

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

**Untersuchungen der Nierenfunktion von diabetischen  
Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen**

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

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

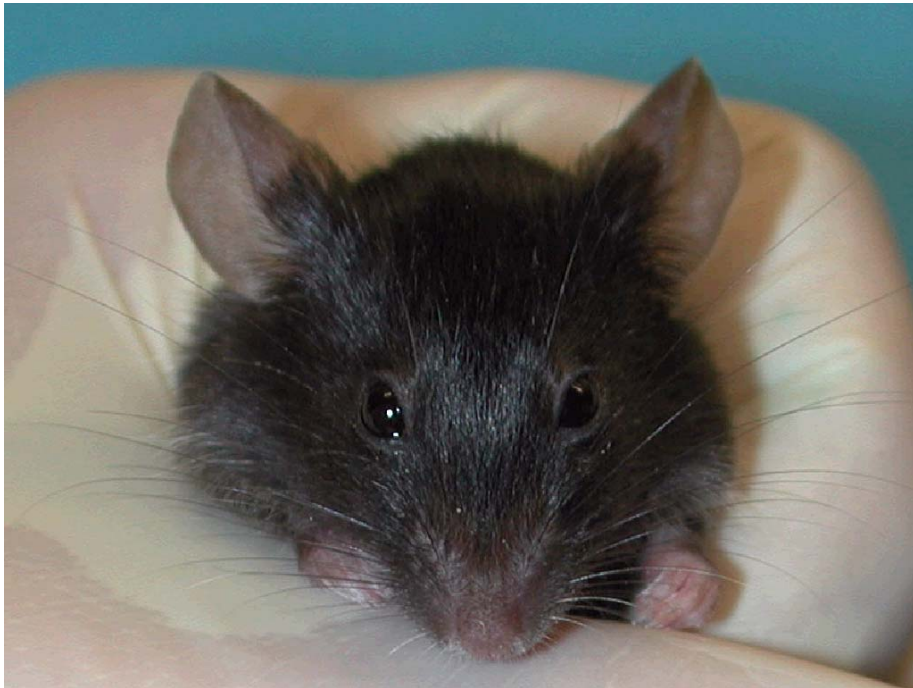
**vorgelegt von  
Renate Frida Weber, geb. Schlotterbeck  
aus  
Bad Urach**

**2004**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. G. Luippold

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Brehm



den Mäusen  
gewidmet

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Gegenstand der Arbeit</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Allgemeine Grundlagen</b>	<b>7</b>
1.2.1 Nephron und Glomeruläre Filtrationsrate	7
1.2.2 Klassifikation, Ätiologie und Pathophysiologie des Diabetes mellitus	11
1.2.3 Entstehung der diabetischen Nephropathie	13
<b>1.3 Bisheriger Kenntnisstand</b>	<b>16</b>
1.3.1 Synthese und Metabolismus von Dopamin	16
1.3.2 Wirkungen von Dopamin	18
1.3.3 Dopaminrezeptoren	20
1.3.4 Dopamin D <sub>3</sub> Rezeptoren und diabetische Hyperfiltration	22
1.3.5 Dopamin D <sub>3</sub> Rezeptoren und Natriumexkretion	22
1.3.6 Dopamin D <sub>3</sub> Rezeptoren und Hypertension	23
<b>1.4 Eigene Fragestellung</b>	<b>26</b>
<b>2. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Versuchstiere</b>	<b>27</b>
2.1.1 Generierung von D <sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen	27
2.1.2 Tierhaltungsbedingungen	28
<b>2.2 Versuchsgruppen und Anzahl der Versuchstiere</b>	<b>28</b>

<b>2.3</b>	<b>Experimenteller Ablauf</b>	29
2.3.1	Versuchsdesign und zeitlicher Ablauf der Versuche	29
2.3.2	Induktion eines Diabetes mellitus	31
2.3.3	Applikation von Insulin-Pellets	31
2.3.4	Schwanzdruckmessung an Mäusen	33
2.3.4.1	Gewöhnung der Mäuse an die Bedingungen	33
2.3.4.2	Vorbereitung der Messung	33
2.3.4.3	Schwanzdruckmessung	34
2.3.5	Stoffwechselkäfigversuche	34
2.3.5.1	Versuchsablauf	34
2.3.5.2	Bestimmung von Tiergewicht, Futtermenge und Trinkvolumen	35
2.3.5.3	Urinprobengewinnung und –behandlung	35
2.3.6	Clearanceversuche	36
2.3.6.1	Zeitlicher Ablauf der Clearanceversuche	36
2.3.6.2	Infusion	36
2.3.6.3	Narkose bei Mäusen	37
2.3.6.4	Präparation	37
2.3.6.5	Gewinnung von Plasma- und Urinproben	38
2.3.6.6	Entnahme der Nieren	39
2.3.6.7	Probenbehandlung	39
<b>2.4</b>	<b>Analytik</b>	40
2.4.1	Analysierte Parameter	40
2.4.2	Gewichte und Volumina	42
2.4.3	Konzentration von Natrium und Kalium	42
2.4.4	Konzentration von Chlorid	42
2.4.5	Glucosemessung	43
2.4.5.1	Glucosemessung im Blut	43
2.4.5.2	Glucosemessung im Plasma	43
2.4.6	Messung der Osmolalität	44
2.4.7	Hämatokrit	44

2.4.8	[ <sup>3</sup> H]-Aktivität in Plasma und Urin	45
2.4.9	Systolischer und diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz	45
<b>2.5</b>	<b>Berechnungen</b>	46
2.5.1	Mittlerer arterieller Blutdruck	46
2.5.2	Urinzeitvolumen	46
2.5.3	Glomeruläre Filtrationsrate	46
2.5.4	Absolute Ausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid	47
2.5.5	Fraktionelle renale Natriumausscheidung	47
<b>2.6</b>	<b>Statistik</b>	48
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	49
<b>3.1</b>	<b>Schwanzdruckmessung</b>	49
3.1.1	Systolischer Blutdruck	50
3.1.2	Mittlerer arterieller Blutdruck	50
3.1.3	Herzfrequenz	51
<b>3.2</b>	<b>Stoffwechselkäfigversuche bei wachen Mäusen</b>	52
3.2.1	Tiergewicht und Änderung der Körpergewichte im Versuch	53
3.2.2	Futtermenge und Trinkvolumen	53
3.2.3	Urinvolumen	54
3.2.4	Blutglucose	54
3.2.5	Glucoseausscheidung	55
3.2.6	Renale Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung	56
3.2.7	Osmolalität	58
<b>3.3</b>	<b>Clearanceversuche bei narkotisierten Mäusen</b>	59
3.3.1	Mittlerer arterieller Blutdruck	60
3.3.2	Herzfrequenz	60

3.3.3	Hämatokrit	60
3.3.4	Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma	61
3.3.5	Urinvolumen	62
3.3.6	Natrium- und Kaliumausscheidung	63
3.3.7	Fraktionelle renale Natriumausscheidung	64
3.3.8	Glomeruläre Filtrationsrate	65
3.3.9	Nierengewicht, Körpergewicht und Nierenindex	67
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
4.1	D <sub>3</sub> Rezeptor und diabetische Hyperfiltration	69
4.2	D <sub>3</sub> Rezeptor und Natriumexkretion	79
4.3	D <sub>3</sub> Rezeptor und Blutdruckverhalten	83
4.4	Effekte der Insulinbehandlung	86
4.5	Ausblick und klinische Implikation	88
<b>5</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>89</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>91</b>
<b>7.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>104</b>

## **1. EINLEITUNG**

### **1.1 Gegenstand der Arbeit**

Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren sind an der Regulation der renalen Hämodynamik beteiligt. In der vorliegenden Arbeit wird an diabetischen und nicht diabetischen D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen und den entsprechenden Wildtyp-Tieren durch Clearanceversuche untersucht, ob der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor an der pathologischen Hyperfiltration der diabetischen Nephropathie beteiligt ist. Unter diesem Aspekt wird ebenfalls die Beteiligung des D<sub>3</sub> Rezeptors an der Regulation des Natriumhaushalts und die Pathogenese der arteriellen Hypertonie untersucht. Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden sowohl an wachen als auch an narkotisierten Mäusen durchgeführt.

### **1.2. Allgemeine Grundlagen**

#### **1.2.1 Nephron und Glomeruläre Filtrationsrate**

Die Nephrone werden als die architektonische Grundeinheit der Niere aufgefasst (Abb. 1). Beide Nieren des Menschen enthalten zusammen etwa 2-2,5 Millionen Nephrone. Man unterscheidet zwei Typen von Nephronen. Die kortikalen Nephrone mit einer kurzen Henleschen Schleife und die juxtamedullären Nephrone mit einer bis zu 40 mm langen Schleife. Die Harnkonzentration ist von der Schleifenlänge abhängig. Nephrone mit einer kurzen Henleschen Schleife produzieren dünn konzentrierten Harn, die juxtamedullären Nephrone mit den langen Schleifen sind in der Lage einen hochkonzentrierten Harn auszuscheiden. Jedes Nephron besteht aus Nierenkörperchen und Nierenkanälchen. Ein Nierenkörperchen wiederum besteht aus einem kompliziert gebauten Kapillarknäuel, dem Glomerulus, das von der Bowman-Kapsel umgeben ist (Abb. 2 und 3). Zwischen den Kapillaren befinden sich die Mesangiumzellen, die an der Regulation der Filtration mit



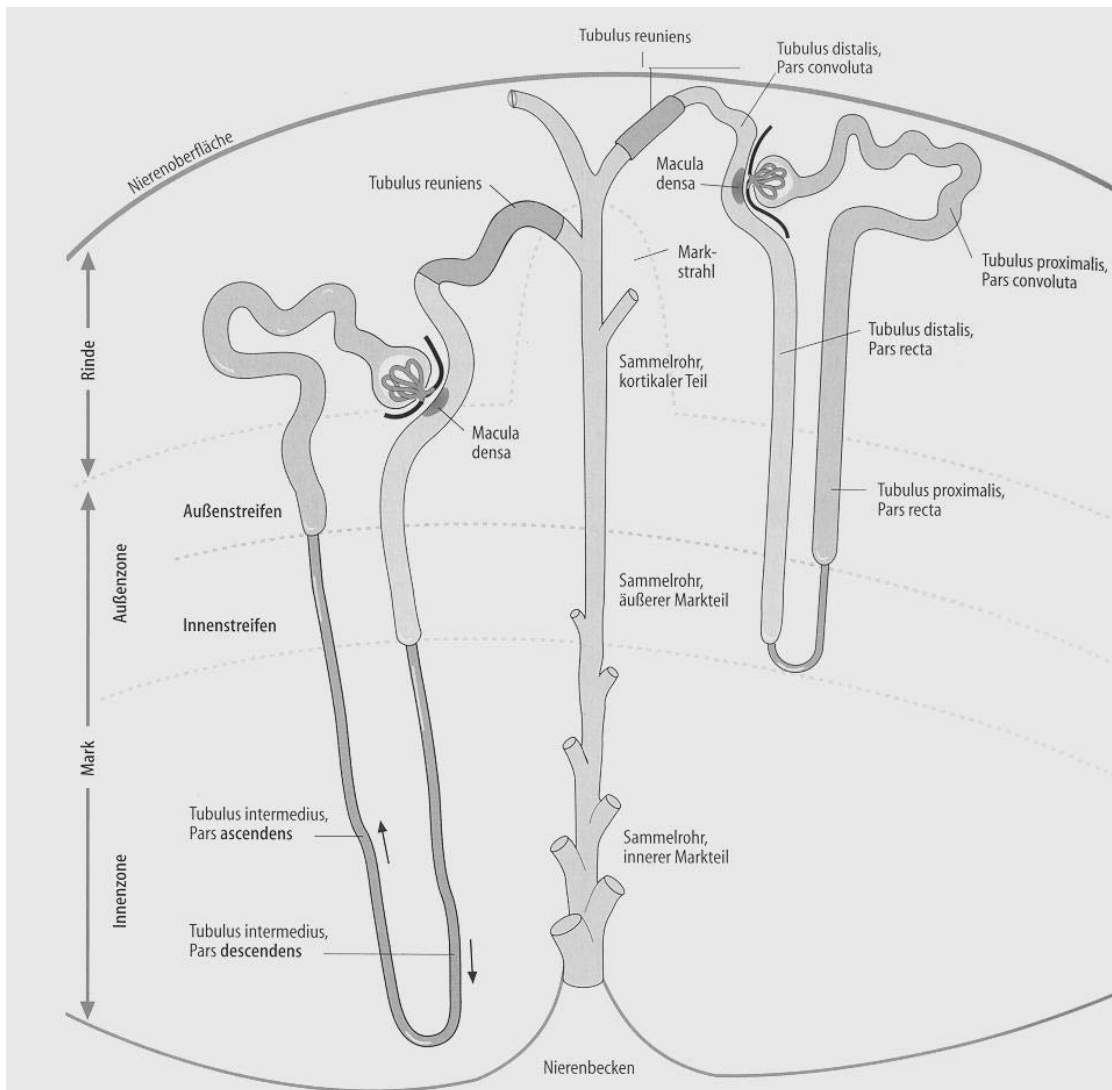
beteiligt sind. Über das Vas afferens gelangt das Blut in das Glomerulus. Dort wird unter Zurückhaltung der Blutzellen und der großmolekularen Bestandteile Blutplasma in die Bowman-Kapsel abfiltriert. Über das Vas efferens fließt das Blut aus dem Glomerulus in die Vasa recta, die in das Nierenmark hinunterziehen.

Die Filtrationsprozesse erfordern spezifische Strukturen in den Glomeruli. Das Epithel der Bowman-Kapsel legt sich den Kapillaren an. So entsteht ein dreischichtiger Filter, der aus dem Kapillarendothel, der Basalmembran mit den fest anliegenden Podozyten und der Schlitzmembran besteht. Das gebildete Ultrafiltrat, der Primärharn, gelangt am Harnpol in das nachgeschaltete Tubulussystem, in dem nahezu 99% des Primärharns wieder rückresorbiert und dem zirkulierenden Blut zugeführt wird (Berry 1996). Der am Ende des Sammelrohres gebildete Endharn fließt nun in das Nierenbecken und wird über die ableitenden Harnwege ausgeschieden.

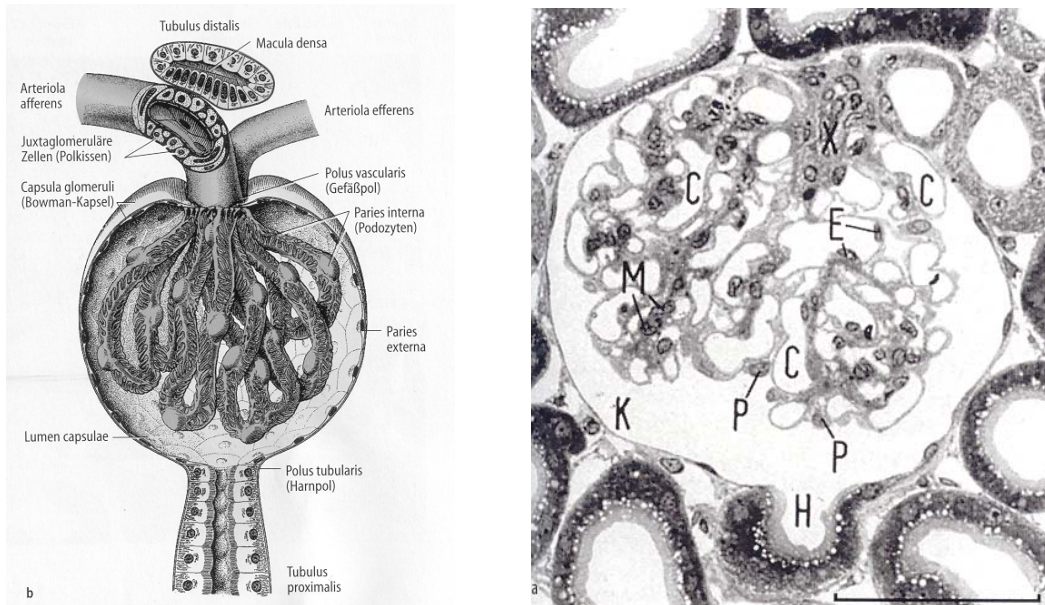
Im proximalen Tubulus erfolgen die wichtigsten Resorptionsleistungen. Die osmotische Konzentration bleibt hier unverändert. Zwei Drittel der gesamten Flüssigkeit werden dort schon rückresorbiert. Treibende Kraft dafür ist die dort ablaufende Resorption von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  und  $\text{HCO}_3^-$ , denen das Wasser zum osmotischen Ausgleich nachfolgt. Eine zusätzlich treibende Kraft für die Wasserresorption ist der onkotische Druck in den peritubulären Kapillaren. Er ist um so höher, je mehr Wasser am Glomerulus filtriert wurde, da die Proteine bei der Filtration zu 99,9% im Blut verbleiben. Über den nachfolgenden intermediären Tubulus gelangt das Filtrat in die Henlesche Schleife. Sie dient dem Aufbau eines osmotischen Gradienten im Nierenmark, der die Voraussetzung dafür ist, dass am Ende im Harn eine hohe osmotische Konzentration eingestellt werden kann. Der wichtigste Prozess für diese Funktion ist ein aktiver Salztransport aus dem Tubuluslumen ins Gewebe, bei fehlender Wasserpermeabilität. Der aufsteigende dicke Ast der Henleschen Schleife läuft zum Glomerulus desselben Nephrons zurück und bildet dort im distalen Tubulus eine Zone sehr engen Kontaktes mit dem Gefäßpol. Dieser sogenannte juxtaglomeruläre Apparat ist der Ort wichtiger Rückkopplungen (tubuloglomerulärer Feedback, TGF) vom früh distalen Tubulus zum

Glomerulus. Zum juxtaglomerulären Apparat gehören die Polkissen (epitheloide, juxtaglomeruläre Zellen), die Macula densa und die extraglomerulären Mesangiumzellen, auch Goormaghtigh-Zellen genannt. In den Polkissen konnte immunhistochemisch das Enzym Renin nachgewiesen werden. Außerdem enthalten die Zellen Angiotensinase A. Renin wirkt auf das Angiotensinogen und beeinflusst über das Angiotensin-Aldosteron-System Blutdruck und Natriumhaushalt, indem die Natriumrückresorption stimuliert wird. In der Macula densa wird die Natriumkonzentration des Tubulusharns ermittelt. Erhöhung der Natriumkonzentration im Tubulusharn induziert eine Konstriktion des Vas afferens und führt zur Verminderung der Glomerulusdurchblutung und zu einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Bei Erniedrigung der Natriumkonzentration beobachtet man den umgekehrten Effekt (Schnermann et al. 1984).

Der distale Tubulus mündet in das Sammelrohr. In den medullären Abschnitten der Sammelrohre findet die endgültige Einstellung des auszuscheidenden Urinvolumens statt. Unter der Wirkung von Adiuretin (ADH) wird hier dem Urin bei seiner Passage durch das zunehmend hypertone Nierenmark so viel Wasser entzogen, dass sich die Osmolalität des Urins gegenüber dem Plasma mehr als vervierfachen kann (Antidiurese). In Abwesenheit von ADH kommt es zur Wasserdiurese.



**Abb. 1:** Juxtamedulläres (links) und kortikales (rechts) Nephron mit jeweils langer, bzw. kurzer Henleschen Schleife in der schematischen Darstellung. Die Grenzen von Mark und Rinde, bzw. die Zonen des Marks sind gestrichelt eingezeichnet. Das Sammelrohr und die geraden Abschnitte des proximalen und distalen Tubulus des kortikalen Nephrons liegen in einem Markstrahl, der gleichfalls durch eine gestrichelte Linie abgegrenzt ist. (Modifiziert nach Junqueira et al. 1996).



**Abb. 2 (links) und Abb. 3 (rechts):** Aufbau eines Glomerulus. **Abb. 3 :** Der juxtaglomeruläre Apparat **X** markiert den Gefäßpol. Gegenüber der mit **H** gekennzeichnete Harnpol. **C** Glomeruluskapillaren, **E** Kapillarendothelien, **K** Bowman-Kapselraum, **M** Mesangiumzellen, **P** Podozyten (Modifiziert nach Junqueira 1996).

### 1.2.2 Klassifikation, Ätiologie und Pathophysiologie des Diabetes mellitus

Der Diabetes mellitus (DM), zu deutsch „Zuckerharnruhr“, ist in der westlichen Kulturgesellschaft mit 4% eine der häufigsten endokrinen Stoffwechselstörungen (Statistisches Bundesamt Stuttgart 1998). Dies entspricht etwa 3,5 Millionen diagnostizierter Patienten in Deutschland. Diese Erkrankung ist durch eine dauerhafte Erhöhung der Plasmaglukosekonzentration charakterisiert, die nicht therapiert mit schweren Störungen anderer Organsysteme einhergeht. Die beiden häufigsten

pathogenetisch verschiedenen Diabetesformen sind der Typ-1- und der Typ-2-Diabetes. Etwa 5% sind Typ-1-Diabetiker, über 90% Typ-2-Diabetiker.

Der Pathogenese, des meist in jungen Jahren auftretenden Typ-1- Diabetes, liegt die Zerstörung der B-Zellen der Langerhans-Inseln durch Autoimmuninsulinitis mit absolutem Insulinmangel zugrunde. Es wird vermutet, dass Zusammenhänge zwischen den genetisch determinierten Histokompatibilitätsantigenen des HLA-Systems (-DR 3 und/oder -DR 4) und dem Typ-1-Diabetes bestehen und somit eine Immunreaktion begünstigt wird. Der Typ-2-Diabetes manifestiert sich meist erst nach dem 35. Lebensjahr, dabei nimmt die Insulinempfindlichkeit mit zunehmendem Lebensalter ab. Bei der Pathophysiologie des Typ-2-Diabetes steht die Insulinresistenz und die Insulinsekretionsstörung im Vordergrund. Diese ist ebenfalls genetisch festgelegt, kann aber durch Umwelteinflüsse wie fettreiche Ernährung, Übergewicht und Bewegungsmangel verstärkt werden. Da Glucose, selbst bei hoher Blutkonzentration, nicht in die Zellen aufgenommen werden kann, wird ein Metabolismus, der dem Hungerzustand entspricht, ausgelöst. Glykogenolyse und Gluconeogenese treiben zusätzlich den Blutglucosespiegel in die Höhe. Überschreitet die Glucosekonzentration die renale Schwelle, tritt Glucose in den Urin über und bindet Wasser im Zuge des osmotischen Prozesses. Klinisch wird der Kalorien- und Wasserverlust durch Polyurie, Polydipsie, Polyphagie, Müdigkeit und Gewichtsverlust sichtbar. Ein anhaltender Insulinmangel führt weiterhin zur gesteigerten Lipolyse mit vermehrtem Anfall von freien Fettsäuren. Diese freien Fettsäuren werden über die  $\beta$ -Oxidation zu Acetyl-CoA-Verbindungen abgebaut. Über alternative Stoffwechselwege wird das in großen Mengen anfallende Acetyl-CoA zur Ketonkörper- und Cholesterinsynthese verwendet. Steigt die Konzentration der Ketonkörper an, führt dies zu einer metabolischen Azidose, die zunächst respiratorisch kompensiert werden kann. Die respiratorische Kompensation ist die pathophysiologische Basis für das charakteristisch klinische Phänomen der sogenannten „Kussmaul-Atmung“. Eine nicht kompensierte Azidose führt schließlich zum lebensbedrohlichen diabetischen Koma.

Weitere Folgeschäden entstehen durch die nichtenzymatische Proteinglykosierung, die intrazelluläre Anhäufung von Sorbitol und das vermehrte Auftreten von freien Radikalen. Typische diabetische Organschäden entstehen am Auge (Retinopathie/Katarakt), am Nervensystem (Neuropathie), an den arteriellen Gefäßen (Makro- und Mikroangiopathien) und an der Niere (Nephropathie).

Da Glucose auch ein extrazelluläres Nährmedium für Mikroorganismen darstellt, können bei Diabetikern auch rezidivierende Atemwegs-, Vaginal- oder andere Infektionen beobachtet werden. Inzwischen werden 78% aller Todesfälle bei DM durch makroskopische Komplikationen verursacht (Janka 1996). Diabetiker stellen mehr als ein Drittel der Dialysepatienten (Ritz et al. 1996) und verursachen die Mehrzahl der nicht unfallbedingten Amputationen (Standl und Stiegler 1996).

Die stetig zunehmende Volkskrankheit geht mit erheblichen Kosten für das Gesundheitssystem einher. Im Rahmen der CODE-2<sup>®</sup>-Studie (Costs of Diabetes in Europe-Type 2) wurden die Gesamtkosten für Typ-2-Diabetiker in Deutschland erfasst und analysiert. Die im Jahr 1998 durch Patienten mit Typ-2-Diabetes in Deutschland verursachten Kosten betragen 31,4 Mrd. DM. Die Gesamtkosten pro Patient beliefen sich aus volkswirtschaftlicher Sicht auf 9018 DM. Verantwortlich für die hohen Kosten sind in erster Linie diabetesbedingte Komplikationen und Folgeerkrankungen. Die Kosten pro Patient stiegen mit dem Komplikationsstatus vom 1,3-fachen (kleine Komplikationen) auf das 4,1-fache (mikro- und makrovaskuläre Komplikationen) (Liebl et al. 2001). Eine optimierte Behandlung des Typ-2-Diabetes ist im Sinne einer Prophylaxe von Langzeitfolgen nicht nur aus medizinischer Sicht, sondern auch aus gesundheitsökonomischer Sicht dringend geboten.

### **1.2.3 Entstehung der diabetischen Nephropathie**

Die diabetische Nephropathie (DN) ist die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz. Das Verhältnis von Typ-1- zu Typ-2-Diabetikern mit

terminaler Niereninsuffizienz beträgt etwa 1:10. Ungefähr 35-40% aller Typ-1-Diabetiker entwickeln im Laufe ihrer Erkrankung eine DN (O'Donnell et al. 1988, Jones und Viberti 1995). Der Anteil der Typ-2-Diabetiker an der Gesamtdialysepopulation in Deutschland beträgt derzeit bereits über 30% (Fliser und Haller 2000).

Klinisch verläuft die DN in 5 Stadien (s. Tabelle 1). Im ersten Stadium, etwa zum Zeitpunkt der klinischen Diagnose, werden eine glomeruläre Hyperfiltration und Hypertrophie der Nieren beobachtet. Die initial auftretende Hyperfiltration ist multifaktoriell. Makroangiopathische Veränderungen führen gehäuft zu Nierenarterienstenosen. Auch neurogene Blasenentleerungsstörungen mit rezidivierenden Harnwegsinfekten müssen als zusätzliche pathogenetische Faktoren in Betracht gezogen werden. Glucose schädigt direkt die Endothelzellen. Durch die schädigende Wirkung der Glucose auf das Nierenparenchym kommt es zur Bildung von sogenannten advanced glycation endproducts (AGE), die durch Quervernetzung eine Strukturvermehrung in der mesangialen Matrix erzeugen. Weitere Folgen der Endothelschädigung sind der reduzierte Abbau glomerulärer Basalmembranbestandteile, die gesteigerte Bindung von Plasmaproteinen und Freisetzung von Zytokinen. Der spätere Funktionsverlust der Nieren wird vor allem durch eine zusätzlich auftretende Hypertonie gefördert.

**Table 1** Stadieneinteilung der diabetischen Nephropathie (nach Hasslacher)

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

Eine klassische charakteristische Schädigung der Nieren bei Diabetikern stellt die noduläre oder diffuse Glomerulosklerose nach Kimmelstiel-Wilson dar. Die diffuse glomeruläre Schädigung entsteht durch Verdickung der Kapillarwände und Ausweitung auf das Mesangialgebiet. Die Knötchenbildung ist möglicherweise eine reparative Antwort auf mikroaneurysmale Dilatation der glomerulären Kapillaren, mesangiale Ruptur und Lyse mit nachfolgender Organisation (Riegel 1999).

Weiterhin zeigten Untersuchungen bei Patienten mit DM Typ-1, dass eine gesteigerte GFR mit einem größeren Risiko für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie sowie einer terminalen Niereninsuffizienz assoziiert ist (Mogensen und Christensen 1984; Mogensen 1986).

Um die Progression der DN zu reduzieren, spielt die Stoffwechselkontrolle der Diabetiker eine entscheidende Rolle (Ibrahim et al. 1997, Mogensen 1997). Eine prospektive Studie konnte zeigen, dass eine optimale Blutzucker-



einstellung die Mikroalbuminrate der Patienten um 30% verringert (UKPDSG 1998). Weiterhin sollte neben der Stoffwechselkontrolle der Blutdruck optimal eingestellt sein. Um das Risiko einer Mikroalbuminurie zu minimieren, sollten Blutdruckwerte unterhalb 130/80 angestrebt werden (Bakris 2001).

### **1.3 Bisheriger Kenntnisstand**

#### **1.3.1 Synthese und Metabolismus von Dopamin**

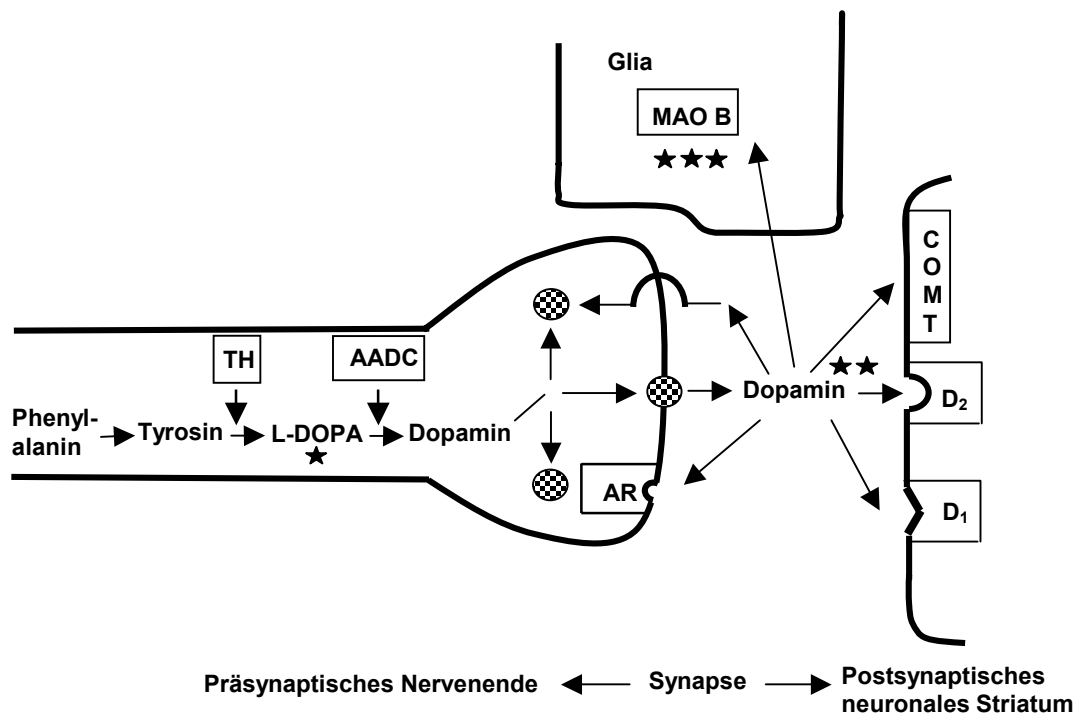
Im Jahre 1910 berichteten unabhängig voneinander Mannich und Jacobson sowie Barger und Ewins erstmals über die Synthese von 3,4-Dihydroxyphenylethylamin, kurz Dopamin. Die Transmitter Dopamin, Noradrenalin und Adrenalin sind Produkte eines gemeinsamen Biosynthesewegs, der von der aromatischen Aminosäure Tyrosin bzw. des essentiellen Phenylalanins ausgeht. Durch die Phenylalaninhydroxylase wird aus Phenylalanin Tyrosin gebildet. Das durch Tyrosinhydroxylase gebildete L-Dihydroxyphenylalanin (L-DOPA) wird im nächsten Schritt durch eine Decarboxylase für aromatische L-Aminosäuren (AADC) in Dopamin (3,4-Dihydroxyphenylethylamin) umgewandelt. Zur Bildung von Noradrenalin aus Dopamin wird die Monooxygenase Dopamin- $\beta$ -Hydroxylase benötigt. Mit Hilfe der Phenylethanolamin-N-methyltransferase erfolgt als letzte Reaktion die N-Methylierung von Noradrenalin zu Adrenalin. Dopamin gehört somit, wie Noradrenalin und Adrenalin, in die Gruppe der Katecholamine.

Dopamin wird in adrenergen und dopaminergen Neuronen sowie im Nebennierenmark gebildet. Sowohl in den sympathischen Nervenendigungen als auch im Nebennierenmark werden Katecholamine in spezifischen Granula gespeichert. Bei der Katecholaminsekretion wandern die Sekretgranula zur Zellmembran und werden durch Depolarisation in den synaptischen Spalt ausgeschüttet.

Die Inaktivierung des Transmitters erfolgt einerseits durch präsynaptische Wiederaufnahme in die freisetzende Nervenendigung und andererseits durch

eine Kombination von Oxidation und Methylierung zu biologisch inaktiven Produkten. Die am Abbau beteiligten Enzyme sind die Monoaminoxidase (MAO) und die Katechol-O-Methyltransferase (COMT). Als Hauptabbauprodukt wird die 3-Methoxy-4-hydroxymandelsäure (Vanilinmandelsäure) gebildet, die mit dem Harn ausgeschieden wird (Petrides 1990).



Die proximalen Tubuluszellen der Niere stellen einen weiteren wichtigen Ort der Dopaminsynthese dar. L-DOPA wird glomerulär filtriert und aus dem Tubuluslumen über apikale Natrium-abhängige Transporter in die proximalen Tubuluszellen aufgenommen (Soares-da-Silva et al. 1994). Das in den Tubuluszellen in hoher Konzentration vorkommende L-AADC decarboxyliert die Vorstufe L-DOPA zu Dopamin (Baines und Chan 1980). Wie Dopamin in den Tubuluszellen gespeichert wird und welche Mechanismen der Speicherung zugrunde liegen, ist bisher weitgehend ungeklärt.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung einer dopaminergen nigrostriatalen Synapse

Im präsynaptischen Nervenende wird aus Phenylalanin über Tyrosin und L-DOPA der Transmitter Dopamin hergestellt. Dopamin wird freigesetzt und bindet postsynaptisch an den  $D_1$  Rezeptoren und  $D_2$  Rezeptoren und präsynaptisch an die Autorezeptoren, die den  $D_2$  Rezeptoren entsprechen. Dopamin wird aus dem synaptischen Spalt über einen

Rückaufnahmemechanismus entfernt bzw. über die Enzyme Monoaminoxidase B (MAO B) und Catechol-O-Methyltransferase (COMT) abgebaut. Die Sterne zeigen die unterschiedlichen Wirkorte von L-DOPA, D<sub>2</sub> Agonist und MAO B-Hemmern. (Modifiziert nach Brandt et al. 1998).

AR	= Autorezeptor
COMT	= Catechol-O-methyltransferase
D <sub>1</sub>	= Dopamin D <sub>1</sub> Rezeptor
D <sub>2</sub>	= Dopamin D <sub>2</sub> Rezeptor
AADC	= Decarboxylase für L-Aminosäuren
L-DOPA	= L-Dihydroxyphenylalanin
MAO B	= Monoaminoxidase B
TH	= Tyrosinhydroxylase
★	= Wirkung von L-DOPA
★★	= Wirkung von Dopamin-Agonisten
★★★	= Wirkung von Monoaminoxidase B-Hemmern
	= Vesikel
	= Dopamin Rückaufnahme

### 1.3.2 Wirkungen von Dopamin

Dopamin ist an vielen Regulationsvorgängen im Organismus beteiligt. Im ZNS ist Dopamin ein wichtiger Neurotransmitter. Die größte dopaminerge Zellgruppe befindet sich in der Pars compacta der Substantia nigra (Petrides 1990, Trepel 1995). Die Atrophie melaninhaltiger Zellen in der Substantia nigra bedingt eine verminderte Dopaminsynthese und führt zum klinischen Bild des Morbus Parkinson (Masuhr und Neumann 1998). Wahrscheinlich ist bei der Pathogenese der Schizophrenie eine Überaktivität der dopaminergen mesolimbischen Projektionen beteiligt. Für diese Zusammenhänge spricht auch die klinisch etablierte Erfahrung, dass mit Medikamenten, die die Aktivität des Dopamins an den postsynaptischen Rezeptoren im limbischen System herabsetzen (Dopaminantagonisten), die Symptomatik dieser psychisch Kranken erheblich gebessert werden kann (Trepel 1995). Weiterhin ist Dopamin an der Steuerung von Bewegungsabläufen, der Emotionen und im kognitiven Bereich beteiligt. Auch Einflüsse auf das Brechzentrum, die Körpertemperatur,

sowie auf die Hormonsynthese und Hormonfreisetzung werden dem Dopamin zugeschrieben (Jose et al. 1992, Missale et al. 1998).

Die peripheren kardialen Wirkungen zeigen sich in einer Steigerung der Kontraktionsfähigkeit des Myokards. Die Durchblutung der Mesenterialgefäße wird durch Dopamin gesteigert. Eine weitere häufig beschriebene renale Wirkung des exogenen Dopamins ist die Steigerung der Natriurese (Meyer et al. 1967, Olsen et al. 1990, Puschett et al. 1992), wobei die vermehrte Natriumausscheidung hauptsächlich der Stimulation der D<sub>1</sub> Rezeptorfamilie zugeschrieben wird (Baines et al. 1986). Jedoch muss darauf hingewiesen werden, dass die Wirkung des Dopamins dosisabhängig ist (Mühlbauer 1996).

Eine dopaminerge Wirkung tritt bei *niedriger Dosierung* (0,5 bis ca. 1 µg/kg/min) auf. Durch Vasodilatation beeinflusst Dopamin die renale und mesenteriale Hämodynamik. Indem der renale Gefäßwiderstand verringert wird, kommt es zu einer Steigerung des renalen Plasmaflusses (RPF) und der GFR. Möglicherweise hat Dopamin noch einen zusätzlichen Effekt auf die Bürstensaumzellen im proximalen Tubulussystem. Felder et al. (1990) und Aperia et al. (1987) konnten in vitro zeigen, dass Dopamin den Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Antiport sowie die Aktivität der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase hemmt und so dem Dopamin eine natriuretische Wirkung zugesprochen werden kann.

Bei *mittlerer Dosierung* (ca. 3 µg/kg/min) von Dopamin wird eine β-adrenerge Wirkung beobachtet. Eine positive Inotropie macht sich durch Zunahme des Schlagvolumens und einen leichten systolischen Blutdruckanstieg bemerkbar. Die β-adrenerge Wirkung wirkt sich auch auf die Niere aus. Hier wird in diesem Dosisbereich eine Antidiurese beobachtet, was auf eine verstärkte Rückresorption von Natrium aus dem Lumen des Tubulussystems zurückzuführen ist (Puschett und Winaver 1992). Durch den β-adrenergen Effekt wird zusätzlich die Reninfreisetzung stimuliert, was wiederum eine Aktivierung des Angiotensin-Aldosteron-Systems mit sich bringt.

Wird Dopamin in *hoher Dosierung* verabreicht (>10 µg/kg/min), werden die α-Adrenozeptoren stimuliert und es überwiegt der vasokonstriktorische Effekt, der zu einem Anstieg des peripheren Widerstandes führt (Hoffman und Lefkowitz

1990). Die daraufhin auftretende antidiuretische Wirkung kommt durch den Abfall des renalen Blutflusses zustande.

Wird über einen längeren Zeitraum Dopamin verabreicht, läßt die Wirkung nach, was auf eine „down-regulation“ der Rezeptoren zurückzuführen ist. Diese auftretende Tachyphylaxie konnte Omre et al. (1973) an hypertensiven Patienten zeigen. Die durch Dauerinfusion anfangs gesteigerte GFR normalisierte sich innerhalb von zwei Tagen.

Die Funktion des endogenen renalen Dopamins ist noch weitgehend ungeklärt. Es wird von Neuronen im ZNS und im proximalen Tubulussystem der Niere synthetisiert (Baines und Chan 1980). Einerseits wurde beobachtet, dass unter Salzbelastung die renale Dopaminausscheidung erhöht ist, was durch die Hemmung der tubulären Natriumrückresorption erklärt werden kann (Lee 1993). Andererseits konnte in einer Studie an Ratten gezeigt werden, dass durch orale Proteinzufuhr die renale Dopaminproduktion unabhängig von der Salzbilanz beeinflusst wird (Mühlbauer und Osswald 1992).

### **1.3.3 Dopaminrezeptoren**

Die Dopaminwirkung wird über spezifische Rezeptoren vermittelt. Bis vor wenigen Jahren wurden zwei Rezeptortypen unterschieden die im zentralen Nervensystem (ZNS) als D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> (Kebabian und Calne 1979) sowie in der Peripherie als DA<sub>1</sub> und DA<sub>2</sub> (Goldberg und Kohli 1983) bezeichnet wurden. Molekularbiologische Untersuchungen haben weiterhin fünf verschiedene Rezeptorsubtypen identifiziert, die entsprechend ihrer pharmakologischen Eigenschaften in D<sub>1</sub>-ähnliche (D<sub>1</sub>, D<sub>5</sub>) und D<sub>2</sub>-ähnliche (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub>, D<sub>4</sub>) Familien unterteilt werden (Gingrich und Caron 1993).

Werden Rezeptoren der D<sub>1</sub>-ähnlichen Familie stimuliert, kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptorproteins, was zu einer Aktivierung eines membranständigen G-Proteins (Guanin-Nucleotid-bindendes Protein) führt. Durch die nun anschließend aktivierte Adenylatcyclase (AC) kommt es zur vermehrten Bildung des wichtigen intrazellulären Botenstoffs cAMP (cyclisches

Adenosinmomonophosphat). cAMP trägt wiederum zur Aktivierung der Proteinkinase A bei, die nach anschließender Phosphorylierung spezifische Zellfunktionen auslöst (Kebabian und Calne 1979).

Die Wirkung der D<sub>2</sub>-ähnlichen Rezeptoren, so Missale et al. (1998), scheint jedoch über verschiedene Signaltransduktionswege vermittelt zu werden. Unter anderem wird ein inhibitorischer Effekt auf die AC beschrieben. Griffon et al. (1997) konnte ebenfalls feststellen, dass in D<sub>3</sub> Rezeptor exprimierten Zellkulturen die AC sowohl gehemmt als auch stimuliert werden konnte. Über die Signalkopplung von D<sub>3</sub> und D<sub>4</sub> Rezeptoren sind die Kenntnisse jedoch noch unvollständig.

Dopaminrezeptoren sind in verschiedenen Regionen des Organismus lokalisiert. So konnten D<sub>1</sub> Rezeptoren, die postsynaptisch lokalisiert sind, in vielen Gefäßgebieten, vor allem an den glatten Gefäßmuskelzellen der Niere, des Mesenteriums und der Koronararterien nachgewiesen werden (Toda 1983). Immunhistochemisch wurden D<sub>1</sub> Rezeptoren im juxtaglomerulären Apparat, im proximalen Tubulus apikal und basolateral, im distalen Tubulus und im Sammelrohr gefunden (O'Connell et al. 1995).

Die D<sub>2</sub>-ähnliche Rezeptorfamilie, die sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert ist, wurde schon Ende der siebziger Jahre im ZNS nachgewiesen (Kebabian et al. 1979). Gao et al. (1994) und Hussain und Lokhandwala (1998) konnten diese Rezeptoren unter anderem noch in den Glomeruli, im proximalen Tubulus und in den renalen Gefäßen lokalisieren.

Die D<sub>3</sub> Rezeptoren konnten anfang der neunziger Jahre kloniert werden (Sokoloff et al. 1992). Das humane D<sub>3</sub> Rezeptorgen wurde der q13.3-Bande zugeordnet. Die cDNA für den D<sub>3</sub> Rezeptor codiert für ein Protein, dessen Struktur aus 7 transmembranen Domänen besteht, was darauf hinweist, dass der D<sub>3</sub> Rezeptor zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren gehört. Er ist mit 52% homolog zu den D<sub>2</sub> Rezeptoren. Wenn nur die transmembranen Domänen betrachtet werden, erhöht sich die Homologie auf 78%.

Nachweisen konnte Aretha et al. (1995) den D<sub>3</sub> Rezeptor im ZNS im Bereich des Nucleus caudatus und Striatum, im Tuberculum olfactorium und in Teilen

des limbischen Systems. Eine erhöhte Rezeptordichte konnte auch im Hippocampus und Hypothalamus beobachtet werden (Sokoloff et al. 1990).

In Rattennieren konnte die Lokalisation der D<sub>3</sub> Rezeptoren durch immunhistochemische Untersuchungen in der Peripherie nachgewiesen werden (O'Connell et al. 1998). Die D<sub>3</sub> Rezeptoren präsentieren sich in den Glomeruli und dort an den Podozyten, an der apikale Seite des proximalen Tubulus und in der Nierenarterie. Nicht nachweisbar waren sie im Nierenmark und in mesangialen Zellen.

#### **1.3.4 Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren und diabetische Hyperfiltration**

Die glomeruläre Hyperfiltration in der Frühphase des Diabetes mellitus trägt mit zur Entstehung der diabetischen Nephropathie bei (Mogensen 1986). Es konnte in der eigenen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass endogenes Dopamin an der Aminosäuren bedingten Hyperfiltration über Rezeptoren der D<sub>2</sub> Unterfamilie beteiligt ist (Mühlbauer et al. 1994). Mit den D<sub>2</sub>-ähnlichen Rezeptorantagonisten Domperidon und S(-)-Sulpirid ließ sich eine Hemmung der Aminosäuren-induzierten Steigerung der GFR nachweisen (Luippold und Mühlbauer 1998). Weitere Versuche zeigten, dass bei diabetische Ratten, die mit einem peripher wirkenden D<sub>3</sub> Rezeptorantagonisten BSF-135170 behandelt wurden, sich die pathologisch gesteigerte GFR wieder normalisierte (Luippold et al. 2001).

Auf welche Art und Weise D<sub>3</sub> Rezeptoren an der diabetischen Hyperfiltration beteiligt sind, soll in der vorliegenden Arbeit an D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen (KO) untersucht werden.

#### **1.3.5 Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren und Natriumexkretion**

Schon 1964 wurde der natriuretische und diuretische Effekt des Dopamins beobachtet (McDonald et al. 1964). Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor an der Regulation des Salz- und

Volumenhaushalts beteiligt ist. Mit Hilfe von Immunhistochemie und Immunzytochemie lässt sich die Lokalisation des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors in der Niere nachweisen (O'Connell et al. 1995, O'Connell et al. 1998). Auch durch autoradiographische Techniken konnten Dopaminrezeptoren in der Niere nachgewiesen werden (Barili et al. 1997, Amenta 1997). In weiteren funktionellen Untersuchungen konnte unter Verwendung des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoragonisten R(+)-7-hydroxy-dipropylaminotetralin (7-OH-DPAT) (Levesque 1996) an Ratten eine dosisabhängige GFR-Steigerung mit einhergehender Diurese und Natriurese beobachtet werden (Mühlbauer et al. 2000). Durch Mikropunktionsuntersuchungen konnte gezeigt werden, dass die GFR-Steigerung durch eine postglomeruläre Vasokonstriktion und Reduktion des renalen Blutflusses hervorgerufen wurde (Luippold et al. 1998). Durch eine chronische renale Denervierung konnten die Effekte, die durch Gabe von 7-OH-DPAT verursacht wurden, größtenteils verhindert werden (Luippold et al. 1999). Dies zeigt, dass die renale Innervierung unter anderem Einfluss auf die Vermittlung der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptorwirkung haben könnte.

In einer weiteren Studie konnten die Effekte, die durch 7-OH-DPAT ausgelöst wurden durch den selektiven Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor Antagonisten 5,6-dimethoxyl-2-(di-n-propylamino)-indane (U-99194A) inhibiert werden, was jedoch durch den D<sub>2</sub> Rezeptorantagonisten S(-)-Sulpirid nicht möglich war (Waters et al. 1993). Zusammengefasst zeigen diese Studien, dass der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor modulierend auf die glomeruläre und tubuläre Nierenfunktion einwirkt.

### **1.3.6 Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren und Hypertension**

Die essenzielle Hypertonie trägt als wichtigster Risikofaktor zur Entstehung von Herzinfarkt, zerebraler Ischämie und terminaler Niereninsuffizienz bei (Lifton 1996). Eine genetische Disposition reicht jedoch nicht aus, um die Entstehung der essenziellen Hypertonie erklären zu können. Es wird angenommen, dass



sowohl hämodynamische und renale Mechanismen als auch psychische und soziale Faktoren zur Entstehung des Bluthochdrucks beitragen können.

Dopamin greift über unterschiedliche Rezeptoren regulatorisch in das kardiovaskuläre und renale System ein (Jose et al. 1992). Eine primär vasodilatatorische Wirkung haben Rezeptoren der D<sub>1</sub>- und der D<sub>2</sub>-Familie, die in renalen, mesenterialen, pulmonalen, koronaren und zerebralen Widerstandsgefäßen nachgewiesen wurden (Jose et al. 1999). Die D<sub>2</sub> Rezeptorfamilie (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> und D<sub>4</sub>) scheint vor allem im zentralen Nervensystem von Ratten eine Rolle bei der Blutdruckregulation zu spielen (Lin und Yang 1994).

Dopamin scheint an der Langzeitregulation des Gesamtkörperwassers beteiligt zu sein (Guyton 1980). Indirekt könnte der Blutdruck über das Renin-Angiotensin-System, das antidiuretische Hormon (ADH) sowie dem atrialen natriuretischen Faktor (ANF) und Aldosteron beeinflusst werden. Bei Ratten konnte die ADH-Ausschüttung durch Rezeptoren der D<sub>2</sub> Rezeptorfamilie stimuliert und durch Rezeptoren der D<sub>1</sub> Rezeptorfamilie inhibiert werden (Nagahama et al. 1986, Racke et al. 1986). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass über Rezeptoren der D<sub>2</sub> Rezeptorfamilie die Aldosteronsekretion sowohl direkt aus der Nebennierenrinde (Zellen der Zona glomerulosa) als auch indirekt über das zentrale Nervensystem inhibiert werden kann. Welcher der beiden Mechanismen vorliegt, scheint jedoch speziesabhängig zu sein (Carey und Sen 1986). Die Stimulation der Renin- und Aldosteronsekretion könnte in gleicher Weise an die D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> Rezeptoreffekte gekoppelt sein. Vermutlich mitbedingt durch natriuretische und hypotone Effekte wurde einerseits eine Steigerung der Reninfreisetzung durch Stimulation der Rezeptoren der D<sub>1</sub> Rezeptorfamilie (D<sub>1</sub> und D<sub>5</sub>) beobachtet (Yamaguchi et al. 1997), während andererseits die Stimulation der Rezeptoren der D<sub>2</sub> Rezeptorfamilie (D<sub>2</sub>, D<sub>3</sub> und D<sub>4</sub>) inhibierend auf die Reninsekretion wirken können (Sanada et al. 1997, Jose et al. 1997). Die Rezeptorfunktionen bei der Reninausschüttung scheinen außerdem vom Zustand des Natriumhaushaltes abhängig zu sein (Williams et al. 1985, Bertorello et al. 1988).

In wie weit der D<sub>1</sub> Rezeptor an der Entstehung der Hypertonie beteiligt ist, wurde von Albrecht et al. (1996) untersucht. Im Tierexperiment konnte unter Verwendung von D<sub>1</sub> Rezeptor Knockout Mäusen eine diastolische und systolische Blutdruckerhöhung beobachtet werden. Die höchsten Blutdruckwerte wurden bei Knockout Tieren, gefolgt von heterozygoten Mäusen gemessen. Bei den Wildtyptieren wurden Blutdruckwerte im normotensiven Bereich beobachtet. In Radioligandenstudien konnte weiterhin gezeigt werden, dass im proximalen Tubulussystem der Niere die Dichte von D<sub>1</sub> Rezeptoren am höchsten ist (Burgess et al. 1993). Diese D<sub>1</sub> Rezeptoren könnten möglicherweise in enger Verbindung mit der durch Dopamin beobachteten Natriuresis stehen (Jose et al. 1992).

Auch bei D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen konnte eine Hypertonie beobachtet werden (Asico et al. 1998). Sowohl die Knockout Mäuse als auch die heterozygoten Tiere wiesen in gleichem Maße erhöhte diastolische und systolische Blutdruckwerte auf. Normotensive Blutdruckwerte wurden auch hier bei den Wildtyptieren gemessen. Die höchste Dichte der D<sub>3</sub> Rezeptoren konnte in den juxtaglomerulären Zellen nachgewiesen werden (Sanada et al. 1997). Da durch Stimulation der D<sub>2</sub> Rezeptorfamilie (zu der der D<sub>3</sub> Rezeptor zählt) eine Reduktion der Reninsekretion zu beobachten ist, wurde von Asico et al. (1998) die renale Reninaktivität bei den Versuchstieren gemessen. Es zeigte sich, dass die Reninaktivität mit den Blutdruckwerten der Tiere korreliert. Die Tiere, die hohe Blutdruckwerte aufzeigten, hatten eine gesteigerte Reninaktivität, Tiere mit niedrigen oder normotonen Blutdruckwerten entsprechend niedrige bzw. normale Reninaktivität.

Außerdem wurde in dieser Studie in Folge einer akuten Salzbeladung eine vermehrte Natriuresis und eine gesteigerte Urinflussrate sowohl bei den D<sub>3</sub> Knockout Mäusen als auch den heterozygoten Mäusen beobachtet. Eine Stunde nach Salzbeladung jedoch wurde bei den Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor defizienten Tiere eine Na<sup>+</sup>-Menge gemessen, die deutlich unter dem ermittelten Basalwert lag. Dagegen konnte bei den heterozygoten Nagern eine noch anhaltend gesteigerte Natriumausscheidung beobachtet werden. Die gesteigerte Reninaktivität könnte somit bei einem defekten D<sub>3</sub> Rezeptor-System

zu einer vermehrten Natrium-Retention führen, die wiederum die Entwicklung einer reninabhängigen Hypertonie begünstigen könnte. In einer weiteren Studie konnte bei den selben Versuchsgruppen gezeigt werden, dass nach Behandlung mit einem Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten ein Blutdruckabfall in allen Versuchsgruppen zu beobachten war, wobei die Wildtyptiere am schnellsten die Blutdruckausgangswerte erreichten. Die Knockout Tiere und heterozygoten Tiere erreichten die Blutdruckausgangswerte erst mit einer zeitlichen Verzögerung.

#### **1.4 Eigene Fragestellung**

Durch Experimente an narkotisierten Dopamin D<sub>3</sub> Knockout Mäusen und den entsprechenden Wildtyptieren im Clearanceversuch, an wachen Mäusen im Stoffwechsellkäfig und der Schwanzdruckmessung an wachen Tieren, sollen folgende Fragestellungen untersucht werden:

Ist der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor an der Regulation der renalen Hämodynamik beim STZ-induziertem Diabetes mellitus beteiligt?

Sind Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren an der Regulation des Natriumhaushaltes beteiligt?

Hat der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor Einfluss auf die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie?

Welchen Einfluss hat die Insulinsubstitution auf die diabetische Hyperfiltration?

## **2. MATERIAL UND METHODEN**

### **2.1 Versuchstiere**

#### **2.1.1 Generierung von D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen**

Für pharmakologische Untersuchungen eignen sich Mäuse als experimentelles Modellsystem. Die für diese vorliegende Arbeit benötigten genetisch veränderten D<sub>3</sub> Knockout Mäuse wurden durch eine zielgerichtete Veränderung im D<sub>3</sub> Rezeptor-Genlocus anhand homologer Rekombination in embryonalen Stammzellen im Sinne eines „gene-targeting“ hergestellt. Der komplette Funktionsverlust des D<sub>3</sub> Rezeptorgens wurde durch Ersetzen des Promotors und des ersten Exons mit einem Selektionsmarkergen (Neomycinresistenz) erreicht. Anschließend wurden die Klone mittels Antibiotikagabe (Neomycin) selektiert und auf die Anwesenheit der Mutation am gewünschten Genort mittels PCR-Methode untersucht. Die identifizierten Zellklone wurden vermehrt und in Embryonen injiziert. Die Übertragung der Embryonen erfolgt im Stadium der Blastozyste in den Uterus scheinchwangerer Ammentiere. Nach ungefähr drei Wochen werden die Nachkommen (F0-Generation) geboren, von denen ungefähr 20-30% das Transgen in ihrem Genom tragen. Diese entstandenen heterozygoten Tiere werden nun miteinander verpaart, um schließlich (frühestens in der F2-Generation) homozygote Mutanten zu erhalten. Um Unterschiede im Background der Tiere zu vermeiden, wurden die heterozygoten Tiere mit B16 Mäusen bis zur 6. Generation zurückgekreuzt. Die homozygoten Tiere wurden mit Hilfe molekularbiologischer Methoden (PCR) der Schwanzspitzenbiopsie identifiziert. (Luippold et al. 2004; Kulozik A.E; Hentze MW; Hagemaiier C; Bartram CR; Molekulare Medizin Grundlagen-Pathomechanismen-Klinik 2000). Die Generierung der Mäuse erfolgte durch die Firma Abbott GmbH & Co. KG, Ludwigshafen, Germany.

### 2.1.2 Tierhaltungsbedingungen

Die Experimente wurden an männlichen 12 bis 15 Wochen alten Mäusen (Fa. Abbott, Ludwigshafen) durchgeführt. Bei Anlieferung hatten die Tiere ein Gewicht zwischen 18 und 25 g. Sie wurden in Makrodex<sup>®</sup>-Standardkäfigen (Fa. Ehret, Freiburg) bei einer Temperatur von 21°C und 57% Luftfeuchtigkeit sowie einem 12-stündigem Tag-Nacht-Zyklus unter kontrollierten Bedingungen im institutseigenen Tierstall gehalten. Pro Käfig befanden sich zwei bis fünf Mäuse, die jederzeit freien Zugang zu Leitungswasser und Futter (Standard-Nagerfutter Altromin C-1320<sup>®</sup>, Fa. Altromin, Lage) hatten. Die Eingewöhnungszeit der Tiere bis zum Versuchsbeginn betrug drei Wochen.

### 2.2 Versuchsgruppen und Anzahl der Versuchstiere

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende sechs Versuchsgruppen untersucht:

Anzahl n der Versuchstiere im Stoffwechselkäfigversuch (SWK)

Anzahl n der Versuchstiere im Clearanceversuch (CL)

CON-WT	nicht diabetische, nicht behandelte Wildtyp-Mäuse als Kontrollgruppe SWK n = 10;      CL n = 9
CON-KO	nicht diabetische, nicht behandelte D <sub>3</sub> Knockout Mäuse als Kontrollgruppe SWK n = 12;      CL n = 12
DM-WT	diabetische, nicht behandelte Wildtyp-Mäuse als hyperglykämische Diabetes-Gruppe SWK n = 10;      CL n = 9

DM-KO	diabetische, nicht behandelte Dopamin D <sub>3</sub> Knockout Mäuse als hyperglykämische Diabetes-Gruppe SWK n = 12;      CL n = 9
LIN-DM-WT	diabetische, mit Insulin behandelte Wildtyp-Mäuse als normoglykämische Diabetes-Gruppe SWK n = 8;      CL n = 8
LIN-DM-KO	diabetische, mit Insulin behandelte Dopamin D <sub>3</sub> Knockout Mäuse als normoglykämische Diabetes-Gruppe SWK n = 8;      CL n = 8

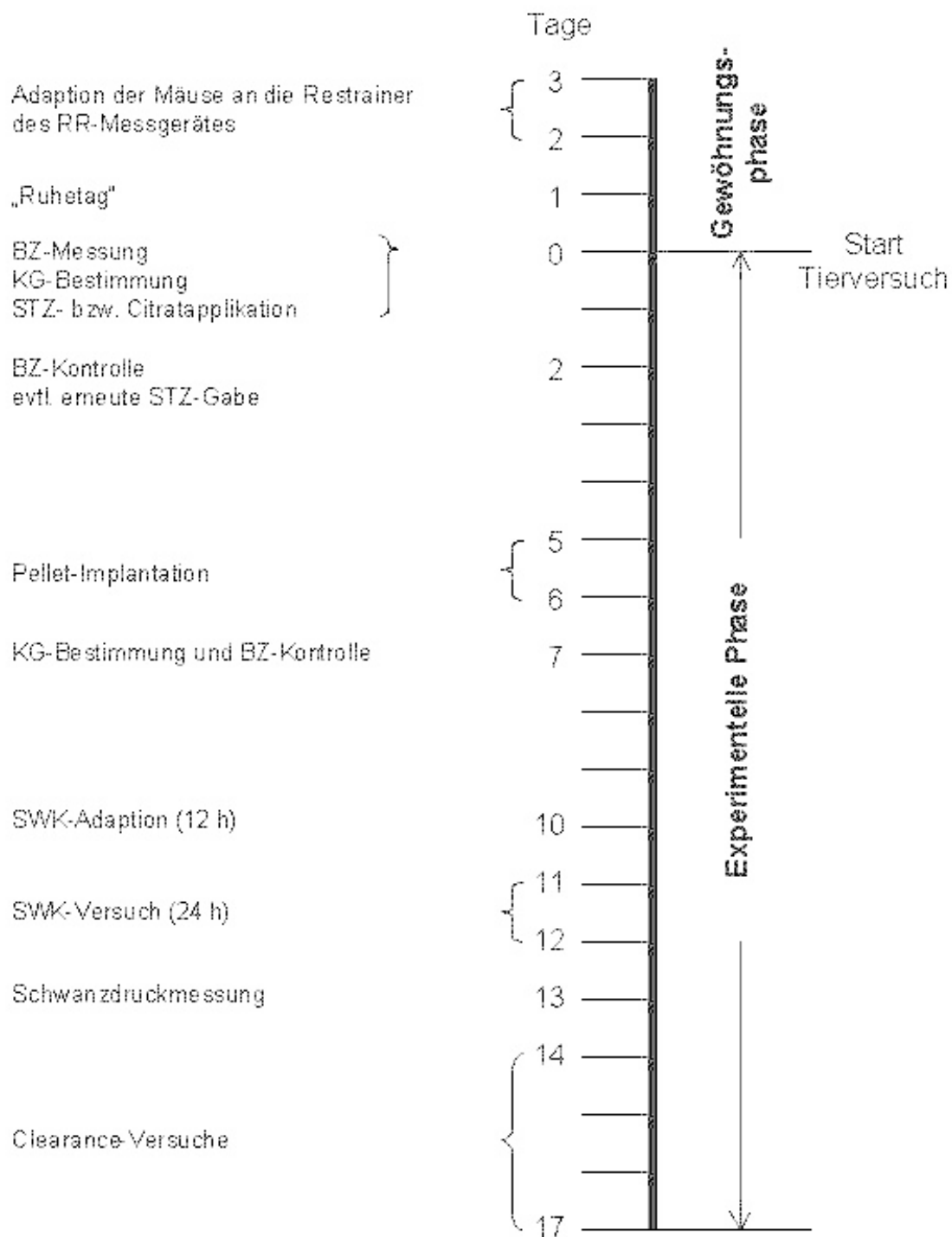
Bei den Stoffwechselkäfigversuchen (SWK) wurden mehr Tiere untersucht als bei den Clearanceversuchen (CL), da intraoperativ einige Tiere verstarben.

## **2.3 Experimenteller Ablauf**

### **2.3.1 Versuchsdesign und zeitlicher Ablauf der Versuche**

Die Tiere der einzelnen Versuchsgruppen wurden in einem Zeitraum von 14 bis 17 Tagen untersucht. Am zweiten und dritten Tag vor Beginn des eigentlichen Versuchs, wurden die Tiere an die Schwanzdruckmessung gewöhnt. Vor Induktion des Diabetes mellitus, bzw. vor Citrat-Applikation der Vehikelgruppen wurde das Körpergewicht der Tiere sowie der Blutglucosewert bestimmt (Tag 0). Weitere Körpergewichts (KG)- und Blutglucose (BZ)-bestimmungen erfolgten am zweiten und siebten Tag. Am 10. Versuchstag wurden die Mäuse an die Bedingungen im Stoffwechselkäfig gewöhnt, der eigentliche Stoffwechselkäfigversuch (24 Stunden) erfolgte vom 11. auf den 12. Tag. Tags darauf wurde die Schwanzdruckmessung durchgeführt und anschließend vom 14. bis 17. Tag fanden die Clearanceversuche an narkotisierten Tieren statt. Bei den Versuchsgruppen LIN-DM-WT und LIN-DM-KO erfolgte eine Insulin-Pelletimplantation am 5. bzw. am 6. Versuchstag.

## Versuchsdesign



**Abb. 5:** Schematische Darstellung des Versuchsdesigns und des zeitlichen Ablaufs.

### **2.3.2 Induktion eines Diabetes mellitus**

Unmittelbar vor Induktion des Diabetes mellitus wurde bei den Tieren das Körpergewicht und der Blutglucosewert bestimmt. Danach bekamen die Tiere eine Einzeldosis Streptozotocin (STZ, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim) von 120 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert, wobei STZ zuvor in Citratpuffer (0,210 g Zitronensäure in 10 ml Aqua bidest., pH 4,0) gelöst wurde. Die Mäuse erhielten eine weitere Einzeldosis STZ von 60 mg/kg Körpergewicht, falls sich nach 48 Stunden kein deutlicher Anstieg des Blutglucosewertes gezeigt hatte. Die Kontrollgruppen, die als Vehikelgruppen dienten, erhielten die entsprechende Menge Citratpuffer intraperitoneal injiziert. Die diabetischen Mäuse wiesen Blutglucosewerte zwischen 350 und 650 mg/dl auf, die Kontrollgruppen waren weiterhin normoglykämisch. Auch der im Verlauf auftretende Gewichtsverlust, Polydipsie, Polyphagie sowie Polyurie waren ein Zeichen des Diabetes mellitus. Die CON-Gruppen zeigten dagegen im Verlauf ein konstantes Körpergewicht und wiesen normale Trink- und Fressgewohnheiten auf.

### **2.3.3 Applikation von Insulin-Pellets**

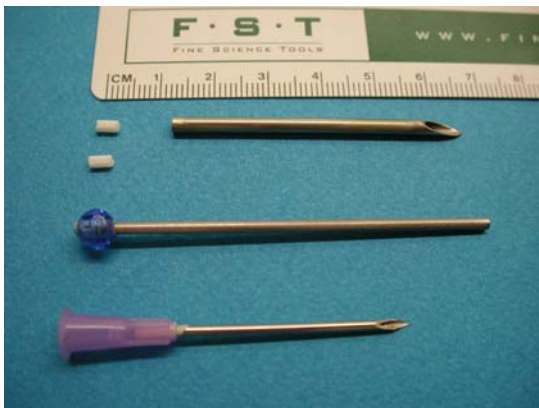
5 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus wurde bei den vorgesehenen Gruppen (LIN-DM-WT und LIN-DM-KO) eine Insulintherapie begonnen. Dazu wurden mikrokristallisierte Palmitinsäurepellets (Linbit™ for mice ©Linshin, Ontario, Kanada) (s. Abb. 4), die bovines Insulin enthalten, den Mäusen in die Nackenregion implantiert. Die Insulin-Abgaberate beträgt laut Herstellerangaben 0,1 U /Tag /Pellet.

Die Implantation der Insulinpellets erfolgte in Kurzzeitnarkose mit Äther. Zuerst wurde die Maus in ein Glasgefäß gesetzt, in dem sich ein in Äther getränktes Zellstofftuch befand. Nach ca. 30 Sekunden war die Maus narkotisiert und wurde herausgenommen. Es erfolgte die Desinfektion des Applikationsortes mit Betaisodona®-Lösung (Mundipharma, Limburg) (s. Abb. 5). Anschließend



wurde durch einem Trokar mit einem Stab die vorgesehene Menge an Pellets durchgeschoben und in die Nackenregion implantiert (s. Abb. 6 und Abb. 7). Die Anzahl der Pellets, die jede Maus erhielt, errechnete sich nach dem Körpergewicht und der Höhe des Blutglucosewertes, so dass pro Maus zwischen 0,5 und 2,5 Pellets verabreicht wurden. Die Pellets haben einen Durchmesser von 2 mm, eine Länge von 3 mm und ein Gewicht von  $13\pm 2$  mg, so dass ein Wundverschluss nicht nötig war. Die Mäuse erholten sich rasch (nach 2-3 Minuten). Der Eingriff wurde von allen Tieren gut und komplikationslos vertragen.

Waren nach drei bis vier Tagen die Blutglucosewerte mit 90-180 mg/dl nicht im Normbereich, wurde erneut 0,5 bis 1 Pellet implantiert.



**Abb. 6: Instrumente zur Pelletimplantation**



**Abb. 7: Desinfektion des Applikationsorte**



**Abb. 8: Punktion mit einem Trokar**



**Abb. 9: Implantation der Pellets**

## 2.3.4 Schwanzdruckmessung an Mäusen

### 2.3.4.1 Gewöhnung der Mäuse an die Bedingungen

Um realistische Blutdruckwerte zu erhalten, wurden die Tiere vor der eigentlichen Messung an die sogenannten Restrainer und den Messvorgang gewöhnt (s. Abb. 8). Deshalb wurden die Mäuse mehrere Tage zur selben Tageszeit einzeln in die aus Plexiglas bestehenden Restrainer gesetzt, die Druckmanschetten am proximalen Ende des Schwanzes angelegt und die Blutdruckmessung mehrmals simuliert. Die Gewöhnung hatte den Zweck, mögliche Stressfaktoren bei der eigentlichen Messung zu reduzieren.



*Abb. 10: Maus im Restrainer*

### 2.3.4.2 Vorbereitung der Messung

Zur Blutdruckmessung, die in einem auf 32°C erwärmten Plexiglaskasten durchgeführt wurde, befanden sich die Tiere in den größenverstellbaren Restrainern. Es folgte eine Adaptionszeit von ungefähr 10 Minuten, dabei hatten die Mäuse die Möglichkeit, sich innerhalb des Restrainers zu bewegen, um eine bequeme Position einzunehmen. Während der Adaptionszeit wurde das Blutdruckmessgerät (Model 179 Blood pressure analyzer, Fa. Hugo Sachs Elektronik-Harvard, March-Hugstetten) kalibriert.

### **2.3.4.3 Schwanzdruckmessung**

Unmittelbar vor der Messung wurde der Schieber des Restrainers zur Ruhigstellung der Tiere enger gestellt. Mit konstanter Geschwindigkeit wurde zunächst die Staumanschette aufgeblasen und nach Erreichen des vorher festgelegten Maximaldruckes (180 mmHg) langsam wieder entlastet. Die erste registrierte Pulswelle, die vom Gerät detektiert wurde, konnte auch optisch wahrgenommen werden und als systolischer Wert des Blutdrucks erfasst und aufgezeichnet werden. Anhand des Verlaufs der Blutdruckkurve konnte der diastolische Wert und der mittlere arterielle Druck (MAP) vom Messgerät und einen Thermoschreiber, der im Messgerät integriert ist, ermittelt und dokumentiert werden. Pro Versuchstier wurden drei bis fünf Messungen durchgeführt und daraus die Mittelwerte errechnet.

### **2.3.5 Stoffwechselkäfigversuche**

#### **2.3.5.1 Versuchsablauf**

Jedes Tier aller Versuchsgruppen hat 24 Stunden (Beginn 8:00 Uhr) in einem Stoffwechselkäfig (Techniplast<sup>®</sup>, Fa. Ehret, Emmendingen) verbracht. Die Mäuse saßen einzeln auf einem Gitterrost und hatten freien Zugang zu Trinkwasser (Leitungswasser) und Futter (Altromin 1320 Altromin, Lage). Ein darunter liegendes engmaschiges Drahtgitter fing den Kot der Tiere auf, der Urin konnte über einen konusförmigen Trichter aufgefangen und gesammelt werden. Alle Tiere wurden einen Tag vor Versuchsbeginn für 12 Stunden an die Bedingungen im Stoffwechselkäfig gewöhnt.

### **2.3.5.2 Bestimmung von Tiergewicht, Futtermenge und Trinkvolumen**

Vor und nach dem Stoffwechselkäfigversuch wurden bei allen Mäusen das Körpergewicht und der Blutglucosewert bestimmt, sowie die Futtermenge und das Trinkwasser abgewogen. Nach Abzug des verschütteten Futters und Trinkwassers konnte die Futter- und Trinkmenge ermittelt werden.

### **2.3.5.3 Urinprobengewinnung und -behandlung**

Nach Bestimmung des Urinvolumens wurde der Urin zentrifugiert und der Überstand portionsweise in PE-Gefäßen (Safe-Lock 2,0 ml, Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert (alle verwendeten Pipetten Fa. Eppendorf, Hamburg) und bis zur Analyse der Proben bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren.

## 2.3.6 Clearanceversuche

### 2.3.6.1 Zeitlicher Ablauf der Clearanceversuche

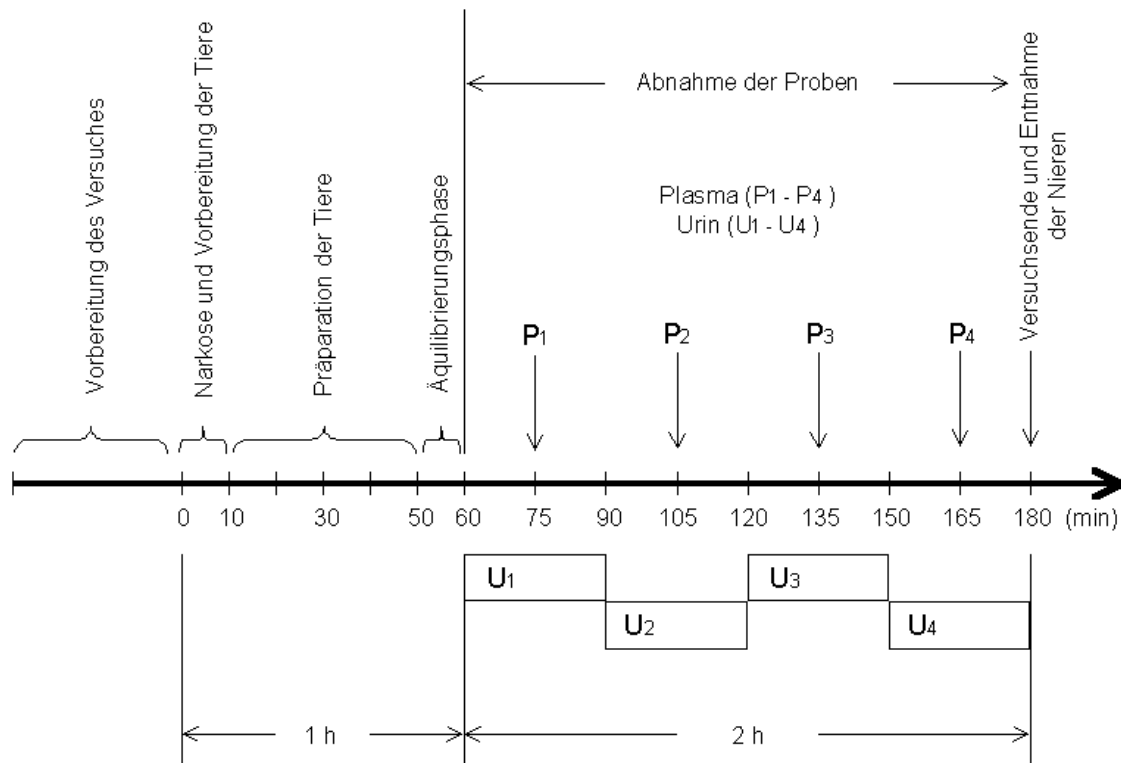


Abb. 11: Zeitlicher Ablauf des Clearanceversuchs

### 2.3.6.2 Infusion

Zur Infusion über den venösen Katheter wurde eine Infusionslösung mit Ringerlösung, 2,25% BSA (bovines Serumalbumin) und [<sup>3</sup>H]-markiertes Inulin (Aktivität von 2 µCi/ml) hergestellt. Dazu wurde in einem Liter bidestilliertem Wasser 6,4 g Kochsalz (NaCl reinst, Merck, Darmstadt), 2,5 g Natriumbicarbonat (NaHCO<sub>3</sub>, Merck, Darmstadt) und 0,35 g Kaliumchlorid (KCl, Merck, Darmstadt) gelöst. Die Infusion erfolgte mit einer Perfusorpumpe (Typ 871642<sup>®</sup>, Fa. Braun, Melsungen), die Infusionsgeschwindigkeit betrug 300 µl/h. Der arterielle Katheter wurde mit einer heparinisierten NaCl-Lösung (100 µl 5%ige Heparinlösung und 900 µl 0,9%ige NaCl-Lösung) offen gehalten.

### **2.3.6.3 Narkose bei Mäusen**

Die Narkose erfolgte mittels einer intraperitonealen Gabe von in Kochsalz gelöstem Pentobarbital – Natrium (Pentobarbital, Sigma St.Lois, USA) in einer Dosierung von 100 mg/kg Körpergewicht. Die ausreichende Narkosetiefe wurde nach 3 bis 5 Minuten überprüft und durch fehlende Schmerzreize bestätigt. Während des Versuchs erhielten die Tiere nach Bedarf eine Nachinjektion von Pentobarbital in einer Dosis von 20 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal.

### **2.3.6.4 Präparation**

Die Mäuse wurden auf einem vorgeheizten OP-Tisch (Fa. Effenberg, Pfaffing) in Rückenlage gebracht. Über eine rektal eingeführte Temperatursonde, die über ein Temperaturmessgerät (Fa. Effenberg, Pfaffing) mit dem OP-Tisch gekoppelt war, konnte die Körpertemperatur der Versuchstiere konstant auf 37,5°C gehalten werden. Über einen Schlauch, der in Kopfhöhe der Maus auf dem OP-Tisch fixiert wurde, erhielten die Tiere während des Versuch kontinuierlich Sauerstoff von 2 l/min.

Zuerst wurde bei den Tieren mit einer Präparierschere (alle Operationsinstrumente: Fa. Aesculap, Tuttlingen) ein ca. 20 mm ventraler Medianschnitt im Halsbereich angelegt. Nach stumpfer Freipräparation der Trachea und Inzision zwischen zwei Knorpelspangen erfolgte das Einlegen eines ungefähr 20 mm langen Polyethylen(PE)-Katheters (alle Katheter: SIMS Portex Ltd.; Hythe, UK) in die Trachea. Der Katheter, mit einem Innendurchmesser (ID) von 0,86 mm und einem Außendurchmesser (OD) von 1,27 mm wurde ca. 5 mm in das Tracheallumen nach caudal vorgeschoben und mittels einer, vor Inzision angelegten, Ligatur (alle Fäden: Seidenfäden 5/0 metric 1 schwarz geflochten, Fa. Suprama, Berlin) fixiert.

Im Folgenden wurde mit Hilfe eines binokularen Mikroskops (VMT 10x<sup>®</sup>, Fa. Olympus, Japan) die rechte V. jugularis externa dargestellt, cranial ligiert und durch Haltefäden gespannt. Zwei weitere, anfangs locker geknotete Ligaturen,

die zur Fixierung des Venenkatheters dienten, wurden caudal des Gefäßes vorgelegt. Es folgte die Inzision des Gefäßes, der mit Infusionslösung durchgespülte PE-Katheter (ID 0,58 mm; OD 0,96 mm) wurde sorgfältig ca. 3 mm nach caudal vorgeschoben. Die korrekte Lage des Katheters wurde überprüft, indem ein Bolus von ca. 50 µl verabreicht und anschließend die Infusionspumpe (Typ 871642<sup>®</sup>, Fa. Braun, Melsungen) gestartet wurde.

Danach wurde die linke A. carotis communis stumpf, unter Schonung des N. vagus, freipräpariert. Auch hier erfolgte das Ligieren des Gefäßes auf der cranialen Seite, damit die Arterie vorsichtig gespannt werden konnte. Nach kaudal wurde das Gefäß mit einer Arterienklemme verschlossen, um dann, nach Inzision des Gefäßes, den PE-Katheter (ID 0,4 mm; OD 0,80 mm) einführen zu können. Auch hier wurde der Katheter mit einer vorgelegten Ligatur fixiert. Anschließend wurde die Arterienklemme abgenommen, mit der Puls- und Blutdruckmessung (Lineacorder WR3001<sup>®</sup>, Hugstetten) begonnen und der Halsbereich, nach Reposition der Speicheldrüse, mit zwei Nähten verschlossen.

Anschließend erfolgte ein medianer Hautschnitt im suprapubischen Bereich von ungefähr 10 mm Länge. Die Harnblase wurde stumpf freipräpariert, inzidiert und ein PE-Katheter (ID 0,4 mm; OD 0,8 mm) eingeführt und ligiert. Nach Reposition der Blase in ihre anatomische Lage erfolgte der Verschluss der Wunde mit zwei Nähten.

Zur weiteren Versuchsdurchführung wurde das Tier vorsichtig auf die linke Seite gelagert, der Sauerstoffschlauch wieder korrekt platziert, der Urin in PE-Gefäßen gesammelt und die Infusionspumpe auf korrekte Infusionsgeschwindigkeit kontrolliert.

#### **2.3.6.5 Gewinnung von Plasma- und Urinproben**

Nach der Hälfte jeder Sammelperiode (15 min) erfolgte die Blutentnahme von ungefähr 50 µl über den in der A. carotis liegenden Katheter. Dafür standen heparinisierte Glaskapillare (Mikro-Hämatokrit-Kapillaren<sup>®</sup> 75 µl, Brand

GmbH&CO, Wertheim) zur Verfügung. Nach der Blutentnahme wurden die Kapillaren einseitig mit Kitt (Hämatokrit-Versiegelungskitt<sup>®</sup>, Fa. Brand) verschlossen. Bis zum Ende jeder Periode wurde der Urin in einzelnen PE-Gefäßen gesammelt.

#### **2.3.6.6 Entnahme der Nieren**

Nach 4 Sammelperioden wurde die Maus wieder in Rückenlage verbracht und Pentobarbital in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht i.v. nachinjiziert. Anschließend erfolgte das Eröffnen des Abdomens und Aufsuchen der linken Niere. Die Gefäße wurden hilusnah durchtrennt, die Niere entnommen und sorgfältig von der Nierenkapsel und den Resten der Gefäße und des Ureters befreit. Die Entnahme der rechten Niere erfolgte nach dem selben Schema. Beide Nieren wurden getrennt gewogen und anschließend für die Bestimmung des Nierentrockengewichts getrocknet.

#### **2.3.6.7 Probenbehandlung**

Die Glaskapillaren, die das während der Sammelperioden entnommene Blut enthielten, wurden 5 min in einer Hämatokritzentrifuge (Hettich Hämatokrit<sup>®</sup>, Fa. Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Anschließend wurde der Hämatokrit abgelesen und das gewonnene Blutplasma in PE-Gefäßen bis zur Analyse bei -20°C eingefroren. Die Urinproben wurden ebenfalls bis zur weiteren Analyse bei -20°C eingefroren.



## 2.4 Analytik

### 2.4.1 Analyisierte Parameter

Gemessene Parameter bei Stoffwechselkäfigversuchen:

Körpergewicht aller analysierten Tiere	KG	[g]
Gewichtsänderung während des Versuchs	$\Delta$ KG	[g]
Futtermenge	FM	[g]
Trinkvolumen	TV	[ml]
Urinvolumen	UV	[ml]
Konzentration von $\text{Na}^+$ im Urin	$[\text{Na}]_{\text{Urin}}$	[mmol/l]
Konzentration von $\text{K}^+$ im Urin	$[\text{K}]_{\text{Urin}}$	[mmol/l]
Konzentration von $\text{Cl}^-$ im Urin	$[\text{Cl}]_{\text{Urin}}$	[mmol/l]
Glucosekonzentration im Blut	[BZ]	[mg/dl]
Glucosekonzentration im Urin	$[\text{BZ}]_{\text{Urin}}$	[mg/dl]
Osmolalität im Urin	$\text{OS}_{\text{Urin}}$	[mosmol/l]

Vor Induktion des Diabetes mellitus bzw. Citratgabe wurde gemessen:

Systolischer Blutdruck	$\text{RR}_{\text{sys}}$	[mmHg]
------------------------	--------------------------	--------

Diastolischer Blutdruck	$RR_{\text{dia}}$	[mmHg]
Mittlere arterielle Blutdruck	MAP	[mmHg]
Herzfrequenz	HF	[1/min]
Untersuchte Parameter im Clearanceversuch:		
Systolischer Blutdruck (Clearanceversuch)	$P_{\text{sys}}$	[mmHg]
Diastolischer Blutdruck (Clearanceversuch)	$P_{\text{dia}}$	[mmHg]
Hämatokrit	Hkt	[%]
Plasmakonzentration von $\text{Na}^+$ und $\text{K}^+$	$[\text{Na}]_{\text{Pl}}$	[mmol/l]
	$[\text{K}]_{\text{Pl}}$	[mmol/l]
Urinkonzentration von $\text{Na}^+$ und $\text{K}^+$	$[\text{Na}]_{\text{Urin}}$	[mmol/l]
	$[\text{K}]_{\text{Urin}}$	[mmol/l]
Urinvolumina der Sammelperioden 1-4	$UV_{1-4}$	[ml]
Nierenfeuchtgewicht	NFG	[g]
Nierentrockengewicht	NTG	[g]

#### **2.4.2 Gewichte und Volumina**

Die Bestimmung der Körpergewichte erfolgte mittels einer Tierwaage (Fa Mettler, Zürich), alle übrigen Gewichte und Volumina wurden mit einer Feinwaage (Prescia 100<sup>®</sup>, Fa Oerliko Zürich) ermittelt.

#### **2.4.3 Konzentration von Natrium und Kalium**

Die Bestimmung der Na<sup>+</sup>-und K<sup>+</sup>-Konzentrationen erfolgte mit Hilfe eines Flammenphotometers (Elex 6361<sup>®</sup>, Fa. Eppendorf, Hamburg). Für die Elektrolytmessung in den Urinproben wurden jeweils zwei Proben à 10 µl Urin in 2 ml Lithiumlösung (Standard Lithiumlösung, Fa. Eppendorf, Hamburg) pipettiert, vermischt und gemessen und aus den Doppelwerten der Mittelwert errechnet. Die Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen im Plasma wurde mit Einfachproben durchgeführt, um den Blutverlust der Mäuse so gering wie möglich zu halten. Für die Bestimmung der Na<sup>+</sup>-und K<sup>+</sup>-Konzentrationen im Plasma wurde jeweils 10 µl Plasma in 1 ml Lithiumlösung pipettiert. Vor Beginn der Messungen und nach weiteren 20 Bestimmungen erfolgte eine Kalibrierung des Flammenphotometers mit einer Standardlösung. Alle ermittelten Werte wurden in mmol/l bestimmt.

#### **2.4.4 Konzentration von Chlorid**

Der Chloridgehalt im Urin wurde in einem coulometrischen Verfahren mit Hilfe eines Chloridmeters (6610<sup>®</sup>, Fa. Eppendorf, Hamburg) ermittelt. Nach Kalibrierung des Gerätes mit einer Kontroll-Lösung (100 mmol/l KCl) wurde in eine Basislösung (15 ml Essigsäure (1,02 mol/l), Salpetersäure (92,4 mmol/l) und 1 ml Gelatine-Lösung (12,33 mol/l Methanol, 6,7 mmol/l Thymol, 2,1 mol/l Thymolblau, 0,007 mmol/l Gelatine) jeweils 25 µl Urin pipettiert und die Chloridkonzentration von der Anzeige des Gerätes in mmol/l abgelesen.

## 2.4.5 Glucosemessung

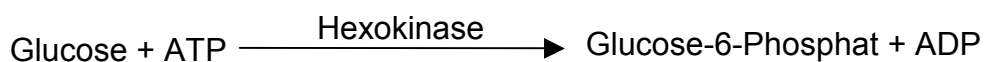
### 2.4.5.1 Glucosemessung im Blut

Die Glucosemessung im Blut erfolgte über Teststäbchen mit einem Blutzuckermessgerät (Accu-Chek<sup>®</sup> Sensor, Fa. Roche, Mannheim). Die Blutglucose wird mit diesem Gerät amperometrisch bestimmt. Dies bedeutet, dass der Elektronenfluss zwischen einer Mess- und Vergleichselektrode gemessen wird. Auf ein, für das o.g. Gerät, geeignetes Teststäbchen (Accu-Chek<sup>®</sup> Sensor Comfort Teststreifen, Fa. Roche, Mannheim) wurde 7,5 µl Blut, das aus der Schwanzvene der Maus gewonnen wurde, gegeben. Nach 30 Sekunden konnte der gemessene Blutzuckergehalt auf der Anzeige abgelesen werden.

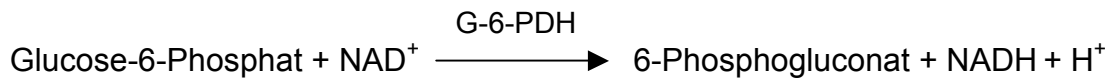
### 2.4.5.2 Glucosemessung im Plasma

Zur quantitativen Glucosebestimmung im Plasma wurde eine enzymatisch-photometrische Methode gewählt, die mit dem Spektrophotometer (U-300<sup>®</sup> Hitachi Ltd., JP) durchgeführt wurde. Diesem Messprinzip liegen folgende Reaktionen zugrunde:

1. Die Glucose wird mit Hilfe der Hexokinase und ATP zu Glucose-6-Phosphat unter Bildung von ADP phosphoryliert.



2. Glucose-6-Phosphat wird mit Hilfe der Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) und Nikotinsäureamidadenindinukleotid (NAD<sup>+</sup>) zu 6-Phosphogluconat (6-PG) oxidiert, wobei NAD zu NADH + H<sup>+</sup> umgesetzt wird.



Die Menge des gebildeten NADH ist proportional zur Glucosekonzentration in der Probe. Der Anstieg der Extinktion konnte bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessen werden.

Zunächst wurden je zwei Proben à 3 µl Urin und 300 µl Reagenz (Infinity<sup>®</sup>, Fa. Sigma, Steinheim) in PE-Gefäße pipettiert, durchmischt und drei Minuten im Wasserbad bei 37°C inkubiert. Nach dem Erstellen einer Kalibriergeraden wurde die Messung der Doppelproben durchgeführt und die Mittelwerte in mmol/l bestimmt. Anschließend wurde mit Kenntnis der Molmasse von Glucose die Werte in mg/dl umgerechnet.

#### **2.4.6 Messung der Osmolalität**

Mit Hilfe des Osmometers (Osmomat 030, Fa. Gonotec, Berlin) erfolgte die Messung der Osmolalität im Urin. Dazu wurden 0,5 ml Urin in PE-Gefäße pipettiert und anschließend mit dem Verfahren der Gefrierpunktniederdrigung, die abhängig von der Osmolalität ist, die Werte der Doppelproben bestimmt. Zu Beginn und mehrfach während der Probenmessungen wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Aus den Werten der Doppelproben wurde auch hier der Einzelwert ermittelt und in mosmol/l angegeben.

#### **2.4.7 Hämatokrit**

Bei jeder Blutabnahme wurde eine heparinisierte Glaskapillare (Mikro-Hämatokrit-Kapillaren<sup>®</sup> 75µl, Brand GmbH&CO, Wertheim) mit ca. 50 µl

arteriellem Blut gefüllt, mit Hämatokrit-Versiegelungskit (Fa. Brand) einseitig verschlossen und fünf Minuten zentrifugiert. Der danach abgelesene prozentuale Anteil der korpuskulären Elemente im Verhältnis zur Säulenhöhe entsprach dem Hämatokrit (Hkt).

#### **2.4.8 $[^3\text{H}]$ -Aktivität in Plasma und Urin**

Die  $[^3\text{H}]$ -Aktivität in Plasma und Urin wurde mit Hilfe eines Szintillationsmessgerätes (2550TR<sup>®</sup>, Fa. Packard) bestimmt. Zunächst wurden 5 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold<sup>®</sup>, Fa. Packard, Groningen, Niederlande) in spezielle Messgefäße (Midi-Vial<sup>®</sup>, Fa. Packard, Groningen, Niederlande) pipettiert und jeweils 5  $\mu\text{l}$  Probe dazugegeben und vermischt. Die Szintillationsflüssigkeit dient dazu, die freiwerdende Energie beim Zerfall des  $[^3\text{H}]$ -markierten Inulins, in Lichtimpulse umzuwandeln. Die Bestimmung der Aktivität im Plasma wurde mit Einfachproben, die Bestimmung im Urin mit Doppelproben durchgeführt. Die Einzelwerte ergaben sich aus den Mittelwerten der Doppelproben.

#### **2.4.9 Systolischer und diastolischer Blutdruck und Herzfrequenz**

Während des Clearanceversuchs wurde der systolische und diastolische Blutdruck [mmHg], sowie die Herzfrequenz [1/min] mittels Schreiber kontinuierlich registriert und aufgezeichnet.

Die Bestimmung des systolischen und diastolischen Blutdrucks bei der Schwanzdruckmessung wurde in 2.3.4.3 schon erwähnt.

## 2.5 Berechnungen

### 2.5.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der mittlere arterielle Blutdruck in mmHg errechnet sich aus den graphischen Aufzeichnungen des Schnellschreibers und wird wie folgt berechnet:

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

### 2.5.2 Urinzeitvolumen

Das Urinzeitvolumen (UZV) in [ $\mu\text{l}/\text{min}/\text{g}$  NFG] zeigt das ausgeschiedene Urinvolumen (UV) pro Dauer der Sammelperiode ( $D_s$ ) und wird auf das Nierenfeucht (NFG)- oder Körpergewicht (KG) bezogen.

$$\text{UZV} = \frac{\text{UV} \times 1000}{D_s \times \text{NFG}}$$

### 2.5.3 Glomeruläre Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) in [ $\text{ml}/\text{min}/\text{g}$  NFG] jeder Sammelperiode wurde nach der Standardformel berechnet:

$$\text{GFR} = \frac{A_{\text{Urin}} \times \text{UV}}{A_{\text{Plasma}} \times D_s \times \text{NFG}}$$

#### 2.5.4 Absolute Ausscheidung von Natrium, Kalium und Chlorid

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

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

Da bei den Stoffwechselläufigversuchen keine Nieren bei den Tieren entnommen wurden, bezieht sich das  $U_{\text{Na}}V$  nicht auf das NFG, sondern auf 100 g Körpergewicht (KG).

Die Berechnung der renalen Exkretion von Kalium ( $U_{\text{K}}V$ ) und Chlorid ( $U_{\text{Cl}}V$ ) wurden nach der selben Formel berechnet.

#### 2.5.5 Fraktionelle renale Natriumauscheidung

Die fraktionelle Natriumexkretion ( $FE_{\text{Na}}$ ) ist ein Maß der tubulären Resorptionsleistung der Niere. Sie wird in Prozent (%) angegeben und folgendermaßen berechnet:

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



## 2.6 Statistik

Zuerst wurden pro Versuchstier die Daten berechnet und anschließend jeweils die Mittelwerte  $\pm$  SEM (standard error of means) für die Gruppen angegeben. Hierbei wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 98 Version (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) gearbeitet.

Sowohl für die Versuchsergebnisse der Stoffwechselkäfigversuche als auch für die Ergebnisse der Clearanceversuche und der Schwanzdruckmessung wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) mit dem anschließenden Bonferroni post-test durchgeführt. Es wurden dabei in den Kontrollgruppen, den diabetischen und insulinbehandelten Gruppen jeweils die Wildtyp-Tiere mit den Knockout Tieren verglichen. Weiterhin wurden Vergleiche zwischen insulinbehandelten Tieren und diabetischen Tieren jeder Gruppe, zwischen diabetischen Tieren und Kontrollgruppen und Vergleiche zwischen insulinbehandelten Tieren und den Kontrollgruppen durchgeführt. Ab einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  wurde die Nullhypothese, dass die verglichenen Gruppen gleich seien, verworfen.

Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Computerprogrammes InStat V3.0<sup>®</sup> (Graph Pad nc., USA).

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Schwanzdruckmessung

Eine Übersicht der Ergebnisse zur Schwanzdruckmessung ist in Tabelle 2 dargestellt.

**Tabelle 2** Die durchschnittlichen Blutdruckwerte der Schwanzdruckmessung von wachen Mäusen. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2.

	CON-WT n=10	CON-KO n=12	DM-WT n=10	DM-KO n=12	LIN-DM- WT n=8	LIN-DM- KO n=8
<b>Sys</b> (mmHg)	112 $\pm$ 4	103 $\pm$ 4	98 $\pm$ 3	98 $\pm$ 5	95 $\pm$ 6	92 $\pm$ 7
<b>MAP</b> (mmHg)	78 $\pm$ 4	78 $\pm$ 3	73 $\pm$ 3	76 $\pm$ 4	67 $\pm$ 4	64 $\pm$ 3
<b>HR</b> (Schläge/min)	341 $\pm$ 10	371 $\pm$ 11	354 $\pm$ 12	380 $\pm$ 15	453 $\pm$ 29 ∇ o	459 $\pm$ 21 # *

∇ p<0,05 versus CON-WT (ANOVA)

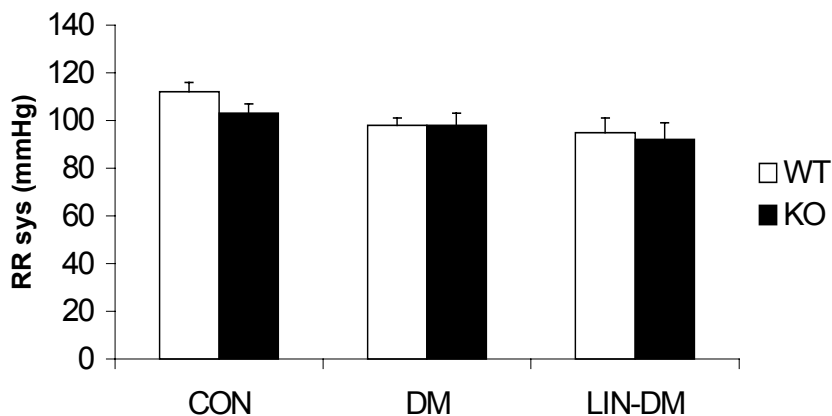
\* p<0,05 versus CON-KO (ANOVA)

o p<0,05 versus DM-WT (ANOVA)

# p<0,05 versus DM-KO (ANOVA)

### 3.1.1 Systolischer Blutdruck

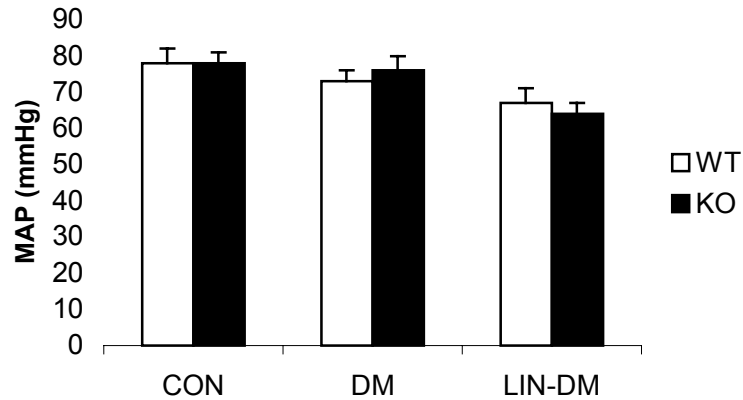
Die systolischen Blutdruckwerte aller Versuchstiere lagen mit Werten im Mittel zwischen  $112 \pm 4$  und  $92 \pm 7$  mmHg. Statistisch signifikante Unterschiede der Blutdruckwerte zwischen KO- und WT Tieren konnten nicht beobachtet werden. Bei beiden diabetischen Gruppen wurden gleiche systolische Blutdruckwerte gemessen. Die insulinbehandelten Tiere zeigten niedrigere Werte gegenüber den Kontrolltieren, erreichten jedoch nicht das Signifikanzniveau (Abb. 12).



**Abb. 12:** Systolische Blutdruckwerte ( $RR_{sys}$ ) wurden an wachen Wildtyp- (WT) und  $D_3$  Knockout Mäusen (KO) in mmHg gemessen. Dargestellt sind Kontrollgruppen (CON); Diabetische Gruppen (DM) und mit Insulin behandelte Gruppen (LIN-DM).

### 3.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck

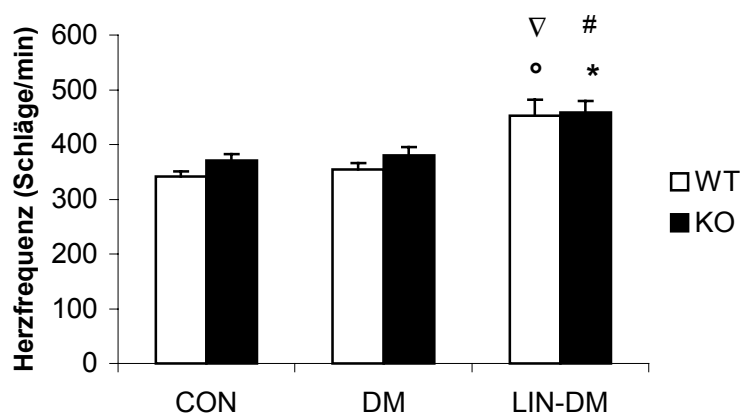
Der mittlere arterielle Blutdruck war auch hier bei allen Versuchstieren sehr ähnlich. Die Werte lagen zwischen  $78 \pm 4$  und  $64 \pm 3$  mmHg. Weder bei den Wildtyptieren (WT) noch bei den  $D_3$  Knockout Tieren (KO) wurden unterschiedliche Werte gemessen. Es fällt auf, dass die Werte der insulinbehandelten Tiere um ca. 12 mmHg niedriger lagen als die der Kontrolltiere. Das Signifikanzniveau wurde aber nicht erreicht (Abb. 13).



**Abb. 13:** Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde an wachen Wildtyp-Tieren (WT) und  $D_3$  Knockout Tieren (KO) in mmHg gemessen. Dargestellt sind Kontrollgruppen (CON); Diabetische Gruppen (DM) und mit Insulin behandelte Gruppen (LIN-DM).

### 3.1.3 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz der Kontrolltiere und der diabetischen Tiere lag im Mittel zwischen  $341 \pm 10$  und  $380 \pm 15$  Schläge pro Minute. Auffallend ist bei den insulinbehandelten Gruppen LIN-DM-WT und LIN-DM-KO eine höhere Herzfrequenz ( $p < 0,05$  vs. CON-WT, CON-KO und  $p < 0,05$  vs. DM-WT, DM-KO) gegenüber den entsprechenden Vergleichsgruppen. Die Herzfrequenz lag bei diesen Tieren im Mittel zwischen  $453 \pm 29$  und  $459 \pm 21$  Schlägen pro Minute (Abb. 14).



**Abb. 14:** Die Herzfrequenz wurde an wachen Wildtyp-Tieren (WT) und  $D_3$  Knockout Tieren (KO) gemessen. Dargestellt sind Kontrollgruppen (CON); Diabetische Gruppen (DM) und mit Insulin behandelte Gruppen (LIN-DM).  $\nabla$   $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA); \*  $p < 0,05$  versus CON-KO (ANOVA); o  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA); #  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

### 3.2 Stoffwechselkäfigversuche bei wachen Mäusen

Eine Übersicht der Ergebnisse der Stoffwechselkäfigversuche ist in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3** Die Ergebnisse der Stoffwechselkäfigversuche mit wachen Mäusen verschiedener Versuchsgruppen. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2.  $\nabla$   $p < 0,05$  vs. CON-WT (ANOVA), \*  $p < 0,05$  vs. CON-KO (ANOVA),  $\circ$   $p < 0,05$  vs. DM-WT (ANOVA), #  $p < 0,05$  vs. DM-KO (ANOVA).

	CON-WT n=10	CON-KO n=12	DM-WT n=10	DM-KO n=12	LIN-DM-WT n=8	LIN-DM-KO n=8
Tiergew. vor DM-Induktion (g)	25,7 $\pm$ 0,51	26,3 $\pm$ 0,41	24,2 $\pm$ 0,39	24,3 $\pm$ 0,56	26,6 $\pm$ 0,48	25,7 $\pm$ 0,86
Tiergew. vor SWK Versuch (g)	25,6 $\pm$ 0,47	26,4 $\pm$ 0,42	23,2 $\pm$ 0,52	23,2 $\pm$ 0,71	26,0 $\pm$ 0,56	25,9 $\pm$ 0,87
Gew.änderung während SWK-Versuch (g/24h)	+0,43 $\pm$ 0,12	+0,13 $\pm$ 0,10	-0,30 $\pm$ 0,12 $\nabla$	-0,35 $\pm$ 0,13 *	-0,54 $\pm$ 0,11 $\nabla$	-0,29 $\pm$ 0,17
Futtermenge (g/24h)	5,08 $\pm$ 0,18	5,67 $\pm$ 0,21	11,69 $\pm$ 0,89 $\nabla$	11,56 $\pm$ 1,23 *	8,32 $\pm$ 0,73	7,71 $\pm$ 1,46 #
Trinkvolumen (ml/24h)	5,42 $\pm$ 1,30	5,89 $\pm$ 0,46	26,35 $\pm$ 1,87 $\nabla$	24,32 $\pm$ 2,04 *	9,72 $\pm$ 0,80 $\circ$	9,55 $\pm$ 1,98 #
BZ (mg/dl)	101 $\pm$ 2	117 $\pm$ 4	514 $\pm$ 26 $\nabla$	441 $\pm$ 15 *	183 $\pm$ 38 $\circ$	128 $\pm$ 35 #
Osmolalität im Urin (mosmol/l)	3028 $\pm$ 184	2269 $\pm$ 127 $\nabla$	1236 $\pm$ 83 $\nabla$	1321 $\pm$ 83 *	1542 $\pm$ 122 $\nabla$	1493 $\pm$ 145 *
UV (ml/24 h)	1,40 $\pm$ 0,15	1,71 $\pm$ 0,19	15,87 $\pm$ 2,05 $\nabla$	15,48 $\pm$ 4,30 *	4,65 $\pm$ 0,59 $\circ$	3,68 $\pm$ 0,60 #
UV ( $\mu$ l/min/100g)	3,75 $\pm$ 0,36	4,35 $\pm$ 0,55	46,62 $\pm$ 5,55 $\nabla$	46,51 $\pm$ 4,30 *	12,40 $\pm$ 1,68 $\circ$	10,25 $\pm$ 1,87 #
U <sub>Na</sub> V (mmol/24h/100g)	1,01 $\pm$ 0,13	0,93 $\pm$ 0,15	1,75 $\pm$ 0,31	1,73 $\pm$ 0,15 *	0,84 $\pm$ 0,12 $\circ$	0,95 $\pm$ 0,19
U <sub>K</sub> V (mmol/24h/100g)	2,48 $\pm$ 0,22	2,33 $\pm$ 0,18	4,21 $\pm$ 0,30 $\nabla$	4,06 $\pm$ 0,30 *	2,76 $\pm$ 0,30 $\circ$	2,96 $\pm$ 0,56
U <sub>Cl</sub> V (mmol/24h/100g)	1,46 $\pm$ 0,19	1,46 $\pm$ 0,14	2,28 $\pm$ 0,18 $\nabla$	2,58 $\pm$ 0,18 *	1,53 $\pm$ 0,26	1,36 $\pm$ 0,24 #
U <sub>Gluc</sub> V (mmol/24h/100g)	0,048 $\pm$ 0,01	0,049 $\pm$ 0,01	37,35 $\pm$ 2,88 $\nabla$	35,36 $\pm$ 2,93 *	6,95 $\pm$ 1,31 $\circ$	2,84 $\pm$ 1,30 #

### **3.2.1 Tiergewicht und Änderung der Körpergewichte im Versuch**

Vor Beginn des Versuchs (Tag 0), d.h. vor Induktion des DM und vor Citratgabe wurde bei allen Tieren das Körpergewicht bestimmt. Die Kontrollgruppen (CON-WT und CON-KO) und die mit Insulin behandelten Gruppen (LIN-DM-WT und LIN-DM-KO) wogen im Mittel zwischen 25,7 und 26,6 g. Beide diabetischen Gruppen (DM-WT und DM-KO) hatten ein etwas geringeres Gewicht (24,3 g).

Die Körpergewichte der Mäuse wurden vor dem Stoffwechselkäfigversuch erneut bestimmt. Zu diesem Zeitpunkt waren die Tiere 11 Tage in diabetischer Stoffwechsellage bzw. nach Citratgabe. Es fällt zunächst auf, dass die CON und LIN Gruppen während dieser Zeit ihr Gewicht nahezu konstant halten konnten, während sich bei den beiden DM Gruppen das Körpergewicht um 1 g reduziert hatte. Ein signifikanter Unterschied zeigte sich bei den DM-KO Tieren ( $p < 0,05$  vs. CON-KO), den LIN-DM-WT Tieren ( $p < 0,05$  vs. DM-WT) und LIN-DM-KO Tieren ( $p < 0,05$  vs. DM-KO).

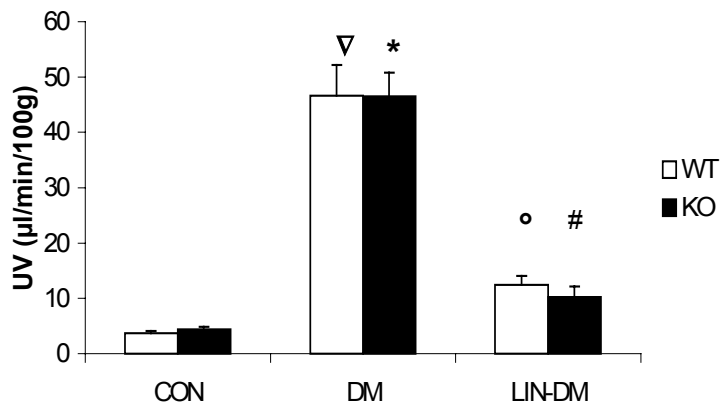
Nach 24 Stunden im Stoffwechselkäfig nahmen die Mäuse beider Kontrollgruppen an Gewicht zu. Die Tiere der Gruppen DM-WT ( $p < 0,05$  vs. CON-WT), DM-KO ( $p < 0,05$  vs. CON-WT) und LIN-DM-WT ( $p < 0,05$  vs. CON-WT) zeigten jedoch einen signifikanten Gewichtsverlust, der durch die diabetische Stoffwechsellage erklärt werden kann.

### **3.2.2 Futtermenge und Trinkvolumen**

Wie zu erwarten, konnte bei den hyperglykämischen Tieren gegenüber den gesunden Tieren die für das Krankheitsbild typisch auftretende Polyphagie und Polydipsie ( $p < 0,05$ ) beobachtet werden. Signifikante Unterschiede im Bezug auf die Nahrungs- und Flüssigkeitsaufnahme zeigten sich zwischen den diabetischen Tieren gegenüber den mit Insulin behandelten Tieren ( $p < 0,05$ ).

### 3.2.3 Urinvolumen

In allen Versuchsgruppen (CON, DM und LIN-DM) war das Urinvolumen sowohl bei den Wildtyptieren (WT) als auch bei den D<sub>3</sub> Knockout Tieren (KO) nahezu identisch. Die Urinvolumina der normoglykämischen Kontrollgruppen pro 100 g Körpergewicht lagen zwischen 3,75 und 4,35 ml. Die Urinausscheidung der diabetischen Tiere war um das 10-fache höher ( $p < 0,05$  vs. CON-WT und  $p < 0,05$  vs. CON-KO). Eine Reduktion des Urinvolumens konnte bei den mit Insulin behandelten Gruppen festgestellt werden. Hier lag die Ausscheidungsmenge zwischen 10,25 und 12,40 ml ( $p < 0,05$  vs. DM-Gruppen) (Abb. 15). Die Flüssigkeitsbilanz der Tiere (Differenz aus Trink- und Urinvolumen) war bei allen Gruppen positiv.



**Abb. 15:** Die Urinvolumina (UV) aller Versuchsgruppen (CON, DM LIN-DM) im Stoffwechselkäfigversuch. In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtyptiere (WT) mit D<sub>3</sub> Knockout Tieren (KO) verglichen.

∇  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

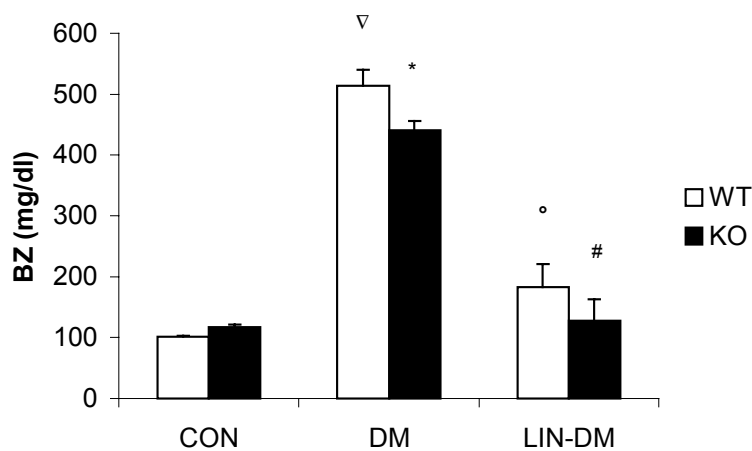
o  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

### 3.2.4 Blutglucose

Bei den Blutglucosewerten konnte in allen Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und KO Mäusen gezeigt werden. Die Werte der

Kontrolltiere lagen zwischen 101 und 117 mg/dl. Bei den diabetischen Mäusen zeigten sich die Effekte der Streptozotocinbehandlung in einer signifikanten ( $p < 0,001$  vs. entsprechende Kontrollgruppe) Hyperglykämie mit Werten im Mittel zwischen 441 und 514 mg/dl. Auffallend sind auch hier die signifikant geringeren Blutglucosewerte der insulinbehandelten Tiere gegenüber der diabetischen Gruppen ( $p < 0,001$ ). Die behandelten Tiere wiesen im Mittel Blutglucosewerte zwischen 128 und 183 mg/dl auf (Abb. 16).



**Abb. 16:** Die Blutglucosewerte (BZ) aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM) im Stoffwechselfähigversuch. In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

∇  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

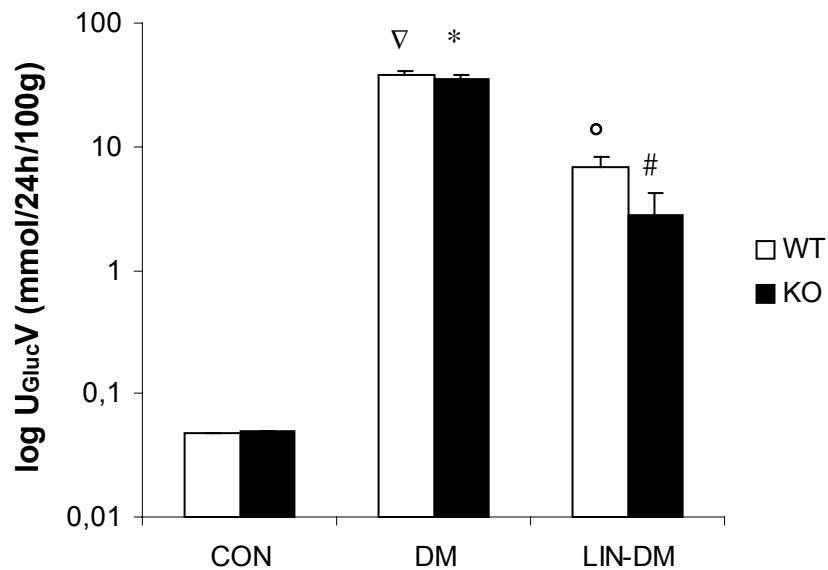
o  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

### 3.2.5 Glucoseausscheidung

Sowohl bei den WT- als auch bei den KO Tieren waren keine Unterschiede bezüglich der Glucoseausscheidung zu beobachten. Die tiergewichtsbezogene Glucoseausscheidung der diabetischen Tiere in 24 Stunden war um das 750-fache höher ( $p < 0,05$  vs. entsprechender Kontrollgruppen) als die der normoglykämischen Mäuse. Eine signifikant verminderte Glucoseausscheidung konnte durch die Insulintherapie der Tiere hervorgerufen werden ( $p < 0,05$  vs. DM-Gruppen) (Abb. 17).





**Abb. 17:** Glucoseausscheidung ( $U_{GlucV}$ ) aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM) im Stoffwechselkäfigversuch. In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen. Man beachte hier die logarithmische Darstellung.

∇  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

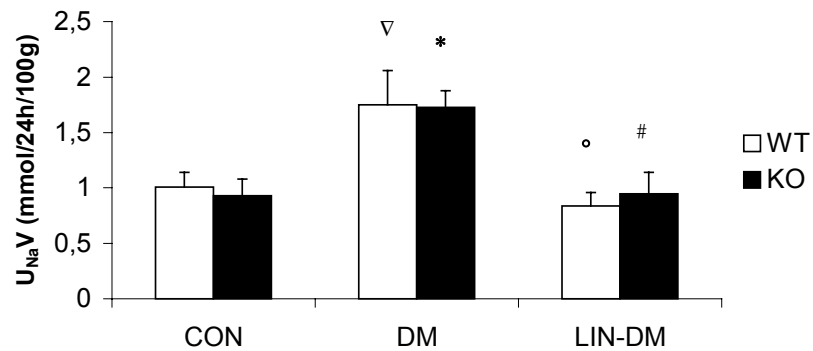
°  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

### 3.2.6 Renale Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung

Bezüglich der Urinelektrolytausscheidung konnte in allen Versuchsgruppen (CON, DM und LIN-DM) keine signifikanten Unterschiede zwischen den WT- und KO Tieren beobachtet werden. Eine signifikant höhere Natrium-, Kalium- und Chloridausscheidung (mmol/24h/100g) konnte bei den diabetischen Versuchsgruppen gegenüber den Kontrollgruppen beobachtet werden (Abb. 18, Abb. 19, Abb. 20). Die DM-WT Tiere erreichten bei der Natriumausscheidung kein Signifikanzniveau, das möglicherweise durch die niedrigere n-Zahl der Versuchstiere zu erklären wäre. Die mit Insulin behandelten Tiere der Versuchsgruppen LIN-DM-WT und LIN-DM-KO hatten nahezu die selbe Elektrolytausscheidung wie die Kontrollgruppen CON-WT und CON-KO. Signifikant niedrigere Natrium- und Kaliumwerte wurden bei LIN-DM-WT

( $p < 0,05$  vs. DM-WT) und signifikant niedrigere Chloridwerte bei LIN-DM-KO ( $p < 0,05$  vs. DM-KO) beobachtet.



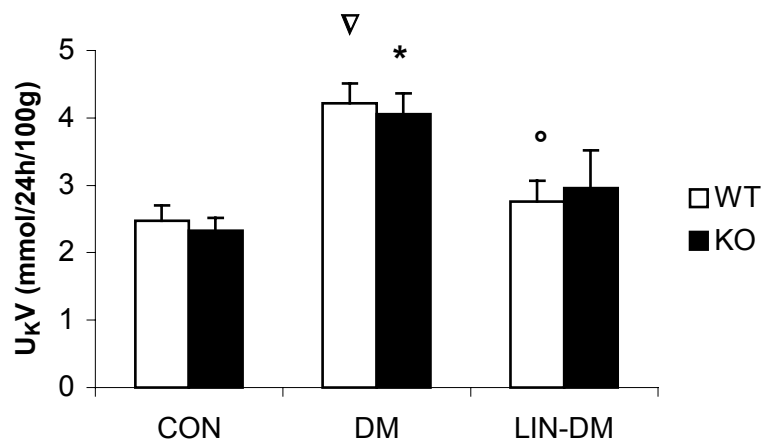
**Abb. 18:** Die Natriumausscheidung ( $U_{Na}V$ ) aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM) im Stoffwechselkäfigversuch. In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

∇  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

o  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)



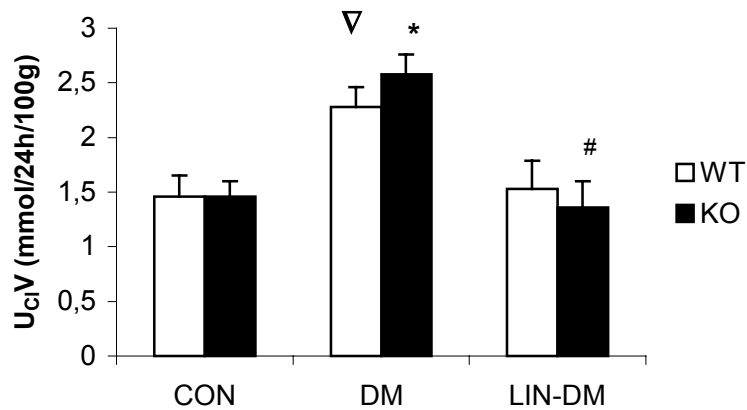
**Abb.19:** Die Kaliumausscheidung ( $U_KV$ ) aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM) im Stoffwechselkäfigversuch. In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

∇  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

o  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)



**Abb. 20:** Die Chloridausscheidung ( $U_{Cl}V$ ) aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM) im Stoffwechselfähigversuch. In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

∇  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

o  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

### 3.2.7 Osmolalität

Die Werte der Osmolalität im Urin zeigten signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Bei beiden Kontrollgruppen konnten die höchsten Mittelwerte gemessen werden (CON-WT  $3028 \pm 184$  mosmol/l und CON-KO  $2269 \pm 127$  mosmol/l). Die DM-WT und DM-KO Gruppen hatten eine signifikant niedrigere Osmolalität ( $p < 0,05$  vs. CON-WT u. CON-KO) mit Mittelwerten zwischen  $1236 \pm 83$  und  $1321 \pm 83$  mosmol/l. Bei den insulinbehandelten Mäusen konnte gegenüber den DM-Tieren eine höhere Osmolalität gezeigt werden. Hier wurde das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$ ) gegenüber den entsprechender Kontrollgruppen erreicht.

### 3.3 Clearanceversuche bei narkotisierten Mäusen

Eine Übersicht und Zusammenfassung der Clearanceversuche ist in Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4** Ergebnisse der Clearanceversuche an narkotisierten Mäusen. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Die Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2

∇  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

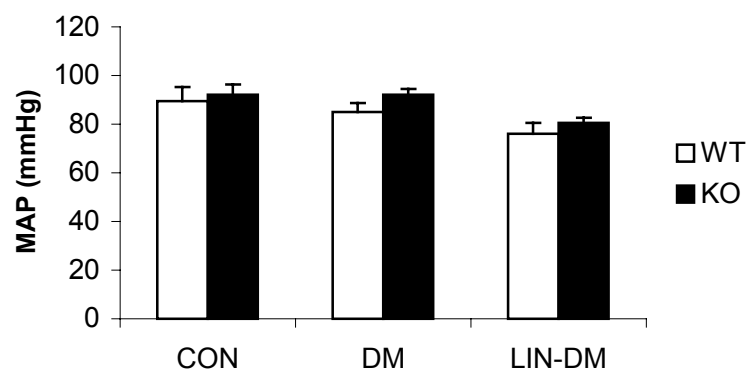
o  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

	CON-WT n=9	CON-KO n=12	DM-WT n=9	DM-KO n=9	LIN-DM- WT n=8	LIN-DM- KO n=8
MAP (mmHg)	89,4 $\pm$ 5,8	92,1 $\pm$ 4,3	85,0 $\pm$ 3,7	92,1 $\pm$ 2,5	76,1 $\pm$ 4,4	80,4 $\pm$ 2,3
HF (Schläge /min)	570 $\pm$ 29	534 $\pm$ 14	523 $\pm$ 32	626 $\pm$ 11 * o	527 $\pm$ 21	600 $\pm$ 10
Hkt (%)	39,0 $\pm$ 1,2	40,1 $\pm$ 0,5	41,3 $\pm$ 0,5	43,4 $\pm$ 0,9 *	39,6 $\pm$ 0,5	40,9 $\pm$ 0,7
PI <sub>Na</sub> (mmol/l)	147,2 $\pm$ 2,2	148,3 $\pm$ 1,7	146,1 $\pm$ 1,4	145,4 $\pm$ 1,6	156,0 $\pm$ 1,0 o ∇	155,4 $\pm$ 0,9 # *
PI <sub>K</sub> (mmol/l)	3,9 $\pm$ 0,1	4,0 $\pm$ 0,1	3,3 $\pm$ 0,1 ∇	3,2 $\pm$ 0,1 *	3,8 $\pm$ 0,1 o	3,7 $\pm$ 0,1 #
UV ( $\mu$ l/min/100g)	8,0 $\pm$ 2,6	6,1 $\pm$ 1,0	13,7 $\pm$ 2,4	13,1 $\pm$ 1,9	6,37 $\pm$ 1,92	4,7 $\pm$ 1,9 #
U <sub>NaV</sub> ( $\mu$ mol/min/100)	1,15 $\pm$ 0,54	1,04 $\pm$ 0,17	1,59 $\pm$ 0,38	1,98 $\pm$ 0,49	0,76 $\pm$ 0,32	0,46 $\pm$ 0,22 #
FE <sub>Na</sub> (%)	0,82 $\pm$ 0,25	0,93 $\pm$ 0,11	1,09 $\pm$ 0,24	1,38 $\pm$ 0,26	0,83 $\pm$ 0,32	0,58 $\pm$ 0,23
U <sub>KV</sub> ( $\mu$ mol/min/100)	0,65 $\pm$ 0,07	0,88 $\pm$ 0,09	1,50 $\pm$ 0,14 ∇	1,48 $\pm$ 0,09 *	0,73 $\pm$ 0,16 o	0,70 $\pm$ 0,15 #
GFR (ml/min/gNiere)	0,68 $\pm$ 0,08	0,64 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,07	0,94 $\pm$ 0,06 *	0,53 $\pm$ 0,06 o	0,50 $\pm$ 0,04 #

### 3.3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Die Blutdruckwerte aller Tiere lagen während der Clearanceversuche sehr nahe beieinander. Es fällt jedoch auf, dass intraoperativ der Blutdruck aller KO Mäuse tendenziell höher lag als bei den korrespondierenden WT Mäusen. Diese Beobachtung war jedoch statistisch nicht signifikant (Abb. 21).



**Abb. 21:** Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) während der Clearanceversuche aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM). In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

### 3.3.2 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz aller Tiere lag im Mittel zwischen  $570 \pm 29$  und  $626 \pm 11$  Schläge pro Minute. Eine signifikante Erhöhung der Herzfrequenz konnte bei den DM-KO Mäusen ( $p < 0,05$  vs. CON-KO und DM-WT) beobachtet werden. Möglicherweise ist diese Differenz zwischen den Gruppen durch die unterschiedliche n-Zahl zu erklären.

### 3.3.3 Hämatokrit

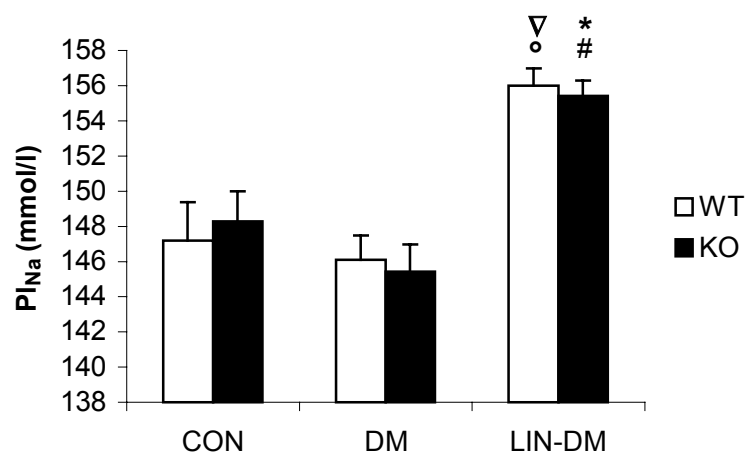
Nahezu identische Hämatokritmittelwerte hatten die Kontrollgruppen und die mit Insulin behandelten Mäuse. Die Werte lagen zwischen 39,0 und 40,9%. Bei den

diabetischen Gruppen konnten erhöhte Hämatokritwerte zwischen 41,3 und 43,4% ermittelt werden, wobei die DM-KO Tiere das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$  vs. CON-KO) erreichten.

### 3.3.4 Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma

Weder bei den WT Tieren noch bei den KO Tieren zeigten sich unterschiedliche Konzentrationen von Natrium und Kalium im Plasma. Ähnliche Natriumkonzentrationen im Plasma konnten bei den Kontrolltieren und den hyperglykämischen Mäusen ermittelt werden. Bei all diesen Gruppen wurden Natriumkonzentrationen im Mittel zwischen 145,4 und 148,3 mmol/l gemessen. Eine signifikant ( $p < 0,05$  vs. DM-WT, DM-KO, CON-WT und CON-KO) erhöhte Natriumkonzentration im Plasma zeigte sich bei den LIN-DM-WT und LIN-DM-KO Gruppen (Abb. 22). Hier scheint die Insulinbehandlung einen Einfluss auf die Natriumkonzentration im Plasma zu haben.

Die Kaliumkonzentration im Plasma der diabetischen Tiere war gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ). Eine statistisch signifikante Erhöhung des Kaliumplasmaspiegels ( $p < 0,05$ ) zeigte sich bei den mit Insulin behandelten Tieren im Vergleich zu den diabetischen Versuchsgruppen (Abb. 23).



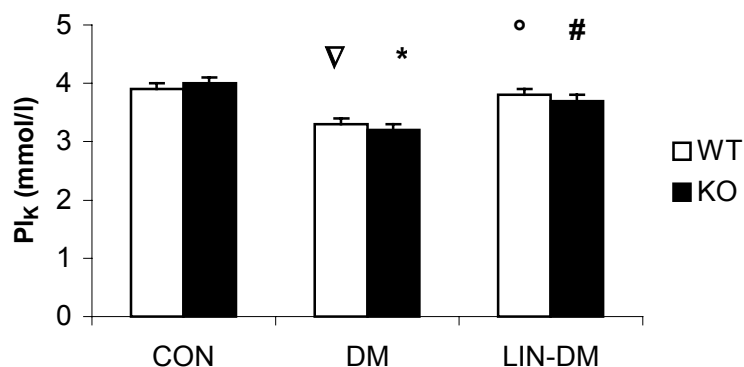
**Abb. 22:** Die Natriumkonzentration im Plasma ( $PI_{Na}$ ) während der Clearanceversuche aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM). In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

▽  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

○  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)



**Abb. 23:** Die Kaliumkonzentration im Plasma ( $PI_K$ ) während der Clearanceversuche aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM). In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

▽  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

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

○  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

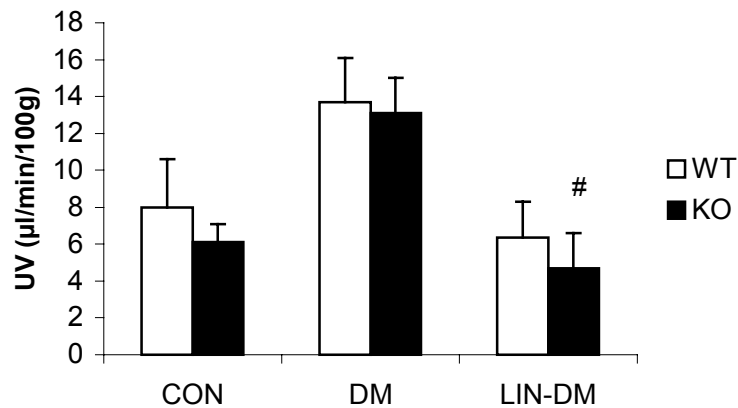
#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

### 3.3.5 Urinvolumen

Auch bei den Urinvolumina konnte in allen Versuchsgruppen kein signifikanter Unterschied zwischen WT- und KO Tieren gezeigt werden. Die Ausscheidung der DM-WT Gruppe stieg gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe um das 1,7-fache an, die Urinproduktion der DM-KO Tiere vs. CON-KO war sogar um das 2,1-fache erhöht. Beide DM-Gruppen erreichten das Signifikanzniveau gegenüber den CON-Gruppen nicht.

Aufgrund der Insulingabe und der dadurch besseren Stoffwechsellage der Tiere konnte die Polyurie der Mäuse aufgehoben werden. Die LIN-DM-WT Tiere produzierten 6,37  $\mu$ l/min/100g Urin, die LIN-DM-KO Tiere schieden nur 4,7

$\mu\text{l}/\text{min}/100\text{ g}$  Urin aus und erreichten das Signifikanzniveau gegenüber der diabetischen Vergleichsgruppe ( $p < 0,05$  vs. DM-KO) (Abb. 24).

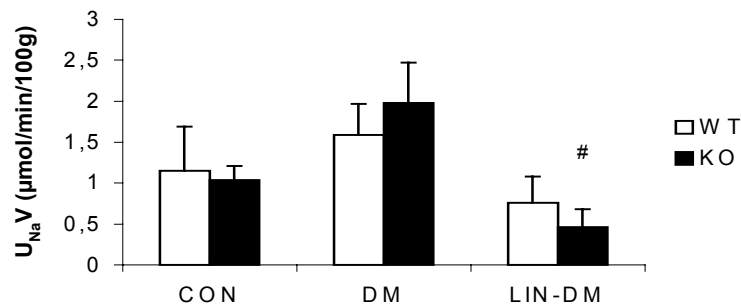


**Abb. 24:** Die Urinolumina (UV) während der Clearanceversuche aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM). In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtyptiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen. #  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA).

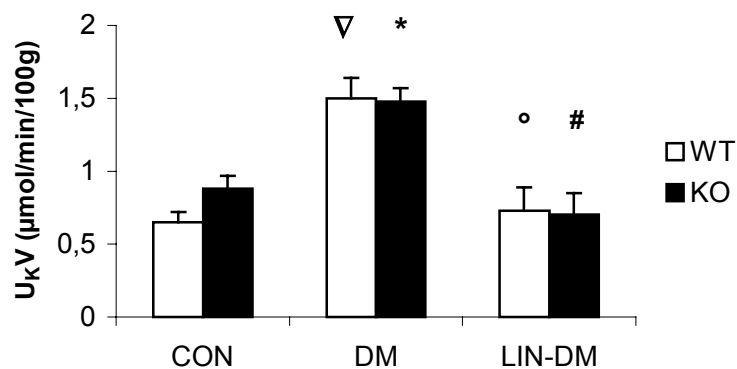
### 3.3.6 Natrium- und Kaliumausscheidung

Bezüglich der Natrium- und Kaliumausscheidung konnten auch hier keine Unterschiede zwischen WT- und KO Tieren beobachtet werden. Sowohl die Natrium- als auch die Kaliumausscheidung war bei beiden diabetischen Gruppen (DM-WT u. DM-KO) gegenüber den Kontrollgruppen (CON-WT u. CON-KO) erhöht, wobei die Kaliumausscheidung bei den diabetischen Tieren sogar das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$  vs. entsprechender CON-Tiere) erreichte. Wie zu erwarten, schieden die mit Insulin behandelten Mäuse gegenüber den DM-WT und DM-KO Tieren signifikant weniger Kalium aus. Eine reduzierte Natriumausscheidung bei erhöhten Natriumkonzentrationen im Plasma (s. 3.3.4) konnte bei den mit Insulin behandelten Tieren beobachtet werden, jedoch erreichte nur die LIN-DM-KO Gruppe das Signifikanzniveau vs. der entsprechenden DM-Gruppe (Abb. 25 und Abb. 26).





**Abb. 25:** Die Natriumausscheidung ( $U_{Na}V$ ) während der Clearanceversuche aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM). In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen. #  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA).



**Abb. 26:** Die Kaliumausscheidung ( $U_KV$ ) während der Clearanceversuche der Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM). In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

∇  $p < 0,05$  versus CON-WT (ANOVA)

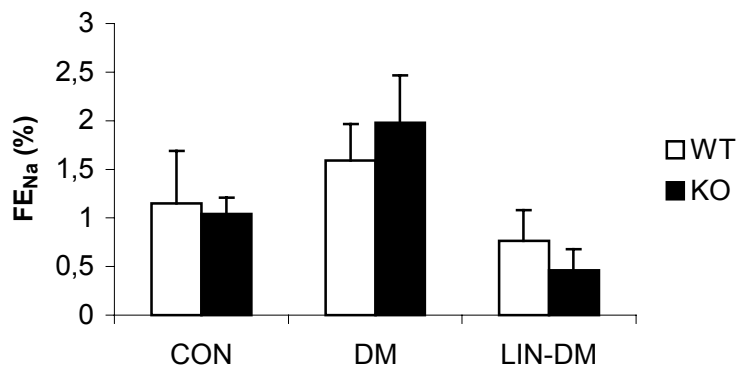
\*  $p < 0,05$  versus CON-KO (ANOVA)

o  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

### 3.3.7 Fraktionelle renale Natriumausscheidung

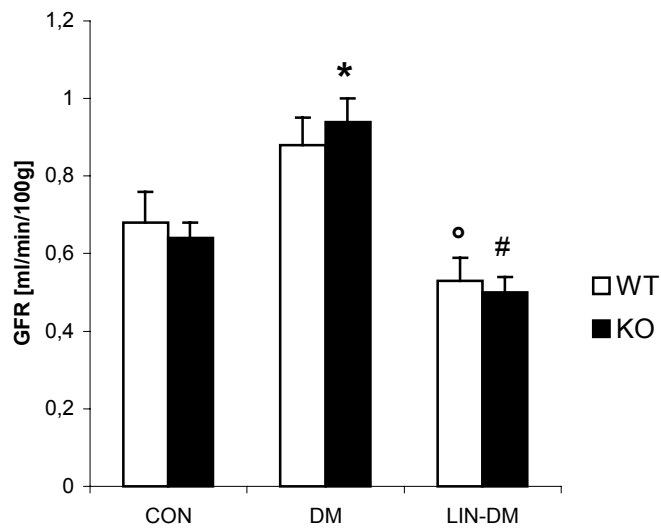
Die Mittelwerte der fraktionellen renalen Natriumausscheidung korreliert in allen Gruppen nahezu mit den Mittelwerten der Natriumausscheidung bezogen auf 100 g Körpergewicht (Abb. 27).



**Abb. 27:** Die Fraktionelle Natriumausscheidung ( $FE_{Na}$ ) während der Clearanceversuche aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM). In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtyptiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

### 3.3.8 Glomeruläre Filtrationsrate

Bei der glomerulären Filtrationsrate (GFR) konnte in keiner der Versuchsgruppen CON, DM und LIN-DM ein signifikanter Unterschied zwischen den WT- und KO Tieren festgestellt werden. Die GFR der CON-WT Gruppe (0,68 ml/min/100g) unterschied sich nicht wesentlich von der GFR der CON-KO Gruppe (0,64 ml/min/100g). Die typische diabetes-induzierte glomeruläre Hyperfiltration konnte sowohl bei der DM-WT Gruppe als auch der DM-KO Gruppe gezeigt werden. Bei der diabetischen WT Gruppe wurde eine Steigerung der GFR um 30% gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe beobachtet. Bei den diabetischen KO Tieren stieg die GFR sogar um 50% an. Eine signifikante Steigerung gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe wurde hier beobachtet ( $p < 0,05$  vs. CON-KO). Der Effekt der Insulintherapie der LIN-DM-WT Gruppe drückt sich wiederum in einer signifikanten Abnahme der GFR ( $p < 0,05$  vs. DM-WT) aus. Auch der Rückgang der GFR der LIN-DM-KO Tiere bestätigt die Wirkung des Insulins, was sich im erreichten Signifikanzniveau ( $p < 0,05$  vs. DM-KO) widerspiegelt (Abb. 28).



**Abb. 28:** Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) der Clearanceversuche aller Versuchsgruppen (CON, DM, LIN-DM). In jeder Versuchsgruppe wurden Wildtypiere (WT) mit  $D_3$  Knockout Tieren (KO) verglichen.

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

°  $p < 0,05$  versus DM-WT (ANOVA)

#  $p < 0,05$  versus DM-KO (ANOVA)

### 3.3.9 Nierengewicht , Körpergewicht und Nierenindex

Eine Übersicht und Zusammenfassung der Ergebnisse der Körper- und Nierengewichte ist in Tabelle 5 dargestellt.

**Tabelle 5** Die durchschnittlichen Körper- und Nierengewichte der einzelnen Versuchsgruppen im Clearanceversuch. Der Nierenindex gibt das Nierengewicht relativ zum Körpergewicht an. Alle Werte sind Mittelwerte  $\pm$  SEM. Bezeichnungen der Versuchsgruppen s. Kapitel 2.2.

	<b>CON-WT</b> n=9	<b>CON-KO</b> n=12	<b>DM-WT</b> n=9	<b>DM-KO</b> n=9	<b>LIN-DM-WT</b> n=8	<b>LIN-DM-KO</b> n=8
<b>KG vor Cl.-versuch (g)</b>	25,0 $\pm$ 0,7	28,0 $\pm$ 0,5 ∇	23,1 $\pm$ 0,3	23,9 $\pm$ 0,6 *	25,0 $\pm$ 0,4	24,9 $\pm$ 0,8 *
<b>NG feucht links (mg)</b>	312 $\pm$ 13	316 $\pm$ 46	291 $\pm$ 10	284 $\pm$ 5	297 $\pm$ 12	268 $\pm$ 10
<b>NG trocken links (mg)</b>	45 $\pm$ 3	46 $\pm$ 2	43 $\pm$ 2	40 $\pm$ 6	46 $\pm$ 5	36 $\pm$ 2
<b>Nierenindex NFG/KG*100</b>	1,22 $\pm$ 0,026	1,15 $\pm$ 0,030	1,26 $\pm$ 0,035	1,20 $\pm$ 0,036	1,20 $\pm$ 0,055	1,06 $\pm$ 0,033

∇ p<0,05 versus CON-WT (ANOVA)

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

Die Körpergewichte der Tiere wurden unmittelbar vor Narkosebeginn des Clearanceversuchs (14.-17. Versuchstag) bestimmt. Hier fällt auf, dass die Knockout Mäuse der Kontrollgruppe (CON-KO) ein signifikant höheres Ausgangsgewicht gegenüber den Wildtyptieren (CON-WT) hatten. Beide diabetischen Versuchsgruppen waren zu Beginn des Versuchs gleich schwer, jedoch, bedingt durch die diabetische Stoffwechsellage, leichter als die Kontrollgruppen. Die DM-KO Tiere erreichten das Signifikanzniveau (p<0,05) gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe CON-KO. Nahezu gleiche Körpergewichte zeigten beide mit Insulin behandelten Gruppen (LIN-DM-WT

und LIN-DM-KO). Ihr Ausgangsgewicht war ähnlich der CON-WT Gruppe. Die mit Insulin behandelten Knockout Tiere waren signifikant leichter ( $p < 0,05$ ) gegenüber der entsprechenden Kontrollgruppe. Sowohl die Nierentrockengewichte als auch die Nierenfeuchtgewichte der verschiedenen Gruppen weichen nur unwesentlich voneinander ab. Auch die Mittelwerte für den Nierenindex sind in allen Gruppen ähnlich. In diesem 14-tägigen Versuchsdesign konnte keine Hypertrophie der Nieren durch Diabetes mellitus beobachtet werden.

## **4. DISKUSSION**

Die Ergebnisse der Tierexperimente werden unter drei verschiedenen Aspekten diskutiert. Zuerst soll die diabetische Hyperfiltration von Dopamin D<sub>3</sub> Knockout Mäusen am Modell des Streptozotocin-induzierten Diabetes mellitus diskutiert werden. Die Natriumexkretion bei Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor defizienten Mäusen mit insulinabhängigem Diabetes mellitus wird ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit sein. In wie weit die diabetische Hyperfiltration und die Natriumexkretion an der Entstehung einer Hypertension beteiligt sind, soll anhand der präsentierten Forschungsergebnisse der Schwanzdruckmessung an wachen Mäusen diskutiert werden. Wie die Effekte der Insulinbehandlung bei den verschiedenen Versuchsgruppen sich auswirken, wird Inhalt aller drei Diskussionspunkte sein.

### **4.1 D<sub>3</sub> Rezeptor und diabetische Hyperfiltration**

Zur Durchführung der Experimente diente das Modell des Streptozotocin (STZ)-induzierten Diabetes mellitus bei Dopamin D<sub>3</sub> Knockout- und Wildtypmäusen. Streptozotocin ist ein aus *Streptomyces achromogenes* gewonnenes Antibiotikum. Schon vor 40 Jahren wurde bei Ratten und Hunden erstmals durch eine i.v.-Injektion von STZ eine diabetische Stoffwechsellage beobachtet (Ratieken et al. 1963). In weiteren Studien (Junod et al. 1967) konnte gezeigt werden, dass STZ selektiv die  $\beta$ -Zellen des Pankreas zerstört, jedoch selbst keine nephrotoxische Wirkungen aufweist. Bereits eine Stunde nach STZ-Injektion konnten histologische Veränderungen der  $\beta$ -Zellen des Pankreasgewebes nachgewiesen werden. Nach weiteren 7-10 Stunden zeigten sich massive Degranulationen und Nekrosen der Zellen. Der Untergang der Zellen machte sich auch im Absinken des Insulinspiegels bemerkbar. Der Insulinspiegel sank dabei unter 5% des Ausgangswertes. Eine darauffolgend eintretende Hyperglykämie konnte nach 12-24 Stunden beobachtet werden. Die

Effekte der STZ-Applikation auf die  $\beta$ -Zellen des Pankreas sind dosisabhängig (Junod et al. 1969, Tomlinson et al. 1992). Bei Ratten genügt eine Dosis von 60 mg/kg, um eine diabetische Stoffwechsellage hervorzurufen. Bei einer Injektion von 100 mg/kg sind die Stoffwechselstörungen so schwerwiegend, dass die Tiere bereits nach 2-3 Tagen sterben. Bei Mäusen konnte ebenfalls eine dosisabhängige Wirkung von STZ nachgewiesen werden (Ito et al. 1999). Die Glucosekonzentration im Plasma stieg kontinuierlich über einen Zeitraum von neun Wochen bei einer i.p. Injektion von STZ von 100 mg/kg an. Dabei war eine Reduktion der  $\beta$ -Zellen des Pankreas zu beobachten. Bei dieser Dosis kommen die Tiere noch ohne Insulinsubstitution aus. Einen insulinabhängigen Diabetes mellitus mit völliger Zerstörung der  $\beta$ -Zellen konnte durch eine Dosis von 200 mg/kg STZ erzeugt werden.

Nach Vorversuchen wurde in der vorliegenden Arbeit eine einmalige Dosis von 120 mg/kg STZ intraperitoneal (i.p.) den Tieren verabreicht. Die Mäuse, die nach 48 Stunden noch keine diabetische Stoffwechsellage aufwiesen, erhielten eine weitere Dosis von 60 mg/kg STZ i.p. Die klinischen Zeichen der frühen Phase des Diabetes mellitus spiegeln sich in der auftretenden Hyperglykämie, Polyurie, Polydipsie, Polyphagie sowie in der Gewichtsreduktion (siehe Tabelle 3) wieder. Diese Symptomatik wurde auch von anderen Autoren (O'Donnell et al. 1988, Bank et al. 1988, Craven et al. 1997, Tomlinson et al. 1992) beobachtet, die ebenfalls durch STZ-Applikationen bei Tieren einen experimentellen Diabetes mellitus induzierten.

In der vorliegenden Arbeit befanden sich die Tiere während der Clearanceexperimente in einem stabilen Zustand. Dies bestätigten die kontinuierlichen Messungen von Blutdruck und Herzfrequenz sowie die regelmäßige Bestimmung des Hämatokritwertes. Im Bezug auf das Volumen waren alle Gruppen gut ausgeglichen bilanziert, so dass die Abschwächung bzw. die Steigerung der Hyperfiltration nicht von unspezifischen Änderungen des Volumenausgleichs beeinflusst wurde. Nicht diabetische Kontrolltiere (CON), die mit Vehikel (Citratpuffer) behandelt wurden, dienten als Vergleichsgruppe.

Bei der Durchführung der Clearanceexperimente konnte die diabetische Hyperfiltration (DH), ein klassisches Merkmal der Frühphase der diabetischen Nephropathie (DN), beobachtet werden. Von vielen Autoren wird die diabetische Hyperfiltration als verantwortlicher Parameter für die Progression der diabetischen Nephropathie angesehen. Untersuchungen bei Patienten mit insulinabhängigem Diabetes mellitus weisen darauf hin, dass eine erhöhte GFR mit einem größeren Risiko für die Entwicklung einer DN sowie einer terminalen Niereninsuffizienz assoziiert ist (Mogensen und Christensen 1984, Mogensen 1986). Schon in den ersten Tagen nach STZ-Injektion beschrieb Carney et al. (1997) eine 1,5-fache Steigerung der GFR. Erhöhte Werte der hämodynamischen Parameter beim Diabetes mellitus wurden auch von Hostetter et al. (1991) und Jensen et al. (1981) beobachtet. Eine Hypothese zur Erklärung der DH ist der erhöhte Blutfluss durch die Niere (Mogensen 1971, Christiansen et al. 1981). Möglicherweise wird als Ursache der glomerulären Hyperfiltration eine Erniedrigung des renalen arteriolen Widerstandes mit nachfolgender Erhöhung des glomerulären Kapillardrucks und Steigerung des renalen Plasmaflusses diskutiert (Bank 1991). Weiterhin wird eine Schädigung der Endothel- und Mesangiumzellen, die durch Migration von Makrophagen zu einer Entzündungsreaktion führen, als Ursache der glomerulären Hyperfiltration mit Erhöhung des glomerulären Perfusionsdruckes angesehen (Sharma und Ziyadeh 1995). Welche Pathomechanismen der diabetischen glomerulären Hyperfiltration genau zugrunde liegen, ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Als mögliche Mediatoren, die zur Entstehung der DH beitragen, werden vasoaktive Hormone, wie Prostaglandine, Angiotensin II sowie der atriale natriuretische Faktor (ANF) oder Katecholamine genannt (Bank et al. 1988, Bank 1991).

Seit Jahren ist die aminosäurebedingte Hyperfiltration ein an Hunden (Shannon et al. 1932), Ratten (Meyer et al. 1983) und beim Menschen (Luippold et al. 2001) bekanntes Phänomen, dessen Mechanismus noch nicht genau bekannt ist. Möglicherweise spielen humorale und intrarenale Faktoren dabei eine Rolle (King und Levey 1993). Eine glomeruläre Hyperfiltration durch Infusion von



Aminosäuren wurde in der eigenen Arbeitsgruppe an Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen (KO) beobachtet. In Clearanceexperimenten wurde den Mäusen eine 10 %-ige Aminosäurelösung (AS) infundiert. Bei den Wildtyptieren (WT) verursachte die AS Infusion eine signifikante Steigerung der GFR. Im Gegensatz dazu konnte die GFR der KO Mäuse durch Infusion von AS nicht beeinflusst werden. Weiterhin konnte in Untersuchungen an Ratten gezeigt werden, dass durch die Denervierung der Nieren die aminosäurebedingte Hyperfiltration gehemmt wurde (Mendez et al. 1991, Mühlbauer et al. 1997). Die präsynaptische Lokalisation der D<sub>2</sub> ähnlichen Rezeptoren könnte auf eine funktionelle Verknüpfung der Dopaminrezeptoren mit dem autonomen Nervensystem hinweisen. Somit könnte über die Hemmung der Noradrenalinfreisetzung durch Aktivierung der Dopaminrezeptoren eine Vasodilatation der renalen Gefäße, die zur GFR-Steigerung durch AS führt, erklärt werden. Im Gegensatz zur physiologischen Hyperfiltration, als Reaktion auf die AS Infusion, wird die auftretende Hyperfiltration beim Diabetes mellitus als pathologisch betrachtet. Ein zusätzlicher Faktor für die DH könnte die Erhöhung der Futtermenge sein. Durch die vermehrte Aufnahme von Nahrungsproteinen wird die Nierenfunktion von Ratten beeinflusst (King und Levey 1993). Die erhöhte Proteinaufnahme führt zur Steigerung der GFR, der Diurese und der Natriurese. Die Autoren folgerten daraus, dass Proteine bzw. Aminosäureinfusionen funktionelle Veränderungen an den Nieren bewirken könnten. Entsprechend kann durch Proteinrestriktion die Hyperfiltration bei Diabetikern gehemmt werden (Kupin et al. 1987).

In wie weit der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor an der DH beteiligt ist, soll im Folgenden diskutiert werden. In vorangegangenen Versuchen der eigenen Arbeitsgruppe wurde diabetischen Ratten kontinuierlich über zwei Wochen der selektive D<sub>3</sub> Rezeptorantagonist BSF 135170 verabreicht. Die aufgetretene diabetische Hyperfiltration konnte durch die Gabe des D<sub>3</sub> Rezeptorantagonisten nahezu vollständig aufgehoben werden. Bei den nicht-diabetischen Tieren, die mit der gleichen Dosis BSF 135170 behandelt wurden, wurde keine Änderung der renalen Hämodynamik beobachtet. Dies deutet darauf hin, dass BSF 135170

einen spezifischen Effekt auf die DH haben könnte (Luippold et al. 2001). In einer weiteren Untersuchung an tuberoinfundibulären dopaminergen Neuronen (Lin et al. 2000) war die neuronale Dopaminfreisetzung durch Gabe des selektiven Dopamin D<sub>3</sub> Agonisten 7-OH-DPAT um 80% vermindert, wobei Waters et al. (1993) die Wirkung von 7-OH-DPAT durch Gabe des selektiven Dopamin D<sub>3</sub> Antagonisten U-99194A vollständig aufheben konnte. Auch durch die Gabe von Aminosäuren kann eine Hyperfiltration ausgelöst werden (Luippold und Mühlbauer 1998, Luippold et al. 2001). In Studien am D<sub>2</sub> Rezeptor, der eine starke Homologie mit dem D<sub>3</sub> Rezeptor aufweist, konnte eine Beteiligung des Rezeptors an der aminosäurebedingten Hyperfiltration beobachtet werden. Durch pharmakologische Stimulation an Ratten mit dem D<sub>2</sub> Agonisten Quinpirol konnte eine GFR-Steigerung sowie eine Diurese als auch Natriurese gezeigt werden, die vergleichbar mit der aminosäurebedingten Hyperfiltration ist (Luippold et al. 1998). Dass auch diese durch D<sub>2</sub> Agonisten entstandene Hyperfiltration wieder aufgehoben werden konnte, zeigten Versuche mit dem zentral und peripher wirkenden Antagonisten S(-)-Sulpirid und dem selektiv peripher wirkenden Antagonisten Domperidon. Die Hyperfiltration konnte gehemmt werden, die Effekte auf die Diurese und Natriurese waren jedoch weniger ausgeprägt. In einer weiteren Untersuchung an Ratten konnte in der Frühphase eines STZ -induzierten DM durch Gabe von L-Dopa und des selektiven D<sub>1</sub> Agonisten Fenoldopam jedoch eine diabetische Hyperfiltration *gehemmt* werden (Barthelmebs et al. 1991). Durch die vasodilatatorischen Effekte auf die Vasa efferentes konnte die intraglomeruläre Hypertension reduziert werden. Eine Steigerung der Hyperfiltration dagegen wurde durch Gabe von Carbidopa (Decarboxylasehemmer) und des selektiven D<sub>1</sub> Antagonisten SCH 23390 beobachtet.

Welche Rezeptoren der D<sub>2</sub> Unterfamilie für die Hemmung der GFR verantwortlich sind, konnte bisher noch nicht eindeutig geklärt werden. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren im Hinblick auf die diabetische Hyperfiltration weiter untersucht werden.

In den Clearanceexperimenten der vorliegenden Arbeit wurde nach 14-tägiger Diabetesinduktion eine manifeste Hyperfiltration bei diabetischen Dopamin D<sub>3</sub> Knockout Mäusen (DM-KO) und den diabetischen Wildtyptieren (DM-WT) gegenüber den zugehörigen Kontrollgruppen (CON-WT, CON-KO) (s. Tabelle 4) gezeigt. Ein signifikanter Unterschied zwischen der DM-KO- und der DM-WT Gruppe konnte nicht beobachtet werden. Auch in den beiden CON- und LIN-DM Gruppen wurde eine nahezu identische GFR sowohl bei den WT- als auch bei den KO Tieren beobachtet. Da bei den CON- und LIN-DM Gruppen die KO- und WT Tiere eine ähnliche GFR aufwiesen, könnte das erreichte Signifikanzniveau der DM-KO Tiere ( $p < 0,05$  vs. CON-KO) durch die höhere n-Zahl der CON-KO Tiere erklärt werden. Dieses Ergebnis widerspricht einer früheren Arbeit der eigenen Arbeitsgruppe (Tappe 2003). Dort wurde im selben Versuchsdesign ein signifikanter GFR-Anstieg bei diabetischen WT-Mäusen gegenüber der normoglykämischen Kontrollen beobachtet, nicht aber bei Dopamin D<sub>3</sub> KO Tieren, was darauf hindeutet, dass der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor an der Hyperfiltration beim experimentellen Diabetes mellitus regulatorisch beteiligt ist. Dieses Ergebnis widerspricht einer weiteren Untersuchung an Patienten mit Diabetes mellitus Typ-1. Hier konnte gezeigt werden, dass durch Dopamininfusion die hämodynamische Antwort erhalten blieb, während die Infusion von Aminosäuren keinen Einfluss auf die renale Hämodynamik zeigte (ter Wee et al. 1987). Allerdings sind aufgrund der methodischen Unterschiede der Untersuchungen die Ergebnisse sicherlich nur eingeschränkt vergleichbar. In weiteren Clearanceexperimenten an Ratten konnte durch pharmakologische Stimulation mit dem selektiven D<sub>3</sub> Agonisten 7-OH-DPAT eine dosisabhängige Steigerung der GFR und eine Reduktion des renalen Plasmaflusses beobachtet werden (Luippold et al. 2000). Die Normalisierung der GFR zeigt sich entsprechend in weiteren Experimenten mit diabetischen Ratten unter Gabe eines selektiven D<sub>3</sub> Antagonisten (Mühlbauer und Schneider 2000). Insgesamt deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren an der Regulation der renalen Hämodynamik beteiligt sind.

Ein Grund, weshalb in der vorliegenden Arbeit gegenüber früheren Ergebnissen (Tappe 2003) keine Unterschiede zwischen WT- und KO Tieren zu beobachten

waren, könnten die verschiedenen Kontrolltiere sein, die für diese Clearanceexperimente verwandt wurden. In der Arbeit Tappe (2003) wurden C57Bl6N Mäuse als Kontrolltiere benutzt. In der vorliegenden Arbeit hingegen wurde mit reinen Wildtypen experimentiert (s. Kapitel 2.1.1 Generierung von D<sub>3</sub> KO-Mäusen). Dass diese verschiedenen Mausstämmen unterschiedliches Hyperfiltrationsverhalten zeigen, konnte in Vorversuchen der eigenen Arbeitsgruppe schon bestätigt werden. Somit sollte bei der Verwendung der Maus zu experimentellen Zwecken immer in Betracht gezogen werden, dass Differenzen in der renalen Basalfunktion zwischen den einzelnen Mausstämmen vorliegen können. Das Nierengewicht, der Nierenindex, der das Verhältnis zwischen Nierengewicht zu Körpergewicht wiedergibt, sowie der mittlere arterielle Blutdruck unterscheiden sich zwischen den verschiedenen Mausstämmen (Schlager 1966, Schlager 1968, Hackbarth und Harrison 1982b). In einer weiteren Studie (Hackbarth und Hackbarth 1982a) wurde die renale Funktion bei 24 unterschiedlichen Mausstämmen untersucht. Hier wurde kein Unterschied für die Natrium- und Kaliumausscheidung, die Osmolalität und das Urinvolumen zwischen weiblichen und männlichen Mäusen *eines* Stammes festgestellt. Eine 6-10-fache Differenz der erhobenen Parameter wurde jedoch zwischen den unterschiedlichen Mausstämmen beobachtet. Es wird angenommen, dass die Unterschiede in den Nahrungsgewohnheiten aber auch in der Struktur und Funktion der Niere begründet liegen. Um die Funktion des ausgeschalteten Gens eindeutig charakterisieren zu können, sollten Experimente bei genmanipulierten Mäusen (z.B. Knockout Mäuse) an verschiedenen Mausstämmen und den entsprechend generierten Kontrollgruppen durchgeführt werden (Meneton et al. 2000). Einen weiteren wichtigen Faktor, der bei Untersuchungen mit Mäusen berücksichtigt werden sollte, stellt der zirkadiane Schlaf-Wach-Rhythmus bei nachtaktiven Nagern dar. Hier konnte beobachtet werden, dass die Tiere nachts eine im Vergleich zum Tag bis um das vierzigfache gesteigerte Urinelektrolytausscheidung aufweisen (Cambar et al. 1981).

Einen zusätzlichen Einfluss auf die renale Hämodynamik scheint das Alter der Tiere zu haben. Durch den Alterungsprozess werden funktionelle und strukturelle Veränderungen nicht nur im kardiovaskulären und respiratorischen System, sondern auch im renalen System beobachtet (Epstein 1996). In einer weiteren Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe wurden zur Beurteilung der funktionellen Reserve bei jungen und älteren CD-1 Mäusen eine Aminosäurelösung infundiert. Bei den jungen Tieren stieg die GFR signifikant an, bei den älteren Tieren veränderte sich die GFR dagegen nicht (Luippold et al. 2002). Möglicherweise kommen die hämodynamischen Veränderungen im Alter durch die reduzierte Gesamtzahl der funktionierenden Glomeruli zustande. Auch Fliser et al. (1993) konnte bei Tieren mit zunehmendem Lebensalter einen Abfall des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate beobachten. Außerdem lässt sich mit zunehmendem Alter bei Mäusen eine Vergrößerung der gesamten Niere beobachten. Möglicherweise könnte so die verminderte Filtrationsleistung kompensiert werden (Verzár und Hugin 1957; Hackbarth und Harrison 1982b). Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit darauf geachtet, dass für die Experimente in den verschiedenen Versuchsgruppen Tiere mit ähnlichem Alter verwendet wurden.

Abgesehen von Störungen im dopaminergen System könnte die DH durch die erhöhte intravasale Glucosekonzentration zustande kommen (Ortola et al. 1987 und Sakamoto et al. 1995). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei Probanden mit basaler diabetischer Hyperfiltration durch Gabe einer Glucoseinfusion die GFR um bis zu 35% gesteigert werden konnte. Bei gesunden Probanden jedoch nur ein GFR-Anstieg um 6-10% zu beobachten war (Viberti und Jones 1995). Das Ausmaß der DH könnte möglicherweise von einer vorangegangener Schädigung der Gefäße durch chronisch erhöhten Blutglucosespiegel oder durch Störung des Hormongleichgewichts abhängig sein.

Weiterhin könnte die osmotische Wirkung der erhöhten Glucosekonzentration beim DM zu einer Volumenexpansion führen, die zum Teil auch für die erhöhte Diurese bei Diabetikern verantwortlich ist. Die vermehrte Harnausscheidung

führt normalerweise zur adäquat gesteigerten Flüssigkeitsaufnahme, womit der renale Verlust wieder ausgeglichen wird. Daraus resultiert wiederum eine intravasale Volumenexpansion. Durch diese Volumenexpansion werden spezialisierte Zellen des rechten Vorhofs stimuliert und der atriale natriuretische Faktor (ANF) vermehrt ausgeschüttet. Dieser Mechanismus führt zur GFR-Steigerung mit dem Ziel der Volumensenkung. Wurde dagegen den Tieren ein ANF-Antiserum verabreicht, konnte ein Rückgang der GFR beobachtet werden (Ortola et al. 1987). Somit könnte auf diese Weise ANF eine Rolle bei der glomerulären Hyperfiltration spielen.

Für die pathologisch veränderte renale Hämodynamik beim DM könnte auch ein verminderter tubuloglomerulärer Feedback (TGF) verantwortlich sein. Die diabetische Stoffwechsellage ist unter anderem durch eine erhöhte Glucosekonzentration im Blut charakterisiert. Bedingt durch diesen erhöhten Blutglucosespiegel wird in der Niere mehr Glucose filtriert. Gleichzeitig wird durch den Natrium/Glucose-Cotransporter auch entsprechend mehr Natrium tubulär reabsorbiert. Dies wiederum führt zu einer geringeren Natriumkonzentration an der Macula densa mit der Folge einer Verminderung des TGF und einer Steigerung der GFR (Woods 1993, Vallon et al. 1999). Demnach müsste eine verminderte Natriumausscheidung beim Diabetes mellitus zu beobachten sein, die weder in der vorliegenden Arbeit noch in anderen Arbeiten beobachtet wurde. Betrachtet man dagegen die Natriumausscheidung ( $U_{NAV}$ ) der Tiere in den Stoffwechselkäfigversuchen (s. Tabelle 3), so ist eine signifikante Steigerung der Natriumausscheidung bei den diabetischen Dopamin  $D_3$  Knockout Mäusen zu beobachten. Möglicherweise könnten durch die diabetische Stoffwechsellage morphologische Veränderungen bzw. eine Schädigung der Mesangiumzellen der Macula densa entstehen (Seyer-Hansen et al. 1980), die die Natriumempfindlichkeit dieser spezialisierten Zellen herabsetzt.

Einen weiteren Einfluss auf die glomeruläre Hämodynamik könnten die morphologischen Veränderungen der Nieren haben. Schon wenige Tage nach

Induktion des Diabetes mellitus konnten vergrößerte Nieren und eine Erhöhung des Nierengewichtes beobachtet werden (Seyer- Hansen 1983). Die Prognose von Diabetikern mit großen Nieren ist schlechter als die von Patienten, deren Nierengröße noch im Normbereich liegt (Baumgartl et al. 1998). Die Erhöhung des Nierengewichts kann somit als morphologischer Marker für die Progression der diabetischen Nephropathie angesehen werden.

In der vorliegenden Arbeit konnten in allen Versuchsgruppen (CON-, DM- und LIN-Gruppen) keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Nierengewichte und der Nierenindices festgestellt werden (s. Tabelle 5). Die Pathogenese der Hypertrophie der Nieren ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Hypertrophie der Glomeruli wird vor allem für die Gewichtszunahme der Nieren verantwortlich gemacht (Seyer-Hansen 1976, Österby und Gundersen 1980, Seyer-Hansen 1983). Bereits vier Tage nach Induktion des Diabetes mellitus konnte bei Ratten eine Vergrößerung des glomerulären Volumens beobachtet werden. Eine Zunahme der Länge des proximalen Tubulus und Vergrößerung des tubulären Durchmessers trat mit Verzögerung erst nach 47 Tagen ein (Seyer-Hansen et al. 1980). Der Hypertrophie der Nieren wird der Einfluss von Wachstumsfaktoren – speziell dem transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) zugeschrieben. Bereits zwei Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus bei Ratten konnte eine zweifache Erhöhung des TGF- $\beta$ 1 im diabetischen Nierengewebe gezeigt werden (Shankland und Sholey 1994). Der Beobachtungszeitraum entspricht zwar dem selben Zeitraum wie im Versuchsdesign in der vorgelegten Arbeit, jedoch konnte hier eine Hypertrophie der Nieren nicht beobachtet werden. Besonders in der Frühphase der diabetischen Nephropathie scheint der transforming growth factor- $\beta$ 1 ein wichtiger Mediator der Hypertrophie zu sein (Ziyadeh und Sharma 1995, Rabkin und Fervenza 1996, Fine et al. 1992). Es werden vermehrt Kollagene, Fibronectin und Proteoglykane produziert, die zu verstärktem Wachstum der entsprechenden Strukturen in der Niere führen (Viberti 1979, Di Mario et al. 1990). Dies könnte eine Erklärung unter anderem für die Verbreiterung der Basalmembran, der Hypertrophie des Mesangiums und der Volumenzunahme der Glomeruli und Tubuli sein. Die Beteiligung des growth hormon (GH) wird auch durch Esposito et al. (1996) bestätigt. Hier

konnte bei diabetischen Mäusen durch Gabe eines GH-Antagonisten die diabetische Nephropathie gehemmt werden. Möglicherweise könnte beim Diabetes mellitus durch die hyperglykämische Stoffwechsellage auch die Produktion von Diacylglycerin (DAG) und Proteinkinase C (PKC) stimuliert werden und dadurch wiederum eine TGF- $\beta$ 1-Aktivierung daraus resultieren (Koya et al. 1997).

#### **4.2 D<sub>3</sub> Rezeptor und Natriumexkretion**

Eine der zentralen Funktionen der Niere ist die Aufrechterhaltung und Regulation des Wasser- und Elektrolythaushalts. Im Organismus werden durch präzise Regulationsprozesse der Niere lebenswichtige Größen wie Blutdruck, Extrazellulärflüssigkeit und Organdurchblutung im Gleichgewicht gehalten. In welchem Maße der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor Einfluss auf den Salzhaushalt – speziell auf die Natriumexkretion hat, soll im folgenden diskutiert werden.

Dopamin wurde wiederholt als natriuretisches Hormon beschrieben (Lee 1982, Aperia et al. 1987, Bertorello et al. 1988, Seri et al. 1990). Hauptsächlich die Dopamin D<sub>1</sub> Rezeptorfamilie scheint eine hemmende Wirkung auf die Flüssigkeits- und Elektrolytresorption zu haben (Felder et al. 1989). Ein Mechanismus, der die Natriurese erklären könnte, ist die Hemmung des Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Antiport an der luminalen Seite des proximalen Tubulus (Felder et al. 1989b). Ein weiterer möglicher Mechanismus scheint durch die Inhibierung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase an der basolateralen Seite ebenfalls der proximalen Tubuluszellen zu sein (Aperia et al. 1987). Des weiteren wurde an Ratten gezeigt, dass durch Stimulation der D<sub>2</sub> Rezeptorfamilie auch eine Hemmung der Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase möglich ist (Aperia et al. 1994).

In der vorliegenden Arbeit war während der Stoffwechselkäfigversuche bei allen Versuchsgruppen (CON, DM und LIN-DM) die Natriumausscheidung ( $U_{NaV}$ ) der WT Tiere gegenüber den KO Tieren nahezu identisch (s. Tabelle 3). Gleiches gilt für die Kalium- und Chloridausscheidung ( $U_{KV}$  und  $U_{ClV}$ ). Bedingt durch die



diabetische Stoffwechsellage der Tiere wurde bei den beiden diabetischen Versuchsgruppen (DM-WT und DM-KO) eine Natriurese festgestellt. Auch hier schieden sowohl die WT als auch die KO Tiere die selbe Menge Natrium aus. Die DM-KO Tiere erreichten gegenüber der entsprechenden Kontrolltieren das Signifikanzniveau ( $p < 0,05$  vs. CON-KO). Die Kalium- und Chloridausscheidung war bei den DM Tieren ebenfalls erhöht. Die Urinelektrolytausscheidung der mit Insulin behandelten Gruppen (LIN-WT und LIN-KO) war denen der Kontrollgruppen sehr ähnlich. Ein signifikanter Rückgang der Natrium- und Kaliumausscheidung der LIN-WT Tiere vs. der DM-WT Tiere konnte beobachtet werden.

Betrachtet man in den Clearanceversuchen (s. Tabelle 4) die Natriumausscheidung im Urin ( $U_{Na}V$ ) an narkotisierten Mäusen, so sind die Ergebnisse der verschiedenen Versuchsgruppen ähnlich denen der Stoffwechselkäfigversuchen. Auch hier ist die Natriumexkretion in allen Versuchsgruppen (CON, DM und LIN-DM) fast identisch. Unterschiede zwischen WT und KO Tieren konnten in diesem Versuchsdesign ebenfalls nicht beobachtet werden. Wie erwartet, ist bei den Tieren im hyperglykämischen Zustand (DM-WT und DM-KO) die Natriumausscheidung erhöht. Gleiches gilt auch für die Kaliumausscheidung und die fraktionelle Natriumexkretion ( $FE_{Na}$ ), die prozentual die renale Natriumausscheidung der Gesamtmenge des filtrierten Natriums angibt. Ebenso wurde bei den mit Insulin behandelten Tieren (LIN-WT und LIN-KO) wieder ein deutlicher Rückgang der Natriumausscheidung beobachtet. Zusammengefasst zeigen die Versuche, dass in diesem Modell der Dopamin  $D_3$  Rezeptor für die Regulation der Natriumausscheidung keine Rolle zu spielen scheint.

Asico et al. konnten zeigen, dass Mäuse mit ausgeschaltetem  $D_3$  Rezeptorgen verzögert auf eine akute Salzbelastung mit einer gesteigerten Natriurese reagieren (Asico 1998). Die Natriumexkretion der Dopamin  $D_3$  defizienten Mäuse überstieg kaum den Basalwert, während bei den Wildtyptieren die Natriumausscheidung um das Doppelte anstieg.

Weitere Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe zeigen, dass der Dopamin  $D_3$  Rezeptor an der Natrium- und Urinausscheidung beteiligt ist. An

narkotisierten Ratten führte eine Volumenexpansion mit isotonischer Kochsalzlösung (Infusionsvolumen von 2,5% des Körpergewichts pro Stunde) zu einer gesteigerten Natrium- und Urinausscheidung. Anschließend wurde den Tieren der selektive Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptorantagonist BSF 135170 verabreicht. Unter den gleichen Versuchsbedingungen konnte eine deutlich geringere Natrium- und Urinausscheidung beobachtet werden (Luippold et al. 1998). In weiteren Untersuchungen an chronisch denervierten Ratten wurde durch die Gabe des selektiven Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoragonisten 7-OH-DPAT kein Anstieg der GFR und des Urinzeitvolumens beobachtet. Ebenso war der Anstieg der absoluten und fraktionellen Natriumausscheidung nach Infusion von 7-OH-DPAT abgeschwächt. Dies deutet auf eine funktionelle Verknüpfung des dopaminergen Systems mit der neuronalen Versorgung der Niere hin. Möglicherweise könnte die Aktivierung der präsynaptisch lokalisierten D<sub>3</sub> Rezeptoren durch 7-OH-DPAT die Noradrenalinfreisetzung hemmen. Durch die verminderte NoradrenalinKonzentration würden die vasodilatierenden Faktoren (Prostaglandine, Stickstoffmonoxyd) überwiegen, die Niere würde vermehrt durchblutet werden und dies zu einem GFR Anstieg führen. (Luippold et al. 1999). Möglicherweise wird durch das vermehrte intravasale Volumen die renale Dopaminproduktion stimuliert und über die Aktivierung der D<sub>3</sub> Rezeptoren könnte dieser Mechanismus zu einer verminderten tubulären Rückresorption, mit der Folge einer gesteigerten Natriurese und Diurese führen. Eine Vielzahl von Studien deuten darauf hin, dass der Dopamin D<sub>1</sub> Rezeptor an der gesteigerten Natrium- und Wasserausscheidung durch Volumenexpansion mit verantwortlich ist (Hegde et al. 1989, Hegde et al. 1989). Ebenso konnte hier durch Dopamin D<sub>1</sub> Antagonisten die Natriurese und Diurese wieder aufgehoben werden (Frederickson et al. 1985). Möglicherweise kommen im Bezug auf die Volumenexpansion synergistische Wirkmechanismen von D<sub>1</sub> und D<sub>2</sub> ähnlichen Rezeptorfamilien zur Geltung (Jose et al. 1998). In einer weiteren experimentellen Studie an Ratten konnte gezeigt werden, dass durch Gabe des unselektiven Dopamin Rezeptorblockers Haloperidol die Natriumausscheidung in Abhängigkeit der Volumenexpansion (VE) gehemmt werden kann (Hansell und Fasching 1991). Bei einer 2%-igen VE war die natriuretische Antwort um

67% niedriger als die der Kontrollgruppe. Dagegen wurde bei einer 10-%igen VE nur ein Unterschied von 19% beobachtet. Daraus kann geschlossen werden, dass der Effekt des inaktivierten Dopaminrezeptorsystems vom Ausmaß der VE abhängig ist. Da in der vorliegenden Arbeit die diabetischen WT und KO Tiere im Clearanceversuch aufgrund ihrer Stoffwechsellage sich eher in einem hypovolämischen Zustand befinden (siehe Hämatokritwerte der Tabelle 4), muss die Natriuresis der diabetischen Tiere durch die Hyperglykämie erklärt werden. Weitere physiologische Faktoren, die bei der natriuretischen Antwort auf VE mit involviert sein könnten, sind unter anderem die renale Hämodynamik (Earley und Fiedler 1965), das sympathische Nervensystem (Alexander et al. 1974), physikalische Faktoren (Martino et al. 1967), der ANF (Hirth et al. 1986) und Prostaglandine (Rosenthal et al. 1974).

Durch eine weitere Untersuchung der eigenen Arbeitsgruppe (Tappe 2003) konnte die Hypothese, dass die Ausschaltung des D<sub>3</sub> Rezeptorgens mit einer Salzretention verbunden ist, nicht bestätigt werden. Hier wurde, ebenfalls in Versuchen mit oraler und parenteraler Salzbeladung, sowohl bei WT als auch KO Tieren aller Versuchsgruppen eine fast identische Natriumausscheidung beobachtet. Auf Grund des unterschiedlichen Versuchsdesigns und dem variablen genetischen Hintergrund der verwendeten Mäuse, ist ein direkter Vergleich der Ergebnisse mit der Salzbeladung von Asico et al. (1998) sicherlich erschwert. In früheren Untersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe konnte auch kein funktioneller Zusammenhang zwischen der Dopamin- und der Natriumausscheidung beobachtet werden (Mühlbauer 1994). Möglicherweise ist die funktionelle Bedeutung von Dopamin im Tubulussystem beschränkt und eventuell durch andere Faktoren beeinflussbar.

In neueren Studien wurden weitere Kompensationsmechanismen untersucht, die sich auf die NaCl-Ausscheidung auswirken könnten. Brooks et al. (2001) konnte an Knockout Mäusen mit Defekt am Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Antiporter und einer weiteren Gruppe mit defizientem Na<sup>+</sup>-Cl<sup>-</sup> Cotransporter zeigen, dass diese Transporter an der Rückresorption des Natriums im proximalen und distalen Tubulussystem

beteiligt sind. Durch Antikörper konnte eine gesteigerte Expression eines Natrium-Phosphat Cotransporters und eines epithelialen Natriumkanals sowie eine Reduktion der GFR bei den Tieren mit Defekt am  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Antiport beobachtet werden. Die Versuchsgruppe mit defizientem  $\text{Na}^+\text{-Cl}^-$  - Cotransporter zeigten eine kompensatorische Up-Regulation des epithelialen Natriumkanals. In wie weit diese beobachteten Phänomene bei Dopamin  $\text{D}_3$  defizienten Mäusen auftreten können, sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

### **4.3 $\text{D}_3$ Rezeptor und Blutdruckverhalten**

Der Niere liegt nicht nur der Regelmechanismus des Salz- und Elektrolythaushalts zugrunde, ihr wird neben endokrinen und metabolischen Funktionen auch eine zentrale Funktion der Blutdruckregulation zugeschrieben. Im Folgenden soll der Einfluss des Dopamin  $\text{D}_3$  Rezeptors im Hinblick auf die Entstehung einer Hypertonie betrachtet werden.

In der eigenen Arbeitsgruppe wurden in diesem Zusammenhang verschiedene Tierexperimente durchgeführt. Mit Hilfe von salz-sensitiven (DS) und salz-resistenten (DR) Dahl-Ratten wurde die Entwicklung eines salz-abhängigen Hypertonus beobachtet (Luippold et al. 2000). Üblicherweise entwickeln die salz-sensitiven Tiere bei Hoch- und Normalsalz Fütterung einen Hypertonus, während die salz-resistenten Tiere Werte im normotensiven Bereich aufweisen. Nun wurden beide Gruppen mit dem Dopamin  $\text{D}_3$  Rezeptoragonisten 7-OH-DPAT im Clearanceversuch pharmakologisch stimuliert. Die DR Ratten reagierten mit einer Steigerung der GFR und Natriurese. Die DS Ratten zeigten keine Zunahme der GFR, eine Natriurese entwickelten jedoch die Normalsalz ernährten Tiere. In einem weiteren Versuchsdesign wurden Ratten 29 Tage lang mit dem selektiven  $\text{D}_3$  Rezeptorantagonisten BSF 135170 behandelt. Während unter Normalsalzernährung keine Veränderungen des systolischen Blutdrucks beobachtet wurden, konnte unter Hochsalzernährung eine Zunahme des systolischen Blutdrucks bei den DR Ratten gemessen werden. Diese

Untersuchungen und der Blutdruckanstieg bei DR Ratten mit D<sub>3</sub> Rezeptor Antagonistenbehandlung und Hochsalzernährung deuten darauf hin, dass der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor in diesem Modell an der Entstehung eines salzabhängigen Hypertonus beteiligt ist.

Asico et al. (1998) beobachtete die Entwicklung eines salzabhängigen Hypertonus in Versuchen an Dopamin D<sub>3</sub> defizienten Mäusen. Sowohl D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäuse als auch heterozygote Tiere wiesen in gleichem Maße erhöhte diastolische und systolische Blutdruckwerte auf. Normotensive Blutdruckwerte wurden bei den Wildtyptieren gemessen. Eine akute Salzbeladung bei Wildtyptieren und heterozygoten Tieren führte zu einer Steigerung der Urinflussrate und zur vermehrten Natriumexkretion, während bei den D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen die Steigerung weniger ausgeprägt war. Auch die Plasminogenaktivität war entsprechend in D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Tieren höher als bei Wildtyptieren. Die Werte der heterozygoten Mäuse lagen zwischen den Knockout- und Wildtyptieren. Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass die Untersuchungen von Asico und Mitarbeiter an narkotisierten Tieren durchgeführt wurden. Da der Blutdruck durch die Gabe des Narkotikums und durch die Blutabnahme während des Versuchs beeinflusst werden kann (Meneton et al. 2000), ist die Beurteilung des Ergebnisses sicherlich erschwert.

In der vorliegenden Arbeit wurden Blutdruckmessungen an allen sechs Versuchsgruppen (CON-WT, CON-KO, DM-WT, DM-KO, LIN-DM-WT, LIN-DM-KO) sowohl im wachen als auch im narkotisierten Zustand durchgeführt. Es wurde bei den Clearanceversuchen dasselbe Narkotikum wie bei Asico et al. (1998) verabreicht. In der vorliegenden Arbeit wurde den Tieren das Narkotikum intraperitoneal verabreicht. Damit wurden Blutdruckschwankungen, die durch intravenöse Bolusgaben zustande kommen können, vermieden. Erstaunlicherweise konnten keine Unterschiede der gemessenen Blutdruckwerte bei wachen Mäusen beobachtet werden. Die Wildtyptiere zeigten gegenüber den D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen keine signifikanten Blutdruckunterschiede. Im narkotisierten Zustand während der

Clearanceexperimente reagierten jedoch alle Versuchsgruppen mit leicht erhöhtem mittleren arteriellen Druck (MAP). Möglicherweise könnte dieser Unterschied auf einen intraoperativen Stress oder eine Reaktion auf das verabreichte Narkotikum und/oder die Blutabnahme hindeuten. Beim genaueren Betrachten der MAP-Werte im Clearanceversuch (siehe Tabelle 4) hingegen konnte eine leichte Tendenz der Blutdrucksteigerung zwischen 3 und 8 % bei allen Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor defizienten Mäusen, jedoch ohne Erreichen des Signifikanzniveaus, gegenüber den entsprechenden Kontrolltieren beobachtet werden. Diese intraoperative MAP-Erhöhung der KO Tiere könnte ansatzweise mit den gemessenen Blutdruckwerten von Asico übereinstimmen. Interessant wäre in diesem Zusammenhang die Bestimmung der Plasminogenaktivitätswerte der Tiere, was im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt wurde. Möglicherweise könnten die leicht erhöhten MAP-Werte der KO Tiere in den Clearanceversuchen als Reaktion des autonomen Nervensystems erklärt werden. Da durch die fehlenden präsynaptischen Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren der KO Tiere die Hemmung der Noradrenalinfreisetzung nicht mehr gewährleistet ist, könnte dieser Mechanismus den Blutdruckanstieg und die Steigerung der Herzfrequenz der Versuchstiere erklären. Weiterhin wurde beobachtet, dass vor allem Dopaminrezeptoren der D<sub>2</sub> Familie bei der zerebralen Regulation des Blutdrucks eine Rolle spielen (Jose et al. 1999). Eine Hypertension könnte somit auch durch den zerebralen Ausfall des Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptors mit verursacht werden.

Da in der vorgelegten Arbeit bei allen Versuchsgruppen nur während der Clearanceexperimente eine leichte Blutdruckerhöhung zu beobachten war, muß am ehesten von einer intraoperativen streßbedingten Hypertonie ausgegangen werden. In der eigenen Arbeitsgruppe wurden weitere Blutdruckmessungen an wachen Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout- und Wildtypmäusen mit unterschiedlicher Salzdiät durchgeführt. Sowohl bei normalsalz- als auch bei hochsalzernährten jungen Tieren konnten keine signifikanten Blutdruckunterschiede gemessen werden (noch nicht veröffentlichte Arbeit).

#### 4.4 Effekte der Insulinbehandlung

Am Modell des STZ-induzierten Diabetes mellitus an Dopamin D<sub>3</sub> Knockout Mäusen (DM-KO) und den entsprechenden Wildtyptieren (DM-WT) konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die diabetische Hyperfiltration in der Frühphase durch Behandlung mit Insulin in beiden Versuchsgruppen in gleichem Maße verhindert werden kann (siehe Tabelle 4).

Weitere Parameter wie Rückgang der Urinausscheidung, Normalisierung der Elektrolytausscheidung, reduzierte Futter- und Wasseraufnahme sowie der signifikante Rückgang der Glucoseausscheidung (siehe Tabelle 3) kann sowohl bei den DM-KO- als auch den DM-WT Tieren einer nahezu normoglykämischen Stoffwechsellage zugeschrieben werden. Jedoch wurden unterschiedliche Effekte der Insulinbehandlung im Bezug auf die renale Hämodynamik in früheren Arbeiten beobachtet. Einerseits hatte die Insulintherapie keinen Einfluss auf die GFR und den RPF (Hostetter et al. 1981, Michels et al. 1981), andererseits konnte die diabetische Hyperfiltration durch Applikation von Insulin reduziert werden (Jensen et al. 1987). Weshalb solche Differenzen der renalen Hämodynamik unter einer Insulintherapie zustande kommen, konnte bis heute noch nicht vollständig geklärt werden.

Auch quantitative morphologische Veränderungen der Nieren wurden durch eine Insulintherapie beobachtet (Rasch und Dorup 1997). In dieser Studie konnte an diabetischen Ratten gezeigt werden, dass der Blutglucosespiegel mit der Nierengröße korreliert, d.h. je länger mit Insulin behandelt wurde, um so eher kam es zur Reduktion des Nierengewichts. Nach einer Insulinbehandlung von 4 Stunden konnte eine Reduktion des Nierengewichts um 20% beobachtet werden, bei 5-tägiger Insulingabe konnte ein Rückgang des Nierengewichts um 31% gezeigt werden.

Weiterhin konnte in der vorgelegten Arbeit gezeigt werden, dass durch die Applikation der Insulinpellets sowohl im Stoffwechselkäfigversuch als auch in den Clearanceexperimenten die gesteigerte Natriurese der diabetischen Tiere wieder aufgehoben werden konnte (siehe Tabellen 3 und 4). Die Natriumausscheidung im Urin ( $U_{NaV}$ ) der LIN-DM-WT und LIN-DM-KO Tiere war noch

niedriger als die der entsprechenden Kontrollgruppen (siehe Tabelle 3). Dem zufolge konnte eine Erhöhung der Natriumkonzentration im Plasma ( $PI_{Na}$ ) beobachtet werden. In den Glomeruli und im renalen Tubulussystem von Ratten wurden Insulinrezeptoren nachgewiesen (Kurokawa et al. 1979 und 1980, Meezan et al. 1980 und 1982). Nach der Applikation von Insulin wurde eine erhöhte renale  $Na^+K^+$ -ATPase-Aktivität beobachtet, womit der Anstieg der Natriumreabsorption erklärt werden könnte (Rostand et al. 1980, DeFronzo 1981).

Auch scheint die Insulinapplikation bei den diabetischen Tiere keinen weiteren direkten Einfluss auf den Blutdruck zu haben. Die beiden behandelten Versuchsgruppen (LIN-DM-WT und LIN-DM-KO) zeigten bei der Schwanzdruckmessung im wachen Zustand nahezu identische Werte. Im Vergleich zu den diabetischen Tieren (DM-WT und DM-KO) und Kontrollen (CON-WT und CON-KO) wurden ähnliche Blutdruckwerte gemessen. Wahrscheinlich war der diabetische Zeitraum zu kurz, um die Entstehung hypertensiver Blutdruckwerte beobachten zu können.



#### 4.5 Ausblick und klinische Implikation

Frühere Studien weisen darauf hin, dass das Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptorsystem an der diabetischen Hyperfiltration beteiligt sein könnte. In der vorliegenden Arbeit, in einem Mausmodell, scheint jedoch deutlich zu werden, dass zusätzlich andere Mechanismen eine wichtige Rolle in der Regulation der renalen Hämodynamik spielen. Da die meisten Untersuchungen bisher an Ratten durchgeführt wurden, ist es naheliegend, dass andere Spezies durchaus andere Regulationsmechanismen aufweisen. Wie auch von mehreren Autoren beschrieben, scheinen verschiedene vasoaktive Faktoren einen zusätzlichen Einfluss auf die renale Hämodynamik zu haben. Um die Funktion eines ausgeschalteten Gens eindeutig charakterisieren zu können, sollten Experimente bei genmanipulierten Mäusen an verschiedenen Stämmen durchgeführt werden. Interessant wären zudem Langzeitversuche bei diabetischen Dopamin D<sub>3</sub> defizienten Tieren. Von Bedeutung wären in diesem Zusammenhang unter anderem die Albuminausscheidung, die Reninaktivität und die Aldosteronproduktion. Auch morphologische Veränderungen der Niere im Sinne einer diabetischen Nephropathie könnten Aufschluss über den Einfluss der D<sub>3</sub> Rezeptoren bei diesem Krankheitsbild liefern. In wie weit zentrale oder periphere D<sub>3</sub> Rezeptoren für die renale Hämodynamik verantwortlich sind, müssen zukünftige Experimente klären. In dieser Frage könnten Denervierungsversuche oder organspezifische Knockout Tiere weiterhelfen.

Die Reduktion der glomerulären Hyperfiltration sollte als therapeutisches Ziel des DM angestrebt werden, um dadurch die Progression einer diabetischen Nephropathie zu vermindern. Über den Mechanismus der efferenten Vasodilatation und der daraus resultierenden Abnahme des intraglomerulären Kapillardruckes wird bereits mit Hilfe von Angiotensin Converting Enzym (ACE)-Inhibitoren die Progression der DH reduziert. Wichtig ist noch eine effiziente Versorgung mit Insulin, um eine normoglykämischen Stoffwechsellage zu erreichen.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

In verschiedenen tierexperimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass das dopaminerge System an der Regulation der renalen Hämodynamik und der Tubulusfunktion beteiligt ist. Die zu Beginn eines Diabetes mellitus auftretende glomeruläre Hyperfiltration der Niere stellt einen Risikofaktor für die Entwicklung einer diabetischen Nephropathie dar. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welchen Einfluss der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor auf die glomeruläre Hyperfiltration, die renale Natriumausscheidung und damit auch das Blutdruckverhalten bei Mäusen mit durch Streptozotocin (einmalig 120 mg/kg, i.p.) erzeugtem Diabetes mellitus hat.

Hierzu wurde an wachen Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäusen (KO) und den entsprechenden Wildtyptieren (WT), die einen funktionell aktiven Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor aufweisen, Schwanzblutdruckmessungen sowie Stoffwechsellage (SWK)-Versuche durchgeführt. An narkotisierten Tieren wurde in Clearanceexperimenten die glomeruläre Filtrationsrate, das Urinzeitvolumen und die renale Natriumausscheidung bestimmt. Die Untersuchungen wurden an nichtdiabetischen (CON), nicht behandelten diabetischen (DM) und mit Insulin behandelten (LIN-DM) Mäusen nach vorgegebenem Zeitschema innerhalb von 14-17 Tagen nach Induktion des Diabetes mellitus durchgeführt.

Der gemessene systolische Blutdruck war unabhängig von der diabetischen Stoffwechsellage in allen Versuchsgruppen ähnlich. Die KO Tiere zeigten gegenüber den WT Tieren keine signifikanten Unterschiede. In den SWK-Versuchen waren bei den DM Mäusen gegenüber den CON Tieren eine signifikante Polyphagie, Polydipsie, Polyurie und Glukosurie zu beobachten. Die mit Insulin behandelten diabetischen Tiere wiesen eine den CON-Gruppen vergleichbare normoglykämische Stoffwechsellage auf. Der Vergleich der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor Knockout Mäuse mit den WT Tieren erbrachte in den verschiedenen experimentellen Gruppen bezüglich der in den SWK-Versuchen erhobenen Parametern keine signifikanten Unterschiede. Bei den Clearanceexperimenten konnte die typische Diabetes-induzierte glomeruläre Hyperfiltration und eine gesteigerte Natriumausscheidung in den DM-Gruppen

gezeigt werden. Interessanterweise konnte sowohl die glomeruläre Hyperfiltration als auch die gesteigerte Natriumausscheidung durch die Insulinapplikation aufgehoben werden. Keine Hemmung der glomerulären Hyperfiltration war durch das Fehlen der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptoren bei den KO Tieren zu beobachten.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mäuse mit einer diabetischen Stoffwechsellage eine glomeruläre Hyperfiltration entwickeln, die überwiegend durch eine Hyperglykämie bedingt ist. Hingegen scheint in diesem Mausmodell der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor an der pathologischen Hyperfiltration in der Frühphase des Diabetes mellitus nicht beteiligt zu sein. Ebenfalls weist der D<sub>3</sub> Rezeptor unter den untersuchten Bedingungen keinen Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks auf. In Langzeitversuchen über mehrere Monate soll zukünftig geprüft werden, ob der Dopamin D<sub>3</sub> Rezeptor für die Progressionverzögerung einer diabetischen Nephropathie eine Rolle spielt.

## 6. LITERATURVERZEICHNIS

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

Alexander RW, Gill JR, Yamabe H, Lovenberg W, Keiser HR. Effects of dietary sodium and of acute saline infusion on the interrelationship between dopamine excretion and adrenergic activity. *J Clin Invest* 1974; 54: 194-200

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

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

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

Aretha CW, Sinha A, Galloway MP. Dopamine D<sub>3</sub>-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 Dopamin D<sub>3</sub>-Rezeptor gene produces renin-dependent hypertension. *J Clin Invest* 1998; 3: 493-498

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

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

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

Bank N, Lahorra MAG, Aynedjian HS, Schlondorff D. Vasoregulatory hormones and the hyperfiltration of diabetes. *Am J Physiol* 1988; 254: F202-F209

Bank N. Mechanisms of diabetic hyperfiltration. *Kidney Int* 1991; 40: 792-807

Barger G, Ewins AJ. Some phenolic derivatives of phenylalanine. *J Chem Soc* 1910; 97: 2261-2263

Barili P, Ricci A, Baldoni E, Mignini F, Amenta F. Pharmacological characterisation and autoradiographic localisation of a putative dopamine D<sub>3</sub>-receptor in the rat kidney. *Eur J Pharmacol* 1997; 338: 89-95

Barnett R, Scharschmidt L, Ko Y-H, Schlondorff D. Comparison of glomerular and mesangial prostaglandin synthesis and glomerular contraction in two rat models of diabetes mellitus. *Diabetes* 1987; 36:1468-1475

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

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<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity is inhibited during high-salt diet: evidence for DA-mediated effect. *Am J Physiol* 1988; 254: F795-F801

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

Brooks HL, Sorensen AM, Terris J, Schultheis P, Lorenz J, Shull G, Knepper M. Profiling of renal tubule Na<sup>+</sup> transporter abundances in NHE3 and NCC null mice using targeted proteomics. *J Physiol* 2001; 530: 359-366

Burgess LH, Monsma FJ, Shen Y, Jose PA, Sibley DR. Further characterization of D<sub>1A</sub> and D<sub>1B</sub> dopamine receptors in rat kidney. *Soc Neurosci Abst* 1993 Washington DC. 75

Cambar J, Toussaint C, Le Moigne F, Cales PM, Crockett R. Circadian rhythms in rat and mouse urinary electrolytes and nitrogen derivates 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

Christiansen JS, Gammelgaard J, Frandsen M, Parving H-H. Increased kidney size, glomerular filtration rate and renal plasma flow in short-term insulin-dependent diabetics. *Diabetologia* 1981; 20: 451-456

DeFronzo RA. The effect of insulin on renal sodium metabolism. A review with clinical implications. *Diabetologia* 1981; 21: 165

Di Mario U, Cancelli A, Pietravalle P, Altamore G, Mariani G, De Rossi MG, Bernadini G, Pasquale A, Borgia MC, Frontoni S, Marano S. Anionic versus cationic immunoglobulin clearance in normal subjects. a novel approach to the evaluation of charge selectivity. *Nephron* 1990; 55: 400-407

Earley LE, Friedler RM. Studies on the mechanism of natriuresis accompanying increased renal blood flow and its role in the renal response to extracellular volume expansion. *J Clin Invest* 1965; 44: 1857-1865

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

Esposito C, Liu Z, Striker G, Phillips C, Chen N, Chen W, Kopchick J, Striker L. Inhibition of diabetic nephropathy by GH antagonist: A molecular analysis. *Kidney Int* 1996; 50: 506-514

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

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

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

Fine GL, Norman JT, Kujubu DA, Knecht A. Renal hypertrophy. Kap.92, S 3113-3133 In: Seldin Giebisch: *The kidney Physiology and pathophysiology* 1992; Vol.III (2.Aufl., Raven Press, New York)

Fliser D, Haller H. Nephropathie bei Diabetes mellitus Typ 2. *Internist* 2000; 41: 1363-1373

Frederickson ED, Bradley T und Goldberg LI. Blockade of renal effects of dopamine in the dog by the DA<sub>1</sub> antagonist SCH 23390. *Am J Physiol* 1985; 249: F236-F240

Gao D-Q, Canessa LM, Mouradian MM, Jose PA. Expression of the D<sub>2</sub> subfamily of dopamine receptor genes in kidney. *Am J Physiol* 1994; 266: F646-F650

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

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

Goldstein DS, Eisenhofer RSG, Gill JR. Urinary excretion of dihydroxyphenylalanine and dopamine during alterations of dietary salt intake in humans. *Clin Sci* 1989; 76: 517-522

Griffon N, Pilon C, Sautel F, Schwartz JC und Sokoloff P. Two intracellular signaling pathways for the dopamine D<sub>3</sub> receptor: opposite and synergistic interactions with cyclic AMP. *J Neurochem* 1997; 68: 1-9

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&CBAF<sub>1</sub> Mice. *J Gerontol* 1982b; 37: 540-547

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

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

Hedge SS, Jadhav AL und Lokhandwala MF. Role of kidney dopamine in the natriuretic response to volume expansion in rats. *Hypertension* 1989; 13: 828-834

Hedge SS, Ricci A, Amenta F und Lokhandwala MF. Evidence from functional and autoradiographic studies for the presence of tubular dopamine-1 receptors and their involvement in the renal effects of fenoldopam. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 251: 1237-1245

Hirth C, Stasch JP, John A, Kazda S, Morich F, Neuser D, Wohlfeil S. The renal response to acute hypervolemia in caused by atrial natriuretic factor. *J Cardiovasc Res* 1986; 8: 268-275

Hoffman BB, Lefkowitz RJ. Catecholamines and sympathomimetic drugs. In: Gilman AG, Rall TW, Nies AS, Taylor P (Hrsg) *The pharmacological basis of therapeutics*. Pergamon Press, New York, 1990; S. 187-220

Hostetter TH, Troy JL, Brenner BM. Glomerular hemodynamics in experimental diabetes mellitus. *Kidney Int.* 1981; 19: 410-415

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

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

Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Naruse A. New model of progressive non-insulin-dependent diabetes mellitus in mice induced by streptozotocin. *Biol Pharm Bull* 1999; 22: 988-989

Janka HU. Prävalenz des Diabetes mellitus und der Folgekrankheiten. *Diabetologie Informationen* 1996; 4: 243-253

Jensen PK, Christiansen JS, Steven K, Parving HH. Renal function in streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 1981; 21: 409-414

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

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

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

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

Jose PA, Eisner MG, Felder RA. Role of Dopamine in the Pathogenesis of Hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 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

Kebabian JW, Calne D. Multiple receptors for dopamine. *Nature* 1997; 277: 93-96



King AJ, Levey AS. Dietary protein and renal function. *J Am Soc Nephrol* 1993; 3: 1723-1737

Koya D, Jirousek MR, Lin, YW, Ishii H, Kuboki K, King GL. Characterisation 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

Kupin WL, Cortes P, Dumler F, Feldkamp CS, Kilates MC, Levin MW. Effect on renal function of change from high to moderate protein intake in type I diabetic patients. *Diabetes* 1987; 36: 73-79

Kurokawa K, Silverblatt FJ, Klein KL, Wang MS, Lerner RL. Binding of  $^{125}\text{I}$ -insulin to the isolated glomeruli of rat kidney. *J Clin Invest* 1979; 64: 1357

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

Kurokawa K, Lerner RL. Binding and degradation of insulin by isolated renal cortical tubules. *Endocrinology* 1980; 106: 655

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

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

Levesque D. Aminotetralin drugs and  $D_3$  receptor functions. What may partially selective  $D_3$  receptor ligands tell us about dopamine  $D_3$  receptor functions? *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 511-518

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

Levesque D. Aminotretalin drugs and  $D_3$  receptor functions. What may partially selective  $D_3$  receptor ligands tell us about dopamine  $D_3$  receptor functions? *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 511-518

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

Lin JY, Yen SH, Shieh KR, Liang SL, Pan JT. Dopamine and 7-OH-DPAT may act on  $D_3$  receptors to inhibit tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Brain Res Bull* 2000; 52: 567-572

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

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

Luippold G, Makri S, Osswald H, Mühlbauer B. Role of renal nerves in the dopamine D<sub>3</sub> receptor induced renal changes in anaesthetized rats (Abstract). *Pluegers Arch Eur J Physiol* 1999; 437: R187

Luippold G, Benöhr P, Piesch C, Heyne N, Mühlbauer B. Urinary dopamine excretion in healthy volunteers: effect of sodium diet and acute water load. *Eur J Physiol* 2000; 440: 28-33

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

Luippold G, Schneider S, Stefanescu A, Benöhr P und Mühlbauer B. Dopamine D<sub>2</sub>-like receptors and amino acid-induced glomerular hyperfiltration in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2001; 51: 415-421

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

Luippold G, 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-F890

Luippold G, Pech B, Schneider S, Drescher K; Müller R, Gross G, Mühlbauer B. Absence of amino acid-induced glomerular hyperfiltration in dopamine D<sub>3</sub> receptor knockout mice. *J Am Soc Nephrol* 2004; (eingereicht)

Mannich C, Jacobsohn W. Über Oxyphenylalkylamine und Diophenylalkylamine *Ber Dtsch Chem Ges* 1910; 43: 189-193

Martino JA, Earley LE. Demonstration of a role of physical factors as determinants of the natriuretic response to volume expansion. *J Clin Invest* 1967; 46: 1963-1978

Masuhr KF, Neumann M. *Neurologie*. 4.Auflage Hippokrates Stuttgart, 1998; 189-196

McDonald RH, Goldberg LI, McNay JL, Tuttle EP. Effect of dopamine in man: augmentation of sodium excretion, glomerular filtration rate and renal plasma flow. *J Clin Invest*. 1964; 43: 1116-1124

Meezan E, Freychet P. Rat renal glomeruli and tubules have specific insulin receptors of different affinity. *Mol Pharmacol* 1979; 16: 1095

Meezan E, Freychet P. Specific insulin receptors in rat renal glomeruli. In: Lubec G (ed) *The Glomerular Basement Membrane 1<sup>st</sup> International Symposium of Vienna*. Karger Basel 1980; 3: 72

Meezan E, Freychet P. Binding and degradation of <sup>125</sup>I-insulin by renal glomeruli and tubules isolated in rats. *Diabetologia* 1982; 22: 276

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

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

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

Mogensen CE, Andersen MJF. Increased kidney size and glomerular filtration rate in early juvenile diabetes. *Diabetes* 1973; 22: 706-712

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. *Scan J Clin Lab Invest* 1986; 46: 201-206

Mogensen CE. How to protect the kidney in diabetic patients. *Diabetes* 1997; 2: 104-111

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

Mühlbauer B, Osswald H. Feeding-induced increase in urinary dopamine excretion is independent of renal innervation and sodium intake. *Am J Physiol* 1994; 266: F563-F567

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

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

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

Mühlbauer B, Küster E, Luippold G. Dopamin D<sub>3</sub> receptors in the rat kidney: role in physiology and pathophysiology. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 219-223

Mühlbauer B, Schneider S. (2000) Interim Report: Dose dependent effect of the Dopamin D<sub>3</sub> – Antagonist BSF201640 on experimental diabetic nephropathy. Dept. Of Pharmacology, Medical Faculty, University of Tübingen, Germany

Nagahama S, Chen YF, Lindheimer MD, Oparil L. Mechanism of the pressor action of LY171555, a specific dopamine D<sub>2</sub> receptor agonist, in the conscious rat. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 236: 735-742

O'Connell DP, Botkin SJ, Ramos SI, Sibley DR, Ariano MA, Felder RA, Carey RM. Localisation of D1A receptor protein in the rat kidneys. *Am J Physiol* 1995; 268: F1185-F1197

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

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

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* 1990; 78: 503-507

Omre ML, Breckenridge A, Dollery CT. The effects of long term administration of dopamine on renal function in hypertensive patients. *Eur J Clin Pharmacol* 1973; 6:150-155

Ortola FV, Ballermann BJ, Anderson S, Mendez RE, Brenner BM. Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rats. Potential mediator of hyperfiltration. *J Clin Invest* 1987; 80: 670-674

Österby R, Gundersen HJG. Glomerular size and structure in diabetes mellitus I. Early Abnormalities. *Diabetologia* 1975; 11: 225-229

Österby R, Gundersen HJG. Fast accumulation of basement membrane material and the rate of morphological changes in acute experimental diabetic glomerular hypertrophy. *Diabetologia* 1980; 18: 493-500

Parving HH, Hommel E, Matheisen ER, Skott P, Edsberg B, Bahnsen M, Lauritzen M, Hougaard P, Lauritzen E: Prevalence of microalbuminuria, arterial hypertension, retinopathy and neuropathy in patients with insulin-dependent diabetes. *Br Med J* 1988; 296: 156-160

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

Pittman QJ, Lawrence D, Lederis K. Presynaptic interaction in the neurohypophysis: Endogenous modulators of release. In: *Neurohypophysis: Structure, Function and Control*; edited by Gross, G Leng, Amsterdam; Elsevier, 1983; 319-332

Puschett JB, Winaver J. Effects of diuretics on renal function. In: Windhager EE (Hrsg) *Handbook of Physiology (8): Renal Physiology*. Oxford University Press, New York 1992; Kap.50, S 2335-2406

Rabkin R, Fervenza FC. Renal hypertrophy and kidney disease in diabetes. *Diabetes/Metabolism. Reviews* 1996; 3: 217-241

Racke K, Meuresch K, Tapp B, Muscholl E. Modulation by fenoldopam (SKF82526) and bromocriptine of the electrically evoked release of vasopressin from the rat neurohypophysis. Effect of dopamine depletion. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1986; 332: 332-337

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 (NSC 37917). *Cancer Chemother* 1963; 29: 91-98

Riegel W. Diabetische Nephropathie. In: *Thiemes Innere Medizin, TIM*. Thieme-Verlag Stuttgart 1999; S.1331-1334

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

Rosenthal J, Simone PG, Silbergleit A. Effects of prostaglandin deficiency on natriuresis, diuresis and blood pressure. *Prostaglandins* 1974; 5: 435-440

Rostand SG, Watkins JB, Clements Jr.RS. The effect of insulin and of anti-insulin serum on handling of sodium by the isolated perfused kidney of the streptozotocin-diabetic rat. *Diabetes* 1980; 29: 679

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

Schambelan M, Balke S, Sraer J, Bens M, Nivez MP, Wahbe F. Increased prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. *J Clin Invest* 1985; 75: 404-412

Schiebler T, Schmidt W, Zilles K. *Anatomie*. 7. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York 1997; S. 751-752

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

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

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

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

Seyer-Hansen K. Renal hypertrophy in streptozotocin-diabetic rats. *Clin Sci Mol Med* 1976; 51: 551-555

Seyer-Hansen K, Hansen J, Gundersen HJG. Renal hypertrophy in experimental diabetes. *Diabetologia* 1980; 18: 501-505

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

Shankland SJ, Sholey JW. Expression of transforming growth factor-β 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, ect. 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

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

Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Bouthenet ML, Souil E, Schwartz JC. Localization and function of the D<sub>3</sub> dopamine receptor. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 224-230

Standl E, Stiegler H. Mangelnder Erfolg bei der Reduktion von Amputationen bei Diabetikern in Deutschland. Kirchheim-Verlag: Mainz, In: Berger M, Trautner C. Hg.: Die Forderungen von St.Vincent -Stand 1996 in Deutschland

Tappe JM. Die Bedeutung des renalen D<sub>3</sub> Rezeptors für die Vermittlung der pathologischen diabetischen Hyperfiltration. 2003; Med. Dissertation, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen

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

Toda N. Dopamine vasodilates human cerebral artery. *Experientia* 1983; 39: 1131-1132

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

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

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

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

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

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

Viberti GC. Early functional and morphological changes in diabetic nephropathy. *Clinical Nephrology* 1979; 2: 47-53

Waters N, Svensson K, Haadsma-Svensson SR, Smith MW, Carlsson A. The dopamine D<sub>3</sub>-receptor: postsynaptic receptor inhibitory on rat locomotor activity. *J Neural Transm Gen Sect* 1993; 94: 11-19

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

Wilkes B, Mento P, Macica C, Solomon J. Reduced thromboxane (Tx) receptors in diabetic glomeruli: relationship to hyperfiltration. *Am Soc Nephrol* 1989; 336a

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

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

Yamaguchi I, Yao L, Sanada H, Ozono R, Mouradian MM, Carey RM, Jose PA, Felder RA. Characterization of dopamine D<sub>1A</sub> receptors in rat juxtaglomerular cells. *Hypertension* 1997; 29: 962-968

Ziyadeh FN, Sharma K. Role of transforming growth factor  $\beta$  in diabetic glomerulosclerosis and renal hypertrophy. *Kidney Int* 1995; 51: S34-S36



## 7. ANHANG

### Danksagung

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

Meinen großen Dank möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. G. Luippold für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit aussprechen. Von Anfang an stand er bei allen aufkommenden Fragen und Problemen mit Rat und Tat zur Seite. Seine fachliche Kompetenz und menschliche Unterstützung hat zum Gelingen dieser Arbeit entscheidend beigetragen. Zu jeder Zeit hatte er ein offenes Ohr für mich und diskutierte die anstehenden Fragen.

Kaum zu übertreffen war das überdurchschnittliche Engagement von Frau Dr. S. Schneider, die mit unbeschreiblicher Geduld mir das Präparieren der Tiere bei brachte, unaufhaltsam mich immer wieder bei meiner experimentellen Arbeit ermunterte und mich so motivierte, dass die Arbeit in der Arbeitsgruppe mir viel Spaß bereitet hat.

Frau K. Richter danke ich für die Einführung in die Laborarbeit und Herrn T. Staudacher für die Beratung beim Layout. Darüber hinaus danke ich vielmals Herrn M. Reder, der mit seinem außergewöhnlichen Engagement zur Fertigstellung der Arbeit beigetragen hat.

Ein Dankeschön möchte ich auch den Tierpflegern für die Pflege meiner Tiere im Tierstall aussprechen.

Bedanken möchte ich mich bei meinen Söhnen Felix und Moritz, die mich während meiner Tätigkeit im Labor oft entbehren mussten und dafür Verständnis zeigten.