

Aus dem Institut für Pharmakologie der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

Die Bedeutung des renalen D₃-Rezeptors für die Vermittlung der pathologischen diabetischen Hyperfiltration

INAUGURAL – DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Jens-Michael Tappe
aus Mutlangen

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen
1.Berichterstatter: Professor Dr. B. Mühlbauer
2.Berichterstatter: Professor Dr. T. Risler

Den Mäusen gewidmet

Inhalt

1. Einleitung

1.1. Gegenstand der Arbeit	1
1.2. Grundlagen	1
1.2.1. Die Niere: Nephron und GFR	1
1.2.2. Diabetes mellitus	5
1.2.3. Diabetische Nephropathie	7
1.3. Bisheriger Wissensstand	9
1.3.1. Struktur und Stoffwechsel des Dopamins	9
1.3.2. Funktion von Dopamin im Organismus	10
1.3.3. Dopaminrezeptoren	12
1.3.4. Der Dopamin D ₃ -Rezeptor	14
1.3.5. Beteiligung des D ₃ -Rezeptors an der Steuerung des Salz- und Volumenhaushaltes	16
1.3.6. Beteiligung des D ₃ -Rezeptors an der Vermittlung der diabetischen Hyperfiltration	17
1.4. Eigene Fragestellung	18

2. Materialien und Methoden

2.1.	Versuchstiere	19
2.1.1.	Erzeugung von D ₃ (-/-) Tieren	19
2.1.2.	Haltungsbedingungen	20
2.2.	Versuchsgruppen	21
2.2.1.	Diabetes mellitus bei Mäusen	21
2.2.2.	Hochsalzernährung	22
2.2.3.	Volumenbelastung/Volumenexpansion	22
2.2.4.	Zusammenfassung der Gruppen	22
2.3.	Versuchsdurchführung	24
2.3.1.	Stoffwechselläufigversuche mit wachen Mäusen	24
2.3.1.1.	Stoffwechselläufige	24
2.3.1.2.	Ablauf der Versuche zur Volumenbelastung	24
2.3.1.3.	Ablauf der Versuche mit diabetischen Tieren	25
2.3.1.4.	Probengewinnung und -behandlung	25
2.3.2.	Clearanceversuch an narkotisierten Mäusen	25
2.3.2.1.	Narkose	25
2.3.2.2.	Präparation	25
2.3.2.3.	Infusion	27
2.3.3.	Ablauf der Experimente	28
2.3.3.1.	Probenentnahme	29
2.3.3.2.	Nierenentnahme	29
2.3.3.3.	Probenbehandlung	30
2.3.4.	Retrobulbäre Blutentnahme zur Blutglucosebestimmung	30
2.4.	Analytik	31
2.4.1.	Analysierte Parameter	31
2.4.2.	Gewichte und Volumina	31
2.4.3.	Elektrolytkonzentrationen von Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻	32
2.4.4.	Glucosemessung	32
2.4.5.	Osmolalitätsmessung	33
2.4.6.	Systolischer und diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz	33
2.4.7.	Hämatokrit	33
2.4.8.	[³ H]-Aktivität in Plasma und Urin	33
2.5.	Berechnungen	34
2.5.1.	Mittlerer arterieller Blutdruck	34
2.5.2.	Urinzeitvolumen	34
2.5.2.	Glomeruläre Filtrationsrate	34
2.5.3.	Absolute renale Exkretion von Na ⁺ , K ⁺ und C ⁻	35
2.5.4.	Fraktionelle Natriumexkretion der Niere	35
2.6.	Statistik	36

3. Ergebnisse

3.1. Orale Volumenbelastung und parenterale Volumenexpansion (VE)	37
3.1.1. Stoffwechselläufigversuche mit wachen Mäusen	37
3.1.2. Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen	40
3.2. Diabetes mellitus (DM)	46
3.2.1. Stoffwechselläufigversuche mit wachen Mäusen	46
3.2.2. Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen	49
3.2.3. Nierengewicht und Nierenindex	54

4. Diskussion

4.1. D ₃ (-/-) und Salzretention	55
4.2. D ₃ (-/-) und Hypertonie	58
4.3. Volumenexpansion	60
4.4. Diabetes mellitus	63
4.4.1. Diabetesmodell mit Streptozotocin (STZ)	63
4.4.2. Nierengewicht und Nierenindex	64
4.4.3. Diabetische Hyperfiltration	65
4.5. Schlußfolgerungen aus der vorliegenden Arbeit	71
4.6. Ausblick und klinische Implikation	72

5. Zusammenfassung 73

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis	75
6.2. Glossar verwendeter Abkürzungen	84

1. Einleitung

1.1. Gegenstand der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Bedeutung des renalen Dopamin D₃-Rezeptors für die Vermittlung der pathologischen Hyperfiltration der diabetischen Nephropathie. Unter diesem Aspekt wurde weiterhin die Beteiligung des Dopamin D₃-Rezeptors an der Steuerung des renalen Salz- und Volumenhaushaltes untersucht. Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden an wachen sowie narkotisierten Mäusen durchgeführt. Die Versuchsgruppen bestanden aus Dopamin D₃-Rezeptor Knockout Mäusen und Wildtypmäusen als Kontrollgruppen.

1.2. Grundlagen

1.2.1. Die Niere: Nephron und GFR

Die menschliche Niere besteht aus 1-2 Millionen Nephronen, die die kleinsten Funktionseinheiten der Niere darstellen. Über die Vasa afferentia gelangen rund 1,2 Liter Blut pro Minute zu den Glomerula, welche aus Kapillarkonvoluten bestehen, die in den sogenannten Bowmanschen Kapseln gelagert sind. Die Kapillaren des Glomerulums sind von innen mit Endothel ausgekleidet und außen von einer Basalmembran umgeben. Sie werden von speziellen Zellen, den Podozyten, bedeckt, die mit ihren fußförmigen Zytoplasmaausläufern den Kapillarschlingen aufsitzen. Zwischen den Kapillaren befinden sich Mesangiumzellen, die unter anderem an der Regulation der Filtration beteiligt sind. Im Glomerulum findet die Ultrafiltration statt. Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) wird durch folgende Determinanten bestimmt:

- 1) Die hydraulische Leitfähigkeit (\cong Filtrationskoeffizient, die vergleichsweise hohe Wasserdurchlässigkeit des Endothels)

- 2) Die Filterfläche
- 3) Den effektiven Filtrationsdruck (der Druckunterschied zwischen Kapillarlumen und der Harnseite des Filters, incl. osmotischem Druck)

Das Ultrafiltrat gelangt am Harnpol in den proximalen Tubulus, in dem je 60% des filtrierte Wassers und Natriums sowie 50% des filtrierte Chlorids rückresorbiert werden. Außerdem werden hier 95% der filtrierte Glucose zurückgewonnen. Über den intermediären Tubulus gelangt das Filtrat in die Henlesche Schleife, wo weitere 25% des Wassers und 30% des Natriums rückresorbiert werden. Ein Gegenstromprinzip erzeugt einen osmotischen Gradienten, der die Harnkonzentrierung im Sammelrohr ermöglicht. So kann die Niere je nach Wasseraufnahme zwischen 0,3% und 20% des Filtrates ausscheiden. An die Henlesche Schleife schließt sich der distale Tubulus an, in dessen Tubulussystem spezialisierte Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zum Glomerulum desselben Nephrons liegen. Diese Stelle wird Macula densa genannt. Sie gehört zusammen mit der afferenten sowie efferenten Arteriole und den reninspeichernden epitheloiden Zellen zum juxtaglomerulären Apparat. Kommen an der Macula densa hohe Mengen von NaCl an, wird die GFR dieses Nephrons gedrosselt. Bei einer Schädigung des proximalen Tubulussystem (in dem der Großteil des NaCl rückresorbiert werden sollte) wird so ein inadäquater Salzverlust vermieden. Dieser Mechanismus wird tubulo-glomerulärer Feedback (TGF) genannt [Silbernagl 1994]. Danach gelangt der Harn über einen Verbindungs-tubulus in das Sammelrohr und wird abgeleitet. In diesem letzten Abschnitt wird unter hormonaler Kontrolle (Adiuretin für Wasser und Aldosteron für Natrium) die Zusammensetzung des Endurins reguliert.

Außerdem steigt beim Absinken der Natriumbeladung an der Macula densa die Reninsekretion der epitheloiden Zellen. Dies führt zu einer erhöhten Aktivität von Angiotensin II und Aldosteron, wodurch unter anderem die Natriumrückresorption stimuliert wird. So wird der Natriumgehalt des Körpers erhöht.

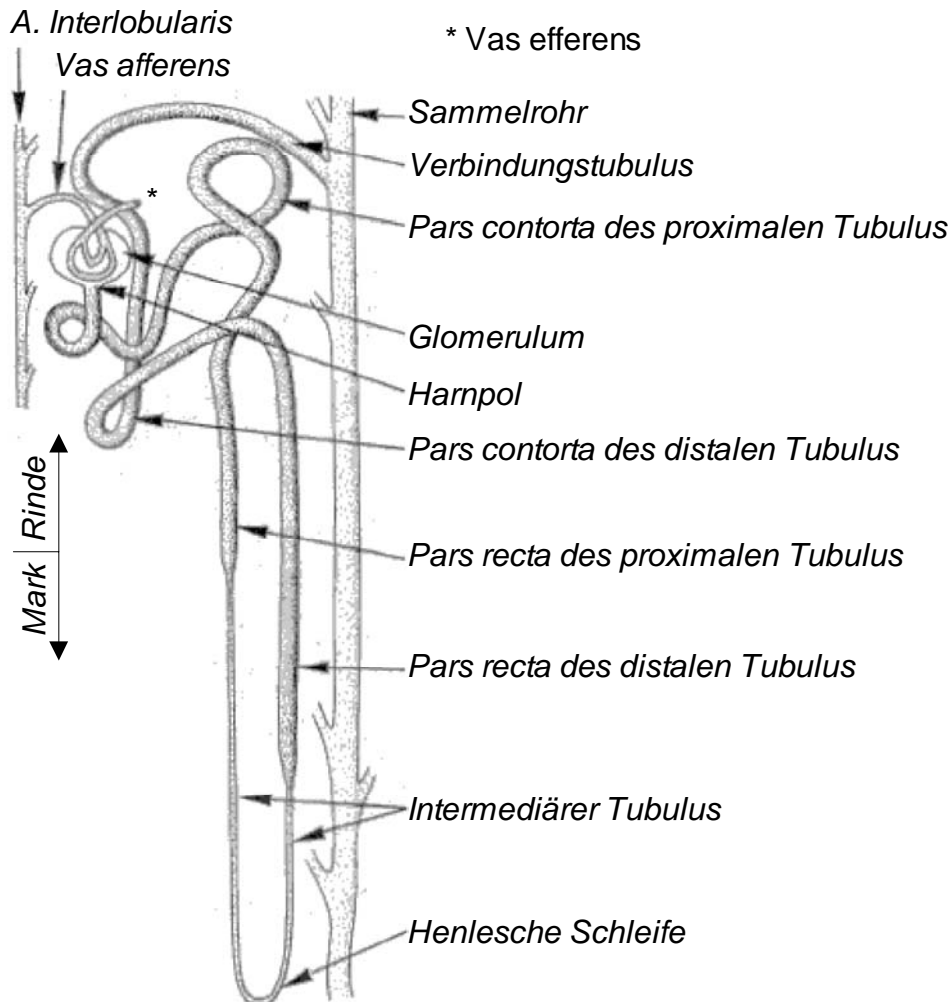


Abbildung 1: Nephron. Von der A. interlobularis aus erreicht das Blut das Glomerulum über das Vas afferens am Gefäßpol. Das Blut verlässt das Glomerulum über das Vas efferens. Auf der gegenüberliegenden Seite befindet sich der Harnpol. Der proximale Tubulus führt zur Henlesche Schleife, die bis in das Nierenmark hinabreicht. Der distale Tubulus mündet über einen Verbindungstubulus in ein Sammelrohr. Proximaler und distaler Tubulus teilen sich in je einen gewundenen Teil (pars contorta) und einen auf- bzw. absteigenden Teil (pars recta) ein.

Abbildungen 1-3 modifiziert nach Moll, Moll: Anatomie, Jungjohann Verlag

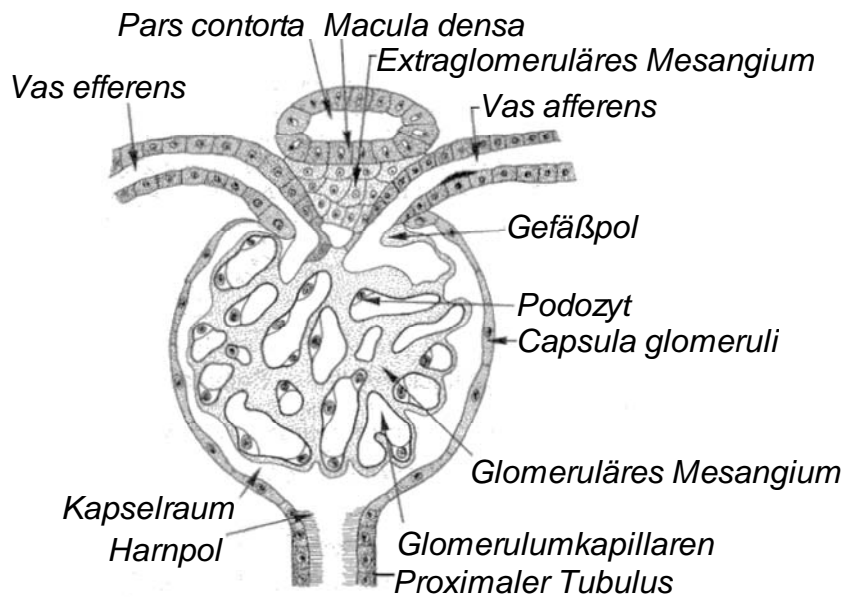


Abbildung 2: Schnitt durch ein Glomerulum mit Kapsel. Zwischen Vas afferens und efferens verzweigt sich ein Netz aus Glomerulumkapillaren. Der Kapselraum vereinigt sich am Harnpol zum proximalen Tubulus.

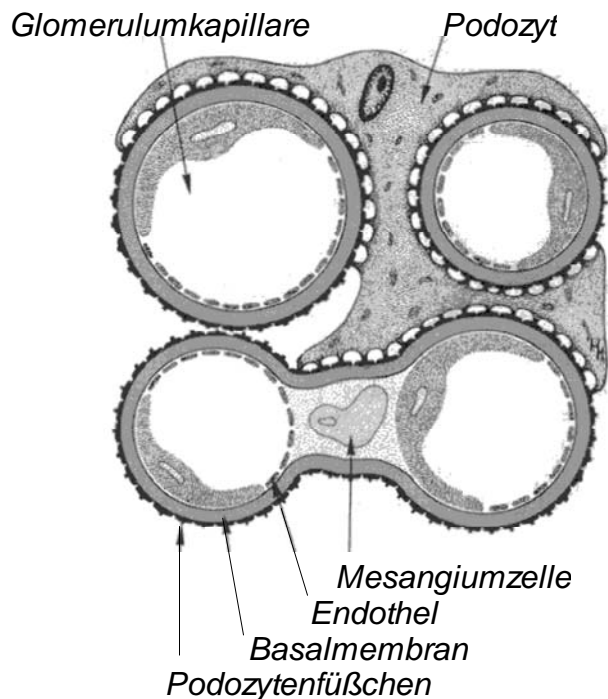


Abbildung 3: Schnitt durch Glomerulumkapillaren. Zwischen den Kapillaren befinden sich glomeruläre Mesangiumzellen. Dieses System ist von Podozyten mit ihren fußförmigen Zytoplasmaausläufern umgeben.

1.2.2. Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus ist mit einer Prävalenz von circa 1% die häufigste endokrine Störung der Industrienationen. Es wird zwischen einem Typ I, der ungefähr 20% aller Fälle ausmacht, und einem Typ II unterschieden.

Der Diabetes mellitus Typ I ist durch absoluten Insulinmangel gekennzeichnet. Ursache ist ein Untergang der Pankreasinseln. Es wird zwischen einem Typ Ia, der praktisch nur im Kindesalter auftritt, und einem Typ Ib des Erwachsenenalters (bis zum 35. Lj.) unterschieden. Ätiologisch wird für den Typ Ia eine virale Genese diskutiert, wogegen sich beim Typ Ib häufig Inselzellantikörper im Serum finden (genetische Prädisposition).

Der Diabetes mellitus Typ II tritt meist im höheren Lebensalter auf und ist durch einen relativen Insulinmangel gekennzeichnet. Die Minderheit der Patienten sind normalgewichtig (Typ IIa), die meisten sind übergewichtig (Typ IIb). Hier geht eine herabgesetzte Insulinempfindlichkeit des Gewebes mit einer erniedrigten, erhaltenen oder sogar erhöhten Insulinsekretion einher. Folge ist aber immer der relative Insulinmangelzustand. Ätiologisch werden ebenfalls genetische Ursachen diskutiert, jedoch stehen die Lebensgewohnheiten des Patienten im Vordergrund.

Der absolute oder relative Insulinmangel führt zu Veränderungen im Kohlenhydrat-, Lipid-, und Proteinstoffwechsel. Daraus resultieren Hyperglykämie, Hyperlipidämie sowie die Steigerung des Protein- und Lipidabbaus. Die erhöhte Glucosekonzentration im Blut führt zu einer erhöhten Konzentration von Glucose im Ultrafiltrat und weiter zu einer Überlastung der Rückresorptionsmechanismen im proximalen Tubulussystem. Es entsteht eine Glucosurie, die aus osmotischen Gründen eine Polyurie, die wiederum eine Polydipsie nach sich zieht. An morphologischen Veränderungen ist nach langjähriger Erkrankung eine Makro- und Mikroangiopathie zu beobachten, die sich in besonderer Weise am Auge (Retinopathie), den Nerven (Neuropathie) und an der Niere (Nephropathie) manifestiert. Diese Veränderungen führen zu weiteren Problemen, wie z.B. Wundheilungsstörungen oder pAVK.

Besonderes Augenmerk soll in der vorliegenden Arbeit auf die diabetische Hyperfiltration gelegt werden. Obwohl schon seit 1952 bekannt [Fiaschi 1952], und seitdem Gegenstand intensiver Forschung, konnte der Pathomechanismus, der zur Erhöhung der GFR beim Diabetes mellitus führt, noch nicht eindeutig geklärt werden. Die verschiedenen möglichen Mechanismen werden in Kapitel 4.4.3. *Diabetische Hyperfiltration* diskutiert.

Tatsache ist, dass sich bei 25-50% der Typ I-Diabetiker eine Hyperfiltration feststellen lässt [Ibrahim 1997], manche Autoren sprechen sogar davon, dass 100% aller Typ I-Diabetiker erhöhte GFR-Werte aufweisen [Rosenstock 1986]. Diese Hyperfiltration ist nach Meinung einiger Autoren [Mogensen 1986, Rudberg 1992] ein Frühzeichen für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie – andere Autoren dagegen bestreiten dies [Lerwang 1988, Jones 1991]. Ein deutlicher Hinweis auf das Risiko einer späteren Manifestation einer diabetischen Nephropathie scheint außerdem eine initial geringfügige Erhöhung der renalen Albuminausscheidung zu sein. [Mogensen 1984].

1.2.3. Diabetische Nephropathie

Der Diabetes mellitus ist mit 43% die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz. Hiervon geht wiederum 25% zu Lasten des Diabetes Typ I, obwohl dieser Typ nur einen Anteil von 10% unter allen Diabetikern ausmacht.

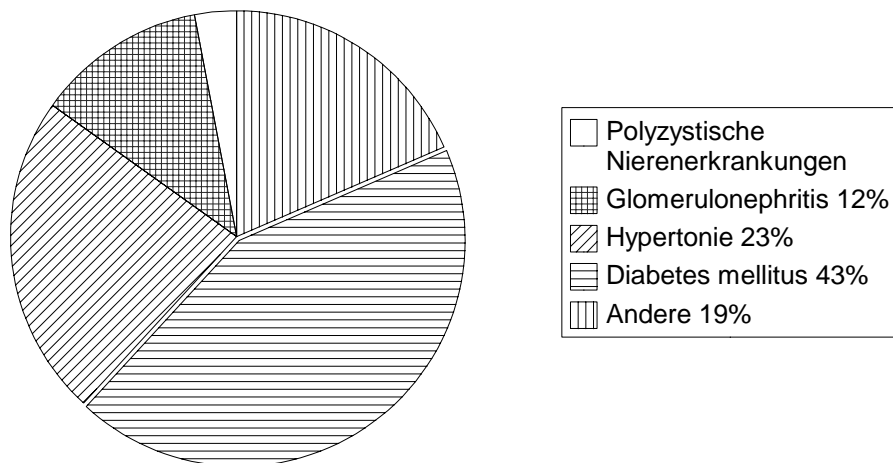


Abbildung 4: Prozentuale Ursachen der terminalen Niereninsuffizienz. [NIDDK 2001]

Circa 35-40% aller Typ I-Diabetiker entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung eine diabetische Nephropathie [O'Donnell 1988, Jones 1995]. Die Krankheit lässt sich in fünf Stadien einteilen:

1. Diagnose des Diabetes mellitus. Die GFR ist erhöht (frühe diabetische Hyperfiltration). Die Nieren hypertrophieren.
2. Klinisch stumme Phase. Die GFR ist immer noch erhöht. Weiterhin kommt es zu morphologischen Veränderungen, wie Verdickung der Basalmembran und Vergrößerung des Mesangiums. Teilweise ist schon zu diesem Zeitpunkt eine Mikroalbuminurie zu beobachten.
3. Beginnende Nephropathie. Die GFR fällt auf Normalniveau, außerdem kommt es zu erhöhten Blutdruckwerten und zu einer deutlichen Mikroalbuminurie.
4. Manifeste Nephropathie. Kennzeichnend ist eine erniedrigte GFR und eine

Makroalbuminurie, letztere ist jetzt mit routinemäßig eingesetzten Urinsticks festzustellen. Klinisch kann sich dieses Stadium außerdem durch Ödeme und eine arterielle Hypertonie äußern.

5. Endstadium. Progredienter Nierenfunktionsverlust kann eine Abnahme der GFR bis zu 3% pro Monat bedeuten. Es kommt zur Urämie, die Dialysepflichtigkeit nach sich zieht. Terminale Niereninsuffizienz mit Zusammenbruch der exkretorischen und endokrinen Funktionen der Niere markieren den Endzustand. Es finden sich Veränderungen im Sinne einer diffusen nodulären Glomerulosklerose, charakterisiert durch Mesangiumvergrößerung [Ibrahim 1997, Seyer-Hansen 1980] und Basalmembranverbreiterung [Ibrahim 1997, Österby 1980]

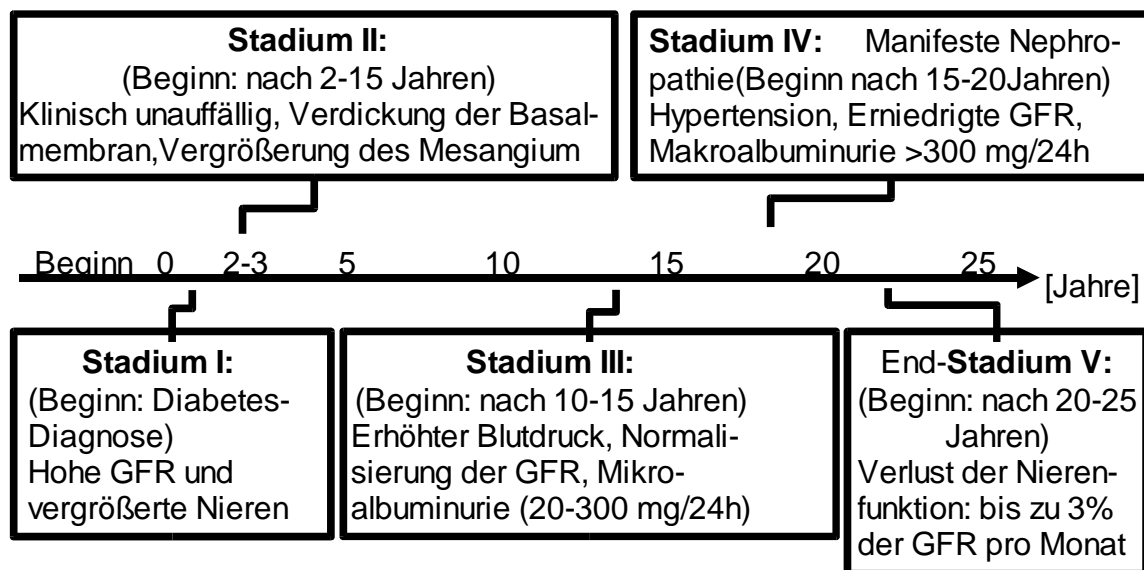


Abbildung 5: Die Stadien der diabetischen Nephropathie. Circa 35% aller Typ I-Diabetiker entwickeln eine Nephropathie. Die angegebenen Jahreszahlen sind Anhaltswerte. Abbildung modifiziert nach [The Nephron Information Center 2001]

Eine große Rolle für die Geschwindigkeit, mit der sich die Nephropathie entwickelt, spielt die Stoffwechselkontrolle der Diabetiker [Ibrahim 1997, Mogensen 1997]. Eine prospektive Studie über 12 Jahre konnte zeigen, dass optimale Blutzuckerkontrolle die Mikroalbuminrate der Patienten um 30% ver-

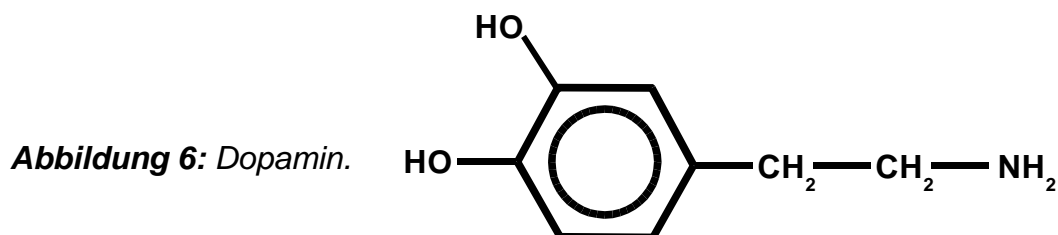
ringert [UKPDSG 1998]. Neben der Güte der Stoffwechselkontrolle spielt auch der Blutdruck eine Rolle für das Auftreten der Nephropathie. Neuere Empfehlungen für Diabetiker propagieren einen Zielblutdruck unterhalb 130/80 mmHg, um das Risiko für eine Mikroalbumie zu minimieren [Bakris 2001].

Die diabetische Nephropathie mit terminaler Niereninsuffizienz setzt die Lebensqualität sowie die Lebenserwartung der Erkrankten erheblich herab [Borch-Johnsen 1985] und verursacht hohe Kosten: Durchschnittlich 50.000 € kostet die jährliche Behandlung eines Dialyse-Patienten [Kobrin 1998].

1.3. Bisheriger Wissensstand über Dopamin

1.3.1. Struktur und Stoffwechsel des Dopamins

Das biogene Amin Dopamin wird aus den Aminosäuren Phenylalanin oder Tyrosin im Zytoplasma dopaminerner Nervenendigungen des ZNS, im Nebennierenmark sowie in der Niere selbst gebildet. Durch die Phenylalaninhydroxylase wird aus Phenylalanin enzymatisch Tyrosin gebildet. Tyrosin wird nun durch die Tyrosin-3-Monooxygenase zu DOPA hydroxyliert, aus welchem durch Dekarboxylierung Dopamin entsteht. Letzteres geschieht durch das Enzym Dopa-Decarboxylase ($\hat{=}$ aromatic L-amino acid decarboxylase, AADC). Durch Hydroxylierung einer Seitenkette entsteht durch die Dopamin- β -Monooxygenase aus Dopamin Noradrenalin, welches zu Adrenalin durch N-Methylierung umgewandelt wird (N-Methyltransferase) [Koolman 1998]. Dopamin gehört somit zu der Klasse der Katecholamine.



Das gebildete Dopamin wird – wie Adrenalin und Noradrenalin – in Vesikeln gespeichert und nach calciumvermittelter Depolarisation in den synaptischen Spalt ausgeschüttet. Die Inaktivierung erfolgt durch präsynaptische Wiederaufnahme durch organische Transporter oder durch Abbau mittels der Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Hauptabbauprodukt ist die 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure (Vanillinmandelsäure), die letztlich ausgeschieden wird [Buddecke 1994].

Renales Dopamin wird folgendermaßen synthetisiert: Zirkulierendes L-DOPA wird glomerulär filtriert und ins Zytoplasma proximaler aber auch distaler Tubuluszellen aufgenommen. In der Niere erfolgt der letzte Schritt der Synthese [Lee 1982]. Die AADC, die in Tubuluszellen starke Aktivität aufweist [Hayashi 1991], decarboxyliert L-DOPA zu Dopamin [Goldstein 1972, Bertorello 1988].

1.3.2. Funktion von Dopamin im Organismus

ZNS. Im zentralen Nervensystem spielen dopaminerge Systeme eine große Rolle. Neben seiner Rolle als Vorstufe von (Nor-)Adrenalin hat es als endogenes Katecholamin Bedeutung als Neurotransmitter. Überaktivität der mesolimbischen dopaminergen Projektionen sind an der Entstehung von psychiatrischen Erkrankungen, wie z.B. Schizophrenie [Trepel 1995] oder Depression [Dikeos 1999] beteiligt. Andererseits führt ein Untergang der dopaminergen Zellen der Substantia nigra zum klinischen Bild des Morbus Parkinson [Trepel 1995]. Außerdem werden Dopamin als Neurotransmitter Einflüsse auf kognitive, emotionale, motorische (Akinese) und reflektorische (Brechzentrum) Funktionen, auf Erregungsleitung, Hormonsynthese sowie Hormonfreisetzung (Prolactinhemmung), Blutdruck und Ionenfluss zugeschrieben [Missale 1998, Jose 1992].

Peripherie. Dopamin ist an der Modulation der Darmmotorik und -durchblutung beteiligt. Über Stimulation der β_1 -adrenergen und in höheren Dosen auch über α_1 -adrenerge Rezeptoren entfaltet Dopamin auch kardiovaskuläre Wirkungen.

Niere. Dopamin (DA) soll an der Steuerung des Flüssigkeits- und Elektrolythaushaltes beteiligt sein, indem es Einfluss auf den epithelialen Transport und auf die renale Hämodynamik ausübt. Nach Infusion von DA wurde eine dosisabhängige Erhöhung des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate beobachtet, wofür die Autoren eine Relaxation von afferenten und efferenten Arteriolen verantwortlich machten [Lee 1993, Missale 1998]. Darüberhinaus wird die Sekretion von weiteren Substanzen wie Renin, eventuell auch Vasopressin, Aldosteron und Katecholaminen moduliert. Dies geschieht einerseits präsynaptisch, wo DA seine Wirkung über inhibitorische Autorezeptoren entfaltet, andererseits könnte DA auch direkt juxtaglomerulär, tubulär und vaskulär in die renalen Steuerkreisläufe eingreifen. Dies hat systemische Auswirkungen, möglicherweise könnten Regelgrößen wie der mittlere arterielle Blutdruck auf diese Weise entscheidend mitbestimmt werden [Jose 2000].

Auf den renalen Elektrolythaushalt, so verschiedene Autoren, übt DA seine Wirkung als intrarenales natriuretische und diuretisches Hormon aus [Hussain 1998]. Durch Hemmung der Dopaminsynthese mit Benserazid konnte die natriuretische Antwort auf Salzbelastung abgeschwächt werden [Bertorello 1988]. Allerdings konnten Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an Ratten sowie an gesunden Probanden keinen funktionellen Zusammenhang zwischen der Natrium- und der Dopaminausscheidung feststellen [Mühlbauer 1994, Luippold 2000]. Möglicherweise hat der extrazelluläre Flüssigkeitshaushalt grossen Einfluss auf die Ergebnisse. Es wird vermutet, dass bei mittlerer Salzzufuhr in der Nahrung die renalen Salzausscheidung zu 50% durch DA kontrolliert wird [Jose 2000]. Dies geschieht hauptsächlich durch eine Hemmung der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase in Zellen des proximalen Tubulus. Neben einer Erhöhung der Natriumausscheidung nach Dopamingabe konnte ebenfalls eine Steigerung der Kalium- und Calciumausscheidung beobachtet werden [Lee 1993].

Studien der eigenen Arbeitsgruppe an Ratten ergaben, dass nach Gabe von Aminosäurelösung ausschließlich die Anwesenheit von Phenylalanin und Tyrosin in der Lösung darüber entschieden, ob die Dopaminausscheidung im Urin erhöht war. Hieraus wurde geschlossen, dass Dopamin im Urin ein Ausscheidungsweg für Katecholaminvorstufen darstellen könnte [Mühlbauer 1997].

1.3.3. Dopaminrezeptoren

Seit 1972 ist bekannt, dass Dopaminrezeptoren im ZNS die Adenylatcyclase (AC) beeinflussen. Sie wurden wegen ihrer unterschiedlichen Wirkung auf die AC in D₁ und D₂-Rezeptoren unterschieden. Weitere Untersuchungen bestätigten dieses Klassifikationsschema im Hinblick auf pharmakologische, biochemische und physiologische Eigenschaften und im Hinblick auf ihre anatomische Verteilung. Ende der 1970er wurde gezeigt, dass auch peripher lokalisierte Dopaminrezeptoren existieren. Sie wurden zunächst als DA₁ und DA₂-Rezeptoren bezeichnet, um sie auf Grund einiger pharmakologischer Eigenschaften von den zentralen Rezeptoren zu unterscheiden [Goldberg 1978]. Jedoch zeigten weitere Untersuchungen, dass große Ähnlichkeiten zwischen den zentralen und peripheren Dopaminrezeptoren bestehen, und man verließ dieses Unterscheidungsschema [Andersen 1990].

In der Folge wurden weitere Dopaminrezeptoren identifiziert, die D₃, D₄, und D₅ genannt wurden. Auf Grund hoher Homologien in transmembranären Domänen und pharmakologischer Eigenschaften wurden der D₁ und der D₅-Rezeptor zur D₁-ähnlichen Familie und der D₂, D₃, und D₄-Rezeptor zur D₂-ähnlichen Familie zusammengefasst [Missale 1998].

Die Rezeptoren der D₁-ähnlichen Familie aktivieren über ein stimulierendes G_s-Protein die AC, die über eine cAMP-abhängige Proteinkinase ihre Wirkung entfaltet [Zhou 1990, Demchyshyn 1995]. Auf diese Weise soll beispielsweise der tubuläre Na⁺/H⁺-Antiport in der luminalen Membran gehemmt werden [Felder 1990]. Außerdem ist eine Hemmung der ebenfalls tubulär gelegenen basolateralen Na⁺/K⁺-ATPase beschrieben worden [Chen 1993]. Dem D₁-

Rezeptor wird weiterhin eine Stimulation der Phospholipase C zugesprochen, die eine Aktivierung von Diacylglycerin (DAG) und Phosphoinositol (IP_3) nach sich zieht [Felder 1989]. Folge hiervon ist wiederum die Aktivierung der Proteinkinase C und eine Freisetzung von Calciumionen.

Die Rezeptoren der D_2 -ähnlichen Familie scheinen teilweise gerade entgegengesetzte Effekte zu haben. Die AC wird, wenn auch schwach, über ein inhibierendes G_i -Protein gehemmt [Gingrich 1993, Missale 1998]. Jedoch sind auch andere Signaltransduktionswege beschrieben worden. Die Wirkung auf die Na^+/K^+ -ATPase ist noch völlig unklar.

Bezüglich der Affinität des natürlichen Agonisten Dopamin zu den verschiedenen Subtypen wurde für die Peripherie folgende Reihenfolge vorgeschlagen: $D_3 > D_5 > D_2 > D_4 > D_1$ [Jose 1992].

Lokalisiert wurde der D_1 -Rezeptor u.a. in Rattennieren und dort im juxtaglomerulären Apparat, im proximalen und distalen Tubulus, im Sammelrohr und in der renalen Gefäßmuskulatur. Außerdem gelang ein Nachweis sowohl in der basolateralen Membran als auch auf der apikalen Seite [O'Connell 1995]. Jedoch konnte er in dem dicken Teil der Henleschen Schleife, im Nierenmark nicht gefunden werden [Sanada 1997]. Einer neueren Arbeit zur Folge ist der größere Teil der D_1 -Rezeptoren im Zytosol lokalisiert, und nach Stimulation der membranständigen Rezeptoren wird ein Teil der Rezeptoren des Zytosols im Sinne eines positiven Rückkoppelungsmechanismus an die Zelloberfläche gebracht. So könnte eine höhere Rezeptordichte entstehen, was einer Sensitivierung gleichkäme [Carey 2001].

Die D_2 -ähnliche Rezeptorfamilie ist u.a. im Glomerulum, in sympathischen Nervendigungen, im proximalen wie distalen Tubulus und in der renalen Gefäßmuskulatur gefunden worden [Hussain 1998, Lokhandwala 1991].

1.3.4. Der Dopamin D₃-Rezeptor

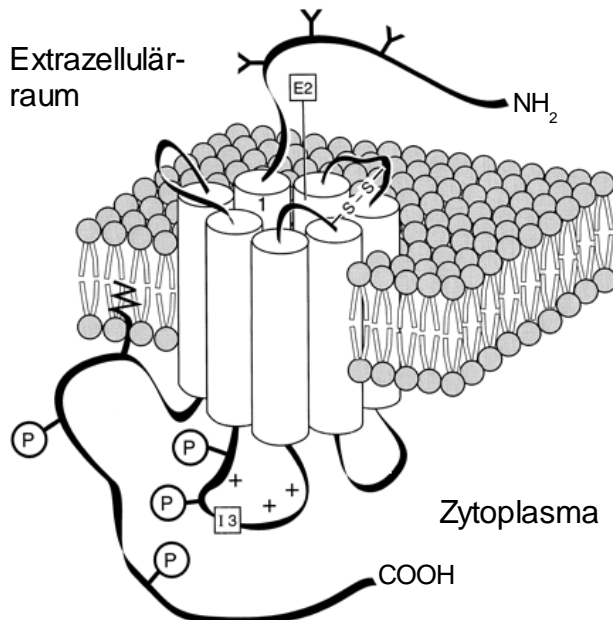


Abbildung 7: Der Dopamin D₃-Rezeptor

Die genetische Information des Dopamin D₃-Rezeptors ist im menschlichen Genom auf Chromosom 3 und dort auf Bande q13.3 lokalisiert. Er besteht aus 446 Aminosäuren, und bildet insgesamt sieben transmembranäre Domänen aus, was auf eine Koppelung an ein G-Protein hindeutet. Die Homologie zwischen dem menschlichem D₃-Rezeptor und dem der Ratte beträgt 88%, jedoch erhöht sich

dieser Anteil auf 97%, wenn nur die transmembranären Domänen betrachtet werden, die für die Ligandenerkennung wahrscheinlich ausschlaggebend sind. Desweiteren besteht eine 52%-ige Homologie zum D₂-Rezeptor, die sich bei Betrachtung der transmembranären Domänen wiederum auf 78% erhöht [Sokoloff 1992].

Lokalisiert wurde der D₃-Rezeptor im ZNS und dort im Nucleus caudatus und Nucleus accumbens (\cong Striatum) [Aretha 1995], im Tuberculum olfactorium, wobei die Islands of Calleja des ZNS der Ratte eine besonders hohe D₃-Rezeptordichte zeigten und schließlich in Teilen des limbischen Systems, wie z.B. Hippocampus oder Hypothalamus [Sokoloff 1990]. Peripher wurde der D₃-Rezeptor unter anderem in der Niere lokalisiert. Die tubuläre Lokalisation [Amenta 1997] deutet auf eine Beteiligung an der Modulation des Elektrolythaushaltes hin. Aber auch in Mesangiumzellen der Glomerula, renalen Arteriolen [Barili 1997, Amenta 2000] und juxtaglomerulären Zellen wurde er gefunden [Sanada 1997]. Dies widerspricht jedoch einer anderen Arbeit [O'Connell 1998], deren Autoren immunhistochemisch kein D₃-Signal in

juxtaglomerulären Zellen fanden. Jedoch konnten sie dagegen eine deutliche Lokalisation in glomerulären Podozyten und ihren Zytoplasmaausläufern feststellen. Dies ist interessant vor dem Hintergrund, dass Podozyten für circa 40% der hydraulischen Leitfähigkeit der Filtrationsbarriere verantwortlich sind, und dass bei der diabetischen Nephropathie diese Zellen starke Veränderungen aufweisen, die mit einer Proteinurie assoziiert sind [Pavenstädt 2000]. Sowohl im ZNS als auch in der Niere liegt keine eindeutige Überschneidung von Dopamin D₂- und D₃-Rezeptor-mRNA vor [Sokoloff 1990, O'Connell 1998].

Die Signaltransduktionsmechanismen des Dopamin D₃-Rezeptors sind nicht geklärt. Eine schwache, aber eindeutige Hemmung der AC durch den D₃-Rezeptor ist in einigen Zelllinien beschrieben worden [Missale 1998]. Neueste Erkenntnisse deuten auf eine Interaktion zwischen dem D₂- und dem D₃-Rezeptor hin: Ein gebildetes 'Heterodimer' wirkt inhibitorisch auf die AC [Sokoloff 2001]. Außerdem hemmt der D₃-Rezeptor den Calciumeinwärtsstrom. Keinen direkten Einfluss scheint er dagegen auf den Arachidonsäurestoffwechsel oder die IP₃-Kaskade zu haben [Missale 1998]. Jedoch ergaben die Untersuchungen einer anderen Arbeitsgruppe, dass der D₃-Rezeptor über die IP₃-Kaskade an der Steuerung der mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) beteiligt ist [Cussac 1999]. Von Chio [1994] ist ein pH-Abfall des Extrazellulärraumes nach pharmakologischer D₃-Stimulation beschrieben worden. Der Autor schloss daraufhin auf eine Aktivierung der Na⁺/H⁺-Antiporters.

Entsprechend der anatomischen Verteilung beeinflusst der Dopamin D₃-Rezeptor kognitive, emotionale und endokrine Funktionen. Schon 1990, als er kloniert wurde, vermutete man eine therapeutische Option, weil die Neuroleptika, die eine hohe Affinität zum D₃-Rezeptor aufwiesen, jene waren, die weniger extrapyramidale Symptome hervorriefen [Sokoloff 1990]. D₃-Agonisten zeigen einen guten therapeutischen Effekt in der Behandlung des M. Parkinson [Piercey 1998] und teilweise auch bei Depression [Bennett 1999]. Neueste Erkenntnisse sprechen für eine Beteiligung des D₃-Rezeptors an komplexen Vorgängen wie der lokomotorischen Aktivität [Accili 1996] und der Steuerung der Körpertemperatur [Millan 2000].

In Ratten bewirkte die Stimulation renaler Dopamin D₃-Rezeptoren mit dem D₃-Agonisten 7-OH-DPAT eine dosisabhängige Steigerung der glomerulären Filtrationsrate [Luippold 1998]. Bei D₃-Knockout Mäusen wurde Salz- und Volumenretention nach Volumen-expansion beobachtet [Asico 1998]. Außerdem war bei solchen Tieren einer anderer Herkunft eine Hemmung der aminosäurebedingten Hyperfiltration zu beobachten [Luippold 2000].

1.3.5. Beteiligung des D₃-Rezeptors an der Steuerung des Salz- und Volumenhaushaltes

Verschiedene Hinweise deuten auf eine Beteiligung des Dopamin D₃-Rezeptors bei der Modulation des Salz- und Volumenhaushaltes hin. Zunächst spricht die tubuläre Lokalisation für eine solche Aktivität. Desweiteren könnte die für die D₁-Rezeptoren vermutete Beteiligung an der Steuerung des Elektrolyt-haushaltes auch für Rezeptoren der D₂-ähnlichen Familie gelten, die unter bestimmten Bedingungen zusammen mit D₁-Rezeptoren die Na⁺/K⁺-ATPase hemmen und so die Salzausscheidung erhöhen könnten [Jose 2000]. Angesichts des Einflusses des D₃-Rezeptors auf die glomeruläre Filtration könnte dieser Rezeptor der verantwortliche Subtyp der D₂-ähnlichen Familie sein. Ergebnisse von Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe an Ratten zeigten, dass eine Dopamin D₃-Rezeptor-Stimulation zu einer Natriuresis und Diuresis führte [Luippold 1998]. Weiterhin entwickelt sich bei Vorhandensein des gegenteiligen Effektes, z.B. bei D₃-defizienten Mäusen, eine reninabhängige Hypertonie mit Tendenz zur Retention von Natrium [Asico 1998]. Darüberhinaus konnte ebenfalls in der eigenen Arbeitsgruppe beobachtet werden, dass eine selektive Blockade des D₃-Rezeptors bei salzresistenten Dahl Ratten eine phänotypische Konversion zu salzsensiblen Ratten verursachte: Die Tiere zeigten unter D₃-Rezeptorblockade eine klare Tendenz zur Natrium- und Volumenretention. Diese Daten weisen darauf hin, dass der Dopamin D₃-Rezeptor entscheidend die renale Salz- und Volumenhomöostase mitbeeinflussen könnte.

1.3.6. Beteiligung des D₃-Rezeptors an der Vermittlung der diabetischen Hyperfiltration

Die aminosäurebedingte Hyperfiltration von Ratten konnte mit Quinpirol, einem D₂-ähnlichem Agonisten mit Hauptwirkung auf D₂ und D₃ nachgeahmt werden. Sowohl die aminosäurebedingte Hyperfiltration als auch die Imitation durch Quinpirol konnte mit (–)-Sulpirid, einem Antagonisten der D₂-Familie, wieder normalisiert werden [Luippold 1998]. Weiterführende Versuche zeigten, dass der D₃-Rezeptoragonist 7-OH-DPAT eine Steigerung der glomerulären Filtrationsrate bewirkte, die nicht mit dem Antagonisten (–)-Sulpirid beeinflussbar war, jedoch konnte die Vorbehandlung mit dem D₃-Rezeptorantagonisten U-99194A die Hyperfiltration vollständig aufheben [Luippold 1998]. Desweiteren konnte bei diabetischen Ratten, die mit dem peripher wirkendem D₃-Rezeptorantagonisten BSF-135170 behandelt wurden, die pathologisch gesteigererte glomeruläre Filtrationsrate nahezu normalisiert werden [Beilharz 2000]. Schließlich zeigten Versuche mit D₃-defizienten Mäusen, dass die aminosäurebedingte Hyperfiltration signifikant abgeschwächt war gegenüber den entsprechenden Kontrollen [Luippold 2000]. Zusammengenommen geben diese Daten den Hinweis, dass der physiologischen, aminosäurebedingten und der pathologischen, diabetischen Hyperfiltration derselbe D₃-vermittelte Mechanismus zu Grunde liegen könnte.

1.4. Eigene Fragestellung

Vor dem Hintergrund der beschriebenen Zusammenhänge wurden folgende Fragestellungen durch Experimente an narkotisierten Mäusen im Clearanceexperiment und an wachen Tieren im Stoffwechsellkäfig untersucht:

Ist der Dopamin D₃-Rezeptor an der Modulation der Salzausscheidung nach akuter Salzbeladung beteiligt ?

Ist der Dopamin D₃-Rezeptor an der Regulation des Volumenhaushaltes nach akuter Volumenbeladung beteiligt ?

Inwieweit ist der Dopamin D₃-Rezeptor an der Vermittlung der diabetischen Hyperfiltration in der Frühphase des Diabetes mellitus Typ I beteiligt ?

2. Materialien und Methoden

2.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an männlichen Mäusen der Stämme C57/BL6 (Fa. Charles River, Sulzfeld) und Dopamin D₃-Rezeptor Knockout Mäusen D₃(-/-) (Abbott GmbH & Co. KG, ehemals Knoll AG, Ludwigshafen) durchgeführt. Die Erzeugung der Knockouttiere geschah unter der Leitung von Höger T und Lemaire HG (Knoll AG, Ludwigshafen)

2.1.1. Erzeugung von D₃(-/-) Tieren

Sogenannte D₃ Knockout Mäuse wurden erzeugt, indem das Gen für den Dopamin D₃-Rezeptor ausgeschaltet wurde. Zunächst wurde ein Genfragment konstruiert, das einen dominanten Marker, die Aminoglykosid-Phosphotransferase (APH) enthält. Dieses Enzym bringt – wenn exprimiert – eine Neomycin/G418 Resistenz mit sich. Weiterhin musste das Fragment so gestaltet sein, dass seine beiden Enden denen des Originalfragmentes glichen, das für den Dopamin D₃-Rezeptor kodiert. Das generierte Fragment hatte nun drei wichtige Eigenschaften: Erstens war das D₃-Gen nicht mehr in seiner funktionsfähigen Form vorhanden, zweitens wurde eine Resistenz geschaffen, drittens entsprach es der D₃-Sequenz im Anfangs- und Endteil.

Aus Blastozysten wurden embryonale Stammzellen (ES) gewonnen, aus denen permanente Zelllinien hergestellt wurden, die eine fast beliebige Manipulation erlauben. In diesen ES-Zellen wurde jetzt das generierte Erbgut eingeschleust (Transfektion). Im Idealfall (eine von 10⁴ Zellen) wurde stabil transfiziert, was durch doppeltes Crossing-over geschah: In den beiden homologen Regionen wurde die Originalsequenz durch die entsprechende konstruierte Sequenz ersetzt. Der Promotor, der ursprünglich dafür gesorgt hatte, dass die D₃-Sequenz exprimiert wurde, bewirkte nun eine APH-Expimierung. Dieser Genaustausch wird als homologe Rekombination

bezeichnet und gewährleistet, dass eine eventuelle Insertion der mutierten Sequenz an zufälliger Stelle (was bedeuten würde, dass das D₃-Gen weiterhin aktiv wäre) dazu führt, dass die Zelle kein APH exprimiert, weil der vorgeschaltete Promotor fehlt.

Nun konnte eine Selektion mittels Neomycin vorgenommen werden. Nur Zellen, die APH exprimieren, können die Antibiotikagabe überleben. Die so identifizierten Zellen wurden in Blastozysten injiziert und in eine Ammenmaus implantiert. Die entstehende F0-Tiere waren Chimären aus normalen und genetisch veränderten Zellen, je nachdem, wie sich die ES-Zellen eingenistet hatten. Stammen die Keimbahnzellen von veränderten ES-Zellen ab, enthielten auch die F1-Tiere das Transgen. Frühestens in der F2-Generation erhält man die ersten Tiere, die homozygot für das Transgen sind. Dies wurde durch konstante Genanalyse überprüft [Mühlhardt 1999].

2.1.2. Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden in einem Alter von vier bis zehn Wochen mit einem Gewicht von 18-25 g geliefert. Nach Eintreffen wurde den Tieren mindestens eine Woche Zeit zur Regeneration gegeben, bevor die Versuche begannen. Die Tiere wurden im institutseigenen Tierstall in Makrodex®-Standardkäfigen (Fa. Ehret, Freiburg) bei einer Temperatur von 21°C und 57% Luftfeuchtigkeit und einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Die Tiere hatten jederzeit freien Zugang zu Trinkwasser und Futter (Standard-Nagerfutter Altromin C-1320®, Fa. Altromin, Lage mit einem NaCl-Gehalt von 0.6% bei Normalsalzdiät beziehungsweise 4% bei salzreicher Diät).

2.2. Versuchsgruppen

Die C57-Gruppen, im weiteren Wildtyp (WT) genannt, dienten als Kontrollgruppen zu den D₃-Knockout-Gruppen, im weiteren KO genannt. Bis zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente waren keine Mäuse der selben Zuchtlinie verfügbar, die homozygot den D₃-Rezeptor exprimierten D₃(+/+).

2.2.1. Diabetes mellitus bei Mäusen

Den Tieren wurde eine Einzeldosis Streptozotozin (STZ) 120 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal in den rechten unteren Abdominalquadranten verabreicht (gelöst in Citratpuffer von pH 4,5). Dies führte zu einer Schädigung der β -Zellen der Pankreasinseln, so dass die Tiere innerhalb von zwei bis drei Tagen einen Diabetes mellitus entwickelten. Der für Mäuse normale Glucosewert im Plasma von 190-200 mg/dl stieg auf Werte bis zu 970 mg/dl an. Ein Problem stellte die große Variabilität der Glucoseantwort auf die STZ-Injektion dar. Im Mittel stellte sich ein Blutglucosewert von 470 mg/dl ein, wobei den Tieren kein Insulin verabreicht wurde. Für die Versuche wurden Tiere mit einem Glucosewert zwischen 240 und 750 mg/dl verwendet. Hyperglykämische Tiere dieser Art tragen im weiteren die Bezeichnung DM. Als Kontrollgruppen zu den DM-Gruppen dienten Vehikelgruppen, die ausschließlich die entsprechende Menge Citratpuffer intraperitoneal injiziert erhielten, sie tragen im weiteren die Bezeichnung CON.

Nach STZ-Injektion wurde mindestens zwei Wochen zugewartet, bevor die Versuche durchgeführt wurden. In dieser Zeit war ein Gewichtsverlust der Tiere zu verzeichnen, der mit dem jeweiligen Plasmaglucosewert korrelierte. Zur selben Zeit wiesen die CON-Gruppen ein konstantes Gewicht auf. Weiterhin konnte zur groben Einschätzung der Stoffwechsellage der Tiere – wie schon früher beschrieben [Ibrahim 1997] – eine Polydipsie (Erhöhung des Trinkvolumens um Faktor 4,4), Polyphagie (Erhöhung der Nahrungsmenge um

Faktor 1,6) und ein Polyurie festgestellt werden. Dieses Modell des STZ-induzierten Diabetes mellitus simuliert somit den insulinabhängigen Typ I des Menschen (IDDM).

2.2.2. Hochsalzernährung

Diese Tiere hatten freien Zugang zu ausschließlich salzreicher Nahrung (Standarddiät + 4% NaCl) und normalem Trinkwasser. Die Tiere wurden für mindestens zwei Wochen auf dieser salzreiche Diät belassen, bevor Versuche durchgeführt wurden. Tiere, die diese Diät erhielten, tragen im weiteren die Bezeichnung HS. Normalsalzernährte Tiere werden im weiteren mit NS bezeichnet.

2.2.3. Volumenbeladung/Volumenexpansion

Diesen Tieren wurde bei Stoffwechselläufigversuchen eine orale Volumenbeladung von 5% des Körpergewichtes verabreicht (siehe 2.3.2.2. *Versuchsablauf zur Volumenbeladung*).

Bei Clearanceversuchen wurde zwischen der letzten Basalperiode und der ersten Hauptperiode das Infusionsvolumen auf 4,5% des Körpergewichtes / h erhöht. Diese Gruppe trägt im weiteren die Bezeichnung VE (siehe 2.3.3.3. *Infusion*).

2.2.4. Zusammenfassung der Gruppen

Folgende Versuchsgruppen wurden somit in der vorliegenden Arbeit untersucht:

VE-NS-WT	Volumenexpansion Wildtyp normalsalzernährt
VE-NS-KO	Volumenexpansion D ₃ (-/-) normalsalzernährt
VE-HS-WT	Volumenexpansion Wildtyp hochsalzernährt
VE-HS-KO	Volumenexpansion D ₃ (-/-) hochsalzernährt
CON-WT	Zeitkontrolle Wildtyp
CON-KO	Zeitkontrolle D ₃ (-/-)
DM-WT	Wildtyp mit Diabetes mellitus
DM-KO	D ₃ (-/-) mit Diabetes mellitus

2.3. Versuchsdurchführung

2.3.1. Stoffwechselkäfigversuche mit wachen Mäusen

2.3.1.1. Stoffwechselkäfige

Für die Stoffwechselkäfigversuche wurden Käfige verwendet, die eine getrennte Sammlung von Urin und Faeces ermöglichen (Techniplast®, Fa. Ehret, Freiburg i.Br.). Während der Versuche hatten die Mäuse freien Zugang zu Trinkwasser, jedoch erhielten sie keine Nahrung. Im oberen Teil des Käfigs konnten sich die Tiere frei auf dem Gitternetzrost bewegen, durch den die Exkremamente auf ein darunterliegendes Drahtgitter durchfielen. Im unteren Teil des Käfigs sorgte ein konusförmiger Trichter dafür, dass der Urin in einem zum Käfig gehörenden Sammelgefäß aufgefangen wurde.

Um die Verdunstung so gering wie möglich zu halten, wurde in jedes Urinsammelgefäß 1 ml wassergesättigtes Paraffinöl gegeben, unter dem sich der Urin ansammeln konnte. Die Tiere wurden in jeweils zwei einstündigen Sitzungen an die Käfige gewöhnt, bevor die eigentliche Stoffwechselkäfigversuche durchgeführt wurden.

2.3.1.2. Ablauf der Versuche zur Volumenbeladung

Normal- und hochsalzernährte Tiere (NS-WT, NS-KO, HS-WT, HS-KO) erhielten 4%-ige NaCl-Lösung intragastral sondiert, wobei die Menge jeweils 5% ihres Körpergewichtes entsprach. Anschließend wurde für eine Stunde sowie für drei weitere Stunden Urin gesammelt und die Urin- bzw. Trinkmenge bestimmt. Nach dem Versuch wurden die Tiere für mindestens zwei weitere Tage in den Standardkäfigen gehalten, bevor sie für Clearanceversuche verwendet wurden.

2.3.1.3. Ablauf der Versuche mit diabetischen Tieren

Die Stoffwechselkäfigversuche mit normo- und hyperglykämischen Tieren (CON-WT, CON-KO, DM-WT, DM-KO) wurden in der Zeit von 18 Uhr bis 24 Uhr durchgeführt. Diese Zeit wurde gewählt, weil sich in Vorversuchen gezeigt hatte, dass in diesem Zeitraum die Ausscheidung der Maus am höchsten ist. Auch hier wurde mindestens ein weiterer voller Tag mit Haltung der Tiere in Normalkäfigen abgewartet, bevor die Clearanceversuche durchgeführt wurden.

2.3.1.4. Probengewinnung und -behandlung

Nach Bestimmung des Urin- und Trinkvolumens wurden die Urinproben unter Zurücklassen des Paraffinöls mit einer Pipette (alle verwendeten Pipetten: Fa. Eppendorf, Hamburg) entnommen und bis zur Analyse von Elektrolyten, Glucose und Osmolalität bei -20°C eingefroren.

2.3.2. Clearanceversuch an narkotisierten Mäusen

2.3.2.1. Narkose

Für die Narkose wurde Pentobarbital-Natrium (Pentobarbital, Sigma St. Louis, USA) in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht verwendet. Es wurde in *aqua bidest* gelöst und intraperitoneal in den rechten unteren Abdominalquadranten injiziert. Fehlende Reaktionen auf Schmerzreize zeigten die ausreichende Narkosetiefe an. In einigen Fällen erfolgte eine Nachinjektion von 15 mg/kg Pentobarbital-Natrium.

2.3.2.2. Präparation

Die Versuchstiere wurden in Rückenlage auf den vorgeheizten Präparationstisch (Fa. Effenberg, Pfaffing) plaziert. Die Körpertemperatur wurde

rektal mit einer Temperatursonde registriert. Präparationstisch und Sonde waren an ein Temperatureinstellgerät (Fa. Effenberg, Pfaffing) angeschlossen, das die Körpertemperatur konstant auf 37,5°C hielt.

Die Operation begann mit der Sicherung der Atemwegsfreiheit. Dazu erfolgte mit Hilfe einer Präparierschere (alle verwendeten Operationsinstrumente: Fa. Aesculap, Tuttlingen) zunächst ein ungefähr 15 mm langer suprasternaler Hautschnitt in der Medianebene. Weiterhin wurde die Halsfaszie durchtrennt, die Speicheldrüsen stumpf zur Seite luxiert und die infrahyale Muskulatur median gespalten. Die freigelegte *Trachea* wurde unter Schonung aller Gefäße und Nerven mit Hilfe eines Seidenfadens (alle Fäden: Seidenfäden, Fa. Suprama, Berlin) angeschlungen und mittels Federschere inzidiert. Ein ungefähr 15 mm langer Polyethylen(PE)-Katheter (alle Katheter: SIMS Portex Ltd., UK) mit Außendurchmesser 1,27 mm wurde ungefähr 5 mm in die *Trachea* eingeführt und mit dem Faden fixiert.

Anschließend wurde die rechte Speicheldrüse nach medial über das Tracheostoma luxiert und die oberflächlich liegende *V. jugularis dexter* 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. Daraufhin wurde eine zweite Ligatur an der kaudalen Seite vorgelegt, um anschließend den Venenkatheter fixieren zu können. Nach Inzision des Gefäßes wurde ein PE-Katheter (Außendurchmesser 0,96 mm) ungefähr 3 mm eingeführt. Um die richtige Lage des Katheters zu überprüfen wurde ein Bolus von 50 µl verabreicht. Schließlich konnten die Infusionspumpen (Typ 871642[®], Fa. Braun, Melsungen; Sp101[®], WPI, Berlin) gestartet werden.

Anschließend erfolgte das Aufsuchen der paratrachealen *A. carotis sinistra*. Die Arterie wurde vom umliegenden Bindegewebe befreit und vom *N. vagus* getrennt. Danach wurde das Gefäß kranial ligiert und kaudal durch eine gefäßchirurgische Klemme so abgeklemmt, dass dazwischen inzidiert werden konnte, um den arteriellen Katheter (Außendurchmesser 0,65 mm) einzufügen. Mit Hilfe einer vorgelegten Schlinge wurde er fixiert. Nun konnte die Arterienklemme abgenommen werden und mit der Puls/Blutdruckmessung

(Linearcorder WR3001®, Hugstetten) begonnen werden. Der eröffnete Halsbereich wurde mit drei Nähten verschlossen.

Für die Katheterisierung der Harnblase erfolgte ein medianer Hautschnitt 5 mm kranial der Peniswurzel. Die Muskelfaszien wurden entlang der *Linea alba* durchtrennt. Nach Durchtrennung der Abdominalmuskulatur wurde die Harnblase herausluxiert und eine Schlinge vorgelegt. Die Harnblase wurde inzidiert und ein PE-Katheter (Außendurchmesser 0,96 mm) eingebracht. Nach Reposition konnte nun die Wunde mit einer Naht verschlossen werden.

Anschließend wurde das Tier in Linksseitenlage gebracht und der Urin in PE-Gefäßen 0,5 ml (Fa. Eppendorf, USA) gesammelt. Schließlich wurde an das Tracheostoma ein Schlauch angelegt, über den das Tier mit Sauerstoff angereicherte Zimmerluft versorgt wurde.

2.3.2.3. Infusion

An den venösen Katheter waren zwei Perfusorpumpen über ein T-Stück angeschlossen. Zum einen die elektrische Präzisionspumpe (Sp101®, WPI, Berlin), die eine Lösung mit folgender Zusammensetzung förderte: 0,85%-ige NaCl-Lösung, 2,25% BSA (bovines Serumalbumin), [³H]-markiertes Inulin (Aktivität: 10µCi/ml), Pentobarbital entsprechend dem Körpergewicht, so dass eine Infusionsrate von 9 mg Pentobarbital pro Kilogramm und Stunde erreicht wurde. Die Gesamtförderrate der Präzisionspumpe betrug kontinuierlich 180 µl/h.

Zum anderen war eine zweite Perfusorpumpe parallel geschaltet, deren Infusionsrate bei den Versuchsgruppen Volumenbeladung/Volumenexpansion (VE) verändert wurde. Diese Perfusorpumpe (Typ 871642®, Fa. Braun, Melsungen) förderte 0,85%-ige NaCl-Lösung mit 2,25% BSA. Bei allen Basalperioden der einzelnen Versuchsgruppen war die Perfusorpumpe zunächst auf eine Infusionsgeschwindigkeit von 150 µl/h eingestellt. Somit betrug das Gesamtinfusionsvolumen 180µl/h+150µl/h=330µl/h, was etwa 1% des Körpergewichtes pro Stunde entspricht. Diese Rate wurde bei den Zeitkontrollen und bei den diabetischen Tieren während des gesamten

Versuches nicht verändert. Lediglich bei den Tieren der Gruppe VE wurde die Förderrate des zweiten Perfusors zu Beginn der ersten Hauptperiode so erhöht, dass insgesamt ein stündliches Volumen infundiert wurde, das 4,5% des Körpergewichtes der jeweiligen Maus entsprach.

2.3.3. Ablauf der Experimente

An die ungefähr 50 Minuten dauernde Präparation schloss sich eine Äquilibrationsperiode von mindestens 35 Minuten an, um dem Organismus die Stabilisierung der physiologischen Funktionen zu ermöglichen. Mit den Versuchen wurde begonnen, sobald die Versuchstiere eine gleichmäßige Urinausscheidung aufwiesen und Blutdruck, Puls und Atmung ein stabiles Niveau erreichten.

Der Versuchsablauf war in drei gleiche Basalperioden (bei DM und CON) oder zwei Basalperioden und drei Hauptperioden (bei VE) à 30 Minuten untergliedert. Während des gesamten Versuches wurden Puls und Blutdruck kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet (Linearcorder WR3001®, Hugo Sachs Elektronik, Hugstetten). Am Ende des Versuches wurden die Nieren entnommen und die Versuchstiere durch die Erzeugung eines unmittelbaren Herzstillstandes durch intravenöse Gabe von gesättigter KCl-Lösung getötet.

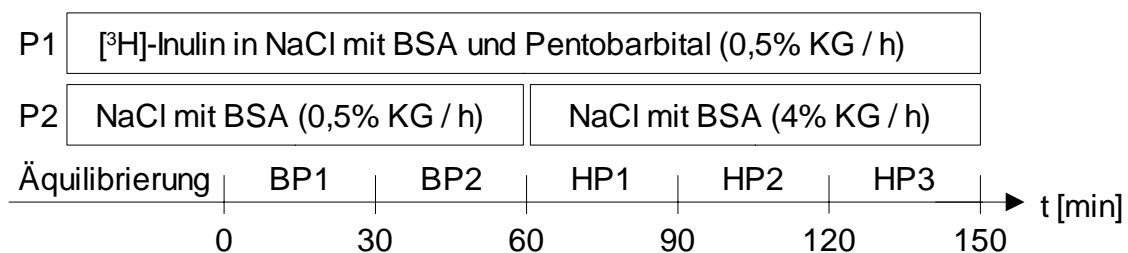


Abbildung 8: Design der Clearanceversuche bei Volumenbeladung/Volumenexpansion (VE). Die Versuchsdauer betrug 90 Minuten. Perfusorpumpe 1 (P1) förderte kontinuierlich isotone NaCl-Lösung mit Inulin, Pentobarbital und bovinem Serumalbumin (BSA) mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,5% KG/h. Perfusorpumpe 2 (P2) förderte in den Basalperioden NaCl-Lösung mit BSA bei einer Infusionsgeschwindigkeit von zunächst 0,5% KG/h. Dies wurde in den Hauptperioden auf 4% KG/h erhöht.

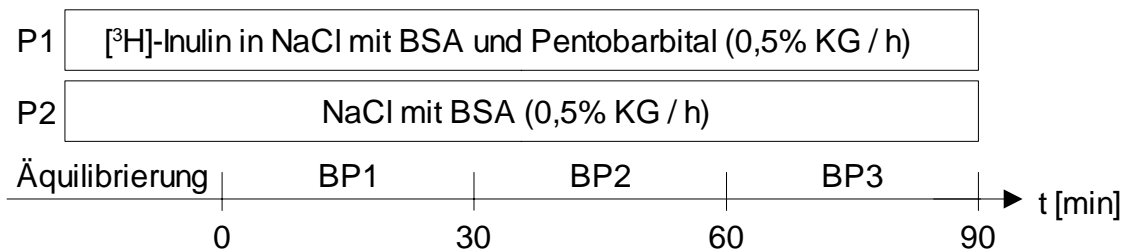


Abbildung 9: Design der Clearanceversuche bei Tieren mit Diabetes mellitus (DM) bzw Kontrollgruppen (CON). Die Versuchsdauer betrug 90 Minuten. Perfusionpumpe 1 (P1) förderte kontinuierlich isotone NaCl-Lösung mit Inulin, Pentobarbital und bovinem Serumalbumin (BSA) mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 0,5% KG/h. Perfusionpumpe 2 (P2) förderte NaCl-Lösung mit BSA bei einer Infusionsgeschwindigkeit von kontinuierlich 0,5% KG/h. Die Gesamtrate betrug somit 1% KG/h.

2.3.3.1. Probenentnahme

Über den in der *A. carotis* liegenden Katheter wurden nach der Hälfte einer Sammelperiode 40 μl Blut in einer heparinisierten Glaskapillare (Mikro-Hämatokrit-Kapillaren[®] 75 μl , Brand GmbH&CO, Wertheim) entnommen. Zum Ende jeder Sammelperiode wurde der Urin in PE-Gefäßen gesammelt und die Urinmenge gravimetrisch bestimmt.

2.3.3.2. Nierenentnahme

Zunächst wurde Pentobarbital mit einer Dosis von 30 mg/kg i.v. nachinjiziert, um eine ausreichende Narkosetiefe zu gewährleisten. Daraufhin wurde das Tier in Rückenlage gebracht und der mediane Schnitt am Blasenkatheter um 2 cm erweitert. Der Dünndarm wurde mobilisiert und die rechte Niere aufgesucht. Danach wurden die renalen Gefäße hilusnah durchtrennt und die Niere herausgenommen. Nachdem die Nierenkapsel entfernt war, konnte das Nierenfeuchtgewicht gravimetrisch bestimmt werden. Die Entnahme der linken Niere erfolgte nach dem gleichen Schema.

2.3.3.3. Probenbehandlung

Die mit arteriellem Blut gefüllten Glaskapillaren wurden auf einer Seite mit Knet (Hämatokrit-Versiegelungskitt®, Fa. Brand) verschlossen und zentrifugiert (Hettich Hämatokrit®, Fa. Hettich). Die Urinproben wurden in verschließbaren PE-Gefäßen gesammelt und die Urinvolumina gravimetrisch bestimmt. Die weitere Verarbeitung erfolgte direkt nach dem Versuch.

2.3.4. Retrobulbäre Blutentnahme zur Blutglucosebestimmung

Die Blutentnahme diente der Bestimmung der Glucosekonzentration im Plasma. Zunächst wurden die Tiere einzeln in einen Glaskasten verbracht, der mit Ether angereicherter Zimmerluft gefüllt war. Nach 10-20 Sekunden war die Maus bewusstlos und wurde herausgenommen. Nun wurde die den Bulbus umgebende Haut digital gespreizt, sodass der Bulbus hervortrat. Jetzt war es möglich, mit einer heparinisierten Glaskapillare (Mikro-Hämatokrit-Kapillaren® 10 µl, Brand GmbH&CO, Wertheim) das retrobulbäre Venengeflecht zu punktieren. Mit Hilfe einer weiteren heparinisierten Glaskapillare (75µl) wurde das Blut aufgenommen und entsprechend 2.3.3.1. *Probenentnahme* und 2.4.4. *Glucosemessung* weiter verarbeitet. Da die Tiere schon wenige Minuten nach der Blutentnahme normales Verhalten wie Fressen und Putzen zeigten und somit keinen erkennbaren Schaden davontrugen, konnte diese Methode dazu benutzt werden, bei den diabetischen Tieren die Blutglucosekonzentration im Langzeitverlauf zu beobachten.

2.4. Analytik

2.4.1. Analyisierte Parameter

Folgende Größen wurden bei den Stoffwechselläufigversuchen bestimmt:

• Tiergewicht	TG	[g]
• Gewichtsverlust während des Versuches	Δ TG	[g]
• Trinkvolumen	TV	[ml]
• Urinvolumen einer Sammelperiode	U_{v_s}	[ml]
• Elektrolytkonzentrationen von Na^+ , K^+ , Cl^-	$[Na]_{Urin}$	[μ mol/l]
• Glucosekonzentration im Plasma	$[Glu]_{Plasma}$	[mg/dl]
• Glucosekonzentration im Urin	$[Glu]_{Urin}$	[g/dl]
• Osmolalität	OS	[osmol/kg]

Diese Werte wurden in den Clearanceversuchen bestimmt:

• Systolischer und diastolischer Blutdruck	P_{sys}, P_{dias}	[mmHg]
• Herzfrequenz	HF	[1/min]
• Hämatokrit	Hkt	[%]
• [3H]-Aktivität in Plasma und Urin	A_{Plasma}, A_{Urin}	[1/min]
• Plasmakonzentrationen von Na^+ und K^+	$[Na]_{Plasma}$	[mmol/l]
• Urinkonzentrationen von Na^+ und K^+	$[Na]_{Urin}$	[mmol/l]
• Urinvolumen einer Sammelperiode	U_{v_s}	[ml]
• Nierenfeuchtgewicht	NFG	[g]

2.4.2. Gewichte und Volumina

(TG, U_{v_s})

Die Tiergewichte wurden gravimetrisch bestimmt (Tierwaage Fa. Mettler, Zürich), alle übrigen Gewichte und Volumina wurden ebenfalls gravimetrisch mit einer Feinwaage genommen (Precisa 100®, Fa. Oerliko Zürich). Einheit: [g] bzw. [mg]

2.4.3. Elektrolytkonzentrationen von Na^+ , K^+ , Cl^- (Plasma & Urin)

Von den Urinproben wurde jeweils 10 μl in PE-Gefäße gebracht und mit 2 ml Lithiumlösung (Standard Lithiumlösung, Fa. Eppendorf, Hamburg) versetzt, die bis zur Messung bei -20°C eingefroren wurden. Es wurden für jeden Wert Doppelproben pipettiert. Von den Plasmaproben wurden jeweils 10 μl in PE-Gefäße gebracht und ebenfalls eingefroren. Hier wurden nur Einfachproben bestimmt, um den Blutverlust der Versuchstiere so gering wie möglich zu halten. Die Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen von Na^+ und K^+ erfolgte mit Hilfe eines Flammenphotometers (Elex 6361[®], Fa. Eppendorf, Hamburg) und wurden in [mmol/l] ausgegeben.

Die Bestimmung der Cl^- -Konzentrationen wurde mit Hilfe des Chloridmeter 6610[®] (Fa. Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Dieses Gerät arbeitet nach einem coulometrischen Verfahren. Von der Silberanode gehen oxidierte Silberionen in Lösung. Nach Zugabe von Chloridionen fällt Silberchlorid aus. Der Ladungsfluss zwischen Anode und Kathode, der nötig ist, um die ursprüngliche Konzentration an Silberionen wieder herzustellen ist proportional zu der Anzahl zugegebener Cl^- -Teilchen. Praktisch wurde je Messung 10 μl Urin direkt in die Standardlösung gegeben. Nach vorangegangener Kalibrierung des Gerätes wurden auch hier Einfachwerte in [mmol/l] bestimmt.

2.4.4. Glucosemessung (Glu)

Die Glucosemessung erfolgte enzymatisch/photometrisch mit dem Spectrophotometer U-300[®] (Hitachi Ltd., JP). Zunächst wurden jeweils 3 μl Plasma bzw. Urin und 300 μl Reagenz (Infinity[®], Fa. Sigma, Steinheim) in PE-Gefäße gebracht und drei Minuten bei 37°C inkubiert. Das Reagenz induzierte, entsprechend des Pentosephosphatweges, je nach Glucosegehalt eine entsprechende Menge $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Diese wurde photometrisch über die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda=340\text{ nm}$ gemessen. Es wurde eine Kalibriergerade erstellt und jeweils Doppelproben gemessen. Ausgegeben

wurden zunächst Werte in [mmol/l], die mit Kenntnis der Molmasse in [mg/dl] umgerechnet wurden.

2.4.5. Osmolalitätsmessung (OS)

Die Osmolalität des Urins wurde mit Hilfe eines Osmometers (Osmomat 030, Fa. Gonotec, Berlin) bestimmt. Die Methode basierte auf einer Gefrierpunkt-erniedrigung von Lösungen in Abhängigkeit der Osmolalität. Nach Kalibrierung des Gerätes wurden Einfachproben bestimmt in [osmol/kg] angegeben.

2.4.6. Systolischer und diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz (P_{sys} , P_{dias}) (HF)

Systolischer und diastolischer Blutdruck [mmHg] wurden wie die Herzfrequenz [1/min] registriert und vom Schreiber fortlaufend aufgezeichnet.

2.4.7. Hämatokrit (Hkt)

An den zentrifugierten Kapillaren wurde der Hämatokrit in [%] - entsprechend des prozentualen Anteils der korpuskulären Elemente im Verhältnis zur Höhe der Säule – visuell abgelesen. Der Überstand nichtkorpuskulärer Bestandteile (Plasma) wurde aus den Kapillaren in PE-Gefäße gebracht, der Rest verworfen.

2.4.8. [^3H]-Aktivität in Plasma und Urin (A_{Urin} , A_{Plasma})

Von dem gewonnenen Plasma und Urin wurden Doppelproben von je 5 μl in spezielle Meßgefäße (Midi-Vial®, Fa. Packard, Groningen, NL) mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold®, Fa. Packard) vermischt. Die Szintillationsflüssigkeit wandelte die bei Zerfall des [^3H]-markierten Inulins freiwerdende Energie in Lichtblitze um, die von einem Szintillationsmeßgerät (2550TR®, Fa. Packard) in [1/min] erfasst wurden.

2.5. Berechnungen

2.5.1. Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der mittlere arterielle Blutdruck in [mmHG] errechnet sich aus den Werten des systolischen (P_{sys}) und diastolischen (P_{dia}) Blutdruckes nach folgender Formel:

$$\text{MAP} = P_{\text{dia}} + 1/3(P_{\text{sys}} - P_{\text{dia}})$$

2.5.2. Urinzeitvolumen (UV)

Das Urinzeitvolumen [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{g NG}$] veranschaulicht die ausgeschiedene Menge Urin (U_{Vs}) pro Zeit (Dauer einer Sammelperiode D_{S}) und wird auf das Nierenfeuchtgewicht (NFG) bezogen.

$$\text{UV} = U_{\text{Vs}} \times 1000 / D_{\text{S}} / \text{NFG}$$

2.5.2. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate in [$\text{ml}/\text{min}/\text{g NG}$] wird anhand der [³H]-Aktivitäten in Urin (A_{Urin}) und Plasma (A_{Plasma}) sowie des Urinzeitvolumens errechnet und bezieht sich auf das Nierenfeuchtgewicht (NFG) und die Zeit (Dauer einer Sammelperiode D_{S}):

$$\text{GFR} = A_{\text{Urin}} / A_{\text{Plasma}} \times \text{UV} / D_{\text{S}} / \text{NFG}$$

2.5.3. Absolute renale Exkretion von Na⁺, K⁺ und Cl⁻ (U_{Na}V)

Die absolute renale Natriumexkretion im Urin wird in [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NG}$] angegeben und errechnet sich wie folgt:

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

Bei Stoffwechselfäßversuchen ist U_{Na}V nicht auf das NFG, sondern auf 100 g Tiergewicht bezogen, da keine Nierenentnahme stattfand.

Gleiches gilt für die Berechnung der renalen Exkretion von Kalium (U_KV) und Chlorid (U_{Cl}V).

2.5.4. Fraktionelle Natriumexkretion der Niere (FE_{Na})

Die fraktionelle Natriumexkretion, ein Maß der tubulären Resorptionsleistung der Niere, wird in [%] des filtrierte Natriums angegeben und folgendermaßen berechnet:

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

2.6. Statistik

Die Daten wurden zunächst pro Versuchstier berechnet und anschließend für die jeweiligen Gruppen als Mittelwerte \pm SEM (standard error of means) angegeben.

Um die Daten der Stoffwechselkäfigversuche statistisch beurteilen zu können, wurden Varianzanalysen (ANOVA) mit post-Tests durchgeführt, wobei das Signifikanzniveau entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests erhöht wurde (Bonferroni-Korrektur). Getestet wurden einerseits die diabetischen Tiere gegen ihre normoglykämischen Kontrollen, andererseits wurden die KO-Gruppen gegen die entsprechenden WT-Gruppen getestet. Für die Versuchsgruppen mit Hochsals-Ernährung gilt das gleiche Schema. Als Maß zur Beurteilung statistischer Signifikanz dient der p-Wert, welcher die Wahrscheinlichkeit einer Überschreitung der Nullhypothese angibt. Als Nullhypothese gilt hierbei die Annahme der Gleichheit der verglichenen Werte. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $< 0,05$ angesehen.

Vor der statistischen Auswertung der Clearanceversuche wurden zunächst die Ergebnisse der Basalperioden zusammengefasst. Dies betrifft bei den Versuchen zur Volumenbeladung/Volumenexpansion die beiden Basalperioden, bei den Versuchen zu Diabetes mellitus die gesamten drei Perioden. Es wurden Mittelwerte gebildet und Varianzanalysen mit Bonferroni post-Tests durchgeführt (wie oben beschrieben). Um bei den Versuchen mit Volumenbeladung/Volumenexpansion zusätzlich eine statistisch signifikante Änderung der Hauptperioden gegenüber den Basalperioden beurteilen zu können wurden Dunnett-Tests durchgeführt. Hierbei wurden innerhalb einer Gruppe die Werte der Hauptperioden mit dem Mittelwert der beiden Basalperioden verglichen.

Die statistische Auswertung wurde mit Hilfe des Computerprogrammes InStat V3.0® (Graph Pad Inc., USA) durchgeführt. Die Graphiken wurden mit FigureP V2.5® (FigP Software Corporation, USA) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Orale Volumenbeladung und Parenterale Volumenexpansion (VE)

3.1.1. Stoffwechselkäfigversuche mit wachen Mäusen

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse findet sich in *Tabelle 1*. Es fällt zunächst auf, dass bei ähnlichem Alter der Tiere das durchschnittliche Gewicht der beiden Knockout-Gruppen (KO) jeweils größer war als die der dazugehörigen Wildtypgruppen (WT), die als Kontrollen dienten. Die Exkretionswerte wurden auf 100 g Körpergewicht bezogen. Die Ergebnisse der NS-Gruppen dienen als Vergleichsgrundlage für die HS-Gruppen. Sie stammen aus früheren Studien unserer Arbeitsgruppe.

Die Trink- und Urinvolumina aller vier Gruppen entsprachen sich in etwa, dabei war die durchschnittliche Flüssigkeitsbilanz der Tiere (Differenz aus Trink- und Urinvolumen) bei allen Gruppen negativ, jedoch nur etwa halb so groß wie der durchschnittliche Gewichtsverlust aller Tiere. Im Überblick ist zu erkennen, dass die KO-Gruppen keine signifikanten Unterschiede in den Werten für Trink- und Urinvolumen sowie den Exkretionswerten gegenüber den WT-Mäusen aufwiesen. Dies war unabhängig von der Salzdiät.

Innerhalb der ersten Stunde schieden die Tiere durchschnittlich 0,50 ml aus, in der anschließenden dreistündigen Phase betrug der Wert 1,22 ml. Gegenüber den NS-Gruppen war in beiden HS-Gruppen in der Frühphase der Sammelperiode eine verminderte Elektrolytexkretion zu erkennen. So lag die Natriumausscheidung der NS-Tiere in der frühen Phase bei 12,87 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$, wogegen die HS-Tiere mit 10,63 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$ einen um 15% niedrigeren Wert erreichten. Die Chloridausscheidung der NS-Gruppen betrug 12,24 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$, die der HS-Gruppen lag um 8% unter diesem Wert.

Betrachtet man die Ausscheidungswerte für Kalium, so beläuft sich dieser Unterschied auf 25%, bei einem Basalwert der NS-Gruppen von 2,22 $\mu\text{mol}/\text{min}/100\text{g}$. Eine um 20% erniedrigte Gesamtosmolalität des Urins der Frühphase spiegelte dies wieder. Die Werte für die Spätphasen waren bei den HS-Gruppen mindestens so hoch wie bei den NS-Gruppen. Die an Salz gewöhnten hochsalzernährten Tier scheiden also oral zugeführtes Kochsalz langsamer wieder aus als die NS-Tiere. Jedoch war die Natriumbilanz, d.h. der prozentuale Anteil der von der Beladung innerhalb der gesamten vierstündigen Versuchsdauer ausgeschieden wurde, in allen vier Gruppen nahezu identisch. Allen Gruppen gelang es, in den vier Stunden gleichermaßen ungefähr 60% des zugeführten Natriums wieder auszuschcheiden. Dabei war die Chloridexkretion mit der des Natriums korreliert.

Tabelle 1 Die Ergebnisse der Stoffwechselläufigversuche mit wachen Mäusen, normal- und hochsalzernährt (NS/HS). Verglichen wurden die D3-Knockouttiere (KO) gegenüber den Wildtyptieren (WT). Den Tieren wurde 4%-ige NaCl-Lösung sondiert, wobei die Menge in ml 5% des Körpergewichtes entsprach. Die Tiere wurden insgesamt vier Stunden nüchtern in Stoffwechselläufigen gehalten. Die Ergebnisse der NS-Gruppen dienen als Vergleichsgrundlage für die HS-Gruppen, sie sind im Rahmen einer zurückliegenden Doktorarbeit unserer Arbeitsgruppe erhoben worden. Die Natriumbilanz gibt den Anteil des ausgeschiedenen Natriums an der zugeführten Menge an. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe (n)	NS-WT (8)	NS-KO (9)	HS-WT (9)	HS-KO (9)
Tiergewicht initial [g]	21,05 \pm 0,60	29,32 \pm 0,54*	24,23 \pm 0,47°	26,36 \pm 0,65°*
Gewichtsverlust über 4h [g]	-0,96 \pm 0,12	-1,44 \pm 0,16	-1,67 \pm 0,13	-1,13 \pm 0,12 *
Trinkvolumen (1h) [ml]	0,49 \pm 0,07	0,60 \pm 0,06	0,61 \pm 0,13	0,32 \pm 0,07
Trinkvolumen (3h) [ml]	0,80 \pm 0,18	0,62 \pm 0,21	0,57 \pm 0,05	0,40 \pm 0,03
Urinvolumen (1h) [ml]	0,46 \pm 0,05	0,64 \pm 0,05	0,40 \pm 0,05	0,48 \pm 0,06
Urinvolumen (3h) [ml]	0,93 \pm 0,09	1,41 \pm 0,17	1,56 \pm 0,11°	0,96 \pm 0,12*
Na-Exkretion (1h) [μ mol/min/100g]	13,47 \pm 1,42	12,26 \pm 1,26	9,99 \pm 1,36	11,27 \pm 1,71
Na-Exkretion (3h) [μ mol/min/100g]	6,60 \pm 0,54	7,52 \pm 0,63	8,03 \pm 0,34	6,86 \pm 0,67
Cl-Exkretion (1h) [μ mol/min/100g]	11,15 \pm 1,43	13,32 \pm 0,98	10,64 \pm 1,49	11,92 \pm 1,73
Cl-Exkretion (3h) [μ mol/min/100g]	6,63 \pm 0,59	7,74 \pm 0,61	8,54 \pm 0,36	7,47 \pm 0,77
K-Exkretion (1h) [μ mol/min/100g]	2,11 \pm 0,18	2,33 \pm 0,25	1,75 \pm 0,33	1,51 \pm 0,15
K-Exkretion (3h) [μ mol/min/100g]	0,76 \pm 0,10	1,06 \pm 0,07	0,85 \pm 0,08	1,00 \pm 0,11
Osmolalität (1h) [osmol/kg]	1,03 \pm 0,06	0,97 \pm 0,02	0,76 \pm 0,10°	0,81 \pm 0,05
Osmolalität (3h) [osmol/kg]	0,67 \pm 0,02	0,75 \pm 0,05	0,58 \pm 0,03	0,82 \pm 0,05*
Na-Bilanz [% der Beladung]	57,96 \pm 1,56	60,58 \pm 4,16	60,26 \pm 3,15	53,00 \pm 5,04

*p<0,05 KO versus WT (ANOVA)

°p<0,05 HS versus NS (ANOVA)

3.1.2. Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen

Die Volumenexpansion (VE) wurde an normal- und hochsalzernährten Mäusen (NS/HS) durchgeführt. Als Zeitkontrollgruppen (CON) wurden Tiere eingesetzt, die keine VE erhielten. In *Tabelle 2a* sind die Variablen zusammengefasst, die sich auf die Nierenfunktion beziehen, *Tabelle 2b* zeigt die entsprechenden systemischen Variablen. Zwischen den Basalperioden der einzelnen Gruppen waren statistisch keine signifikanten Unterschiede zu beobachten.

Die GFR wies weder beim Vergleich der Hauptperioden (HP) mit den Basalperioden (BP) innerhalb einer Gruppe, noch beim Vergleich der Gruppen untereinander einen Unterschied auf. Zwischen den Knockouttieren (KO) und den Wildtyptieren (WT) waren somit keine Unterschiede erkennbar. Alle Werte lagen ungefähr bei 0,52 ml/min/g NG. Lediglich die Zeitkontrollgruppen ließen über die Gesamtdauer der Versuche einen Zeiteffekt erkennen: Hier sank die GFR im Laufe der Zeit um circa 10% ab. Dieser Effekt fand sich bei den VE-Gruppen nicht, ihre GFR blieb stabil oder steigerte sich geringfügig.

Das Urinzeitvolumen (UV) betrug bei allen Gruppen basal ungefähr 10,2 μ l/min/g NG. Während bei den CON-Gruppen eine Steigerung um den Faktor 1,2 bis 2 im Versuchsverlauf zu beobachten war, erhöhte sich das UV bei den Gruppen mit VE auf annähernd das Fünffache. *Abbildung 10* veranschaulicht dies. Die eingezeichneten Geraden markieren diejenigen Zeitvolumina, die der Infusion pro Zeit entsprechen. Die Graphiken zeigen also, dass alle Gruppen in etwa ausgeglichen bilanziert waren, da das Infusionszeitvolumen in etwa dem UV entsprach.

Ähnlich verhielt es sich mit der Natriumausscheidung (U_{NaV}). Während die CON-Gruppen gleichermaßen auf das 2,3-fache anstiegen schwankte der Faktor bei den VE-Gruppen zwischen 4 und 6. KO- und WT-Tiere reagierten somit in ähnlichem Ausmaß auf die VE mit einer Natriuresis. Auch hier zeigte sich, dass die Tiere bezüglich der Natriumbilanz relativ ausgeglichen waren. Die Natriummenge, die kontinuierlich infundiert wurde belief sich bei den CON-Gruppen und VE-Gruppen auf 2,3 bez. 8,7 μ mol/min/g NG.

Die fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) erhöhte sich bei den Zeitkontrollen gleichermaßen um den Faktor 2,7 bei den VE-NS-Tieren um 5 und bei den VE-HS-Tieren um 4,5. Auch hier wurden keine Unterschiede zwischen KO- und WT-Tieren beobachtet.

Hatte die Salzdiät und die VE keinen Einfluss auf den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP), war dagegen bei KO-Tieren ein durchschnittlich um 9% erhöhter MAP zu beobachten. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant. Die Herzfrequenz (HF) war bei allen sechs Gruppen ähnlich und lag in einem Bereich von 490-580 pro Minute. In allen KO-Gruppen war ein – im Gegensatz zu den WT-Tieren – um circa 4% erhöhter Hämatokritwert (Hkt) zu messen. Außerdem fiel der Hkt bei VE um ungefähr 7% als Ausdruck eines Verdünnungseffektes, wogegen die Zeitkontrollen nur durchschnittlich 3,2% verloren. Die Natriumkonzentration in Plasma (Na_{Plasma}) lag in allen sechs Gruppen bei knapp 140 mmol/l. Keine der untersuchten Bedingungen vermochte dies zu verändern.

Tabelle 2a Nierenfunktionsvariablen bei den Clearanceversuchen an narkotisierten Mäusen. Verglichen wurden die Knockouttiere (KO) mit den Wildtyp-Tiere (WT). Außerdem wurden die Auswirkungen von Volumenexpansion (VE) gegenüber den Zeitkontrollen (CON) getestet. Die Gruppen mit VE erhielten ein erhöhtes Infusionsvolumen in den Hauptperioden (HP) (s. 2.3.2.3. Infusion). Die Versuche dauerten jeweils 150 Minuten. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	Periode	GFR	UV	U _{Na} V	FE _{Na}
		[ml/min/g NG]	[μ l/min/g NG]	[μ mol/min/g NG]	[%]
CON-WT (n=10)	Basal	0,50 \pm 0,05	11,0 \pm 3,3	0,97 \pm 0,35	1,85 \pm 0,73
	HP1	0,45 \pm 0,05	16,9 \pm 3,3	1,38 \pm 0,47	3,86 \pm 1,20
	HP2	0,52 \pm 0,06	17,8 \pm 3,8	2,17 \pm 0,52	3,98 \pm 1,22
	HP3	0,45 \pm 0,04	15,8 \pm 3,7	2,27 \pm 0,51	5,45 \pm 1,96
CON-KO (n=10)	Basal	0,52 \pm 0,04	7,3 \pm 2,2	0,89 \pm 0,23	1,30 \pm 0,37
	HP1	0,52 \pm 0,04	13,6 \pm 3,5	1,84 \pm 0,40	2,72 \pm 0,67
	HP2	0,48 \pm 0,06	18,4 \pm 3,2	2,52 \pm 0,40*	4,07 \pm 0,79
	HP3	0,47 \pm 0,12	16,3 \pm 5,4	2,13 \pm 0,70	3,78 \pm 1,32
VE-NS-WT (n=7)	Basal	0,56 \pm 0,04	9,8 \pm 2,8	0,62 \pm 0,17	0,86 \pm 0,25
	HP1	0,56 \pm 0,04	27,1 \pm 8,6	2,51 \pm 0,78	3,65 \pm 1,32
	HP2	0,57 \pm 0,05	48,4 \pm 14,5*	5,83 \pm 1,90*	6,91 \pm 1,76*
	HP3	0,57 \pm 0,04	39,9 \pm 9,4	5,46 \pm 1,32*	7,40 \pm 1,55*
VE-NS-KO (n=8)	Basal	0,48 \pm 0,06	9,3 \pm 2,9	1,79 \pm 0,94	2,03 \pm 0,91
	HP1	0,61 \pm 0,05	28,1 \pm 6,2	3,56 \pm 1,61	4,15 \pm 1,70
	HP2	0,63 \pm 0,04	47,6 \pm 9,7*	4,30 \pm 1,95	4,93 \pm 2,06
	HP3	0,54 \pm 0,04	50,2 \pm 8,9*	6,26 \pm 2,62	7,56 \pm 2,46
VE-HS-WT (n=5)	Basal	0,49 \pm 0,07	11,2 \pm 1,5	1,24 \pm 0,47	2,04 \pm 0,87
	HP1	0,47 \pm 0,05	20,7 \pm 3,1	2,24 \pm 0,25	3,62 \pm 0,53
	HP2	0,64 \pm 0,09	50,8 \pm 6,0*	7,65 \pm 0,92*	9,45 \pm 1,51*
	HP3	0,49 \pm 0,05	50,5 \pm 5,9*	7,81 \pm 0,96*	13,21 \pm 2,46*
VE-HS-KO (n=7)	Basal	0,51 \pm 0,04	12,4 \pm 4,2	2,04 \pm 0,67	3,48 \pm 1,56
	HP1	0,58 \pm 0,04	16,4 \pm 2,9	4,14 \pm 0,48	5,63 \pm 0,92
	HP2	0,48 \pm 0,05	53,2 \pm 5,6*	8,15 \pm 0,96*	12,10 \pm 0,89*
	HP3	0,53 \pm 0,04	58,4 \pm 5,0*	8,85 \pm 0,88*	11,53 \pm 0,52*

*p<0,05 Hauptperioden 1-3 versus Basalperioden (ANOVA)

Tabelle 2b Systemische Variablen bei den Clearanceversuchen an narkotisierten Mäusen. Verglichen wurden die Knockouttiere (KO) mit den Wildtypiere (WT). Außerdem wurden die Auswirkungen von Volumenexpansion (VE) gegenüber den Zeitkontrollen (CON) getestet. Die Gruppen mit VE erhielten ein erhöhtes Infusionsvolumen in den Hauptperioden (HP) (s. 2.3.2.3. Infusion). Die Versuche dauerten jeweils 150 Minuten. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	Periode	MAP [mmHg]	HF [1/min]	Hkt [%]	Na _{Plasma} [mmol/l]
CON-WT (n=10)	Basal	90,2 \pm 3,6	493,9 \pm 28,1	39,6 \pm 1,2	141,6 \pm 4,2
	HP1	93,6 \pm 4,5	523,9 \pm 22,0	38,4 \pm 1,1	140,1 \pm 5,0
	HP2	93,8 \pm 4,5	513,9 \pm 25,2	37,4 \pm 1,1	143,3 \pm 4,1
	HP3	91,9 \pm 3,8	548,6 \pm 25,7	37,2 \pm 1,1	142,4 \pm 4,8
CON-KO (n=10)	Basal	104,8 \pm 4,2	511,6 \pm 10,4	44,5 \pm 1,6	137,6 \pm 4,7
	HP1	105,3 \pm 3,6	515,0 \pm 14,7	42,4 \pm 1,6	139,9 \pm 4,9
	HP2	105,8 \pm 4,2	520,9 \pm 16,6	41,2 \pm 1,7	137,8 \pm 4,5
	HP3	105,6 \pm 4,4	542,5 \pm 16,4	40,5 \pm 1,7	139,1 \pm 1,7
VE-NS-WT (n=7)	Basal	94,6 \pm 4,0	500,7 \pm 29,8	38,5 \pm 1,3	141,6 \pm 1,4
	HP1	100,4 \pm 4,2	522,7 \pm 29,8	34,0 \pm 0,8*	135,3 \pm 3,4
	HP2	97,9 \pm 6,1	530,7 \pm 22,8	32,3 \pm 0,9*	142,2 \pm 3,3
	HP3	93,0 \pm 5,1	562,9 \pm 24,0	30,9 \pm 1,0*	140,0 \pm 1,6
VE-NS-KO (n=8)	Basal	99,3 \pm 4,5	514,7 \pm 13,0	42,4 \pm 1,3	141,6 \pm 3,9
	HP1	98,5 \pm 3,9	521,1 \pm 08,8	36,8 \pm 1,2*	140,0 \pm 4,7
	HP2	106,3 \pm 4,2	536,7 \pm 10,1	35,5 \pm 1,4*	135,9 \pm 4,9
	HP3	104,8 \pm 4,7	540,0 \pm 16,9	34,4 \pm 1,3*	137,3 \pm 5,2
VE-HS-WT (n=5)	Basal	96,8 \pm 4,4	491,3 \pm 23,6	40,7 \pm 1,4	138,8 \pm 6,8
	HP1	93,6 \pm 4,4	479,5 \pm 24,1	36,0 \pm 1,2*	140,0 \pm 7,2
	HP2	99,0 \pm 4,2	558,8 \pm 31,9	34,6 \pm 1,2*	141,7 \pm 5,8
	HP3	89,8 \pm 4,4	586,3 \pm 12,2*	33,4 \pm 1,1*	131,3 \pm 9,0
VE-HS-KO (n=7)	Basal	100,6 \pm 5,1	492,1 \pm 21,9	44,1 \pm 1,2	139,2 \pm 2,4
	HP1	108,0 \pm 4,8	520,7 \pm 20,4	41,7 \pm 0,9	136,5 \pm 3,9
	HP2	107,4 \pm 4,4	544,3 \pm 17,7	40,1 \pm 1,4	140,9 \pm 4,1
	HP3	102,0 \pm 2,4	541,7 \pm 08,6	39,3 \pm 1,4*	144,7 \pm 4,9

*p<0,05 Hauptperioden 1-3 versus Basalperioden (ANOVA)

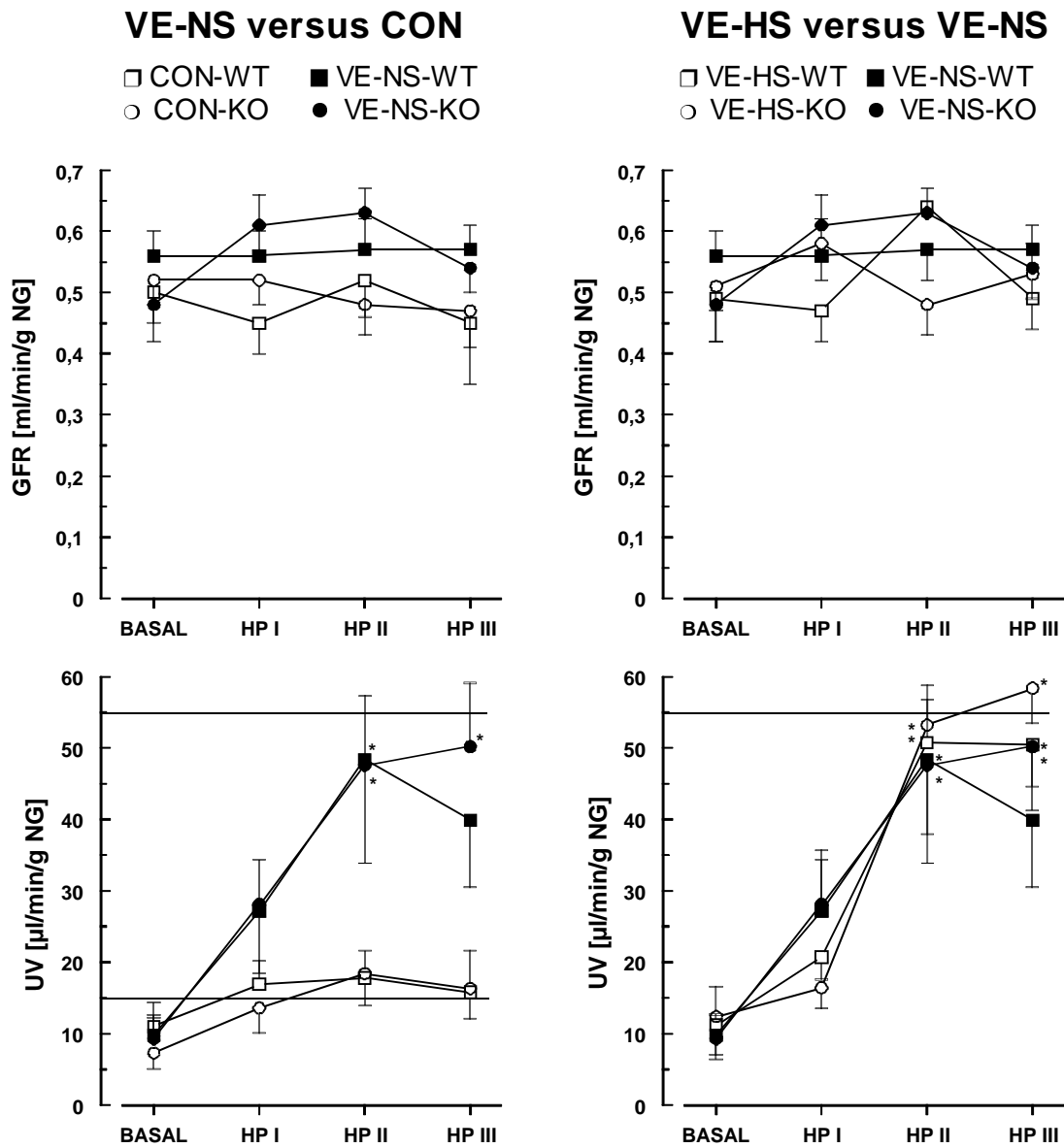


Abbildung 10: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und Urinzeitvolumen (UV) in Clearanceversuchen. Links die normalsalzernährten Gruppen (NS) mit Volumenexpansion im Vergleich mit den Kontrollgruppen (CON) und rechts die hochsalzernährten Gruppen mit Volumenexpansion im Vergleich mit den entsprechenden normalsalzernährten Gruppen mit Volumenexpansion. Die eingezeichneten Geraden markieren diejenigen Zeitvolumina, die der Infusion pro Zeit entsprechen (ausgeglichene Bilanzierung). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ Hauptperioden I-III versus Basalperioden (ANOVA)

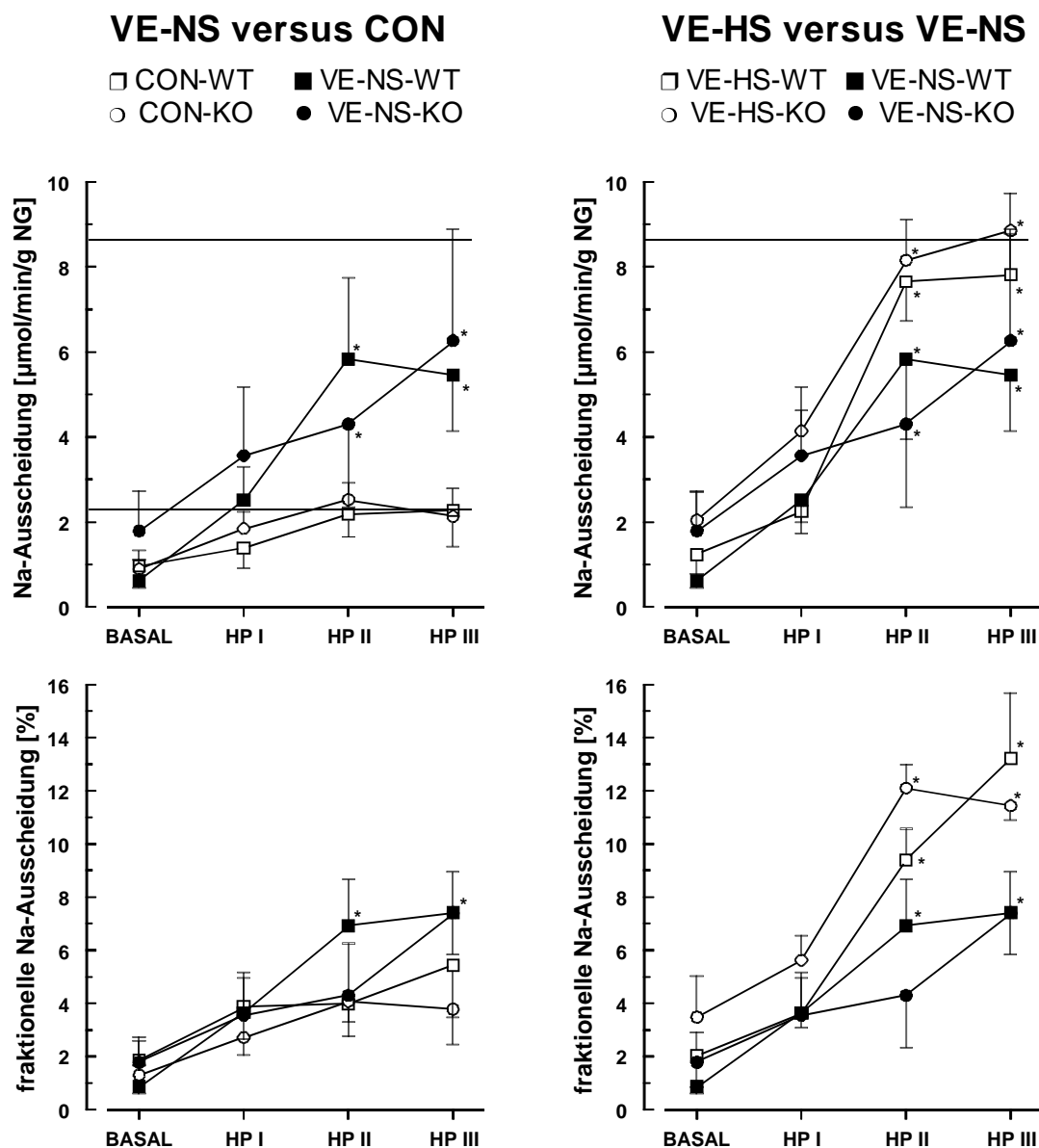


Abbildung 11: Natriumausscheidung ($U\text{-Na-V}$) und fraktionelle Natriumausscheidung ($FE\text{-Na}$) in Clearanceversuchen. Links die normalsalzernährten Gruppen (NS) mit Volumen-expansion im Vergleich mit den Kontrollgruppen (CON) und rechts die hochsalzernährten Gruppen mit Volumenexpansion im Vergleich mit den entsprechenden normalsalzernährten Gruppen mit Volumenexpansion. Die eingezeichneten Geraden markieren diejenigen Ausscheidungsmengen, die der Infusion von Natrium pro Zeit entsprechen (ausgeglichene Bilanzierung).

Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

* $p < 0,05$ Hauptperioden I-III versus Basalperioden (ANOVA)

3.2. Diabetes mellitus (DM)

3.2.1. Stoffwechselkäfigversuche mit wachen Mäusen

Im Gegensatz zu den Kontrollen waren die hyperglykämischen Tiere etwas leichter und zeigten bei den sechs Stunden dauernden Stoffwechselkäfigversuchen einem um 30% größeren absoluten Gewichtsverlust (s. *Tabelle 3*). Der relative Gewichtsverlust betrug 13% bei den DM-Gruppen gegenüber 8% Verlust bei den Kontrollgruppen. Ferner ist ein signifikant niedrigeres Tiergewicht in der DM-KO Gruppe nach Diabetesinduktion auffällig; dies war auch in Clearanceversuchen (s. *Kapitel 3.2.2.*) mit größeren n-Zahlen zu beobachten.

Desweiteren waren, wie zu erwarten, große Unterschiede in den Plasma-glucosewerten meßbar. Die durchschnittliche Glucosekonzentration im Plasma der hyperglykämischen Tiere stieg auf das 3,3-fache an, im Urin war sogar eine Steigerung um den Faktor 200 gegenüber den normoglykämischen Tieren zu verzeichnen. Dieser Anstieg war auch für die tiergewichtsbezogene Glucoseausscheidung zu beobachten, wo sich hierbei ein Faktor von 300 einstellte. Die Tiere der Kontrollgruppe schieden in sechs Stunden circa 1,25 mg/100g aus, die diabetischen Tiere dagegen durchschnittlich 380 mg/100g. *Abbildung 12* verdeutlicht diese Unterschiede.

Die Werte der Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung lagen mit ungefähr 1 µmol/min/100g Tiergewicht bei allen vier Gruppen sehr eng beieinander. Die Tiere der DM-KO-Gruppe schieden gegenüber der DM-WT-Gruppe vermehrt Elektrolyte aus, ungefähr 30% mehr Natrium und Chlorid, sowie 10% mehr Kalium. Bei den Kontrollgruppen war dieser Unterschied ins Gegenteil verkehrt, hier schieden die KO-Tiere z.T. deutlich weniger aus. Keine der genannten Unterschiede erreichte jedoch das Signifikanzniveau, da die interindividuellen Variabilitäten innerhalb der Gruppen zu groß waren.

Auch die Werte für die Osmolalität des Urins zeigten keine signifikanten Unterschiede in den einzelnen Gruppen. Bei den Osmolalitätsmessungen fiel

auf, dass trotz großer Unterschiede der Glucosekonzentrationen im Urin die Werte der DM-Gruppen ähnlich denen der WT-Gruppen waren, bei wiederum ähnlichen Ausscheidungswerten für Natrium, Kalium und Chlorid.

Tabelle 3 Die Stoffwechselläufigversuche mit wachen, diabetischen und nicht-diabetischen Mäusen (DM/CON). Verglichen wurden die Knockouttiere (KO) gegen die Wildtypiere (WT). Alle Tiere wurden insgesamt sechs Stunden nüchtern in Stoffwechselläufigen gehalten. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe (n)	CON-WT (6)	CON-KO (6)	DM-WT (8)	DM-KO (6)
Tiergewicht [g]	26,21 \pm 0,13	27,37 \pm 0,55	24,56 \pm 0,43	22,26 \pm 0,65 ^{°*}
Gewichtsverlust [g]	-2,03 \pm 0,13	-2,06 \pm 0,14	-3,00 \pm 0,29 [°]	-3,00 \pm 0,31 [°]
Trinkvolumen [ml]	0,70 \pm 0,16	1,20 \pm 0,40	0,63 \pm 0,12	0,90 \pm 0,30
Urinvolumen [ml]	0,83 \pm 0,09	0,73 \pm 0,04	1,18 \pm 0,08	0,93 \pm 0,21
Glucose Plasma [mg/dl]	199,3 \pm 6,3	189,0 \pm 3,37	591,8 \pm 45,9 [°]	707,7 \pm 30,8 [°]
Glucose Urin [g/dl]	0,042 \pm 0,008	0,044 \pm 0,008	9,954 \pm 0,383 [°]	7,188 \pm 0,826 [°]
Glu Exkretion (mg/6h/100g)	1,37 \pm 0,27	1,13 \pm 0,18	468,81 \pm 48,78 [°]	292,59 \pm 85,0 [°]
Na-Exkretion [μ mol/min/100g]	0,953 \pm 0,117	1,012 \pm 0,161	1,004 \pm 0,192	1,396 \pm 0,210
K-Exkretion [μ mol/min/100g]	1,789 \pm 0,330	1,035 \pm 0,100	1,144 \pm 0,080	1,254 \pm 0,230
Cl-Exkretion [μ mol/min/100g]	1,057 \pm 0,150	0,854 \pm 0,060	0,969 \pm 0,140	1,374 \pm 0,190
Osmolalität [osmol/kg]	1,220 \pm 0,100	1,006 \pm 0,020	1,255 \pm 0,060	1,346 \pm 0,150

*p<0,05 KO versus WT (ANOVA)

°p<0,05 DM versus CON (ANOVA)

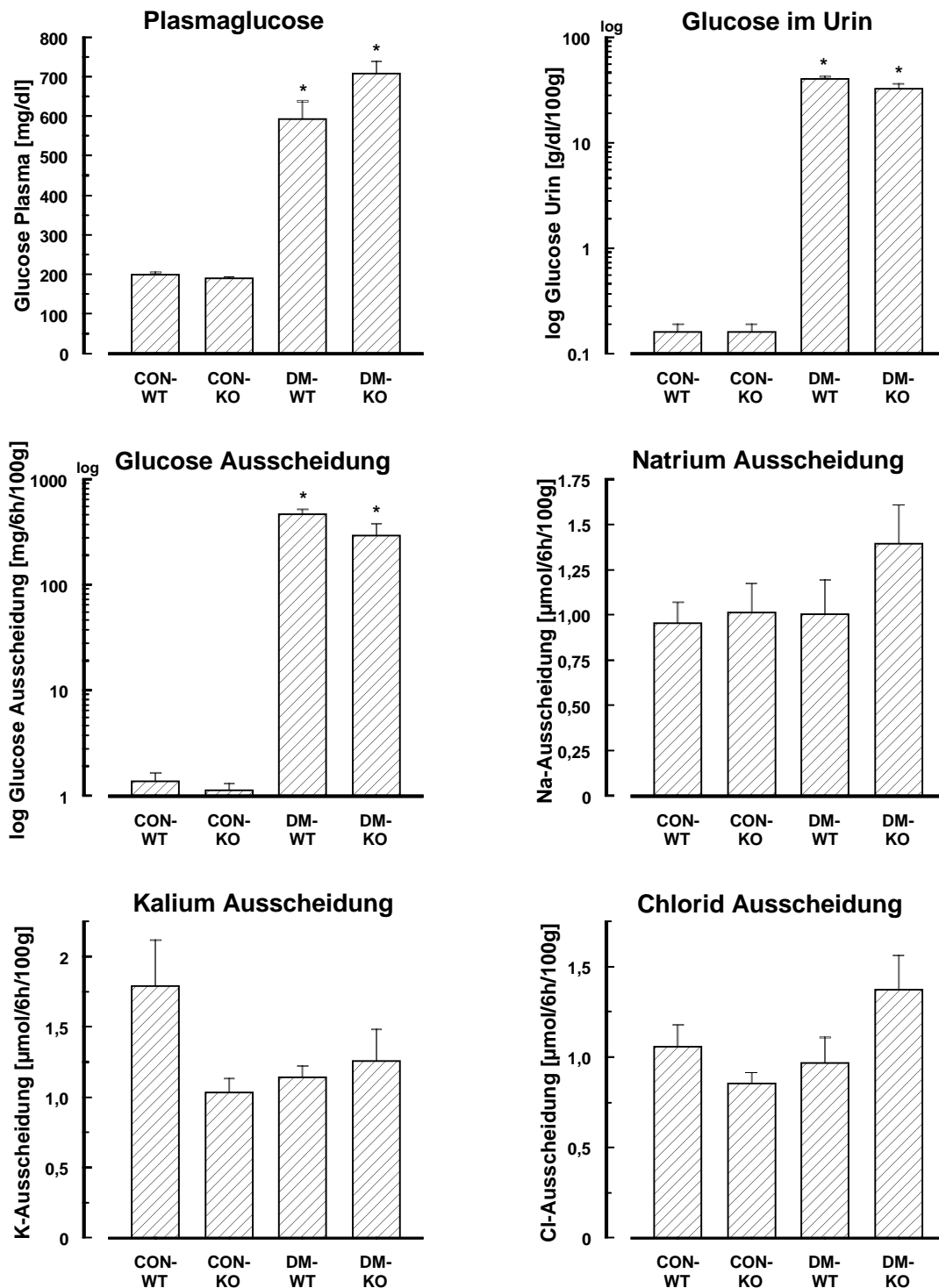


Abbildung 12: Darstellung der Ergebnisse von sechsstündigen Stoffwechselfähigkeitsversuchen. Verglichen wurden Knockouttiere (KO) gegenüber Wildtypischen (WT). Außerdem wurden diabetische Tiere (DM) gegen Kontrolltiere (CON) getestet. Man beachte die z.T. logarithmische Darstellung. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ KO versus WT (ANOVA)

3.2.2. Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen

Die Zusammenstellung der Ergebnisse dieser Versuche findet sich in *Tabelle 4a+b* und *Abbildung 13*. Die DM-Tiere unterschieden sich von ihren Kontrollgruppen zunächst im Urinzeitvolumen (UV), das um den Faktor 2,4 signifikant gegenüber den CON-Tieren erhöht war. Während die DM-Mäuse durchschnittlich 26,9 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ NG ausschieden, erreichten die CON-Tieren lediglich einen Wert von 11,2 $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ NG. Außerdem fiel hier ein Unterschied zwischen den KO- und den WT-Tieren auf: Das UV war bei den WT-Gruppen jeweils durchschnittlich um 25% größer als bei den KO-Gruppen, was jedoch das Signifikanzniveau nicht erreichte. Als Zeiteffekt trat eine Steigerung des UV auf. Pro Periode nahm das UV der CON-Tiere um circa 30% zu, bei den DM-Tieren – bei höheren Basalwerten – betrug diese Steigerung 12%. Dieses Verhalten setzt sich auch in den anderen Ausscheidungswerten fort.

Die absolute Natriumausscheidung der diabetischen Tieren war ungefähr um das Dreifache gegenüber den nicht-diabetischen Tieren gesteigert. Dies gilt für die KO-Gruppe im gleichen Maße wie für die WT-Gruppe. Die fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) unterschied sich in den einzelnen Gruppen nicht signifikant. Es war eine signifikante Steigerung in der dritten Basalperiode gegenüber der ersten zu beobachten, und zwar in allen vier Gruppen als Zeiteffekt.

Gegenüber den WT-Tieren wies die KO-Gruppe unter nicht-diabetischen Bedingungen einen um 13% erhöhten mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) auf. Dieser schon in *Kapitel 3.1.2.* festgestellte, aber statistisch nicht signifikante Blutdruckunterschied, war bei diabetischen Bedingungen nicht zu beobachten. Hier erreichten auch die WT-Tiere ähnlich hohe Werte wie die KO-Tiere. Der Durchschnittswert der DM-Gruppen lag bei 102 mmHg, der Wert der CON-Tiere betrug 98 mmHg. Desgleichen war die Herzfrequenz (HF) bei den KO-Gruppen um 6% höher als bei den WT-Tieren. Dies galt für DM-Mäuse gleichermaßen wie für die CON-Tiere. Die Mittelwerte lagen in einem Bereich von 480 bis 530

pro Minute. Die ebenfalls schon in *Kapitel 3.1.2.* beobachtete Differenz der Hämatokritwerte (Hkt) von KO- und WT-Tieren betrug bei den CON-Gruppen 4,5% und bei den DM-Gruppen 2,6%. Dagegen zeigten sich bei der Natriumkonzentration im Plasma ($\text{Na}_{\text{Plasma}}$) keine Unterschiede zwischen den vier Gruppen. Alle Werte lagen bei ungefähr 140 mmol/l.

Die durchschnittliche glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der CON-Gruppen betrug 0,50 ml/min/g NG. In der DM-Gruppe war bei den Wildtyptieren in der ersten Periode ein Wert von 0,93 ml/min/g NG zu messen, der im Verlauf des Versuches auf 0,70 ml/min/g NG absank. Die Knockouttiere zeigten geringere GFR-Werte: Von 0,70 sank der Wert im Verlauf auf 0,61 ml/min/g NG. Es zeigten sich also in beiden diabetischen Tiergruppen signifikant höhere Werte gegenüber den Kontrollgruppen. Jedoch war hier ein Unterschied zu beobachten: Während die Wildtyptiere (WT) um 73% höhere Werte zeigten, war der Wert der Knockoutgruppe (KO) nur um 25% gegenüber den entsprechenden CON-Gruppen erhöht. So hatte die DM-KO-Gruppe signifikant niedrigere GFR-Werte im Vergleich mit der DM-WT-Gruppe. Im Gegensatz dazu zeigte die DM-WT-Gruppe die höchsten GFR-Werten überhaupt, wobei ein leichter Abfall im Verlauf der Versuche zu verzeichnen war: Der GFR-Wert der dritten Periode war signifikant niedriger als der der ersten. Ein GFR-Abfall im Verlauf des Versuches ist zwar auch bei den anderen Gruppen zu erkennen, jedoch geringer ausgeprägt und nicht signifikant (s. *Abbildung 13*).

In der Kontrollgruppe (CON) wogen die WT-Tiere durchschnittlich 26,8g \pm 0,82g, die KO-Tiere kamen auf 32,0g \pm 0,76g. Bei den diabetischen Tiere war das Gewicht bei den WT-Tieren um 6% reduziert: DM-WT 25,1g \pm 0,55g und bei den KO-Tieren um 25%: Die Tiere der Gruppe DM-KO wogen durchschnittlich 24,0g \pm 0,77g.

Tabelle 4a Nierenvariablen bei den Clearanceversuchen an narkotisierten Mäusen. Normo- und hyperglykämische Tiere (CON/DM). Knockouttiere (KO), Wildtyp (WT). Die Versuche dauerten jeweils 90 Minuten. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	Periode	GFR [ml/min/g NG]	UV [μ l/min/g NG]	$U_{Na}V$ [μ mol/min/g NG]	FE_{Na} [%]
CON-WT (n=10)	BP 1	0,51 \pm 0,06	9,0 \pm 2,7	0,70 \pm 0,25	1,39 \pm 0,60
	BP 2	0,48 \pm 0,05	13,0 \pm 4,0	1,24 \pm 0,44	2,32 \pm 0,87
	BP 3	0,45 \pm 0,05	16,9 \pm 3,8	1,89 \pm 0,48	3,86 \pm 1,20
CON-KO (n=10)	BP 1	0,53 \pm 0,05	5,62 \pm 1,6	0,62 \pm 0,15	0,91 \pm 0,26
	BP 2	0,51 \pm 0,03	8,90 \pm 2,9	1,17 \pm 0,34	1,70 \pm 0,51
	BP 3	0,52 \pm 0,04	13,6 \pm 3,5	1,84 \pm 0,40°	2,72 \pm 0,67°
DM-WT (n=10)	BP 1	0,93 \pm 0,08	26,5 \pm 4,8	2,72 \pm 0,61	2,14 \pm 0,47
	BP 2	0,86 \pm 0,04 }#	31,1 \pm 5,2 }#	3,90 \pm 0,83 }#	3,22 \pm 0,65
	BP 3	0,70 \pm 0,04°	33,1 \pm 3,7	4,30 \pm 0,48	4,62 \pm 0,50°
DM-KO (n=10)	BP 1	0,70 \pm 0,06	20,9 \pm 4,5	2,89 \pm 0,85	2,58 \pm 0,67
	BP 2	0,63 \pm 0,06 }◆	22,6 \pm 4,0 }#	3,79 \pm 0,96 }#	3,80 \pm 0,70
	BP 3	0,61 \pm 0,05	27,1 \pm 2,7	4,48 \pm 0,58	4,97 \pm 0,54°

◆ p<0,05 KO versus WT, Bezug auf Mittelwert von Basal 1-3 (ANOVA)

p<0,05 DM versus CON, Bezug auf Mittelwert von Basal 1-3 (ANOVA)

° p<0,05 Basalperiode 2 oder 3 versus Basalperiode 1 (ANOVA)

Tabelle 4b Systemische Variablen bei den Clearanceversuchen an narkotisierten Mäusen. Normo- und hyperglykämische Tiere (CON/DM). Knockouttiere (KO), Wildtyp (WT). Die Versuche dauerten jeweils 90 Minuten. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	Periode	MAP [mmHG]	HF [l/min]	Hkt [%]	Na _{Plasma} [mmol/l]
CON-WT (n=10)	BP 1	89,5 \pm 3,8	485,6 \pm 23,0	40,0 \pm 1,2	142,3 \pm 4,0
	BP 2	90,9 \pm 3,7	480,6 \pm 24,0	39,2 \pm 1,1	140,9 \pm 4,8
	BP 3	93,6 \pm 4,5	523,9 \pm 22,0	38,4 \pm 1,1	140,1 \pm 5,0
CON-KO (n=10)	BP 1	102,7 \pm 4,4	502,5 \pm 13,0	45,0 \pm 1,6	134,4 \pm 4,9
	BP 2	106,9 \pm 4,0	520,7 \pm 10,2	44,0 \pm 1,6	140,7 \pm 5,8
	BP 3	105,3 \pm 3,6	515,0 \pm 14,7	42,4 \pm 1,6	139,9 \pm 4,9
DM-WT (n=10)	BP 1	101,4 \pm 2,8	473,2 \pm 16,9	40,8 \pm 1,0	135,0 \pm 4,6
	BP 2	101,4 \pm 3,3	488,8 \pm 18,5	40,2 \pm 0,8	141,5 \pm 4,8
	BP 3	103,3 \pm 3,5	492,0 \pm 17,0	39,0 \pm 0,9	137,6 \pm 4,5
DM-KO (n=10)	BP 1	101,3 \pm 5,6	524,0 \pm 20,2	43,7 \pm 1,7	142,9 \pm 4,2
	BP 2	103,3 \pm 6,7	535,0 \pm 13,0	42,6 \pm 1,5	143,7 \pm 5,7
	BP 3	101,0 \pm 3,6	529,5 \pm 11,3	41,5 \pm 1,4	146,1 \pm 5,9

◆ p<0,05 KO versus WT, Bezug auf Mittelwert von Basal 1-3 (ANOVA)

p<0,05 DM versus CON, Bezug auf Mittelwert von Basal 1-3 (ANOVA)

° p<0,05 Basalperiode 2 oder 3 versus Basalperiode 1 (ANOVA)

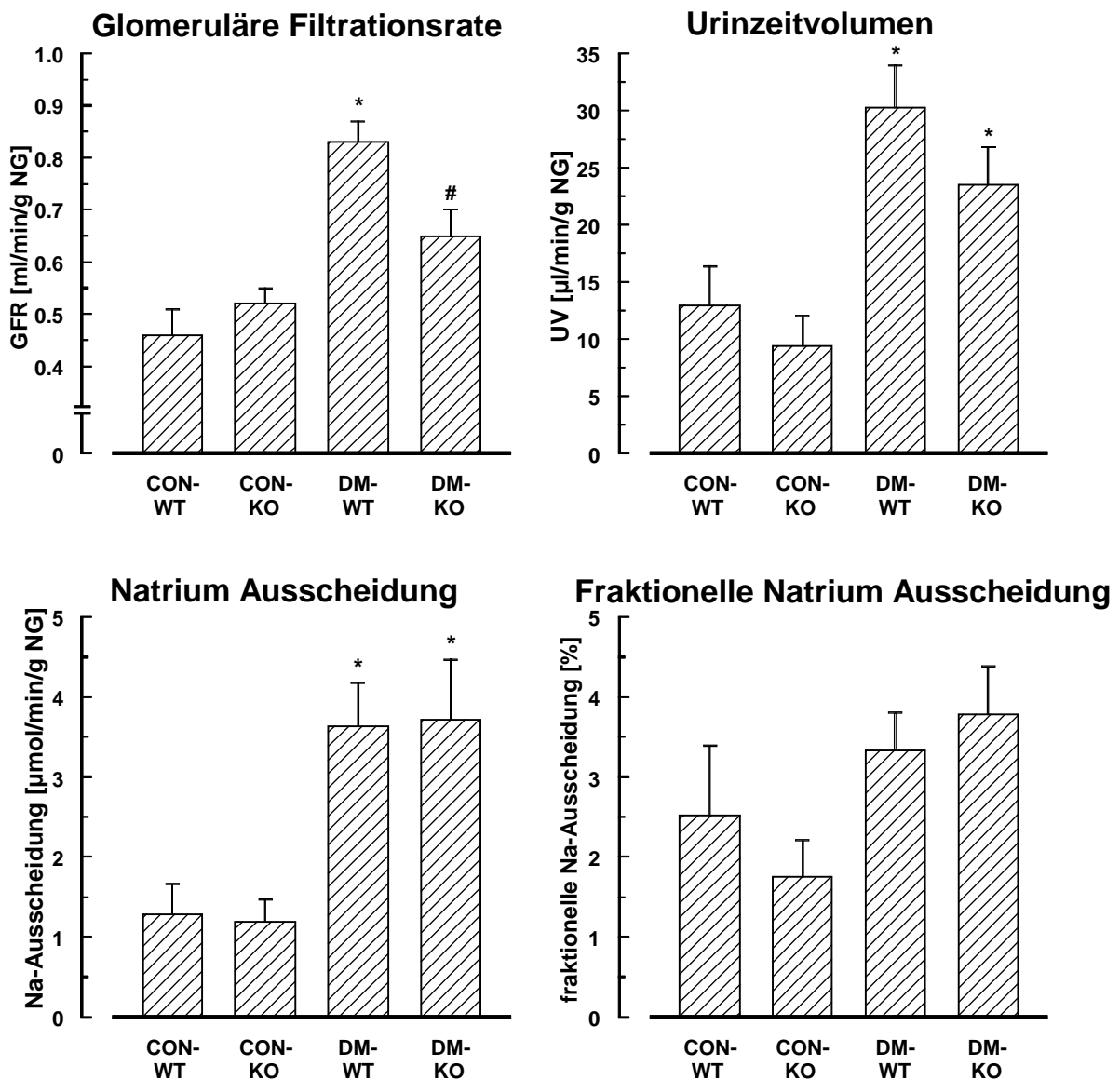


Abbildung 13: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Urinzeitvolumen (UV), Natriumausscheidung (U-Na-V) und fraktionelle Natrium-ausscheidung (FE-Na). Die Clearanceversuche wurden an narkotisierten Mäusen durchgeführt. Diabetische Tiere (DM) wurden mit nicht-diabetischen Kontrollen (CON) verglichen. Die Knockouttiere trugen die Bezeichnung KO und die Wildtypiere WT. Die Versuche dauerten 90 Minuten, alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

* $p < 0,05$ DM versus CON (ANOVA)

$p < 0,05$ KO versus WT (ANOVA)

3.2.3. Nierengewicht und Nierenindex

Tabelle 5 Die durchschnittlichen Körper- und Nierengewichte der einzelnen Versuchsgruppen. Der Nierenindex gibt das Nierengewicht relativ zum Körpergewicht an. Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2.4.

Tiergruppe	Nierengewicht [g]	Körpergewicht [g]	Nierenindex [g/100g]
CON-WT	0,355 ± 0,026	26,75 ± 0,82*	1,31 ± 0,07
CON-KO	0,404 ± 0,026	31,93 ± 0,76	1,26 ± 0,07
DM-WT	0,342 ± 0,015	25,08 ± 0,55*	1,36 ± 0,05
DM-KO	0,371 ± 0,020	23,95 ± 0,77*	1,56 ± 0,09*

*p<0,05 versus CON-KO (ANOVA)

In *Tabelle 5* findet sich die Berechnung der Nierenindices aus den Nieren- und Körpergewichten. Es zeigt sich zunächst, dass die Mittelwerte der Nierengewichte der verschiedenen Gruppen nur unwesentlich voneinander abweichen. Dies zeigen auch die ähnlichen Werte für den Nierenindex. Lediglich der Index der DM-KO-Gruppe lag mit 1,56 oberhalb denen der anderen Gruppen. Desweiteren lagen die Werte der Körpergewichte der diabetischen Tiere 16% unterhalb denen der nicht-diabetischen. Signifikanz-unterschiede ergaben sich jedoch lediglich gegenüber der CON-KO-Gruppe, die das höchste Körpergewicht aufwies.

4. Diskussion

Im Folgenden sollen die Ergebnisse unter vier verschiedenen Aspekten betrachtet werden. Zunächst soll die Salzretention im Vordergrund stehen, danach die Hypertonie, und schließlich soll der Diabetes mellitus und die diabetische Hyperfiltration diskutiert werden.

4.1. D_3 (-/-) und Salzretention

Im Laufe eines Tages wird die gesamte Extrazellulärflüssigkeit der Maus einhundertmal durch die Glomerula der Nieren geschleust, beim Mensch geschieht dies fünfzehnmal [Schnermann 1999]. Nahezu die gesamte filtrierte Salz- und Wassermenge wird in den renalen Tubuli reabsorbiert. Eine genaue Abstimmung zwischen Ultrafiltration einerseits und tubulärer Reabsorption andererseits ist daher unbedingt erforderlich, um lebenswichtige Größen wie Extrazellulärflüssigkeit, Blutdruck oder Organdurchblutung im Gleichgewicht zu halten.

Asico und Mitarbeiter berichteten, dass die Ausschaltung des D_3 -Rezeptorgenes in Mäusen ihre Fähigkeit vermindert, auf eine akute Salzbeladung mit einer gesteigerten Natriurese zu reagieren. Hierbei überstieg die renale Natriumausscheidung bei den transgenen Tieren kaum den Basalwert, während sich die der Wildtypiere verdoppelte [Asico 1998]. Die Hypothese, dass die Ausschaltung des D_3 -Rezeptorgenes mit einer Salzretention verbunden ist, konnte in der vorliegenden Arbeit nicht bestätigt werden. Die Versuche mit akuter Salzbeladung (4%-ige NaCl-Lösung per Schlundsonde, die Menge entsprach 5% des KG) zeigten, dass sowohl in der ersten Phase eine Stunde nach Salzbeladung, wie auch in der anschließenden dreistündigen Phase keine Unterschiede zwischen den D_3 -Knockout (KO) und den Wildtypieren (WT) bestanden (s. *Tabelle 1*). Die Natriumausscheidung war in allen Versuchsgruppen nahezu identisch. Gleiches gilt für die Exkretionswerte von Chlorid und Kalium sowie für die Natriumbilanz des gesamten Versuches. Die

KO-Tiere zeigten in dieser Versuchsanordnung somit keine verminderte Fähigkeit, eine akute Salzbeladung auszuscheiden. Übereinstimmend hierzu waren in den Clearanceexperimenten die Basalwerte für die Natriumausscheidung sowie für die fraktionelle Natriumausscheidung der KO-Tiere nicht vermindert, sondern sogar über denen der entsprechenden WT-Tiere erhöht.

Die Versuchsanordnungen wiesen jedoch einige Unterschiede auf, die die Diskrepanz erklären könnten. Deutliche Unterschiede fanden sich in der Wahl des Narkotikums, dem chirurgischen Eingriff und der Applikationsart der Salzbeladung. In der vorliegenden Arbeit wurden die Stoffwechselkäfigversuche mit wachen Mäusen durchgeführt, im Gegensatz zu narkotisierten Mäusen bei Asico. Das dort verwendete Narkotikum verursacht einen zehnfachen Anstieg der Plasmapreninaktivität [Menton 2000]. Dies aktiviert das renale Renin/Angiotensinsystem, was wiederum erhöhte Angiotensin II und Aldosteronsekretion zur Folge hat. Diese Hormone wirken einer Natriumausscheidung entgegen, da sie die Rückresorption von Natrium fördern. Weiterhin wurden die narkotisierten Mäuse bei Asico tracheotomiert und die Femoralgefäße katheterisiert. Dieser durch den chirurgischen Eingriff verursachte Stress vermindert die physiologischen Fähigkeiten der Versuchstiere [Menton 2000], was eine herabgesetzte Fähigkeit zur Natriumausscheidung bedeuten kann. Diesem Stress wurden die Tiere in dieser Studie nicht ausgesetzt, da im Rahmen von Stoffwechselkäfigversuchen keine Operation stattfand. Ein weiterer Unterschied bestand in der Applikationsart der Salzbeladung. Während Asico die intravenöse Applikation verwendete, wurde in der vorliegenden Arbeit per Schlundsonde der Magen-Darmtrakt sondiert. Möglicherweise wurde überschüssiges Salz gar nicht erst resorbiert und mit dem Faeces ausgeschieden, da bei Salzüberschuss die jejunale Na⁺/K⁺-ATPase gehemmt ist [Vieira-Coelho 1998].

Zusammengefasst besteht die Möglichkeit, dass die Exkretionsleistung der Versuchstiere in der vorliegenden Studie nicht in dem Maße gefordert war, wie bei den Versuchstieren von Asico. Möglicherweise haben erst Asicos Maximalbedingungen einer Natriurese nach Salz- und Volumenbeladung so

entgegengewirkt, dass eine verminderte Fähigkeit zur Salzausscheidung bei Knockouttieren in Erscheinung trat. Anzumerken ist, dass im Gegensatz zu Asicos Versuchen mit narkotisierten Mäusen, die in dieser Studie durchgeführten Stoffwechselläufigversuche eher den physiologischen Bedingungen entsprechen. Weiterhin ist eine direkte Vergleichbarkeit der Versuchstiere möglicherweise nicht gegeben, da die Zuchtlinie von Asicos Mäusen und deren genetischer Hintergrund nicht näher bekannt ist. Darüberhinaus ist schwierig zu interpretieren, dass eine dritte von Asico untersuchte Versuchsgruppe, Mäuse die für den Dopamin D₃-Rezeptor heterozygot waren, mit ihren Ausscheidungswerten für Natrium nicht etwa zwischen denen der Knockouttiere und denen der Wildtypieren lagen, sondern oberhalb denen der Wildtypkontrollen, was gegen dessen Hypothese spricht. Möglicherweise ist die funktionelle Bedeutung von Dopamin im Tubulus beschränkt, wofür auch frühere Arbeiten der eigenen Arbeitsgruppe sprechen. Es konnte bei Versuchen an Ratten kein funktioneller Zusammenhang zwischen der Natrium- und der Dopaminausscheidung gesehen werden [Mühlbauer 1994]. Die von Hussain postulierte Funktion von Dopamin als natriuretisches und diuretisches Hormon muss also in Frage gestellt werden.

Ratten, denen kochsalzreiche Nahrung angeboten wird, müssen das überschüssige Salz wieder ausscheiden. Um eine verstärkte Natriurese zu erreichen, muss die tubuläre Na⁺/K⁺-ATPase gehemmt werden. Diese Hemmung könnte unter anderem dopaminvermittelt sein [Bertorello 1988]. Die Autoren konnten mit Hilfe von *in vitro* Versuche zeigen, dass durch Hemmung der Dopaminsynthese mit Benserazid (AADC-Hemmung) im proximalen Tubulus die Na⁺/K⁺-ATPase hochsalzernährter Tiere auf das Aktivitätsniveau von normalsalzernährten Tieren gebracht werden konnte. Danach müsste ein defekter Dopamin D₃-Rezeptor einen ähnlichen antinatriuretischen Effekt zeigen, wie eine gehemmte Dopaminsynthese. In *Tabelle 1* sind die Ergebnisse der akuten Salzbeladung mit Stoffwechselläufigversuchen und in *Tabelle 2a+2b* die Ergebnisse der Clearanceexperimente mit Volumenexpansion von Tieren zusammengefasst, die mindestens über 14 Tage mit Hochsalznahrung gefüttert

wurden. Diese Hochsalzdiät führte nicht zu unterschiedlichen Exkretionswerten von KO-Tieren im Vergleich zu WT-Tieren. Diese Ergebnisse stehen zunächst im Kontrast zu Studien der eigenen Arbeitsgruppe mit Ratten. Hierbei verminderte ein selektiver D₃-Antagonist bei Salz-resistenten Dahl Ratten die Natriurese. Das Ausscheidungsverhalten glich sowohl bei Stoffwechselkäfigversuchen als auch bei Clearanceexperimenten mit Volumenexpansion dem der Salz-sensitiven Dahl Ratten: Die Salz-resistenten Tiere zeigten die beste Fähigkeit, auf eine Salzbelastung mit einer Steigerung der Natriurese zu reagieren, wogegen die Salz-sensitiven die geringsten Werte für die Natriumausscheidung aufwiesen [Zimmermann 2001]. Es ist jedoch denkbar, dass KO-Tiere, die den genetischen Defekt im D₃-Lokus schon von Geburt an tragen, durch Überexprimierung anderer Rezeptoren sich an die gegebenen Bedingungen anpassen können. Darüberhinaus bleibt eine direkte Vergleichbarkeit zwischen genetisch salzresistenten Dahl Ratten einerseits und transgenen Mäusen andererseits fragwürdig.

4.2. D₃ (-/-) und Hypertonie

Asico berichtete weiterhin über gesteigerte Blutdruckwerte und erhöhte Reninspiegel bei KO-Tieren [Asico 1998]. Auch die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Tendenz erkennen, dass die Ausschaltung des D₃-Genes die Entstehung einer Hypertonie fördert. Während die durchschnittlichen Druckwerte der WT-Tiere unter 100 mmHG lagen, sind die der KO-Tiere über 100 mmHG (s. *Tabelle 2b*). Dieser Unterschied erreichte aufgrund hoher interindividueller Variabilität nicht das Signifikanzniveau. Allerdings stand in dieser Studie der arterielle Blutdruck unter dem Einfluss des Narkotikums. Zur Zeit werden deshalb an den hier verwendeten Knockouttieren Blutdruckmessungen im wachen Zustand durchgeführt.

Eine selektive pharmakologische Stimulation der Dopamin D₃-Rezeptoren bewirkte bei Ratten einen Anstieg der glomerulären Filtrationsrate und der Natriumausscheidung [Luippold 2000]. Eine Ausschaltung des D₃-Rezeptorgenes könnte demnach langfristig zu einer Zunahme des Extrazellulärvolumens führen und so die Entstehung einer Hypertonie begünstigen. Jedoch wiesen transgene Mäuse ohne D₃-Rezeptor keine basalen Veränderung der GFR gegenüber ihren Kontrollen auf (s. *Tabelle 2a*). Ebenso waren die Werte für das Urinzeitvolumen und die Natriumausscheidung der KO-Tiere ähnlich denen der WT-Kontrollgruppen. Eine mögliche Hypertonie der transgenen Tiere scheint somit nicht durch Veränderungen der glomerulären Hämodynamik verursacht zu sein. Eine weitere Erklärung könnte eine Steigerung der Reninaktivität darstellen. In den juxtaglomerulären Zellen des extrazellulären Mesangiums – als Ort der Reninproduktion und -sekretion – wurden, wie bereits beschrieben, D₁- und D₃-Rezeptoren nachgewiesen [Sanada 1997]. Da eine Stimulation der D₁-Rezeptoren zu einer Erhöhung der Reninaktivität führen soll [Yamaguchi 1997], ist es möglich, dass die D₃-Rezeptoren im Sinne einer inhibitorischen Autorezeption die Reninsekretion hemmen. Eine Ausschaltung des D₃-Rezeptors in Knockout Mäusen könnte demnach eine Steigerung der Reninsekretion bedeuten und somit die Ursache für die von Asico beobachtete Erhöhung der Plasmaninkonzentration sein. Versuche mit dem AT₁-Rezeptorantagonisten Losartan deuteten darauf hin, dass die Hypertonie reninabhängig ist: Losartan senkte den Blutdruck aller Gruppen auf ein nahezu gleiches Niveau, bei signifikant unterschiedlichen Ausgangswerten der Versuchsgruppen. Auch hielt der Effekt bei Knockouttieren wesentlich länger an als bei den Wildtyptieren, was der Autor als Beleg für die Reninabhängigkeit des bei den Knockouttiere beobachteten Hypertonus heranzog [Asico 1998].

In diesem Zusammenhang konnte in Studien der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die pharmakologische D₃-Rezeptorblockade über drei Wochen bei genetisch salzresistenten Dahl Ratten zur Retention von Salz und Flüssigkeit führt und damit langfristig zur Entstehung einer Hypertonie beitrug,

wie sie von salzsensitiven Dahl Ratten bekannt ist: Die Behandlung der Tiere führte zu einem Anstieg des systolischen Blutdruckes um 30-50% [Zimmermann 2001]. Dies unterstützt die These, dass das D₃-Rezeptorsystem bei der Entstehung der arteriellen Hypertonie von entscheidender Bedeutung sein könnte, auch wenn die hier gezeigten Ergebnisse dies nur eingeschränkt belegen können.

4.3. Volumenexpansion

Es wurde vorgeschlagen, dass nach akuter Volumenexpansion endogenes Dopamin zumindest teilweise die natriuretische und diuretische Antwort auf die Volumenexpansion (VE) vermittelt.

Jedoch fördern auch D₂-ähnliche Rezeptoren die Diurese und Natriurese während der VE, indem sie die Effekte von Vasopressin und Aldosteron antagonisieren [Jose 2000]. Derselbe Autor postulierte, dass ein Synergismus zwischen D₁- und D₂-ähnlichen Rezeptoren, vor allem unter der Bedingung der Volumenexpansion, zur Geltung kommen könnte [Jose 1998].

Tatsächlich ergaben Studien der eigenen Arbeitsgruppe, dass bei Ratten, die mit einem D₃-Antagonisten behandelt wurden die Antwort auf eine VE signifikant geringer ausfiel, als bei den Kontrolltieren: Während die Werte für Urinzeitvolumen, absolute und fraktionelle Natriumausscheidung nach Volumengabe signifikant stiegen, blieb die Antwort der behandelten Tiere signifikant darunter – und dies bei basal nahezu identischem Urinzeitvolumen.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Folgen einer Defizienz des D₃-Rezeptor Genes, speziell unter der Bedingung der VE, untersucht. Die Ergebnisse der WT-Gruppen entsprachen weitestgehend denen früherer Studien, die eine VE am gleichen Mausstamm untersuchten [Cervenka 1999]. In dieser Studie wurde eine ähnliche Antwort auf die VE deutlich (Anstieg des Urinvolumens und der Natriumausscheidung). Die *Abbildungen 10+11* zeigen, dass die Tiere während des Versuches relativ ausgeglichen bilanziert waren. Sehr ähnlich war auch der Hämatokritabfall nach VE um circa 8% als Ausdruck

der Verdünnung des Plasmas. Die Ergebnisse von Cervenka unterscheiden sich jedoch in der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Während die GFR auf einem basal deutlich höherem Niveau lag und nach VE signifikant anstieg, konnte in dieser Studie eine Veränderungen der GFR nicht beobachtet werden. Desweiteren zeigten die KO-Tiere keinen Unterschied zu den WT-Tieren. Sie waren gleichermaßen in der Lage, zusätzliches Volumen und Salz wieder auszuscheiden und so eine ausgeglichene Balance zwischen Infusion und Exkretion herzustellen. Möglicherweise ist der Effekt des inaktiviertem D₃-Rezeptorsystemes vom Ausmaß der VE abhängig: So beobachtete Hansell bei VE-Versuchen an Ratten, dass die natriuretische Antwort einer 2%-igen VE bei pharmakologischer Dopaminrezeptorblockade um 67% niedriger war, als die Kontrollgruppe. Dagegen war bei 10%-iger VE nur ein Unterschied von 19% festzustellen [Hansell 1991]. Da in den Clearanceversuchen die basale Natriumzufuhr 2,5-fach über der basalen Natriumausscheidung und die Volumengabe 1,6-fach über dem basalem Urinzeitvolumen lag, wäre es möglich, dass bereits in der Basalperiode eine geringgradige VE durchgeführt wurde. Dies könnte einen D₃-vermittelten Effekt maskiert haben.

In einer Untersuchung bei Menschen wurde beobachtet, dass eine einwöchige Hochsalzdiät deutlich erhöhte Ausscheidungswerte für DOPA und Dopamin verursachte [Goldstein 1989]. Dies wurde von Luippold et al. nicht bestätigt, der keinen Zusammenhang zwischen Diurese und Dopaminausscheidung fand [Luippold 2000], doch ergaben andere Untersuchungen an hochsalzernährten Ratten, dass die AADC-Aktivität signifikant erhöht war [Hayashi 1991]. Interessanterweise hatte der Effekt der chronischen, renalen Denervation keinen Einfluss auf die beobachteten Ergebnisse. Hayashi schloß daraus, dass das unter Hochsalzbedingungen gebildete Dopamin extraneuronalen Ursprungs sein müsse. Dieses vermehrt gebildete Dopamin könnte für die Natriurese unter Hochsalzdiät verantwortlich sein, da die Natriumausscheidung bei Blockade der Dopaminsynthese oder der Dopaminrezeptoren signifikant abgeschwächt war [Seri 1990]. Diesem hauptsächlich über D₁-Rezeptoren vermittelten Effekt [Jose 1996] könnte ein Synergismus zwischen

D₁-ähnlichen und D₂-ähnlichen Rezeptoren zugrunde liegen. Eine eingeschränkte Fähigkeit zur Natriurese und Diurese unter den Bedingungen der Volumenexpansion und salzreicher Diät könnte auch auf ein fehlerhaftes D₂-ähnliches Rezeptorsystem zurückgeführt werden. Untersuchungen mit dem Dopaminagonisten Z-1046 (Selektivität D₃>D₄>D₂>D₅>D₁) ergaben, dass der entstandene natriuretische Effekt sowohl mit D₁- auch mit D₂-Antagonisten aufhebbar war [Jose 1998]. Wenn nun hochsalzernährte KO-Mäuse bei VE weniger Natrium ausscheiden, dann könnte ein defekter D₃-Rezeptor der verantwortliche Subtyp sein. Jedoch wiesen die Tiere bei den vorliegenden Untersuchungen keine Unterschiede in der Salzausscheidung auf. Trotz defektem D₃-Rezeptor konnte bei den Knockouttieren wie auch bei den Wildtyptieren eine adäquate Natriurese beobachtet werden. Eine Erklärung hierfür könnte eine Anpassung der renalen Funktion an die Hochsalzdiät darstellen. Andauernder Salzüberschuß bewirkt, dass die Macula densa die tubuloglomeruläre Feedback Schleife (TGF) neu justiert, indem das Gleichgewicht zwischen den Vasokonstriktoren (AngII) und Vasodilatoren (NO) neu eingestellt wird [Schnermann 1999]. Dies verhindert die an sich physiologische (akut-) Reaktion, dass erhöhte Salzmengen, die in Kontakt mit der Macula densa kommen die Filtrationsrate dauerhaft verringern (was ja einer gesteigerten Natriurese im Wege stehen würde).

4.4. Diabetes mellitus

4.4.1. Diabetesmodell mit Streptozotozin (STZ)

STZ ist ein Antibiotikum, das von dem Bakterium *Streptomyces achromogenes* gebildet wird. Seit 1963 ist bekannt, dass die Gabe von STZ i.v. in Ratten einen Diabetes mellitus verursacht [Rakieten 1963]. In späteren Studien konnten histologische Veränderungen der Inselzellen des Pankreas festgestellt werden: Bereits zehn Stunden nach Injektion konnte eine massive Degranulierung und Nekrotisierung der β -Zellen beobachtet werden. Eine anfängliche Hyperinsulinämie mit Hypoglykämie ging in eine anhaltende Hyperglykämie über. Für diese STZ-Wirkung wurde eine Dosisabhängigkeit bewiesen [Tomlinson 1992]. Jedoch bestehen zwischen den untersuchten Spezies große Unterschiede in den Dosen, die benötigt werden um einen Diabetes mellitus zu induzieren. Für Ratten wird eine Dosis von ungefähr 60 mg/kg gewählt, nach einer Injektion von 100 mg/kg überleben die Tiere lediglich 2-3 Tage. Dagegen wird für Mäuse eine Dosis von 100-200 mg/kg verwendet. Einige Arbeitsgruppen verteilen diese Dosis auf mehrere Tage, so dass beispielsweise an fünf aufeinanderfolgenden Tagen eine Dosis von 40 mg/kg verabreicht wurde. Dieses Schema wurde in der vorliegenden Arbeit nicht angewandt, vielmehr wurde einmalig 120 mg/kg intraperitoneal verabreicht, um die Gefahr einer Fehlapplikation zu minimieren. Für Mäuse wurde gezeigt, dass nach einer einmaligen Injektion von 100 mg/kg die Glucosekonzentration im Plasma über neun Wochen kontinuierlich anstieg. Für Dosen von 120-160 mg/kg wurde beobachtet, dass nach einem schnellerem Anstieg zwei Wochen nach Injektion ein Plateau erreicht wurde. Bei einer Dosis von 200 mg/kg war keine Insulinproduktion mehr messbar [Ito 1999].

Streptozotozin wird neben seiner Wirkung auf die Pankreasinseln auch ein schädigender Einfluss auf andere Organe zugeschrieben. Die Schwierigkeit besteht allerdings darin, zwischen den direkt toxischen und den Folgeeffekten

zu unterscheiden, die die Hypoinsulinämie nach sich zieht. Es ist jedoch ein schädigender Einfluss auf unter anderem das Nervensystem und das Myokard beschrieben worden [Tomlinson 1992]. Versuche mit Ratten, deren rechte Nieren durch vorübergehendes Abklemmen vor dem Einfluss des STZ geschützt wurden zeigten jedoch, dass die Nephrotoxizität von STZ zu vernachlässigen ist, wenn die Folgen des Diabetes mellitus untersucht werden. Dies bestätigte eine weitere Arbeit, in der gezeigt wurde, dass eine supranormale Einstellung der Glucosekonzentration im Plasma die Veränderungen der renalen Hämodynamik nach STZ-Injektion nahezu verhindert [Jensen 1987].

In der vorliegenden Arbeit wurde nach Vorversuchen eine einmalige Dosis von 120 mg/kg gewählt, weil die Glucosekonzentration schnell ein Plateau im hyperglykämischen Bereich erreichte, trotzdem jedoch auf eine Insulingabe verzichtet werden konnte.

4.4.2. Nierengewicht und Nierenindex

Die Nierengewichte der verschiedenen Versuchsgruppen wichen nur unwesentlich voneinander ab (s. *Tabelle 5*). Die in dieser Studie untersuchte frühe Phase des STZ-induzierten Diabetes mellitus ist somit noch nicht von einer Hypertrophie der Nieren gekennzeichnet. Dies zeigen auch die ähnlichen Werte für den Nierenindex. Der Index der DM-KO-Gruppe lag oberhalb denen der anderen Gruppen, was darauf beruht, dass die Tiere dieser Gruppe eine höhere Gewichtsabnahme aufwiesen. Der Unterschied zwischen der CON-WT-Gruppe und der CON-KO-Gruppe ist vermutlich auf unterschiedliches Alter und auf Unterschiede in der Gewichtszunahme pro Zeit zurückzuführen. Die DM-Gruppen waren bei Diabetesinduktion ungefähr gleich schwer. Sie verloren circa 10% ihres Körpergewichtes, was wahrscheinlich hauptsächlich auf Verlust von Fett zurückzuführen ist. Das Körpergewicht war bei den DM-Tieren ein Maß für den Schweregrad der Erkrankung. Von vorausgegangenen Untersuchungen mit diabetischen Ratten ist bekannt, dass sich auch im Frühstadium des

Diabetes eine renale Hypertrophie einstellt: Das durchschnittliche Nierengewicht der diabetischen Tiere war hier um 40% höher als das der Kontrollgruppen [Beilharz 2000]. Jedoch ist im beobachteten Zeitraum in Folge des Diabetes mellitus keine renale Hypertrophie der Mäuse zu erkennen.

4.4.3. Diabetische Hyperfiltration

Der diabetischen Hyperfiltration wird ein direkt schädigender Einfluss auf das renale System zugeschrieben [Mogensen 1988]. Sie begünstigt im Frühstadium des insulinabhängigem Diabetes mellitus (IDDM) die Entstehung einer diabetischen Nephropathie. Es ist daher von Bedeutung, die Pathophysiologie der DH zu kennen, um Strategien mit dem Ziel zu entwickeln, die Progression der DN zumindest zu verlangsamen.

In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass bei diabetischen D₃-defizienten Knockout Mäusen die DH signifikant geringer ausgeprägt war als bei den Wildtyptieren, obwohl die Nieren der diabetischen Tiere noch nicht hypertrophiert waren. Während die GFR der diabetischen WT-Gruppe um 75% anstieg gegenüber den normoglykämischen Kontrollen, stieg die GFR der KO-Gruppe nur um 25% an (s. *Tabelle 4*). Dies bedeutet, dass die Dopamin D₃-Rezeptoren an der Hyperfiltration regulatorisch beteiligt sind. Es stellt sich die Frage, auf welche Art und Weise der D₃-Rezeptor die DH vermittelt und so die Entstehung einer DN begünstigt.

Im Folgenden werden verschiedene Hypothesen zur DH und die mögliche Beteiligung des Dopamin D₃-Rezeptors diskutiert. Hierbei wird Bezug auf das Review „Mechanisms of diabetic hyperfiltration“ von N. Bank genommen [Bank 1991]. Ein Schwerpunkt liegt sicherlich in der renalen Hämodynamik. Ein verminderter Gefäßtonus führt zu einem erhöhten Blutfluss durch die Niere, was unter Umständen den effektiven Filtrationsdruck erhöht. Es gilt als sicher, dass der DH nicht nur ein Pathomechanismus zugrunde liegt, sondern dass verschiedene Veränderungen zusammenkommen.

Zum einen werden vasoaktive Hormone für die pathologisch veränderte Hämodynamik verantwortlich gemacht. Die Zellen des Mesangiums und der Glomerula diabetischer Ratten produzieren mehr Prostaglandine – speziell PGE₂ – im Vergleich zu ihren normoglykämischen Kontrollen. Diese dilatativen und permeabilitätssteigernden Gewebshormone können zur Entstehung der DH beitragen. Insulingabe normalisierte die Prostaglandin-Produktion sowie die Hyperfiltration. Darüberhinaus wurde in den Glomerula diabetischer Ratten eine verminderte Rezeptordichte für das konstriktorisch wirksame Thromboxan A₂ gemessen [Wilkes 1989]. Untersuchungen ergaben, dass die Stimulation der D₂-ähnlichen Rezeptoren die Freisetzung von Arachidonsäure erhöht. Jedoch scheinen hier eher die D₂- und D₄-Rezeptoren die verantwortlichen Subtypen zu sein, weil der D₃-Rezeptor den Arachidonsäurestoffwechsel nicht beeinflusst [Missale 1998]. Auch weitere Argumente sprechen gegen diesen Mechanismus: So senken beispielsweise Cyclooxygenasehemmstoffe die GFR initial, eine längere Behandlung dieser Art führt jedoch zu einer weiteren Steigerung der GFR.

Desweiteren produziert das Gefäßendothel lokal wirksame Hormone. Dazu zählen das konstriktorische Endothelin wie auch der dilatative *Endothelium-derived relaxing factor* (EDRF). Diese Hormone interagieren mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche und beeinflussen direkt den Tonus der glatten Muskelzellen der Gefäße. Untersuchungen ergaben, dass die Gefäße diabetischer Tiere eine verminderte Antwort auf physiologische Stimuli der Freisetzung dieser Hormon aufwiesen. Allerdings konnte dieser Effekt mit Gefäßen normo-glykämischer Tiere imitiert werden, die akut hohen Glucosekonzentrationen ausgesetzt wurden [Tesfamariam 1990]. Die Autoren schlossen daraus, dass die Hyperglykämie per se der entscheidende Pathomechanismus war. Störungen der Endothelhormone wären demnach nur eine Folgeerscheinung.

Noradrenalin ist eines der wichtigsten vasoaktiven Hormone, die die renalen Blutgefäße kontrahieren. Untersuchungen der Sensitivität der Blutgefäße diabetischer Tiere gegenüber NA brachten widersprüchliche Ergebnisse.

Einige Arbeitsgruppen berichteten über erhöhte, andere über erniedrigte Sensitivität. Der D₃-Rezeptor wird als präsynaptischer Autorezeptor diskutiert, der die Katecholaminfreisetzung aus sympathischen Nervenendigungen hemmt [Piercey 1996]. Dies wurde zum Teil durch Studien der eigenen Arbeitsgruppe unterstützt [Mühlbauer 2000]. Ein defektes D₃-Rezeptorsystem könnte demnach eine erhöhte NA-Freisetzung nach sich ziehen. In den Untersuchungen von Asico waren jedoch die NA-Konzentrationen D₃-defizienter Mäuse nicht verändert gegenüber den Wildtypen [Asico 1998]. Um den Einfluss von NA auf die Pathophysiologie der renalen Hämodynamik zu bewerten, werden derzeit weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Als weiteres wichtiges Hormon wird das atriale natriuretische Peptid diskutiert. Dieses vasodilatierend wirkende Peptid ist bei Patienten mit IDDM deutlich erhöht, besonders bei schlechter metabolischer Kontrolle [Bell 1989]. Exogenes ANP verursachte in normoglykämischen Tieren eine GFR-Steigerung während ANP-Antiserum eine Minderung der GFR bei diabetischen Tieren bewirkte [Ortola 1987]. Die Wirkung von ANP waren neben GFR-Anstieg auch eine Steigerung der Natriuresis und eine Verminderung des renalen Plasmaflusses. Genau diese Konstellation ist mit pharmakologischer Dopamin D₃-Rezeptor Stimulation beobachtet worden [Luippold 2000]. 7-OH-DPAT, ein selektiver D₃-Agonist, bewirkte bei Ratten eine GFR-Steigerung um 20% und einen Abfall des RPF um 25%. Mikropunktionsuntersuchungen unterstützen die Hypothese einer postglomerulären Vasokonstriktion als Ursache der Hyperfiltration. Dies entspricht der für ANP charakteristischen Wirkung: Dilatation der afferenten Arteriolen und Konstriktion der efferenten Arteriolen um 10% [Martin-Grez 1986]. Angesichts der Tatsache, dass KO-Tiere in der vorliegenden Studie deutlich weniger Hyperfiltration zeigten, könnte die Hypothese formuliert werden, dass im hyperglykämischen Zustand eine pathologisch gesteigerte D₃-Rezeptor Stimulation eine erhöhte ANP-Freisetzung bewirkt und so die DH begünstigt. Auch wenn die DH nicht ausschließlich durch ANP vermittelt wird, könnte ein pharmakologisch inaktiviertes Dopamin D₃-Rezeptorsystem über diesen Mechanismus der

Hyperfiltration zumindest zum Teil entgegenwirken und so den Krankheitsverlauf günstig beeinflussen.

Das Renin/Angiotensin-System betreffend finden sich in der Literatur widersprüchliche Hypothesen. Ging man früher von einer systemisch wie renal verminderten Reninkonzentration im diabetischen Organismus aus, so sprechen neuere Studien für normale Reninspiegel bei IDDM [Kennefick 1996]. Die Erklärung, dass eine geringere Angiotensin II – Aktivität, mit verminderter konstriktorischer Wirkung auf die renalen Gefäße, die DH verursacht, erscheint somit nicht ausreichend. Möglicherweise ist die Rezeptordichte für Angiotensin II bei diabetischer Stoffwechsellage erniedrigt. Untersuchungen an Glomerula unterstützen diese Hypothese [Ballerman 1984]. Da sich durch ACE-Hemmer mit dilatierendem Effekt auf die glomeruläre Gefäßmuskulatur die DH deutlich mindern lässt [Komers 1995], könnten auch dilatativ wirkenden Kinine, beispielsweise Bradykinin, relevant sein, an dessen Abbau das ACE beteiligt ist. Um diese Systeme voneinander zu trennen, wurden vergleichende Versuche mit den AT₁-Rezeptorantagonisten Valsartan und Losartan durchgeführt, die wiederum widersprüchliche Ergebnisse brachten. So konnte Komers keinen Einfluss von Valsartan auf die DH beobachten [Komers 1995], wogegen Remuzzi mit Losartan die DH vollständig verhindern konnte [Remuzzi 1993].

Die Frage ist, wie ein inaktives Dopamin D₃-Rezeptorsystem hier von Vorteil sein könnte. Wie die vorliegende Arbeit zeigt, ist bei diabetischen KO-Tieren eine signifikant abgeschwächte DH zu beobachten. Da Asico bei D₃-defizienten Tieren eine deutlich erhöhte Angiotensin I - Konzentration messen konnte, ist es möglich, dass vermehrt gebildetes Angiotensin I neben dem hypertensiven Effekt auch protektiv gegenüber der Ausbildung einer DH wirken kann. Kennefick infundierte hyperglykämischen wie normoglykämischen Ratten AI und AII. Bei normaler Stoffwechsellage hatten beide Angiotensine keinen Einfluss auf die GFR, dagegen schwächten beide Substanzen die DH signifikant ab [Kennefick 1996]. Entsprechend war der renale Gefäßwiderstand signifikant erhöht in den behandelten Tieren. Dies korreliert mit den Ergebnissen dieser Studie, da KO-Tiere im Vergleich zu ihren Kontrollen erst bei diabetischer Stoffwechsellage

einen Unterschied aufwiesen, nicht aber unter Normalbedingungen. Die Ursache hierfür könnte in einer veränderten Antwort auf All im diabetischen Zustand liegen. Während unter Normalbedingungen der RPF nur gering gesenkt wird und das Signifikanzniveau nicht erreicht wird, ist die Abschwächung bei diabetischen Tieren deutlicher und signifikant [Kennefick 1996]. Ein gesteigertes Aktivitätsniveau des renalen RAS bei KO-Mäusen könnte die DH mitbeeinflussen.

Eine weiterer Pathomechanismus der DH sind vermutlich der Insulinmangel sowie die Hyperglykämie. Beispielsweise war bei Versuchen mit kultivierten, glomerulären Mesangiumzellen Insulin für die kontraktile Antwort auf All nötig [Kreisberg 1982]. Hierbei spielen anscheinend auch Calciumionen eine Rolle. Alleinige Insulingabe vermochte die DH in Versuchen mit diabetischen Ratten nicht zu senken, jedoch konnte eine mit Calcium versetzte Insulininfusion einen GFR-Abfall in den Normalbereich induzieren [Bank 1987]. Da All über eine IP₃-Kaskade als second Messenger eine von Calcium getragene Tonussteigerung entfaltet, wäre es möglich, dass die bei IDDM erniedrigte Insulinwirkung über den Calciumhaushalt zu Tonusverlust in der glatten Muskulatur und damit zu gesteigertem renalem Blutfluss führt. Dieser Effekt von Insulin trat nur dann auf, wenn der Blutglucosewert absank. Gleichzeitige Glucoseinfusion konnte den GFR-senkenden Effekt aufheben [Christiansen 1981]. Dies bedeutet zunächst, dass die Hypoinsulinämie per se nicht als Ursache der DH in Frage kommt. Da der Dopamin D₃-Rezeptor eine hemmende Wirkung auf den Calciumeinwärtsstrom in die Zelle besitzen soll [Missale 1998], könnte die Ausschaltung dieses Rezeptorsystemes in Knockouttieren eine erhöhte intrazelluläre Calciumkonzentration und damit einen gesteigerten Gefäßtonus bewirken, sodass bei diabetischer Stoffwechsellage die renale Hämodynamik nicht den Veränderungen unterliegt, wie bei den Wildtyptieren. Die Calciumkonzentrationen wurden in den gegenwärtigen Experimenten nicht bestimmt.

Auch die Glucosekonzentration im Plasma per se hat entscheidenden Einfluss auf die GFR. Während Glucoseinfusion bei gesunden Probanden die GFR lediglich um 6-10% zu steigern vermochte, war bei Probanden mit basaler diabetischer Hyperfiltration ein Anstieg um bis zu 35% zu verzeichnen [Viberti 1995]. Dies könnte bedeuten, dass Glucose zwar einen Einfluss auf die GFR hat, dessen pathologische Relevanz jedoch abhängig von vorangegangener Schädigung oder Störung der Hormongleichgewichte ist. Wahrscheinlich beeinflusst ein chronisch erhöhter Glucosespiegel über zusätzliche Mechanismen die DH.

Schließlich kann eine erhöhte Glucosekonzentration zu gesteigerter tubulärer Reabsorption von Natrium und Wasser führen. Glucose, die nach Filtration den proximalen Tubulus erreicht, wird durch Natrium/Glucose-Cotransporter reabsorbiert. Erreicht nun ein Vielfaches der physiologischen Glucosemenge den Tubulus so wird Natrium verstärkt reabsorbiert. In Folge wird an der Macula densa eine verminderte Salzkonzentration registriert, was ein vermindertes TGF-Signal darstellt. Mikropunktionsuntersuchungen an diabetischen Ratten ergaben, dass neben einer Erhöhung der Einzelnephron-GFR ein erniedrigter Druck in der Bowman-Kapsel besteht und die Elektrolytkonzentrationen im früher distalen Tubulus signifikant reduziert sind [Vallon 1999].

Da aber Asicos D₃-defiziente Mäuse eher eine Salzretention zeigten [Asico 1998], erscheint es als wenig wahrscheinlich, dass über diesen Mechanismus Knockouttiere eine geringere diabetische Hyperfiltration ausprägen können. Auch zeigen die Exkretionswerte der diabetischen KO-Tiere sowohl in den Clearanceexperimenten (s. *Tabelle 4a*) als auch in den Stoffwechselversuchen (s. *Tabelle 3*) keinen Unterschied zu ihren WT-Kontrollen. So mag der Mechanismus der gesteigerten frühproximalen Natriumreabsorption insgesamt zur DH beitragen, jedoch scheint der Dopamin D₃-Rezeptor hier keine entscheidende Rolle zu spielen.

4.5. **Schlußfolgerungen aus der vorliegenden Arbeit**

Mit Hilfe von Streptozotozin wurde bei Dopamin D₃-Rezeptor Knockout Mäusen (KO), sowie bei entsprechenden Wildtyptieren (WT) ein experimenteller Diabetes mellitus induziert. Die diabetische Hyperfiltration war bei den KO-Tieren signifikant abgeschwächt. An diesem Modell für IDDM konnte somit gezeigt werden, dass die geringere D₃-Aktivität im Frühstadium der Erkrankung einen Vorteil bedeutet. Der Dopamin D₃-Rezeptor scheint also in die Pathophysiologie der diabetischen Hyperfiltration involviert zu sein.

Es gibt verschiedene Regulationen und Mechanismen, an denen der Dopamin D₃-Rezeptor seinen Einfluss auf die entscheidenden Größen ausüben zu könnte. Dies könnte über eine Hemmung des Renin/ Angiotensin-Systemes, des Calciumeinwärtsstromes in die glatte Muskulatur und oder einen gesteigerten ANP-Plasmaspiegel geschehen.

Außerdem scheint der Dopamin D₃-Rezeptor auch systemische Wirkungen zu besitzen. Beispielsweise wurde seine Inaktivierung mit der Ausbildung einer arteriellen Hypertonie in Zusammenhang gebracht. Versuche von Asico mit D₃-defizienten Mäusen, die eine Salz- und Volumenretention dieser Tiere zeigten, konnten in dieser Arbeit nicht gesehen werden, was unter Umständen auf die veränderten Versuchsbedingungen oder auf andere genetische Hintergründe der verwendeten Tierstämme zurückzuführen ist.

4.6. Ausblick und klinische Implikation

Um die Ergebnisse dieser Studie besser verstehen zu können, sollte die Bildung von endogenem Dopamin in Niere bei diabetischer Hyperfiltration untersucht werden. Es besteht die Möglichkeit, dass bei diabetischer Stoffwechsellage die Dopaminkonzentration der Niere pathologisch erhöht ist, und die Wirkung von Dopamin bei D₃(-/-)-Tiere in geringerem Ausmaß in Erscheinung tritt. Außerdem sollte geprüft werden, ob sich die D₃-Rezeptorsensitivität im Laufe der Erkrankung verändert. Mit Hilfe der D₃-defizienten Mäuse sollte geklärt werden, ob die Abschwächung der diabetischen Hyperfiltration in der Frühphase des Diabetes mellitus einen Einfluss auf die Progression der diabetischen Nephropathie hat. Wenn entsprechenden Langzeitversuche zu dem Ergebnis kommen, dass die diabetischen D₃(-/-)-Tieren in geringerem Ausmaß Veränderungen der Nierenfunktion und der renale Morphologie entwickeln, könnte mit entsprechenden Untersuchungen an Patienten begonnen werden.

Es gibt deutliche Hinweise darauf, dass die in der Frühphase des Diabetes mellitus Typ I beobachtbare diabetische Hyperfiltration (DH) schädigenden Einfluss auf das glomeruläre Filtersystem ausübt und so die Entstehung der diabetischen Nephropathie begünstigt. Da ein inaktiviertes D₃-Rezeptorsystem die diabetische Hyperfiltration signifikant abzuschwächen vermag, könnten D₃-Antagonisten eine therapeutische Option zur frühzeitigen Behandlung des Typ I Diabetes darstellen. Ziel ist eine Verlangsamung der Progredienz der Erkrankung. So könnten diätetische Maßnahmen und die Kontrolle von Blutdruck, Körpergewicht und Nierenfunktion sinnvoll ergänzt werden.

5. Zusammenfassung

Diese Studie wurde durchgeführt, um die renalen Effekte der Inaktivierung des Dopamin D₃-Rezeptorsystemes zu untersuchen. Dazu wurden D₃-defiziente Mäuse mit ihren Wildtypkontrollen verglichen. Zunächst wurde der Salz- und Volumenhaushalt unter der Bedingung der Normal- und Hochsalzernährung untersucht. Mit wachen Tieren wurden hierzu Stoffwechselläufigversuche und Clearanceexperimente mit narkotisierten Tieren durchgeführt. Bestimmt wurde die glomeruläre Filtration, das Urinzeitvolumen und die Elektrolytexkretion, sowie systemische Variablen. Darüberhinaus wurde die Nierenfunktion von diabetischen Tieren untersucht. Hierzu wurde durch einmalige Injektion von Streptozotocin ein Diabetes mellitus induziert. Clearanceexperimente gaben Auskunft über die glomeruläre Filtrationsrate und das Ausscheidungsverhalten der diabetischen Tiere gegenüber den normoglykämischen Kontrollgruppen.

Weder bei den salzreich ernährten Tieren noch bei den normalernährten Gruppen zeigten sich, im Vergleich D₃-Knockout versus Wildtyp, Unterschiede in den renalen Exkretionswerten und den Urinvolumina. In den Clearanceexperimenten zeigten alle Gruppen in gleichem Ausmaß eine deutliche Diurese und Natriurese als Antwort auf Volumenexpansion mit Salzbeladung. Keine Unterschiede waren bei der glomerulären Filtrationsrate zu beobachten, auch nicht bei den systemischen Variablen wie Herzfrequenz oder Blutdruck.

Die Ergebnisse der Stoffwechselläufigversuche mit den diabetischen Tieren zeigten erwartungsgemäß eine Erhöhung der Glucosekonzentration im Plasma und im Urin. Keine Unterschiede zeigten sich jedoch in der Elektrolytausscheidung. Die Clearanceexperimente mit diesen Versuchsgruppen zeigten, dass das Urinzeitvolumen gegenüber den nichtdiabetischen Kontrollen erhöht war (bei den Wildtyptieren in deutlich stärkerem Maße als bei den D₃-Knockout Tieren). Gleiches gilt für die fraktionelle Natriumausscheidung. Herzfrequenz und Blutdruck wiesen keine Unterschiede auf. Die durch die Hyperglykämie pathologisch erhöhte glomeruläre Filtrationsrate hingegen war bei den diabetischen D₃(-/-)-Tieren signifikant niedriger als bei den diabetischen

Wildtyptieren. Die in der Frühphase des Diabetes Typ I auftretende pathologische Hyperfiltration war also deutlich abgeschwächt. Sollte sich dieser Zusammenhang auch an Spezies mit intakter D_3 -Funktion nachweisen lassen, die mit D_3 -Antagonisten vorbehandelt sind, dann könnten pharmakologische D_3 -Antagonisten eine therapeutische Option zur frühzeitigen Behandlung der diabetischen Nephropathie darstellen

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

- Accili D, Fishburn CS, Drago J, Seiner H, Lachowicz JE, Park BH, Gauda EB, Lee EJ, Cool MH, Sibley DR. A target mutation of the D₃ dopamine receptor gene is associated with hyperactivity in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:1945-1949
- Asico LD, Ladines C, Fuchs S, Accili D, Carney RM, Semearo C, Pocchiari F, Felder RA, Eisner GM, Jose PA. Disruption of the Dopamin D₃-Rezeptor gene produces renin-dependent hypertension. *J Clin Invest* 1998; 3:493-498
- Amenta F. Light microscope autoradiography of peripheral dopamine receptor subtypes. *Clin Exp Hypertension* 1997; 19:27-41
- Amenta F, Barili P, Bronzetti E, Felici L. Localization of dopamine receptor subtypes in systemic arteries. *Clin Exp Hypertension*; 2000; 22:277-288
- Andersen PH, Gingrich JA, Bates MD, Dearry P. Dopamine receptor subtypes: beyond the D₁/D₂ classification. *Trends Pharmacol Sci* 1990; 11:231-236
- Aretha CW, Sinha A, Galloway MP. Dopamine D₃-preferring ligands act at synthesis modulating autoreceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274:609-613
- Ballerman BJ, Skorecki KL, Brenner BM. Reduces glomerular angiotensin II receptor density in early untreated diabetes mellitus in the rat. *Am J Physiol* 1984; 247:F110-F116
- Bank N, Lahorra MA, Aynedjian HS. Acute effect of calcium and insulin on hyperfiltration of early diabetes. *Am J Physiol* 1987; 252:E13-E20
- Bank N. Mechanisms of diabetic hyperfiltration. *Kid Int* 1991; 40:792-807
- Bakris GL. Microalbuminuria: what is it? Why is it important? What should be done about it?. *J Clin Hypertens* 2001; 3:99-102
- Beilharz M. Unveröffentlichte Doktorarbeit der eigenen Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie der Universität Tübingen 2000.
- 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; 9:187-194

- Bell GM, Bernstein RK, Laragh JH, Atlas SA, James GD, Pecker MS, Sealey LE. Increased plasma atrial natriuretic factor and reduced plasma renin in patients with poorly controlled diabetes mellitus. *Clin Sci* 1989; 77:177-182
- Bennett JP, Piercey MF. Pramipexole – a new dopamine agonist for the treatment of Parkinson's disease. *J Neurol Sci* 1999; 163:2-3
- Bertorello A, Hökfelt T, Goldstein M, Aperia A. Proximal tubule Na/K-ATPase activity is inhibited during high-salt diet: evidence for DA-mediated effect. *Am J Physiol* 1988; 254:F795-F801
- Borch-Johnsen K, Andersen PK, Deckert T. The effect of proteinuria on relative mortality in type 1 diabetes mellitus. *Diabetologia* 1985; 28:590-596
- Buddecke E. *Grundriss der Biochemie*. 9. Auflage. Walter de Gruyter Verlag Berlin, 1994; 327-330
- Carey RM. Renal Dopamine System – Paracrine Regulator of Sodium Homeostasis and Blood Pressure. *Hypertension* 2001; 38:297-302
- Cervenka L, Mitchell KD, Navar LG. Renal Function in Mice: Effects of Volume Expansion and Angiotensin II. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2631-2636
- Chio C, Lajiness ME, Huff RM. Activation of heterologously expressed D₃ dopamine receptors: comparison with D₂ dopamine receptors. *Mol Brain Res* 1994; 45:51-60
- Christiansen JS, Frandsen M, Parving H-H. The effect of intravenous insulin infusion on kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1981; 20:199-204
- Cussac D, Newman-Tancredi, Pasteau V, Millan MJ. Human Dopamine D₃ Receptors Mediate Mitogen-Activated Protein Kinase Activation Via a Phosphatidylinositol 3-Kinase and an Atypical Protein Kinase C-Dependent Mechanism. *Mol Pharmacol* 1999; 56:1025-1030
- Demchyshyn LL, Sugamori KS, Lee FJS, Hamadanizadeh SA. The Dopamine D_{1b} receptor. Cloning and characterization of three pharmacologically distinct D₁-like receptors. *J Biol Chem* 1005; 270:4005-4012
- Dikeos GD, Papadimitriou GN, Avramopoulos D. Association between the dopamine D₃ receptor gene locus (DRD3) and unipolar affective disorder. *Psychiatr Genet* 1999; 9(4):189-195

-
- Felder CC, Blecher M, Jose PA. Dopamine-1-mediated stimulation of phospholipase C activity in rat cortical membranes. *J Biol Chem* 1989; 264:8739-8745
- Felder CC, Campbell T, Albrecht F, Jose PA. Dopamine inhibits Na/H exchanger activity in renal BBMVs by stimulating of adenylat cyclase. *Am J Physiol* 1990; 259:F297-F303
- Fiaschi E, Grassi B, Andres G. La funzione renale nel diabete mellito. *Rassengna Fisiopatologica. Clin Terap* 1952; 4:373-410
- Gingrich Ja, Caron MG. Recent advances in the molecular biology of dopamine receptors. *Annu Rev Neurosci* 1993; 16:299-321
- Goldberg LI, Volkman PH, Kohli JD. A comparison of the vascular dopamine receptoes with other dopamine receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1978; 18:57-79
- Goldstein DS, Eisenhofer RSG, Gill JR. Urinary excretion of dihydroxyphenylalanine and dopamine during alterations of dietary salt intake in humans. *Clin Sci* 1989; 76:517-522
- Goldstein M, Fuxe K, Hokfelt T. Charakterization and Tissue Localization of Catecholamine Synthesizing Enzymes. *Pharmacol Rev* 1972; 24:293-308
- Hansell P, Fasching A. The effect of dopamine receptor blockade on natriuresis is dependent o the degree of hypervolemia. *Kid Int* 1991; 39:253-258
- Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, Saruta T. Effects of high salt intake on dopamine production in rat kidney. *Am J Physiol* 1991; 260:E675-679
- Hedge SS, Jadhav AL, Lokhandwala MF. Role of Kidney Dopamine in the Natriuretic Response to Volume Expansion in Rats. *Hypertension* 1989; 13:828-834
- Hussain T, Lokhandwala MF. Renal Dopamine Receptor Function in Hypertension. *Hypertension* 1998; 32:187-197
- Ibrahim HN, Hostetter I, Hostetter T. Diabetic Nephropathy. *J Am Nephrol* 1997; 8:487-493
- Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Naruse A. New model of progressive non-insulin-dependent diabetes mellitus in mice induced by streptozotocin. *Biol Pharm Bull* 1999; 22:988-989

- Jensen PK, Christiansen JS, Steven K, Parving HH. Strict metabolic control and renal function in the streptozotocin diabetic rat. *Kid Int* 1987; 31:47-51
- Jones SL, Wiseman MJ, Viberti GC: Glomerular hyperfiltration as a risk factor for diabetic nephropathy. *Diabetologia* 1991; 34:59-60
- Jones SL, Viberti G. Renal functional reserve in subjects with diabetes mellitus. *Semin Nephrol* 1995; 15:475-481
- Jose PA, Raymond JR, Bates MD, Aperia A, Felder RA. The renal dopamine receptors. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2:1265-1278
- Jose PA, Eisner GM, Drago J, Carey RM, Felder RA. Dopamine receptor signaling defects in spontaneous hypertensive rats. *Am J Hypertens* 1996; 9:400-405
- Jose PA, Asico LD, Eisner GM, Pocchiari F, Semeraro C, Felder RA. Effects of costimulation of dopamine D₁- and D₂-like receptors on renal function. *Am J Physiol* 1998; 275:R986-994
- Jose PA, Eisner GM, Felder RA. Renal Dopamine and Sodium Homeostasis. *Curr Hypertension Rep* 2000; 2:174-183
- Kennefick TM, Oyama TT, Thompson MM, Vora JP, Anderson S. Enhanced renal sensitivity to angiotensin actions in diabetes mellitus in the rat. *Am J Physiol* 1996; 271:F595-602
- Kreisberg JI. Insulin requirement for contraction of cultured rat glomerular mesangial cells in response to angiotensin II: possible role for insulin in modulating glomerular hemodynamics. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79:4190-4192
- Kobrin S. Diabetic nephropathy. *Dis Mon* 1998; 44:214-234
- Komers R, Cooper ME, Acute renal hemodynamic effects of ACE inhibition in diabetic hyperfiltration: role of kinins. *Am J Physiol* 1995; 268:F588-594
- Koolman J. *Taschenatlas der Biochemie*. 2. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart, 1998; 334-335
- Kupin WL, Cortes P, Dumler F, Feldkamp CS, Kilates MC, Levon NW. Effect in renal function of change from high to moderate protein intake in type I diabetic patients. *Diabetes* 1987; 36:73-79
- Lee MR. Dopamine and the kidney. *Clin Sci* 1982; 62:439-448
- Lee MR. Dopamine and the kidney: ten years on. *Clin Sci* 1993; 84:357-375

- Lervang H-H, Jensen S, Brochner-Mortensen J. Early diabetic hyperfiltration and the development of late nephropathy in type 1 insulin dependent diabetes mellitus. *Diabetologia* 1988; 31:723-729
- Lokhandwala MF, Amenta F. Anatomical distribution and function of dopamine receptors in the kidney. *FASEB J* 1991; 5:3023-3030
- Luippold G, Osswald H, Mühlbauer B. Renal effects of exogenous dopamine: modulation by renal nerves and dopamine receptor antagonists. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 358:445-451
- Luippold G, Mühlbauer B. Dopamine D₂ Receptors Mediate Glomerular Hyperfiltration Due To Amino Acids. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 1998; 286:1248-1252
- Luippold G, Küster E, Joos T, Mühlbauer B. Dopamine D₃-rezeptor activation modulates renal function in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998; 358:445-451
- Luippold G, Küster E, Vallon V, Osswald H, Mühlbauer B. Dopamine D₃ receptor in the rat kidney: glomerular and tubular actions. *Nephrol Dial Transplant* 1999; 14:24-25
- Luippold G, Pech B, Lemaire HG, Höger T, Gross G, Mühlbauer B. Absence of Amino Acid-Induced Glomerular Hyperfiltration in Dopamin D₃-Rezeptor Deficient Mice. *Kidney Blood Press Res* 2000; 23:217-218 (Abstract)
- Luippold G, Schneider S, Vallon V, Osswald H, Mühlbauer B. Postglomerular vasokonstriction induces by dopamine D₃ receptor activation in anesthetized rats. *Am J Physiol* 2000; 278:F570-575
- Luippold G, Benöhr P, Piesch C, Heyne N, Mühlbauer B. Urinary dopamine excretion in healthy volunteers: effect of sodium diet and acute water load. *Eur J Physiol* 2000; 440:28-33
- Luippold G, Beilharz M, Mühlbauer B. Reduction of glomerular hyperfiltration by dopamine D₂-like receptor blockade in experimental diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2001; 16:1350-1356
- Lüllmann H, Mohr K. *Pharmakologie und Toxikologie*. 14. Auflage. Thieme Verlag Stuttgart, 1999; 79-80 und 293f
- Martin-Grez M, Flemming JT, Steinhausen M. Atrial natriuretic peptide causes preglomerular vasodilatation and postglomerular vasoconstriction in rat kidney. *Nature* 1986; 324:473-476

- Menton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J. Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol* 2000; 278:F339-351
- Millan MJ, Dekeyne A, Rivet MJ, Dubuffet T, Lavielle G, Brocco M. S33084, a novel, potent, selective and competitive antagonist at dopamine D(3)-receptors: II. Functional and behavioral profile compared with GR218,231 and L741,626. *J Pharmacol Exp Ther* 2000; 293:1063-1073
- Missale C, Russel Nash S, Robinson SW, Jaber M, Caron MG. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol Rev* 1998; 78:189-222
- Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984; 311:89-93
- Mogensen CE. Early glomerular hyperfiltration in insulin dependent diabetics and late nephropathy. *Scand J ClinLab Invest* 1986; 46:201-206
- Mogensen CE, Christensen CK, Christiansen JS, Boye N, Pedersen MM, Schmitz A. Early hyperfiltration and late renal damage in insulin-dependent diabetes. *Pediatr Adol Endocrinol* 1988; 17:197-205
- Mogensen CE. How to Protect the Kidney in Diabetic Patients. *Diabetes* 1997; 46 suppl 2:104-111
- Mühlbauer B, Osswald H. Feeding-induced increase in urinary dopamine excretion is independent of renal innervation and sodium intake. *Am J Physiol* 1994; 266:563-567
- Mühlbauer B, Mickeler C, Schenk F. Protein-induced increase in urinary dopamine in normal and diabetic rats: role of catecholamine precursors. *Am J Physiol* 1997; 273:R80-85
- 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
- Mühlhardt C. 2.Auflage *Der Experimentator*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 2000
- NIDDK 2001. *Kidney Disease of Diabetes*. National Kidney and Urological Diseases Information Clearinghouse. <http://www.niddk.nih.gov/health/kidney>
- O'Connell DP, Botkin SJ, Romos SI, Sibley DR. Localization of dopamin D1A receptor protein in rat kidneys. *Am J Physiol* 1995; 268:F1185-1197 b42

- O'Connell DP, Vaughan CJ, Aherne AM, Botkin SJ, Wang ZQ, Felder RA. Expression of the dopamine D₃ receptor protein in the rat kidney. *Hypertension* 1998; 32:886-895
- O'Donnell MP, Kasiske BL, Keane WF. Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. *FASEB J* 1988; 2:2339-2347
- Österby R, Gundersen HJG. Glomerular size and structure in diabetes mellitus I. *Diabetologia* 1980; 18:493-500
- Ortola FV, Ballerman BJ, Andersen S, Mendez RE, Brenner BM. Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. *J Clin Invest* 1987; 80:670-674
- Pavenstädt H. Roles of the podocyte in glomerular function. *Am J Physiol* 2000; 278:F173-179
- Piercey MF. Pharmacology of pramipexole, a dopamine D₃-preferring agonist useful in treating Parkinson's disease. *Clin Neuropharmacol* 1998; 21:141-151
- Piercey MF, Hoffmann WE, Smith MW, Hyslop DK. Inhibition of dopamine neuron firing by pramipexole, a dopamine D₃ receptor-preferring agonist: comparison to other dopamine receptor agonists. *Eur J Pharmacol* 1996; 312:35-44
- Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother* 1963; 29:91-98
- Remuzzi A, Perico N, Amuchastegui CS, Malachini B, Mazerska M, Battaglia C, Bertani T, Remuzzi G. Short- and long-Term Effect of Angiotensin II Receptor Blockade in Rats with Experimental Diabetes. *J Am Soc Nephrol* 1993; 4:40-49
- Rosenstock J, Raskin P. Early diabetic nephropathy: Assessment and potential therapeutic interventions. *Diabetes Care* 1986; 9:529-545
- Rudberg S, Persson B, Dahlquist G. Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy. *Kid Int* 1992; 41:822-828
- Sanada H, Lynne Y, Jose PA, Carey RM, Felder RA. Dopamine D₃-Receptors in Juxtaglomerular Cells. *Clin Exp Hypertension* 1997; 19:93-105
- Schnermann J, Briggs JP. The macula densa is worth its salt. *J Clin Invest* 1999; 104:1007-1009

- Seri I, Kone BC, Gullans SR, Aperia A, Brenner BM, Ballerman BJ. Influence of Na⁺ intake on dopamine-induced inhibition of renal cortical Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol* 1990; 258:F52-60
- Seyer-Hansen K, Hansen J, Gundersen HJG. Renal Hypertrophy in Experimental Diabetes. *Diabetologia* 1980; 18:501-505
- Silbernagl S. Die Funktion der Nieren. 2. Auflage. Aus: Lehrbuch der Physiologie, Thieme Verlag Stuttgart, 1996; 283-357
- Siragy HM, Felder RA, Howell NL, Chevalier RL, Peach MJ Carey RM. Evidence that dopamine-2 mechanisms control renal function. *Am J Physiol* 1990; 259:793-800
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Bouthenet ML, Schwartz JC. Molecular cloning and characterization of a novel dopamine receptor (D₃) as a target for neuroleptics. *Nature* 1990; 347:146-151
- Sokoloff P. Localization and funktion of the D₃ dopamine receptor. *Arzneim.-Forsch./Drug Res* 1992; 41(I), Nr 2a
- Sokoloff P, Scarselli M, Novi F, Schalmach E, Lin R. D2/D3 dopamine receptors heterodimer exhibit unique functional properties. *JBCP* 2001 in press
- Tesfamariam B, Brown ML, Deykin D, Cohen RA. Elevated glucose promotes generation of endothelium-derived vasoconstrictor prostanoids in rabbit aorta. *J Clin Invest* 1990; 85:929-932
- The Nephron Information Center 2001. <http://www.nephron.com>
- Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional Consequences of Streptozotocin-induced Diabetes Mellitus, with Particular Reference to the Cardiovascular System. *Pharmacol Rev* 1992; 44:103-150
- Trepel M. Neuroanatomie. 1. Auflage. Urban&Schwarzenberg München, 1995; 123-128
- UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in type 2 diabetes. *Lancet* 1998; 352:837-853
- Vallon V, Richter K, Blantz RC, Thomson S, Osswald H. Glomerular Hyperfiltration in Experimental Diabetes Mellitus: Potential Role of Tubular Reabsorption. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10:2569-2576

-
- Viberti GC, Jones SL. Renal Functional Reserve in Subjects With Diabetes Mellitus. *Sem Nephrol* 1995; 15:475-481
- Vieira-Coelho MA, Teixeira VA, Finkel J. Dopamine-dependent inhibition of jejunal Na⁺-K⁺-ATPase during high-salt diet in young but not in adult rats. *Am J Physiol* 1998; 275:G1317-1323
- Wilkes B, Mento P, Macica C, Solomon J. Reduced thromboxane (TX) receptors in diabetic glomeruli: relationship to hyperfiltration. *Am Soc Nephrol* 1989:p336a
- Yamaguchi I, Yao L, Sanada H, Ozono R, Mouradian MM, Carey RM, Jose PA, Felder RA. Characterization of dopamine D_{1A} receptors in rat juxtaglomerular cells. *Hypertension* 1997; 29:962-968
- Zhou QY, Grandy DK, Thambi L, Kushner JA. Cloning and expression of human and rat D₁-dopamine receptors. *Nature* 1990; 347:76-79
- Zimmermann C. Unveröffentlichte Doktorarbeit der eigenen Arbeitsgruppe am Institut für Pharmakologie der Universität Tübingen 2001.

6.2. Glossar verwendeter Abkürzungen

A _{Plasma}	[³ H]-Aktivität in Plasma
A _{Urin}	[³ H]-Aktivität in Urin
Ang II	Angiotensin II
AA	Arachidonsäure
AADC	Aromatische L-Amino Decarboxylase
AC	Adenylatcyclase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ANP	atriales natriuretisches Peptid
APH	Aminoglykosid-Phosphotransferase
AT ₁	Angiotensin II – Rezeptor Sybtyp 1
BP _x	Basalperiode Nummer X
BSA	bovines Serumalbumin
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CON	Kontrollgruppe
CON-KO	Kontrollgruppe bestehend aus D ₃ (-/-)-Mäusen
CON-WT	Kontrollgruppe bestehend aus Wildtyp-Mäusen
D _x	Dopaminrezeptor der Bezeichnungsnummer X
D ₃ (-/-)	homozygote Ausschaltung des Dopamin D ₃ -Rezeptor-Genes
D _s	Dauer einer Sammlerperiode
DA	Dopamin
DAG	Diacylglycerin
DH	diabetische Hyperfiltration
DM	Versuchsgruppe mit Diabetes mellitus Typ I
DM-KO	diabetische D ₃ (-/-)-Mäuse
DM-WT	diabetische Wildtyp-Mäuse
DN	Diabetische Nephropathie
ES	Embryonale Stammzellen
FE _{Na}	fraktionelle Natriumausscheidung
Glu	Glucose
[Glu] _{Plasma}	Glucosekonzentration im Plasma
[Glu] _{Urin}	Glucosekonzentration im Urin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
h	Stunde
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
HP _x	Hauptperiode Nummer X
HS	Hochsalzdiät
i.v.	intravenös
IDDM	insulinabhängiger Diabetes mellitus (Typ I)
IP ₃	Phosphoinositol
K ⁺	Kaliumionen
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
KO	Dopamin D ₃ -Rezeptor Knockout Mäuse = D ₃ (-/-)-Mäuse

MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule (Druckeinheit)
Na ⁺	Natriumionen
NA	Noradrenalin
[Na] _{Plasma}	Natriumkonzentration im Plasma
[Na] _{Urin}	Natriumkonzentration im Urin
NaCl	Natriumchlorid = Kochsalz
NFG	Nierenfeuchtgewicht
NG	Nierengewicht
NO	Stickstoffmonoxid (Vasodilatator)
NS	Normalsalzernährung
OS	Osmolalität
P _x	Perfusorpumpe Nummer X
P _{sys}	systolischer Blutdruckwert
P _{dia}	diastolischer Blutdruckwert
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
pH	potentia Hydrogenii = negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PE	Polyethylen
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
RAS	Renin/Angiotensin-System
RPF	renaler Plasmafluss
s.	siehe
STZ	Streptozotozin
t	time = Zeit
TG	Tiergewicht
TGF	tubuloglomerulärer Feedback
TV	Trinkvolumen
UV	Urinzeitvolumen
U _{Na} V	absolute Natriumausscheidung
U _K V	absolute Kaliumausscheidung
U _{cl} V	absolute Chloridausscheidung
U _v s	Urinvolumen einer Sammelperiode
VE	Volumenexpansion
VE-HS	Volumenexpansion mit hochsalzernährten Mäusen
VE-HS-KO	Volumenexpansion mit hochsalzernährten D ₃ (-/-)-Mäusen
VE-HS-WT	Volumenexpansion mit hochsalzernährten Wildtyp-Mäusen
VE-NS	Volumenexpansion mit normalsalzernährten Mäusen
VE-NS-KO	Volumenexpansion mit normalsalzernährten D ₃ (-/-)-Mäusen
VE-NS-WT	Volumenexpansion mit normalsalzernährten Wildtyp-Mäusen
WT	Wildtyp-Mäuse (Stamm: C57/BL6)
z.T.	zum Teil
ZNS	zentrales Nervensystem

Die verwendeten aber nicht aufgeführten physikalischen Einheiten und deren Abkürzungen entsprechen denen des Systeme Internationale (SI).