ursachen hierfür sind jedoch noch nicht hinreichend verstanden. Es wird die Zunahme von spontan auftretenden Nierenerkrankungen, wie Nephrosklerose, im Alter angenommen [Dunn, 1967]. Des Weiteren scheinen nahrungsabhängige Faktoren für die altersbedingte Nephropathie eine Rolle zu spielen. Neuhaus und Flory [1975] fanden bei

Ratten, dass bei proteinreicher Ernährung die renalen Veränderungen stärker und schneller auftreten. Darüber hinaus scheint eine natriumarme Diät sich positiv auf die degenerativen renalen Prozesse auszuwirken [Elema und Arends 1975], insbesondere bei Nagetieren wird ein immunologischer Prozess für das Fortschreiten von Nierenveränderungen diskutiert [Mellars, 1965; Hirokawa, 1975]. Bei Mäusen spielen besonders genetische Unterschiede zwischen den Mäusestämmen eine entscheidende Rolle für die Veränderung der Nierenfunktion im Alter [Hackbarth und Harrison 1982b].

Zur Beurteilung der renalen funktionellen Reserve wurde bei den jungen und älteren CD-1-Mäusen eine Aminosäurelösung infundiert. Bei den jungen Tieren fand sich der erwartete signifikante GFR Anstieg. Bei den älteren Tieren veränderte sich die GFR dagegen nicht. Somit haben die älteren CD-1-Mäuse aufgrund struktureller Veränderungen ihre renale funktionelle Reserve verloren, bzw. benötigen schon unter Basalbedingungen diese Reserve zur Erhaltung einer suffizienten Nierenleistung. Parallel mit der Aminosäureinfusion stieg bei den jungen CD-1-Mäusen das Urinvolumen und die Natriumausscheidung im Urin an. Bei den älteren CD-1-Mäusen zeigte sich trotz einer gleichbleibenden GFR eine leichte Zunahme des Urinvolumens und der Natriumausscheidung im Urin. Der altersabhängige Unterschied der Reaktion auf eine Glycininfusion wurde von Baylis et. al. [1990] an Ratten im Alter von 3-4, 18 und 22-24 Monaten untersucht. In Übereinstimmung mit den Beobachtungen an CD-1-Mäusen fand sich, dass die basale GFR mit zunehmendem Alter der Ratten abnimmt und eine GFR Steigerung in Folge Glycininfusion nur bei den jungen (3-4 Monate) und mittelalten (18 Monate) Ratten beobachtet werden konnte, nicht aber bei alten (22-24 Monate) Tieren. Im Gegensatz zur Studie von Baylis et. al. [1990] wurden in der vorliegenden Arbeit nur zwei Gruppen von unterschiedlich alten CD-1-Mäusen untersucht, die altersbedingt eher den jungen und mittelalten Ratten entsprachen. Dies würde bedeuten, dass bei CD-1-Mäusen der renale Alterungsprozess und dessen Effekt auf die renale Hämodynamik schneller verläuft als bei den von Baylis et. al. [1990] untersuchten Ratten. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, dass in der

vorliegenden Studie mit Ratten von Baylis et. al. [1990] eine reine Glycin-Lösung verabreicht wurde und kein physiologisches Gemisch unterschiedlicher Aminosäuren.

Beim Menschen hingegen scheint auch in höherem Alter noch eine renale Reserve vorhanden zu sein. Fliser et. al. [1993] beobachtete eine GFR Zunahme nach Aminosäureinfusion bei jungen (23-32 Jahre) und älteren (61-82 Jahre) Probanden, wobei die GFR bei den älteren Probanden etwas weniger anstieg. Das Urinvolumen und die Natriumausscheidung wurden nicht beschrieben. Bei der Betrachtung der Befunde bei Mäusen und Ratten scheinen die hämodynamischen Veränderungen im Alter im Vordergrund zu stehen. Dies ist vermutlich bedingt durch die reduzierte Gesamtzahl an funktionierenden Glomeruli. Eine weitere Deutung bietet die von Woods et. al. [1993a] aufgestellte Gesamtheorie. Es wird davon ausgegangen, dass durch einen Kotransport von Aminosäuren und Natrium im Tubulussystem ein sekundäres Signal von der *Macula densa* ausgeht, welches dann zur Ausschüttung von Mediatoren führt, die die Dilatation des *Vas afferens* und im folgenden die Steigerung der GFR und des RBF induzieren. Es wäre nun vorstellbar, dass die Gefäße durch Arteriosklerose nur eine ungenügende Dilatation erreichen was zu einer verringerten bzw. ganz aufgehobenen GFR-Steigerung führen würde. Die altersbedingten Veränderungen des renalen Gefäßwiderstandes wurden von Baylis et. al. [1990] in der Untersuchung an Ratten ebenfalls beurteilt. Es fand sich, dass der renale Gefäßwiderstand bei den alten Ratten schon im Basalzustand gegenüber den jüngeren Tieren erhöht war und paradoxerweise in Folge der Glycininfusion noch weiter zunahm, während der renale Gefäßwiderstand bei den jüngeren Ratten abfiel. Inwieweit dieses vaskuläre Phänomen auch bei Mäusen von Bedeutung ist, muss noch untersucht werden. Die Theorie von Woods et. al. [1993a] fußt auf der Koresorption von Aminosäuren und Natrium, die eine reduzierte Natriumausscheidung erwarten liesse. In dieser Arbeit und zahlreichen anderen Veröffentlichungen konnte dieses nicht bestätigt werden [Mühlbauer et. al., 1994; Ruilope et.al., 1987]. Möglicherweise werden in den der *Macula densa*

nachfolgenden Tubulusabschnitten die Ionenkonzentrationen des Urins noch modifiziert, so dass in der Urinprobe aus einem Blasenkatheter die reduzierte Natriumkonzentration des Urins nicht mehr gemessen werden kann. Dies erscheint quantitativ betrachtet aber unwahrscheinlich.

Die Elektrolytausscheidung, welche hauptsächlich durch die tubuläre Resorptionsleistung beeinflusst wird, wurde durch die altersbedingten Veränderungen der Niere bei CD-1-Mäusen wenig verändert. Diese Zunahme der Natriumausscheidung im Urin (absolute Na-Ausscheidung, fraktionelle Na-Ausscheidung) und des Urinvolumens bei den älteren CD-1-Mäusen wies einen ähnlichen Anstieg wie bei den jungen CD-1-Mäusen in Folge der Aminosäureinfusion auf. Bei Untersuchungen an Ratten wurde dieses Phänomen ebenfalls beobachtet, was dafür spricht, dass die altersbedingten renalen Veränderungen hauptsächlich die Hämodynamik der Niere betreffen und weniger die tubuläre Funktion.

4.2 D₃-Rezeptor Funktion

Im Hauptabschnitt dieser Arbeit wurde die Relevanz des D₃-Rezeptors für die Regulation der hämodynamischen und tubulären Funktionen der Niere untersucht. Es konnten signifikante Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und D₃-knock-out (D₃ (-/-)) Mäusen beobachtet werden.

Bei der Untersuchung der basalen Nierenfunktion von D₃ (-/-) Mäusen und Wildtypmäusen im Stoffwechsellkäfig fiel ein erhöhtes Urinvolumen und eine gesteigerte Natriumausscheidung im Urin der D₃ (-/-) Mäusen gegenüber den Wildtyptieren auf. Für die übrigen erhobenen Parametern (Trinkvolumen, Kaliumausscheidung, Chloridausscheidung, Osmolalität) fanden sich keine Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Alle erfassten Daten liegen in der physiologischen Schwankungsbreite und sind in Übereinstimmung mit den von Meneton et. al. [2000] veröffentlichten Größenordnungen für Mäuse in wachem Zustand. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass der D₃-Rezeptor regulierend auf die tubuläre Funktion einwirken könnte und möglicherweise auch mit der Volumenregulation in Zusammenhang steht.

Um die Urin- und Elektrolytausscheidung an wachen, unbehandelten D₃ knock-out Mäusen und Wildtypmäusen im Stoffwechsellkäfigversuch besser beurteilen zu können, wurden die Tiere mit einer NaCl-Lösung von 1% oder 4% beladen. Der Versuch umfasst zwei getrennte Sammelperioden (SP1 & SP2), um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf der Ausscheidung nach oralen NaCl-Beladung treffen zu können. Bei der Beladung mit 1%-iger NaCl-Lösung fiel auf, dass die D₃ knock-out Mäuse in der SP1 eine höhere Natriumausscheidung hatten als die Wildtyptiere, die in der SP2 mehr Natrium als die D₃ (-/-) Mäuse ausschieden. Eine weitere Beobachtung ergab sich beim Trinkvolumen der SP2. Die D₃ knock-out Mäuse tranken bei 1%-iger geringfügig weniger und bei 4%-iger NaCl-Beladung signifikant weniger als die Wildtyptiere, wobei sie vergleichbare Urinvolumina ausschieden. Asico et. al. [1998] beobachtete bei

seinen Untersuchungen an narkotisierten Mäusen, dass für das D₃-Gen heterozygote Mäuse eine NaCl-Beladung besser ausscheiden konnten als Wildtypiere. Die homozygoten knock-out Mäuse zeigten bei Asico et. al. [1998] akut nach der NaCl-Gabe ebenfalls einen Anstieg der Na-Ausscheidung im Urin wie bei den hier durchgeführten Versuchen an wachen D₃ knock-out Mäusen. Bei der infolge durchgeführten 4%-igen, oralen NaCl-Beladung der D₃ knock-out Mäuse war dieser beschleunigte Anstieg der Na-Ausscheidung im Urin, wie unter 1%-iger NaCl-Beladung beobachtet, im Vergleich mit den Wildtypmäusen nicht mehr zu beobachten. Vermutlich greifen bei höherer Beladung noch andere regulatorische Mechanismen ein, die den funktionellen Defekt durch den D₃-knock-out kompensieren. Darüber hinaus wies Asico et. al. [1998] eine gesteigerte Reninaktivität bei den D₃ (-/-) Mäusen nach, was in Übereinstimmung mit der Beobachtung steht, dass der D₃-Rezeptor in juxtaglomerulären Zellen die Reninsekretion hemmt [Sanada et. al., 1997]. Aufgrund dieser Zusammenhänge könnten im Organismus der D₃ knock-out Maus bereits natriuretisch wirkende Systeme stimuliert sein, die sofort nach der NaCl-Beladung ihre Wirkung entfalten, während bei der Wildtypmaus in normaler Stoffwechsellage diese erst noch angeregt werden müssen. Das reduzierte Trinkvolumen würde sich auch durch die gesteigerte Reninaktivität erklären lassen, welche sekundär zu einer erhöhten Wasserrückresorption führt. Die erniedrigte Trinkmenge könnte jedoch auch in einer reduzierten Flüssigkeitsausscheidung oder einer vermehrter Flüssigkeitsaufnahme im Vorfeld des Stoffwechselkäfigversuchs begründet liegen. Des weiteren wurde bei den D₃ (-/-) Mäusen wie bereits bei den Basalwerten eine erhöhte Kaliumausscheidung im Urin während der 1%- und 4%-igen NaCl-Beladung beobachtet, die durch die Aldosteron bedingte Natriumrückresorption im Tubulussystem verursacht sein könnte. Die gesteigerte Kaliumausscheidung könnte jedoch auch durch die direkte Interaktion mit Rezeptoren der D₂-Rezeptorfamilie zustande kommen, da Rezeptoren der D₂-Rezeptorfamilie unter anderem durch Modulation von Calcium- und Kaliumkanälen ihre Wirkung entfalten [Robinson und Caron 1997]. Somit scheinen einige Beobachtungen, die Befunde von Asico et. al. [1998] bezüglich der gesteigerten Reninaktivität

bei D_3 (-/-) Mäusen zu bestätigen und die Wichtigkeit des D_3 -Rezeptors für die Hemmung der Reninausschüttung aus den juxtaglomerulären Zellen zu unterstreichen.

In diesem Zusammenhang interessant sind Untersuchungen der Arbeitsgruppe an einem Rattenmodell des salzabhängigen Hypertonus [Luippold *et. al.*, 2000]. Es wurden salz-sensitive (DS) und salz-resistente (DR) Dahl Ratten untersucht. Üblicherweise entwickeln die salz-sensitiven Tiere unter normal- oder hochsalz Ernährung einen Hypertonus während die salz-resistenten Tiere normotensiv bleiben. Zunächst wurden beide Tiergruppen mit dem D_3 -Rezeptor Agonist 7-OH-DPAT behandelt. Bei den DR Ratten zeigte sich eine GFR Steigerung und Natriuresis, wie sie bereits von Luippold *et. al.* [1998] an anderen Ratten beobachtet wurde. Die DS Ratten hingegen wiesen keine GFR Zunahme auf und die Natriuresis ließ sich nur bei normalsalz ernährten Tieren beobachten, nicht jedoch bei hochsalz ernährten. Fortsetzend wurden DR Ratten chronisch (29 Tage) mit dem selektiven D_3 -Rezeptor Antagonist BSF 135170 behandelt, während unter normalsalz Ernährung keine Veränderungen des systolischen Blutdrucks gemessen wurden, konnte unter hochsalz Ernährung eine Zunahme des Blutdrucks bei den zuvor salz-resistenten Ratten beobachtet werden. Die funktionellen Untersuchungen und der Blutdruckanstieg bei DR mit D_3 -Rezeptor Antagonistenbehandlung und hochsalz Ernährung legen nahe, dass der D_3 -Rezeptor eine Rolle in der Pathophysiologie des salzabhängigen Hypertonus spielt. Asico *et. al.* [1998] beobachtete bei den D_3 knock-out Mäusen einen Hypertonus. Allerdings wurden die Daten an narkotisierten Mäusen erhoben, was die Beurteilung des Phänomens erschwert, da das Narkotikum durchaus modulierend auf den MAP wirken kann. Deshalb wäre es sinnvoll, diese Untersuchung an wachen Tieren mit Hilfe der Schwanzdruck Plethysmographie, wie sie bei den Versuchen an Dahlratten verwendet wurde und von Meneton *et. al.* [2000] auch bei Mäusen beschrieben wurde, zu wiederholen.

Die Beobachtungen unter akuter NaCl-Beladung der wachen D_3 knock-out Mäuse scheinen darauf hinzudeuten, dass die D_3 (-/-) Mäuse in der Lage sind,

die NaCl-Beladung wieder auszuscheiden. Die Untersuchungen von Asico et. al. [1998] an narkotisierten Mäusen machen in diesem Punkt keine klare Aussage. Dass diese Beobachtungen nicht zwangsläufig bedeuten, dass der D₃-Rezeptor nicht natürlicherweise an der NaCl-Ausscheidung beteiligt ist, zeigen neuere Studien, die sich mit Kompensationsmechanismen bei knock-out Mäusen beschäftigen. Brooks et. al. [2001] untersuchten eine Gruppe von knock-out Mäusen mit einem defizienten Na⁺-H⁺ Austauscher (NHE3) und eine weitere Gruppe mit einem Defekt am Na⁺-Cl⁻ Kotransporter (NCC) hinsichtlich der eingreifenden Kompensationsmechanismen. Die beiden untersuchten Transporter werden für den größten Teil des rückresorbierten Natriums im distalen und proximalen Tubulus verantwortlich gemacht. Bei den NHE3 knock-out Mäusen konnte durch Antikörper eine gesteigerte Expression eines Natrium-Phosphat Kotransporters (NaPi-2) und eines epithelialen Natriumkanals (ENaC) nachgewiesen werden. Darüber hinaus fand sich eine Reduktion der GFR bei den NHE3 knock-out Mäusen. Die NCC knock-out Mäuse zeigten nur eine kompensatorische Hochregulation des ENaC. Es scheint, dass diese eintretenden Kompensationsmechanismen, das Überleben der knock-out Mäuse ermöglichen. Aus diesem Grund wäre es durchaus denkbar, dass auch im Falle der D₃ knock-out Mäuse solche Phänomene regulierend auf den Natriumhaushalt einwirken, was in weiterführenden Studien untersucht werden sollte. Eine wichtige Voraussetzung für das Auftreten solcher Kompensationsmechanismen könnte die lebenslange Defizienz des Rezeptors/Transporters sein, was erklären könnte, warum bei den DR Ratten nach einer chronischen Behandlung mit dem D₃-Rezeptor Antagonisten keine kompensatorisch wirkenden Faktoren zum Tragen kamen und eine Blutdrucksteigerung auftrat.

Bei den Clearanceversuchen mit D₃ (-/-) Mäusen und Wildtypmäusen war in beiden Gruppen im Versuchsverlauf ein MAP Anstieg von maximal 10% zu beobachten, der jedoch physiologisch nicht relevant sein dürfte. Die D₃ knock-out Mäuse wiesen die gleichen diastolischen und systolischen Blutdruckwerte wie die Wildtypmäuse auf. Somit konnten die Beobachtungen von Asico et. al.

[1998], die einen Hypertonus der D₃ (-/-) Mäuse in narkotisiertem Zustand bei ihrer Studie zeigen konnten, nicht bestätigt werden. Eine Hypertonie wäre jedoch als Folge der gesteigerten Reninaktivität durchaus möglich, wobei Reninaktivitätsmessungen in narkotisiertem Zustand nur bedingt aussagefähig sind. Darüber hinaus könnte ein erhöhter Blutdruck auch durch den zerebalen Ausfall des D₃-Rezeptors verursacht werden, da beobachtet wurde, dass vor allem Dopaminrezeptoren der D₂-Rezeptorfamilie bei der zerebralen Regulation des Blutdrucks beteiligt sind [Jose *et. al.*, 1999].

Bedingt durch die Blutabnahmen trat ein Hämatokritabfall in beiden Versuchgruppen ein, der maximal 8% des zirkulierenden Blutvolumens betrug. Bei der Herzfrequenz, der Natriumkonzentration im Plasma und bei der GFR zeigten sich keine Unterschiede zwischen den D₃ (-/-) Mäusen und den Wildtypmäusen. Dies deutet darauf hin, dass die renale Hämodynamik im basalen Zustand nicht direkt von der Funktion des D₃-Rezeptor abhängt bzw. durch eintretende regulierende Mechanismen der D₃-Rezeptorausfall kompensiert werden konnte. Wie bereits bei den NaCl-Beladungsversuchen an wachen Mäusen diskutiert, konnten bei knock-out Mäusen Kompensationsmechanismen beobachtet werden, die sowohl die tubuläre Funktion (Na-Kanäle und -Transporter) als auch die renale Hämodynamik (kompensatorischer GFR Abfall) beeinflussten [Brooks *et. al.*, 2001]. Bei der basalen Ausscheidung von Urin und Natrium ließen sich leicht erhöhte Parameter bei den D₃ (-/-) Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen beobachten. Dies ist in Übereinstimmung mit den Beobachtungen aus den basalen Stoffwechselläufigversuchen. Es wirft sich erneut die Vermutung auf, dass bei den D₃ (-/-) Mäusen im basalen Zustand eine Stimulation natriuretischer Systeme vorliegt, die die mögliche Natrium- und Volumenretention auszugleichen versuchen.

Die glomeruläre Funktion des D₃-Rezeptors wurde mittels einer 10%-igen Aminosäureinfusion bei D₃ (-/-) Mäusen und Wildtypmäusen erforscht. Für die Basalparameter (MAP, Herzfrequenz, Hämatokrit, Natriumkonzentration im

Plasma) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den D₃ (-/-) Mäusen und den Wildtypmäusen. Das Phänomen der Aminosäure bedingten Hyperfiltration und der nachfolgend auftretenden Diurese und Natriurese ist schon lange bekannt und wurde an Hunden [Shannon *et. al.*, 1932], Ratten [Meyer *et. al.*, 1983] und am Menschen [Pullmann *et.al.*, 1954; Castellino *et. al.*, 1986] beobachtet.

Bei der vorliegenden Untersuchung fand sich, dass die Wildtypmäuse ebenfalls mit einer renalen Hyperfiltration, Diurese und Natriurese auf eine Aminosäureinfusion reagierten. Sie wiesen eine GFR Steigerung gegenüber den Basalperioden auf, sowie eine starke Steigerung der Urin- und Natriumausscheidung. Demgegenüber stand der Befund bei den D₃ (-/-) Mäusen, welche trotz Aminosäureinfusion über den gesamten Versuch eine konstante GFR und Urinausscheidung hatten. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schließen, dass der D₃-Rezeptor eine entscheidende Funktion für die renale Hämodynamik besitzt. In früher durchgeführten Untersuchungen an Ratten wurde durch die Gabe des selektiven D₃-Rezeptor Agonist 7-OH-DPAT eine vergleichbare GFR-Steigerung, Diurese und Natriurese wie nach einer Aminosäureinfusion beobachtet [Mühlbauer *et. al.*, 2000]. Bedingt durch die Lokalisation des D₃-Rezeptors in der Niere scheinen eine Reihe von Mechanismen möglich [O'Connell *et. al.*, 1998]. In den Glomeruli und den Podozyten finden sich D₃-Rezeptoren, die dort direkt die Filtrationsleistung des einzelnen Glomerulums beeinflussen könnten. Des weiteren sind in den glatten Muskelzellen der Arteriolen D₃-Rezeptoren nachgewiesen worden. Diese könnten direkt oder über den von Woods *et. al.* [1993a] beschriebenen TGF Mechanismus aktiviert werden und dann eine Dilatation des *Vas afferens* bewirken, die zu einer GFR-Steigerung führt. Diese präglomeruläre Vasodilatation wurde schon mehrfach nach einer Aminosäureinfusion beobachtet [Baylis *et. al.*, 1990; Mendez *et. al.*, 1991]. Die genauen Wirkmechanismen, die für die Vermittlung der Dilatation des *Vas afferens* verantwortlich sind konnten bisher nicht vollständig verstanden werden. Dass der D₃-Rezeptor an der Modulation des intrarenalen Gefäßtonus beteiligt ist, zeigte sich in Untersuchungen mit dem D₃-Rezeptor Agonisten, der eine

Vasokonstriktion im *Vas efferens* erzeugte und neben einer GFR-Steigerung einen Abfall des RBF hervorrief [Mühlbauer *et. al.*, 2000]. Die scheinbar paradoxe Wirkung einer präglomerulären Vasodilatation und einer postglomerulären Vasokonstriktion durch ein Rezeptorsystem wäre über eine unterschiedliche Rezeptorkopplung denkbar. Es scheint, dass die präzise Autoregulation der GFR und des RBF durch ein Rezeptorsystem erklärbar wäre.

Studien am D₂-Rezeptor, der eine hohe Homologie mit dem D₃-Rezeptor aufweist, zeigten eine Beteiligung dieses Rezeptors an der Aminosäurebedingten Hyperfiltration. Bei Untersuchungen an Ratten mit dem D₂/D₃-Rezeptor Agonist Quinpirol wurde eine GFR-Steigerung, Diurese und Natriurese beobachtet, die vergleichbar mit den Veränderungen nach Aminosäureinfusion waren [Luippold und Mühlbauer 1998]. Fortführend wurde untersucht in wie weit die Aminosäure- und Quinpirol-bedingte Hyperfiltration durch D₂-Rezeptor Antagonisten wieder gehemmt werden konnte. Der zentral und peripher wirkende Antagonist S(-)-Sulpirid konnte in beiden Fällen die Hyperfiltration hemmen. Die Effekte auf die Diurese und Natriurese waren weniger eindeutig. In der Studie von Luippold und Mühlbauer [1998] fanden sich trotz Hemmung der Hyperfiltration signifikante Steigerungen des Urinvolumens und der Natriumausscheidung. Auch bei den Untersuchungen von Mendez *et. al.* [1991] war diese Tendenz zu erkennen. Hier waren die Steigerungen jedoch nicht signifikant. Hingegen war bei der Gabe des selektiv peripher wirkenden Antagonisten Domperidon nur ein marginaler Effekt auf die Steigerung der Filtration, der Diurese und der Natriurese zu erkennen. Diese Beobachtungen scheinen nahezu legen, dass zentrale und periphere D₂-Rezeptoren für die Vermittlung der Aminosäure- und Quinpirol-bedingten Hyperfiltration verantwortlich sind. Hierfür sprechen auch Ergebnisse aus Versuchen mit einer chronischen Denervierung der Nieren, bei denen keine Hyperfiltration nach Aminosäureinfusion mehr beobachtet werden konnte [Mühlbauer *et. al.*, 1997]. Ein weiterer Unterschied zwischen den beiden verwendeten Antagonisten besteht darin, dass Domperidon eine größere Affinität für den D₂-Rezeptor als

für den D₃-Rezeptor aufweist, während S(-)-Sulpirid eine höhere Affinität für den D₃-Rezeptor zu haben scheint. Darüber hinaus scheint auch der D₂-Rezeptor Agonist Quinpirol an den D₃-Rezeptor zu binden. In Kenntnis dieser Wirkungen könnten die beobachteten Phänomene vorwiegend D₃-Rezeptor-vermittelt sein. Hierfür sprechen die vorliegenden Untersuchungen an den D₃ knock-out Mäusen, bei denen die Reaktion auf Aminosäureinfusion vergleichbar mit der Gabe von S(-)-Sulpirid bei den Versuchen an Ratten war. Die trotz pharmakologischer Blockade oder genetischem knock-out zu beobachtende Natriuresis in Folge der Aminosäureinfusion lässt annehmen, dass diese Reaktion nicht ausschließlich auf die hämodynamische Antwort mit Hyperfiltration, wie von Mendez et. al. [1991] vermutet, zurückzuführen ist, sondern das Eingreifen weiterer Regulationssysteme voraussetzt. In diesem Zusammenhang kann bei den D₃ (-/-) Mäusen auch nicht von vergleichbaren Kompensationsmechanismen für die Natriumausscheidung, wie bereits bei den Stoffwechselkäfigversuchen mit NaCl-Beladung besprochen, ausgegangen werden, da nicht nur bei den D₃ knock-out Mäusen, sondern auch bei den Akutversuchen mit Antagonistengabe eine leichte Natriuresis beobachtet wurde.

Die Problematik der Rezeptorselektivität einzelner Pharmaka unterstreicht die Bedeutung von Studien mit knock-out Mäusen, da bei diesen Tieren gezielt nur ein Gen z.B. ein Rezeptor ausgeschaltet und somit dessen physiologische Funktion untersucht werden kann. Bei der Arbeit mit solch permanenten knock-out Mäusen darf jedoch nicht unterschätzt werden, dass sich für das defekte Gen Kompensationsmechanismen entwickeln können. Dieses Phänomen wird mit der neuen Generation von konditionalen knock-out Tieren, bei denen durch pharmakologische Modulation das entsprechende Gen intakt oder defekt ist, umgangen.

Zusammenfassend haben die vorliegenden Experimente an D₃ (-/-) Mäusen und Wildtypmäusen gezeigt, dass der D₃-Rezeptor eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Aminosäure-bedingten Hyperfiltration bei Mäusen spielt. Diese Beobachtung scheint in Übereinstimmung mit der nachgewiesenen

Lokalisation des D₃-Rezeptors an renalen Arteriolen und an Glomeruli zu sein. Inwieweit zentrale oder periphere D₃-Rezeptoren für die renale Hämodynamik während einer Aminosäureinfusion bei Mäusen verantwortlich sind, ist nicht abschließend geklärt. In dieser Frage könnten Denervierungsversuche oder organspezifische knock-out Tiere weiterhelfen.

Die D₃ (-/-) Mäuse haben unter Basalbedingungen und Stimulation durch orale NaCl-Beladung kein Defizit bei der Elektrolytausscheidung. Die Tiere scheinen sogar rascher eine NaCl-Beladung auszuscheiden, was auf eine bereits bestehende Stimulation von kompensatorischen natriuretischen und diuretischen Faktoren schließen lässt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Maus gewinnt durch die neuen Methoden zur Erzeugung von transgenen knock-out und knock-in Modellen zunehmend an Bedeutung für die experimentelle Forschung.

Der erste Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem bereits von anderen Spezies bekannten altersabhängigen Veränderungen der Nierenfunktion. Untersucht wurden junge und ältere CD-1-Mäuse. An wachen Tieren im Stoffwechselläufigversuch zeigte sich, dass die älteren CD-1-Mäuse im Vergleich zu den jungen CD-1-Mäusen einen grösseren Flüssigkeitsumsatz hatten und eine gesteigerte Elektrolytausscheidung aufwiesen. Für die Beurteilung der funktionellen renalen Reserve wurde die Hyperfiltration nach Aminosäureinfusion untersucht. Die älteren CD-1-Mäuse hatten eine niedrigere basale GFR und zeigten keine GFR-Steigerung infolge der AS-Infusion. Bei den jungen Tiere nahm die GFR durch AS-Infusion stark zu. Eine gesteigerte Natriumausscheidung und Diurese nach Aminosäuregabe war bei jungen und älteren Tieren zu beobachten, bei den älteren CD-1-Mäusen jedoch nur in abgeschwächter Form. Diese Erkenntnis legt nahe, dass bei Mäusen im Alter die hämodynamischen Veränderungen im Vordergrund stehen, was in einer reduzierten Gesamtzahl an funktionierenden Glomeruli begründet liegen könnte. Der grössere Nierenindex (Verhältnis des Nierenfeuchtgewichts zum Körpergewicht) bei den älteren CD-1-Mäusen könnte Folge einer kompensatorische Hypertrophie der gesamten Niere sein.

Der zweite Teil der Arbeit untersucht die Bedeutung des D_3 -Rezeptors für die renale Hämodynamik und Ausscheidungsfunktion bei D_3 (-/-) Mäusen und Wildtypmäusen. Die Basalwerte der D_3 (-/-) Mäuse in wachem Zustand im Stoffwechselläufig liessen keine Unterschiede gegenüber den Wildtyptieren erkennen. Sie zeigten sogar die Tendenz, mehr Natrium auszuscheiden als die Wildtyptiere. Diese Beobachtung wurde durch weitere Versuche mit einer

oralen NaCl-Beladung von 1% bzw. 4% bestätigt. Auch hier konnte kein Defizit in der Menge und der Geschwindigkeit der Natriumausscheidung bei D_3 knock-out Mäusen gegenüber den Wildtypmäusen beobachtet werden. Im Vergleich zu den Wildtyptieren büssten die D_3 (-/-) Mäuse durch den Verlust des D_3 -Rezeptors ihre Fähigkeit zur suffizienten Elektrolyt- und Volumenausscheidung nicht ein.

Um die Bedeutung des D_3 -Rezeptors für die renale Hämodynamik zu untersuchen, wurde den D_3 (-/-) Mäusen und den Wildtypmäusen in Pentobarbitalnarkose eine 10%-ige Aminosäurelösung infundiert. Es zeigte sich, dass die Wildtyptiere eine starke GFR-Steigerung, Diurese und Natriurese aufwiesen, die von anderen Spezies seit langem bekannt ist. Die D_3 (-/-) Mäuse zeigten im Gegensatz dazu keine Steigerung ihre basalen GFR und Urinausscheidung. Diese Beobachtungen bestätigen eindrucksvoll die aus früheren Experimenten mit D_3 -Antagonisten vermutete Bedeutung des D_3 -Rezeptors für die renale Hämodynamik insbesondere bei der Aminosäurebedingten Hyperfiltration.

Abschließend lässt sich sagen, dass der D_3 -Rezeptor wohl besonders für die renale Hämodynamik von Bedeutung ist, während er für die tubuläre Ausscheidungsfunktion eher sekundär zu sein scheint.

6. ANHANG

6.1 Literaturverzeichnis

Accili D, Fishburn CS, Drago J, Steiner H, LachowiczJE, Park BH, Gauda EB, Lee EJ, Cool MH, Sibley DR, Gerfen CR, Westphal H, Fuchs S: A targeted mutation of the D₃ dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1996; 93: 1945-1949.

Aherne AM, Vaughan CJ, Carey RM, O'Connell DP: Localization of dopamine D1A receptor protein and messenr ribonucleic acid in rat drean cortex. *Endocrinology* 1997; 138: 1282-1288.

Albrecht FE, Drago J, Felder RA, Printz MP, Eisner GM, Robillard JE, Sibley DR, Westphal HJ, Jose PA: Role of the D_{1A} Dopamine Receptor in the Pathogenesis of Genetic Hypertension. *J Clin Invest* 1996; 97: 2283-2288.

Alt JM, Hackbarth H, Deerberg F, Stolte H: Proteinuria in rats in relation to age-dependent renal changes. *Laboratory Animals* 1980; 14: 95-101.

Amenta R: Density and dirstribution of dopamine receptors in the cardiovascular system and in the kidney. *J Auton Pharmacol* 1990; (Suppl.1), s11-s18.

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.

Aperia A, Holtback U, Syren ML, Svensson LB, FryckstedtJ, Greengard P: Activation/deactivation of renal Na/K-ATPase: a final common pathway for regulation of natriuresis. *FASEB J* 1994; 26: 253-259.

Aperia A: Dopamine action and metabolism in the kidney. *Nephrology and Hypertension* 1994; 3: 39-45.

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

Baines AD, Drangova R: Neural but not tubular dopamine increases glomerular filtration rate in perfused rat kidneys. *Am J Physiol* 1986; 250. F674-F679.

Barendregt JN, Muizert Y, von Nispen tot Pannerden LL, Chang PC: Intrarenal production of dopamine and natriuresis following DOPA and saline infusions in healthy human volunteers. *J Hum Hypertens* 1995; 9: 187-194.

Barili P, Ricci A, Baldoni E, Mignini F, Amenta F: Pharmacological characterisation and autoradiographic localisation of a putative dopamine D₃ receptor in the rat kidney. *Eur J Pharmacol* 1997; 29: 89-95.

Bell C, Ferguson M, Petrovic T : Neurochemistry of dopaminergic nerves, in *Peripheral Actions of Dopamine* edited by C Bell, B McGrath, London, Macmillan Press, 1988, 41-45.

Bellomo R, Chapman M, Finfer S, Hickling K, Myburgh J: Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Clinical Trials Group. *Lancet* 2000 Dec 23-30; 356(9248): 2139-43

Berndt TJ, Khraibi AA, Thothathri V, Dousa TP, Tyce GM, Knox FG: Effects of increased dietary phosphate intake on dopamine excretion in the presence and absence of the renal nerves. *Miner Electrolyte Metab* 1994; 20: 158-162.

Berry CA: Renal transport of glucose, aminoacids, sodium, chloride and water. In: Brenner BM und Rector FC (Hrsg.), *The kidney*. 5. Aufl., Saunders, Philadelphia 1996, Kap. 8, S. 334-370.

Bertorello A, Hökfelt T, Goldstein M, Aperia A: Proximal tubule Na/K-ATPase activity is inhibited during salt-intake: evidence for DA-mediated effect. *Am J Physiol* 1988; 254:F795-F801.

Bertorello A, Aperia A, Aperia A: Inhibition of proximal tubule Na⁺-K⁺-ATPase activity requires simultaneous activation fo DA₁ and DA₂ receptors. *Am J Physiol* 1990; 259: F924-F928.

Bosch JP, Saccaggi A, Lauer A, Ronco C, Belledonne M, Glabman S: Renal functional reserve in humans. Effect of protein intake on glomerular filtration rate. *Am J Med* 1983; 75: 943-950.

Brodde OE: Affinities of dopamine agonists and antagonists for peripheral dopamine receptors. In: Hieble JP (Hrsg.): Cardiovascular function of peripheral dopamine receptors. New York 1989, Kap. 2: 27-74.

Brown SA, Navar LG: Single-pephron responses to systemic administration of amino acids in dogs. *Am J Physiol* 1990; 259: F739-F746.

Burgess LH, Monsma FJ, Shen Y, Jose PA, Sibley DR: Further characterization of D_{1A} and D_{1B} dopamine receptors in rat kidney. *Soc Neurosci Abst* 1993 Washington DC. 75.

Burich RL: Effects of age on renal function and enzyme activity in male C57/Bl6 mice. *J Gerontology* 1975; 30: 539-545.

Busse R: Gefäßsystem und Kreislaufregulation. In: Schmidt RF und Thews G (Hrsg.). *Physiologie des Menschen*. 26. Aufl., Springer, Berlin 1995, Kap. 24, S. 498-564.

Cambar J, Toussaint C, Le Moigne F, Cales Pm Crockett R: Circadian rhythms in rat and mouse urinary electrolytes and nitrogen derivatives excretion. *J Physiol (Paris)* 1981 ; 77: 887-890.

Carey RM, Sen S : Recent progress in the control of aldosterone secretion. *Pec Prog Horm Res* 1986; 42: 251-296.

Castellino P, Giordano C, Perna A, DeFronzo RA: Effects of plasma amino acid and hormone levels on renal hemodynamics in humans. *Am J Physiol* 1988; 255: F444-F449.

Crane MG, Harris JJ: Effect of aging on renin activity and aldosterone excretion. *J Lab Clin Med* 1976; 87: 947-959.

Cuche JL, Marchand GR, Greger RF, Lmag F, Knox FG: Possible role of intrarenally produced dopamine in phosphat excretion. *J Clin Invest* 1976; 58: 71-76.

Debska Slizien A, Ho P, Drangova R, Baines AD: Endogenous renal dopamine production regulates phosphate excretion. *Am J Physiol* 1994; 266: F858-F867.

Drieman JC, van Kann FJ, Thijssen HH, von Essen H, Smits JF, Struijker Boudier HA: Regional haemodynamic effects of dopamine and its prodrugs L-dopa and gludopa in the rat and in the glycerol-treated rat as a model for acute renal failure. *Br J Pharmacol* 1994; 111: 1117-1122.

Dunn TB: Renal disease of the mouse. In E. Cotchin & F.J.C. Roe (Eds.) *Pathology of Laboratory rats and mice*. Blackwell Scientific Publications, Philadelphia, PA, 1967.

Dworkin LD, Brenner BM: The renal circulation. In: Brenner BM und Rector FC (Hrsg.) *The kidney*. 5. Aufl., Saunders, Philadelphia 1996, Kap. 6, S. 247-285.

Elema JD, Arends A: Focal and segmental glomerular hyalinosis and sclerosis in the rat. *Lab Invest* 1975; 33: 554-561.

Epstein M, Hollenberg NK: Age as a determinant of renal sodium conservation in normal man. *J Lab Clin Med* 1976; 87:411-417.

Epstein M: Effects of aging on the kidney. *Fed Proc* 1979; 38: 168-172.

Epstein M: Aging and the Kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* 1996; 7: 1106-1122.

Felder CC, McKelvey AM, Gitler MS, Eisner GM, Jose PA: Dopamine receptor subtypes in renal brush border and basolateral membranes. *Kidney Int* 1989a; 36: 183-193.

Felder CC, Campbell T, Jose PA: Role of cAMP on dopamine-1 (DA-1) receptor regulated Na-H antiport in renal tubular brush border membrane vesicles (BBMV). *Kidney Int (Abstract)* 1989b; 35: 172.

Felder RA, Felder CC, Eisner GM, Jose PA: The Dopamine receptor in adult and maturing kidney. *Am J Physiol* 1989; 257: F315-F327.

Fliser D, Zeier M, Nowack R, Ritz E: Renal Functional Reserve in Healthy Elderly Subjects. *J. Am Soc Nephrol* 1993; 3 :1371-1377.

Gao DQ, Canessa LM, Mouradian MM, Jose PA: Expression of the D₂ subfamily of dopamine receptor genes in the kidney. *Am J Physiol* 1994; 266: F646-F650.

Gingrich JA, Caron MG: Recent advances in the molecular pharmacology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16: 299-321.

Goldberg LI: Cardiovascular and renal implications of dopamine: Potential clinical applications. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 1-29.

Goldberg LI, Kohli JD: Peripheral dopamine receptors: A classification based on potency series and specific antagonism. *Trends Tharmacol Sci* 1983; 4(2): 64-66.

Goldstein M, Fuxe K, Hökfelt T: Characterization of tissue localization of catecholamine synthesizing enzymes. *Pharmacol Rev* 1972; 24: 293-308.

Gordon JW, Scoangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH: Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1980; 77: 7380-7384.

Goyal VK: Changes with age in the human kidney. *Exp Gerontol* 1982; 17: 321-331.

Guyton AC: *Arterial Pressure and Hypertension*. WB Saunders Co., Philadelphia. 1980

Hackbarth H, Hackbarth D: Genetic analysis of renal function in mice. 1. Glomerular filtration rate and its correlation with body and kidney weight. *Lab Anim Sci* 1981; 15: 267-272.

Hackbarth H, Hackbarth D: Genetic analysis of renal function in mice. 2. Strain differences in clearances of sodium, potassium, osmolar and free water, and their correlations with body and kidney weight. *Lab Anim Sci* 1982a; 16: 17-32.

Hackbarth H, Harrison DE: Changes in Age in Renal Function and Morphology in C57/BL6, CBA/HT6 and B&CBAF₁ Mice. *J Gerontol* 1982b; 37: 540-547.

Hansell P, Fasching A, Sjöquist M, Andén N-E, Ulfend HR: The dopamine receptor antagonist haloperidol blocks natriuretic but not hypotensive effects of the atrial natriuretic factor. *Acta Physiol Scand* 1987; 130: 401-407.

Hansell P, Fasching A: The effect of dopamine receptor blockade on natriuresis is dependent on the degree of hypervolemia. *Kidney Int* 1991; 39: 253-258.

Hiatt EP, Hiatt RB: The effect of food on the glomerular filtration rate and renal blood flow in the harbor seal (*Phoca Vitulina L.*). *J Cell Comp Physiol* 1942; 19: 221-227.

Hirokawa K: Characterization of age-associated kidney disease in Wistar rats. *Mechanisms of Aging and Development* 1975; 4: 301-316.

Hoffman BB, Lefkowitz RJ: Catecholamines, sympathomimetic drugs, and adrenergic receptor antagonists. In: Hardman JG et al. (Hrsg.) *The pharmacological basis of therapeutics*. 9. Aufl., Pergamon Press, New York 1996, Kap. 10, S. 199-248.

Honrath U, Chong CK, Melo LG, Sonnenberg H: Effect of saline infusion on kidney and collecting duct function in atrial natriuretic peptide (ANP) gene "knockout" mice. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; 77: 454-457.

Hubbard PC, Henderson IW: Renal dopamine and the tubular handling of sodium. *J Mol Endocrinol* 1995; 10: 199-200.

Igarashi Y, Chen YF, Wyss JM, Lindheimer MD; Oparil S: Continuous intravenous infusion of LY171555, a potent selective D2 receptor agonist, lowers blood pressure in the conscious rat. *Pharmacology* 1987; 35: 194-202.

Isaac J, Berndt, Knox FG: Role of dopamine in the exaggerated phosphaturic response to parathyroid hormone in the remnant kidney. *J Lab Clin Med* 1995; 126: 470-473.

Jockenhövel F: Nierenfunktion, Wasser- und Elektrolythaushalt. In: Hick C und Hick A (Hrsg.). *Physiologie*. 2. Aufl., Gustav Fischer, Stuttgart 1997, Kap. 9, S. 191-219.

Jose PA, Asico LD, Eisner MG: Z1046, a novel dopaminergic agonist: Vasodilator and natriuretic and inhibitory of renin secretion. *J Invest Med* 1997; 45: 277A.

Jose PA, Eisner MG, Felder RA: Role of Dopamine in the Pathogenesis of Hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999 ; 26 (Suppl.) 10-13.

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

Kallskog O, March DJ: TGF-initiated vascular interactions between adjacent nephrons in the rat kidney. *Am J Physiol* 1990; 259: F60-F64.

Kellum JA, M Decker J: Use of dopamine in acute renal failure: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2001 Aug; 29(8): 1526-31

Klahr S: The Modification of Diet in Renal Disease Study. *N Engl J Med* 1989; 320: 846-866.

Kohli JD, Goldberg LI: Dopamine receptors: A classification based on physiological studies. In: Creese I, Fraser CM (eds). *Receptor Biochemistry and Methodology: Dopamine Receptors*, Vol. 8. Alan R Liss Inc., New York. 1987; 97-114.

Kulozik AE, Hentze MW, Hagemaiier C, Bartram CR: Molekularmedizinische Methoden, Tiermodelle In: Molekulare Medizin. Walter de Gruyter Verlag; Berlin 2000.

Laduron P, Leysen JE: Domperidone, a specific in vitro dopamine antagonist, devoid of in vivo central dopaminergic activity. *Biochem Pharmacol* 28: 2161-2165.

Lang F, Öttl I, Häussinger D, Deetjen P, Ahloulay M, Bankir L: Renal hemodynamic response to intravenous and oral amino acids in animals. *Semin nephrol* 1995; 15: 415-418.

Lassnigg A, Donner E, Grubhofer G, Prestler E, Druml W, Hiesmayr M: Lack of Renoprotective Effects of Dopamine and Furosemide during Cardiac Surgery. *J Am Soc Nephrol* 2000;11: 97-104

Lee MR: Dopamine and the kidney. *Clin Sci* 1982; 62: 439-448.

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

Levesque D: Aminotetralin drugs and D₃ receptor functions. What my partially selective D₃ receptor ligands tell us about dopamine D₃ receptor functions? *Biochem Pharmacol* 1996; 23: 511-508.

Lew SQ, Bosch JP: Effect of diet on creatinine clearance and excretion in young and elderly healthy subjects and in patients with renal disease. *J Am Soc Nephrol* 1991; 2: 856-865.

Lin MT, Yang JJ: Stimulation of the nigrostriatal dopamine system produces hypertension and tachycardia in rats. *Am J Physiol* 1994; 266: H2489-H2496.

Lokhandwala MF, Amenta F: Anatomical distribution and function of dopamine receptors in the kidney. *FASEB J* 1991; 5: 3023-3030.

Luippold G, Küster E, Joos TO, Mühlbauer B: Dopamine D₃ receptor activation modulates renal function in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; 358: 690-693.

Luippold G, Muehlbauer B: Dopamine D₂ Receptors Medicate Glomeerular Hyperfiltration Due to Amino Acids. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 1248-1252.

Luippold G, Makri S, Osswald H, Mühlbauer B: Role of renal nerves in the dopamine D₃ receptor-induced renal changes in anesthetized rats (Abstract). *Pluegers Arch Eur J Physiol* 1999; 437: R187.

Luippold G, Schneider S, Stefanescu A, Benöhr P, Mühlbauer B: Dopamine D₂-like receptors and amino acid-induced glomerular hyperfiltration in humans. *Blackwell Science Ltd Br J Clin Pharmacol* 2001; 51: 415-421.

Maddox DA, Brenner BM: Glomerular ultrafiltration. In: Brenner BM und Rector FC (Hrsg.). *The Kidney. 5. Aufl.*, Saunders, Philadelphia 1996, Kap.7, S. 286-333.

Matsumoto M, Hidaka K, Tada S, Tasaki Y, Yamaguchi I: Full-length cDNA cloning and redistribution of human dopamine D₄ receptor. *Mol Brain Res* 1995; 29: 157-162.

Mc Lachlan MSF: The aging kidney. *Lancet* 1978; 2: 143-145.

Mellars RC: Autoimmune disease in NZB/BL mice. Pathology and pathogenesis of spontaneous glomerulonephritis. *J Exp Med* 1965; 122: 24-40.

Melo LG, Veress AT, Chong CK, Ackermann U, Sonnenberg H: Salt-sensitive hypertension in ANP knockout mice is prevented by AT₁ receptor antagonist losartan. *Am J Physiol* 1999; 277: R624-R630.

Mendez RE, Lopez R, Lopez G, Marti MS, Martinez-Maldonado M: Effects of dopamine-receptor antagonists and renal denervation on amino acid-induced hyperfiltration. *Am J Physiol* 1991; 261: F70-F75.

Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J: Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol* 2000; 476: F339-F351.

Meyer MB, Mc Nay JL, Goldberg LI: Effects of dopamine on renal function and hemodynamics in the dog. *J Pharmacol Exp Ther* 1967; 156: 186-192.

Meyer TW, Ichikawa I, Zatz R, Brenner BM: The renal hemodynamic response to amino acid infusion in the rat. *Trans Assoc Am Physicians* 1983; 251: F132-F140.

- Mühlbauer B**, Osswald H: Urinary dopamine excretion in conscious rats: Effects of carbidopa in different states of sodium balance. *Renal Physiol Biochem* 1993; 16: 117-124.
- Mühlbauer B**, Hartenburg E, Osswald H: Renal response to aminoacid infusion in rats: Effect of dopamine antagonists and benserazide. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1994; 349: 244-249.
- Mühlbauer B**: Die therapeutische Wirksamkeit von Dopamin bei akutem Nierenversagen. *Anaesthetist* 1996; 45: 657-696.
- Mühlbauer B**, Spöhr F, Schmidt R, Osswald H: Role of renal nerves and endogenous dopamine in amino acid-induced glomerular hyperfiltration. *Am J Physiol* 1997b; 273: F144-F149.
- Mühlbauer B**, Küster E, Luippold G: Dopamine D₃ receptors in the rat kidney: role in physiology and pathophysiology. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 219-223.
- Murakami M**, Suzuki H, Ichihara A, Naitoh M, Nakamoto H, Saruta T: Effects of L-arginine on systemic and renal hemodynamics in conscious dogs. *Clin Sci* 1991; 81: 727-732.
- Nagahama S**, Chen YF, Lindheimer MD, Oparil L: Mechanism of the pressor action of LY171555, a specific dopamine D₂ receptor agonist, in the conscious rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236: 735-742.
- Neuhaus OW**, Flory W: The effect of dietary protein on the excretion of α the sex dependent protein of the male rat. *Biochimica Biophysica Acta* 1975; 411: 74-86.
- Nowicki S**, Levin G, Enero MA: Involvement of renal dopamine synthesis in the diuretic effect of furosemide in normohydrated rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 264:1377-1380.
- O'Connell DP**, Botkin SJ, Ramos SI, Sibley DR, Ariano MA, Felder RA, Cary RM: Localisation of dopamine D_{1A} receptor protein in rat kidneys. *Am J Physiol* 1995; 268: F1185-F1197.
- O'Connell DP**, Vaughan CJ, Aherne AM: Expression of the dopamine D₃ receptor protein in the rat kidney. *Hypertension* 1998; 32: 886-895.
- Ohlsen NV**, Hansen JM, Ladefoged SD, Fogh-Andersen N, Leyssac PP: Renal tubular reabsorption of sodium and water during infusion of low-dose dopamine in normal man. *Clin Sci* 1990; 78: 503-507.
- Pawlik W**, Mailman D, Shanbour LL, Jacobson ED: Dopamine effects on the intestinal circulation. *Am Heart J* 1976; 91: 325-331.

-
- Petrides PE:** Nervengewebe. In: Löffler G und Petrides P (Hrsg.). Physiologische Chemie. 4. Aufl., Springer, Berlin 1990, Kap. 33, S. 909-926.
- Pittman QJ,** Lawrence D, Lederis K: Presynaptic interaction in the neurohypophysis: Endogenous modulators of release, in: *Neurohypophysis: Structure, Function and Control*, edited by Cross, G Leng, Amsterdam; Elsevier, 1983, 319-332.
- Premen AJ,** Hall JE, Smith MJJ: Postprandial regulation of renal hemodynamics: role of pancreatic glucagon. *Am J Physiol* 1985; 248: F656-F662.
- Premen AJ:** Nature of the renal hemodynamic action of amino acids in dogs. *Am J Physiol* 1989; 256: F516-F523.
- Pullmann TN,** Alving AS, Dern RJ, Landowne M: The influence of dietary protein intake on specific renal functions in normal man. *J Lab Clin Med* 1954; 44: 320-332.
- Puschett JB,** Winaver J: Effects of diuretics on renal function. In: Windhager EE (Hrsg.). *Handbook of Physiology (8): Renal Physiology*. Oxford University Press, New York 1992, Kap. 50, S. 2335-2406.
- Racke K,** Meuresch K, Trapp B, Muscholl E: Modulation by fenoldopam (SKF82526) and bromocriptine of the electrically evoked release of vasopressin from the rat neurohypophysis. Effects of dopamine depletion. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1986; 332: 332-337.
- Robinson SW,** Caron MG: Selective Inhibition of Adenylyl Cyclase Type V by the Dopamine D₃ Receptor. *Mol Pharmacol* 1997; 52: 508-514.
- Rowe JW,** Shock NW, DeFronzo RA: The influence of age on the renal response to water deprivation in man. *Nephron* 1976; 17: 270-278.
- Ruilope LM,** Rodicio J, Garcia-Robles R: Influence of a low sodium diet on the renal response to amino acid infusions in humans. *Kidney Int* 1987; 31: 992-999.
- Rump LC,** Schwertfeger E, Schuster MJ, Schaible U, Frankenschmidt A, Schollmeyer PJ: Dopamine DA₂-Receptor Activation Inhibits Noradrenaline Release in Human Kidney Slices. *Kidney Int* 1993; 43: 197-204.
- Sanada H,** Yao L, Jose PA, Carey RM, Felder RA: Dopamine D₃ receptors in juxtaglomerular cells. *Clin Exp Hypertens* 1997; 19: 93-105.
- Schlager G:** Systolic blood pressure in eight inbred strains of mice. *Nature* 1966; 212: 519-520.

Schlager G: Kidney weight in mice: in strain differences and genetic determination. *J Hered* 1968; 59: 171-174.

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

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

Seri I, Aperia A: Contribution of dopamine₂ receptors to dopamine-induced increase in glomerular filtration rate. *Am J Physiol* 1988; 254: F196-F201.

Seri I, Kone BC, Gullans SR, Aperia A, Brenner BM, Ballermann BJ: Influence of Na⁺ intake on dopamine-induced inhibition of renal cortical Na(+)-K(+)-ATPase. *Am J Physiol* 1990; 258: F52-F60.

Shannon JA, Jolliffe N, Simith HW: The excretion of urine in the dog. IV. The effect of maintenance diet, feeding, etc., upon the quantity of glomerular filtrate. *Am J Physiol* 1932; 101: 625-638.

Sheikh-Hamad D, Wang Y-P, Jo OOD, Yanagawa N: Dopamine Antagonizes the Actions of Angiotensin II in Renal Brush-Border Membrane. *Am J Physiol* 1993; 264: F737-F743.

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

Soares-Da-Silva P : A Study on the Neuronal and Non-neuronal Stores of Dopamine in Rat and Rabbit Kidney. *Pharmacol Res* 1992; 26: 161-171.

Sokoloff P, Giros B, Martes M-P, Bouthenet M-L, Schwartz J-C: Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990; 347: 146-151.

Takazakura E, Sawabu N, Handa A, Takada A, Schinoda A, Takeuchi J: Intrarenal vascular changes with age and disease. *Kidney Int* 1972; 2: 224-230.

Tauchi H, Tsuboi K, Okutomi J: Age changes in the human kidney of the different races. *Gerontologia (Basel)* 1971; 17: 87-97.

Ter Wee PM, Rosman JB, von derGeest S, Sluiter WJ, Donker AJM: Renal hemodynamics during separate and combined infusion of amino acids and dopamine. *Kidney Int* 29: 870-874.

Tolins JP, Raj L: Effects of amino acid infusion on renal hemodynamics: role of endothelium-derived relaxing factor. *Hypertension* 1991; 17: 1045-1051.

Tong Wang, Courtois-Coutry N, Giebisch G, Caplan MJ: Atyrosine-based signal regulates H-K-ATPase-mediated potassium reabsorption in the kidney. *Am J Physiol* 1998; 275: F818-F826.

Traynor TR, Schnermann J: Renin-Angiotensin System Dependence of Renal Hemodynamics in Mice. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10: S184-S188.

Vanreenterghem YF, Verberckmoes RK, Roels LM, Michielsen PJ: Role of prostaglandins in protein-induced glomerular hyperfiltration in normal humans. *Am J Physiol* 1988; 254: F463-F469.

Veress AT, Chong CK, Field LJ, Sonnenberg H: Blood pressure and fluid-electrolyte balance in ANF-transgenic mice on high-and low-salt diets. *Am J Physiol* 1995; 269: R186-R198.

Verzár F, Hugin F: Einfluss des Alters auf die Entwicklung der Arbeitshypertrophie von Organen. *Acta Anatomica* 1957, 30: 918-927.

Waters N, Svensson K, Haadsma-Svensson SR, Smith MW, Carlsson A: The dopamine D₃-receptor: postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J Neural Transm Gen Sect* 1993; 94: 11-19.

Weidmann P, Demyttenaere-Bursztein S, Maxwell MH, DeLima J: Effect of aging on plasma renin and aldosterone in normal man. *Kidney Int* 1975; 8: 325-333.

Wheeler DC, Cosgriff PS, Bennett SE, Walls J: Measurement of renal functional reserve of the single kidney in man. *Clin Nephrol* 1987; 28: 87-92.

Whitfield L, Sowers JR, Tuck ML, Golub MS: Dopamine in control of plasma catecholamine and aldosterone responses in acute stimuli in man. *J Clin Endocrinol Metab* 1989; 51: 724-729.

Williams BV, Eglen AM, Duncan FM, Edwards CR: The effect of sodium intake on the renin response to dopamine in superfused rat renal cortical cells. *J Hypertens* 1985; 3: 267-268.

Woods LL: Mechanisms of renal hemodynamic regulation in response to protein feeding. *Kidney Int* 1993a; 44: 659-675.

Woods LL: Mechanisms of renal vasodilation after protein feeding: role of the renin-angiotensin system. *Am J Physiol* 1993b; 264: R601-R609.

Yamaguchi I, Yao L, Sanado H: Characterization of dopamine D_{1A} receptors in rat juxtaglomerular cells. *Hypertension* 1997; 29: 962-968.

DANKSAGUNG

Ich danke Herrn **Prof. Dr. H. Oßwald** für die Ermöglichung der Arbeit am Pharmakologischen Institut der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen.

Besonderer Dank gilt Herrn **Prof. Dr. B. Mühlbauer** für die Überlassung des Themas und seine engagierte, fachkundige und kontinuierliche Betreuung. Er hat mit seinem wissenschaftlichen Enthusiasmus entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ganz herzliche danke ich Herrn **Dr. G. Luippold** für seinen unermüdlichen Beistand während der praktischen Arbeit und der schriftlichen Ausarbeitung. Darüber hinaus danke ich Frau **Dr. S. Schneider** für ihre zahlreichen fachkundigen Ratschläge und menschliche Unterstützung. Frau **Christine Piesch** danke ich für die Einführung in die Laborarbeit und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe.

LEBENS LAUF

Bärbel Susanne Pech

Klosterstr. 29

72793 Pfullingen

- 10.07.75 geboren in Reutlingen als Tochter von Helga Pech, geb. Settgast und Dr. med. Dr. rer. nat. Hans Pech
- 1982 - 1984 Gottlieb-Rühle-Grundschule Mössingen
- 1984 - 1986 Uhland Grundschule Pfullingen
- 1986 - 1992 Wilhelm-Hauff-Realschule Pfullingen
- 1992 - 1995 Laura-Schradin-Schule,
Ernährungswissenschaftliches Gymnasium Reutlingen
- 1995 Allgemeine Hochschulreife
- 8/1995 – 7/1996 Sprachstudien in Sydney, Australien
- 9/1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhardt-Karls-Universität, Tübingen
- 9/1998 Ärztliche Vorprüfung
- 9/1999 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 4/2002 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
- 5/2003 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung