

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

**Wirkung des K<sup>+</sup>-Kanalblockers HMR 1556  
auf die Nierenfunktion bei Ratten**

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

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

**vorgelegt von  
Kathrin Pangidis  
aus  
Tübingen**

**2003**

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. V. Vallon

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

In Dankbarkeit meinen Eltern.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Gegenstand der Arbeit .....	1
1.2 Bisheriger Kenntnisstand .....	1
1.2.1 Die Niere .....	1
1.2.2 Proximaler Tubulus .....	2
1.2.3 KCNE1 und KCNQ1 im Herz und anderen Organen.....	4
1.2.4 KCNE1 und KCNQ1 in der Niere.....	6
1.2.5 Ionenkanalerkrankungen .....	8
1.2.6 Eigenschaften der KCNE1 und KCNQ1 knockout Maus .....	8
1.3 HMR 1556.....	9
1.4 Eigene Fragestellung .....	11
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>12</b>
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	12
2.2 Experimenteller Ablauf .....	12
2.2.1 Narkotisierung und Präparation .....	12
2.2.2 Ablauf der Experimente .....	15
2.3 Analytik .....	17
2.3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz.....	17
2.3.2 Hämatokrit.....	17
2.3.3 Urinzeitvolumen.....	18
2.3.4 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate .....	18
2.3.5 Bestimmung der renalen Natrium- und Kaliumausscheidung .....	19
2.3.6 Bestimmung der renalen Chloridausscheidung .....	20
2.3.7 Bestimmung der renalen Glukoseausscheidung .....	21
2.4 Statistik .....	22

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>23</b>
3.1 Vergleich basaler Werte aller Gruppen.....	23
3.2 Wirkung des K <sup>+</sup> -Kanalblockers HMR 1556.....	23
3.2.1 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz.....	23
3.2.2 Glomeruläre Filtrationsrate .....	26
3.2.3 Urinzeitvolumen und fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung .....	27
3.2.4 Renale Natriumausscheidung .....	28
3.2.5 Renale Kaliumausscheidung .....	31
3.2.6 Renale Chloridausscheidung .....	33
3.2.7 Renale Glukoseausscheidung .....	35
<b>4. Diskussion</b>	<b>37</b>
4.1 Hintergrund der Untersuchungen.....	37
4.2 Versuchsbedingungen .....	37
4.2.1 Clearance-Experimente .....	37
4.2.2 Vehikelkontrollen.....	38
4.3 HMR 1556 .....	39
4.4 Wirkung von HMR 1556.....	40
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>43</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>45</b>
<b>7. Anhang</b>	<b>50</b>
7.1 Material .....	50
7.1.1 Verbrauchsmaterialien .....	50
7.1.2 Chemikalien .....	51
7.2 Tabellen.....	52
7.2.1 Absolute Mittelwerte aus den Clearance-Experimenten.....	52
7.3 Glossar.....	56

# **1. Einleitung**

## **1.1 Gegenstand der Arbeit**

In der vorliegenden Arbeit wird die Wirkung des  $K^+$ -Kanalblockers HMR 1556 auf die Nierenfunktion bei Ratten untersucht. HMR 1556 ist ein  $K^+$ -Kanalblocker, der zur Blockierung von  $I_{Ks}$ -Kanälen im Herz als Antiarrhythmikum entwickelt wurde [12]. Es zeigte sich, dass diese Kanäle aus 2 Proteinen (Untereinheiten) bestehen: KVLQT1 (KCNQ1-Gen) und  $I_sK$  bzw.  $minK$  (KCNE1-Gen) [2] [27]. Es gibt Hinweise, dass KCNQ1 und KCNE1 zusammen im proximalen Tubulus der Niere exprimiert werden und dort einen funktionellen  $K^+$ -Kanal ausbilden [30] [32] [34].

In Clearance-Experimenten wurde deshalb an Ratten getestet, welche Auswirkung HMR 1556 auf die Nierenfunktion hat.

## **1.2 Bisheriger Kenntnisstand**

### **1.2.1 Die Niere**

Die Nieren sind das wichtigste Organ zur Regulation des Ionen- und Wasserhaushalts und spielen eine zentrale Rolle bei der Ausscheidung von Stoffwechselprodukten und Fremdstoffen. Darüber hinaus haben die Nieren die Aufgabe der Regulation des Säure-Base-Haushalts und der Synthese von Hormonen wie Renin und Erythropoetin.

Die funktionelle und strukturelle Einheit der Niere ist das Nephron, welches aus einem Glomerulus mit Bowman-Kapsel und dem Tubulussystem besteht, das in ein Sammelrohrsystem mündet.

Der Tubulus kann mikroanatomisch in ein proximales und ein distales Konvolut unterteilt werden, die durch einen geraden, eine Schleife bildenden Abschnitt, die Henlesche Schleife, verbunden werden. Der Nierenkortex wird in das kortikale Labyrinth und die Markstrahlen unterteilt. Die Glomerula und das

proximale und distale Konvolut befinden sich im kortikalen Labyrinth. Dagegen bilden die kortikalen proximalen und distalen geraden Abschnitte des Tubulus, die die initialen und terminalen Abschnitte der Henleschen Schleife darstellen, zusammen mit den kortikalen Sammelrohren die Markstrahlen. In der Medulla finden sich die medullären Abschnitte der Sammelrohre sowie die medullären auf- und absteigenden Schenkel der Henleschen Schleife.

Das Blut wird in den Glomeruli zunächst filtriert. Das Filtrat wird in den Nierentubuli weiterbearbeitet. Im proximalen Tubulus steht die Rückresorption großer Mengen von Elektrolyten, Glukose und Aminosäuren im Vordergrund. Die Henle-Schleife trägt zum Gegenstrommechanismus und damit zur Verdünnung bzw. Konzentrierung des Harns bei. Im distalen Tubulus und den Sammelrohren wird die Feineinstellung der Elektrolyt- und Wasserresorption vorgenommen.

### **1.2.2 Proximaler Tubulus**

Im proximalen Tubulus werden 60-70% des glomerulären Filtrats, und dabei Aminosäuren und Glucose fast vollständig, reabsorbiert. In der basalen Membran der proximalen Tubuluszellen befindet sich die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, die in einem aktiven, energieverbrauchenden Transport  $\text{Na}^+$  aus der Zelle in das Interstitium befördert. Für je drei ausgeschleuste  $\text{Na}^+$ -Ionen werden zwei  $\text{K}^+$ -Ionen eingeschleust. Da die intrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration höher ist, diffundiert  $\text{K}^+$  passiv über die basolaterale Membran zurück in das Interstitium. Dadurch entsteht eine Potentialdifferenz, das heißt das Zellinnere ist elektronegativer im Vergleich zum Extrazellulärraum.

Aufgrund der Potentialdifferenz und der niedrigen intrazellulären  $\text{Na}^+$ -Konzentration strömt  $\text{Na}^+$  passiv aus dem Tubuluslumen über spezielle Transportsysteme in der luminalen Membran (z.B. Kotransport mit Glukose bzw. Aminosäuren und Gegentransportmechanismen mit Protonen) in die Tubuluszelle ein.

Aminosäuren und Glukose werden gekoppelt an  $\text{Na}^+$  durch elektrogenen Kotransport in die Tubuluszelle aufgenommen. Die entstehende Depolarisation würde dem  $\text{Na}^+$ -Transport entgegen wirken. Um die Depolarisation zu minimieren, wird ein  $\text{K}^+$ -Ausstrom induziert und die Zellmembran repolarisiert [11] [15] [21] [26] (Abb. 1.1).

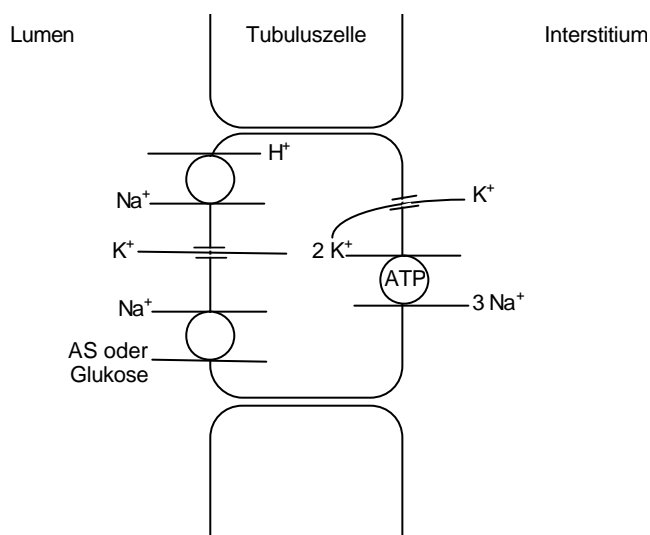


Abbildung 1.1: **Transportprozesse im proximalen Tubulus.** Im proximalen Tubulus senkt die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase in der basolateralen Membran unter ATP-Verbrauch die intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration und trägt zum Membranpotential bei. Gegentransportmechanismen und elektrogenen  $\text{Na}^+/\text{Glukose}$  bzw.  $\text{Na}^+/\text{Aminosäure}$  (AS) Kotransport bewirken eine Depolarisation der Zellmembran, die eine Aktivierung eines Kaliumkanals verursacht und einen  $\text{K}^+$ -Ausstrom ins Lumen bedingt um der Depolarisation entgegen zu wirken.



### 1.2.3 KCNE1 und KCNQ1 im Herz und anderen Organen

Das KCNE1-Gen kodiert für ein Protein, das aus 130 Aminosäuren besteht. Es wird angenommen, dass es ein Transmembranprotein ist. Wegen seiner kompakten Struktur wird dieses K<sup>+</sup>-Kanalprotein auch „minK“, oder „the minimal K<sup>+</sup> channel“ genannt [24]. Aufgrund geringer Größe und langsamer Kinetik („slow kinetics“), wird es auch als Isk Protein bezeichnet [10].

Erstmals konnte es in einer Rattenniere nachgewiesen werden: KCNE1 wurde aus einer Rattenniere geklont und in *Xenopus laevis* Eizellen exprimiert. Dies führte zu einem langsam-aktivierten Kaliumstrom [30]. Zuerst nahm man an, dass KCNE1 alleine einen Kaliumkanal ausbildet, da sich bei Expression in verschiedenen Gewebezellen ein messbarer Kaliumstrom zeigte. In manchen Geweben ließen sich jedoch keine Kaliumströme induzieren, so dass man bald eine zweite Untereinheit identifizierte, die in besagten Geweben nicht exprimiert wurde. Es wurden initial also nur in solchen Geweben Kaliumströme gemessen, in denen dieser Kanal mit beiden Untereinheiten exprimiert wurde [19].

Schließlich konnte im Herz nachgewiesen werden, dass KCNE1 alleine keinen K<sup>+</sup>-Kanal bildet, aber zusammen mit einer anderen Untereinheit einen speziellen Kanal ausbilden kann. Der Partner wurde als Produkt des KCNQ1 Gens: KVLQT1 identifiziert. Das KCNQ1 Gen codiert für ein Protein, das aus 604 Aminosäuren besteht und sechs Transmembran-Segmenten aufweist [2] [23] [27] (Abb. 1.2). Das Zusammenwirken von KCNE1 und KCNQ1 erhöht also die Spannungsabhängigkeit und verändert die pharmakologischen Eigenschaften diese Kanals [6].

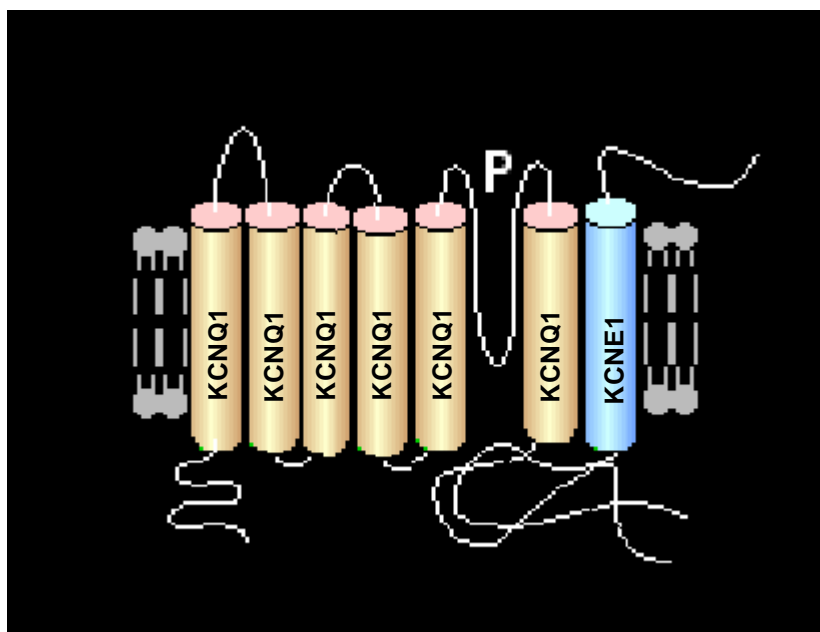


Abbildung 1.2: **Schematische Kanalstruktur von KCNE1/KCNQ1.** KCNQ1 besteht aus sechs Transmembran-Segmenten und einer extrazellulären Schleife, die die Pore (P) zwischen den Transmembran-Segmenten 5 und 6 auskleidet. KCNE1 hat nur ein Transmembran-Segment.

Auch im Innenohr bilden KCNE1 und KCNQ1 einen funktionellen  $K^+$ -Kanal aus [8] [13] [29]. KCNE1 konnte noch in anderen Organen nachgewiesen werden, so zum Beispiel in submandibulären Drüsen, im Uterus von Ratten, im Magen und in der Blase [4] [5] [30] [36], ebenso im Auge, in Ganglienzellen der Retina und in Epithelzellen der Kornea [22] [33] [36].

Im Dünndarm und Colon von Mäusen konnte KCNQ1 nachgewiesen werden. Der Nachweis von KCNE1 Expression war dort jedoch nicht möglich [8] [17] [28]. KCNQ1 konnte außerdem noch im Skelettmuskel, in der Leber, der Lunge, im Magen und in Ovar und Testis nachgewiesen werden. Beide Untereinheiten, KCNQ1 und KCNE1, konnten also neben Herz, Innenohr und Niere, in den

Augen, im Magen, im Pankreas und in submandibulären Drüsen gemeinsam nachgewiesen werden [14] [36].

#### **1.2.4 KCNE1 und KCNQ1 in der Niere**

1988 wurde erstmals das KCNE1 (mink bzw. Isk) Gen aus einer Rattenniere isoliert. Takumi et al. vermuteten, dass dieses Gen für einen langsamen spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanal codiert. In vitro konnte dieser  $K^+$ -Kanal durch die  $K^+$ -Kanalblocker Tetraethylammonium und  $Ba^{2+}$  inhibiert werden. Der Kanal war nicht durch  $Ca^{2+}$  zu beeinflussen. Die Ströme, die durch elektrische Depolarisation erzeugt wurden, waren nur sehr langsam zu aktivieren [31].

1990 konnte das Isk Protein in der luminalen Membran sowohl im proximalen Konvolut als auch im geraden Teil des proximalen Tubulus der Ratte nachgewiesen werden [30].

In der Niere der Maus konnten Vallon et al. nachweisen, dass KCNQ1 und KCNE1 ebenfalls zusammen exprimiert werden; beide im proximalen Tubulus, nämlich im proximalen Konvolut und im geraden Teil [34].

Im Zusammenhang mit diesen Erkenntnissen wurde folgende These aufgestellt: im proximalen Tubulus entsteht durch den  $Na^+$ /Glukose bzw.  $Na^+$ /Aminosäure Kotransport eine Depolarisation der luminalen Zellmembran, welche die Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen verursacht, die wiederum einen  $K^+$ -Ausstrom ins Lumen verursachen [30].

Da KCNE1 und KCNQ1 im proximalen Tubulus der Maus und Ratte bereits nachgewiesen wurden und Isk-Kanäle spannungsabhängig sind, legt dies den Verdacht nahe, dass ein Kaliumkanalkomplex bestehend aus KCNQ1 und KCNE1 in Zusammenhang mit der Repolarisation stehen könnte [30] (Abb. 1.3). Da der  $Na^+$ /Glucose-Kotransport durch die Blockierung dieses Kanalkomplexes vermindert wird, sollte man bei Defekten in KCNE1 oder KCNQ1 ein leichtes Ansteigen der Glukose im Endurin erwarten. Ebenso würde man einen Anstieg von  $Na^+$ , folglich  $Cl^-$  und Urinvolumen erwarten. Vallon et al. untersuchten die

Nierenfunktion von KCNE1 knockout Mäusen und konnten diese These bestätigen [34].

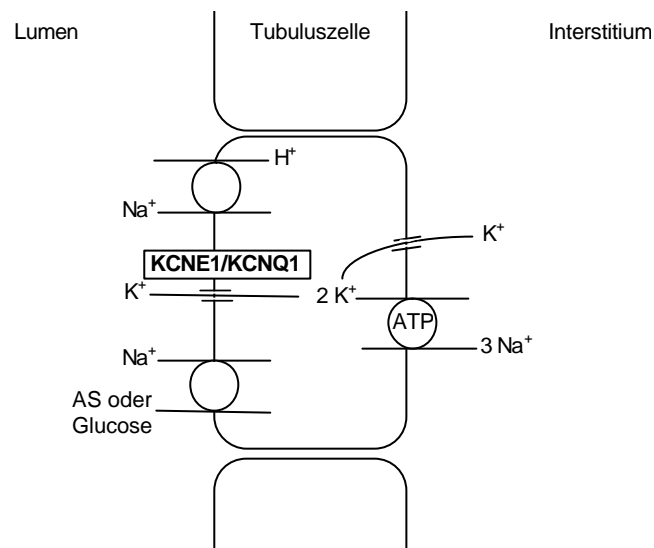


Abbildung 1.3: **Hypothese zur Funktion von KCNE1/KCNQ1 im proximalen Tubulus.** Transportprozesse im proximalen Tubulus führen zu einem K<sup>+</sup>-Ausstrom ins Lumen. Dies könnte durch eine Aktivierung eines Kaliumkanalkomplexes, bestehend aus KCNQ1 und KCNE1, verursacht werden.

### **1.2.5 Ionenkanalerkrankungen**

Es gibt Erkrankungen denen Mutationen in Ionenkanalgenen zugrunde liegen. So wurden beim Menschen unter anderem Mutationen an den Genen KCNQ1 und KCNE1 nachgewiesen. Diese treten im Zusammenhang mit dem Long-QT Syndrom (LQTS) auf (deshalb auch die ursprüngliche Bezeichnung KVLQT1). LQTS ist eine familiär auftretende Krankheit. Die Patienten haben eine pathologisch verlängerte QT-Zeit, ein hohes Risiko für ventrikuläre Tachykardien und sind prädispositioniert für den plötzlichen Herztod [25].

Man unterscheidet hauptsächlich 2 verschiedene Krankheitsbilder:

Eine autosomal-dominant vererbte Form mit hauptsächlich kardialen Symptomen (Romano-Ward) und eine seltenere autosomal-rezessiv vererbte Form, die zusätzlich zu den kardialen Symptomen, auch kongenitale Taubheit aufweist (Jervell and Lange-Nielsen) [2] [23] [27].

Diese Symptome erklären sich dadurch, dass die Genprodukte von KCNQ1 und KCNE1 zusammen im Herz als auch im Innenohr einen funktionellen K<sup>+</sup>-Kanal bilden. Die Nierenfunktion dieser Patienten wurde bisher nicht untersucht.

Ebenso wird diskutiert, ob KCNQ1 bei dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) eine Rolle spielt [16]. BWS ist ein genetisch bedingtes, angeborenes Fehlbildungssyndrom. Für diese Erkrankung sind sowohl fetale Makrosomie als auch embryonale Tumore, insbesondere der Wilmstumor typisch. Unklar ist bis heute, ob KCNQ1 hierbei direkt eine Veränderung verursacht, oder nur ein Gen in der Nähe inaktiviert [17].

### **1.2.6 Eigenschaften der KCNE1 und der KCNQ1 knockout Maus**

Die oben erwähnten Krankheitsbilder und deren klinische Relevanz, sowie die Betrachtung der Phänotypen der beiden knockout Mäuse zeigen, dass der Kaliumkanalkomplex, bestehend aus KCNE1 und KCNQ1, auch in anderen Geweben eine bedeutende Rolle in der bisher unbekanntem Pathophysiologie anderer Krankheitsbilder spielen könnte.

KCNE1 knockout Mäuse zeigen außer einer verlängerten QT-Zeit, sowie Taubheit mit Störung des Gleichgewichts und Veränderung des renalen Natrium- und Glucosetransports, auch einen erhöhten Aldosteronspiegel im Plasma. In Geweben wie Pankreas, Darm und Lunge konnten ebenfalls Veränderungen bei KCNE1 knockout Mäusen festgestellt werden, die allerdings noch weitere Untersuchungen benötigen [36].

Die KCNQ1 knockout Mäuse wiesen Taubheit und Hyperplasien des Magens auf. Außerdem zeigten sich im EKG Veränderungen der T- und P-Welle, sowie eine Verlängerung der QT-Zeit [17]. Die Nierenfunktion wurde bisher nicht untersucht.

### 1.3 HMR 1556

$I_{Ks}$ -Hemmstoffe wurden ursprünglich als neue Klasse III Antiarrhythmika entwickelt. Als Vorgänger von HMR 1556 wurde Chromanol 293B zur Blockierung von  $I_{Ks}$ -Kanälen genutzt [7]. Durch die Entwicklung von HMR 1556 konnte eine höhere Selektivität bei der Blockierung von  $I_{Ks}$ -Kanälen erzielt werden. Die Struktur von HMR 1556 und Chromanol 293 B unterscheidet sich in folgenden Punkten:

HMR 1556 hat eine Trifluorobutoxyethergruppe in Position 6 und ist ein Enantiomer. Chromanol 293 B ist im Gegensatz dazu ein Racemat [12]. Loussouarn et al. konnten in ihrer Arbeit belegen, dass Chromanol 293B an die KCNQ1 Untereinheit bindet, und nicht an KCNE1 [20].

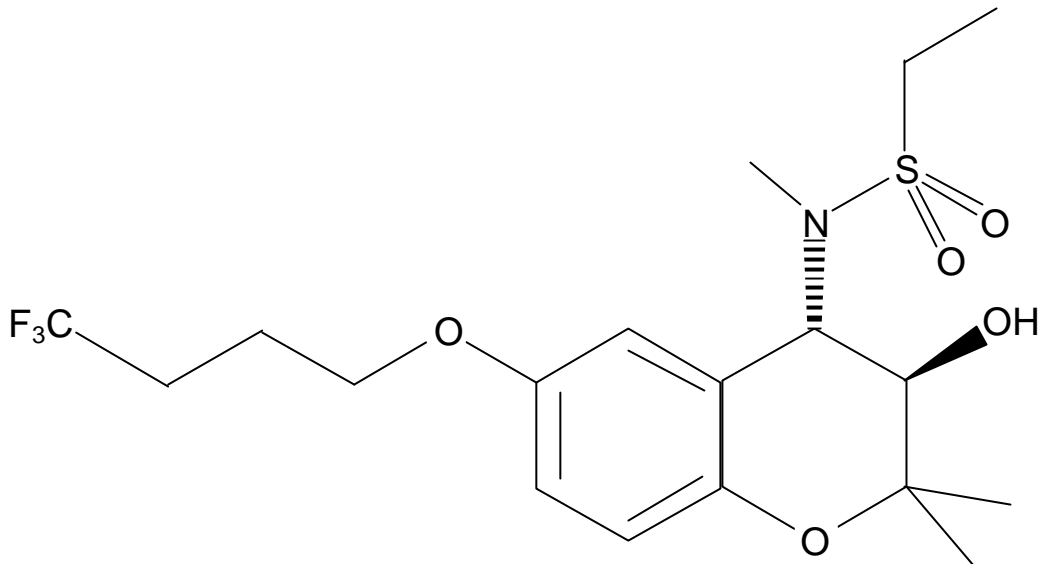


Abbildung 1.4: **Strukturformel von HMR 1556** [(3R,4S)-(+)-N-(3-Hydroxy-2,2-dimethyl-6-(4,4,4-trifluorobutoxy)chroman-4-yl)-N-methyl-ethansulfonamid

Es zeigte sich weiterhin, dass HMR 1556 wesentlich stärker  $I_{Ks}$ -Kanäle blockiert als sein Vorgänger. Ferner fand man heraus, dass die KCNE1 Untereinheit dieser Kanäle den inhibitorischen Effekt erhöhte. KCNE1/KCNQ1 Komplexe erhöhten den Effekt von HMR 1556 im Gegensatz zu homomeren KCNQ1 Kanälen.

Daraus ließ sich schließen, dass KCNE1-Proteine zwar nicht direkt von Chromanolen inhibiert werden, KCNE1 jedoch eine allosterische Veränderung des Partners KCNQ1 hervorruft [18]. Dies konnte unter anderem auch schon bei dem  $I_{Ks}$  Hemmstoff Chromanol 293B festgestellt werden. Koexpression von KCNE1 und KCNQ1 Untereinheiten zeigten eine höhere Affinität für diese Blocker als KCNE1 alleine [6]. Dies würde auch zu der Hypothese passen, dass KCNE1 als Regulatorprotein fungiert [1].

## 1.4 Eigene Fragestellung

Wenn KCNQ1 und KCNE1 im proximalen Tubulus zusammen einen funktionellen K<sup>+</sup>-Kanal bilden und KCNQ1 dabei die Kanalpore bildet, dann sollte HMR 1556 als Hemmstoff dieses Kanalkomplexes eine Wirkung erzielen, die dem Phänotyp der KCNE1 knockout Maus ähnlich ist; das heißt moderat erhöhte fraktionelle Ausscheidung von Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Urinvolumen und Glukose [34]. Um diese Frage zu untersuchen, wurden Clearance-Experimente an narkotisierten Ratten durchgeführt und die Wirkung von HMR 1556 auf die Nierenfunktion untersucht.



## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Für alle Versuche wurden männliche Sprague-Dawley-Ratten der Firma Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden in Macrodex® Standardkäfigen (Fa. Ehret, Freiburg, Deutschland) bei konstanter Temperatur von 22,5°, 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus und 50% relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Freier Zugang zu Leitungswasser und Standard-Nagerfutter (Altromin 1320, 4% NaCl, Fa. Altromin, Lage, Deutschland) war gewährleistet.

### **2.2 Experimenteller Ablauf**

#### **2.2.1 Narkotisierung und Präparation**

Die Ratten wurden am Versuchstag gewogen und durch intraperitoneale Gabe von Inactin® (Thiobutabarbital, 100 mg/kg, gelöst in 0,85% NaCl, 100 mg/ml, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) narkotisiert. Bei Bedarf wurde zusätzlich 1/3 der Ausgangsmenge nachappliziert. Die Ratten hatten am Versuchstag ein Gewicht zwischen 256 und 330 g.

Nach Wirkungseintritt (wenige Minuten) wurden die Versuchstiere sofort in Rückenlage auf den vorgeheizten Operationstisch (Fa. Effenberger, Pfaffing, Deutschland) gelegt. Um ein Absinken der Körpertemperatur zu vermeiden wurde eine rektale Temperatursonde (Goedecke Forschung und Entwicklung, Freiburg, Deutschland) eingeführt, fixiert und die Solltemperatur auf 37°C eingestellt. Um die Präparation zu erleichtern wurden Fadenschlingen um die Extremitäten und die oberen Schneidezähne gelegt, die mit Klebestreifen am Operationstisch befestigt wurden.

Als erstes wurden die Ratten tracheotomiert, um eine Verlegung der Atemwege zu verhindern. Das Fell des Halses wurde mit Paraffinöl (Fa. Merck, Darmstadt,

Deutschland) beträufelt und ein etwa 2 cm langer suprasternaler Hautschnitt in Medianlinie erfolgte. Die infrahyoidale Muskulatur wurde freigelegt und die Laminae der Halsfaszie samt dem M. sternohyoideus sowie dem M. sternothyroideus median gespreizt, um die Trachea freizulegen.

Unter Schonung aller Gefäße und Nerven wurde eine Fadenschlinge (S.M.I. AG, Hünningen, Belgien) um die Trachea vorgelegt. Diese wurde mittels einer Mikro-Federschere (Operationsinstrumente: Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) zwischen zwei Knorpelspangen eingeschnitten. Ein etwa 3cm langer Trachealtubus (Polyethylen-Schlauch, Innendurchmesser: 1,57 mm; Außendurchmesser: 2,08 mm; Fa. Labomedic, Deutschland) wurde dann etwa 1cm tief in die Trachea eingeführt und anschließend mit dem vorgelegten Faden fixiert.

Anschließend wurde unter stereomikroskopischer Sicht (Fa. Wild M3C, Heerbrugg, Schweiz) die V. jugularis interna freigelegt, kranial ligiert, kaudal eine Fadenschlinge vorgelegt, mit der Mikro-Federschere das Gefäß eröffnet und ein Polyethylen- (PE) Katheter (Innendurchmesser: 0,58 mm; Außendurchmesser: 0,96 mm; Fa. Labomedic, Deutschland) eingeführt und ebenfalls mit dem vorgelegten Faden und dem Ligaturfaden fixiert. Dieser Katheter wurde an eine Infusionspumpe angeschlossen, über den während der restlichen Präparationszeit und einen Teil der Äquilibrierungsphase 0,85% NaCl bzw. zur Bestimmung der GFR  $^3\text{H}$ -Inulin infundiert wurde.

Als nächstes wurde ein etwa 2 cm langer Schnitt entlang der linken Leistenfalte durchgeführt. Die Vasa epigastrica wurden freigelegt, von dem parallel verlaufenden N. femoralis getrennt und mit Hilfe zweier Ligaturen unterbunden und durchschnitten.

Die nun gut sichtbaren Femoralisgefäße wurden vom N. femoralis getrennt und distal der epigastrischen Gefäße mit einem Faden ligiert. Vena und Arteria femoralis wurden vorsichtig voneinander gelöst und soweit kranial wie möglich jeweils zwei weitere Fäden vorgelegt.

Sowohl am distalen Faden, als auch an einem der proximal vorgelegten Fäden der Arterie und Vene wurde eine Klemme befestigt. Arterie und Vene konnten somit unter vorsichtigem Zug an diesen Klemmen unter dem Stereomikroskop inzidiert und katheterisiert werden. Die beiden eingeführten PE Katheter wurden fixiert. Der A. femoralis Katheter wurde an ein Blutdruck- und Pulsmessgerät (Fa. Hellige) angeschlossen, wobei die Kalibrierung des Gerätes regelmäßig mit Hilfe einer Quecksilbersäule (Fa. C.F. Palmer, London, Großbritannien) überprüft wurde. Mit einer Heparinlösung (Fa. Braun-Melsungen, Deutschland) wurde der A. femoralis Katheter durchgespült, um eine Verlegung durch geronnenes Blut zu verhindern.

Der V. femoralis Katheter wurde an einen Perfusor (Perfusor® Secura, Fa. Braun-Melsungen, Deutschland) angeschlossen, über den 0,85% NaCl infundiert und zu gegebenem Zeitpunkt HMR 1556 bzw. Vehikellösung appliziert wurde.

Im nächsten Schritt wurde die Harnblase katheterisiert. Dazu wurde ein suprapubischer, etwa 0,5 cm langer Hautschnitt durchgeführt. Die Abdominalmuskulatur und das Peritoneum entlang der Linea alba wurden vorsichtig gespalten. Die Harnblase wurde aus dem Peritonealraum herausluxiert und mit einer Klemme fixiert. Zwei Fadenschlingen wurden um die Blase vorgelegt, möglichst weit kranial ohne Verletzung der Blasengefäße inzidiert, der Blasen Katheter eingebracht und mit den vorgelegten Schlingen fixiert. Zur Herstellung des Blasen Katheters wurde das in die Blase einzubringendes Ende des PE-Schlauchs über einer Bunsenbrennerflamme erhitzt und plattformartig verformt unter gleichzeitiger Beibehaltung des Lumens. Dies gewährleistete eine sichere Fixierung in der Blase. Anschließend wurde die Blase wieder in der Bauchhöhle versenkt.

Zum Schluss wurde die Ratte in Rechtsseitenlage gebracht, die um die Extremitäten und die Schneidezähne geschlungenen Fäden neu befestigt und ein Eppendorf-Gefäß (Eppendorf Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Safe-Lock 2,0 ml) unter den Blasen Katheter gestellt um den Urin zu sammeln.

### 2.2.2 Ablauf der Experimente

Nach ca. 30-minütiger Präparation und einer 5-minütigen „Bolus-Infusion“ von 1 ml 0,85% NaCl (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) zur Sicherstellung der Flüssigkeitszufuhr der Ratte, folgte eine Stabilisierungsphase von 90 Minuten.

Während der Stabilisierungsphase erhielten die Ratten ein Gesamtfusionsvolumen von 3 ml/h über 2 Perfusoren. Über die V. femoralis wurden 2 ml/h NaCl infundiert, über die V. jugularis in den ersten 30 Minuten 1 ml/h 0,85% NaCl, dann wurde eine  $^3\text{H}$ -Inulinlösung (2,25  $\mu\text{Ci/ml}$  0,85% NaCl, Fa. Biotrend, Köln, Deutschland), ebenfalls 1 ml/h, angehängt. Nach Beendigung der Stabilisierungs-Phase konnte mit dem eigentlichen Experiment begonnen werden.

Der Ablauf gliederte sich in insgesamt 2 Perioden á 40 Minuten. In der ersten Periode (Periode 1) erhielten alle Tiere weiterhin oben genanntes Infusionsprotokoll. Zu Anfang, in der Mitte und am Ende der Periode wurde jeweils Blutdruck und Puls registriert und über den in der A. femoralis liegenden Katheter Blut abgenommen (pro Blutabnahme ~ 2 x 75  $\mu\text{l}$ ). Urin wurde während jeder Periode quantitativ gesammelt.

Nach Periode 1 wurde kurzzeitig der Perfusor der V. femoralis abgeschaltet und ein Bolus mit HMR 1556 (3 mg/kg, 0,3 mg/kg, 0,03 mg/kg 0,003 mg/kg) bzw. mit Vehikellösung gegeben.

#### Herstellung der Vehikellösung:

3,3 % DMSO (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland); 96,7 % Polyethylenglycol 400 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland)

#### Bolusvolumen insgesamt:

283,125  $\mu\text{l/kg}$

Der Bolus wurde über 3 min gegeben um die Infusionsrate beizubehalten. Vor und nach der Bolusflüssigkeit wurde eine kleine Luftblase im Infusionsschlauch

platziert um eine Vermischung der Lösung mit verbleibendem NaCl und somit eine Ausfällung von HMR 1556 zu vermeiden. Nach vollständigem Übertritt der Bolusflüssigkeit in die Ratte, schloss sich eine 5-minütige Stabilisierungsperiode an, bevor mit der experimentellen Periode 2 begonnen wurde. Das Infusionsprotokoll entsprach dem selben Protokoll wie vor der Gabe des Bolus.

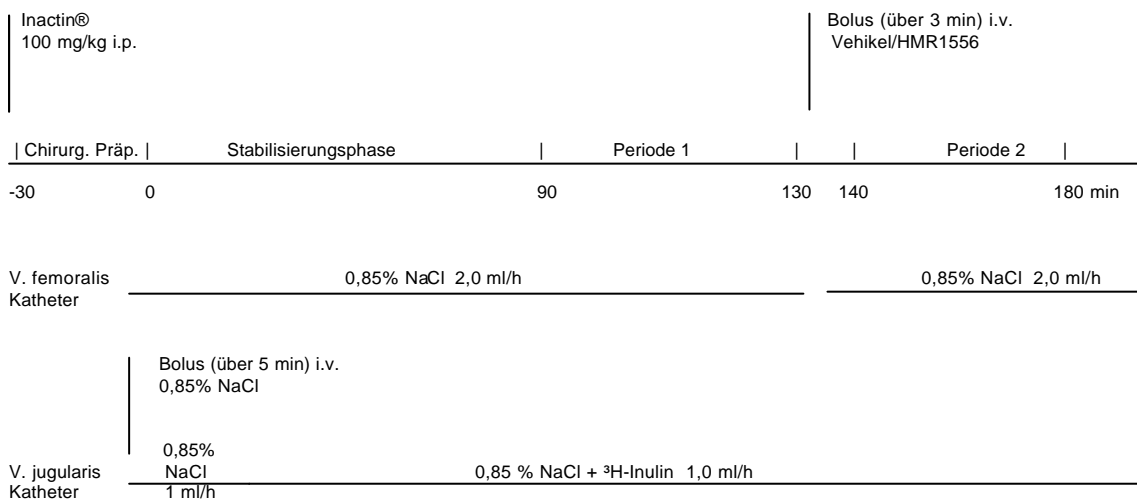


Abbildung 2.1: **Versuchsablauf der Experimente.** Nach Einleitung der Inactin®-Narkose und Beendigung der chirurgische Präparation schloss sich eine Stabilisierungsphase an. Zur Untersuchung der GFR wurde <sup>3</sup>H-Inulin infundiert. Im Anschluss an die Periode 1 wurde entweder Vehikel oder HMR 1556 in unterschiedlichen Dosierungen als Bolus appliziert. Es schloss sich die experimentelle Periode 2 an.

Um das Bolusvolumen möglichst gering zu halten wurde die Zusammensetzung von Polyethylenglycol 400 und DMSO so optimiert, dass HMR 1556 bei der höchsten Dosis ( 3 mg/kg ) nicht ausfiel und DMSO/PEG 400 keine Hämolyse

verursachte. Deshalb war es notwendig einen zweiten venösen Zugang (V. femoralis) zu legen. Die Boluslösung durfte im Katheter nicht mit NaCl zusammentreffen, um ein Ausfallen zu verhindern. Sobald die Boluslösung im Kreislauf des Tieres angekommen ist, wird HMR 1556, wie jede lipophile Substanz im Blut an Albumin gebunden. Die Infusion über den V. jugularis-Katheter sollte aber nicht unterbrochen werden, da sonst ein konstanter  $\text{H}$ -Inulin Spiegel nicht mehr gewährleistet gewesen wäre.

## 2.3 Analytik

### 2.3.1 Mittlerer Arterieller Blutdruck und Herzfrequenz

Systolischer ( $P_{sys}$ ) und diastolischer ( $P_{dia}$ ) Blutdruck wurden von den Aufzeichnungen des Blutdruckmessgeräts (Hellige GmbH, Freiburg, Deutschland) ermittelt. Mittlerer Arterieller Blutdruck ( $MAP$ ) wurde wie folgt errechnet:

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

Die Herzfrequenz ( $HF$ ) in 1/min wurde anhand der pulsatorischen Blutdruckregistrierungen ausgezählt.

### 2.3.2 Hämatokrit

Über den A. femoralis Katheter wurde Blut in heparinisierten Glaskapillaren (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland) gesammelt, die an der einen Seite mit Hämatokrit (Hk)-Versiegelungskitt (Fa. Brand, Wertheim, Deutschland) verschlossen und anschließend ca. 3 Minuten zentrifugiert wurden (Zentrifuge: Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland). Anhand des prozentualen Anteils der korpuskulären Elemente zum Säuleninhalt wurde der Hk bestimmt. Der

Überstand nichtkorpuskulärer Anteile (Plasma) wurde in Eppendorfgläsern gesammelt und dann entsprechend weiterverarbeitet.

### 2.3.3 Urinzeitvolumen

Das Urinvolumen ( $U_{Vol}$ ) wurde gravimetrisch bestimmt, dieses auf die 40-minütigen Sammelperioden bezogen und so das Urinzeitvolumen (UZV) bestimmt:

$$UZV = U_{Vol} / 40 \text{ min}$$

Die Fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung ( $FA_F$ ) wurde wie folgt bestimmt:

$$FA_F = (UZV/GFR) \times 100$$

### 2.3.4 Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist das pro Zeiteinheit von allen Glomeruli beider Nieren aus dem Blut gebildete Filtratvolumen. Da Inulin frei filtrierte, aber weder metabolisiert, noch resorbiert oder sezerniert wird, entspricht die Inulin-Clearance der GFR.

Je 2 x 10 µl Urin bzw. Plasma wurden in Szintillationsgefäße (Midi-Vial Fa. Packard, Niederlande) pipettiert und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Fa. Packard, Niederlande) vermischt.

Die bei Zerfall des  $^3\text{H}$ -markierten Inulins freiwerdende  $\beta$ -Strahlung wurde von der Szintillationsflüssigkeit in Lichtblitze umgewandelt, welche dann durch einen  $\beta$ -Counter (2550 TR, Fa. Packard, Niederlande) erfasst wurden. Die Berechnung der GFR erfolgte aus den Mittelwerten der Doppelbestimmungen. Dazu wurde die  $^3\text{H}$  Aktivität im Plasma ( $^3\text{H}_{Plasma}$ ) und die  $^3\text{H}$  Aktivität im Urin ( $^3\text{H}_{Urin}$ ) sowie das Urinzeitvolumen (UZV) verwendet:

$$GFR = UZV \times ^3\text{H}_{Urin} / ^3\text{H}_{Plasma}$$

### 2.3.5 Bestimmung der Natrium- und Kaliumausscheidung

Die Natrium- und Kaliumkonzentration in Urin und Plasmaproben wurden flammenphotometrisch (ELEX 6361, Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) gemessen. Jeweils 10 µl Probe bzw. Standardlösung (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) wurden mit 1 ml (Plasma) bzw. 2 ml (Urin) Lithiumlösung in 1,5 bzw. 2 ml großen Eppendorfgefäßen gemischt.

Lithiumlösung (Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) diente als Nullwert der Messung und zur Aufbereitung der Proben. Da vor allem in den Plasmaproben Proteine ausfallen und die Messung beeinträchtigen, wurden die Proben über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt und am nächsten Morgen abzentrifugiert. War eine Urinprobe zu stark konzentriert, so wurde die Probe verdünnt (Verdünnungsfaktor 1:2).

Die Elektrolytausscheidung ( $U_{Na^+}$  bzw.  $U_{K^+}$ ), gibt die pro Zeiteinheit ausgeschiedene Elektrolytmenge an:

$$U_{Na^+} \text{ bzw. } U_{K^+} = [Na^+] \text{ Urin bzw. } [K^+] \text{ Urin} \times UZV$$

Die Fraktionelle Natrium- und Kaliumausscheidung ( $FA_{Na^+}$ ,  $FA_{K^+}$ ) wurde wie folgt berechnet:

$$FA_{Na^+}, FA_{K^+} = (U_{Na^+} \text{ bzw. } U_{K^+}) / (GFR \times [Na^+] \text{ Plasma bzw. } [K^+] \text{ Plasma}) \times 100$$

wobei  $[Na^+] \text{ Plasma}$  bzw.  $[K^+] \text{ Plasma}$  die Natrium- bzw. Kaliumkonzentration im Plasma ist.



### 2.3.6 Bestimmung der Chloridausscheidung

Die Chloridkonzentration in Urin und Plasma wurde am Chloridmeter (6610, Eppendorf Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) bestimmt.

Das Gerät arbeitet nach einem coulometrischen Verfahren, bei dem Silberionen erzeugt und durch einen Indikatorstrom zwischen zwei Silberelektroden gemessen werden. Die Höhe des Indikatorstroms ist der Silberionenkonzentration in der Elektrolytlösung ( 15 ml Essigsäure-Salpetersäure-Lösung + 1 ml Gelatine-Lösung, Eppendorf Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland) proportional. Das Probenvolumen betrug 25 µl, es wurden Einzelbestimmungen durchgeführt.

Die Chloridausscheidung ( $U_{Cl}$ ) gibt die pro Zeiteinheit ausgeschiedene Chloridmenge an:

$$U_{Cl} = [Cl]_{Urin} \times UZV$$

Die Fraktionelle Chloridausscheidung ( $FA_{Cl}$ ) wurde wie folgt berechnet:

$$FA_{Cl} = (U_{Cl}) / (GFR \times [Cl]_{Plasma}) \times 100$$

wobei  $[Cl]_{Plasma}$  die Chloridkonzentration im Plasma ist.

### 2.3.7 Bestimmung der Glukoseausscheidung

Glukose wurde mit INFINITY™ – Glukose–Reagenz (17-25; Sigma Diagnostics, Deisenhofen, Deutschland) in Plasma und Urin bestimmt.

Zur Bestimmung wurden je 3 µl Probe benötigt. Da Glukose bei Zimmertemperatur nur wenige Stunden stabil bleibt, wurden sofort von den Proben 10 µl abpipettiert und in 0,5 ml Eppendorfgefäßen separat eingefroren.

Am Messtag wurden die Proben aufgetaut und je 3 µl zur Doppelbestimmung in Eppendorfgefäße pipettiert. Nach Zugabe von 300 µl Glukose-Reagenz wurden die Proben 3 min bei 37°C inkubiert und anschließend photometrisch (Fa. Hitachi, Spektralphotometer, Modell U-3000) untersucht.

Die Glukoseausscheidung ( $U_{Gluc}$ ) gibt die pro Zeiteinheit ausgeschiedene Glukosemenge an:

$$U_{Gluc} = [Gluc]_{Urin} \times UZV$$

Die Fraktionelle Glukoseausscheidung ( $FA_{Gluc}$ ) wurde wie folgt berechnet:

$$FA_{Gluc} = (U_{Gluc}) / (GFR \times [Gluc]_{Plasma}) \times 100$$

wobei  $[Gluc]_{Plasma}$  die Glukosekonzentration im Plasma ist.

## 2.4 Statistik

Für die Periode 1 und die Periode 2 wurden jeweils die Mittelwerte mit den dazugehörigen Standardfehlern (SEM) bestimmt. Zur statistische Auswertung wurden für jeden betrachteten Wert Periode 1 mit Periode 2 im zweiseitig gepaarten t-Test verglichen. Als statistisch signifikant wurden p-Werte  $<0,05$  angesehen. Da mehrere Tests in der selben Gruppe durchgeführt wurden, wurde das Signifikanzniveau entsprechend der Anzahl der durchgeführten Tests reduziert (Bonferroni-Korrektur). Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler angegeben.

## **3. Ergebnisse**

### **3.1 Vergleich basaler Werte aller Gruppen**

Die Ausgangsparameter wie Gewicht, sowie die in Periode 1 der Clearance-Experimente gemessenen Parameter wie Blutdruck, Herzfrequenz, die Elektrolyt- und Glucosekonzentration im Plasma und die renale Ausscheidung unterschieden sich zwischen den einzelnen Gruppen nicht signifikant. In den Tabellen 7.2.1, 7.2.2, und 7.2.3 im Anhang sind die absoluten Mittelwerte der einzelnen Parameter unter basalen Bedingungen (Periode 1), sowie nach Gabe von Vehikel bzw. HMR 1556 wiedergegeben (Periode 2).

### **3.2 Wirkung des K<sup>+</sup>-Kanalblockers HMR 1556**

In den folgenden Abbildungen werden die Mittelwerte der absoluten Änderungen in Periode 2 versus Periode 1 mit den dazugehörigen Standardfehlern wiedergegeben. Zur statistischen Auswertung wurden für jeden betrachteten Wert die Daten aus den Perioden 1 und 2 im zweiseitig gepaarten t-Test verglichen.

#### **3.2.1 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz**

Weder die Applikation von Vehikel noch von HMR 1556 veränderte den mittleren arteriellen Blutdruck oder die Herzfrequenz in signifikanter Weise. (Abb. 3.1) (Abb. 3.2)

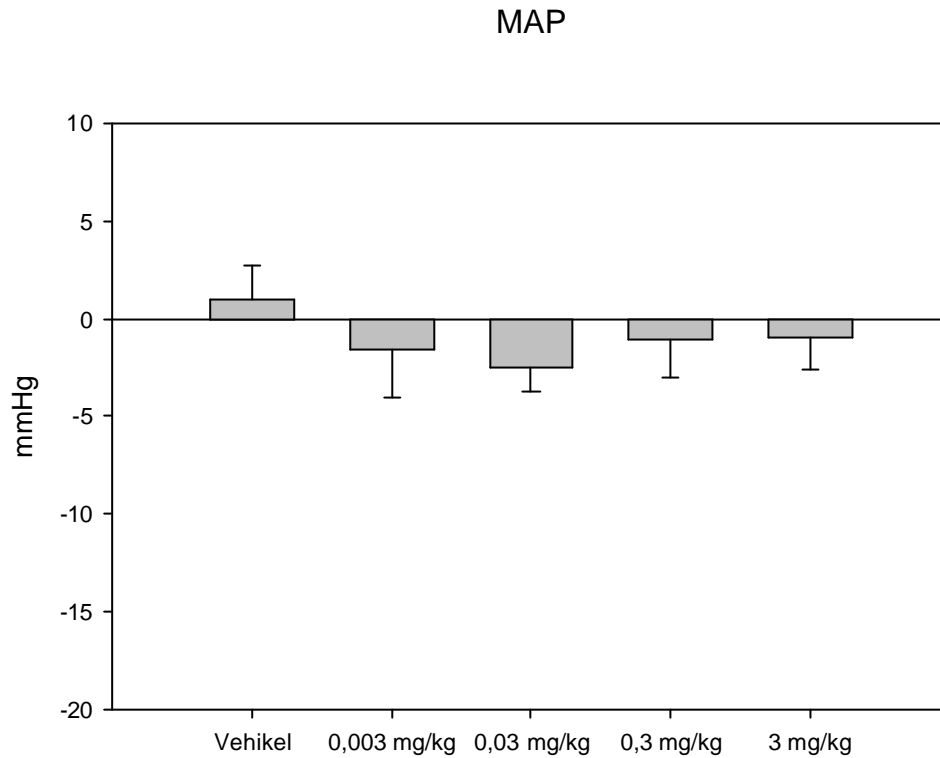


Abbildung 3.1: **Änderung des mittleren arteriellen Blutdrucks nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) des mittleren arteriellen Blutdrucks innerhalb der gepaarten Experimente (n=10-11). *Der mittlere arterielle Blutdruck veränderte sich nicht signifikant nach Gabe von HMR 1556.*

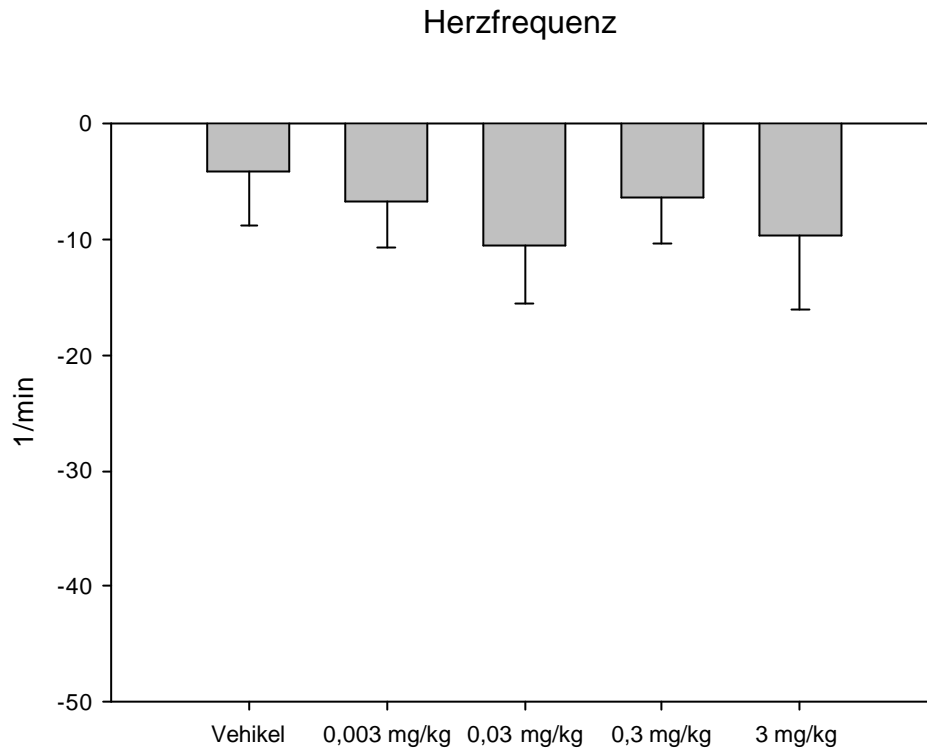


Abbildung 3.2: **Änderung der Herzfrequenz nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der Herzfrequenz innerhalb der gepaarten Experimente (n=10-11). *Die Herzfrequenz veränderte sich nicht signifikant nach Gabe von HMR 1556.*

### 3.2.2 Glomeruläre Filtrationsrate

Weder die Applikation von Vehikel noch von HMR 1556 veränderte die glomeruläre Filtrationsrate in signifikanter Weise. (Abb. 3.3)

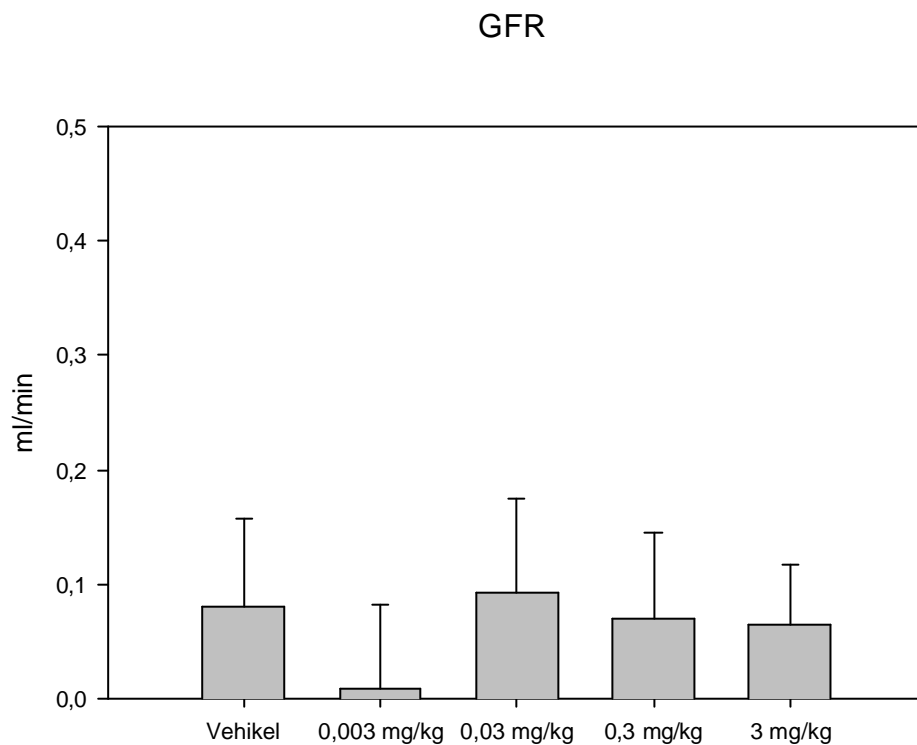


Abbildung 3.3: **Änderung der glomerulären Filtrationsrate nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der glomerulären Filtrationsrate innerhalb der gepaarten Experimente (n=10-11). *Die glomeruläre Filtrationsrate veränderte sich nach Gabe von HMR 1556 nicht signifikant.*

### 3.2.3 Urinzeitvolumen und fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung

Die Gabe von Vehikellösung hatte keinen signifikanten Einfluss auf das Urinzeitvolumen oder die fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung. Im Gegensatz dazu erhöhte die Applikation von HMR 1556 das Urinzeitvolumen und die fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung dosisabhängig. In einer Dosierung von 3 mg/kg, 0,3 mg/kg als auch bei 0,03 mg/kg waren das Urinzeitvolumen und die fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung signifikant erhöht. (Abb. 3.4 und Abb. 3.5)

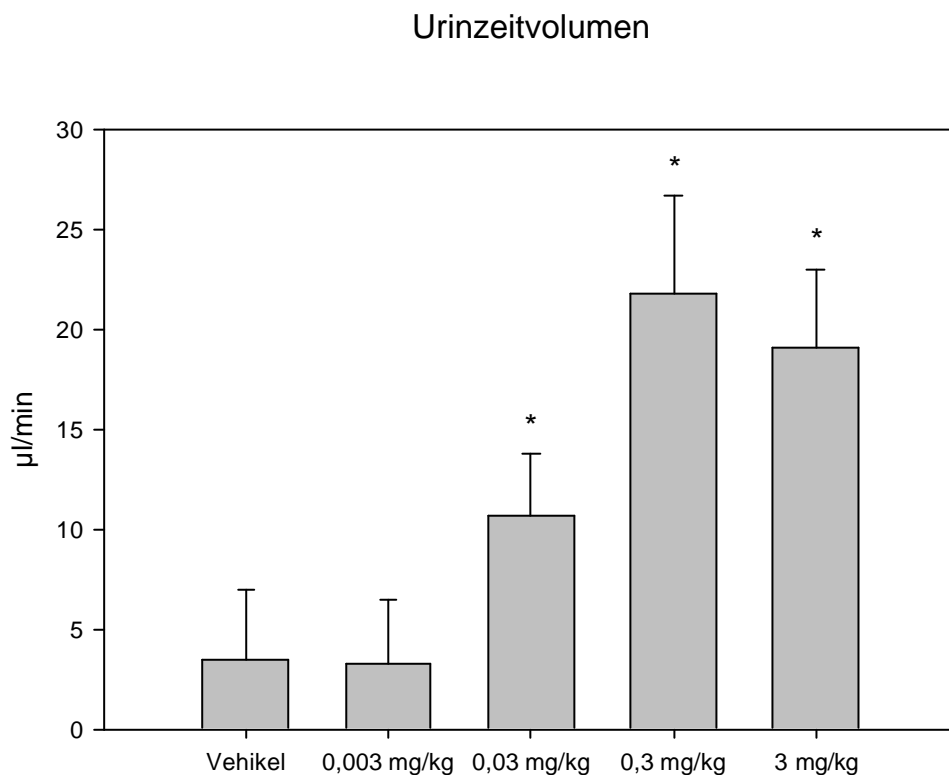


Abbildung 3.4: **Änderung des Urinzeitvolumens nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) des Urinzeitvolumens innerhalb der gepaarten Experimente. \*  $p < 0,05$  (Periode2 vs. Periode1) ( $n=10-11$ ). Das Urinzeitvolumen nahm dosisabhängig nach Gabe von HMR 1556 zu.



## Fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung

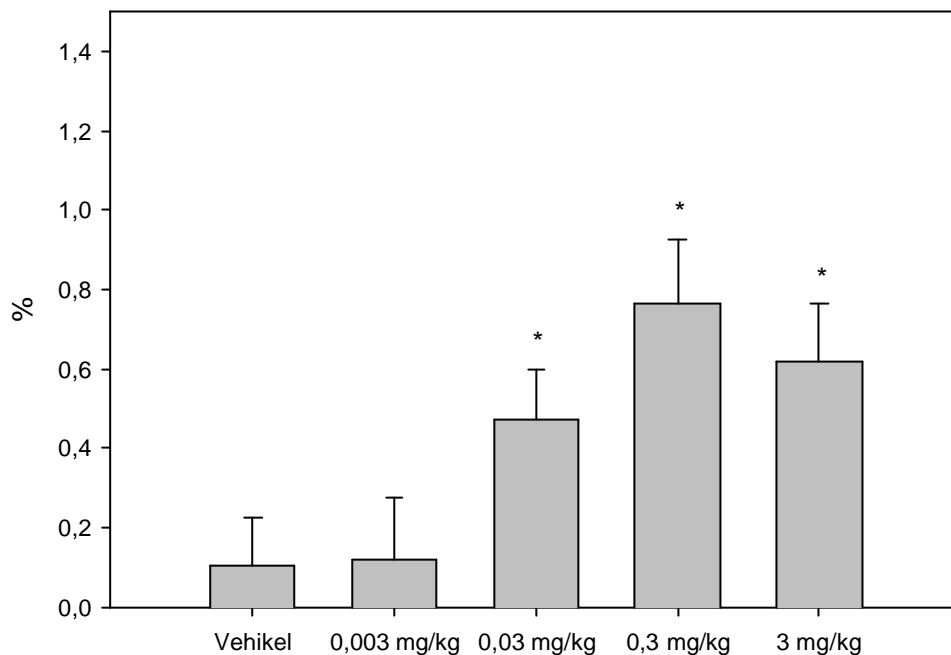


Abbildung 3.5: **Änderung der fraktionellen Flüssigkeitsausscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der fraktionellen Flüssigkeitsausscheidung innerhalb der gepaarten Experimente. \*  $p < 0,05$  (Periode2 vs. Periode1) ( $n=10-11$ ). Die fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung nahm dosisabhängig nach Gabe von HMR 1556 zu.

### 3.2.4 Renale Natriumausscheidung

Die Applikation von HMR 1556 erhöhte die absolute und fraktionelle renale Natriumausscheidung nur bei einer Dosis von 3 mg/kg in überzeugender und signifikanter Weise. Gabe von HMR 1556 in den Dosierungen von 0,003 mg/kg, 0,03 mg/kg und 0,3 mg/kg ergaben Werte für die renale Natriumausscheidung, die im Bereich der Werte lagen wie sie für die Vehikelgabe bestimmt wurden. Dabei ergab sich für die Dosis von 0,03 mg/kg ein signifikanter Unterschied in

Periode 2 versus Periode 1, da die Streuung in der Gruppe relativ gering war. (Abb. 3.6 und Abb. 3.7)

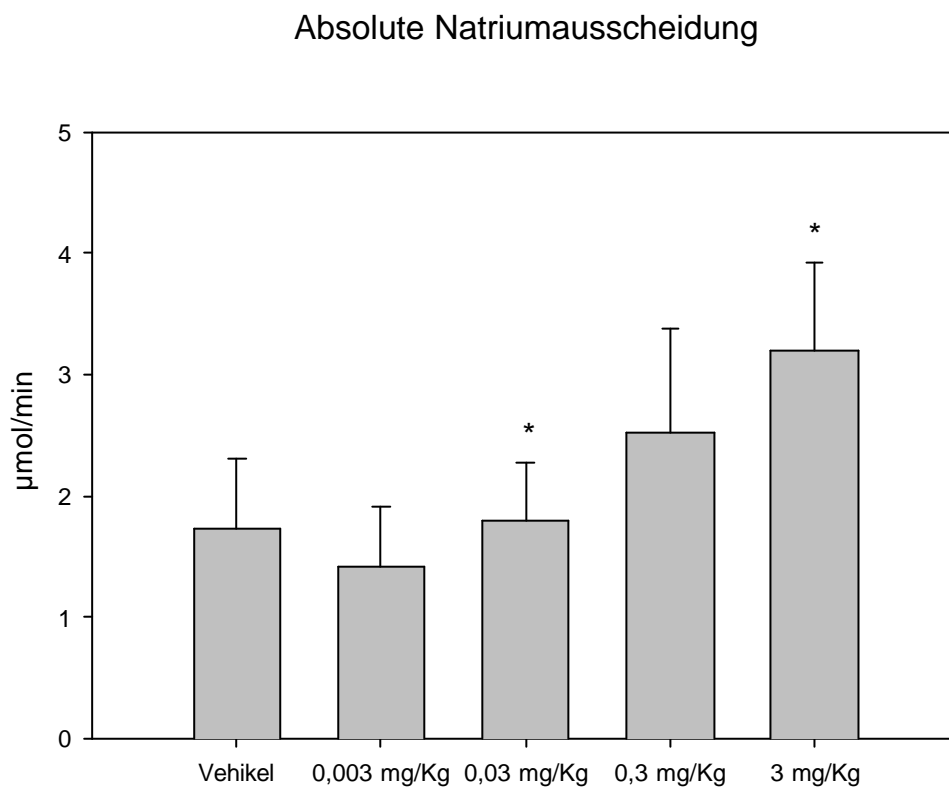


Abbildung 3.6: **Änderung der absoluten Natriumausscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der absoluten Natriumausscheidung innerhalb der gepaarten Experimente. \*  $p < 0,05$  (Periode2 vs. Periode1) ( $n=10-11$ ). Die absolute Natriumausscheidung nahm in signifikanter und überzeugender Weise nach Gabe von HMR 1556 in einer Dosis von 3 mg/kg zu.

## Fraktionelle Natriumauscheidung

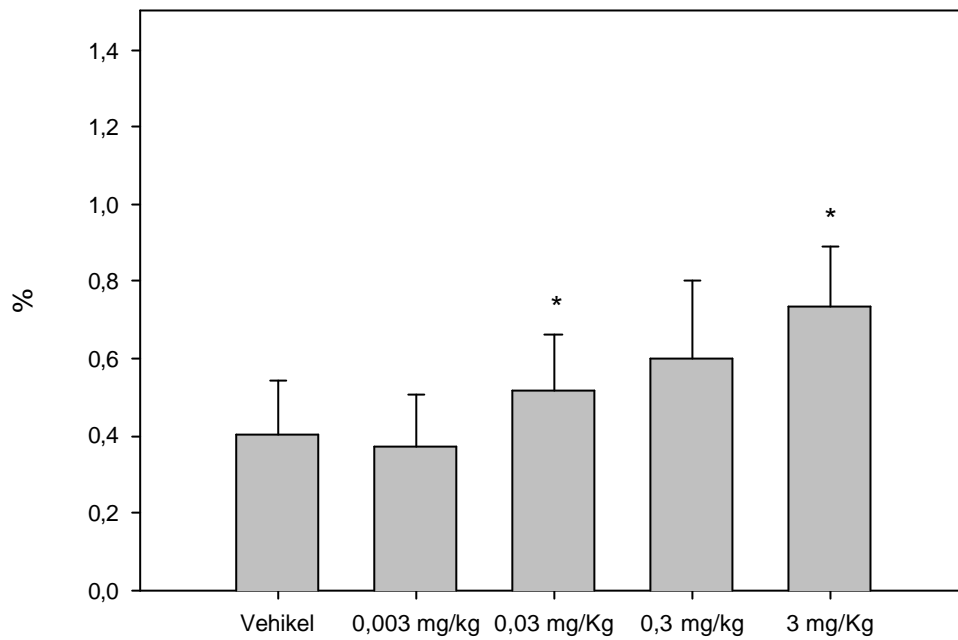


Abbildung 3.7: **Änderung der fraktionellen Natriumauscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der fraktionellen Natriumauscheidung innerhalb der gepaarten Experimente. \*  $p < 0,05$  (Periode2 vs. Periode1) ( $n=10-11$ ). Die fraktionelle Natriumauscheidung nahm in signifikanter und überzeugender Weise nach Gabe von HMR 1556 in einer Dosis von 3 mg/kg zu.

### 3.2.5 Renale Kaliumausscheidung

Weder die Applikation von Vehikel noch von HMR 1556 veränderte die renale Kaliumausscheidung in signifikanter Weise. (Abb. 3.8 und 3.9)

#### Absolute Kaliumausscheidung

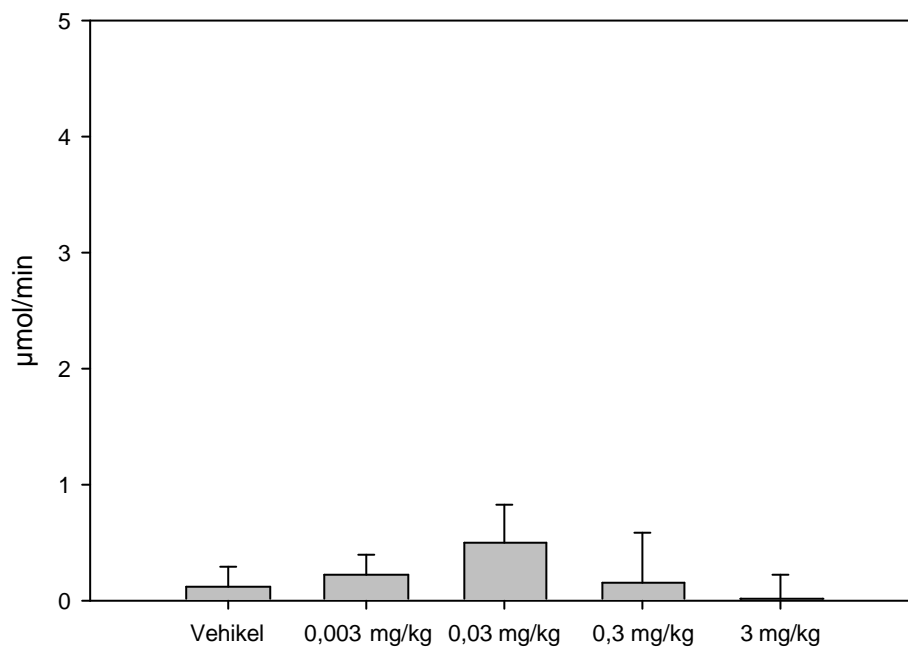


Abbildung 3.8: **Änderung der absoluten Kaliumausscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der absoluten Kaliumausscheidung innerhalb der gepaarten Experimente (n=10-11). *Die absolute Kaliumausscheidung veränderte sich nach Gabe von HMR 1556 nicht signifikant.*

## Fraktionelle Kaliumausscheidung

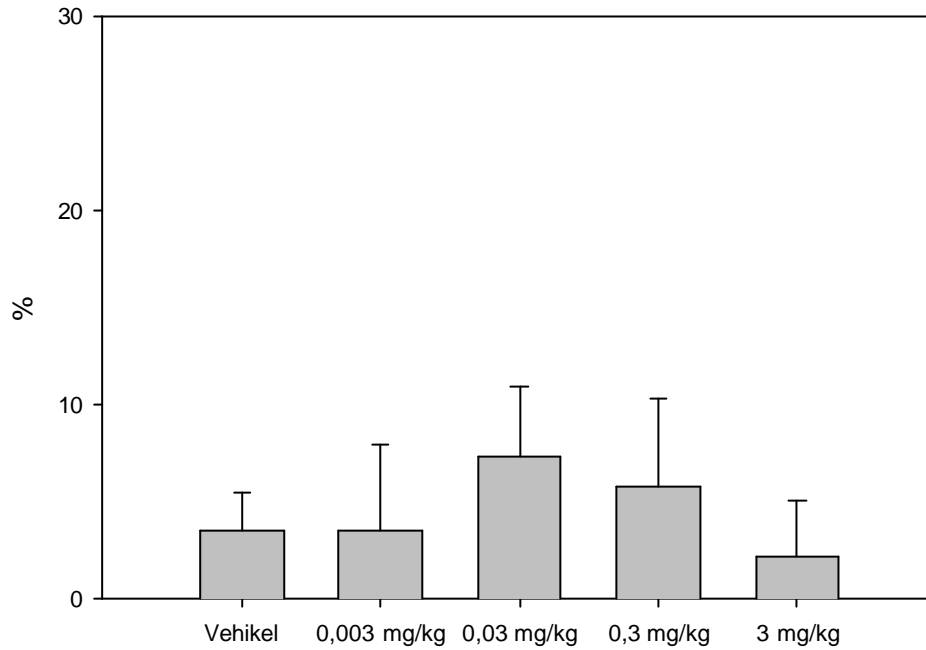


Abbildung 3.9: **Änderung der fraktionellen Kaliumausscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der fraktionellen Kaliumausscheidung innerhalb der gepaarten Experimente (n=10-11). *Die fraktionelle Kaliumausscheidung veränderte sich nach Gabe von HMR 1556 nicht signifikant.*

### 3.2.6 Renale Chloridausscheidung

Die Gabe von Vehikellösung hatte keinen signifikanten Einfluss auf die renale Chloridausscheidung. Im Gegensatz dazu erhöhte die Applikation von HMR 1556 die renale Chloridausscheidung dosisabhängig. In einer Dosierung von 3 mg/kg, bei 0,3 mg/kg als auch bei 0,03 mg/kg waren die absolute Chloridausscheidung und die fraktionelle Chloridausscheidung signifikant erhöht. (Abb. 3.10 und Abb. 3.11)

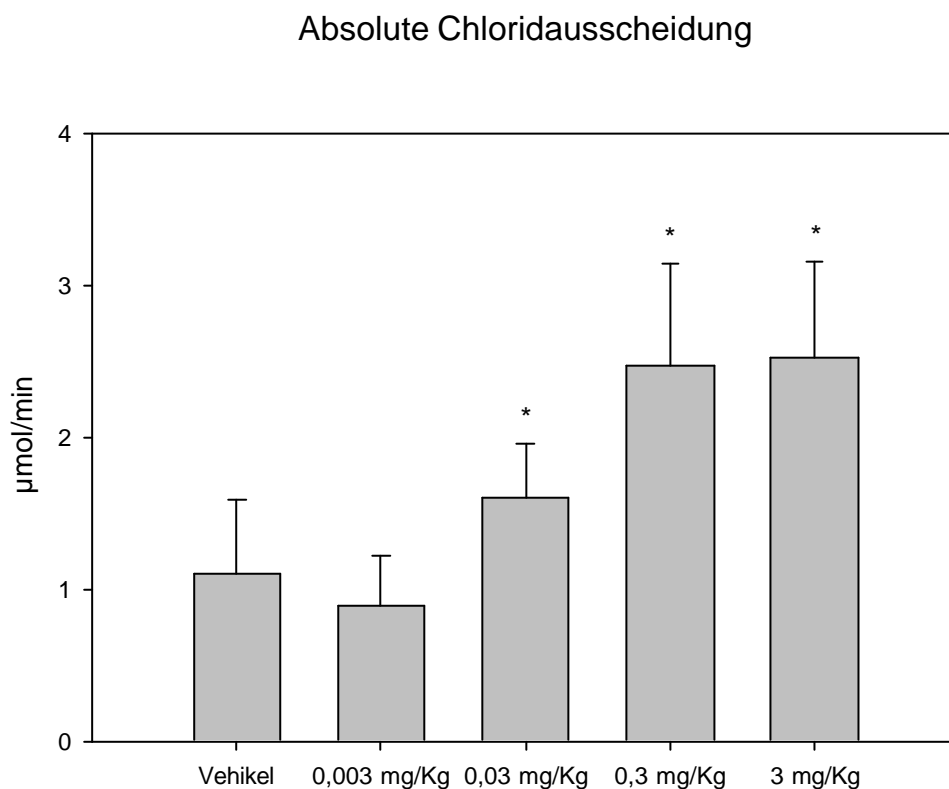


Abbildung 3.10: **Änderung der absoluten Chloridausscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der Chloridausscheidung innerhalb der gepaarten Experimente. \*  $p < 0,05$  (Periode2 vs. Periode1) ( $n=10-11$ ). *Die absolute Chloridausscheidung nahm dosisabhängig nach Gabe von HMR 1556 zu.*

## Fraktionelle Chloridausscheidung

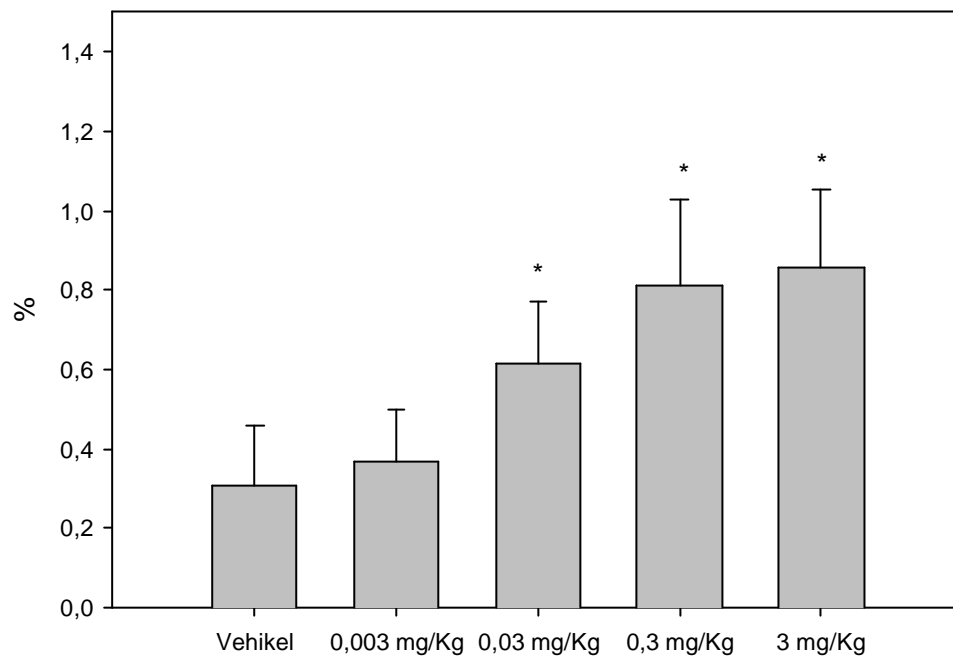


Abbildung 3.11: **Änderung der fraktionellen Chloridausscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der fraktionellen Chloridausscheidung innerhalb der gepaarten Experimente. \*  $p < 0,05$  (Periode2 vs. Periode1) ( $n=10-11$ ). Die fraktionelle Chloridausscheidung nahm dosisabhängig nach Gabe von HMR 1556 zu.

### 3.2.7 Renale Glukoseausscheidung

Vehikelgabe führte zu einer moderaten aber signifikanten Erhöhung der absoluten und fraktionellen Glukoseausscheidung. Nach Applikation von HMR 1556 konnte eine signifikante Erhöhung nur bei 0,3 mg/kg festgestellt werden. Beim ungepaarten Vergleich erwiesen sich die Anstiege durch 0,3 mg/kg HMR 1556 als signifikant größer im Vergleich zu der Vehikelgruppe. (Abb. 3.12 und Abb. 3.13)

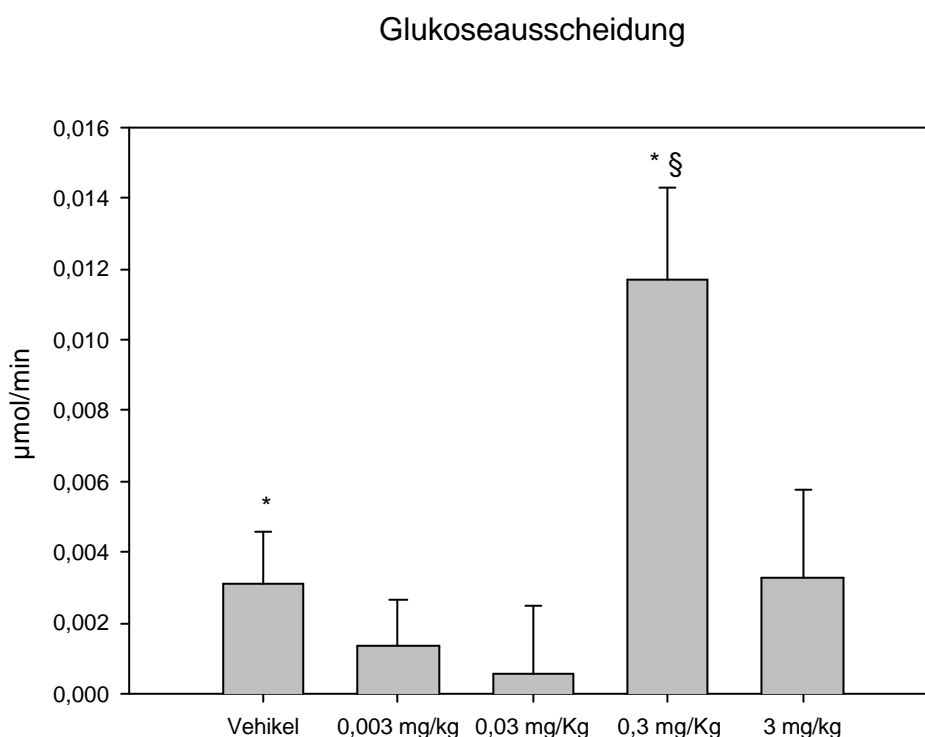


Abbildung 3.12: **Änderung der absoluten Glukoseausscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der Glukoseausscheidung innerhalb der gepaarten Experimente. \*  $p < 0,05$  (Periode2 vs. Periode1). §  $p < 0,0125$  (HMR 1556 vs. Vehikel) ( $n=10-11$ ). Nach Gabe von HMR 1556 konnte eine eindeutige Wirkung auf die absolute Glukoseausscheidung nur für eine Dosis von 0,3 mg/kg festgestellt werden.



## Fraktionelle Glukoseausscheidung

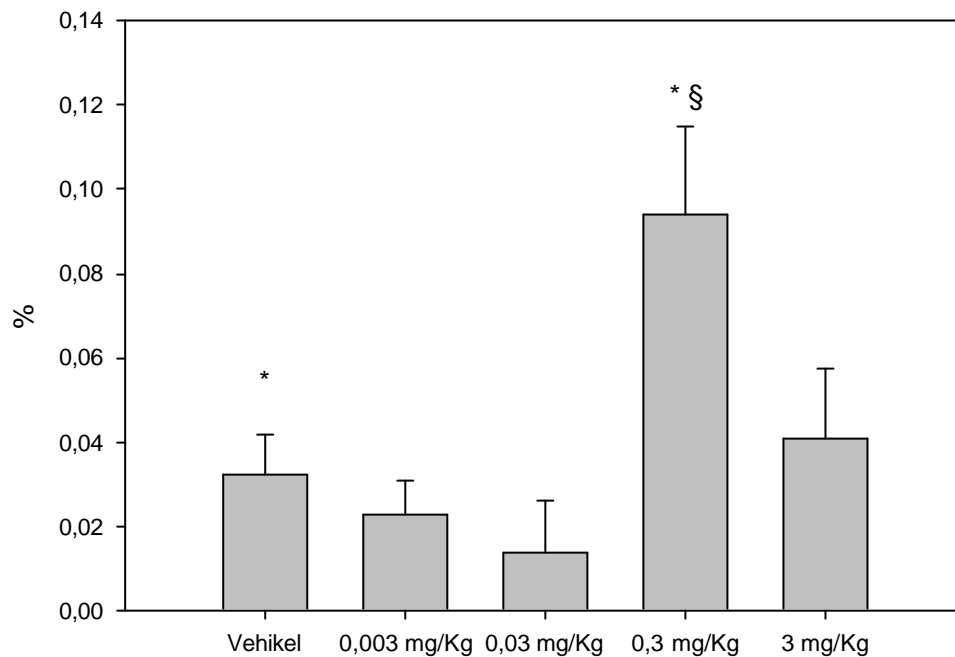


Abbildung 3.13: **Änderung der fraktionellen Glukoseausscheidung nach Gabe von HMR 1556.** Dargestellt ist der Mittelwert der absoluten Änderung (Periode2-Periode1) der fraktionellen Glukoseausscheidung innerhalb der gepaarten Experimente. \*  $p < 0,05$  (Periode2 vs. Periode1). §  $p < 0,0125$  (HMR 1556 vs. Vehikel) ( $n=10-11$ ). *Nach Gabe von HMR 1556 konnte eine eindeutige Wirkung auf die fraktionelle Glukoseausscheidung nur für eine Dosis von 0,3 mg/kg festgestellt werden.*

## **4. Diskussion**

### **4.1 Hintergrund der Untersuchungen**

Vorausgegangene Untersuchungen an Mäusen implizierten, dass ein Kaliumstrom in das Tubuluslumen durch einen  $K^+$ -Kanal, bestehend aus den Untereinheiten KCNE1 und KCNQ1, im proximalen Tubulus der Depolarisation bei elektrogenem Kotransport von  $Na^+$  mit Glukose oder Aminosäuren entgegen wirkt. In dieser Arbeit wurde die Wirkung von HMR 1556 auf die Nierenfunktion bei Ratten untersucht, einem Hemmstoff der im Herz auf einen  $K^+$ -Kanal mit den selben Untereinheiten wirkt.

### **4.2 Versuchsbedingungen**

#### **4.2.1 Clearance-Experimente**

An narkotisierten Ratten können Versuchsbedingungen gut standardisiert werden. Durch Verwendung von Inzuchtstämmen ist eine gute Vergleichbarkeit der ermittelten Daten möglich. Die einzelnen Präparationsschritte und die experimentelle Ausführung des Versuchs erfolgten nach einer standardisierten Reihenfolge. Durch eine 90-minütige Stabilisierungsphase am Ende der Präparation, konnten annähernd gleichbleibende Versuchsbedingungen geschaffen werden. Zwischen dem Ende der Präparation und dem Beginn der Stabilisierungsphase wurde eine 5-minütige „Bolus-Infusion“ von 1 ml 0,85% NaCl gegeben. So wurde gewährleistet, dass die Ratten mit ausreichend Flüssigkeit versorgt waren und der Flüssigkeitsverlust (OP-Wunden und Zeitspanne ohne Infusion) ausgeglichen werden konnte. Außerdem wurden alle Experimente morgens zur selben Zeit durchgeführt, um zirkadiane Schwankungen auszuschließen.

### 4.2.2 Vehikelkontrollen

HMR 1556 wurde als Bolus in den Lösungsmitteln DMSO und Polyethylenglycol 400 verabreicht. Das Bolusvolumen wurde möglichst gering gehalten, um keine Diurese zu provozieren. Die Zusammensetzung von Polyethylenglycol 400 und DMSO wurde so optimiert, dass HMR 1556 bei der höchsten Dosis (3 mg/kg) nicht im Infusionskatheter ausfiel und DMSO/PEG 400 keine Hämolyse verursachte.

Um mögliche Wirkungen von PEG bzw. DMSO auf die Nierenfunktion bei Ratten zu erfassen, wurde einer Gruppe Vehikel appliziert. [Tabelle 7.2.1]

In der Vehikelgruppe konnten bis auf die Glucoseausscheidung keine signifikante Veränderung der Nierenfunktion festgestellt werden. Urinvolumen, GFR, Na<sup>+</sup>-Ausscheidung, Cl<sup>-</sup>-Ausscheidung und K<sup>+</sup>-Ausscheidung blieben statistisch unverändert, ebenso der mittlere arterielle Blutdruck, die Herzfrequenz und der Hämatokrit.

Lediglich K<sup>+</sup> und Glukose im Plasma fielen während der Vehikel-Experimente moderat, aber statistisch signifikant ab. Dies ist auf die relativ lange Dauer der Experimente ohne Nahrungs- und Glukosezufuhr zurückzuführen. Vergleichbare Änderungen auf K<sup>+</sup> und Glucose im Plasma wurden auch bei Gabe von HMR 1556 beobachtet.

Wie erwähnt, nahm die absolute und fraktionelle Glukoseausscheidung in der Vehikelgruppe moderat aber signifikant zu. Dies könnte auf einen Effekt der Vehikellösung hindeuten. Allerdings war der Anstieg der fraktionellen Glukoseausscheidung von 0,18 auf 0,21% gering. [Tab. 7.2.1 – 7.2.3]

### 4.3 HMR 1556

HMR 1556 ist ein  $K^+$ -Kanalblocker der  $I_{Ks}$ -Kanäle im Herz blockiert.

Es ist bekannt, dass dieser Kanalkomplex aus zumindest zwei Untereinheiten besteht: KCNQ1 und KCNE1 [2][27].

Lerche et al. konnten nachweisen, dass KCNE1-Proteine zwar nicht direkt von Chromanolen inhibiert werden, dass aber KCNE1 eine allosterische Veränderung des Partners KCNQ1 hervorruft [18].

In der Niere konnte das KCNE1 Protein in mehreren Arbeiten nachgewiesen werden. Erstmals wurde es 1988 von Takumi et al. beschrieben [31]. Später konnte das KCNE1 Protein in der luminalen Membran des proximalen Tubulus der Ratte nachgewiesen werden [30]. In Mäusen konnten Vallon et al. selbiges nachweisen und zusätzlich auch KCNQ1 in den selben Abschnitten des proximalen Tubulus [34].

Im Nierengewebe der Maus gibt es jedoch eine Arbeit, die andere Ergebnisse zur Expression von KCNQ1 und KCNE1 zeigte. Demelombe et al. konnten in Mausnieren keinen Nachweis erbringen, dass KCNQ1 und KCNE1 zusammen exprimiert werden. Sie beschrieben, dass KCNE1 mRNA im distalen Konvolut des distalen Tubulus und im kortikalen Anteil der Sammelrohre zu finden war. KCNQ1 hingegen wurde in den Sammelrohren der äußeren Medulla und im distalen Tubulus nachgewiesen [8]. Das heißt weder KCNQ1 noch KCNE1 sind nach diesen Untersuchungen im proximalen Tubulus der Maus.

Vallon et al. konnten jedoch ihre Expressionsdaten insofern untermauern, als sie zeigen konnten, dass die KCNE1 knockout Maus im proximalen Tubulus eine eingeschränkte Fähigkeit zur Repolarisation bei Applikation von Glukose oder Aminosäuren hat [34].

Ausgehend von diesen Untersuchungen nahmen wir deshalb an, dass KCNE1 und KCNQ1 auch im proximalen Tubulus der Ratte exprimiert werden und als Zielorgan für HMR 1556 dort hemmbar sein sollten.

Bislang liegen weder in vivo noch in vitro Daten dazu vor, wie sich HMR 1556 bezüglich der Metabolisierung verhält. Im Rattenplasma konnten nach Gabe von 5mg/kg i.v. unter anderem HMR 1556 und Desmethyl-HMR 1556 nachgewiesen werden. Im Rattenurin konnten deutlich polarere Metabolite, vermutlich das Glucoronid nach Abspaltung der Trifluorbutylgruppe, nachgewiesen werden [9]. Untersuchungen zu HMR 1556 im proximalen Tubulus liegen bis jetzt nicht vor.

#### **4.4 Wirkung von HMR 1556**

Folgende Wirkungen würde man nach Gabe von HMR 1556 und Blockierung von KCNE1/KCNQ1 im proximalen Tubulus erwarten:

Die eingeschränkte Funktion von KCNE1/KCNQ1 würde die substrat-induzierte Depolarisation im proximalen Tubulus hemmen und somit den Na<sup>+</sup>-Kotransport vermindern. Dies führt zu einer geringeren Reabsorption von Na<sup>+</sup> und somit auch von Cl<sup>-</sup> und Glukose. Dies sollte letztendlich in einer geringeren Flüssigkeitsreabsorption resultieren.

Diese Ergebnisse wurden in der KCNE1 knockout Maus beobachtet, wobei die fraktionelle Reabsorption von Flüssigkeit und Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und Glukose zwar signifikant aber nur moderat vermindert waren. Obgleich in der KCNE1 knockout Maus die Sekretion von Kalium in das Lumen des proximalen Tubulus vermindert war, zeigte die gesamte Niere keine unterschiedliche absolute oder fraktionelle Kalium-Ausscheidung [34].

Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit bei Gabe von HMR 1556 in Abhängigkeit der Dosis ein mäßiger, aber signifikanter Anstieg der renalen Ausscheidung von Na<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> und Urinvolumen nachgewiesen werden. [Abb. 3.3; 3.4; 3.6; 3.7; 3.10; 3.11]

Hingegen blieb nach Gabe von HMR1556 wie bei der KCNE1 knockout Maus die K<sup>+</sup>-Ausscheidung der gesamten Niere unverändert. [Abb. 3.8; 3.9]

Eine wahrscheinliche Erklärung hierfür ist, dass die geringere  $K^+$ -Sekretion im proximalen Tubulus durch  $K^+$ -Sekretion in späteren Abschnitten des Nephrons ausgeglichen wird.

Die Ergebnisse zur Glukoseausscheidung waren in der vorliegenden Arbeit nicht eindeutig. Ausgehend von der oben erläuterten Theorie, würde man ebenfalls einen dosisabhängigen Anstieg von Glukose nach Gabe von HMR 1556 im Endurin erwarten.

In den Ergebnissen zeigte schon die Vehikelgruppe eine geringe, aber statistisch signifikante Erhöhung der Glukoseausscheidung. [Abb. 3.12; 3.13] Nach Gabe von HMR 1556 war im Vergleich zu Vehikel lediglich bei einer Dosis von 0,3 mg/kg die absolute und fraktionelle Glukoseausscheidung erhöht. Bei Gabe von 3 mg/kg war jedoch keine Zunahme der Glukoseausscheidung nachzuweisen. Ferner war der Anstieg der Glukoseausscheidung war bei 0,3 mg/kg relativ gering im Vergleich zu den KCNE1 knockout Mäusen: Zunahme der renalen Glukoseausscheidung von ~ 0,05 % der glomerulär filtrierte Glukosemenge nach 0,3 mg/kg HMR 1556 versus 0,8 % (bei KCNE1 knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen) der glomerulär filtrierte Glukosemenge.

Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse zu denen von Vallon et al., die einen signifikanten Anstieg der Glukoseausscheidung im Endurin feststellen konnten [34], könnte eine unterschiedliche Expression und Funktion von KCNE1/KCNQ1 in der Maus und in der Ratte sein.

Zu bedenken ist auch, dass KCNE1 und KCNQ1, zumindest in der Maus, besonders im spätproximalen Tubulus exprimiert werden. Da aber der frühproximale Tubulus normalerweise den Großteil der filtrierte Glukose reabsorbiert, könnte es sein, dass insbesondere bei der Ratte die spätproximalen Abschnitte kaum noch Glukose absorbieren und damit HMR 1556 wenig Einfluss auf Glukose aber noch gewissen Einfluss auf  $Na^+$ ,  $Cl^-$  und Flüssigkeitstransport im spätproximalen Tubulus hat.

Vallon et al. konnten in einer Arbeit, in der Mikropunktionsexperimente bei Ratten durchgeführt wurden, zeigen, dass erst bei einer höheren, supraphysiologischen Glukosekonzentration (20 mM) im spätproximalen Tubulus eine eindeutig hemmende Wirkung von HMR 1556 auf die Glukoseabsorption nachzuweisen ist [35].

Es könnte also sein, dass in den Clearance Experimenten die Änderung der Glukoseausscheidung zu gering war um eine signifikante Änderung festzustellen, da die Glucosebeladung im spätproximalen Tubulus sehr gering ist.

Zusammenfassend kann man sagen, dass HMR 1556 eine Wirkung auf die Nierenfunktion zeigt. Am eindeutigsten war dies am Urinzeitvolumen bzw. der fraktionellen Flüssigkeitsausscheidung [Abb.3.1 und 3.2] und der Chloridausscheidung bzw. fraktionellen Chloridausscheidung [Abb. 3.5 und 3.6] zu sehen. Eine deutliche Wirkung zeigte sich bei 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg und 3 mg/kg. Bei der absoluten bzw. fraktionellen Natriumausscheidung [Abb. 3.3 und 3.4] erhöhte die Gabe von HMR 1556 nur in einer Dosis von 3 mg/kg die absolute und fraktionelle Natriumausscheidung signifikant. Letztendlich kann man nicht mit Sicherheit sagen ob HMR 1556 in der vorliegenden Arbeit wirklich eine Wirkung im proximalen Tubulus gezeigt hat. Allerdings deuten die Ergebnisse dieser Arbeit darauf hin, da Übereinstimmungen zu Ergebnissen und Hypothesen anderer Arbeiten erkennbar sind.

Es werden weitere Untersuchungen nötig sein, um endgültig Klarheit über die Funktion apikaler  $K^+$ -Kanäle im proximalen Tubulus der Niere zu bekommen.

## **5. Zusammenfassung**

Im proximalen Tubulus der Niere induziert ein elektrogener  $\text{Na}^+$ /Glukose bzw.  $\text{Na}^+$ /Aminosäure Kotransport eine Depolarisation der luminalen Zellmembran und induziert einen lumenwärts gerichteten, repolarisierenden  $\text{K}^+$ -Strom.

Untersuchungen an Mäusen zeigen, dass KCNQ1 und KCNE1, die zusammen im Herz den  $I_{\text{Ks}}$ -Kanal bilden, auch im proximalen Tubulus der Niere zusammen exprimiert werden und dort einen funktionellen Kaliumkanal ausbilden, der zur Repolarisation bei elektrogenem Natriumtransport wesentlich beiträgt. HMR 1556 ist ein selektiver Hemmstoff des  $I_{\text{Ks}}$ -Kanals.

In Clearance-Experimenten an Thiobutabarbital-narkotisierten Ratten wurde die Wirkung einer systemischen Applikation von HMR 1556 in unterschiedlichen Dosierungen auf die Nierenfunktion untersucht.

Bei Blockade einer durch KCNQ1 und KCNE1 vermittelte Repolarisation im proximalen Tubulus durch HMR 1556, könnte ein Anstieg von Urinvolumen, Natrium, folglich Chlorid, sowie ein leichter Anstieg von Glucose im Endurin resultieren.

Der Ablauf der Clearance-Experimente gliederte sich in 2 Perioden zu je 40 min. In der ersten Periode wurden basale Werte für Blutdruck, Herzfrequenz, Hämatokrit, GFR sowie Elektrolyte und Glucose im Urin erfasst. Nach anschließender Applikation von Vehikel, oder 0,003 mg/kg, 0,03 mg/kg 0,3 mg/kg bzw. 3 mg/kg HMR 1556 wurden die gesamten Parameter in einer zweiten Periode erneut bestimmt.

HMR 1556 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Herzfrequenz, den Blutdruck oder die GFR, beeinflusste die Nierenfunktion aber wie folgt: HMR 1556 verminderte die renale Reabsorption von Natrium, Chlorid und Flüssigkeit in dosisabhängiger und signifikanter Weise ohne die Kaliumausscheidung zu verändern.



Signifikante Wirkungen zeigen sich für das Urinvolumen bzw. die fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung und die absolute bzw. fraktionelle Chloridausscheidung bei 0,03 mg/kg, 0,3 mg/kg und 3 mg/kg, wobei das Wirkungsmaximum bei 0,3 mg/kg erreicht schien. Für die absolute bzw. fraktionelle Natriumausscheidung konnte nach Gabe von HMR 1556 nur für 3 mg/kg eine signifikante Zunahme nachgewiesen werden.

Die renale Glukoseausscheidung bzw. -reabsorption wurde durch HMR 1556 jedoch nicht in relevanter Weise verändert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die These vorrausgegangener Arbeiten, dass HMR 1556 dosisabhängig  $K^+$ -Kanäle, die aus den Untereinheiten KCNQ1 und KCNE 1 bestehen, im proximalen Tubulus der Niere blockieren und damit die Reabsorption von Natrium, Chlorid und Flüssigkeit hemmen könnte. Die Bedeutung dieser Kanäle für die Glukoseabsorption muss noch geklärt werden.

## **6. Literaturverzeichnis**

- [1] Attali, B., Guillemare, E., Lesage, F., Honore, E., Romey, G., Lazdunski, M., Barhanin, J. (1993)  
The protein IsK is a dual activator of K<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> channel  
*Nature* 365: 850-852
- [2] Barhanin, J., Lesage, F., Guillemare, E., Fink, M., Lazdunski, M., and Romey, G. (1996)  
K(V)LQT1 and IsK (mink) proteins associate to form the I<sub>ks</sub> cardiac potassium current  
*Nature* 384: 78-80
- [3] Bleich, M., Warth, R. (2000)  
The very small conductance K<sup>+</sup> channel KVLQT1 and epithelial function  
*Pflugers Arch-Eur J Physiol* 440: 202-206
- [4] Boyle, M.B., Maclusky, N. J., Naftolin, F., Kaczmarek, L. K. (1987)  
Hormonal regulation of K<sup>+</sup>-channel messenger RNA in rat myometrium during estrus cycle and in pregnancy  
*Nature* 330: 373-375
- [5] Boyle, M.B., Maclusky, N. J., Naftolin, F., Kaczmarek, L. K. (1987)  
Very slowly activating K<sup>+</sup> current from rat uterine smooth muscle expressed in RNA-injected *Xenopus* oocytes  
*Science* 235: 1221-1224
- [6] Busch, A.E., Busch, G.L., Suessbrich, H., Lang, H.-J., Greger, R., Kunzelmann, K., Attali, B., Stühmer, W. (1997)  
The role of the Isk protein in the specific pharmacological properties of the I<sub>ks</sub> channel complex  
*Brit. J. Pharmacol.* 122 : 187-189
- [7] Busch, A.E., Suessbrich, H., Waldegger, S., Sailer, E., Greger R., Lang, H.J., Lang, F., Gibson K.J., Maylie, J.G. (1996)  
Inhibition of I<sub>ks</sub> in guinea pig cardiac myocytes and guinea pig Isk channels by the chromanol 293B  
*Pflugers Arch* 432: 1094-1096
- [8] Demolombe, S., Franco, D., De Boer, P., Kuperschmidt, S., Roden, D., Pereon, Y., Jarry, A., Moormann, A. F. M., Escande, D. (2001)  
Differential expression of KVLQT1 and its regulator IsK in mouse epithelia  
*Am J Physiol Cell Physiol* 280: C359-C372

- [9] Dudda, A. et al. (2001)  
14C-HMR 1556 Biotransformation study in urine and feces of male rats after a single oral dose of approx. 10 mg/kg and a single intravenous dose of approx. 5 mg/kg body weight  
*Aventis Pharma (unpublished data)*
- [10] Freeman, L. C., Kass, R. S., (1993)  
Expression of minimal K<sup>+</sup> channel protein in mammalian cells and immunolocalization in guinea pig heart  
*Circ. Res.* 73: 698-973
- [11] Fromter, E., (1982)  
Electrophysiological analysis of rat renal sugar and amino acid transport. I. Basic phenomena.  
*Pflugers Arch.* 393: 179-89
- [12] Gögelein, H., Brüggemann, A., Gerlach, U., Brendel, J., Busch, A. E. (2000)  
Inhibition of I<sub>Ks</sub> channels by HMR 1556  
*Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 362(6): 480-8.
- [13] Hausdorff, S. F., Goldstein, S. A. N., Rushin E. E., Miller, C., (1991)  
Functional characterization of a minimal K<sup>+</sup> channel expressed from a synthetic gene  
*Biochemistry* 30: 3341-3346
- [14] Köttgen, M., Hofer, A., Kim, S.J., Beschorner, U., Schreiber, R., Hug, M.J., Greger, R. (1999)  
Carbachol activates a K<sup>+</sup> channel of very small conductance in the basolateral membrane of rat pancreatic acinar cells  
*Pflugers Arch* 438: 597- 603
- [15] Lang, F., Messner, G., Rehwald, W. (1986)  
Electrophysiology of sodium-coupled transport in proximale tubules  
*Am. J. Physiol.* 250:F953-62
- [16] Lee, M.P., Hu, R., Johnson, L.A., Feinberg, A.P. (1997)  
Human KVLQT1 gene shows tissue-specific imprinting and encompasses Beckwith-Wiedemann syndrome chromosomal rearrangements  
*Nat. Genet.* 15: 181-185

- [17] Lee, M.P., Ravenel, J.D., Hu, R., Lustig, L.R., Tomaselli, G., Berger, R.D., Brandenburg, S.A., Litzi, T.J., Bunton, T.E., Limb, C., Francis, H., Gorelikow, M., Gu, H., Washington, K., Argani, P., Goldenring, J.R., Coffey, R.J., Feinberg, A.P. (2000)  
Targeted disruption of the KVLQT1 gene causes deafness and gastric hyperplasia in mice  
*J. Clin. Invest.* Vol. 106 Number 12, 1447-1455
- [18] Lerche, C., Seebohm, G., Wagner, C. I., Scherer, C.R., Dehmelt, L., Abitbol, I., Gerlach, U., Brendel, J., Attali, B., Busch, A.E. (2000)  
Molecular impact of Mink on the enantiospecific block of I<sub>ks</sub> by chromanols  
*Brit. J. Pharmacol.* 131: 1503-1506
- [19] Lesage, F., Attali, B., Lakey, J., Honore, E., Romey, G., Faurobert, E., Lazdunski, M., Barhanin, J. (1993)  
Are Xenopus oocytes unique in displaying functional I<sub>sk</sub> channel heterologous expression?  
*Receptors Channels* 1: 143-152, 1993
- [20] Loussouarn, G., Charpentier, F., Mohammad-Panah, R., Kunzelmann, K., Baro, I., Escande, D. (1997)  
KvLQT1 Potassium Channel but not I<sub>sk</sub> is the molecular target for trans-6-Cyano-4-(N-ethylsulfonyl-N-methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-chromane  
*Mol. Pharmacol.* 52:1131-1136
- [21] Messner, G., Oberleithner, H., Lang, F., [1985)  
The effect of phenylallalanin on the electrical properties of proximale tubule cells in the frog kidney  
*Pflugers Arch.* 404:138-44
- [22] Mori, N., Sagakimi, M., Fukazawa, F., Matsunaga, T., (1993)  
An immunohistochemical and electrophysiological study on I<sub>sk</sub> protein in the stria vascularis of the guinea pig  
*Eur. Arch. Otorhinolaringol.* 250: 186-189
- [23] Neyroud, N., Tesson, F., Denjoy, I., Leibovici, M., Donger, C., Barhanin, J., Faure, S., Gary F., Coumel, P., Petit, C., Schwartz, K., Guicheney, P. (1997)  
A novel mutation in the potassium channel gene KVLQT causes the Jervell and Lange-Nielsen cardioauditory syndrome.  
*Nat Genet* 15:186-9

- [24] Philipson, L.H., Miller, R.J. (1992)  
A small K<sup>+</sup> channel looms large  
*Trends pharmacol. scien.* 13 : 8-11
- [25] Priori, S. G., Barhanin, J., Hauer, R.N., Haverkamp, W., Jongsma, H.J., Kleber, A.G., McKenna, W.J., Roden, D.M., Schwartz, K., Schwartz, P.J., Towbin, L.A., Wilde, A.M. (1999)  
Genetic and molecular basis of cardiac arrhythmias: impact on clinical management part I and II  
*Circulation* 99:518-528
- [26] Rehwald, W., Messner, G., Lang, F. (1986)  
Influence of barium on the effects of phenylalanine in proximal tubules  
*Pflugers Arch.* 406:574-7
- [27] Sanguinetti, M.C., Curran, M. E., Zou, A., Shen, J., Spector, P.S., Atkinson, D.L., Keating, M. (1996)  
Coassembly of K(V)LQT1 and minK (IsK) proteins to form cardiac I(Ks) potassium channel  
*Nature* 384: 80-3
- [28] Schroeder, B.C., Waldegger, S., Fehr, S., Bleich, M., Warth, R., Greger, R., Jentsch, T.J. (2000)  
A constitutively open potassium channel formed by KCNQ1 and KCNE3  
*Nature* 403: 196-199
- [29] Suessbrich, H., Busch, A.E. (1999)  
The I<sub>Ks</sub> channel: coassembly of IsK(minK) and KVLQT1 proteins  
*Rev Physiol Biochem Pharmacol* 137: 191-226
- [30] Sugimoto, T., Tanabe, Y., Shigemoto, R., Iwai, M., Takumi, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S., (1990)  
Immunohistochemical study of a rat membrane protein which induces a selective potassium permeation: its localization in the apical membrane portion of epithelial cells  
*J. Membr. Biol.* 113 : 39-47
- [31] Takumi, T., Ohkubo, H., Nakanishi, S. (1988)  
Cloning of a membrane protein that induces a slow voltage-gated potassium current  
*Science* 242: 1042-1045

- 
- [32] Tristani-Firouzi, M., Sanguinetti, M.C. (1998)  
Voltage-dependent inactivation of the human K<sup>+</sup> channel KVLQT1 is eliminated by association with minimal K<sup>+</sup> channel (minK) subunits  
*J. Physiol.* 510: 37-45
- [33] Tsukahara Y., Houtani, T., Ueyama, T., Ikeda, M. Nakanishi, S., Yamamoto, A., Tashiro, Y., Sugimoto, T. (1995)  
A subpopulation of large ganglion neurons express IsK protein mRNA: an in situ hybridization analysis in the rat eye  
*Mol. Brain Res.* 29: 376-380
- [34] Vallon, V., Grahmmer F., Richter K., Bleich, M., Lang, F., Barhanin, J., Volkl, H., Warth, R. (2001)  
Role of KCNE1 – dependent K<sup>+</sup> fluxes in mouse proximal tubule  
*J Am Soc Nephrol* 12(10): 2003-11
- [35] Vallon, V., Huang, D. Y., Gerlach, U., Richter, K. (2003)  
HMR 1556, a blocker of potassium channel forming KCNQ1, inhibits glucose absorption in proximal tubule  
*NSAP Suppl.* 1, 367: A418
- [36] Warth, R., Barhanin, J. (2002)  
The multifaceted phenotype of the knockout mouse for the KCNE1 potassium channel gene  
*Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 282:R639-R648, 2002

## **7. Anhang**

### **7.1 Material**

#### **7.1.1 Verbrauchsmaterialien**

- männliche Sprague-Dawley-Ratten: Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland
- Macrodex® Standardkäfig: Fa. Ehret, Freiburg, Deutschland
- Standard-Nagerfutter (Altromin 1320, 4% NaCl): Fa. Altromin, Lage, Deutschland
- Operationstisch: Fa. Effenberger, Pfaffing, Deutschland
- Temperatursonde ( 220 V, 50 Hz, 6.6 VA): Goedecke Forschung und Entwicklung, Freiburg, Deutschland
- Operationsinstrumente: Fa. Aeskulap, Tuttlingen, Deutschland
- Mikroskop (Wild M3C, 6,4 – 40x Vergrößerung, Okular: 10x/21B): Heerbrugg, Deutschland
- Lichtquelle (KL 1500 electronic): Fa. Schott, Deutschland
- Blutdruck- und Pulsmessgerät: Fa. Hellige
- Blutdruckeichgerät: Fa. C. F. Palmer, London, Großbritannien
- Infusionspumpen (Perfusor® Secura): Fa. Braun-Melsungen, Deutschland
- Tracheostoma (Polyethylen-Schlauch, Innendurchmesser: 1,57 mm; Außendurchmesser: 2,08 mm): Fa. Labomedic, Deutschland
- V. jugularis interna-, A. femoralis-Katheter bzw. Blasenkatheter (Polyethylenschlauch, Innendurchmesser : 0,58mm ; Außendurchmesser : 0,96 mm) : Fa. Labomedic, Deutschland
- Ligatur-Faden (Perma-Hand 4-0): S. M. I., Hünningen, Belgien
- Zellstoff (apura extra soft): Apura GmbH, Mainz-Kostheim, Deutschland
- Paraffinöl: Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- Heparinspritze ( 1ml Einmalspritze): Fa. Braun-Melsungen, Deutschland

- Glaskapillaren (Mikrohämatokritröhrchen): Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
- Hämatokrit-Versiegelungskit: Fa. Brand, Wertheim, Deutschland
- Zentrifuge ( 0-15x 1000 U/min, Mikro 12-24) Hettrich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland
- Eppendorf-Vial, Safe-Lock 1,5 ml und 2,0 ml: Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- Flammenphotometer (Acetylen, ELEX 6361): Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- <sup>3</sup>H-Meßgefäße (Midi-Vial): Fa. Packard, Niederlande
- β-Counter (2550 TR): Fa. Packard, Niederlande
- Photometer (Spektralphotometer): Fa. Hitachi, Modell U-3000

### 7.1.2 Chemikalien

- Inactin® (Thiobutabarbital, 100 mg/kg, gelöst in 0,85% NaCl, 100 mg/ml): Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland

Infusionslösungen:

- NaCl-Lösung (0,85%): Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- HMR 1556: Fa. Aventis
- DMSO: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Polyethylenglycol 400: Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
- Heparinlösung (zur Spülung des A. femoralis-Katheters; 10 ml Heparin-Natrium Braun, „Multi“ 10 000 IE/ml): Fa. Braun-Melsungen, Deutschland

Für die Bestimmung der <sup>3</sup>H-Aktivität:

- Inulinlösung ( <sup>3</sup>H-Inulin, 2,25 µCi/ml NaCl): Fa. Biotrend, Köln, Deutschland
- Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold), Fa. Packard, Niederlande



Für die flammenphotometrischen Messungen:

- Netzmittellösungen (1:200-Verdünnung der Stammlösung): Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
- Lithiumlösung (1:200-Verdünnung der Stammlösung): Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
- Serum-Standard-Lösung: Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland
- Urin-Standard-Lösung: Eppendorf-Netheler-Hinz-GmbH, Hamburg, Deutschland

Für die Glucosebestimmung:

- Glukose-Reagenz (INFINITY™ - Glucose-Reagenz; 17-25): Sigma Diagnostics, Deisenhofen, Deutschland

## 7.2 Tabellen

### 7.2.1 Absolute Mittelwerte aus den Clearance-Experimenten

Nachfolgend werden die absoluten Mittelwerte der Parameter, die in den Clearance-Experimenten gemessen wurden, angegeben.

Die Tabellen 7.2.1, 7.2.2 und 7.2.3 geben die Parameter wieder, die in den Perioden 1 und 2 gemessen wurde.

Tabelle 7.2.1: **Absolute Mittelwerte aus den Clearance-Experimenten der Vehikelgruppe und der Gruppe 0,003 mg/kg HMR 1556.** \* $p < 0,05$  (Periode 2 vs. Periode 1) innerhalb der Gruppe.

	Einheit	Basal	Vehikel	Basal	0,003 mg/kg
n		11		10	
Gewicht	g	300 ± 5		287 ± 7	
MAP	mmHg	107 ± 4	108 ± 4	104 ± 3	103 ± 4
HF	1/min	395 ± 10	391 ± 11	374 ± 5	367 ± 5
HK	%	44 ± 0,5	44 ± 0,5	44 ± 0,7	43 ± 0,8 *
UV	µl/min	37 ± 10	41 ± 8	31 ± 6	34 ± 7
UV	µl/min/100 g	12,6 ± 3,3	13,8 ± 2,6	10,7 ± 2,3	11,8 ± 2,5
FA U	%	1,25 ± 0,31	1,36 ± 0,24	1,23 ± 0,22	1,35 ± 0,22
GFR	ml/min	2,89 ± 0,11	2,97 ± 0,12	2,44 ± 0,19	2,45 ± 0,17
GFR	ml/min/100g	0,96 ± 0,04	0,99 ± 0,04	0,84 ± 0,04	0,84 ± 0,05
Na Plasma	mmol/l	143 ± 2	144 ± 2	136 ± 1	136 ± 1
U NA	µmol/min	1,29 ± 0,51	3,03 ± 0,87	0,96 ± 0,55	2,39 ± 1,02
U Na	µmol/min/100g	0,44 ± 0,17	1,04 ± 0,30	0,35 ± 0,20	0,85 ± 0,37
FA NA	%	0,31 ± 0,12	0,71 ± 0,21	0,27 ± 0,15	0,64 ± 0,23
K Plasma	mmol/l	3,82 ± 0,13	3,50 ± 0,10 *	4,36 ± 0,15	4,00 ± 0,15
U K	µmol/min	4,06 ± 0,32	4,17 ± 0,26	3,88 ± 0,29	4,09 ± 0,26
U K	µmol/min/100g	1,36 ± 0,12	1,40 ± 0,10	1,34 ± 0,10	1,41 ± 0,08
FA K	%	37 ± 3	41 ± 2	37 ± 2	44 ± 3
Cl Plasma	mmol/l	102 ± 2	104 ± 1	104 ± 1	103 ± 1
U CL	µmol/min	4,18 ± 0,66	5,28 ± 0,70	4,21 ± 0,69	5,28 ± 0,90
U Cl	µmol/min/100g	1,47 ± 0,23	1,77 ± 0,25	1,46 ± 0,26	1,84 ± 0,33
FA CL	%	1,44 ± 0,22	1,75 ± 0,24	1,57 ± 0,24	1,93 ± 0,30
Gluc. Plasm	mmol/l	7,24 ± 0,18	6,53 ± 0,16 *	6,58 ± 0,15	6,10 ± 0,14 *
U GLUC	µmol/min	0,0377 ± 0,0039	0,0408 ± 0,0036	0,0295 ± 0,0022	0,0309 ± 0,0030
U Gluc.	µmol/min/100g	0,0127 ± 0,0014	0,0137 ± 0,0014	0,0102 ± 0,0008	0,0106 ± 0,0009
FA GLUC	%	0,1806 ± 0,1660	0,2128 ± 0,0169 *	0,1850 ± 0,0106	0,2077 ± 0,0109

Tabelle 7.2.2: **Absolute Mittelwerte aus den Clearance-Experimenten der Gruppen 0,03 mg/kg und 0,3 mg/kg HMR 1556.** \*p<0,05 (Periode 2 vs. Periode 1) innerhalb der Gruppe.

	Einheit	Basal	0,03 mg/kg	Basal	0,3 mg/kg
n		10		10	
Gewicht	g	296 ± 4		281 ± 3	
MAP	mmHg	105 ± 4	103 ± 4	97 ± 5	96 ± 5
HF	1/min	380 ± 8	369 ± 7	374 ± 9	368 ± 9
HK	%	45 ± 0,7	44 ± 0,8	45 ± 0,3	44 ± 0,2 *
UV	µl/min	30 ± 7	42 ± 9 *	22 ± 5	44 ± 7 *
UV	µl/min/100 g	10,7 ± 2,6	14,9 ± 3,0 *	7,5 ± 1,6	14,9 ± 2,6 *
FA U	%	1,25 ± 0,27	1,72 ± 0,32 *	0,79 ± 0,15	1,56 ± 0,24 *
GFR	ml/min	2,32 ± 0,18	2,41 ± 0,15	2,71 ± 0,11	2,78 ± 0,10
GFR	ml/min/100g	0,82 ± 0,06	0,86 ± 0,05	0,92 ± 0,03	0,94 ± 0,03
Na Plasma	mmol/l	145 ± 1	145 ± 2	144 ± 2	145 ± 2
U Na	µmol/min	1,81 ± 0,73	3,6 ± 1,16 *	0,62 ± 0,28	3,15 ± 1,10
U Na	µmol/min/100g	0,64 ± 0,26	1,27 ± 0,41 *	0,22 ± 0,10	1,09 ± 0,39
FA Na	%	0,50 ± 0,20	1,01 ± 0,34 *	0,15 ± 0,07	0,76 ± 0,26
K Plasma	mmol/l	4,07 ± 0,28	3,69 ± 0,28 *	4,16 ± 0,18	3,64 ± 0,15 *
U K	µmol/min	3,83 ± 0,32	4,32 ± 0,41	4,38 ± 0,31	4,53 ± 0,55
U K	µmol/min/100g	1,35 ±	1,54 ± 0,14	1,48 ± 0,11	1,52 ± 0,18
FA K	%	43 ± 4	51 ± 4	40 ± 3	46 ± 5
Cl Plasma	mmol/l	102 ± 1	101 ± 1	106 ± 0,4	105 ± 0,6 *
U Cl	µmol/min	5,03 ± 0,79	6,68 ± 1,02 *	3,76 ± 0,41	6,25 ± 1,00 *
U Cl	µmol/min/100g	1,78 ± 0,28	2,37 ± 0,36 *	1,29 ± 0,15	2,14 ± 0,36 *
FA Cl	%	2,06 ± 0,30	2,67 ± 0,40 *	1,29 ± 0,14	2,14 ± 0,33 *
Gluc. Plasm	mmol/l	6,71 ± 0,16	6,23 ± 0,18 *	6,39 ± 0,24	5,67 ± 0,22 *
U GLUC	µmol/min	0,0321 ± 0,0035	0,0327 ± 0,0027	0,0304 ± 0,0036	0,0421 ± 0,0046 *
U Gluc.	µmol/min/100g	0,0114 ± 0,0012	0,0116 ± 0,0009	0,0103 ± 0,0012	0,0142 ± 0,0016 *
FA GLUC	%	0,2112 ± 0,0204	0,2247 ± 0,0197	0,1746 ± 0,0174	0,2688 ± 0,0279 *

Tabelle 7.2.3: **Absolute Mittelwerte aus den Clearance-Experimenten der Gruppe 3 mg/kg HMR 1556.** \* $p < 0,05$  (Periode 2 vs. Periode 1) innerhalb der Gruppe.

	Einheit	Basal	3 mg/kg
n		10	
Gewicht	g	290 ± 6	
MAP	mmHg	98 ± 5	97 ± 5
HF	l/min	353 ± 13	344 ± 10
HK	%	44 ± 0,4	44 ± 0,2
UV	µl/min	32 ± 8	51 ± 8 *
UV	µl/min/100 g	11,2 ± 2,7	17,9 ± 3,0 *
FA U	%	1,26 ± 0,32	1,87 ± 0,29 *
GFR	ml/min	2,62 ± 0,17	2,69 ± 0,17
GFR	ml/min/100g	0,91 ± 0,05	0,93 ± 0,05
Na Plasma	mmol/l	145 ± 2	147 ± 3
U NA	µmol/min	1,16 ± 0,33	4,36 ± 0,96 *
U Na	µmol/min/100g	0,41 ± 0,12	1,51 ± 0,33 *
FA NA	%	0,31 ± 0,09	1,04 ± 0,23 *
K Plasma	mmol/l	3,91 ± 0,25	3,64 ± 0,18
U K	µmol/min	4,5 ± 0,33	4,51 ± 0,29
U K	µmol/min/100g	1,56 ± 0,10	1,57 ± 0,09
FA K	%	45 ± 2	47 ± 2
Cl Plasma	mmol/l	106 ± 1,1	104 ± 1,1
U CL	µmol/min	4,58 ± 0,62	6,99 ± 0,98 *
U Cl	µmol/min/100g	1,62 ± 0,23	2,53 ± 0,36 *
FA CL	%	1,71 ± 0,23	2,56 ± 0,33 *
Gluc. Plasm	mmol/l	6,69 ± 0,18	5,96 ± 0,21 *
U GLUC	µmol/min	0,0398 ± 0,0049	0,0431 ± 0,0064
U Gluc.	µmol/min/100g	0,0137 ± 0,0015	0,0148 ± 0,0020
FA GLUC	%	0,2224 ± 0,0160	0,2629 ± 0,0266

### 7.3 Glossar

ATP	Adenosintriphosphat
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
Chromanol 293 B	K <sup>+</sup> -Kanal-Blocker
Cl <sup>-</sup>	Chlorid
[Cl <sup>-</sup> ] Plasma	Chloridkonzentration im Plasma
[Cl <sup>-</sup> ] Urin	Chloridkonzentration im Urin
DMSO	Dimethylsulfoxid
FA <sub>Cl</sub>	Fraktionelle Chloridausscheidung
FA <sub>F</sub>	Fraktionelle Flüssigkeitsausscheidung
FA <sub>Gluc</sub>	Fraktionelle Glukoseausscheidung
FA <sub>Na<sup>+</sup></sub>	Fraktionelle Natriumausscheidung
FA <sub>K<sup>+</sup></sub>	Fraktionelle Kaliumausscheidung
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
[Gluc] Plasma	Glucosekonzentration im Plasma
[Gluc] Urin	Glucosekonzentration im Urin
HF	Herzfrequenz
Hk	Hämatokrit
HMR 1556	K <sup>+</sup> -Kanal-Blocker
<sup>3</sup> H-Plasma	<sup>3</sup> H-Aktivität im Plasma
<sup>3</sup> H-Urin	<sup>3</sup> H-Aktivität im Urin
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Iks – Kanäle	K <sup>+</sup> -Kanal
K <sup>+</sup>	Kalium
[K <sup>+</sup> ] Plasma	Kaliumkonzentration im Plasma
[K <sup>+</sup> ] Urin	Kaliumkonzentration im Urin
KVLQT1	K <sup>+</sup> -Kanal-Untereinheit
LQTS	Long-QT-Syndrom
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck

---

m – RNA	messenger Ribonukleinsäure
mink	K <sup>+</sup> -Kanal -Untereinheit
n	Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium
[Na <sup>+</sup> ] Plasma	Natriumkonzentration im Plasma
[Na <sup>+</sup> ] Urin	Natriumkonzentration im Urin
PEG	Polyethylenglycol
P <sub>Dia</sub>	Diastolischer Blutdruck
P <sub>Sys</sub>	Systolischer Blutdruck
RNA	Ribonukleinsäure
SEM	Standardfehler
UV	Urinvolumen
U <sub>Cl-</sub>	Chloridausscheidung
U <sub>Gluc</sub>	Glukoseausscheidung
U <sub>Vol</sub>	Urinvolumen
U <sub>K+</sub>	Kaliumausscheidung
U <sub>Na+</sub>	Natriumausscheidung
UZV	Urinzeitvolumen

Die physikalischen Einheiten bzw. deren Abkürzungen sind diejenigen des Système International (SI).

Einzige Ausnahme: Als Einheit für Druck wurden Millimeter Quecksilber (mmHg) statt Pascal (Pa) verwendet. Die anatomischen Beziehungen entsprechen denen der Pariser Nomina Anatomica (PNA).

## **Danksagung**

Für die Mithilfe bei der Erstellung dieser Arbeit danke ich allen, die mich unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gilt:

Meinen Eltern - die mir das Medizinstudium ermöglicht haben.

Herrn Professor Dr. H. Oßwald - für ein freies Arbeiten in professioneller Umgebung.

Herrn Privatdozent Dr. V. Vallon - für das interessante Thema, die Unterstützung und die anregenden Diskussionen während der gesamten Arbeit, sowie die Hilfe bei der Erstellung dieser Arbeit.

Frau K. Richter - für die Einarbeitung in die Methodik und die Unterstützung bei Problemen.

Frau S. Redling - für zahlreiche Aufmunterungen über die gesamte Zeit.

Herrn Dipl. Ing. F. Bachmair - für die tatkräftige Unterstützung bei Computerproblemen und beim Korrekturlesen.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Kathrin Pangidis  
geb. am 21. Mai 1976 in Tübingen

## Schule

1982 – 1986 Grundschule Winkelwiese in Tübingen  
1986 – 1995 Gymnasium der Geschwister-Scholl-Schule in Tübingen, Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/1995 – 03/1996 Freiwilliges Soziales Jahr, Chirurgische Universitätsklinik Tübingen

## Studium

SS 1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
03/1998 Physikum  
03/1999 1. Staatsexamen  
03/2002 2. Staatsexamen  
05/2003 3. Staatsexamen (13.05.2003)

## Famulaturen

07/98 – 08/98 Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe, Kreiskrankenhaus Reutlingen  
08/99 – 09/99 Abteilungen Chirurgie, Gynäkologie und Geburtshilfe, Iloilo Mission Hospital, Iloilo City, Philippinen  
02/01 – 03/01 Abteilung für Anästhesiologie der BG-Unfallklinik Tübingen  
07/01 – 08/01 Internistische Praxis Dr. med. Ch. Bothge, München

## Doktorarbeit

seit 2001 „Wirkung des K<sup>+</sup>-Kanalblockers HMR 1556 auf die Nierenfunktion bei Ratten“, Pharmakologisches Institut der Universität Tübingen

## Praktisches Jahr

04/02 - 08/02 Abteilung für Innere Medizin, Paracelsus-Krankenhaus Ruit  
08/02 - 12/02 Abteilung für Chirurgie, Kantonsspital Frauenfeld, Schweiz  
12/02 - 03/03 Abteilung für Anästhesiologie, Paracelsus-Krankenhaus Ruit

## Berufliche Tätigkeit

seit 06/2003 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Anästhesie und Intensivmedizin, Donau-Ries-Klinik Donauwörth