Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie
Abteilungsleiter: Professor Dr. H. Oßwald

Das dopaminerge System bei diabetischen Ratten unter Normal-, Hoch- und Niedrigsalzernährung

INAUGURAL – DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
Der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
BERIT ANGELA SONJA HALSIG
aus Ravensburg

2006

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. G. Luippold
2. Berichterstatter: Professor Dr. B. Brehm

1 EINLEITUNG 4

1.1 GEGENSTAND DER ARBEIT 4
1.2 BISHERIGER KENNTNISSTAND 4
1.2.1 AUFBAU UND FUNKTIONEN DER NIERE 4
1.2.2 RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERON-SYSTEM 5
1.2.3 RENALE HÄMODYNAMIK 6
1.2.4 DOPAMIN 8
1.2.4.1 Aufbau und Biosynthese 8
1.2.4.2 Dopamin im zentralen Nervensystem 8
1.2.4.3 Dopamin in der Niere 9
1.2.4.4 Dopaminrezeptoren 11
1.2.4.5 Einfluss von exogenem Dopamin 13
1.2.5 DIABETES MELLITUS 14
1.2.5.1 Ätiologie, Pathophysiologie und Klinik 14
1.2.5.2 Morphologische und funktionelle Veränderungen der Niere 15
1.2.5.3 Diabetische Hyperfiltration 16
1.3 EIGENE FRAGESTELLUNG 18

2 MATERIAL UND METHODEN 20

2.1 VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN 20
2.2 VERSUCHSGRUPPEN UND EXPERIMENTELLER ABLAUF 20
2.2.1 VERSUCHSGRUPPEN 20
2.2.2 EXPERIMENTELLER ABLAUF 21
2.2.2.1 Induktion des Diabetes mellitus 21
2.2.2.2 Blutdruckmessung an wachen Ratten 21
2.2.2.3 Stoffwechselkäfigversuche 22
2.2.2.4 Clearanceversuche 24
2.2.2.5 Nierenentnahme 26
2.2.3 ANALYTIK 27
2.2.3.1 Stoffwechselkäfigversuche 27

2.2.3.2 Clearanceversuche 30
2.2.3.3 Dopaminbestimmung im Nierengewebe 31
2.2.3.4 Reninbestimmung im Plasma 32
2.3 BERECHNUNGEN 32
2.3.1 MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK: 32
2.3.2 GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE 33
2.3.3 FRAKTIONELLE NATRIUMAUSSCHEIDUNG (FE_{NA}) 33
2.3.4 ELEKTROLYTAUSSCHEIDUNG IM URIN 33
2.3.5 DOPAMINAUSSCHEIDUNG IM URIN 33
2.3.6 GLUCOSEAUSSCHEIDUNG IM URIN 34
2.4 STATISTIK 34

3 ERGEBNISSE 35

3.1 TIERGEWICHT, BLUTGLUCOSE UND SYSTOLISCHER BLUTDRUCK 35
3.1.1 TIERGEWICHT 35
3.1.2 BLUTGLUCOSE 36
3.1.3 BLUTDRUCKMESSUNGEN AN WACHEN RATTEN 37
3.2 STOFFWECHSELKÄFIGVERSUCHE AN WACHEN RATTEN 38
3.2.1 SWK I 38
3.2.1.1 Physiologische Parameter 39
3.2.1.2 Ausscheidungsparameter 40
3.2.2 SWK II 43
3.2.2.1 Physiologische Parameter 44
3.2.2.2 Ausscheidungsparameter 47
3.2.3 CLEARANCEVERSUCHE AN NARKOTISIERTEN RATTEN 50
3.2.3.1 Systemische Parameter 50
3.2.3.2 Renale Hämodynamik 51
3.2.3.3 Ausscheidungsparameter 52
3.2.4 DOPAMINGEHALT IM NIERENGEWEBE 54
3.2.5 RENIN IM PLASMA 54

4 DISKUSSION 61

4.1 MODELL DES DIABETES MELLITUS 61
4.2 DIABETISCHE HYPERFILTRATION UND DOPAMIN 62
4.3 DOPAMIN UND SALZDIÄT 67
4.4 RENIN - ANGIOTENSIN - ALDOSTERON - SYSTEM 70
4.5 ZUSAMMENFASSUNG 73

1 Einleitung

1.1 Gegenstand der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit wurde die Dopaminausscheidung im Urin und der Dopamingehalt der Nieren bei diabetischen Tieren im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren untersucht. Die aufgrund der modifizierten Pathophysiologie beim Diabetes mellitus resultierende glomeruläre Hyperfiltration wurde mit der aus der Literatur bekannten Induktion einer Hyperfiltration nach Dopamin-Rezeptor-Stimulation - in Bezug auf eine mögliche Reduktion der diabetischen Hyperfiltration durch Dopaminantagonisten - in Verbindung gebracht. Zusätzlich wurden die Auswirkungen unterschiedlichen Salzgehaltes der Nahrung auf das dopaminerge System und die diabetische Hyperfiltration untersucht.
Als Modell des Diabetes mellitus wurden mit Streptozotocin behandelte Sprague-Dawley-Ratten verwendet, welche eine Hyperglycämie mit entsprechender diabetischer Stoffwechsellage entwickelten.

1.2 Bisheriger Kenntnisstand

1.2.1 Aufbau und Funktionen der Niere

Die kleinste funktionelle Einheit der Niere ist das Nephron. Die menschliche Niere enthält ca. 1,2 Millionen solcher Nephrone. Das Nephron besteht aus einem Glomerulum mit einer Bowman-Kapsel, einem proximalen Tubulus, einer Henle-Schleife und einem distalen Tubulus, welcher in das Sammelrohr mündet. Das zum Glomerulum führende Gefäß wird als Vas afferens bezeichnet, in dem ein Teil des Blutes als Primärfiltrat in die Bowman-Kapsel filtriert wird, während der unfiltrierte Anteil des Blutes das Glomerulum über das Vas efferens verlässt. Dieses zweigt sich in Kapillaren auf, welche die Tubuli als

peritubuläres Netzwerk umgeben. Dieses komplexe System bildet ein Gegenstromprinzip, welches die Voraussetzung für die Konzentrierungsleistung der Niere darstellt.

Die Niere ist vor allem ein Ausscheidungsorgan. Daraus ergeben sich folgende zentrale Nierenfunktionen, wie die regulierte Elimination von Abbauprodukten, insbesondere der Stickstoffendprodukte Harnstoff, Harnsäure und Kreatinin. Zur Regulation des Säure-Basen-Haushaltes kann die Niere durch variierende Resorption, bzw. Sekretion von Bicarbonat, H^+-Ionen und NH_4-Ionen beitragen. Insgesamt werden 99% des Primärharns im Tubulus rückresorbiert, wobei die Hauptresorption (unter anderem Glucose/Na^+ im sekundär-aktiven Cotransport) im proximalen Tubulus stattfindet.
Zusätzlich ist die Niere an der Regulation von Blutdruck und Blutvolumen beteiligt, indem sie auf eine unzureichende Nierendurchblutung mit einer Steigerung der Renin-Produktion (in den Epitheloidzellen des juxtaglomerulären Apparates) und -Abgabe reagieren kann. Diese Funktion ist eng mit der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes über das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (siehe unten) verknüpft. Als endokrines Organ spielt die Niere durch die Produktion von Erythropoietin (EPO) eine zentrale Rolle in der Regulation der Erythrozyten– und Hämoglobinkonzentration. Darüber hinaus wird in der Niere im Rahmen des Vitamin-D-Stoffwechsels die Endstufe des wirksamen Vitamin-D-Hormons, das 1,25-Dihydroxy-Cholecalciferol gebildet. Gesteuert werden die Funktionen der Niere über unterschiedliche humorale Faktoren sowie über die renalen Nerven.

1.2.2 Renin-Angiotensin-Aldosteron-System

Die Henle-Schleife besteht aus dünnen und dicken Abschnitten. Der aufsteigende dicke Ast läuft zum Glomerulum desselben Nephrons zurück und bildet dort eine Zone sehr engen Kontaktes mit dem Gefäßpol

(juxtaglomerulärer Apparat). Dieser ist der Ort wichtiger Rückkopplungen vom distalen Tubulus zum Glomerulum. Das Tubulusepithel verändert sich in diesem Bezirk zur Macula densa, charakterisiert durch besonders kernreiche und hohe Zellen. In der Kontaktzone zu diesen Zellen sind Zellen der Media des Vas afferens zu epitheloiden Zellen modifiziert, die auf die Produktion von Renin spezialisiert sind. Renin ist ein Enzym, das im Blut die Umwandlung von Angiotensinogen in Angiotensin I fördert. Angiotensin I wird schließlich zu Angiotensin II metabolisiert (vorwiegend in der Lunge). Dieses gehört zu den potentesten Vasokonstriktoren und führt über eine Widerstandszunahme (bevorzugter Effekt auf die efferente Arteriole der Niere) [Kalinyak et al. 1993] zum Blutdruckanstieg, es löst zentralnervös Durst und Salzappetit aus und stimuliert die Bildung und Ausschüttung von Aldosteron aus der Nebenniere. Dieses wiederum steigert in der Niere die Natriumrückresorption und damit das Flüssigkeitsvolumen.
Vermittelt werden die Funktionen des Angiotensin II über AT II- Rezeptoren (dazu gehören AT_1-, AT_2- und AT_4-Rezeptoren). Diese werden an der basolateralen Membran und am Bürstensaum exprimiert, wobei die AT_1-Rezeptoren, stimuliert durch Angiotensin II die Salzresorptionsrate ansteigen lassen und die AT_2- und AT_4-Rezeptoren diese vermindern [Jose et al. 2003].

1.2.3 Renale Hämodynamik

Durchschnittlich werden beim Menschen 125 ml Primärharn pro Minute von beiden Nieren zusammen abfiltriert. Diese Größe, die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) kann mit Hilfe einer Indikatorsubstanz bestimmt werden. Diese muss frei filtrierbar sein und darf im späteren Verlauf des Nierentubulus weder resorbiert noch sezerniert werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Substanz mit diesen Eigenschaften war Inulin. Die GFR wiederum ist abhängig von der hohen Wasserdurchlässigkeit (hydraulische Leitfähigkeit) des Filters, von der Filterfläche und von dem effektiven Filtrationsdruck [Jensen

et al., 1981]. Dieser errechnet sich aus dem Blutdruck in der Glomerulumkapillare, dem Druck in der Bowman-Kapsel und dem onkotischen Druck in der Kapillare, der durch die Plasmaproteine verursacht wird. Über den Gefäßwiderstand des Vas afferens und vor allem des Vas efferens wird der intraglomeruläre Druck und damit die GFR moduliert. Wichtige physiologische Mechanismen zur Konstanthaltung der GFR und des renalen Blutflusses (RBF) sind das druckpassive Dehnungsverhalten und die myogene Antwort der Nierengefäße, insbesondere der Arteriae interlobulares und der Vasa afferentia, auf systemische Blutdruckänderungen. Zudem wird in der Macula densa ein veränderter Volumenfluss und dessen Chloridkonzentration registriert und je nach Konzentration die Renin - Sekretion, der präglomeruläre Gefäßwiderstand und der glomeruläre Druck verändert [Moore et al., 1991]. Erhöhung der Cl^--Konzentration im distalen Tubulus beispielsweise führt reflektorisch über die Macula densa zum Abfall der GFR. Dieser Regulationsmechanismus, als tubulo-glomerulärer Feedback (TGF) bezeichnet, ist wichtig um die Filtrationsleistung jedes einzelnen Nephrons den tubulären Veränderungen anzupassen.

Durch krankheitsbedingte Störungen der renalen Regulation des Wasser- und Salzhaushaltes kann es zu einem erhöhten Filtrationsdruck kommen, der zu einem Verlust von Glomeruli führen kann. Um die Filtrationsleistung trotzdem konstant zu erhalten, muss die GFR der übrigen noch funktionsfähigen Glomeruli erhöht werden, was diese zusätzlich stärker belastet. Dieser Mechanismus kann, beispielsweise bei der diabetischen Nephropathie zum Funktionsverlust der Niere führen.

1.2.4 Dopamin

1.2.4.1 Aufbau und Biosynthese

Dopamin als biogenes Amin, zugehörig zur Gruppe der Katecholamine, Vorläufer des Noradrenalins und des Adrenalins, wird aus der essentiellen Aminosäure L-Phenylalanin in der Leber durch die Phenylalaninhydroxylase zu L-Tyrosin und durch Oxidierung des Tyrosins zum Dihydroxyphenylalanin (= L-Dopa) und anschließender Decarboxylierung gebildet. Die an der Biosynthese beteiligten Enzyme sind die Tyrosin-Hydroxylase, welche den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der Biosynthese darstellt [Zigmond et al., 1989], die DOPA-Decarboxylase (AADC = aromatic L-amino acid decarboxylase) und die DOPA-Hydroxylase, welche Dopamin zu Noradrenalin umsetzt. Dopamin sowie Noradrenalin werden per Catechol-O-Methyl-Transferase (COMT) umgesetzt und in die präsynaptischen Nervenendigungen wiederaufgenommen, bzw. per Monoamin-Oxidase (MAO) katabolisiert.
Als Stoffwechselendprodukt entsteht die Homovanillinmandelsäure (3-Methoxy-4-Hydroxy-Mandelsäure-Aldehyd), welche durch ihren hydrophilen Charakter mit dem Urin ausgeschieden werden kann [Kopin, 1972].

1.2.4.2 Dopamin im zentralen Nervensystem

Lange Zeit beschäftigte sich die Forschung ausschließlich mit Dopamin als Neurotransmitter und Hormon im Gehirn. Dort spielt es durch Vermittlung über die verschiedenen Rezeptorsubtypen vor allem im limbischen, extrapyramidal-motorischen System und bei der Synthese und Sekretion einiger Hormone eine große Rolle. Bei dort lokalisierten dopaminergen Störungen entstehen Erkrankungen wie Morbus Parkinson, Lesch-Nyhan-Syndrom, Hyperprolaktinämie und Erkrankungen des schizoiden Formenkreises.
Syntheseorte sind dopaminerge und noradrenerge Neurone des ZNS [Ganong, 1991] und des autonomen Nervensystems, in welchen sich das für die

Biosynthese des Dopamins entscheidende Enzym, die DOPA-Decarboxylase befindet.

1.2.4.3 Dopamin in der Niere

Ursprünglich wurde angenommen, daß Dopamin nur durch Filtration aus dem Plasma im Urin erscheint. Diese Aussage ließ sich jedoch nicht verifizieren, da die Dopaminkonzentration im Urin höher war in Relation zu der im Plasma zirkulierenden Dopaminmenge [Da Prada und Zürcher, 1976; Ziegler et al., 1989].

Die These, dass gebundenes (sulfatiertes oder glucuronidiertes) Dopamin aus peripheren sympathischen Strukturen, wie beispielsweise dem Nebennierenmark, durch Enzyme in der Niere dekonjugiert und im Urin freigesetzt wird [Unger et al., 1980], wurde widerlegt [Akpaffiong, 1981]. Weiterhin wurde angenommen, daß dopaminerge Neurone für die endogene Dopaminbildung in der Niere verantwortlich sind [Bell und McLachlan, 1982; Bell und Mann, 1990; Ziegler et al., 1990; Dinerstein et al., 1983]. Auch diese Aussage konnte durch Untersuchungen an isolierten perfundierten Nieren [Baines, 1985], bzw. Vergleiche von wachen Ratten nach renaler Denervierung mit Kontrollen mit intakter Innervierung [Mühlbauer und Oßwald, 1994] nicht bestätigt werden.

Zahlreiche Arbeiten weisen heute darauf hin, dass die Niere filtriertes oder zirkulierendes L-DOPA in ihren epithelialen Zellen (also im nicht-neuronalen Gewebe) des proximalen Tubulus zu Dopamin umwandelt [Wolfovitz et al., 1993; Lee, 1993] Für diese These spricht auch eine hohe Konzentration an AADC (L-DOPA-Decarboxylase), welche in den proximalen Tubuluszellen gefunden wurde [Goldstein et al., 1972; Hayashi et al., 1990]. Woher allerdings das filtrierte L-DOPA stammt, ist bislang noch nicht geklärt. Als gesichert gilt, dass es nicht nur aus der Nebennierenrinde (die dortige Syntheseproduktion ist nicht hoch genug) [Hansell et al., 1996] und anderen nicht neuronalen Geweben, wie Gastrointestinaltrakt, Leber und eben Niere stammt, sondern

auch aus Neuronen des sympathischen Nervensystems, welche vorwiegend im Skelettmuskel [Grossmann et al., 1992] lokalisiert sind.

Bei dem in der Niere produzierten (hauptsächlich in den proximalen Tubuluszellen) Dopamin soll es sich um ein natriuretisches Hormon handeln [Alexander, 1974; Hayashi et al., 1991]. Erklärt wurde die natriuretische Wirkung mit einer Hemmung der tubulären Na^+-K^+-ATPase [Aperia et al., 1987]. Dieselben Autoren wiesen aber in nachfolgenden Studien darauf hin, dass die natriuretische Wirkung nur bei gleichzeitiger Gabe von Angiotensin II oder Oxymetazolin hervorzurufen war [Aperia et al., 1994]. Ebenso wird auch der Na^+/H^+-Austauscher in den proximalen Tubuluszellen durch Dopamin gehemmt (über D_1-Rezeptoren vermittelt) [Gesek und Schoolwerth 1990; Felder et al., 1990]. Bemängeln muss man aber, dass in den meisten Studien nicht berücksichtigt wurde, dass die Ausscheidung von Dopamin im Urin stark von dem in der Nahrung enthaltenden L-DOPA und Tyrosin abhängig ist [Mühlbauer und Osswald, 1992]. Auf diese Aussage gestützt stellt sich nun die Frage, ob tubuläres Dopamin parakrine Funktionen übernimmt oder lediglich als Abbau-, bzw. Endprodukt ausgeschieden wird und ob die Dopamin-Ausscheidung im Urin als Maß für die renale Dopamin-Produktion angesehen weden kann. Luippold et al. [Arbeiten von 1999 und 1998a] konnte durch Infusion von 7-OH-DPAT, einem D_3-Rezeptor-Agonist einen Anstieg der GFR, verknüpft mit einer Natri- und Diurese verzeichnen. Durch Behandlung mit U-99194A, einem D_3-Antagonist konnten diese Veränderungen der renalen Hämodynamik aufgehoben werden. Lokalisiert sein sollen die D_3- Rezeptoren sowohl glomerulär als auch tubulär [O´Donnell et al., 1998]. Andererseits ließ sich durch die Dopamin-Vorstufen L-Tyrosin, bzw. L-DOPA keinerlei Modifikation der renalen Hämodynamik und Natriumausscheidung herbeiführen. Bei Infusion hoher Dosen Dopamins (6 nmol/min) kam es jedoch zu einem signifikanten Anstieg der GFR [Mühlbauer et al., 1997; Luippold et al.,1998b].

Als gesichert gilt ein Zusammenhang zwischen Natriumchloridzufuhr und Entstehung der arteriellen Hypertonie. Diese Form des Bluthochdrucks wird als sekundäre Hypertonie bezeichnet im Gegensatz zum essentiellen (primären) Hypertonus, dessen kausale Ursachen nicht bekannt sind. Bei einem Teil der

essentiellen Hypertoniker wird eine Veränderung der Nierenphysiologie angenommen, deren Folge eine inadäquate Salzausscheidung darstellt (salz-abhängiger, sensitiver Hypertonus) [Curtis et al.,1983].
Eine Veränderung der Nierenphysiologie schließt auch die Tatsache mit ein, dass renales Dopamin als natriuretisches Hormon bei der Pathogenese einiger Hypertonieformen eine Rolle spielt, da Dopamin, lokal produziert und unabhängig von der Innervation ein wichtiger Faktor der autokrinen/parakrinen Regulation des renal tubulären und jejunalen Natriumchlorid-Transportes ist [Jose et al. 2003]. Somit ist der Zusammenhang zwischen endogenem Dopamin, erhöhter Natriumchloridzufuhr und der Entwicklung eines Hypertonus gegeben. Da es sich aber in der vorliegenden Arbeit nicht um spezielle salz-sensitive Tiere, wie z.B. salz-sensitive Dahl-Ratten handelt, stellte sich die Frage, ob es allein durch vermehrte Salzbeladung der Nahrung zu einem erhöhten Blutdruck, bzw. einer veränderten Dopaminausscheidung im Urin, bzw. Dopaminkonzentration im Nierengewebe kommt.

1.2.4.4 Dopaminrezeptoren

Die Signalübermittlung von Dopamin geschieht nicht nur über die Stimulation von α- und β- Adrenorezeptoren (hohe Dosen von Dopamin sind notwendig), sondern über 2 spezifische Rezeptortypen, den D_1-Typ (D_1-like), welcher in D_1 und in D_5-Rezeptoren untergliedert wird und den D_2-Typ (D_2-like), welcher in D_2-,D_3-und D_4-Rezeptoren unterteilt wird. Vom D_2-Rezeptor sind die beiden Isoformen D_{2long} und D_{2short} bekannt [Monsma et al., 1989; Giros et al., 1989]. Die Einteilung wurde aufgrund struktureller und biochemischer Ähnlichkeiten vorgenommen [Sokoloff et al., 1992; Seemann und van Tol, 1994]. In der Peripherie (beispielsweise in der Niere) wurden 2 verschiedene Typen von Dopaminrezeptoren vermutet, nämlich DA_1- und DA_2-Rezeptoren [Jose et al., 1992]. Lokalisiert sein sollen die Rezeptoren sowohl in der basolateralen als auch in der luminalen Membran der proximalen Tubuluszelle [Felder et al., 1989].

In der Zwischenzeit konnten die fünf bekannten Rezeptoren jedoch alle in der Niere nachgewiesen werden [Amenta, 1997]. Auch ihre Lokalisationen sind nicht nur auf die proximalen Abschnitte des Nephrons beschränkt.

Die unterschiedlichen Rezeptoren gehören alle zu den Klasse 2-Rezeptoren, das heißt ihre Transmission findet über GTP-bindende Proteine, die sogenannten G-Proteine statt. Während die Aktivierung des D_1- und des D_5-Rezeptors (überwiegend postsynaptisch lokalisiert) in einer Aktivierung der Adenylat-Cyclase, Erhöhung der cAMP- und IP_3-Konzentration mit anschließender intrazellulärer Kalziumgehalterhöhung resultiert, kommt es bei Stimulierung des D_2-Rezeptors zu einer Senkung der intrazellulären cAMP–Konzentration (das G-Protein wird als sog. inhibitorisches Protein = G_i bezeichnet) und einer Erhöhung der IP_3-Konzentration [Jose et al., 1992]. Der Transmissionsweg des D_4 Rezeptors führt ebenfalls über ein G_i–Protein, welches auch Kaliumkanäle beeinflussen soll [Colville et al., 1994]. Dennoch ist der genaue Übertragungsweg der Signale des D_4- und des D_3-Rezeptors noch ungenügend geklärt. Besonders beim D_3-Rezeptor können Zweifel an der oben beschriebenen Hypothese aufkommen, da Griffon et al. [1997] in ihrer Arbeit über den D_3-Rezeptor die Adenylatcyclase sowohl hemmen als auch stimulieren konnten.

Die kontrovers diskutierte (siehe oben) durch exogenes Dopamin ausgelöste Diu - und Natriurese soll über D_1-Rezeptoren vermittelt werden [Olsen et al., 1990, Puschett und Winaver, 1992], welche durch immunhistochemische Detektion in renalen Gefäßen, im juxtaglomerulären Apparat, im proximalen und distalen Tubulus sowie im Sammelrohr lokalisiert werden konnten [O´Connell et al., 1995]. Ein defekter Regulationsmechanismus des proximalen tubulären Na-Transportes, vermittelt durch D_1-Rezeptoren ist bei beim essentiellen Hypertonus nachgewiesen [O´Connell et al., 1997]. Andererseits sollen Dopamin D_2-like Rezeptoren an der Regulation des Blutdrucks durch das zentrale Nervensystem beteiligt sein; vermittelt durch postsynaptische D_2-like-Rezeptoren lässt sich ein Blutdruckanstieg verzeichnen, während präsynaptische D_2-like Rezeptorenstimulierung den gegenteiligen Effekt hervorruft [Jose et al. 1999].

In vitro-Studien an Ratten zeigten, dass pharmakologische Stimulation (Dopamin oder Fenoldopam, ein D_1-Agonist) die Renin-Sekretion und Freisetzung ansteigen ließen [Kurtz et al., 1988]. Glu-DOPA und L-DOPA allerdings ließen die Plasma-Renin-Aktivität absinken [Worth et al., 1986 und 1988]. Präsynaptische D_2-Rezeptorstimulation soll hingegen durch Hemmung der Noradrenalinfreisetzung zu einer Vasodilatation, Herabsetzung der ganglionären Transmission und Verminderung der Aldosteronsekretion führen [Seri und Aperia, 1988]. Die dopaminbedingte Steigerung der GFR und die Hyperfiltration im Frühstadium des Diabetes mellitus soll ebenfalls aus einer D_2-like Rezeptorstimulierung resultieren [Luippold et al., 1998; Luippold und Mühlbauer, 1998] (siehe Kapitel *1.2.5.3*). Interessanterweise konnten Barthelmebs et al. [1991] die glomeruläre Hyperfiltration diabetischer Ratten durch L-DOPA, Gludopa, bzw. Fenoldopam (ein selektiver D_1-Agonist) normalisieren.

1.2.4.5 Einfluss von exogenem Dopamin

Durch Infusion von Dopamin (1-3 µg/kg/min = Nierendosis) konnte eine dosisabhängige Steigerung der GFR, des RBF [Olsen, 1990] und des Urinvolumens [Bello-Reuss et al., 1982] nachgewiesen werden. Außerdem soll es über D_1-Rezeptoren vermittelt, durch exogenes Dopamin zu einer Natri- und Diurese [Goldberg,1972; Olsen et al., 1990; Puschett und Winaver, 1992] kommen. Diese Beobachtung konnte allerdings von verschiedenen Autoren nicht bestätigt werden [Luippold et al., 1998; Mühlbauer et al., 1994; Driemann et al., 1994; Wheeler et al., 1987]. Luippold und Mühlbauer [1998] führten die Steigerung der GFR auf eine Aktivierung des D_2-like Rezeptors zurück.
Klinisch soll die Infusion von Dopamin den Verlauf des akuten Nierenversagens nach Kreislaufschock oder fulminantem Blutverlust verbessern. Ziel ist es die tubuläre Nekrose - Hauptursache des akuten Nierenversagens - durch eine verbesserte Perfusion der Niere mittels Erhöhung der GFR und des RBF zu verhindern [Denton et al., 1996]. Dieses Vorgehen wird aber in neueren Arbeiten nicht mehr empfohlen, da sich das Dopamin durch Hypoxieerzeugung

im Gewebe sogar schädlich auf die Niere auswirken könnte [Thadhani et al., 1996; Mühlbauer, 1996; Thompson und Cockrill, 1994]. Durch Dopamin zeigt sich kardial eine Steigerung der Kontraktilität des Myokards, mesenterial wird die Durchblutung der Gefäße durch Verminderung des Gefäßwiderstands erhöht.

1.2.5 Diabetes mellitus

1.2.5.1 Ätiologie, Pathophysiologie und Klinik

Der Diabetes mellitus ist eine erbliche chronische Glucosestoffwechselstörung, die auf einem absoluten oder relativen Mangel an Insulin beruht.
Man unterteilt die an Diabetes Erkrankten in zwei verschiedene Typen, nämlich den Typ I (Insulin Dependent Diabetes Mellitus = IDDM), welcher 10 % der Betroffenen ausmacht und sich meist vor dem 40.Lebensjahr manifestiert und den Typ II Diabetes mellitus. Ätiologisch kann man beim Typ II Diabetes mellitus eine immunologische, seltener auch idiopathische β-Zellzerstörung definieren, welche sich in einem lebensbedrohlichen absoluten Insulinmangel mit Neigung zu ketoazidotischer Stoffwechselentgleisung äußert. Desweiteren konnten verschiedene Autoantikörper nachgewiesen werden, deren Entstehung möglicherweise durch Virusinfektionen getriggert wird.
Der Typ II-Diabetes (Non Insulin Dependent Diabetes mellitus = NIDDM) äußert sich in einem zunächst über Jahre verlaufenden blanden, dann jedoch klinisch manifestem Verlauf, dessen Ausprägung sich in Abhängigkeit von Ernährungsgewohnheiten und körperlicher Aktivität darstellt. Der Typ II-Diabetes entwickelt sich über eine Insuliresistenz (verminderte Empfindlichkeit der Rezeptoren für Insulin) mit relativem Insulinmangel zu einer Sekretionsstörung mit Neigung zu hyperosmolaren Stoffwechselentgleisungen. Ausgangspunkt ist möglicherweise eine genetisch bedingte Insulinresistenz, die v.a. Leber, Muskel- und Fettzellen betrifft und neben einer Hyperinsulinämie auch eine Dyslipoproteinämie und Hypertonie zur Folge hat. Die Insulinsekretion ist gestört (Sekretionsstarre) und kann sich im Laufe der Jahre

erschöpfen (Sekundärversagen). Klinisch äußert sich der manifeste Diabetes mellitus durch unspezifische Allgemeinsymptome, wie Müdigkeit, Leistungsminderung, Wundheilungsstörungen, Infektanfälligkeit und Depressionen, sowie durch Symptome infolge Hyperglycämie und Glucosurie mit osmotischer Diurese, Polyurie, Durst, Polydipsie und Gewichtsverlust. Außerdem kommt es zu Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt.
Im weiteren Krankheitsverlauf zeigen sich Mikro- und Makroangiopathien mit Verdickung der kapillären Basalmembranen, deren Ausmaß mit der Dauer des Diabetes mellitus korreliert. Die durch die Blutzuckererhöhung bedingte nichtenzymatische Glykosylierung von Proteinen, intrazelluläre Sorbitolanreicherung [Bank et al., 1991] und Einlagerung von Glucose in die Basalmembran der Gefäße, welche zu Permeabilitätsstörungen und Entzündungsreaktionen der Membranen führt, scheint eine Rolle bei der Entstehung der Mikroangiopathie zu spielen [Shostak und Gotloib, 1996]. Die Mikroangiopathie kann zu Glomerulosklerose, Retinopathie, Neuropathie und Angiopathien der intramuralen kleinen Koronararterien führen. Die Makroangiopathie führt zur Koronaren Herzkrankheit durch stenosierende Arteriosklerose der großen epikardialen Koronararterien und zu arterieller Verschlusskrankheit der Peripherie und der Hirnarterien.

1.2.5.2 Morphologische und funktionelle Veränderungen der Niere

Im Verlauf des Diabetes mellitus kommt es bei einem Drittel der Typ I- und bei einem hohen Prozentsatz der Typ II-Diabetikern zu Hypertrophie und Hyperplasie der Nieren, welche mit einer Erhöhung der glomerulären Filtrationsrate einher geht. Diese funktionellen Veränderungen können allerdings über Jahre hinweg klinisch persistieren, jedoch müssen sie schon als erste Anzeichen einer diabetischen Nephropathie gewertet werden.
Die ersten morphologischen Veränderungen, wie die Verdickung der Basalmembran (ungefähr zwei Jahre nach Erstmanifestation) und Veränderungen der mesangialen Funktion sind charakterisiert durch Proteinurie, Hypertonus, Ödeme und progrediente Niereninsuffizienz. Als

weitere morphologische Veränderungen sieht man Mesangiumzellproliferationen (diffuse Glomerulosklerose, diagnostizierbar circa fünf Jahre nach Diagnosestellung), immunhistochemisch nachweisbar durch vermehrte Ablagerungen von Kollagen Typ IV (α_1-, α_2-chain) [Schleicher und Olgemöller, 1992]. Ebenfalls immunhistochemisch, mit Hilfe von Antikörpern gegen verschiedene Regionen der extrazellulären Matrix, konnte eine Verminderung von Heparan-Sulfat-Proteoglykanenen der Mesangiumzellmatrix und der glomerulären Basalmembran gezeigt werden. Im Spätstadium kann man knötchenförmige Ablagerungen in der Mesangiumzellmatrix sehen, die zu einer Verdrängung der Mesangiumzellen führen (noduläre Glomerulosklerose = Kimmelstiel-Wilson-Glomerulosklerose), wodurch der glomeruläre Raum vergrößert wird [Hasslacher, 1988]. Andere Läsionen sind hyaline, degenerative Veränderungen in den afferenten und efferenten glomerulären Arteriolen und exsudative, hyaline Läsionen im subendothelialen Raum.

1.2.5.3 Diabetische Hyperfiltration

Das durch verschiedenste strukturelle und pathophysiologische Mechanismen (siehe unten) hervorgerufene Symptom der Hyperfiltration beim Diabetes mellitus ist schon seit längerem bekannt. Christiansen et al. konnten beispielsweise 1981 eine um 27% gesteigerte GFR bei diabetischen Patienten gegenüber gesunden Probanden aufzeigen. Übereinstimmende Ergebnisse wurden auch im Tierexperiment unter Insulinsubstitution gefunden [Jensen et al., 1981]. Ohne Insulinbehandlung allerdings zeigten die diabetischen Tiere in der Arbeit von Hostetter et al. [1981] einen GFR-Wert unterhalb des Normbereichs. Eine Veränderung der GFR wirkt sich auf die tubuläre Resorption und den distalen Urin-Auswurf aus (tubuloglomerulärer feedback, siehe Kapitel *4.1.2*). Da aber die fraktionelle Resorption und die GFR beide ansteigen, kann dies nicht durch eine Störung der ,,glomerulotubuläre balance“ (GTB) allein erklärt werden. Als Erklärungsmodell hierzu könnte eine Veränderung in der Anzahl der Transporter oder ihrer Affinität, bzw. eine erhöhte Resorptionsrate, eine verminderte Cl^--Konzentration und folgernd eine

Hyperfiltration vorliegen [Vallon et al., 2003]. Verantwortlich für eine Steigerung der GFR bei Insulin-behandelten diabetischen Ratten unter schlechter metabolischer Kontrolle, aber ohne Ketonuria scheinen auch eine Veränderung im RPF, im kolloidosmotischen Druck der glomerulären Kapillaren (gesteigert bei Hostetter et al., 1981), im transglomerulärem Druck, dem intratubulären Druck (verringert bei Jensen et al., 1981), einen verminderten Widerstand der afferenten Arteriole und eine Vergrößerung des Ultrafiltationskoeffizienten zu sein, da der glomeruläre Plasmafluss den Ultrafiltrationsdruck beeinflusst und damit direkt mit der GFR korreliert ist.
Diskutiert wird auch eine direkte Korrelation zwischen der erhöhten Plasma-Glucose und dem Anstieg der GFR, da der Mangel an Insulin per se - Insulin ist wichtig für den Eintritt von Calcium in die Zelle - zur Hyperfiltration beitragen könnte. Mene et al. [1993] stellten einen geringeren intrazellulären IP_3-Gehalt und folgernd einen gesenkten Kalziumspiegel in Mesangiumzellen, die in hohen Glucosekonzentrationen kultiviert wurden fest. Cohen et al. [1984] fanden heraus, dass Calcium die Renin-Freisetzung an isolierten, perfundierten Rattennieren unterdrückte, jedoch nur, sobald sich Insulin in der Perfusionsflüssigkeit befand. Auch Bank et al. [1987] konnten, sofern Calcium einer Insulin-Infusion beigefügt wurde, eine Reduktion der Hyperfiltration bewirken. Aussagen über den Einfluß einer Insulintherapie differieren. Jensen et al. [1987] und Christiansen et al. [1981] beispielweise fanden eine Reduktion der Hyperfiltration unter Insulinsubstitution, während bei Bank [1991] sowohl mit als auch ohne Therapie eine Steigerung der GFR vorhanden war.

Auch hormonelle Einflüsse, wie den des Wachstumshormons (sehr kontrovers diskutiert), des Glucagons [Hostetter, 1992] und renaler Prostaglandine (Indometacin, ein Prostaglandin-Synthese-Inhibitor ließ die GFR absinken, Jensen et al., 1986) werden als Erklärung herangezogen. Ebenfalls möglich wäre, dass eine durch den Diabetes mellitus ausgelöste Volumenexpansion eine Steigerung des ANP-Levels im Plasma bewirkt und dadurch die GFR ansteigt. Eine direkte Korrelation wurde auch zwischen der Vergrößerung des glomerulären Raumes (morphologisch gemessen aus renalen Biopsien) durch

die Verdrängung der Mesangiumzellen und der Hyperfiltration gezeigt. Auch eine Verbreiterung der Filtrationsfläche aufgrund der Hypertrophie könnte ein auslösender Faktor der Hyperfiltration sein [Obineche et al., 2001].
Kontrovers diskutiert wird der Einfluss des Dopamins auf die renale Hämodynamik, da sich eine aminosäurenbedingte Hyperfiltration [Meyer et al., 1983] durch Einsatz von S-Sulpiride, einem DA_2-Antagonisten [Goldberg und Kohli, 1983] und Benserazide, einem Inhibitor der peripheren Dopamin-Synthese [Mühlbauer et al., 1994] verhindern ließ (siehe Kapitel *4.2 und 4.2.1*).
Sicher ist, dass multiple Faktoren und ein komplexes Zusammenspiel morphologischer und hämodynamischer Veränderungen zur Entstehung der glomerulären Hyperfiltration beitragen und letztendlich für die Progredienz der diabetischen Nephropathie verantwortlich sind.

1.3 Eigene Fragestellung

Auf Grund der vorangegangenen Erläuterungen ist der Zusammenhang von morphologischen Veränderungen und modifizierter Pathophysiologie der Niere beim Diabetes mellitus gesichert. Eine besondere Rolle spielt dabei das dopaminerge System, die glomeruläre Hyperfiltration und möglicherweise auch unterschiedliche Salzkonzentrationen der Nahrung. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die aminosäurenbedingte Hyperfiltration bei diabetischen Ratten durch Infusion von D_2-like-Rezeptor-Antagonisten verhindert werden konnte. Bei vorliegender Arbeit stand in diesem Zusammenhang die Untersuchung der Dopaminausscheidung im Urin und die Dopaminkonzentration im Nierenparenchym (als Ausdruck der Dopaminproduktion in der Niere) in Bezug auf die glomeruläre Hyperfiltration bei diabetischen Ratten im Vordergrund. Durch Blutdruckmessungen und Stoffwechselkäfigversuche sollte der Einfluß verschiedener Ausscheidungsparameter wie Elektrolyt-, Glucose- und Dopaminausscheidung (im Hinblick auf die These des Dopamins als natri- und diuretischen Hormons) als Reaktion auf die diabetische Stoffwechsellage im Vergleich zu Kontrolltieren

und weiterführend das Einwirken unterschiedlicher Salzdiäten auf die genannten Parameter und auf den Blutdruck bestimmt werden.

In den durchgeführten Inulinclearanceversuchen sollte der Einfluss einer möglichen Dopaminproduktion in der Niere, ausgedrückt durch die Dopaminkonzentration im Nierenparenchym sowohl in Bezug auf die diabetische Hyperfiltration als auch auf die Normal-, Hoch-, bzw. Niedrigsalzernährung betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Für die Versuche wurden männliche, 60-90 Tage alte und 225-250 g schwere Sprague-Dawley-Ratten (Fa. Charles-Rivers, Sulzfeld) verwendet. Nach ihrer Anlieferung wurden sie im Tierstall des Instituts unter standardisierten Bedingungen gehalten. Die Raumtemperatur lag bei konstant 24°C und es herrschte ein 12-stündiger wechselnder Hell/Dunkel-Rhythmus. Die Tiere hatten in ihren Makrodex®-Standardkäfigen (Fa. Ehret, Freiburg) freien Zugang zu Nahrung (Altromin C 1320®, Altromin, Lage) und zu Leitungswasser ad libitum. Den Tieren wurde je nach Gruppenzuteilung Nahrung unterschiedlichen Salzgehaltes mit einer NaCl-Konzentration von 0,6%, bzw. 2%, 4% oder 0,1% NaCl angeboten.

2.2 Versuchsgruppen und experimenteller Ablauf

2.2.1 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in folgende 7 Gruppen eingeteilt:

CON-NS (n=13): Durchgehend normalsalzernährte Sprague-Dawley-Ratten, die als Kontrolltiere dienten.

DM-NS (n=12): Durchgehend normalsalzernährte SD-Ratten, die aufgrund von injiziertem Streptozotozin (siehe experimenteller Ablauf) einen Diabetes mellitus entwickelten.

CON-HS (n=12): Kontrolltiere, welche nach 7 Tagen Normalsalzernährung für die restliche Versuchszeit auf Hochsalzfutter (4 % NaCl

enthaltendes Diätfutter) umgestellt wurden.

DM-HS (n=11): Diabetische Ratten, welche aufgrund der erhöhten Nahrungsaufnahme auf HS-Futter mit einem NaCl-Gehalt von nur 2 % umgestellt wurden.

CON-LS (n=11): Kontrolltiere, die nach 7 Tagen auf Niedrigsalzfutter umgestellt wurden (0,1 % NaCl enthaltendes Diätfutter)

DM-LS (n=12): Diabetische Tiere, die nach 7 Tagen auf Niedrigsalzdiät umgestellt wurden.

DM-LS $_{impl.}$(n=6): SD-Ratten, welche gleich behandelt wurden wie die Gruppe DM-LS, denen aber am Tag 11 ein Insulindepotpräparat (Linplant®, LinShin, Canada) implantiert wurde, welches Blutzuckerspitzen über 600 mg/dl abfangen sollte.

2.2.2 Experimenteller Ablauf

2.2.2.1 Induktion des Diabetes mellitus

Streptozotozin (STZ, Sigma Aldrich Chemie, Steinheim) wurde in Citratpuffer (0,210 g Zitronensäure in 10 ml Aqua bidest., pH 4) gelöst und den Tieren in der Dosierung von 55 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert. Nach 48 Stunden wurden die Blutglucosewerte bestimmt und der Diabetes mellitus durch einen Blutglucoseanstieg (über 250 mg /dl) bestätigt. Wurde dieser Wert nicht erreicht, erfolgte eine weitere Injektion mit 40-55 mg STZ pro kg Körpergewicht.

2.2.2.2 Blutdruckmessung an wachen Ratten

Die Blutdruckmessungen wurden basal, am 7. Versuchstag (Tag der Ernährungsumstellung) und am 14. Versuchstag durchgeführt, um den Einfluss

durch die unterschiedliche NaCl-Beladung der Nahrung auf den Blutdruck zu dokumentieren.

Bei den Blutdruckmessungen wurde darauf geachtet, diese immer zur selben Tageszeit durchzuführen, um etwaige Verschiebungen, die sich durch die zirkadianen Blutdruckschwankungen ergeben, zu vermeiden. Außerdem wurden die Tiere einige Tage vor den eigentlichen Versuchsmessungen an die nachfolgend beschriebenen Messungsbedingungen gewöhnt, um Blutdruckerhöhungen, ausgelöst durch die Streßsituation zu minimieren. Für die Blutdruckmessung, welche pro Tier dreimal durchgeführt wurde, wurden die Tiere in Fließstoff eingewickelt, um Verletzungen zu vermeiden und in größenverstellbaren Restrainern (gefertigt in der institutseigenen Werkstatt) gehalten. Diese wurden in einen Plexiglaskasten (Herstellung ebenfalls in der institutseigenen Werkstatt), in welchem eine konstante Temperatur von 37°C herrschte, gestellt. Daraufhin wurde an den Schwanz der Tiere eine Staumanschette (D=9,5 mm, Rhema Labortechnik, Hofheim/Ts.) und ein piezoelektrischer Pulswellensensor (D=7,0 mm, Rhema Labortechnik, Hofheim/Ts.) angebracht. Sobald über den Pulswellensensor ein gleichmäßiges Signal des Schwanzarterienpulses registriert wurde, wurde die Staumanschette bis zu einem Druck von 170 mmHg aufgepumpt, um dann langsam abgelassen zu werden. Beim erneuten Auftreten der Pulsationen, wurde der dabei gemessene Druck als systolischer Blutdruckwert festgehalten.

2.2.2.3 Stoffwechselkäfigversuche

Die Stoffwechselkäfigversuche wurden zweiphasig (siehe unten) an wachen Ratten durchgeführt. Hierzu wurden Käfige (Tecniplast®, Fa. Ehret, Freiburg i.Br.), die eine separate Sammlung von Urin und Faeces ermöglichten, verwendet. Im oberen Teil des Käfigs konnte sich das Tier auf einem Gitterrost frei bewegen, wobei die Exkremente durch einen konusförmigen Trichter in das dafür vorgesehene Behältnis fielen. Der Urin konnte hierbei über eine Ablaufrinne in einem eigenen Sammelgefäß aufgefangen werden. Die Versuche wurden am Tag 6 (nach Streptozotozin-Injektion) unter Normalsalzernährung

und Tag 15 (jeweilige Diät) über 24 Stunden ausgeführt, wobei den Tieren in der ersten 6-stündigen Periode nur freier Zugang zum Trinkwasser ermöglicht wurde, um Kontamination des Urins mit Futterbestandteilen zu vermeiden. In der darauf folgenden 18-stündigen Periode wurde den Tieren Futter angeboten. In das Uringefäß wurden bei den diabetischen Tieren 3 ml und bei den Kontrolltieren 1 ml eines Konservierungsmittels (201,3 g/l Citronensäure-Monohydrat + 76,7 g/l di-Natriumhydrogencitrat-1,5-Hydrat, Fa. Merck, Darmstadt, in Aqua bidest. gelöst, pH 2,7) vorgelegt, welches den oxydativen Abbau der Katecholamine bei Raumtemperatur, insbesondere den des Dopamins verhindern sollte.

Folgende Werte wurden zur späteren Auswertung festgehalten:

- Tiergewicht: Gewicht der Tiere zu Beginn und nach Beendigung des Versuchs.
- Trinkmenge: Flüssigkeitsverbrauch in 24 Stunden.
- Urinvolumen: Menge des Urins in 24 Stunden.
- Dopamin im Urin: Nach der ersten 6-stündigen Periode wurden die Uringefäße gewogen und es wurden je 3 mal 500 µl des Urins entnommen (Pipette: Fa. Eppendorf, Hamburg) und bis zur Auswertung bei -80°C eingefroren
- Glucose/Elektrolyte im Urin: Am Ende des Versuchs wurden Urinproben (3 x 2 ml) aus den Sammelgefäßen zur Glucose-, Natrium- und Kaliumbestimmung entnommen, abzentrifugiert und bei -20°C bis zur weiteren Analytik aufbewahrt.
- Blutzuckerwerte: Die Blutglucosewerte wurden mittels direkter Blutentnahme aus der Schwanzvene des Tieres zu Beginn und zu Ende des Stoffwechselkäfigversuchs ermittelt (Blutzuckergerät: Accu-Chek Sensor®, Fa. Roche, Mannheim)

2.2.2.4 Clearanceversuche

2.2.2.4.1 Narkose

Für die Narkose wurde Thiopental-Natrium (Trapanal®, Fa. Byk-Gulden, Konstanz) in Aqua bidest. gelöst und in einer Dosierung von 80 mg/kg Körpergewicht (nicht diabetische Tiere), bzw. 60 mg/kg Körpergewicht (diabetische Tiere) intraperitoneal injiziert. Innerhalb von ca. 3-5 min war der Wirkungseintritt der Narkose durch schlaffen Muskeltonus, fehlende Kornealreflexe und fehlende Schmerzreize feststellbar. Vereinzelt mußte, um eine ausreichende Tiefe der Narkose zu erreichen, Thiopental in einer Dosis von 10-30 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal nachinjiziert werden.

2.2.2.4.2 Präparation

Die Tiere wurden zunächst in Rückenlage auf der Heizplatte des Präparationstisches fixiert. Zur Temperaturmessung diente eine rektale Sonde, die mit einem Temperaturregelgerät (RT, Effenberger, München) verbunden war, welches über die Heizplatte für die kontinuierliche Körpertemperatur des Tieres von 37,2 °C sorgte.
Nach Aufbringen von Paraffinöl im vorderen Halsbereich wurde ein ca. 3-4 cm suprasternaler, medianer Hautschnitt mittels Präparierschere (Fa. Aesculap, Tuttlingen) gesetzt. Daraufhin erfolgte lateral des M. sternocleidomastoideus das Aufsuchen und Darstellen der rechten Vena jugularis. Unter mikroskopischer (Leica Wild M 10, bzw. M 3 C, Fa. Wild, Heerbrugg, Schweiz) Sicht wurde die Vene distal ligiert (Faden: Perma-Hand 4-0®, Fa. Ethicon, Norderstedt) und proximal locker umschlungen. Durch Beschweren der proximalen Ligatur wurde die Vene unter Zug gebracht und konnte so, mittels Mikrofederschere inzidiert werden. Daraufhin wurde ein Polyethylenkatheter (Lumen 0,58 mm) ca. 10 mm vorgeschoben und durch den proximal vorgelegten Faden fixiert. Der Katheter, welcher sich über ein Verbindungsstück aufzweigte, war an zwei Infusionspumpen (Perfusor® secura, Fa.Braun, Melsungen AG) angeschlossen, welche eine kontinuierliche Flüssigkeits- und Inulinzufuhr gewährleisteten (siehe Kapitel: Verwendete Infusionslösungen)

Anschließend wurde der M. sternohyoideus vertikal gespalten und die darunterliegende Trachea vorsichtig ca. 15 mm freipräpariert, distal locker umschlungen und zwischen zwei Knorpelspangen inzidiert. Durch diese Inzisur konnte nun ein ca. 3 cm langer Katheter (Lumen 1,9 mm) eingeschoben werden. Die Befestigung erfolgte durch Zuziehen der Ligatur. Darauf folgend wurde paratracheal die linke A. carotis aufgesucht und unter Schonung des Nervengeflechts des N. vagus aus der Vagina carotica herauspräpariert. Das Gefäß wurde kranial ligiert und unter Zug gebracht, kaudal locker umschlungen und mittels gefäßchirurgischer Klemme abgeklemmt. Nun konnte die Arterie zwischen Klemme und Ligatur inzidiert und ein Katheter eingeführt werden, der an einen Druckaufnehmer (TBM 4, World Precision Instruments, Heidelberg), einen Brückenverstärker (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) und einen Schnellschreiber (WK-280 R, WKK, Kaltbrunn, Schweiz) angeschlossen war. Daraufhin wurde die Klemme entfernt und der Katheter fixiert.

Das Operationsgebiet wurde durch eine Hautnaht verschlossen um etwaige Flüssigkeitsverluste während des Experiments zu minimieren. Um die Harnblase zu katheterisieren wurde ca. 1 cm oberhalb der Peniswurzel eine Inzisur entlang der Linea alba gesetzt, diese durchtrennt und die Abdominalmuskulatur durch stumpfe Präparation gespalten. Die Harnblase wurde luxiert, inzidiert und ein ca. 3 cm langer Katheter (Lumen 1,14 mm) eingebracht, der durch eine äußere Ligatur fixiert wurde. Danach wurde die Blase reponiert, und das Operationsfeld durch eine weitere Hautnaht verschlossen. Die Tiere wurden nun auf der linken Seite gelagert und der Urin in PE-Gefäßen (Fa. Eppendorf, Hamburg) gesammelt.

2.2.2.4.3 Design der Clearanceversuche

Vor Narkoseinjektion erfolgte eine Blutglucosemessung. Nach einer Äquilibrierungsperiode von ca. 60-90 min, in der die Tiere einen kreislaufstabilen Zustand (wenn nötig, wurde über den Venenkatheter zusätzlich Trapanal injiziert) und eine gleichmäßige Urinausscheidung entwickelten, wurde mit der ersten 20-minütigen Sammelperiode begonnen (Sammlung des Urins in PE Gefäßen, Safe-Lock 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg).

Nach zehn Minuten wurde Blut über den arteriellen Katheter in 3 ca. 70 µl enthaltende Mikrohämatokritröhrchen® (Fa.Brand, Wertheim) abgenommen. Auf diese Periode folgten drei weitere desselben Schemas, wobei zusätzlich in der 2. Periode eine Blutglucosemessung erfolgte. Am Ende der vier Perioden wurden außerdem 100 µl Blut zur Reninbestimmung entnommen.

2.2.2.4.4 Verwendete Infusionslösungen

Bei den nicht diabetischen Tieren wurden über den venösen Katheter 1 % des KG in ml/h 0,9 %ige NaCl Lösung und Inulin-Lösung (zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate = GFR) infundiert, bei den diabetischen Tieren aufgrund des größeren Flüssigkeitsverlustes 1,5 % des KG in ml/h, wobei über den einen Schenkel des venösen Katheters permanent 0,6 ml/h Inulin-Lösung (80 µl [^{3}H]-markiertes Inulin, Aktivität: 1,2 Ci/ml in 5 ml 0,9 %ige NaCl-Lösung) und in den anderen Schenkel das übrige Volumen an reiner 0,9 %iger NaCl-Lösung infundiert wurde.

2.2.2.5 Nierenentnahme

Allen Tieren wurden nach Beendigung der Clearancexperimente beide Nieren entnommen. Dazu wurden die Tiere in Rückenlage verbracht und kaudal, ausgehend vom Harnblasenoperationsfeld eine Laparatomie bis zu den unteren Rippenbögen durchgeführt. Um die rechte Niere zu entnehmen wurde der Dünndarm nach links mobilisiert, die Niere wurde schonend von umgebendem Fettgewebe und Faszie befreit, Gefäße und Ureter wurden aufgesucht, ligiert und durchtrennt. Die Niere wurde sofort nach Entnahme mit einer Wollenbergzange (Werkstatt des Instituts für Pharmakologie & Toxikologie), welche in flüssigem Stickstoff vorgekühlt wurde, schockgefroren und darauf in Aluminiumfolie verpackt bei -80°C bis zur weiteren Analyse gelagert. Die Entnahme der linken Niere erfolgte in gleicher Weise, die Niere wurde aber nicht schockgefroren, sondern nach Entnahme sofort gewogen

(Präzisionswaage, Precisa® 100A-300M, Fa. PAG Oerlikon, Zürich, Schweiz) um das Nierenfeuchtgewicht zu bestimmen.

2.2.3 Analytik

2.2.3.1 Stoffwechselkäfigversuche

- Tiergewicht [g]
- Trinkmenge [ml]
- Urinvolumen [ml/24h]
- Elektrolytkonzentrationen [mmol/24h/100g]
- Dopaminkonzentration im Urin [nmol/6h/100g]
- Glucosekonzentration im Urin [mmol/24h/100g]

2.2.3.1.1 Elekrolytmessungen

Die Urinproben wurden aufgetaut, abzentrifugiert und jeweils 10 µl Probe mit 2 ml Lithiumlösung versetzt. Mit den Standardproben definierter Elektrolytkonzentrationen (zur Kalibrierung) und 0,9 %iger NaCl–Lösung (zur Überprüfung der Kalibrierung) wurde gleichermaßen verfahren. Danach erfolgte die Messung mittels Flammenphotometer (ELEX 6361®, Fa. Eppendorf, Hamburg). Zur Berechnung wurden die Mittelwerte, die aus den Einzelwerten der Doppelproben berechnet wurden verwendet.

2.2.3.1.2 Dopaminbestimmung im Urin

2.2.3.1.2.1 Prinzip

Die quantitative Dopaminbestimmung wurde mittels Hochleistungsflüssigkeit-Trennungschromatographie (high performance liquid chromatography, HPLC) durchgeführt. Die Trennung der Katecholamine erfolgte per

Ionenpaarchromatographie an mobiler (polar) und stationärer Phase (unpolar) (Umkehrphasen=reversed phase chromatography) unter hohem Druck (Hochdruckpumpe: S 1100®, Fa. Sykam, Gilching).

Bei der mobilen Phase handelte es sich um ein polares Fliessmittel (Säure: 11,36 g/l Trinatriumcitratdihydrat, 1,97 g/l Citronensäuremonohydrat, 0,15 g/l Ethylendiamin-tetraessigsäure, 0,3 g/l Octansulfonsäure in Aqua bidest., versetzt mit 3 % Methanol und 3 % Acetonitril, alle Chemikalien Fa. Merck, Darmstadt), welches sowohl mit den ionisierten Katecholaminen Ionenpaare bilden konnte, als auch mit der C 18 reversed-phase Trennsäule (Nucleosil 5 µm®,125 x 4 mm Fa.Grom, Herrenberg) in Verbindung treten konnte und so eine Auftrennung der Katecholamine ermöglichte, da jede einzelne Substanz eine für sie spezifische Zeit für den Durchtritt durch die stationäre Phase in der Trennsäule benötigt. Die einzelnen Substanzen wurden elektrochemisch detektiert (Detektor: EP 30®, Fa. Biometra, Göttingen) und konnten nun durch Vergleich mit dem DHBA-Standard-Peak ermittelt werden (Einheiten in ng/ml). Gesteuert wurde dieses System durch die Software Axxi-Chrom 737® (Fa. Axxiom Chromatography, Calabasas, USA).

Die Auftrennung der Katecholamine erfolgte bei einem Druck von 9 MPa (Hochdruckpumpe: S 1100®, Fa. Sykam, Gilching), die Flussrate des Laufmittels betrug 1,0 ml/min. In das System integriert war ein Probengeber (Gina 160®, Gynkothek, München).

2.2.3.1.2.2 Probenvorbereitung

Die Urinproben (je 2-mal 500 µl) wurden aufgetaut, in einen mit Eis gefüllten Ständer verbracht und mit je 50 µl internem DHBA-Standard (500 µl in 50 ml Aqua bidest.) versetzt. Entsprechend wurde mit 2 Kathecholaminstandards verfahren. Daraufhin wurde zu jeder Probe und den Standards 1 ml TRIS-Puffer (121,16 g/l Trisaminomethan und 20 g/l EDTA, Fa. Merck, Darmstadt, auf pH 8,6 eingestellt) zugegeben und falls der pH von 8,6 abwich, mit 2 M NaOH bzw. 2 M HCl eingestellt. Die genaue pH–Einstellung wurde vorgenommen, da das nun zugefügte (ca. 70 mg) neutrale Aluminiumoxid (Al_2O_3, Fa. Sigma-Aldrich)

bei diesem pH am besten adsorbieren konnte. Dieses Gemisch wurde nun 15 min. lang mittels IKA-Vibrax-Schüttler, Stufe 1400 durchmischt, abzentrifugiert (Hettrich Tischzentrifuge Mikro 12-24, Fa. Hettich, Tuttlingen) und der Überstand abgenommen. Das verbleibende Al_2O_3 mit den gebundenen Katecholaminen wurde zur Waschung mit 1 ml gekühltem Aqua bidest. versetzt und nochmals 5 min. geschüttelt, abzentrifugiert, der Überstand verworfen und mit 1000 µl Aqua bidest. in Extraktionssäulen überführt. Daraufhin wurden die Säulen kurz (ca. 30 sec.) geschüttelt, unten geöffnet und in Reagenzgläser gestellt. Die Extraktionssäulen wurden nun 10 min bei 2500 U/min abzentrifugiert, wobei durch den Filter im Boden der Extraktionssäulen nur das Wasser entweichen konnte, welches verworfen wurde. Die Säulen wurden wieder verschlossen, es wurden je 250 µl 0,1 M H_3PO_4 zu dem verbliebenen Aluminiumoxid (und somit den gebundenen Katecholaminen) zugegeben und das Gemisch 10 min geschüttelt. Die Proben wurden nun durch Zentrifugieren (10 min bei 2400 U/min) in Probengebervials überführt und mittels HPLC (siehe Kapitel 2.3 *Prinzip*) gemessen.

2.2.3.1.3 Glucosebestimmung im Urin

Um eine Kalibrierungsgerade herzustellen, wurde eine Glucosestammlösung (0,99085 g Glucose-Monohydrat in 50 ml Aqua bidest.) in aufsteigenden Verdünnungen (0 mmol/l bis 40 mmol/l) angesetzt, und das Glucose Reagenz (Sigma Kit No.17-UV, St. Louis, USA) währenddessen in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Nun wurden je zweimal 3 µl der unterschiedlichen Verdünnungen mit 300 µl Reagenz versetzt und nochmals für 3 Minuten bei 37°C inkubiert. Mit den Urinproben wurde gleichermaßen (3 µl Probe und 300 µl Reagenz) verfahren, wobei der Urin der diabetischen Tiere 1:20 verdünnt wurde. Nun konnte die Kalibrierungsgerade erstellt, bzw. die Proben gemessen werden. Die Messung erfolgte am Hitachi UV/VIS Spektrometer, bei einer Wellenlänge von λ=340 nm und einer Spaltbreite von λ=1 nm. Es wurden Hellma QS 1.0 ml Küvetten verwendet.

2.2.3.2 Clearanceversuche

- Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]
- Herzfrequenz [1/min]
- Hämatokrit [%]
- Urinvolumen [µl/min/100g]
- Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) [ml/min/100g]
- Natriumkonzentration im Plasma [mmol/l]
- Natriumkonzentration im Urin [µmol/min/100g]
- Fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) [%]
- Renin im Plasma [ng/ml]

2.2.3.2.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Sowohl systolischer als auch diastolischer Blutdruckwert wurden vom Schreiber ausgewertet und aufgezeichnet und der MAP nach 2.3.1 berechnet.

2.2.3.2.2 Herzfrequenz

Der arterielle Katheter war an ein analoges Signaltriggergerät angeschlossen, welches die Herzfrequenz aufzeichnete.

2.2.3.2.3 Hämatokrit

Die mit arteriellem Blut gefüllten Mikrohämatokritkapillaren wurden mit Knetmasse (Hämatokrit-Versiegelungskitt®, Fa. Brand) versiegelt, abzentrifugiert (Hettrich Hämatokrit®, Fa. Hettrich) und der Wert mit Hilfe einer Vorlage abgelesen. Der Plasmaüberstand wurde für weitere Analysen (siehe unten) abgenommen, während die korpuskulären Bestandteile verworfen wurden.

2.2.3.2.4 Urinvolumen

Der Urin der einzelnen Perioden wurde in PE-Gefäßen gesammelt, gewogen und das Leergewicht der Gefäße abgezogen.

2.2.3.2.5 GFR

Je 2 x 10 µl der Urin- und Plasmaproben wurden mit 5 ml einer Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold®, Fa. Packard) in speziellen Szintillationsgefäßen vermischt und mittels Messgerät (Szintillisationszähler 2 TR®, Fa. Canberra-Packard, Frankfurt) gemessen. Für die Berechnung der GFR (*siehe Kapitel 2.3.2*) wurde der Mittelwert der gemessenen Doppelwerte herangezogen.

2.2.3.2.6 Natriumkonzentration in Plasma und Urin

Die Urin- und Plasmaproben wurden aufgetaut, abzentrifugiert und die hergestellten Doppelproben (je 10 µl) mit 2 ml (Urinproben), bzw. 1 ml (Plasma) verdünnter (1:100) Lithiumlösung versetzt. Die flammenphotometrische Bestimmung erfolgte entsprechend der Beschreibung in *Kapitel 2.2.3.1.1*.

2.2.3.3 Dopaminbestimmung im Nierengewebe

Die bei -80°C gelagerten Nieren wurden in gekühlte, zuvor mit 2 ml Sulfosalicylsäure gefüllte und gewogene (Precisa®) Plastikröhrchen verbracht und sofort mittels Homogenisator (Ultra-Turrax T 25®, Fa. Janke & Kunkel) bei 24000 U/min zerkleinert. Darauf folgte eine erneute Gewichtsbestimmung, um das absolute Nierengewicht feststellen zu können. Dem Nierengewicht in g wurden nun die entsprechende Menge in µl des DHBA–Standards (siehe Kapitel 2.3 *Dopaminbestimmung im Urin)* zugesetzt, das Gemisch kurz vermengt und 1 Stunde auf Eis gestellt. Auch 2 Katecholaminstandards (je 500 µl + 25 µl Aqua bidest. + 25 µl DHBA-Standard) wurden angesetzt und ebenfalls eine Stunde im Eis gekühlt (Katecholaminstandard siehe *Kapitel 2.2.3.1.2.2*).

Darauffolgend wurden die Plastikröhrchen 10 min bei 4000 U/min mittels Hettrich-Zentrifuge abzentrifugiert, es wurden 2 x je 500 µl des Überstands abgenommen und in 2 ml Eppendorf–Cups pipettiert. Weiterhin wurde mit den Proben ab der Zugabe von 1 ml TRIS-Puffer entsprechend oben in *Kapitel 2.2.3.1.2* beschrieben, verfahren.

2.2.3.4 Reninbestimmung im Plasma

Im Rahmen der Clearanceversuche wurde arterielles Blut entnommen und mittels Zentrifugation Plasma gewonnen. Anhand eines spezifischen Radioimmunoassay wurde Angiotensin I bestimmt, welches durch die Plasma-Reninaktivität aus Angiotensinogen entsteht. Das Reninsubstrat bestand aus Plasma von beidseits nephrektomierten Ratten. Jede Probe wurde mit einem Proteaseinhibitor versetzt und für 90 Minuten bei 37°C inkubiert. Unter Zugabe von [^{125}J]-markiertem ANG I (NEN Life Science Products, Boston, USA) und einem spezifischen polyklonalen Anti-Ratten ANG I-Antikörper wurde alles sorgsam gemischt. Nach einer Äquilibrierungszeit von 18 Stunden bei 4°C wurde freies von gebundenem [^{125}J]-ANG I getrennt. Aus Aliquots des Überstandes wurde die Radioaktivität im Gamma-Zähler (COBRA, Packard, Heidelberg) gemessen [Albinus et al., 1998].

2.3 Berechnungen

2.3.1 Mittlerer arterieller Blutdruck:

Die systolischen und diastolischen Werte konnten aus den Aufzeichnungen des Druckschreibers abgelesen werden. Berechnet wurde der MAP anhand folgender Formel:

$$MAP\ [mmHg] = P_{diast} + 1/3\ (P_{syst} - P_{diast})$$

2.3.2 Glomeruläre Filtrationsrate

Dieser Wert wurde anhand der [^{3}H]-Aktivitäten von Inulin in Urin (A_{Urin}) und Plasma (A_{Plasma}) und mit Hilfe des Urinvolumens (UV) ermittelt und auf 100 g Körpergewicht bezogen.

$$\text{GFR [ml/min/100g]} = \frac{A_{Urin}}{A_{Plasma}} \text{ x UV}$$

2.3.3 Fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na})

Die Berechnung erfolgte mit Hilfe der Konzentration von Natrium im Urin und der Urinausscheidung. Die FE_{Na} ist ein Wert, welcher den Anteil der Natriumauscheidung am gesamten filtrierten Natrium angibt, wobei $U_{Na}V$ die Natriumauscheidung und P_{Na} die flammenphotometrisch gemessene Na–Konzentration im Plasma darstellt.

$$FE_{Na}\ [\%] = \frac{100 \times U_{Na} V}{P_{Na} \times GFR}$$

2.3.4 Elektrolytausscheidung im Urin

Die Berechnung erfolgte mittels flammenphotometrisch gemessener Natriumkonzentration im Urin (U_{Na}) und dem Urinvolumen (UV) pro definierter Zeit. Bezogen wurden die Werte auf 100 g Körpergewicht.

$$U_{Na}V\ [\text{mmol/24h/100g}] = U_{Na} \text{ x UV}$$

2.3.5 Dopaminausscheidung im Urin

Die Dopaminausscheidung wurde mittels HPLC gemessener Dopaminkonzentration im Urin (U_{DA}) und dem im Stoffwechselkäfig

gesammelten Urinvolumen (UV), bezogen auf 100 g Körpergewicht und unter Berücksichtigung der Molmasse von Dopamin bestimmt.

$$U_{DA}V\ [\text{nmol/6h/100g}] = \frac{U_{DA}V \times UV}{153}$$

2.3.6 Glucoseausscheidung im Urin

Mittels gemessener Glucosekonzentration im Urin (U_{Gl}) (bei den diabetischen Tieren wurde die 1:20 Verdünnung des Urins berücksichtigt) und dem Urinvolumen (UV) konnte die Glucoseausscheidung ($U_{Gl}V$) bestimmt werden. Das Ergebnis wurde auf 100 g Körpergewicht bezogen.

$$U_{Gl}V\ [\text{mmol/24h/100g}] = (U_{Gl} \times UV) \times 20$$

2.4 Statistik

Zunächst wurden die Daten der Einzeltiere zusammengefasst und als Mittelwerte ± SEM (standard error of means) pro Gruppe mittels Tabellenkalkulation Excel XP (Microsoft Corporation, Redmont, WA, USA) ausgewertet.

Die statistische Berechnung erfolgte mittels Instat Programm, Version 3.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Dabei wurden die Werte der diabetischen Tiere mit den Werten ihrer jeweiligen Kontrollgruppe verglichen, ebenso wurden die Werte der unterschiedlich ernährten Kontrollgruppen bzw. die diabetischen Gruppen mittels Varianzanalyse (ANOVA) ermittelt. Die Signifikanzen der einzelnen Gruppen wurden mit Hilfe des Bonferroni post-test errechnet. Der p-Wert wurde als Maß der statistischen Signifikanz herangezogen. Wenn dieser Wert < 0,05 betrug, wurde die Nullhypothese, welche besagt, dass zwei zu vergleichende Gruppen sich nicht unterscheiden, verworfen.

3 Ergebnisse

3.1 Tiergewicht, Blutglucose und systolischer Blutdruck

Alle Tiere wurden bezüglich ihres Gewichts, der Blutglucose und des systolischen Blutdrucks über den gesamten Versuchszeitraum beobachtet. Die Messungen fanden jeweils basal, das heißt einen Tag vor Steptozotocin (STZ)-Behandlung, am Tag 7 und am Tag 14 - gerechnet nach STZ-Behandlung - statt. Basal erhielten alle Tiere Normalsalzernährung, ab Tag 7 wurden die Tiere ihrer jeweiligen Gruppenzuteilung entsprechend mit Normalsalz-, Hochsalz-, bzw. Niedrigsalzdiät ernährt. Eine Übersicht findet sich in Tabelle 1.

3.1.1 Tiergewicht

Zu Beginn der Verlaufsmessungen wogen die Tiere zwischen 257 und 280 g. (siehe Abb. 1). Während die Kontrolltiere in den ersten 7 Tagen zwischen 37 und 46 g und in den weiteren 7 Tagen zwischen 24 und 30 g zunahmen, war die Gewichtsentwicklung der diabetischen Tiere deutlich geringer, es zeigten sich bei allen drei unterschiedlichen Ernährungsgruppen signifikant geringere Gewichtssteigerungen im Vergleich zu den Kontrollen (siehe Tab. 1). Die Gewichtszunahme in den ersten 7 Tagen betrug zwischen 7 und 15 g, in den folgenden 7 Tagen zwischen 2 und 17 g.

Die deutlichste Gewichtszunahme zeigte sich in der HS-Gruppe nach Ernährungsumstellung (Messung Tag 14), sowohl bei den diabetischen als auch bei den Kontrolltieren, allerdings erreichten sie im direkten Vergleich zu ihrer jeweiligen NS-, bzw. LS-Gruppe am Tag 14 nicht das Signifikanzniveau.

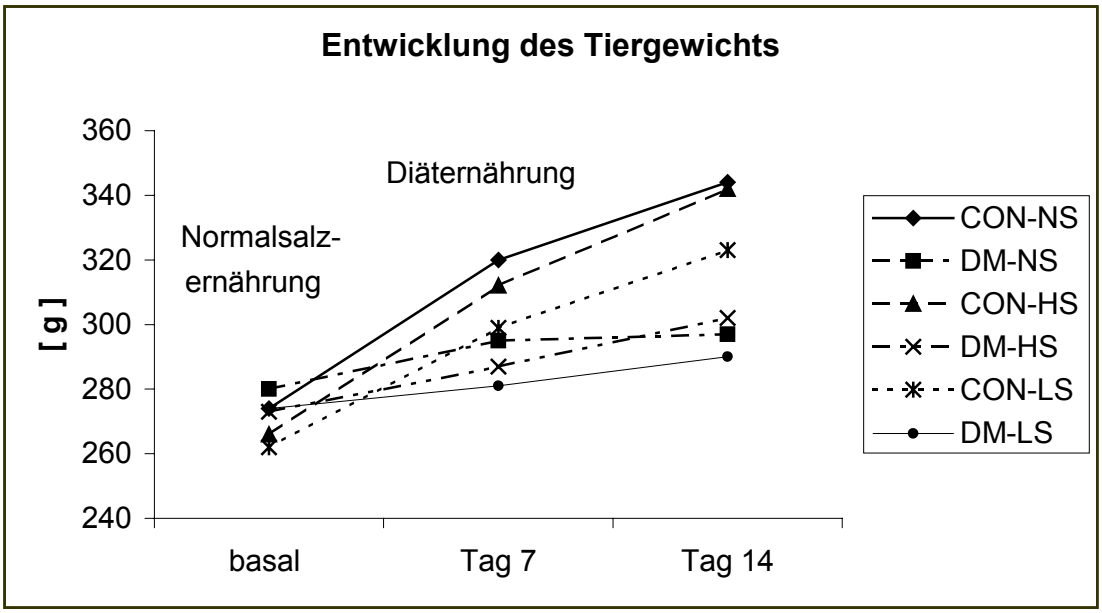

Abbildung 1: Sowohl Kontroll-, als auch diabetische Tiere wurden basal (alle Tiere bekamen Normalsalzernährung), am Tag 7 (unter Normal-, Hoch- bzw. Niedrigsalzernährung) und am Tag 14 gewogen. Signifikanzen ergaben sich am Tag 14 bei den diabetischen Tieren im Vergleich mit ihren jeweiligen Kontrolltieren: DM-NS vs. CON-NS ($p < 0,001$), DM-HS vs. CON-HS ($p < 0,01$), DM-LS vs. CON-LS ($p < 0,01$). Aufgetragen und in der Legende verzeichnet sind die verwendeten Tiergruppen. CON: n=36; DM: n=38. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Mittelwerte in g.

3.1.2 Blutglucose

Basal hatten alle Tiere einen Blutglucosewert im Normbereich um 90 mg/dl (siehe Tabelle 1). Erwartungsgemäß zeigten die mit Steptozotocin behandelten Tiere nach 2 Tagen eine hoch signifikante Hyperglykämie ($p < 0,001$). Einen Effekt der Ernährungsumstellung in Bezug auf die Blutglucose zeigte sich bei den Niedrigsalzernährten diabetischen Tieren im Anschluß an die Ernährungsumstellung, bei denen im Vergleich zu den Normal- und Hochsalzernährten Ratten ein signifikanter Anstieg der Blutglucose zu verzeichnen war (DM-NS vs. DM-LS $p < 0,001$). Am Tag 7 (Messung nach Ernährungsumstellung) lag der Blutglucosewert mit 542,0 ± 19,6 mg/dl 46 % über dem Basalwert (Tag 2 unter Normalsalzernährung) von 378,2 ± 26,6 mg/dl. Während die DM-LS-Gruppe auch am Tag 14 einen Blutglucosewert von 506 mg/dl aufwies, konnten diese hohen Werte bei den DM-LS_{impl}-Tieren

abgefangen werden, in dem ihnen am Tag 11 ein Insulindepotpräparat implantiert wurde. Diese Tiere zeigten daraufhin am Tag 14 moderate Blutzuckerwerte von 328 mg/dl.

3.1.3 Blutdruckmessungen an wachen Ratten

Pro Tier wurden 3 Messungen durchgeführt, deren Werte gemittelt wurden (siehe Kapitel 2.2). Aus den Blutdruckwerten aller Tiere einer Gruppe wurden für jeden Messtag wiederum die Mittelwerte gebildet. Initial, d. h. unter Normalsalzernährung und ohne Diabetes–Induktion variierten die systolischen Blutdruckwerte in einem Bereich zwischen 102 mmHg und 115 mmHg. Bei der hochsalzernährten Gruppe und bei den CON-NS-Tieren zeigten sich erhöhte Blutdruckwerte bei Messung am Tag 14 ohne das Signifikanzniveau zu erreichen; bei den CON-HS zeigte sich nach Ernährungsumstellung eine Steigerung um 9 % von 117 auf 126 mmHg, bei den DM-HS eine Steigerung um 5 % von 122 auf 127 mmHg und bei den CON-NS steigerte sich der Blutdruck um 4 % von 113 auf 117 mmHg. Bei den übrigen Gruppen war eine Senkung des Blutdrucks, bzw. keinerlei Schwankung zu beobachten; bei den DM-NS verringerte sich dieser um 2 % von 119 auf 116 mmHg, bei den DM-LS um 6 % von 124 auf 117 mmHg und bei den CON-LS blieb der Blutdruck in einem Bereich von113 mmHg konstant.

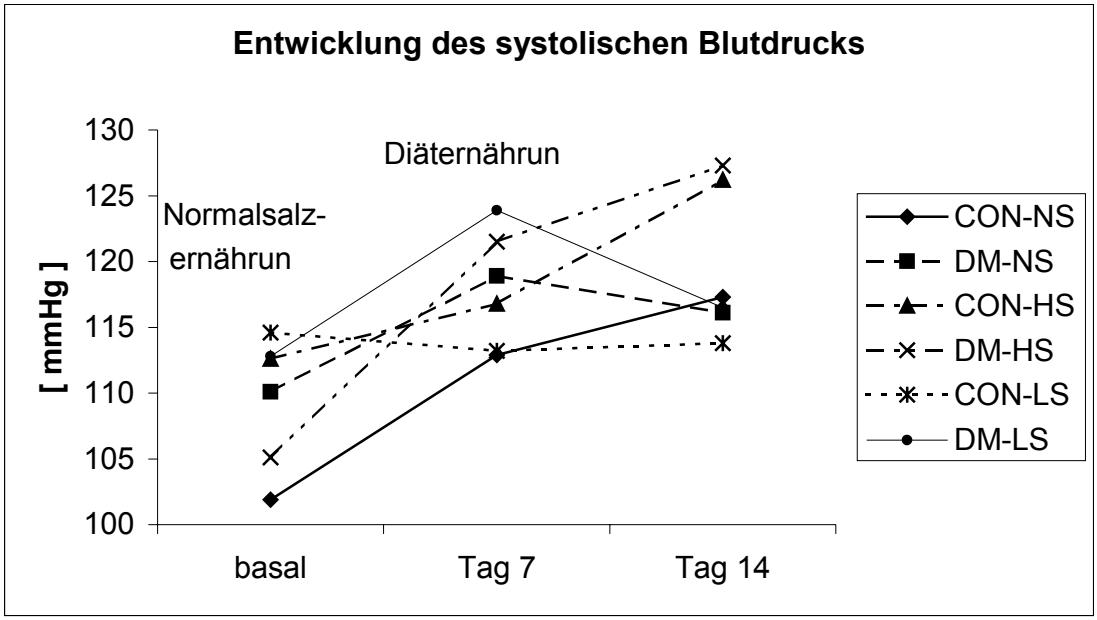

Abbildung 2: Die Blutdruckmessungen wurden basal unter Normalsalzernährung, am Tag 7 und 14 unter entsprechender Diäternährung vorgenommen. CON: n=36; DM: n= 38. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Dargestellt sind die Mittelwerte der unterschiedlichen Gruppen (siehe Legende Abb.1) in mmHg.

3.2 Stoffwechselkäfigversuche an wachen Ratten

Eine Übersicht über die Ergebnisse der Stoffwechselkäfigversuche ist in Tabelle 2 (SWK I nach 6 Tagen), bzw. in Tabelle 3 (SWK II nach 15 Tagen) dargestellt.

3.2.1 SWK I

Im SWK-Versuch I erhielten die Tiere entsprechend des Versuchsdesigns alle Normalsalzernährung. So ergibt sich, wie zu erwarten, ein sehr ausgeglichenes Bild der einzelnen Parameter im direkten Vergleich der Kontrolltiere, bzw. der diabetischen Tiere miteinander.

3.2.1.1 Physiologische Parameter

Aufgrund des erhöhten Blutglucosewertes zwischen 289 ± 23 mg/dl und 414 ± 60 mg/dl der diabetischen Tiere (siehe Abb. 3 und 4) und der daraus resultierenden diabetischen Stoffwechsellage, welche sich auch in einem 4-10 % geringeren Körpergewicht gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe äußert, resultiert das um das vierfach erhöhte Trinkvolumen, die mit 40-60 % signifikant gesteigerte Futteraufnahme und höhere renale Ausscheidungsparameter.

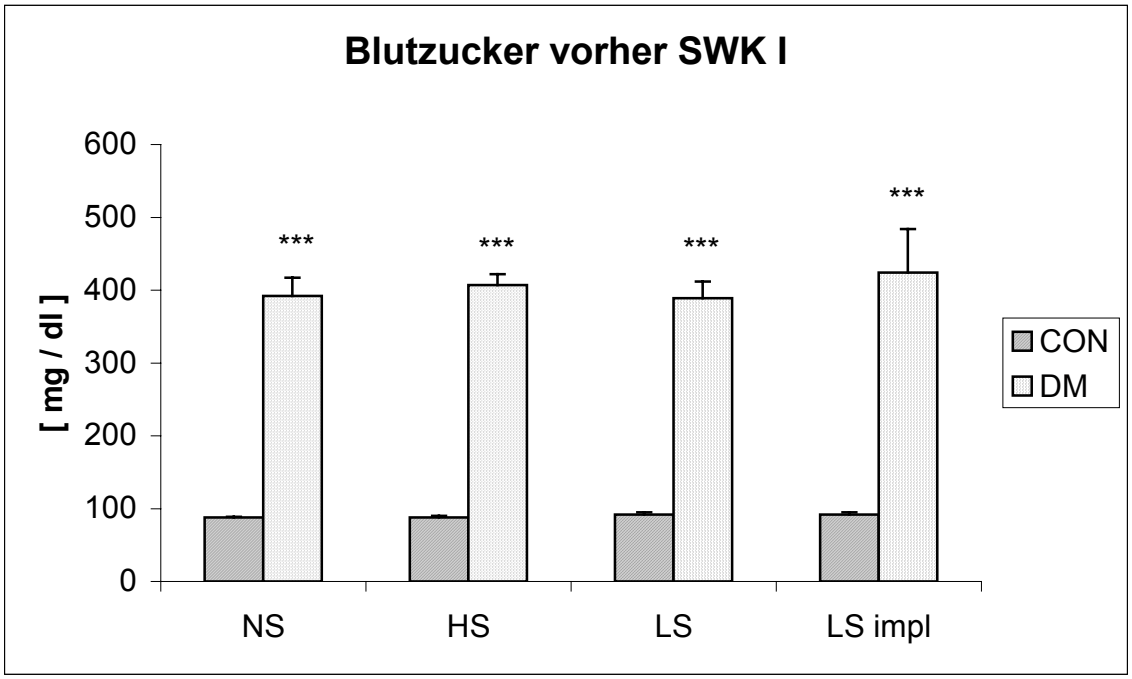

Abbildung 3: Blutglucose gemessen unmittelbar bevor die Tiere in den Stoffwechselkäfig gesetzt wurden. Alle Tiere erhielten Normalsalzernährung. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Aufgezeichnet sind Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikant höhere Werte der diabetischen Tiere gegenüber ihren Kontrollgruppen sind gekennzeichnet. DM vs. CON *** p < 0,001

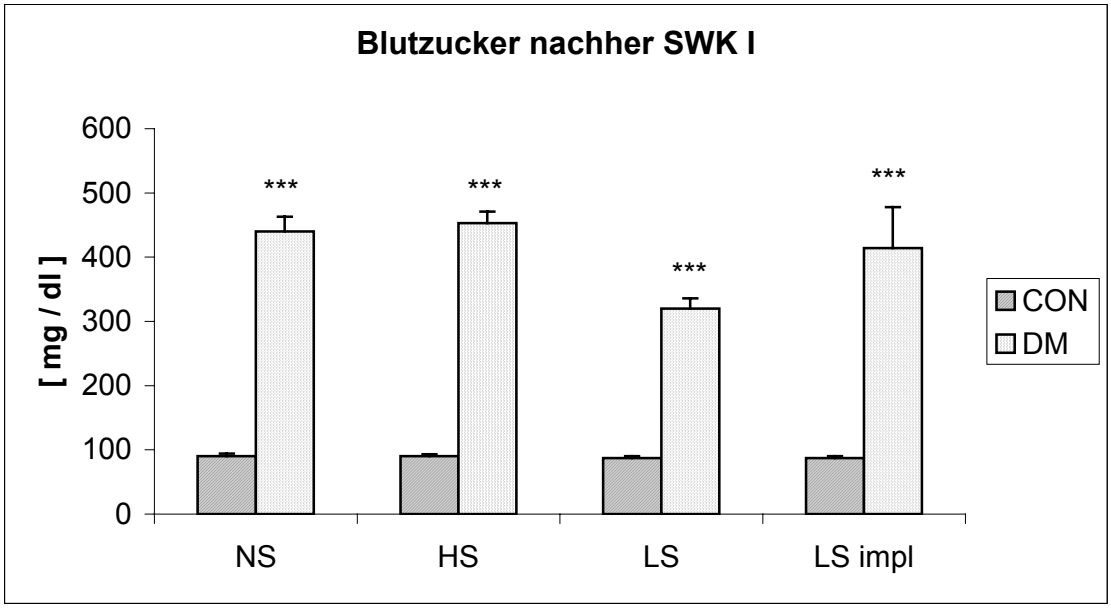

Abbildung 4: Blutglucose gemessen, nachdem die Tiere aus dem Stoffwechselkäfig entnommen wurden. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Angaben in Mittelwerten ± SEM. Statistische Signifikanzen sind gekennzeichnet. DM vs. CON *** p < 0,001

3.2.1.2 Ausscheidungsparameter

Aufgrund der diabetischen Stoffwechsellage resultierte die um 20% erhöhte Glucoseausscheidung. Das Urinvolumen nahm einen bis zu 11-fach gesteigerten Wert an, die Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Urin lagen bis zu doppelt so hoch im Vergleich zu den nicht diabetischen Tieren (siehe Abb. 5 und 6).

Die Dopaminausscheidung bei den Kontrolltieren lag in einem Bereich zwischen 1,09 ± 0,5 und 1,30 ± 0,25 nmol/6h/100g und bei den diabetischen Tieren zwischen 1,35 ± 0,15 und 1,67 ± 0,29 nmol/6h/100g. Folgernd zeigte sich, unabhängig von der Salzdiät, eine tendenziell gesteigerte Dopaminausscheidung bei den diabetischen Tieren, welche das Signifikanzniveau jedoch nicht erreichte (siehe Abb. 7).

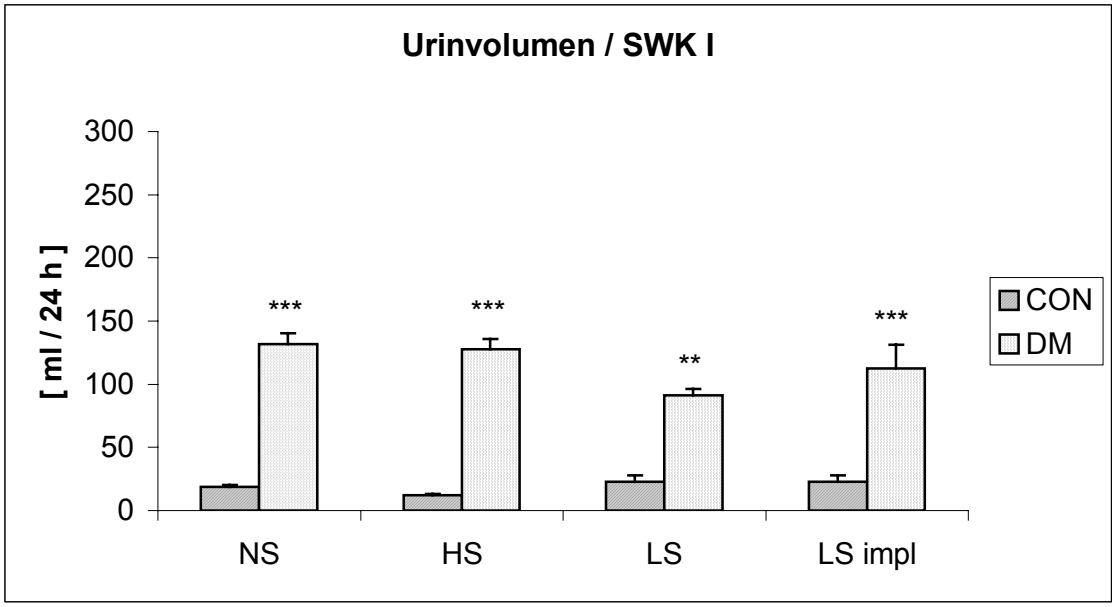

Abbildung 5: Der Urin wurde über einen Zeitraum von 24 h gesammelt. Alle Tiere erhielten Normalsalzernährung. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Angaben der Mittelwerte ± SEM. Signifikanzen:

DM vs. CON ** p < 0,01, *** p < 0,001

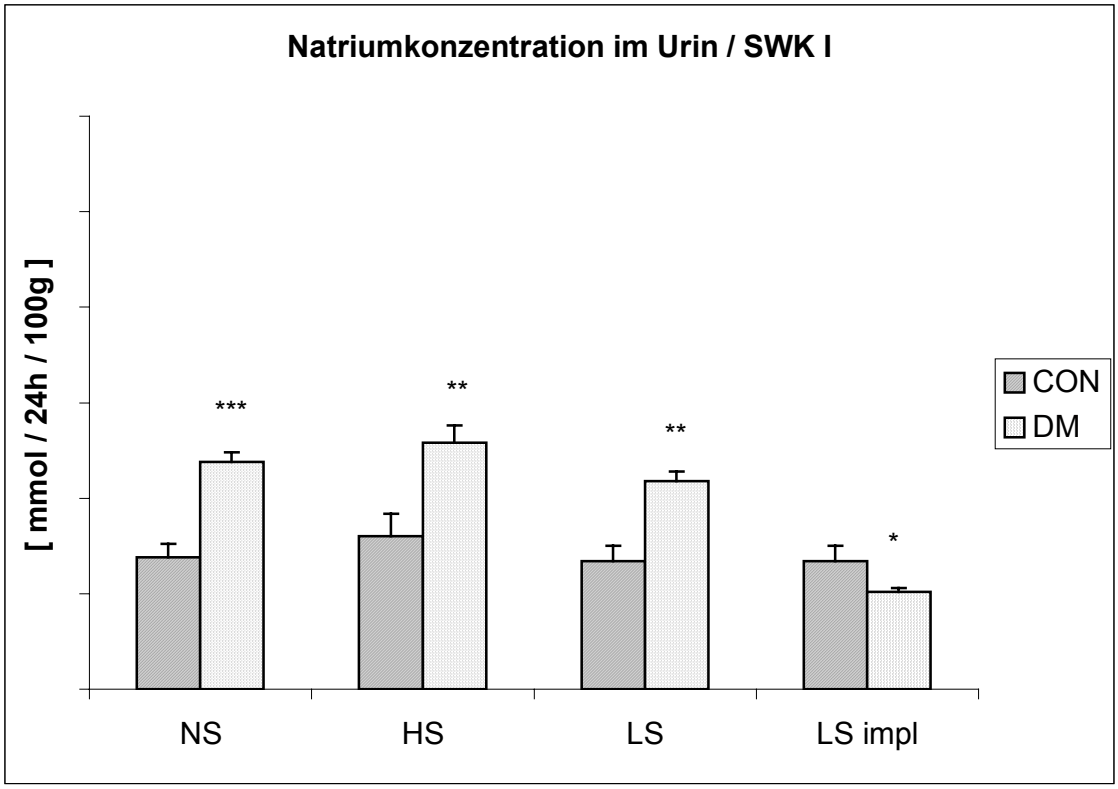

Abbildung 6: Der Urin wurde über einen Zeitraum von 24 h gesammelt und mittels flammenphotometrischer Bestimmung ausgewertet. Alle Tiere erhielten Normalsalzernährung. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Angegeben sind die Mittelwerte ± SEM. Signifikanzen:

DM vs. CON * p < 0,05 ** p < 0,01 *** p < 0,001 **** p < 0,0001

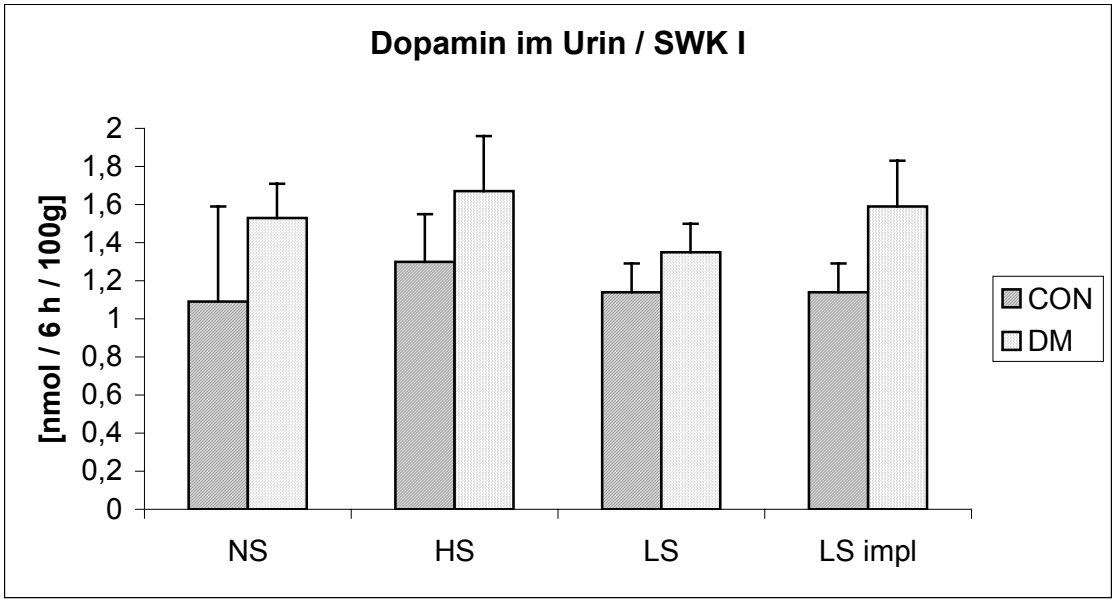

Abbildung 7: Der Urin wurde über einen Zeitraum von 6 h in einem mit Konservierungsmittel vorgelegten Gefäß gesammelt. Während dieser Zeitspanne erhielten die Tiere keine Nahrung. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Darstellung der Mittelwerte ± SEM. Es konnten keine signifikante Unterschiede gezeigt werden.

3.2.2 SWK II

Unter modifizierten Ernährungsbedingungen (Normalsalz-, Hochsalz-, bzw. Niedrigsalzernährung) konnten ähnlich signifikante Unterschiede zwischen den diabetischen Tieren und ihren jeweiligen Kontrolltieren wie in SWK I festgestellt werden. Besonders hervorzuheben sind nun aber deutlich signifikante Unterschiede in Bezug auf die unterschiedlichen Diäternährungen im Vergleich der diabetischen Tiere untereinander, bzw. der nicht behandelten Tiere untereinander.

3.2.2.1 Physiologische Parameter

Bei den niedrigsalzernährten diabetischen Tieren konnte eine signifikante Steigerung des Blutglucosewertes gegenüber den Hoch- (35 % Steigerung) und Normalsalzernährten (60 % Steigerung) Tieren festgestellt werden (siehe Abb. 8 und 9), welches sich auch im Tiergewicht widerspiegelte: Die NS-Tiere blieben im Bereich der 10 % Gewichtsminderung gegenüber ihrer Kontrollgruppe (siehe auch Kapitel SWK I, Physiologische Parameter). Bei den HS-Tieren waren es 13% Verringerung des Gewichts und bei den LS-Tieren - wie bei dem hohen Blutglucosewert (592 ± 7 mg/dl) zu erwarten - eine Gewichtsreduktion um 16 %. Wobei die Gewichtsreduktion auch aus der im Mittel 20% verminderten Nahrungsaufnahme der LS-diabetischen als auch nicht diabetischen Tiere im Vergleich zu ihren jeweiligen NS-ernährten Tieren resultierte.

Während sich das Trinkvolumen bei den Kontrolltieren im Mittel zwischen 38 und 47 ml (gesteigertes Volumen bei den HS-Tieren aufgrund der erhöhten Salzaufnahme) bewegte, zeigte sich ein signifikant gesteigertes ($p < 0,001$) Trinkvolumen bei der DM-LS-Gruppe (277,9 ± 7,7 ml) im Vergleich zur DM-NS- (171,1 ± 20,9 ml) und DM-HS-Gruppe (211,0 ± 8,4 ml).

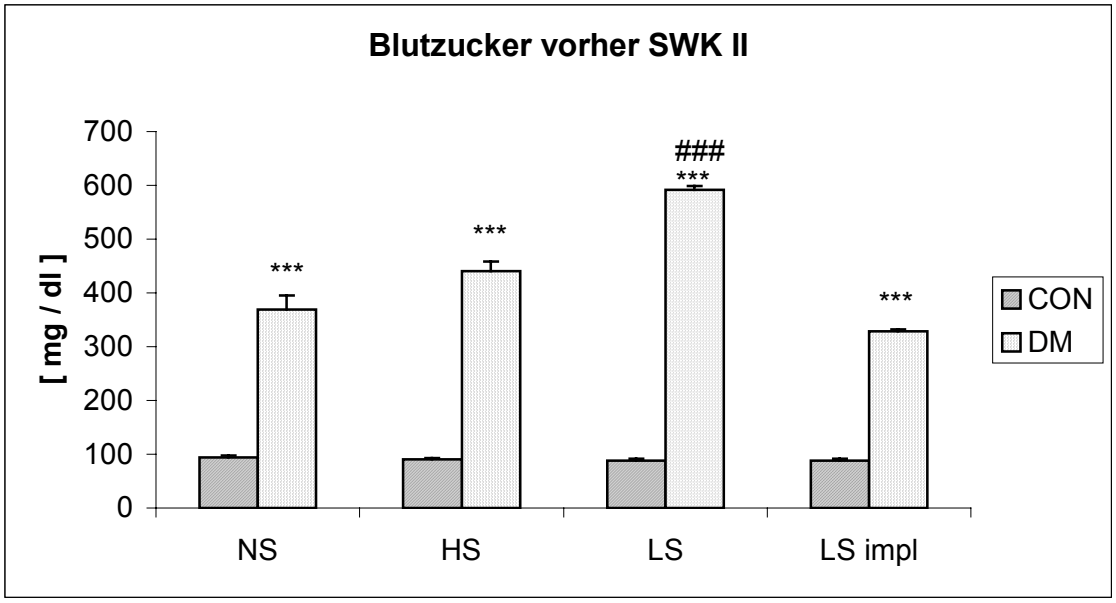

Abbildung 8: Die Blutglucose wurde unmittelbar vor dem Stoffwechselkäfig gemessen. Die Tiere wurden entsprechend ihrer Zuteilung Normalsalz (NS) -, Hochsalz (HS) - bzw. Niedrigsalz (LS)-ernährt. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Darstellung in Mittelwerten ± SEM. Statistische Signifikanzen sind angezeigt:

DM vs. CON *** $p < 0,001$, DM-LS vs. DM-NS ### $p < 0,001$

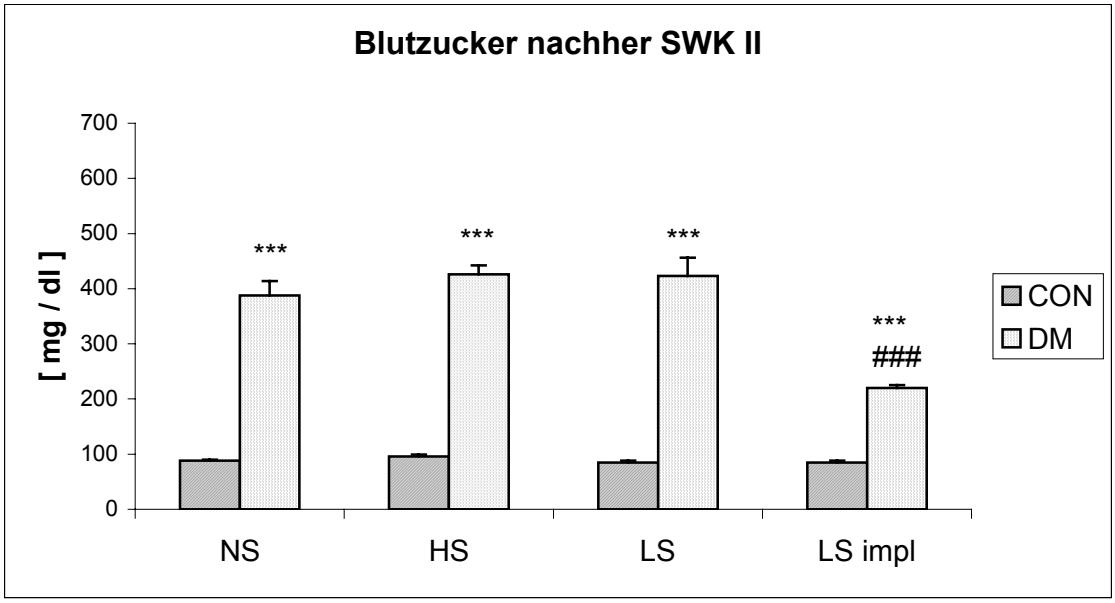

Abbildung 9: Die Blutglucose wurde direkt nach Beendigung des Stoffwechselkäfigversuchs unter modifizierten Ernährungsbedingungen gemessen. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Die Werte wurden als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Die statistisch signifikanten höheren Blutglucosewerte der diabetischen Tieren gegenüber ihren Kontrolltieren sind gekennzeichnet.

DM vs. CON *** p < 0,001, DM-LS impl vs. DM-NS ### p < 0,001

3.2.2.2 Ausscheidungsparameter

Das Urinvolumen bei den NS- und LS-Kontrolltieren lag in einem Bereich von 14 ml/24h (CON-NS) bis 26 ml/24h (CON-LS), während es bei den CON-HS-Tieren gegenüber den CON-NS-Tieren zu einer nahezu 4-fachen Erhöhung des Urinvolumens kam. Bei der DM-NS-Gruppe trat ein 9-fach höheres Urinvolumen im Vergleich zu ihren Kontrollen auf, bei den DM-HS-Tieren nahm es einen 3,5-fachen Wert an, bei der DM-LS-Gruppe war das Urinvolumen ebenfalls um den Faktor 9 erhöht. Das höchste Urinvolumen mit im Mittel 224 ml/24h konnte somit bei der DM-LS-Gruppe verzeichnet werden (siehe Abb.10).
Entsprechend der Salzdiät trat eine unterschiedliche Natriumausscheidung im Urin auf: Bei den hochsalzernährten CON-Tieren war die Natriumkonzentration im Urin 8-fach erhöht im Vergleich zu den CON-NS-Tieren, bei den CON-LS-Tieren im Vergleich zu den CON-NS-Tieren gar 16-fach erniedrigt. Die Natriumkonzentration bei den diabetischen Tieren der Normalsalz- und Niedrigsalzgruppe war gegenüber ihren Kontrollgruppen um den Faktor 2 erhöht, hingegen war eine Steigerung bei den Hochsalzernährten diabetischen Tieren gegenüber der HS-CON-Gruppe nur noch um 20% möglich, da diese entsprechend ihrer Hochsalzernährung einen 4-fach erhöhten Natriumwert aufwiesen (siehe Abb.11).
Bei der Dopaminausscheidung im Urin ließ sich nur bei den NS-, bzw. HS-diabetischen Tieren eine Steigerung um 9% (bei den NS-Tieren) bzw. um 33% (bei den HS-Tieren) im Vergleich zu ihren Kontrollen erkennen. Die LS-Tiere schieden Dopamin in einem Bereich zwischen 0,56 ± 0,11 und 0,64 ± 0,06 nmol/6h/100g aus. Das heißt sowohl bei den CON-Tieren als auch bei den DM-Tieren wurde ein signifikant ($p < 0,01$) geringerer Dopamingehalt im Urin gegenüber den NS-CON- bzw. NS-DM-Tieren festgestellt (siehe Abb.12).

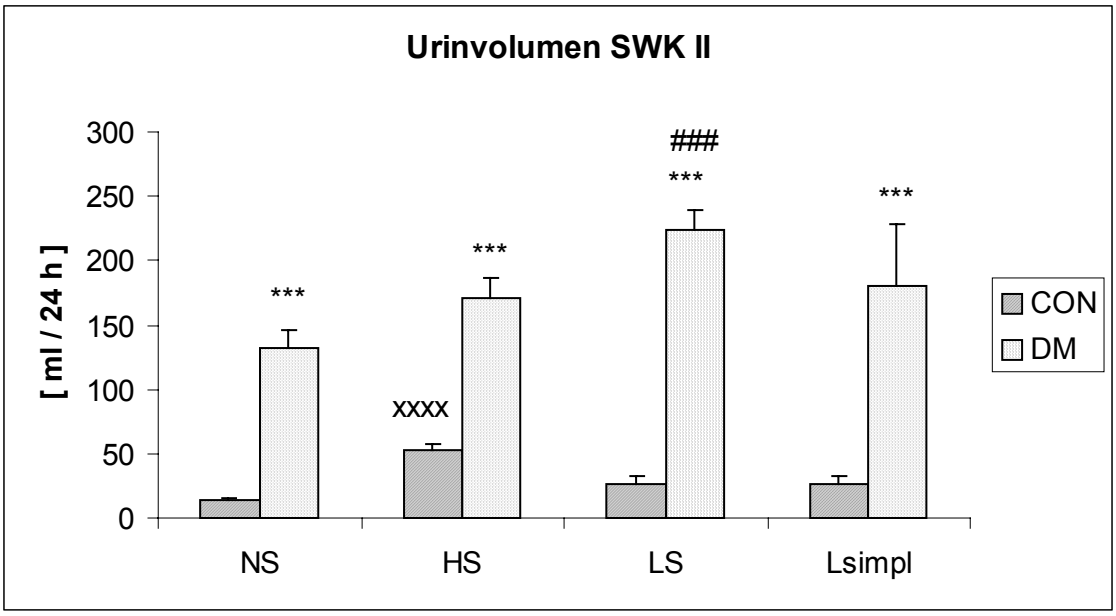

Abbildung 10: Der Urin wurde über einen Zeitraum von 24 h gesammelt, die Tiere erhielten unterschiedliche Ernährung. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Angaben der Werte in Mittelwerten ± SEM. Signifikanzen sind gekennzeichnet: DM vs. CON *** p < 0,001, DM-LS vs DM-NS ### p < 0,001, CON-HS vs. CON-NS xxxx p < 0,0001

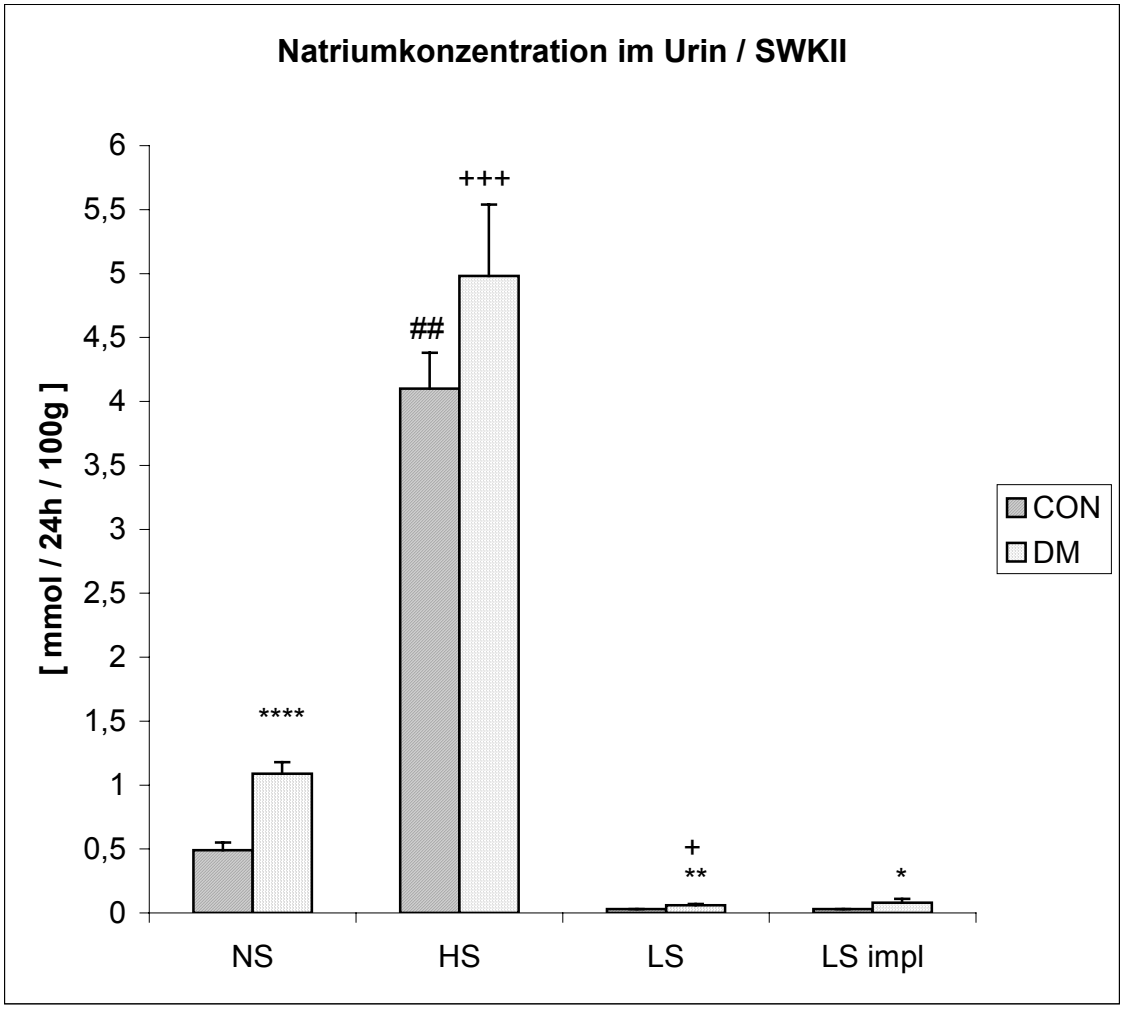

Abbildung 11: Der Urin wurde über einen Zeitraum von 24 h gesammelt und mittels Flammenphotometrie ausgewertet. Die Tiere erhielten entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit Normalsalz (NS) -, Hochsalz (HS) – oder Niedrigsalz (LS) – Ernährung. CON: n=36; DM: n=43. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. Statistische Signifikanzen sind: DM vs. CON * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$, CON-HS vs. CON-NS ### $p < 0,001$, DM-LS bzw. DM-HS vs. DM-NS + $p < 0,05$ +++ $p < 0,001$

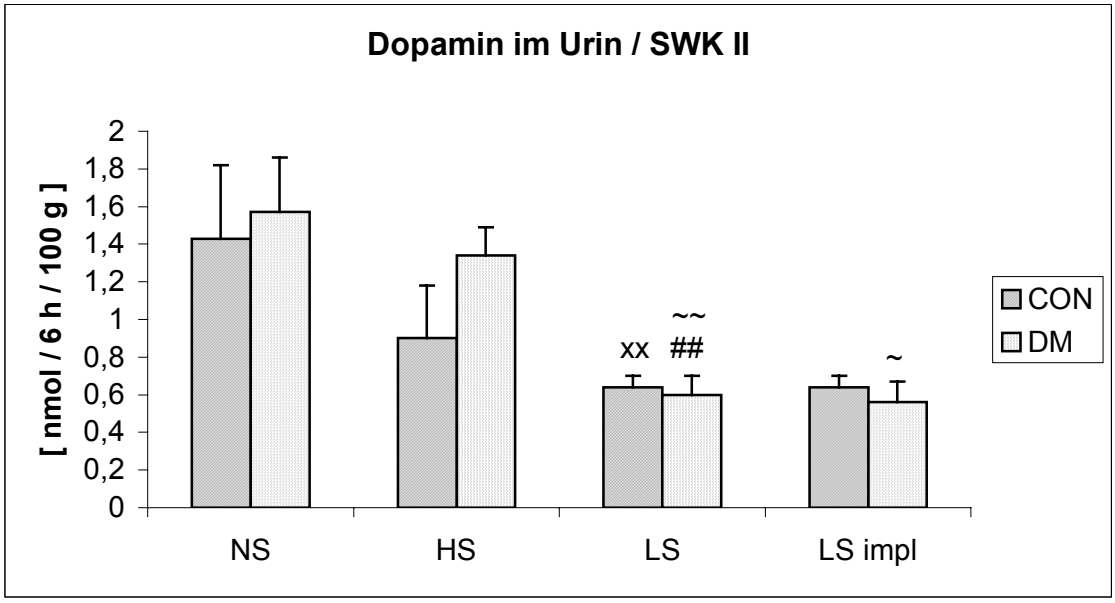

Abbildung 12: Der Urin wurde über einen Zeitraum von 6 h gesammelt. Während dieses Zeitraumes wurden die Tiere nüchtern gehalten. Darauf folgend erhielten die Tiere entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit Normalsalz (NS) -, Hochsalz (HS) - oder Niedrigsalz (LS) -Ernährung. CON: n=36; DM: n=43. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Angaben der Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikant verminderte Werte waren: CON-LS vs. CON-NS xx $p < 0,01$, DM-LS vs. DM-NS ## $p < 0,01$, DM-HS vs. DM-LS ~~ $p < 0,001$, DM-HS vs. DM-LS impl ~ $p < 0,01$

3.2.3 Clearanceversuche an narkotisierten Ratten

3.2.3.1 Systemische Parameter

Wie in Tabelle 4 dargestellt, waren die Versuchsbedingungen für alle zu untersuchenden Gruppen stabil. Herzfrequenz und Hämatokrit variierten aufgrund der interindividuellen Schwankungen geringfügig (Herzfrequenz im Mittel zwischen 338 Schläge/min ± 11 Schläge/min und 370 Schläge/min ± 13 Schläge/min, Hämatokrit im Mittel zwischen 42,8 % ± 1,1 % und 47,0 % ± 0,6 %). Da den diabetischen Tieren aufgrund des erhöhten Flüssigkeitsbedarfes 1,5 % des KG infundiert wurden, weist der ausgeglichene Hämatokrit auf eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr hin. Der mittlere arterielle Blutdruck bewegte sich in einem Bereich zwischen 102,7 mmHg ± 4,2 mmHg und 108,3 mmHg ±

3,9 mmHg, lediglich bei den diabetischen hochsalzernährten Tieren zeigte sich ein Anstieg des MAP auf 112,8 mmHg ± 3,4 mmHg.

3.2.3.2 Renale Hämodynamik

Wie erwartet zeigten die diabetischen Tiere in allen Gruppen (unter verschiedenen Ernährungen) gegenüber ihren nicht diabetischen Kontrollgruppen eine signifikante ($p < 0,01$ bei NS und HS, bzw. $p < 0,05$ bei LS) Steigerung der GFR um 22 (NS-Gruppe) bis 25 % (LS- und HS-Gruppe) (siehe Tabelle 4). Eine Auswirkung der unterschiedlichen Salzbeladungen der Nahrung auf die GFR konnte nicht gezeigt werden. Bei allen drei Kontrollgruppen lag die GFR in einem Bereich zwischen 0,75 ± 0,05 und 0,81 ± 0,05 ml/min/100g. Bei den diabetischen Tieren äußerte sich die Hyperfiltration durch GFR-Werte zwischen 1,0 ± 0,06 und 1,08 ± 0,07 ml/min/100g.

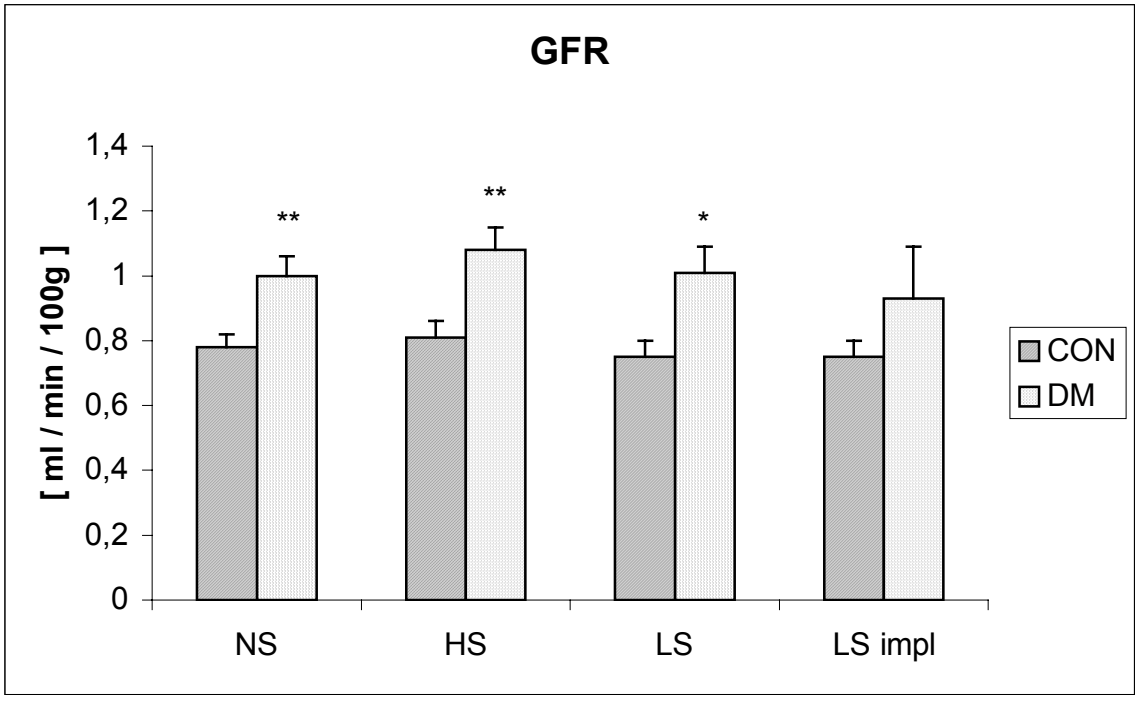

Abbildung 13: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR), bestimmt mittels Inulinclearance. CON: n=36; DM: n=41. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Abgebildet sind Mittelwerte ± SEM. Statistisch signifikant höhere Werte der diabetischen Tiere gegenüber ihren Kontrolltieren sind gekennzeichnet: DM vs. CON * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.2.3.3 Ausscheidungsparameter

Wie zu erwarten war, zeigte sich bei den hochsalzernährten Tieren im Vergleich zu den normalsalzernährten Tieren eine 40 %-ige Steigerung des Urinvolumens, bei den diabetischen Tieren war das Urinvolumen gar doppelt so hoch im Vergleich zu den NS-diabetischen Tieren, während bei den niedrigsalzernährten Tieren die Urinausscheidung im einem vergleichbaren Bereich wie bei den NS-Tieren lag (siehe Tabelle 4). Auffallend war, dass es in dieser Gruppe keine Steigerung bei den diabetischen Tieren gab, es kam sogar zu einem 8 %-igen Abfall des Urinvolumens. Bei den Normalsalzernährten diabetischen Tieren steigerte sich das Urinvolumen im Vergleich zu ihren Kontrollen um 23 %, bei den HS-DM-Tieren betrug die Steigerung 35 % (siehe Abb. 14)

Die Tendenzen der Natriumausscheidung verhielten sich ähnlich derer der Urinausscheidung. Bei den CON-HS-Tieren zeigte sich eine Steigerung um 66 %, bei den diabetischen Tieren stieg die Natriumausscheidung im Urin um 37 % im Vergleich zu den NS-Tieren an. Bei den LS-Tieren kam es zu einem Abfall um 53 % bei den diabetischen Tieren im Vergleich zu ihren Kontrollen.

Die Natriumkonzentration im Plasma bewegte sich bei allen Tieren im Mittel in einem Bereich von 141,3 $\pm$ 1,8 mmol/l (DM-NS) bis 148,5 $\pm$ 5,6 mmol/l (CON-HS). Die fraktionelle Natriumausscheidung verhielt sich ähnlich wie die Natriumausscheidung im Urin. Bei den DM-NS-Tieren verdoppelte sich der Wert im Vergleich zu ihren Kontrollen. Bei den DM-HS-Tieren kam es im Vergleich zu den DM-NS-Tieren zu einer Steigerung um 40 %, während der Wert im Vergleich zu ihren direkten Kontrolltieren keine große Steigerung zeigte. Bei den DM-LS-Tieren kam es wiederum zu einem 50 %-igen Abfall im Vergleich zu ihren Kontrollen.

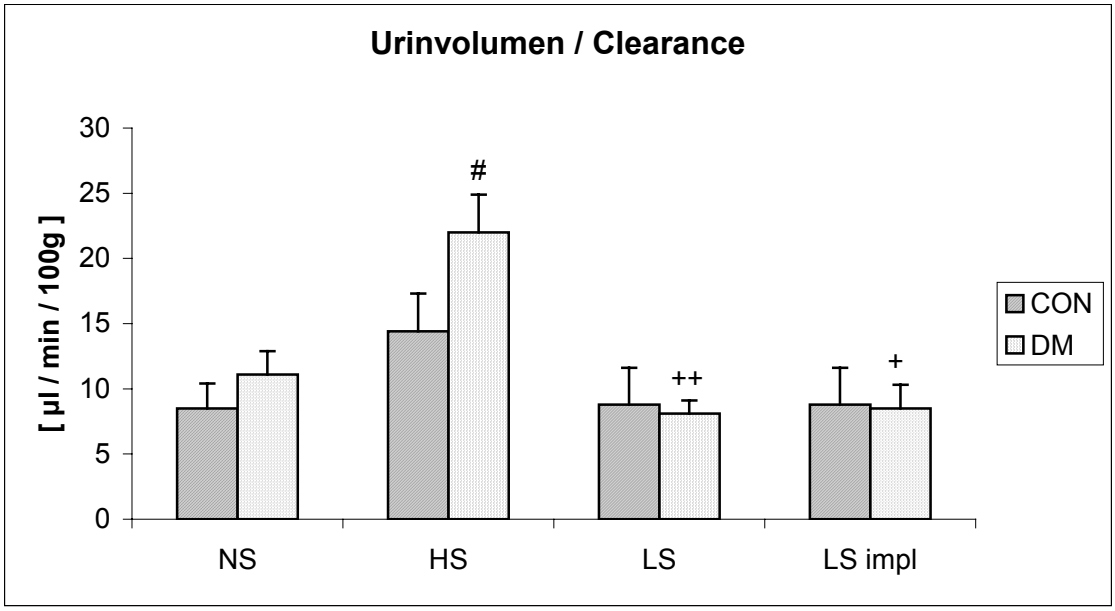

Abbildung 14: Der Urin wurde über den gesamten Zeitraum des Experiments von 4 mal 20 min gesammelt. CON: n=36; DM: n=41. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. Signifikanzen: DM-NS vs. DM-HS # $p < 0,01$, DM-HS vs. DM-LS, bzw. DM-LS_{impl} + $p < 0,05$ ++ $p < 0,001$

3.2.4 Dopamingehalt im Nierengewebe

Bei Vergleich des Dopamingehaltes im Nierengewebes konnten keinerlei signifikante Unterschiede, weder in Abhängigkeit von der diabetischen Stoffwechsellage noch von der unterschiedlichen Salzdiät nachgewiesen werden. Tendenziell konnte bei den diabetischen Tieren, außer bei den Linplant –implantierten ein minimal geringerer Dopamingehalt festgestellt werden (siehe Abb. 15).

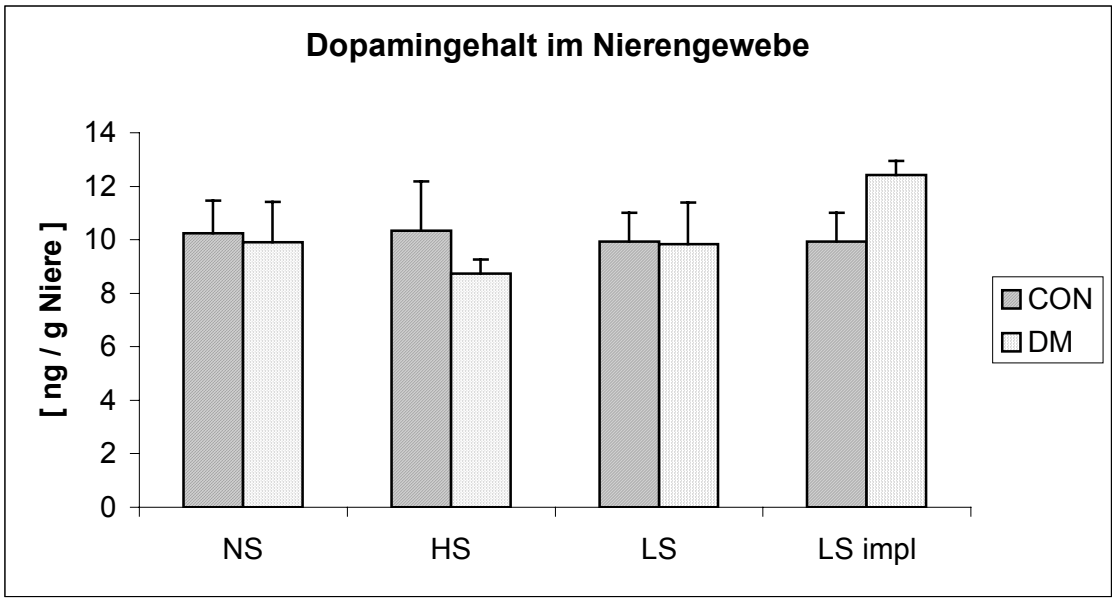

Abbildung 15: Dopamingehalt im gesamten Nierengewebe, welches per HPLC analysiert wurde. CON: n=36; DM: n=41. Pro Gruppe n=6-14 Tiere. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. Es konnten keine Signifikanzen aufgezeigt werden.

3.2.5 Renin im Plasma

Bei Vergleich des Reningehalts im Plasma von diabetischen Tieren mit Kontrolltieren in jeder Ernährungsgruppe konnte kein signifikanter Unterschied

festgestellt werden. Jedoch konnte die physiologische Aktivierung des RAAS bei den niedrigsalzernährten Tieren, bzw. die Hemmung bei den hochsalzernährten Tieren dargestellt werden (siehe Abb. 16).

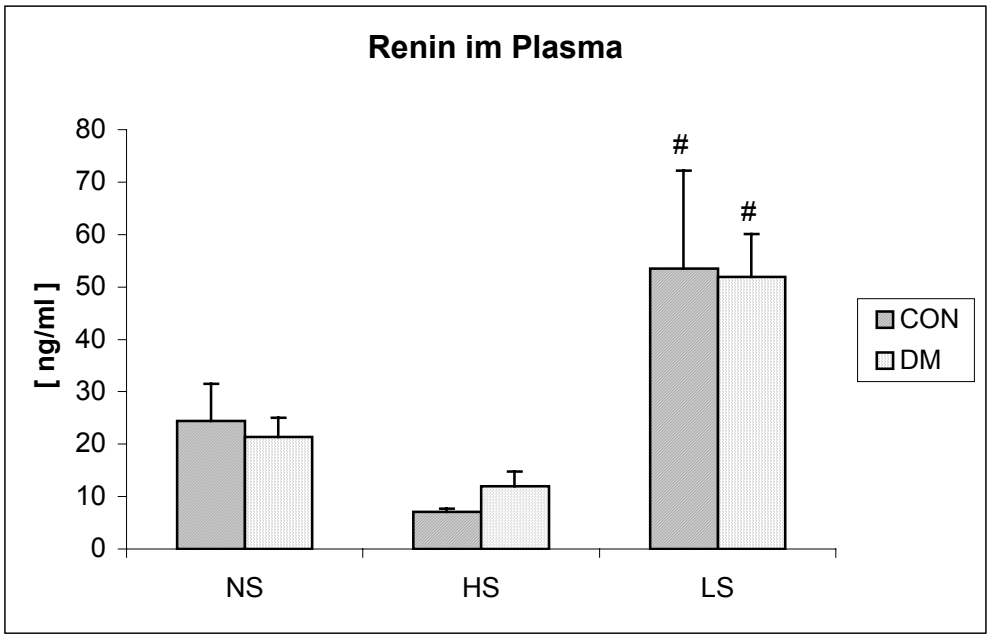

Abbildung 16: Reninbestimmung im Plasma. Im Rahmen der Clearanceversuche wurde den Tieren arterielles Blut abgenommen, aufbereitet und anhand der Fähigkeit der Plasma-Reninaktivität, Angiotensinogen in Angiotensin I umzuwandeln, ausgewertet. CON: n=22 Tiere; DM: n=34 Tiere. Pro Gruppe n= 5-14 Tiere. Angegeben sind Mittelwerte ± SEM. Signifikanzen: CON-HS vs. CON-LS, bzw. DM-HS vs. DM-LS # $p < 0,01$

Tabelle 1: Tiergewicht, Blutglucose und systolischer Blutdruck, jeweils basal, bzw. am 2., 7. und 14. Tag nach STZ-Injektion gemessen. Basal erhielten die Tiere alle Normalsalzernährung, ab Tag 7 bekamen sie entsprechend ihrer Zuteilung Diäternährung unterschiedlichen Salzgehaltes. Signifikanzen sind innerhalb der Tabelle bezeichnet und unten näher erläutert.

		CON-NS (n=14)	DM-NS (n=13)	CON-HS (n=11)	DM-HS (n=13)	CON-LS (n=11)	DM-LS (n=12)	DM-LS$_{impl.}$ (n=6)
Tier-gewicht [g]	Basal	274 ± 4,4	280 ± 6,1	266 ± 3,6	273 ± 4,0	262 ± 2,8	274 ± 3,8	257 ± 3,8
	7	320 ± 4,0	295 ± 7,3	312 ± 5,8	287 ± 4,3	299 ± 3,8	281 ± 5,2	268 ± 4,2
	14	344 ± 5,6	297 ± 6,9 ***	342 ± 6,3	302 ± 7,2 **	323 ± 8,7	290 ± 6,2 **	285 ± 4,4
Blut-glucose [mg/dl]	2	90,5 ± 2,6	288,6 ± 26,6 ***	90,0 ± 1,0	318,2 ± 29,3 ***	91,0 ± 2,4	378,2 ± 26,6 ***	419,3 ± 58,1 *** ###
	7	90,2 ± 1,4	343,5 ± 15,6 ***	92,7 ± 1,6	431,5 ± 20,0 ***	95,8 ± 3,3	542,0 ± 19,6 *** ### ◊	600,0 ± 0,0 *** ◊◊
	14	97,3 ± 3,0	387,7 ± 36,7 ***	96,4 ± 2,7	377,5 ± 26,0 ***	93,3 ± 3,0	505,8 ± 23,4 *** ## ◊◊	327,5 ± 51,7 *** □
Syst. Blutdruck [mmHg]	Basal	101,9 ± 9,3	110,1 ± 4,4	112,6 ± 3,7	105,1 ± 3,7	114,6 ± 4,1	112,8 ± 5,3	102,7 ± 6,5
	7	112,9 ± 3,0	118,9 ± 5,8	116,8 ± 5,0	121,5 ± 6,0	113,2 ± 4,0	123,9 ± 4,9	105,5 ± 5,1
	14	117,3 ± 3,6	116,1 ± 4,4	126,2 ± 5,5	127,3 ± 5,7	113,8 ± 3,7	116,5 ± 4,3	112,8 ± 6,2

CON vs. jeweilige DM	*DM-NS vs. DM-LS*	*DM-HS vs. DM-LS*	*DM-LS vs. DM-LS$_{impl}$*
* *p < 0,05*	# *p < 0,05*	◊ *p < 0,05*	□ *p < 0,001*
** *p < 0,01*	## *p < 0,01*	◊◊ *p < 0,01*	
*** *p < 0,001*	### *p < 0,001*	◊◊◊ *p < 0,001*	

Tabelle 2: Stoffwechselkäfigversuch I, 6 Tage nach Induktion des Diabetes mellitus über 24 Stunden durchgeführt. Die ersten 6 Stunden wurden die Tiere nüchtern belassen, um für die Dopaminmessung Kontaminationen des Urins mit Futterbestandteilen zu vermeiden. Für die weiteren 18 Stunden erhielten alle Tiere Normalsalzernährung. Abgekürzt sind: Natrium-, Kalium-, Glucose- und Dopamin-Konzentration im Urin ($U_{Na}V$, U_KV, $U_{GL}V$, $U_{Da}V$). Signifikanzen sind unten erläutert.

	CON-NS (n=13)	**DM-NS** (n=12)	**CON-HS** (n=12)	**DM-HS** (n=13)	**CON-LS** (n=11)	**DM-LS** (n=12)	**DM-LS-I** (n=6)
Tiergewicht [g]	313 ± 5	288 ± 1	307 ± 5	283 ± 4	294 ± 4	282 ± 5	267 ± 4
Blutzucker vorh. [mg/dl]	88 ± 1	392 ± 25 ***	88 ± 2	407 ± 15 ***	92 ± 3	389 ± 23 ***	424 ± 60 ***
Blutzucker nach. [mg/dl]	90 ± 4	440 ± 23 ***	90 ± 3	453 ± 18 ***	87 ± 3	320 ± 16 ***	414 ± 64 ***
Urinvolumen [ml]	18,8 ± 1,6	131,7 ± 8,6 ***	12,2 ± 1,1	127,8 ± 8,0 ***	23,0 ± 5,0	91,0 ± 5,3 **	112,4 ± 19,1 ***
$U_{Na}V$ [mmol/24h/100g]	0,69 ± 0,07	1,19 ± 0,05 ****	0,80 ± 0,12	1,29 ± 0,09 **	0,76 ± 0,08	1,09 ± 0,05 **	0,51 ± 0,02 *
U_KV [mmol/24h/100g]	1,82 ± 0,15	2,98 ± 0,10 ****	1,4 ± 0,13	2,92 ± 0,17 ****	2,11 ± 0,35	2,24 ± 0,20	1,80 ± 0,17
$U_{Gl}V$ [mmol/24h/100g]	0,02 ± 0,00	21,8 ± 1,5 ***	0,00 ± 0,00	19,8 ± 1,2 ***	0,04 ± 0,01	14,8 ± 1,1 ***	22,4 ± 1,7 ***
Trinkvolumen [ml/24h]	40 ± 2,0	155,6 ± 9,2 ***	32,4 ± 2,0	154,1 ± 7,9 ***	36,0 ± 5,8	114,7 ± 7,0 ***	149,7 ± 6,0 ***
Futtermenge [g/24h]	29,1 ± 1,9	46,5 ± 3,7 ***	30,7 ± 1,5	48,9 ± 1,9 ***	24,3 ± 2,1	36,0 ± 4,0 *	34,3 ± 3,6 *
$U_{Da}V$ [nmol/6h/100g]	1,09 ± 0,5 (n=12)	1,53 ± 0,18 (n=4)	1,30 ± 0,25 (n=10)	1,67 ± 0,29 (n=11)	1,14 ± 0,15 (n=10)	1,35 ± 0,15 (n=13)	1,59 ± 0,24 (n=6)

*CON vs. jeweilige DM * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$*

Tabelle 3: Stoffwechselkäfigversuch nach 14 o.15 Tagen durchgeführt. Nachdem die Tiere die ersten 6 Stunden aufgrund der Kontaminationsgefahr des Urins durch Futter nüchtern gehalten wurden, bekamen sie in den darauffolgenden 18 Stunden entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit Diäternährungen unterschiedlichen Salzgehaltes. (siehe Material und Methoden). Signifikanzen sind in der Tabelle gekennzeichnet und unten erläutert.

	CON-NS (n=13)	**DM-NS** (n=12)	**CON-HS** (n=12)	**DM-HS** (n=13)	**CON-LS** (n=11)	**DM-LS** (n=12)	**DM-LS-I** (n=6)
Tiergewicht [g]	347 ± 4	308 ± 5 ***	347 ± 7	301 ± 6 ***	320 ± 5 #	269 ± 9 *** □□□	279 ± 4 **
Blutzucker vorh.[mg/dl]	94 ± 4	369 ± 26 ***	91 ± 2	440 ± 18 ***	88 ± 4	592 ± 7 *** □□□	328 ± 4 ***
Blutzucker nach.[mg/dl]	88 ± 2	388 ± 26 ***	96 ± 3	426 ± 16 ***	85 ± 3	423 ± 33 ***	220 ± 5 *** □□□
Urinvol. [ml]	14,2 ± 1,7	132,4 ± 14,3 ***	53,0 ± 5,1 ####	170,8 ± 15,8 ***	25,8 ± 6,7	224,3 ± 15,3 *** □□□	180,1 ± 47,7 ***
$U_{Na}V$ [mmol/24h/100g]	0,49 ± 0,06	1,09 ± 0,09 ****	4,10 ± 0,28 ###	4,98 ± 0,56 □□□	0,03 ± 0,00	0,06 ± 0,01 ** □	0,08 ± 0,03 *
$U_{K}V$ [mmol/24h/100g]	1,29 ± 0,12	2,67 ± 0,18 ****	2,60 ± 0,37 ##	3,38 ± 0,32	0,86 ± 0,04 ##	2,04 ± 0,10 ****	2,29 ± 0,12 **** □□
$U_{Gl}V$ [mmol/24h7100g]	0,02 ± 0,0	21,7 ± 1,4 ***	0,00 ± 0,00	18,5 ± 1,8 ***	0,02 ± 0,0	43,1 ± 3,8 *** □□□	31,8 ± 8,3 ***
Trinkvolumen [ml/24h]	38,8 ± 1,9	171,1 ± 20,9 ***	47,4 ± 14	211,0 ± 8,4 ***	37,6 ± 5,2	277,9 ± 7,7 **** □□□	171 ± 50,1 ***
Futtermenge [g/24h]	30,9 ± 0,8	52,9 ± 3,7 ***	38,4 ± 2,6 ##	49,1 ± 3,8 *	23,1 ± 1,2 ####	45,9 ± 1,6 ***	34,3 ± 3,6 ◊
$U_{Da}V$ [nmol/6h/100g]	1,43 ± 0,39 (n=3)	1,57 ± 0,29 (n=3)	0,9 ± 0,28 (n=10)	1,34 ± 0,15 (n=10)	0,64 ± 0,06 ## (n=11)	0,60 ± 0,10 □□ ◊◊ (n=13)	0,56 ± 0,11 ◊ (n=6)

CON vs. jeweilige DM *CON-NS vs. CON-HS, bzw. CON-LS* *DM-NS vs. DM-HS, bzw. DM-LS*

**p < 0,05 **p < 0,01 ***p < 0,001 ****p < 0,0001 # p < 0,05 ## p < 0,01 ### p < 0,001 #### p < 0,0001 □ p < 0,05 □□ p < 0,01 □□□ p < 0,001*

DM-HS vs. DM-LS ◊◊ p < 0,001 DM-HS vs. DM-LS$_{impl}$ ◊ p < 0,01

Tabelle 4: Übersicht über die Clearanceversuche und den Dopamingehalt im Nierengewebe. Abgekürzt sind: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP), Herzfrequenz (HF), Hämatokrit (Hkt), glomeruläre Filtrationsrate (GFR), Natriumkonzentration im Urin ($U_{Na}V$), Natriumkonzentration im Plasma (Pl_{Na}), Fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na}) und der Dopamingehalt im gesamten Nierengewebe (DA_{Niere}). Signifikante Differenzen sind gekennzeichnet und im Anschluß an die Tabelle erläutert.

	CON-NS (n=13)	**DM-NS** (n=12)	**CON-HS** (n=12)	**DM-HS** (n=11)	**CON-LS** (n=11)	**DM-LS** (n=12)	**DM-LS$_{impl}$** (n=6)
MAP [mmHg]	104,9 ± 1,0	102,7 ± 4,2	102,9 ± 1,7	112,8 ± 3,4 *	104,1 ± 4,2	104,9 ± 4,0	108,3 ± 3,9
HF [1/min]	370 ± 12,7	337,8 ± 10,8	344,0 ± 6,0	342,5 ± 9,9	357,5 ± 8,4	349,0 ± 8,5	352,9 ± 18,4
Hkt [%]	45,1 ± 0,9	46,8 ± 0,6	44,8 ± 0,4	47,0 ± 0,6	42,9 ± 2,0	42,8 ± 1,1	46,6 ± 1,0
GFR [ml/min/100g]	0,78 ± 0,04	1,00 ± 0,06 **	0,81 ± 0,05	1,08 ± 0,07 **	0,75 ± 0,05	1,01 ± 0,08 *	0,93 ± 0,16
Urinvolumen [µl/min/100g]	8,5 ± 1,9	11,1 ± 1,8	14,4 ± 2,9	22,0 ± 2,9 □	8,8 ± 2,8	8,1 ± 1,0 ◊◊	8,5 ± 1,8 x
$U_{Na}V$ [µmol/min/100g]	0,98 ± 0,35	1,72 ± 0,45	2,89 ± 0,69 #	2,74 ± 0,59	1,05 ± 0,38 °	0,49 ± 0,14 ◊◊	0,58 ± 0,23 *x*
Pl_{Na} [mmol/l]	147,3 ± 2,6	141,3 ± 1,8	148,5 ± 5,6	142,5 ± 1,6	147,6 ± 2,1	144,4 ± 1,6	144,3 ± 0,6
FE_{Na} [%]	0,86 ± 0,28	1,55 ± 0,36	2,40 ± 0,5 #	2,53 ± 0,43	0,87 ± 0,29 °	0,44 ± 0,16 ◊	0,47 ± 0,11 x
DA_{Niere} [ng/ g Niere]	10,24 ± 1,22	9,91 ± 1,51	10,35 ± 1,83	8,74 ± 0,59	9,93 ± 1,07	9,84 ± 1,55	12,41 ± 0,54

CON vs. DM-Tiere # *CON-NS vs. CON-HS p<0,05* □ *DM-HS vs. DM-NS p<0,01* ◊ *DM-HS vs. DM-LS p<0,01* *x DM-HS vs. DM-LS$_{impl}$ p<0,05*

* *p < 0,05* ° *CON-HS vs. CON-LS p<0,05* ◊◊ *DM-HS vs. DM-LS p< 0,001*

** *p < 0,01*

Tabelle 5: Übersicht über den Reningehalt im Plasma, abgenommen im Rahmen der Clearanceversuche.

	CON-NS (n=7)	**DM-NS** (n=9)	**CON-HS** (n=10)	**DM-HS** (n=11)	**CON-LS** (n=7)	**DM-LS** (n=16)
Renin [ng/ml]	24,43 ± 7,12	21,43 ± 3,56	7,06 ± 0,65	11,99 ± 2,84	53,52 ± 18,69 #	51,89 ± 8,17 #

 # CON-HS vs. CON-LS, bzw. DM-HS vs. DM-LS *p<0,01*

4 Diskussion

Das Verständnis für das dopaminerge System in der Niere zur Erforschung neuer Therapieansätze, beispielsweise zur Behandlung des Diabetes mellitus und dessen Folgeerkrankungen (diabetische Nephropathie) oder verschiedenster Hypertonieformen ist von großer Bedeutung. In der vorliegenden Arbeit wurde das Modell des Diabetes mellitus gewählt, um anhand dessen mögliche Veränderungen des dopaminergen Systems in Bezug auf die Nierefunktion zu untersuchen. Zusätzlich wurden die Wirkungen unterschiedlicher Salzbeladung durch die Nahrung auf das dopaminerge System beobachtet.

4.1 Modell des Diabetes mellitus

Um eine diabetische Stoffwechsellage zu induzieren, wurde den Sprague-Dawley-Ratten intraperitoneal Streptozotocin (STZ) injiziert. Das aus Steptomyces achromogenes gewonnene Substrat zerstört selektiv die β-Zellen des Pankreas, wobei es sonst keine nephrotoxische Wirkung hervorruft. Circa 12-24 Stunden nach STZ-Injektion ist eine Hyperglycämie nachzuweisen. Bei Junod et al. [1967] zeigten sich schon eine Stunde nach STZ-Gabe histologische Veränderungen des Pankreas, nach ca. 10 Stunden nekrotisierte Gewebebereiche mit einer massive Degranulation der Zellen. Da der Effekt auf die Pankreaszellen dosisabhängig ist, wurde in der vorliegenden Arbeit eine Dosis von 55 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert, um einen Blutzuckerwert von ca. 350 - 450 mg/dl zu erreichen. Dieser Wert induzierte eine diabetische Stoffwechsellage, bei der die Tiere noch ohne Insulinsubstitution überleben konnten. Um eine Verfälschung der Ergebnisse zu verhindern, mussten bei den niedrigsalzernährten Tieren jedoch bei einer

Gruppe von Tieren Insulin abgebende Stäbchen (Linplant®) implantiert werden, um die hohen Blutzuckerspiegel - hervorgerufen durch die Niedrigsalz-induzierte Insulinresistenz - abzufangen. In der vorliegenden Arbeit waren ein bis zwei Tage nach STZ-Injektion Auswirkungen der diabetischen Stoffwechsellage zu verzeichnen. Die Tiere nahmen trotz vermehrter Futteraufnahme (40-60 %-ige Steigerung gegenüber den Kontrollen) prozentual weniger an Gewicht zu (4 bis 10 %) im Vergleich zu den Kontrolltieren. Im Stoffwechselkäfigversuch zeigten sich Hyperglycämie, Polyurie (11-fach gesteigert), Polydipsie (vierfach erhöhtes Trinkvolumen), Natriurese (doppelt so hoch), Kaliurese und Glucosurie (20 %ige Steigerung). Ähnliche Symptome wurden auch schon in Arbeiten von Bank et al. [1988, 1991] und O´Donell et al. [1988] gefunden. Auch die von einigen Autoren [Jensen et al., 1981; Hostetter, 1981] aufgezeigte Steigerung der GFR konnte durch die vorliegende Arbeit bestätigt werden (siehe Kapitel 4.2). Die durch das Tiermodell des Diabetes mellitus aufgezeigten Symptome finden sich ebenso bei unbehandelten diabetischen Patienten, so dass der STZ-induzierte Diabetes mellitus ein geeignetes Modell für den humanen Typ I DM darstellt.

4.2 Diabetische Hyperfiltration und Dopamin

Eine ansteigende GFR und einen erhöhten RBF findet man charakteristischerweise schon im frühen Stadium des Diabetes mellitus beim Menschen und im Tiermodell. Diese hämodynamischen Veränderungen vergesellschaftet mit einem gesteigerten intraglomerulären Druck werden als führende pathogene Faktoren in der Entstehung und im Verlauf der diabetischen Glomerulosklerose angesehen [Mogensen und Christensen, 1984]. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte 14 Tage nach Entwicklung der Hyperglycämie eine mittels Clearanceversuchen über vier Perioden gemessene signifikante Hyperfiltration dargestellt werden. Diese Steigerung der GFR um 22 % bis 25 % war auch unter den verschiedenen Salzdiäten sehr konstant, im Gegensatz zu der von Vallon et al. [1995 und 1997] aufgestellten These, dass es unter Salzrestriktion zu einer Steigerung (paradoxerweise wird der renale

vaskuläre Widerstand reduziert), bzw. unter Hochsalzernährung zu einer Senkung der GFR beim frühen DM (einige Tage nach Induktion) kommt. Eine mögliche Erklärung der differierenden Werte wären die unterschiedlichen Rattenrassen. Während Vallon Munich-Wistar-Ratten verwendete, wurden in vorliegender Arbeit SD-Ratten verwendet. O´Donell [1988] konnte Rassenunterschiede in Bezug auf die GFR und den kapillären Druck im Glomerulum (Drucksteigerung bei MW-Ratten um 2-10 mmHg) feststellen. Zudem gab es Unterschiede im Versuchsaufbau: Während in vorliegender Arbeit bei den hochsalzernährten Tieren die erhöhte Salzzufuhr dem Futter beigegeben war (2 % NaCl) wurde bei Vallon 1 % NaCl dem Trinkwasser zugefügt.

Unterstützt und beschrieben worden ist die glomeruläre Hyperfiltration beim Diabetes mellitus auch schon von zahlreichen anderen Autoren [Bank et al., 1988, 1991; Remuzzi et al., 1993] und gilt als einer der ersten Symptome der diabetischen Nephropathie. Bei Bank betrug die Steigerung 30 % 7-10 Tage nach Induktion des DM, in vorliegender Arbeit waren Steigerungen von 22 % bis 25 % zu verzeichnen. Mögliche Ursachen der differierenden Werte könnten unterschiedliche Volumeninfusionen, unterschiedliche Ernährungen, die Art der Anästhesie oder der Blutdruck zum Zeitpunkt der Experimente sein.

In der Literatur gibt es verschiedenste Ansätze die diabetische Hyperfiltration, wie sie auch in dieser Arbeit gut gezeigt werden konnte zu erklären. Eine erste mögliche Erklärung könnte die vermehrte Futteraufnahme der diabetischen Tiere wie sie auch in der vorliegenden Arbeit auftrat (Hyperphagie um 40 bis 60 %) und damit die erhöhte Proteinzufuhr sein. Bestätigt wird diese Beobachtung durch die Arbeit von King und Levey [1993] und Hostetter [1986], welche hämodynamische Veränderungen der Niere, wie gesteigerte GFR, Natriurese und Diurese nach vermehrter Proteinzufuhr beim Menschen und im Tiermodell beobachten konnten. Infolgedessen soll durch eiweißarme Diät die Hyperfiltration bei Diabetikern gehemmt werden [Walker et al., 1989, Kupin et al., 1987]. Nicht zu vernachlässigen ist auch die gegenseitige Beeinflussung von diabetischer Hypertrophie der Nieren und glomerulärer Hyperfiltration,

wobei es noch nicht möglich ist zu ergründen welches von beiden Symptomen ursächlich und welches reaktiv sein soll [Vallon et al., 2003].

Als weitere Ursache der Hyperfiltration könnte die Überlegung eines erhöhten tubuloglomerulären Feedbacks gelten. Pollock et al. fanden 1991 einen signifikanten Anstieg der TGF-Aktivität bei diabetischen SD-Ratten. Er postulierte, dass die diabetische Hyperfiltration mit einer gesteigerten proximalen und distalen tubulären Resorption von Na^+ - unabhängig vom Na^+/Glucose-Cotransport und der osmotischen Diurese - assoziiert ist.

Auch Vallon et al. [1999] konnte eine gesteigerte Resorption bei diabetischen Ratten aufzeigen, aufgrunddessen die Macula densa nur eine geringere Na^+-, Cl^--, bzw. K^+- Konzentration detektieren kann (20-28 % Konzentrationssenkung gegenüber Kontrolltieren), was zu einem Anstieg des tubuloglomerulären Feedbacks, vergesellschaftet mit einem reduzierten vaskulären Widerstand der afferenten Arteriole und einem Anstieg der GFR führt [Vallon et al., 2003]. Auch Thomson et al. [2001] fanden bei Ratten eine erhöhte Resorptionsrate, erklärt durch eine Hypertrophie des Tubulus, ausgelöst durch einen Anstieg der Ornithin-Decarboxylase-Aktivität und folgernd verbunden mit einem erhöhten tubuloglomerulären Feedback.

Ebenso konnte bei hyperfiltrierenden diabetischen Patienten eine vermehrte proximale Resorptionsrate (gemessen mittels Lithium-Clearance) in positiver Korrelation zur steigenden GFR aufgezeigt werden [Hannedouche et al., 1990]. Resultierend wurde bei hyperglycämischen Hunden mit einem geblockten TGF keine GFR-Steigerung gefunden [Woods et al.,1987]. Um diese Hypothese zu bestätigen müsste jedoch eine verminderte Natriumkonzentration im Urin der diabetischen Tiere vorliegen, was sich jedoch durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigen ließ. Die diabetischen Tiere zeigten eine doppelt so hohe Na^+-Konzentration im Urin im Gegensatz zu den CON-Tieren. Eine mögliche Erklärung wären die Blutglucosespiegel über 180 mg/dl. In diesem Bereich sind die Glucose-Carrier bereits abgesättigt und es wird Glucose und damit Na^+ mit dem Urin abgegeben.

Als weitere pathophysiologische Hypothese findet man beim Diabetes mellitus eine Erhöhung der GFR durch Sekretion des Vasodilatators ANP (atrial

natriuretic peptide) [Ortola et al.,1987; Laragh und Atlas, 1988], welcher als Antwort auf eine Volumenexpansion, hervorgerufen durch die osmotische Wirkung der gesteigerten intravasalen Glucosekonzentration, aus dem rechten Vorhof ausgeschüttet wird. Außerdem konnte die diabetische Hyperfiltration dosisabhängig durch HS-142-1, einen ANP-Rezeptor-Antagonisten gesenkt werden [Sakamoto et al., 1995].

Die Volumenexpansion und die Sekretion von ANP könnten Ursache für den geringeren Plasmareninspiegel beim Diabetes mellitus sein, denn ANP antagonisiert die Vasokonstriktoren AT II und Norepinephrin [Laragh und Atlas, 1988]. In vorliegender Arbeit fand sich bei den NS- und bei den LS-ernährten diabetischen Tieren ein nicht signifikant verminderter Plasma-Renin-Spiegel im Vergleich zu ihren Kontrollen.

Im Zusammenhang mit einem verminderten vaskulären Widerstand darf auch der Einfluss vasodilatierender Prostaglandine nicht unerwähnt bleiben. Barnett et al. [1987], Schambelan et al. [1985] und Craven et al. [1987] fanden in den ersten zwei Wochen nach Diabetes-Induktion eine vermehrte glomeruläre Produktion von PGE_2, bzw. weiteren Prostaglandinen ($PGF_{1\alpha}$) bei Streptozotocin-induzierten diabetischen Ratten gegenüber nicht diabetischen Kontrollen. Durch Indometacin, einem Prostaglandin-Synthese-Inhibitor ließ sich die Hyperfiltration beim Menschen und im Tiermodell reduzieren [Jensen et al., 1986; Hommel et al., 1987]. Allerdings könnte bei den Tieren durch die vorausgegeangene Behandlung mit Insulin schon eine Reduktion der GFR hervorgerufen worden sein. Bank [1991] konnte nämlich keinerlei Veränderung der GFR durch Indometacin hervorrufen. Zudem scheinen die renalen Blutgefäße diabetischer Ratten dem konstriktorischen Effekt der Thromboxane gegenüber teilweise resistent zu sein [Bank, 1991]. Auch eine verminderte Synthese und Ausscheidung von Kallikrein bei unbehandelter diabetischer Stoffwechsellage ist gesichert [Jaffa et al., 1987].

Obwohl die Bedeutung des Dopamins für die Nierenfunktion seit längerer Zeit untersucht wird, sind viele Details wie die Herkunft des Dopamins, das Zusammenspiel der verschiedenen Dopaminrezeptoren, deren genaue Funktion und der Einfluss auf das Regelsystem der Nieren noch ungeklärt.

Baines und Drangova [1986] vertraten die Hypothese, dass tubulär sezerniertes Dopamin keinen Einfluss auf die renale Hämodynamik ausübt. In vorliegender Arbeit konnte ebenfalls kein kausaler Zusammenhang gefunden werden, da sich die GFR (siehe Kapitel 3.2.3.2 und Abb. 13) - im Gegensatz zur Dopaminausscheidung im Urin (siehe Kapitel 3.2.2.2 und Abb. 12) - unter den verschiedenen Salzdiäten als sehr konstanter Wert darstellte. Mühlbauer et al. [1997] konnten durch Aminosäureninfusion eine signifikante Steigerung der GFR hervorrufen, zusätzlich führte Aminosäureninfusion mit L-Tyrosin zu einer fünffach gesteigerter Dopaminausscheidung. In diesem Zusammenhang postulierte Mühlbauer jedoch, dass Dopamin im Urin keine signifikante Rolle in Bezug auf die Regulation der Nierenfunktion spiele, da sich in einer früheren Arbeit durch alleinige Infusion von Tyrosin keine Steigerung der GFR hervorrufen ließ [Mühlbauer et al., 1995,1997]. Barthelmebs et al. [1991] allerdings konnten eine Normalisierung der gesteigerten GFR-Werte bei diabetischen Ratten durch Fenoldopam, L-DOPA und Glu-DOPA hervorrufen. In der vorliegenden Arbeit stellte sich nun die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der durch den Diabetes mellitus ausgelösten Hyperfiltration und einem stimulierten dopaminergen System besteht. Luippold et al. [2001a] konnten am Menschen eine durch Aminosäuren hervorgerufene Hyperfiltration durch Blockade von D_2-like Rezeptoren reduzieren, bzw. aufheben. Zudem konnte durch eine weitere Arbeit von Luippold et al. [2005] eine Beteiligung von D_3-Rezeptoren an der Modulation der diabetischen Hyperfiltration nachgewiesen werden: Die mit dem D_3-Rezeptor-Antagonisten BSF 135170 behandelten diabetischen Ratten zeigten im Vergleich zu ihren nicht diabetischen Kontroll-Tieren einen den nicht diabetischen Tieren angenäherten GFR-Wert. BSF 135170 ist für seine hohe Selektivität für den D_3-Rezeptor bekannt. Liganden-Verdrängungsstudien zeigten eine bis zu 800-fach höhere Affinität für den D_3-Rezeptor im Vergleich zu D_2-, D_4- und D_1-Rezeptoren [Luippold et al., 2001b]. In vorliegender Arbeit zeigten sich bei den diabetischen Tieren der Normalsalz- bzw. Hochsalz-Gruppe im Rahmen der Stoffwechselkäfigversuche eine Steigerung der Dopaminausscheidung im Vergleich zu ihren Kontrollen um 9 % bzw.33 %. Ob es sich hierbei um ein

stimuliertes dopaminerges System handelt ist fraglich, da bei der Dopaminausscheidung im Urin und dem Dopamingehalt im Nierengewebe keine Korrelation festgestellt werden konnte. Es zeigten sich beim Dopamingehalt im Nierengewebe ein nicht signifikant gerinerer Wert bei den NS-, HS- und den LS-diabetischen Tieren, bei den LS_{impl}-Tieren wurde ein erhöhter Dopamingehalt gemessen.

4.3 Dopamin und Salzdiät

Mühlbauer und Osswald [1994] konnten zeigen, dass die renale Dopaminausscheidung weder abhängig ist von einer intakten renalen Innervierung noch vom Natriumgehalt im Urin, bzw. dem Natriumgehalt im Trinkwasser, jedoch lässt sie sich durch sonstige Nahrungsbestandteile wie Aminosäuren beeinflussen. Auf Grund dessen wurde den Tieren in vorliegender Arbeit der Nahrungszugang im SWK-Versuch für 6 Stunden verweigert und in diesem Zeitraum die Dopamin-Ausscheidung bestimmt, um die exogene Beeinflussung zu minimieren. In diesem Zusammenhang postulierte Mühlbauer [1994], dass Fütterung die Dopamin-Ausscheidung um mehr als den 2-fachen Wert ansteigen lässt. Der entscheidende Faktor der Steigerung der renalen Dopaminausscheidung nach Nahrungszufuhr scheint die Aufnahme der Dopaminvorstufen Tyrosin und Phenylalanin zu sein (Dissertation Mickeler,1996). In vorliegender Arbeit kann jedoch ein Einfluss durch vorausgegangene (vor den 6 Stunden Nahrungskarenz im SWK-Versuch) Nahrungsaufnahme nicht ausgeschlossen werden.

Im Hinblick auf die Dopamin-Ausscheidung unter erhöhter diätetischer Salzzufuhr konnten in einer Arbeit von Luippold et al. [2000a] beim Menschen keine Veränderungen festgestellt werden. Dies steht im Gegensatz zu einer Studie von Rudberg et al. [1996], welche eine Steigerung der Dopaminausscheidung durch Hochsalzernährung allerdings nur in der Kontrollgruppe, nicht aber beim IDDM feststellte. Rudberg fand heraus, dass bei Patienten mit IDDM der Mechanismus einer Steigerung der Dopaminausscheidung - wahrscheinlich genetisch bedingt - gestört ist und in Korrelation dazu zeigten sie einen geringeren Anstieg der Natrium-

Ausscheidung im Urin als Reaktion auf eine Natriumbelastung durch die Nahrung im Vergleich zu ihren Kontrollen. In vorliegender Arbeit konnte die Natriumausscheidung bei den HS-DM-Tieren nur um 20 % gesteigert werden im Vergleich zu ihren Kontrollen. Bei den DM-NS, bzw. DM-LS Tieren steigerte sich die Natriumausscheidung um den Faktor 2, jedoch stand dies in keiner Korrelation zur Dopaminausscheidung.

Es zeigte sich bei der NS- und der HS-Gruppe tendenziell eine Steigerung der Dopaminausscheidung im Urin der diabetischen Tiere im Vergleich zu ihren Kontrollen. Da diese Tiere quantitativ im Vergleich zu den nichtdiabetischen Ratten eine gesteigerte Natriumausscheidung im Urin aufwiesen, stellt dies wiederum eine Verknüpfung zur Aussage dar, dass Dopamin als natriuretisches und diuretisches Hormon angesehen wird und somit wichtig für die Aufrechterhaltung einer konstanten Elektrolytbalance ist. Als unterstützend für diese These kann die Arbeit von Luippold et al. [1998] angesehen werden: 7-OH-DPAT, eine spezifischer D_3-Rezeptor-Agonist verursachte bei SD-Ratten eine verminderte tubuläre Natrium-Rückresorption, was wiederum eine erhöhte Natrium- und Flüssigkeitsausscheidung bewirkte und mit einen Anstieg der GFR assoziiert war. Ascio et al. [1998] zeigte in seiner Arbeit mit D_3-Rezeptor-knockout-Mäusen, dass diese auf eine akute Natriumbelastung nicht mit einer quantitativ angemessenen Steigerung der Natriumausscheidung reagieren konnten im Vergleich zu ihren Kontrolltieren. Auch D_1-Rezeptoren scheinen an der natri- und diuretischen Wirkung von Dopamin beteiligt zu sein. So konnten Hegde und Mitarbeiter [1989] eine über diesen Rezeptor vermittelte Wirkung als Reaktion auf eine akute Volumenbelastung aufzeigen. Ausgelöst soll die Natriurese durch Inhibition des im proximalen Tubulus lokalisierten apikalen Na^+/H^+-Austauschers [Gesek und Schoolwerth, 1990; Felder et al. 1990] und dosisabhängig durch Inhibition der im proximalen Tubulus lokalisierten basolateralen Na^+/K^+-ATPase-Aktivität [Bertorello et al., 1988] werden. Die funktionale Inhibition dieser beider Transportsysteme wird sowohl über D_1-like als auch über D_2-like Rezeptoren vermittelt [Bertorello und Aperia,1988 & 1990]. Als unterstützend für diesen kausalen Zusammenhang einer Natriurese durch Inhibition der Natriumrückresorption durch Dopamin, könnte man die

verminderte Dopaminausscheidung der LS-Tiere sehen. Da in diesem Fall eine Hemmung der Na^+/K^+-ATPase - aufgrund der verminderten Natriumaufnahme - unphysiologisch wäre, könnte beispielsweise ein reduzierter Dopaminspiegel als hämodynamischer Kompensationsmechanismus Folge sein, vorausgesetzt es handelt sich bei dem durch die Niere ausgeschiedenen Dopamin um funktionelles Dopamin. Zahlreiche Studien haben die herausragende Rolle endogenen, intrarenal produzierten Dopamins gegenüber systemischem oder neuronal produziertem Dopamins in der renalen Na-Homöostase als Antwort auf akute und chronische Salzbeladung belegt [Ball and Lee,1977; Hayashi et al.1991].

In der vorliegenden Arbeit stellte sich nun weiterführend die Frage, ob die Dopaminausscheidung als Maß für die renale Dopaminproduktion angesehen werden kann, da sich im Gegensatz zu einer verminderten Dopaminausscheidung im Urin der LS-ernährten Tiere (siehe Kapitel *3.2.2.2*, bzw. Abb. 12) keine parallel verminderte Dopaminkonzentration im Nierenparenchym (siehe Kapitel *3.3*, bzw. Abb. 15) derselbigen Tiere finden ließ. Hayashi et al. [1990] und Mühlbauer et al. [1993] konnten zeigen, dass tubulär synthetisiertes Dopamin auf dem Weg durch das Nephron nicht rückresorbiert wird. Als ein weiterer Beweis zur Unterstützung dieser Aussage können die Arbeiten von Wang et al. [1997] und Küster et al. [1997] angesehen werden. Wang konnte zeigen, dass Dopamin nach Verabreichung der Vorstufe Gludopa trotzdem ins Tubuluslumen abgegeben wird. Bei Küster zeigte sich trotz Infusion von L-DOPA ein nur minimaler Anstieg des Plasma-Dopamin-Levels.

Mühlbauer und Osswald [1994] allerdings stellten im Zusammenhang mit der Beeinflussung der Dopaminausscheidung durch Nahrungsbestandteile einen Anstieg der Kreatininausscheidung fest, was eine GFR-Steigerung anzeigen könnte. Da der Clearancewert für Kreatinin nicht genau mit der GFR übereinstimmt - Kreatinin wird in gewissem Umfang noch sezerniert - ist diese Bestimmung weniger geeignet.

4.4 Renin - Angiotensin - Aldosteron - System

In der klinischen Anwendung zeigte sich, dass ACE-Inhibitoren die glomerulären Schädigungen bei der Entstehung und Progression der diabetischen Nephropathie potenter verzögern als andere antihypertensive Medikamente [Allen et al., 1997b]. Diese Aussage kann als Beweis dafür interpretiert werden, dass das RAAS eine wichtige Rolle in Bezug auf die Veränderungen der renalen Hämodynamik beim Diabetes mellitus spielt [Kalinyak et al. 1993].

Christiansen et al. [1988] und Christlieb und Long [1972] zeigten in ihren Arbeiten am Menschen mit Diabetes mellitus, bzw. am Tiermodell, dass die Plasma-Renin und Angiotensin II-Levels im Normbereich oder unterhalb dieses Bereichs lagen. Kikkawa beobachtete 1986 eine Senkung der Renin- und Angiotensinplasmakonzentration vier Wochen nach Induktion des Diabetes mellitus. Vallon et al. [1995] und Allen et al. [1997a] fanden eine verminderte ATII-Konzentration im Gewebe der Niere, bzw. im Plasma. Nakayama et al. [1998] konnten vier Wochen nach Induktion eines Diabetes mellitus eine Hyporeninämie und einen Abfall des Plasma-Angiotensin II-Levels aufzeigen. Grund für dieses Phänomen könnte eine durch die erhöhte Blutglucosekonzentration hervorgerufene Volumenexpansion sein (siehe Kapitel 4.1.2). Auch Wilkes [1987] und Ballermann et al. [1984] fanden nach Induktion eines Diabetes mellitus eine verminderte Dichte an Angiotensin II-Rezeptoren. Eine Woche nach Induktion zeigte sich in seinen Arbeiten jedoch eine erhöhte Angiotensinplasmakonzentration. Ballermann et al. [1984] konnten die verminderte Plasma-Renin-Aktivität diabetischer Ratten durch Insulin normalisieren.

In vorliegenden Arbeit wurde die Plasma-Renin-Aktivität im Rahmen der Clearanceversuche gemessen. Es konnte eine nicht signifikante Verminderung der Werte bei den diabetischen Tieren der NS- und der LS-Gruppe gegenüber den nicht-diabetischen Ratten aufgezeigt werden. Bei den DM-HS-Tieren kam es zu einer Erhöhung der Renin-Werte. Deutlich konnte die physiologische Aktivierung des RAAS bei den niedrigsalzernährten Tieren, bzw. dessen Hemmung bei den hochsalzernährten Tieren dargestellt werden. Die Annahme

einer gegenseitige Beeinflussung des dopaminergen Systems und des RAAS als Grundlage für die Adaptation der Nierenfunktion an gegebene Verhältnisse konnte durch die vorliegende Arbeit nicht bestätigt werden, da sich keine Korrelation zum Dopamingehalt im Nierengewebe, bzw. der Dopaminausscheidung im Urin und der Plasma-Renin-Aktivität ergab. Gegensätzliches fand Barnett et al. [1986]: Der Dopaminrezeptor wirke via D_1-like an den glomerulären Mesangiumzellen vasodilatierend, der ATII-Rezeptor vasokonstringierend um die renalen Funktionen zu steuern. Ähnlich wie sich die beiden Rezeptor-Typen antagonisierend in Bezug auf die renale Hämodynamik verhalten, so verhalten sie sich auch bei der parakrinen Regulation des renalen Salztransportes. Zeng et al. [2001] konnte gar durch immunhistochemische Verfahren eine Interaktion von D_1- und ATII-Rezeptoren aufzeigen.

Gestützt wird die These der gegenseitigen Beeinflussung durch Arbeiten von Ascio et al. [1998], welche bei D_3-knockout-Mäusen eine deutlich erhöhte Plasma-Renin-Aktivität im Vergleich zu Wildtypmäusen zeigen konnten. Außerdem konnte die arterielle Hypertonie, welche bei den knockout-Mäusen auftrat, durch Gabe des AT_1-Rezeptor-Antagonisten Losartan gemildert werden. Diese These würde auch die geringere Dopaminkonzentration im Urin der LS-ernährten Tiere im Vergleich zu den HS- und NS-Tieren erklären, da das RAAS infolge der niedrigen NaCl-Konzentration der Nahrung aktiviert würde. Durch jene Aktivierung, welche zentralnervös ein gesteigertes Durstgefühl hervorruft, kam es bei den LS-ernährten diabetischen Tieren zu einem signifikant erhöhten Trinkvolumen gegenüber den NS- und HS-DM-Tieren. Als gesichert gilt auch ein Zusammenhang zwischen Entgleisungen der renalen dopaminergen Regulation der Aldosteron-Sekretion via D_2-Rezeptor und bestimmten Entstehungsformen des Hypertonus [Jose et al. 1999] im Zusammenhang mit Salzbeladungen des Organismus. Spontan hypertensive Ratten (SHR) schieden mehr Dopamin im Vergleich zu normotensiven Ratten aus [Hansell et al., 1996].

Jose et al. [2003] beschrieb in seinen Studien, dass der natriuretische Effekt der D_1-Rezeptoren gesteigert wäre, wenn die AT II-Produktion abfiele oder wenn die AT II–Rezeptoren geblockt würden. Die Expression von D_1-Rezeptoren

verminderten die AT_1-Rezeptor-messenger-RNA in den proximalen Tubuluszellen von normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten. Im Gegensatz dazu, ließ die Stimulation von AT_1-Rezeptoren die Expression von D_1-Rezeptoren in den renalen proximalen Tubuluszellen ansteigen. Letztere Aussage würde die Steigerung der Reninsekretion in der Arbeit von Kurtz et al. [1988] durch Aktivierung des D_1-Rezeptors in juxtaglomerulären Rattennierenzellen bestätigen. Eadington et al. [1993] jedoch postulierten, dass keine Korrelation zwischen NaCl-Ausscheidung, Dopaminausscheidung und Angiotensin II-Infusion bestehe, wobei in jener Arbeit durch AT II-Infusion eine Reduktion der Dopaminausscheidung im Urin und eine Antinatriurese aufzeigten werden konnte.

Eine weiterere - in der Literatur bekannte und als Insulin-Resistenz titulierte - Verknüpfung zwischen RAAS-System und Diabetes mellitus zeigte sich bei den Niedrigsalzernährten diabetischen Tieren, welche innerhalb kürzester Zeit nach Ernährungsumstellung eine gegenüber den NS-, bzw. HS-Tieren signifikante Hyperglycämie entwickelten. Als Erklärungsmechanismus könnte das durch die Niedrigsalzernährung aktivierte RAAS (erhöhte ATII-Konzentration im Nierengewebe und Plasma diabetischer niedrigsalzernährter Ratten [Vallon et al., 1995]), eine verminderte Glucose-Oxidation [Nielsen et al., 2001] und folgernd eine herabgesetzte Insulin-Sensitivität [Petrie et al., 1998] geltend gemacht werden. Feldmann und Schmidt [1999] konnten beispielsweise eine durch Salzrestriktion signifikant reduzierte Insulin-vermittelte Vasodilatation induzieren. Auch Allen et al. konnten in ihrer Arbeit von 1997[a] eine Wiederherstellung der - durch den Diabetes mellitus verminderten ATII-Plasmakonzentration - durch Salzrestriktion erreichen. Während viele Studien einen klaren Zusammenhang zwischen denen durch Angiotensin II-stimulierten intrazellulären Second-messengern und der Insulin-Sensitivität zeigen konnten [Melander et al., 2000], postulierten Prada et al. [2000] eine RAAS-unabhängige Insulin-Sensitivität bei LS-ernährten Ratten. Sie fanden eine erhöhte GLUT4-(Glucosetransporter, welcher Insulin-induziert ist) Expression bei HS-ernährten Ratten und im Gegensatz zu vorliegender Arbeit ein gesteigertes Tiergewicht der LS-ernährten Tiere. Auch Perry et al. [2003] fanden eine reduzierte Insulin-

Sensitivität durch Niedrigsalzernährung beim Menschen, doch wurde der Effekt von AT II auf die Insulin-Funktion (Expression der Insulin-vermittelten Glucose-Transporter oder einen Einfluss auf die Lipolyse) verneint. Nichtsdestotrotz scheint aber eine erhöhte Salzzufuhr die Glucose-Toleranz und Insulin-Sensitivität zu verbessern [Ames, 2001].
Eine differierende These vertreten Donovan et al. [1993], welche nach HS-Ernährung nichtdiabetischer, normotensiver Probanden einen verminderten Renin- und Aldosteron-Spiegel im Plasma aufzeigten und eine erhöhte Insulin-Resistenz infolge HS-Ernährung durch eine vermehrte Konzentration an zirkulierenden freien Fettsäuren erklärten. Auch Ogihara et al. [2001] stellte bei HS-ernährten SD-Ratten eine Hyperglycämie und Hyperinsulinämie - ausgelöst durch eine verminderte Insulin-abhängige Glycogen-Synthase-Aktivität in der Leber - fest.

4.5 Zusammenfassung

Ein entscheidender Faktor für das Verständnis zur Entstehung der diabetischen Nephropathie ist das Zusammenspiel von morphologischen Veränderungen und der modifizierten Pathophysiologie der Niere beim Diabetes mellitus. Eine wichtige Rolle scheint dabei das dopaminerge System, die glomeruläre Hyperfiltration und mögliche Veränderungen dieser Parameter in Bezug auf unterschiedliche Salzkonzentrationen in der Nahrung zu spielen. Nachdem in früheren Arbeiten die diabetische Hyperfiltration durch Dopamin D_2-Antagonisten reduziert werden konnte, ist eine Teilnahme von Dopamin an der Regulation der Hyperfiltration wahrscheinlich. Zudem wird endogenes in der Niere gebildetes Dopamin als diuretisches und natriuretisches Hormon diskutiert, so dass sich in vorliegender Arbeit die Frage stellt, ob es zu einer veränderten Ausscheidung bzw. Produktion von Dopamin in der Niere beim Diabetes mellitus kommt, bzw. ob diese abhängig ist von einem modifizierten Salzgehalt in der Nahrung. Zudem wurde durch Bestimmung der Plasma-Reninaktivität der Einfluss des RAAS untersucht.
Als geeignetes Modell zur Erforschung der pathophysiologischen Vorgänge beim Diabetes mellitus dient die Ratte. Durch die Injektion von Streptozotocin

(STZ) und die daraus resultierende selektive Zerstörung der ß-Zellen des Pankreas wurde eine diabetische Stoffwechsellage bei den Tieren hervorgerufen. Nicht-diabetische Tiere wurden als Kontrollen mitgeführt. Zudem wurden die Tiere in Gruppen mit Normal-, Hoch- und Niedrigsalzernährung eingeteilt. Im Stoffwechselkäfigversuch wurden an wachen Tieren verschiedenste Ausscheidungsparameter, wie Urinvolumen, Elekrolyte und in einem futterfreien Intervall die Dopaminausscheidung im Urin bestimmt.

Bei den hochsalzernährten Tieren bzw. niedrigsalzernährten Tieren kam es physiologischerweise zu einer Erhöhung bzw. Erniedrigung der Natriumausscheidung und des Urinvolumens. Die diabetischen Tiere zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Polydipsie, Polyurie, Polyphagie und Glucosurie. Bei der Dopaminausscheidung im Urin im Rahmen der Stoffwechselkäfigversuche ließ sich bei den Normalsalz- bzw. Hochsalz-diabetischen Tieren eine Steigerung im Vergleich zu ihren nicht-diabetischen Kontrollen feststellen. Bei den niedrigsalzernährten Tieren wurde bei den diabetischen Tieren und ihren Kontrollen eine signifikant geringere Dopaminausscheidung gegenüber den normalsalzernährten Tieren festgestellt. Ab dem 16. Tag nach STZ-Injektion wurde an mit Thiopental narkotisierten Tieren im Clearanceversuch die renale Hämodynamik und die Plasma-Renin-Aktivität bestimmt. Am Ende der Experimente wurden die Nieren zur Bestimmung des Dopamingehalts im Gewebe mittels HPLC entnommen. Erwartungsgemäß zeigte sich bei allen diabetischen Tieren unabhängig von der Salzdiät eine glomeruläre Hyperfiltration. Bezüglich des Dopamingehaltes in der Gesamtniere konnten jedoch keinerlei signifikante Unterschiede, weder in Abhängigkeit von der diabetischen Stoffwechsellage noch von der unterschiedlichen Salzdiät nachgewiesen werden. Die Plasmareninaktivität war zwischen den diabetischen und nicht-diabetischen Tieren nicht unterschiedlich. Deutlich konnte die physiologische Aktivierung bzw. Hemmung des RAAS bei den hochsalz- bzw. niedrigsalzernährten Tieren dargestellt werden.

Schlussfolgernd muss im Rahmen des vorliegenden Versuchsaufbaus davon ausgegangen werden, dass das dopaminerge System (gemessen als renale Dopaminausscheidung und Dopamingehalt der Gesamtniere) keinen Einfluss

auf die Regulation der diabetischen Hyperfiltration hat. Zudem wurden keine signifikanten Auswirkungen der verschiedenen Salzdiäten auf den Dopamingehalt im Nierengewebe gefunden.

Literaturverzeichnis

Akpaffiong MJ, Redfern PH und Woodward B (1981) Factors affecting the release and excretion of dopamine in the rat. J Pharm Pharmacol 32: 839-843

Albinus M, Finkbeiner E, Sosath B und Oswald H (1998) Isolated superfused juxtaglomerular cells from rat kidney: a model for study of renin secretion. Am J Physiol 44: F991-F997

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

Allen TJ, Waldron MJ, Casley D, Jerums G und Cooper ME (1997) Salt restriction reduces hyperfiltration, renal enlargement and albuminuria in experimental diabetes. Diabetes 46(1): 19-24

Allen TJ, Cao Z, Youssef S, Hulthen UL und Cooper ME (1997) Role of angiotensin II and bradykinin in experimental diabeticnephropathy. Functional and structural studies. Diabetes 46(10): 1612-8

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

Ames RP (2001) The effect of sodium supplementation on glucose toleranceand insulin concentrations in patients with hypertension and diabetes mellitus. Am J Hypertens 14(7 Pt): 653-9.

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

Aperia A, Holtback U, Syren ML, Svensson LB, Fryckstedt J und Greengard P (1994) Activation/deactivation of renal Na^+, K^+-ATPase: a final common pathway for regulation ofnatriuresis. FASEB J 8: 436-439

Ascio LD, Ladines C, Fuchs S, Accili D, Carey RM, Semeraro C, Pocchiari F, Felder RA, Eisner GM und Jose PA (1998) Disruption of the dopamine D_3 receptor gene produces renin-dependent hypertension. J Clic Invest 102: 493-498

Baines AD, Drangova R und Hatcher C (1985) Dopamine production by isolated glomeruli and tubules from rat kidney. Can J Physiol Pharmacol 63: 155-158

Baines AD und Drangova R (1986) Neural not tubular dopamine increases glomerular filtration rate in perfused rat kidneys. Am J Physiol 250: F674-F679

Ball SG and Lee MR (1977) The effect of carbidopa administration on urinary sodium excretion in man: is dopamine an intrarenal natriuretic hormone. Br J Pharmacol 4: 115-118

Ballerman BJ, Skorecki KL und Brenner BM (1984) Reduced glomerular angiotensin II receptor density in early untreated diabetes mellitus in the rat. Am J Physiol 247: F110-F116

Bank N, Lahorra G, Aynedjian HS und Wilkes BM (1988) Sodium restriction corrects hyperfiltration of diabetes. Am J Physiol 254: F668-F676

Bank N (1991) Mechanisms of diabetic hyperfiltration. Kidney Int 40: 792-807

Barnett R, Sighal PC, Scharschmidt LA und Schlondorff D (1986) Dopamine attenuates the contractile response to angiotensin II in isolated rat glomeruli and cultured mesangial cells. Circ Res 59: 529-33

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

Barthelmebs M, Vailly B, Grima M, Velly J, Stephan D, Froehly S und Imbs JL (1991) Effects of dopamine prodrugs and fenoldopam on glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetes in rats. J of Cardiovascular Pharmacology 18: 243-253

Bell C und Mann R (1990) Identification of dopaminergic nerves in humans. Am J Hypertens 3: 4S-6S

Bello-Reuss E, Colindres RE, Pastoriza-Munoz E, Mueller RA und Gottschalk CW (1975) Effects of acute unilateral renal denervation in the rat. J Clinc Invest 56: 208-217

Bell C und McLachlan MC (1982) Dopaminergic neurons in sympathetic ganglia of the dog. Proc R Soc Lond B Biol Sci 215: 175-190

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

Christiansen JS, Giese J, Damkjaer M und Parving HH (1988) The renin-angiotensin system and kidney function during initial insulin treatment in diabetic man. Scand J Clin Lab Invest 48: 451-456

Christiansen J, Frandsen M und Parving HH (1981) The effect of intravenous insulininfusion on kidney function in insulin-dependent diabetes mellitus. Diabetologia 20: 199

Christlieb AR und Long R (1979) Renin-angiotensin system in phlorhizin compared with alloxan diabetes in the rat. Diabetes 28: 106-109

Colville M, Liu LX, Burgess GD, Crawford DR, Sibley DR und Chiodo LA (1994) D_4 dopamine receptors inhibit a voltage-dependent potassium current in N18TG2 X mesencephalic cell (MES-25) hybrid. Soc Neurosci Abs 20: 523

Craven PA, Caines MA und DeRubertis FR (1987) Sequential alterations in glomerular prostaglandin and thromboxane synthesis in diabetic rats: relationship to the hyperfiltration of early diabetes. Metab 36: 95-103

Curtis JJ, Luke RG, Dustan HP, Kastgarian M, Whelchel JD, Jones P und Diethelm AG (1983) Remission of essential hypertension after renal transplantation. N Engl J Med 309: 1009-1015

Da Prada M und Zürcher G (1976) Simultanous radioenzymatic determination of plasma and tissue adrenaline, noradrenaline and dopamine within the femtomol range. Life Sci 19:1161-1174

De Prada P, Okamota M, Furukawa L, Machado U, Heimann J und Dolnikoff M (2000) High- or low-salt diet from weaning to adulthood, effect on insulin sensitivity in wistar rats. Hypertension 35: 424

Denton MD, ChertowGM und Brady HR (1996) “renal dose” dopamine for the treatment of acute renal failure: Scientific rationale, experimental studies and clinical trials. Kidney Int 50: 4-14

Dinerstein RJ, Vannice J, Henderson RC, Roth LJ, Goldberg LI und Hoffmann PC (1979) Histofluorescence techniques provide evidence for dopamine-containing neuronal elements in canine kidney. Science 205: 497-499

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

Donovan DS, Solomon CG, Seely EW, Williams GH und Simonson DC (1993) Effect of sodium intake on insulin sensitivity. Am J Physiol Endocrinol Metab 264: E730-E734

Eadington DW, Swainson CP, frier BM, Johnston N, Samson RR und Lee MR (1993) Urinary dopamine response to angiotensin II is not abnormal in type I diabetes mellitus. Nephrol Dial transplant 8 (1): 36-40

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

Felder CC, Campbell T, Albrecht F und Jose PA (1990) Attenuated renal response to dopaminergic drugs in spontaneously hypertensive rats. Hypertension 15: 560-569

Ganong WF (1991) Synaptic and junctine transmission. Neural basis of instinctual behaviour and emotions. Review of medical physiology; Prentice&Hall; London: 76-105

Gesek FA und Schoolwert AC (1990) Hormonal interactions with the proximal Na+, H+- Exchanger. Am J Physiol 258: F514-521

Giros B, Martres MP, Sokoloff P und Schwartz JC (1990) Gene cloning of human dopaminergic D_3 receptor and identification of its chromosome. C R Acad Sci III 311: 501-508

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

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

Grossman E, Hoffman A, Armando I, Abassi Z, Kopin IJ und Goldstein DS (1992) Sympathoadrenal contribution to plasma dopa in rats. Clin Sci Colch 83: 65-74

Goldstein DS, Grossman E und Armando I (1993) Correlates of urinary excretion of catechols in humans. Biogenic Amines 10: 3-17

Griffon N, Pilon C, Sautel F, Schwartz JC und Sokoloff P (1997) Two intracellular signaling pathways for the dopamine D_3 receptor: opposite and synergistic interactions with cyclic AMP. J Neurochem 68: 1-9

Hannedouche TP, Delgado AG, Gnoinsahe DA, Boitard C und Gruenfeld JP (1990) Renal hemodynamics and segmental tubular sodium reabsorption inearly type I diabetes. Kidney Int 37: 1126-1133

Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, Saruta T (1990) Aromatic L-amino acid decarboxylase along the rat nephron. Am J Physiol 258: F28-F33

Hayashi M, Yamaji Y, Kitajima W, Saruta T (1991) Effects of hihg salt intake on dopamine production in the rat. Am J Physiol 260: E675-E679

Hansell P, Källskog Ö und Wolgast M (1996) The adrenal glands as suppliers of plasma L-DOPA and sources of urinary dopamine. Kidney Bood Press Res 19: 109-114

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

Hommel E, Mathiesen E, Arnold-Larsen S, Edsberg B, Olsen UB und Parving HH (1987) Effects of indomethacin on kidney funktion in type I (insulin-dependent) diabetic patients with nephropathy. Diabetologia 30: 78-81

Hostetter TH (1986) Human renal response to meat meal. Am J Physiol 250: F613-F618

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

Hostetter TH (1992) Diabetic nephropathy. Metabolic versus hemodynamic considerations. Diabetes Care 15(9): 1205-1215

Jaffa AA, Miller DH, Bailey GS, Chao J, Margolius HS und Mayfield RK (1987) Abnormal regulation of renal kallikrein in experimental diabetes. J Clin Invest 80: 1651-1659

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

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

Jensen PK, Steven K, Blaehr H, Christiansen JS und Parving HH (1986) The effects of indomethacin on glomerular hemodynamics in experimental diabetes. Kidney Int 29: 490-495

Jose PA, Raymond JR, Bates MD, Aperia A, Felder RA und Carey RM (1992) The renal dopamine receptors. J Am Soc Nephrol 259: F60-F64

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

Kalinyak JE, Sechi LA, Chandi AG, Burl RD, Kamran T, Kraemer FB, Hoffman AR und Schambelan M (1993) The renin-angiotensin system in streptozotocin-induced diabetes mellitus in the rat. J Am Soc Nephrol 4: 1337-1345

King AJ und Levey AS (1993) Dietary protein and renal function. JASN 3: 1723-1737

Kikkawa R, Kitanwa E, Fujiwara Y, Haneda M und Shigeta Y (1986) Biphasic alterations of renin-angiotensin-aldosterone-system in streptozotocin diabetic rats. Renal Physiol 9: 187-192

Kopin IJ (1972) metabolic degradation of catecholamines. The relative importance of different pathways under physiological conditions and after administration of drugs. In Blascko HKF und Muscholl E (Eds) Handbuch der experimentellen Pharmakologie (pp. 271-282) Berlin, Springer-Verlag

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

Küster E, Dantonello T und Mühlbauer B (1997) Dopamine in plasma and urine of normo- and hypertensive rats in response to L-DOPA-Infusion. Pfluegers Arch Eur J Physiol 433 (suppl.): P-612

Laragh JH und Atlas SA (1988) Atrial natriuretic hormone: A regulator of blood pressure and volume homeostasis. Kidney Int 34: S64-S71

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

Luippold G, Küster E, Joos TO und Mühlbauer B (1998a) Dopamine D_3 receptor activation modulates renal function in anesthetized rats. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 358: 690-693

Luippold G und Mühlbauer B (1998b) Dopamine D_2 receptors mediate glomerular hyperfiltration due to amino acids. J Pharmacol Exp Ther 286: 1248-1252

Luippold G, Küster E, Vallon V, Osswald H und Mühlbauer B (1999) Dopamine D_3 receptors in the rat kidney: glomerular and tubular actions. Nephrol Dial Transplant 14 (suppl) 4: 24-25

Luippold G, Benohr P, Piesch C, Heyne N und Mühlbauer B (2000) Urinary dopamine excretion in healthy volunteers: effect of sodium diet and acute water load. Pflugers Arch 440: 28-33

Luippold G, Schneider S, Stefanescu A, Benöhr P und Mühlbauer B (2001a) Dopamine D_2-like receptors and amino acid-induced glomerular hyperfiltration in humans. Br J Clin Pharmacol 51: 415-421

Luippold G, Zimmermann C, Mai M, Kloor D, Starck D, Gross G und Mühlbauer B (2001b) Dopamine D_3-receptors and salt dependent hypertension. J Am Soc Nephrol 12: 2272-2279

Luippold G, Beilharz M, Wehrmann M, Unger L, Gross G und Mühlbauer B (2005) Effect of dopamine D_3 receptor blockade on renal function and glomerular size in diabetic rats. Naunyn-Schmiedeberg´s Arch Pharmacol 371: 420-427

McDonald TM, Jeffrey RF, Freestone S und Lee MR (1988) (+)- sulpiride antagonises the renal effects of gamma-L-glutamyl-L-DOPA in man. Br J Clin Pharmacol 25: 203-212

Melander O, Groop L und Hulthen UL (2000) Effect of salt on insulin sensitivity differs according to gender and degree of salt sensitivity. Hypertension 35(3): 827-831

Mene P, Pugliese G, Pricci F Di Mario U, Cinotti GA und Pugliese F(1993) High glucose inhibits calcium signalling in cultured rat mesangial cells. Kidney Int 43: 585-591

Meyer TW, Ichikawa I, zatz R und Brenner BM (1983) The renal hemodynamic response to amino acid infusion in the rat. Trans Assoc Am Physicans 96: 76-83

Mogensen CE und Christensen CK (1984) Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. N Engl J Med 311: 89-93

Monsma FJ, McVittie LD, Gerfen CR, manhan LC und Sibley DR (1998) Multiple D_2 receptors produced by alternative RNA splicing. Nature 342: 926-929

Moore LC, Iijama K, Rich A, Casellas D und Goligorsky MS (1991) Communication of the tubuloglomerular feedback signal in the JGA. Kidney Int 39 (suppl 32): 45-50

Mühlbauer B und Osswald H (1992) Feeding but not salt-loading is the dominant factor controlling urinary dopamine excretion in conscious rats. Naunyn Schmiedeberg`s Arch Pharmacol 346: 469-471

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

Mühlbauer B, Gleiter CH, Büscher K, Gies C und Osswald H (1995) Contribution of L-tyrosine and L-DOPA to the renal dopamine excretion in rats. Pfluegers Arch 429 (suppl): R125

Mühlbauer B und Osswald H (1993) Urinary dopamine excretion in conscious rats: effect of carbidopa in different states of sodium balance. Renal Physiol Biochem 16: 117-124

Mühlbauer B (1996) Die therapeutische Wirksamkeit von Dopamin bei akutem Nierenversagen. Anesthesist 45: 657-669

Mühlbauer B, Spöhr F, Schmidt R und Osswald H (1997) Role of renal nerves and endogenous dopamine in amino acid-induced glomerular hyperfiltration. Am J Physiol 273: F144-f149

Nakayama T, Izumi Y, Soma M und Kanmatsuse K (1998) Adrenal renin-angiotensin-aldosteron system in streptozotocin-diabetic rats. Horm Metab Res 30(1): 12-15

Nielsen S, Hove KY, Dollerup J, Christiansen JS, Scmitz O und Mogensen CE (2001) Losartan modifies glomerular hyperfiltration and insulin sensitivity in type I diabetes. Diabetes Obes Metab 3(6): 463-471

Obineche EN, Mensah-Brown E, Chandranath SI, Ahmed I, Naseer O und Adem A (2001) Morphological changes in the rat kidney following long-term diabetes. Arch of Physiol and Biochem 109(3): 241-245

O´Conell DP, Vaughan CJ, Aherne AM, Botkin SJ, Wang Z-Y, Felder RA und Carey RM (1998) Expression of dopamine D_3 receptor protein in the rat kidney. Hypertension 32: 886-895

O´Conell DP, Botkin SJ, Ramos SI, Sibley DR, Ariano MA, Felder RA, und Carey RM (1995) Localisation of D_1A receptor protein in rat kidney. Am J Pysiol 268: F1185-F1197

O´Donell MP, Kasiske BL und Keana WF (1988) Glomerular hemodynamic and structural alterations in experimental diabetes mellitus. FASEB 2: 2339-2347

Ogihara T, Asano T, Ando K, Chiba Y, Sakoda H, Anai M, Shojima N, Ono H, Onishi Y, Fujishiro M, Katagiri H, Fukusshima Y, Kikuchi M, Noguchi N, Aburatani H, Komuro I und Fujita T (2002) Angiotensin II-induced insulin resistance is associated with enhanced insulin signalling. Hypertension 40(6): 872-879

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

Ortola FV, Ballerman BJ, Andersen S, Mendez RE und Brenner BM (1987) Elevated plasma atrial natriuretic peptide levels in diabetic rat. J Clin Invest 80: 670-674

Remuzzi A, Perico N, Amuchastegi CS, Malanchini B, Mazerska M, Battaglia C, Bertani T und Remuzzi G (1993) Short- and long-term effect of angiotensin II

receptor blockade in rats with experimental diabetes. J Am Soc Nephrol 4: 40-49

Perry CG, Palmer T, Cleland SJ, Morton IJ, Salt IP, Petrie JR, Gould GW und Connell JM (2003) Decreased insulin sensitivity during dietary sodium restriction is not mediated by effects of angiotensin II on insulin action. Clin Sci (Lond) 105(2): 187-194

Petrie JR, Morris AD, Minamisawa K, Hilditch TE, Elliott HL, Small M und McConnell J (1998) Dietary sodium restriction impairs insulin sensitivity in noninsulin-dependent diabetes mellitus. J Clin Endocrinol Metab 83(3): 1552-1557

Pollock AC, Lawrence RJ und Field JM (1991) Tubular sodium handling and tubuloglomerular feedback in experimental diabetes mellitus. Am J Physiol 260 (6Pt2): F946-F952

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

Rudberg S, Lemne C, Persson B, Krekula A, de Faire U und Aperia A (1997) The dopaminuric response to high salt diet in insulin-dependent diabetes mellitus and in family history of hypertension. Pediatr Nephrol 11: 169-173

Sakamoto K, Kikkawa R, Haneda M und Shigeta Y (1995) Prevention of glomerular hyperfiltration in rats with streptozotozin-induced diabetes by an atrial peptide receptor antagonist. Diabetologia 38(5): 536-542

Schambelan M, Balke S, Sraer J, Bens M, Nivez MP und Wahbe F (1985) Increased prostaglandin production by glomeruli isolated from rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus. J Clin Invest 75(2): 404-412

Schleicher ED und Olgemöller B (1992) Glomerular Changes in diabetes mellitus. Eur J Clin Chem Clin Biochem 30: 635-640

Seeman P und Van Tol HH (1994) Dopamine receptor pharmacology. Trends Pharmacol Sci 15: 264-270

Seyer-Hansen K, Hansen J und Gundersen HJG (1980) Renal hypertrophy in experimental diabetes. A Morphometric study. Diabetologia 18: 501-505

Seri I und Aperia A (1988) Contribution of dopamine 2 receptors to dopamine-induced increase in glomerular filtration rate. Am J Physiol 254: F196-201

Shostak A und Gotloib L (1996) Increased peritoneal permeability to albumin in streptozotozin diabetic rats. Kidney Int 49: 705-714

Sokoloff P, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Martres MP, Giros B und Schwartz JC (1992) Pharmacology of human dopamine D_3 receptor expressed in a mammalian cell line: comparison with D_2 receptor. Eur J Pharmacol 225: 331-337

Thadhani R, Pascual M und Bonventre JV (1996) Acute renal failure. N Engl J Med 334 : 1448-1460

Thompson BT und Cockrill BA (1994) Renal-dose dopamine: a siren song ? Lancet 334: 7-8

Thomson SC, Deng A, Bao D, Satriano J, Blantz RC und Vallon V (2001) Ornithine decarboxylase, kidney size and the tubular hypothesis of glomerular hyperfiltration in experimental diabetes. J Clin Invest 107(2): 217-224

Tucker BJ, Collins RC, Ziegler MG und Blantz RC (1991) Disociation between glomerular hyperfiltration and extracellular volume in diabetic rats. Kidney Int 39: 1176-1183

Unger T, Buu NT, Kuchel O und Schurch W (1980) Conjugated dopamine. Peripheral origin, distribution and response to acute stress in the dog. Can J Physiol Pharmacol 58: 22-27

Vallon V, Kirschenmann D, Wead LM, Lortie MJ, Satriano J, Blantz RC und Thomson SC (1997) Effect of chronic salt loading on kidney function in early and established diabetes mellitus in rats. J Lab Clin med 130: 76-97

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

Vallon V, Blantz RC und Thomson S (2003) Glomerular hyperfiltration and the salt paradox in rarly type I diabetes mellitus: a tubulo-centric view. J Am Soc Nephrol 14: 530-537

Walker JD, Bending JJ, Dodds RA, Viberti GC und Keen H (1989) Restriction of dieary protein and progression of renal failure indiabetic nephropathy. Lancet: 1411-1415

Wang ZQ, Siragy HM, Felder RA und Carey RM (1997) Intrarenal dopamine production and distribution in the rat. Hypertension 29: 228-234

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

Wilkes BM (1987) Reduced glomerular angiotensin II receptor density in diabetes mellitus in the rat: time course and mechanism BM. Wilkes Endocrinology 120(4): 1291-1298

Wolfovitz E, Grossman E, Folio CJ, Keiser HR, Kopin IJ und Goldstein DS (1993) Derivation of urinary dopamine from plasma dihydroxyphenylalanine in humans. Clin Sci 84: 549-557

Wolf G, Zahner G, Schroeder R und Stahl RA (1996) Transforming growth factor beta mediates the angiotensin II induced stimulation of collage type IV synthesis in cultured murine proximal tubular cells. Nephrol Dial Transplant 11(29): 263-269

Wolf G, Ziyadeh FN (1997) Renal tubular hypertrophy induced by angiotensin II. Semin Nephrol 17(5):448-454

Woods LL, Mizelle HL und Hall JE (1987) Control of renal hemodynamics in hyperglycemia: Possible role of tubuloglomerular feedback. Am J Physiol 252: F65-F73

Worth DP, Harvey JN, Brown J, Worral A und Lee MR (1986) Domperidone treatment in man inhibits the fall in plasma renin activity induced by intravenous gamma-L-glutamyl-L-dopa. Br J Clin Pharmacol 21: 497-502

Worth D, Harvey J, Brown J und Lee M (1988) The effects of intravenous L-dopa on plasma renin activity, renin function and blood pressure in man. Eur J Clin Pharmacol 35: 137-141

Ziegler MG, Morrissey EC, Kennedy B und Elayan H (1990) Sources of urinary catecholamines in renal denervated transplant recipients. J Hypertension 8: 927-931

Zigmond RE, Schwarzschild MA und Ritterhouse AR (1989) Acute regulation of tyrosine hydroxylase by nerve activity and by neurotransmitters via phosphorylation. Annu Rev Neurosci 12:415-461

Ziyadeh FN und Sharma K (1995) Role of transforming growth factor ß in diabetic glomerulerosis and renal hypertrophy. Kidney Int 51: S34-S36

Lebenslauf

Berit Angela Sonja Halsig

09.04.1977	geboren in Ravensburg als Tochter von Monika Marie Halsig, geb. Pörner und Peter Sylvester Halsig
1983 – 1987	Grundschule Weststadt Ravensburg
1987 – 1996	Spohn-Gymnasium Ravensburg
Juni 1996	Allgemeine Hochschulreife
Ab April 1997	Studium der Medizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen/Nürnberg
Oktober 1998	Wechsel an die Eberhard-Karls-Universität Tübingen
August 2000	Ärztliche Vorprüfung
August 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
März 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2004 - März 2005	Praktisches Jahr am Klinikum am Steinenberg, Reutlingen
31. Mai 2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ab November 2005	Arbeit als Assistenzärztin in der Inneren Abteilung des Kreiskrankenhauses Calw

Danksagung

Die vorliegende Arbeit ist am Institut für Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Tübingen entstanden.

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald danke ich für die Ermöglichung der Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Großer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerd Luippold für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit, für seinen überaus engagierten Einsatz, seine Geduld, seine persönliche Unterstützung bei der Durchführung und seine fachkundigen Anregungen beim Schreiben der Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Swetlana Schneider, die mich von Beginn der Doktorarbeit an mit viel Engagement und unermüdlicher Motivation begleitet hat.

Bei Frau Christine Piesch möchte ich mich für die kompetente Durchführung der Messungen bedanken und allen Mitarbeitern des Instituts für Pharmakologie für die überaus angenehme Arbeitsatmosphäre. Sie haben die Zeit der Doktorarbeit auch für mich persönlich zu einer erfreulichen Erfahrung werden lassen.

Meinen Eltern und Jochen Raithel in Liebe und Dankbarkeit.