

**Aus dem Department für Experimentelle und Klinische
Pharmakologie und Toxikologie der Universität Tübingen
Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie
Direktor: Prof. Dr. Dr. B. Nürnberg**

**Charakterisierung der renalen und systemischen
Eigenschaften von Dopamin D3- Rezeptor Antagonisten
in vivo**

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

**der Medizinische Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Jonas Boelsen (geb. Heisig)
aus
Achim
2012**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Mühlbauer

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Artunc

Carmen
Charlotte Winona
Gustav Johannes

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	
1.1. Gegenstand der Arbeit	5
1.2. Grundlagen	7
1.3. Fragestellung der Arbeit	27
2. Material & Methoden	
2.1. Versuchstiere	28
2.2. Wirkstoffe	28
2.3. Infusionslösungen	29
2.4. Clearance Experimente	29
2.5. Experimente zur Dosisfindung	34
2.6. Experimente nach Diabetes Induktion	35
2.7. Analytik während der Clearance Experimente	38
2.8. Analytik nach Diabetes Induktion, STWKV	39
2.9. Berechnungen und zugrunde gelegte Formeln	41
2.10. Dokumentation und statistische Auswertung	43
3. Ergebnisse	
3.1. Ergebnisse der Clearance Experimente	44
3.2. Ergebnisse nach Diabetes Induktion	50
3.3. Ergebnistabellen	54
3.4. Ergebnisabbildungen	65
4. Diskussion	
4.1. AS- Hyperfiltration und Hemmung mittels D3RA	75
4.2. Veränderung von Kreislaufparametern durch D3RA	78
4.3. Vergleich der einzelnen Wirkstoffe	79
4.4. Dosis- Wirkungs- Kurve	80
4.5. Diabetes mellitus Modell und metabolische Variablen	81
4.6. Hemmung der diab. Hyperfiltration durch D3RA	82
4.7. Albuminurie im Stoffwechselfäfigversuch	84
4.8. Veränderung metabolischer Variablen	85
4.9. Veränderung von Kreislaufparametern durch Diabetes	86
5. Zusammenfassung	87
6. Abkürzungsverzeichnis	89
7. Literaturverzeichnis	90

1. EINLEITUNG

1.1. *Gegenstand der Arbeit*

Die Inzidenz des Diabetes mellitus wird in der Zukunft weiter ansteigen. Eine amerikanische Untersuchung nimmt an, dass die Anzahl von Patienten mit Diabetes mellitus zwischen 2000 und 2050 um 165% steigen wird [Boyle et al., 2001]. Ähnliche Zuwachsraten sind auch für andere westliche Länder zu befürchten. Eine häufige Komplikation bei langjährigem Diabetes mellitus ist die diabetische Nephropathie (DN). Etwa ein Viertel der Patienten mit Typ 1 Diabetes und ein unterschiedlicher Anteil der Patienten mit Typ 2 Diabetes zeigen eine glomeruläre Hyperfiltration in den ersten Krankheitsjahren [Jones et al, 1995]. Bei einer prospektiven Untersuchung zeigte sich ein hoher negativer prädiktiver Wert in Bezug auf das Fehlen einer initialen Hyperfiltration und der Entstehung einer DN [Rudberg et al. 1992]. Auf welcher Grundlage diese Hyperfiltration entsteht ist nicht genau geklärt. Bekannt ist, dass neben anderen vasoaktiven Substanzen auch das Dopamin die glomeruläre Filtration und Hämodynamik der Niere beeinflusst. Vorhergehende Untersuchungen von Mühlbauer und Luippold konnten zeigen, dass durch Antagonisierung der Dopaminwirkung eine aminosäureinduzierte und Streptozotocin- induzierte glomeruläre Hyperfiltration abgeschwächt werden kann. Zum Einsatz kamen in den Untersuchungen klinisch eingesetzte Dopamin- D2- Rezeptorantagonisten und experimentelle Dopamin- D3- Rezeptorantagonisten [Mühlbauer et al., 1994b; Luippold, 1998a; Luippold et al., 2005]. Diese Untersuchungen stützen die Hypothese, dass der Transmitter Dopamin an der pathophysiologischen Hyperfiltration in der Frühphase der diabetischen Nephropathie beteiligt ist. Im weiteren Verlauf der diabetischen Nephropathie kommt es zur fortschreitenden Verringerung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), bis letztlich eine terminale Niereninsuffizienz vorliegt. Die terminale Niereninsuffizienz wird im englischsprachigen Raum auch als end- stage renal disease (ESRD) bezeichnet. Patienten mit ESRD bedürfen einer Nierenersatztherapie, zu der entweder die Hämodialyse oder eine

Nierentransplantation zählen. Die häufigste Ursache der terminalen Niereninsuffizienz in westlichen Ländern ist die diabetische Nephropathie. In den vereinigten Staaten von Amerika litten im Jahr 2007 44% der Patienten, die einer ESRD- Therapie zugeführt wurden, an Diabetes mellitus [United States Renal Data System, 2009]. Eine Untersuchung von Lippert et al. schätzt die Inzidenz von terminalem Nierenversagen bei Patienten mit manifestem Diabetes mellitus auf etwa 5/100.000/Jahr [Lippert et al., 1995]. Auch Brancati et al. konnten bei einer prospektiven Studie in den USA ein 12,7fach erhöhtes Risiko für eine terminale Niereninsuffizienz bei Patienten mit Diabetes mellitus im Vergleich zur Normalbevölkerung nachweisen [Brancati et al., 1997]. Neben der erhöhten Morbidität und Mortalität spielen auch gesundheitsökonomische Aspekte eine wichtige Rolle in der Prävention der terminalen Niereninsuffizienz. Die durchschnittlichen Versorgungskosten eines Patienten mit Diabetes mellitus und ESRD betragen jährlich bis zu 50.000 US-Dollar [Kobrin, 1998, Lee et al., 2002].

In dieser Arbeit wurde die Beeinflussung der glomerulären Hyperfiltration durch selektive D3- Rezeptor- Antagonisten untersucht. Die Hyperfiltration wurde entweder durch Aminosäuregabe oder Induktion eines Diabetes mellitus mittels Streptozotocin ausgelöst. Diese tierexperimentelle Untersuchung erfolgte an narkotisierten Sprague- Dawley- Ratten.

1.2. Grundlagen

1.2.1. Niere

Die paarigen Nieren liegen beiderseits retroperitoneal im Bauchraum. Sie setzen sich aus harnbildenden und harnleitenden Strukturen zusammen. Die Nieren sind funktionell für die Homöostase der Körperflüssigkeiten in Bezug auf die Menge, Osmolalität, pH- Wert und Ionenkonzentration verantwortlich. Des Weiteren werden Stoffwechselprodukte und andere körperfremde Substanzen durch die Nieren eliminiert. Als endokrines Organ nehmen die Nieren mit dem Renin- Angiotensin- System, mit Vitamin D3 und Erythropoetin an äußerst wichtigen regulatorischen Vorgängen teil.

Makroskopisch sind sie bohnenförmig und von rotbrauner Farbe. Man unterscheidet einen oberen und einen unteren Pol, zudem eine Vorder- und Rückseite, die lateral ineinander übergehen. Medial befindet sich eine Einkerbung, die als Nierenhilus bezeichnet wird. Im Nierenhilum treten Ureter, Gefäße und Nerven in die Niere ein bzw. aus. Das Gewicht einer gesunden Niere beträgt etwa 120 bis 200 Gramm, wobei die rechte Niere in der Regel etwas kleiner ist. Dem oberen Nierenpol liegen die Nebennieren auf. Die arterielle Blutversorgung erfolgt über die beiden Aa. renales, die fast rechtwinklig aus der Aorta abdominalis entspringen. Der venöse Abstrom erfolgt in der Regel über mehrere Venenstämme, die am Hilum austreten und sich zur V. renalis vereinen. Im Längsschnitt lassen sich zwei Anteile unterscheiden, einerseits die Nierenrinde und andererseits das Nierenmark. Das Mark ist pyramidenförmig aufgebaut und wird von Nierenrinde überzogen. An der Pyramidenspitze ragt die Nierenpapille in das Nierenbecken hinein. Die menschliche Niere ist multipapillär aufgebaut, wohingegen bei kleinen Säugern (z.B. Ratten oder Kaninchen) eine einpapilläre Niere vorliegt. Mikroskopisch setzt sich die Nieren aus Nephronen, Sammelrohren und Blutgefäßen zusammen.

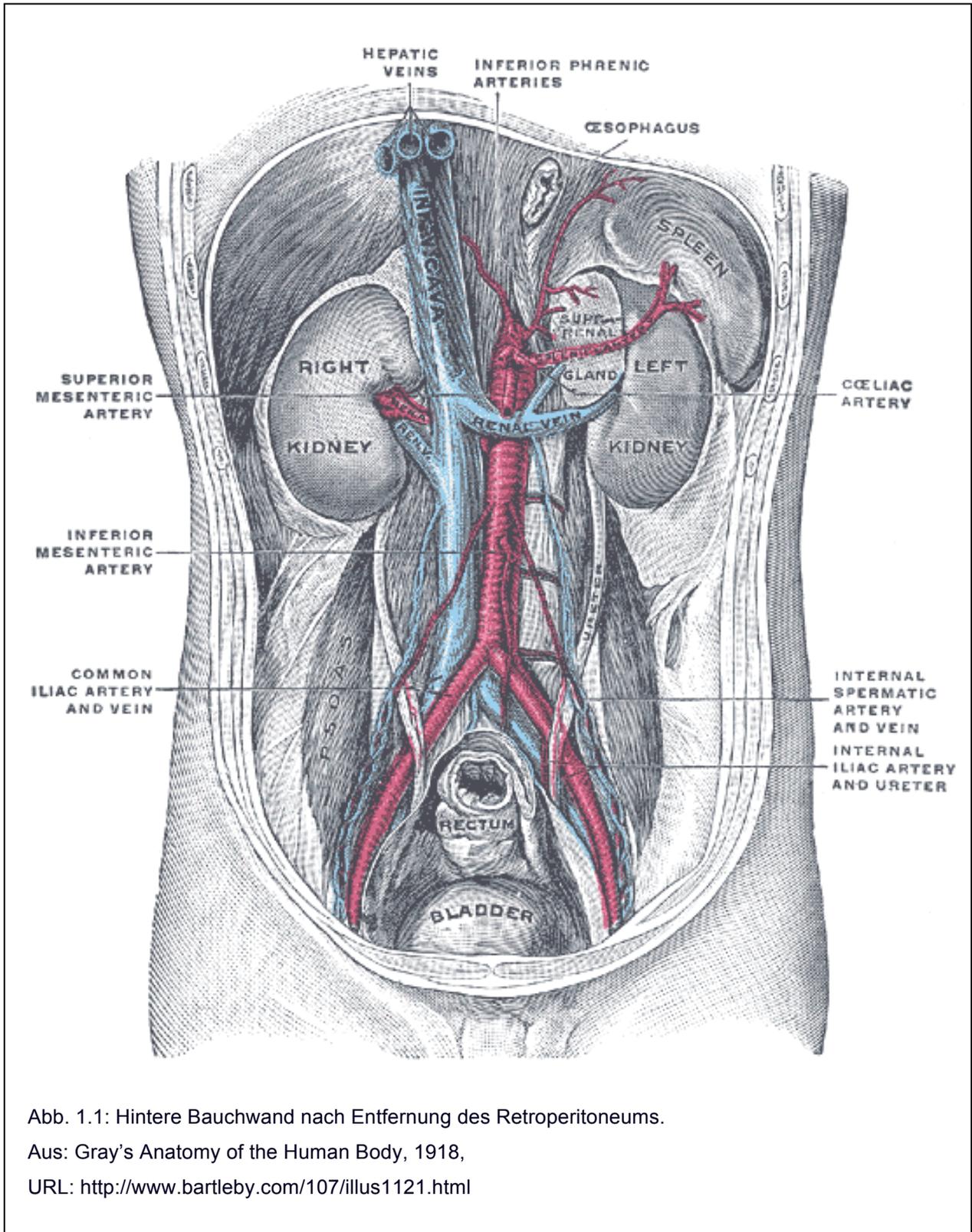


Abb. 1.1: Hintere Bauchwand nach Entfernung des Retroperitoneums.

Aus: Gray's Anatomy of the Human Body, 1918,

URL: <http://www.bartleby.com/107/illus1121.html>

Das Nephron wird als funktionelle und strukturelle Einheit der Niere bezeichnet, wobei auch das Sammelrohr an der Harnbildung beteiligt ist. Das Nephron beginnt mit einem Nierenkörperchen, das in der Nierenrinde lokalisiert ist. Funktionell ist das Nierenkörperchen eine Filtrationseinrichtung, in der kontinuierlich ein Anteil des Blutplasmas als Ultrafiltrat ausgeschieden wird. Dieses Ultrafiltrat erreicht als Primärharn danach das dem Nierenkörperchen angeschlossene komplexe Tubulussystem des Nephrons. Zu jedem Nierenkörperchen führt eine Arteriole, welche sich am Gefäßpol des Nierenkörperchens in ein Kapillarknäuel aufzweigt. Aus dem Kapillarknäuel geht eine abführende Arteriole hervor. Das Kapillarknäuel ist von einer blind-endenden Tubulussackung, der Bowman'schen Kapsel, umgeben. Die Kapillaren sind hierbei von den Podozyten überzogen, die dem viszeralem Epithel der Bowman'schen Kapsel entsprechen. Am Gefäßpol geht das viszerale Epithel in das parietale Epithel über, das am Harnpol zum Tubulusepithel wird. Zwischen Podozyten und Kapillaren befindet sich die glomeruläre Basalmembran (GBM). Diese drei Teile gemeinsam bilden den Glomerulus. Die Tubuli der Niere sind kleine Kanäle, die von einschichtigem Epithel gebildet werden. Während der Harnpassage entsteht durch diverse Sekretions- und Resorptionsvorgänge der endgültige Harn, der dann im Sammelrohr weiter konzentriert wird. Dem Nierenkörperchen schließt sich das gewundene proximale Tubuluskonvolut an, das über die sog. Henle'sche Schleife in das Nierenmark ab- und wieder in die Rindenregion aufsteigt. Dieser Schleife schließt sich das gewundene distale Konvolut an, das mit dem eigenen Nierenkörperchen eine Verbindung über die Macula densa ausbildet. Die Macula densa dient als „Chloridsensor“ und ist für ein Filtrations- Resorptions-Feedback verantwortlich. Macula densa, afferente und efferente Arteriole und reninspeichernde epitheloide Myozyten in der Wand des Vas afferens gehören zum sog. juxtaglomerulären Apparat. Dieser ist für die Reninfreisetzung und so GFR- und Blutdruckregulation von entscheidender Bedeutung. Das distale Konvolut geht schließlich über einen Verbindungstubulus in das Sammelrohr über, das in der Regel Zufluss von 11 Nephronen erhält [Benninghoff et al., 2003].

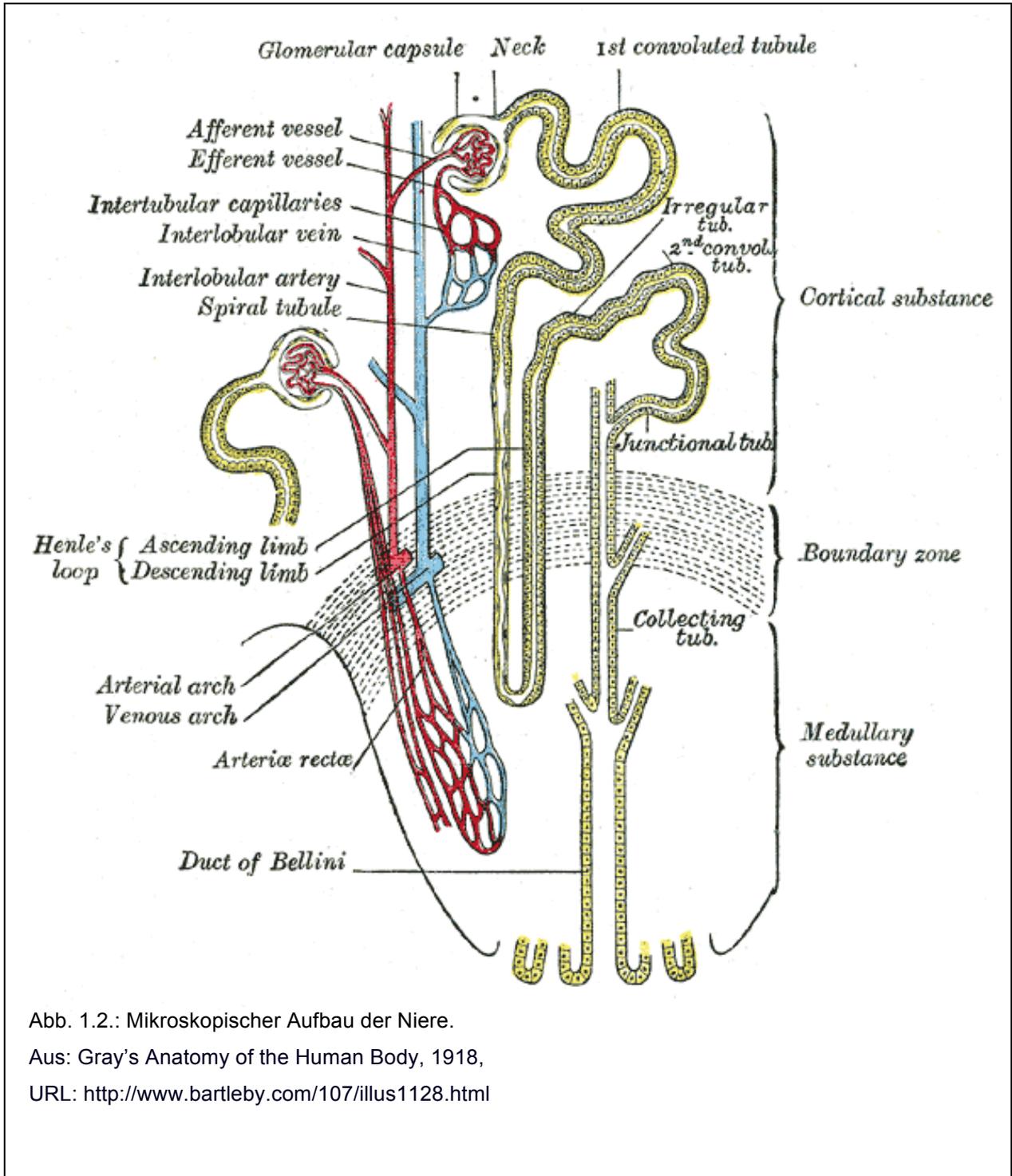


Abb. 1.2.: Mikroskopischer Aufbau der Niere.
Aus: Gray's Anatomy of the Human Body, 1918,
URL: <http://www.bartleby.com/107/illus1128.html>

1.2.2. Primärharnbildung und GFR

Der Ausgangspunkt der Primärharnbildung ist das Glomerulum. Der Blutdruck in der Glomerulumkapillare wird durch die Muskelspannung im Vas afferens und Vas efferens bestimmt. Die Regulation der Wandspannung dieser Gefäße ist unter anderem von der sympathischen Aktivität und hormonalen Faktoren abhängig. Dabei wirken Angiotensin und Norepinephrin stärker vasokonstriktorisch auf das Vas efferens als auf das Vas afferens und erhöhen so den hydraulischen Druck in der Glomerulumkapillare. Zudem kann durch eine Veränderung der filtrierenden Oberfläche eine Veränderung der Primärharnbildung erreicht werden. Hierbei wirken Prostaglandine und Parathormon als humorale Faktoren auf das Mesangium ein.

An der Primärharnbildung sind die glomeruläre Basalmembran und ihre hydraulische Permeabilität (k), mesangiale Zellen mit Myofilamenten, die die Glomerulumoberfläche (s) beeinflussen, die Differenz zwischen onkotischem Druck in der Glomeruluskapillare und der Bowman- Kapsel- Raum (ΔP_i) und die Differenz zwischen hydraulischem Druck in der Glomeruluskapillare und im Bowman- Kapsel- Raum (ΔP) beteiligt.

Das Einzelnephronfiltrat (SNGFR) berechnet sich hieraus wie folgt:

$$\text{SNGFR} = k \times s \times (\Delta P - \Delta P_i)$$

Tierexperimentelle Untersuchungen und Beobachtungen am Menschen konnten zeigen, dass Läsionen einzelner Glomerula durch Hypertrophie, intrakapilläre Hypertonie und Hyperfiltration ausgeglichen werden können, sodass die globale Clearance gleich bleiben kann. Diese Mechanismen werden auch bei der diabetischen Nephropathie gefunden.

Als Maß für die GFR dient im klinischen Alltag das Serumkreatinin. Das Serumkreatinin ist von der Kreatininproduktionsrate und der GFR abhängig. Da Kreatinin zu variablen Teilen auch extrarenal eliminiert wird ist die Bestimmung dieses Wertes oder die Berechnung der Kreatinin- Clearance nicht präzise. Festzuhalten ist jedoch, dass schon bei einem geringen Serumkreatininanstieg ein erheblicher Funktionsverlust der Nieren besteht.

Die genaueste Bestimmung der GFR erfolgt mithilfe der Inulin- Clearance, da Inulin weder tubulär sezerniert noch rückresorbiert wird und ausschließlich per renaler Filtration eliminiert wird. Für die Ermittlung einer Clearance beim Menschen gilt allgemein folgende Formel [Kuhlmann et al, 2003]:

$$\text{Clearance [ml/min]} = \frac{U \text{ [g/l]} \times \text{Uvol [ml]} \times 1,73 \text{ m}^2}{s \text{ [g/l]} \times t \text{ [min]} \times \text{KO [m}^2\text{]}}$$

U =	Konzentration der gemessenen Substanz im Urin
Uvol =	Urinvolumen pro 24 h
s =	Konzentration der gemessenen Substanz im Serum
t =	1440 min (bei Urinsammlung über 24 h)
KO =	Körperoberfläche des Patienten in m ²

1.2.3. Sekundärharnbildung und tubuläre Transportmechanismen

In der menschlichen Niere werden etwa 120 ml Primärharn pro Minute gebildet. Die einzelnen Tubulusabschnitte verfügen über diverse Transportmechanismen. Viele dieser Transporter werden, sekundär aktiv, über die Na⁺- K⁺- ATPase an der basolateralen Tubulusmembran ermöglicht. Der Wassertransport erfolgt passiv nach vorhergehendem Elektrolyttransport.

- Proximales Konvolut:

Im proximalen Tubulus werden etwa 60- 70 % der filtrierten Menge von Natriumchlorid und Wasser reabsorbiert. Wichtigster luminaler Carrier ist ein Na⁺- H⁺- Austauscher, der für eine intrazelluläre Anreicherung von Natrium sorgt. Basolateral wird Natrium durch die Na⁺- K⁺- ATPase aus der Zelle in die Blutbahn transportiert. Außerdem findet basolateral noch ein Na⁺- HCO₃⁻- Symport nach extrazellulär statt. Die für diese Vorgänge nötige Kohlensäure wird durch eine luminale, membranständige Carboanhydratase bereitgestellt. Die basolaterale Anreicherung von HCO₃⁻ wirkt osmotisch aktiv und ermöglicht so eine Wasserrückresorption. In diesem Wasserstrom werden auch kleine Teilchen wie Na⁺ und Cl⁻ mitgerissen. Dieser Mechanismus wird als „solvent drag“ bezeichnet und ist für rund 30% der proximalen Natriumresorption verantwortlich. Neben der Wasser- und Elektrolytresorption findet eine

Rückresorption von Glucose und Aminosäuren im Symport mit Na^+ statt. Der Glucosetransporter zeigt bei einer Plasmakonzentration von etwa 10 mmol/l Glucose eine Sättigungscharakteristik. Bei Diabetes mellitus kommt es so zum Symptom der Glukosurie. Für den Aminosäuretransport gibt es unterschiedliche Carriersysteme, die bei bestimmten Erkrankungen einzeln ausfallen und so zu selektiven Aminoazidurien führen.

- Henle- Schleife:

Die Henle Schleife wird auch als Verdünnungssegment bezeichnet. Am Ende der Henle- Schleife ist der Harn hypoton, da der Salztransport im für Wasser impermeablen Schleifensegment stattfindet. In diesem Tubulusabschnitt werden rund 30 % des primär filtrierte Kochsalzes rückresorbiert. Wichtigster Transporter ist der Na^+ - 2Cl^- - K^+ - Kotransporter. Das aufgenommene Kalium rezirkuliert über luminale Kaliumkanäle, Chlorid erreicht basolateral über Chloridkanäle das Blut. Natrium wird über die basolaterale Na^+ - K^+ - ATPase aus der Zelle entfernt. Durch den elektrisch ungleichen Transport entsteht ein lumenpositives Potential von etwa 5-10 mV, was für einen parazellulären Transport von weiterem Natrium führt. Der Zwischenzellraum in der Henle- Schleife ist für kleine Kationen durchlässig, hingegen aber relativ undurchlässig für Anionen und Wasser. Durch ein Gegenstromsystem wird die Osmolarität im Nierenmark stark gesteigert, was für die Wasserrückresorption im Sammelrohr von entscheidender Bedeutung ist (s.u.).

- Distales Konvolut:

Hier befindet sich die sog. Macula- densa Region. Sie dient als Messinstrument für die frühdistale Kochsalzkonzentration und besteht wohl aus spezifisch umgebauten Zellen der Henle- Schleife mit einem Na^+ - 2Cl^- - K^+ - Kotransporter. Wenn die Transportkapazität der Henle- Schleife ausgeschöpft ist, registrieren die Zellen der Macula- densa dieses und lösen durch eine Rückkopplung eine Verminderung des Einzelnephronfiltrates aus. Dieser Mechanismus wird als tubulo- glomeruläres Feedback bezeichnet. Eine weitere Kochsalzresorption findet in diesem Segment über einen durch Thiazid- Diuretika hemmbaren Na^+ - Cl^- - Kotransporter statt.

- **Sammelrohr:**

Im Sammelrohr gibt es drei unterschiedliche Zelltypen. Protonensezernierende A- Zwischenzellen, bicarbonatsezernierende B- Zwischenzellen und Na⁺-resorbierende Hauptzellen. Dieser Resorption findet im Austausch zu K⁺ statt. Im Sammelrohr findet die Feinkontrolle der Natriumresorption statt. Unter Anwesenheit von Aldosteron kann ein sehr natriumarmer Urin gebildet werden. Die Hauptzellen regulieren zudem die Wasserausscheidung. Unter dem Einfluss von Adiuretin werden in den Hauptzellen luminale Wasserkanäle eingebaut. Beim Verlauf des Sammelrohres durch das Nierenmark ist die peritubuläre Osmolarität sehr hoch. Je nach Menge der Wasserkanäle kann so eine Harnkonzentrierung bis zu 1500 mosmol/l erreicht werden. Durch Adiuretin kann die Harnmenge zwischen 0,7 und 20 Liter täglich variiert werden [Deetjen et al., 1999].

1.2.4. Regulation der Nierendurchblutung

Die normale Nierendurchblutung beträgt beim gesunden Erwachsenen etwa 1,2 Liter pro Minute, was in Ruhe rund ¼ des HZV entspricht. Je nach Spannung des Vas afferens und efferens verändert sich der renale Plasmafluss (RPF) und die glomeruläre Filtrationsrate. Bei Tonuserhöhung in der afferenten Arteriole sinken sowohl RPF als auch GFR. Bei Tonuserhöhung in der efferenten Arteriole sinkt der RPF, die GFR hingegen steigt an.

Die Niere besitzt eine Autoregulation, die dafür sorgt, dass die Nierendurchblutung in weiten Bereichen des MAP konstant bleibt. Da die Autoregulation auf eine Konstanthaltung der GFR abzielt erfolgt die Regulation an Vas afferens und efferens gleichzeitig. Als myogene Komponente scheinen die glatten Muskelzellen der Arteriolen eine Erhöhung des Druckes mit Kontraktion zu beantworten. Über das Renin- Angiotensin- System wird zudem eine Vasokonstriktion erreicht. Bei Druckanstieg wird die Reninsekretion in der afferenten Arteriole gedrosselt. Das tubulo- glomeruläre Feedback greift ein, wenn zu große Mengen NaCl filtriert werden. Über einen nicht genau bekannten Mechanismus wird bei steigender NaCl- Konzentration im distalen Tubulus eine Kontraktion der afferenten Arteriole erreicht, was zu einer Verminderung von

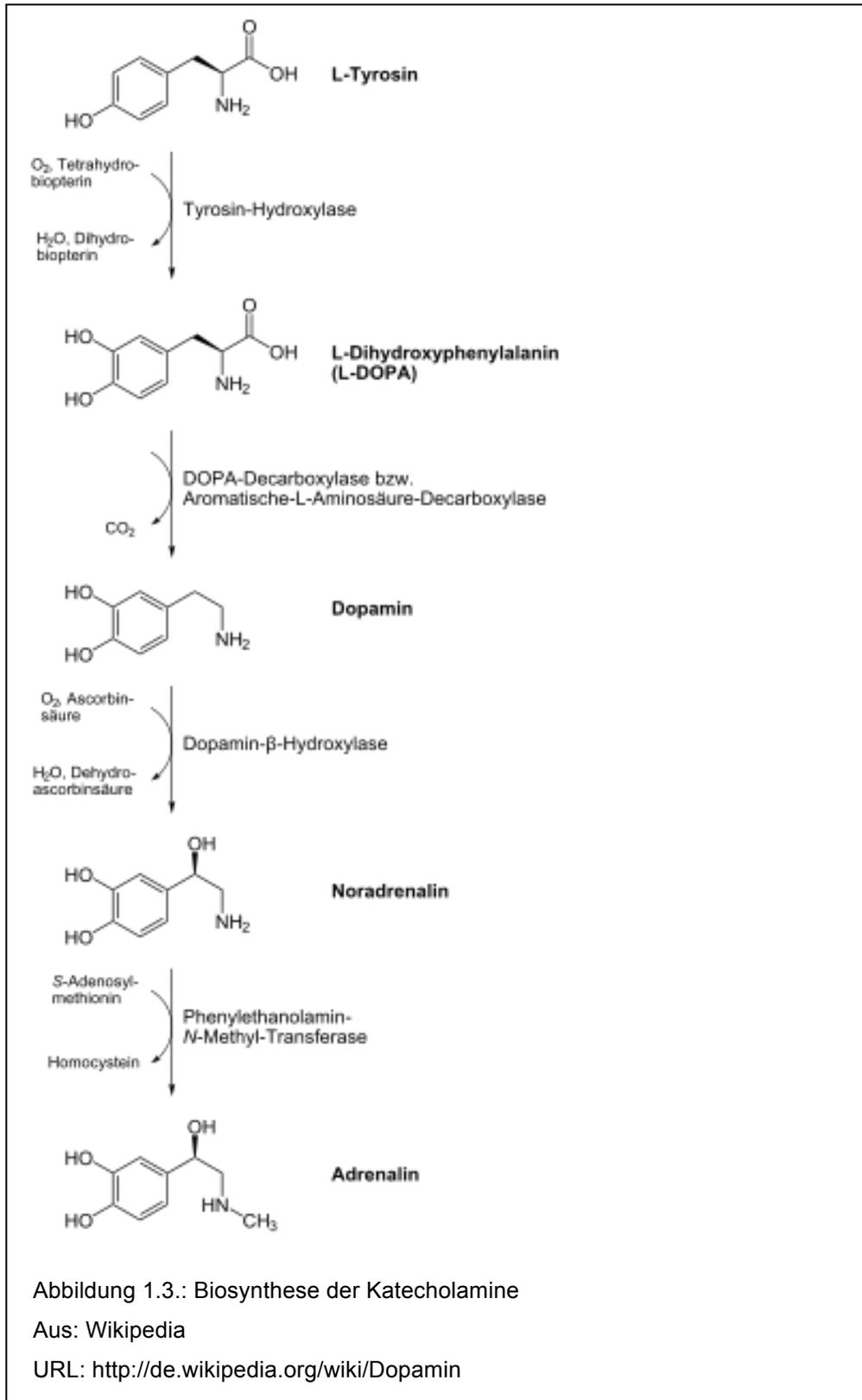
RPF und GFR führt. Viele weitere Faktoren, wie Adenosin, Acetylcholin, Katecholamine und Dopamin regulieren die Gefäßweite der Nieren. In niedrigen Dosen scheint Dopamin eine Dilatation beider Arteriolen zu bewirken, wohingegen eine hohe Dopaminkonzentration gegensinnige Effekte hervorruft [Deetjen et al., 1999]. Untersuchung von Luippold et al. konnten zeigen, dass es über den Dopamin D3- Rezeptor zu Veränderungen der intraglomerulären Verschlussdrücke kommt, die zu einer postglomerulären Vasokonstriktion, mit dazugehörigem GFR- Anstieg passen würde [Luippold et al., 2000].

1.2.5. Dopaminsynthese

Das biogene Amin Dopamin gehört zu der Gruppe der Katecholamine. Neben Dopamin beinhaltet diese Gruppe auch Noradrenalin und Adrenalin. Biochemisches Ausgangsprodukt ist L- Thyrosin. Die Katecholamine haben einen gemeinsamen Biosyntheseweg, wobei Dopamin erster eigenständiger Transmitter ist. L- Thyrosin wird zu Dihydroxyphenylalanin (L- DOPA) hydroxyliert und in der Folge zu Dopamin decarboxyliert. Unter Anwesenheit der Dopamin- β - Hydroxylase entsteht Noradrenalin. Bilden Neurone zudem das Enzym Phenylethanolamin- N- methyltransferase, so entsteht Adrenalin. L- Thyrosin wird entweder enteral aufgenommen oder aus L- Phenylalanin synthetisiert [Löffler & Petriedes, 2003].

Neben seiner wichtigen Rolle als zentraler Neurotransmitter ist Dopamin auch in extraneuronalen Geweben für viele Regulationsvorgänge verantwortlich. Renales Dopamin wird durch die L- aromatic acid decarboxylase (L-AADC) der niereneigenen Tubuluszellen synthetisiert. Das Substrat wird aus zuvor filtrierte und über einen Symporter reabsorbiertem L- DOPA gebildet [Suzuki et al. 1984]. Hauptbildungsort ist das proximale Tubulussegment der Nephronen, da hier die höchste Aktivität der L-AADC nachgewiesen werden konnte [Hayashi et al. 1990]. Als klinischer Parameter zur Beurteilung der renalen Dopaminsyntheseleistung kann die Dopaminausscheidung in Urin angesehen werden, da die aus dem Plasma filtrierte Dopaminmenge unbedeutend klein und somit zu vernachlässigen ist [Van Loon et al., 1980]. Eine Untersuchung hat zudem gezeigt, dass die renale Dopaminausscheidung

im Urin mit der Menge an substituiertem L- DOPA korreliert [Mühlbauer et al. 1997b].



1.2.6. Dopaminrezeptoren und deren renale Lokalisation

Dopaminrezeptoren sind metabotrope Rezeptoren, die über gekoppelte G-Proteine ihre Wirkung entfalten und in der Regel aus sieben transmembranären Domänen zusammengesetzt sind (vgl. Abb.1.4). Derzeit sind fünf verschiedene Dopaminrezeptoren identifiziert worden, wobei eine Unterteilung in die D1- und D2- Rezeptorsubfamilie stattgefunden hat. Die Dopaminrezeptoren der D1-Subfamilie beinhalten den Dopamin- D1- Rezeptor und den Dopamin- D5- Rezeptor, die beide über ein Gs- Protein die Adenylatcyclase aktivieren. Die Dopaminrezeptoren der D2- Subfamilie beinhalten den Dopamin- D2-, D3-, und D4- Rezeptor und inhibieren über ein Gi- Protein die Adenylatcyclase [Löffler et al., 2003]. Die Affinität für Dopamin ist unter den einzelnen Rezeptoren unterschiedlich, sie nimmt wie folgt ab: D3 > D5 > D2 > D4 > D1 [Jose et al., 1992].

Der Dopamin D3- Rezeptor konnte im ZNS in großer Dichte im Bereich des Tuberculum olfactorium, der Stria terminalis und des Nucleus accumbens nachgewiesen werden. Vereinzelt Expression zeigten Zellen des Striatums [Sokoloff et al., 1992]. Untersuchungen über die Lokalisation des Dopamin D3- Rezeptors in der Niere, konnten eine Anreicherung von spezifischen Antikörpern im Bereich der Podozyten, des proximalen- und distalen Tubulus und den Sammelrohren zeigen. Die Abschnitte der Nierenmarkregion exprimierten keinen D3- Rezeptor [O'Connell et al., 1998]. Deckende Ergebnisse bezüglich der Expression von D3- Rezeptoren im proximalen Tubulus finden sich in einer neueren Arbeit von Nürnberger und Mitarbeitern. Eine besonders hohe D3- Rezeptordichte wurde in der Nähe des glomerulären Harnpols gefunden. Die mittels Immunfluoreszenz nachgewiesenen Rezeptoren befanden sich hierbei an der luminalen Membran der Tubulusepithelien. Eine Lokalisation an den anderen Nierenabschnitten wie bei der Arbeit von O'Connell konnte hingegen nicht gefunden werden. [Nürnberger et al., 2004]. Im Rahmen von Ergebnispräsentationen auf einer Konferenz wurden zudem Ergebnisse vorgestellt, die bisher noch nicht publiziert wurden. Hierbei wurden Dopamin D3- Rezeptoren im Bereich der Mesangiumzellen und Podozyten

Etwa 9/10 erkranken an einem Typ 2 Diabetes, der vorwiegend auf einer Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel beruht. Etwa fünf Prozent haben leiden an einem Typ 1 Diabetes, bei dem es durch Autoantikörper zu einer Zerstörung der β - Zellen im Pankreas kommt. Hieraus resultiert ein absoluter Insulinmangel. Die American Diabetes Association unterscheidet zudem noch andere Diabetesformen, die aber insgesamt eine Minderheit darstellen.

- Typ 1 Diabetes:

Bei einer Zerstörung von etwa 80 Prozent der β - Zellen steigt der Blutzuckerspiegel an. Genetische Faktoren spielen eine prädisponierende Rolle. Es konnten sowohl Autoantikörper als auch bestimmte HLA- Merkmale identifiziert werden, die mit einer Häufung von Diabetes mellitus Typ 1 korrelieren. Im Gegensatz zum Typ 2 Diabetes manifestiert sich der Typ 1 Diabetes recht rasch. Neben Inappetenz und Müdigkeit kommt es zur Polyurie und Polydipsie. Wird die Klinik verkannt kommt es aufgrund von intrazellulärem Glukosemangel zum ketoazidotischen Coma diabeticum. Patienten mit Typ 1 Diabetes sind bei Erkrankungsbeginn in der Regel jung und bedürfen einer lebenslangen Insulintherapie.

- Typ 2 Diabetes:

Beim Typ 2 Diabetes spielen zwei Störungen eine Rolle. Einerseits kommt es zu einer gestörten postprandialen Insulinsekretion, was mit postprandialer Hyperglykämie einhergeht, andererseits scheint die zelluläre Empfindlichkeit gegenüber Insulin durch einen Rezeptordefekt vermindert zu sein. Der Typ 2 Diabetes entwickelt sich in der Mehrzahl der Fälle auf dem Boden eines metabolischen Syndroms, das durch Adipositas, Hypertonie und Dyslipoproteinämie gekennzeichnet ist. Therapeutisch kommen zu Beginn insbesondere diätetische Maßnahmen in Frage. Im weiteren Krankheitsverlauf kommen unterschiedliche orale Antidiabetika oder auch subkutan verabreichtes Insulin zum Einsatz.

Komplikationen einer länger andauernden Hyperglykämie sind eine rasch progrediente Makro- und Mikroangiopathie, die diabetische Nephropathie, die diabetische Retinopathie und die diabetische Neuropathie [Herold 2010].

1.2.8. Diabetische Nephropathie

Im späten 18. Jahrhundert wurde erstmals eine Proteinurie bei Patienten mit Diabetes mellitus beschrieben. Kimmelstiel und Wilson beschrieben in den 30er Jahren eine noduläre Glomerulussklerose bei Diabetikern mit Proteinurie und Hypertonie. In den 50er Jahren etablierte sich die Nephropathie als typische Komplikation des Diabetes mellitus, wobei etwa 50 % der Patienten mit Diabetes mellitus nach 20 Jahren Erkrankungsdauer an dieser Komplikation litten [Soman et al., 2009]. Zum heutigen Zeitpunkt ist die Prävalenz der diabetischen Nephropathie durch eine verbesserte Therapie zwar geringer, jedoch manifestiert sie sich nach 10 bis 30 jähriger Erkrankungsdauer bei rund 30 bis 45 % der Patienten mit Typ 1 Diabetes und etwa 20 % der Patienten mit Typ 2 Diabetes [Kuhlmann et al., 2003].

Der Verlauf der diabetischen Nephropathie ist durch folgende drei klinische Erscheinungsbilder charakterisiert:

- Veränderung der Albuminausscheidung im Urin,
- Abnahme der glomerulären Filtrationsrate im Verlauf,
- Entwicklung oder Verstärkung von Hypertonie, Dyslipoproteinämie und weiteren diabetischen Begleiterkrankungen.

Als Screening bei erkrankten Patienten eignet sich eine, mindestens einmal jährlich durchgeführte, Bestimmung der Albuminkonzentration im Urin. Zudem sollte die glomeruläre Filtrationsrate mittels verschiedener Berechnungsformeln anhand des Serumkreatinins berechnet werden. Eine persistierende Albuminurie in unterschiedlichen Proben von > 20 mg/l kann als Diagnosekriterium für die diabetische Nephropathie gewertet werden [Haslacher et al. 2008].

Die GFR Abnahme variiert zwischen rund einem bis 3,5 ml/min im Jahr bei Patienten, die an Diabetes erkrankt sind. Hierbei haben Patienten mit Typ 1 Diabetes einen höheren GFR- Verlust als Patienten mit Typ 2 Diabetes. Zeigen Diabetiker eine manifeste diabetische Nephropathie, so vermindert sich die GFR jährlich um 5,5 bis 12 ml/min, wobei auch hier bei Typ 1 Diabetikern größere GFR- Verluste zu erwarten sind.

Endstadium der diabetischen Nephropathie ist die terminale Niereninsuffizienz mit der Notwendigkeit einer Nierenersatztherapie. Im Jahr 2008 litten 34% der deutschen Patienten, die einer Nierenersatztherapie zugeführt wurden an einem Diabetes mellitus (vgl. Abb.1.5). In den Vereinigten Staaten von Amerika betrug der Anteil 2007 sogar 44% [Quasi Niere, 2008; United States Renal Data System, 2009].

Die diabetische Nephropathie verläuft klassischerweise in 2 Phasen. Die initiale Phase ist ohne klinische Symptome. Zunächst kommt es in den ersten Krankheitsjahren zu einer glomerulären Hyperfiltration gefolgt von einer Mikroalbuminurie. In der klinisch manifesten Phase besteht dann eine dauerhafte Albuminurie, eine Hypertonie und ein progredienter GFR- Verlust (s.o.).

Der genaue Pathomechanismus, welcher der Hyperfiltration in der frühen Phase der diabetischen Nephropathie zugrundeliegt, ist nicht endgültig geklärt. Schon vor längerer Zeit wurde eine erhöhte Prostaglandin und Kininsekretion in der Niere nachgewiesen, die über eine präglomeruläre Vasodilatation die Filtrationsfraktion erhöhen könnte bzw. zur Erhöhung des renalen Plasmaflusses beiträgt [Jaffa et al., 1995]. Kikkawa et al. machen zudem eine verminderte Aktivität der Noradrenalinfreisetzung und eine mesangiale Zelldysfunktion über eine erhöhte Aktivität der Angiotensin II- Rezeptoren für die Fehlregulation verantwortlich [Kikkawa et al., 1986]. Histologisch finden sich eine Verdickung der glomerulären Basalmembran und eine Proliferation der Mesangiumzellen. Neuere Übersichtsarbeiten unterscheiden hämodynamische und metabolische Faktoren, die eine Rolle bei der Entwicklung der DN spielen. Zu den hämodynamischen Faktoren zählen das Renin- Angiotensin- System, das Endothelinsystem und weitere vasoaktive Substanzen. Die metabolischen Einflüsse bewirken insbesondere durch die Ablagerung von advanced glycosilated endproducts (AGE) strukturelle glomeruläre Veränderungen. Für die Formation der AGEs werden unter anderem transforming growth factor β (TGF- β) und die Proteinkinase C (PKC) verantwortlich gemacht [Siegenthaler et al., 2006; Forbes et al. 2007; Barton M, 2010; Turgut & Bolton, 2010].

Nach Mogensen werden für die diabetische Nephropathie bei Typ 1 Diabetikern 5 Stadien unterteilt (Vgl. Abb. 1.6) [Mogensen, 1987; Mogensen et al., 1995]. Im *Stadium 1* kommt es zu einer GFR- Zunahme von 20 bis 40 %. Die Glomeruli sind hypertrophiert und die Nierengröße nimmt zu. Blutdruck und Urinbefunde sind unauffällig. Bei Typ 2 Diabetikern findet sich in diesem frühen Stadium oft schon eine Mikroalbuminurie und Hypertonie. Die Hyperfiltration kann bei bis zu 50 % der Diabetiker nachgewiesen werden und scheint durch Veränderungen der glomerulären Hämodynamik zu entstehen. Es kommt zu einer Vasodilatation der afferenten und Vasokonstriktion der efferenten Arteriole. Die genaue Ursache ist nicht bekannt. Es gibt Hinweise darauf, dass Angiotensin II eine zentrale Rolle bei diesem Vorgang einnimmt. Die Dichte der Angiotensinrezeptoren ist besonders stark am Vas efferens und an Mesangiumzellen ausgeprägt. Im *Stadium 2* besteht meist eine hochnormale oder rückläufige GFR. Mikroskopisch wird die Proliferation der glomerulären Basalmembran deutlich. Der Urinbefund und der Blutdruck sind bei Typ 1 Diabetikern weiterhin unauffällig. Die proliferativen Vorgänge vergrößern die Poren und die negative Ladung entlang der Basalmembran vermindert sich. Hierdurch kommt es zu einer beginnenden Permeabilitätszunahme für Albumin. Im *Stadium 3* kommt es zum Auftreten einer Mikroalbuminurie, die als < 300 mg Albumin pro Tag definiert ist. Die strukturellen Veränderungen gleichen denen des Stadiums 2. Blutdruck und GFR liegen bei Typ 1 Diabetikern häufig noch im Normbereich. Der Nachweis einer Mikroalbuminurie ist das früheste klinisch verwendete Zeichen einer diabetischen Nephropathie. Die Detektion der Mikroalbuminurie kann beispielsweise mittels Urinteststreifen erfolgen. Das *Stadium 4* ist klinisch gekennzeichnet durch eine Zunahme der Albuminurie auf > 300 mg pro Tag und dem Auftreten einer Hypertonie. Rund die Hälfte der neudiagnostizierten Patienten mit Typ 2 Diabetes haben bereits eine Albuminurie und Hypertonie. Durch die Nephropathie kommt es zu einer akzelerierten Atherosklerose. Ohne intensivierte Therapie fällt die GFR um bis zu 1 ml/min pro Monat. Das *Stadium 5* beschreibt die chronische Niereninsuffizienz mit Kreatininanstieg bis hin zur terminalen Niereninsuffizienz.

Auf diesem Weg kann sich ein nephrotisches Syndrom entwickeln, zudem haben nahezu alle Patienten eine therapiepflichtige Hypertonie.

Die therapeutischen Optionen bei der diabetischen Nephropathie, liegen in dem Ziel das Fortschreiten der Erkrankung zu verringern und, wenn es zu einer terminalen Niereninsuffizienz gekommen ist, eine Nierenersatztherapie durchzuführen. Wichtigstes Ziel ist sicherlich die Kontrolle und Normalisierung des Blutglukosespiegels, wobei in einer Studie gezeigt werden konnte, dass eine gute Einstellung die Zeit bis zum Auftreten von Diabetes assoziierten Begleiterkrankungen verlängert [UKPDS, 1998]. Die zweite Säule der Progressionsverlangsamung ist die konsequente Therapie einer Hypertonie. So konnte Mogensen zeigen, dass eine konsequente Blutdruckeinstellung zu einem verminderten GFR- Verlust pro Jahr führen kann [Mogensen, 1989]. Die UKPDS Studie aus Großbritannien konnte eine 12%ige Risikoreduktion für diabetische Komplikationen bei einer Senkung des systolischen Blutdruckes um 10 mmHg nachweisen, wobei das geringste Risiko für Komplikationen bei einer systolischen Wert von 120 mmHg lag. Die Dritte medikamentöse Therapiesäule ist die Inhibition des Renin- Angiotensin- Aldosteron- Systems (RAAS). Diese kann auch unabhängig von einer Hypertonie das Fortschreiten der diabetischen Nephropathie verzögern [Laight, 2009].

Neuere Untersuchungen mit Endothelinantagonisten, die antiinflammatorisch und antifibrotisch auf die Nieren wirken sollen zeigen eine stärkere Reduktion der Albuminurie als eine alleinige Standardtherapie [Wenzel et al., 2009].

Zudem wird der Proteinkinase- C Inhibitor Pyridoxamin derzeit als mögliche neue Therapieoption untersucht [Burney et al, 2009]. Weitere Maßnahmen zur Progressionsprophylaxe sind eine niedrige Proteinzufuhr, Behandlung einer Dyslipoproteinämie und Verbesserung der Lebensgewohnheiten.

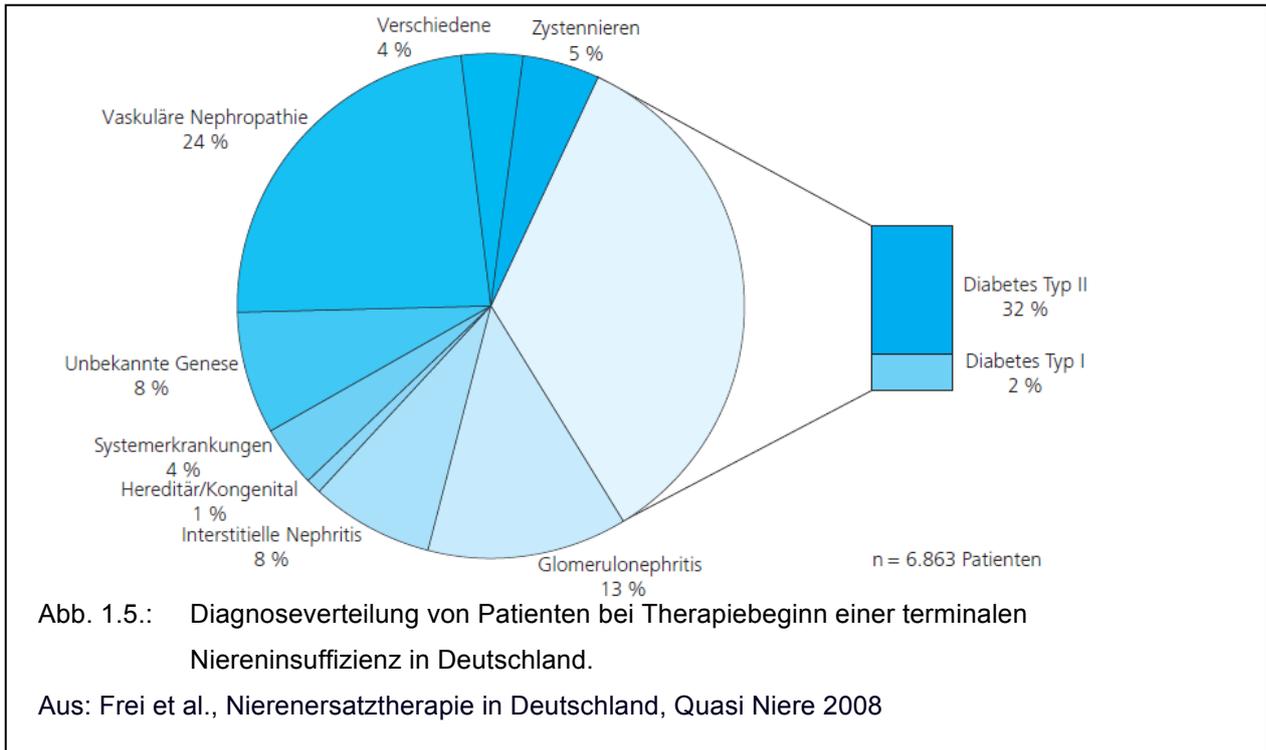


Abb. 1.5.: Diagnoseverteilung von Patienten bei Therapiebeginn einer terminalen Niereninsuffizienz in Deutschland.

Aus: Frei et al., Nierenersatztherapie in Deutschland, Quasi Niere 2008

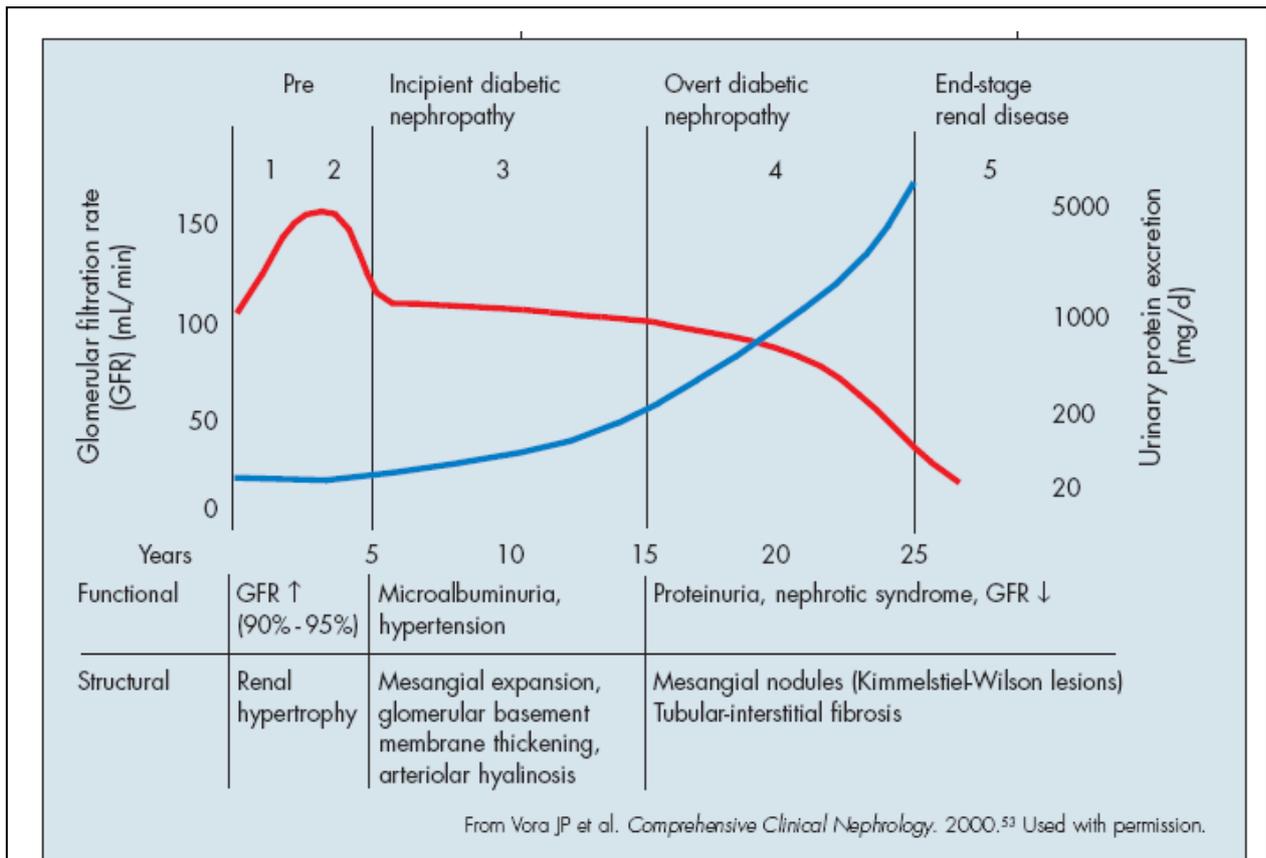


Abb. 1.6.: GFR- und Proteinurie bei diabetischer Nephropathie.

Aus: Frei et al., Nierenersatztherapie in Deutschland, Quasi Niere 2008

URL: http://i.cmpnet.com/consultantlive/images/articles/2008/01012008/figure2_goldfarb.gif

1.2.9. Dopaminrezeptoren und diabetischen Nephropathie

Dopamin und dessen Rezeptoren sind für die renale Hämodynamik und Exkretionsfunktion mitverantwortlich [Lee, 1993]. Durch vorhergehende Arbeiten liegt der Verdacht nahe, dass Dopamin ebenfalls an der Entstehung der diabetischen Nephropathie beteiligt ist. Pathophysiologisch könnte es dopaminvermittelt zu einer glomerulären Hyperfiltration kommen, welche im Frühstadium der diabetischen Nephropathie beobachtet wird. Eine Untersuchung an Wistar- Ratten, denen mittels Streptozotocin ein Diabetes induziert wurde, konnte zeigen, dass durch Stimulation von renalen Dopamin D1- Rezeptoren eine Unterdrückung der frühen diabetische Hyperfiltration erreicht werden konnte [Barthelmebs et al., 1991]. Durch eine Stimulation der D2- like- Subfamilie der Dopaminrezeptoren kam es zum gegenteiligen Effekt. So konnte mittels Quinpirol, einem D2/D3- Dopaminrezeptoragonist, eine Veränderung der renalen Hämodynamik beobachtet werden, wie sie bei der aminosäureinduzierten Hyperfiltration beobachtet wird. Sowohl die Effekte von Aminosäurelösung, als auch die von Quinpirol konnten durch Antagonisierung mittels Domperidon und Sulpirid aufgehoben werden. Interessanterweise scheinen auch zentrale Dopaminrezeptoren eine Rolle zu spielen, da das zentral wirksame Sulpirid in der Lage war die Hyperfiltration komplett zu inhibieren, während das peripher wirkende Domperidon lediglich eine partielle Hemmung erzielen konnte [Luippold et al. 1998a]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die eine glomeruläre Hyperfiltration auch durch selektive Aktivierung von Dopamin D3- Rezeptoren mittels 7-OH-DPAT erreicht werden kann. Ratten, die zuvor mit selektiven Dopamin D3- Rezeptorantagonisten behandelt wurden zeigten hingegen keine Hyperfiltration [Luippold et al. 1998c]. Transferiert werden konnte dieses Modell auch auf Ratten, denen mittels Streptozotocin eine diabetische Hyperfiltration induziert wurde. 2001 gelang es der Arbeitsgruppe um Luippold die diabetische Hyperfiltration mittels Blockade von Dopamin D2-like- Rezeptoren zu unterdrücken [Luippold et al. 2001b]. In einer weiteren Untersuchungen erfolgte die Unterdrückung mittels selektiver Dopamin D3- Rezeptorantagonisten [Luippold et al., 2005]. Durch den Erfolg mit selektiven Antagonisten von Dopamin D3- Rezeptoren kommt diesem

Rezeptorsubtyp wohl eine Schlüsselrolle in der Entstehung der diabetischen Hyperfiltration zu, die in dieser Arbeit mit neuen selektiven Dopamin D3-Rezeptorantagonisten weiter untersucht wurde.

1.3. Fragestellung der Arbeit

- Wie groß ist die aminosäureinduzierte Hyperfiltration bei gesunden Kontrolltieren?
- Lässt sich die aminosäureinduzierte Hyperfiltration mittels selektiver D3-Rezeptorantagonisten unterdrücken und wenn ja, wie sieht die Dosis-Wirkungs- Beziehung aus?
- Wie groß ist die diabetische Hyperfiltration nach Diabetes mellitus Induktion mittels Streptozotocin?
- Lässt sich die diabetische Hyperfiltration durch selektive D3-Rezeptorantagonisten unterdrücken und/ oder verbessert sich die glomeruläre Filtrationsreserve (aminosäurebedingte Hyperfiltration)?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Sprague- Dawley- Ratten (Charles River, Sulzfeld), die bei Lieferung 200 bis 250 Gramm schwer waren. Die Tiere wurden in Nagerkäfigen (2000P, Tecniplast, Hohenpeissenberg) gehalten und hatten freien Zugang zu Leitungswasser und Standardnagerdiät (1324, Altromin, Lage).

Die Käfige wurden in einem Laborraum deponiert, in dem ein 12- stündiger Tag- Nacht- Wechsel mittels elektronischer Zeitschaltuhr eingerichtet war. Bei Tagesrhythmus erfolgte eine indirekte Beleuchtung der Käfige mittels Leuchtstoffröhrenlicht, wobei die Helligkeit im Nagerkäfig 160 Lux nicht überschritt. Zudem wurde den Tieren ein Haus und Spielgeräte zur Beschäftigung zur Verfügung gestellt. Während der Haltung betrug die Raumtemperatur 22 °C und die relative Luftfeuchtigkeit 45 %. Raumtemperatur und Luftfeuchtigkeit wurden permanent mittels eines Thermo- und Hygrometers (CT485-RS, White Box, Stanford, USA) ermittelt und dokumentiert.

2.2 Wirkstoffe

Die zu untersuchenden Wirkstoffe wurden von den Abbott Labs, North Chicago USA, hergestellt und der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt. Die Bezeichnung der Substanzen lautete wie folgt:

- A-437203.33
- A-901394.1
- A-962424.1
- A-956028.1

Bei allen Substanzen handelte es sich um periphere, selektive Dopamin D3- Rezeptorantagonisten.

2.3 Infusionslösung

2.3.1 10%ige Aminosäurelösung

Aminoplasmal 10% (B.Braun, Melsungen)

Pro 1000 ml enthielt die Aminosäurelösung (Angaben in Gramm): Isoleucin 5.00, Leucin 8.90, Lysinacetat 5.74, Lysin- Monohydrat 3.12, Methionin 4.40, Phenylalanin 4.70, Threonin 4.20, Tryptophan 1.60, Valin 6.20, Arginin 11.50, Histidin 3.00, Alanin 10.50, Glycin 12.00, Asparaginsäure 5.60, Glutaminsäure 7.20, Prolin 5.50, Serin 2.30, Thyrosin 0.40. Der Nährwertgehalt betrug 400 kcal/ 1000 ml bei einer Osmolarität von 864 mOsm/l und einem pH- Wert von 5.7-6.3.

2.3.2 Isotonische Kochsalzlösung

Die Herstellung einer isotonischen Kochsalzlösung erfolgte mittels Abmessen eines Liters bidestilliertem Wasser mittels Messkolben. Anschließend wurden 8,5 Gramm NaCl mittels Laborwaage (Procisa 2200C, PAG Oerlikon AG, Zürich CH) abgewogen und mit dem Wasser vermischt. Die Kochsalzlösung hatte somit eine Konzentration von 0,85 % NaCl.

2.3.3 Vehikellösung

Die Vehikellösung wurde aus isotonischer Kochsalzlösung hergestellt (s.o.).

Hinzugefügt wurde radioaktiv- markiertes Inulin (Inulin-methoxy, Perkin Elmer, Boston, USA) mit einer Aktivität von ca. 110.000 Bequerel (Bq) pro Stunde Infusion. Je nach Versuchsgruppe wurde der jeweilige Wirkstoff, nach Lösung in 20 µl Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich, Steinheim), in unterschiedlichen Dosen hinzugefügt. Die Vehikellösung enthielt in den Gruppen ohne Wirkstoff ebenfalls 20 µl DMSO.

2.4 Clearance- Experimente

2.4.1 Anästhesie

Vor dem Narkosebeginn wurde das Körpergewicht mit einer Laborwaage (Procisa 2200C, PAG Oerlikon AG, Zürich CH) bestimmt. Die Versuchstiere wurden mit Thiopental- Natrium (Trapanal Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg) narkotisiert. Hierzu wurde die Trockensubstanz in 0,85 %iger Kochsalzlösung gelöst

und den Tieren 80 mg/ kg Körpergewicht intraperitoneal appliziert. Eine ausreichende Narkosetiefe wurde nach etwa 5 Minuten erreicht und mittels fehlender Schmerzreaktion und Erlöschen des Cornealreflexes evaluiert. Bei unzureichender Narkosetiefe wurde eine Repititionsdosis von 20- 40 mg/ kg Körpergewicht verabreicht und die Narkosetiefe reevaluiert.

2.4.2 Operation für die Clearance- Experimente

Die narkotisierten Tiere wurden auf einen Operationstisch in Rückenlage platziert. Rektal wurde eine Temperatursonde eingeführt, die eine kontinuierliche Aufzeichnung der Körpertemperatur ermöglichte. Die Temperatursonde wurde mit einem Temperaturregelgerät (Typ RT, Klaus Effenberger, Pfaffing) verbunden, welches über eine Heizplatte im Operationstisch die Körpertemperatur auf 37,2°C konstant hielt.

Das Operationsgebiet wurde mittels Paraffinöl vorbehandelt. Es erfolgte eine Inzision im vorderen Halsbereich und vornehmlich stumpfe Präparation des Operationssitus. Im rechtslateralen Operationsfeld wurde zunächst die Vena jugularis dargestellt, vorsichtig vom umliegenden Bindegewebe befreit und distal angeschlungen um sie im späteren Verlauf einfach identifizieren zu können. Nach Durchtrennung der geraden Halsmuskulatur wurde als erstes die Trachea dargestellt, behutsam von umliegendem Bindegewebe und Gefäßen befreit, getunnelt und mit einem Haltefaden angeschlungen. Zwischen zwei Trachealspangen erfolgte eine Inzision. Durch die Öffnung wurde ein kleiner Polyethylentubus (Fine Bore Polyethene Tubing ID 2,0 mm, Portex- Smiths- Medical, Keene, USA) eingeführt und mit dem Haltefaden fixiert. Die Tracheotomie erfolgte zur Sicherung der Atemwege, da es im Rahmen der Narkose zu Verlegung der oberen Atemwege durch Sekrete oder die Zungenmuskulatur kommen könnte.

Unter stereomikroskopischer Sicht (VM, Olympus, Tokyo, Japan) wurde die linke Arteria carotis dargestellt und vom begleitenden N. vagus vorsichtig befreit. Die distale Arteria carotis wurde ligiert, mit einer feinen Gefäßklemme (DeBakey, Rebstock Instruments GmbH, Tuttlingen) abgeklemmt. Vor und hinter der Klemme wurde eine Schlaufe vorgelegt. Danach wurde die Arterie unter mikroskopischer Sicht zur Hälfte inzidiert und ein kleiner Polyethylenkatheter (Fine Bore Polyethene Tubing ID 0,86 mm, Portex- Smiths- Medical, Keene, USA) eingeführt, der zuvor

durch vorsichtiges Ziehen der Größe des jeweiligen Gefäßes angepasst wurde. Mit der ersten Schlaufe wurde der Katheter fixiert und abgedichtet. Nach Eröffnen der Gefäßklemme wurde der Katheter um etwa 5 bis 10 mm weiter vorgeschoben und dann mittels der zweiten Schlaufe fest fixiert. Der arterielle Katheter wurde mit einem arteriellen Druckabnehmer verbunden (Deltran I, Utah Medical Products, Midvale, USA), der die Druckinformation über einen Brückenverstärker (TBM 4, World Precision Instruments, Heidelberg) an einen Schnellschreiber (WK 280, WKK, Kaltbrunn, Schweiz) weiterleitete. Zur Ermittlung der Herzfrequenz wurde das Signal des Brückenverstärkers zusätzlich an ein Digitalmultimeter (MT-52, Voltcraft, Hirschau) weitergeleitet. Dieses wurde so eingestellt, dass es die Anzahl der Schwingungen pro Sekunde in Hertz anzeigte. Nach Multiplikation mit dem Faktor 60 erhielt man die Herzfrequenz pro Minute. Hiernach erfolgte die mikroskopische Inzision der Jugularvene über die zwei kleine Polyethylenkatheter (Fine Bore Polyethene Tubing ID 0,4 mm, Portex- Smiths- Medical, Keene, USA) eingeführt und etwa 10 mm nach proximal vorgeschoben. Die beiden Venenkatheter für Infusionszwecke wurden fixiert und mit Perfusorspritzen (Ultra- Asept 10 ml, Henke-Sass Wolf GmbH, Tuttlingen) verbunden, die in den passenden Perfusor (Perfusor 71100, B.Braun, Melsungen) eingesetzt wurden.

Zur Platzierung eines Blasenkatheters erfolgte eine suprapubische Inzision nach vorhergehender Behandlung mit Paraffinöl. Nach Darstellung der Bauchmuskulatur wurde diese im Bereich der Linea alba samt Peritoneum durchtrennt. Mittels stumpfer Präparation wurde die Blase aufgesucht und an die Oberfläche verbracht. Nach Anschlingen der Blase wurde diese an einer gefäßarmen Stelle inzidiert, ein Polyethylenkatheter (Fine Bore Polyethene Tubing ID 0,86 mm, Portex- Smiths- Medical, Keene, USA) eingeführt und mittels Faden fixiert. Die Spitze des Katheters wurde zuvor mittels Erhitzen so vorbereitet, dass eine kleine Wulst das Herausrutschen des Katheters zusätzlich verhinderte. Nach erfolgreicher Fixierung des Katheters wurde die Blase reponiert.

Am Ende der Operation erfolgte ein lockerer Verschluss der Operationszugänge und die Versuchstiere wurden in Linksseitenlage gelagert. Der Urin wurde in Reaktionsgefäßen (MicroTube 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen. Zum Schutz vor unnötigen Reizen wurde das rechte Auge mit Dexpanthenol- Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen) abgedeckt.

2.4.3 Äquilibration

Postoperativ wurden die Tiere weiter überwacht. Die Erholungsphase dauerte zwischen 60 und 90 Minuten, wobei regelmäßig der Urinfluss, die Herzfrequenz, der Blutdruck und die Narkosetiefe evaluiert wurden. Bei unzureichender Narkosetiefe wurde eine Repititionsdosis des Narkotikums in einer Dosis von 20 mg/ kg KG appliziert.

2.4.4 Versuchsperioden

Clearance Experimente mit aminosäureinduzierter Hyperfiltration:

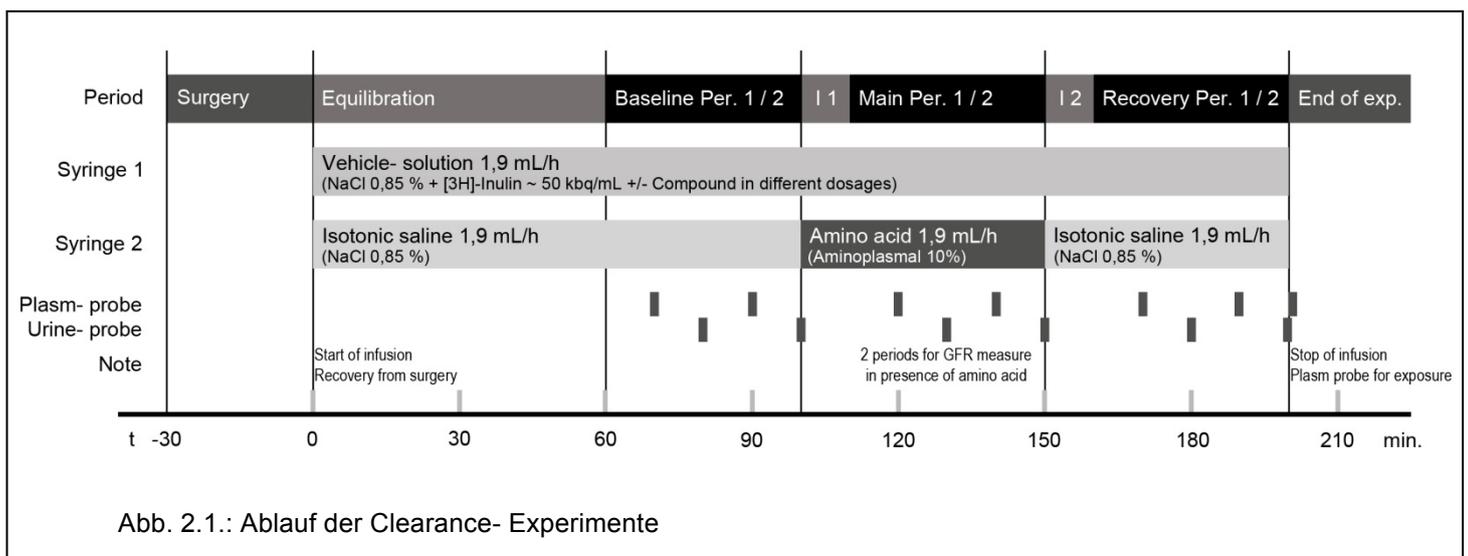
Die Clearance- Experimente schlossen sich der Äquilibrationsperiode an. Es wurden pro Experiment 6 einzelne Sammelperioden durchgeführt, die jeweils 20 Minuten andauerten. Zuerst erfolgten zwei Vorperioden (VP) gefolgt von zwei Hauptperioden (HP) und zwei Nachperioden (NP). Zwischen den jeweiligen Versuchsphasen wurden 10 minütige Zwischenphasen gesetzt. Über alle Perioden erhielten die Versuchstiere eine 0,85%ige Kochsalzlösung mit einer Laufrate von etwa 0,5 % des Körpergewichts pro Stunde. Dieser Infusionslösung wurde ³H- Inulin (Inulin-methoxy, Perkin Elmer, Boston, USA) mit einer Aktivität von etwa 110 Kilobecquerel (kBq) pro Stunde hinzugefügt. In den Experimenten zur Dosisfindung enthielt diese Lösung zudem einen Wirkstoff in definierter Dosis pro Kilogramm Körpergewicht und Stunde. In der Basalperiode erhielten alle Versuchstiere über einen 2. Perfusor eine isotonische Kochsalzlösung mit einer Infusionsrate von etwa 0,5 % des Körpergewichts pro Stunde. Die Kochsalzlösung wurde in der 1. Zwischenperiode durch eine klinisch übliche 10%ige Aminosäurelösung (Aminoplasma 10%, B.Braun, Melsungen) ersetzt.

Nach den zwei Hauptperioden wurde in der zweiten Zwischenperiode die Aminosäurelösung wieder durch eine isotonische Kochsalzlösung ersetzt. Nach den zwei Nachperioden wurde den Tieren ein Blutvolumen von etwa drei Milliliter entnommen, dies zentrifugiert und eine Plasmaprobe zur Ermittlung der Konzentration des Wirkstoffes mittels Massenspektrometrie archiviert. Da nach einem solchen Blutverlust ein Blutverlustschock bei den Tieren entsteht und eine postoperative Versorgung der Wunden und Schmerzen nicht möglich ist, erfolgte am Ende des Clearanceexperiments eine Injektion von Kaliumchloridlösung (1-M-

Kaliumchloridlösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg), die eine sofortige Kardioplegie induzierte.

2.4.5 Probengewinnung

Während der Clearance- Experimente wurden Blut- und Urinproben gesammelt. Der Urin wurde über die 20minütige Periode in einem Reagiergefäß (MicroTube 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht) aufgefangen. In der Mitte einer Sammelperiode wurde den Tieren über den Carotiskatheter eine Blutprobe mit einer Menge von etwa 150 µl entnommen. Die Blutproben wurden mittels zwei heparinisierte Blutgaskapillaren (BK 85, KABE Labortechnik, Nümbrecht) mit einem Volumen von je 80 µl aufgefangen.



2.5 Experimente zur Dosisfindung

Zur Überprüfung der Wirksamkeit eines Wirkstoffes wurde die Fähigkeit der Inhibition der akuten aminosäureinduzierten Hyperfiltration getestet. Zuvor erfolgte eine Referenzbestimmung der sog. funktionellen renalen Reserve auf eine Aminosäuregabe an gesunden Versuchstieren. Im weiteren Verlauf wurde dann die Stärke der Inhibition in verschiedenen Dosen der jeweiligen Wirkstoffe ermittelt und so eine Dosis- Wirkungs- Beziehung hergestellt.

2.5.1 Versuchsgruppenübersicht:

- CON- ZK (n=8): Zeitkontrolle, nicht behandelte Tiere als Kontrolltiere zur Bestimmung der Stabilität der Versuchsparameter.
- CON- VHC (n=11): Gesunde, nicht behandelte Tiere als Kontrolltiere zur Bestimmung der physiologischen, aminosäureinduzierten Hyperfiltration.
- CON-A-437203.33 (n=6): Gesunde, behandelte Tiere zum Nachweis der Inhibition der aminosäureinduzierten Hyperfiltration. Der Compund wurde dem Versuchstier mit 0,33 mg pro kg KG pro Stunde intravenös verabreicht.
- CON-A-901394.1: Gesunde, behandelte Tiere zur Dosisfindung. Der Compund wurde dem Versuchstier in folgenden Dosen (pro kg KG pro Stunde) intravenös verabreicht:
- 0,33 mg (n=6)
 - 1 mg (n=7)
 - 3,3 mg (n=6)
 - 10 mg (n=6)
- CON-A-962424.1: Gesunde, behandelte Tiere zur Dosisfindung. Der Compund wurde dem Versuchstier in folgenden Dosen (pro kg KG pro Stunde) intravenös verabreicht:
- 0,033 mg (n=3)
 - 0,1 mg (n=6)
 - 0,33 mg (n=7)
 - 1 mg (n=5)

CON-A-956028.1: Gesunde, behandelte Tiere zur Dosisfindung. Der Compund wurde dem Versuchstier in folgenden Dosen (pro kg KG pro Stunde) intravenös verabreicht:

- 0,1 mg (n=4)
- 0,33 mg (n=6)
- 1 mg (n=6)
- 3,3 mg (n=2)

Um einen Anhaltswert zu haben, welche Plasmakonzentration des jeweiligen Wirkstoffs zum Zeitpunkt der Aminosäureapplikation bestand, wurde eine zusätzliche Exposure- Serie für jeden Wirkstoff angelegt. Die hierzu verwendete Dosis wurde an die errechnete ED 50 angelehnt. Bei der Exposure- Serie wurde eine Plasmaprobe nach 3 Perioden zuzüglich Äquilibrationszeit (insgesamt ca. 120 Min.) entnommen. Hiermit sollte insbesondere eine Kumulation des Wirkstoffes am Experimentende ausgeschlossen werden.

2.6 Experimente nach Diabetes mellitus Induktion

2.6.1 Induktion von Diabetes mellitus

Zur Induktion des Diabetes mellitus wurde bereits in mehreren Arbeiten Streptozotocin verwendet. Nach Applikation dieser Substanz kommt es zur raschen Zerstörung der β - Zellen des Pankreas, ähnlicher der Zerstörung beim autoimmunologisch begründeten Diabetes mellitus Typ 1.

In dieser experimentellen Serie erfolgte nach einer 4 tägigen Eingewöhnungszeit eine intraperitoneale Injektion von Streptozotocin (STZ, Sigma Aldrich, Steinheim) in einer Dosis von 60 mg/ kg Körpergewicht. Das Streptozotocin wurde hierfür in bidestilliertem Wasser, welches mit Zitronensäure versetzt wurde (0,21 g pro 10 ml Aqua bidest), gelöst. Nach 24 Stunden erfolgte eine Blutglucosebestimmung mittels eines handelsüblichen Glucosemessgerätes (Ascensia Contour, Bayer Vital GmbH, Leverkusen). Lag die Blutglucose noch im Normbereich (< 120 mg/dl) erfolgte eine erneute Streptozotocingabe in einer Dosis von 30 mg/ kg Körpergewicht. Waren die Tiere zu diesem Zeitpunkt hyperglykämisch, so wurde die Blutglucose nach weiteren 24 Stunden erneut gemessen und bei erfolgreicher Diabetes mellitus Induktion in die

jeweilige Versuchsgruppe eingeordnet. Tiere mit einer Blutglucosekonzentration von über 180 mg/dl wurden als diabetische Tiere eingestuft. Tiere, die nach zweimaliger STZ- Injektion keinen Diabetes aufwiesen wurden nicht verwendet.

2.6.2 Versuchsgruppen

Im Diabetes mellitus Modell wurden folgende Versuchsgruppen gebildet:

- CON- VHC (n=5): Gesunde, nicht behandelte Tiere als Kontrolltiere.
- DM- VHC (n=8): Diabetische, nicht behandelte Tiere als Diabetes mellitus Gruppe.
- DM- A-901394 10 (n=12): Diabetische, behandelte Tiere. Die Tiere erhielten täglich eine Dosis von 10 mg der Substanz A-901394.1 über eine Schlundsonde, als diabetische, behandelte niedrigdosis-Gruppe.
- DM- A-901394 30 (n=12): Diabetische, behandelte Tiere. Die Tiere erhielten täglich eine Dosis von 30 mg der Substanz A-901394.1 über eine Schlundsonde, als diabetische, behandelte hochdosis-Gruppe.

Die Applikation der Substanz A-901394.1 erfolgte alle 24 Stunden über eine Schlundsonde. Zuvor wurde der Wirkstoff auf einer Präzisionswaage (Type A200S, Sartorius GmbH, Göttingen) abgewogen und in 50 µl DMSO gelöst. Die Tiere der gesunden und diabetischen Kontrollgruppe erhielt lediglich die gleiche Menge an DMSO.

2.6.3 Versuchsablauf

Während der Zeit nach Diabetes mellitus- Induktion wurden die Tiere täglich auf Vorhandensein pathologischer Verhaltensmuster, wie Apathie, Gewichtsverlust, Ess- und Trinkverhalten untersucht. Zudem wurde die Tägliche Flüssigkeitsaufnahme erhoben und dokumentiert. Die genaue Verifizierung der Urinausscheidung pro Tag wurde an Tag sechs oder sieben und Tag zehn, elf oder zwölf nach Gruppenzuordnung, in 24stündigen Stoffwechselkäfigversuchen, erhoben. Um die Stressreaktion im Stoffwechselkäfigversuch zu reduzieren (Einzelhaltung, Gitterboden, geringerer Platz), erfolgte eine Eingewöhnung an diese Unterbringung.

Hierzu wurden die Tiere vor dem ersten Stoffwechselkäfigversuch an verschiedenen Tagen für dreimal 60 bis 90 Minuten in den Spezialkäfigen untergebracht. An Tag 12 bis 15 erfolgte dann ein Clearanceexperiment zur Messung der GFR im Basalzustand und unter Aminosäureinfusion (Vgl. Abb. 2.2.).

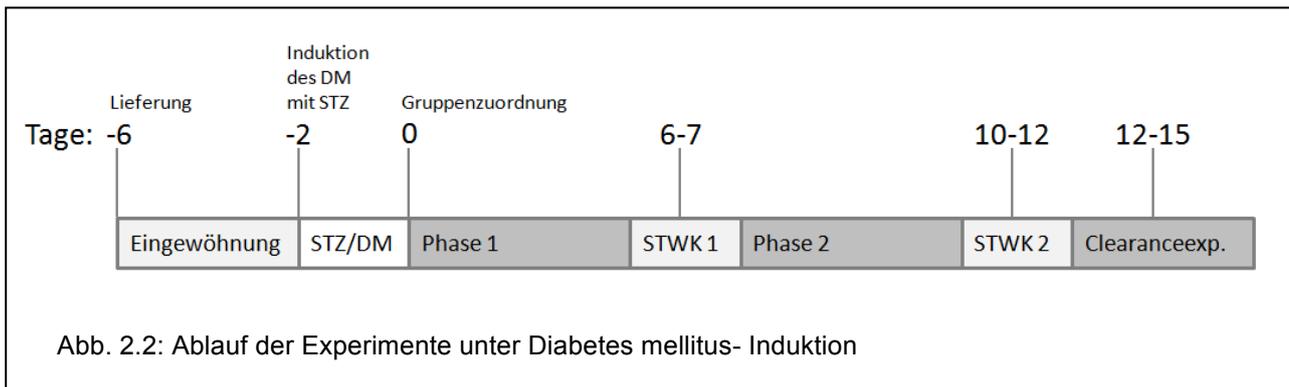
2.6.4 Stoffwechselkäfigversuche

Für die Stoffwechselkäfigversuche standen spezielle Käfige (600, Tecniplast, Hohenspeissenberg) zur Verfügung. Die Stoffwechselkäfige ermöglichen die getrennte Sammlung von Urin und Kot des Tieres. Am 6. oder 7. Tag nach Einteilung in eine Versuchsgruppe wurde der erste Stoffwechselkäfigversuch (STWKV) durchgeführt. Der zweite STWKV erfolgte an Tag 10 bis 12 nach Gruppenzuteilung. Ein STWKV dauerte 24 Stunden, wobei die Tiere freien Zugang zu Trinkwasser und Standardfutter hatten. Nach 24 Stunden wurden die Trinkmenge und das Urinvolumen bestimmt. Die Urinproben wurden zur Bestimmung von Kreatinin und Albumin aufbereitet und in Reagiergefäßen (MicroTube 1,5 ml, Sarstedt, Nümbrecht) archiviert.

2.6.5 Clearance Experimente

An Tag 12 bis 15 erfolgte eine Operation als Vorbereitung auf die Clearanceexperimente. Das operative Vorgehen, der Versuchsablauf und die Probengewinnung erfolgten in gleicher Art und Weise, wie die Clearanceexperimente zur Dosisfindung an gesunden Versuchstieren.

Diabetische Versuchstiere erhielten jedoch mit 60 mg/kg KG, eine verminderte Dosis des Thiopentals zur Narkoseeinleitung. Zudem wurde das Infusionsvolumen auf 1,5 % des Körpergewichts angehoben, um dem gesteigerten Flüssigkeitsbedarf bei Diabetes mellitus und Polyurie Rechnung zu tragen.



2.7 Analytik während der Clearance- Experimente

2.7.1 Hämatokrit und Plasmagewinnung

Nach erfolgter Blutentnahme wurden die Hämatokritkapillaren in einer Hämatokritzentrifuge (Typ 2010, Hettich, Tuttlingen) zentrifugiert. Die Bestimmung des Hämatokrits erfolgte mittels Hämatokrit- Ableser (Micro- Haematocrit- Reader, Hawksley, London, GB). Die Kapillaren wurden über den festen Blutbestandteilen durchtrennt und das Plasma für die weitere Verwendung in Reagiergefäßen aufbewahrt.

2.7.2 Urinvolumen

Die Urinsammlung in den Sammelperioden erfolgte in Reagiergefäße, deren Eigengewicht zuvor mittels Feinwaage (Type A200S, Sartorius GmbH, Göttingen) bestimmt wurde. Nach einer Sammelperiode wurde das Gefäß erneut gewogen und das Eigengewicht subtrahiert. Das Ergebnis wurde in Milliliter umgerechnet, wobei ein Gramm Urin einem Milliliter Urin gleichgesetzt wurde. Das spezifische Gewicht des Urins wurde somit vernachlässigt.

2.7.3 Aktivität von Methoxy- Inulin in Plasma und Urin

Die Bestimmung der Radioaktivität des Tritiums erfolgte indirekt über Lichtimpulse. Das hierfür verwendete Geräte vom Typ MicroBeta Trilux 1450 (Wallac/ Perkin-Elmer, Massachusetts, USA) kann Lichtimpulse messen, die von einer Scintillationsflüssigkeit (Optiphase Supermix, Perkin Elmer, Massachusetts, USA) ausgesendet werden. Generiert werden die Lichtimpulse über eine Aktivierung von

Flüssigkeitsbestandteilen mittels Energie aus radioaktivem Zerfall in Form von β -Strahlung. Über die Einstellung des Zählgerätes wurde die Zeit, die eine jeweilige Probe gemessen wird, so eingestellt, dass der Fehler unter 3% gehalten wurde. Die Zählzeit ist daher abhängig von der Tritium- Konzentration in der jeweiligen Probe. Die Plasmaproben benötigten etwa 30 Minuten, die Urinproben in der Regel nur wenige Sekunden. Die zu untersuchende Probe wurde in einer Menge von 20 μ l mit 1 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und anschließend gründlich für etwa 20 Sekunden mittels eines Rüttlers (Reax 2000, Heidolph, Schwabach) vermischt. Jede Probe wurde doppelt angelegt und nach der Messung der Mittelwert bestimmt. Das Ergebnis wurde in „counts per minute“ (CPM) angegeben.

2.7.4 Wirkstoff- Konzentration im Plasma

Die Konzentration der einzelnen Wirkstoffe wurde aus Plasmaproben bestimmt, die mittels Flüssig- chromatographie und Massenspektrometrie (LC-MS) analysiert wurden. Die Messung erfolgte im Institut für Pharmakologie am Klinikum Bremen-Mitte im Bereich forensische Toxikologie. Die Proben wurden am Ende der Clearance- Experimente gewonnen und tiefgefroren.

2.7.5 Elektrolytkonzentration in Plasma und Urin

Die Elektrolyte wurden mittels eines Elektrolysanalysators (EML 100, Radiometer, Copenhagen, Dänemark) bestimmt. Die Urinproben wurden nach den Clearance- Experimenten tiefgefroren und nummeriert. Für die Messung der Elektrolyte wurden 150 μ l der Urinprobe in das Gerät appliziert. Die Ergebnisse wurden auf einem Blatt und Excel- Datenblatt dokumentiert.

2.8 *Analytik nach Diabetes mellitus Induktion, STWKV*

2.8.1 Gewicht

Das Gewicht der Tiere wurde vor Diabetes- Induktion, vor jedem Stoffwechselläufigversuch und vor dem Clearanceexperiment bestimmt. Die Gewichtsbestimmung erfolgte mit einer Laborwaage (Procisa 2200C, PAG Oerlikon AG, Zürich CH).

2.8.2 Blutglucose

Die Blutglucosemessung erfolgte 24 und 48 Stunden nach Diabetes- Induktion, sowie vor jedem Stoffwechselkäfigversuch und Clearance- Experiment. Zum Erhalt einer Blutprobe erfolgte eine kleine Inzision am Schwanzende des Tieres mittels Skalpell. Für die Bestimmung des Blutglucosegehaltes wurde ein handelsübliches BZ- Messgerät der Firma Bayer genutzt (Ascensia Contour, Bayer Vital GmbH, Leverkusen).

2.8.3 Urin- Analytik

Nach dem Stoffwechselkäfigversuch wurde das Urinvolumen mittels Abwiegen auf einer Laborwage bestimmt und hiernach in Reaktionsgefäße verbracht, codiert und zur späteren Analytik tiefgefroren. Zur quantitativen Bestimmung der Albuminurie wurde ein ELISA der Firma Celltrend verwendet (ELISA Nr. 50100, Celltrend, Luckenwalde). Die Bestimmung des Kreatinins im Urin und Plasma erfolgte in einem externen Labor.

2.8.4 ELISA- Albuminurie

Bei dem ELISA handelt es sich um einen Festphasen- Enzymimmunoassay mit direkter kompetitiver Testung. An der Kavität der Testplatte war Rattenalbumin gebunden. Während der Inkubationszeit wird die Bindung eines anti- Ratten- Albumin- Antikörpers an die Platte durch in der Probe befindliches Albumin kompetitiv gehemmt. Durch eine Reinigung der Proben wird nicht gebundener Antikörper entfernt. Da der Antikörper mit Peroxidase markiert war, konnte die gebundene Menge mit einer Chromogen- Lösung quantifiziert werden. Die Zugabe einer Säure stoppt die Reaktion und führt zum Farbumschlag von blau nach gelb. Danach wurde die Absorption bei einer Lichtwellenlänge von 450 nm gemessen. Die absorbierte Lichtmenge ist hierbei umgekehrt proportional zur Albuminkonzentration der Probe.

Die Urinproben wurden aufgetaut und für die Albuminbestimmung vorbereitet. Es wurden jeweils Doppelproben angelegt und der Mittelwert aus diesen Gruppen gebildet. Als Referenz wurde die dem Kit beiliegende Standard- Albuminlösung verwendet und mittels einer Verdünnungsreihe (1:4) verdünnt. Die Extinktionsmessung erfolgte mittels ELISA- Plate- Reader (Spectra Mini AP, Tecan

Group Ltd., Schweiz) bei einer Wellenlänge von 450 nm. Der Messbare Bereich lag nach Referenzmessung zwischen 10 und 2560 ng/ml, da in diesem Abschnitt der Referenzmessungen ein annähernd gerader Verlauf der Extinktion zu beobachten war. Insgesamt 5 gemessene Werte waren extrem hoch und wurden nicht in die Untersuchung mit einbezogen. Am ehesten kam es hier zu einer Kontamination der Urinproben mit Futtermitteln.

2.9 Berechnungen, zugrundegelegte Formeln

2.9.1 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz wurde während des gesamten Experiments über ein Tischmultimeter erhoben, das parallel zum Schnellschreiber geschaltet wurde und in der Lage war die arterielle Druckkurve in Hertz auszudrücken. Die ermittelten Hertz wurden dann mit 60 multipliziert um eine Herzfrequenz von Schlägen pro Minute zu erhalten.

2.9.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Der mittlere arterielle Blutdruck setzt sich aus systolischem und diastolischem Blutdruck nach folgender Formel zusammen:

$$\text{Mittlerer Arterieller Blutdruck [mmHg]} = P(\text{dia}) + \left(\frac{P(\text{sys}) - P(\text{dia})}{3} \right)$$

Der systolische und diastolische Blutdruck wurde während der jeweiligen Sammelperiode mittels ThermoSchnellschreiber dokumentiert und anhand der zuvor genannten Formel berechnet.

2.9.3 Urinvolumen (UZV)

Das Urinzeitvolumen beschreibt die ausgeschiedene Urinmenge (Sekundärharn) in einer bestimmten Sammelperiode. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{UZV } [\mu\text{l}/\text{Min}] = \text{Urinmenge } [\mu\text{l}] / \text{Dauer einer Sammelperiode } [\text{Min}]$$

Als Standardisierung wurde das Urinzeitvolumen auf 100g Tiergewicht umgerechnet.

2.9.4 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate beschreibt das Gesamtvolumen des Primärharns, der von allen Glomerula beider Nieren zusammen in einer definierten Zeitperiode produziert wird. Die GFR jeder Sammelperiode wurde mittels folgender Formel berechnet:

$$\begin{aligned} \text{Glomeruläre Filtrationsrate [ml/Min]} \\ = \frac{\text{Inulin Urin [CPM]}}{\text{Inulin Plasma [CPM]}} \times \text{Urinvolumen [ml/Min]} \end{aligned}$$

CPM beschreibt die radioaktive Aktivität als „counts per minute“ im Betastrahlungscounter. Als Standardisierung wurde die GFR pro 100g Tiergewicht angegeben.

2.9.5 Absolute renale Natriumexkretion ($U_{Na}V$)

Die absolute renale Natriumexkretion im Urin beschreibt die Menge an ausgeschiedenem Natrium pro Minute. Der Berechnung wurde folgende Formel zugrunde gelegt:

$$U_{Na}V [\mu\text{mol/Min}] = \text{Natrium im Urin} [\mu\text{mol}] \times \text{Urinvolumen [ml/Min]}$$

Als Standardisierung wurde die GFR pro 100g Tiergewicht angegeben.

2.9.6 Fraktionelle Natriumausscheidung (FE_{Na})

Die Fraktionelle Natriumausscheidung im Urin wird in Prozent ausgedrückt. Die FE_{Na} kann als Maß für die tubuläre Resorptionsquote herangezogen werden und wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Fraktionelle Natriumexkretion [\%]} = \frac{\text{absolute renale Natriumexkretion} \times 100}{\text{Natrium im Plasma} [\mu\text{mol/ml}] \times \text{GFR}}$$

Die Natriumkonzentration im Plasma wurde lediglich einmalig aus einer Plasmaprobe, die nach Beendigung der Versuchsperioden entnommen wurde, ermittelt und als Bemessungsgrundlage herangezogen.

2.10 Dokumentation und statistische Auswertung

Alle erhobenen Daten wurde in ein standardisiertes Papierdokument und eine Microsoft- Excel (Microsoft Inc, USA) Tabelle eingetragen. Die statistische Aufarbeitung der erhobenen Daten und deren graphische Darstellung erfolgte mittels Prism 5 (GraphPad Software Inc, USA).

In den Ergebnistabellen wurden, soweit nicht anders gekennzeichnet, die Mittelwerte und der standard error of the mean (SEM) angegeben.

Als signifikante Unterschiede in den statistischen Vergleichen wurde eine geringere Überschreitungswahrscheinlichkeit (p-Wert) von 5 Prozent und weniger ($\leq 0,05$) angesehen. Als hochsignifikante Unterschiede wurde ein p- Wert von 1 Prozent und weniger ($\leq 0,01$) definiert. Der p- Wert beschreibt hierbei die Wahrscheinlichkeit für die Überschreitung der Nullhypothese. Die Nullhypothese besagt, dass in der Gesamtheit der Experimente kein Effekt der verabreichten Substanzen existiert.

Um basale Effekte der verschiedenen Wirkstoffe im Clearanceversuch auszuschließen, wurde eine Varianzanalyse aller Parameter durchgeführt, die in den Vorperioden erhoben wurden (sog. Vorperiodenvergleich). Bei bestehenden signifikanten Unterschieden der Varianzanalyse mittels one- way- ANOVA schloss sich der Dunett's post- test an, bei dem die einzelnen Versuchsgruppen mit den Werten der gesunden Kontrollgruppe (CON- VHC) verglichen wurden.

Im zweiten Schritt erfolgte eine gepaarte Varianzanalyse (one- way- ANOVA) innerhalb der jeweiligen Versuchsgruppe. Bei signifikanten Unterschieden innerhalb einer Versuchsgruppe wurden die Werte der Haupt- und Nachperiode mittels Dunett's post- test mit der Vorperiode verglichen.

Die erhobenen Parameter im Stoffwechselläufigversuch wurden ebenfalls mittels Varianzanalyse (one- way- ANOVA) untersucht und bei signifikanten Unterschieden ein Subgruppenanalyse mittels Boferroni multiple comparison post test durchgeführt, bei dem alle Gruppen gegeneinander analysiert wurden, um Unterschiede unter den erkrankten nicht therapierten (DM- VHC) und erkrankten therapierten (DM- A- 901394.1 ...) Versuchstieren zu detektieren.

3. ERGEBNISSE

3.1. Ergebnisse der Clearanceexperimente

Bei den angegebenen Werten handelt es sich, sofern nicht anders angegeben um Mittelwerte und SEM.

3.1.1. Gesunde Kontrollgruppe ohne Medikation und AS- Gabe (CON- ZK)

In den Zeitkontrollen fanden sich über sechs Versuchsperioden stabile Bedingungen bezüglich Herzfrequenz, mittlerem arteriellem Blutdruck, glomerulärer Filtrationsrate und Urinzeitvolumen.

3.1.2. Gesunde Kontrollgruppe ohne Medikation (CON- VHC)

Zum Zeitpunkt der Clearanceexperimente wogen Tiere in dieser Gruppe im Mittel 307 Gramm \pm 13,3 (Tab. 3.4.). Die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck veränderten sich zwischen den Versuchsperioden nur geringfügig ohne Erreichen des Signifikanzniveaus (Tab. 3.1. und 3.2., Abb. 3.1. und 3.2.). Der Hämatokrit sank hochsignifikant über den experimentellen Zeitraum um 2 % (Tab. 3.3.).

Die glomeruläre Filtrationsrate stieg während der Aminosäureinfusion hochsignifikant um 28 % an und näherte sich in der Nachperiode dem Wert aus der Vorperiode wieder an. In der Nachperiode war die GFR noch 11 % höher als in der Vorperiode (Tab. 3.5, Abb. 3.3.a.).

Das Urinzeitvolumen stieg während der Aminosäureinfusion auf das 3,2 fache der Vorperiode an und blieb in der Nachperiode etwa gleich hoch (Tab. 3.6, Abb. 3.4.).

Auch die fraktionelle Natriumexkretion stieg während der Hauptperiode um 55 % an. In der Nachperiode erhöhte sich die FENa um weitere 11 % im Vergleich zur Hauptperiode (Tab. 3.7, Abb. 3.5.).

3.1.3. Gesunde Versuchstiere therapiert mit A- 437203.33 (CON- A- 437203.33)

Die Tiere in dieser Versuchsgruppe erhielten den Wirkstoff A- 437203.33 in einer Dosis von 0,33 mg pro kg KG pro Stunde infundiert. Zum Zeitpunkt der Clearanceexperimente wogen Tiere in dieser Gruppe im Mittel 300 Gramm \pm 19,5 (Tab. 3.4.). Die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck veränderten sich

zwischen den Versuchsperioden nur geringfügig ohne Erreichen des Signifikanzniveaus (Tab. 3.1. und 3.2., Abb. 3.9.). Die Herzfrequenz in der Vorperiode war rund 5 % niedriger als die der gesunden Kontrollgruppe (CON-VHC), ohne dass dieser Unterschied signifikant war. Der Hämatokrit sank hochsignifikant über den experimentellen Zeitraum um 2 % (Tab 3.3.).

Die glomeruläre Filtrationsrate stieg während der Aminosäureinfusion nur um etwa 1 % an und fiel in der Nachperiode um rund 13 % ab. Der Abfall erreichte dabei einen p- Wert < 0,01 (Tab. 3.5., Abb. 3.9.).

Das Urinzeitvolumen war in der Vorperiode fast 3 mal so groß wie bei der gesunden Kontrollgruppe ($p < 0,01$) und stieg während der Aminosäureinfusion um rund 65 % an und blieb in der Nachperiode etwa gleich hoch (Tab. 3.6, Abb. 3.9.). Die fraktionelle Natriumexkretion stieg während der Hauptperiode nahezu um denselben Betrag, rund 62 % an und erhöhte sich in der Nachperiode um weitere 7 % (Tab. 3.7, Abb. 3.9.).

3.1.4. Gesunde Versuchstiere therapiert mit A- 901394.1 (CON- A- 901394.1)

Die Tiere in dieser Versuchsgruppe erhielten den Wirkstoff A- 901394.1 in einer Dosis von 0,33 mg, 1 mg, 3,3 mg oder 10 mg pro kg KG und Stunde infundiert. Zum Zeitpunkt der Clearanceexperimente wogen Tiere in dieser Gruppe im Mittel 299 Gramm \pm 9,5 (Tab. 3.4.). In der Dosis Gruppe 3,3 mg/ kg KG/ h wogen die Tiere etwa 17 % weniger, als in der gesunden Kontrollgruppe, was signifikant weniger war ($p = < 0,05$).

In der Vorperiode betrug die Herzfrequenz in der Gruppe $337 \pm 4,5$, was insgesamt signifikant geringer war als in der gesunden Kontrollgruppe ($p = 0,0005$). Im separaten Subgruppenvergleich war die Herzfrequenz bei den Dosen von 1 und 10 mg signifikant vermindert. Im experimentellen Verlauf war die Herzfrequenz in den beiden niedrigen Dosen konstant. In den beiden höheren Dosen kam es zu einem Herzfrequenzabfall über die Versuchsperioden. Der Abfall bei der Dosis 10 mg/ kg KG/ h betrug in der Hauptperiode etwa 7 % ($p = < 0,01$) und setzte sich in die Nachperiode fort (Tab. 3.1., Abb. 3.1.).

Der mittlere arterielle Blutdruck veränderte sich innerhalb der einzelnen Subgruppen kaum. In der Subgruppe mit der Dosis 10 mg/ kg KG/ h fiel der MAP im experimentellen Verlauf um etwa 7 % ohne statistische Signifikanz. Im Vergleich aller

Vorperioden mit der gesunden Kontrollgruppe zeigte sich ein signifikant verminderter MAP ($p = 0,001$) mit $101 \text{ mmHg} \pm 1,6$ (Tab. 3.2., Abb. 3.2.). Der Hämatokrit sank hochsignifikant über den experimentellen Zeitraum zwischen 2 und 3 % (Tab 3.3.). Die glomeruläre Filtrationsrate war in der Vorperiode im Vergleich zur nicht therapierten Gruppe mit einem Mittelwert von $0,80 \pm 0,02$ um 11 % höher, und erreichte mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von $p = 0,014$ Signifikanzniveau. Die GFR stieg während der Aminosäureinfusion in allen Subgruppen an. Der Anstieg verminderte sich dosisabhängig. Die relative Steigerung betrug in der Dosis $0,33 \text{ mg/ kg KG/ h}$ 20 % ($p = < 0,01$ im Vgl. zur Vorperiode), bei 1 mg/ kg KG/ h 17 % ($p = < 0,05$ im Vgl. zur Vorperiode), bei $3,3 \text{ mg/ kg KG/ h}$ 11 % und in der Dosis 10 mg/ kg KG/ h um 5 %.

Die Steigerungen in den beiden höheren Dosen waren statistisch nicht mehr signifikant. In der Nachperiode fiel die GFR wieder ab und unterschritt hierbei stets den Wert der Vorperiode. Der Abfall war im Vergleich zur Vorperiode nur in der höchsten Dosis signifikant ($p = < 0,05$) (Tab. 3.5., Abb. 3.9.).

Das Urinzeitvolumen war, außer in der niedrigsten Dosis, im Vergleich der Vorperioden zur gesunden Kontrollgruppe etwa gleich groß. In der Dosis $0,33 \text{ mg/ kg KG/ h}$ war das Uvol hochsignifikant um das 3,2fache ($p = < 0,001$) erhöht. Im experimentellen Verlauf stieg das UVol in allen vier Subgruppen an, ohne statistisches Signifikanzniveau zu erreichen. In der Nachperiode war lediglich das UVol in der Dosis $0,33 \text{ mg/ kg KG/ h}$ im Vergleich zur Vorperiode signifikant erhöht und erreichte das 2,4 fache des Ausgangswertes (Tab. 3.6., Abb. 3.4.). Die fraktionelle Natriumexkretion war mit $0,57 \% \pm 0,17$ in den Vorperioden der gesamten Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe um 18 % niedriger ($p = 0,07$). Keine der Verminderung war im Subgruppenvergleich jedoch signifikant. Nach Aminosäureinfusion kam es in allen Subgruppen zu einer Steigerung der FENa zwischen 52 und 203 %. In der Nachperiode kam es in den beiden niedrigen Dosisgruppen zu einer weiteren Steigerung, die in der Gruppe $0,33 \text{ mg/ kg KG/ h}$ Signifikanzniveau im Vergleich zur eigenen Vorperiode erreichte. In den beiden höheren Dosisgruppen fiel die FENa in der Nachperiode ab, ohne den Wert der Vorperiode zu erreichen (Tab. 3.7, Abb. 3.5.).

Die Plasmakonzentration des Wirkstoffes nach den Clearanceexperimenten war in Analogie zu den verabreichten Dosen steigend (Tab. 3.8., Abb. 3.6.).

3.1.5. Gesunde Versuchstiere therapiert mit A- 962424.1 (CON- A- 962424.1)

Die Tiere in dieser Versuchsgruppe erhielten den Wirkstoff A- 962424.1 in einer Dosis von 0,033 mg, 0,1 mg, 0,33 mg oder 1 mg pro kg KG pro Stunde infundiert. Zum Zeitpunkt der Clearanceexperimente wogen Tiere in dieser Gruppe etwa gleich viel wie die nicht therapierte Kontrollgruppe, im Durchschnitt 306 Gramm \pm 8,6 (Tab. 3.4.).

Im Vergleich aller Vorperioden dieser Medikamentengruppe mit der nicht therapierten Kontrollgruppe waren Herzfrequenz und mittlerer arterielle Blutdruck annähernd gleich. Die Herzfrequenz betrug im Mittel $371 \pm 5,8$, der MAP $110 \pm 1,7$. In der Subgruppenanalyse war die Herzfrequenz bei der niedrigsten Dosisgruppe im Vorperiodenvergleich mit der Kontrollgruppe um 12 % geringer, was mit einem $p = < 0,01$ statistisches Signifikanzniveau erreichte. Im experimentellen Verlauf waren Herzfrequenz und MAP in allen Dosisgruppen annähernd konstant (Tab. 3.1. und 3.2., Abb. 3.1. und 3.2.). Der Hämatokrit sank hochsignifikant über den experimentellen Zeitraum zwischen 1 und 4 % (Tab 3.3.).

Die glomeruläre Filtrationsrate war in der Vorperiode im Vergleich zur nicht therapierten Gruppe mit einem Mittelwert von $0,67 \pm 0,02$ um 7 % geringer, was bei der statistischen Auswertung kein Signifikanzniveau erreichte. Die GFR stieg während der Aminosäureinfusion in allen Subgruppen an. Der Anstieg verminderte sich dosisabhängig. Die relative Steigerung betrug in der Dosis

0,033 mg/ kg KG/ h 22 % ($p = < 0,01$ im Vgl. zur Vorperiode),
bei 0,1 mg/ kg KG / h 18 %,
bei 0,33 mg/ kg KG/ h 6 % und
in der Dosis 1 mg/ kg KG/ h um 5 %.

Die Steigerung war nur in der niedrigsten Dosis signifikant. In der Nachperiode fiel die GFR wieder ab und unterschritt hierbei, außer in der Dosisgruppe 0,033 mg, stets den Wert der Vorperiode. Der Abfall war im Vergleich zur Vorperiode nur in der Dosis 0,33 mg signifikant ($p = < 0,05$) (Tab. 3.5., Abb. 3.3.a.).

Das Urinzeitvolumen war in den Vorperioden insgesamt 1,9 fach höher als bei der nicht therapierten Kontrollgruppe. In der Dosis 0,1 mg erreichte die Erhöhung

statistische Signifikanz ($p = < 0,01$). Im experimentellen Verlauf stieg das UVol in allen Subgruppen nach Aminosäureinfusion an. Insgesamt erhöhte sich das UVol etwa um den Faktor 1,8, wobei die Steigerung bei der Dosis 0,1 mg signifikant war ($p = < 0,05$) (Tab. 3.6., Abb. 3.4.). Die fraktionelle Natriumexkretion war mit $0,9 \% \pm 0,17$ in den Vorperioden der gesamten Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe um 29 % höher ($p = 0,17$). Nach Aminosäureinfusion kam es in allen Subgruppen zu einer Steigerung der FENa zwischen 61 und 161 %. In der Nachperiode kam es in allen Dosisgruppen zu einer weiteren Steigerung, die jedoch nicht so groß war wie die nach Aminosäureinfusion (Tab. 3.7, Abb. 3.5.). Die Plasmakonzentration des Wirkstoffes nach den Clearanceexperimenten war in Analogie zu den verabreichten Dosen steigend (Tab. 3.8., Abb. 3.6.).

3.1.6. Gesunde Versuchstiere therapiert mit A- 956028.1 (CON- A- 956028.1)

Die Tiere in dieser Versuchsgruppe erhielten den Wirkstoff A- 956028.1 in einer Dosis von 0,1 mg, 0,33 mg, 1 mg oder 3,3 mg pro kg KG pro Stunde infundiert. Zum Zeitpunkt der Clearanceexperimente wogen Tiere in dieser Gruppe etwa 7 % mehr als die nicht therapierte Kontrollgruppe, im Durchschnitt $328 \text{ Gramm} \pm 7,6$ (Tab. 3.4.).

Im Vergleich aller Vorperioden dieser Medikamentengruppe mit der nicht therapierten Kontrollgruppe waren die Herzfrequenz mit 350 ± 4 und der mittlere arterielle Blutdruck mit $106 \pm 1,1$ jeweils etwa 4 % geringer ($p = 0,018$ bzw. $0,022$). In der Subgruppenanalyse war die Verminderung der Herzfrequenz nur in der Dosisgruppe 0,33 mg signifikant ($p = 0,011$). Der MAP war im post test in den Dosisgruppen 0,33 und 3,3 mg signifikant niedriger (jeweils $p = < 0,05$). Im experimentellen Verlauf stieg die Herzfrequenz, außer in der höchsten Dosis, an. Der MAP stieg in allen Subgruppen in der Hauptperiode und näherte sich in der Hauptperiode dem Wert der Kontrollgruppe an. Der Anstieg innerhalb der Dosisgruppen war bei 0,33 und 1 mg signifikant (jeweils $p = < 0,05$) (Tab. 3.1. und 3.2., Abb. 3.1. und 3.2.). Der Hämatokrit sank hochsignifikant über den experimentellen Zeitraum zwischen 1 und 3 % (Tab 3.3.).

Die glomeruläre Filtrationsrate blieb in der Vorperiode dem der nicht therapierten Kontrollgruppe mit einem Mittelwert von $0,72 \pm 0,02$. Die GFR stieg während der

Aminosäureinfusion in allen Dosisgruppen an. Der Anstieg verminderte sich dosisabhängig. Die relative Steigerung betrug in der Dosis

0,1 mg/ kg KG/ h 19 % ($p = < 0,05$ im Vgl. zur Vorperiode),
bei 0,33 mg/ kg KG / h 15 % ($p = < 0,05$ im Vgl. zur Vorperiode),
bei 1 mg/ kg KG/ h 6 % und
in der Dosis 3,3 mg/ kg KG/ h um 3 %.

Die Steigerung war in den beiden höheren Dosisgruppen nicht mehr signifikant. In der Nachperiode fiel die GFR wieder ab. Hierbei unterschritt sie, außer in der Dosisgruppe 0,1 mg, immer den Wert der Vorperiode. Der Abfall war im Vergleich zur Vorperiode nur in der Dosis 1 mg signifikant ($p = < 0,05$) (Tab. 3.5., Abb. 3.3.b.). Das Urinzeitvolumen war in den Vorperioden zwischen 1,7 und 3,9 fach höher als in der Kontrollgruppe. In den Dosen 0,33 und 1 mg erreichte die Erhöhung statistische Signifikanz ($p = < 0,001$). Nach Aminosäureinfusion stieg das UVol in allen Subgruppen an. Insgesamt erhöhte sich das UVol etwa um den Faktor 1,6, wobei die Steigerung nie Signifikanzniveau erreichte (Tab. 3.6., Abb. 3.4.). Die fraktionelle Natriumexkretion war mit $1,5 \% \pm 0,2$ in den Vorperioden der gesamten Gruppe im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe um 117 % signifikant höher ($p = 0,0146$). Nach Aminosäureinfusion kam es in allen Subgruppen zu einer Steigerung der FENa zwischen 33 und 127 %. In der Nachperiode kam es in allen Dosisgruppen, ausser in der höchsten Dosis, zu einem mäßigen Abfall der FENa, ohne den Wert der Vorperiode zu erreichen. In der Dosisgruppe 3,3 mg stieg die FENa auch in der Nachperiode weiter an, wenn auch nicht so stark, wie nach Aminosäureinfusion (Tab. 3.7, Abb. 3.5.).

Die Plasmakonzentration des Wirkstoffes nach den Clearanceexperimenten war in Analogie zu den verabreichten Dosen steigend (Tab. 3.8., Abb. 3.6.).

3.1.7. Exposure- Serie

In der Exposure- Serie glichen die gemessenen Plasmaspiegel nach ca. 120 Minuten denen, die am Ende der Clearanceexperimente erhoben wurden. Ein Kumulationseffekt konnte somit nicht beobachtet werden.

3.2. Ergebnisse nach Diabetes mellitus Induktion / Stoffwechselkäfigversuche

3.2.1. Gesunde Versuchstiere als Zeitkontrollen (CON- VHC)

Die erhobenen Ergebnisse der Clearanceexperimente sind bereits zuvor dargestellt worden. Während der zweiwöchigen Stoffwechselversuchsphase kam es zu einer hochsignifikanten, 21,4 %igen Gewichtszunahme nach 7 Tagen und 42 %igen Gewichtszunahme über den gesamten Versuchsablauf (Tab. 3.9., Abb. 3.8.).

Die Blutglucosekonzentration betrug während des Beobachtungszeitraumes im Mittel $114 \text{ mg/dl} \pm 4,16$ (Tab. 3.10., Abb. 3.7.). Das gemessene Urinzeitvolumen betrug im STWKV ein Drittel des Trinkvolumens. Die mittlere Futtermenge betrug $32 \text{ Gramm} \pm 1,52$ in 24 Stunden (Tab. 3.11., Abb. 3.7.). Im 24 Stunden Sammelurin konnte eine mittlere Albuminurie von etwa $42 \text{ } \mu\text{g} / 100\text{g} / 24 \text{ h} \pm 6,74$ nachgewiesen werden. Die Kreatininclearance betrug pro Tier etwa $2,4 \text{ ml/ min.}$ (Tab. 3.12., Abb. 3.7.).

3.2.2. Erkrankte Versuchstiere ohne Therapie (DM- VHC)

Während der ersten 7 Tage kam es zu einer 6 %igen Gewichtsabnahme, gefolgt von einer mäßigen Gewichtszunahme in den Tagen 8 bis 14 nach Diabetes Induktion. Das Gewicht nach 14 Tagen lag im Mittel 3 % über dem Ausgangsgewicht (Tab. 3.9., Abb. 3.8.). Die Blutglucosekonzentration war mit dem 4fachen Wert hochsignifikant ($p = < 0,001$) höher als in der gesunden Kontrollgruppe (Tab. 3.10., Abb. 3.7.). Das gemessene Urinzeitvolumen stieg im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe hochsignifikant auf das 10 fache, das Trinkvolumen um das 4 fache an (jeweils $p = < 0,001$). Die mittlere Futtermenge erhöhte sich ebenfalls signifikant ($p = < 0,05$) um den Faktor 1,6 (Tab. 3.11., Abb. 3.7.). Die Albuminausscheidung im 24 Stunden Sammelurin erhöhte sich um 74 %, konnte aber bei der statistischen Analyse kein Signifikanzniveau erreichen ($p = 0,072$) (Tab. 3.12., Abb. 3.7.).

Während der Clearanceexperimente war die Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe um 12 % niedriger. Die Herzfrequenzminderung war mit $p = < 0,01$ hochsignifikant. In der Hauptperiode fiel die Herzfrequenz um weitere 3 % und stieg in der Nachperiode wieder leicht an. Der MAP stieg von Vor- zu Hauptperiode und Haupt- zu Nachperiode jeweils um 3 % an

(Tab. 3.1. und 3.2., Abb. 3.1. und 3.2.). Der Hämatokrit sank hochsignifikant über den experimentellen Zeitraum um 2 % (Tab 3.3.).

Die glomeruläre Filtrationsrate war in der Vorperiode um 26 % höher als bei der gesunden Kontrollgruppe ($p = < 0,01$). Nach Aminosäureinfusion stieg die GFR um 6 % an, ohne das die Steigerung Signifikanzniveau erreichen konnte. In der Nachperiode fiel die GFR ab und war in der Nachperiode 4 % geringer als in der Vorperiode (Tab. 3.5., Abb. 3.3.b.).

Das Urinzeitvolumen war in den Vorperioden 6,4 fach höher als in der Kontrollgruppe ($p = < 0,001$). Nach Aminosäureinfusion stieg das UVol um 14 % an um in der Nachperiode zum Wert der Vorperiode zurückzukehren (Tab. 3.6., Abb. 3.4.). Die fraktionelle Natriumexkretion war im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe um 156 % höher ($p = 0,3849$). Nach Aminosäureinfusion kam es zu einer Steigerung der FENa um 29 %, in der Nachperiode zu einer weiteren Steigerung um 17 % (Tab. 3.7., Abb. 3.5.).

3.2.3. Erkrankte Versuchstiere therapiert mit A- 901394.1 (DM- A- 901394.1)

In der Gruppe, die 10 mg/ Tier/ Tag erhielt kam es während der ersten 7 Tage zu einer 12 %igen Gewichtsabnahme, gefolgt von einer Gewichtszunahme in den Tagen 8 bis 14 nach Diabetes Induktion. Das Gewicht zum Ende des Beobachtungszeitraumes glich dem Ausgangsgewicht. Die Subgruppe mit einer Dosis von 30 mg/ Tier / Tag zeigte eine 12 %ige Gewichtszunahme über den gesamten Experimentzeitraum. In der ersten Woche steigerten die Versuchstiere dieser Gruppe ihr Gewicht im Mittel um 10 % und in den Tagen 8- 14 um weitere 2 % (Tab. 3.9., Abb. 3.8.). Die Blutglucosekonzentration war mit der 4,3 fachen (10 mg Dosisgruppe) bzw. 4 fachen (30 mg Dosisgruppe) Menge hochsignifikant ($p = < 0,001$) höher als in der gesunden Kontrollgruppe. Im statistischen Vergleich aller erkrankten Subgruppen konnte kein signifikanter Unterschied der Blutglucosekonzentration gefunden werden (Tab. 3.10., Abb. 3.7.). Das gemessene Urinzeitvolumen stieg in beiden Dosisgruppen im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe hochsignifikant auf das 8,6 fache bei einer Dosis von 10 mg bzw. das 10,1 fache bei einer Dosis von 30 mg an (jeweils $p = < 0,001$). Das Trinkvolumen war mit der 3 fachen Menge in beiden Dosisgruppen hochsignifikant gegenüber den gesunden Tieren erhöht ($p = < 0,001$). Im Vergleich mit den erkrankten, nicht

therapierten Tieren war das Trinkvolumen der therapierten Tiere etwa ein Drittel geringer, was statistisches Signifikanzniveau erreichte ($p < 0,001$). Die Futtermenge erhöhte sich im Vergleich zu den gesunden Tieren bei der 10 mg Dosis hochsignifikant um den Faktor 1,7 ($p = < 0,001$), in der Dosisgruppe 30 mg um den Faktor 1,4 ($p = < 0,01$) (Tab. 3.11., Abb. 3.7.). Die Albuminausscheidung im 24 Stunden Sammelurin verringerte sich bei einer Dosis von 10 mg um 5 % im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe, in der Dosisgruppe 30 mg war die Albuminausscheidung etwa 6 % höher als in der gesunden Kontrollgruppe (10 mg $p = 0,88$; 30 mg $p = 0,84$) (Tab. 3.12., Abb. 3.7.).

Während der Clearanceexperimente war die Herzfrequenz in beiden Dosisgruppen um rund 3 % niedriger als in der gesunden Kontrollgruppe. Im Verlauf war die Herzfrequenz annähernd konstant, nur in der Dosis 30 mg kam es in der Nachperiode zu einer geringfügigen Steigerung um etwa 5 % (Tab. 3.1., Abb. 3.1.). Der mittlere arterielle Blutdruck war in der Dosisgruppe 30 mg nahezu gleich dem der Kontrollgruppe und blieb während des experimentellen Ablaufes konstant. In der 10 mg Dosisgruppe war der MAP hingegen in der Vorperiode um 22 % niedriger als in der Kontrollgruppe ($p = < 0,001$). Nach Aminosäureinfusion stieg er jedoch hochsignifikant an ($p = < 0,01$) und war in der Nachperiode fast genauso hoch wie in der Kontrollgruppe (Tab. 3.2., Abb. 3.2.). Über den experimentellen Zeitraum hinweg sank der Hämatokrit in beiden Dosisgruppen hochsignifikant um 2 % (Tab 3.3.). Die glomeruläre Filtrationsrate war in der Dosisgruppe 10 mg in der Vorperiode um 36 % höher als bei der gesunden Kontrollgruppe ($p = < 0,001$) und stieg nach Aminosäureinfusion signifikant um 16 % an. In der 30 mg Dosisgruppe war die GFR in der Vorperiode um 7 % niedriger als in der gesunden Kontrollgruppe und stieg nach Aminosäureinfusion um 21 % signifikant an ($p = < 0,05$). In der Nachperiode fiel die GFR in beiden Dosisgruppen ab und unterschritt den Wert der Vorperiode (Tab. 3.5., Abb. 3.3.b.). Das Urinzeitvolumen war in den Vorperioden 5 fach (Dosis 10 mg) bzw. 4,2 fach (Dosis 30 mg) höher als in der Kontrollgruppe ($p = < 0,001$ bzw. $< 0,01$). Nach Aminosäureinfusion stieg das UVol um 44 % (Dosis 10 mg) bzw. 110 % (Dosis 30 mg) an. Die Steigerung war in der 30 mg Dosisgruppe hochsignifikant. In der Nachperiode fielen die Volumina in beiden Gruppen ab, wobei der Wert der Vorperiode nur in der 10 mg Dosisgruppe unterschritten wurde (Tab. 3.6., Abb. 3.4.). Die fraktionelle Natriumexkretion in der Vorperiode war im Vergleich zur gesunden

Kontrollgruppe um 57 % (Dosis 10 mg) bzw. 107 % (Dosis 30 mg) höher. Nach Aminosäureinfusion kam es zu einer Steigerung der FENa um 90 % (Dosis 10 mg) bzw. 129 % (Dosis 30 mg). In der Nachperiode kam es in der 10 mg Dosisgruppe zu einer weiteren Steigerung um 23 % und in der 30 mg Gruppe zu einem 10 % igen Abfall (Tab. 3.7, Abb. 3.5.).

3.3. Ergebnistabellen:

Die verabreichte Wirkstoffdosis bezieht sich in der gesunden Kontrollgruppe (CON) auf eine intravenöse Applikation in mg/ kg KG/ h. In der erkrankten Gruppe (DM) wurde die Dosis oral verabreicht und in mg/ Tier/ Tag angegeben.

Tab. 3.1. Herzfrequenz pro Minute
Angaben in Schlägen pro Minute

Gruppe	n	Vorperiode		Hauptperiode		Nachperiode	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
CON- VHC	11	365	4,97	364	5,18	365	5,64
CON- A- 437203.33							
0,33 mg	6	346	10,03	337	10,14	342	7,76
CON- A- 901394.1							
0,33 mg	6	340	10,14	334	10,40	333	8,00
1 mg	7	338 *	8,80	339	9,47	338	9,48
3,3 mg	6	339	11,72	332	7,47	326	6,40
10 mg	6	333 *	5,60	309 ##	4,27	304 ##	4,48
CON- A- 962424.1							
0,033 mg	3	321 **	16,16	324	18,26	325	19,74
0,1 mg	6	376	12,35	371	13,06	374	12,46
0,33 mg	7	379	6,25	375	7,70	377	7,13
1 mg	5	383	7,18	385	7,47	381	9,97
CON- A- 956028.1							
0,1 mg	4	360	8,10	370	4,93	379	10,97
0,33 mg	6	342 *	7,16	350	6,54	351	8,99
1 mg	6	352	7,55	355	9,45	357	6,88
3,3 mg	2	345	6,24	339	5,20	344	9,60
DM- VHC	3	321 **	4,58	312	5,80	315	5,95
DM- A- 901394.1							
10 mg	6	356	15,70	359	11,55	354	11,68
30 mg	4	354	11,59	359	5,00	373	3,61

*) $p = < 0,05$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

***) $p = < 0,01$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

#) $p = < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

###) $p = < 0,01$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

Tab. 3.2. mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Angaben in mmHg

Gruppe	n	Vorperiode		Hauptperiode		Nachperiode	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
CON- VHC	11	110	1,67	110	2,69	114	3,02
CON- A- 437203.33 0,33 mg	6	107	2,85	107	2,94	102	4,36
CON- A- 901394.1 0,33 mg	6	112	3,37	112	3,65	110	3,57
1 mg	7	96 ***	1,86	95	2,14	92	1,68
3,3 mg	6	100 *	3,81	103	3,31	97	4,10
10 mg	6	97 ***	1,63	94	4,00	90	3,31
CON- A- 962424.1 0,033 mg	3	104	2,95	109	0,80	106	1,96
0,1 mg	6	108	3,99	111	5,77	110	6,49
0,33 mg	7	115	2,61	117	2,33	118	2,57
1 mg	5	110	2,18	111	2,82	115	3,96
CON- A- 956028.1 0,1 mg	4	107	3,66	115	3,47	111	1,12
0,33 mg	6	102 *	2,71	107 #	2,66	103	2,06
1 mg	6	105	2,11	113 #	2,10	112	3,21
3,3 mg	2	98 *	2,89	103	5,77	100	2,36
DM- VHC	3	97	7,17	100	6,15	103	6,32
DM- A- 901394.1 10 mg	6	86 ***	4,12	94 ##	3,93	109	1,97
30 mg	4	105	10,69	104	9,87	110	8,75

*) $p < 0,05$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP**) $p < 0,01$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP***) $p < 0,001$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP#) $p < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP##) $p < 0,01$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

Tab. 3.3. Hämatokrit (Hkt)

Angaben in %

Gruppe	n	Vorperiode		Hauptperiode		Nachperiode	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
CON- VHC	11	44	0,75	43 ###	0,82	42 ###	0,86
CON- A- 437203.33 0,33 mg	6	44	0,48	43 #	0,60	42 ###	0,60
CON- A- 901394.1 0,33 mg	6	45	0,61	44 ##	0,55	43 ###	0,56
1 mg	7	45	0,65	44 ##	0,75	43 ###	0,82
3,3 mg	6	47	0,58	45 ###	0,61	44 ###	0,54
10 mg	6	45	0,19	44 ##	0,31	43 ###	0,40
CON- A- 962424.1 0,033 mg	3	45	0,21	44 ###	0,26	44 ###	0,34
0,1 mg	6	45	0,47	43 #	0,67	43 ##	0,69
0,33 mg	7	45	0,31	42 ##	0,48	41 ###	0,52
1 mg	5	46	0,96	44 ##	1,06	43 ###	1,08
CON- A- 956028.1 0,1 mg	4	46	0,71	46	0,71	44 ##	0,68
0,33 mg	6	45	0,64	44 ##	0,58	43 ###	0,49
1 mg	6	46	0,55	45 #	0,83	45 ###	0,87
3,3 mg	2	45	0,29	42 ##	0,25	42 ##	0,29
DM- VHC	3	43	0,31	42 ##	0,33	41 ###	0,56
DM- A- 901394.1 10 mg	6	43	1,08	43	1,05	41 ##	1,30
30 mg	4	41	1,40	40	1,25	39 ##	0,92

 #) $p < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

 ##) $p < 0,01$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

 ###) $p < 0,001$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

Tab. 3.4. Gewicht

Tiergewicht zum Zeitpunkt der Operation. Angaben in Gramm

Gruppe	Gewicht in Gramm		
	n	Mean	SEM
CON- VHC	11	307	13,30
CON- A- 437203.33			
0,33 mg	6	300	19,54
CON- A- 901394.1			
0,33 mg	6	314	9,67
1 mg	7	333	16,72
3,3 mg	6	252 *	11,29
10 mg	6	290	20,31
CON- A- 962424.1			
0,033 mg	3	318	34,02
0,1 mg	6	313	18,25
0,33 mg	7	320	9,26
1 mg	5	270	10,00
CON- A- 956028.1			
0,1 mg	4	318	8,54
0,33 mg	6	325	10,00
1 mg	6	339	20,27
3,3 mg	2	325	0,00
DM- VHC	3	279	11,10
DM- A- 901394.1			
10 mg	6	270	11,92
30 mg	4	299	23,13

 *) $p = < 0,05$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

Tab. 3.5. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Angaben in ml/ 100g/ Minute

Gruppe	n	Vorperiode		Hauptperiode		Nachperiode	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
CON- VHC	11	0,72	0,03	0,92 ###	0,03	0,80	0,04
CON- A- 437203.33							
0,33 mg	6	0,76	0,02	0,77	0,02	0,66 ##	0,03
CON- A- 901394.1							
0,33 mg	6	0,79	0,03	0,95 ##	0,03	0,73	0,03
1 mg	7	0,76	0,03	0,89 #	0,01	0,72	0,04
3,3 mg	6	0,81	0,04	0,90	0,03	0,76	0,03
10 mg	6	0,83 *	0,03	0,87	0,03	0,73 #	0,02
CON- A- 962424.1							
0,033 mg	3	0,61	0,02	0,74 ##	0,02	0,65	0,03
0,1 mg	6	0,62	0,04	0,72	0,05	0,55	0,05
0,33 mg	7	0,72	0,03	0,78	0,05	0,59 #	0,03
1 mg	5	0,69	0,03	0,72	0,03	0,59	0,03
CON- A- 956028.1							
0,1 mg	4	0,69	0,03	0,82 #	0,04	0,74	0,04
0,33 mg	6	0,69	0,02	0,79 #	0,03	0,64	0,04
1 mg	6	0,76	0,02	0,81	0,03	0,65 #	0,04
3,3 mg	2	0,78	0,00	0,81	0,02	0,69	0,04
DM- VHC	3	0,91 **	0,04	0,96	0,05	0,87	0,07
DM- A- 901394.1							
10 mg	6	0,98 ***	0,04	1,14 #	0,08	0,80 #	0,07
30 mg	4	0,67	0,06	0,81 #	0,05	0,62	0,04

*) p = < 0,05 one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

**) p = < 0,01 one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

***) p = < 0,001 one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

#) p = < 0,05 one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

##) p = < 0,01 one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

###) p = < 0,001 one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

Tab. 3.6. Urinzeitvolumen (UZV)

Übersicht über das UZV während der Clearanceexperimente in $\mu\text{l}/100\text{g}/\text{Minute}$

Gruppe	n	Vorperiode		Hauptperiode		Nachperiode	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
CON- VHC	11	3,25	0,53	10,51	2,36	10,63	2,83
CON- A- 437203.33							
0,33 mg	6	9,66 **	2,35	15,85	1,27	14,47	1,85
CON- A- 901394.1							
0,33 mg	6	10,32 ***	1,99	16,60	1,69	24,41 #	3,24
1 mg	7	2,32	0,23	4,14	0,43	7,48	2,59
3,3 mg	6	5,34	2,03	10,62	3,31	7,26	1,93
10 mg	6	5,42	1,96	8,55	1,90	6,16	1,34
CON- A- 962424.1							
0,033 mg	3	6,70	1,68	13,61	2,91	12,56	3,53
0,1 mg	6	7,50 **	1,42	15,01 #	2,82	9,14	1,77
0,33 mg	7	6,00	1,19	7,87	1,18	9,15	1,98
1 mg	5	5,39	0,54	8,98	1,43	12,20	2,62
CON- A- 956028.1							
0,1 mg	4	8,66	2,65	19,82	1,98	16,16	2,36
0,33 mg	6	12,64 ***	2,56	13,96	1,90	9,15	1,57
1 mg	6	12,48 ***	2,26	18,21	2,13	12,45	2,32
3,3 mg	2	5,03	0,53	10,74	1,51	13,49	2,96
DM- VHC	3	20,86 ***	4,61	23,83	1,87	20,53	4,44
DM- A- 901394.1							
10 mg	6	16,20 ***	2,56	23,29	4,89	14,84	2,90
30 mg	4	13,70 **	2,45	28,80 ##	1,94	20,24	2,78

*) $p < 0,05$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP**) $p < 0,01$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP***) $p < 0,001$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP#) $p < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP##) $p < 0,01$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

Tab. 3.7. Fraktionelle Natriumexkretion (FENa)

Angaben in %

Gruppe	n	Vorperiode		Hauptperiode		Nachperiode	
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
CON- VHC	11	0,69	0,23	1,07	0,25	1,20	0,52
CON- A- 437203.33							
0,33 mg	6	1,75	0,56	2,84	0,22	3,04	0,54
CON- A- 901394.1							
0,33 mg	6	1,26	0,45	1,92	0,16	3,40 #	0,51
1 mg	7	0,12	0,02	0,28	0,08	0,41	0,18
3,3 mg	6	0,57	0,40	0,99	0,45	0,70	0,32
10 mg	6	0,34	0,17	1,03	0,50	0,89	0,44
CON- A- 962424.1							
0,033 mg	3	0,85	0,20	2,22	0,57	2,49	0,99
0,1 mg	6	1,28	0,57	2,10	0,80	2,11	0,73
0,33 mg	7	0,72	0,20	1,16	0,22	1,62	0,56
1 mg	5	0,75	0,15	1,26	0,07	1,69	0,55
CON- A- 956028.1							
0,1 mg	4	1,24	0,44	2,54	0,36	2,28	0,37
0,33 mg	6	1,73	0,36	2,30	0,35	1,93	0,36
1 mg	6	1,74	0,36	2,56	0,43	1,93	0,49
3,3 mg	2	0,81	0,10	1,84	0,42	2,35	0,62
DM- VHC	3	1,77	1,31	2,29	0,37	2,68	0,94
DM- A- 901394.1							
10 mg	6	1,08	0,12	2,05	0,63	2,53	0,99
30 mg	4	1,43	0,28	3,27	0,94	2,94	0,33

Kein signifikanter Unterschied im Vorperiodenvergleich

#) $p = < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

Tab. 3.8. Exposure

Plasmakonzentration des Wirkstoffes am Ende der Clearanceexperimente in ng / ml (etwa 200 Min. Infusion) bzw. nach 120 minütiger Infusion (Exposure- Serie)

Gruppe		n	Mean	SEM
CON- A- 901394.1				
	0,33 mg	6	142	32,63
	1 mg	7	233	26,7
	3,3 mg	6	790	80,33
	10 mg	6	2340	156,8
	Exposure Serie 1 mg	6	210	21
CON- A- 962424.1				
	0,033 mg	3	51	8,083
	0,1 mg	6	192	16,62
	0,33 mg	7	552	38,51
	1 mg	5	1502	377,4
	Exposure Serie 0,33 mg	4	508	42,1
CON- A- 956028.1				
	0,1 mg	4	173	36,37
	0,33 mg	6	545	61,03
	1 mg	6	957	51,94
	3,3 mg	2	2600	400
	Exposure Serie 1 mg	4	988	49,2
DM- A- 901394.1				
	10 mg	6	92	28,43
	30 mg	4	135	36,32

Die Bestimmung der Konzentration in der erkrankten Gruppe gibt den Talspiegel nach rund 24 Stunden wieder und nicht direkt mit dem der Kontrollgruppe vergleichbar.

Tab. 3.9. Gewichtsverlauf während STWKV

Zeitpunkte: 1. Injektion des Streptocotozins, 2. Stoffwechselkäfigversuch 1 (Tag 6-7), 3. Stoffwechselkäfigversuch 2 (Tag 12-14) Angaben in Gramm.

Gruppe	n	STZ- Injektion		STWKV 1		STWKV 2		
		Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM	
CON- VHC	5	238	14,19	289 **	6,7	338 ***	10,8	
DM- VHC	8	244	12,75	229	5,62	252	5,11	
DM- A- 901394.1	10 mg	12	234	9,59	205	10,79	234	14,16
	30 mg	12	220	2,11	241	10,5	247	14,68

Ausgangsgewicht zu Versuchsbeginn mittels one- way ANOVA ohne signifikante Unterschiede

*) $p = < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus Gewicht bei STZ- Injektion

**) $p = < 0,01$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus Gewicht bei STZ- Injektion

***) $p = < 0,001$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus Gewicht bei STZ- Injektion

Tab. 3.10. Blutglucosekonzentration während STWKV

Angaben in mg/ dl

Gruppe	n	Blutglucose		
		Mean	SEM	
CON- VHC	5	114	4,16	
DM- VHC	8	460 ***	20,72	
DM- A- 901394.1	10 mg	12	489 ***	14,65
	30 mg	12	460 ***	23,77

***) $p = < 0,001$ one- way ANOVA mit Dunnett's posttest versus CON- VHC

Blutglucosewerte innerhalb der erkrankten Gruppe ohne signifikante Unterschiede

Tab. 3.11. Trinkzeitvolumen, Urinzeitvolumen und Futtermenge während STWKV
TZV und UZV in ml/ Tier/ 24 Stunden, Futtermenge in g/ Tier/ 24 h.

Trinkzeitvolumen			
Gruppe	n	Mean	SEM
CON- VHC	5	53 ###	1,29
DM- VHC	8	214 ***	4,31
DM- A- 901394.1			
10 mg	12	158 ***/ ###	3,63
30 mg	12	157 ***/ ###	3,2
Urinzeitvolumen			
Gruppe	n	Mean	SEM
CON- VHC	5	19 ###	1,69
DM- VHC	8	188 ***	9,99
DM- A- 901394.1			
10 mg	12	164 ***	6,9
30 mg	12	192 ***	10,58
Futtermenge			
Gruppe	n	Mean	SEM
CON- VHC	5	32 ###	1,52
DM- VHC	8	52 ***	2,5
DM- A- 901394.1			
10 mg	12	53 ***	1,85
30 mg	12	45 **	3,08
<p>*) p = < 0,05 one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus CON- VHC **) p = < 0,01 one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus CON- VHC ***) p = < 0,001 one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus CON- VHC</p> <p>#) p = < 0,05 one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus DM- VHC ###) p = < 0,001 one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus DM- VHC</p>			

Tab. 3.12. Absolute Albuminausscheidung im Urin (AlbU) und Kreatininclearance
AlbU in µg/ 100g/ 24 h Kreatininclearance in ml/ min/ 100g.

Gruppe	n	Absolute Albuminausscheidung im Urin	
		Mean	SEM
CON- VHC	5	41,62	6,04
DM- VHC	8	72,31	15,29
DM- A- 901394.1	12	39,47	11,8
	12	43,94	9,16

3.4. Ergebnisabbildungen:

Die Abbildungen zeigen, sofern nicht anders angegeben, Mittelwerte und SEM.

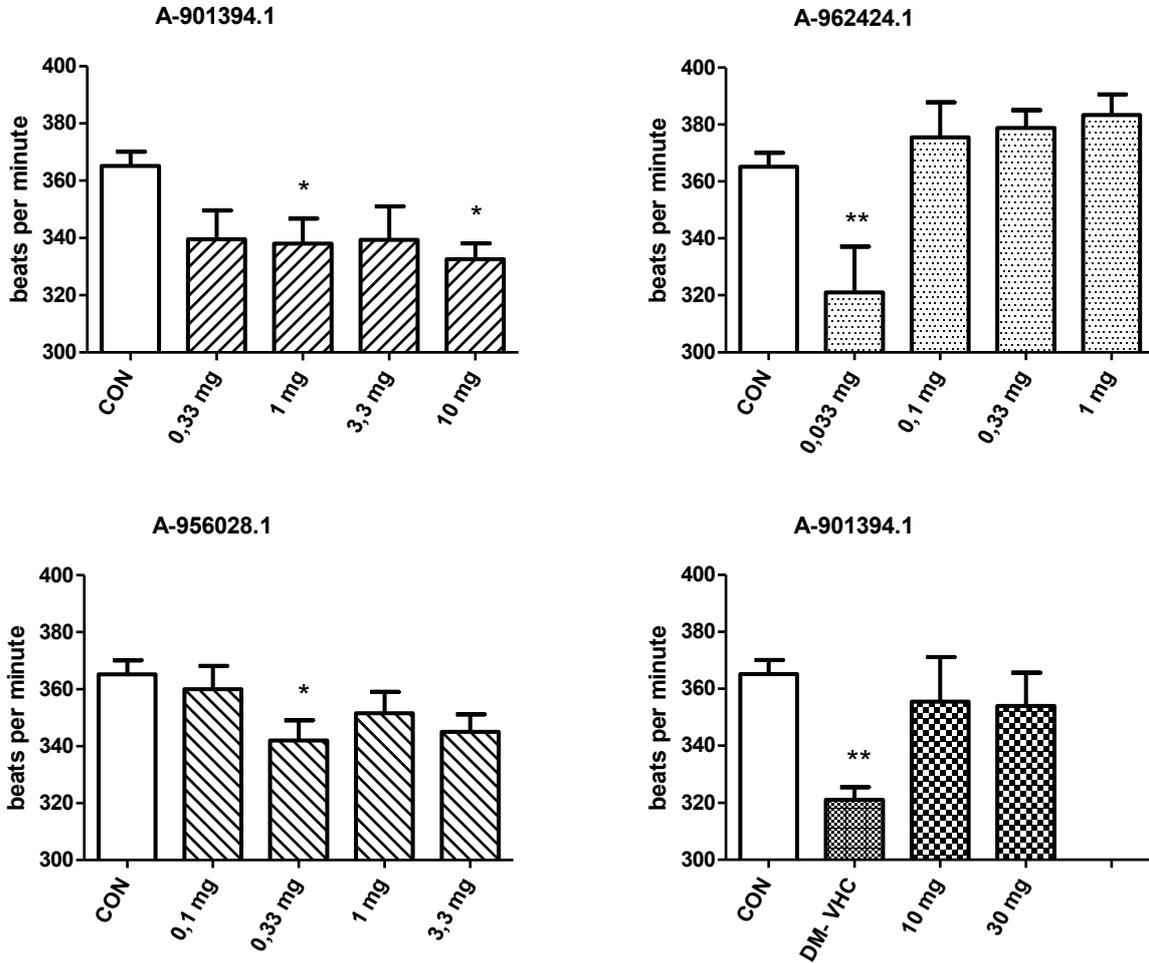


Abb. 3.1.: Vorperiodenvergleich der Herzfrequenz

*) $p = < 0,05$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

**) $p = < 0,01$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

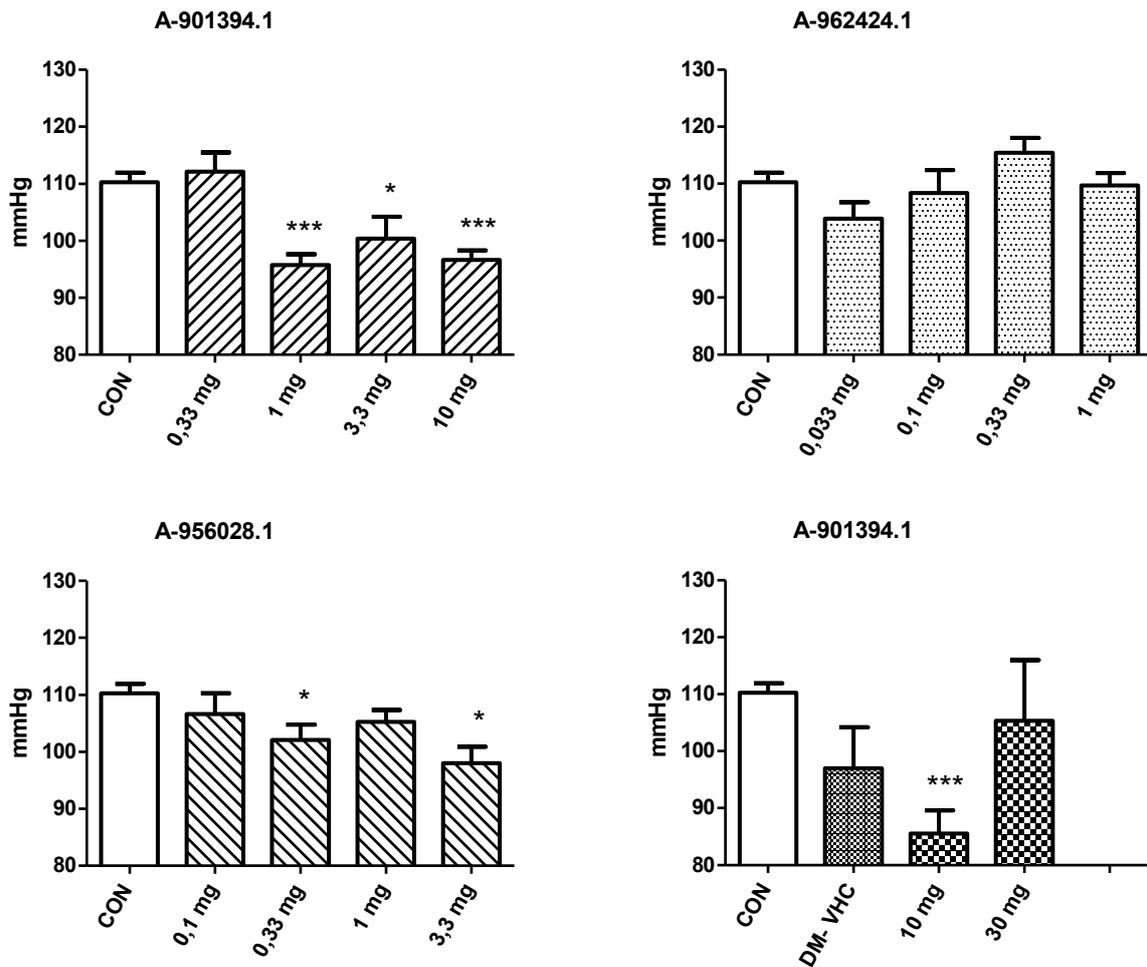


Abb. 3.2.: Vorperiodenvergleich des mittleren arteriellen Blutdrucks

*) $p = < 0,05$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

***) $p = < 0,01$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

****) $p = < 0,001$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

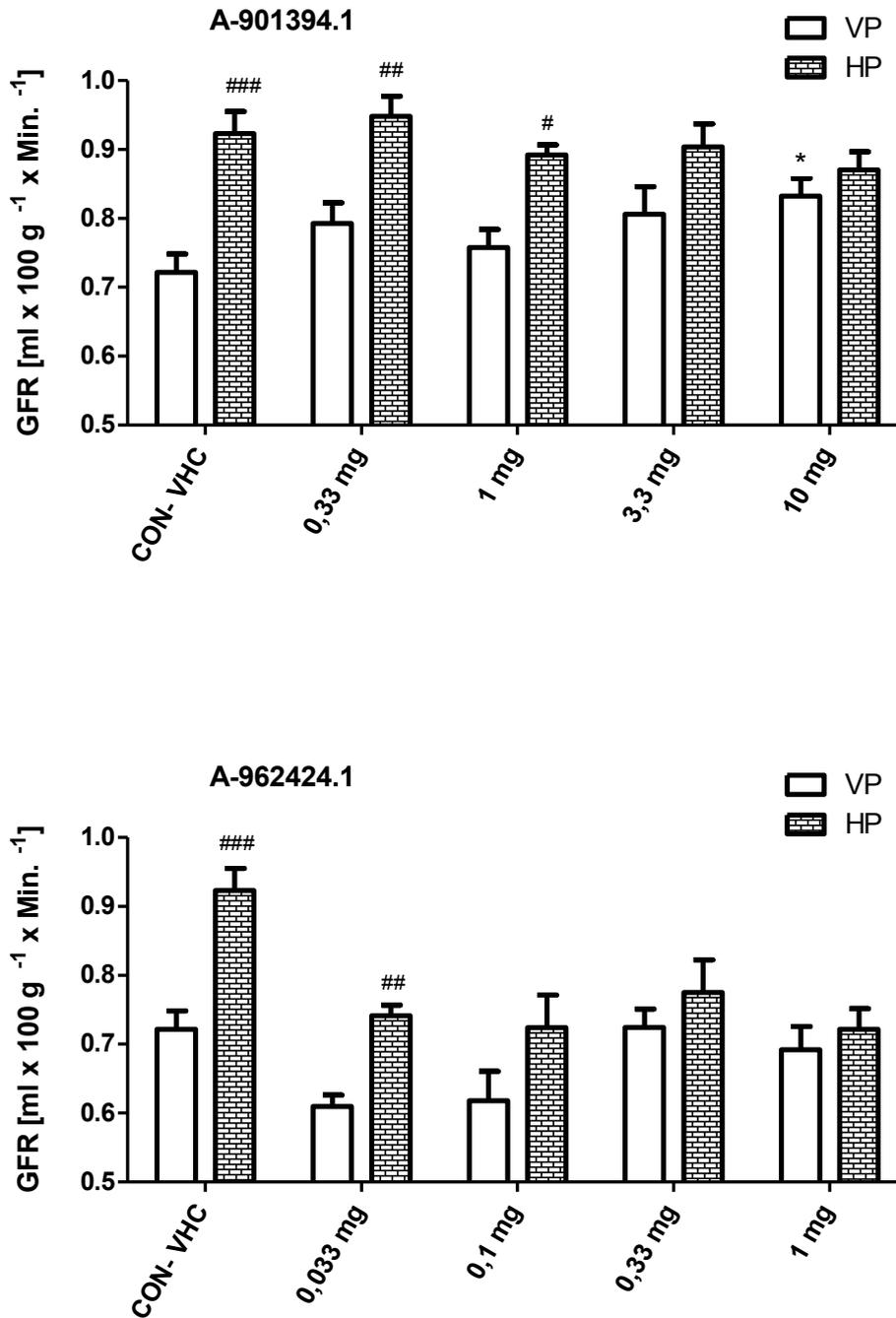


Abb. 3.3.a.: Glomeruläre Filtrationsrate in der Vorperiode und nach AS- Infusion (HP)

*) $p = < 0,05$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

#) $p = < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

##) $p = < 0,01$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

###) $p = < 0,001$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

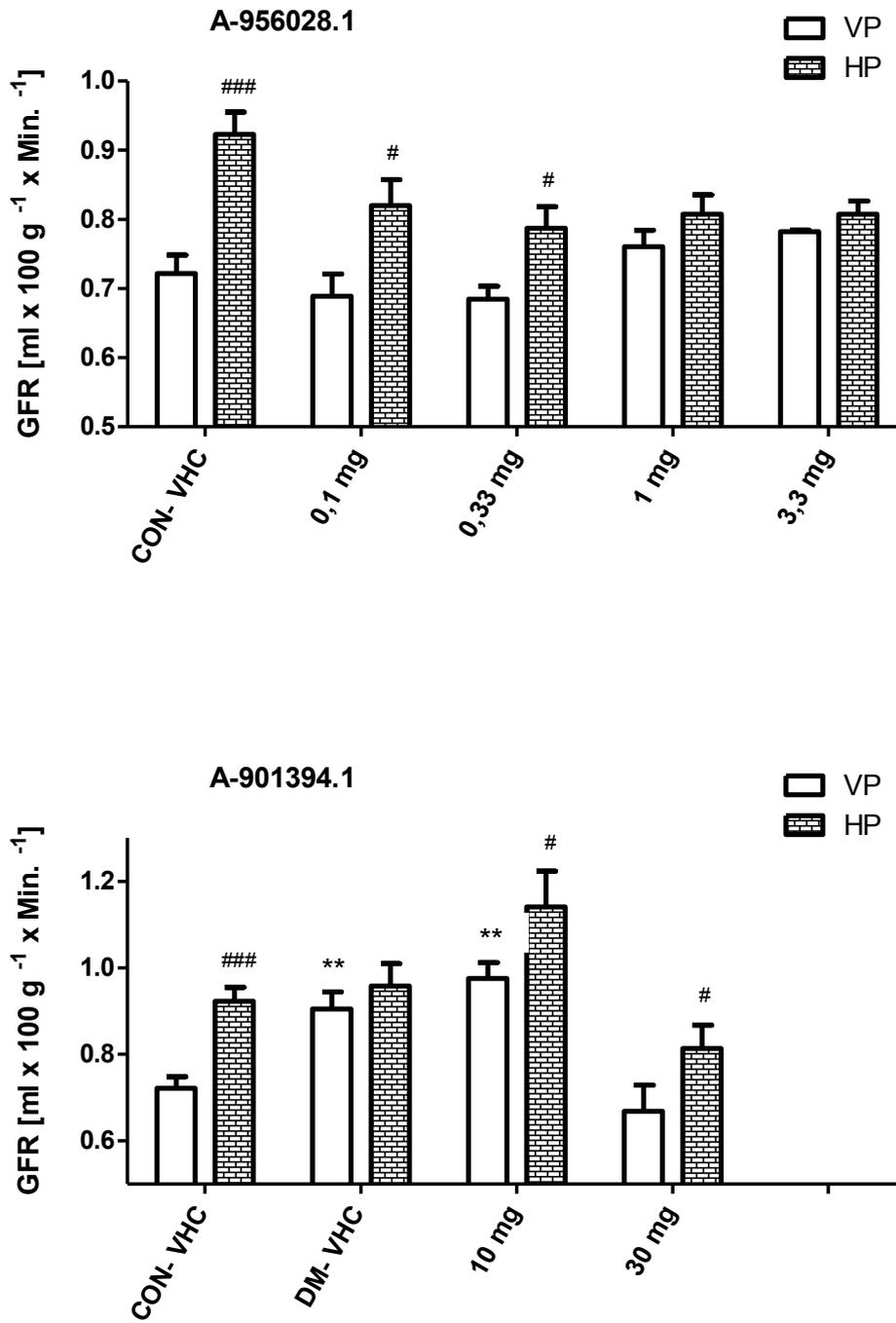


Abb. 3.3.b.: Glomeruläre Filtrationsrate in der Vorperiode und nach AS- Infusion (HP)

**) $p < 0,01$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

#) $p < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

###) $p < 0,001$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

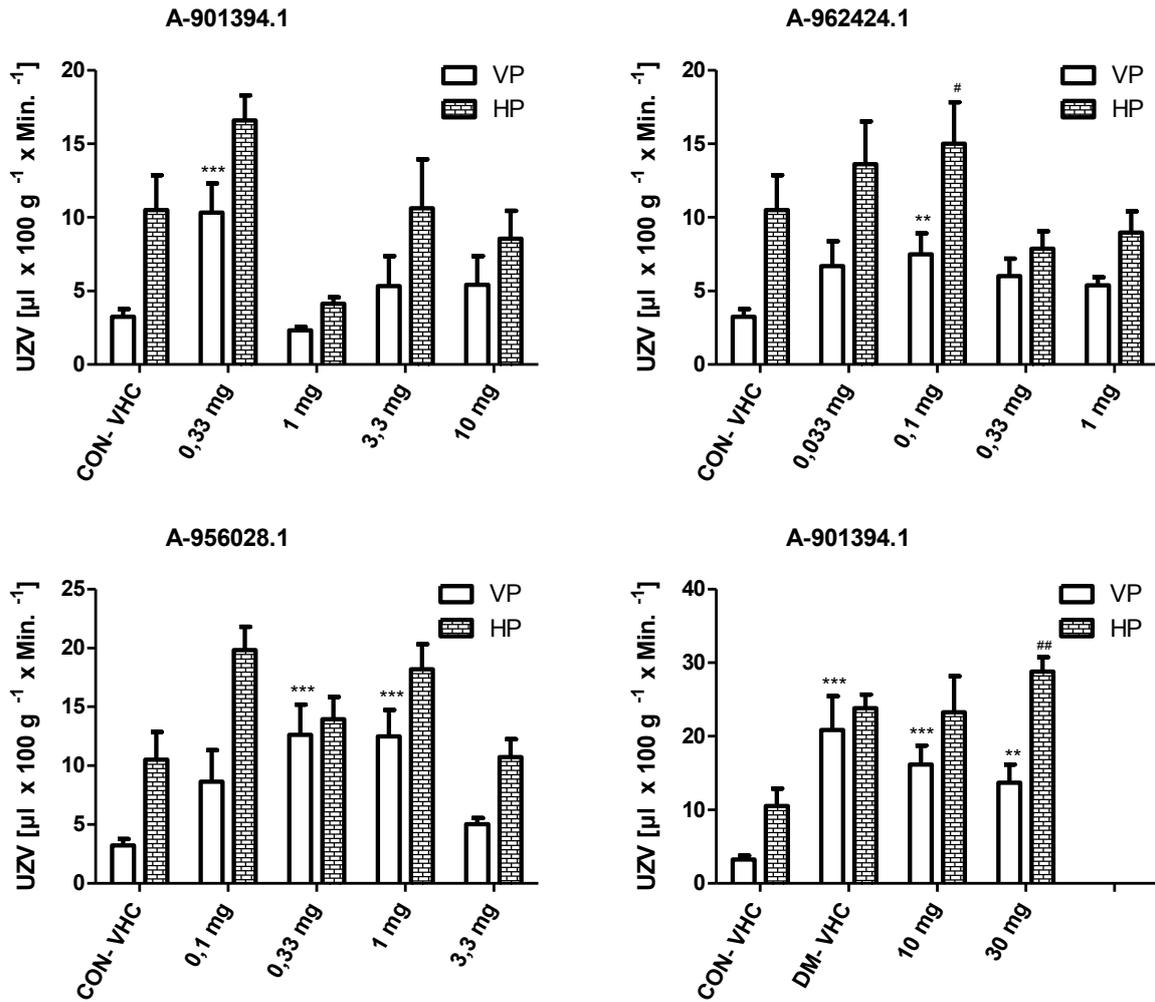


Abb. 3.4.: Urinzeitvolumen in der Vorperiode und nach AS- Infusion (HP)

*) $p = < 0,05$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

**) $p = < 0,01$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

***) $p = < 0,001$ one- way ANOVA mit Dunett's posttest versus CON- VHC VP

#) $p = < 0,05$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

##) $p = < 0,01$ one- way ANOVA (gepaart) mit Dunett's posttest versus VP

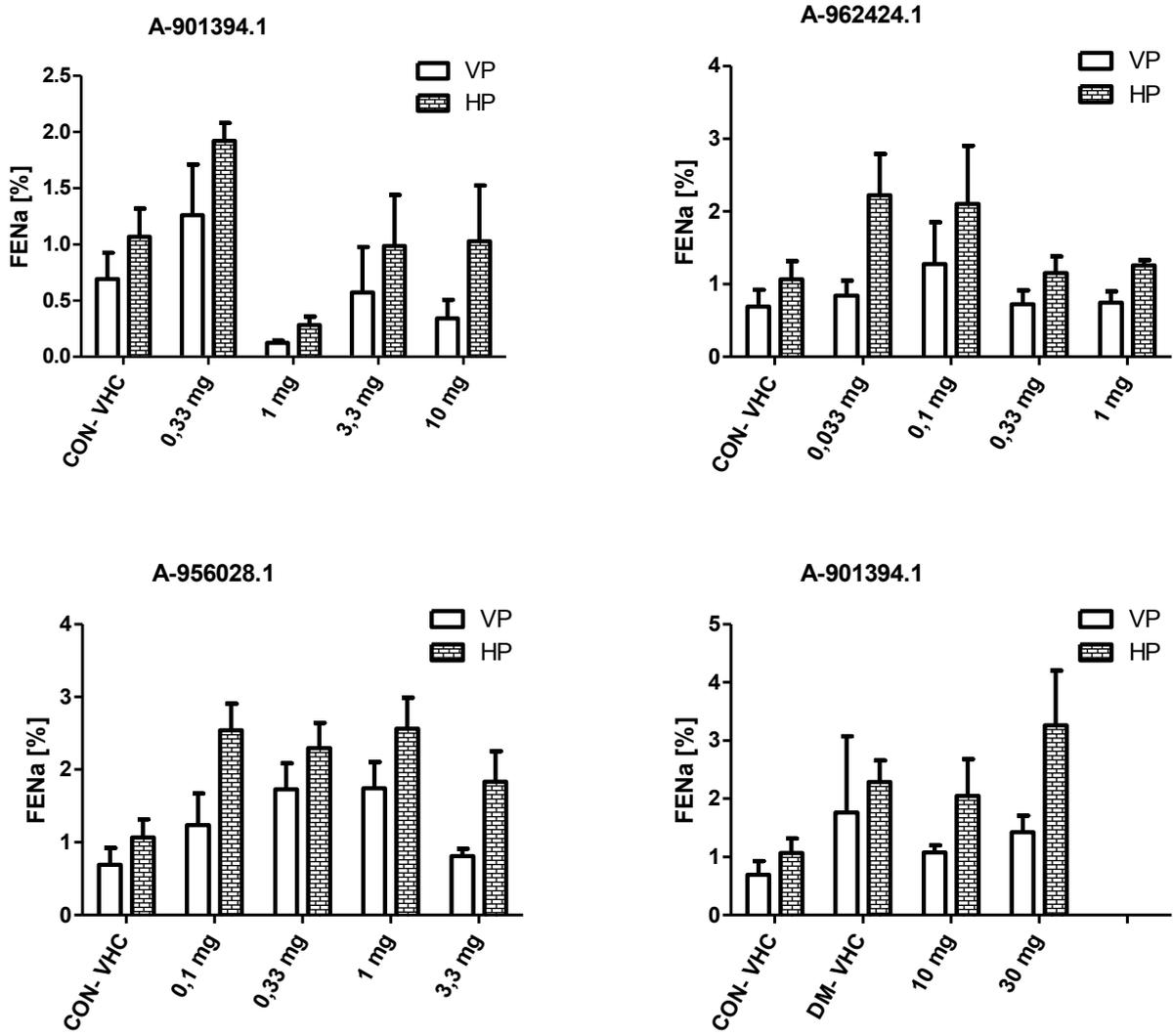


Abb. 3.5.: Fraktionelle Natriumexkretion in der Vorperiode und nach AS- Infusion (HP)

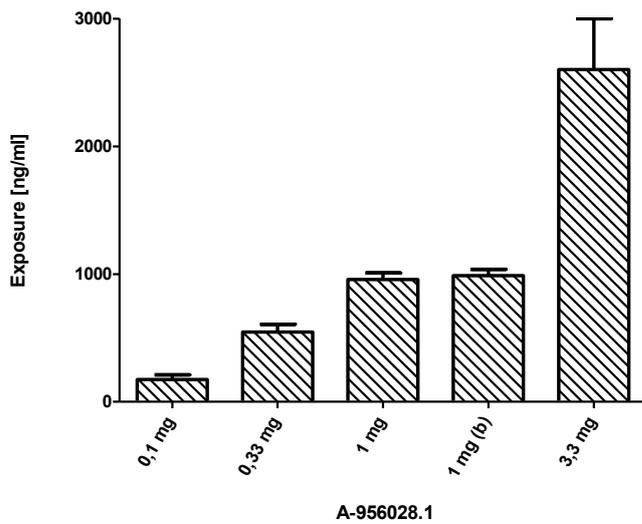
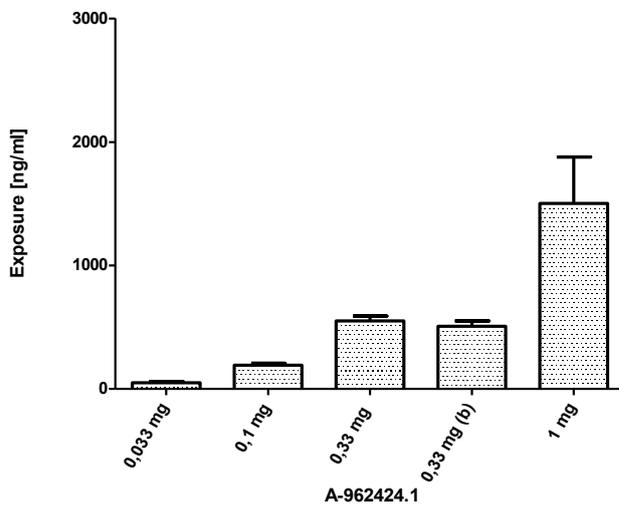
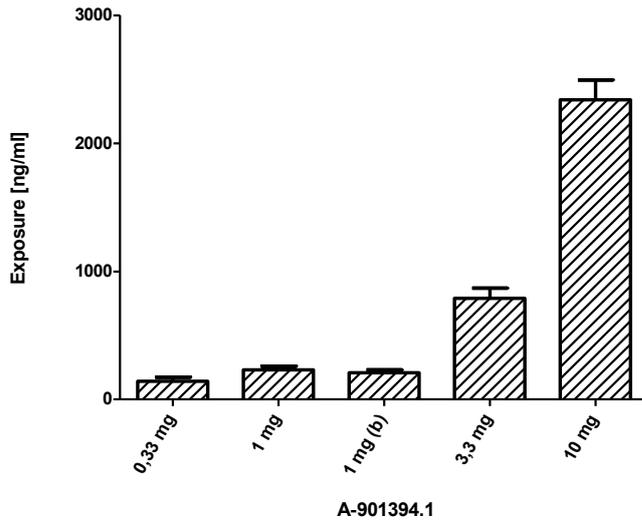


Abb. 3.6.: Exposure nach den Clearanceexperimenten in der gesunden Versuchsgruppe
Die mit (b) gekennzeichnete Dosis bezieht sich auf die erhobenen Plasmaspiegel in der Exposure-Serie.

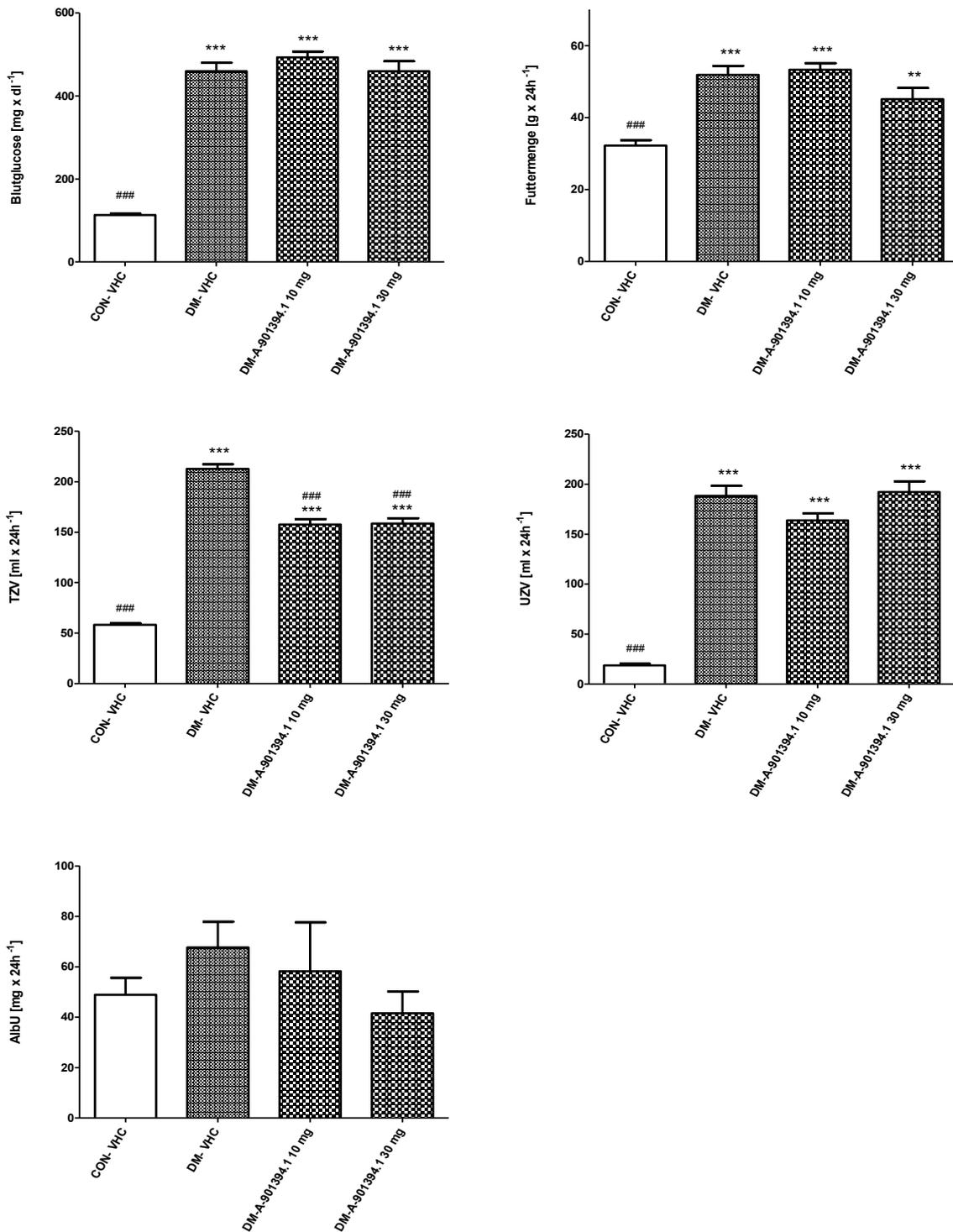


Abb. 3.7.a-e: Metabolische Variablen während der STWKV. Kontrollen und Therapie mit A-901394.1

*) $p = < 0,05$ one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus CON- VHC

***) $p = < 0,001$ one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus CON- VHC

###) $p = < 0,001$ one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus DM- VHC

#) $p = < 0,05$ one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus DM- VHC

####) $p = < 0,001$ one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus DM- VHC

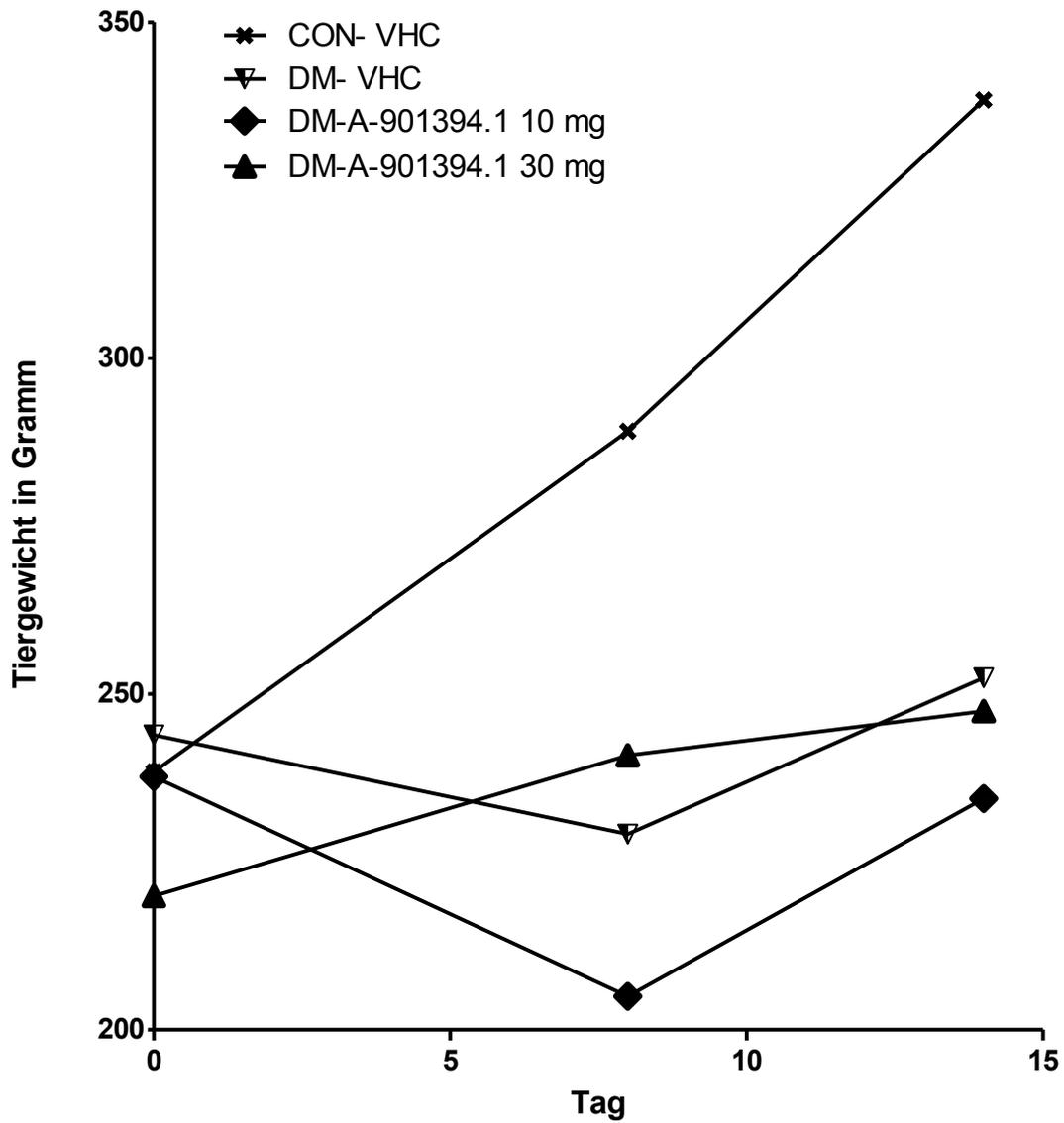


Abb. 3.8. Gewichtsverlauf bei STWKV

Zeitpunkte: 1. Injektion des Streptocotozins, 2. Stoffwechselkäfigversuch 1 (Tag 6-7),

3. Stoffwechselkäfigversuch 2 (Tag 12-14). Angaben in Gramm.

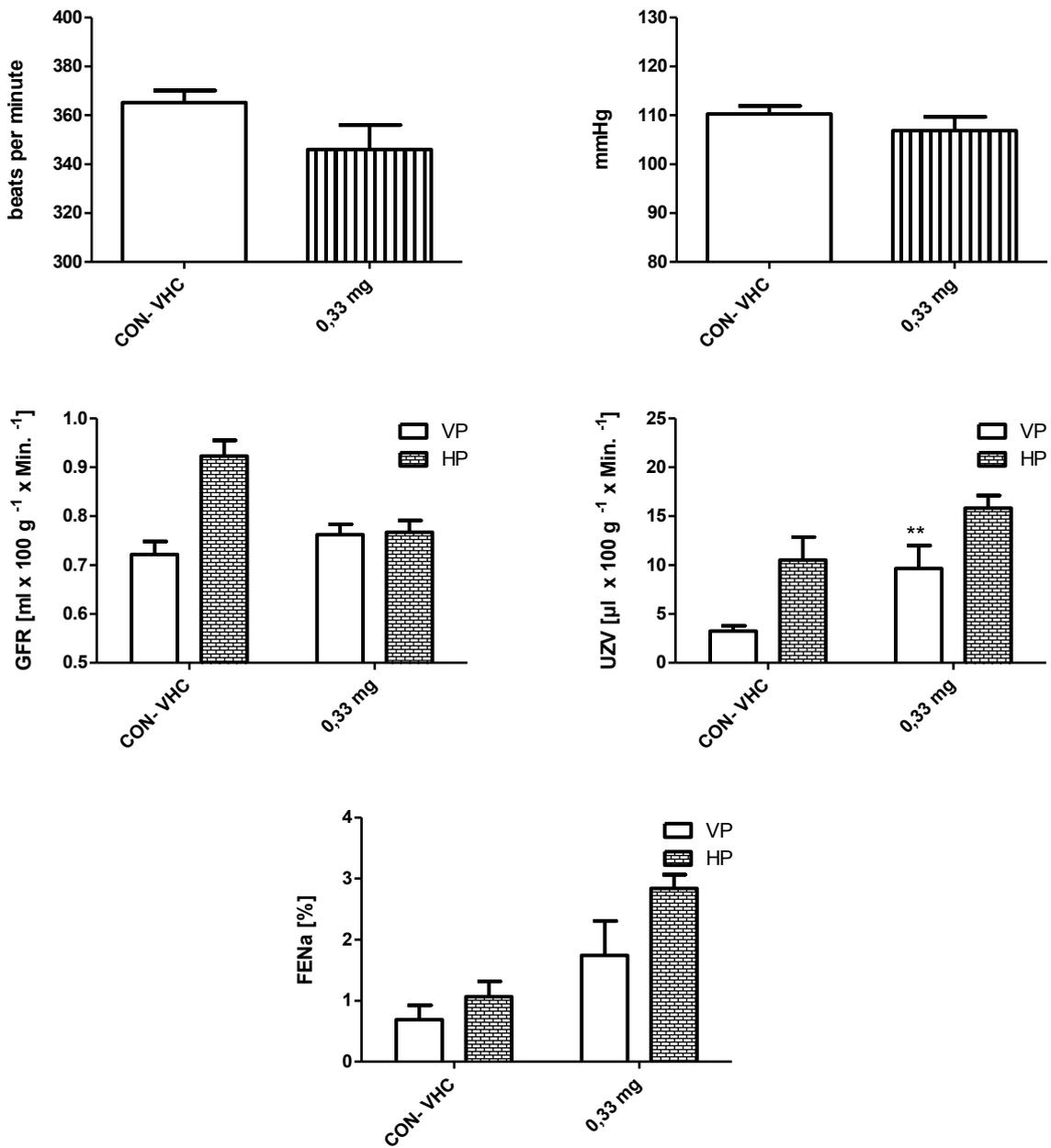


Abb. 3.9.: Vital- und Nierenparameter bei Kontrolle und Therapie mit A- 437203.33

**) $p < 0,01$ one- way ANOVA mit Bonferroni's posttest versus CON- VHC

4. DISKUSSION

4.1 *Aminosäurebedingte Hyperfiltration und Hemmung mittels Dopamin D3-Rezeptorantagonisten*

Eine Steigerung der glomerulären Filtrationsrate nach Proteinzufuhr ist seit Jahrzehnten bekannt und konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen reevaluiert werden. So führte eine Aminosäuregabe zunächst bei Hunden [Shannon et al. 1932], später auch bei Ratten, wie in unserer Untersuchung, und auch bei Menschen zu einer Hyperfiltration [Castellino et al. 1986, Luippold et al. 2001a].

Als fundamentaler Mechanismus dieser physiologischen Reaktion kommt eine Veränderung der glomerulären Arteriolen in Betracht, da die GFR insbesondere durch den hydraulischen Druck innerhalb des Glomerulums verändert werden kann. Das Renin- Angiotensin- Aldosteron- System (RAAS) wurde hierfür verantwortlich gemacht, da es als entscheidendes Regelsystem in die renale Vasomotorik eingreift. Da sich aber keine Veränderung der renalen Reaktion auf proteinreiche Nahrung nachweisen ließen, nachdem das RAAS mittels Captopril gehemmt bzw. durch Salzzufuhr aktiviert wurde, lässt dies vermuten, dass andere regulatorische Faktoren die Hauptrolle in der Induktion der Hyperfiltration spielen [Woods et al. 1993].

Die Beobachtung einer erhöhten Dopaminausscheidung im Urin (U_{DAV}) nach Aminosäureinfusion und die Möglichkeit der Auslösung einer Hyperfiltration durch Dopamingabe liess einen Zusammenhang dieser Phänomene vermuten. Diese Hypothese wurde durch die Beobachtung gestärkt, dass die aminosäurebedingte Hyperfiltration durch die Zufuhr von Benserazid (einem DA- Synthesehemmer) und den Dopaminantagonisten S(-)- Sulpirid aufgehoben wird [Mühlbauer et al., 1994b]. Nachfolgende Untersuchungen mit der Gabe von L- Dopa ließen zwar die U_{DAV} ansteigen, eine Hyperfiltration setzte aber nicht ein [Mühlbauer et al. 1997c]. Dies zeigte, dass tubulär gebildetes Dopamin nicht an der renalen Hämodynamik und somit Auslösung einer Hyperfiltration beteiligt ist, sondern vielmehr ein möglicher Eliminationsweg von Dopaminvorstufen darstellt. Neuronales Dopamin macht zwar nur einen Bruchteil der renalen Gesamtmenge aus [Baines et al, 1982], spielt aber

möglicherweise eine wichtige Rolle in der Vermittlung der AS- bedingten Hyperfiltration, da diese nach Denervation der Nerven im Tiermodell nicht auslösbar war [Mühlbauer et al., 1997a].

Auf der Suche nach dem verantwortlichen Dopaminrezeptor- Subtyp für die Vermittlung der aminosäurebedingten Hyperfiltration gab es Hinweise auf den Dopamin D2- Rezeptor, der unter anderem durch S(-)- Sulpirid antagonisierbar ist. Neben den Ergebnissen der Arbeitsgruppen um Luippold & Mühlbauer wurden vergleichbare Ergebnisse in Bezug auf die Unterdrückung der AS- Hyperfiltration durch S(-)- Sulpirid in der Arbeitsgruppe um Méndez gefunden. Auch bzgl. der Denervation fanden sich entsprechende Ergebnisse. Ein D1- Rezeptorantagonist beeinflusste die Reaktion auf Aminosäuregabe hingegen nicht [Méndez et al., 1991]. Diese Daten sprechen also ebenfalls für die Beteiligung der D2- like Dopaminrezeptoren.

Zur Gruppe der D2- like Dopaminrezeptoren gehören neben dem Dopamin D2- Rezeptor auch die D3- und D4- Dopaminrezeptoren [Missale et al., 1998]. Die Tatsache, dass S(-)- Sulpirid auch Affinität zu anderen Dopaminrezeptoren hat [Levant et al. 1997] führte zu weiteren Untersuchungen mit weiteren Dopaminrezeptorantagonisten bzw. knockout Tieren. Bei den weiteren Arbeiten wurde insbesondere die Blockade der Dopamin D3- Rezeptor näher untersucht. Es gibt Hinweise, dass die Vermittlung der aminosäurebedingten Hyperfiltration auf den Dopamin D3- Rezeptor zurückzuführen ist, da sich mittels einem D3- Rezeptoragonist (7-OH-DPAT) eine GFR- Steigerung induzieren ließ, die mittels D3- Rezeptorantagonist U-99194A wiederum antagonisierbar war [Luippold et al. 1998]. Des Weiteren war eine GFR- Steigerung durch Aminosäuregabe bei D3- knockout Mäusen nicht möglich [Luippold et al., 2000 & 2006]. Diese Beobachtungen sprechen für eine wesentliche Beteiligung des D3- Rezeptors an der glomerulären Hyperfiltration durch Aminosäuren.

Fraglich ist weiterhin, ob renale, zentrale oder beide Dopamin D3 Rezeptorlokalisationen für die Regulation der Hyperfiltration verantwortlich sind. In dieser Arbeit wurde zunächst ein älterer Dopamin D3- Rezeptorantagonist (A-

437203.33) in seiner Wirksamkeit der Unterdrückung der AS- Hyperfiltration überprüft. Die Substanz ist ein Abkömmling der Substanz BSF 201640, die in vorhergehenden Untersuchungen eine fast vollständige Unterdrückung des GFR-Anstiegs in der Hauptperiode zeigte [Daten aus der eigenen Arbeitsgruppe]. Danach kamen drei neuere Substanzen (A- 901394.1/ 962424.1/ 956028.1), allesamt periphere Dopamin D3- Rezeptorantagonisten, zum Einsatz. Die neueren Substanzen wurden in verschiedenen Dosen verabreicht um eine Dosis- Wirkungs- Beziehung herstellen zu können.

In der Zeitkontrolle (CON-ZK) für die Experimente war ein stabiler Versuchsablauf zu beobachten. Die Kreislauf- und Nierenparameter blieben über die Zeit konstant. Somit konnten Zeiteffekte innerhalb der Experimente ausgeschlossen werden.

Die Applikation 10%iger Aminosäurelösung bei gesunden, nicht behandelten Versuchstieren in der Hauptperiode, führte zu einem GFR- Anstieg in etwa gleicher Höhe, wie er bereits in früheren Untersuchungen [u.a. Luippold, 1998] nachgewiesen werden konnte. Die Erhöhung der GFR ist somit sicher auf die Gabe der Aminosäurelösung zurückzuführen, da kein anderer Umstand in Frage kommt. Neben dem GFR- Anstieg kam es ebenfalls zu einem Anstieg des Urinzeitvolumens und der fraktionellen Natriumexkretion. Diese Beobachtungen decken sich mit vorhergehenden Untersuchungen [Mühlbauer et al. 1997b/c], wobei die starke Steigerung des Urinzeitvolumens nicht ausschließlich durch eine Erhöhung der GFR erklärt werden kann. So könnte eine vermehrte Dopaminsekretion in den Nieren eine Interaktion mit tubulären Dopaminrezeptoren hervorrufen, die wiederum eine natriuretische Wirkung entfalten.

Durch die Applikation der unterschiedlichen Dopamin D3- Rezeptorantagonisten konnte die GFR- Erhöhung in der Hauptperiode dosisabhängig abgeschwächt werden. In der Höchstdosis jedes der drei Medikamente kam es zu einer nahezu vollständigen Aufhebung der GFR- Erhöhung durch Aminosäuregabe. Die Potenz der Substanzen, abgeleitet von der kalkulierten ED50, war A- 962424.1 > A- 956028.1 > A- 901394.1.

Die unterschiedlich starken Wirkungen der einzelnen Substanzen könnten neben der Affinität zum D3- Rezeptor auch von der ZNS-Gängigkeit abhängen. In einer Beobachtung mit D2- Rezeptorantagonisten zeigte sich eine stärkere Hemmung der AS- Hyperfiltration durch zentral wirksame Dopaminantagonisten [Luippold et al. 1998a]. Das Urinzeitvolumen stieg bei den Tieren unter D3- Rezeptorantagonisten-Therapie etwa nur halb so stark an, wie bei den nicht therapierten Tieren. Die fraktionelle Natriumexkretion stieg hingegen etwas stärker an als bei den nicht behandelten Tieren. Als möglicher Erklärungsansatz für das geringere UZV kommt hier eine geringere Steigerung der Primärharnbildung bei verminderter GFR-Zunahme in Frage. Die Steigerung der FENa hingegen könnte auf der Blockade tubulärer Dopamin D3- Rezeptoren beruhen, die zu einer gesteigerten Natriumexkretion führen würde.

4.2. Veränderungen von Kreislaufparametern durch Dopamin D3- Rezeptorantagonisten

Dopamin als klassisches Sympathomimetikum wirkt unter anderem positiv chronotrop. Bei einer hohen Dosierung eines Antagonisten könnte es somit zu einer Bradykardie kommen. In den von uns durchgeführten Experimenten waren Herzfrequenz und der mittlere arterielle Blutdruck der Versuchstiere in der Gruppe der Tiere, die A- 901394 erhielten, signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Bei der Interpretation der Ergebnisse scheint es einen dosisabhängigen, supprimierenden Effekt auf diese Parameter zu geben. Diese Veränderungen konnten bei den Substanzen A- 962424 und A- 956028 nicht beobachtet werden.

Der zugrunde liegende Mechanismus der kreislaufdepressiven Wirkung von A- 901394 könnte einerseits auf substanzspezifische Mechanismen zurückzuführen sein, die nichts mit der antidopaminergen Wirkung am Dopamin D3- Rezeptor zu tun haben, wie z.B. Veränderungen an Ionenkanälen oder ähnlichem. Andererseits könnte es sich bei dieser Beobachtung um antidopaminerge Wirkungen an anderen Dopaminrezeptoren handeln, die auf einer geringeren Selektivität im Vergleich zu den anderen Prüfsubstanzen zurückzuführen sein könnte.

Eine Auswirkung der negativen Kreislaufwirkung durch A- 901394 auf die Ergebnisse, insbesondere der GFR, ist jedoch unwahrscheinlich, da die erhobenen Parameter für Herzfrequenz und mittlerem arteriellem Druck zwar geringer als in der Kontrollgruppe sind, jedoch für die Versuchstiere eher im unteren Referenzbereich anzusiedeln sind und so eine Beeinflussung der anderen Parameter unwahrscheinlich ist.

4.3. Vergleich der einzelnen Wirkstoffe

Vergleicht man die Ergebnisse bezüglich der Potenz der einzelnen Substanzen in Bezug auf den hemmenden Effekt der GFR- Steigerung nach Aminosäureinfusion, so stellt man fest, dass – ausgehend von der verwendeten intravenösen Dosis – die Substanz A- 962424.1 mit einer errechneten ED50 von etwa $0,15 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min.}^{-1}$ am potentesten ist. Der Wirkstoff A- 956028.1 hat eine errechnete ED50 von etwa $0,40 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min.}^{-1}$. Am schwächsten war die Wirkung von A- 901394.1. Die ermittelte ED50 lag hier bei etwa $3,34 \text{ mg} \times \text{kg}^{-1} \times \text{min.}^{-1}$. Setzt man zudem die erhobene Plasmakonzentration in Bezug zur relativen Inhibition der AS- bedingten Hyperfiltration, so scheinen die Substanzen A- 901394.1 und A-956028.1 bei gleichem Plasmaspiegel eine etwa gleiche Wirkung zu entfalten. Auch bei der Betrachtung des Plasmaspiegels scheint A- 962424.1 eine höhere Potenz zu besitzen.

Als Ursache der deutlich unterschiedlichen intravenösen Dosierungen werden unterschiedliche pharmakokinetische Eigenschaften angenommen. So könnte insbesondere die Plasmaproteinbindung und raschere Elimination für deutlich höhere Dosierungen von A- 901394.1 verantwortlich sein. Aus pharmakodynamischer Sicht scheinen die Substanzen A- 901394.1 und A-956028.1 eine nahezu gleiche Potenz zu haben. Die höhere Potenz von A- 962424.1 könnte durch eine höhere Affinität am Dopamin D3- Rezeptor erklärt werden.

In der erwarteten ED 50 zeigte keines der Medikamente einen kreislaufdepressiven Effekt per se, wobei die Substanz A- 901394.1. in höherer Dosierung zur Verlangsamung der Herzfrequenz und Erniedrigung des Blutdrucks führte. Diese Effekte ließen sich bei den anderen beiden Substanzen nicht finden.

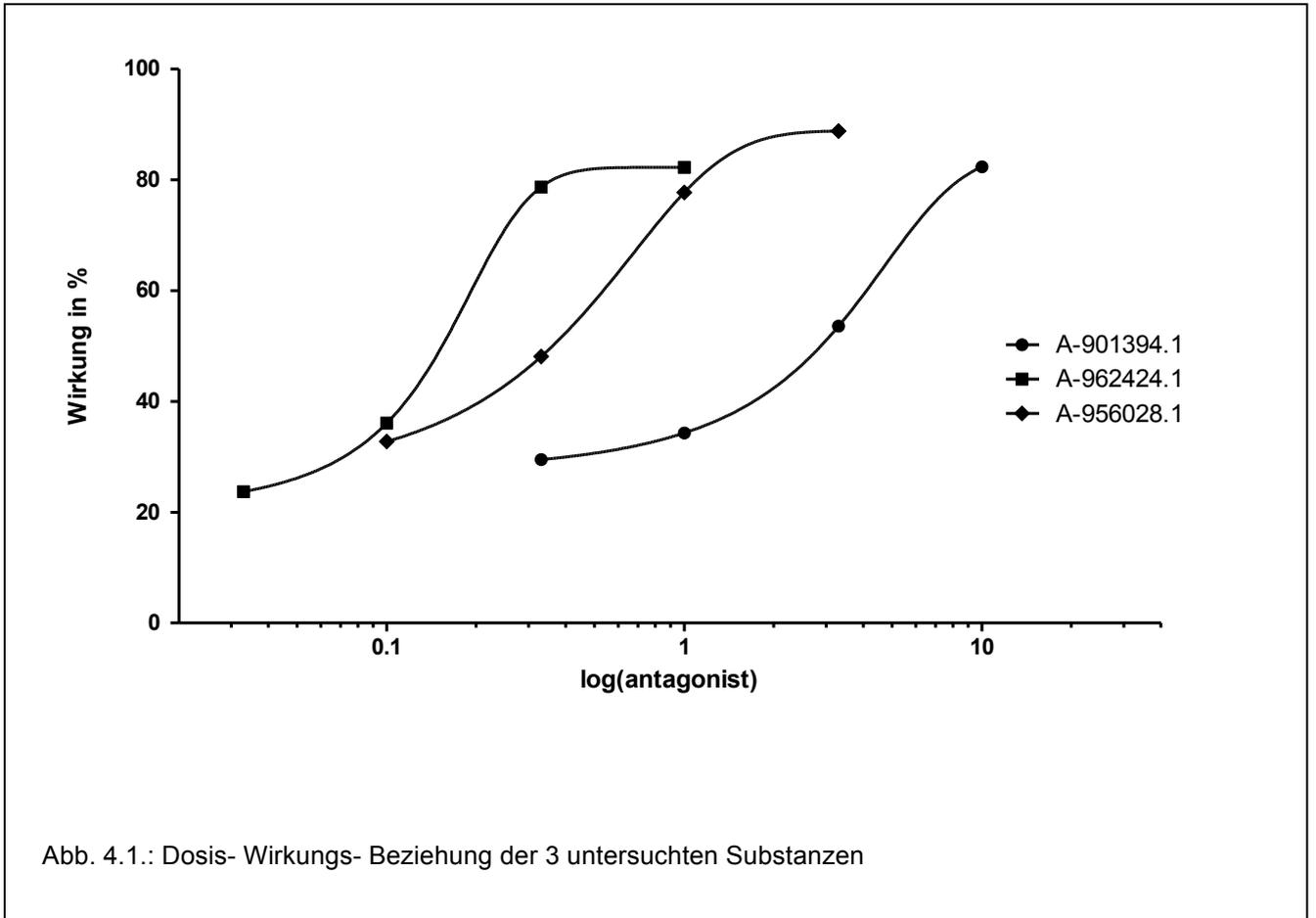


Abb. 4.1.: Dosis- Wirkungs- Beziehung der 3 untersuchten Substanzen

4.4. Diabetes mellitus Modell und Veränderung metabolischer Variablen

Der mittels Streptozotocin (STZ) induzierte Diabetes mellitus ist ein etabliertes Verfahren zur Diabetesinduktion bei Versuchstieren. Das ursprünglich als Antibiotikum entwickelte STZ, generiert durch *Streptomyces achromogenes*, induziert den Diabetes mellitus durch Zerstörung der β - Zellen des Pankreas. Dies entspricht im Pathomechanismus dem menschlichen autoimmunen Diabetes mellitus Typ 1.

Nach Diabetes mellitus Induktion kommt es zu Hyperglykämie, Polydipsie, Polyurie und Hyperphagie. Diese Veränderungen wurden von diversen Autoren beschrieben [u.a. Akbarzadeh et al., 2007]. Die Induktion von Diabetes mellitus mittels STZ stellt auch für die Untersuchung der diabetischen Nephropathie ein geeignetes Modell dar. Diverse Untersuchungen mit Diabetes mellitus Typ 1 Versuchstieren nutzen dieses Induktionsverfahren. Es scheint keine direkt nephrotoxische Wirkungen von STZ zu geben, so dass die renalen Veränderung durch die pathophysiologischen Mechanismen des Diabetes mellitus entstehen [Yokozawa et al. 2001; Junod et al. 1967].

In einer weiteren Untersuchung fanden sich hingegen Hinweise darauf, dass STZ die Proteinbarriere beeinträchtigen und so eine Messung von Albuminurie mit zweifelhaftem Charakter erzeugen könnte [Palm et al., 2004]. Die Dosis des STZ korreliert eng mit der diabetogenen Wirkung. In geringer Dosis manifestiert sich kein Diabetes, sondern lediglich eine geringe Hyperglykämie. Bei sehr hohen Dosen (bei Ratten > 200 mg/kg KG) kommt es durch den absoluten Insulinmangel rasch zum Tod der Versuchstiere, wenn nicht eine adäquate Insulinsubstitution vorgenommen wird. In mittleren Dosen lässt sich eine diabetische Stoffwechsellage erzeugen, die auch mittelfristig keiner dauerhaften Insulintherapie bedarf [Junod et al. 1969; Steiner et al. 1970].

In der durchgeführten Untersuchung wurde eine mittlere STZ- Dosis von 60 mg/ kg KG intraperitoneal verabreicht. Im Verlauf der Experimente kam es zu einem Anstieg der Blutglucose auf Werte um 460 mg/ dl, ohne das die Tiere einer Insulintherapie bedurften. Nach Diabetes mellitus Induktion konnten nahezu gleiche Ergebnisse in

Bezug auf Veränderung des Flüssigkeits- und Nahrungsmittelkonsums bzw. der Urinausscheidung und des Gewichtverlaufes beobachtet werden, wie in anderen Untersuchungen in der Vergangenheit [Akbarzadeh et al., 2007, Tomlinson et al., 1992]. Das Ziel der Diabetes mellitus- Induktion, nämlich die Erzeugung einer glomerulären Hyperfiltration, die durch die orale Gabe von A- 901394.1 beeinflusst werden sollte, konnte so sichergestellt werden.

4.5. Hemmung der diabetischen Hyperfiltration mittels Dopamin D3- Rezeptorantagonisten

In der Frühphase der Diabetischen Nephropathie (Stadium 1 nach Mogensen [Mogensen, 1987; Mogensen et al., 1995]) kommt es zu einer glomerulären Hyperfiltration. Diese konnte in mehreren tierexperimentellen Untersuchungen schon kurz nach Diabetes- Induktion mittels STZ beobachtet werden. Rund 25 % der Typ 1 Diabetikern und ein nicht definierter Anteil der Typ 2 Diabetikern zeigt ebenfalls eine Hyperfiltration in den frühen Krankheitsjahren [Jones et al., 1995]. Unter der Annahme, dass dieses Phänomen ein früher Mechanismus der beginnenden strukturellen renalen Schädigung ist, könnte eine pharmakologische Intervention zu diesem Zeitpunkt im besten Falle eine komplette Protektion der Nierenanatomie, mindestens aber eine Progressionsverlangsamung der diabetischen Nephropathie bewirken.

Neben vielen diskutierten Mechanismen der Entstehung einer Hyperfiltration, haben diverse Untersuchungen das dopaminerge System als einen möglichen Regulator dieses Pathomechanismus identifiziert. Unterstützt wurde dies durch die Beobachtung, dass es innerhalb der Mesangiumzellen, die für die intraglomeruläre Vasomotorik mitverantwortlich sind, durch Diabetes zu einer erhöhten Konzentration von Dopamin und Noradrenalin kam [Marco et al. 2008]. Neben dem dopaminergen System kommen für diese Veränderung auch das RAAS und Endothelinsystem als mögliche vasoaktive Faktoren in Frage.

Die strukturellen Veränderungen im Krankheitsprozess werden wiederum von unterschiedlichen metabolischen Faktoren bestimmt [Barton, 2010, Turgut, 2010].

Auch bei der diabetischen Hyperfiltration scheint die renale Innervation von Bedeutung zu sein. So blieb bei denervierten Versuchstieren eine diabetische Hyperfiltration aus. Auch diabetesbedingte histologische Veränderungen konnten nach Denervation nicht mehr beobachtet werden [Luippold et al., 2000].

Eine aktuelle Arbeit mit dem Vergleich von ACE- Hemmer- Gabe und Dopamin D3- Rezeptorantagonisten-Behandlung oder deren Kombination, deutet an, welches therapeutische Potenzial D3- Rezeptorantagonisten besitzen könnten. Gross et al. konnten bei einer 6 monatigen Verabreichung von Trandolapril (ACE- Hemmer) vs. A- 437203 (D3- RA) quantitativ nahezu gleiche Endpunktverbesserungen in Bezug auf glomerulosclerosis damage index, Albuminurie, glomeruläres Volumen und Desminexpression nachweisen [Gross et al., 2006]. Neben der diabetischen Hyperfiltration auf der einen Seite kommt es auf der anderen Seite typischerweise zu einer Verminderung der funktionellen renalen Reserve. Diese sonst physiologische Reaktion (z.B. AS- bedingte Hyperfiltration oder Dopamininfusion) ist bei Diabetikern mit Hyperfiltration bzw. manifester diabetischer Nephropathie abgeschwächt [Amiel et al., 1991, Raes et al.2007].

In dieser Untersuchung wurde 14 Tage nach STZ- Induktion eines Diabetes ein Clearanceexperiment durchgeführt. In der Vehikel-behandelten diabetischen Kontrollgruppe (DM-VHC) konnte im Clearanceexperiment eine diabetische Hyperfiltration nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den nicht erkrankten Tieren war die basale GFR rund 25 % höher. Nach Applikation von 10 %iger Aminosäurelösung kam es nur noch zu einem geringen Anstieg der GFR, des Urinzeitvolumens und der fraktionellen Natriumexkretion, wobei das in der Vorperiode gemessene Urinvolumen deutlich höher war als bei nicht erkrankten Tieren. Das basal erhöhte Urinzeitvolumen passt zu den allgemein gültigen Beobachtungen einer Polyurie bei Diabetes mellitus. Das Unvermögen der Nieren, auf eine Aminosäuregabe mit einer adäquaten GFR- Steigerung zu antworten kann als Zeichen einer insuffizienten funktionalen renalen Reserve angesehen werden [Amiel et al., 1991].

Die orale Behandlung der Tiere mit dem D3- Rezeptorantagonisten A- 901394.1 bewirkte bei der Dosis von 10 mg / kg am Tag zwar keine Verhinderung der diabetischen Hyperfiltration, es kam jedoch nach Aminosäuregabe zu einem signifikanten GFR- Anstieg. UZV- und FENa- stiegen ebenfalls an. Dies spricht für eine verbesserte funktionelle renale Reserveleistung. Die basale GFR in der Dosisgruppe 30 mg betrug gleiche Werte, wie man sie bei gesunden Tieren erwarten würde. Nach Aminosäuregabe kam es zu einem Anstieg der GFR nahe dem von gesunden Tieren. Das Urinzeitvolumen war in den Vorperioden geringer als bei den nicht therapierten Tieren und steigerte sich signifikant nach AS- Applikation. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die Hemmung der Dopamin D3- Rezeptoren mit entsprechenden Antagonisten einerseits die Initiierung einer diabetischen Hyperfiltration unterdrückt und andererseits die funktionelle renale Reserveleistung wiederherstellt.

4.6. Albuminurie im Stoffwechselkäfigversuch

Nach diabetesbedingter Schädigung der Glomerula kommt es schon vor dem Auftreten einer Mikroalbuminurie zu einer Hyperfiltration. Der Nachweis dieser korreliert mit der Manifestationswahrscheinlichkeit einer diabetischen Nephropathie [Rudberg et al. 1992]. Die im weiteren Verlauf der diabetischen Nephropathie auftretende Mikroalbuminurie gilt ebenfalls als Prädiktor einer sich klinisch manifestierenden Nephropathie [Mogensen et al., 1987]. Hierbei spricht man beim Menschen von einer Mikroalbuminurie bis zu einer Ausscheidung von 300 mg pro Tag. Bei Typ 1 Diabetikern findet man in den ersten drei Jahren nach Diagnosestellung bei 6 % eine Mikroalbuminurie, nach 20 Jahren beträgt die Nachweisrate schon 50 % [Warram et al., 1996].

Typ 2 Diabetiker zeigen unabhängig vom Zeitpunkt der Erhebung in etwa einem Viertel eine Mikroalbuminurie [Mogensen et al., 1994]. Der genaue Mechanismus, welcher einer Mikroalbuminurie zugrundeliegt ist bisher nicht genau bekannt. Ursächlich muss von einer veränderten Filterbarriere der Glomerula ausgegangen werden. Diese gestörte Filterfunktion könnte auf einer Überbeanspruchung bei dauerhaft erhöhter hämodynamischer Beanspruchung zurückzuführen sein [Keane et

al., 1990]. Eine neuerer Übersichtsarbeit macht hingegen eine gestörte Glykokalix für die Barrierestörung verantwortlich [Satchell et al., 2008]. Die Glykokalix ist eine proteinreiche, dem Endothel aufliegende Schicht, die unter anderem den kolloidosmotischen Druck des Intravasalraumes aufrechterhält und bei Diabetes mellitus chronisch alteriert sein könnte.

In den Stoffwechselläufigversuchen dieser Studie, eine und zwei Wochen nach Induktion des Diabetes, kam es in der nicht behandelten Diabetes- Gruppe (DM-VHC) zu einer knapp signifikanten Erhöhung der Albuminausscheidung im Sammelurin. Dieses konnte bei den behandelten Tieren in keiner der beiden Dosisgruppen beobachtet werden. Das fehlende Signifikanzniveau beruht entweder auf einer zu geringen Fallzahl oder auf einem zu kurzen Beobachtungszeitraum. Diese Beobachtung stützt die Hypothese, dass Dopamin D3- Rezeptorantagonisten die Albuminexkretion vermindern können. In der Arbeit von Gross et al., die auf einen längeren Beobachtungszeitraum angelegt war, konnte eine Normalisierung der Albuminurie bei D3- RA- Therapie beobachtet werden, die sich mit unseren Ergebnissen deckt [Gross et al., 2006].

4.7. *Veränderungen metabolischer Variablen*

Nach Manifestation eines Diabetes mellitus kommt es zu klinischen Beobachtungen, die sich durch eine erhöhte Blutglucosekonzentration bzw. intrazellulären Glucosemangel erklären lassen. So ist eine Polyurie, Polydipsie und Hyperphagie typisch für das Bild des Diabetes mellitus.

Diese Veränderungen konnten in der durchgeführten experimentellen Serie genauso reproduziert werden. Interessanterweise war das Trinkvolumen bei den Tieren unter A- 901394.1- Therapie hochsignifikant geringer als das der unbehandelten Kontrolle. Beide Dosisserien zusammengenommen war auch das Urinvolumen leicht gegenüber der Diabetes- Kontrollserie vermindert. Eine gleiche Beobachtung machte die Arbeitsgruppe um Luippold, wobei hier auch die Verminderung der Urinausscheidung Signifikanzniveau erreichte [Luippold 2005].

4.8. Veränderungen von Kreislaufparametern unter Diabetes mellitus und durch Behandlung mit A-901394

Die gemessene Herzfrequenz war in der diabetischen Kontrollgruppe signifikant geringer als in der gesunden Kontrollgruppe. Die mit A- 901394 behandelten diabetischen Tiere zeigten hingegen keine Änderung im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe. Ähnliche Ergebnisse in Bezug auf eine geringere Herzfrequenz bei diabetischen Versuchstieren, die ebenfalls Signifikanzniveau erreichte, fand sich in der Arbeit von Pfeil et al. [Pfeil et al., 2006]. Diese Beobachtung könnte mit einer geringeren Toleranz gegenüber Narkosemedikamenten bei erkrankten Tieren erklärt werden. Ein negativ chronotroper Effekt von A- 901394, der nach den Dosisfindungsexperimenten beobachtet wurde, konnte bei den verwendeten, oral applizierten Dosen nicht beobachtet werden.

Der mittlere arterielle Druck war in der Dosisgruppe 10 mg A- 901394 signifikant geringer als bei den Vergleichsgruppen. Das Medikament als Ursache hierfür anzusehen ist jedoch nicht plausibel, da es in der Gruppe mit der dreifachen Tagesdosis zu keinerlei Veränderungen des Mitteldrucks in den Clearanceexperimenten kam.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Diabetes mellitus ist die weitaus häufigsten metabolische Erkrankung der zivilisierten Welt. Die Inzidenz wird in den nächsten Jahrzehnten weiter zunehmen. Eine bedeutsame Diabetes- assoziierte Komplikation ist die Diabetische Nephropathie, die schon heute der häufigste Grund für eine Nierenersatztherapie in westlichen Ländern ist.

In der frühen Phase der Diabetischen Nephropathie kommt es pathophysiologisch zu einer glomerulären Hyperfiltration, die als unabhängiger Risikofaktor für strukturelle Nierenveränderungen angesehen wird.

Unter dieser Annahme, könnte eine pharmakologische Unterdrückung dieses Phänomens als Therapieoption von Bedeutung sein. Nach Aminosäuregabe kommt es bei Gesunden zu einer physiologischen Hyperfiltration. Der zugrundeliegende Mechanismus könnte dem der pathophysiologischen Veränderungen bei Diabetes mellitus ähneln.

Frühere Arbeiten haben gezeigt, dass die Dopamin D3- Rezeptoren an diesem physiologischen Mechanismus beteiligt sind und dass sie auch bei der pathologischen Hyperfiltration eine Rolle spielen könnten.

Fragestellung dieser Arbeit ist es, in wie fern sich die physiologische Hyperfiltration mittels Gabe von verschiedenen Dopamin D3- Rezeptorantagonisten unterdrücken lässt und ob sich diese Hemmung auch an einem Tiermodell des Diabetes mellitus nachweisen lässt.

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden zwei experimentelle Serien durchgeführt. Zunächst wurde an narkotisierten Sprague- Dawley Ratten die physiologische Hyperfiltration als Reaktion auf Aminosäureapplikation ausgelöst und deren Beeinflussbarkeit durch drei selektive Dopamin D3- Rezeptorantagonisten untersucht. Zur GFR- Bestimmung wurde die Inulin-clearance erhoben.

In der zweiten Serie erfolgt die subchronische orale Applikation der am weitesten experimentell erforschten Substanz an Sprague- Dawley Ratten, denen zuvor mittels Injektion von Streptozotocin ein Diabetes mellitus induziert worden war. Nach zweiwöchiger oraler Behandlung der Tiere schlossen sich zur Evaluation der Therapie Clearanceexperimente an.

In der ersten Serie konnte als physiologische Antwort auf eine Aminosäuregabe

ein GFR- Anstieg von 28 % beobachtet werden. Dieser Anstieg konnte mit allen drei Dopamin D3- Rezeptorantagonisten dosisabhängig signifikant abgeschwächt werden. Aus der Dosis- Wirkungs- Beziehung wurden die ED50 errechnet und durch massenspektrometrische Untersuchungen die dazugehörige Plasmaspiegel ermittelt.

Durch subchronische Behandlung von diabetischen Sprague- Dawley Ratten mittels einem der drei D3- Rezeptorantagonisten in Dosen im Bereich der ED50 konnte auch die diabetische Hyperfiltration gehemmt werden: Nicht- therapierte diabetische Tiere hatten im Vergleich zu gesunden Tieren eine 26 % höhere GFR. Behandelte Tiere zeigten in der höheren Dosisgruppe keine diabetische Hyperfiltration. Auch die in Stoffwechselfäfigversuchen erhobenen Albuminurie war in der behandelten Gruppe geringer ausgeprägt.

Die Gesamtheit der erhobenen Ergebnisse sprechen dafür, dass dem Dopamin D3- Rezeptor eine Schlüsselrolle bei der physiologische Hyperfiltration nach Aminosäuregabe und in der pathophysiologischen diabetischen Hyperfiltration zukommt. Die selektive Dopamin D3- Rezeptorblockade stellt somit eine vielversprechende neue Therapieoption der frühen Diabetischen Nephropathie dar.

6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A.	Arteria
Aa.	Arteriae
AA	Amino acid
AGE	advanced glycolsilated endproducts
AlbU	absolute Albuminausscheidung im Urin
ANP	atriales natriuretisches Peptid
AS	Aminosäure
BP	Basalperiode
Bq	Bequerel
CPM	Counts per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Diabetische Nephropathie
D3-RA	Dopamin D3- Rezeptorantagonisten
ESRD	end-stage renal disease
FRR	Funktionelle renale Reserve
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HF	Herzfrequenz
HR	heart ratio
HZV	Herzzeitvolumen
KG	Körpergewicht
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MP	Main period
RAAS	Renin- Angiotensin- Aldosteron- System
RP	Recovery period
SNGFR	Einzelnephron- GFR
STZ	Streptozotocin
TGF- β	transforming growth factor β
V.	Vena
Vv.	Venae

7. LITERATURVERZEICHNIS

- Akbarzadeh A, Norouzian D, Mehrabi MR, Jamshidi S, Farhangi A, Allah Verdi A, Mofidian SMA, Lame Rad B. Induction of diabetes by streptozotocin in rats. *Indian J of Clinical Biochemistry*, 2007; 22: 60-64
- Amiel C, Blanchet F, Friedlander G, Nitenberg A. The functional renal reserve. *Nephrologie* 1991; 12(2):55-61
- Barthelmebs M, Vailly B, Grima M, Velly J, Stephan D, Froehly S, Imbs J-L. Effects of dopamine prodrugs and fenoldopam on glomerular hyperfiltration in streptozotocin-induced diabetes in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18: 243-253
- Barthelmebs M, Mayer P, Thomas A, Grima M, Imbs JL. Pathophysiological role of dopamine in the kidney: effects in diabetes mellitus and after contralateral nephrectomy. *Hypertens Res.* 1995; 18 Suppl 1: 131-136
- Barton M. Therapeutic potential of endothelin receptor antagonists for chronic proteinuric renal disease in humans. *Biochimica et Biophysica Acta* 2010; 1802: 1203-1213
- Benninghoff, Drenckhahn D. *Anatomie - Band 1.* Urban & Fischer Verlag München 2003; 758-790
- Boyle J, Honeycutt A, Narayan K, Hoerger T, Geiss L, Chen H, Thompson T. Projection of Diabetes Burden Through 2050 – Impact of changing demography and disease prevalence in the U.S.. *Diabetes Care* 2001; 24: 1936-1940
- Brancati F, Whelton P, Randall B, Neaton J, Stamler J, Klag M. Risk of End-stage Renal Disease in Diabetes Mellitus - A Prospective Cohort Study of Men Screened for MRFIT. *JAMA* 1997; 278(23): 2069-2074
- Burney BO, Kalaitzidis RG, Bakris GL. Novel therapies of diabetic nephropathy. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2009; 18(2): 107-111
- Castellino P, Coda B, DeFronzo RA. Effect of amino acid infusion on renal haemodynamics in humans. *Am J Physiol* 1986; 251: F132-F140
- Deetjen P, Speckmann E-J. *Physiologie.* Urban & Fischer Verlag München 1999; 371-407
- Forbes JM, Fukami K, Cooper ME. Diabetic Nephropathy: Where Hemodynamics Meets Metabolism. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2007; 00: 1-16
- Frei U, Schomer-Halstenberg H. Nierenersatztherapie in Deutschland Bericht 2006/07. *Quasi Niere* 2008: 35

- Gross ML, Koch A, Mühlbauer B, Adamczak M, Ziebart H, Drescher K, Gross G, Berger I, Amann KU, Ritz E. Renoprotective effect of a dopamine D3 receptor antagonist in experimental type II diabetes. *Lab Invest* 2006; 86: 262-274
- Hasslacher C, Wolf G, Kempe P, Ritz E. Diabetische Nephropathie. *Diabetologie* 2008; 3 Suppl. 2: 143-146
- Hayashi M, Yasuyoshi Y, Kitajima W, Saruta T. Aromatic L-amino acid decarboxylase activity along the rat nephron. *Am J Physiol* 1990; 258: F28-F33
- Herold G. Herold Verlag Köln 2010; 685-712
- Jaffa AA, Rust PF, Mayfield RK. Kinin, a mediator of Diabetes- induced glomerular hyperfiltration. *Diabetes* 1995; 44: 156-160
- Jones SL, Viberti G. Renal functional reserve in subjects with diabetes mellitus. *Semin Nephrol* 1995; 15: 475-481
- Jose PA, Raymond JR, Bates MD, Aperia A, Felder RA. The renal dopamine receptors. *J Am Soc Nephrol* 1992; 2: 1265-1278
- Junod A, Lambert AE, Orci L, Pictet R, Gonet AE, Renold AE. Studies of the diabetogenic action of streptozotocin. *Proc Soc Exp Biol Med* 1967; 126: 201-205
- Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969; 48: 2129-2139
- Keane WF, Shapiro PE. Renal protective effects of angiotensin-converting enzyme inhibition. *Am J of Cardiology* 1990; 65: 491 – 531
- Kikkawa R, Kitamura E, Fujiwara Y, Arimura T, Haneda M, Shigeta Y. Impaired contractile responsiveness of diabetic glomeruli to angiotensin II: a possible indication of mesangial dysfunction in diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun.* 1986; 136 (3): 1185-1190
- Kobrin SM. Diabetic nephropathy. *Dis Mon* 1998; 44: 214-234
- Kuhlmann U, Walb D, Luft F. *Nephrologie - Pathophysiologie, Klinik, Nierenersatzverfahren.* Thieme Verlag Stuttgart 2003; 16-20, 136-141
- Lippert J, Ritz E, Schwarzbeck A, and Schneider P. The rising tide of endstage renal failure from diabetic nephropathy type II-an epidemiological analysis. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10: 462-467
- Laight DW. Therapeutic inhibition of the renin angiotensin aldosterone system. *Expert Opin Ther Pat.* May 21 2009

- Lee H, Manns B, Taub K, Ghali W, Dean S, Johnson D, Donaldson C. Cost analysis of ongoing care of patients with end-stage renal disease: The impact of dialysis modality and dialysis access. *American Journal of Kidney Diseases* 2002; 40: 611-622
- Lee MR. Dopamine and the kidney: 10 years on. *Clin Sci* 1993; 84: 357-375
- Löffler & Petrides. *Biochemie & Pathobiochemie*. Springer Verlag Berlin 2003; 853, 1069-1070
- Luippold G, Mühlbauer B. Dopamine D2 receptors mediate glomerular hyperfiltration due to amino acids. *J Pharm Exp Ther* 1998a; 286: 1248-1252
- Luippold G, Osswald H, Mühlbauer B. Renal effects of exogenous dopamine: modulation by renal nerves and dopamine receptor antagonists. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998b; 358(4): 445-451
- Luippold G, Küster E, Joos TO, Mühlbauer B. Dopamine D3 receptor activation modulates renal function in anesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1998c; 358: 690-693
- Luippold G, Küster E, Vallon V, Osswald H, Mühlbauer B. Dopamine D3 receptors in the rat kidney: glomerular and tubular actions. *Nephrol Dial Transplant* 1999a; 14 [Suppl 4]: 24-25
- Luippold G, Makri S, Osswald H, Mühlbauer B. Role of renal nerves in the dopamine D3 receptor-induced renal changes in anesthetized rats. *Pluegers Arch Eur J Physiol* 1999b; 437: R187
- Luippold G, Schneider S, Vallon V, Osswald H, Mühlbauer B. Postglomerular vasoconstriction induced by dopamine D3 receptor activation in anesthetized rats. *Am J Renal Physiol* 2000; 278: F570-F575
- Luippold G, Schneider S, Stefanescu A, Benöhr P, Mühlbauer B. Dopamine D2-Like receptors and amino acid-induced glomerular hyperfiltration in humans. *Br J Clin Pharmacol* 2001a; 51: 415-421
- Luippold G, Beilharz M, Mühlbauer B. Reduction of glomerular hyperfiltration by dopamine D2-like receptor blockade in experimental diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2001b; 16: 1350-1356
- Luippold G, Zimmermann C, Mai M, Kloor D, Starck D, Gross G, Mühlbauer M. Dopamine D3 receptors and salt-dependent hypertension. *J Am Soc Nephrol* 2001c; 12: 2272-2279
- Luippold G, Pech B, Schneider S, Osswald H, Mühlbauer B. Age dependency of renal function in CD-1 mice. *Am J Physiol* 2002a; 282: F886-F890
- Luippold G. Die Bedeutung der renalen Dopamin D3-Rezeptoren für die Physiologie und Pathophysiologie der Niere. Habilitation 2002b, Tübingen

- Luippold G, Beilharz M, Mühlbauer B. Chronic renal denervation prevents glomerular hyperfiltration in diabetic rats. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 342-347
- Luippold G, Beilharz M, Wehrmann M, Unger L, Gross G, Mühlbauer B. Effect of dopamine D3 receptor blockade on renal function and glomerular size in diabetic rats. *Naunyn-Schmiedberg's Arch of Pharm* 2005; (371) 5: 420-427
- Luippold G, Pech B, Schneider S, Drescher K, Müller R, Gross G, Mühlbauer B. Absence of amino-acid-induced glomerular hyperfiltration in dopamine D3 receptor knockout mice. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 2006; 372: 284-290
- Marco GS, Colucci JA, Fernandes FB, Vio CP, Schor N, Casarini DE. Diabetes induces changes of catecholamines in primary mesangial cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40 (4): 747-754
- Mathiesen ER, Hommel E, Hansen HP, Smidt UM, Parving H-P. Randomised controlled trial of long term efficacy of captopril on preservation of kidney function in normotensive patients with insulin dependent diabetes and microalbuminuria. *BMJ* 1999; 319: 24-25
- Missale C, Nash R, Robinson S, Jaber M, Caron M. Dopamine Receptors: From Structure to Function. *Physiol. Rev.* 1998; 78: 189-225
- Mogensen CE, Christensen CK. Predicting diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *N Engl J Med* 1984; 311: 89-93
- Mogensen CE. Early glomerular hyperfiltration in insulin-dependent diabetics and late nephropathy. *Scand J Clin Invest* 1986; 46: 201-206
- Mogensen CE. Microalbuminuria as a predictor of clinical diabetic nephropathy. *Kidney int.* 1987; 36: 673
- Mogensen CE. The effect of blood pressure intervention on renal function in insulin-dependent diabetes. *Diabete Metab.* 1989; 15 (5 Pt 2): 343-51
- Mogensen CE, Poulsen PL. Epidemiology of microalbuminuria in diabetes and in the background population. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1994; 3: 248-256
- Mogensen CE, Keane W, Bennett P. Prevention of diabetic renal disease with special reference to microalbuminuria. *Lancet* 1995; 346: 1080
- Mühlbauer B, Osswald H. Feeding-induced increase in urinary dopamine excretion is independent of renal innervation and sodium intake. *Am J Physiol* 1994a; 266: F563-F567
- Mühlbauer B, Hartenburg E, Osswald H. Renal response to amino acid infusion in rats: effect of dopamine receptor antagonists and benserazide. *Naunyn-Schmiedberg's Arch Pharmacol* 1994b; 349: 244-249

- Mühlbauer B, Spöhr F, Schmidt R, Osswald H. Role of renal nerves and endogenous dopamine in amino acid-induced glomerular hyperfiltration. *Am J Physiol* 1997a; 273: F144-F149
- Mühlbauer B, Gleiter CH, Gies C, Luippold G, Löschmann PA. Renal response to infusion of dopamine precursors in anaesthetized rats. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1997b; 356: 838-845
- Mühlbauer B, Mickeler C, Schenk F. Protein-induced increase in urinary dopamine in normal and diabetic rats: role of catecholamine precursors. *Am J Physiol* 1997c; 273: R80-R85,
- Mühlbauer B, Küster E, Luippold G. Dopamine D3 receptors in the rat kidney: role in physiology and pathophysiology. *Acta Physiol Scand* 2000; 168: 219-223
- Nürnberg A, Rübiger M, Mack A, Diaz J, Sokoloff P, Mühlbauer B, Luippold G. Subabical localization of the dopamine D3 receptor on proximal tubules of the rat kidney. *J Histochem Cytochem* 2004; 52(12'): 1647-1655
- Ortola FV, Ballermann BJ, Anderson S, Mendez RE, Brenner BM. Elevated plasma arterial natriuretic peptide levels in diabetic rats. Potential mediator of hyperfiltration. *J Clin Invest* 1987; 80(3): 670-674
- O'Connell DP, Vaughan CJ, Aherne AM, Botkin SJ, Wang ZQ, Felder RA, Carey RM. Expression of dopamine D3 receptor protein in the rat kidney. *Hypertension* 1998; 32: 886-895
- Palm F, Ortsater H, Hansell P, Liss P, Carlsson PO. Differentiating between effects of Streptozotocin per se and subsequent hyperglycemia on renal function and metabolism in the Streptozotocin-diabetic rat model. *Diabetes Metab Res Rev* 2004; 20: 452-459
- Pfeil K, Staudacher T, Luippold G. Effect of L-Dopa Decarboxylase Inhibitor Benserazid on Renal Function in Streptozotocin- Diabetic Rats. *Kidney Blood Press Res* 2006; 29: 43-47
- Raes A, Donckerwolcke R, Craen M, Hussein MC, Vande Walle J. Renal hemodynamic changes and renal functional reserve in children with type 1 diabetes mellitus. *Pediatr Nephrol*. 2007; 22 (11): 1903-1909
- Ratieken N, Ratieken ML, Nadkarni MV. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC 37917). *Cancer Chemother* 1963; 29: 91-98
- Rudberg S, Persson B, Dahlquist G. Increased glomerular filtration rate as a predictor of diabetic nephropathy - An 8-year prospective study. *Kidney International* 1992; 41: 822-828
- Satchell SC, Tooke JE. What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium?. *Diabetologia* 2008; 51: 714- 725

- Siegenthaler W, Blum HE. Klinische Pathophysiologie. Thieme Verlag Stuttgart 2006: 954
- Sokoloff P, Giros B, Martres MP, Andrieux M, Besancon R, Pilon C, Bouthenet ML, Souil E, Schwartz JC. Localization and function of the D3 dopamine receptor. *Arzneimittelforschung* 1992; 42: 224-230
- Soman S, Soman A. Diabetic Nephropathy, emedicine from WebMD, 2009
URL: <http://www.emedicine.medscape.com>
- Steiner H, Oelz O, Zahnd G, Froesch ER. Studies on Islet Cell Regeneration, Hyperplasia and Intra-islet Cellular Interrelations in Long Lasting Streptozotocin Diabetes in Rats. *Diabetologia* 1970; 6: 558-564
- Suzuki H, Nakane H, Kawamura M, Yoshizawa M, Takeshita E, Saruta T. Excretion and metabolism of dopa and dopamine by isolated perfused rat kidney. *Am J Physiol* 1984; 247: E285-E290
- Tomlinson KC, Gardiner SM, Hebden RA, Bennett T. Functional consequences of streptozotocin-induced diabetes mellitus, with particular references to the cardiovascular system. *Pharmacol Rev* 1992; 44 103-150
- Turgut F, Bolton WK. Potential New Therapeutic Agents for Diabetic Kidney Disease. *Am J of Kidney Diseases* 2010; 55: 928-940
- UK Prospective Diabetes Study Group. Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). *Lancet* 1998; 352(9131): 837-853
- United States Renal Data System – National Institutes of Health, 2009 Annual Data Report – Volume Two – Atlas of End-Stage Renal Disease in the United States, 192-193,
URL: http://www.usrds.org/2009/slides/indiv/INDEX_ESRD.HTML
- Van Loon GR, Sole MJ. Plasma dopamine: source, regulation and significance. *Metabolism* 1980; 29(Suppl. 1): 1119-1123
- Warram JH, Gearin G, Laffel L, Krolewski AS (1996) Effect of duration of type I diabetes on the prevalence of stages of diabetic nephropathy defined by urinary albumin/creatinine ratio. *J Am Soc Nephrol* 7:930–937
- Wenzel RR, Littke T, Kuranoff S, et al. Avosentan reduces albumin excretion in diabetics with macroalbuminuria. *J Am Soc Nephrol*. Mar 2009; 20(3): 655-664
- Yokozawa T, Nakagawa T, Wakaki K, Koizumi F. Animal model of diabetic nephropathy. *Experimental and Toxicologic Pathology*. 2001; 53(5): 359-363