

Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie
Direktor: Professor Dr. H. Oßwald

**Einfluss des Dopamin D₃ Rezeptors auf die Progredienz
der diabetischen Nephropathie sowie dessen
Interaktion mit dem AT₁ Rezeptor**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Vanessa Ariane Dilger
aus Ludwigsburg

2007

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Luippold

2. Berichterstatter: Professor Dr. T. Risler

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Gegenstand der Arbeit	1
1.2 Allgemeine Grundlagen	1
1.2.1 Niere: Nephron und glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	1
1.2.2 Diabetes mellitus: Ätiologie, Pathophysiologie, Klinik	5
1.2.3 Diabetische Nephropathie: Entwicklung, Bedeutung, Folgen.....	8
1.3 Bisheriger Kenntnisstand über Dopamin	11
1.3.1 Synthese und Metabolismus des Dopamins	11
1.3.2 Wirkungen/Funktion von Dopamin	13
1.3.3 Dopaminrezeptoren.....	14
1.3.4 Der Dopamin D ₃ Rezeptor.....	16
1.3.4.1 Dopamin D ₃ Rezeptor und diabetische Nephropathie/Hyperfiltration	18
1.3.4.2 Dopamin D ₃ Rezeptor und arterielle Hypertonie	20
1.3.4.3 Dopamin D ₃ Rezeptor und AT ₁ Rezeptor	23
1.4 Eigene Fragestellung	25
2. MATERIAL UND METHODEN	26
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	26
2.2 Erzeugung von D₃ Rezeptor Knockout D₃(-/-) Mäusen	26
2.3 Diabetes mellitus Induktion bei Mäusen	27
2.4 Experimenteller Ablauf	28
2.4.1 Stoffwechselexperimente an wachen Mäusen	28
2.4.1.1 Versuchsgruppen der Stoffwechselfäfigexperimente	28
2.4.1.2 Stoffwechselfäfige.....	28
2.4.1.3 Versuchsablauf der Stoffwechselfäfigexperimente	29
2.4.1.4 Probengewinnung und -behandlung	29
2.4.2 Blutdruckmessung an wachen Mäusen.....	30
2.4.2.1 Versuchsgruppen	30
2.4.2.2 Blutdruckmessgerät.....	30

2.4.2.3 Versuchsaufbau.....	30
2.4.2.4 Datengewinn.....	31
2.4.3 Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen	32
2.4.3.1 Versuchsgruppen der Clearanceversuche	32
2.4.3.2 Narkose	32
2.4.3.3 Präparation	32
2.4.3.4 Applizierte Infusionslösungen.....	34
2.4.3.5 Zeitlicher Versuchsablauf	35
2.4.3.6 Probengewinnung.....	36
2.4.3.7 Nierenentnahme	36
2.5 Analytik	37
2.5.1 Analytierte Parameter.....	37
2.5.2 Gewichte und Volumina	38
2.5.3 Blutglukose.....	38
2.5.4 Elektrolytkonzentration (Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻) in Plasma und Urin	38
2.5.5 Osmolalität	39
2.5.6 Glukosebestimmung im Urin	39
2.5.7 Albuminbestimmung im Urin	40
2.5.8 Proteinbestimmung im Urin	41
2.5.9 Hämatokrit.....	41
2.5.10 [³ H]-Aktivität in Plasma und Urin	41
2.5.11 Nierenfeuchtgewicht.....	42
2.5.12 Histologische Untersuchung der Nieren.....	42
2.5.12.1 Morphometrie	42
2.5.12.2 Morphologie.....	44
2.6 Berechnungen und Statistik.....	45
2.6.1 Urinzeitvolumen (UV)	45
2.6.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	45
2.6.3 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	45
2.6.4 Absolute renale Elektrolytausscheidung	46

2.6.5 Fraktionelle renale Natriumauscheidung (FE_{Na}).....	46
2.6.5 Renale Albuminausscheidung.....	47
2.6.6 Nierenindex (NI)	47
2.6.7 Morphometrie	47
2.6.8 Statistische Methoden	48
3. ERGEBNISSE.....	49
3.1 Stoffwechselläufigversuche an wachen Mäusen.....	49
3.1.1 Blutglukose und Tiergewicht	53
3.1.2 Urin- und Trinkvolumen.....	54
3.1.3 Renale Elektrolytauscheidung (Na^+ , K^+ und Cl^-).....	55
3.1.4 Albumin- und Proteinurie.....	56
3.1.5 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz.....	57
3.1.6 Organgewichte und Histologie	59
3.1.6.1 Nierenindex und Herzgewicht	59
3.1.6.2 Morphologie.....	60
3.1.6.3 Morphometrie	61
3.2 Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen	64
3.2.1 Vergleich zwischen normoglykämischen und diabetischen Tieren.....	64
3.2.1.1 Urinvolumen und glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	67
3.2.1.2 Na^+ - / K^+ - Ausscheidung im Urin und fraktionelle Na^+ -Ausscheidung.....	68
3.2.1.3 MAP und Herzfrequenz	69
3.2.1.4 Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma	70
3.2.2 Vergleich zwischen jungen und alten normoglykämischen Tieren	71
3.2.2.1 Urinvolumen und glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	74
3.2.2.2 Na^+ - / K^+ -Ausscheidung im Urin und fraktionelle Na^+ -Ausscheidung.....	75
3.2.2.3 MAP und Herzfrequenz	76
3.2.2.4 Natrium -und Kaliumkonzentration im Plasma	77

4. DISKUSSION	78
4.1 Diskussion der Methoden	78
4.1.1 Das Dopamin D ₃ Rezeptor Knockout-Mausmodell.....	78
4.1.2 Diabetes mellitus Induktion mittels Streptozotozin (STZ)	80
4.1.3 Blutdruckmessung mit Hilfe der Schwanzvenenplethysmographie	82
4.2 Diskussion der Ergebnisse	83
4.2.1 Dopamin D ₃ Rezeptor und diabetische Nephropathie/Hyperfiltration ..	83
4.2.2 Dopamin D ₃ Rezeptor und arterielle Hypertonie	92
4.2.3 Dopamin D ₃ Rezeptor und AT ₁ Rezeptor	95
4.3 Schlußfolgerung	99
5. ZUSAMMENFASSUNG	100
6. LITERATURVERZEICHNIS	102
7. ANHANG	113

1. EINLEITUNG

1.1 Gegenstand der Arbeit

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des renalen Dopamin D₃ Rezeptors auf die Progredienz der diabetischen Nephropathie. Hierzu wurden Langzeitstoffwechselläufigexperimente an wachen normoglykämischen und diabetischen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- (KO) und Wildtyp- (WT) Mäusen durchgeführt. Desweiteren wurde mit den selben Versuchstieren die Bedeutung des Dopamin D₃ Rezeptors für die arterielle Hypertonie untersucht. Im zweiten Teil der Arbeit wurden Clearanceexperimente an narkotisierten normo- und hyperglykämischen Dopamin D₃ Rezeptor KO- und WT- Mäusen durchgeführt. Hierbei wurde die Interaktion zwischen Dopamin D₃ und Angiotensin Typ 1 (AT₁) Rezeptoren geprüft, wobei zusätzlich untersucht wurde, ob sich altersbedingte Effekte zeigten.

1.2 Allgemeine Grundlagen

1.2.1 Niere: Nephron und glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die kleinsten funktionellen Einheiten der menschlichen Niere sind die Nephrone, deren Aufgabe in der Harnbildung liegt. Die Anzahl der Nephrone beläuft sich auf etwa 1 bis 1,2 Millionen pro Niere, wobei jedes Nephron aus Nierenkörperchen (Malpighi-Körperchen) und tubulärem System besteht. Das Nierenkörperchen wiederum besteht aus dem Glomerulum, einem innerhalb der Bowmanschen Kapsel gelegenen Kapillarkonvolut bzw. Gefäßknäuel. Das tubuläre System setzt sich zusammen aus proximalem Tubulus, Henlescher Schleife, distalem Tubulus und Sammelrohr.

Der Vorgang der Ultrafiltration findet im Glomerulum statt, wobei das zu filtrierende Blut dem Glomerulum über das Vas afferens zugeführt wird. Über das Vas efferens gelangt das nicht abfiltrierte Blut aus dem Glomerulum dann in

die Vasa recta, die in das Nierenmark hinabziehen und an Rückresorptions- und Konzentrierungsvorgängen beteiligt sind. Als Hauptort der Filtration erfordern die Kapillaren des Glomerulums einen spezifischen Wandaufbau, der letztendlich ein dreischichtiges Filtersystem enthält. Dieses setzt sich zusammen aus dem fenestrierten Kapillarendothel, der Basalmembran und den Kapillarschlingen mit fußförmigen Ausläufern aufsitzenden Podozyten, die durch eine Schlitzmembran verbunden sind. Zwischen den Kapillaren befinden sich kontraktile Mesangiumzellen, die neben der Beteiligung an der glomerulären Filtration, durch die Kontrolle des kapillären Blutflusses, auch Stütz- und Makrophagozytosefähigkeit besitzen. Über die gefenesterte Kapillarmembran wird der Primärharn bzw. das Ultrafiltrat unter Rückhaltung der großmolekularen Bestandteile, wie z.B. die der Proteine und Blutzellen, in die Bowmansche Kapsel abfiltriert. Das von allen Glomeruli pro Zeiteinheit filtrierte Flüssigkeitsvolumen wird als glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bezeichnet. Diese ist das Produkt aus effektivem Filtrationsdruck (Differenz zwischen hydrostatischem Kapillardruck und Gewebedruck in der Bowmanschen Kapsel sowie onkotischem Druck der Plasmaproteine), glomerulärer Filtrationsfläche (abhängig von der Anzahl verfügbarer bzw. intakter Glomeruli) und hydraulischer Leitfähigkeit (Wasserpermeabilität des glomerulären dreischichtigen Filters).

Der Primärharn gelangt dann über den Harnpol in das sich anschließende tubuläre System, in welchem in etwa 99% des Primärharns wieder rückresorbiert und anschließend dem zirkulierenden Blut zugeführt werden (Berry 1996). Im proximalen Tubulus findet der Hauptteil der Reabsorption von Wasser, Elektrolyten, Aminosäuren und Glukose statt. So sind am Ende des proximalen Tubulus ca. 60% des Natriums, Chlorids und des abfiltrierten Wassers und nahezu 100% der abfiltrierten Glukose und der Aminosäuren rückresorbiert. Der Antrieb der Wasserrückresorption beruht zum einen auf der Resorption von Na^+ , Cl^- und HCO_3^- , denen das Wasser zum Ausgleich des osmotischen Gradienten folgt, und zum anderen auf der Wasseraufnahme in die peritubulären Kapillaren, die wiederum zurückzuführen ist auf den hier vorherrschenden erniedrigten hydrostatischen und hohen onkotischen Druck.

Über den sich im Anschluss an den proximalen Tubulus befindlichen intermediären Tubulus gelangt das Filtrat in die Henlesche Schleife. Auch hier werden im dünnen Teil der Henleschen Schleife ca. 25% des filtrierten Wassers in das hypertone Mark reabsorbiert. Im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife kommt es zu einem aktiven Salztransport ins Gewebe bei vorherrschender Wasserimpermeabilität. Durch das Gegenstromprinzip wird hier ein osmotischer Gradient erzeugt, der unabdingbar für die Konzentrierung des Harns ist. Der Henleschen Schleife schließt sich der distale Tubulus an, der eine Region spezialisierter Zellen enthält, die dem Gefäßpol des Glomerulums desselben Nephrons unmittelbar anliegen und als Macula densa bezeichnet wird. Die Macula densa gehört zusammen mit den extraglomerulären Mesangiumzellen (Lacis-Zellen, Goormaghtigh-Zellen) und den Polkissen (reninspeichernde epitheloide juxtaglomeruläre Zellen) zum juxtaglomerulären Apparat. Eine Hauptfunktion des juxtaglomerulären Apparats besteht zum einen im Mechanismus des tubulo-glomerulären Feedbacks (TGF), wobei je nach NaCl-Konzentration die Durchblutung des Vas afferens und somit des angeschlossenen glomerulären Systems reguliert wird. Werden somit an der Macula densa hohe NaCl-Konzentrationen gemessen, induziert dies eine lokale Vasokonstriktion, wodurch die Durchblutung des Glomerulums abnimmt und somit die GFR abfällt. Entsprechend hierzu kann man bei erniedrigten NaCl-Werten den reziproken Effekt beobachten (Schnermann et al. 1984). Desweiteren ist der juxtaglomeruläre Apparat der Hauptbildungsort des Hormons Renin. Renin wirkt auf Angiotensinogen und kann somit über das Angiotensin-Aldosteron-System den Blutdruck und den Natriumhaushalt beeinflussen indem die Natriumrückresorption stimuliert wird.

Über ein Verbindungsstück wird der Harn schließlich in das Sammelrohr geleitet, in welchem die endgültige Zusammensetzung des auszuscheidenden Urins erfolgt. Hierbei spielt der hormonelle Einfluss des Adiuretins (ADH) die entscheidende Rolle, welches für eine gesteigerte Permeabilität und somit für einen vermehrten Wasserübertritt in das hypertone Nierenmark sorgt. Dieser Mechanismus ermöglicht folglich eine stärkere Harnkonzentrierung.

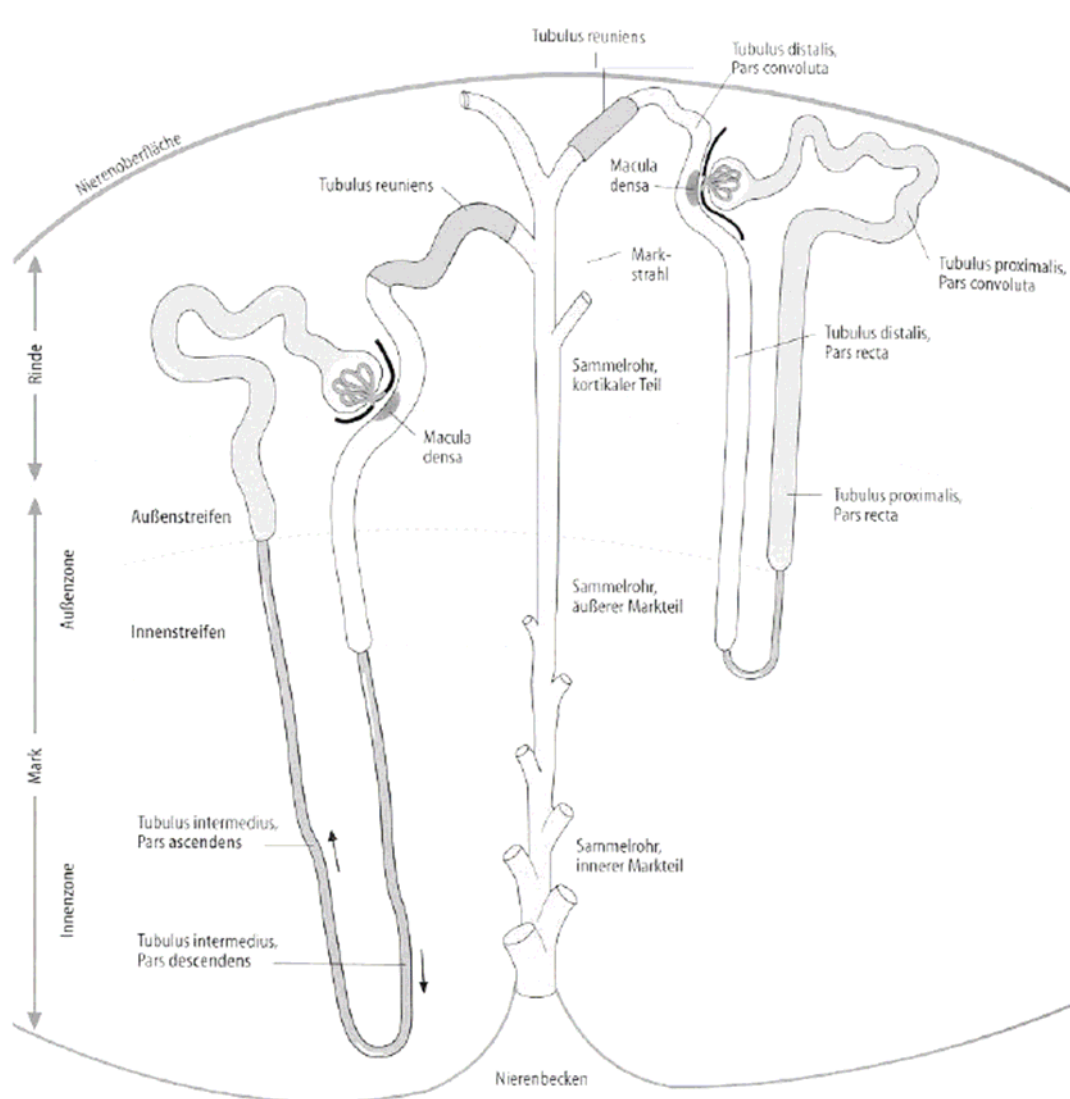


Abbildung 1: Schematische Darstellung eines juxtamedullären (links) und kortikalen (rechts) Nephrons mit jeweils langer, bzw. kurzer Henlescher Schleife. Die Grenzen von Mark und Rinde, bzw. die Zonen des Marks sind gestrichelt dargestellt. Das Sammelrohr und die geraden Abschnitte des proximalen und distalen Tubulus des kortikalen Nephrons liegen in einem Markstrahl, der ebenfalls durch eine gestrichelte Linie abgegrenzt ist (modifiziert nach Junqueira et al. 1996 (2005)).

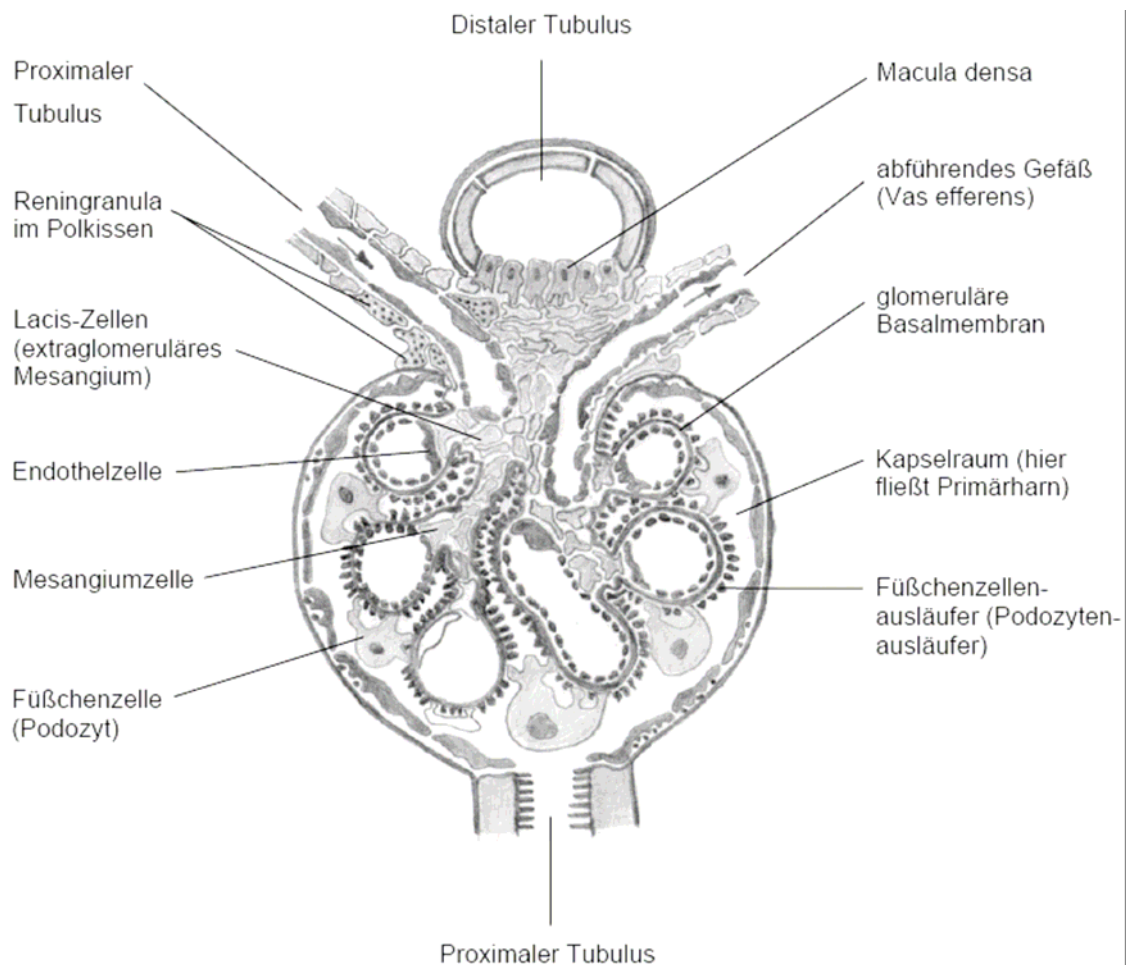


Abbildung 2: Schematische Darstellung eines Glomerulums (Staudacher (2005), modifiziert nach Spornitz (1996))

1.2.2 Diabetes mellitus: Ätiologie, Pathophysiologie, Klinik

Diabetes mellitus bedeutet wörtlich übersetzt „honigsüßer Durchfluss“ und ist eine der häufigsten endokrinen Stoffwechselerkrankungen der westlichen Industrienationen. So leiden in Deutschland derzeit ca. 7-8% der Erwachsenen an einem Diabetes mellitus. Der Hauptbefund ist sowohl ein chronisch erhöhter Blut- als auch Uringlukosespiegel, der unbehandelt zu typischen Spätschäden führt. Man unterscheidet je nach Ursache zwischen verschiedenen Diabetestypen, wobei hauptsächlich zwei Diabetesformen von Bedeutung sind. Zum einen der Typ-1 Diabetes mellitus, der meist im jugendlichen Alter auftritt

und einen absoluten Insulinmangel aufweist. Dieser ist zurückzuführen auf eine autoimmunologische B-Zelldestruktion der Langerhansschen Inseln mit nachfolgender Unfähigkeit des Pankreas Insulin zu produzieren. Ätiologisch findet sich eine genetische Prädisposition, die in Zusammenhang mit bestimmten HLA-Mustern (HLA-DR 3 und DR 4) steht. Zum anderen der Typ-2 Diabetes mellitus, der sich in der Regel erst ab dem 40. Lebensjahr manifestiert und von welchem ca. 90% der Diabetiker betroffen sind. Hier liegt ein relativer Insulinmangel vor, welcher sich zum einen durch die zunehmende Unempfindlichkeit der Zellen gegenüber Insulin (Insulinresistenz) und zum anderen durch eine inadäquate Insulinsekretion erklären lässt. Neben genetischen Ursachen sind auch verschiedene Umwelteinflüsse wie z.B. Bewegungsmangel und Fehlernährung von Bedeutung. Oft wird diese Form deshalb in Zusammenhang mit Adipositas und Metabolischem Syndrom beobachtet.

Absoluter und relativer Insulinmangel, d.h. sowohl Diabetes mellitus Typ-1 als auch Typ-2 führen zu Veränderungen in Kohlenhydrat-, Fett- und Proteinmetabolismus. Die Folge sind Hyperglykämie, Hyperlipidämie und gesteigerte Proteolyse. Die aus verminderter Glukoseaufnahme in die Zelle, Glykogenolyse und gesteigerter Glukoneogenese resultierende erhöhte Blutglukosekonzentration führt bei Überschreitung der sogenannten Nierenschwelle, die bei etwa 180 mg/dl liegt, zur Glukosurie. Resultierend hieraus kommt es durch die osmotische Wirkung der Glukose zu einer ausgeprägten Polyurie, die wiederum eine Polydipsie bedingt. Als weitere Allgemeinsymptome können z.B. Leistungsschwäche, Müdigkeit, Gewichtsverlust und Heißhunger beobachtet werden. Nach langjähriger Erkrankung können weitere Folgeschäden auftreten, wobei man zwischen mikro- und makroangiopathischen Veränderungen unterscheidet. Diabetes-typische Mikroangiopathien manifestieren sich vornehmlich an der Niere (Nephropathie), am Auge (Retinopathie) und an den Nerven (Neuropathie). Die Makroangiopathie führt zu vermehrtem Auftreten von Herzerkrankungen (KHK und Myokardinfarkt), zerebralen Durchblutungsstörungen (TIA und Schlaganfälle) und pAVK. Sowohl bei Diabetes mellitus Typ-1 als auch Typ-2 ist

die eingeschränkte Lebenserwartung gegenüber der Gesamtbevölkerung vom Auftreten mikro- und makroangiopathischer Komplikationen abhängig. So stehen kardiovaskuläre- und Nierenerkrankungen an der Spitze der allgemeinen Todesstatistik (Janka und Michaelis 2002).

Die in den westlichen Industrienationen stetig steigenden Zahlen der neu diagnostizierten Diabetes mellitus Patienten sind mit erheblichen Mehrkosten für das Gesundheitssystem verbunden. Im Rahmen der CODE-2[®]-Studie (Costs of Diabetes in Europe-Type 2 Study) wurden erstmals die Kosten erfasst, die durch Typ-2 Diabetiker in Europa entstehen. So wurden die durchschnittlichen Kosten pro Patient und Jahr (hier 1999) auf 2834 Euro geschätzt (Jonsson 2002). Hierbei wurde ebenfalls der Einfluss mikro- und makroangiopathischer Komplikationen an den Gesamtkosten analysiert, wobei die pAVK, Amputationen und Schlaganfälle als die kostenintensivsten festgesetzt wurden. Etwa die Hälfte aller an Typ-2 Diabetes mellitus Leidenden zeigten eine auf den Diabetes zurückzuführende Erkrankung, wobei 23% der Patienten sogar an zwei oder mehr als einer Folgeerkrankung litten. Die Kosten bei Patienten mit mikro- oder makroangiopathischen Komplikationen stiegen hier auf das 4,1 fache im Vergleich zum durchschnittlich versicherten Patienten (Liebl et al. 2002).

Der Fokus sollte somit auf präventive Maßnahmen und folglich der Vermeidung der Diabetes mellitus spezifischen Folgeerkrankungen gelegt werden. Ein optimiertes Monitoring, entscheidend sind regelmäßige Blutzuckerkontrollen und Urintests, ist somit sowohl aus medizinischer Sicht, zur Prognoseverbesserung, als auch aus wirtschaftlichen Gründen, zur Senkung der Mehrkosten, unerlässlich.

1.2.3 Diabetische Nephropathie: Entwicklung, Bedeutung, Folgen

Die diabetische Nephropathie ist die häufigste Ursache einer dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz in der westlichen Welt. In etwa 35-40% aller an Typ-1- Diabetes mellitus leidenden Patienten entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung eine diabetische Nephropathie (O'Donnell et al. 1988, Jones und Viberti 1995, Vora et al. 2000).

Es können fünf Stadien im Verlauf der diabetischen Nephropathie beobachtet werden, wobei der Patient erste Symptome meist erst im fortgeschrittenen Stadium mit zunehmender Proteinurie (Stadium IV) bemerkt. Das erste Stadium, welches zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose des Diabetes mellitus meist vorherrschend ist, wird auch als „Hypertrophie-Hyperfunktions-Stadium“ bezeichnet. Wie der Name schon sagt kommt es auf Grund der hyperglykämischen Stoffwechsellage und einer gestörten renalen Hämodynamik zu hypertrophen Nieren und einer glomerulären Hyperfiltration ($GFR \geq 150 \text{ ml/min}$). Im zweiten Stadium, dem sogenannten Latenzstadium, sind trotz erster histologischer Veränderungen, wie z. B. einer Verdickung der Basalmembran und einer Ausdehnung des Mesangiums, meist noch keine funktionellen Veränderungen feststellbar. Das dritte Stadium bezeichnet das früheste klinische Nephropathiestadium und ist gekennzeichnet durch eine Mikroalbuminurie, einer erhöhten Albuminexkretionsrate von ca. 30-300 mg/24 h, und erhöhten Blutdruckwerten. Dieses Stadium ist verbunden mit einem mehrfach erhöhten Risiko eine manifeste diabetische Nephropathie zu entwickeln. Kennzeichnend für das vierte Stadium, das Stadium der manifesten diabetischen Nephropathie, ist eine Makroalbuminurie (Proteinurie) mit Werten über 300 mg/24 h. Desweiteren kann eine zunehmende Nierenfunktionverschlechterung mit ausgeprägtem Rückgang der glomerulären Filtrationsrate (GFR) (um ca. 1 ml/min/Monat) und vermehrter Wassereinlagerung beobachtet werden. Ödeme und arterielle Hypertonie bestimmen somit das klinische Bild. Oft zeigen sich in diesem Stadium gleichzeitig auch erste makroangiopathische Veränderungen mit koronarer, zerebraler oder peripherer Symptomatik. Das fünfte Stadium bezeichnet das Endstadium bzw.

das Stadium der dialysepflichtigen terminalen Niereninsuffizienz und geht einher mit erhöhten Serumkreatininwerten und fortschreitendem Abfall der Nierenfunktion (GFR <30 ml/min).

Tabelle 1: Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie (nach Mogensen)

Stadium	Zeitverlauf	Charakteristische Symptome/Befunde	Prognose
I Hypertrophie-Hyperfunktionsstadium	Bei Diabetesdiagnose	Grosse Nieren, RPF und GFR erhöht	Reversibel
II Klinische Latenz	2 bis 5 Jahre	Verdickung der kapill. Basalmembran, Ausweitung des Mesangiums	Bedingt reversibel
III Beginnende Nephropathie	5 bis 15 Jahre	Mikroalbuminurie, Anstieg des Blutdrucks	Progression kann gestoppt werden
IV Klinisch manifeste Nephropathie	10 bis 25 Jahre	Persistierende Proteinurie, RPF und GFR Abnahme, Hypertonie in ca. 60%	Progression kann gebremst werden
V Niereninsuffizienz	15 bis 30 Jahre	Serum- Kreatinin erhöht, Hypertonie in ca. 90%	Irreversibel

Synonym für den Begriff der „diabetischen Nephropathie“ wird oft auch der Begriff der diffusen, nodulären diabetischen Glomerulosklerose (M. Kimmelstiel-Wilson) gebraucht, welche hauptsächlich bei Diabetes mellitus Typ-1 beobachtet werden kann. Wie bereits erwähnt, kommt es durch Ablagerung von Glykoproteinen in Basalmembran und Mesangiumzellen, durch eine Mesangiumvergrößerung und Basalmembranverbreiterung, zu einer Störung der renalen Filterfunktion, welche experimentell am Rattenmodell auch schon in frühen Stadien (vier Tage nach Induktion eines Diabetes mellitus) beobachtet werden konnte (Österby und Gundersen 1980).

Schon innerhalb der ersten Jahre nach Manifestation eines Diabetes mellitus kann bei bis zu 25 % der Typ-1 und einer geringeren Anzahl an Typ-2 Diabetikern eine glomeruläre Hyperfiltration beobachtet werden (Jones und

Viberti 1995). Der genaue Pathomechanismus, der zur Erhöhung der GFR führt ist dennoch nicht eindeutig geklärt. Die glomeruläre Hyperfiltration wird von einigen Autoren als ein Frühzeichen für einen später auftretenden glomerulären Schaden im Rahmen einer diabetischen Nephropathie betrachtet (Mogensen 1986, Ibrahim et al. 1997). Um diejenigen Patienten zu identifizieren, die ein erhöhtes Risiko aufweisen eine diabetische Nephropathie zu entwickeln, sollte deshalb möglichst frühzeitig eine Messung der GFR und der renalen Albuminexkretion stattfinden (Mogensen 1986).

Auch die Mikroalbuminurie kann als ein entscheidender prognostischer Faktor betrachtet werden, deren Auftreten stark mit der Entwicklung einer diabetischen Nephropathie und somit der einer terminalen Niereninsuffizienz korreliert (Mogensen und Christensen 1984, Ibrahim und Vora 1999). Die Mikroalbuminurie ist somit ein Marker für eine endotheliale Dysfunktion und ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko (Bakris 2001).

Eine entscheidende Rolle, die Progredienz der diabetischen Nephropathie und somit einen möglichen zukünftigen Organschaden zu verhindern, sind frühzeitige präventive Maßnahmen. Hierbei ist ein optimales Stoffwechselmonitoring, d.h. regelmäßige Blutzuckerkontrollen sowie regelmäßige Kontrollen und frühzeitige Behandlung der Mikroalbuminurie notwendig um die Entwicklung bzw. das Fortschreiten renaler Schäden zu verhindern. (Ibrahim und Vora 1999, Mogensen 1997). In einer prospektiven Studie (über 12 Jahre) konnte gezeigt werden, dass die optimale Blutzuckerkontrolle die Mikroalbuminurierate der Patienten um 30 % verringert (UKPDSG 1998). Ein weiterer Risikofaktor für die Entwicklung einer Mikroalbuminurie und einer damit verbundenen diabetischen Nephropathie sind erhöhte Blutdruckwerte. Prognostisch ist somit neben optimaler Stoffwechselkontrolle auch eine effektive und aggressive antihypertensive Therapie von entscheidender Bedeutung (Vora et al. 2000, Rossing et al. 2005). Optimalerweise sollte somit ein Blutdruck von unter 130/80 mmHg angestrebt werden (Bakris 2001). Allerdings kann bei bis zu 90% der sowohl an Hypertonus als auch an Diabetes mellitus leidenden Patienten der erwünschte systolische Blutdruckwert von <130 mmHg nicht erreicht werden (Bakris 2003). In einer prospektiven Studie

konnte jedoch gezeigt werden, dass sich durch die Mitte der 80er Jahre eingeführte routinemäßige antihypertensive Therapie und den verbesserten Blutzuckerkontrollen bei Patienten mit diabetischer Nephropathie, eine erhebliche Lebenszeitverlängerung erreicht werden konnte (Astrup et al. 2005).

1.3 Bisheriger Kenntnisstand über Dopamin

1.3.1 Synthese und Metabolismus des Dopamins

Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylethylamin) ist ein biogenes Amin aus der Gruppe der Katecholamine, dessen Synthese aus den Aminosäuren Tyrosin bzw. Phenylalanin erfolgt. Durch die Phenylalaninhydroxylase wird aus Phenylalanin Tyrosin gebildet, welches enzymatisch zu 3,4 L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) hydroxyliert wird. In einem weiteren Schritt der Biosynthese wird schliesslich L-DOPA durch eine spezifische Decarboxylase (AADC = aromatic L-amino acid decarboxylase) in Dopamin umgewandelt. Dopamin ist der direkte biochemische Vorläufer des Katecholamins Noradrenalin. Durch Hydroxylierung einer Seitenkette wird durch die Monooxygenase Dopamin- β -Hydroxylase aus Dopamin Noradrenalin gebildet, welches durch N-Methylierung mit Hilfe der N-Methyltransferase zu Adrenalin umgewandelt wird.

Die Biosynthese des Dopamins findet sowohl in neuronalem als auch in nicht-neuronalem Gewebe statt. Zu den Bildungsorten zählen dopaminerge Neuronen des ZNS und des peripheren Nervengewebes, das Nebennierenmark sowie die Niere selbst. Das synthetisierte Dopamin wird ebenso wie Noradrenalin und Adrenalin in Vesikeln gespeichert und nach calciumvermittelter Depolarisation in den synaptischen Spalt entleert. Die Inaktivierung des Dopamins erfolgt entweder durch die Wiederaufnahme in präsynaptische Nervenendigungen oder enzymatisch. Der enzymatische Abbau erfolgt durch die Monoaminoxidase (MAO) und die Catechol-O-Methyltransferase (COMT). Das Hauptabbauprodukt ist hierbei die 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure (Vanillinmandelsäure), die letztendlich mit dem Harn ausgeschieden wird (Petrides 1990).

Wie bereits erwähnt, stellt die Niere bzw. die proximalen Tubuluszellen der Niere einen wichtigen Ort der Dopaminsynthese dar. Da in der vorliegenden Arbeit das Hauptaugenmerk auf der nicht-neuronalen Dopaminfreisetzung des renalen Systems liegt, soll genauer auf die Synthese des renalen Dopamins eingegangen werden. So wird das im Blutkreislauf zirkulierende L-DOPA glomerulär filtriert und ins Zytoplasma proximaler Tubuluszellen aufgenommen. Die Aufnahme in die proximalen Tubuluszellen erfolgt aus dem Tubuluslumen über apikale Natrium-abhängige Transporter (Soares-da-Silva et al. 1994). In den Tubuluszellen kann eine hohe Konzentration an L-Dopadecarboxylase (AADC) nachgewiesen werden (Hayashi et al. 1991), welche schliesslich L-DOPA in Dopamin umwandelt (Bertorello et al. 1988). Der genaue Vorgang der Dopaminspeicherung und dessen Freisetzung aus den Tubuluszellen ist nach wie vor weitestgehend ungeklärt.

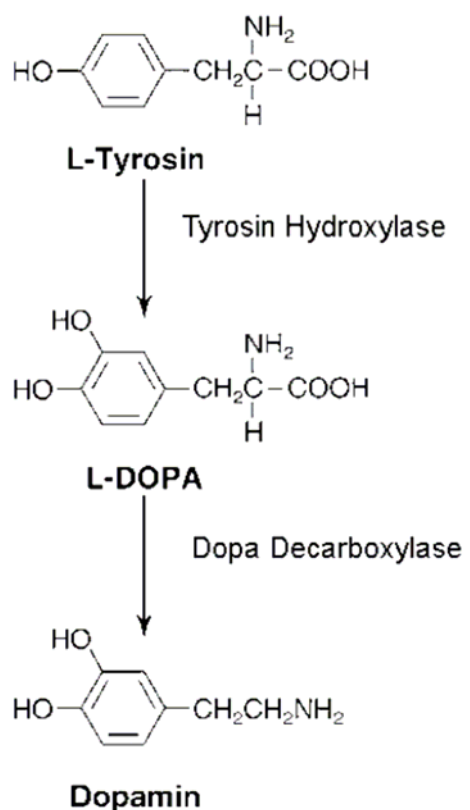


Abbildung 3: Dopaminsynthese aus L-Tyrosin (Siegel et. al (1998)).

1.3.2 Wirkungen/Funktion von Dopamin

Dopamin ist an vielen verschiedenen Regulations- und Steuerungsvorgängen des Organismus beteiligt. Unter anderem spielt Dopamin eine wichtige Rolle als Neurotransmitter des zentralen Nervensystems. Es hat entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung verschiedener Erkrankungen, wie z.B. die des Morbus Parkinson und der Schizophrenie. Durch eine Degeneration melaninhaltiger, dopaminerger Zellen in der Pars compacta der Substantia nigra kommt es durch eine verminderte Dopaminproduktion zum klinischen Bild des Morbus Parkinson. Gestützt wird diese Erkenntnis durch die Therapiemöglichkeit der M. Parkinson spezifischen Symptome mit der Dopaminvorstufe L-DOPA. Andererseits besteht die Annahme, dass durch die dopaminerge Überaktivität im mesolimbischen System das Krankheitsbild der Schizophrenie bedingt ist. Die Symptomatik dieser Patienten kann durch die Verabreichung von Dopaminrezeptorantagonisten, die die Aktivität des Dopamins an entsprechenden Neuronen herabsetzen bzw. blockieren, entscheidend verbessern. Desweiteren werden dem Dopamin eine Beteiligung an der Steuerung kognitiver, emotionaler und motorischer Leistungen zugeschrieben. Ein Einfluss auf das Brechzentrum, die Körpertemperatur sowie auf die Hormonsynthese und deren Freisetzung werden ebenfalls beschrieben (Jose et al. 1992, Missale et al. 1998).

Zusätzlich können auch dopaminerge periphere Wirkungen beobachtet werden, so zeigen sich beispielsweise kardiovaskuläre Effekte in einer Steigerung der Myokardkontraktilität, sowie gastrointestinale Wirkungen in einer Verbesserung der Mesenterialdurchblutung. Renale Wirkungen des exogenen Dopamins zeigen sich in einer Steigerung der GFR und des renalen Plasmaflusses (RPF) (Greven und Klein 1977, Olsen et al. 1990) sowie in einer Steigerung der Natriurese (Meyer et al. 1967, Olsen et al. 1990) und Diurese (Doggrell 2002). Die Natriurese soll hierbei hauptsächlich über die Dopamin D₁ Rezeptorfamilie vermittelt werden (Baines und Drangova 1986).

Die Wirkung des Dopamins ist dosisabhängig. In niedriger Dosierung, der sogenannten „Nierendosis“ (1-3 µg/kg/min), kommt es durch die vaso-

dilatatorische Wirkung zu einer Beeinflussung der renalen und intestinalen Hämodynamik. Durch eine Erniedrigung des renalen Widerstands wird die GFR und Diurese gesteigert. In mittlerer Dosierung (ca. 4-8 µg/kg/min) kommen hauptsächlich β-adrenerge Effekte zum tragen, wobei sich hier v.a. durch die positive Inotropie klinische Anwendung bei der Behandlung der akuten Herzinsuffizienz und dem kardiogenen Schock findet. In höherer Dosierung (> 8-10 µg/kg/min) kommt es durch die Stimulation von α- Adrenorezeptoren und der dadurch zunehmenden Freisetzung von Noradrenalin zu vaso-konstriktorischen Effekten, welche zu einer Erhöhung des peripheren Widerstands, einer damit verbundenen Blutdruckerhöhung und verminderter renaler und intestinaler Durchblutung führen. Durch die Verminderung des renalen Blutflusses tritt schliesslich eine reduzierte Diurese auf.

Durch oben angeführte renale und kardiovaskuläre Wirkungen des Dopamins wird bzw. wurde dieses im klinischen Alltag zur Verlaufsverbesserung bei der schockbedingten Niereninsuffizienz eingesetzt (Goldberg 1972, Hoffman und Lefkowitz 1996). Heutzutage ist der therapeutische Nutzen jedoch umstritten, denn es konnte diesbezüglich in einigen durchgeführten Studien kein positiver Einfluss gezeigt werden (Bellomo et al. 2000, Lassnigg et al. 2000, Kellum und Decker 2001, Mühlbauer 1996). Nach exogener Dopaminapplikation konnte sogar eine intestinale Ischämie und Hypoxie beobachtet werden (Pawlik et al. 1976, Mühlbauer 1996), welche somit sogar schädigende Effekte hätte.

1.3.3 Dopaminrezeptoren

Die Wirkung des Dopamins wird über spezifische membranständige Rezeptoren vermittelt. In früheren Jahren wurden zwei Rezeptorfamilien unterschieden, die im zentralen Nervensystem (ZNS) als D₁ und D₂-Rezeptoren (Kebabian und Calne 1979) bzw. in der Peripherie als DA₁ und DA₂-Rezeptoren (Goldberg und Kohli 1983) bezeichnet wurden. Da sich jedoch keine wesentlichen Unterschiede zwischen zentralen und peripheren Dopaminrezeptoren zeigten, wurde die Unterscheidung in DA₁ und D₁ bzw. DA₂ und D₂ weitestgehend verlassen (O'Connell et al. 1995, Missale et al. 1998).

Durch molekularbiologische Untersuchungen konnten weitere Rezeptorsubtypen identifiziert werden, welche entsprechend ihrer pharmakologischen Eigenschaften in die D₁- oder die D₂-ähnliche Familie eingeteilt wurden. Dopamin D₁ und D₅ Rezeptoren wurden hierbei zur D₁-ähnlichen Familie, Dopamin D₂, D₃ und D₄ Rezeptoren zur D₂-ähnlichen Familie gerechnet (O'Connell et al. 1995, Missale et al. 1998).

Die Differenzierung in die beiden Subfamilien kommt mitunter durch deren unterschiedliche Kopplung an intrazelluläre Effektorsysteme. Die Vermittlung der Dopaminwirkung an Rezeptoren der D₁-ähnlichen Familie erfolgt über ein stimulierendes G_s-Protein, welches die Adenylatcyclase (AC) aktiviert, was wiederum in einer Erhöhung der cAMP-Konzentration als second messenger resultiert (Gingrich und Caron 1993). Desweiteren wird angenommen, dass es durch eine Dopamin D₁ Rezeptor vermittelte Stimulation der Phospholipase C zur Aktivierung von Diacylglycerin (DAG) und Phosphoinositol (IP₃) kommt (Felder et al. 1989). Als Folge hieraus kann eine Erhöhung des intrazellulären Calciumgehalts beobachtet werden.

Die Wirkung an D₂-ähnlichen Rezeptoren scheint über verschiedene Signalkaskaden vermittelt zu werden (Missale et al. 1998). Mitunter kommt es über ein inhibitorisches G_i-Protein zu einer Hemmung der AC (Gingrich und Caron 1993). Auch Interaktionen mit Kaliumkanälen, Calciumkanälen sowie eine Beteiligung am IP₃ Metabolismus wurden beobachtet (Sibley und Monsma 1992, Jose et al. 1992, Gingrich und Caron 1993). Der Wissensstand über die Signalkopplung der Dopamin D₃ und D₄ Rezeptoren ist jedoch noch immer unzureichend.

Das Vorkommen der Dopaminrezeptoren im Organismus ist multifokal, wobei jedoch inzwischen jeder der fünf gängigen Dopaminrezeptoren in der Niere lokalisiert werden konnte (Jose et al. 1992, Amenta 1997, O'Connell et al. 1998, Felder et al. 2000). Der Nachweis von D₁ Rezeptoren, welche postsynaptisch lokalisiert sind, gelang auf glatten Muskelzellen von Nieren- und Mesenterialgefäßen sowie der Koronararterien. Renal konnte dieser immunhistochemisch im juxtaglomerulären Apparat, im proximalen Tubulus

sowohl apikal als auch basolateral, im distalen Tubulus und im Sammelrohr nachgewiesen werden (O'Connell et al. 1995).

Rezeptoren der D₂-ähnlichen Familie, welche sowohl prä- als auch postsynaptisch exprimiert werden, konnten im ZNS (z.B. im Corpus striatum, Hypophysenvorderlappen, Area postrema), im Glomerulum, im proximalen und distalen Tubulus und den renalen Gefäße lokalisiert werden (Hussain und Lokhandwala 1998). Da sich die vorliegende Arbeit hauptsächlich mit der Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors beschäftigt, wird auf dessen Lokalisation im folgenden Kapitel (siehe Kap. 1.3.4) eingegangen.

1.3.4 Der Dopamin D₃ Rezeptor

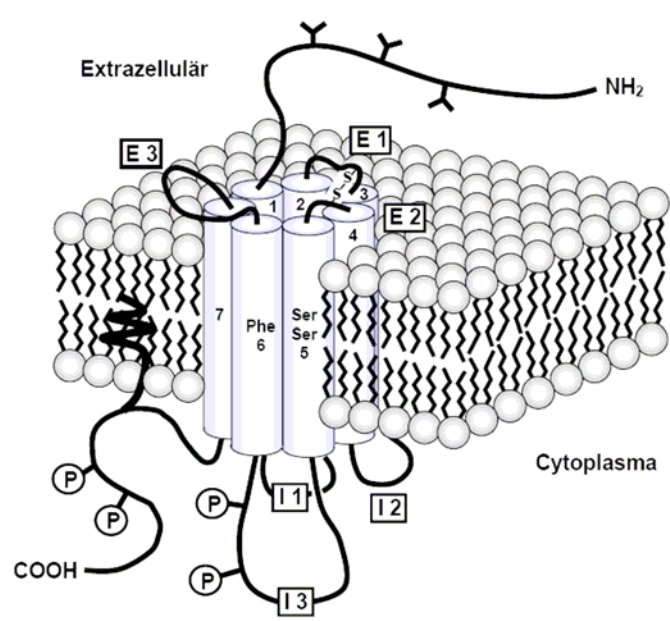


Abbildung 4: Schematische Darstellung des Dopamin D₃ Rezeptors (Staudacher (2005), modifiziert nach Missale et al. (1998)).

Erstmals konnte der Dopamin D₃ Rezeptor 1990 von Sokoloff et al. im Rattengehirn durch Klonierung identifiziert werden. Im Zuge dessen konnte auch der humane D₃ Rezeptor kloniert werden. Die genetische Information konnte hierbei der q13.3-Bande des Chromosoms 3 zugeordnet werden (Giros et al. 1989). Der D₃ Rezeptor bildet sieben transmembranäre Domänen aus,

was auf eine Zugehörigkeit zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren hindeutet. Zwischen D₂ und D₃ Rezeptor beobachtete man eine Homologie von 52%, wohingegen sich diese auf 78% erhöht wenn nur die transmembranären Domänen betrachtet werden. Es konnte zudem gezeigt werden, dass der D₃ Rezeptor, wie auch der D₂ Rezeptor als postsynaptischer Rezeptor und vermutlich auch als Autorezeptor fungiert. Der D₃ Rezeptor konnte sowohl auf prä- als auch postsynaptischen Membranen lokalisiert werden (Kim et al. 2005). Zusätzlich fand man heraus, dass Dopamin eine 20fach höhere Affinität für den D₃ im Vergleich zum D₂ Rezeptor aufweist (Sokoloff et al. 1992).

Lokalisiert werden konnte der Dopamin D₃ Rezeptor sowohl zentral als auch peripher. Im ZNS wurde dieser im Bereich des Nucleus caudatus, im Striatum, im Tuberculum olfactorium und in Teilen des limbischen Systems beobachtet (Aretha et al. 1995). Auch Sokoloff et al. (1990) konnten schon zeigen, dass es beim Nachweis des Dopamin D₃ Rezeptors vornehmlich zur Signalexpression im ventralen Striatum und anderen Teilen des limbischen Systems, wie z.B. in denen des Hippocampus und Hypothalamus, kommt. In der Peripherie konnte der Dopamin D₃ Rezeptor mitunter in der Niere lokalisiert werden. O'Connell et al. (1998) gelang ein immunhistochemischer, immunocytochemischer Nachweis in der Rattenniere, wobei der Dopamin D₃ Rezeptor hierbei hauptsächlich im apikalen Teil des proximalen und distalen Tubulus, im renalen Cortex, im Sammelrohr, in den Glomeruli, hier v.a. in Podozyten und in den renalen Arteriolen identifiziert werden konnte. In Mesangiumzellen, juxtaglomerulären Zellen und dem Nierenmark konnte kein D₃-Signal detektiert werden, was jedoch anderen Arbeiten widerspricht, die in juxtaglomerulären Zellen (Sanada et al. 1997) D₃ Rezeptoren nachweisen konnten. In der eigenen Arbeitsgruppe gelang eine Lokalisation des Dopamin D₃ Rezeptors im renalen Kortex und im proximalen Konvolut, v.a. in der Nähe bzw. in Verbindung zum glomerulären Harnpol (Nürnberger et al. 2004). Eine erhöhte Rezeptordichte konnte hierbei v.a. unterhalb des Bürstensaums der subapikalen Membran beobachtet werden.

Die Datenlage, die Signalkaskade des D₃ Rezeptors bzw. die Kopplung an intrazelluläre Effektorsysteme betreffend, ist noch immer uneinheitlich.

Anfänglich wurde noch berichtet, dass der D₃ Rezeptor weder die AC inhibiert noch an G-Proteine koppelt (Sokoloff et al. 1990). Inzwischen konnte jedoch eine schwache Inhibition der AC durch den D₃ Rezeptor gezeigt werden (Missale et al. 1998). Desweiteren konnte nachgewiesen werden, dass der Calciumeinwärtsstrom durch den D₃ Rezeptor gehemmt wird, wohingegen andererseits der Arachidonsäurestoffwechsel und die IP₃ Kaskade jedoch nicht beeinflusst zu sein scheinen (Missale et al. 1998).

1.3.4.1 Dopamin D₃ Rezeptor und diabetische Nephropathie/Hyperfiltration

Wie bereits in Kap. 1.2.3 besprochen, ist auch heutzutage die diabetische Nephropathie noch immer einer der Hauptgründe für die Entstehung einer terminalen Niereninsuffizienz. Dopaminrezeptoren bzw. allgemein das dopaminerge System sind an multiplen Regulationsvorgängen des Organismus beteiligt (siehe Kap. 1.3.2). Dem Dopaminsystem wird so auch ein entscheidender Einfluss auf die renale Hämodynamik und Exkretionsfunktion zugeschrieben. Nach Dopaminapplikation konnte somit neben einer erhöhten Natriumexkretion sowohl eine gesteigerte Kalium- als auch Calciumausscheidung beobachtet werden (Lee 1993). Letztendlich wird auch eine Beteiligung bei der Vermittlung der diabetischen Nephropathie und somit bei der glomerulären Hyperfiltration angenommen.

Auf Grund dieser Annahme wurden verschiedene Studien durchgeführt, die diese Vermutung teilweise untermauern. So konnte in einer Arbeit von Barthelmebs et al. 1991 gezeigt werden, dass durch die Stimulation von Dopamin D₁ Rezeptoren eine Normalisierung der Diabetes bedingten glomerulären Hyperfiltration erreicht werden kann. Hierbei konnte die glomeruläre Hyperfiltration bei Ratten in diabetogener Stoffwechsellage (Streptozotozin induziert) sowohl durch die Gabe von Dopaminvorstufen (L-Dopa und Gludopa) als auch durch die Gabe des selektiven D₁ Agonisten Fenoldopam aufgehoben werden.

Bezüglich der Beteiligung der Rezeptoren der D₂ Unterfamilie konnte durch die Applikation von Quinpirol, einem D₂ ähnlichen Agonisten, die Aminosäuren

induzierte Hyperfiltration bei Ratten imitiert werden. Sowohl die aminosäurebedingte Steigerung der GFR als auch die Nachahmung durch Quinpirol konnte mit dem D_2 ähnlichen Rezeptorantagonisten Domperidon teilweise und mit S (-)-Sulpirid vollständig aufgehoben werden. Die Schlussfolgerung daraus war, dass die glomeruläre Hyperfiltration letztendlich über D_2 ähnliche Rezeptoren vermittelt wird (Luippold und Mühlbauer 1998). Auf Grund der vornehmlichen Wirkung von Quinpirol an Dopamin D_3 Rezeptoren (Seeman und Schaus 1991) wurden weitere Studien hauptsächlich bezüglich dieses Rezeptors, so auch in vorliegender Arbeit, vorgenommen.

In unserer eigenen Arbeitsgruppe konnte auf funktioneller Ebene gezeigt werden, dass es nach pharmakologischer Stimulation des Dopamin D_3 Rezeptors durch 7-OH-DPAT, einem selektiven D_3 Rezeptor Agonisten, dosisabhängig sowohl zu einer GFR Steigerung als auch zur Natriurese kommt. Durch die Vorbehandlung mit dem selektiven Dopamin D_3 Rezeptorantagonisten U-99194A konnte durch die 7-OH-DPAT Gabe keine glomeruläre Hyperfiltration hervorgerufen werden (Luippold et al. 1998). In weiteren Studien konnte zum einen durch eine D_2 -ähnliche Rezeptorblockade (Luippold et al. 2001a) und zum anderen durch die Applikation eines peripher wirkenden selektiven Dopamin D_3 Rezeptorantagonisten, hier BSF-135170 (Luippold et al. 2005), die diabetesbedingte pathologische GFR Steigerung wieder in Bereiche der gesunden Kontrolltiere normalisiert werden.

Als Maß für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie spielen diagnostisch, neben der Messung der GFR, auch die Bestimmung sowohl der Albumin- als auch der Proteinexkretion im Urin (siehe Kap. 1.2.3) eine entscheidende Rolle. In einer Arbeit von Gross et al. 2006 zeigte sich im Diabetes mellitus Typ II Modell bei spontan hypertensiven SHR/N-cp Ratten, bei sowohl den Tieren, die einen Dopamin D_3 Rezeptorantagonisten (BSF 201640) als auch bei denen, die einen ACE Hemmer (hier Trandolapril) erhalten hatten, eine signifikante Verminderung der Albuminurie im Vergleich zu den unbehandelten, diabetischen Tieren. Es konnte also erneut gezeigt werden, dass der Einsatz eines Dopamin D_3 Rezeptorantagonisten einen vorteilhaften Einfluss auf den Verlauf bzw. auf die Entwicklung einer diabetischen

Nephropathie, in vergleichbarem Ausmaß wie die Gabe eines ACE Hemmers, aufweist.

Die Untersuchung der Albumin- bzw. Proteinurie im Diabetes mellitus Typ I Modell (STZ induziert) wurde wiederum in der eigenen Arbeitsgruppe in einer Langzeitstudie (46 Wochen) durchgeführt, welche den Langzeiteffekt eines Dopamin D₃ Rezeptorantagonisten (BSF 201640) bezüglich der diabetischen Nephropathie untersuchte. Auch hier gelang der Nachweis, dass die pharmakologische Inhibition des Dopamin D₃ Rezeptors, wie auch der Einsatz eines ACE Hemmers, eine Reduktion der diabetisch bedingten Albumin- und Proteinurie bedingt. Hier jedoch in deutlicherem Ausmaß durch den ACE Hemmer (nicht publizierte Daten). Die Datenlage diesbezüglich ist jedoch kontrovers, so konnte in einer Studie von Petterson-Fernholm et al. (2005) kein Anhalt auf eine Beteiligung des Dopamin D₃ Rezeptors an der Pathogenese der diabetischen Nephropathie bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ I nachgewiesen werden. Hierbei handelte es sich jedoch um eine Polymorphismusstudie bezüglich des Dopamin D₃ Rezeptors und nicht, wie in oben genannten Arbeiten um eine funktionelle Studie mit Dopamin D₃ Rezeptorantagonisten.

Zusammengefasst legen diese Daten jedoch nahe, dass die Dopamin D₃ Rezeptorblockade eine Verminderung der diabetischen Hyperfiltration bewirken kann. Neben der bereits erwähnten pharmakologischen Inhibition, soll dies nun in vorliegender Arbeit am Dopamin D₃ Rezeptor- Knockout Mausmodell untersucht werden.

1.3.4.2 Dopamin D₃ Rezeptor und arterielle Hypertonie

Die Ätiologie und Pathogenese der primären bzw. essentiellen Hypertonie ist multifaktoriell und noch immer nicht vollständig geklärt. Die Hypertonie gilt als einer der wichtigsten Riskofaktoren für die Entstehung von KHK, Schlaganfall und terminaler Niereninsuffizienz (Lifton 1996). In den westlichen Industrienationen liegt die Prävalenz der Hypertonie bei 10-20% der Gesamtbevölkerung und zeigt auf Grund verschiedener Umwelt- und Ernährungseinflüsse, wie z.B. erhöhte Kochsalzzufuhr, fettreiche Kost, übermäßigem Nikotinkonsum und

Stress, eine stetig steigende Tendenz. Für die Entstehung des Bluthochdrucks spielen neben diesen sozioökonomischen und psychischen Faktoren sowohl eine genetische Disposition als auch hämodynamische und renale Mechanismen eine entscheidende Rolle.

Über seine spezifischen Rezeptoren greift das Dopamin regulatorisch sowohl in das kardiovaskuläre als auch in das renale System ein (Jose et al. 1992) (siehe auch 1.3.2). Eine primär vasodilatatorische Wirkung konnte bei Rezeptoren der D₁- und D₂-Familie nachgewiesen werden, welche in renalen, mesenterialen, koronaren, pulmonalen und zerebralen Widerstandsgefäßen lokalisiert werden konnten (Jose et al. 1999). Im ZNS hingegen scheinen vor allem die D₂-ähnlichen Rezeptoren (D₂, D₃ und D₄) eine tragende Rolle bei der Beteiligung an der Blutdruckregulation zu spielen (Lin und Yang 1994, Jose et al. 1999).

Sekundäre Botenstoffe wie z.B. ANF (atrialer natriuretischer Faktor), ADH (antidiuretisches Hormon), Aldosteron und schliesslich Renin-Angiotensin sind an der Langzeitregulation des Gesamtkörperwassers beteiligt. Dopamin wiederum scheint an deren Regulation beteiligt zu sein und somit einen indirekten Einfluss auf den Blutdruck zu haben (Guyton 1980). Im Rattenmodell konnte gezeigt werden, dass die ADH-Ausschüttung durch Rezeptoren der D₂-Rezeptorfamilie stimuliert und durch Rezeptoren der D₁-Familie inhibiert wird (Nagahama et al. 1986). Eine andere Arbeit kam zu dem Schluss, dass die Aldosteronsekretion aus der Nebenniere über Rezeptoren der D₂-Familie inhibiert werden kann. Zum einen durch direkten Angriff an den Zellen der Zona glomerulosa und zum anderen indirekt über das ZNS. Welcher Mechanismus im einzelnen vorliegt, scheint jedoch speziesabhängig zu sein (Carey und Sen 1986). Die Rolle der Rezeptoren der D₁-Familie konnte in diesem Zusammenhang noch nicht vollständig geklärt werden (Aherne et al. 1997).

Auch die Reninausschüttung scheint sowohl an D₁- als auch an D₂-Rezeptor vermittelte Effektorsysteme gekoppelt zu sein. So soll die Stimulation der Rezeptoren der D₁-Familie (D₁ und D₅) zu einer Steigerung der Reninfreisetzung aus juxtaglomerulären Zellen (Kurtz et al. 1988, Yamaguchi et al. 1997) führen, welche auch durch natriuretische und hypotone Effekte mitbedingt zu sein scheint. Die Stimulation der D₂-Rezeptorenfamilie (v.a. D₃

und D₄) hingegen wirkt inhibierend auf die Reninsekretion (Sanada et al. 1997, Jose und Felder 1996, Jose et al. 1997). Die Rezeptorfunktionen scheinen bei der Reninausschüttung zudem vom Zustand des Natriumhaushaltes abhängig zu sein (Williams et al. 1985, Bertorello et al. 1988).

Die Funktion des Dopamin D₁- und auch des D₃ Rezeptors bezüglich der Ätiologie des Hypertonus wurde schon mehrfach mittels Knockout Mäusen untersucht. So untersuchte Albrecht et al. (1996) inwieweit der Dopamin D₁ Rezeptor Einfluss auf die Entstehung einer arteriellen Hypertonie hat. Hierzu wurde das Knockout Mausmodell gewählt, wobei v.a. bei den Knockouttieren, jedoch auch bei den heterozygoten Tieren ein deutlicher, sowohl systolischer als auch diastolischer, Blutdruckanstieg verzeichnet werden konnte. Die Wildtypiere hingegen zeigten normotensive Werte.

Da in vorliegender Arbeit jedoch das Hauptaugenmerk auf der Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors liegt, soll nun auf dessen Bedeutung für die arterielle Hypertonie näher eingegangen werden. Asico et al. (1998) konnte bei Dopamin D₃ Rezeptor Knockout Mäusen einen Anstieg des Blutdrucks (ca. 20 mmHg) beobachten. Hierbei zeigten sich wiederum erhöhte Blutdruckwerte sowohl bei den homozygoten Knockouttieren als auch bei den heterozygoten Tieren, die Wildtypmäuse zeigten erwartungsgemäß normotensive Werte. Wie bereits erwähnt, kommt es durch die Stimulation der D₂-Rezeptorenfamilie (v.a. D₃ und D₄) zu einer Inhibition der Reninsekretion aus juxtaglomerulären Zellen, in welchen der D₃ Rezeptor lokalisiert werden konnte (Sanada et al. 1997). Auf Grund dessen wurde die renale Reninaktivität bei oben genannten Versuchstieren gemessen, wobei sich bei den homozygoten Knockouttieren im Vergleich zu den Wildtypieren, entsprechend des jeweiligen Blutdruckverhaltens, eine deutlich erhöhte Reninaktivität zeigte (Asico et al. 1998). Zusammengefasst konnte also gezeigt werden, dass die Defizienz des Dopamin D₃ Rezeptors einen entscheidenden Einfluss auf die Entstehung einer arteriellen Hypertonie hat. Die erhöhten Blutdruckwerte waren hierbei mit einer gesteigerten renalen Reninaktivität assoziiert.

1.3.4.3 Dopamin D₃ Rezeptor und AT₁ Rezeptor

Es gibt verschiedene Regulationsmechanismen, die für die Aufrechterhaltung von Osmolalität, Plasmavolumen und Blutdruck eine Rolle spielen. Hier soll nun im speziellen auf das Renin-Angiotensin-Aldosteron System (RAAS) eingegangen werden. Unter anderem wird von Zellen des juxtaglomerulären Apparates die Natriumkonzentration des Primärharns registriert. Bei Verminderung der Nierendurchblutung oder auch bei Abfall der Natriumkonzentration im Primärharn kommt es schliesslich zu einer vermehrten Reninsekretion. Renin wird hauptsächlich von in den Gefäßwänden gelegener Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates gebildet und von dort dann an das Blut abgegeben. Renin bildet durch enzymatische Hydrolyse aus Angiotensinogen Angiotensin I, welches wiederum durch das Angiotensin Converting Enzym (ACE) in Angiotensin II umgewandelt wird. Angiotensin II (AT II) wirkt direkt an den Arteriolen vasokonstriktorisch und stimuliert die Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa, wodurch es zu einer Natrium- und Wasserretention in den spätdistalen Tubuli und Sammelrohren kommt. Zudem kommt es durch AT II zur Förderung des Durstgefühls und des Kochsalzappetits. Eine Beeinflussung der renalen Durchblutung wie auch der glomerulären Filtrationsrate (GFR), kann durch den auch direkt an der Niere wirkenden vasokonstriktorischen Effekt verzeichnet werden. Zusammenfassend kann AT II also ein blutdrucksteigernder Effekt zugeschrieben werden, wobei hier v.a. die vasokonstriktorische Komponente die entscheidende Rolle spielt. Vermittelt werden diese Effekte über AT₁ Rezeptoren, wobei auch noch ein AT₂ Rezeptortyp existiert, dessen Funktion noch nicht vollständig geklärt ist. Pharmakologisch bieten sowohl die ACE-Hemmer als auch die neueren Antagonisten an AT₁ Rezeptoren eine Therapieoption bei der Behandlung der arteriellen Hypertonie.

Zur Blutdruckregulation interagieren das dopaminerge und das Renin-Angiotensin System. Am Knockout Mausmodell konnte in einer Studie von Asico et al. (1998) mit drei Versuchsgruppen (D₃(+/+), D₃(+/-), D₃(-/-)) außer den bereits erwähnten Ergebnissen (siehe Kap. 1.3.4.2) gezeigt werden, dass

es durch die Gabe eines Angiotensin II Rezeptorantagonisten zu einem Blutdruckabfall in allen drei Versuchsgruppen kam. Die Blutdruckabnahme hielt jedoch bei den Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmäusen (D₃^{-/-}) und bei den heterozygoten Tieren (D₃^{+/-}) länger an als bei den Wildtyptieren (D₃^{+/+}). So konnten bei den D₃^{-/-} und D₃^{+/-} Tieren erst mit einer zeitlichen Verzögerung wieder die Blutdruckausgangswerte erreicht werden.

Auch ein direkter Zusammenhang zwischen dem Dopamin D₃- und dem AT₁ Rezeptor konnte hergestellt werden. Es wurde gezeigt, dass der Dopamin D₃ Rezeptor eine Downregulation des AT₁ Rezeptors in Zellen des proximalen Tubulus bei normotensiven Wistar-Kyoto Ratten hervorruft (Zeng et al. 2003, Zeng et al. 2006). Diese Studie stellte die These auf, dass Dopamin D₃ Rezeptoren möglicherweise die AT₁ Rezeptorfunktion regulieren. Einerseits durch direkte Interaktion mit dem AT₁ Rezeptor und andererseits auch durch Regulation der AT₁ Rezeptorexpression. Die Vermutung, dass noch weitere Dopaminrezeptoren eine Interaktion mit dem AT₁ Rezeptor aufweisen besteht zudem, so vor allem zwischen dem Dopamin D₅- und dem AT₁ Rezeptor (Zeng et al. 2005). Ein möglicher Mechanismus der Hypertonieentstehung könnte somit in der Interaktion zwischen dem Dopamin D₃ Rezeptor, bzw. allgemein der Dopaminrezeptoren und dem AT₁ Rezeptor begründet liegen.

In vorliegender Arbeit wurde die Interaktion des Dopamin D₃ Rezeptors mit dem AT₁ Rezeptor anhand des Knockout Mausmodells in Clearanceexperimenten geprüft.

1.4 Eigene Fragestellung

Die Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors, als zentrale Fragestellung, wurde an Hand mehrerer Experimente überprüft. Hierbei wurden, unter Berücksichtigung oben genannter Zusammenhänge, zum einen durch Stoffwechselläufig- experimente und Blutdruckmessungen an wachen normo- und hyperglykämischen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- (KO) und entsprechenden Wildtyp- (WT) Mäusen, und zum anderen durch Clearanceversuche an narkotisierten Tieren, nachfolgend aufgeführte Fragestellungen untersucht:

Hat der Dopamin D₃ Rezeptor einen Einfluss auf die Progredienz der diabetischen Nephropathie?

Ist die Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie assoziiert?

Kann, gemessen an der glomerulären Filtrationrate (GFR), eine Interaktion des Dopamin D₃ Rezeptors mit dem AT₁ Rezeptor beobachtet werden?

In wie weit spielt hierbei das Alter der jeweiligen Tiere, bezüglich der GFR- Regulation, eine Rolle?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die Experimente wurden an männlichen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout (KO) D₃(-/-) Mäusen und Wildtyp (WT) D₃(+/+) Tieren (Fa. Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen) durchgeführt. Die Versuchstiere wurden in einem Alter von 12 bis 16 Wochen geliefert und im institutseigenen Tierstall bis zu einem Alter von 28 Wochen und einem Gewicht von 25-35 g in MacroDEX[®]-Standardkäfigen bei einem Tag-Nacht-Zyklus von 12 Stunden, einer Temperatur von 21°C und 57% Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Mäuse hatten über die komplette Versuchsdauer freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter (Altromin C-1320[®], Fa. Altromin, Lage)

2.2 Erzeugung von D₃ Rezeptor Knockout D₃(-/-) Mäusen

Die Generierung der hier verwendeten D₃ Rezeptor Knockout Mäuse erfolgte durch die Fa. Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen. Die zielgerichtete genetische Veränderung eines bestimmten Genlocus, hier das des D₃ Rezeptor-Gens, erfolgt mittels homologer Rekombination in embryonale Stammzellen (ES) im Sinne eines „gene-targeting“. Die verwendeten ES-Zellen wurden aus Blastozysten gewonnen, aus denen stabile Zelllinien etabliert wurden, die vollständig undifferenziert sind und somit durch deren Omnipotenz eine nahezu beliebige Manipulation zulassen.

Um das Gen für den Dopamin D₃ Rezeptor auszuschalten, und somit die benötigten D₃ (-/-) Tiere zu erhalten, wurde der Promotor und das erste Exon durch ein Neomycinresistenzgen, ein sogenanntes Selektionsmarkergen, ersetzt. Mittels Transfektion gelangte dieses generierte Erbgut anschließend in ES-Zellen. Die Selektion der dadurch gewonnenen Klone erfolgte anhand einer Antibiotikagabe (Neomycin). Ausschließlich die Zellen, die das Resistenzgen enthielten, konnten die Antibiotikagabe überleben. Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (PCR, Southern Plot-Analyse) wurden die

Klone der überlebenden Zellen zudem auf die Anwesenheit der Mutation am gewünschten Genlocus untersucht. Die hierdurch identifizierten Klone wurden in Kultur vermehrt, in Blastozysten injiziert und im Anschluss in den Uterus eines scheinchwangeren Ammentieres implantiert. Die entstehenden Nachkommen (F0-Generation) tragen zu ca. 20-30% das Transgen in ihrem Genom. Die Chimären, die die gewünschte Mutation aufweisen, werden mittels PCR identifiziert, um dann diese heterozygoten Genträger miteinander zu verpaaren, und schliesslich frühestens in der F2-Generation homozygote Mutanten zu erhalten. Die Identifikation der homozygoten Tiere erfolgte anhand einer Schwanzspitzenbiopsie und Genotypisierung mittels molekularbiologischer Methoden (PCR).

2.3 Diabetes mellitus Induktion bei Mäusen

Den Tieren wurde eine tägliche Dosis Streptozotozin (STZ) 80 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal in den rechten oder linken unteren Quadranten des Abdomens appliziert, gelöst in 0,1 M Citratpuffer und einem pH-Wert von 4,0. Der Blutglukosewert wurde täglich überprüft, das Blut hierfür wurde aus der Schwanzvene der Maus gewonnen. Die Bestimmung erfolgte mittels eines Blutglukosemessgeräts (Accu-Chek[®] Sensor, Fa. Roche, Mannheim). Die tägliche STZ-Applikation erfolgte bis der Blutglukosespiegel mindestens 200 mg/dl erreicht hatte, jedoch wurden den Tieren höchstens 8 Injektionen verabreicht (Bellush et al. 1999).

STZ bewirkt eine Zerstörung der β -Zellen der Pankreasinselzellen, so dass die Tiere innerhalb von drei bis sieben Tagen einen Diabetes mellitus entwickeln. Der Blutglukosewert stieg bei den einzelnen Versuchstieren unterschiedlich schnell an, somit zeigte sich auch eine sehr hohe Variabilität der Blutglukosewerte, diese lagen zwischen 250 und 600 mg/dl.

Während der kompletten Versuchsdauer erhielten die Tiere keine Insulingaben. Als Kontrollgruppen dienten die Tiere, die mit einem Vehikel beladen wurden, hierfür wurde diesen Tieren eine äquivalente Menge an Citratpuffer ebenfalls intraperitoneal appliziert.

Bezeichnung: DM – Tiere mit induziertem Diabetes mellitus
CON – nicht diabetische Kontrolltiere

Nachdem alle Tiere einen Diabetes mellitus entwickelt hatten, wurde ca. zwei Wochen gewartet bis die ersten Stoffwechselkäfigversuche begonnen wurden. Während dieser Zeit war ein deutlicher Gewichtsverlust, Polydipsie, Polyurie und ein weiterer Anstieg des Blutglukosewertes zu verzeichnen. Die Kontrollgruppen zeigten keinerlei Veränderungen. Der durch STZ induzierte experimentelle Diabetes mellitus entspricht somit einem Diabetes mellitus Typ 1 des Menschen (IDDM).

2.4 Experimenteller Ablauf

2.4.1 Stoffwechselexperimente an wachen Mäusen

2.4.1.1 Versuchsgruppen der Stoffwechselkäfigexperimente

Kontrollgruppen (normoglykämisch): **CON-WT** und **CON-KO**

Diabetische Versuchsgruppen : **DM-WT** und **DM-KO**

2.4.1.2 Stoffwechselkäfige

Für die Stoffwechselkäfigexperimente wurden Käfige (Techniplast®, Fa. Ehret, Freiburg i. Br.) verwendet, die es ermöglichten Urin und Faeces getrennt zu sammeln. Während der gesamten Versuchsdauer hatten die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser, wobei jedoch auf eine Futtergabe verzichtet wurde. Im oberen Teil des Käfigs konnten sich die Tiere frei auf einem Gitterrost bewegen, durch den die Exkremete auf ein darunterliegendes Drahtgitter durchfielen.

Im unteren Teil des Käfigs sorgte ein konusförmiger Trichter dafür, dass der Urin in einem Sammelgefäß aufgefangen werden konnte. Bevor die eigentlichen Stoffwechselkäfigexperimente durchgeführt wurden, wurden die

Versuchstiere in 1-2 dreistündigen Sitzungen an die Stoffwechselkäfige gewöhnt.

2.4.1.3 Versuchsablauf der Stoffwechselkäfigexperimente

Die Stoffwechselkäfigversuche der normoglykämischen Versuchstiere, d.h. der Kontrolltiere und aller Versuchstiere während des ersten Stoffwechselkäfigversuchs (STWK 0 - zur Ermittlung der Basalwerte) wurden für eine Dauer von 12 Stunden, zwischen 7 Uhr und 19 Uhr durchgeführt. Die Stoffwechselkäfigversuche der hyperglykämischen, diabetischen Tiere wurden zwischen 8 Uhr und 11 Uhr, für eine Dauer von 3 Stunden durchgeführt. Bei allen Versuchstieren wurde während der kompletten Versuchsdauer auf eine Futtergabe verzichtet um möglichst keine Futterrückstände im Urin vorzufinden. Auf Grund des erhöhten Flüssigkeits- und Nahrungsbedarfs der diabetischen Tiere musste bei diesen die Versuchsdauer auf drei Stunden verkürzt werden um den geschwächten Allgemeinzustand der Tiere nicht weiter zu verschlechtern. Die Ausscheidung war auf Grund der diabetogenen Stoffwechsellage trotzdem gegeben.

2.4.1.4 Probengewinnung und -behandlung

Nach der gravimetrischen Bestimmung des Urin- und Trinkvolumens wurde das jeweilig vorhandene Urinvolumen mittels einer Pipette (alle verwendeten Pipetten: Fa. Eppendorf, Hamburg) entnommen und bis zur Analyse von Elektrolyten, Albumin, Protein und Osmolalität bei -20°C eingefroren.

2.4.2 Blutdruckmessung an wachen Mäusen

2.4.2.1 Versuchsgruppen

Kontrollgruppen (normoglykämisch): **CON-WT** und **CON-KO**

Diabetische Versuchsgruppen : **DM-WT** und **DM-KO**

2.4.2.2 Blutdruckmessgerät

Für die Blutdruckmessung wurde ein Blutdruckmessgerät (Model 179 Blood Pressure Analyzer, Fa. Hugo Sachs Elektronik-Harvard, March-Hugstetten) verwendet, das es ermöglichte sowohl den Blutdruck als auch den Puls festzustellen. Die Aparatur bestand aus einem Druckregelgerät, dem Schreiber mit Thermopapier und einer Heizung, die den Arbeitsbereich auf 32 °C konstant hielt. Um die Bewegungsartefakte möglichst gering zu halten, wurden die Mäuse in einen Restraîner gesetzt. Bei dem Restraîner handelt es sich um eine mit Löchern versehene Plexiglasröhre, welche nach ventral mit einem Schieber verschlossen war, der es ermöglichte die Maus richtig zu positionieren. Nach dorsal wurde der Schwanz des Tieres durch eine aufpumpbare Blutdruckmanschette geführt, die mittels einer Lichtsonde die vorhandene Pulstätigkeit detektierte, welche dann am Messgerät durch das Aufleuchten einer Diode wahrgenommen werden konnte.

2.4.2.3 Versuchsaufbau

Bevor die eigentlichen Blutdruckmessungen gestartet werden konnten, wurden die Tiere an die beengte Situation in den Restrainern gewöhnt, in dem sie 2 Wochen lang täglich für ca. 5-10 Minuten in die Kammern gesetzt wurden und die Blutdruckmessung durch das Aufpumpen der Manschette simuliert wurde. Dies war erforderlich um die Mäuse auf den Versuchsablauf vorzubereiten und somit reproduzierbare, verlässliche und stabilere Blutdruckwerte zu erhalten. Die eigentliche Messreihe wurde dann an den bereits konditionierten Tieren

durchgeführt. Die Messung erfolgte immer zur selben Tageszeit zwischen 8 und 11 Uhr um mögliche zirkadiane Blutdruckschwankungen zu vermeiden. Vor Versuchsbeginn räumte man den Tieren eine ca. 5 minütige Äquilibrationsperiode ein. Während dieser Zeit war es den Versuchstieren möglich sich in eine bequeme Position zu begeben und sich zu akklimatisieren. Unmittelbar vor der Messung wurde zur Ruhigstellung der Tiere der Schieber des Restrainers enger gestellt um somit extreme Bewegungsartefakte zu verhindern. Danach wurde die Messung gestartet, die Manschette pumpete sich mittels einer Automatik auf, wobei gleichzeitig die grafische Aufzeichnung durch den Schreiber gestartet wurde. Pro Maus wurden 6-10 Messungen durchgeführt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Versuchsdauer möglichst kurz gehalten wurde und die Messungen in geräuscharmer Kulisse stattfanden.

2.4.2.4 Datengewinn

Die durch den Schreiber aufgezeichneten Blutdruckwerte wurden manuell ausgewertet, in dem bei sichtbar beginnend einsetzendem Pulssignal das Lot gefällt wurde und somit der Blutdruckwert abgelesen werden konnte. Desweiteren wurde der detektierte Pulswert automatisch vom Gerät ermittelt und ausgedruckt. Die Auswertung gestaltete sich des öfteren als schwierig, da durch die vorhandenen Bewegungsartefakte das beginnende Pulssignal nicht eindeutig als solches erkannt werden konnte. Wenn also die Bewegungsartefakte auf das beginnende Pulssignal fielen, waren diese Messungen nicht auswertbar.

2.4.3 Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen

2.4.3.1 Versuchsgruppen der Clearanceversuche

Kontrolltiere: **CON-WT**: Junge (6 Mon.) und alte Tiere (1-1½ Jahre)

CON-KO: Junge (6 Mon.) und alte Tiere (1-1½ Jahre)

Diabetische Tiere: **DM-WT** und **DM- KO** (ausschliesslich junge (6 Mon.) Tiere)

2.4.3.2 Narkose

Die Tiere erhielten initial eine intraperitoneale Injektion von 100 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital-Natrium (Pentobarbital, Sigma, St. Louis, USA) in den unteren rechten Quadranten des Abdomens. Die ausbleibende Reaktion auf Schmerzreize und ein fehlender Cornealreflex zeigte eine ausreichende Narkosetiefe an. War nach ca. 15 Minuten noch kein Wirkungseintritt zu verzeichnen, erfolgte eine Nachinjektion von 10 – 20 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital.

2.4.3.3 Präparation

Die narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage auf den vorgeheizten Operationstisch (Fa. Effenberg, Pfaffing) gelagert, desweiteren wurde durch eine rektale Temperatursonde die Körperkerntemperatur registriert, wobei ein mit dieser Sonde verbundenes Temperaturregelgerät (Fa. Effenberg, Pfaffing) die Körpertemperatur durch Beheizung des OP-Tisches auf 37.2 °C konstant hielt.

Erster Schritt der Operation war es dem Tier möglichst rasch eine freie Atmung zu ermöglichen. Dies geschah durch eine Inzision in der Medianlinie des Halses, dabei wurde die Halsfaszie durchtrennt und die Trachea stumpf

freipräpariert und mobilisiert. Hierzu mussten die Speicheldrüsen luxiert und die infrahyale Muskulatur medial gespalten werden (alle verwendeten Operationsinstrumente: Fa. Aesculap, Tuttlingen). Durch stumpfes, vorsichtiges Unterfahren der Trachea konnte diese angehoben und somit mittels eines Seidenfadens angeschlungen werden (alle Fäden: Seidenfäden 5/0 metric 1 schwarz geflochten, Fa. Suprema, Berlin). Die Membran zwischen zwei Knorpelspangen wurde mit Hilfe einer Mikro-Federschere inzidiert und der vorbereitete Tracheltubus, ein ca. 15 mm langer Polyethylen (PE)-Katheter mit Aussendurchmesser 1,27 mm (alle verwendeten Katheter: SIMS Portex Ltd.; Hythe, UK) ca. 0,5 cm tief eingeführt und durch den vorgelegten Faden fixiert.

Danach wurde die rechte Vena jugularis aufgesucht und stumpf freipräpariert wobei diese vom umliegenden Binde- und Fettgewebe befreit wurde und unter Berücksichtigung der multiplen Anastomosen bzw. zuführenden Gefäße unter mikroskopischer Kontrolle (VMT 10x[®], Fa. Olympus, Japan) möglichst weit kranial ligiert wurde, diese Ligatur diente dem Spannen der Vene. Eine weitere Ligatur wurde weiter kaudal vorgelegt, um eine sofortige Befestigung des Katheters nach dem Einführen zu ermöglichen. Nach Inzision des Gefäßes wurde ein PE-Katheter ca. 3 mm weit eingeführt. Nach der Befestigung des Katheters durch den vorgelegten und einen evtl. zweiten Faden wurde durch eine Bolusgabe von ca. 50 µl die Dichtigkeit bzw. richtige Lage des Katheters überprüft, sichtbar durch leichtes Beschlagen des Katheters. War dies gewährleistet wurde die Infusionpumpe (Typ 871642[®], Fa. Braun, Melsungen) gestartet.

Anschließend wurde die linke Arteria carotis communis wie bereits die rechte V. jugularis vom umliegenden Binde- und Fettgewebe befreit und der an der A. carotis verlaufende N. vagus stumpf abpräpariert, um diese auf einer möglichst langen Strecke darstellen zu können. Die Arterie wurde kranial ligiert, gespannt und eine weitere Ligatur am kaudalen Ende vorgelegt. Desweiteren wurde kaudal eine gefässchirurgische Arterienklemme angebracht, um die Arterie unter ständiger mikroskopischer Kontrolle zu inzidieren und den arteriellen

Katheter einführen zu können. Dieser wurde dann mit Hilfe des kaudal vorgelegten Fadens befestigt und durch einen weiteren Knoten gesichert. Nach dem Lösen der Arterienklemme begann die kontinuierliche Aufzeichnung des Blutdrucks und des Pulses durch einen an den Katheter gekoppelten Druckaufnehmer mit Schreiber (Linear Corder Mark VII[®], Fa. Watanabe, Japan). Desweiteren diente dieser Katheter der Blutabnahme während des Experiments.

Um die Harnblase zu katheterisieren wurde suprapubisch die Haut in der Medianlinie inzidiert, die Muskelfaszien durchtrennt und die Bauchmuskulatur zur Seite hin verdrängt. Nach dem Aufsuchen der Harnblase wurde diese aus der Bauchhöhle luxiert, angeschlungen und am oberen Harnpol inzidiert. Nach dem Einführen des Blasenkatheters wurde dieser fixiert und die Blase in den Intrapertonealraum reponiert. Nach Beendigung der Operation wurden die entstandenen Operationswunden im cervikalen und suprapubischen Bereich durch eine Hautnaht verschlossen (verwendeter Faden: Perma-Hand 4-0[®], Fa. Ethicon, Norderstedt). Nach der Umlagerung des Tieres auf die Seite konnte das Experiment gestartet werden, wobei der Urin in 0,5 ml PE-Gefäßen (Fa. Eppendorf, USA) gesammelt wurde.

2.4.3.4 Applizierte Infusionslösungen

Über den venösen Katheter wurde in beiden Vorperioden bei allen Versuchstieren 0,85%-ige NaCl-Lösung, die 2,25% BSA (bovines Serumalbumin) (Sigma Chemical Company, St. Louis, USA) enthält, infundiert. Zusätzlich enthielt die Lösung Tritium [³H]-markiertes Inulin (Aktivität: 10 µCi/ml). Infundiert wurde die Lösung kontinuierlich mittels einer elektrischen Präzisionsinfusionspumpe (Typ 871642[®], Fa. Braun, Melsungen) mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 450 µl/h.

Im Anschluss an die Vorperioden wurde die Perfusorspritze gewechselt. Das Versuchstier erhielt dann in den Hauptperioden über den selben Katheter Angiotensin II (150 µg/ml NaCl). Die Infusionslösung war hierbei wie folgt

zusammengesetzt: 0,85%-iger NaCl-Lösung, 2,25% BSA, Tritium [^3H]-markiertes Inulin (Aktivität: 10 $\mu\text{Ci/ml}$) und Angiotensin II.

2.4.3.5 Zeitlicher Versuchsablauf

Der zwischen 40 und 50 Minuten dauernden Präparation schloss sich eine ca. 30 minütige Äquilibrationsperiode an. Der eigentliche Versuch, d.h. die erste Vorperiode wurde begonnen sobald sich zeigte, dass sowohl der Blutdruck als auch die Herzfrequenz konstant waren und eine ausreichende Urinausscheidung gewährleistet war. Der Äquilibrationsperiode schlossen sich zwei Vorperioden und weitere zwei bis drei Hauptperioden an, wobei die Versuchsdauer jeder Periode 30 Minuten betrug.

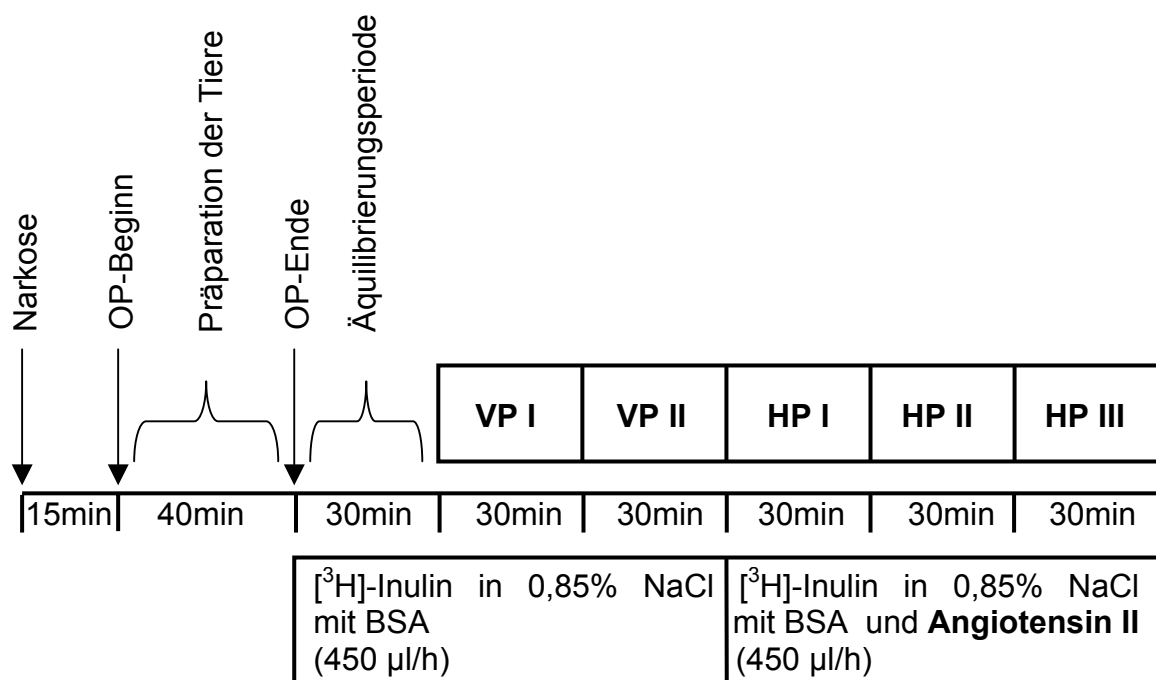


Abbildung 5: Zeitlicher Ablauf der Clearanceexperimente.

Während der Äquilibrationsperiode und den beiden Vorperioden (VP I+VP II) wurde den Tieren kontinuierlich [^3H] Inulin in NaCl und BSA infundiert. In den direkt im Anschluss folgenden Hauptperioden (HP I-III) enthielt die applizierte Infusionslösung zudem Angiotensin II.

2.4.3.6 Probengewinnung

Die Blutentnahme erfolgte mittels einer heparinisierten Galskapillare (Mikrohämatokrit- Kapillaren[®] 75 µl, Brand GmbH&CO, Wertheim), in dem in der Mitte jeder Sammelperiode ca. 40 µl Blut über den arteriellen Katheter entnommen wurde. Am Ende jeder 30-minütigen Urinsammelperiode wurde das PE-Sammelgefäß (Safe-Lock 0,5 ml[®], Fa. Eppendorf, Hamburg) gewechselt und die Urinmenge gravimetrisch bestimmt. Der während der Äquilibrationsperiode gewonnene Urin wurde verworfen.

2.4.3.7 Nierenentnahme

Nach Beendigung des Clearanceexperiments wurden dem Tier zunächst ca. 50 mg/kg Körpergewicht Pentobarbital über den bereits venös liegenden Katheter nachinjiziert. Dies war notwendig um eine ausreichende Narkosetiefe zu gewährleisten. Danach wurde das Tier in Rückenlage gebracht und der durch das Legen des Blasenkatheters vorhandene suprapubische Schnitt um ca. 2 cm nach kranial erweitert. Zunächst wurde die rechte Niere aufgesucht und nach hilusnaher Durchtrennung der renalen Gefäße entnommen. Die Entnahme der linken Niere erfolgte nach dem selben Schema. Bevor das Nierenfeuchtgewicht gravimetrisch bestimmt werden konnte, musste noch die Nierenkapsel abpräpariert werden.

2.5 Analytik

2.5.1 Analysierte Parameter

Folgende Größen wurden bei den Stoffwechselläufigversuchen bestimmt:

- Tiergewicht [g]
- Trinkvolumen [ml]
- Urinvolumen [ml]
- Blutglukose [mg/dl]
- Elektrolytkonzentration (Na^+ , K^+ , Cl^-) im Urin [mmol/l]
- Osmolalität [mosmol/kg]
- Glukosekonzentration im Urin [mmol/l]
- Albuminkonzentration im Urin [ng/ml]
- Proteinkonzentration im Urin [$\mu\text{g}/\text{ml}$]

Folgende Größen wurden in den Clearanceexperimenten bestimmt:

- Systolischer und diastolischer Blutdruck [mmHg]
- Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) [mmHg]
- Herzfrequenz [1/min]
- Hämatokrit [%]
- [^3H]-Aktivität in Plasma und Urin [Zerfälle/min]
- Plasmakonzentration von Na^+ und K^+ [mmol/l]
- Urinkonzentration von Na^+ und K^+ [mmol/l]
- Urinvolumen der jeweiligen Periode [ml]
- Nierenfeuchtgewicht [g]

2.5.2 Gewichte und Volumina

Die Gewichte und Volumina wurden gravimetrisch mit Hilfe einer Präzisionswaage (Precisa 100A-300M[®], PAG Oerlikon, Zürich/Schweiz) bestimmt. Vom Gesamtgewicht der Uringefäße wurde das vor Versuchsbeginn ermittelte Leergewicht subtrahiert. Die Gewichts Differenz in mg diente als direktes Maß für das Urinvolumen in μl . Die Trinkvolumina wurden durch Wiegen des Trinkgefäßes vor und nach dem Versuch ermittelt. Die so ermittelte Gewichts Differenz war dem getrunkenen Volumen der Tiere gleichzusetzen.

2.5.3 Blutglukose

Die Blutglukosewerte wurden mittels eines Blutglukosemessgeräts (Accu-Chek[®] Sensor, Fa. Roche, Mannheim) ermittelt. Das hierfür benötigte Blut wurde aus der Schwanzvene des Tieres gewonnen. Die Messung erfolgte an Hand von Teststäbchen (Accu-Chek[®] Sensor Comfort Teststreifen, Fa. Roche, Mannheim), auf die 7,5 μl Blut aufgebracht wurden. Nach ca. 20 Sekunden konnte das Ergebnis dann auf der Anzeige abgelesen werden.

2.5.4 Elektrolytkonzentration (Na^+ , K^+ , Cl^-) in Plasma und Urin

Um die Elektrolyte (Na^+ und K^+) im Urin zu bestimmen, wurden 10 μl von dem nach dem Versuch bei -20°C eingefrorenen Probenurin mit 2 ml Lithiumlösung (Standard Lithiumlösung, Fa. Eppendorf, Hamburg) versetzt. Zur Elektrolytbestimmung im Plasma wurden 5 μl des gewonnenen Plasmas mit 5 μl bidestilliertem Wasser verdünnt und mit 1 ml Lithiumlösung versetzt. Für jeden Wert wurden jeweils Doppelproben pipettiert.

Die Elektrolytkonzentrationen von Na^+ und K^+ wurden dann mittels eines Flammenphotometers (Elex 6361[®], Fa. Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Das Gerät wurde zu Beginn jeder Messreihe mit einer Standardlösung definierten

Elektrolytgehalts (Urin- bzw. Plasmastandard, Fa. Eppendorf, Hamburg) kalibriert.

Die Bestimmung der Cl^- -Konzentration der Urinproben aus den Stoffwechselkäfigversuchen erfolgte in einem coulometrischen Verfahren mit Hilfe eines Chloridmeters (6610[®], Fa. Eppendorf, Hamburg). Die Messung erfolgte durch Zugabe von 50 μl Probenurin zu einer vorgegebenen Messlösung, bestehend aus 1 ml Gelatinelösung (Fa. Eppendorf, Hamburg) und 15 ml Essigsäure (1,02 mol/l), Salpetersäure (92,4 mmol/l). Dieses Gerät wurde ebenfalls vor jeder Messreihe mit einer Standardlösung definierten Chloridgehalts (100 mmol/l KCl) kalibriert. Für jeden Wert wurden wiederum jeweils Doppelproben pipettiert.

2.5.5 Osmolalität

Die Osmolalität des Urins der Stoffwechselkäfigversuche wurde mittels eines Osmometers (Osmomat 030, Fa. Gonotec, Berlin) bestimmt. Die Messmethode beruht auf einer Gefrierpunktniedrigung von Lösungen, die eine höhere Osmolalität als Wasser besitzen. Vor Versuchsbeginn wurde das Gerät mit Lösungen bekannter Osmolalität (H_2O , Kalibrierlösung 300 mosmol/l und 600 mosmol/l) kalibriert. Nach abgeschlossener Kalibrierung wurden auch hier Doppelwerte bestimmt.

2.5.6 Glukosebestimmung im Urin

Die Glukosebestimmung erfolgte nach einem enzymatisch-photometrischen Prinzip mittels eines Spektrophotometers (U-300[®], Hitachi Ltd., JP). Zunächst wurden jeweils Doppelproben mit 3 μl Urin und 300 μl Reagenz (Infinity[®], Fa. Sigma, Steinheim) in PE-Gefäße gebracht, gemischt und 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Entsprechend des Pentosephosphatwegs induzierte das Reagenz proportional zur vorhandenen Glukosekonzentration in der Probe eine entsprechende Menge an $\text{NADPH}+\text{H}^+$. Über die Absorption bei einer Wellenlänge von 340 nm konnte diese photometrisch bestimmt werden. Nach

der Erstellung einer Kalibriergeraden konnten dann die jeweiligen Doppelproben gemessen werden. Die hierdurch ermittelten Werte wurden in [mmol/l] angegeben und dann mit Kenntnis der Molmasse von Glukose in [mg/l] umgerechnet.

2.5.7 Albuminbestimmung im Urin

Albumin ist ein wichtiges Indikatorprotein der diabetischen Nephropathie. Zur quantitativen Bestimmung des Albumins im Urin wurde ein spezifischer Albumin-Maus-ELISA (Fa. CellTrend GmbH, Luckenwalde) verwendet. Bei diesem Festphasen-Enzymimmunoassay ist an die Kavitäten der Mikrotiterplatten Maus-Albumin gebunden. Das Messprinzip beruhte darauf, dass während der Inkubation die Bindung eines anti-Maus-Albumin-Antikörpers an die Platte kompetitiv durch das sich in der Urinprobe befindliche Albumin gehemmt wurde. Danach wurde durch das Waschen der Mikrotiterplatte nach Abschluß der Immunreaktion der nicht an der Platte gebundene Anteil des anti-Maus-Albumin-Antikörpers entfernt. Da der Antikörper mit Peroxidase markiert war, konnte der gebundene Anteil mit Hilfe einer Substrat-Chromogen-Lösung quantifiziert werden. Um die Reaktion zu beenden wurde eine Stopplösung zugegeben, welche gleichzeitig einen sichtbaren Farbumschlag hervorrief. Photometrisch wurde dann bei einer Wellenlänge von 450 nm die Absorption gemessen, welche umgekehrt proportional zur Albuminkonzentration in der Urinprobe ist. Die Albuminkonzentrationen wurden an Hand der Standardkurve abgelesen, welche mittels einer Computer-ELISA-Software erstellt wurde.

Die Messungen wurden mit je 50 µl verdünnter Urinproben durchgeführt. Hierbei wurde der zuvor bei -20°C eingefrorene Urin mit einem Verdünnungspuffer im Verhältnis 1:50 gemischt, der Urin der diabetischen Tiere in einem Verhältnis von 1:20. Für jede Urinprobe wurden Doppelproben bestimmt. Ebenfalls wurde eine Standardreihe sowie eine Positiv- und Negativkontrolle in die Kavitäten pipettiert.

2.5.8 Proteinbestimmung im Urin

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration im Urin wurde ein kommerzieller Kit (Bio-Rad Protein Assay, Bio Rad Laboratories, München) verwendet. Hierbei handelt es sich um das Prinzip nach Bradford. Dabei ändert sich das Absorptionsmaximum einer Coomassie Brilliant Blau-Lösung, in welche die zu bestimmende Probe gegeben wird, im Falle einer Proteinbindung von 465 nm nach 595 nm. Anhand eines Photometers (Modell Sunrise, Tecan, Salzburg) erfolgte dann die Extinktionsmessung bei 595 nm. Die Ermittlung der Proteinkonzentration erfolgte aus dem ermittelten Extinktionswert und einer Standardkurve, die jeweils vor der Messreihe erstellt wurde.

2.5.9 Hämatokrit

In der Mitte jeder Clearanceperiode wurde aus dem arteriellen Katheter Blut entnommen. Das Blut wurde in einer einseitig, durch Kitt (Hämatokrit-Versiegelungskitt, Fa.Brand, Wertheim) verschlossenen Glaskapillare (Mikrohämatokrit- Kapillaren[®] 75 µl, Brand GmbH&CO, Wertheim) ungefähr 4 min. in einer Hämatokritzentrifuge (Hettich Hämatokrit, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Der Hämatokrit in [%] wurde dann aus dem Verhältnis der korpuskulären Anteile zur Gesamtblutsäule ermittelt. Der Überstand nichtkorpuskulärer Anteile (Plasma) wurde für weitere Analysen gewonnen, in PE-Gefäßen asserviert und bei -20°C eingefroren. Die zellulären Bestandteile wurden verworfen.

2.5.10 [³H]-Aktivität in Plasma und Urin

Von dem während der jeweiligen Perioden gewonnenen Plasma und Urin wurden Doppelproben von je 5 µl in spezielle Meßgefäße (Midi-Vial[®], Fa. Packard, Groningen/Niederlande) pipettiert und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold[®], Fa. Packard, Groningen/Niederlande) vermischt.

In der Szintillationsflüssigkeit wurde die bei Zerfall des [³H]-markierten Inulins freiwerdende Energie in Lichtblitze umgewandelt. Diese wurden durch ein β -Szintillationsmeßgerät (2550 TR[®], Fa. Packard, USA) erfasst. Aus den hiermit ermittelten Werten konnte dann die GFR berechnet werden. (Berechnung der GFR- siehe 2.6.3)

2.5.11 Nierenfeuchtgewicht

Die nach Beendigung eines Clearanceexperiments entnommenen Nieren wurden von der Nierenkapsel befreit und anschließend gravimetrisch deren Feuchtgewicht mittels einer Präzisionswaage (Precisa 100A-300M[®], PAG Oerlikon, Zürich/Schweiz) bestimmt.

2.5.12 Histologische Untersuchung der Nieren

2.5.12.1 Morphometrie

Zur histologischen Untersuchung wurden die entnommenen Nieren in Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Zur Färbung der Nierenschnitte wurde PAS-Reagenz (periodic-acid-Schiff-Reagenz) verwendet, eine Standardfärbung für Nieren.

Folgende Strukturen wurden lichtmikroskopisch beurteilt:

Glomeruli: Größe, Kapillarschlingen

Tubuli: Höhe der Zellen, Lumen

Die morphometrische Untersuchung der Nieren erfolgte lichtmikroskopisch mit Hilfe der Eclipse Net Software (Labatory Imaging s.r.o.).

Die Messung der Glomeruli beinhaltete die Erfassung der Gesamtgröße des Glomerulums sowie die Größe des Kapillarkonvoluts. Dies geschah durch

Umfahrung sowohl der Bowmanschen Kapsel als auch des Kapillarkonvoluts mit dem Cursor.

Äquivalent erfolgte die Messung der Tubuli, wobei hier der äußere Umfang sowie das Lumen des Tubulus mit Hilfe des Cursors umfahren wurde. Im Folgenden wurden dann die so markierten Flächen automatisch mittels der oben erwähnten Software berechnet. Bei der Messung wurde darauf geachtet, dass nur Glomeruli in die Auswertung mit einbezogen wurden, die im Anschnitt sowohl Harn- als auch Gefäßpol zeigten. Da jedoch die Anzahl der Glomeruli, die diese Kriterien erfüllten, zu gering war, wurden auch solche Glomeruli ausgewertet die entweder Gefäß -oder Harnpol zeigten. Bei der Messung der Tubuli wurde darauf geachtet, dass nur solche herangezogen wurden, die exakt quer geschnitten waren.

Pro Niere wurden $n= 20-25$ Glomeruli und $n= 20$ Tubuli ausgemessen.

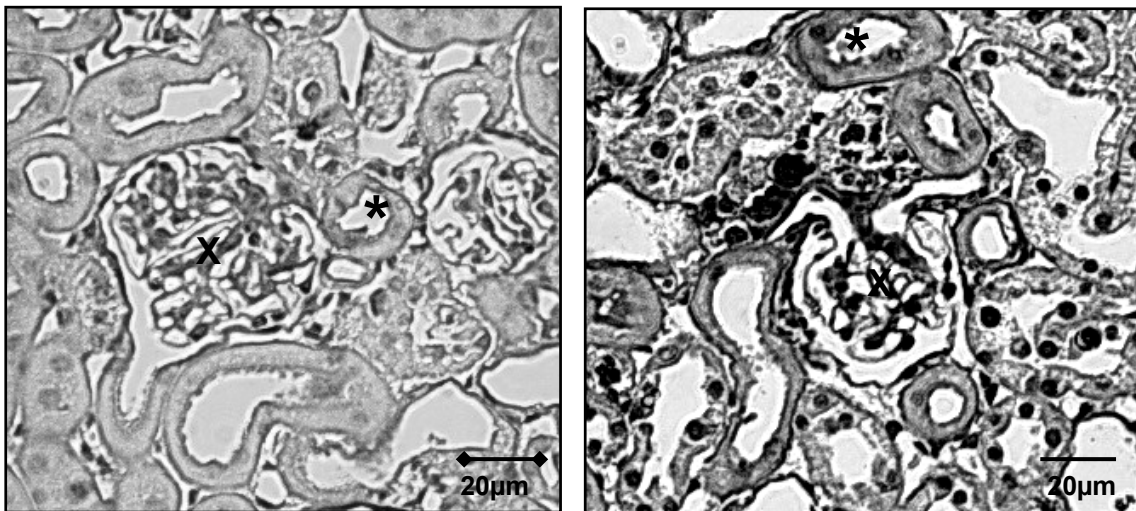


Abbildung 6: Lichtmikroskopische Darstellung von Glomeruli und Tubuli. X kennzeichnet ein Glomerulum, * kennzeichnet einen Tubulus.

2.5.12.2 Morphologie

Um die Nierenmorphologie zu beurteilen wurden Skleroseindizes herangezogen. Zur Beurteilung der Glomeruli wurde ein Glomeruloskleroseindex (El Nahas et al. 1991), zur Beurteilung der Tubuli ein tubulointerstitieller Index (Velasquez et al. 1997) verwendet.

Glomeruloskleroseindex:

- 0 Normale Glomeruli
- 1 mesangiale Ausdehnung/ Verdickung der Basalmembran
- 2 leichte bis mäßige segmentale Hyalinose/Sklerose, wobei weniger als 50% der glomerulären Kapillarschlingen betroffen sind
- 3 diffuse Hyalinose/Sklerose, wobei mehr als 50% der glomerulären Kapillarschlingen betroffen sind
- 4 diffuse Glomerulosklerose mit totaler Obliteration und Kollaps der Kapillarschlingen

Tubulointerstitieller Index:

- 0 Normale Tubuli
- 1 vereinzelte, kleine fokale Läsionen mit äußerst geringen tubulären Veränderungen und interstitiellen inflammatorischen Zellinfiltraten
- 2 < 25% fokale Läsionen mit tubulären Veränderungen und interstitiellen inflammatorischen Zellinfiltraten und/oder Fibrose
- 3 > 25% und < 50% fokaler Läsionen mit tubulären Veränderungen und interstitiellen Zellinfiltraten und/oder Fibrose
- 4 mehr als 50% des renalen Parenchyms oder Interstitiums sind betroffen

2.6 Berechnungen und Statistik

2.6.1 Urinzeitvolumen (UV)

Das Urinzeitvolumen in [$\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$ NFG] wurde anhand der ausgeschiedenen Menge Urin einer Sammelperiode (UV_s) und der Dauer einer jeweiligen Periode (D_s) bezogen auf das Nierenfeuchtgewicht (NFG) errechnet.

$$UV = \frac{UV_s}{D_s \times \text{NFG}}$$

2.6.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der mittlere arterielle Blutdruck in [mmHg] wurde aus den Werten des systolischen (P_{sys}) und des diastolischen (P_{dia}) Blutdrucks, der aus den Aufzeichnungen des Schreibers hervorging mit Hilfe folgender Formel ermittelt:

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

Die jeweiligen Werte sowohl des systolischen als auch des diastolischen Blutdrucks beziehen sich jeweils auf eine Sammelperiode.

2.6.3 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate in [$\text{ml}/\text{min}/\text{g}$ NFG] wurde mittels der [^3H]-Aktivitäten in Urin (U_{In}) und Plasma (P_{In}) sowie des Urinzeitvolumens (UV) ermittelt und sowohl auf das Nierenfeuchtgewicht (NFG) als auch auf die Zeit (Sammelzeit einer Periode (D_s)) bezogen. Dies erfolgte anhand folgender Formel:

$$GFR = \frac{U_{\text{In}} \times UV}{P_{\text{In}} \times D_s \times \text{NFG}}$$

2.6.4 Absolute renale Elektrolytausscheidung

Nach Bestimmung der Urinkonzentrationen von Na^+ , K^+ und Cl^- erfolgte die Berechnung der absoluten renalen Elektrolytexkretion in [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$ NFG] folgendermaßen (am Beispiel von Na^+):

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

Da bei den Stoffwechselkäfigversuchen im Gegensatz zu den Clearanceexperimenten keine Nierenentnahme stattfand, bezieht sich $U_{\text{Na}}V$ hier nicht auf das Nierenfeuchtgewicht (NFG), sondern auf 100 g Tiergewicht.

Die Berechnung der renalen Exkretion von Kalium ($U_{\text{K}}V$) und Chlorid ($U_{\text{Cl}}V$) erfolgte gleichermaßen. $[\text{Na}]$ und $[\text{K}]$ bezeichnen hierbei die flammenphotometrisch bestimmten Konzentrationen von Na^+ und K^+ , $[\text{Cl}]$ und die Chloridkonzentration die mit Hilfe des Chloridmeters bestimmt wurde. UV bezeichnet den Urinfluss (ml/min).

2.6.5 Fraktionelle renale Natriumauscheidung (FE_{Na})

Die fraktionelle Natriumexkretion (FE_{Na}) in [%] ist ein Parameter der tubulären Resorptionsleistung der Niere, welche die Natriumauscheidung ($U_{\text{Na}}V$) in Prozent des filtrierten Natriums angibt und wie folgt berechnet wird:

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

2.6.5 Renale Albuminausscheidung

Die Albuminausscheidung im Urin wurde mittels der Albuminkonzentration, gemessen mit Hilfe des ELISA (siehe 2.5.7) und der Urinflußrate (UV) nach folgender Formel berechnet:

$$U_{\text{Alb}} V = [\text{Alb}]_{\text{Urin}} \times UV$$

Die Berechnung der renalen Proteinausscheidung erfolgte äquivalent, ebenfalls mittels der oben angeführten Formel.

2.6.6 Nierenindex (NI)

Der Nierenindex (NI) gibt das Verhältnis des Gesamtnierenfeuchtgewichts (NFG), d.h. der rechten und der linken Niere, zum absoluten Körpergewicht (KG) in [%] an.

$$NI = \frac{NFG \times 100}{KG}$$

2.6.7 Morphometrie

Der Radius (r) der Glomeruli und Tubuli wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$r = \sqrt{\frac{A}{\pi}}$$

Um den Durchmesser zu berechnen, wurde der Radius mit Faktor 2 multipliziert. Das Volumen wurde unter Annahme einer Kugelform wie folgt bestimmt:

$$V = \frac{4}{3} \times \pi \times r^3$$

2.6.8 Statistische Methoden

Die Berechnung der Daten erfolgte zunächst pro Versuchstier und wurde danach für die jeweiligen Gruppen als Mittelwerte \pm SEM (standard error of means) angegeben. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten sowohl für die Ergebnisse aus den Stoffwechselläufigkeitsexperimenten, der Blutdruckmessung als auch für die der Clearanceversuche erfolgte anhand von Varianzanalysen (ANOVA) mit Korrektur durch den Bonferroni post-test.

Verglichen wurden die hyperglykämischen, diabetischen Tiere mit den normoglykämischen Kontrolltieren, desweiteren wurden die D₃ Rezeptor -KO-Tiere mit den Wildtyp-Tieren verglichen. Bei der statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse der Clearanceexperimente wurden die Mittelwerte der Vorperioden (Basalwert) jeweils mit denen jeder einzelnen der 3 Hauptperioden verglichen (hierzu wurde der Dunnett-Test herangezogen). Der statistische Vergleich des Basalwertes (VP 1 und VP 2) mit dem Mittelwert der 3 Hauptperioden (HP 1 - 3) erfolgte anhand eines ungepaarten t-Tests. Um das statistische Signifikanzniveau beurteilen zu können, wurde der p-Wert herangezogen, der die Überschreitungswahrscheinlichkeit gegenüber der Nullhypothese angibt. Das Ergebnis wurde als statistisch signifikant betrachtet, wenn $p < 0,05$ war.

Die Durchführung der statistischen Auswertung erfolgte mittels des Computerprogramms InStat V3.0[®] (Graph Pad Inc., USA), die Erstellung der Graphiken mit Hilfe des Computerprogramms Figure P V2.5[®] (FigP Software Corporation, USA)

3. ERGEBNISSE

3.1 Stoffwechselläufigversuche an wachen Mäusen

Eine Übersicht der Ergebnisse der einzelnen Stoffwechselläufigexperimente findet sich in den Tabellen 2-5.

Tabelle 2: Stoffwechselläufigversuch 0 (STWK 0). Basalwerte. Vergleich der Dopamin D₃ Knockout (KO) mit den Wildtyptieren (WT). Ausserdem Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit den ab STWK 1 hyperglykämischen Tieren (DM). (In diesem Versuch sind DM-Tiere noch normoglykämisch).

Variablen: renale Elektrolytexkretion (Na⁺, K⁺, Cl⁻) (U_{Na}V, U_KV, U_{Cl}V), renale Glukoseexkretion (U_{Gl}V), systolischer Blutdruck (RR_{sys}), Herzfrequenz (HF). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM.

Gruppe (n)	CON-WT (n=8)	CON-KO (n=8)	DM-WT (n=15)	DM-KO (n=15)
Tiergewicht [g]	29,27 ± 0,66	29,86 ± 0,97	28,11 ± 0,40	31,10 ± 0,65 #
Blutzucker [mg/dl]	126,9 ± 3,8	123,1 ± 5,2	130,6 ± 4,4	117,8 ± 4,6
Trinkvolumen [µl/12h]	1360 ± 238,74	2368 ± 238,17*	1693 ± 191,99	1360 ± 116,43°
Urinvolumen [µl/12h]	660 ± 57,47	883,8 ± 107,9	791,33 ± 86,79	1088 ± 115,09
Osmolalität [mosmol/kg]	1068 ± 89,88	852 ± 88,87	679,23 ± 44,93*	750,87 ± 42,06
U _{Na} V [nmol/min/100g]	266,10 ± 28,59	340,76 ± 36,85	297,73 ± 28,66	460,97 ± 60,40 #
U _K V [nmol/min/100g]	405,04 ± 54,50	424,19 ± 52,53	301,15 ± 30,85	393,81 ± 41,44
U _{Cl} V [nmol/min/100g]	228,60 ± 24,12	300,17 ± 43,06	265,26 ± 26,10	417,01 ± 55,64 #
U _{Gl} V [µmol/min/100g]	0,0073 ± 0,0012	0,0085 ± 0,0018	0,0050 ± 0,0004	0,0063 ± 0,0007
Albuminurie [µg/24h]	9,36 ± 1,78	9,66 ± 1,55	5,42 ± 0,77	4,98 ± 0,78°
Proteinurie [mg/24h]	1,33 ± 0,11	1,60 ± 0,25	1,32 ± 0,14	1,53 ± 0,16
RR _{sys} [mmHg]	109,78 ± 11,59	110,93 ± 11,46	110,73 ± 2,96	106,93 ± 2,24
HF [1/min]	337,98 ± 5,59	344,42 ± 7,37	360,62 ± 11,12	352,11 ± 5,88

* p < 0.05 vs CON-WT (ANOVA)

° p < 0.05 vs CON-KO (ANOVA)

#p < 0.05 vs DM-WT (ANOVA)

Tabelle 3: Stoffwechselfähigversuch 1 (STWK 1). Werte einen Monat nach Induktion eines Diabetes mellitus (DM-Tiere). Vergleich der Dopamin D₃ Knockout (KO) mit den Wildtyptieren (WT). Ausserdem Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit den hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM).

Variablen: renale Elektrolytexkretion (Na⁺, K⁺, Cl⁻) (U_{Na}V, U_KV, U_{Cl}V), renale Glukoseexkretion (U_GV), systolischer Blutdruck (RR_{Sys}), Herzfrequenz (HF). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM.

Gruppe (n)	CON-WT (n=8)	CON-K.O. (n=8)	DM-WT (n=15)	DM-K.O. (n=14)
Tiergewicht [g]	29,85 ± 0,70	31,32 ± 1,09	23,27 ± 0,57*x	25,09 ± 0,60°x
Blutzucker [mg/dl]	145,3 ± 7,8	124,9 ± 3,9	494,7 ± 20,6 *x	521,9 ± 22,4 °x
Trinkvolumen [µl/12h]	1089 ± 68,98	833,8 ± 134,76x	2922,67 ± 372,96*x	2705,71 ± 202,62°x
Urinvolumen [µl/12h]	618,8 ± 84,14	658,8 ± 97,83	4541,33 ± 405,84*x	4562,86 ± 534,73°x
Osmolalität [mosmol/kg]	1308 ± 155,97	1044 ± 85,15	1062 ± 53,61x	974,89 ± 52,86x
U_{Na}V [nmol/min/100g]	294,89 ± 30,11	285,19 ± 39,01	1523,92 ± 216,71*x	1118,21 ± 174,52°x
U_KV [nmol/min/100g]	407,55 ± 40,84	378,44 ± 54,24	1432,28 ± 99,29 *x	1312,83 ± 123,92°x
U_{Cl}V [nmol/min/100g]	286,66 ± 37,50	297,67 ± 35,48	1667,79 ± 243,43*x	1278,30 ± 174,89°x
U_GV [µmol/min/100g]	0,0048 ± 0,0012	0,0068 ± 0,0008	1,95 ± 0,17*x	1,64 ± 0,23°x
Albuminurie [µg/24h]	7,39 ± 0,95	9,03 ± 0,65	44,98 ± 5,71*x	39,29 ± 5,58°x
Proteinurie [mg/24h]	2,24 ± 0,30x	2,42 ± 0,21	1,42 ± 0,16	1,31 ± 0,22°
RR_{Sys} [mmHg]	106,09 ± 10,87	104,66 ± 10,77	108,28 ± 4,49	105,06 ± 3,54
HF [1/min]	321,97 ± 11,18	316,87 ± 10,58	322,41 ± 10,84x	341,59 ± 10,70

* p < 0.05 vs CON-WT (ANOVA)

° p < 0.05 vs CON-KO (ANOVA)

p < 0.05 vs DM-WT (ANOVA)

x p < 0.05 vs STWK 0 (ANOVA)

Tabelle 4: Stoffwechselkäfigversuch 2 (STWK 2). Werte zwei Monate nach Induktion eines Diabetes mellitus (DM-Tiere). Vergleich der Dopamin D₃ Knockout- (KO) mit den Wildtyptieren (WT). Ausserdem Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit den hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM).

Variablen: renale Elektrolytexkretion (Na⁺, K⁺, Cl⁻) (U_{Na}V, U_KV, U_{Cl}V), renale Glukoseexkretion (U_GV), systolischer Blutdruck (RR_{Sys}), Herzfrequenz (HF). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM.

Gruppe (n)	CON-WT (n=8)	CON-K.O. (n=8)	DM-WT (n=11)	DM-K.O. (n=12)
Tiergewicht [g]	29,95 ± 0,74	32,01 ± 1,19	24,38 ± 0,53*x	25,01 ± 0,56°x
Blutzucker [mg/dl]	132,2 ± 9,1	139,6 ± 10,7	553,4 ± 20,6*x	523,9 ± 23,7 °x
Trinkvolumen [µl/12h]	1683 ± 354,56	1275 ± 147,95	2389,09 ± 276,03	3980 ± 560,27 # °x
Urinvolumen [µl/12h]	831,3 ± 96,80	746,3 ± 64,13	5923,64 ± 580,74*x	5826,67 ± 651,07°x
Osmolalität [mosmol/kg]	859,19 ± 65,10	878,8 ± 93,73	990,91 ± 22,50x	815,38 ± 50,45
U_{Na}V [nmol/min/100g]	307,90 ± 31,02	264,14 ± 32,47	1627,51 ± 145,39*x	1292,90 ± 207,36°x
U_KV [nmol/min/100g]	408,30 ± 47,63	365,84 ± 36,99	1736,40 ± 179,28*x	1461,48 ± 129,87°x
U_{Cl}V [nmol/min/100g]	275,43 ± 36,06	241,09 ± 36,31	1949,23 ± 212,52*x	1524,13 ± 240,55°x
U_GV [µmol/min/100g]	0,0087 ± 0,0014	0,0068 ± 0,0008	18,18 ± 1,88*x	12,51 ± 2,07°x
Albuminurie [µg/24h]	12,25 ± 1,31	9,50 ± 1,28	38,88 ± 6,03*x	64,61 ± 7,69 # °x
Proteinurie [mg/24h]	2,04 ± 0,33	1,83 ± 0,23	2,73 ± 0,54x	2,55 ± 0,47x
RR_{Sys} [mmHg]	98,34 ± 9,99	98,59 ± 10,17	101,14 ± 4,33	100,68 ± 2,65
HF [1/min]	338,82 ± 8,48	323,03 ± 7,51	329,87 ± 10,77	330,92 ± 16,63

* p < 0.05 vs CON-WT (ANOVA)

° p < 0.05 vs CON-KO (ANOVA)

p < 0.05 vs DM-WT (ANOVA)

x p < 0.05 vs STWK 0 (ANOVA)

Tabelle 5: Stoffwechselfähigversuch 3 (STWK 3). Werte drei Monate nach Induktion eines Diabetes mellitus (DM-Tiere). Vergleich der Dopamin D₃ Knockout (KO) mit den Wildtypieren (WT). Ausserdem Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit den hbhyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM).

Variablen: renale Elektrolytexkretion (Na⁺, K⁺, Cl⁻) (U_{Na}V, U_KV, U_{Cl}V), renale Glukoseexkretion (U_GV), systolischer Blutdruck (RR_{Sys}), Herzfrequenz (HF). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM.

Gruppe (n)	CON-WT (n=8)	CON-K.O. (n=8)	DM-WT (n=9)	DM-K.O. (n=10)
Tiergewicht [g]	29,97 ± 0,79	32,22 ± 0,92	24,06 ± 0,45*x	25,82 ± 0,54°x
Blutzucker [mg/dl]	118,9 ± 3,9	129,5 ± 7,2	576,1 ± 11,4 *x	550,8 ± 19,1°x
Trinkvolumen [µl/12h]	2476 ± 450,63x	2148 ± 555,47	1280 ± 313,14	3244 ± 605,27#x
Urinvolumen [µl/12h]	560 ± 70,16	796,3 ± 230,01	6911,11± 464,39*x	6540 ± 587,45°x
Osmolalität [mosmol/kg]	1099 ± 128,07	916,3 ± 141,65	922,94 ± 41,27x	855,30 ± 61,11
U_{Na}V [nmol/min/100g]	215,20 ± 18,78	239,26 ± 58,62	1606,03 ± 160,28*x	1445,26 ± 247,27°x
U_KV [nmol/min/100g]	347,99 ± 39,60	356,03 ± 76,49	1929,27 ± 139,62*x	1605,02 ± 121,76°x
U_{Cl}V [nmol/min/100g]	226,26 ± 24,83	221,17 ± 59,72	1904,41 ± 148,29*x	1885,18 ± 264,62°x
U_GV [µmol/min/100g]	0,0084 ± 0,0011	0,0073 ± 0,0014	18,97 ± 2,17*x	14,84 ± 1,98°x
Albuminurie [µg/24h]	10,86 ± 1,64	8,93 ± 1,85	54,19 ± 8,19*x	77,60 ± 1,72° #x
Proteinurie [mg/24h]	1,88 ± 0,20	2,73 ± 0,64	2,13 ± 0,33	1,93 ± 0,25
RR_{Sys} [mmHg]	100,70 ± 10,40	102,70 ± 10,67	102,26 ± 2,50	103,63 ± 1,93
HF [1/min]	323,60 ± 16,79	351,00 ± 6,81	321,66 ± 11,55	386,18 ± 49,12

* p < 0.05 vs CON-WT (ANOVA)

° p < 0.05 vs CON-KO (ANOVA)

p < 0.05 vs DM-WT (ANOVA)

x p < 0.05 vs STWK 0 (ANOVA)

3.1.1 Blutglukose und Tiergewicht

Bei der Messung des Blutglukosebasalwertes, d.h. vor Induktion des Diabetes mellitus, wiesen noch alle Gruppen einen Blutglukosewert (BZ) von etwa 120 mg/dl auf. Wie zu erwarten war, zeigte sich nach Streptozotozinapplikation (STZ) und der dadurch induzierten diabetogenen Stoffwechsellage bei beiden diabetischen Gruppen (DM-WT und DM-KO) eine signifikante Hyperglykämie mit BZ-Werten von 500-600 mg/dl.

Bei der Messung der Basalwerte des Körpergewichts der Mäuse lag dieses im Mittel zwischen 28,1 und 31,1 g. Vor jedem weiteren Stoffwechselkäfigversuch wurde dann wiederum das Tiergewicht bestimmt, welches sich erwartungsgemäß nach STZ-Applikation bei beiden diabetischen Gruppen im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrollgruppen signifikant auf Werte zwischen 24,1 und 25,8 g reduzierte.

In allen Versuchsgruppen konnte kein signifikanter Unterschied sowohl bei der Messung der Blutglukose als auch des Tiergewichts zwischen Wildtyp (WT)- und Dopamin D₃ Knockout (KO) Mäusen gezeigt werden.

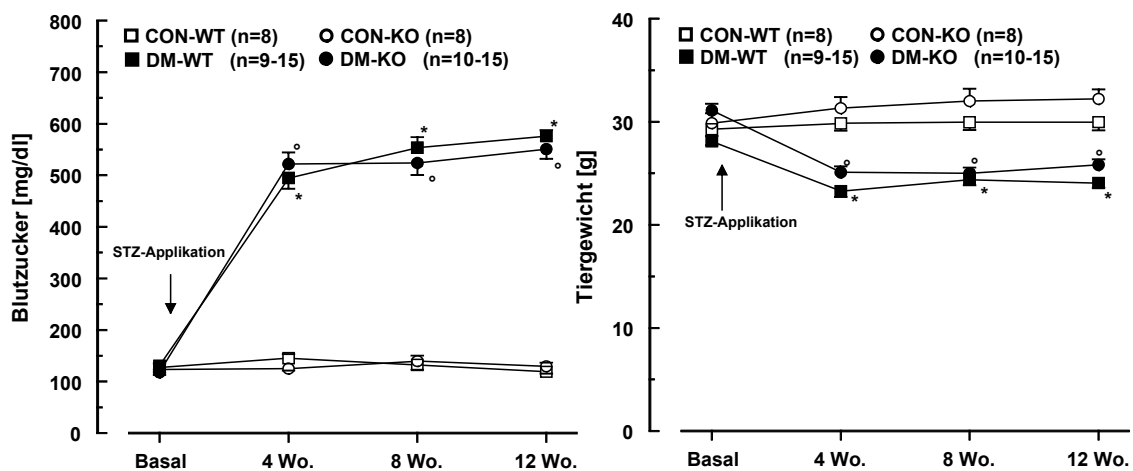


Abbildung 7: Blutglukose (BZ) und Tiergewicht aller Versuchsgruppen im Stoffwechselkäfigversuch im zeitlichen Verlauf. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D₃ Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA); ° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA)

$p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA)

3.1.2 Urin- und Trinkvolumen

Während sich die Urinvolumina aller vier Versuchsgruppen bei der Messung der Basalwerte in etwa entsprachen, zeigten die diabetischen Tiere schon innerhalb der ersten Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus erwartungsgemäß eine deutliche Polyurie. Die Ausscheidung der diabetischen Tiere wies im Laufe des Experiments signifikant höhere Werte im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Diese Werte lagen im Mittel bei den diabetischen Tieren 8-fach höher zwischen 6,5 und 6,9 ml im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 8).

Äquivalent zu den Urinvolumina verhielten sich auch die Trinkvolumina, wobei bei den diabetischen Tieren nach STZ-Applikation eine signifikante Polydipsie im Vergleich zu den Kontrolltieren gezeigt werden konnte (Trinkvolumina sind nicht graphisch dargestellt).

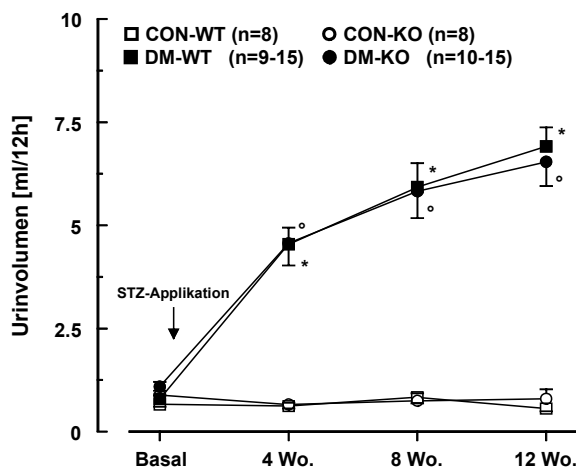


Abbildung 8: Urinvolumen (UV) im Stoffwechselkäfigversuch im zeitlichen Verlauf. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA);

° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA);

$p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA);

3.1.3 Renale Elektrolytausscheidung (Na^+ , K^+ und Cl^-)

Die Elektrolytexkretion betreffend, konnten bei allen vier Versuchsgruppen, sowohl bei der Natrium-, Kalium- als auch der Chloridausscheidung, keine Unterschiede bei der Bestimmung der Basalwerte beobachtet werden. Wiederum konnte jedoch nach STZ-Applikation bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu den normoglykämischen Tieren ein signifikanter Anstieg der Elektrolyte im Urin verzeichnet werden. Weiterhin kann man tendenziell eine erniedrigte Natrium- und Chloridexkretion der diabetischen D_3 Rezeptor Knockout (DM-KO) Tiere im Vergleich zur entsprechenden Wildtypgruppe (DM-WT) erkennen, welche allerdings das Signifikanzniveau nicht erreichen konnte.

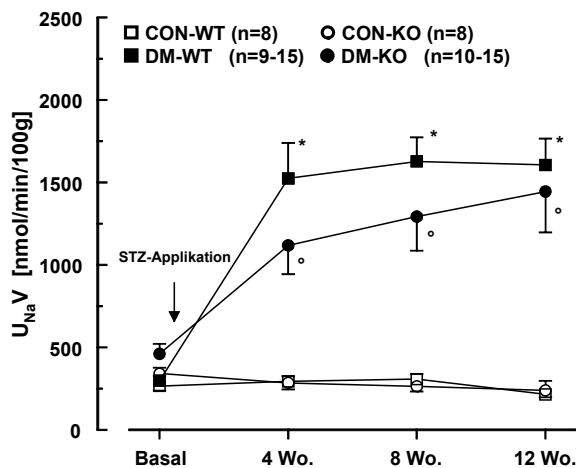


Abbildung 9: Na^+ -Exkretion im Urin ($U_{\text{Na}V}$) im Stoffwechselkäfigversuch im zeitlichen Verlauf. Sowohl Vergleich der normo-glykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM
 * $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA);
 ° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA);
 # $p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA);

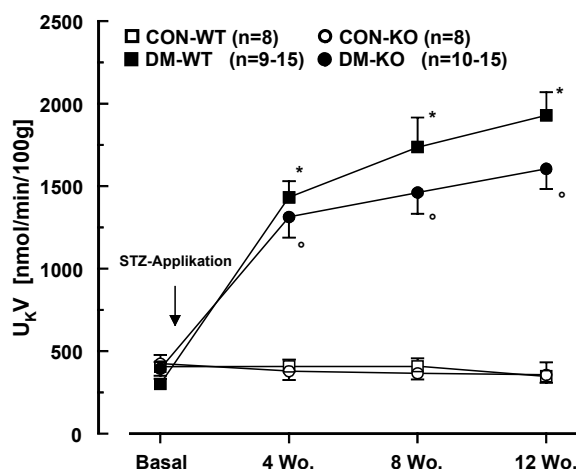


Abbildung 10: K^+ -Exkretion im Urin ($U_{\text{K}V}$) im Stoffwechselkäfigversuch im zeitlichen Verlauf. Sowohl Vergleich der normo-glykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM
 * $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA);
 ° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA);
 # $p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA);

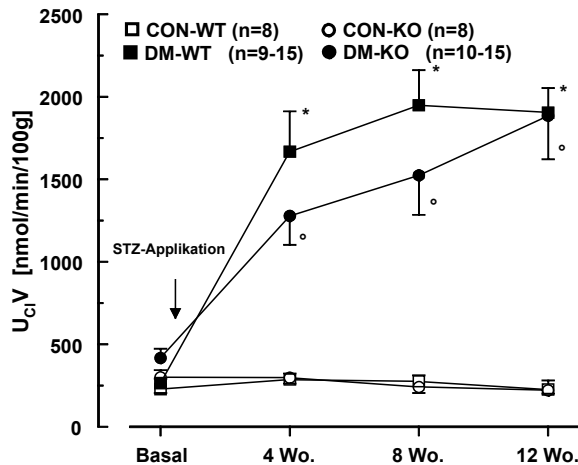


Abbildung 11: Cl^- -Exkretion im Urin ($U_{Cl}V$) im Stoffwechselkäfigversuch im zeitlichen Verlauf. Sowohl Vergleich der normo-glykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM
 * $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA);
 ° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA);
 # $p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA);

3.1.4 Albumin- und Proteinurie

Bei der Albumin- und Proteinausscheidung im Urin handelt es sich um die beiden Hauptparameter der diabetischen Nephropathie. Hierbei steht die Albuminurie für ein frühes und die Proteinurie für ein bereits fortgeschrittenes Stadium der diabetischen Nephropathie. In den beiden abgebildeten Diagrammen sind die Werte des letzten Stoffwechselkäfigversuchs (STWK 3) in $\mu g/24$ h aufgetragen (Abb. 12).

Bezüglich der Albuminurie konnte eine signifikante Steigerung der Albuminausscheidung beider diabetischer Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen gezeigt werden. Während die Kontrolltiere über die komplette Versuchsdauer gesehen Werte von ca. $10 \mu g$ pro 24 h aufwiesen, lagen die Werte der diabetischen Tiere zwischen 55 und $75 \mu g$ pro 24 h. Zwischen Wildtyp (WT) und Knockout (KO) Tieren ergaben sich keine Unterschiede.

Bei der Messung der Proteinausscheidung im Urin konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen allen vier Versuchsgruppen festgestellt werden, was einen Rückschluss auf ein frühes Stadium der diabetischen Nephropathie in diesem Modell zulässt.

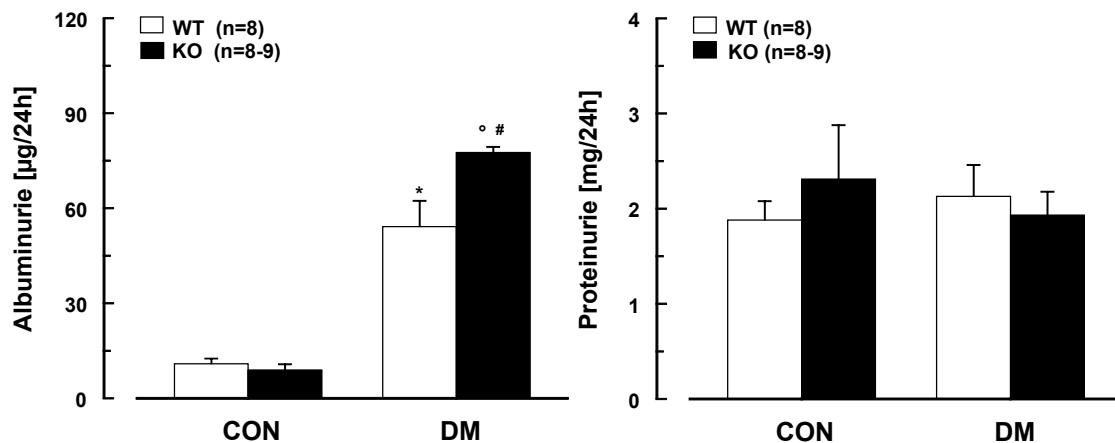


Abbildung 12: Albumin- und Proteinurie aller Versuchsgruppen des letzten Stoffwechselläufigversuchs (STWK 3 - Werte nach 12 Wochen (siehe Tab. 4)). Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D₃ Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM
 * $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA); ° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA)
 # $p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA)

3.1.5 Systolischer Blutdruck und Herzfrequenz

Wie unter 2.4.2 beschrieben erfolgte die Messung des systolischen Blutdrucks mittels einer Schwanzvenenplethysmographie. Durch dieses Verfahren war es ebenfalls möglich die Herzfrequenz zu erfassen. Die Messung der systolischen Blutdruckwerte ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen allen vier Versuchsgruppen, wobei die Werte im Mittel zwischen 98 ± 10 und 110 ± 11 mmHg lagen.

Gleiches konnte in Bezug auf die Herzfrequenz beobachtet werden, diese zeigte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede im Vergleich aller Versuchstiere. Die Werte lagen zwischen 316 ± 10 und 387 ± 49 Schlägen pro Minute.

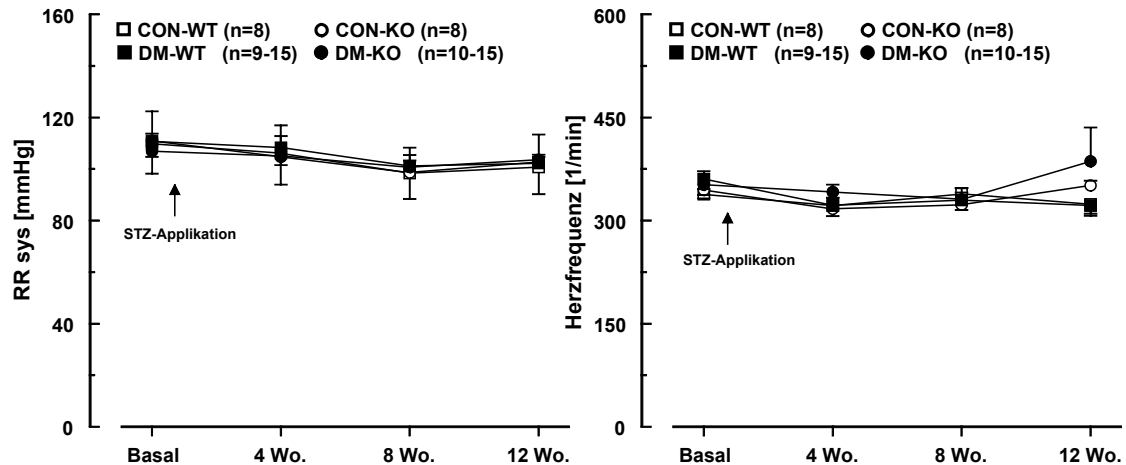


Abbildung 13: Systolischer Blutdruck (RR_{sys}) und Herzfrequenz (HF) aller Versuchsgruppen im Stoffwechselkufigversuch im zeitlichen Verlauf. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtyptiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM
 * $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA); ° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA)
 # $p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA)

Anmerkung:

Der Übersichtlichkeit halber wurden die Signifikanzen versus STWK 0 (Ausgangswerte) nicht in oben angeführte Schaubilder (Abb. 7-13) übernommen, sind aber aus Tabellen 3-5 ersichtlich.

3.1.6 Organgewichte und Histologie

Eine Übersicht zusätzlicher Parameter nach Beendigung der Langzeit-Stoffwechsellängsexperimente findet sich in Tabelle 6.

Tabelle 6: Werte nach Beendigung der Langzeit-Stoffwechsellängsexperimente. Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout (KO) und Wildtyp-Tieren (WT). Ausserdem Vergleich zwischen normoglykämischen Kontrolltieren (CON) und hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM). **Variablen:** Hämatokrit (Hkt), Nierenfeuchtgewicht (NFG), Nierenindex (Nierengewicht relativ zum Körpergewicht), Glomeruloskleroseindex und Tubulointerstitieller Index (siehe 2.5.12.2). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	CON-WT (n=8)	CON-KO (n=8)	DM-WT (n=8)	DM-KO (n=9)
Hkt [%]	45,29 \pm 0,39	46,71 \pm 0,77	43,25 \pm 0,79	44,71 \pm 0,72
Herzgewicht [g]	0,1589 \pm 0,0052	0,1571 \pm 0,0063	0,1398 \pm 0,0046	0,1436 \pm 0,0082
NFG (gesamt) [g]	0,4233 \pm 0,0141	0,3776 \pm 0,0112	0,5753 \pm 0,0831	0,4633 \pm 0,0175
Nierenindex [%]	1,38 \pm 0,03	1,21 \pm 0,02	1,95 \pm 0,09*	1,77 \pm 0,06°
Glom.sklerose- index	0,75 \pm 0,23	0,63 \pm 0,17	1,13 \pm 0,28	1,33 \pm 0,16
Tubulointest.- index	0,38 \pm 0,17	0,13 \pm 0,12	1,13 \pm 0,28	0,33 \pm 0,16

* $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA)

° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA)

$p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA)

3.1.6.1 Nierenindex und Herzgewicht

Die Ermittlung des Nierenindex, d.h. des Gesamtnierenfeuchtgewichts im Verhältnis zum Körpergewicht, sowie die des Herzgewichts erfolgte nach Beendigung des letzten Stoffwechsellängsexperiments, welches drei Monate nach Induktion des Diabetes mellitus stattfand.

Bezüglich des Nierenindex konnte ein signifikanter Anstieg bei den diabetischen Tieren auf Werte von jeweils 1,95 \pm 0,09 (DM-WT) bzw. 1,77 \pm 0,06 % (DM-KO) im Vergleich zu den jeweiligen Kontrolltieren (CON-WT 1,38 \pm 0,03 und CON-KO 1,21 \pm 0,02 %) verzeichnet werden. Es konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp- und D₃ Knockoutgruppe festgestellt werden.

Die Messung des Herzgewichts ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen allen vier Versuchsgruppen.

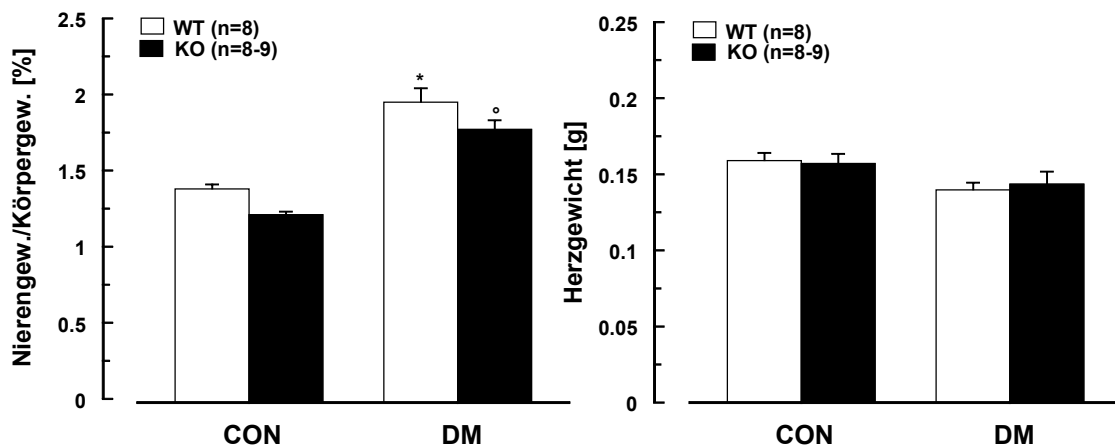


Abbildung 14: Nierenindex (Nierengewicht/Körpergewicht) und Herzgewicht aller Versuchsgruppen nach Beendigung der Stoffwechsellkäufigversuche. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtyptiere (WT) mit D₃ Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte ± SEM
 * $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA); ° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA)
 # $p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA)

3.1.6.2 Morphologie

Als Maß zur Beurteilung der Glomeruli wurde ein Glomeruloskleroseindex mit Werten von 0 – 4 herangezogen (siehe 2.5.12.2). Hierbei bezeichnet 0 das normale Glomerulum und 4 steht für eine diffuse Glomerulosklerose. Äquivalent dazu erfolgte die Beurteilung der Tubuli anhand eines Tubulointerstitiellen Index (nicht graphisch dargestellt).

Sowohl der Glomerulosklerose- als auch der Tubulointerstitielle Index der diabetischen Tiere stellte sich als leicht erhöht im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollgruppen dar. Die Ergebnisse erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau. Die nur geringfügigen Veränderungen lassen wiederum auf ein frühes Stadium der diabetischen Nephropathie schließen.

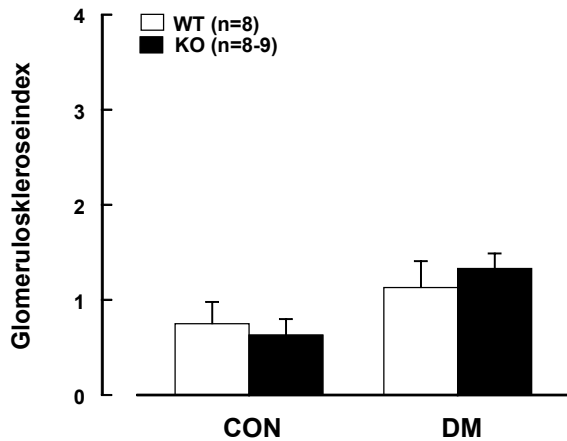


Abbildung 15: Glomeruloskleroseindex aller Versuchsgruppen nach Beendigung der Stoffwechselläufigversuche. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D₃ Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA);

° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA);

$p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA);

3.1.6.3 Morphometrie

Eine Übersicht der Ergebnisse der morphometrischen Untersuchung findet sich in den Tabellen 7 und 8.

Tabelle 7: Messung der Glomeruli. Messung erfolgte an den, nach Beendigung der Langzeit-Stoffwechselläufigexperimente, entnommenen Nieren. Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout (KO) und Wildtypieren (WT). Ausserdem Vergleich zwischen normoglykämischen Kontrolltieren (CON) und hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM).

Variablen: Gesamtglomerulum (Glom.), Kapillarkonvolut (Tuft), Volumen des Bowmanschen Kapselraums (Vol.(Bowman)). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	CON-WT (n=8)	CON-KO (n=8)	DM-WT (n=8)	DM-KO (n=9)
Glom.fläche [μm^2]	1125,06 \pm 17,32	1062,82 \pm 27,38	1209,44 \pm 13,78*	1192,51 \pm 21,41°
Radius(Glom.) [μm]	18,88 \pm 0,15	18,35 \pm 0,25	19,11 \pm 0,22	18,42 \pm 0,29
Vol. (Glom.) [μm^3]	28577,80 \pm 660,73	26145,71 \pm 980,27	31088,95 \pm 448,77	29273,33 \pm 811,75°
Tuft [μm^2]	819,48 \pm 25,06	829,88 \pm 21,64	923,44 \pm 16,1*	932,01 \pm 19,67°
Radius(Tuft) [μm]	16,09 \pm 0,24	16,21 \pm 0,22	16,68 \pm 0,15	16,27 \pm 0,28
Vol.(Tuft) [μm^3]	17846,63 \pm 842,38	18130,62 \pm 695,10	20744,95 \pm 352,34*	20328,82 \pm 677,53
Vol.(Bowman) [μm^3]	10731,17 \pm 896,41	8401,96 \pm 960,96	10576,51 \pm 500,99	9133,93 \pm 263,33

* $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA)

° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA)

$p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA)

Table 8: Messung der Tubuli. Messung erfolgte an den, nach Beendigung der Langzeit-Stoffwechselkäfigexperimente, entnommenen Nieren. Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout (KO) und Wildtyp (WT). Ausserdem Vergleich zwischen normoglykämischen Kontrolltieren (CON) und hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	CON-WT (n=8)	CON-KO (n=8)	DM-WT (n=8)	DM-KO (n=9)
Gesamtfläche [μm^2]	324,57 \pm 3,98	293,82 \pm 4,77*	319,58 \pm 5,52	321,27 \pm 4,38°
Radius(Ges.fl.) [μm]	10,14 \pm 0,06	9,65 \pm 0,08*	10,07 \pm 0,09	9,59 \pm 0,17#
Tubulus- lumen [μm^2]	40,37 \pm 3,45	29,53 \pm 3,63	31,17 \pm 2,79	35,85 \pm 2,27
Radius(Tub.- lumen) [μm]	3,47 \pm 0,18	2,92 \pm 0,22	3,07 \pm 0,14	3,16 \pm 0,12
Zellhöhe [μm]	6,66 \pm 0,19	6,72 \pm 0,26	7,00 \pm 0,19	6,45 \pm 0,15

* $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA)

° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA)

$p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA)

Die renale Drucksteigerung, als mögliche Spätfolge bei Diabetes mellitus führt nachweislich zur Vergrößerung der Glomeruli und Tubuli. Auf Grund dessen, wurden die nach Beendigung des letzten Stoffwechselkäfigexperimentes entnommenen Nieren zusätzlich morphometrisch untersucht.

Sowohl das Volumen des gesamten Glomerulums als auch das Volumen des Tufts, d.h. des Kapillarkonvoluts zeigen tendenziell einen leicht erhöhten Wert bei beiden diabetischen Gruppen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollgruppen, wobei jedoch das Signifikanzniveau nicht erreicht wurde.

Bei der Untersuchung der Tubuli zeigten sich bei allen vier Versuchsgruppen ähnliche Werte, wobei die Zellhöhe der Tubuli im Mittel zwischen $6,45 \pm 0,15$ und $7,0 \pm 0,19 \mu\text{m}$ lag. Bezüglich Glomeruli- und Tubuligröße ergaben sich somit keine Unterschiede im Vergleich zwischen Wildtyp- und Dopamin D₃ Knockoutgruppen.

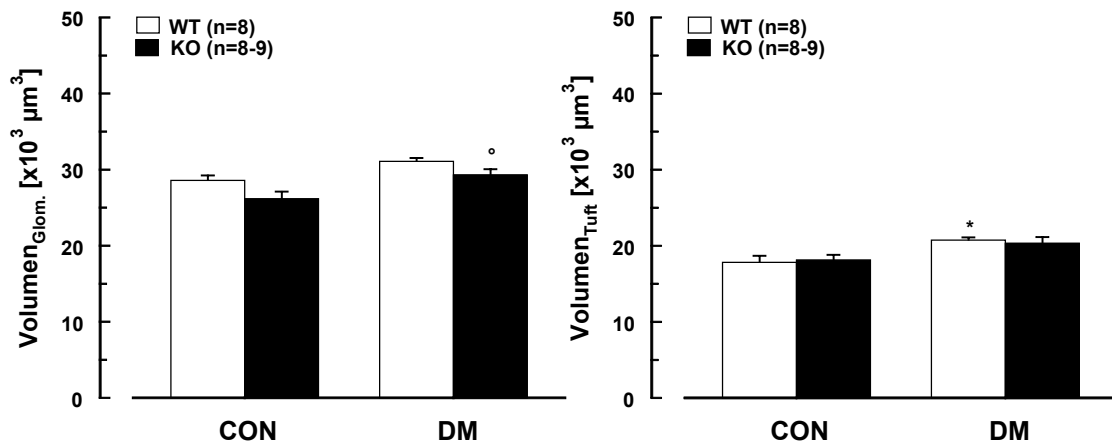


Abbildung 16: Volumen des gesamten Glomerulums und Volumen des jeweiligen Kapillarkonvoluts (Tuft) aller Versuchsgruppen nach Beendigung der Stoffwechselläufigversuche. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA); ° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA)

$p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA)

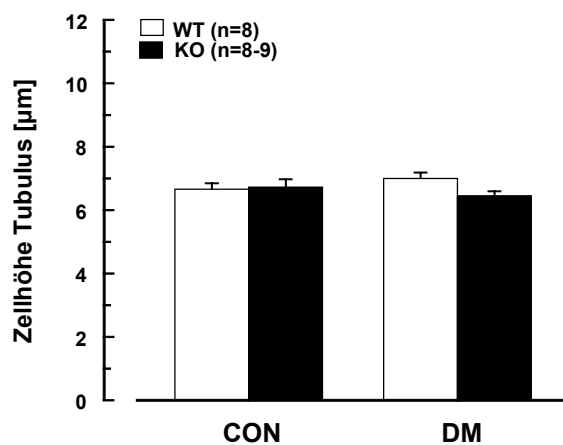


Abbildung 17: Zelhöhe der Tubuli aller Versuchsgruppen nach Beendigung der Stoffwechselläufigversuche. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0.05$ vs CON-WT (ANOVA);

° $p < 0.05$ vs CON-KO (ANOVA);

$p < 0.05$ vs DM-WT (ANOVA);

3.2 Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen

3.2.1 Vergleich zwischen normoglykämischen und diabetischen Tieren

Tabelle 9: Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen mit jeweils 2 Vorperioden (Basalwert) und 3 Hauptperioden (HP), wobei in HP 1-3 zusätzlich Angiotensin II infundiert wurde. (Nierenfunktionsvariablen)

Vergleich zwischen Dopamin D_3 Knockout- (KO) und Wildtyptieren (WT) sowie Vergleich zwischen normoglykämischen (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM).

Variablen: Urinvolumen (UV), glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Natriumausscheidung (U_{NaV}), fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	Periode	UV	GFR	U_{NaV}	FE_{Na}
		[μ l/min/g NFG]	[μ l/min/g NFG]	[μ mol/min/g NFG]	[%]
CON-WT (n=7)	Basal	4,24 \pm 0,85	0,77 \pm 0,04	0,40 \pm 0,11	0,36 \pm 0,10
	HP1	11,21 \pm 3,51	0,66 \pm 0,10	1,21 \pm 0,41	1,06 \pm 0,33
	HP2	15,73 \pm 7,17	0,33 \pm 0,09*	2,56 \pm 0,89*	3,39 \pm 0,93*
	HP3	9,24 \pm 3,40	0,39 \pm 0,11*	1,16 \pm 0,32	1,85 \pm 0,70
	HP1-HP3	10,89 \pm 4,09	0,45 \pm 0,09*	1,27 \pm 0,42	1,61 \pm 0,43*
CON-KO (n=7)	Basal	2,84 \pm 0,32	0,64 \pm 0,06	0,33 \pm 0,06	0,36 \pm 0,07
	HP1	6,37 \pm 1,74	0,69 \pm 0,10	0,91 \pm 0,33	0,77 \pm 0,20
	HP2	4,05 \pm 1,74	0,28 \pm 0,10*	0,73 \pm 0,37	1,12 \pm 0,26
	HP3	1,87 \pm 0,42	0,33 \pm 0,09	0,23 \pm 0,07	0,85 \pm 0,37
	HP1-HP3	4,09 \pm 1,16	0,43 \pm 0,08	0,60 \pm 0,22	0,82 \pm 0,17*
DM-WT (n=7)	Basal	11,0 \pm 3,51	1,12 \pm 0,07#	1,61 \pm 0,55#	0,94 \pm 0,32
	HP1	17,33 \pm 6,0	1,08 \pm 0,14	2,96 \pm 1,09	1,71 \pm 0,39
	HP2	25,57 \pm 6,76	0,64 \pm 0,10*	4,24 \pm 1,13	4,16 \pm 0,96*
	HP3	17,59 \pm 4,54	0,70 \pm 0,03*	3,29 \pm 0,80	3,46 \pm 0,75*
	HP1-HP3	18,80 \pm 5,02	0,79 \pm 0,07*#	3,24 \pm 0,89	2,86 \pm 0,65*
DM-KO (n=7)	Basal	13,50 \pm 2,15^	1,17 \pm 0,03^	1,40 \pm 0,18	0,85 \pm 0,09
	HP1	32,58 \pm 6,09^	1,09 \pm 0,11	4,78 \pm 0,81*^	3,01 \pm 0,37^x
	HP2	40,77 \pm 7,79*^	0,65 \pm 0,07*^	6,05 \pm 1,09*^	6,81 \pm 1,10*^
	HP3	19,59 \pm 7,57	0,66 \pm 0,11*	3,28 \pm 1,20^	3,12 \pm 0,94
	HP1-HP3	30,62 \pm 5,71*^	0,81 \pm 0,06*^	4,66 \pm 0,80*^	4,26 \pm 0,59*^

* p < 0,05 vs Basalperiode

p < 0,05 vs CON-WT

^ p < 0,05 vs CON-KO

x p < 0,05 vs DM-WT

Tabelle 10: Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen mit jeweils 2 Vorperioden (Basalwert) und 3 Hauptperioden (HP), wobei in HP 1-3 zusätzlich Angiotensin II infundiert wurde. (systemische Variablen)

Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout- (KO) und Wildtyp-Tieren (WT) sowie Vergleich zwischen normoglykämischen (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM).

Variablen: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HF), Hämatokrit (Hkt), Natriumkonzentration im Plasma (Na_{Plasma}). Alle Werte sind Mittelwerte ±SEM.

Gruppe	Periode	MAP [mmHg]	HF [1/min]	Hkt [%]	Na _{Plasma} [mmol/l]
CON-WT (n=7)	Basal	98,4 ± 5,5	526,4 ± 12,2	41,2 ± 1,1	146,1 ± 1,4
	HP1	106,5 ± 9,8	590,0 ± 26,4	38,3 ± 1,8	146,5 ± 1,5
	HP2	99,9 ± 13,1	622,9 ± 28,8	36,4 ± 1,7	144,3 ± 1,3
	HP3	112,0 ± 3,6	595,0 ± 51,8	35,3 ± 1,2*	145,4 ± 1,7
	HP1-HP3	100,4 ± 10,3	608,9 ± 27,6*	36,9 ± 1,7	145,1 ± 1,0
CON-KO (n=7)	Basal	99,6 ± 5,0	543,9 ± 8,9	38,9 ± 0,9	149,6 ± 1,6
	HP1	102,0 ± 7,5	589,3 ± 10,5	33,6 ± 1,3	147,2 ± 1,2
	HP2	90,3 ± 10,0	623,6 ± 13,0*	28,7 ± 1,9*#	148,0 ± 2,4
	HP3	90,5 ± 6,4	630,0 ± 29,8*	29,0 ± 2,2*	144,4 ± 3,8
	HP1-HP3	92,2 ± 7,3	612,3 ± 13,1*	30,2 ± 1,4*#	147,3 ± 2,0
DM-WT (n=7)	Basal	94,0 ± 3,5	481,8 ± 12,8	39,1 ± 0,6	142,9 ± 2,1
	HP1	116,1 ± 5,3*	548,6 ± 17,5*	37,6 ± 1,3	138,2 ± 1,7#
	HP2	111,6 ± 10,0	594,3 ± 18,7*	33,7 ± 2,7	133,8 ± 1,7*#
	HP3	120,6 ± 2,4*	566,0 ± 23,9*	34,4 ± 1,8	130,2 ± 2,4*#
	HP1-HP3	111,4 ± 7,9	574,2 ± 14,5*	34,7 ± 1,8*	134,8 ± 1,8*#
DM-KO (n=7)	Basal	89,1 ± 3,2	516,8 ± 18,2	36,9 ± 0,9	141,7 ± 3,3
	HP1	109,4 ± 4,7*	549,3 ± 17,2	35,6 ± 1,0	142,3 ± 3,3
	HP2	106,3 ± 4,4	637,9 ± 19,9*	33,3 ± 1,1	134,4 ± 2,5^
	HP3	96,8 ± 8,2x	620,8 ± 21,3*	29,8 ± 2,4*	131,7 ± 4,6
	HP1-HP3	104,4 ± 3,6*	604,4 ± 16,6*	33,2 ± 1,3*	136,7 ± 3,2^

* p < 0,05 vs Basalperiode

p < 0,05 vs CON-WT

^ p < 0,05 vs CON-KO

x p < 0,05 vs DM-WT

Tabelle 11: Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen mit jeweils 2 Vorperioden (Basalwert) und 3 Hauptperioden (HP), wobei in HP 1-3 zusätzlich Angiotensin II infundiert wurde. (systemische Variablen)

Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout- (KO) und Wildtyp-Tieren (WT) sowie Vergleich zwischen normoglykämischen (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM)

Variablen: Kaliumkonzentration im Plasma (K_{Plasma}), Kaliumausscheidung (U_{KV}).

Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	Periode	K_{Plasma} [mmol/l]	U_{KV} [μ mol/min/g NFG]
CON-WT (n=7)	Basal	4,67 \pm 0,27	0,48 \pm 0,10
	HP1	4,74 \pm 0,27	0,56 \pm 0,23
	HP2	4,71 \pm 0,25	0,54 \pm 0,20
	HP3	4,50 \pm 0,13	0,51 \pm 0,15
	HP1-HP3	4,70 \pm 0,10	0,45 \pm 0,16
CON-KO (n=7)	Basal	4,62 \pm 0,17	0,21 \pm 0,03
	HP1	5,03 \pm 0,18	0,33 \pm 0,09
	HP2	4,94 \pm 0,11	0,19 \pm 0,06
	HP3	4,70 \pm 0,17	0,19 \pm 0,05
	HP1-HP3	4,96 \pm 0,14	0,23 \pm 0,06
DM-WT (n=7)	Basal	3,44 \pm 0,13#	0,96 \pm 0,21#
	HP1	3,43 \pm 0,17#	0,90 \pm 0,27
	HP2	3,33 \pm 0,16#	0,65 \pm 0,12
	HP3	3,16 \pm 0,14#	0,65 \pm 0,12
	HP1-HP3	3,35 \pm 0,15#	0,70 \pm 0,16
DM-KO (n=7)	Basal	3,43 \pm 0,23^	1,01 \pm 0,05^
	HP1	3,30 \pm 0,17^	1,18 \pm 0,20^
	HP2	2,97 \pm 0,17^	0,69 \pm 0,10^
	HP3	3,12 \pm 0,11^	0,47 \pm 0,12*
	HP1-HP3	3,14 \pm 0,13^	0,79 \pm 0,11^

* p < 0,05 vs Basalperiode

p < 0,05 vs CON-WT

^ p < 0,05 vs CON-KO

x p < 0,05 vs DM-WT

3.2.1.1 Urinvolumen und glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Erwartungsgemäß wurden bei der Messung der Urinvolumina (UV) bei den diabetischen Gruppen (DM-WT und DM-KO) basal höhere Werte ermittelt als bei den normoglykämischen Kontrollgruppen (CON-WT und CON-KO). Nach erfolgter zusätzlicher Infusion von Angiotensin II im Anschluss an die beiden Vorperioden (Basalwert) konnte bei allen vier Versuchsgruppen, insbesondere bei den diabetischen Tieren, eine deutliche Polyurie, vor allem in den beiden ersten Hauptperioden beobachtet werden. Es konnte ein deutlicher Unterschied zwischen diabetischen- und entsprechenden Kontrollgruppen gezeigt werden, wobei zwischen DM-KO und CON-KO ein signifikanter Unterschied auffiel. Zwischen Wildtyp- und Dopamin D₃ Knockoutgruppe war kein signifikanter Unterschied festzustellen, wobei jedoch die Werte der Knockouttiere im Mittel höher lagen (Abb. 18).

Bezüglich der glomerulären Filtrationsrate (GFR) konnte auf Grund der Diabetes mellitus-typischen Hyperfiltration bei der Ermittlung der Basalwerte ein signifikanter Unterschied zwischen diabetischen Tieren und Kontrolltieren gezeigt werden. Hierbei wurde bei der diabetischen Wildtypgruppe ein um 30 % und bei der diabetischen Knockoutgruppe ein um 45 % erhöhter Wert gemessen. Nach Angiotensin II Applikation konnte nach initialer Konstanz der GFR ein deutlicher Abfall der GFR aller vier Versuchsgruppen festgestellt werden, wobei ein signifikanter Unterschied der beiden diabetischen Gruppen im Vergleich zu entsprechenden Kontrollgruppen weiterhin verzeichnet wurde. Es ergab sich wiederum kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und KO-Tieren (Abb. 18).

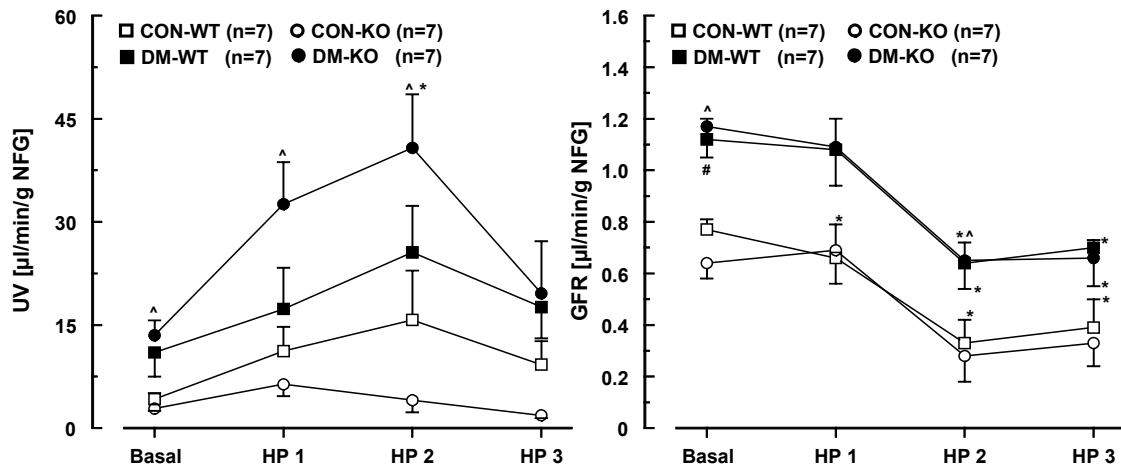


Abbildung 18: Urinvolumen (UV) und glomeruläre Filtrationsrate (GFR) aller Versuchsgruppen im Clearanceversuch. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtyptiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0,05$ vs Basalperiode; # $p < 0,05$ vs CON-WT

^ $p < 0,05$ vs CON-KO; x $p < 0,05$ vs DM-WT

3.2.1.2 Na^+ - / K^+ - Ausscheidung im Urin und fraktionelle Na^+ -Ausscheidung

Auch bei der Natrium- und Kaliumausscheidung im Urin konnten initial, d.h. bei der Messung der Basalwerte, signifikant höhere Werte bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren verzeichnet werden. In den beiden ersten Hauptperioden konnte eine deutlich gesteigerte Natriumausscheidung gezeigt werden, wobei 3 bis 4-fach höhere Werte im Vergleich zur jeweiligen Basalperiode gemessen wurden. Dieser Anstieg war bei den diabetischen Tieren ausgeprägter als bei den entsprechenden Kontrolltieren. Es konnte ein deutlicher Unterschied der beiden diabetischen Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen festgestellt werden, hierbei erreichte die DM-KO Gruppe gegenüber der CON-KO Gruppe das Signifikanzniveau (Abb. 19). Bei der Kaliumausscheidung blieb anders als bei der Natriumausscheidung in den Hauptperioden ein solch deutlicher Anstieg der Werte aus, jedoch lagen auch hier die Werte der diabetischen Tiere im Mittel höher als die der Kontrolltiere, wobei die Werte der DM-KO Gruppe wiederum signifikant höher lagen als die der CON-KO Gruppe. (Kaliumausscheidung nicht graphisch dargestellt).

In allen vier Versuchsgruppen verhielten sich die Mittelwerte der fraktionellen Natriumausscheidung (FE_{Na}) sehr ähnlich zu denen der Natriumausscheidung im Urin ($U_{Na}V$) (Abb. 19).

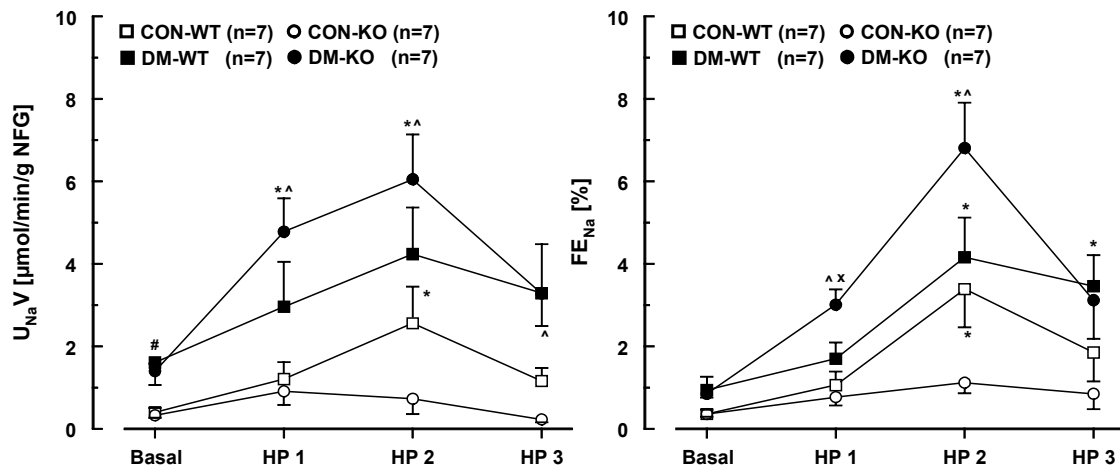


Abbildung 19: Natriumausscheidung im Urin ($U_{Na}V$) und fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) aller Versuchsgruppen im Clearanceversuch. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtypiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0,05$ vs Basalperiode; # $p < 0,05$ vs CON-WT

^ $p < 0,05$ vs CON-KO; x $p < 0,05$ vs DM-WT

3.2.1.3 MAP und Herzfrequenz

Die Basalwerte des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) lagen während der Clearanceexperimente in allen vier Versuchsgruppen bei Werten zwischen 89 ± 3 und 100 ± 5 mmHg. Nach erfolgter Angiotensin II Applikation in der ersten Hauptperiode konnte in beiden diabetischen Gruppen ein deutlicher Anstieg auf Werte zwischen 97 ± 8 und 121 ± 2 beobachtet werden. Es zeigten sich jedoch weder signifikante Unterschiede zwischen diabetischen- und Kontrolltieren noch zwischen der Wildtyp- und Knockoutgruppe.

Die Herzfrequenz betreffend, konnte ein ähnlicher Basalwert bei allen Versuchsgruppen ermittelt werden, der nach Angiotensin II Infusion in allen vier Versuchsgruppen signifikant auf Werte zwischen 549 ± 18 und 638 ± 20 Schlägen pro Minute anstieg (Abb.20).

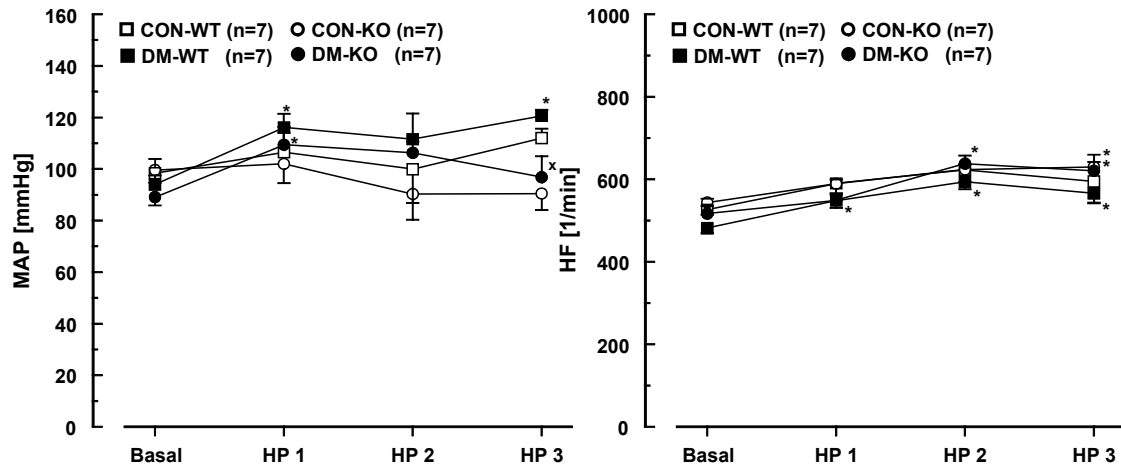


Abbildung 20: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) und Herzfrequenz (HF) aller Versuchsgruppen im Clearanceversuch. Sowohl Vergleich der normoglykämischen Kontrolltiere (CON) mit hyperglykämischen, diabetischen Tieren (DM) als auch der Wildtyptiere (WT) mit D_3 Knockout Tieren (KO). Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0,05$ vs Basalperiode; # $p < 0,05$ vs CON-WT

^ $p < 0,05$ vs CON-KO; x $p < 0,05$ vs DM-WT

3.2.1.4 Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma

Die normoglykämischen Kontrollgruppen, d.h. sowohl WT- als auch KO-Gruppe wiesen untereinander während der kompletten Versuchsdauer ähnliche Werte, sowohl bei der Natrium- als auch der Kaliumkonzentration im Plasma auf. Die Natriumkonzentration lag im Mittel zwischen $144,3 \pm 1,3$ und $149,6 \pm 1,6$ mmol/l, die Kaliumkonzentration zwischen $4,5 \pm 0,13$ und $5,03 \pm 0,18$ mmol/l. Äquivalent dazu konnten bei beiden diabetischen Gruppen ebenfalls ähnliche Werte beobachtet werden. Hier lagen die Werte der Natriumkonzentration im Mittel zwischen $130,2 \pm 2,4$ und $142,9 \pm 2,1$ mmol/l und der Kaliumkonzentration zwischen $2,97 \pm 0,17$ und $3,44 \pm 0,13$ mmol/l. Es konnten folglich sowohl bei der Natrium- als auch der Kaliumkonzentration im Plasma bei den diabetischen Tieren signifikant erniedrigte Werte gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren gezeigt werden. In allen vier Versuchsgruppen konnte jedoch weder bezüglich der Natrium- noch der Kaliumkonzentration ein Einfluss auf die Basalwerte durch die Applikation von Angiotensin II in den Hauptperioden verzeichnet werden.

3.2.2 Vergleich zwischen jungen und alten normoglykämischen Tieren

Die hier als CON-WT-JNG bzw. CON-KO-JNG bezeichneten Tiere entsprechen den in 3.2.1 erwähnten CON-WT und CON-KO Tieren.

Tabelle 12: Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen mit jeweils 2 Vorperioden (Basalwert) und 3 Hauptperioden (HP), wobei in HP 1-3 zusätzlich Angiotensin II infundiert wurde. (Nierenfunktionsvariablen)

Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout- (KO) und Wildtyp-tieren (WT) sowie Auswirkungen des Alters der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Folglich Vergleich zwischen jungen, 6 Mon. alten (JNG) und alten, 1-1½ jährigen (ALT) Tieren.

Variablen: Urinvolumen (UV), glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Natriumausscheidung (U_{Na}V), fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}). Alle Werte sind Mittelwerte ±SEM.

Gruppe	Periode	UV	GFR	U _{Na} V	FE _{Na}
		[µl/min/g NFG]	[µl/min/g NFG]	[µmol/min/g NFG]	[%]
CON-WT-JNG (n=7)	Basal	4,24 ± 0,85	0,77 ± 0,04	0,40 ± 0,11	0,36 ± 0,10
	HP1	11,21 ± 3,51	0,66 ± 0,10	1,21 ± 0,41	1,06 ± 0,33
	HP2	15,73 ± 7,17	0,33 ± 0,09*	2,56 ± 0,89*	3,39 ± 0,93*
	HP3	9,24 ± 3,40	0,39 ± 0,11*	1,16 ± 0,32	1,85 ± 0,70
	HP1-HP3	10,89 ± 4,09	0,45 ± 0,09*	1,27 ± 0,42	1,61 ± 0,43*
CON-KO-JNG (n=7)	Basal	2,84 ± 0,32	0,64 ± 0,06	0,33 ± 0,06	0,36 ± 0,07
	HP1	6,37 ± 1,74	0,69 ± 0,10	0,91 ± 0,33	0,77 ± 0,20
	HP2	4,05 ± 1,74	0,28 ± 0,10*	0,73 ± 0,37	1,12 ± 0,26#
	HP3	1,87 ± 0,42	0,33 ± 0,09	0,23 ± 0,07	0,85 ± 0,37
	HP1-HP3	4,09 ± 1,16	0,43 ± 0,08	0,60 ± 0,22	0,82 ± 0,17*
CON-WT-ALT (n=5)	Basal	2,75 ± 0,32	0,61 ± 0,04	0,27 ± 0,03	0,31 ± 0,04
	HP1	6,26 ± 2,09	0,42 ± 0,05	0,76 ± 0,27	1,14 ± 0,34
	HP2	3,88 ± 1,98	0,20 ± 0,06*	0,59 ± 0,31	1,28 ± 0,50
	HP3	4,98 ± 3,78	0,18 ± 0,11*	0,69 ± 0,50	1,75 ± 0,67
	HP1-HP3	5,27 ± 2,28	0,27 ± 0,05*	0,65 ± 0,31	1,30 ± 0,42*
CON-KO-ALT (n=5)	Basal	3,37 ± 0,70	0,66 ± 0,04	0,39 ± 0,10	0,40 ± 0,09
	HP1	2,92 ± 0,65	0,39 ± 0,05	0,30 ± 0,07	0,57 ± 0,13
	HP2	2,18 ± 0,55	0,27 ± 0,09*	0,22 ± 0,05	1,05 ± 0,31
	HP3	1,16 ± 0,13*	0,30 ± 0,10*	0,11 ± 0,03*	0,51 ± 0,26
	HP1-HP3	2,19 ± 0,42	0,30 ± 0,07*	0,23 ± 0,05	0,80 ± 0,21

* p < 0,05 vs Basalperiode

p < 0,05 vs CON-WT-JNG

^ p < 0,05 vs CON-KO-JNG

° p < 0,05 vs CON-WT-ALT

Tabelle 13: Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen mit jeweils 2 Vorperioden (Basalwert) und 3 Hauptperioden (HP), wobei in HP 1-3 zusätzlich Angiotensin II infundiert wurde. (systemische Variablen)

Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout- (KO) und Wildtyp-Tieren (WT) sowie Auswirkungen des Alters der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Folglich Vergleich zwischen jungen, 6 Mon. alten (JNG) und alten, 1-1½ jährigen (ALT) Tieren.

Variablen: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HF), Hämatokrit (Hkt), Natriumkonzentration im Plasma (Na_{Plasma}). Alle Werte sind Mittelwerte ±SEM.

Gruppe	Periode	MAP [mmHg]	HF [1/min]	Hkt [%]	Na _{Plasma} [mmol/l]
CON-WT-JNG (n=7)	Basal	98,4 ± 5,5	526,4 ± 12,2	41,2 ± 1,1	146,1 ± 1,4
	HP1	106,5 ± 9,8	590,0 ± 26,4	38,3 ± 1,8	146,5 ± 1,5
	HP2	99,9 ± 13,1	622,9 ± 28,8	36,4 ± 1,7	144,3 ± 1,3
	HP3	112,0 ± 3,6	595,0 ± 51,8	35,3 ± 1,2*	145,4 ± 1,7
	HP1-HP3	100,4 ± 10,3	608,9 ± 27,6*	36,9 ± 1,7	145,1 ± 1,0
CON-KO-JNG (n=7)	Basal	99,6 ± 5,0	543,9 ± 8,9	38,9 ± 0,9	149,6 ± 1,6
	HP1	102,0 ± 7,5	589,3 ± 10,5	33,6 ± 1,3	147,2 ± 1,2
	HP2	90,3 ± 10,0	623,6 ± 13,0*	28,7 ± 1,9*	148,0 ± 2,4
	HP3	90,5 ± 6,4#	630,0 ± 29,8*	29,0 ± 2,2*	144,4 ± 3,8
	HP1-HP3	92,2 ± 7,3	612,3 ± 13,1*	30,2 ± 1,4*#	147,3 ± 2,0
CON-WT-ALT (n=5)	Basal	96,0 ± 2,1	623,0 ± 45,2 #	38,4 ± 1,3	147,1 ± 0,8
	HP1	94,6 ± 5,2	671,0 ± 28,0	36,0 ± 2,3	146,5 ± 1,7
	HP2	83,8 ± 6,6	672,0 ± 27,0	31,0 ± 3,5	144,9 ± 1,9
	HP3	90,5 ± 6,7	667,5 ± 23,0	32,0 ± 1,4	147,2 ± 1,8
	HP1-HP3	87,7 ± 5,1	675,0 ± 25,9	32,8 ± 1,7*	145,7 ± 1,2
CON-KO-ALT (n=5)	Basal	86,5 ± 4,5	608,5 ± 27,9	41,4 ± 0,4	149,1 ± 1,4
	HP1	83,4 ± 3,1	675,0 ± 23,3	39,8 ± 1,8	149,6 ± 1,4
	HP2	81,2 ± 4,3	682,0 ± 21,9	37,4 ± 1,7^	145,8 ± 4,0
	HP3	75,0 ± 4,9	663,3 ± 32,0	34,3 ± 2,6*	144,5 ± 2,4
	HP1-HP3	79,7 ± 2,6	678,7 ± 21,9	37,7 ± 1,8^	146,9 ± 2,6

* p < 0,05 vs Basalperiode

p < 0,05 vs CON-WT-JNG

^ p < 0,05 vs CON-KO-JNG

° p < 0,05 vs CON-WT-ALT

Tabelle 14: Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen mit jeweils 2 Vorperioden (Basalwert) und 3 Hauptperioden (HP), wobei in HP 1-3 zusätzlich Angiotensin II infundiert wurde. (systemische Variablen)

Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout- (KO) und Wildtypieren (WT) sowie Auswirkungen des Alters der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Folglich Vergleich zwischen jungen, 6 Mon. alten (JNG) und alten, 1-1½ jährigen (ALT) Tieren.

Variablen: Kaliumkonzentration im Plasma (K_{Plasma}), Kaliumausscheidung (U_{KV}).
Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM.

Gruppe	Periode	K_{Plasma} [mmol/l]	U_{KV} [$\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g NFG}$]
CON-WT-JNG (n=7)	Basal	4,67 \pm 0,27	0,48 \pm 0,10
	HP1	4,74 \pm 0,27	0,56 \pm 0,23
	HP2	4,71 \pm 0,25	0,54 \pm 0,20
	HP3	4,50 \pm 0,13	0,51 \pm 0,15
	HP1-HP3	4,70 \pm 0,10	0,45 \pm 0,16
CON-KO-JNG (n=7)	Basal	4,62 \pm 0,17	0,21 \pm 0,03#
	HP1	5,03 \pm 0,18	0,33 \pm 0,09
	HP2	4,94 \pm 0,11	0,19 \pm 0,06
	HP3	4,70 \pm 0,17	0,19 \pm 0,05
	HP1-HP3	4,96 \pm 0,14	0,23 \pm 0,06
CON-WT-ALT (n=5)	Basal	5,38 \pm 0,27	0,18 \pm 0,05#
	HP1	4,48 \pm 0,46	0,24 \pm 0,09
	HP2	4,78 \pm 0,41	0,11 \pm 0,05
	HP3	5,50 \pm 1,14	0,22 \pm 0,15
	HP1-HP3	4,87 \pm 0,56	0,17 \pm 0,06
CON-KO-ALT (n=5)	Basal	4,34 \pm 0,32	0,27 \pm 0,08
	HP1	5,58 \pm 0,59	0,25 \pm 0,06
	HP2	4,46 \pm 0,17	0,20 \pm 0,07
	HP3	4,67 \pm 0,65	0,15 \pm 0,04
	HP1-HP3	4,89 \pm 0,22	0,19 \pm 0,05

* p < 0,05 vs Basalperiode

p < 0,05 vs CON-WT-JNG

^ p < 0,05 vs CON-KO-JNG

° p < 0,05 vs CON-WT-ALT

3.2.2.1 Urinvolumen und glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die Messung der Urinvolumina (UV) ergab während der kompletten Versuchsdauer keine signifikanten Unterschiede zwischen allen vier Versuchsgruppen, wobei bei den jungen Wildtyptieren nach erfolgter Angiotensin II Applikation in den beiden ersten Hauptperioden eine Polyurie mit Werten zwischen $9,2 \pm 3,4$ und $15,7 \pm 7,2$ $\mu\text{l}/\text{min}$ pro g Nierenfeuchtgewicht (NFG) auffällt (Abb. 21).

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) zeigte ähnliche Basalwerte bei allen Versuchstieren. Das im Anschluss an die beiden Vorperioden (Basalwert) infundierte Angiotensin II bewirkte einen Abfall der GFR, wobei eine signifikante Reduktion vor allem in den Hauptperioden 2 und 3 verzeichnet werden konnten. Eine signifikante Differenz zwischen alten und jungen Tieren, sowohl der Wildtyp- als auch der Knockoutgruppen, konnte nicht festgestellt werden (Abb. 21).

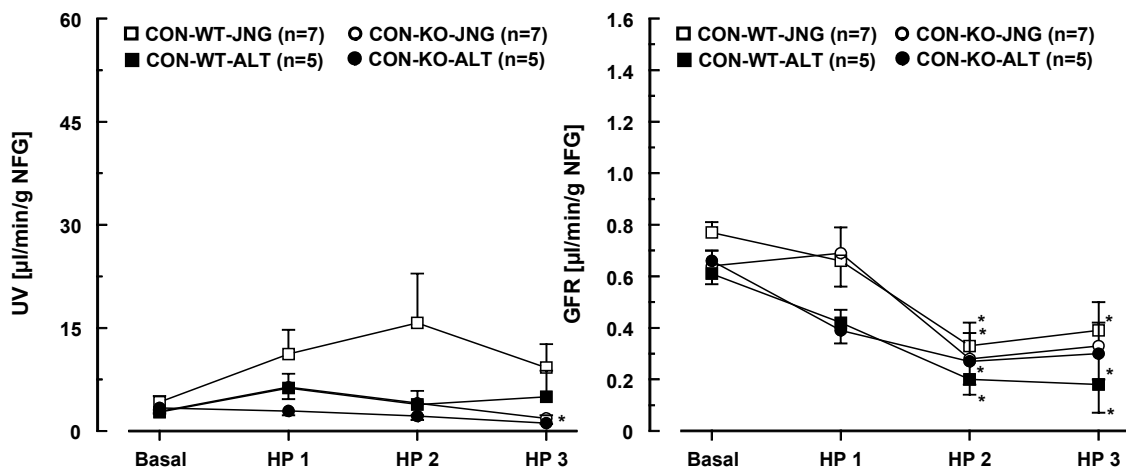


Abbildung 21: Urinvolumen (UV) und glomeruläre Filtrationsrate (GFR) aller Versuchsgruppen im Clearanceversuch. Vergleich zwischen Dopamin D_3 Knockout- (KO) und Wildtyptieren (WT) sowie Auswirkungen des Alters der unterschiedlichen Versuchsgruppen.

Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0,05$ vs Basalperiode; # $p < 0,05$ vs CON-WT-JNG

^ $p < 0,05$ vs CON-KO-JNG; ° $p < 0,05$ vs CON-WT-ALT

3.2.2.2 Na⁺ / K⁺-Ausscheidung im Urin und fraktionelle Na⁺-Ausscheidung

Weder die Natrium- noch die Kaliumausscheidung im Urin (U_{NaV} und U_{KV}) ergab signifikant unterschiedliche Werte im Vergleich aller Versuchsgruppen. Allerdings konnte ein leichter Anstieg der Elektrolytausscheidung (Na^+ und K^+) bei CON-WT-JNG infolge Angiotensin II Infusion beobachtet werden (Abb. 22; K^+ -Ausscheidung nicht dargestellt).

Wie bereits unter 3.2.1.2 erwähnt, korrelieren die Mittelwerte der fraktionellen Natriumausscheidung weitestgehend mit denen der Natriumausscheidung im Urin (Abb. 22).

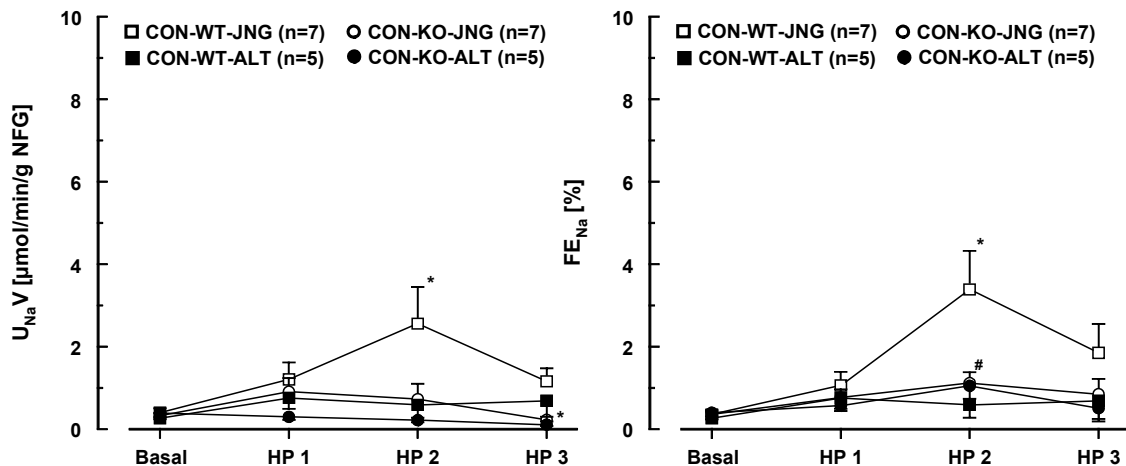


Abbildung 22: Natriumausscheidung im Urin (U_{NaV}) und fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) aller Versuchsgruppen im Clearanceversuch. Vergleich zwischen Dopamin D_3 Knockout (KO) und Wildtyp (WT) sowie Auswirkungen des Alters der unterschiedlichen Versuchsgruppen. Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0,05$ vs Basalperiode; # $p < 0,05$ vs CON-WT-JNG
 ^ $p < 0,05$ vs CON-KO-JNG; ° $p < 0,05$ vs CON-WT-ALT

3.2.2.3 MAP und Herzfrequenz

Auch auf die systemischen Variablen, hier die des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz (HF) hatte das Alter der Tiere keinen statistisch signifikanten Einfluss. Die Blutdruckwerte lagen allgemein jedoch im Mittel bei den jüngeren (6 Monate alt) Tieren höher, zwischen $90,3 \pm 10$ und $112 \pm 3,6$ mmHg, als bei den älteren (1-1½ jährig) Tieren, hier lagen die Werte zwischen $75 \pm 4,9$ und $96 \pm 2,1$ mmHg (Abb. 23).

Bei der Messung der Herzfrequenz konnten bei den älteren Tieren sowohl in der Basalperiode als auch in allen drei Hauptperioden tendenziell höhere Werte im Vergleich zu denen der jüngeren Tiere beobachtet werden. Die Werte der älteren Tiere lagen hierbei im Mittel zwischen $608,5 \pm 27,9$ und $682 \pm 21,9$ pro Minute wohingegen die jüngeren Tiere Werte zwischen $526,4 \pm 12,2$ und $630 \pm 29,8$ pro Minute aufwiesen. Erwartungsgemäß zeigte sich innerhalb aller vier Versuchsgruppen eine deutliche Herzfrequenzzunahme nach erfolgter Angiotensin II Infusion im Vergleich zu den jeweiligen Basalwerten (Abb. 23).

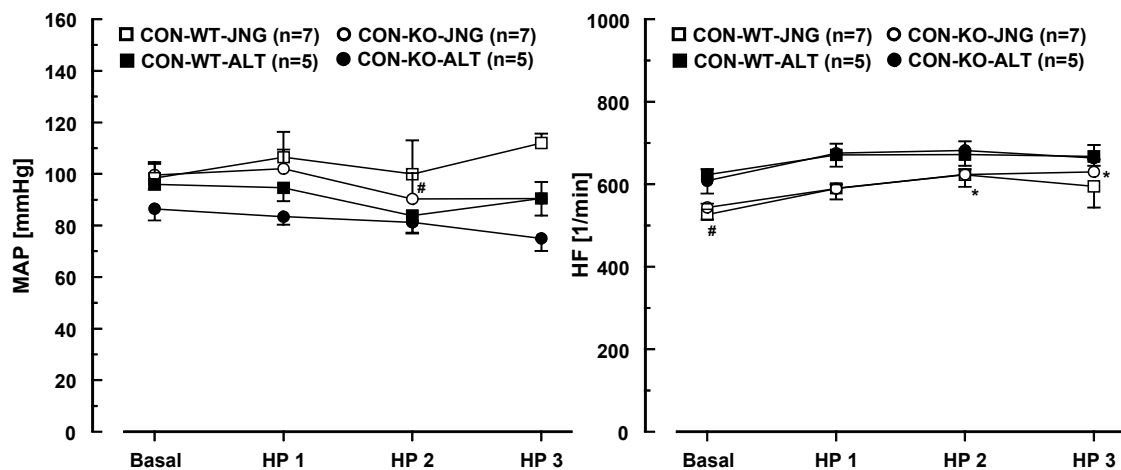


Abbildung 23: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) und Herzfrequenz (HF) aller Versuchsgruppen im Clearanceversuch. Vergleich zwischen Dopamin D₃ Knockout (KO) und Wildtyp (WT) sowie Auswirkungen des Alters der unterschiedlichen Versuchsgruppe.

Alle Werte sind Mittelwerte \pm SEM

* $p < 0,05$ vs Basalperiode; # $p < 0,05$ vs CON-WT-JNG

^ $p < 0,05$ vs CON-KO-JNG; ° $p < 0,05$ vs CON-WT-ALT

3.2.2.4 Natrium -und Kaliumkonzentration im Plasma

Während der gesamten Versuchsdauer zeigten sich konstante Werte sowohl der Natrium- als auch der Kaliumkonzentration im Plasma bei allen Versuchstieren. Die Werte der Natriumkonzentration im Plasma lagen hierbei im Mittel zwischen $144,3 \pm 1,3$ und $149,6 \pm 1,6$ mmol/l und die der Kaliumkonzentration zwischen $4,34 \pm 0,32$ und $5,58 \pm 0,59$ mmol/l. Es konnten also weder Effekte durch die Angiotensin II Gabe noch durch das Alter der Tiere gezeigt werden. Desweiteren konnten auch keine Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockouttieren festgestellt werden (Siehe auch Tabelle 13 und 14).

4. DISKUSSION

Im Folgenden soll zuerst auf die Diskussion wichtiger Grundlagen bzw. verwendeter Methoden eingegangen werden um dann den Hauptteil der Diskussion den tierexperimentellen Ergebnissen zu widmen. Hauptsächlich wird hierbei drei Aspekten Rechnung getragen, welche sich mit der Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors am Knockout Mausmodell beschäftigt: Zum einen dem Einfluss des Dopamin D₃ Rezeptors auf die Progredienz der diabetischen Nephropathie bzw. der diabetischen Hyperfiltration, zum zweiten der Assoziation des Dopamin D₃ Rezeptors mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und schliesslich dessen Interaktion mit dem AT₁ Rezeptor.

4.1 Diskussion der Methoden

4.1.1 Das Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mausmodell

Genmanipulierte Tiere, wie z.B. die in vorliegender Arbeit verwendeten Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmäuse, spielen heutzutage in der klinischen Forschung eine wichtige Rolle. Knockoutmodelle bieten eine Möglichkeit pathophysiologische Vorgänge des Organismus zu untersuchen bzw. näher zu verstehen und somit mögliche Ansatzpunkte für eine pharmakologische Intervention zu finden um dann neue Therapien zu entwickeln. Das Knockoutmodell bietet die Möglichkeit, Zusatzeffekte, die eventuell bei der pharmakologischen Inhibition des jeweiligen Rezeptors eine Rolle spielen, auszuschalten. Weiterhin liegt die Problematik der pharmakologischen Inhibition in der Rezeptorselektivität, welche in vivo Probleme bereiten kann. Anders beim Knockoutmodell, hier kann gezielt nur ein bestimmter Rezeptor ausgeschaltet werden. Gleichwohl ist zu bemerken, dass im Knockoutmodell Kompensationen durch nicht beeinflusste Systeme stattfinden können, und so funktionelle Veränderungen eventuell nicht zu beobachten sind.

Wie bereits in Kap. 2.2 näher erläutert, erfolgte die Generierung der Dopamin D₃ Rezeptor Knockout (KO) Mäuse durch die Fa. Abbott GmbH & Co. KG in Ludwigshafen. Hierbei gelang die zielgerichtete genetische Veränderung des Dopamin D₃ Rezeptorgens mittels homologer Rekombination. Die Durchführung der Experimente erfolgte ausschließlich an homozygoten, männlichen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und entsprechenden Wildtypmäusen. Die in einem anderen Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmodell beobachtete leichte Hyperaktivität der genmanipulierten Tiere (Accili et al. 1996) konnte bei den in vorliegender Arbeit verwendeten Tieren nicht bestätigt werden.

Wird bei der Durchführung von Experimenten die Maus als Versuchstier gewählt, müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden, die für die Auswertung der Ergebnisse von entscheidender Bedeutung sind. Zum einen sollte beachtet werden, dass es zum Teil deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Mausstämmen bezüglich hämodynamischer und systemischer Parameter gibt (Schlager 1966, Schlager 1968, Hackbarth und Harrison 1982b), auf welche in Kap. 4.2.1 näher eingegangen wird. Zum anderen sollte auch der zirkadiane Schlaf-Wach-Rhythmus der Tiere berücksichtigt werden, wobei die nachtaktiven Tiere in der Nacht unter anderem eine deutlich erhöhte Urinelektrolytexkretion aufweisen als tagsüber (Cambar et al. 1981). Auf Grund dieser Umstände wurden die Tiere in vorliegender Arbeit unter standardisierten Bedingungen gehalten. Somit waren die Mäuse einem 12-stündigen Tag-Nacht-Zyklus mit stets konstanter Temperatur und Luftfeuchtigkeit ausgesetzt. Desweiteren wurden die Tiere sowohl bei den Stoffwechsellkäfigexperimenten als auch bei den mittels Schwanzvenenplethysmographie durchgeführten Blutdruckmessungen vor den eigentlichen Messungen an die jeweiligen Versuchsbedingungen gewöhnt, um aussagekräftige, reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten.

4.1.2 Diabetes mellitus Induktion mittels Streptozotozin (STZ)

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Diabetes mellitus Induktion bei Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtypmäusen durch das aus Streptomyces achromogenes gewonnene Antibiotikum Streptozotocin (STZ) (siehe Kap. 2.3). Der so induzierte experimentelle Diabetes mellitus entspricht weitestgehend einem Diabetes mellitus Typ 1 des Menschen (IDDM). Schon vor mehreren Jahrzehnten konnte im Rattenmodell und auch bei Hunden gezeigt werden, dass durch die i.v. Applikation von STZ eine diabetogene Stoffwechsellage hervorgerufen werden kann (Ratieken et al. 1963). Der Wirkungsmechanismus des STZ besteht in der selektiven Zerstörung der β -Zellen der Pankreasinselzellen ohne dabei jedoch selbst nephrotoxisch zu wirken (Junod et al. 1967). Bereits 7-10 Stunden nach erfolgter Applikation beobachtete man eine massive Degranulierung und Nekrotisierung der β -Zellen, welche mit einem initialen Anstieg des Insulinspiegels und einer Hypoglykämie assoziiert war. Im Anschluss daran zeigte sich eine deutliche Hyperglykämie mit einem Abfall des Insulinspiegels unter 5% des Normalwertes. Die beschriebenen Auswirkungen auf das Pankreasgewebe und der somit hervorgerufenen diabetogenen Stoffwechsellage durch das STZ sind dosisabhängig (Junod et al. 1969, Tomlinson et al. 1992), wobei die Dosen je nach Spezies hierbei stark variieren. Bei Ratten benötigt man so eine Dosis von etwa 60 mg/kg Körpergewicht (KG) um eine diabetogene Stoffwechsellage hervorzurufen. Bei einer Applikation von 100 mg/kg KG hingegen versterben die Tiere schon nach 2-3 Tagen. Im Mausmodell zeigte sich in einer Studie von Ito et al. (1999), dass es nach einer einmaligen intraperitonealen Injektion von 100 mg/kg KG zu einem kontinuierlichen Anstieg der Plasmaglukosekonzentration über neun Wochen kam. Eine Insulinsubstitution war hierbei noch nicht erforderlich. Eine vollständige Zerstörung der β -Zellen des Pankreas und eine daraus resultierende komplett sistierende Insulinproduktion konnte bei einer Injektionsdosis von 200 mg/kg KG beobachtet werden.

Es werden verschiedene Applikationsmodi diskutiert, so besteht die Möglichkeit zwischen der einmaligen und der fraktionierten STZ-Gabe. In vorliegender

Arbeit wurde den Tieren eine tägliche STZ Dosis von 80 mg/kg KG appliziert. Hierbei erfolgte die fraktionierte i.p. Injektion von STZ bis der Blutglukosespiegel mindestens 200 mg/dl erreicht hatte, jedoch wurden den Tieren höchstens 8 Dosen verabreicht (Bellush et al. 1999). Während der kompletten Versuchsdauer wurde auf Insulingaben gänzlich verzichtet. Neben den signifikant erhöhten Blutglukosewerten von 500-600mg/dl der diabetischen Tiere gegenüber denen der nicht diabetischen Kontrolltiere, zeigten sich auch die für den Diabetes mellitus typischen klinischen Veränderungen. Es konnte somit ein deutlicher Gewichtsverlust, Polydipsie und Polyurie verzeichnet werden (siehe Kap. 3.1, Tab. 2-5). Auch in anderen Studien, die am STZ-induzierten Diabetes mellitus Modell Experimente durchführten, konnte oben genannte Symptomatik beobachtet werden (O'Donnell et al. 1988, Bellush et al. 1999, Tomlinson et al. 1992).

Die Methode der fraktionierten STZ Applikation wurde gewählt um möglichen Blutglukosespitzen, die des öfteren bei der Einmalgabe zu verzeichnen waren, entgegen zu wirken und einen möglichst konstanten Blutglukosewert im hyperglykämischen Bereich zu erreichen. Entgegen den in der Studie von Bellush et al. (1999) beschriebenen konstanten Blutzuckerwerten, stieg der Blutglukosewert in vorliegender Arbeit trotz identischer Applikationsform des STZ bei den einzelnen Versuchstieren unterschiedlich schnell an. Hierdurch war initial eine sehr hohe Schwankungsbreite der Blutglukosewerte zu verzeichnen, welche in weiteren Studien möglicherweise verhindert werden kann, wenn auf eine tägliche STZ Applikation verzichtet würde. Stattdessen könnte es von Vorteil sein, abzuwarten, ob sich die gewünschte hyperglykämische Stoffwechsellage mit BZ-Werten von über 200 mg/dl möglicherweise mit zeitlicher Verzögerung einstellt, um dann bei Nichterreichen der Schwelle erst jeden zweiten Tag eine wiederholte STZ-Gabe vorzunehmen. Bei der STZ-Wirkung scheint es einen direkten toxischen Effekt auf die β -Zellen des Pankreas zu geben. Daran schließt sich eine immunologische Reaktion an, die durch die mehrmalige STZ-Applikation ausgelöst werden kann. Hierbei entstehen Antikörper, die die β -Zellen zerstören. Dieser Mechanismus könnte

die in unserem Versuchsmodell hohe Variabilität der Blutzuckerwerte sowie den teilweise beobachteten verzögerten Wirkungseintritt des STZ erklären.

4.1.3 Blutdruckmessung mit Hilfe der Schwanzvenenplethysmographie

Bei der Blutdruckregulation spielen eine Vielzahl externer und interner Faktoren eine Rolle, weshalb der Blutdruck einer großen Schwankungsbreite unterliegt. Bei den Blutdruckmessungen mittels der Schwanzvenenplethysmographie (siehe Kap. 2.4.2) kann so v.a. den physiologischen zirkadianen Blutdruckschwankungen sowie dem Stress während des Experiments eine tragende Rolle zugeschrieben werden. Um diesen Faktoren entgegen zu wirken, wurde u.a. durch eine zweiwöchige Eingewöhnungsphase der Tiere und Messungen zur stets gleichen Tageszeit (siehe Kap. 2.4.2.3) versucht, diese Einflüsse möglichst gering zu halten. Wobei die intravasale Blutdruckmessung am narkotisierten Versuchstier, wie auch in der Arbeit von Asico et al. (1998) durchgeführt, eine Methode ist, welche zwar eine relativ genaue Aussage über den Blutdruckwert zulässt, den Einfluss des Narkotikums aber auf die Blutdruckregulation nur schwer einschätzbar und schlecht kontrollierbar macht (Meneton et al. 2000, Janssen et al. 2004). Deshalb wurden die Messungen in vorliegender Arbeit an wachen Tieren durchgeführt, um einen möglichen Einfluss eines Narkotikums auf die Blutdruckregulation zu verhindern. Eine weitere Möglichkeit der Blutdruckdetektion besteht in der Implantation eines Sensors zur telemetrischen Messung, wobei jedoch auch hier den Tieren postoperativ eine gewisse Erholungsphase eingeräumt werden muss um verlässliche Blutdruckwerte zu erhalten. Der Vorteil der telemetrischen Blutdruckbestimmung gegenüber der der Schwanzvenenplethysmographie liegt in der exakteren und kontinuierlichen Blutdruckaufzeichnung und der Möglichkeit Stress während der eigentlichen Blutdruckmessung zu verhindern. Zudem kann bei dieser Methode auf eine Trainings- bzw. Eingewöhnungsphase der Tiere verzichtet werden, welche bei der nichtinvasiven Methode der Schwanzvenenplethysmographie von Nöten ist (Meneton et al. 2000).

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Dopamin D₃ Rezeptor und diabetische Nephropathie/Hyperfiltration

In der Frühphase der diabetischen Nephropathie (siehe Kap. 1.2.3, Tab. 1), dem sogenannten „Hypertrophie-Hyperfunktionsstadium“, meist vorherrschend bei Diagnosestellung eines Diabetes mellitus, kommt es zu einer gestörten renalen Hämodynamik und in Folge dessen zu hypertrophen Nieren und einer Steigerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR). In diesem ersten Abschnitt soll nun das Augenmerk auf die diabetische, glomeruläre Hyperfiltration gelegt werden, welche nach Meinung vieler Autoren, neben dem Auftreten einer Mikroalbuminurie, für die Progression der diabetischen Nephropathie mitentscheidend ist (Mogensen und Christensen 1984, Mogensen 1986). Carney et al. (1979) konnte schon wenige Tage nach STZ Injektion einen deutlichen Anstieg der GFR um das eineinhalbfache beobachten. Auch andere Autoren konnten sowohl bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ-1 als auch Typ-2 eine glomeruläre Hyperfiltration beobachten (Jones et al. 1995). Der Pathomechanismus, welcher zur Diabetes bedingten glomerulären Hyperfiltration führt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. Die Vermutung, dass das dopaminerge System an der Entwicklung der diabetischen Nephropathie und somit der glomerulären Hyperfiltration beteiligt ist, ist die Grundlage umfassender Forschungsergebnisse. Dies stellt jedoch nur einen möglichen Pathomechanismus dar, der neben einer Vielzahl anderer möglicher Mechanismen diskutiert wird.

Wie bereits in Kap. 1.3.4.1 beschrieben, konnte in verschiedenen Studien sowohl ein Einfluss der Rezeptoren der D₂ Unterfamilie als auch des Dopamin D₁ Rezeptors auf die diabetische Hyperfiltration nachgewiesen werden. Da jedoch die Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors in vorliegender Arbeit im Vordergrund steht, soll nun vornehmlich dessen Bedeutung bezüglich der Progredienz der diabetischen Nephropathie näher betrachtet werden.

Schon seit mehreren Jahrzehnten ist bekannt, dass durch Aminosäureinfusion eine Hyperfiltration mit nachfolgender Diurese und Natriurese induziert werden

kann. Dieses Phänomen konnte bei verschiedenen Spezies beobachtet werden, so gelang der Nachweis bei Hunden (Shannon et al. 1932), Ratten (Meyer et al. 1983) und schliesslich auch beim Menschen (Castellino et al. 1986, Luippold et al. 2001b). In der eigenen Arbeitsgruppe wurde dann die aminosäurebedingte glomeruläre Hyperfiltration anhand von Clearance-experimenten am Dopamin D₃ Rezeptor Knockout-Mausmodell nachvollzogen. Hierbei konnte bei den Wildtyptieren nach Applikation einer 10%-igen Aminosäurelösung eine signifikante Steigerung der GFR beobachtet werden. Die entsprechenden Knockouttiere hingegen zeigten eine konstante GFR während der gesamten Versuchsdauer (Pech 2003, Luippold et al. 2006). Wie in der Einleitung (Kap. 1.3.4.1) bereits dargelegt, spielt das dopaminerge System für die aminosäurebedingte Hyperfiltration und die diabetische Nephropathie eine wichtige Rolle. Beispielsweise konnte durch die pharmakologische Stimulation mittels Quinpirol, einem D₂ ähnlichen Agonisten, eine deutliche Steigerung der GFR hervorgerufen werden, welche mit der aminosäurebedingten Hyperfiltration vergleichbar war (Luippold et al. 1998). Dieser Effekt konnte sowohl durch die Gabe von Domperidon, einem D₂ ähnlichen Rezeptorantagonisten als auch durch die Applikation von S(-)-Sulpirid aufgehoben werden. In weiteren Untersuchungen an Ratten konnte durch die Gabe eines selektiven Dopamin D₃ Rezeptor Agonisten (7-OH-DPAT) eine dosisabhängige Steigerung der GFR beobachtet werden, welche durch die Vorbehandlung des selektiven Dopamin D₃ Rezeptorantagonisten U-99194A vollständig aufgehoben werden konnte (Luippold et al. 1998). In der eigenen Arbeitsgruppe konnte desweiteren gezeigt werden, dass sowohl die D₂ ähnliche Rezeptorblockade (Luippold et al. 2001a) als auch die Verabreichung des selektiven D₃ Rezeptorantagonisten BSF 135170 (Luippold et al. 2005) eine nahezu vollständige Normalisierung der diabetischen Hyperfiltration bewirkte. Bezüglich der Beteiligung des Dopamin D₁ Rezeptors an der Vermittlung der diabetischen Hyperfiltration gelang Barthelmebs et al. (1991) der Nachweis, dass durch die Stimulation der Dopaminrezeptoren mittels Dopaminvorstufen (L-Dopa und Gludopa) und des selektiven D₁ Agonisten Fenoldopam die diabetische Hyperfiltration gehemmt werden kann. Da all diese Beobachtungen

eine Beteiligung des dopaminergen Systems bzw. des Dopamin D₃ Rezeptors an der renalen Hämodynamik nahe legen, sollten in vorliegender Arbeit nun diesbezüglich weitere Untersuchungen anhand von Clearanceexperimenten und Stoffwechselläufigversuchen durchgeführt werden. Die Clearanceexperimente zeigten nach Diabetesinduktion in beiden diabetischen Gruppen, d.h. sowohl in der diabetischen Wildtyp (DM-WT)- als auch in der diabetischen Knockoutgruppe (DM-KO) gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren (CON-WT und CON-KO) erwartungsgemäß eine signifikant erhöhte glomeruläre Filtrationsrate (siehe Tab. 9). Entgegen den bereits erwähnten Studien konnte jedoch hier kein signifikanter Unterschied zwischen der DM-KO und der DM-WT Gruppe festgestellt werden. Dies deutet darauf hin, dass in verwendetem Mausmodell der Dopamin D₃ Rezeptor für die diabetische Hyperfiltration keine Rolle zu spielen scheint.

Dieses Ergebnis widerspricht einer anderen Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe (Tappe 2003), die ebenfalls am Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmausmodell durchgeführt wurde. Hier konnte gezeigt werden, dass die diabetische Hyperfiltration bei den diabetischen Dopamin D₃ defizienten Mäusen (DM-KO) signifikant geringer ausgeprägt war als bei den entsprechenden Wildtyptieren (DM-WT). In der DM-WT Gruppe konnte hierbei ein 75%-iger Anstieg der GFR gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe verzeichnet werden, wohingegen in der DM-KO Gruppe nur ein 25%-iger Anstieg beobachtet wurde. Andererseits liegen auch Daten vor, die die Ergebnisse vorliegender Arbeit untermauern. So konnte zum einen in einer Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe (Weber 2004), wiederum mit gleichem Versuchsdesign, kein Unterschied bezüglich der Diabetes mellitus bedingten glomerulären Hyperfiltration zwischen DM-KO und DM-WT Tieren nachgewiesen werden. Zum anderen zeigte sich in einer weiteren Arbeit (Kuohn 2005) am Modell eines STZ-induzierten Diabetes mellitus bei Sprague-Dawley-Ratten erneut, dass es weder durch die pharmakologische Inhibition mittels des Dopamin D₃ Rezeptorantagonisten (BSF 201640), noch durch die Applikation eines ACE-Hemmers (Trandolapril) zu einer Verminderung bzw. Normalisierung der diabetischen Hyperfiltration kam.

Die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gegenüber denen früherer Arbeiten (Tappe 2003), welche einen Unterschied zwischen DM-KO und DM-WT Tieren beobachten konnten, liegt unter Umständen in der Verwendung unterschiedlicher Mausstämmen begründet. So wurden unsere Experimente ausschließlich an homozygoten, männlichen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und entsprechenden Wildtypmäusen durchgeführt, wohingegen in oben genannter Arbeit von Tappe (2003) männliche Mäuse des Stammes C57/BL6 als nichtdiabetische Kontrolltiere dienten. Ein unterschiedliches Hyperfiltrationsverhalten konnte bei diesen Mausstämmen in Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe bereits beobachtet werden. Wie bereits in Kap. 4.1.1 erwähnt, sollte somit bei der Verwendung von Mäusen als Versuchstiere stets beachtet werden, dass zwischen den einzelnen Mausstämmen oftmals erhebliche Unterschiede bezüglich der renalen Hämodynamik vorzufinden sind. Verschiedene Studien konnten eine Differenz des Nierengewichts, des Nierenindex (Nierengewicht in Relation zum Körpergewicht) und des mittleren arteriellen Blutdrucks bei verschiedenen Mausstämmen zeigen (Schlager 1966, Schlager 1968, Hackbarth und Harrison 1982b). So ergab eine Studie von Hackbarth et al. (1981 und 1982a), welche an 24 unterschiedlichen Mausstämmen bezüglich verschiedener renaler Funktionsparameter durchgeführt wurde, dass das Urinvolumen, die Natrium- und Kaliumexkretion und die Osmolalität sich zwischen den einzelnen Stämmen zum Teil um den Faktor 6-10 unterscheiden. Der Grund hierfür wird den unterschiedlichen Nahrungsgewohnheiten und der Struktur bzw. Funktion der Niere zugeschrieben. In einer weiteren Studie, welche sich mit Mausmodellen der diabetischen Nephropathie beschäftigte, konnten bestimmte Stämme identifiziert werden, die eher zur Ausbildung einer Glomerulosklerose neigen als andere (z.B. C57BL/6), welche relativ resistent gegenüber renalen Schäden erscheinen (Breyer et al. 2005). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass funktionelle Experimente möglichst an verschiedenen Mausstämmen mit den korrespondierenden Wildtyptieren durchgeführt werden sollten, um zuverlässige, vergleichbare Daten zu erhalten (Meneton et al. 2000). Ein weiterer Aspekt, welcher einen Einfluss auf die renale Hämodynamik haben

könnte, stellt das Alter der Versuchstiere dar, worauf jedoch in Kap. 4.2.3 näher Bezug genommen wird.

Ein weiterer wichtiger Parameter der diabetischen Nephropathie ist die Albuminurie. Wie bereits mehrfach erwähnt, gilt die Albuminurie als ein wichtiger prädiktiver Parameter für die Progredienz der diabetischen Nephropathie (Mogensen und Christensen 1984, Ibrahim und Vora 1999). Es gibt verschiedene Theorien, welche die Entstehung der Diabetes mellitus bedingten Albuminurie erklären. Zum einen könnte es durch die vorherrschende Hyperglykämie zu einer Glukoseeinlagerung in verschiedene Membranen, wie z.B. die des Glomerulums kommen, was wiederum zu einer Schädigung der Endothelzellen, der Basalmembran und der Podozyten mit nachfolgender Funktionsbeeinträchtigung und Albuminurie führen könnte (Verbeke et al. 1997). Zum anderen könnte der erhöhte Perfusionsdruck der Niere verantwortlich sein, wodurch es nach und nach zu einem Verlust der glomerulären Filterfunktion kommt, was zu einer erhöhten Durchlässigkeit der Basalmembran für Proteine führen könnte (Keane und Shapiro 1990).

Bezüglich einer Albuminurie zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, dass in den durchgeführten Langzeitstoffwechselläufigexperimenten (STWK) schon nach kurzer Zeit ein signifikanter Anstieg der Albuminexkretion beider diabetischer Gruppen (DM-KO und DM-WT) im Vergleich zu den entsprechenden Kontrollgruppen (CON-KO und CON-WT) auftrat (siehe Tab. 2-5). Eine Reduktion der Albuminexkretion der DM-KO Tiere im Vergleich zur DM-WT Gruppe konnte jedoch nicht beobachtet werden. Unsere Arbeitshypothese, welche einen Einfluss des Dopamin D₃ Rezeptors auf die Progredienz der diabetischen Nephropathie und somit der Albuminausscheidung annahm, konnte somit in dem verwendeten Mausmodell nicht bestätigt werden. Bezüglich der Proteinausscheidung, welche eine ausgeprägte Nephropathie beschreibt, konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den vier verschiedenen Versuchsgruppen gefunden werden. Dies lässt auf ein frühes

Stadium der diabetischen Nephropathie im verwendeten Mausmodell schliessen.

Diese Ergebnisse stehen denen anderer Arbeiten gegenüber, welche bereits in Kap. 1.3.4.1 näher beschrieben wurden. Hierbei konnte die pharmakologische Inhibition des D₃ Rezeptors sowohl im Rattenmodell des Diabetes mellitus Typ II (Gross et al. 2006) als auch im STZ-induzierten Diabetes mellitus Modell (unveröffentlichte Daten der eigenen Arbeitsgruppe) einen Zusammenhang des Dopamin D₃ Rezeptors mit der diabetischen Nephropathie darstellen. Es zeigte sich sowohl nach Applikation eines ACE-Hemmers (Trandolapril) als auch nach Gabe eines selektiven, zentral und peripher wirkenden Dopamin D₃ Rezeptorantagonisten (BSF 201640) eine signifikante Verminderung der renalen Albuminexkretion bei diabetischen Ratten im Vergleich zu den entsprechenden nicht behandelten Kontrolltieren. Zudem konnte in der Arbeit von Gross et al. (2006) bei den mit BSF 201640 behandelten Tieren in ähnlichem Ausmaß wie bei denen mit Trandolapril behandelten Tieren, eine Verminderung Diabetes-bedingter histologischer Veränderungen der Niere beobachtet werden.

Die möglichen Gründe, weshalb in vorliegender Arbeit gegenüber oben genannter Studienergebnisse kein Unterschied zwischen DM-KO und DM-WT bezüglich der Albuminexkretion gezeigt werden konnte, liegt möglicherweise an der Verwendung unterschiedlicher Versuchstiere und des unterschiedlichen Versuchsdesigns. In beiden erwähnten Studien dienten Ratten als Versuchstiere wohingegen unsere Versuche am Mausmodell durchgeführt wurden. Zudem erfolgte die Ausschaltung des Dopamin D₃ Rezeptors zum einen durch die pharmakologische Inhibition mittels BSF 201640 und zum anderen durch die zielgerichtete Veränderung des entsprechenden Gens (Knockoutmodell). Bei der pharmakologischen Inhibition könnten somit zusätzliche Effekte auf die renale Hämodynamik eine Rolle spielen, welche die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnten. Außerdem ist auch an Kompensationsmechanismen im Knockout-Modell zu denken. Möglicherweise können weitere Dopaminrezeptoren den Funktionsverlust im Dopamin D₃ Rezeptor KO-Modell kompensieren. Ein möglicher weiterer Aspekt stellt die Versuchsdauer dar, so

handelte es sich bei den am Rattenmodell durchgeführten Experimenten des STZ-induzierten Diabetes mellitus um eine Langzeitstudie von 46 Wochen, wobei die Untersuchungen in vorliegender Arbeit lediglich 16 Wochen andauerten. Möglicherweise hätte die Versuchsdauer somit eventuell verlängert werden müssen, um die Effekte des ausgeschalteten Dopamin D₃ Rezeptors zu sehen. Da jedoch in unserem Versuchsaufbau komplett auf eine Insulinapplikation verzichtet wurde, konnte die Versuchsdauer auf Grund des geschwächten Allgemeinzustandes der diabetischen Tiere nicht verlängert werden. Auf eine Insulinapplikation wurde im Vergleich zu oben genannter Langzeitstudie, in welcher die Tiere während der gesamten Versuchsdauer eine Insulinbehandlung erhielten, verzichtet. Hierdurch sollte der durch die Insulingabe hervorgerufene Einfluss auf die renale Hämodynamik verhindert werden. Verschiedene Studien zeigen, dass es durch eine Insulintherapie u.a. zu einem Rückgang der Urinausscheidung, Normalisierung der Elektrolyt-ausscheidung, einem signifikanten Rückgang der Glukoseausscheidung sowie einer Verhinderung der Entwicklung einer diabetischen Hyperfiltration kommt (Weber 2004). Diesbezüglich ist die Datenlage jedoch kontrovers, auf der einen Seite konnte durch die Insulinapplikation kein Einfluss auf die GFR und RPF verzeichnet werden (Michels et al. 1981), wohingegen eine andere Studie von Jensen et al. (1987) eine Reduktion der diabetischen Hyperfiltration durch eine Insulintherapie beschreibt. Auch ein Einfluss der Insulinapplikation auf renale morphologische Veränderungen konnte beobachtet werden (Rasch und Dorup 1997). Am Rattenmodell zeigte sich hierbei, dass der Blutglukosespiegel mit der Nierengröße korreliert.

Im dritten Abschnitt soll auf die Diabetes mellitus-bedingten morphologischen und morphometrischen Veränderungen der Nieren eingegangen werden. Bei Ratten konnte schon innerhalb der ersten 4 bis 5 Tage nach Induktion eines Diabetes mellitus eine Nierengewichtszunahme und eine glomeruläre Hypertrophie beobachtet werden. Die renale Hypertrophie steht hierbei in Zusammenhang mit der Schwere des Diabetes mellitus, wobei wiederum die Nierenwachstumsrate eng mit dem Blutglukosespiegel in Verbindung steht

(Seyer-Hansen 1983). In einer Humanstudie an Diabetes mellitus Typ I leidenden Patienten konnte gezeigt werden, dass die Nierengröße einen morphologischen Marker für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie und einer daraus resultierenden terminalen Niereninsuffizienz darstellt. Hierbei gelang der Nachweis, dass die Prognose von Patienten mit vergrößerten Nieren erheblich schlechter ist als bei den Patienten, die noch eine normale Nierengröße aufweisen (Baumgartl et al. 1998).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Entnahme der Nieren nach Beendigung der Langzeitstoffwechselfäfigexperimente zur morphologischen und morphometrischen Untersuchung. Die Nierenindices (Nierengewicht in Relation zum Körpergewicht) wiesen bei beiden diabetischen Gruppen signifikant erhöhte Werte im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren auf (siehe Tab. 6), wobei zwischen den DM-KO und DM-WT Tieren kein Unterschied verzeichnet werden konnte. Ein Einfluss des renalen Dopamin D₃ Rezeptors konnte somit nicht nachgewiesen werden.

Wie bereits erwähnt, kommt es durch die Diabetes mellitus bedingte renale Drucksteigerung zu einer glomerulären Hypertrophie, welche durch die morphometrischen Untersuchungen auch in vorliegendem Versuchsmodell nachvollzogen werden sollte. Tendenziell zeigte sich hierbei eine glomeruläre Größenzunahme bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrolltieren (siehe Tab. 8). Dieses Ergebnis deckt sich mit denen einiger früherer Arbeiten, welche zeigen konnten, dass die renale Hypertrophie zu den frühen Veränderungen der diabetischen Nephropathie zählt. Wie bereits eingangs erwähnt konnte am Rattenmodell gezeigt werden, dass es schon wenige Tage nach Induktion eines experimentellen Diabetes mellitus zu einer Nierengewichtszunahme um 15-20% kam, welche vor allem der glomerulären Hypertrophie zugeschrieben wird (Seyer-Hansen 1983). Auch andere Studien konnten diesen Sachverhalt bestätigen, welche in der Frühphase des Diabetes mellitus eine Vergrößerung des glomerulären Volumens beobachteten (Österby et al. 1980, Beilharz 2000).

Der genaue Pathomechanismus, der zur Entstehung einer renalen Hypertrophie führt, ist jedoch noch nicht vollständig geklärt. So gibt es diesbezüglich unterschiedliche Hypothesen. Neben der bereits erwähnten Diabetes mellitus-bedingten renalen Drucksteigerung wird die glomeruläre Hypertrophie auch dem Einfluss von Wachstumsfaktoren, vor allem dem des transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) zugeschrieben. Dieser soll nach Meinung einiger Autoren an der Entstehung wichtiger Frühsymptome der diabetischen Nephropathie beteiligt sein (Ziyadeh et al. 1995, Sharma et al. 1995, Rabkin et al. 1996). Shankland et al. (1994) konnten somit schon zwei Wochen nach Diabetes mellitus Induktion eine doppelte TGF- β 1 Rate im Nierengewebe beobachten. Unter dem Einfluss von TGF- β 1 kommt es durch die Stimulation der Kollagenbiosynthese unter anderem zu glomerulärer und tubulärer Hypertrophie, einer Verbreiterung der Basalmembran und des Mesangiums bis hin zur fibrotischen Umwandlung renalen Gewebes. In der Behandlung mit einem anti-TGF- β -Antikörper zeigte sich somit ein protektiver Nutzen bezüglich Diabetes bedingter morphometrischer renaler Veränderungen (Sharma et al. 1995). Die Pathogenese der TGF- β 1 Erhöhung bei Diabetes mellitus wird hierbei der hyperglykämischen Stoffwechsellage und einer daraus resultierenden Stimulation der Proteinkinase C und Diacylglycerin zugeschrieben, welche wiederum zu einer vermehrten TGF Freisetzung führen (Koya 1997).

Bezüglich der morphologischen Untersuchungen zeigten sich in vorliegender Arbeit keine Unterschiede zwischen allen vier Versuchsgruppen (CON-KO, CON-WT, DM-KO, DM-WT) (siehe Tab. 6), was wiederum, wie für die renale Proteinurie beschrieben, auf ein frühes Stadium der diabetischen Nephropathie schliessen lässt.

4.2.2 Dopamin D₃ Rezeptor und arterielle Hypertonie

Wie bereits erwähnt, unterliegt die Blutdruckregulation einer Vielzahl an endogenen und exogenen Faktoren, wobei der Niere hierbei ein entscheidender Einfluss zugeschrieben wird. Zudem wird auf Grund verschiedener Studien eine Beteiligung des dopaminergen Systems an der Regulation des Blutdrucks und somit an der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie angenommen (siehe Kap. 1.3.4.2). Da sich die vorliegende Arbeit speziell mit der Funktion des Dopamin D₃ Rezeptors beschäftigt, soll nun dessen Bedeutung für die Entstehung einer arteriellen Hypertonie näher betrachtet werden.

In einer viel zitierten Studie von Asico et al. (1998) konnte am Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmausmodell gezeigt werden, dass die Ausschaltung des Dopamin D₃ Rezeptors zur Entwicklung einer arteriellen Hypertonie beitragen kann. Er beobachtete hierbei einen Anstieg sowohl des systolischen als auch des diastolischen Blutdrucks um ca. 20 mmHg bei den Dopamin D₃ Rezeptor defizienten Tieren im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren. Hierbei konnte sowohl bei den heterozygoten als auch bei den homozygoten Dopamin D₃ Rezeptor Knockouttieren ein Blutdruckanstieg verzeichnet werden. Eine akute Salzbelastung führte bei den Wildtyp- und heterozygoten Tieren zu einer erhöhten Urinflussrate und einer Zunahme der Natriumexkretion, wohingegen diese Steigerung bei den D₃ defizienten Tieren deutlich schwächer ausgeprägt war. Entsprechend des Blutdruckverhaltens konnten bei den Knockouttieren auch bezüglich der Plasmareninaktivität erhöhte Werte im Vergleich zu den entsprechenden Wildtyptieren festgestellt werden.

In einer weiteren Studie der eigenen Arbeitsgruppe (Luippold et al. 2001c) konnte ebenfalls ein Zusammenhang des Dopamin D₃ Rezeptors mit der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie beobachtet werden. Anhand von Clearanceexperimenten an narkotisierten salz-sensitiven (DS) und salz-resistenten (DR) Dahl-Ratten sollte die Rolle des Dopamin D₃ Rezeptors bezüglich der Entstehung eines salz-abhängigen Hypertonus untersucht werden. Sowohl bei Normalsalz- als auch bei Hochsalzdiät wiesen die DS Tiere

erwartungsgemäß hypertensive Blutdruckwerte auf, wohingegen der Blutdruck der DR Tiere weiterhin im normotensiven Bereich lag. Durch die pharmakologische Stimulation des Dopamin D₃ Rezeptors mittels 7-OH-DPAT konnte bei den DR Ratten eine Steigerung der GFR und Natriurese beobachtet werden. Bei den DS Tieren hingegen zeigte sich kein Anstieg der GFR, jedoch konnte bei den Tieren auf Normalsalzdiät eine Natriurese verzeichnet werden. In einem weiteren Versuch mit den selben Tieren, wurden die DR Tiere 29 Tage lang mit einem selektiven Dopamin D₃ Rezeptorantagonisten (BSF 135170) behandelt. Konnte bei den DR Ratten unter Normalsalzdiät hierbei kein Anstieg des Blutdrucks beobachtet werden, zeigte sich unter Hochsalzdiät ein signifikanter Blutdruckanstieg von nahezu 40 mmHg. Zusammengefasst legen diese Untersuchungen den Verdacht nahe, dass die Defizienz des Dopamin D₃ Rezeptors einen wichtigen pathophysiologischen Faktor in der Entwicklung eines salzabhängigen Hypertonus darstellt.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese Ergebnisse sowohl an wachen als auch an narkotisierten Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmäusen überprüft. Insgesamt konnten jedoch weder im narkotisierten Zustand während der Clearanceexperimente, noch im wachen Zustand signifikante Blutdruckunterschiede zwischen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und korrespondierenden Wildtyptieren nachgewiesen werden (siehe Tab. 2-5; 10 und 13).

Die unterschiedlichen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gegenüber denen von v.a. Asico et al. (1998), welcher ein unterschiedliches Blutdruckverhalten zwischen Knockout (KO)- und Wildtyp (WT)-Tieren beobachten konnte, liegt möglicherweise in der unterschiedlichen Art der Generierung der Dopamin D₃ Rezeptor defizienten Mäuse begründet. Während bei den von Asico et al. (1998) verwendeten Knockouttieren das zweite Exon durch ein Neomycinresistenzgen ersetzt wurde (Park et al. 1995, Accili et al. 1996), wurde dieses bei den in vorliegender Arbeit verwendeten Versuchstieren hauptsächlich in das erste Exon eingefügt (siehe Kap.2.2). Obwohl es sich bei beiden verwendeten Versuchsmodellen um ein Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmausmodell handelte, konnten dennoch Verhaltensunterschiede der

jeweiligen Tiere beobachtet werden. Wie bereits in Kap. 4.1.1 erwähnt, konnte Accili et al. (1996) eine Hyperaktivität der genmanipulierten Tiere beobachten, an welchen auch die Blutdruckmessungen von Asico et al. vorgenommen wurden. In unserem Modell hingegen konnte die beschriebene Hyperaktivität der Knockouttiere nicht bestätigt werden.

Ein weiterer wichtiger Grund für die unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse ist der Einfluss des Narkotikums. Diesbezüglich konnte von Meneton et al. (2000) gezeigt werden, dass die Applikation eines Narkotikums sowie der intraoperative Stress zu einer Beeinflussung des Blutdrucks führen kann. Da bei der von Asico et al. verwendeten invasiven Methode der Blutdruckmessung eine Narkose (Pentobarbital 50 mg/kg i.v.) notwendig war, könnten hierin die unterschiedlichen Ergebnisse zu vorliegender Arbeit begründet liegen. Um den Einfluss der Narkose auf den Blutdruck untersuchen, erfolgten die Blutdruckmessungen in vorliegender Arbeit sowohl an wachen als auch an narkotisierten Tieren.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden bezüglich des Blutdruckverhaltens bei wachen Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmäusen und entsprechenden Wildtyptieren weitere Studien durchgeführt. So konnten in einer Studie mit gleichem Versuchdesign wie in vorliegender Arbeit ebenfalls keine signifikanten Unterschiede des Blutdruckverhaltens zwischen KO- und WT- Tieren festgestellt werden (Weber 2004). In einer weiteren Arbeit wurden wiederum Blutdruckmessungen an wachen sowohl jungen (3 Monate) als auch älteren (11 Monate) Dopamin D₃ Rezeptor KO- und WT-Mäusen mit unterschiedlicher Salzdiät durchgeführt. Hierbei konnten weder bei den auf Normalsalz-, noch bei den auf Hochsalzdiät befindlichen jungen Tieren signifikante Blutdruckunterschiede zwischen KO- und WT-Tieren beobachtet werden. Bei den älteren Tieren zeigte sich ein geringfügiger Blutdruckunterschied zwischen den beiden Genotypen, der jedoch das Signifikanzniveau nicht erreichte (Staudacher 2005, Staudacher et al. 2007).

4.2.3 Dopamin D₃ Rezeptor und AT₁ Rezeptor

Wie bereits erwähnt ist Angiotensin II (AT II), als ein Teil des Renin-Angiotensin-Systems (RAS), an einer Vielzahl von Regulationsmechanismen des Organismus beteiligt (siehe Kap. 1.3.4.3). Die vermehrte AT II Aktivität bzw. die Stimulation des AT₁ Rezeptors ist somit die Grundlage vieler sowohl renaler als auch kardiovaskulärer Erkrankungen. Der Einsatz von ACE-Hemmern und AT₁ Rezeptorantagonisten stellt sowohl bei der Behandlung einer arteriellen Hypertonie als auch bei der diabetischen Nephropathie eine wichtige Therapieoption dar. Es konnte gezeigt werden, dass diese Pharmaka einen renoprotektiven Effekt aufweisen, wodurch die Progredienz der diabetischen Nephropathie verlangsamt werden kann.

Neben des stark vasokonstriktorisches Effekts wird AT II auch ein entscheidender Einfluss auf die renale Natriumresorption zugeschrieben. Die durch AT II hervorgerufenen systemischen Effekte werden hierbei vornehmlich über die AT₁ Rezeptoren vermittelt, wobei auch AT₂ Rezeptoren existieren, deren Funktion jedoch noch nicht vollständig geklärt ist (Siragy und Bedigian 1999). Wird einerseits durch die Aktivierung des AT₁ Rezeptors die Natriumausscheidung vermindert und somit die tubuläre Natriumreabsorption gefördert, kommt es andererseits durch die Stimulation des AT₂ Rezeptors zum entgegengesetzten Effekt, einer Hemmung der Natriumresorption (Haithcock et al. 1999, Burns 2000).

Bezüglich der Interaktion des dopaminergen Systems mit dem AT₁ Rezeptor wurden verschiedene Studien durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass es durch die Behandlung mittels eines Dopamin D₂-ähnlichen Rezeptoragonisten (Bromocriptin) zu einer deutlichen Reduktion der AT₁ Rezeptoren in proximalen Tubuluszellen kommt, was wiederum zu einer Aufhebung der AT II vermittelten Stimulation der Na⁺-K⁺-ATPase führt (Hussain et al. 1998). Dieser Sachverhalt konnte in einer weiteren Studie bestätigt werden, welche zeigte, dass die Rezeptorkopplung von AT II sowohl durch Dopamin D₁ als auch D₂ ähnliche Rezeptoragonisten verhindert werden kann und dadurch die stimulierenden

Effekte des AT II auf die renale Natriumreabsorption antagonisiert werden können (Sheikh-Hamad et al. 1993). In einer weiteren Studie gelang der Nachweis, dass durch die Applikation eines Dopamin D₁ Rezeptoragonisten (Fenoldopam) die durch AT II hervorgerufene renale Vasokonstriktion gehemmt werden kann (Chatziantoniou et al. 1995).

Wie bereits in der Einleitung (Kap. 1.3.4.3) näher beschrieben, konnte auch ein direkter Zusammenhang zwischen dem Dopamin D₃ und dem AT₁ Rezeptor hergestellt werden. Zeng et al. (2003) zeigten, dass Dopamin D₃ Rezeptoren eine Downregulation der AT₁ Rezeptoren in proximalen Tubuluszellen bei normotensiven Wistar-Kyoto Ratten (WKY) bewirken. Es konnte zudem gezeigt werden, dass Angiotensin II, vermittelt durch AT₁ Rezeptoren, eine Abnahme der Dopamin D₃ Rezeptorexpression in proximalen Tubuluszellen von WKY hervorruft. Eine Interaktion des Dopamin D₃ und des AT₁ Rezeptors könnten somit einen entscheidenden Einfluss auf die renale Durchblutung, die GFR, die Natriumausscheidung und in Folge dessen auf die Blutdruckregulation haben.

In vorliegender Arbeit sollte nun anhand von Clearanceexperimenten am Dopamin D₃ Rezeptor Knockoutmodell ein Zusammenhang des Dopamin D₃ und des AT₁ Rezeptors untersucht werden. Die Durchführung der Experimente erfolgte hierbei sowohl an diabetischen als auch an normoglykämischen KO und WT-Mäusen. Im Vergleich zu den normoglykämischen Kontrolltieren (CON-WT und CON-KO) zeigte sich initial (bei der Messung der Basalwerte) bei den diabetischen Gruppen (DM-WT und DM-KO) erwartungsgemäß eine Steigerung des Urinvolumens, der GFR sowie der Elektrolytexkretion (Na⁺ und K⁺). Durch die kontinuierliche Applikation von Angiotensin II (450 µg/h) in den Hauptperioden, kam es zu einer leichten Erhöhung des systolischen Blutdrucks, der Herzfrequenz und einer Erniedrigung der GFR (siehe Tab. 9-11). Entgegen der Ergebnisse von Zeng et al. (2003) konnte in vorliegendem Versuchsmodell jedoch kein Unterschied zwischen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- und Wildtyp-tieren gezeigt werden. Bei Berücksichtigung der von Zeng et al. (2003) beschriebenen Befunde würden aufgrund des fehlenden Dopamin D₃ Rezeptors, und der dadurch fehlenden Downregulation der AT₁ Rezeptoren, bei

den Knockouttieren mehr AT₁ Rezeptoren exprimiert sein als bei den entsprechenden Wildtyp-tieren. Infolge der vasokonstriktorisches Komponente des AT II sollte demnach bei den Knockouttieren zum einen ein deutlicherer Blutdruckanstieg sowie eine im Vergleich zu den Wildtyp-tieren stärker ausgeprägte Erniedrigung der GFR verzeichnet werden können. Das erwartete unterschiedliche Verhalten der GFR zwischen KO und WT- Tieren nach erfolgter AT II Infusion blieb jedoch aus.

Im Rahmen der Clearanceexperimente wurde auch das Alter der Tiere berücksichtigt um eventuell zusätzliche altersabhängige Effekte auf die renale Hämodynamik zu bestimmen. Die Versuche wurden sowohl an jüngeren (6 Monate) als auch älteren (1-1 ½ Jahre) normoglykämischen KO- und WT- Tieren durchgeführt.

Verschiedene Studien konnten zeigen, dass der Alterungsprozess eine Vielzahl an funktionellen und strukturellen Veränderungen des Organismus mit sich bringt. So konnten neben Modifikationen des respiratorischen und kardiovaskulären Systems auch altersabhängige Effekte in der Niere nachgewiesen werden (Epstein 1996). Mit zunehmendem Lebensalter kann auf struktureller Ebene eine Abnahme des Gesamtnierengewebes beobachtet werden, wobei hier primär die Nierenrinde betroffen ist. Es kommt hierbei zu einer deutlichen Abnahme funktionierender Glomeruli und Tubuluszellen (Goyal 1982). Auf funktioneller Ebene konnte in Humanstudien eine altersabhängige Beeinflussung der renalen Hämodynamik und der tubulären Funktion nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine Abnahme des renalen Blutflusses (Fliser et al. 1993), der glomerulären Filtrationsrate und eine verminderte Fähigkeit sowohl der Natriumexkretion als auch der Natriumretention (Epstein 1985).

Bezüglich des Mausmodells konnte im Zuge des Alterungsprozesses eine Hypertrophie des gesamten Nierengewebes beobachtet werden, wodurch möglicherweise die Minderung der Filtrationsleistung kompensiert wird (Hackbarth et al. 1982). In der eigenen Arbeitsgruppe wurden weitere Untersuchungen bezüglich altersabhängiger hämodynamischer renaler

Veränderungen an CD-1 Mäusen durchgeführt. Zur Beurteilung der renalen funktionellen Reserve wurde sowohl jungen als auch älteren CD-1 Mäusen eine Aminosäurelösung infundiert. Nach erfolgter Aminosäureapplikation zeigte sich bei den jungen Tieren ein signifikanter Anstieg der GFR, wohingegen die GFR der älteren Tiere konstant blieb (Luippold et al. 2002). Zusammengefasst legen die Erkenntnisse einen Einfluss des Alters der Tiere bezüglich der Regulation der renalen Hämodynamik nahe.

In den hier beschriebenen Versuchen an jungen und älteren KO- und WT-Tieren zeigte sich in vorliegendem Versuchmodell keine altersabhängigen Unterschiede bezüglich des Urinvolumens, der GFR und der renalen Elektrolytexkretion. Lediglich bezüglich des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz (HF) machten sich leichte Alterunterschiede bemerkbar. Bei den jüngeren Tieren konnte somit tendenziell ein leicht erhöhter MAP im Vergleich zu den älteren Tieren festgestellt werden. Die HF betreffend zeigten sich bei den jüngeren Tieren tendenziell niedrigere Werte als bei den Älteren (siehe Tab. 12-14). In vorliegender Arbeit konnten somit, mit Ausnahme der Unterschiede in der systemischen Hämodynamik, die von diversen Autoren beschriebenen altersabhängigen renalen Veränderungen nicht bestätigt werden. In verwendetem Versuchmodell zeigten sich keine ausgeprägten altersabhängigen funktionellen Differenzen, insbesondere die Nierenfunktion war durch das Alter nicht beeinflusst. Auch ein Einfluss des Dopamin D₃ Rezeptors konnte in dieser Versuchsreihe nicht beobachtet werden.

4.3 Schlußfolgerung

Da es sich bei der diabetischen Nephropathie noch immer um eine der häufigsten Ursachen einer terminalen Niereninsuffizienz handelt, besteht der Bedarf weitere Therapiemöglichkeiten zu entwickeln, um eine Progression der diabetischen Nephropathie schon in der Frühphase zu verhindern. Die derzeitigen bekannten Behandlungsansätze der diabetischen Nephropathie, die neben der optimalen Blutzuckereinstellung und diätetischen Maßnahmen u.a. auch eine antihypertensive Therapie (v.a. ACE-Hemmer) beinhalten, haben entscheidend zu einer Prognoseverbesserung beigetragen. Die Progredienz bzw. die Entwicklung der diabetischen Nephropathie kann jedoch auch durch diese nicht sicher verhindert werden.

Ein möglicher Therapieansatz stellt somit eine Reduktion der, in der Frühphase des Diabetes mellitus typischen, glomerulären Hyperfiltration dar. Beschrieben werden eine Vielzahl an möglichen Pathomechanismen, die an deren Entwicklung beteiligt sind, wobei verschiedene Studien zeigen konnten, dass hierbei das dopaminerge System mit seinen unterschiedlichen Rezeptoren eine entscheidene Rolle spielt.

Durch eine pharmakologische Inhibition des Dopamin D₃ Rezeptors konnte eine Verminderung bzw. sogar eine Normalisierung der diabetischen Hyperfiltration erreicht werden. Da dieser Sachverhalt in vorliegender Arbeit am Knockout-Mausmodell nicht bestätigt werden konnte, scheinen jedoch noch weitere wichtige Regulationsmechanismen an der renalen Hämodynamik beteiligt zu sein. Auf Grund dessen sollten weitere Untersuchungen an verschiedenen Mausstämmen und verlängerter Versuchsdauer durchgeführt werden, um die Rolle des Dopamin D₃ Rezeptors bezüglich der Progredienz der diabetischen Nephropathie näher zu verstehen. Würde sich hierbei dann der nephroprotektive Nutzen der D₃ Rezeptorblockade, welcher in früheren Studien beobachtet werden konnte, bestätigen, könnten entsprechende Pharmaka eine sinnvolle Ergänzung zu den bereits vorhandenen Therapieoptionen darstellen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In verschiedenen sowohl klinischen als auch experimentellen Studien gelang der Nachweis, dass das dopaminerge System einen entscheidenden Einfluss auf die renale Hämodynamik hat. In vorliegender Arbeit sollten speziell die renalen Effekte des Dopamin D₃ Rezeptors bzw. dessen Inaktivierung untersucht werden. Als Versuchstiere dienten hierbei sowohl diabetische (DM) als auch normoglykämische (CON) Dopamin D₃ Rezeptor Knockout- (KO) und die entsprechenden Wildtypmäuse (WT). Die experimentelle Induktion des Diabetes mellitus erfolgte durch intraperitoneale fraktionierte STZ-Applikationen mit Einzeldosen von 80 mg/kg KG.

Der erste Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit dem Einfluss des Dopamin D₃ Rezeptors auf die Progredienz der diabetischen Nephropathie. Hierzu wurden Langzeitstoffwechsellängsexperimente (STWK) an wachen normoglykämischen und diabetischen Dopamin D₃ Rezeptor KO- und WT-Tieren durchgeführt. Mittels einer Schwanzvenenplethysmographie wurde an den selben Tieren zudem die Bedeutung des Dopamin D₃ Rezeptors für die arterielle Hypertonie untersucht. Bei den diabetischen Tieren zeigte sich im Vergleich zu den entsprechenden Kontrolltieren eine signifikante Polyphagie, Polydipsie und Polyurie sowie ein deutlicher Gewichtsverlust. Bezüglich der in der Frühphase der diabetischen Nephropathie typischen Albuminurie, konnte eine signifikant gesteigerte Albuminexkretion beider diabetischer Gruppen gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren beobachtet werden. Der Vergleich zwischen Dopamin D₃ Rezeptor KO- und WT-Tieren erbrachte bezüglich der in den STWK-Versuchen erhobenen Parametern keine signifikanten Unterschiede. Bei der Messung des systolischen Blutdrucks zeigten sich in verwendetem Versuchsmodell in den vier verschiedenen Versuchsgruppen ähnliche Werte. Es konnten folglich weder zwischen den KO- und WT-Tieren noch zwischen den DM- und CON-Tieren signifikante Unterschiede beobachtet werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde anhand von Clearanceexperimenten an narkotisierten Tieren mit kontinuierlicher Applikation

von Angiotensin II (450 µg/h) in den Hauptperioden geprüft, ob eine Interaktion des Dopamin D₃ und des AT₁ Rezeptors beobachtet werden kann. Als Versuchstiere dienten hierbei wiederum sowohl diabetische als auch normoglykämische KO- und WT-Tiere. Um altersabhängige Effekte auf die renale Hämodynamik zu untersuchen, wurden die Versuche zudem an jungen (6 Monate) und älteren (1-1½ Jahre) normoglykämischen Kontrolltieren durchgeführt. In den beiden diabetischen Gruppen konnte die Diabetes mellitus-typische glomeruläre Hyperfiltration sowie ein Anstieg der Natriumexkretion beobachtet werden, ein unterschiedliches Verhalten der GFR zwischen KO- und WT-Tieren blieb jedoch aus. In den an jungen und älteren KO- und WT-Tieren durchgeführten Experimenten zeigte sich bezüglich der altersabhängigen Effekte auf die renale Hämodynamik kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Auch ein Einfluss des Dopamin D₃ Rezeptors konnte in dieser Versuchsreihe nicht beobachtet werden.

Zusammengefasst scheint in diesem Versuchsmodell der Dopamin D₃ Rezeptor also weder auf die in der Frühphase der diabetischen Nephropathie vorherrschende pathologische glomeruläre Hyperfiltration noch auf die Blutdruckregulation einen entscheidenden Einfluss zu haben. Ebenso konnte unter gegebenen Versuchsbedingungen keine Interaktion des Dopamin D₃ und des AT₁ Rezeptors festgestellt werden. Auf Grund der Daten scheint der nephroprotektive Effekt einer Dopamin D₃ Rezeptorblockade fraglich. Unter Berücksichtigung der bisherigen Befunde sollten weitere Experimente mit verlängerter Versuchsdauer sowie der Versuchsdurchführung an unterschiedlichen Mausstämmen vorgenommen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

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

Aherne AM, Vaughan CJ, Carey RM, O'Connell DP. Localization of dopamine D_{1A} receptor protein and messenger ribonucleic acid in rat adrenal cortex. *Endocrinology* 1997; 138: 1282-1288

Albrecht FE, Drago J, Felder RA, Printz MP, Eisner GM, Robillard JE, Sibley DR, Westphal HJ, Jose PA. Role of the D_{1A} dopamine receptor in the pathogenesis of genetic hypertension. *J Clin Invest* 1996; 97: 2283-2288

Allen TJ, Cooper ME, Lan HY. Use of genetic mouse models in the study of diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep* 2004; 4: 435-440

Amenta F. Light microscope autoradiography of peripheral dopamine receptor subtypes. *Clin Exp Hypertens* 1997; 19: 27-41

Aretha CW, Sinha A, Galloway MP. Dopamine D₃-preferring ligands act at synthesis modulating autoreceptors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995; 274: 609-613

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

Astrup AS, Tarnow L, Rossing P, Pietrzek L, Riis Hansen P, Parving HH. Improved prognosis in type 1 diabetic patients with nephropathy: a prospective follow-up study. *Kidney Int* 2005; 68: 250-257

Baines AD, Drangova R. Neural not tubular dopamine increases glomerular filtration rate in perfused rat kidneys. *Am J Physiol* 1986; 250: F674-679

Bakris GL. Microalbuminuria: What is it? Why is it important? What should be done about it? *J Clin Hypertens* 2001; 3: 99-102

Bakris GL. Hypertension and nephropathy. *Am J Med* 2003; 115 Suppl 8A: 49S-54S

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

Baumgartl HJ, Sigl G, Banholzer P, Haslbeck M, Standl E. On the prognosis of IDDM patients with large kidneys. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 630-634

Beilharz M. Die pathophysiologische Rolle von Dopamin und renaler Innervierung in der Frühphase der diabetischen Nephropathie. 2000; Med. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

Bellomo R, Chapman M, Finfer S, Hickling K, Myburgh J. Low-dose dopamine in patients with early renal dysfunction: a placebo-controlled randomised trial. Australian and New Zealand Intensive Care Society (ANZICS) Clinical Trials Group. *Lancet* 2000; 356: 2139-2143

Bellush LL, Doublier S, Holland AN, Striker LJ, Striker GE, Kopchick JJ. Protection against diabetes-induced nephropathy in growth hormone receptor/binding protein gene-disrupted mice. *Endocrinology* 2000; 141: 163-168

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

Bertorello A, Hökfelt T, Goldstein M, Aperia A. Proximal tubule Na⁺-K⁺-ATPase activity is inhibited during high-salt diet: evidence for DA-mediated effect. *Am J Physiol* 1988; 254: F795-801

Breyer MD, Böttinger E, Brosius FC, Coffman TM, Harris RC, Heilig CW, Sharma K. Mouse models of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 27-45

Burns KD. Angiotensin II and its receptors in the diabetic kidney. *AM J Kidney Dis* 2000; 36: 449-467

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

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

Carney SL, Wong NL, Dirks JH. Acute effects of streptozotocin diabetes on rat renal function. *J Lab Clin Med* 1979; 93: 950-961

Castellino P, Coda B, DeFronzo RA: Effect of amino acid infusion on renal hemodynamics in humans. *Am J Physiol* 1986; 251: F132-140

Chatziantoniou C, Ruan X, Arendshorst WJ. Defective G protein activation of the cAMP pathway in rat kidney during genetic hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2924-2928

Doggrell SA. The therapeutic potential of dopamine modulators on the cardiovascular and renal systems. *Expert Opin Investig Drugs* 2002; 11: 631-644

el Nahas AM, Bassett AH, Cope GH, Le Carpentier JE. Role of growth hormone in the development of experimental renal scarring. *Kidney Int* 1991; 40: 29-34

Epstein M. Aging and the kidney: clinical implications. *Am Fam Physician* 1985; 31: 123-137.

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

Felder CC, Blecher M, Jose PA. Dopamine-1-mediated stimulation of phospholipase C activity in rat renal cortical membranes. *J Biol Chem* 1989; 264: 8739-8745.

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

Felder RA, Eisner GM, Jose PA. D₁ dopamine receptor signalling defect in spontaneous hypertension. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 245-250

Fliser D, Zeier M, Nowack R, Ritz E: Renal functional reserve in healthy elderly subjects. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3 :1371-1377

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

Giros B, Sokoloff P, Martres MP, Riou JF, Emorine LJ, Schwartz JC. Alternative splicing directs the expression of two D₂ dopamine receptor isoforms. *Nature* 1989; 342: 923-926

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

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

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

Greven J, Klein H. Effects of dopamine on whole kidney function and proximal transtubular volume fluxes in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1977; 296: 289-292

Gross ML, Koch A, Mühlbauer B, Adamczak M, Ziebart H, Drescher K, Gross G, Berger I, Amann KU, Ritz E. Renoprotective effect of a dopamine D₃ receptor antagonist in experimental type II diabetes. *Lab Invest* 2006; 86: 262-274

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

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

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

Hackbarth H, Harrison DE. Changes in age in renal function and morphology in C57/BL6, CBA/HT6 and B&CBAF1 Mice. *J Gerontol* 1982b; 37: 540-547

Haithcock D, Jiao H, Cui XL, Hopfer U, Douglas JG. Renal proximal tubular AT₂ receptor: signaling and transport. *J Am Soc Nephrol* 1999; 10 suppl 11: 69-74

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

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

Hussain T, Lokhandwala MF. Renal dopamine receptor function in hypertension. *Hypertension* 1998; 32: 187-197

Hussain T, Abdul-Wahab R, Kotak DK, Lokhandwala MF. Bromocriptine regulates angiotensin II response on sodium pump in proximal tubules. *Hypertension* 1998; 32: 1054-1059

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

Ibrahim HA, Vora JP. Diabetic nephropathy. *Baillieres Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 1999; 13: 239-264

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

Janka HU, Michaelis D. Epidemiology of diabetes mellitus: prevalence, incidence, pathogenesis, and prognosis. *Z Arztl Fortbild Qualitatssich* 2002; 96: 159-165

Janssen BJ, De Celle T, Debets JJ, Brouns AE, Callahan MF, Smith TL. Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *Am J Physiol Heart Circ. Physiol* 2004; 287: H1618-H1624

Jensen PK, Christiansen JS, Steven K, Parving HH. Strict metabolic control and renal function in the streptozotocin diabetic rat. *Kidney Int* 1987; 31: 47-51

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

Jonsson B, CODE-2 Advisory Board. Revealing the cost of Type II diabetes in Europe. *Diabetologia* 2002; 45: 5-12

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

Jose PA, Felder RA. What we can learn from the selective manipulation of dopaminergic receptors about the pathogenesis and treatment of hypertension? *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1996; 5: 447-451

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

Jose PA, Eisner GM, Felder RA. Role of dopamine in the pathogenesis of hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl* 1999; 26: 10-13

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

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

Junqueira LC, Carneiro J, Gratzl M. *Histologie*, 6. Aufl., Springer, Berlin 2005; S.321

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

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

Kellum JA, M Decker J. Use of dopamine in acute renal failure: a meta-analysis. *Crit Care Med* 2001; 29: 1526-1531

Kim KM, Gainetdinov RR, Laporte SA, Caron MG, Barak LS. G Protein-coupled receptor kinase regulates dopamine D₃ receptor signaling by modulating the stability of a receptor-filamin- β -arrestin complex: a case of autoreceptor regulation. *J Biol Chem* 2005; 280: 12774-12780

Koya D, Jirousek MR, Lin, YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterization of protein kinase C beta isoform activation on the gene expression of transforming growth factor-beta, extracellular matrix components and prostanoids in the glomeruli of diabetic rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 115-126

Kuohn AM. Bedeutung der pharmakologischen Blockade von Dopamin D₃ Rezeptoren für die Entstehung einer diabetischen Nephropathie im Tiermodell. 2005; Med. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

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

Lassnigg A, Donner E, Grubhofer G, Presterl E, Druml W, Hiesmayr M. Lack of renoprotective effects of dopamine and furosemide during cardiac surgery. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 97-104

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

Liebl A, Spannheimer A, Reitberger U, Goertz A. Costs of long-term complications in type 2 diabetes patients in Germany. Results of the CODE-2 Study. *Med Klin (Munich)* 2002; 97: 713-719

Liebl A, Neiss A, Spannheimer A, Reitberger U, Wieseler B, Stammer H, Goertz A. Complications, co-morbidity, and blood glucose control in type 2 diabetes mellitus patients in Germany--results from the CODE-2 study. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002; 110:10-16

Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996; 272: 676-680

Lin MT, Yang JJ. Stimulation of the nigrostriatal dopamine system produces hypertension and tachycardia in rats. *Am J Physiol* 1994; 226: H2489-H2496

Luippold G, Küster E, Joos T, Mühlbauer B. Dopamine D₃-receptor activation modulates renal function in anesthetized rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998; 358: 690-693

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

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

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

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

Luippold G, Pech B, Schneider S, Osswald H, Mühlbauer B. Age dependency of renal function in CD-1 mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002; 282: F886-890

Luippold G, Beilharz M, Wehrmann M, Unger L, Gross G, Mühlbauer B. Effect of dopamine D₃ receptor blockade on renal function and glomerular size in diabetic rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2005; 371: 420-427

Luippold G, Pech B, Schneider S, Drescher K, Müller R, Gross G, Mühlbauer B. Absence of amino acid-induced glomerular hyperfiltration in dopamine D₃ receptor knockout mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2006; 372: 284-290

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

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

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

Michels LD, Davidman M, Keana WF. Determinants of glomerular filtration and plasma flow in experimental diabetic rats. *J Lab Clin Med* 1981; 98: 869-885

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 Clin Lab Invest* 1986; 46: 201-206

Mogensen CE. Prediction of clinical diabetic nephropathy in IDDM patients. Alternatives to microalbuminuria? *Diabetes* 1990; 39: 761-767

Mogensen CE. How to protect the kidney in diabetic patients: with special reference to IDDM. *Diabetes* 1997; 46 suppl 2: 104-111

Mühlbauer B. Die therapeutische Wirksamkeit von Dopamin beim akuten Nierenversagen. *Anästhesist* 1996; 45: 657-696

Nagahama S, Chen YF, Lindheimer MD, Oparil L. Mechanism of the pressor action of LY171555, a specific dopamine D₂ receptor agonist, in the conscious rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236: 735-742

Nürnberg A, Rábiger M, Mack A, Diaz J, Sokoloff P, Mühlbauer B; Luippold G. Subapical localization of the dopamine D₃ receptor in proximal tubules of the rat kidney. *J Histochem Cytochem* 2004; 52: 1647-1655

O'Connell DP, Botkin SJ, Ramos SI, Sibley DR, Ariano MA, Felder RA, Carey RM. Localization of dopamine D_{1A} receptor protein in rat kidneys. *Am J Physiol* 1995; 268: F1185-1197

O'Connell DP, Vaughan CJ, Aherne AM, Botkin SJ, Wang ZQ, Felder RA, Carey RM. 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 HJ. Fast accumulation of basement membrane material and the rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. *Diabetologia* 1980; 18: 493-500

Olsen NV, Hansen JM, Ladefoged SD, Fogh-Andersen N, Leyssac PP. Renal tubular reabsorption of sodium and water during infusion of low-dose dopamine in normal man. *Clin Sci (Lond.)* 1990; 78: 503-507

Park BH, Fishburn CS, Carmon S, Accili D, Fuchs S. Structural organization of the murine D₃ dopamine receptor gene. *J Neurochem* 1995; 64: 482-486

Pawlik W, Mailman D, Shanbour LL, Jacobson ED. Dopamine effects on the intestinal circulation. *Am Heart J* 1976; 91:325-331

Pech BS. Untersuchung der Nierenfunktion von Mäusen im Hinblick auf Altersabhängigkeit und Dopamin D₃-Rezeptorfunktion. 2003; Med. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

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

Petterson-Fernholm KJ, Forsblom CM, Perola M, Fagerudd JA, Groop PH, FinnDiane Study Group. Dopamine D₃ receptor gene polymorphisms, blood pressure and nephropathy in type 1 diabetic patients. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 1432-1436

Rabkin R, Fervenza FC. Renal hypertrophy and kidney disease in diabetes. *Diabetes Metab Rev* 1996; 12: 217-241

Rasch R, Dorup J. Quantitative morphology of the rat kidney during diabetes mellitus and insulin treatment. *Diabetologia* 1997; 40: 802-809

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

Renz-Polster H, Krautzig S, Braun J. *Basislehrbuch Innere Medizin*. 3.Auflage Urban & Fischer München; Jena 2004; 804-838

Rossing K, Christensen PK, Hovind P, Parving HH. Remission of nephrotic-range albuminuria reduces risk of end-stage renal disease and improves survival in type 2 diabetic patients. *Diabetologia* 2005; 48: 2241-2247

Sanada H, Yao L, Jose PA, Carey RM, Felder RA. Dopamine D₃ receptors in rat juxtaglomerular cells. *Clin Exp Hypertens* 1997; 19: 93-105

Schlager G. Systolic blood pressure in eight inbred strains of mice. *Nature* 1966; 212: 519-520

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

Schnermann J, Briggs JP, Weber PC. Tubuloglomerular feed back, prostaglandins and angiotensin in the autoregulation of glomerular filtration rate. *Kidney Int* 1984; 25: 53-64

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

Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int* 1983; 23: 643-646

Shankland SJ, Scholey JW, Ly H, Thai K. Expression of transforming growth factor-beta 1 during diabetic renal hypertrophy. *Kidney Int* 1994; 46: 430-442

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

Sharma K, Ziyadeh FN. Hyperglycemia and diabetic kidney disease. The case for transforming growth factor-beta as a key mediator. *Diabetes* 1995; 44: 1139-1146

Sheikh-Hamad D, Wang YP, Jo OD, Yanagawa N. Dopamine antagonizes the actions of angiotensin II in renal brush-border membrane. *Am J Physiol* 1993; 264: F737-743

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

Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD. *Basic Neurochemistry*, 6th edition. CD-ROM ed., Lippincott Williams & Wilkins 1998

Siragy HM, Bedigian M. Mechanism of action of angotensin-receptor blocking agents. *Curr Hypertens Rep* 1999; 1: 289-295

Soares-da-Silva P, Fernandes MH, Pinto-Do-O PC. Cell inward transport of L-DOPA and 3-O-methyl-L-DOPA in rat renal tubules. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 611-615

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

Sokoloff P, Giros B, Martes MP, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Bouthenet ML, Souil E, Schwartz JC. Localization and function of the D₃ dopamine receptor. *Arzneim.-Forsch./Drug Res* 1992; 41(I), Nr 2a

Spornitz UM. *Anatomie und Physiologie - Lehrbuch und Atlas*. 2 Aufl. Springer-Verlag, Berlin 1996

Staudacher T. Experimentelle Untersuchungen zu der Beteiligung des renalen Dopamin D₃ Rezeptors an der Regulation des arteriellen Blutdruckes. *Chem-Pharm. Dissertation* 2005; Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

Staudacher T, Pech B, Tappe M, Gross G, Mühlbauer B, Luippold G. Arterial blood pressure and renal sodium excretion in dopamine D₃ receptor knockout mice. *Hypertension* 2007; 30: 93-101

Tappe JM. Die Bedeutung des renalen D₃ Rezeptors für die Vermittlung der pathologischen diabetischen Hyperfiltration. 2003; Med. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular references to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 1992; 44: 103-150

Velasquez MT, Striffler JS, Abraham AA, Michaelis OE 4th, Scalbert E, Thibault N. Perindopril ameliorates glomerular and renal tubulointerstitial injury in the SHR/N-corpulent rat. *Hypertension* 1997; 30: 1232-1237

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

Vora JP, Ibrahim HA, Bakris GL. Responding to the challenge of diabetic nephropathy: the historic evolution of detection, prevention and management. *J Hum Hypertens* 2000; 14: 667-685

Weber RF. Untersuchungen der Nierenfunktion von diabetischen Dopamin D₃ Rezeptor Knockout Mäusen. 2004; Med. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

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

Yamaguchi I, Yao L, Sanada H, Ozono R, Mouradian MM, Jose PA, Carey RM, Felder RA. Dopamine D_{1A} receptors and renin release in rat juxtaglomerular cells. *Hypertension* 1997; 29: 962-968

Zeng C, Asico LD, Wang X, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Angiotensin II regulation of AT₁ and D₃ dopamine receptors in renal proximal tubule cells of SHR. *Hypertension* 2003; 41: 724-729

Zeng C, Yang Z, Wang Z, Jones J, Wang X, Altea J Mangrum AJ, Hopfer U, Sibley DR, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Interaction of angiotensin II type 1 and D₅ dopamine receptors in renal proximal tubule cells. *Hypertension* 2005; 45: 804-810

Zeng C, Liu Y, Wang Z, He D, Huang L, Yu P, Zheng S, Jones JE, Asico LD, Hopfer U, Eisner GM, Felder RA, Jose PA. Activation of D₃ dopamine receptor decreases angiotensin II type 1 receptor expression in rat renal proximal tubule cells. *Circ Res* 2006; 99: 494-500

Ziyadeh FN, Sharma K. Role of transforming growth factor-beta in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy. *Kidney Int* 1995; 51: 34-36

7. ANHANG

Danksagung

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

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. G. Luippold für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit und der stets engagierten und herausragenden Betreuung während der Durchführung und Auswertung dieser Arbeit. Von Beginn an stand er mir in jeglichen Fragen mit Rat und Tat zur Seite und hat durch seine ausdauernde wie auch geduldige Unterstützung während der gesamten Arbeit entscheidend zu deren Gelingen beigetragen.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. T. Staudacher für seine freundliche und hilfreiche Unterstützung während der Durchführung der experimentellen Arbeit, insbesondere für die Mühe und Geduld beim Erlernen der Präparation der Tiere sowie für viele interessante Diskussionen.

Frau C. Piesch danke ich für die Einführung in die Laborarbeit sowie der Durchführung und Auswertung einiger Versuche.

Herrn Dr. M. Wehrmann aus dem Institut für Pathologie möchte ich für die Anfertigung der Nierenschnitte und der morphologischen Auswertung danken.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch den Tierpflegern für die Versorgung und Pflege meiner Tiere.

Ferner danke ich auch meiner Doktorandenkollegin Katrin Pfeil, meinen gesamten Freunden und meiner Familie für die oftmals notwendige moralische Unterstützung.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Vanessa Ariane Dilger
Geburtsdatum/-ort: 27.02.1979 in Ludwigsburg

Schulischer Werdegang

1985 -1986: Elementary School in Essex Center (Vermont, USA)
1986 -1989: Grundschule Neckarrems
1989 -1998: Lise-Meitner-Gymnasium Remseck a. N.
Schulabschluß: Abitur am 17. Juni 1998

Studium

Mai 2000-Okt. 2006: Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
April 2002: Ärztliche Vorprüfung
März 2003: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Sep. 2005: Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
30./31. Okt. 2006: Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung