

MODULATIONSMECHANISMEN RENALER NORADRENALINFREISETZUNG

Untersuchungen zur Rolle des präsynaptischen
 α_{2A} -Adrenozeptors

SINA HABEL



INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2007

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinärphysiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Joachim Roth

und

dem Zentrum für klinische Forschung der Ruhr-Universität Bochum
Experimentelle Nephrologie und Hypertensiologie
Betreuer: Prof. Dr. med. Lars-Christian Rump
Junior-Prof. Dr. med. Oliver Vonend

Modulationsmechanismen renaler Noradrenalinfreisetzung

Untersuchungen zur Rolle des präsynaptischen
 α_{2A} -Adrenozeptors

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Grades einer
Dr. med. vet.
beim Fachbereich der Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

Sina Habel

Tierärztin aus Iserlohn

Giessen 2007

**Mit Genehmigung des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

Dekan: Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter: Prof. Dr. J. Roth
Prof. Dr. L. C. Rump

Tag der Disputation: 01.06.2007

I Inhaltsverzeichnis

I	<i>Inhaltsverzeichnis</i>	5
II	<i>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</i>	10
III	<i>Verzeichnis der verwendeten Pharmaka</i>	12
IV	<i>Liste der Publikationen/ Poster</i>	13
1.	Einleitung	15
1.1	<i>Hintergrund und Zielsetzung der Studie</i>	15
1.2	<i>Allgemeine Blutdruckregulation</i>	16
1.2.1	<i>Blutdruckregulationsmechanismen</i>	16
1.3	<i>Rolle der Niere bei der Blutdruckregulation</i>	17
1.4	<i>Sympathische vasokonstriktorische Nervenfasern</i>	17
1.4.1	<i>Noradrenalin</i>	18
1.4.2	<i>Adenosin-Triphosphat</i>	21
2.	Methoden	23
2.1	<i>Versuchstiere und Versuchstierhaltung</i>	23
2.2	<i>Isoliert perfundierte Mausniere</i>	24
2.2.1	<i>Anästhesie der Mäuse</i>	24
2.2.2	<i>Präparation der Nieren</i>	24
2.3	<i>Bestimmung der renalen Druckantwort</i>	30
2.3.1	<i>Allgemeiner Versuchsablauf</i>	30
2.3.2	<i>Auswertung der Druckantworten</i>	30

2.3.3	Protokolle der Druckantworten.....	31
	<i>Protokoll 1: Dosis-Wirkungskurve nach Gabe von NA, Methoxamin und UK14,304 in aufsteigender Konzentration in den Nieren von α_{2A}-Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen</i>	<i>31</i>
	<i>Protokoll 2: Stimulation renaler Nerven mit 1–15 Hz bei α_{2A}-Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen</i>	<i>31</i>
	<i>Protokoll 3: Stimulation renaler Nerven mit 1-15 Hz und Applikation von Phentolamin und PPADS bei Wildtyp Mäusen</i>	<i>32</i>
	<i>Protokoll 4: Stimulation renaler Nerven mit 1 und 2 Hz und Applikation von Prazosin und Rauwolszin bei α_{2A}-Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen.....</i>	<i>32</i>
	<i>Protokoll 4.1: Konzentrationsfindung Prazosin für Protokoll 4</i>	<i>33</i>
	<i>Protokoll 4.2: Konzentrationsfindung Rauwolszin für Protokoll 4.....</i>	<i>34</i>
2.4	Bestimmung des Neurotransmitters Noradrenalin	35
2.4.1	Allgemeiner Versuchsablauf	35
2.4.2	Probenaufbereitung	36
2.4.3	Auswertung der Noradrenalin Freisetzung.....	37
2.4.4	Protokolle der Noradrenalin Bestimmung	39
	<i>Protokoll 5: Stimulation renaler Nerven bei α_{2A}-Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen mit 1-15 Hz und Messung der sympathischen Neurotransmission</i>	<i>39</i>
	<i>Protokoll 6: Stimulation renaler Nerven bei α_{2A}-Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen mit 5 Hz und Messung der sympathischen Neurotransmission mit und ohne Phentolamin.....</i>	<i>39</i>
	<i>Protokoll 7.1/ 7.2: Konzentrationsfindung Prazosin und Rauwolszin für Protokoll 4</i>	<i>40</i>

	<i>Protokoll 8: Stimulation renaler Nerven bei Wildtyp Mäusen mit 5 Hz und Messung der sympathischen Neurotransmission mit ATP, ohne und mit PPADS</i>	40
	<i>Protokoll 9: Stimulation renaler Nerven bei Wildtyp Mäusen mit 5 Hz und Messung der sympathischen Neurotransmission unter Einfluss verschiedener P₂ Agonisten und Antagonisten</i>	41
2.5	<i>Der renale Phänotyp der Wildtyp und α_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäuse</i>	42
2.5.1	<i>Die Subtotale Nephrektomie als Modell der chronischen Niereninsuffizienz</i>	42
2.5.2	<i>Blutdruck</i>	43
2.5.3	<i>Gewicht</i>	43
2.5.4	<i>Urinparameter.....</i>	43
2.5.5	<i>Blutentnahme und Serumparameter</i>	44
2.5.6	<i>Histologie.....</i>	45
2.6	<i>Geräte und Materialien</i>	46
2.6.1	<i>Materialien für die Tierhaltung.....</i>	46
2.6.2	<i>Isoliert perfundierte Niere und Noradrenalin Messung.....</i>	46
2.6.3	<i>Geräte zur Bestimmung des renalen Phänotyps.....</i>	48
2.6.4	<i>Verbrauchsmaterialien und Chemikalien.....</i>	49
2.7	<i>Statistik.....</i>	51
3.	<i>Ergebnisse</i>	52
3.1	<i>Tierzahlen und Geschlecht</i>	52

3.2	<i>Druckveränderungen und Neurotransmission bei α_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Tieren</i>	52
3.2.1	<i>Druckantworten bei α-Adrenozeptor Agonisten.....</i>	54
3.2.2	<i>Druckantwort der Nieren bei einer elektrischen Stimulation renaler Nerven.....</i>	56
3.2.3	<i>Neurotransmission nach Stimulation renaler Nerven mit 1-15 Hz</i>	57
3.2.4	<i>Neurotransmission nach Stimulation renaler Nerven mit und ohne α-Adrenozeptorblockade.....</i>	59
3.2.5	<i>Druckantwort nach Stimulation renaler Nerven mit 1-15 Hz nach einer Blockade von α- und P_2-Adrenozeptoren</i>	61
3.2.6	<i>Druckantwort nach Stimulation renaler Nerven mit 1 und 2 Hz nach einer Blockade von α-Adrenozeptoren</i>	63
3.2.7	<i>Neurotransmission nach Stimulation renaler Nerven nach einer Applikation von Adenosin-Triphosphat, ohne und mit P_2-Rezeptor Blockade</i>	70
3.2.8	<i>Neurotransmission nach Stimulation renaler Nerven mit 5 Hz nach einer Applikation verschiedener P_2 Agonisten und Antagonisten</i>	72
3.3	<i>Der renale Phänotyp der Wildtyp und α_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäuse</i>	72
4.	Diskussion	78
4.1	<i>Die Rolle der Niere bei der Blutdruckregulation</i>	78
4.2	<i>Therapie des Bluthochdrucks durch Suppression des Sympathikus.....</i>	78
4.3	<i>Der α_{2A}-Adrenozeptor</i>	79

4.4	<i>Das sympathische Nervensystem und seine Rezeptoren</i>	80
4.4.1	Identifizierung des α_{2A} -Adrenozeptors.....	80
4.4.2	Die Abhängigkeit der Effekte von Noradrenalin und Adenosintriphosphat von der Reizfrequenz.....	82
4.4.3	Der α_{2A} -Adrenozeptor als präsynaptischer inhibitorischer Heterozeptor.....	83
4.4.4	Der Effekt der sympathischen Überaktivität auf die renale Funktion	84
5.	Zusammenfassung	87
6.	Summary	88
7.	Literaturnachweis	89
8.	Danksagung	95
9.	Erklärung	96

II Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
NA	Noradrenalin
NPY	Neuropeptid Y
ADP	Adenosindiphosphat
ADH	Antidiuretisches Hormon
PPADS	Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate
UTP	Uridintriphosphat
UDP	Uridindiphosphat
KCl	Kaliumchlorid
Ca ²⁺	Calcium
Al ₂ O ₃	Aluminiumoxid
HCl	Salzsäure
DHBA	Dihydroxybenzylamin
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
H ₂ O	Wasser
NaHPO ₄	Natriumhydrogenphosphat-2-hydrat
NaOH	Natronlauge
Na	Natrium
Cl	Chlorid
K	Kalium
RNA	Ribonukleinsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
KO	Knockout
WT	Wildtyp
α	Alpha
β	Beta
C57 Black ₆	Wildtyp C57 Black6 Maus Stamm
A.	Arteria
DWK	Dosis-Wirkungs-Kurve
RNS	Renal nerve stimulation, renale Nervenstimulation
Rez	Rezeptor
RAS	Renin Angiotensin System
IS	Interner Standard
HPLC	High Performance Liquid Chromatography

PCR	Polymerase Chain Reaction
Pmax	maximaler Perfusionsdruck
Pbasal	basaler Perfusionsdruck
mmHg	mm Quecksilber
µl	Mikroliter
µMol, µM	Mikromol
pg	Pikogramm
g	Gramm
mg	Milligramm
kg	Kilogramm
ml	Milliliter
cm	Zentimeter
log	Logarithmus
n	Anzahl der Proben
EC50	Konzentration der halbmaximalen Wirkung
SEM	Standard Error of Mean
MW, mean	Mittelwert
SD	Standardabweichung
Hz	Herz
V	Volt
mA	Milliampere
Min	Minute
ms	Millisekunde
s	Sekunde
ca.	cirka
°C	Grad Celsius

III Verzeichnis der verwendeten Pharmaka

	α -Rez	P_2x -Rez	P_2Y -Rez
Agonisten	NA (nicht selektiv)	α/β -M-ATP	ADP
	Methoxamin (α_1)		UTP
	UK14,304 (α_2)		UDP
			2-M-Thio-ADP
			Suramin
Antagonisten	Phentolamin (nicht selektiv)	PPADS (nicht selektiv)	
	Prazosin (α_1)		
	Rauwolszin (α_2)		

IV Liste der Publikationen/ Poster

Abstracts/ Poster:

Regulation of Noradrenaline-Release in Isolated Perfused Kidneys of Wildtype- and α 2A-Adrenoceptor Knockout Mice

Habbel S, Vonend O, Stegbauer J, Hein L, et al.

Department of Nephrology, Marienhospital Herne, Klinikum der Ruhr-Universität Bochum,

* Department of Pharmacology, University of Würzburg, Germany

Presented 2004 on the ISN FOREFRONT CONFERENCE in Dresden

Norepinephrine-release in isolated perfused kidneys of wildtype and alpha 2a adrenoceptor KO-MICE

Habbel S, Stegbauer J, Hein L, et al.

J HYPERTENS 23: S239-S239 Suppl. 2 JUN 2005

Modulation of sympathetic neurotransmitter-release in kidneys of wildtype and alpha2A-adrenoceptor knockout mice

Vonend O, Stegbauer J, Habbel S, et al.

J HYPERTENS 22: S78-S79 Suppl. 2 JUN 2004

Angiotensin (Ang) II modulation of sympathetic neurotransmission involves nitric oxide (NO) in kidneys of AT2-knockout mice

Stegbauer J, Vonend O, Habbel S, et al.

J HYPERTENS 22: S183-S183 Suppl. 2 JUN 2004

ATP regulates renovascular resistance of isolated perfused mouse kidneys by activation of P2X and P2Y receptors

Stegbauer J, Habbel S, Rump LC, et al.

J HYPERTENS 22: S281-S281 Suppl. 2 JUN 2004

Complex interaction of extracellular nucleotides ATP and UTP in regulating renovascular resistance

Habbel S, Stegbauer J, Robaye B, et al.

HYPERTENSION 44 (4): 580-580 PE08 OCT 2004

Nitric oxide (NO) is involved in angiotensin (Ang) II induced modulation of sympathetic neurotransmission in kidneys of AT2-knockout mice

Stegbauer J, Vonend O, Habbel S, et al.

HYPERTENSION 44 (4): 581-581 PE12 OCT 2004

Publikationen (Web of Science):

Angiotensin II modulates renal sympathetic neurotransmission through nitric oxide in AT(2) receptor knockout mice

Stegbauer J, Vonend O, Habbel S, et al.

J HYPERTENS 23 (9): 1691-1698 SEP 2005

Alpha(2A)-adrenoceptors regulate sympathetic transmitter release in mice kidneys

Vonend O, Habbel S, Roth J et al.

BR J PHARMACOL 150 (1): 121-7 Nov 2006

1. Einleitung

1.1 Hintergrund und Zielsetzung der Studie

In der vorliegenden Arbeit liegt das Augenmerk auf dem sympathischen System und hier speziell auf dem α_{2A} -Adrenozeptor, einem wichtigen Regulator der Noradrenalin (NA) Freisetzung und damit des Blutdrucks. Man hatte schon zuvor erkannt, dass eine sympathische Überaktivität und eine erhöhte Noradrenalin Freisetzung eng mit einer Progression des Nierenversagens zusammen hängen (Rump, Amann et al. 2000). Deshalb sollte untersucht werden, ob es sich auch in der Niere tatsächlich um den α_{2A} -Adrenozeptor handelt, der sich in anderen Geweben als präsynaptischer autoinhibitorischer Rezeptortyp darstellt (Brede, Nagy et al. 2003). Es wird vermutet, dass dieser Rezeptor durch neuronal freigesetztes Noradrenalin aktiviert wird, so zu einem negativen Feedback führt und als Kontrollmechanismus dient. Zudem gab es Hinweise, dass der Rezeptor auch in der Lage ist, die Freisetzung des sympathischen Cotransmitters Adenosintri-phosphat (ATP) zu beeinflussen. Es könnte sogar sein, dass ATP selbst auf präsynaptisch wirkende putative P_2 -Rezeptoren einwirkt, die dann als Heterozeptoren die NA Freisetzung modulieren. Eine hypothetische Darstellung zeigt Abbildung 1.

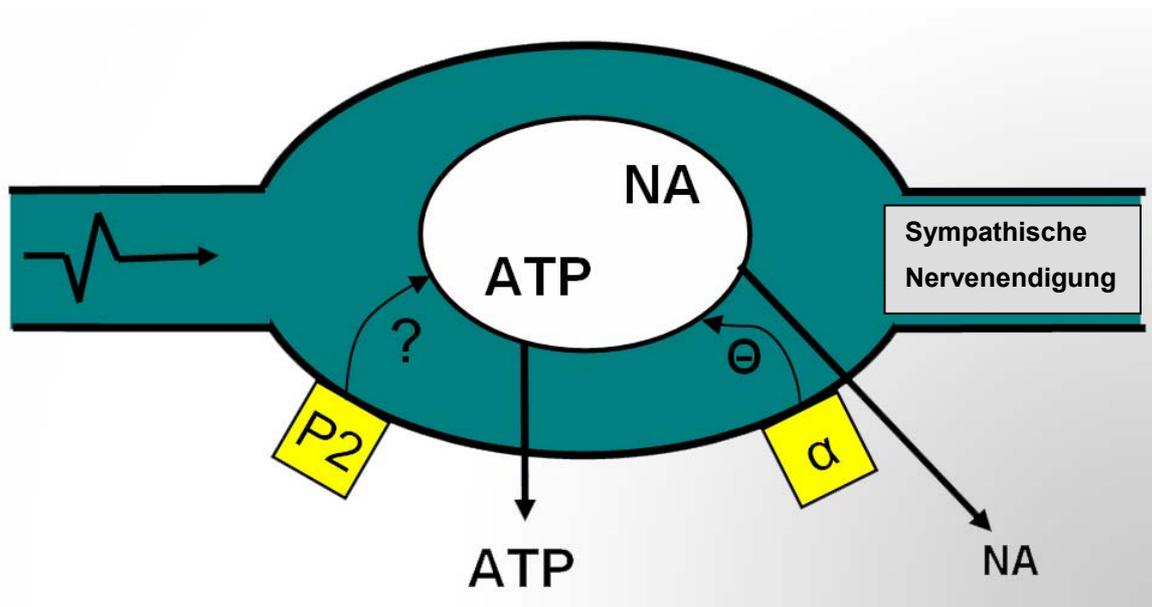


Abbildung 1: Schematische Abbildung einer sympathischen Nervenendigung und der möglichen Wirkungsweise der Rezeptorsubtypen

1.2 Allgemeine Blutdruckregulation

Durch die unterschiedlichen Aufgaben der Organe ergeben sich wechselnde Anforderungen an ihre Durchblutung. Das übergeordnete Zentrum zur Blutdruckregulation liegt in der Medulla oblongata. Durch Modulation des autonomen Nervensystems ist sie das zentrale Stellglied, welchen Blutdruck und Herzfrequenz beeinflussen kann. Hierzu gehört auch die Verteilung des Blutes auf die Organstromgebiete und die Kontrolle des Blutvolumens insgesamt. Die Steuerung dieser Mechanismen geschieht durch neural-humorale Beeinflussung des Herzens und der glatten Gefäßmuskulatur und durch lokal-metabolisch-endotheliale und myogene Vorgänge.

1.2.1 Blutdruckregulationsmechanismen

Man unterscheidet die kurzfristigen Regulationsmechanismen, welche in Sekunden wirken und in ihrer Intensität anfangs sehr stark sind, dann aber mit der Zeit abnehmen, und langfristige Veränderungen, welche ihre Wirkung erst in einem Zeitraum von mehreren Tagen erreichen. Zu den schnell wirkenden Blutdruckregulationsmechanismen, die eine neural gesteuerte vasomotorische Veränderung bewirken, welche hormonell ergänzt werden kann, gehören die Pressor-/Barorezeptor-Reflexe. Die Pressorezeptoren sind an der Grenze zwischen Adventitia und Media der großen Arterien lokalisiert (vor allem Aortenbogen und Karotissinus), werden durch Dehnung der Gefäßwände aktiviert und führen zu einer Hemmung von Sympathikus aktivierenden Neuronen in der Medulla. Zu diesem negativen Feedback werden parasympathische Neuronen aktiviert und es kommt als Folge zu einer Blutdrucksenkung.

Auch die B-Vorhofrezeptoren sind Dehnungsrezeptoren, die in der späten Systole auf die passive Dehnung reagieren und zu einer schnellen sympathischen Hemmung und parasympathischen Aktivierung führen. Bei diesen Rezeptoren besteht die Besonderheit, dass sie vor allem die Nierengefäße beeinflussen und zudem eine Herabsetzung der Renin-Freisetzung und damit des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bewirken.

Diesen schnellen Mechanismen steht die langfristige Regulation des arteriellen Blutdrucks gegenüber, welche das intravasale Flüssigkeitsvolumen in Relation zu der

Gefäßkapazität beeinflusst. Der einfachste Mechanismus, der aber nur begrenzt wirksam ist, ist hier der transkapilläre Flüssigkeitsaustausch, bei dem es zu einer Flüssigkeitsverschiebung zwischen intravasalem und interstitiellen Volumen kommt. Die viel größere Bedeutung kommt dem renalen Volumenregulationsystem zu. Durch diesen Mechanismus kommt es bei einem zu hohen Blutdruck zu einer erhöhten renalen Flüssigkeitsausscheidung und damit nachfolgend zu einer Blutdrucksenkung.

1.3 Rolle der Niere bei der Blutdruckregulation

Die Niere ist ein Organ, das mit 20% Anteil des Herzzeitvolumens in Relation sehr stark durchblutet wird. Sie spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Blutdrucks. Hier steht nicht nur die direkte Variation des Blutvolumens im Vordergrund, sondern auch die Möglichkeit der Niere, verschiedene Hormon- und Nervensysteme zu beeinflussen.

1.4 Sympathische vasokonstriktorische Nervenfasern

Die wohl bedeutendste Einwirkung auf die Niere hat der Sympathikus. Er versorgt das Nierengewebe sowohl mit efferenten als auch afferenten Fasern und wird zentral von der Medulla oblongata gesteuert. Diese sympathische vegetative Innervation erfolgt aus den Bereichen T₅ – L₃ des Rückenmarks. Sympathische Fasern gelangen als Plexus renalis in die Niere und versorgen dort vornehmlich Gefäße. In den arteriellen Gefäßen dringen die postganglionären, marklosen, sympathischen Fasern an der Grenze zwischen Adventitia und Media ein, in den Venen dringen sie auch bis in tiefe Schichten der Media vor. Verschiedene Rezeptoren des purinergen und adrenergen Systems sind dort vorhanden, welche vor allem im Bereich der Synapsen, der glatten Muskelzellen und am Endothel vorkommen. Die terminalen Nervenfasern haben Varikositäten, die mit der Plasmamembran der glatten Gefäßmuskulatur in variabler Beziehung stehen. In den Varikositäten befinden sich kleine und größere Vesikel, die den Hauptüberträgerstoff NA und teilweise auch Cotransmitter, wie Adenosine-5`-Triphosphate (ATP) oder Neuropeptid Y (NPY), enthalten. Die Funktion dieser Cotransmitter variiert von Gewebe zu Gewebe.

Es besteht die Möglichkeit, die Wirkung des Sympathikus auf Organebene durch eine Vielzahl von Faktoren zu verändern. Der bedeutendste Neurotransmitter ist hier das NA und seine Autoinhibition über präsynaptische α_2 -Rezeptoren.

Parasympathische–cholinerge, vasodilatative Fasern, wie man sie an den Genitalorganen, den Piaarterien des Gehirns und an den Koronararterien findet, konnten in der Niere nicht nachgewiesen werden.

1.4.1 Noradrenalin

Noradrenalin ist ein Neurotransmitter des sympathischen Nervensystems, der aus den sympathischen postganglionären Nervenendigungen freigesetzt wird und an noradrenergen Rezeptoren wirkt. An diesen Adrenorezeptoren wirken die Neurotransmitter Adrenalin und NA und vermitteln den Effekt dieser beiden Stoffe (Abbildung 2).

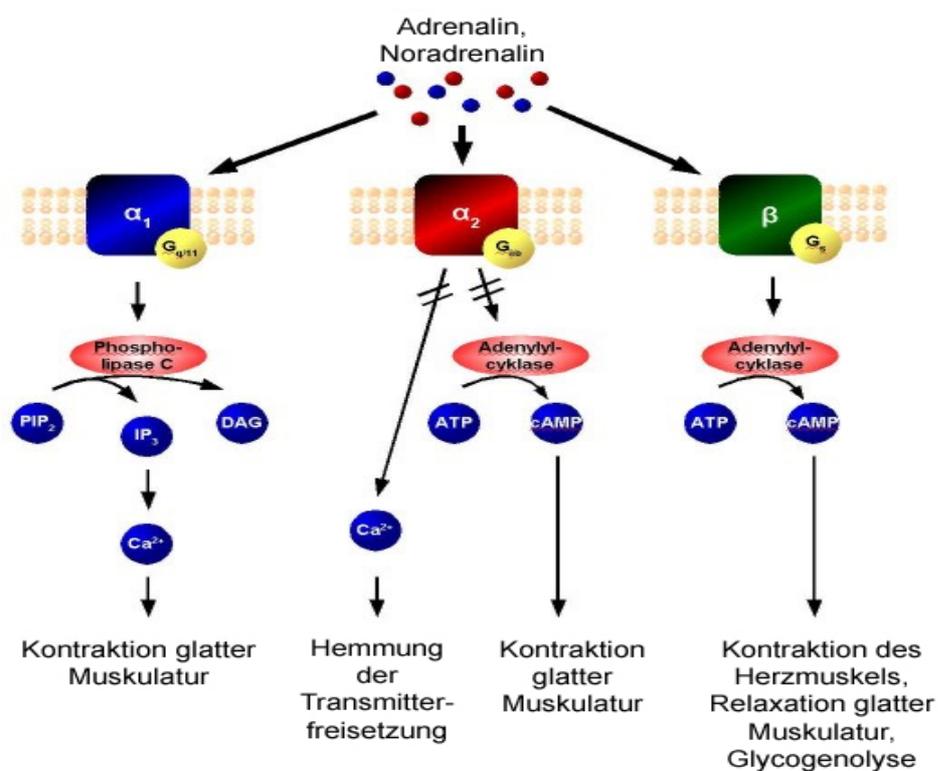


Abbildung 2:
Adrenorezeptoren
und ihre Signal-
transduktions-
wege (Erstellt
von: Sven
Jähnichen
Lizenz: GNU-
FDL)

Diese Rezeptorgruppe besteht aus transmembranalen Proteinen mit einer sieben Helixstruktur in der Membran der Effektorzelle, mit je einer Endkette auf der extrazellulären und einer Endkette auf der intrazellulären Seite.

Das freigesetzte NA wirkt über α - und β -Rezeptoren am Zielorgan. Die Verteilung dieser Rezeptoren ist je nach Gewebe sehr unterschiedlich. In der Skelettmuskulatur findet man vor allem β_2 -Rezeptoren, die eine Vasodilatation bewirken, wohingegen im Splanchnikusgebiet und in der Niere fast ausschließlich α -Rezeptoren vorliegen. Adrenozeptoren sind G-Protein gekoppelte Rezeptoren, die auf Grund ihrer Eigenschaften in drei Familien zu je drei bis vier Subtypen unterteilt werden:

- α_1 -Adrenozeptor: Subtypen α_{1A} , α_{1B} , α_{1D}
- α_2 -Adrenozeptor: Subtypen α_{2A} (Mensch)/D(Maus), α_{2B} und α_{2C} (vor allem präsynaptisch in Neuronen)
- β -Adrenozeptor: Subtypen β_1 , β_2 , β_3 und " β_4 " (Regulation der Herzfrequenz und Relaxation der glatten Muskulatur)

(Docherty 1989; Starke 2001)

Die Lokalisation dieser Rezeptoren ist organ- und speziesabhängig. Das Vorhandensein präsynaptischer, autoinhibitorischer α_2 -Adrenozeptoren, die nicht nur die Freisetzung von NA (Starke 1977; Rump, Schwertfeger et al. 1993), sondern auch die der Cotransmitter ATP und NPY modulieren (Driessen, von Kugelgen et al. 1993), ist in verschiedenen Geweben gezeigt worden.

Natürlich haben die α_2 -Rezeptoren auch einen postsynaptischen Wirkmechanismus, der auf den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtration wirkt (DiBona 1985; Docherty and Hyland 1985; Docherty 1989). Es scheint hierbei speziesrelevante Unterschiede zu geben, da in Nieren von Katzen (Drew and Whiting 1979) und Hunden (Wolff, Buckalew et al. 1984) diese Antwort überwiegend von α_1 -Adrenozeptoren vermittelt zu sein scheint, während entsprechende Effekte bei Kaninchen (Hesse and Johns 1984) und dem Menschen (de Leeuw, van Es et al. 1987) über α_2 -Adrenozeptoren erfolgen.

Mit Experimenten in isolierten Blutgefäßen (Johnson, Coney et al. 2001; Bradley, Law et al. 2003) und in isoliert perfundierten Rattennieren (Oberhauser, Vonend et al. 1999) konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation von sympathischen Nervenendigungen zu einer Vasokonstriktion führte, die nur teilweise durch NA

vermittelt war. Es scheint also der Cocktail von NA, ATP und NPY zu sein, der diese sympathische Vasokonstriktion moduliert. Zudem scheinen diese drei Neurotransmitter sich gegenseitig in ihren Effekten zu potenzieren (Oberhauser, Vonend et al. 1999). Dies ist speziell bei einer sympathischen Überaktivität von Interesse.

Da es heutzutage möglich ist, die Aktivierung des sympathischen Systems durch Gen-Knockout spezieller Rezeptoren zu modifizieren, entwickelten Hein and Mitarbeiter spezielle α_2 -Adrenozeptor-Knockout (KO) Mäuse (α_{2A} -KO, α_{2B} -KO, α_{2C} -KO, α_{2AC} -KO). Diese können als ideales Modell zur Analyse des Effektes einer gesteigerten sympathischen Aktivität eingesetzt werden (Hein, Altman et al. 1999). In Wildtyp (WT) Mäusen bewirkt der α -Adrenozeptor eine Reduktion des sympathischen Tonus im zentralen Nervensystem und eine präsynaptische Autoinhibition, die die Noradrenalin Freisetzung in der Peripherie vermindert (Brede, Wiesmann et al. 2002). Erste in vivo Analysen mit herzinsuffizienten Mäusen verdeutlichten, dass eine akzelerierte sympathische Aktivität (α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout) zu einer Rechts-Herz-Hypertrophie und kardialer Fibrose führt (Brede, Wiesmann et al. 2002). Die Rolle der sympathischen Neurotransmitter bei der Progression eines Nierenversagens ist zurzeit noch nicht ausreichend erforscht. Experimentelle Studien zeigen, dass NA, ATP und NPY in vitro Wachstumsprozesse in glomerulären Zellen induzieren (Erlinge, Brunkwall et al. 1994; Faber, Yang et al. 2001; Vonend, Oberhauser et al. 2002; Vonend, Grote et al. 2003).

Man kann sagen, dass eine erhöhte sympathische Aktivität mit einer erhöhten NA Ausschüttung auch ein typisches Kennzeichen des chronischen Nierenversagens ist. Im Zusammenhang damit stehen oftmals polyzystische Nieren, chronische Glomerulonephritiden und Stenosen der Nierenarterien (Klein, Ligtenberg et al. 2001; Adamczak, Zeier et al. 2002; Petersson, Rundqvist et al. 2002). Der genaue Mechanismus der oft dokumentierten Erhöhung der Sympathikusaktivität bei Nierenerkrankungen ist immer noch nicht bekannt. Man vermutet, dass die renale Schädigung und Ischämie zu einer Aktivierung von afferenten Nierennerven führen und einen erhöhten Ausstoß der sympathischen Neurotransmitter bewirken.

Um diesen Mechanismus der erhöhten Sympathikusaktivität zu untersuchen, haben wir das Modell der isoliert perfundierten Rattenniere auf die Maus übertragen und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse eingesetzt, um die physiologische und pathophysiologische Bedeutung des Rezeptorsubtyps zu studieren. Obwohl es

verschiedene Studien mit isolierten Hirnzellen, arteriellem Gewebe und Vas deferens von α_{2A} , α_{2B} und α_{2C} Adrenozeptor-Knockout Mäusen gibt, die die vorherrschende Rolle dieser Rezeptoren bei der Regulation der Noradrenalin Freisetzung nachweisen, fehlen immer noch Studien, die sich vor allem auf das Nierengewebe konzentrieren, trotz der Schlüsselstellung der Niere bei der Erhöhung der sympathischen Aktivität. Im Rahmen der hier vorgelegten Arbeit sollte mit Hilfe des Modells der isolierten perfundierten Niere untersucht werden, ob der α_{2A} -Adrenozeptor verantwortlich für die Regulation der Noradrenalin Freisetzung ist und als autoinhibitorischer Rezeptor ein negatives Feedback bewirkt. Zudem stellte sich die Frage, ob eine sympathische Überaktivität in der Niere in der Lage ist, selber ohne eine Einwirkung anderer Nierenerkrankungen, Schäden am Nierengewebe hervorzurufen.

1.4.2 Adenosin-Triphosphat

Es konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass es auch bei Blockade des α -Adrenozeptors zu einer sympathisch vermittelten Druckantwort kommen kann. Dies wurde zuerst am Samenleiter des Meerschweinchens (Fedan, Hogaboom et al. 1981) nachgewiesen und man schloss auf ein Mitwirken des Neurotransmitters ATP. Dieses Wirkprinzip konnte später auch noch in anderen Geweben bestätigt werden (Vonend, Stegbauer et al. 2005). Heutzutage besteht die allgemein akzeptierte Ansicht, dass Noradrenalin und ATP nach ihrer Freisetzung aus postganglionären sympathischen Nervenendigungen als Cotransmitter wirken (Burnstock 1986; Burnstock 1986; Todorov, Mihaylova-Todorova et al. 1996). Bei den Rezeptoren, die die Wirkung des ATP vermitteln, handelt es sich um P_1 - und P_2 -Rezeptoren (Burnstock and Kennedy 1985). Es wurde vermutet, dass es auch hier, wie beim adrenergen System, einen präsynaptisch wirkenden Purinorezeptor gibt, der vor allem von Adenosin angeregt wird und zu einer Inhibition der Transmitterfreisetzung von NA und NPY führt. Die Unterteilung der purinergen Rezeptoren erfolgt in P_{2X} -Rezeptoren, welche Ionenkanal gekoppelt aktiviert werden und P_{2Y} -Rezeptoren, welche G-Protein gekoppelt sind. Beide Rezeptoren werden sowohl für vasokonstriktive als auch vasodilatative Effekte in verschiedenen Geweben verantwortlich gemacht. Durch eine elektrische Stimulation der Nerven wird das an den Rezeptoren wirkende ATP freigesetzt, wobei seine genaue Herkunft noch nicht geklärt ist. Man vermutet, dass es wie das NA neuronalen Ursprungs ist, wobei

einige Arbeitsgruppen auch eine extraneuronale Freisetzung von ATP mit Hilfe verschiedener Agonisten nachweisen konnten (Vizi, Sperlagh et al. 1992; Ishii, Shinozuka et al. 1993; Takeuchi, Shinozuka et al. 1994).

Da wir in Vorstudien Hinweise dafür erhielten, dass es eine Interaktion zwischen dem purinergen und adrenergen System gibt, zielt ein weiterer Teil dieser Arbeit auf den Nachweis derartiger Interaktionen ab. Unser Ziel war es nachzuweisen, dass eine Modulation der ATP Freisetzung tatsächlich über den α_{2A} -Adrenozeptor vermittelt wird. Dies ist vor allem deshalb interessant, da ATP in der Lage ist, renovaskuläre und mitogene Effekte im Nierengewebe von Ratten und Menschen über spezifische G-Protein gekoppelte P_2 -Rezeptoren zu induzieren (Vonend, Oberhauser et al. 2002; Vonend, Grote et al. 2003; Vonend, Okonek et al. 2005; Vonend, Stegbauer et al. 2005)

Unter der Annahme, dass bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen eine erhöhte sympathische Aktivität vorliegt, die mit einer erhöhten NA und ATP Konzentration im Nierengewebe einhergeht, war auch die Untersuchung ihres Phänotyps wichtig und relevant. Deshalb wurden ihre Serum- und Urinparameter, ihr Blutdruck und die Nierenmorphologie untersucht.

2. Methoden

2.1 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Die verwendeten Versuchstiere waren männliche Mäuse der Inzuchtlinie C57 Bl6 (eine seit 1921 etablierte Labormaus-Linie) aus der institutseigenen Zucht, dessen erste Pärchen von Charles River Deutschland GmbH, D-Sulzfeld erworben wurden. Diese Tiere werden hier als C57 Bl6 oder Wildtyp (WT) Mäuse bezeichnet, da sie als Kontrolle zu dem Knockout Stamm dienten. Die ebenfalls für diesen Teil der Studie verwendeten α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Tiere wurden alle von L. Hein, Abteilung für Pharmakologie, Universität Würzburg, bezogen und dann in unserem Institut weiter als Inzuchtlinie verpaart (Hein, Altman et al. 1999).

Die Aufzucht und Haltung der Tiere erfolgte entsprechend artgerechter, gesundheitlicher und qualitativer Kriterien in transparenten, 377 x 215 x 150 mm (Länge x Breite x Höhe) großen Makrolon Polycarbonat-Käfigen (Typ III) mit einer Bodenfläche von 810 cm² in der hauseigenen Versuchstieranstalt. Die Tiere wurden bei einer Raumtemperatur von 20-22°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45 % und einem 12-Stunden-Tag-Nacht-Zyklus gehalten. Als Einstreu wurde Altromin-Tiereinstreu-Granulat verwendet. Futter (Altromin Standarddiät Maus und Ratte) und Wasser standen ad libitum zur Verfügung. Im Alter von 4 Wochen wurden die Mäuse abgesetzt, nach Geschlechtern getrennt und in Gruppen von jeweils 5-6 Tieren pro Käfig unter den beschriebenen Haltungsbedingungen von den dortigen Tierpflegern aufgezogen. Die C57 Bl6 und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse gingen mit einem Alter von 70 Tagen und einem Gewicht von 25-29 g in die Versuchsreihe ein.

2.2 Isoliert perfundierte Mausniere

Für diese Experimente wurden sowohl α_{2A} -Adreozepator-Knockout Mäuse, als auch Wildtyp Mäuse verwendet. An diesen Tieren wurde die Operation der isoliert perfundierten Mausniere durchgeführt. Anschließend gab es zwei verschiedene experimentelle Methoden. Auf der einen Seite wurde die Messung der Druckantworten in den isolierten Nieren anhand eines Druckaufnehmers durchgeführt und auf der andern Seite das die Nieren durchfließende Perfusat gewonnen und sein NA Gehalt chromatographisch gemessen.

2.2.1 Anästhesie der Mäuse

Die Narkose der α_{2A} -Adreozepator-Knockout Mäuse und der Wildtyp Mäuse erfolgte durch intraperitoneale Injektion mit 270mg/kg Pentobarbital (Narcoren).

2.2.2 Präparation der Nieren

Zunächst wurde nach Prüfung der Narkosetiefe anhand eines Reflextests eine mediane Laparatomie durchgeführt. Die Haut wurde von der Muskulatur nach rechts und links zur Wirbelsäule hin abpräpariert und die Bauchdecke in der Linea alba eröffnet. Nach zwei Entlastungsschnitten durch die rechte und linke Bauchwand hatte man einen guten Überblick über den Bauchsitus der Maus (Abbildung 3). Die nun folgende Operation erfolgte unter einem Olympus SD 30 Mikroskop.

Mit einem Tupfer wurde nun der Darm der Maus zur linken Seite verschoben und alle Strukturen vom Fettgewebe befreit, so dass die beiden Nieren und ihre Gefäße gut sichtbar waren (Abbildung 4).

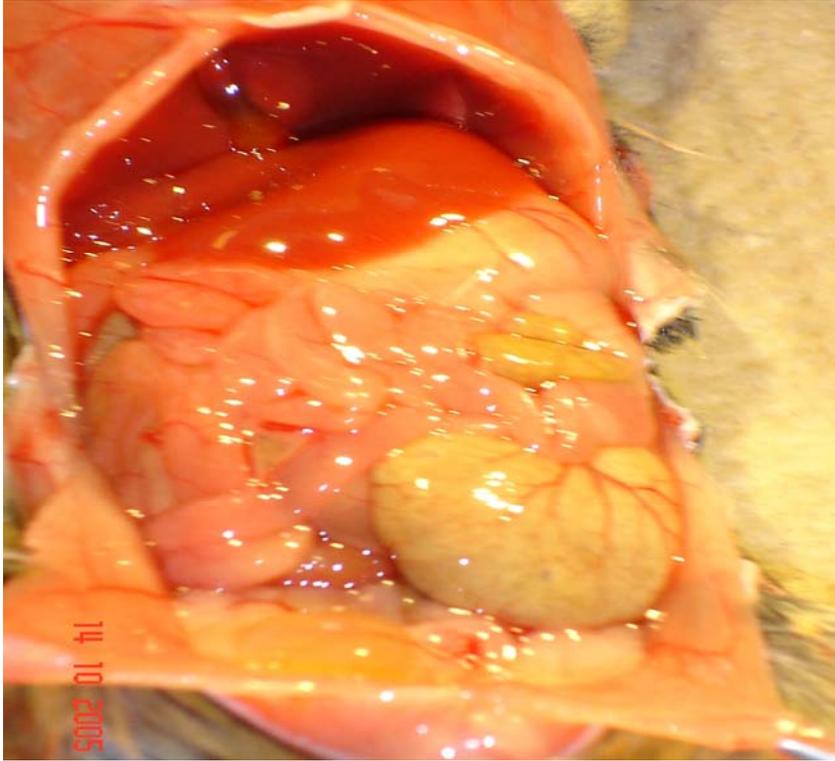


Abbildung 3:
Situs der zu operierenden
Maus

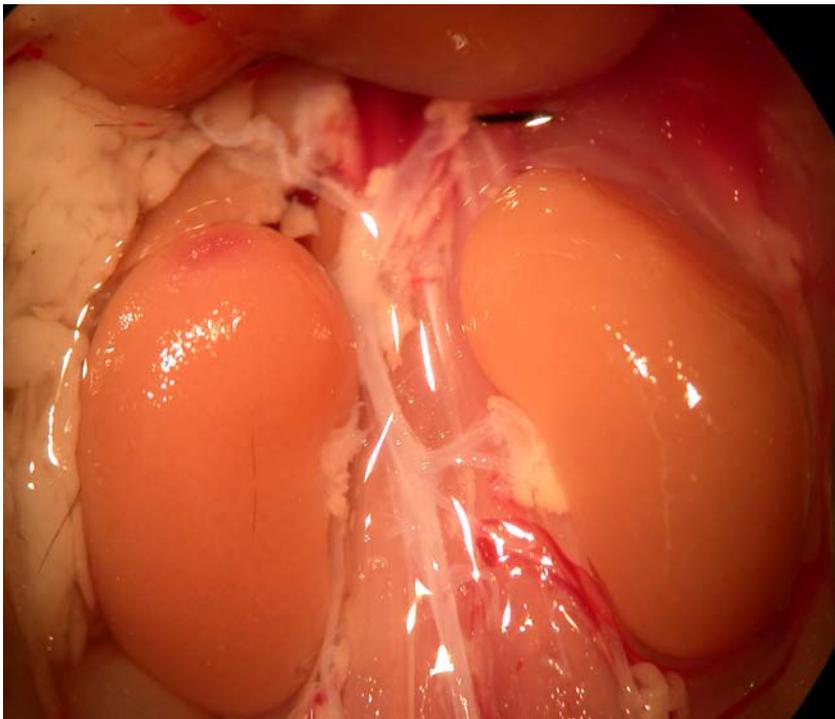


Abbildung 4:
Freipräparierte Nieren mit
abdominaler Aorta und
abgehenden Arteriae (Aa.)
Renalis sinister.

Im cranialen Bereich der abdominalen Aorta kurz hinter der Leber wurde anschließend eine Schlinge (Seide, 1 EP, Serag Wiessner) zur späteren Ligatur der Aorta vorbereitet. Im caudalsten Teil der Aorta kurz vor Abgang der A. iliaca wurde eine gebogene Mosquitoklemme (Martin, gebogen, 12,5cm) angesetzt und die Blutweiterleitung gestoppt. Sehr knapp hinter der A. renalis sinister wurde ein Mini-Gefäßclip (nach Biemer, 9mm, Martin) zur kurzfristigen Unterbrechung des Blutstromes gesetzt (Abbildung 5).

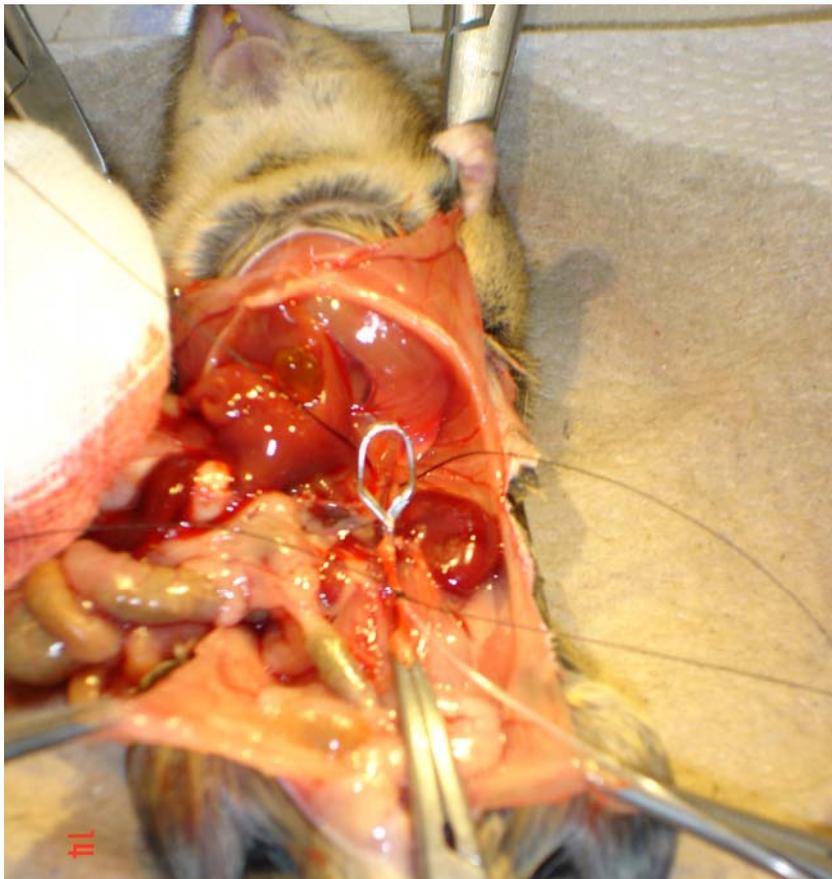


Abbildung 5:

Die Aorta wird nach Unterbrechung des Blutflusses cranial und caudal der nun erfolgten Inzision kanüliert, und die Schlinge in der Nähe des Diaphragmas wird gezogen, so dass die Krebslösung den Blutfluss ersetzen kann.

Dadurch bestand die Möglichkeit, den abdominalen Teil der Aorta proximal der Bifurkation nach einer Inzision mit einer Strabismus-Federschere (gerade, 11,5, Martin) mit einem Polyethylenschlauch (Portex, Kent, UK; Innendurchmesser 0.40 mm, Außendurchmesser 0.80 mm) zu kanülieren. Der Polyethylenschlauch in der Aorta wurde mit einer Ligatur (Seide, 1 EP, Serag Wiessner) befestigt. Über diesen arteriellen Zugang konnten die Nieren nun zur Ausschwemmung des Blutes mit 37°C warmer (geheizt über ein Umwälzthermostat DC10-P5/U, Roth) und mit Carbogen (95% O₂ und 5% CO₂) gesättigter Krebs-Henseleit-Lösung (6,895 g/l NaCl; 0,35 g/l KCl; 0,11 g/l MgSO₄; 2,10 g/l NaHCO₃; 0,14 g/l KH₂PO₄; 1,9997 g/l Glucose; 0,37

g/l CaCl₂; 0,0249 g/l EDTA; 0,012 g/l Ascorbinsäure) in situ perfundiert werden. Diese modifizierte Krebs-Henseleit-Lösung passierte einen 0.45 µm Filter (Millex-AA, Millipore, F) bevor sie die Niere erreichte. Die Perfusion wurde mit einer planetengetriebenen Pumpe (Abimed, Gilson, Minipuls2, Langenfeld, BRD) mit einer Perfusionsrate von 7.25 ml/min/g Niere konstant gehalten. Das Nierengewicht wurde über lineare Regression aus dem Verhältnis des Körpergewichtes zum Nierengewicht bestimmt.

Die Aorta wurde nun cranial des Abgangs der rechten A. renalis unterbunden und die linke V. renalis wurde eröffnet, um einen Abfluss zu schaffen. Die Maus wurde nun unter Eröffnung beider Jugularvenen und Exartikulation im Occipitalgelenk mit Durchtrennung des Rückenmarkes euthanasiert.

Mit anatomischen Pinzetten (fein, gebogen, 10,5 cm, Martin) wurden die Nierenkapseln, ohne die Niere zu verletzen, inzisiert und die Kapsel von der Niere getrennt. Nach Entfernung beider Nierenkapseln wurden nun vorsichtig die Aorta und beide Arteriae renalis von Fettgewebe und den Venen befreit, so dass alle Strukturen und Abgänge gut sichtbar waren. Auch das an den Nierenbecken liegende Fett wurde entfernt und die Harnleiter nah an der Niere abgetrennt. Wenn von den Nierenarterien noch weitere Gefäße abgingen, wurden diese mit Seide legiert. Um eine Dichtigkeit der A. renalis gewährleisten zu können, mussten oftmals die A. suprarenalis, sowie die A. spermatica sinistra unterbunden werden. Anschließend wurde nun die rechte Nierenarterie über die Aorta mit einem Polyethylenschlauch (Portex, Kent, UK; Innendurchmesser 0.28 mm, Außendurchmesser 0.61 mm) kanüliert und mit einer Ligatur (Seide, 1 EP, Serag Wiessner) befestigt (Abbildung 6). Zuvor war eine Ligatur zwischen den Abgängen der rechten und linken Nierenarterie gesetzt worden.

Die rechte Niere konnte nun durch vorsichtiges Heraustrennen unter Inzision des Restgewebes der Nierenvenen aus dem Situs entnommen werden und an einer bipolaren Platinelektrode so befestigt werden, dass sich ein Flüssigkeitsfilm zwischen Elektrode und Nierenhilus bildete. Der Zufluss der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung wurde weiter über den Polyethylenschlauch sichergestellt. Die Niere wurde anschließend in eine beheizte Glaskammer (37°C) gehängt.

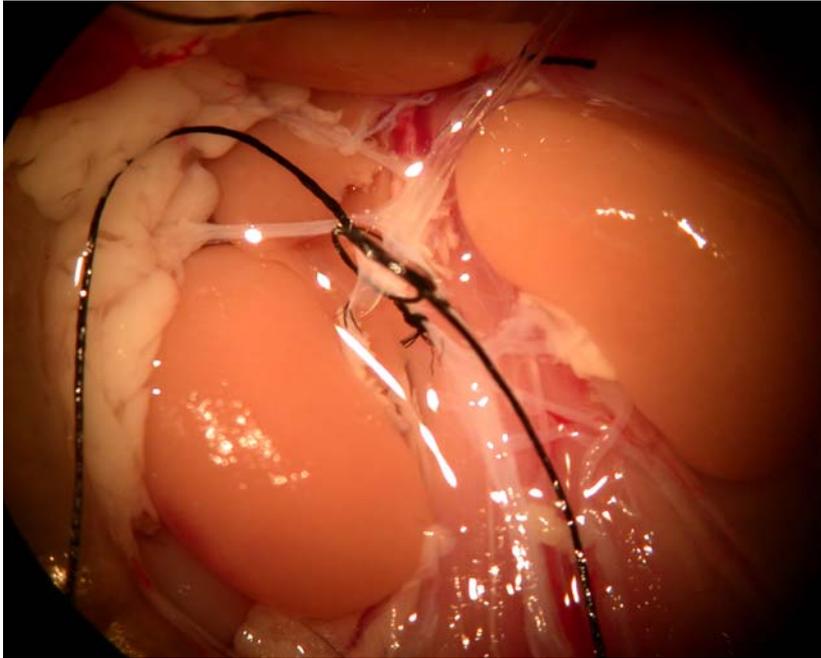


Abbildung 6:
Kanülierung der rechten Niere mit einem Polyethylenschlauch über die Aorta. Anschließend Fixierung des Schlauches mit einer Ligatur.

Die verbliebene linke Niere wurde im folgenden über den caudalen Teil der Aorta kanüliert, ebenfalls mit einer Ligatur an dem Polyethylenschlauch (Portex, Kent, UK; Innendurchmesser 0.28 mm, Außendurchmesser 0.61 mm) befestigt, vorsichtig herausgelöst und an der zweiten bipolaren Platinelektrode angebracht und in der zweiten Glaskammer platziert (Abbildung 7).

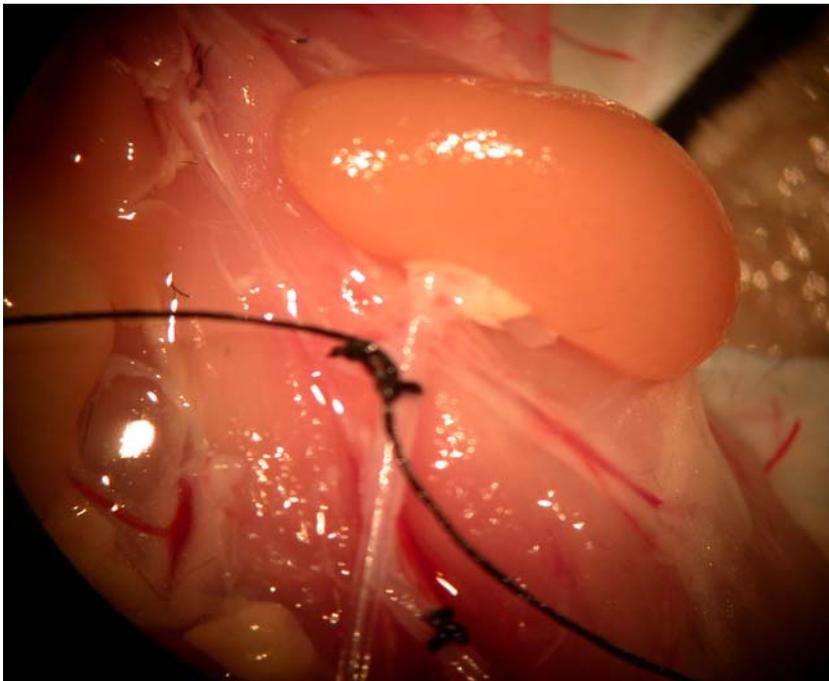
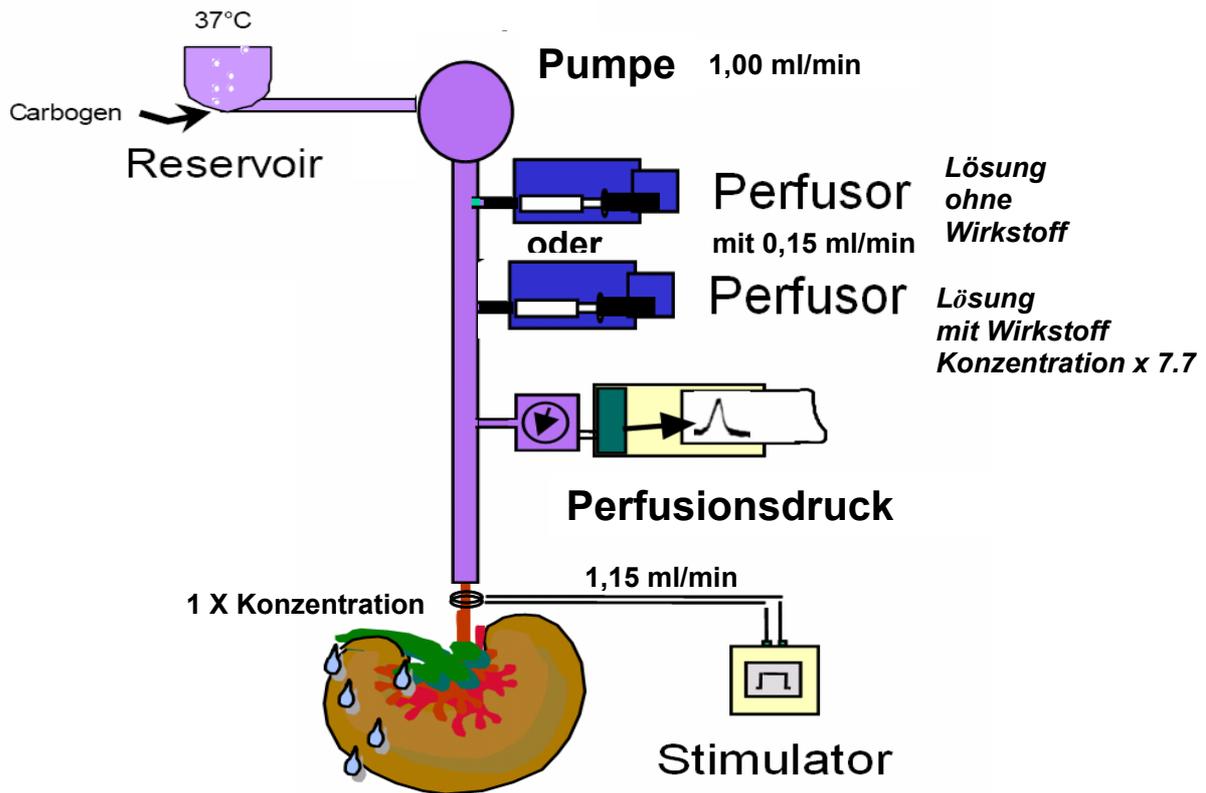


Abbildung 7:
Kanülierung der linken Niere mit einem Polyethylenschlauch über den caudalen Teil der Aorta. Anschließend Fixierung des Schlauches mit einer Ligatur.

Beide um die Nierenarterien platzierten Elektroden wurden zur elektrischen Reizung an einen Stimulator (Typ 21512, HSE, Electronics, March, BRD) angeschlossen.

Der Perfusionsdruck wurde während des gesamten folgenden Experimentes mit einem Statham P23 Db Druckaufnehmer (Gould Inc., Oxnard, Kalifornia, USA), der an einen Watanabe Schreiber (Graphtec Corp., Tokyo, Japan) angeschlossen war, aufgezeichnet. Dieser Druckaufnehmer wurde in regelmäßigen Abständen mit einem Kalibriergerät (KAL84, Erwin Halstrup Multur GmbH, Kirchzarten, BRD) geeicht. Der Versuchsaufbau ist in dem nachfolgenden Schaubild schematisch dargestellt (Abbildung 8).



bei 157 mg Niere → Perfusion mit 1.15 ml/min

Abbildung 8: Versuchsaufbau der isoliert perfundierten Mausniere. Zur elektrischen Stimulation der Nierennerven werden bipolare Platinelektroden um die Nierenarterien platziert. Die Nieren befinden sich in gewärmten Doppelwandgefäßen und werden mit einer Rollenpumpe mit erwärmter modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Der Perfusionsdruck wird von einem Schreiber aufgezeichnet. Sowohl Agonisten als auch Antagonisten können entweder direkt dem Reservoir zugesetzt werden oder über einen Perfusor zusätzlich von außen zugeführt werden. Zu dem Fluss, der über die Pumpe der Niere zugeführt wird, werden dann zwei Perfusoren angeschlossen. Der erste dient als „Neutralperfusor“, welcher vor der eigentlichen Wirkstoffzufuhr angeschaltet wird, um die alleinige Druckerhöhung durch den Perfusor-Zufluss zu simulieren. Sobald der Wirkstoff zugeführt werden soll, wird der erste Perfusor ausgeschaltet.

2.3 Bestimmung der renalen Druckantwort

Am Modell der isoliert perfundierten Mausniere wurde die renale Druckantwort, die durch unterschiedliche Stimulationsfrequenzen oder Gabe von Antagonisten oder Agonisten erzeugt wurde, bestimmt. Zur Aufzeichnung wurde ein Statham P23 Db Druckaufnehmer, der an einen Watanabe Schreiber angeschlossen ist, verwendet.

2.3.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Um die regelrechte Funktion der präparierten Niere zu testen, wurde nach jeder Präparation, Extraktion und Anschluss der Nieren an die elektrische Stimulation sofort eine Probestimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40mA) durchgeführt. Nach einer Pause von 15 min, in der sich die Nieren stabilisieren konnten, wurde dann über eine Perfusionspumpe (Harvard Pump 11Plus Dual Syringe, HSE) eine Bolusinjektion von 60 mM Kaliumchlorid (KCl) hinzugefügt, um die rezeptorunabhängige Druckantwort der beiden Nieren zu testen. Sobald das Maximum der Kurve erreicht war, wurde der Perfusor gestoppt. Anschließend wurde 30 min gewartet, damit sich das System stabilisieren konnte. Danach begann der eigentliche Versuch.

2.3.2 Auswertung der Druckantworten

Das Feuchtnierengewicht wurde nach Daten von Kontrollmäusen errechnet, bei denen das feuchte Gewicht der Nieren mit 5 % des Gesamtkörpergewichtes korrespondierte. Die Höhe der durch Stimulation oder Wirkstoffzugabe erfolgten Peaks wurde mit einer Schieblehre (Elektronische Schieblehre, Pearl) gemessen. Die renale Druckantwort auf eine Stimulation oder einen exogenen Wirkstoff errechnete sich dann aus dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdruckes über den basalen Perfusionsdruck ($P_{max} = P_{max} - P_{basal}$). Diese Drücke wurden sowohl als Absolutwerte in mmHg, sowie teilweise auch als Relativwerte in Prozent angegeben (% von S1). S1 ist eine erste Kontrollstimulation ohne den zu testenden Stoff.

2.3.3 Protokolle der Druckantworten

Protokoll 1: *Dosis-Wirkungskurve nach Gabe von NA, Methoxamin und UK14,304 in aufsteigender Konzentration in den Nieren von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen*

Die Agonisten NA, Methoxamin (α_1 -Agonist) und UK14,304 (α_2 -Agonist) wurden in aufsteigender Konzentration über einen Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) der Perfusionslösung in einer konstanten Rate von 0,158 $\mu\text{l}/\text{min}$ beigelegt. Alle 3 Minuten wurde die Dosis erhöht, so dass folgende Konzentrationsschritte zustande kamen: NA: 0.03 μM , 0.1 μM , 0.3 μM , 1 μM , 3 μM und 10 μM ; Methoxamin und UK14,304: 0,3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM und 300 μM . Auf diese Weise kam eine DWK zustande, die auf dem Schreiber aufgezeichnet wurde. Die Agonisten Gabe wurde beendet, wenn entweder das Maximum der DWK oder kein Effekt zu sehen war.

Die renale Druckantwort auf diesen Agonisten errechnete sich aus dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdruckes über den basalen Perfusionsdruck ($P_{\text{max}} = P_{\text{max}} - P_{\text{basal}}$). Die gemessene Erhöhung wurde dann in % der Druckantwort angegeben, die sich nach der Gabe von KCl einstellt.

Protokoll 2: *Stimulation renaler Nerven mit 1–15 Hz bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen*

Die Nieren wurden mit einem jeweils dazwischen liegenden Intervall von 9 min mit 1 Hz, 2 Hz, 5 Hz, 7.5 Hz, 10 Hz und 15 Hz stimuliert. Die darauf erfolgte Druckantwort wurde durchgehend aufgenommen.

Die renale Druckantwort auf diese Stimulationsreihe errechnete sich aus dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdruckes über den basalen Perfusionsdruck ($P_{\text{max}} = P_{\text{max}} - P_{\text{basal}}$). Die gemessene Erhöhung wurde dann wie zuvor in % von KCl angegeben.

Protokoll 3: Stimulation renaler Nerven mit 1-15 Hz und Applikation von Phentolamin und PPADS bei Wildtyp Mäusen

Die Nieren der Kontrollgruppe wurden mit einem dazwischen liegenden Intervall von 9 min mit 1 Hz, 2 Hz, 5 Hz, 7.5 Hz, 10 Hz und 15 Hz (S1-S6) wie in Protokoll 2 stimuliert. In der zweiten Gruppe wurde jeweils 5 min vor den Stimulationen S1 – S6 mit einem Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) mit einer konstanten Rate von 0,158 µl/min Phentolamin (nicht selektiver α -Adrenozeptor-Blocker) in einer Konzentration von 1 µM in die Perfusionsflüssigkeit zugegeben. In der dritten Versuchsgruppe wurde jeweils 5 min vor S1 – S6 mit einem Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) mit einer konstanten Rate von 0,158 µl/min Phentolamin in einer Konzentration von 1 µM und PPADS (nicht-selektiver P₂X-Blocker) in einer Konzentration von 5 µM in die Perfusionsflüssigkeit zugegeben.

Die darauf erfolgte aufgenommene Druckantwort errechnete sich hier aus dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdruckes über den basalen Perfusionsdruck ($P_{max} = P_{max} - P_{basal}$). Die gemessene Erhöhung wurde dann ebenfalls in % von KCl angegeben.

Protokoll 4: Stimulation renaler Nerven mit 1 und 2 Hz und Applikation von Prazosin und Rauwolszin bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen

Zuerst wurde eine Stimulation der Nieren mit 1 und 2 Hz durchgeführt, wobei zwischen den beiden Reizen eine 6 minütige Pause eingehalten wurde. Diese erste Stimulationsfolge diente als Kontrolle, auf die die Effekte der nachfolgenden Stimulationen bezogen wurden. Nach einer Erholungspause von 10 min wurde mit einer Vorlaufzeit von 3 min Prazosin (α_1 -Blocker) in einer Konzentration von 0,03 µM über einen Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) mit einer konstanten Flussgeschwindigkeit von 0,158 µl/min hinzu gegeben. Wieder wurde, wie oben beschrieben, mit 1 und 2 Hz stimuliert. Nach einer weiteren 10 minütigen Pause wurde zusätzlich über einen zweiten Perfusor noch Rauwolszin (α_2 -Adrenozeptor-Blocker) in einer Konzentration von 5µM drei min vor Stimulationsbeginn in die Krebs-Henseleit-Lösung geleitet. Wieder erfolgte die Stimulationsfolge mit 1 und 2 Hz.

In einem weiteren Experiment wurde der Versuch wie oben beschrieben durchgeführt, allerdings wurde vor dem Start NA (1 μ M) exogen für 3 min über den Perfusor in die Krebs-Henseleit-Lösung geleitet und nach einer Pause von 10 min das eigentliche Experiment begonnen. Nach diesem wurde wieder nach einer Pause von 10 min das NA nun unter Einfluss von Prazosin und Rauwolszin hinzugeleitet. Eine nächste Teilstudie beinhaltete den Versuch wie oben beschrieben, nur dass am Ende nach einer 10 minütigen Pause die Stimulation unter dem Einfluss von PPADS, einem nicht-selektiven P2X-Blocker in einer Konzentration von 5 μ M erfolgte. Die resultierende Druckantwort wurde wie oben beschrieben errechnet und dann in % des vor Stimulationsbeginn registrierten Wertes angegeben.

Protokoll 4.1: Konzentrationsfindung Prazosin für Protokoll 4

Diese gesonderten Versuche wurden Protokoll 4 vorausgeschickt, um eine optimale Konzentration für den Wirkstoff Prazosin zu ermitteln. Wie in Protokoll 1 beschrieben, wurde zuerst für NA eine DWK durchgeführt. Dann folgte eine stabilisierende Pause für die Nieren von 20 min. Während dieser Zeit wurde der Krebs-Henseleit-Lösung im Reservoir Prazosin beigesetzt. Prazosin wurde in verschiedenen Versuchsansätzen in folgenden Konzentrationen verwendet: 30nM, 10nM, 300nM, 100nM, 1 μ M.

Die renale Druckantwort auf diesen Agonisten, mit und ohne das Vorhandensein von Prazosin, errechnete sich aus dem maximalen Druckanstieg des Perfusionsdrucks über den basalen Perfusionsdruck ($P_{max} = P_{max} - P_{basal}$). Die gemessene Erhöhung wurde dann in % von KCl angegeben.

Ein weiterer Kontrollversuch zur Konzentrationsbestimmung des Prazosin, in dem die NA Ausschüttung unter Einwirkung von Prazosin bestimmt wurde, wird in Protokoll 7.1 beschrieben.

Protokoll 4.2: Konzentrationsfindung Rauwolszin für Protokoll 4

Diese zweiten gesonderten Versuche wurden ebenfalls Protokoll 4 vorausgeschickt, um eine optimale Konzentration für den Wirkstoff Rauwolszin zu finden. Nach der üblichen Funktionsprüfung wurde zuerst eine Kontrollstimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40mA) ohne Rauwolszin durchgeführt. In der jeweiligen Stabilisierungsphase von 10 min wurde 5 min vor der nächsten 5 Hz Stimulation Rauwolszin in aufsteigender Konzentration über einem Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) hinzugefügt. Rauwolszin wurde in den Konzentrationen 1nM, 10nM, 100nM und 1µM verwendet. Die Zufuhr des Rauwolszin wurde gestoppt, wenn die Druckantwort ihr Maximum erreicht hatte oder keine Effekte auftraten.

Die gemessene Druckantwort wurde dann in diesem Versuch in mmHg als absoluter Druck angegeben.

Ein weiterer Kontrollversuch zur Konzentrationsbestimmung des Rauwolszin, in dem die NA Ausschüttung unter Einwirkung dieses Stoffs bestimmt wurde, wird in Protokoll 7.2 beschrieben.

2.4 Bestimmung des Neurotransmitters Noradrenalin

Am Modell der isoliert perfundierten Mausniere wurde die NA Freisetzung, die durch eine renale nervale Stimulation oder durch die Zugabe von Antagonisten und Agonisten induziert wurde, bestimmt. Zur Quantifizierung verwendete man die HPLC-ECD.

2.4.1 Allgemeiner Versuchsablauf

Um die regelrechte Funktion der präparierten Niere zu testen, wurde nach jeder Präparation genau wie auch schon bei den Druckversuchen sofort eine Probestimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40mA) durchgeführt. Nach einer Pause von 15 min, in der sich die Nieren stabilisieren konnten, wurde hier ebenfalls über einen Perfusor (Braun, Melsungen) eine Bolusinjektion von 60 mM KCl hinzugefügt. Sobald das Maximum der Kurve erreicht war, wurde der Perfusor gestoppt. Anschließend wurde 30 min zur Stabilisierung des Systems gewartet. Daraufhin wurden Kokain (10 μ M) und Kortikosteron (20 μ M) als Reuptake-Hemmer in die Perfusionslösung hinzu gegeben, um die neuronale und extraneuronale Wiederaufnahme von freigesetztem NA zu verhindern. Nach weiteren 20 min wurde damit begonnen, das Eluat in je zwei dreiminütigen Fraktionen nach jeder Stimulation mit einem Probesammler (LKB, Bromma, Schweden) in Probenkontainern zu sammeln. In manchen experimentellen Protokollen wurden schon vor der Stimulation bei Zugabe eines Wirkstoffes je drei dreiminütige Fraktionen gesammelt.

Zu Beginn wurde bei jedem Experiment jeweils eine 3 Minuten Fraktion als Recovery und die nachfolgende Fraktion als Leerwert gesammelt.

2.4.2 Probenaufbereitung

Um sowohl die Reinheit als auch die Effizienz der Probenaufbereitung überprüfen zu können, wurden für jedes Experiment zusätzlich zu den gesammelten Fraktionen je zwei Proben aufbereitet, die nur Krebs-Henseleit-Lösung (Blank-Wert), beziehungsweise die zweite Probe 1000 pg Noradrenalin-HCl (Recoveries) und 600 pg DHBA (Chromsystems, DHBA, 12 pg/ μ l) als interner Standard enthielten. Zur Noradrenalin Stabilisierung wurde jeder Probenkontainer mit 167 μ l HCl (1 M), 13.3 μ l EDTA (0.067 M) und 3.3 μ l Na₂SO₃ versetzt und nach dem Aufsammeln des Eluats mit einem Tris-Puffer (1 M, pH 10) auf pH 8,4 eingestellt. Nach Zugabe von 50 mg Al₂O₃ wurden die Proben zur quantitativen Adsorption des Noradrenalins 45 min lang umgeschüttelt. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, konnte das an Al₂O₃ absorbierte Noradrenalin mit 1 ml H₂O in mit Mikrofiltern (Glasfaser, Whatman, Maidstone, GB) vorbereitete Glasröhrchen überführt werden. Das Al₂O₃ wurde noch zweimal mit jeweils 1 ml H₂O gewaschen, welches nach weiteren Zentrifugierschritten verworfen wurde. Das Noradrenalin wurde letztlich mit zunächst 100 μ l und schließlich 150 μ l Perchlorsäure (0.1 M) desorbiert. Von diesen 250 μ l wurde ein 125 μ l Aliquot auf eine HPLC-Säule computergesteuert injiziert und das darin enthaltene Noradrenalin detektiert. Das HPLC-System bestand aus einer Pumpe (Waters 600 Controller), einem automatischen Injektor (Waters 717 plus Autosampler), einem Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector), einer Vorsäule (Waters Guard-Pack, ResloveTM C18), und einer Säule (WiCom, Prontosil, 120-5-C18 AQ 5,0 μ m). Die mobile Phase wurde vor jedem Probendurchlauf entgast, filtriert und anschließend mit einer Flussrate von 1 ml/min durch das HPLC-System gepumpt. Sie enthielt NaH₂PO₄ (15 mM), Citronensäure (30 mM), Na₂EDTA (2 mM), (-)Natriumoctylsulfonat (2.77 mM) und Methanol 12% (V/V). Der pH-Wert der mobilen Phase wurde mit NaOH (10 M) auf pH 6.5 eingestellt. Der Noradrenalingehalt des Eluats wurde mit einem Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector) bei einem Arbeitspotential von 0.4 V bestimmt (Abbildung 9).

Prinzipieller Aufbau einer HPLC

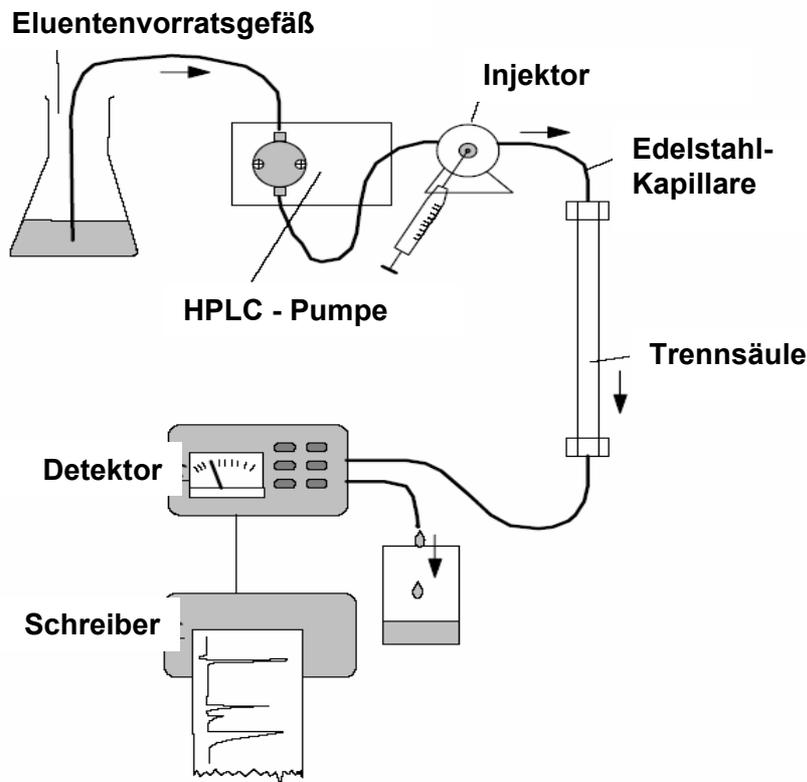


Abbildung 9:

Diese Abbildung zeigt den schematischen Aufbau einer HPLC. Das Probeneluat wird aus speziellen Vorratsgefäßen über eine Pumpe mit der Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min zu einem Injektor gefördert, welcher 125 µl der Probe über eine Trennsäule leitet. Die mit einem Detektor gemessene NA Konzentration wird dann mittels eines Schreibers dargestellt.

2.4.3 Auswertung der Noradrenalin Freisetzung

Die stimulationsinduzierte oder wirkstoffinduzierte NA Freisetzung in jeder Probe wurde anhand einer Noradrenalineichgeraden (0-37,5-75-187,5-375-750 pg NA / 125 µl Perchlorsäure (HClO₄) und jeweils 600 pg DHBA / 125 µl Perchlorsäure), die für jeden Probendurchlauf neu erstellt wurde, berechnet und mit den Wiederfindungsraten (Recoveries) des entsprechenden Experiments korrigiert. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate von NA betrug $50,1 \pm 13 \%$ (n=69). Zudem wurde jede Probe auf den internen Standard bezogen und somit Schwankungen, die innerhalb der Probenaufbereitung auftreten können, ausgeglichen.

Letztendlich wurde die freigesetzte Menge NA auf das Feuchtgewicht der jeweils untersuchten Niere bezogen und pro Stimulationsphase in pg/g Niere angegeben. Es konnte auf Grund der unterschiedlich großen, tierindividuellen Freisetzung von NA zu Schwankungen bei den Noradrenalinabsolutwerten kommen. Um die Werte

besser miteinander vergleichen zu können, wurden sie in manchen Versuchen auf eine interne Kontrolle bezogen. S₀ diente in diesen Fällen deshalb als Kontrollstimulation, auf die die stimulationsinduzierte oder wirkstoffinduzierte Noradrenalin Freisetzung in Prozent bezogen wurde ($S_n/S_0 \cdot 100$). Auf diese Weise konnten auch substanzabhängige Dosiswirkungskurven (DWK) für die NA Freisetzung nach Stimulation oder Wirkstoffbeigabe ermittelt werden, die in % von S₀ angegeben wurden.

2.4.4 Protokolle der Noradrenalin Bestimmung

Protokoll 5: Stimulation renaler Nerven bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen mit 1-15 Hz und Messung der sympathischen Neurotransmission

Eine aufsteigende Stimulationsreihe (S0-S6) mit 1 Hz, 2 Hz, 5 Hz, 7.5 Hz und 10 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40mA) wurde durchgeführt, wobei zeitgleich beginnend mit jeder Stimulation zwei nacheinander folgende 3 min Fraktionen gesammelt wurden, nach denen sich eine Pause von weiteren 5 min anschloss. Nach dieser Pause erfolgte dann die nächst höhere Stimulation und Probensammlung.

Die durch die nervale renale Stimulation hervorgerufene NA Ausschüttung wurde in pg/g Niere ausgedrückt.

Protokoll 6: Stimulation renaler Nerven bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen mit 5 Hz und Messung der sympathischen Neurotransmission mit und ohne Phentolamin

Es erfolgte eine 6 malige Stimulation (S0 – S5) der Nierenerven mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40mA). Nach jeder Stimulation wurden, wie zuvor beschrieben, die beiden Drei-Minuten-Fraktionen gewonnen und anschließend jeweils eine Pause von 5 min eingehalten. Bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und bei den Wildtyp Mäusen gab es je eine Kontrollgruppe, bei der nur eine 5 Hz Stimulation in Reihe, ohne einen weiteren Wirkstoff, durchgeführt wurde.

Im nächsten Teil der Studie wurde jeweils 5 min vor S1 – S5 mit einem Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) mit einer konstanten Rate von 0,158 μ l/min Phentolamin in aufsteigender Konzentration (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M) in die Perfusionsflüssigkeit zugegeben. Die Sammlung der Proben erfolgte dann wieder wie oben beschrieben. Das gewonnene NA der Stimulationen S0 – S5 wurde als pg/g Niere und als % von S0 (S0 = 100%) errechnet und angegeben.

Protokoll 7.1/ 7.2: Konzentrationsfindung Prazosin und Rauwolszin für Protokoll 4

Dieses Protokoll diente zur Absicherung der zuvor ermittelten Prazosin Konzentration. Die Nieren wurden mit einer Frequenz von 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40mA) stimuliert und jeweils zwei Drei-Minuten-Fractionen gesammelt. Dieser erste Wert diente als Kontrollwert. Nachfolgend wurde in der Stabilisierungsphase nach der Stimulation über das Reservoir Prazosin in der zuvor in Protokoll 4.1 ermittelten Konzentration von 30nM mit einer 15 minütigen Vorlaufzeit hinzugefügt. Wieder wurde mit 5 Hz stimuliert und das Eluat in zwei Drei-Minuten-Fractionen gesammelt. Nach einer Pause von 10 min wurde dieser Vorgang wiederholt und anschließend die in Protokoll 4.2 ermittelte Rauwolszin Konzentration mit einer Vorlaufzeit von 5 min über einen Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) zugeführt. Die 5 Hz Stimulation und Sammlung des Eluats wurde ein viertes Mal wiederholt. Das gewonnene NA der Stimulationen S1 – S4 wurde als pg/g Niere errechnet und angegeben.

Auch für die Absicherung der adäquaten Rauwolszin Konzentration mussten noch weitere Vorversuche durchgeführt werden. Hier wurde zuerst eine Kontrollstimulation mit 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40mA) ohne Rauwolszin durchgeführt, bei der zwei Drei-Minuten-Fractionen gesammelt wurden. In der jeweiligen Stabilisierungsphase von 10 min wurde 5 min vor der nächsten 5 Hz Stimulation Rauwolszin in aufsteigender Konzentration über einem Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) hinzugefügt und mit jeder Stimulation wie zuvor die beiden Drei-Minuten-Fractionen gewonnen. Rauwolszin wurde in den Konzentrationen 0,001µM, 0,01µM, 0,1µM und 1µM eingesetzt.

Das gewonnene NA der Stimulationen S0 – S4 wurde als pg/g Niere errechnet und angegeben.

Protokoll 8: Stimulation renaler Nerven bei Wildtyp Mäusen mit 5 Hz und Messung der sympathischen Neurotransmission mit ATP, ohne und mit PPADS

Die erste 5 Hz (30 s, Pulsbreite 1 ms, 40mA) Stimulation wurde als Kontrollwert (S0) mit zwei Drei-Minuten-Fractionen gesammelt. Im nachfolgenden Teil des Protokolls

wurde von der üblichen Vorgehensweise abgewichen, und schon mit Zugabe der ersten ATP Konzentration von 10 μ M wurden die Drei-Minuten-Fractionen gesammelt. Im Anschluss an diese 9 min wurde der 5 Hz Stimulus gesetzt, bei dem wie in den vorherigen Protokollen auch die beiden Drei-Minuten-Fractionen gesammelt wurden. Nach einer 10 minütigen Pause wurde diese Vorgehensweise mit der ATP Konzentration von 100 μ M wiederholt.

In einem zweiten Experiment wurde genau so verfahren, nur wurde vor der Applikation des ATP und der ersten Probensammlung noch PPADS in einer Konzentration von 5.00E-6 und einer Vorlaufzeit von 5 Minuten über einen Perfusor zugegeben.

Auch hier wurde das gewonnene NA der Stimulationen S0 – S4 als % von S0 errechnet und angegeben.

Protokoll 9: Stimulation renaler Nerven bei Wildtyp Mäusen mit 5 Hz und Messung der sympathischen Neurotransmission unter Einfluss verschiedener P₂ Agonisten und Antagonisten

Der Versuchsaufbau entsprach dem in Protokoll 8. Auch hier wurden abweichend von den vorherigen Protokollen drei Fractionen mit Zugabe des Agonisten oder Antagonisten gesammelt und dann wieder zwei Fractionen während der Stimulation. Die benutzten Stoffe wurden alle über einen Perfusor (Braun, Melsungen, BRD) mit einer Flussrate von 0.158 μ l/min der modifizierten Krebs-Henseleit-Lösung zugeführt.

Es wurden folgende Stoffe verwendet:

P_{2Y} - Rezeptor Agonisten in einer Konzentration von 1.00E-5 und 1.00E-4 [ADP, UTP, UDP, 2-Methylthio-ADP]. P_{2X} – Rezeptor Agonisten in einer Konzentration von 1.00E-5 und 1.00E-4 [Alpha, beta-methylen-ATP]

P_{2X} – Rezeptor Antagonisten in einer Konzentration von 1.00E-6 und 1.00E-5 [PPADS, Suramin]

Das im Verlauf der Stimulation S0-S4 freigesetzte NA wurde in % von S0 ermittelt und angegeben.

2.5 Der renale Phänotyp der Wildtyp und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse

Um eine Bewertung des renalen Phänotypus der C57Bl6 (Wildtyp) und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse durchführen zu können wurden diese beiden Stämme hinsichtlich ihrer Serum- und Urinparameter, ihres Blutdruckes und Gewichtes untersucht. Zudem wurden beide Mausstämme jeweils subtotal nephrektomiert, um die Einwirkungen des Knockouts auf den Phänotyp zu beurteilen.

2.5.1 Die Subtotale Nephrektomie als Modell der chronischen Niereninsuffizienz

Die subtotal nephrektomierte Ratte und Maus sind etablierte Modelle zur Untersuchung der chronischen Niereninsuffizienz. Nach operativer Entfernung von 5/6 der Nierenmasse entwickelt sich eine hypertensive, proteinurische Nierenerkrankung, die durch progrediente glomeruläre, tubuläre und vaskuläre Umbauprozesse gekennzeichnet ist (Brenner 1985).

Die Narkose der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse und der Wildtyp Mäuse erfolgte intraperitoneal mit 270mg/kg Pentobarbital (Narcoren, Merial). Das narkotisierte Tier wurde auf dem beheizten OP-Tisch operiert und die Augen der Mäuse wurden mittels Augensalbe (Polyspectran HC, Alcon) vor dem Austrocknen geschützt. Über den Nieren wurde jeweils einen Flankenschnitt gesetzt. Die Haut über der rechten Niere wurde eröffnet, indem zuerst ein ein Zentimeter langer Hautschnitt einen Finger breit hinter dem letzten Rippenbogen gesetzt und dann die Muskulatur darunter stumpf getrennt wurde. Zuerst wurde die rechte Niere komplett entfernt, indem im Hilusbereich eine Ligatur mit einem resorbierbaren Faden gesetzt wurde. Nach Verschluss der Haut und der Muskulatur (Miralene, absorbierbar, 1.5) wurde die Maus vorsichtig gewendet und die Inzision über der linken Niere durchgeführt. Nach Eröffnung der Bauchhöhle durch Trennung der Haut und Muskulatur wurde dann die linke Niere zu zwei Dritteln nephrektomiert. Dafür wurden die beiden Pole der Niere mit resorbierbarem Faden ligiert und mit einer Strabismus-Federschere (gebogen, 11,5, Martin) abgetrennt. Auch hier wurden nun wieder Muskulatur und Haut verschlossen. Die Tiere wurden zum Aufwachen mit einer Rotlichtlampe gewärmt und jedem Tier wurden 1,3 ml NaCl als subkutane Infusion verabreicht.

Zu jeder operierten Gruppe (6x Wildtyp, 6x α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout) gab es eine sham operierte Gruppe (6x Wildtyp, 6x α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout), bei der die

Operation wie oben beschrieben, bis auf die Entnahme des Nierengewebes durchgeführt wurde.

Nach 3 Wochen wurde den Gruppen jeweils Blut entnommen, Puls und Blutdruck gemessen und die Urinparameter bestimmt.

2.5.2 Blutdruck

Die Messung des Blutdrucks erfolgte mit dem Hatteras, SC1000, Blood Pressure Analysis System. Die Mäuse wurden im wachen Zustand in eine Metallbox auf eine auf 38°C angewärmte Platte gesetzt. Die Blutdruckmanschette wurde um den Schwanz nahe am Schwanzansatz gelegt. Nach der Initialisierung des Gerätes erfolgte die Messung. Zuerst erfolgten vier Messphasen, die später nicht in die Auswertung einbezogen wurden, und dann der Zyklus der 10 auszuwertenden Messungen. Die Mäuse wurden im Abstand von drei Tagen dreimal mit diesem Verfahren trainiert und danach erfolgte die eigentliche Messung und Auswertung der Daten.

2.5.3 Gewicht

Das Gewicht der Mäuse wurde auf einer Korona Haushaltswaage genommen. Die gewogenen Mäuse waren alle im Alter von ca. 70 Tagen.

2.5.4 Urinparameter

Die Mäuse wurden jeweils für genau 24 Stunden in einen Stoffwechsellkäfig (Techniplast GmbH, Hohenpeißenberg) gesetzt (Abbildung 10). Wasser und Futter, in Form von Altromin-Standarddiät Maus waren ad libitum zur Verfügung und wurden in den dafür vorgesehenen Fächern platziert. Der in den 24 Stunden aufgefangene Urin wurde mit einer 2ml Spritze aufgenommen, seine Menge bestimmt und der Urin in 15ml Falcontubes überführt. Nach Zentrifugation der abgestandenen Urinprobe in den Falcontubes für 10 min bei 4°C und 3000 U/min wurde der nun von Verunreinigungen befreite Urin abpipettiert. Die Untersuchung des Urins und Bestimmung von Harnstoff, Kreatinin, Na, Cl, K, Eiweiß und Microalbumin wurden im

Routinelabor des Marienhospitals Herne in einem ILab 600, Hitado (Instrumental Laboratories) durchgeführt.



Abbildung 10:
Darstellung eines
Stoffwechselkäfigs
(Techniplast GmbH,
Hohenpeißenberg)

2.5.5 Blutentnahme und Serumparameter

Die Narkose der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse und der Wildtyp Mäuse erfolgte intraperitoneal mit 270mg/kg Pentobarbital (Narcoren, Merial).

Der Kopf der Tiere wurde mit Daumen und Zeigefinger fixiert und durch einen leichten Druck auf die Gegenseite der Bulbus aus seiner Höhle hervorgehoben. Mit der Pasteurpipette (lang, 230mm, Assistent), an deren Spitze man einen kleinen Tropfen Heparin (Liquemin N 25000, Roche, Germany) applizierte, wurde nun in den medialen Augenwinkel eingegangen und der retroperitoneale Venenplexus durchstoßen. Durch waagrechtes Halten der Pipette füllte sich diese nun mit Blut, welches dann in einem 1,5-ml-Eppendorfgefäß, in dem sich ein Tröpfchen Heparin befand, entleert wurde. Die Tubes wurden gekühlt auf Eis aufbewahrt. Etwa 0,4 ml Blut wurden so pro Tier entnommen. Nach Zentrifugation der abgestandenen Blutprobe in dem 1,5-ml-Eppendorfgefäß für 10 min bei 4°C und 3000 U/min wurde

das überstehende Plasma entnommen und für die Bestimmung von Kreatinin, Harnstoff, Ca^{2+} , K^+ und Na^+ Parameter verwendet.

Die Untersuchung des Serums wurde im Routinelabor des Marienhospitals Herne in einem ILab 600, Hitado (Instrumental Laboratories) durchgeführt.

2.5.6 Histologie

Die für die Histologie entnommenen Nieren wurden über Nacht in Paraformaldehyd (PFA) (4%ig) gelagert und fixiert. Nach der Entwässerung des Nierengewebes, welches in eine Einbettkassette gelegt wurde, in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70, 80, 96, 100 % für je 1 Stunde), wurden die Nieren je eine weitere Stunde in Xylol1 und 2 verbracht. Mit Hilfe eines Einbettautomaten (Leica TP1020) wurden die Proben in Paraffin (Histowax) eingebettet und in der Gießstation (Leica EG 1160) in frischem Paraffin eingeblockt. Mit einem Paraffinmikrotom (Leica RM 2155) wurden von den Paraplastblöckchen Serienschnitte in einer Dicke von 8 μm angefertigt. Diese wurden in einem handwarmen Wasserbad mit einem Pinsel gestreckt und danach auf einen beschichteten Objektträger (Super Frost Plus) aufgebracht. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurden die Objektträger bis zur Färbung gelagert.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung:

Bei dieser Färbemethode werden Zellkerne blau und cytoplasmatische Bestandteile rosa bis rot gefärbt.

Nach der Entparaffinierung mit Xylol wurden die Objektträger in eine absteigende Alkoholreihe (Isopropanol 100, 90, 80 %) verbracht und anschließend fließend gewässert. Danach erfolgten die Kernfärbung 3 Minuten mit Hämatoxylin-Lösung und anschließend eine Spülung mit Leitungswasser. Nach einer kurzen Spülung mit Aqua dest. wurde die Plasmafärbung 2 Minuten mit 1%igem Eosin durchgeführt. Danach wurden die Objektträger erneut kurz mit Aqua dest. abgespült. Nun erfolgte die Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (Isopropanol 70, 80, 90, 100 %). Anschließend wurden die Schnitte mit Xylol behandelt und zum Schluss mit Entellan (Schnelleindeckmittel, Merk) betropft und mit Deckgläsern versehen.

2.6 Geräte und Materialien

2.6.1 Materialien für die Tierhaltung

Zuchttiere

Charles River Deutschland GmbH, D-Sulzfeld (Wildtyp)

L. Hein, Abteilung für Pharmakologie, Universität Würzburg (α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse)

Max Delbrück Institut in Berlin, Germany (AT₂ +/y und AT₂-/y Knockout Mäuse)

Käfige

Makrolon, Typ II L, Charles River Deutschland GmbH, D-Sulzfeld

Einstreu und Futter

Altromin-Tiereinstreu-Granulat und

Altromin-Standarddiät Maus und Ratte (Altromin GmbH und Co. KG, D-Lage-Lippe)

2.6.2 Isoliert perfundierte Niere und Noradrenalin Messung

Operationsbesteck

Mosquitoklemme (Martin, gebogen und gerade, 12,5cm)

Mini-Gefäßclip (nach Biemer, 9mm, Martin)

Feine Schere (gerade, 11,5 cm, Martin)

Strabismus-Federschere (gerade und gebogen, 11,5 und 11 cm, Martin)

Anatomische Pinzette, Mini-Adson, (12 cm, Martin)

Anatomische Pinzette (fein, gebogen, 10,5 cm, Martin)

Nahtmaterial

Seide, 1 EP, Serag Wiessner

Narkose

Pentobarbital (Narcoren, Merial)

Operationsmikroskop

Olympus, SD 30, Japan

OP-Tisch

Eigenanfertigung der feinmechanischen Werkstatt der Ruhr-Universität-Bochum,
beheizbar auf 35°C

Anlage der isoliert perfundierten Niere

Doppelwand-Glasbehälter als Reservoir

(Reservoir Jacketed for Buffer, HSE)

Doppelwand-Glasbehälter zur Erwärmung der Nieren

(Schuler Tissue Vessel jacketed, HSE)

Wärmebad mit Pumpe

(Umwälzthermostat DC10-P5/U, Roth)

Perfusionspumpen

(Harvard Pump 11Plus Dual Syringe, HSE und Braun, Melsungen, BRD)

Statham P23 Db Druckaufnehmer

(Gould Inc., Oxnard, Kalifornien, USA)

Planetengeführten Pumpe

(Abimed, Gilson, Minipuls2, Langenfeld, BRD)

Bipolare Platinelektrode

(Eigenanfertigung der Feinmechanischen Werkstatt der Ruhr-Universität-
Bochum)

Stimulator

(Typ 21512, HSE, Electronics, March, BRD)

Watanabe Schreiber

(Graphtec Corp., Tokyo, Japan)

Kalibriergerät

(KAL84, Erwin Halstrup Multur GmbH, Kirchzarten, BRD)

Filter

(0,45 µm, Millex-AA, Millipore, F)

Probensammler

(LKB, Bromma, Schweden)

Polyethylenschläuche zum Kanülieren

Portex, Kent, UK; Innendurchmesser 0.40 mm, Außendurchmesser 0.80 mm

Portex, Kent, UK; Innendurchmesser 0.28 mm, Außendurchmesser 0.61 mm

Detektion des NA in der HPLC

Pumpe (Waters 600 Controller, Probengeber (Waters 717 plus Autosampler),

Detektor (Waters 460 Electrochemical Detector),

Vorsäule (Waters Guard-Pack, Reslove™ C18),

Säule (WiCom, Prontosil, 120-5-C18 AQ 5,0 µm).

Weitere Geräte und Materialien

Feinwaage (Model Sartorius, BP 12 1 S)

Schieblehre (Elektrische Schieblehre, Pearl)

2.6.3 Geräte zur Bestimmung des renalen Phänotyps

Geräte und Materialien

Blutdruckmessgerät (Hatteras, SC1000, Blood Pressure Analysis System)

Urin/Serumanalyse (ILab 600, Hitado, Instrumental Laboratories, Shimadzu Corp)

Stoffwechsellkäfige (Techniplast GmbH, Hohenpeißenberg)

Waage (Korona, D-Langöns)

Einbettautomaten (Leica TP1020)

Gießstation (Leica EG 1160)

Paraffinmikrotom (Leica RM 2155)

Wärmeschrank Heraeus GmbH & Co. KG, D-Hanau

Subtotale Nephrektomie

Feine Schere (gerade, 11,5 cm, Martin)

Anatomische Pinzette, Mini-Adson, (12 cm, Martin)

Anatomische Pinzette (fein, gebogen, 10,5 cm, Martin)

Strabismus-Federschere (gebogen, 11,5, Martin)

Miralene (resorbierbar, 1.5, Braun)

Augensalbe (Polyspectran HC, Alcon)

2.6.4 Verbrauchsmaterialien und Chemikalien

Verbrauchsmaterial

Deckgläser Menzel-Gläser, D-Braunschweig

Objektträger Super Frost Plus; Menzel-Gläser, D-Braunschweig

1,5-ml-Eppendorfgefäß

14ml Falcontubes

Pasteurpipette (lang, 230mm, Assistent)

2, 5 und 10 ml Spritzen

Tupfer

Die Krebs-Henseleit-Lösung

NaCl (Merck, Darmstadt, BRD)

KCl (Merck)

CaCl₂ (Merck)

MgSO₄ (Merck)

NaCO₃ (Merck)

KH₂PO₄ (Merck)

D (+)Glucose (Merck) 11.1;

L(+)-Ascorbinsäure (Riedel-de-Haen, Selze, BRD)

Na₂EDTA (Merck) 0.067.

Die Lösungen hatten einen pH zwischen 7.38 und 7.41 und wurden bei einer Temperatur von 37°C mit Carbogen (95% O₂, 5% CO₂) kontinuierlich begast.

Aufbereitung der Proben

Noradrenalin-HCL (Recoveries, Sigma, Germany)

DHBA (Chromsystems, DHBA, 12 pg/µl)

HCl (1 M, Merk)

EDTA (0.067 M, Sigma)

Na₂SO₃ (J.T.Baker, Holland)

Tris-Puffer (1 M, pH 10)

Al₂O₃ (ClinRep, Recipe, München, Germany)

Perchlorsäure (0.1 M)

Mobile Phase

NaHPO₄ (15 mM, J.T. Baker),
Citronensäure (30 mM, Merk),
Na₂EDTA (2 mM, J.T. Baker),
(-)-Natriumoctylsulfonat (2.77 mM, MP Biomedicals, LLC, Ohio)
Methanol 12% (V/V, J.T.Baker)
NaOH (10 M, Merk)

Chemikalien die bei Druck und NA Ausscheidungsversuchen verwendet wurden:

Kokain HCl (Merk, Darmstadt, Deutschland)
Cortikosteron (Calbiochem, USA)
(±)-Noradrenalin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)
PPADS (Pyridoxal-phosphate-6-azophenyl-2',4'-disulfonate)
Phentolamin, Rauwolszin, Prazosin, ATP (Sigma, Germany)
ADP, UTP, UDP, 2-Methylthio-ADP, alpha, beta-methylen-ATP, Suramin (Sigma, Germany)
Ethanol (Riedel-de-Haen, Selze, BRD)

Alle Substanzen wurden in bidestilliertem Wasser gelöst und anschließend mit Krebs-Henseleit-Lösung verdünnt, ausgenommen Cortikosteron (Ethanol 100%).

Weitere Chemikalien

MgCl₂ (Roche)
Entellan, Schnelleindeckmittel (Merk, D-Darmstadt)
Eosin (Chroma, D-Waldeck)
Ethanol (Merck, D-Darmstadt)
Paraformaldehyd (4%ig, Roche)
Hämatoxylin (Histocom, Wien, Österreich)
Histowax Paraffin (Reichert-Jung, D-Heidelberg)
Isopropanol 30 %, 50 %, 60 %, 70 % (Merck, D-Darmstadt)
Xylol (Merck, D-Darmstadt)
Heparin (Liquemin N 25000, Roche)

2.7 Statistik

Die Anzahl der Experimente pro Gruppe ist mit n aufgeführt. Zur statistischen Auswertung wurden bei allen Tiergruppen die Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) berechnet. Mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Plot der Firma Systat Software Inc., Point Richmond, USA, wurden durch ungepaarten Student`s T-Test und, je nach Graphik, zusätzlich durch zweifaktorielle ANOVA Signifikanzen ermittelt. Differenzen mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galten als signifikant. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte durch die Bildung von homogenen Gruppen. Die Anzahl der Experimente steht für die Anzahl der einzelnen Nieren.

3. Ergebnisse

3.1 Tierzahlen und Geschlecht

Insgesamt gingen die Daten von 203 Nieren in die Arbeit ein. Die Erfolgsquote der funktionstüchtigen Nieren bei der Präparation der isoliert perfundierten Niere war sehr groß, so dass insgesamt nur 15 % mehr als die in die Studie eingehenden Nieren operiert werden mussten. Es wurden bei allen Tierstämmen nur männliche Tiere verwendet, um geschlechtsbedingte Einflüsse auszuschließen.

3.2 Druckveränderungen und Neurotransmission bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich zu Wildtyp Tieren

Sowohl die Nieren der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse als auch die der Wildtyp Tiere wurden, wie zuvor beschrieben, isoliert und mit modifizierter Krebs-Henseleit-Lösung perfundiert. Die Effekte einer Stimulation dieser Nieren mit einer aufsteigenden Stimulationsreihe von 1 -15 Hz auf die Druckantwort und die durch die elektrische Reizung hervorgerufene sympathische Neurotransmitter Freisetzung in Bezug auf Noradrenalin wurden gemessen. Weiterhin wurde überprüft, ob nach einer Stimulation mit 5 Hz in Reihe eine Kontinuität in der Druckantwort bestand und in wie weit der α -Adrenozeptor Blocker Phentolamin eine Veränderung der NA Freisetzung bewirkte. Der Unterschied, den eine Phentolaminbeigabe bei Stimulation mit niedrigen und hohen Frequenzen bewirkte, wurde zudem mit einer Substitution von PPADS, einem nicht-selektiven P_2X -Blocker, untermauert.

Ein weiterer Teil dieser Studie sollte eine Einwirkung des adrenergen Systems auf das purinerge System aufdecken. Dieser Effekt wurde durch eine Kombination des α_1 -Blockers Prazosin mit dem α_{2A} -Blocker Rauwolszin untersucht. Zuvor mussten für die beiden Stoffe die adäquat wirkenden Konzentrationen ermittelt werden. Besonderes Augenmerk wurde hier vor allem auf eine gesteigerte NA Freisetzung gelegt, da diese als Index für die präsynaptische Wirkung herangezogen wurde.

Im letzten Teil der Untersuchung des adrenergen Systems wurde die Wirkung von exogen appliziertem ATP auf die NA-Freisetzung dargestellt und der Einfluss anderer purinergener Agonisten und Antagonisten untersucht.

Der durch die Perfusion verursachte basale Nierendruck der WT-Nieren lag im Durchschnitt bei $46,04 \pm 17,04$ mmHg und der Druck der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout-Nieren bei $47,42 \pm 21,48$ mmHg.

3.2.1 Druckantworten bei α -Adrenozeptor Agonisten

Das in diesem Teil der Studie exogen verabreichte NA, ein nicht selektiver α -Adrenozeptor Agonist, wurde in einer aufsteigenden Konzentrationsfolge von 0.03 μ M, 0.1 μ M, 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M und 10 μ M appliziert und führte zu einer Dosis-Wirkungs-Kurve (Protokoll 1). Die durch das exogene NA entstandene Druckantwort wurde sowohl für die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse als auch für Wildtyp Mäuse in % der Druckantwort auf KCl Gabe (% von KCl) angegeben und ausgewertet (Abbildung 11).

Wirkung von exogenem Noradrenalin auf die renale Druckantwort (Na-DWK)

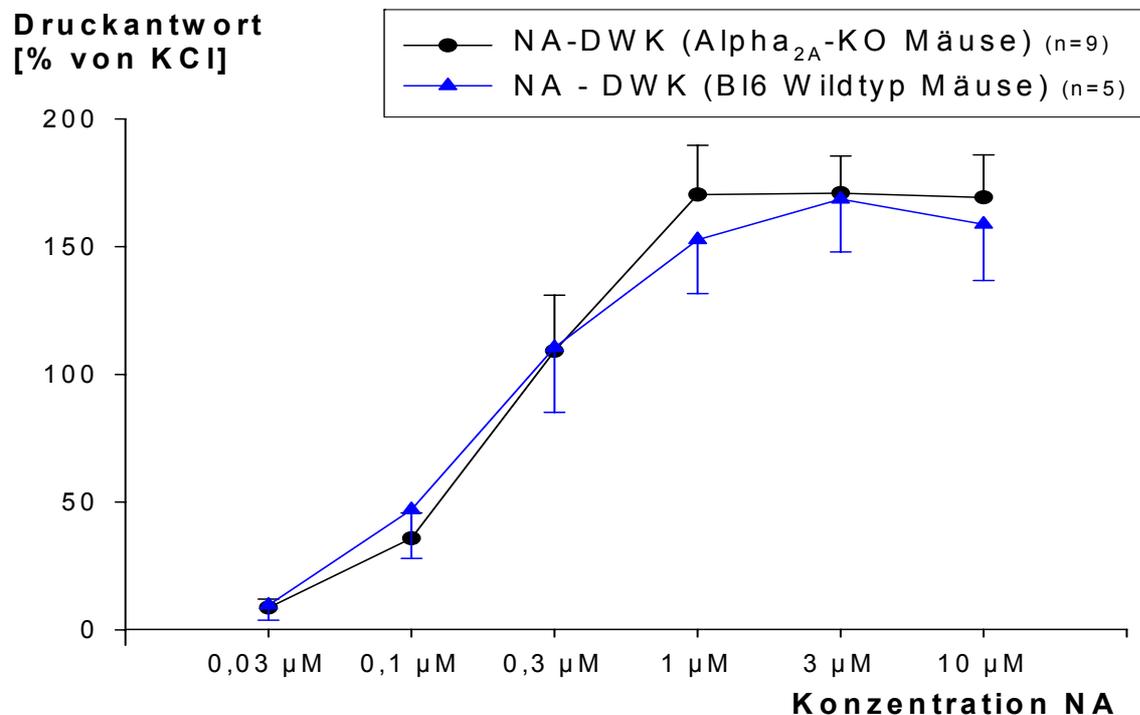


Abbildung 11: Die durch exogene Applikation von NA entstandenen Dosis-Wirkungs-Kurven bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen (n=9) wurde mit denen von Wildtyp Mäusen (n=5) verglichen und die hervorgerufenen Veränderungen in der Druckantwort wurden aufgezeichnet. Die Druckveränderungen bei beiden Mausstämmen wurden in % von KCl angegeben. Man konnte keinen Unterschied in der Druckantwort von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich zu den Wildtyp Mäusen erkennen (Daten angegeben mit MW und SD).

Man konnte erkennen, dass es keine unterschiedliche Druckantwort auf exogen appliziertes NA bei den beiden Stämmen gibt. (EC_{50} - Werte für NA: α_{2A} - KO Mäuse: 0,25 μ M; WT Mäuse: 0,24 μ M) (Abbildung 11).

Weiterhin wurde Methoxamin, ein α_1 -Adrenozeptor Agonist, in einer aufsteigenden Konzentrationsfolge von 0.3 μ M, 1 μ M, 3 μ M, 10 μ M, 30 μ M, 100 μ M und 300 μ M appliziert. Die durch das exogene Methoxamin entstandene Druckantwort wurde sowohl für die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse und die Wildtyp Mäuse in % von KCl angegeben (Abbildung 12). Es kam zu keinem signifikanten Unterschied in der Druckantwort.

Wirkung von Methoxamin auf die renale Druckantwort

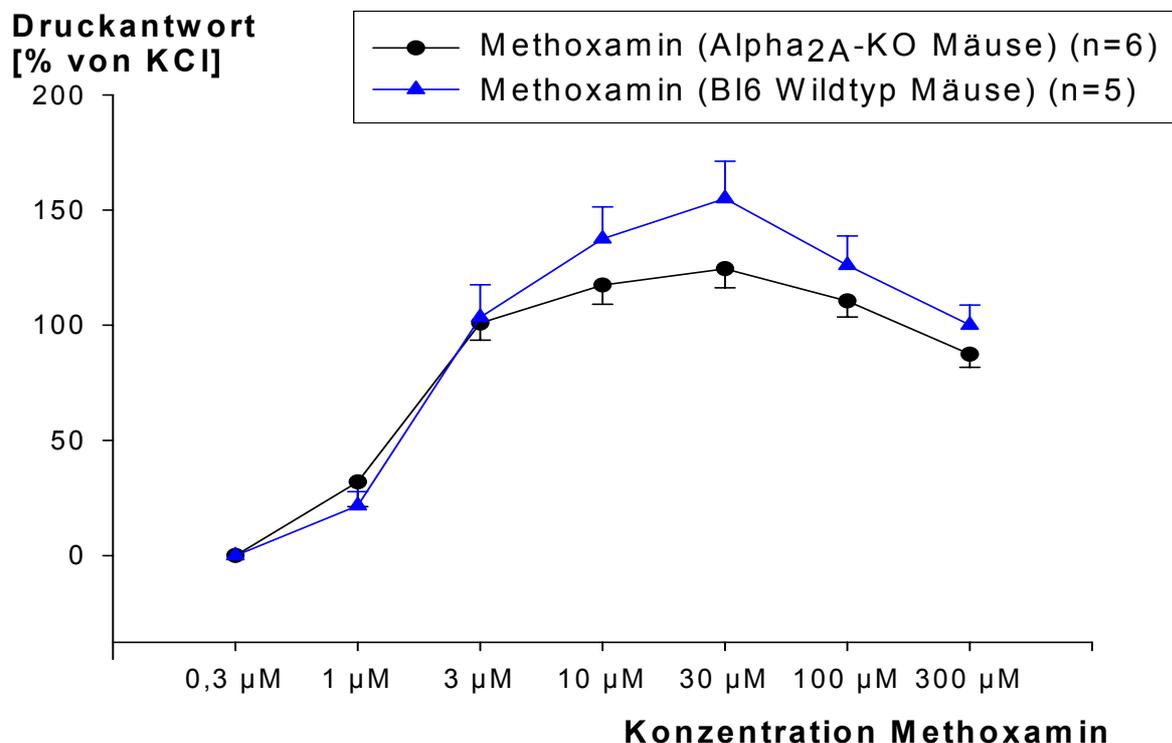


Abbildung 12: Die durch exogene Applikation von Methoxamin entstandenen Dosis-Wirkungs-Kurven bei α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse (n=6) wurde mit denen von Wildtyp Mäusen (n=5) verglichen und die hervorgerufenen Veränderungen in der Druckantwort wurden aufgezeichnet. Die Druckveränderungen bei beiden Mausstämmen wurden in % von KCl angegeben. Es lag kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Druckantworten von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen vor (Daten angegeben mit MW und SD).

Exogen verabreichtes UK14,304, ein α_2 -Adrenozeptor Agonist, war nicht in der Lage bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen oder den Wildtyp Mäusen eine Druckantwort auszulösen (Daten nicht aufgeführt).

3.2.2 Druckantwort der Nieren bei einer elektrischen Stimulation renaler Nerven

Die durch eine renal nervale Stimulation induzierte Druckantwort der Nieren nach einem elektrischen Reiz von 1 Hz, 2 Hz, 5 Hz, 7.5 Hz, 10 Hz und 15 Hz stieg abhängig von der steigenden Frequenz bei beiden Maustypen an (Protokoll 2). Zur Veranschaulichung der experimentellen Durchführung wird hier die Originalkurve der Druckmessung angegeben (Abbildung 13).

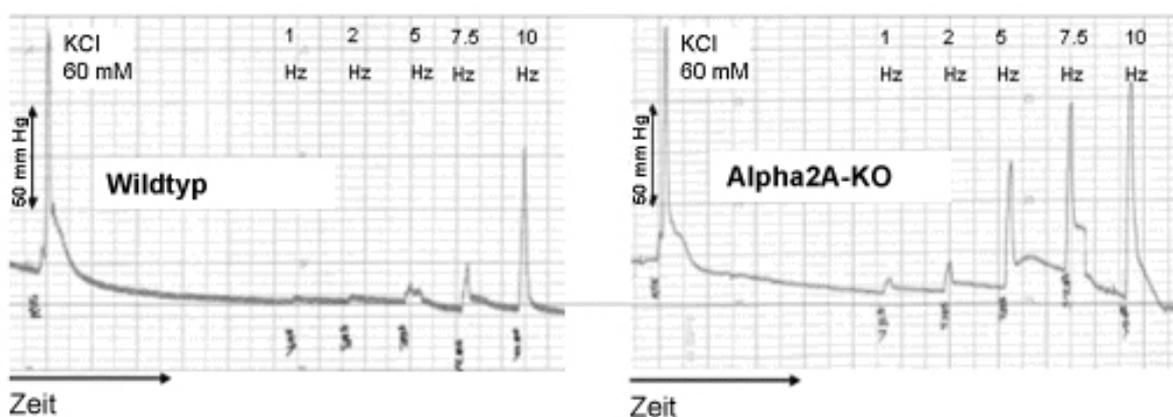


Abbildung 13: Renale Vasokonstriktion nach einer Stimulation der Nierenerven mit 1 -15 Hz und einer vorherigen Applikation von KCl zur Funktionstestung.

Schon bei der niedrig frequenten Stimulation war ein deutlicher Unterschied der Druckausschläge bei den Wildtyp Mäusen im Vergleich zu den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen zu erkennen. Bei der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Maus waren die Peaks signifikant höher als bei der Wildtyp Kontrollgruppe (Abbildung 14).

Effekte der Nervenstimulation (RNS) von 1-15 Hz auf die renale Druckantwort

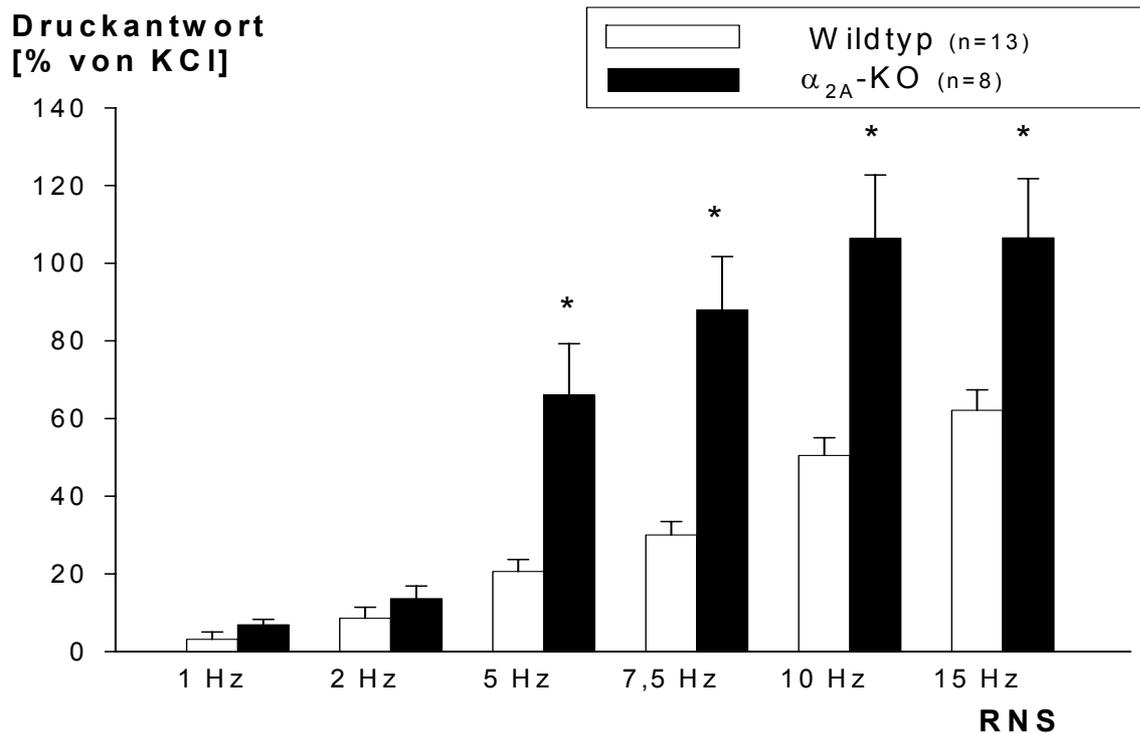


Abbildung 14: Darstellung der renalen nervalen Stimulation in der isoliert perfundierten Mausnieren mit 1-15 Hz. Die induzierte Druckantwort der Wildtyp Mäuse (n=13) wird mit der der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse (n=8) verglichen. Die entstandene Druckantwort wird in % von KCl ausgedrückt. Die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse zeigen eine signifikant größere Steigerung der Druckantwort auf die aufsteigenden Stimulationen als die Wildtyp Mäuse (*P<0.05). Die Daten werden als MW mit SD angegeben.

3.2.3 Neurotransmission nach Stimulation renaler Nerven mit 1-15 Hz

Auch die durch eine nervale renale Stimulation der Nieren hervorgerufene NA Ausschüttung stieg mit Zunahme der Stimulationsfrequenz in beiden Mausarten abhängig von der Frequenzhöhe an. Wieder konnte eine signifikant höhere Steigerung bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen nachgewiesen werden. Die Ergebnisse der Messungen wurden in pg/g Niere angegeben (Abbildung 15).

Neurotransmission nach renaler Nervenstimulation (RNS) mit 1- 15 Hz

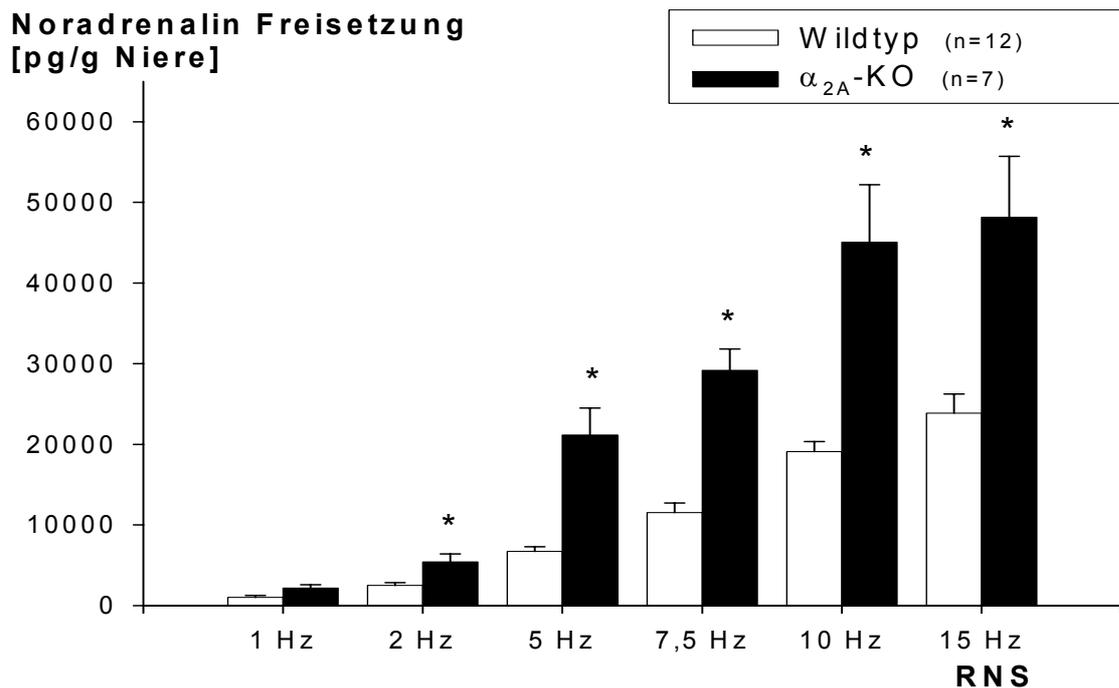


Abbildung 15: Die Abbildung zeigt die NA Freisetzung nach einer renalen nervalen Stimulation von 1-15 Hz in Wildtyp (n=12) und α_{2A} -Adrenoceptor-Knockout Mäusen (n=7). Die NA Ausschüttung wurde mit der HPLC bestimmt und in pg/g Niere angegeben (Daten als MW mit SD). Wie auch bei den Druckmessungen ist die NA Freisetzung bei der α_{2A} -Adrenoceptor-Knockout Maus signifikant höher, teilweise bei den höheren Stimulationen sogar doppelt so hoch im Vergleich zu der Wildtyp Maus (*P<0.05).

3.2.4 Neurotransmission nach Stimulation renaler Nerven mit und ohne α -Adrenozeptorblockade

Vor dem eigentlichen Experiment mit Phentolamin, einem nicht selektiven α -Adrenozeptor Antagonist, wurden Kontrollmessungen mit Nieren von Wildtyp und von Alpha_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäusen durchgeführt. Hierzu wurden die Nieren sechs Mal hintereinander mit 5 Hz stimuliert. Bei den Kontrollgruppen beider Stämme führte eine wiederholte Stimulation renaler Nerven mit 5 Hz zu konstanter und vergleichbarer Freisetzung des Neurotransmitters NA als Antwort auf jede der durchgeführten Stimulationen (Abbildung 16).

Renale Nervenstimulation mit 5 Hz in Reihe und der Effekt auf die Freisetzung von NA in der Kontrollgruppe

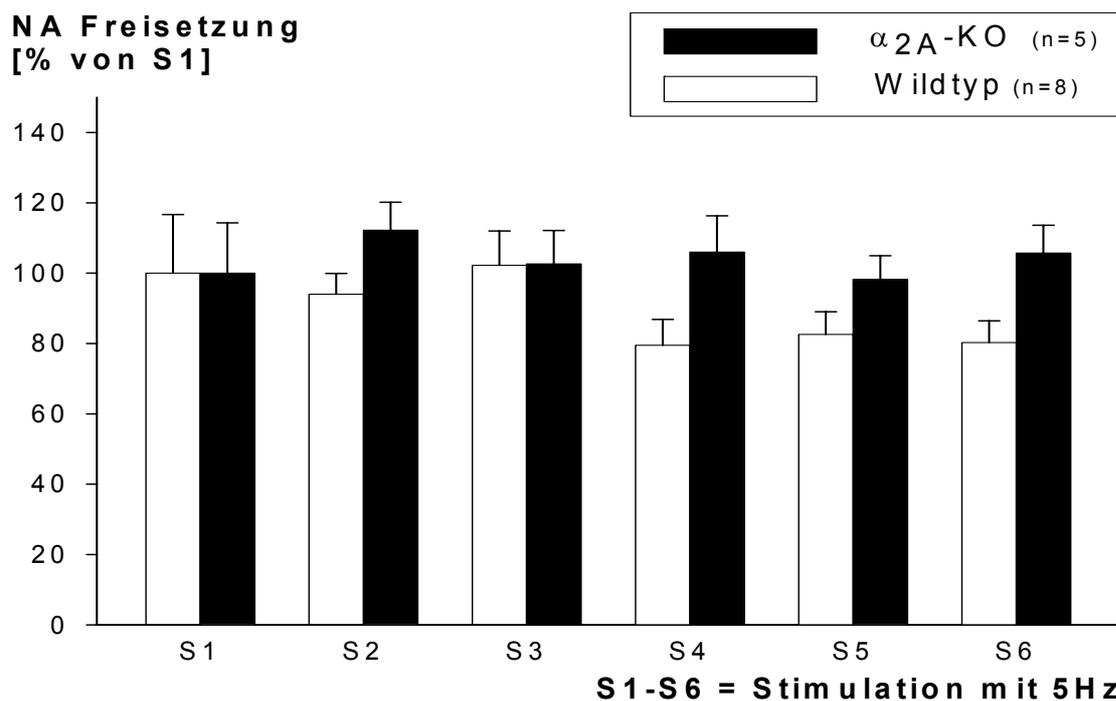


Abbildung 16: Dieses Schaubild zeigt die Kontrollstudie. Die Nieren von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen (n=5) und Wildtyp Mäusen (n=8) wurden sechs Mal hintereinander mit 5 Hz stimuliert und die gemessene NA Freisetzung wurde in % von S1 aufgeführt. Nach einer Stimulation in Reihe mit der gleichen Hz Zahl konnten keine signifikanten Veränderungen zwischen den einzelnen elektrischen Reizen bezogen auf S1 festgestellt werden (Daten als MW mit SD). Dies war sowohl bei den Nieren der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen, als auch bei den Wildtyp Mäusen der Fall.

Bei den Wildtyp Mäusen konnte man einen leichten Abfall der NA Freisetzung zur letzten Stimulation hin (S6) feststellen. Allerdings war dieser Abfall statistisch nicht signifikant im Vergleich zu S1.

Im nächsten Teil der Studie, in dem es um die präsynaptische Wirkung des Rezeptors ging, wurde bei gleichem Versuchsablauf eine ansteigende Konzentration (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M) von Phentolamin dem Perfusionsmedium hinzugefügt, welcher zu einer konzentrationsabhängigen Steigerung der Freisetzung von NA führte (Abbildung 17).

Renale Nervenstimulation mit 5 Hz in Reihe und der Effekt auf die Freisetzung von NA unter Einwirkung von mit Phentolamin

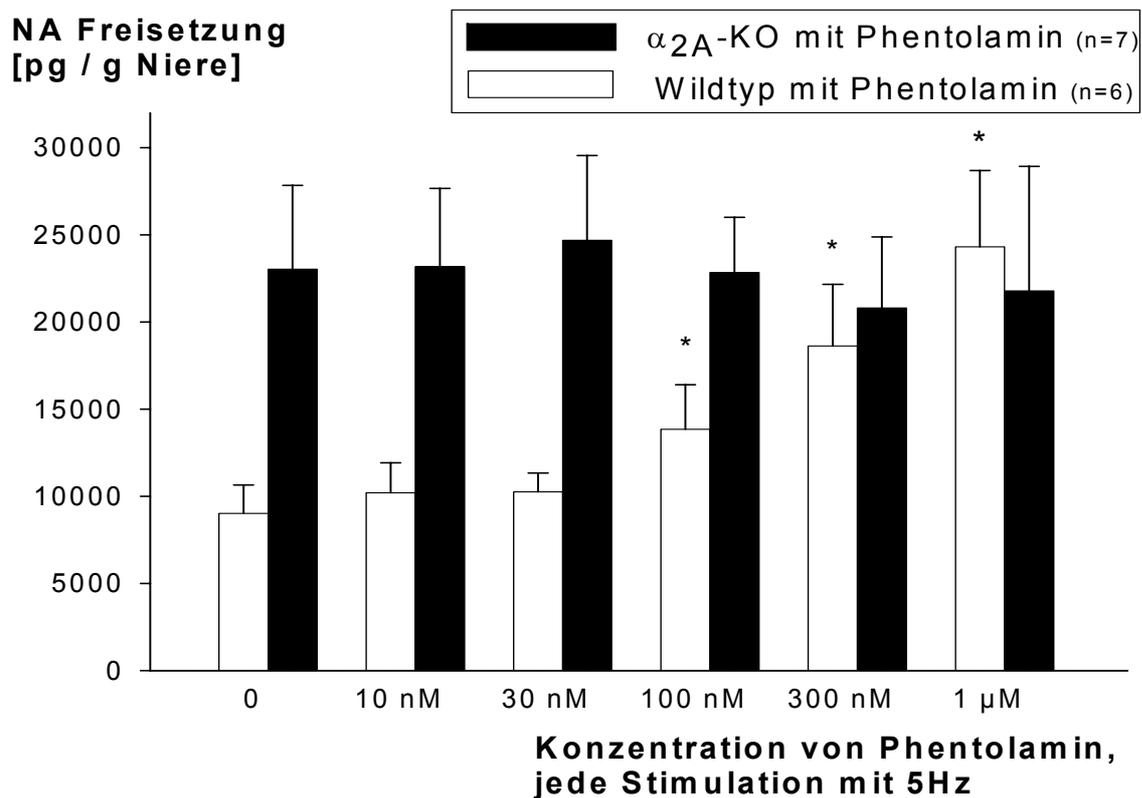


Abbildung 17: Die Nieren der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse (n=7) und der Wildtyp Mäuse (n=6) wurden sechs Mal in Reihe mit einer Frequenz von 5 Hz stimuliert. Im Verlauf der wiederholten Stimulation wurde der nicht selektive α -Adrenozeptor Blocker Phentolamin in aufsteigender Konzentration (10 nM, 30 nM, 100 nM, 300 nM, 1 μ M) unmittelbar vor jeder Stimulation hinzugefügt. Die NA Freisetzung wurde im Eluat mit der HPLC gemessen und in pg/g Niere dargestellt. Man konnte keine signifikanten Veränderungen der NA Ausschüttung

nach einer Stimulation in Reihe bei den Nieren der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse in Kombination mit Phentolamin nachweisen. Bei den Wildtyp Tieren hingegen steigerte der nicht selektive α -Adrenozeptor Blocker Phentolamin die durch nervale Stimulation ausgelöste NA Freisetzung konzentrationsabhängig um bis zu 350% verglichen mit der Kontrolle (*P<0.05). Dieser maximal erreichte Level der NA Ausscheidung bei der Wildtyp Maus war genauso hoch wie die Standardfreisetzung der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Maus.

Je höher die Konzentration an hinzugefügtem Phentolamin war, desto größer war die ausgeschüttete NA Menge bei den Wildtyp Mäusen. Bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen hingegen bewirkte die Applikation dieses nicht selektiven α -Adrenozeptor Blockers keine Veränderung der Noradrenalin Freisetzung (Abbildung 17).

Der Basalwert der NA Freisetzung lag bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen sehr viel höher als bei den Wildtyp Mäusen. Erst mit Zugabe des α -Adrenozeptor Blockers Phentolamin in seiner höchsten Konzentration erreichte auch die NA Freisetzung der Wildtyp Maus Werte, die denen der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse gleichzusetzen sind.

3.2.5 Druckantwort nach Stimulation renaler Nerven mit 1-15 Hz nach einer Blockade von α - und P_2 -Adrenozeptoren

Es erfolgte eine aufsteigende Stimulationsabfolge (1, 2, 5, 7.5, 10, 15 Hz) mit einer konstanten Phentolaminkonzentration von 1 μ M. Wie schon zuvor in anderen Einzelexperimenten beobachtet, kam nach einer Stimulation von 1 und 2 Hz unter der Einwirkung von Phentolamin kaum eine Änderung der Druckantwort der Nieren zustande. Die mit der Schieblehre ausgemessenen Druckveränderungen wurden hier in % von KCl angegeben (Abbildung 18).

Druckantwort nach renaler Nervenstimulation (RNS) mit 1-15 Hz bei Wildtyp Mäusen
nach der Applikation von Phentolamin und PPADS

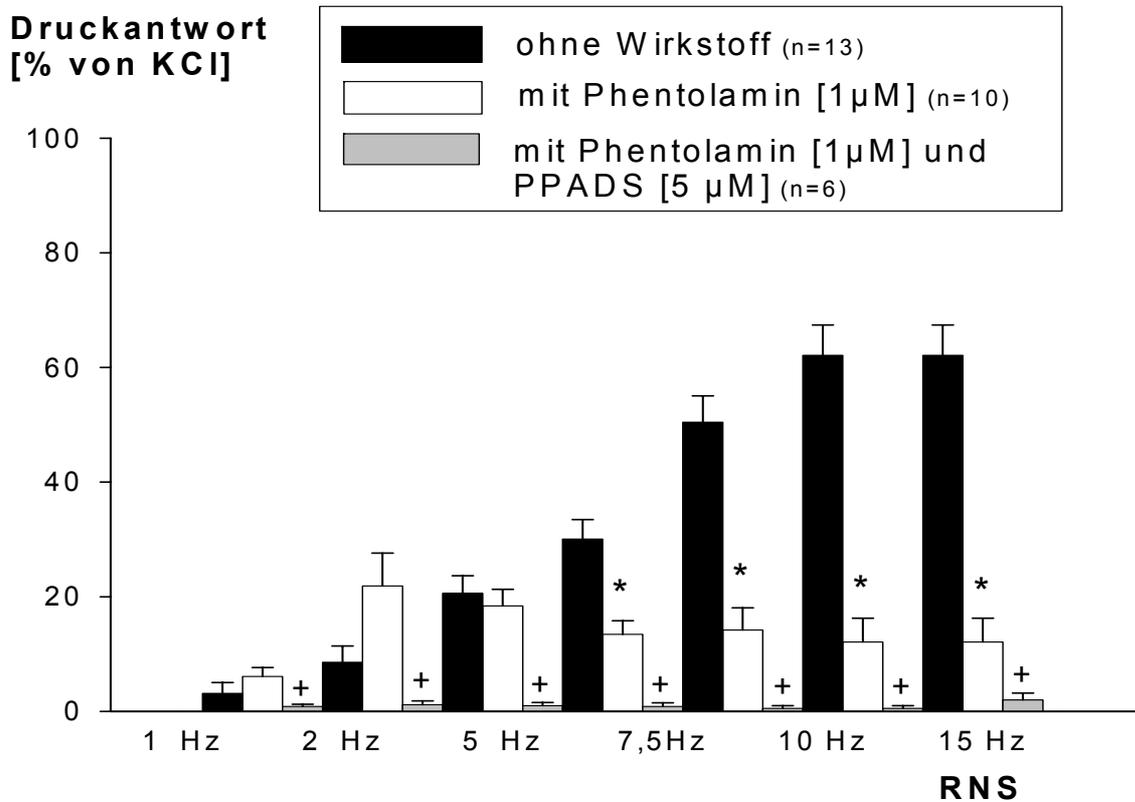


Abbildung 18: Diese Abbildung zeigt den Effekt von Phentolamin (1 μM) und PPADS (5 μM) während einer kontinuierlich gesteigerten renalen Nervenstimulation mit 1-15 Hz bei Wildtyp Mäusen. Die Druckantwort, welche in % von KCl (MW mit SD) ausgedrückt wurde, stieg abhängig von der Höhe der Stimulationsfrequenz bei den Wildtyp Mäusenieren (n=13). Phentolamin hatte scheinbar kaum einen Effekt nach einer Stimulation mit 1 und 2 Hz. Ab einer Stimulationsstärke von 7,5 Hz bewirkt Phentolamin einen signifikanten Abfall, der durch eine renale nervale Stimulation hervorgerufenen Druckantwort (n=10) (*P<0.05). Mit dem nicht-selektiven P₂X-Blocker PPADS und Phentolamin in Kombination konnte die Druckantwort im Vergleich zu der Gruppe ohne Wirkstoff komplett geblockt werden (n=6) (+P<0.05).

Nach einer weiteren Erhöhung der Frequenz der Stimulationsschritte führt das Phentolamin zu einer Absenkung der Druckantwort der Nieren, die sich je nach Steigerung der Frequenz verstärkte. Die Druckveränderung wurde in % von KCl dargestellt (Abbildung 18).

In der nächsten Phase der Studie wurde PPDS, ein nicht-selektiver P₂X Blocker, zusätzlich in einer Konzentration von 5µM eingesetzt. Die Kombination von Phentolamin und PPADS führte dann zu einem kompletten Verlust der Druckantwort (Abbildung 18).

3.2.6 Druckantwort nach Stimulation renaler Nerven mit 1 und 2 Hz nach einer Blockade von α-Adrenozeptoren

Um diese Versuchsreihe optimal gestalten zu können, mussten erst eine Reihe von Vorversuchen zur Bestimmung der nötigen Prazosin und Rauwolszin Konzentrationen durchgeführt werden.

Prazosin, der α₁-Blocker, sollte in einer Dosierung eingesetzt werden, in der er einen guten und gesicherten postsynaptischen Effekt hatte und die adrenerge Antwort, also die Wirkung des NA, blockierte, aber noch keine präsynaptische Beeinflussung zeigte. Hierzu wurden die durch die Gabe von exogen appliziertem NA (30nM, 100nM, 300nM, 1µM, 3µM, 10µM) erstellten Dosis-Wirkungs-Konstanten mit verschiedenen Konzentrationen Prazosin (10µM, 30nM, 100nM, 300nM) versetzt. Die Konzentration von 30nM bewirkte schließlich eine optimale Blockade. Eine gut exogen wirksame Konzentration des NA von 1µM wurde durch diese Prazosin Konzentration komplett geblockt (Abbildung 19).

Vorexperiment Prazosinkonzentration, Dosis-Wirkungs-Kurve

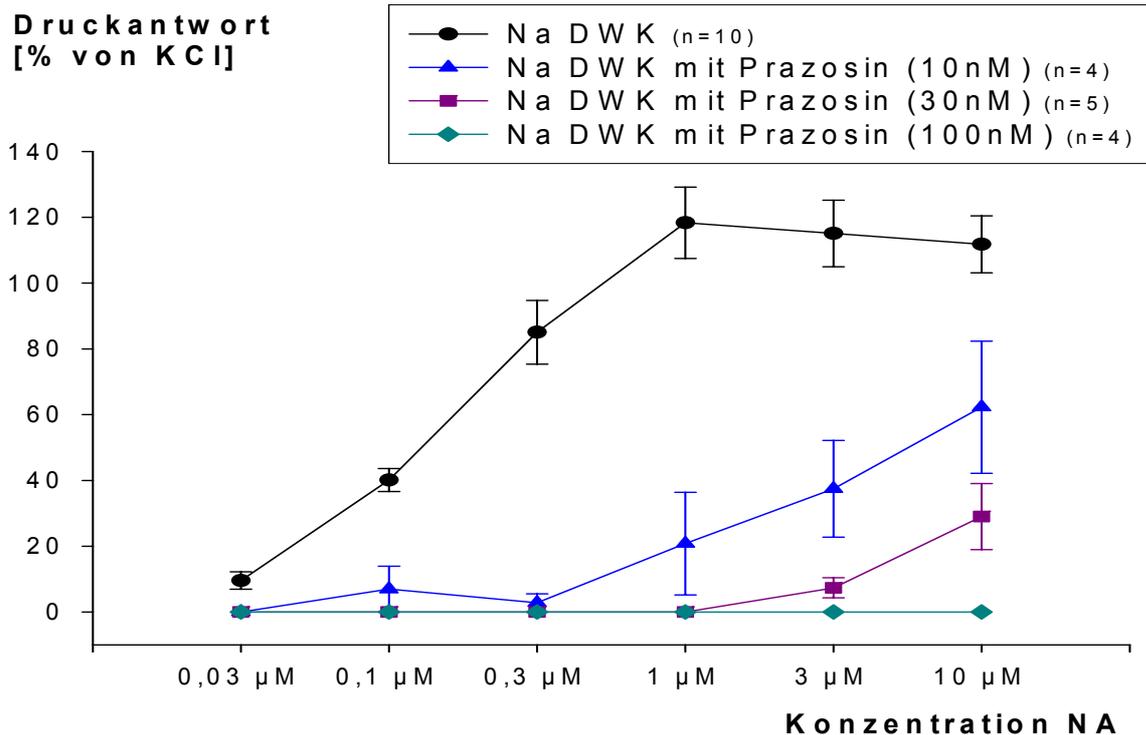


Abbildung 19: Dosis-Wirkungs-Kurve von NA (Wildtype n=10) mit Prazosin (10nM n=4, 30nM n=5 und 100nM n=4) zeigt eine Verringerung der Druckantwort der Wildtyp Maus Niere. Diese wird in dieser Abbildung als % von KCl angegeben. NA wurde bei dieser Studie kumulativ alle drei Minuten der Perfusionslösung zugesetzt. Die entsprechende Prazosin Konzentration war der Lösung 20 Minuten vor Versuchsbeginn zugesetzt worden. Die Prazosin Konzentration von 30nM war in diesem Versuchsansatz die optimal postsynaptisch wirksame Dosierung.

Die Applikation des Wirkstoffes Prazosin in allen Konzentrationen die größer oder gleich 300nM waren, bewirkten eine komplette Verhinderung der Druckantwort durch exogen verabreichtes NA (Daten hier nicht aufgeführt, je n=4).

Die ermittelte Prazosin Konzentration von 30nM sollte keine präsynaptischen Effekte bewirken, da die NA Ausschüttung nach einer 5 Hz Stimulation unter Einfluss von 30nM Prazosin der Freisetzung ohne den Wirkstoff entsprach. Die Noradrenalin Freisetzung wurde hier in pg/g Niere angegeben (Kontrolle: 8626 ± 2755 pg / g Niere, mit Prazosin: 10000 ± 3230 pg / g Niere) (Abbildung 20).

Konzentrationsfindung Prazosin

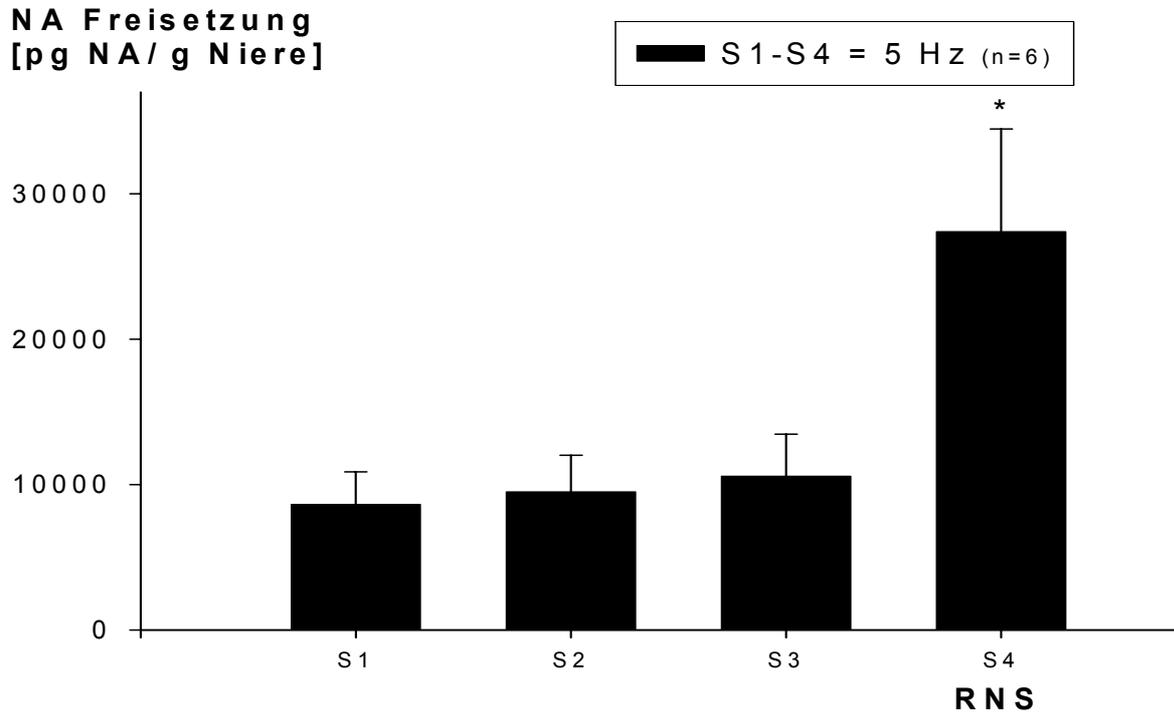


Abbildung 20: Diese Abbildung zeigt das Vorexperiment mit Wildtyp Mäusen, um die gewählte Prazosin Konzentration zu bestätigen (n=6). Zuerst erfolgt eine Kontrollstimulation mit 5 Hz ohne jeglichen Zusatz eines Wirkstoffs (S1). Danach folgen zwei weitere Stimulationen mit 5 Hz in Kombination mit 3.00E-8 Prazosin (S2 und S3). Die gemessene NA Ausschüttung blieb unter Anwendung dieser Prazosin Konzentration gleich. Die Applikation von 1µM Rauwolszin (S4) hingegen steigerte die gemessene NA Freisetzung um bis zu 350 % im Vergleich zu der Kontrolle (*P<0.05). Alle Angaben sind in pg NA/g Niere.

In einer zweiten Reihe an Vorversuchen wurde die optimale Konzentration für Rauwolszin ermittelt. Rauwolszin ist ein α_2 -Blocker, der jedoch auch unspezifisch auf α_1 wirken könnte. Die Daten zu diesen Vorversuchen sind in den Abbildungen 21 und 22 dargestellt.

Durch Druckversuche sollte zuerst eine optimal wirksame Konzentration des Rauwolszins ermittelt werden, welche postsynaptisch keinerlei Effekt hat, aber präsynaptisch die NA Freisetzung steigert. Eine Stimulationsreihe mit 5 Hz in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen des Wirkstoffes Rauwolszin

(0,001 μ M, 0,01 μ M, 0,1 μ M, 1 μ M) zeigte, dass die Vasokonstriktion der Niere nach dem gleichen elektrischen Reiz annähernd konstant blieb. Es war nur eine minimale Verminderung des Druckes mit steigender Rauwolszin Konzentration zu verzeichnen. Alle Angaben sind in mmHg (Abbildung 21).

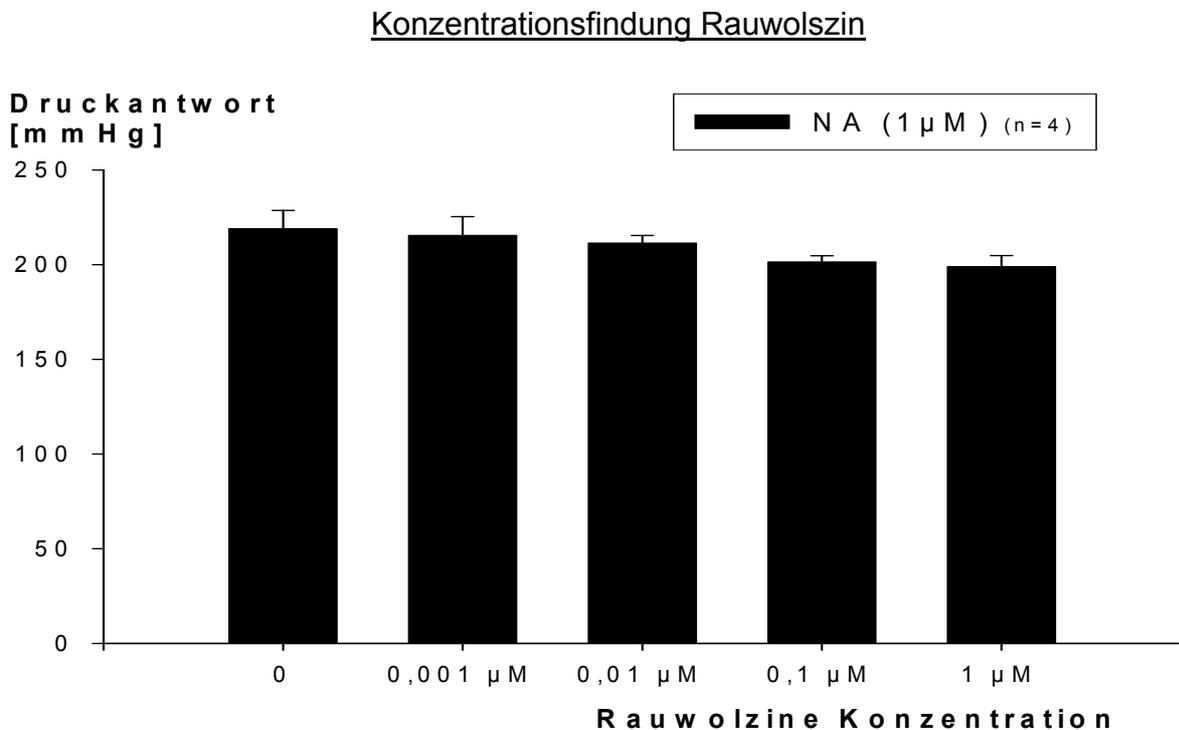


Abbildung 21: Vorexperiment mit Wildtyp Mäusen zur Findung einer optimalen Rauwolszin Konzentration (n=4). Die Druckantwort von exogen verabreichtem NA (1 μ M) ohne und in Kombination mit verschiedenen steigenden Rauwolszin Konzentrationen (0, 1nM, 10nM, 100nM, 1 μ M) wurde ermittelt und in mmHg dargestellt. Es kam zu keiner signifikanten Änderung der Druckantwort im Vergleich zu S0.

Präsynaptisch kam es, abhängig von der ansteigenden Rauwolszin Konzentration, zu einer Verstärkung der NA Ausschüttung (Abbildung 22).

Bei einer Konzentration von 1 μ M Rauwolszin kam es zu einer starken Steigerung der NA Ausschüttung um bis zu 350 %.

Konzentrationsfindung Rauwolszin

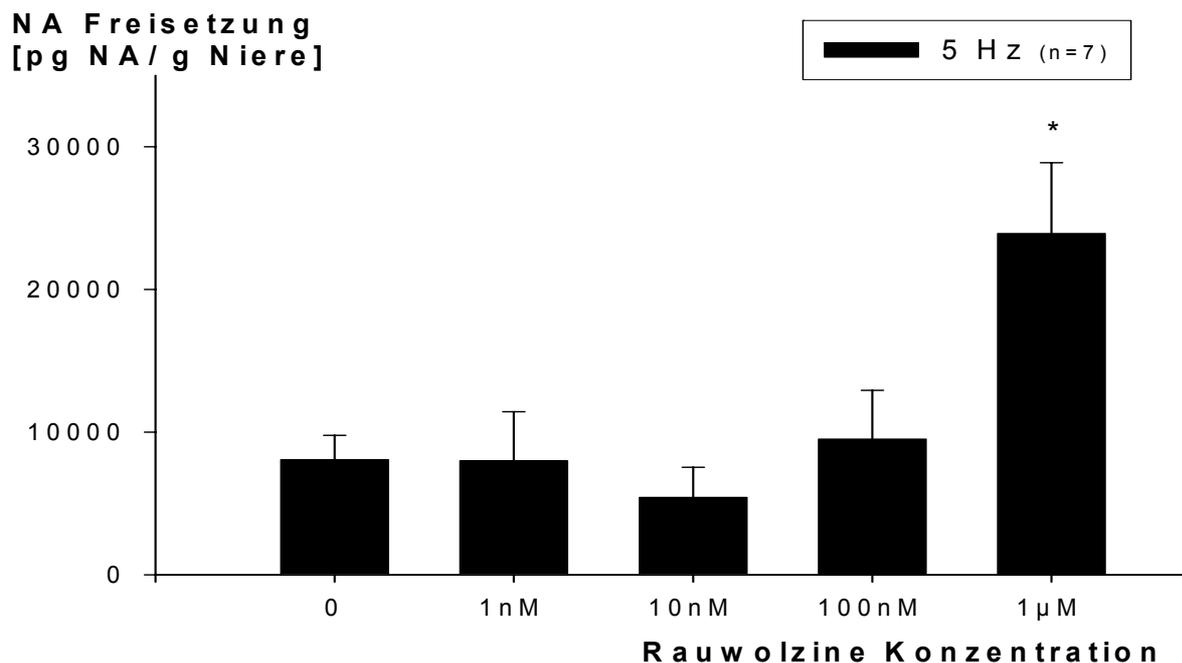


Abbildung 22: Vorexperimente mit Wildtyp Mäusen um die optimale Rauwolszin Konzentration zu ermitteln (n=4). Die NA Freisetzung nach der Applikation von ansteigenden Rauwolszin Konzentrationen (0, 1nM, 10nM, 100nM, 1μM) und Stimulation mit 5 Hz wurde durch Sammlung des Eluats und anschließender HPLC Messung erfasst und in pg NA/g Niere dargestellt (n=7). Die Zugabe von Rauwolszin in einer Konzentration von 1μM führte zu einer Steigerung der Noradrenalin Freisetzung um bis zu 350 % bezogen auf die Kontrolle (*P<0.05).

Die in den vorgeschalteten Experimenten ermittelten Dosierungen des Prazosin von 30nM und des Rauwolszin von 1μM wurden nun in den eigentlichen Versuchen appliziert.

Die Druckveränderungen in den Nieren der Wildtyp Mäuse nach Prazosin und Rauwolszingabe wurden mit denen der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse verglichen. Zur besseren Darstellung wurden die Druckveränderungen, die auf die Kontrollstimulationen mit ein und zwei Hz folgten als % von S1 aufgezeichnet. Bei den Wildtyp Mäusen kam es durch Prazosin, welches die adrenerge Wirkung blockiert, nicht zu größeren Druckveränderungen nach einem ein und zwei Hz Reiz. Nach Applikation von Rauwolszin kam es jedoch zu einer Steigerung der Druckantwort um mehr als das Dreifache (Abbildung 23).

Effekt der renalen Nervenstimulation mit 1 und 2 Hz auf die renale Druckantwort nach Applikation von Prazosin und Rauwolszin

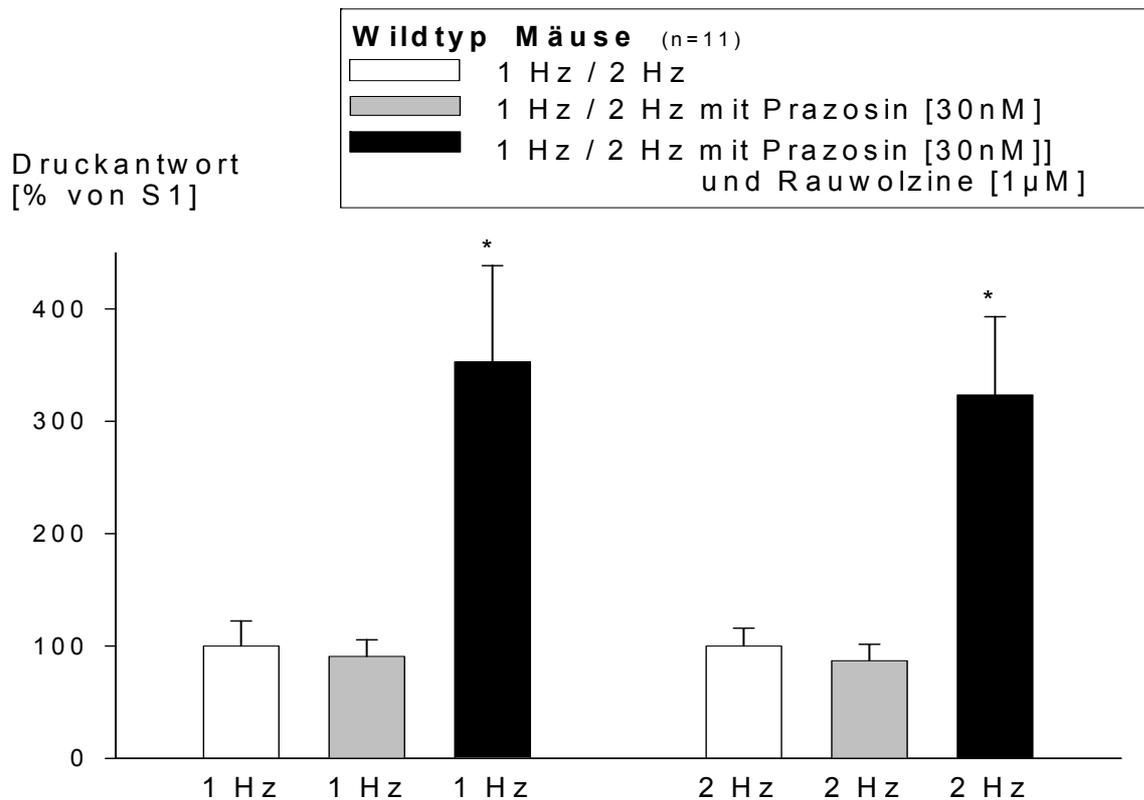


Abbildung 23: Die Abbildung zeigt den Effekt von Rauwolszin auf die nicht-adrenerge Druckantwort in der Niere von Wildtyp Mäusen (n=11). Die Druckantwort wird hier als % von S1 ohne Medikamentierung ausgedrückt. Der α_1 -Blocker Prazosin (30nM) bewirkt bei einer elektrischen Stimulation mit 1 oder 2 Hz keine Veränderung der Druckantwort. Rauwolszin (1µM), ein α_{2A} -Blocker, erhöhte die adrenerge Druckantwort auf über 300% und bewirkte somit eine signifikante Veränderung (*P<0.05).

Bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen kam es bei gleicher Abfolge der applizierten Stoffe zu keiner Veränderung der Druckantwort (Abbildung 24).

Effekt der renalen nervalen Stimulation (RNS) mit 1 und 2 Hz auf die renale Druckantwort nach Applikation von Prazosin und Rauwolszin

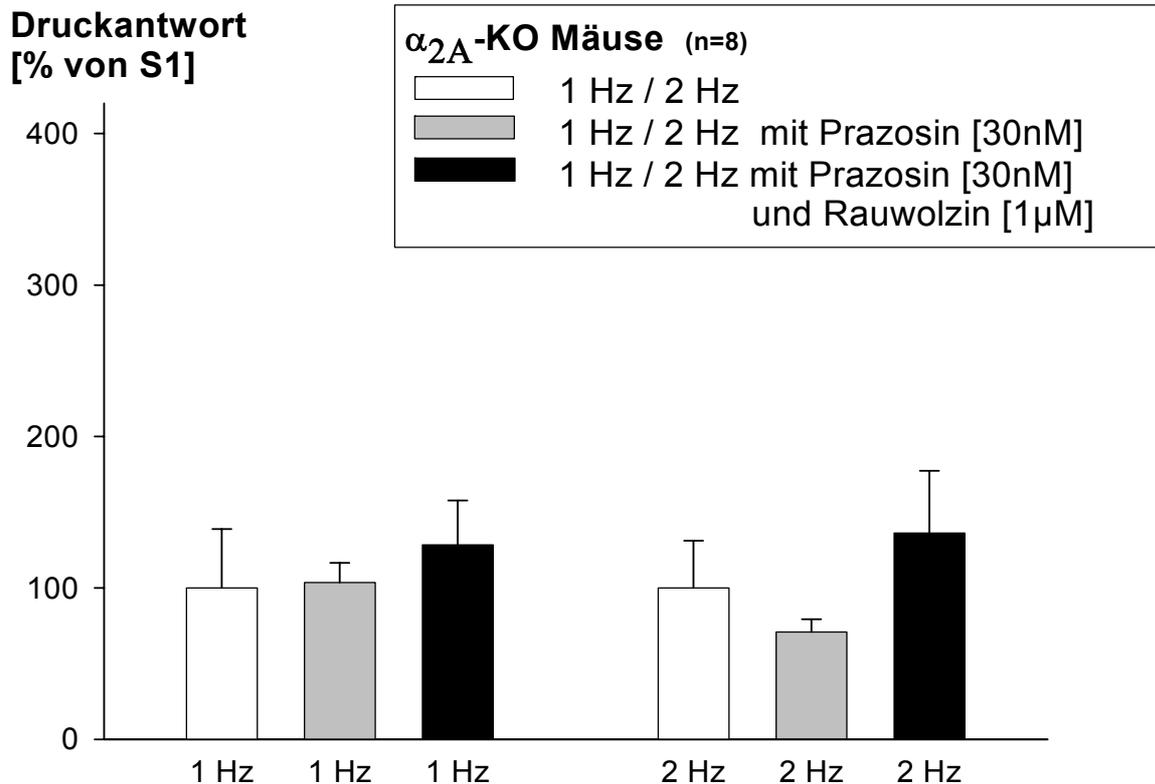


Abbildung 24: Die Abbildung zeigt den Effekt von Rauwolszin auf die nicht-adrenerge Druckantwort in der Niere von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen (n=8). Die Druckantwort wird hier als % von S1 ohne Medikamentierung ausgedrückt. Der Alpha₁ Blocker Prazosin (30nM) bewirkt bei einer elektrischen Stimulation mit 1 oder 2 Hz keine Veränderung der Druckantwort. Rauwolszin (1 μ M), ein Alpha_{2A}-Blocker, verändert die adrenerge Druckantwort ebenfalls nicht.

Am Beginn des Experimentes mit den Wildtyp Mäusen wurde jeweils exogen NA in einer Konzentration von 1 μ M über einen Perfusor zugegeben, welches am Anfang einen gut sichtbare Druckerhöhung bewirkte, und dann nach der Applikation von Prazosin und Rauwolszin nicht mehr in der Lage war, eine Vasokonstriktion auszulösen. Zudem wurde am Ende, nach Gabe von Prazosin und Rauwolszin, PPADS appliziert, welches die zuvor beobachtete erhöhte Druckantwort komplett blocken konnte (Daten nicht aufgeführt).

3.2.7 Neurotransmission nach Stimulation renaler Nerven nach einer Applikation von Adenosin-Triphosphat, ohne und mit P₂-Rezeptor Blockade

Nach Applikation von ATP (10µM, 100µM) wurden große Mengen an NA schon ohne jegliche Stimulation vor dem 5 Hz Reiz freigesetzt, das in der Perfusionsflüssigkeit mit Hilfe der HPLC nachgewiesen werden konnten (Protokoll 8). Die nachfolgende Stimulation mit 5 Hz führte zu einer nicht signifikanten Erhöhung der NA Freisetzung im Vergleich zu einer einfachen 5 Hz Stimulation ohne ATP (Abbildung 25).

Renale Nervenstimulation mit 5 Hz und Messung der NA Freisetzung nach Applikation von ATP

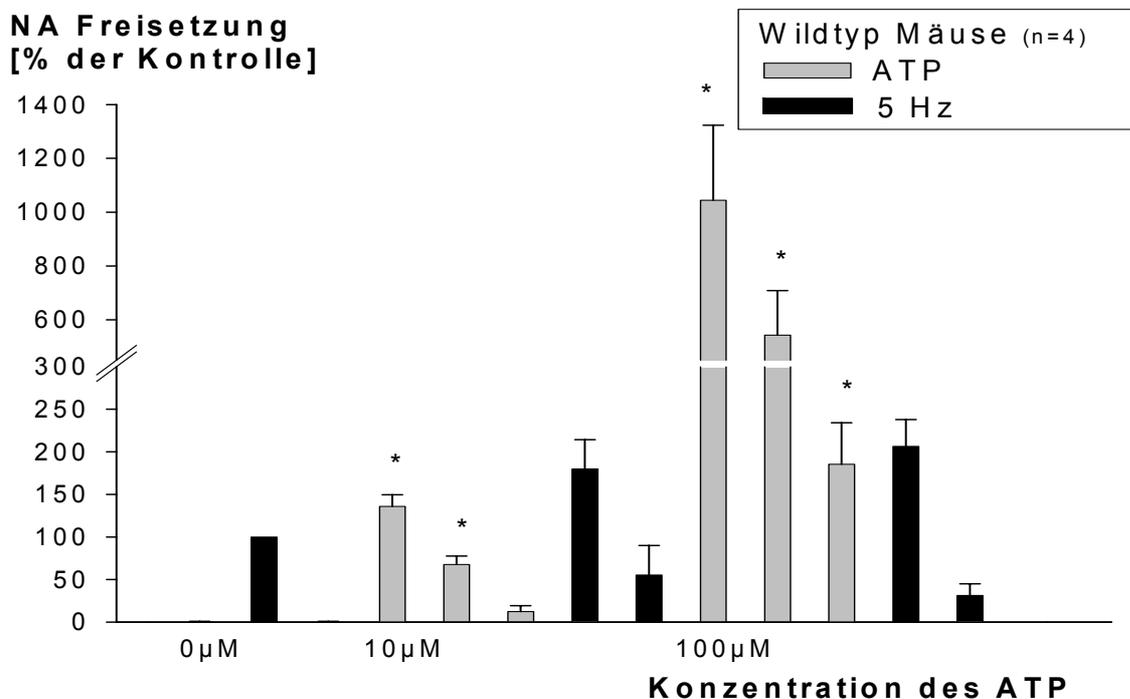


Abbildung 25: Effekt von ATP auf die basale und durch Stimulation induzierte NA Freisetzung in Wildtyp Mäusen. Zuerst wurde die NA Freisetzung nach einer Stimulation mit 5 Hz ohne Gabe einer Substanz gemessen (schwarz gekennzeichnet) und dann wurde die NA Ausschüttung nach Applikation von ATP in 2 verschiedenen Konzentrationen (10µM, 100µM) ohne Stimulation (grau) und nachfolgend zusammen mit dem 5 Hz Reiz (schwarz) beschrieben. Man erkennt, dass ATP eine NA Freisetzung unabhängig von der renalen nervalen Stimulation induzierte. Diese Änderung der NA Freisetzung unter ATP ist signifikant erhöht im Vergleich zum nicht mit ATP stimulierten Grundwert (*P<0.05).

3.2.8 Neurotransmission nach Stimulation renaler Nerven mit 5 Hz nach einer Applikation verschiedener P_2 Agonisten und Antagonisten

P_{2Y} - Rezeptor Agonisten in einer Konzentration von 10 μ M und 100 μ M [ADP, UTP, UDP, 2-Methylthio-ADP], P_{2X} -Rezeptor Agonisten in einer Konzentration von 10 μ M und 100 μ M [Alpha, beta-methylen-ATP], P_{2X} -Rezeptor Antagonisten in einer Konzentration von 1 μ M und 10 μ M [PPADS, Suramin] wurden, wie im Protokoll beschrieben, der Perfusionslösung zugeführt und die NA Freisetzung unter Einwirkung dieser Stoffe ohne und mit 5 Hz Reiz ermittelt. Keiner dieser Agonisten und Antagonisten war in der Lage eine NA Freisetzung vor der Stimulation zu bewirken oder die Freisetzung nach dem elektrischen Reiz zu verändern (Abbildungen hier nicht gezeigt).

3.3 Der renale Phänotyp der Wildtyp und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse

Der zur Bestimmung des renalen Phänotyps untersuchte Blutdruck und das Nierengewicht der Wildtyp und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse waren nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 1). Puls und Urinmengen waren jedoch bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant erhöht.

Bezogen auf die einzelnen Urinparameter zeigte sich bei den absoluten Werten eine signifikante Erhöhung der meisten Ausscheidungsparameter der Wildtyp Mäuse im Vergleich zu den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen. Bezogen auf die täglich produzierten Harnmengen waren dieselben Parameter jedoch bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen signifikant höher. Nach Herstellung des Bezuges des Mikroalbumins zum Kreatinin zeigte sich, dass die Mikroalbuminurie bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen nicht erhöht war (Tabelle 1).

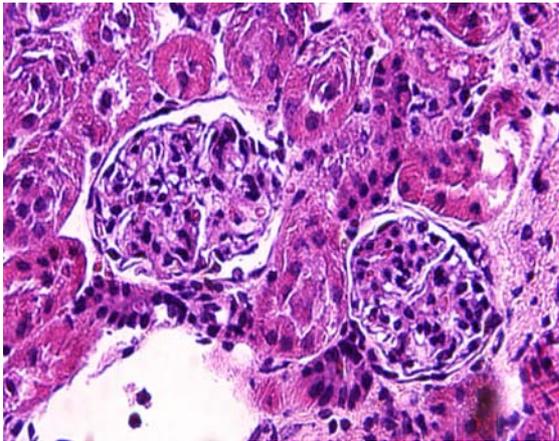
			Wildtyp (n=6)	Alpha_{2A} KO (n=6)
Körpergewicht	[g]		26,6 ± 0,7	28,5 ± 0,5 #
Systolischer Blutdruck	[mmHg]		117,5 ± 6,8	112,3 ± 6,4
Puls	[n/min]		453,8 ± 26,5	586,2 ± 26,4 #
Nierengewicht	[mg]		151,4 ± 3,3	158,0 ± 8,4
Urin Menge	[ml/24h]		0,71 ± 0,09	1,28 ± 0,09 #
Urinparameter	Harnstoff	[mg/dl]	12325 ± 570	8583 ± 614 *
	Harnstoff	[mg/24h]	86,6 ± 10,2	106,7 ± 1,7
	Kreatinin	[mg/dl]	39,0 ± 2,5	28,3 ± 2,0 *
	Kreatinin	[mg/24h]	0,27 ± 0,03	0,35 ± 0,02 #
	Kalium	[mmol/l]	390,6 ± 17,5	321,2 ± 20,7 *
	Kalium	[mmol/24h]	0,28 ± 0,04	0,40 ± 0,02 #
	Natrium	[mmol/l]	197,5 ± 9,6	151,2 ± 6,8 *
	Natrium	[mmol/24h]	0,14 ± 0,02	0,19 ± 0,01 #
	Chlorid	[mmol/l]	252,3 ± 10,9	194,5 ± 11,9 *
	Chlorid	[mmol/24h]	0,18 ± 0,02	0,24 ± 0,01 #
	Protein	[mg/dl]	109,5 ± 10,4	81,2 ± 8,4
	Protein	[mg/24h]	0,8 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	Mikroalbumin	[mg/l]	6,5 ± 0,6	4,7 ± 0,7
	Mikroalbumin / 24 h	[mg/24h]	0,0045 ± 0,006	0,0057 ± 0,005
Mikroalbumin/ Kreatinin	[mg/g]	16,5 ± 2,2	17,2 ± 2,6	
Serumparameter	Harnstoff	[mg/dl]	75,2 ± 5,4	53,3 ± 3,0 *
	Kreatinin	[mg/dl]	0,068 ± 0,003	0,072 ± 0,006
	Kalzium	[mmol/l]	1,94 ± 0,03	2,03 ± 0,07
	Kalium	[mmol/l]	5,5 ± 0,2	6,0 ± 0,8
	Natrium	[mmol/l]	152,3 ± 0,6	156,5 ± 1,9

Tabelle 1: die Tabelle zeigt die physiologischen Daten von C57Bl6 und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen im Vergleich. *, # weisen auf signifikante Unterschiede zwischen den beiden Stämmen hin

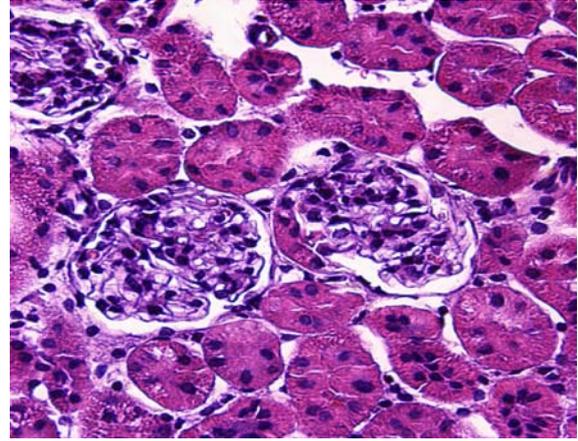
(* WT>KO, # WT<KO) (p < 0,05).

Histologische Untersuchung der Nieren beider Stämme

Die histologische Untersuchung der Nieren der C57Bl6 und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse mit einer HE Färbung zeigte, dass keine akzelerierte Glomerulosklerose oder tubointestinale Veränderungen bei den Nieren der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse zu finden waren (Abbildung 27).



A) α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout, HE, 40fach



B) Bl6, HE, 40fach

Abbildung 27: Darstellung zweier HE gefärbter Gewebeschnitte des Nierengewebes von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout (A) und Bl6 (B) Mäusen.

Subtotale Nephrektomie bei Wildtyp und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen

Nachdem nun bei der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Maus eine erhöhte renale NA Freisetzung nachgewiesen war, sollte deren Einfluss auf den Phänotyp der Mausniere untersucht werden. Eine Bestimmung von Nierenretentionsparametern von operierten und Kontrolltieren wurde durchgeführt.

Neuere Studien zeigten, dass die C57Bl6 Wildtyp Maus im Modell der nephrektomierten Niere keine phänotypischen Anzeichen einer Niereninsuffizienz entwickelt (Ma and Fogo 2003).

Unsere Auswertungen stimmten damit überein, da zwar die Werte (Harnstoff, Kreatinin im Serum) der operierten Mäuse bei beiden Stämmen immer höher waren als bei den nicht operierten (Sham), aber bei dem Vergleich der beiden Stämme kein signifikanter Unterschied nachzuweisen war (Abbildung 28).

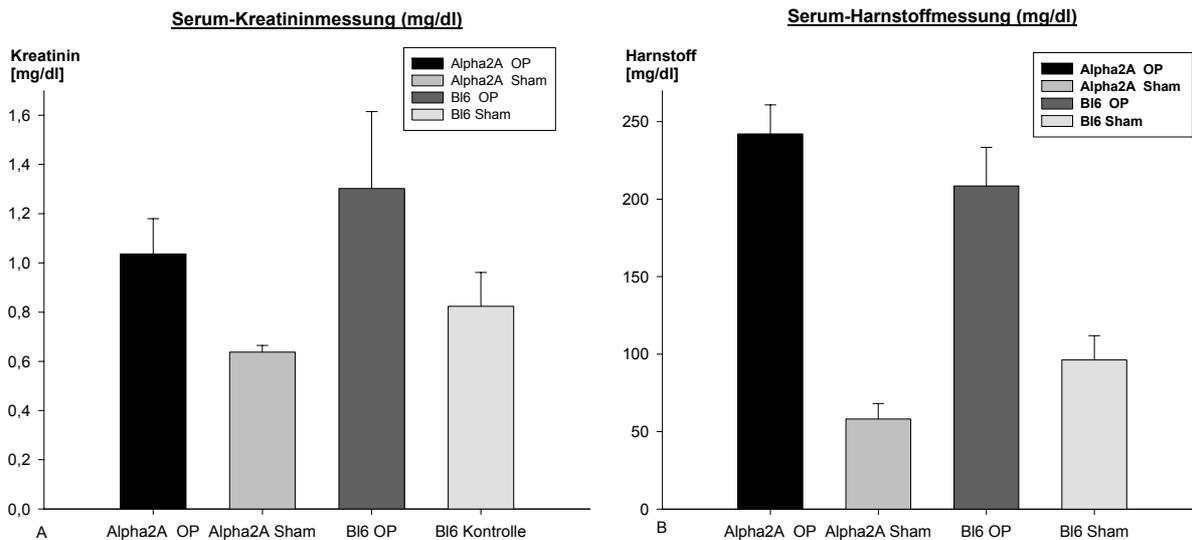


Abbildung 28: A und B: Harnstoff und Kreatinin-Serum Werte von operierten und Sham operierten α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout und Wildtyp Mäusen. Bei beiden Stämmen kommt es zu einem Anstieg der Serum Werte, jedoch ohne signifikanten Unterschied.

Es war nicht möglich bei den Wildtyp Mäusen eine Albuminurie nachzuweisen. Deshalb wurden die Tiere in einem nächsten Teil der Studie erst mit kochsalzreichem Futter, dann mit erhöhtem Proteinanteil gefüttert. Keine dieser es den Nieren erschwerenden Maßnahmen führte zu einer Albuminurie. Um nun den Nachweis der phänotypischen Veränderungen zu erbringen, musste ein für das Modell sensibler Stamm als Kontrolle zu den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen gezüchtet werden (Abbildung 29).

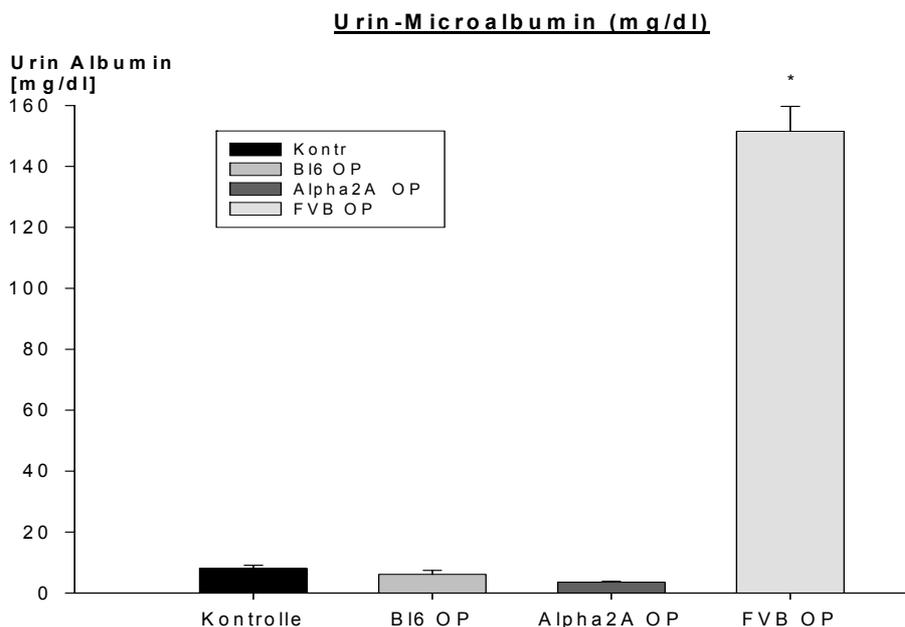


Abbildung 29: FVB Mäuse entwickeln im Gegensatz zu B16 Mäusen eine starke Albuminurie (* $P < 0.05$).

Genetischer Shift der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse

Um das Problem, dass die C57Bl6 Wildtyp Mäuse nicht für das Modell der 5/6 Nephrektomie geeignet sind (Ma and Fogo 2003) zu beheben, wurden Rückkreuzungen der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse mit für das Modell sensiblen FVB Mäusen durchgeführt. Um eine gute genomische Homogenität der Rückkreuzung zu erreichen, wurden sechs Rückkreuzungen mit vorheriger Genotypisierung durchgeführt (M. Silver, Oxford University Press, Mouse Genetics, 1995, 47, Fig. 3.5) (Kash, Condie et al. 1999; Styrna, Kilarski et al. 2003; Le, Fogo et al. 2004). Dabei entstand die FVB- α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Linie (Abbildung 30), welche bald weiteren Studien zur Verfügung steht.

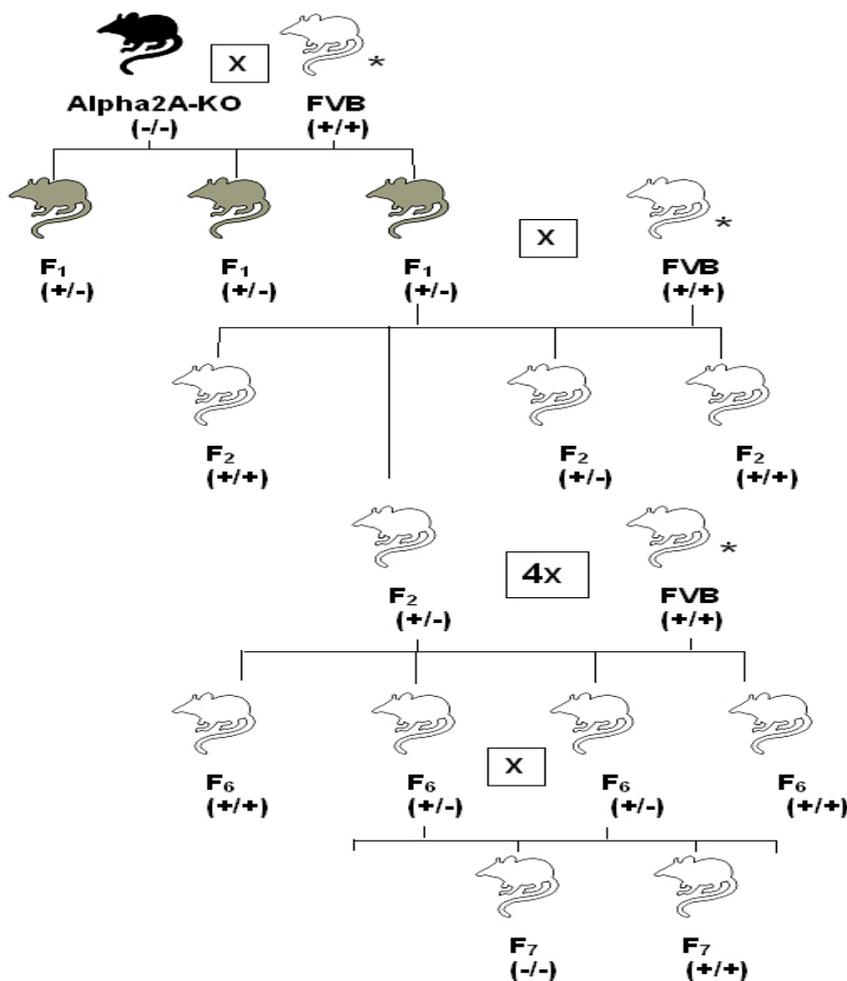


Abbildung 30: Rückkreuzungsschema der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse mit, für das Modell der 5/6 Nephrektomie sensiblen Mäusen des FVB Stammes. Die Rückkreuzung erfolgte sechs Mal, um eine optimale genomische Homogenität zu erreichen.

* Inzucht FVB Wildtyp Maus

Genotyp

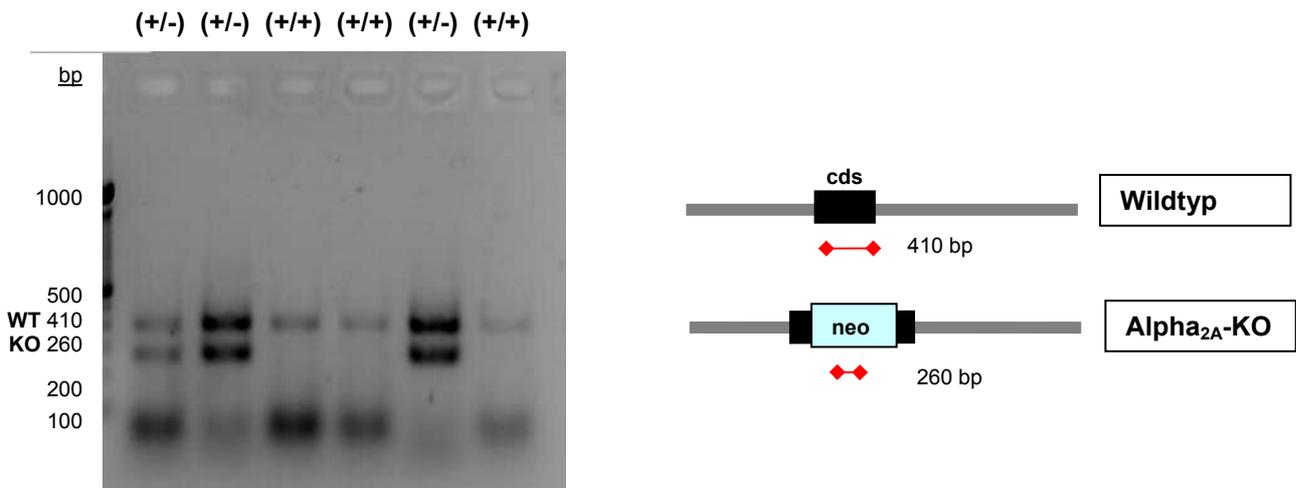


Abbildung 31: Kontrolle der Rückkreuzung der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse mit FVB Mäusen mit spezifischen Primern (α_{2A}^{1-2WT} und α_{2A}^{1-KO}) mittels PCR. Detektion der heterozygoten Tiere und Verpaarung dieser mit einer FVB Wildtyp Maus. Der Knockout wurde mit einer Neomycin Kasette durchgeführt.

Nach jeder Rückkreuzung wurden die Tiere genotypisiert, um den Erhalt des Knockouts zu kontrollieren (Abbildung 31).

4. Diskussion

4.1 Die Rolle der Niere bei der Blutdruckregulation

Die Niere spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation des Blutdruckes. Neben ihrer Möglichkeit das Blutvolumen selber zu variieren, ist vor allem die Beeinflussung von Hormon- und Nervensystemen von großer Bedeutung. Es gibt viele Patienten, die an einer chronischen Niereninsuffizienz und zugleich an einem gesteigerten sympathischen Tonus leiden. Eine Hypertonie muss zwar nicht überwiegend primär renal bedingt sein, aber die Niere wird auf Dauer in die Entwicklung eines Bluthochdruckes und dessen Progression mit einbezogen. Wenn sie selber erkrankt ist, löst sie den Hochdruck auch selber aus. Studien zeigten, dass diese dann entstandene sympathische Überaktivität schließlich die Ursache für die hohe kardiovaskuläre Mortalität ist (Rump and Oberhauser 1999). Es wurde erstmals gezeigt, dass die geschädigten Nieren selbst Impulse zum zentralen Nervensystem senden und hierdurch die sympathischen Entladungen steigern. Auf lokaler Ebene im Nierengewebe wird die sympathische Neurotransmitter Freisetzung erhöht, was dann insgesamt zu einer gesteigerten Progression der Nierenerkrankung und zu einem erhöhten Blutdruck führt.

4.2 Therapie des Bluthochdrucks durch Suppression des Sympathikus

Da nun die Überaktivität des Sympathikus als ein weiterer Faktor, der bei einer Nierenerkrankung zu schneller kardiovaskulärer Mortalität führen kann, identifiziert war, wurde deutlich, dass die pharmakologische Inhibition der sympathischen Nervenaktivität Glomerulosklerosen und Proteinurie verhindern kann. Dies zeigten Amann und Rump 1999 am Modell der chronischen Niereninsuffizienz. Eine Studie (Amann, Rump et al. 2000) mit subtotal nephrektomierten Ratten, die mit Moxonidin behandelt wurden zeigte, dass dieser zentral wirkende und den Sympathikus inhibierende Wirkstoff eine Progression der Nierenerkrankung verlangsamte. Die behandelten Ratten zeigten sehr viel weniger Glomerulosklerosen als die unbehandelte Gruppe. Zudem scheinen Medikamente dieser Art auch die Expression verschiedener Gene zu beeinflussen (Vonend, Apel et al. 2004). Auch am Menschen

existieren Studien zur Wirksamkeit dieser Sympathikus inhibierenden Substanzen (Vonend, Marsalek et al. 2003). Viele der heutzutage erhältlichen und verordneten Medikamente wirken über diesen zentral wirkenden Mechanismus. Doch um lokal wirksame Stoffe zu finden und einsetzen zu können, ist es notwendig, die genauen Freisetzungsmechanismen zu kennen und zu wissen welche Rezeptor Subtypen involviert sind. Oftmals sind die Medikamente, die heutzutage in Gebrauch sind nicht nur an einem Rezeptor Subtyp wirksam, sondern beeinflussen eine ganze Rezeptoren Gruppe bzw. Rezeptorfamilien.

4.3 Der α_{2A} -Adrenozeptor

Die sympathische Überaktivität ist durch eine gesteigerte Freisetzung des Neurotransmitters NA und des Cotransmitters ATP in der Niere charakterisiert. ATP und NA werden in der Ratten- und menschlichen Niere neuronal freigesetzt und vermitteln die Vasokonstriktion der Gefäße in der Niere (Oberhauser, Vonend et al. 1999)

Experimentelle und klinische Studien zeigten, dass in einer erkrankten Niere die Noradrenalin (NA) Ausschüttung erhöht ist (Amann, Rump et al. 2000) (Rump and Oberhauser 1999). Die folgende Progression der Nierenerkrankung führt dann letztendlich zu einem totalen Verlust der Nierenfunktion. Die erhöhte kardiovaskuläre Morbidität und Mortalität von Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz korreliert mit den Plasmakonzentrationen der sympathischen Neurotransmitter NA und Neuropeptid Y (NPY) (Rump, Amann et al. 2000; Hausberg, Kosch et al. 2002; Zoccali, Mallamaci et al. 2002; Zoccali, Mallamaci et al. 2003).

Die Freisetzung dieser sympathischen Neurotransmitter im Gewebe wird durch präsynaptische Rezeptoren, die an den sympathischen Nervenendigungen lokalisiert sind, reguliert. Hier scheinen besonders die Alpha₂ Rezeptoren eine große Rolle zu spielen. Schon 1994 und 1999 zeigten Studien (Bylund, Eikenberg et al. 1994) (Hein, Altman et al. 1999), dass die α -Adrenozeptoren in der Lage sind, präsynaptisch autoinhibitorisch zu wirken und die NA Freisetzung zu vermindern. In welchem Maße diese Rezeptoren in der Lage sind, vor allem in der Niere die NA und Adenosine-5`-Triphosphate (ATP) Freisetzung zu regulieren und welche Subtypen verantwortlich sind, musste noch näher bestimmt werden. Die Charakterisierung dieser Rezeptoren gestaltete sich zunächst als schwierig, da es keine Substanzen gab, die genau auf

nur einen der Subtypen wirkten. Erst durch die Zucht transgener Mäuse, bei denen spezielle Rezeptor Subtypen ausgeschaltet sind, wurde eine Erforschung und genaue Klassifizierung möglich gemacht (Hein 2001).

In ersten Experimenten wurde dargestellt, dass es der α_{2A} -Adrenozeptor Subtyp zu sein scheint, der für ein negatives Feedback und damit eine Verminderung der Noradrenalin Freisetzung verantwortlich ist (Hein, Altman et al. 1999; Brede, Wiesmann et al. 2002; Brede, Nagy et al. 2003). Andere Studien machen nicht nur den α_{2A} -, sondern auch den α_{2C} -Adrenozeptor für dieses negative Feedback verantwortlich (Bucheler, Hadamek et al. 2002). Viele dieser Studien wurden an unterschiedlichen Geweben durchgeführt wie Herz und Cortex, doch interessierten uns vor allem die Vorgänge im Nierengewebe, da die Niere und die Wirkung auf das sympathische System essentiell für die Blutdruckregulation sind.

4.4 Das sympathische Nervensystem und seine Rezeptoren

Im Rahmen dieser Studie wurde der Einfluss speziell des Alpha_{2A}-Adrenozeptors auf die renale Neurotransmission untersucht. Um lokale Freisetzungen und Mechanismen optimal nachvollziehen zu können, wurde das Modell der isoliert perfundierten Mausniere benutzt. Um den Rezeptor genau charakterisieren zu können, wurden transgene Tiere, α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse und deren Kontrollen (C57Bl6), eingesetzt.

4.4.1 Identifizierung des α_{2A} -Adrenozeptors

Es wurden sowohl die Nieren der Wildtyp als auch der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse mit den gleichen steigenden Konzentrationen von exogen verabreichten NA, Methoxamin und UK14,304 stimuliert, um herauszufinden, ob der α_{2A} -Adrenozeptor zu postsynaptischen vaskulären Effekten beiträgt. Diese Untersuchung wurde zuerst durchgeführt, da andere Gruppen (Bultmann, von Kugelgen et al. 1991) (Cleary, Vandeputte et al. 2003) herausgefunden hatten, dass im Vas deferens von α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen der Rezeptor auch postsynaptisch Kontraktionen bei exogen verabreichtem NA vermittelt. In den isoliert perfundierten Nieren hingegen fanden wir keine Hinweis auf einen Unterschied zwischen den Wildtyp und Knockout

Mäusen, sowohl bei NA und Methoxamin. Dies kann bedeuten, dass in der Niere die α_{2A} -Adrenozeptoren nicht in postsynaptische Effekte durch exogen verabreichtes NA oder andere Agonisten involviert sind.

Zunächst wollten wir feststellen, ob es zwischen den Wildtyp und α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Stamm Unterschiede in der Transmitterfreisetzung und der Druckantwort gibt. Hierzu wurden die Nerven der Nieren mit 1 -15 Hz aufsteigend stimuliert, um eine Druckantwort und eine endogene Transmitterfreisetzung zu bewirken. Vor der Stimulationsreihe wurde bei beiden Mausstämmen KCl verabreicht und die rezeptorunabhängige Kontraktionsmöglichkeit der Niere überprüft. Sowohl die Wildtyp als auch die Knockout Mäuse zeigten hier das gleiche Kontraktionspotential, wohingegen der Druckanstieg bei der elektrischen Stimulation von 1-15 Hz bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen sehr viel höher war. Die Ursache hierfür schien das durch den Knockout fehlende negative Feedback auf die NA Freisetzung zu sein. Deshalb wurde die NA Freisetzung unter diesen Bedingungen chromatographisch gemessen und man konnte erkennen, dass die α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäuse signifikant mehr NA in den synaptischen Spalt freisetzen als die untersuchten Kontrollen. Diese erhöhte Transmitterfreisetzung der Knockout Mäuse wurde schon zuvor in isolierten chromaffinen Zellen beobachtet (Brede, Nagy et al. 2003).

Im nächsten Experiment wurde die Wirkung des α -Adrenozeptor Blockers Phentolamin überprüft. Eine andere Arbeitsgruppe (Mishima, Miyahara et al. 1984) hatte schon zuvor beschrieben, dass α -Adrenozeptor Blocker, und hier vor allem Phentolamin, zu einem erhöhten NA Ausstoß führten. Interessant war für uns, diesen Effekt nun an Wildtyp im Vergleich zu den Knockout Tieren nachzuvollziehen.

Die renalen Nerven wurden in diesem Fall konstant mit 5 Hz stimuliert und das Phentolamin vor jeder Stimulation in aufsteigender Konzentration der Perfusionslösung hinzu gegeben. Wie erwartet kam es bei den Wildtyp Mäusen konzentrationsabhängig zu einer Erhöhung der NA Freisetzung durch das Phentolamin. Genau wie bei den Knockout Tieren war das negative Feedback auf die NA Freisetzung ausgeschaltet. Bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen hingegen kam es zu keiner Veränderung der NA Freisetzung durch den Wirkstoff. Sowohl bei den α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Mäusen als auch bei den C57Bl6 Tieren wurde eine Kontrollgruppe mit 5 Hz in Reihe stimuliert, um nachzuweisen, dass eine Kontinuität bei der NA Ausschüttung besteht, auch wenn der elektrische Reiz

mehrfach wiederholt wird. Es wurde sogar offensichtlich, dass die Quantität der NA Freisetzung bei den Knockout Mäusen ohne Phentolamineinwirkung genauso hoch war wie die Freisetzung bei den Wildtyp Tieren unter dem Einfluss der maximalen Blockade durch Phentolamin. Da es sich bei dem Wirkstoff Phentolamin um einen nicht-selektiven Blocker handelt und es bei den Knockout Tieren nicht zu einer Veränderung kam, kann man feststellen, dass in der Mausniere der α_{2A} -Adrenozeptor der einzige Subtyp ist, der einen inhibitorischen präsynaptischen Effekt zeigt. Dies steht im Kontrast zu anderen Studien, die zeigen, dass in Gewebe von Vas deferens, Herz-Vorhof und Gehirn sowohl der α_{2C} und teilweise auch der α_{2B} Rezeptor zumindest anteilig an der Regulation der sympathischen Transmitterfreisetzung beteiligt sind (Hein, Altman et al. 1999; Trendelenburg, Klebroff et al. 2001; Brede, Wiesmann et al. 2002; Trendelenburg, Philipp et al. 2003).

4.4.2 Die Abhängigkeit der Effekte von Noradrenalin und Adenosintriphosphat von der Reizfrequenz

Bei den Wildtyp Mäusen führte eine Stimulation der renalen Nerven zu einer frequenzabhängigen Steigerung des Perfusionsdruckes. Es fiel auf, dass es bei elektrischen Reizen zwischen 1 und 5 Hz nicht möglich war, die postsynaptischen Effekte mit dem Adrenozeptor Blocker Phentolamin so weit zu blocken, dass es zu einer Verminderung der Druckantwort kam. Erst ab einem Frequenzbereich von 5 Hz vermochte das Phentolamin konzentrationsabhängig die Druckantwort postsynaptisch immer mehr zu senken. Bei zusätzlicher Zugabe des nicht selektiven P_2 -Purinozeptor Blockers PPADS kam auch im niedrigen Frequenzbereich keine Druckantwort mehr zustande (Ziganshin, Hoyle et al. 1993). Man kann also daraus schließen, dass im Bereich einer Stimulation der Nierenerven von 1-5 Hz eher neuronal freigesetztes ATP der auslösende Neurotransmitter ist. NA scheint in diesen Frequenzbereichen eine untergeordnete Rolle zu spielen und nur in Frequenzbereichen über 5 Hz wirksamer zu werden. Hierzu existieren auch Studien an den Schwanzarterien von Ratten, die eine ähnliche Reaktion auf die Applikation von Phentolamin beschreiben. Hier scheint der α -Adrenozeptor Blocker in niedrigeren Frequenzbereichen ebenfalls weniger wirksam zu sein (Bradley, Law et al. 2003). Im Gegensatz dazu steht eine Studie (Johnson, Coney et al. 2001) am Rattenschwanz und der Hintergliedmaße, bei der das NA auch schon bei niedrig

frequenten Stimulationen der verantwortlich zu machende Transmitter zu sein schien. Dass die purinerge Neurotransmission eine bedeutende Rolle bei der Druckantwort spielt, wurde schon zuvor an Ratten und Mäusenieren untersucht und beschrieben (Schwartz and Malik 1989; Vonend, Okonek et al. 2005; Vonend, Stegbauer et al. 2005).

Die durch Stimulation der Nierenerven verursachte Druckantwort scheint demnach durch Anteile des purinergen Systems, also ATP, und durch das adrenerge System (NA) zusammen verursacht zu werden, und je nach Höhe der Stimulation überwiegt der eine oder andere Anteil.

4.4.3 Der α_{2A} -Adrenozeptor als präsynaptischer inhibitorischer Heterozeptor

Auffällig war, dass eine Stimulation mit einem elektrischen Reiz von 2 Hz in Kombination mit dem nicht selektiven α -Adrenozeptor Blocker Phentolamin sogar zu einer leichten Erhöhung der Druckantwort führte. Dieses Phänomen veranlasste uns zu hinterfragen, ob die Blockade der α - Adrenozeptoren, im speziellen des α_{2A} -Adrenozeptors, auch einen Einfluss auf die purinerge Komponente der Druckantwort hat. Da die noradrenerge Komponente der Druckantwort unter Einfluss von Phentolamin durch den Block der postsynaptischen Rezeptoren verhindert wurde, die Stimulation der renalen Nerven aber nicht zu einer Absenkung, sondern im Gegenteil eher zu einer Erhöhung der Druckantwort nach einer 2 Hz Stimulation führte, war zu vermuten, dass die Freisetzung von neuronal ausgeschüttetem ATP durch präsynaptische inhibitorische Adrenozeptoren beeinflusst und reguliert wird. Die Arbeitsgruppe um Cleary und Mitarbeiter hatte auch schon beobachtet, dass es an den Vas deferens von Mäusen nach einer Gabe von α_1 -Adrenozeptor Blockern in hoher Konzentration zu einer Steigerung der purinergen Vasokonstriktion kommt. Es wurde schon hier vermutet, dass die hohe Konzentration der zugeführten Antagonisten auch präsynaptische inhibitorische α_2 -Adrenozeptoren anspricht, welche dann nicht nur die NA Freisetzung modulieren, sondern auch regulativ auf die Freisetzung des ATP wirken (Cleary, Vandeputte et al. 2003).

Durch die Schwierigkeit, synaptisch freigesetztes ATP zu messen und zu bestimmen, da große Mengen an ATP auch nicht neuronal freigesetzt werden (Vonend, Oberhauser et al. 2002), was die Messung verfälschen würde, musste der Nachweis auf einem andern Weg erfolgen. Wir stimulierten die Nieren mit 1 und 2 Hz, also im

niedrigen Frequenzbereich, in dem, wie zuvor gezeigt, ATP der dominierende Transmitter ist, und blockten dann selektiv mit Prazosin die postsynaptischen α_1 und $\alpha_{2B/C}$ -Adrenozeptoren. Damit unterdrücken wir den adrenergen Teil der durch eine Stimulation der Nierenerven ausgelösten Druckantwort vollständig (Lee, Walsh et al. 1984). Wenn nun Rauwolszin, ein Wirkstoff, der in der Lage ist, die präsynaptischen α_{2A} -Adrenozeptoren zu blocken, hinzu gegeben wurde, kam es bei den Wildtyp Mäusen zu einer signifikanten Steigerung der purinergen Druckantwort. Da dieser Effekt in der α_{2A} -Adrenozeptor-Knockout Maus nicht nachweisbar war, ist der Schluss, dass die α_{2A} -Rezeptoren wirklich für die Modulation der ATP Freisetzung verantwortlich sind, plausibel. Diese präsynaptischen Autorezeptoren scheinen schlussendlich nicht nur die Freisetzung des NA zu regulieren, sondern auch ein negatives Feedback auf die ATP Freisetzung auszuüben.

Weiterhin konnten wir nachweisen, dass es präsynaptische P_2 -Rezeptoren gibt, deren Aktivierung unabhängig von einer Stimulation große Mengen an NA freisetzen. Über welche Rezeptoren dieser Mechanismus greift, ist uns zurzeit noch nicht bekannt. Fest steht, dass es sich um einen Rezeptor-abhängigen Effekt handelt, da er sich durch PPADS blocken ließ. Eventuell ist es ein über P_{2X} -Rezeptoren vermittelter Effekt (Lambrecht 2000).

4.4.4 Der Effekt der sympathischen Überaktivität auf die renale Funktion

Eine zu hohe Aktivität des Sympathikus wird dafür verantwortlich gemacht, die Progression der Nierenerkrankung zu akzelerieren (Rump, Amann et al. 2000). Der hohe Sympathikotonus führt auf der einen Seite zu einem erhöhten Blutdruck und auf der anderen Seite zu mitogenen Effekten auf die glomerulären und tubulären Strukturen in der Niere (Rump, Amann et al. 2000; Vonend, Oberhauser et al. 2002; Koomans, Blankestijn et al. 2004). Zuvor gab es für diese Hypothese Bestätigung bei dem Modell der subtotal nephrektomierten Ratte, einem etablierten Modell der chronischen Niereninsuffizienz. In diesen Studien wurden zentral und peripher wirkende sympatholytische Mittel in nicht-hypertensiv wirkender Dosierung verabreicht, welche günstige Effekte auf die Funktion und histologischen Parameter der Niere in diesen Tieren hatten (Amann, Rump et al. 2000). Auch die sympatholytische zentral wirkende Substanz Moxonidin reduzierte bei Typ 1

Diabetes die Albuminurie bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz, ohne einen Effekt auf den Blutdruck auszuüben (Vonend, Marsalek et al. 2003).

Weiterhin wurde nachgewiesen, dass ATP-P₂ Rezeptoren bei der Entstehung einer mesangioproliferativen Th1 Glomerulonephritis involviert sind und die Blockade dieser Rezeptoren mit PPADS die mesangiale Proliferation signifikant reduziert (Rost, Daniel et al. 2002). Es ist bekannt, dass sympathische Neurotransmitter, vor allem ATP, mitogene Effekte auf Zellkulturen von Nieren- und Blutgefäßzellen haben (Erlinge, Brunkwall et al. 1994; Faber, Yang et al. 2001; Vonend, Oberhauser et al. 2002; Vonend, Grote et al. 2003).

Wir konnten in den Versuchen mit den isoliert perfundierten Nieren erkennen, dass bei den Mäusen mit einer erhöhten sympathischen Aktivität eine Verstärkung sowohl der NA Ausscheidung als auch der ATP Freisetzung zu verzeichnen war. Unsere Hypothese, dass durch die alleinige Verstärkung der Neurotransmitter Freisetzung des NA und ATP, ohne eine weitere Nierenerkrankung, nun auch eine Schädigung des Nierengewebes einhergehen muss, konnte nicht bestätigt werden. Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu der Studie an Herzmuskelgewebe von Brede und Mitarbeitern, bei der eine kardiale Hypertrophie in Alpha_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäusen gefunden wurde (Brede, Wiesmann et al. 2002). Genau wie in dieser Studie war auch in unseren Experimenten kein Unterschied im Blutdruck zwischen den WT und Alpha_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäusen zu erkennen. Demnach kann eine Hypertension nicht für die bei Brede und Mitarbeitern beobachtete kardiale Hypertrophie verantwortlich gemacht werden. Die histologische Untersuchung der Nieren der Alpha_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäuse in unserer Studie konnte keine Sklerosen im Nierengewebe, keine mesangiale Zellproliferation und keine Hinweise für tubulointestinale und vaskuläre Schäden aufzeigen. Zudem ergab die Serum- und Urinanalyse keinen konkreten Hinweis auf eine renale Dysfunktion. Vor allem bezogen auf die Protein- und Mikroalbuminmenge im Urin der Alpha_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäuse konnte keine signifikante Erhöhung im Vergleich zu den WT Mäusen gefunden werden. Die signifikante Steigerung der Urinmenge bei den Knockout Mäusen kann entweder durch eine erhöhte Freisetzung des atriales natriuretischen Peptids (ANP) oder durch eine Erniedrigung der Freisetzung des antidiuretischen Hormons (ADH) erklärt werden (Fujii, Kojima et al. 1991; Peuhkurinen, Uusimaa et al. 1995). Weiterhin können auch zentrale Regulationsmechanismen des Wasser- und Elektrolythaushaltes verantwortlich sein

(Ota, Kimura et al. 1990). Da die fraktionelle Natrium Exkretion der beiden Maus Stämme auch keinen signifikanten Unterschied aufwies, kann man den Alpha_{2A}-Adrenozeptor nicht für die beobachteten unterschiedlichen Effekte in der tubulären Reabsorption und Urinproduktion bei den beiden Mausstämmen verantwortlich machen. Es ist schwierig nachzuweisen, ob die beobachteten Effekte bei den Urinparametern durch die Abwesenheit des Alpha_{2A}-Adrenozeptors oder durch eine Überaktivierung von anderen tubulären Alpha₂ Adrenozeptoren durch eine gesteigerte Katecholamin Freisetzung zustande kommen. Zudem muss man berücksichtigen, dass es zu Verschiebungen der relativen Daten kam, die auf die Urinmenge bezogen wurden. Allein durch die Harnsammlung im Stoffwechsellkäfig scheint es plausibel, dass die verminderte Urinmenge der WT Mäuse auch mit einer größeren Verdunstung des Urins einhergeht. Je kleiner die ausgeschiedene Menge an Urin desto größer ist die Verdunstungsfläche, so dass es zu falschen Messungen kommen kann. Folglich verschieben sich die Werte, wenn man sie auf die Menge des Urins bezieht.

Man kann nur spekulieren, warum das Nierengewebe, im Gegensatz zum Herzen, durch eine sympathische Überaktivität nicht beeinflusst wird. Ob es in den Nieren der Alpha_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Mäuse zu einer Aktivierung von „rettenden“ Mechanismen kommt, die der sympathischen Überaktivität entgegen wirken, wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Die kürzlich entdeckte Renalase, eine Monoaminoxidase, die von der Niere ins Blut sezerniert wird, könnte zu diesem eventuellen Effekt beitragen (Xu, Li et al. 2005). Auch Fogo und Mitarbeiter suchten hierfür eine plausible Erklärung, indem sie die Wichtigkeit des genetischen Hintergrunds der Nierenschädigungen bei den subtotal nephrektomierten Mäusen hinterfragten (Ma and Fogo 2003). In ihrem experimentellen Modell der chronischen Nierenerkrankung schienen die Wildtyp (C57Bl6) Mäuse im Vergleich zu den 129/Sv und Swiss-Webster Mäusen resistent gegenüber einer durch Hyperperfusion ausgelösten Proteinurie und Glomerulosklerose zu sein (Ma and Fogo 2003). Die hier vorliegende Studie kann dies auch bestätigen und somit kann auch hier ein genereller genetischer Mechanismus vermutet werden, der die Nieren gegenüber Schädigungen schützt. Bevor man wirklich ausschließen kann, dass eine sympathische Überaktivität allein den Phänotyp der Nieren verändern kann, ist es nötig, die Alpha_{2A}-Adrenozeptor-Knockout Maus zu einem „empfindlichen“ Genotyp zurück zu kreuzen.

5. Zusammenfassung

Die Niere ist eines der wichtigsten Organe der Blutdruckregulation und eine sympathische Überaktivität mit einer gesteigerten Noradrenalin (NA) Freisetzung führt bei vielen Patienten zu einer Progression der Niereninsuffizienz. Es gibt drei verschiedene präsynaptische Adrenozeptor-Subtypen ($\alpha_{2A/D}$, α_{2B} und α_{2C}). Ziel der Arbeit war es, nachzuweisen, ob in der Niere der Maus der α_{2A} -Adrenozeptor-Subtyp der entscheidende präsynaptische auto-inhibitorische Rezeptor ist, der die NA Freisetzung moduliert. Eine elektrische Stimulation der Nierennerven bewirkte eine frequenzabhängige NA Freisetzung, wobei die renale Vasokonstriktion bei Deletion des α_{2A} -Adrenozeptors wesentlich höher ausfiel. Als Ursache war hier die erhöhte NA Freisetzung zu erkennen. Eine Blockade aller α -Adrenozeptoren bewirkte eine Erhöhung der stimulationsinduzierten NA Freisetzung nur bei Anwesenheit des α_{2A} -Adrenozeptors. Bei Mäusen ohne α_{2A} -Adrenozeptor war dies nicht der Fall. Somit ist der α_{2A} -Adrenozeptor der einzige Subtyp, der ein negatives Feedback auf die endogene NA Freisetzung bewirken kann. Neben NA sind noch weitere Neurotransmitter an der renalen Vasokonstriktion beteiligt. Eine niedrige elektrische Stimulation der Nierennerven, mit Blockade aller α -Adrenozeptoren, konnte die postsynaptische Antwort nicht vollständig blockieren. Erst nach zusätzlicher Blockade der ATP/ P_2 -Purinozeptoren kam es zu keiner Vasokonstriktion mehr. Somit ist NA für die Vermittlung der renalen Vasokonstriktion bei höheren und ATP bei niedrigeren neuronalen Impulsen zuständig. Weiterhin reguliert der präsynaptische α_{2A} -Adrenozeptor nicht nur die Freisetzung des NA, sondern übt als Heterozeptor ein negatives Feedback auf die ATP Freisetzung aus. Zudem scheint es durch ATP aktivierte, präsynaptische ATP/ P_2 -Rezeptoren zu geben, die nervenunabhängig große Mengen an NA freisetzen.

Es ist bekannt, dass Neurotransmitter Wachstumsprozesse und Umbauvorgängen in der Niere induzieren können. Trotz der nachgewiesenen erhöhten sympathischen Transmitterfreisetzung in den α_{2A} -Adrenozeptor-KO Mäusen wurden keine Veränderungen am Nierenparenchym und keine Proteinurie an diesen Tieren beobachtet. Da der hier verwendete Mausstamm jedoch auch resistent gegenüber chronischen Nierenschädigungen zu sein scheint, wurden die Mäuse auf einen dafür empfänglichen Stamm zurück gekreuzt und stehen weiteren Studien zur Verfügung.

6. Summary

The kidney is very important for blood pressure regulation. Sympathetic over activity and increased norepinephrine (NA) spill over are closely associated with progression of renal failure. There are three different presynaptic adrenoceptor-subtypes ($\alpha_{2A/D}$, α_{2B} und α_{2C}). Therefore the present study investigated whether the α_{2A} -adrenoceptor-subtype represents the presynaptic adrenoceptor that modulates NA release in mouse kidney. Renal nerve stimulation (RNS) induced a frequency dependent release of NA and increase in renal vasoconstriction. Release of NA and increase in renal vasoconstriction was much higher in mice lacking the α_{2A} -adrenoceptor. Non selective blockade of the α -adrenoceptors increased RNS induced NA release only in presence of the α_{2A} -adrenoceptor. Mice without the α_{2A} -adrenoceptor did not show this effect. This means that in mice kidneys the only presynaptic modulating receptor is the α_{2A} -adrenoceptor. Beside NA there are more neurotransmitters involved in renal vasoconstriction. This became evident since low RNS with blockade of the α -adrenoceptors could not totally block postsynaptic vasoconstriction. After additional blockade of ATP/P₂-purinoceptors no vasoconstriction could be provoked. Accordingly NA only mediates renal vasoconstriction at high neuronal pulses, at low frequencies ATP seems to be the predominant transmitter.

Furthermore we could show that the presynaptic α_{2A} -adrenoceptor not only regulates NA release, but also acts as a heteroreceptor regulating ATP release. In addition, there were presynaptic ATP/P₂-receptors which modulated the release of large amounts of NA from sympathetic nerve endings independently of RNS.

It is well known that growth processes are induced by neurotransmitters in the kidney. Despite the increased release of sympathetic transmitters in α_{2A} -adrenoceptor-knockout mice, these mice did not develop albuminuria or other obvious damage within the renal tissue. Since the analysed mice turned out to be resistant to glomerulosclerosis, we back crossed these mice strain to another more susceptible genetic background. These mice are now available for further studies.

7. Literaturnachweis

- Adamczak, M., M. Zeier, et al. (2002). "Kidney and hypertension." Kidney Int Suppl(80): 62-7.
- Amann, K., L. C. Rump, et al. (2000). "Effects of low dose sympathetic inhibition on glomerulosclerosis and albuminuria in subtotaly nephrectomized rats." J Am Soc Nephrol **11**(8): 1469-78.
- Bradley, E., A. Law, et al. (2003). "Effects of varying impulse number on cotransmitter contributions to sympathetic vasoconstriction in rat tail artery." Am J Physiol Heart Circ Physiol **284**(6): H2007-14.
- Brede, M., G. Nagy, et al. (2003). "Differential control of adrenal and sympathetic catecholamine release by alpha 2-adrenoceptor subtypes." Mol Endocrinol **17**(8): 1640-6.
- Brede, M., F. Wiesmann, et al. (2002). "Feedback inhibition of catecholamine release by two different alpha2-adrenoceptor subtypes prevents progression of heart failure." Circulation **106**(19): 2491-6.
- Brenner, B. M. (1985). "Nephron adaptation to renal injury or ablation." Am J Physiol **249**(3 Pt 2): F324-37.
- Bucheler, M. M., K. Hadamek, et al. (2002). "Two alpha(2)-adrenergic receptor subtypes, alpha(2A) and alpha(2C), inhibit transmitter release in the brain of gene-targeted mice." Neuroscience **109**(4): 819-26.
- Bultmann, R., I. von Kugelgen, et al. (1991). "Contraction-mediating alpha 2-adrenoceptors in the mouse vas deferens." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **343**(6): 623-32.
- Burnstock, G. (1986). "The changing face of autonomic neurotransmission." Acta Physiol Scand **126**(1): 67-91.
- Burnstock, G. (1986). "Purines and cotransmitters in adrenergic and cholinergic neurones." Prog Brain Res **68**: 193-203.
- Burnstock, G. and C. Kennedy (1985). "Is there a basis for distinguishing two types of P2-purinoceptor?" Gen Pharmacol **16**(5): 433-40.
- Bylund, D. B., D. C. Eikenberg, et al. (1994). "International Union of Pharmacology nomenclature of adrenoceptors." Pharmacol Rev **46**(2): 121-36.

- Cleary, L., C. Vandeputte, et al. (2003). "Investigation of postjunctional alpha1- and alpha2-adrenoceptor subtypes in vas deferens from wild-type and alpha(2A/D)-adrenoceptor knockout mice." Br J Pharmacol **138**(6): 1069-76.
- de Leeuw, P. W., P. N. van Es, et al. (1987). "Role of alpha 1- and alpha 2-adrenergic receptors in the human hypertensive kidney." Hypertension **9**(6 Pt 2): III210-2.
- DiBona, G. F. (1985). "Neural control of renal function: role of renal alpha adrenoceptors." J Cardiovasc Pharmacol **7 Suppl 8**: S18-23.
- Docherty, J. R. (1989). "The pharmacology of alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors: evidence for and against a further subdivision." Pharmacol Ther **44**(2): 241-84.
- Docherty, J. R. and L. Hyland (1985). "Evidence for neuro-effector transmission through postjunctional alpha 2-adrenoceptors in human saphenous vein." Br J Pharmacol **84**(2): 573-6.
- Drew, G. M. and S. B. Whiting (1979). "Evidence for two distinct types of postsynaptic alpha-adrenoceptor in vascular smooth muscle in vivo." Br J Pharmacol **67**(2): 207-15.
- Driessen, B., I. von Kugelgen, et al. (1993). "Neural ATP release and its alpha 2-adrenoceptor-mediated modulation in guinea-pig vas deferens." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **348**(4): 358-66.
- Erlinge, D., J. Brunkwall, et al. (1994). "Neuropeptide Y stimulates proliferation of human vascular smooth muscle cells: cooperation with noradrenaline and ATP." Regul Pept **50**(3): 259-65.
- Faber, J. E., N. Yang, et al. (2001). "Expression of alpha-adrenoceptor subtypes by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts in rat aorta and in cell culture." J Pharmacol Exp Ther **298**(2): 441-52.
- Fedan, J. S., G. K. Hogaboom, et al. (1981). "Contribution by purines to the neurogenic response of the vas deferens of the guinea pig." Eur J Pharmacol **69**(1): 41-53.
- Fujii, T., S. Kojima, et al. (1991). "Different mechanisms of polyuria and natriuresis associated with paroxysmal supraventricular tachycardia." Am J Cardiol **68**(4): 343-8.
- Hausberg, M., M. Kosch, et al. (2002). "Sympathetic nerve activity in end-stage renal disease." Circulation **106**(15): 1974-9.

- Hein, L. (2001). "[The alpha 2-adrenergic receptors: molecular structure and in vivo function]." Z Kardiol **90**(9): 607-12.
- Hein, L., J. D. Altman, et al. (1999). "Two functionally distinct alpha2-adrenergic receptors regulate sympathetic neurotransmission." Nature **402**(6758): 181-4.
- Hesse, I. F. and E. J. Johns (1984). "An in vivo study of the alpha-adrenoceptor subtypes on the renal vasculature of the anaesthetized rabbit." J Auton Pharmacol **4**(3): 145-52.
- Ishii, R., K. Shinozuka, et al. (1993). "Methoxamine enhances the release of endogenous noradrenaline from rabbit ear artery: possible involvement of ATP." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **348**(1): 46-52.
- Johnson, C. D., A. M. Coney, et al. (2001). "Roles of norepinephrine and ATP in sympathetically evoked vasoconstriction in rat tail and hindlimb in vivo." Am J Physiol Heart Circ Physiol **281**(6): H2432-40.
- Kash, S. F., B. G. Condie, et al. (1999). "Glutamate decarboxylase and GABA in pancreatic islets: lessons from knock-out mice." Horm Metab Res **31**(5): 340-4.
- Klein, I. H., G. Ligtenberg, et al. (2001). "Sympathetic activity is increased in polycystic kidney disease and is associated with hypertension." J Am Soc Nephrol **12**(11): 2427-33.
- Koomans, H. A., P. J. Blankestijn, et al. (2004). "Sympathetic hyperactivity in chronic renal failure: a wake-up call." J Am Soc Nephrol **15**(3): 524-37.
- Lambrecht, G. (2000). "Agonists and antagonists acting at P2X receptors: selectivity profiles and functional implications." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **362**(4-5): 340-50.
- Le, T. H., A. B. Fogo, et al. (2004). "Modifier locus on mouse chromosome 3 for renal vascular pathology in AT1A receptor-deficiency." Hypertension **43**(2): 445-51.
- Lee, J. Y., G. M. Walsh, et al. (1984). "Differential blocking effects of prazosin and yohimbine on vasopressor responses to sympathetic nerve stimulation and intravenous norepinephrine in the pithed rat." Res Commun Chem Pathol Pharmacol **43**(1): 97-112.
- Ma, L. J. and A. B. Fogo (2003). "Model of robust induction of glomerulosclerosis in mice: importance of genetic background." Kidney Int **64**(1): 350-5.
- Mishima, S., H. Miyahara, et al. (1984). "Transmitter release modulated by alpha-adrenoceptor antagonists in the rabbit mesenteric artery: a comparison

- between noradrenaline outflow and electrical activity." Br J Pharmacol **83**(2): 537-47.
- Oberhauser, V., O. Vonend, et al. (1999). "Neuropeptide Y and ATP interact to control renovascular resistance in the rat." J Am Soc Nephrol **10**(6): 1179-85.
- Ota, K., T. Kimura, et al. (1990). "Effects of intracerebroventricular administration of adrenoceptor-agonists on the regulation of renal water and electrolytes handling through endocrine, renal and hemodynamic function." Tohoku J Exp Med **162**(1): 27-39.
- Petersson, M. J., B. Rundqvist, et al. (2002). "Increased cardiac sympathetic drive in renovascular hypertension." J Hypertens **20**(6): 1181-7.
- Peuhkurinen, K. J., P. A. Uusimaa, et al. (1995). "Hemodynamic recovery, atrial natriuretic peptide, and catecholamines during simulated ventricular tachycardia: effects of ventriculoatrial conduction." Pacing Clin Electrophysiol **18**(1 Pt 1): 75-82.
- Rost, S., C. Daniel, et al. (2002). "P2 receptor antagonist PPADS inhibits mesangial cell proliferation in experimental mesangial proliferative glomerulonephritis." Kidney Int **62**(5): 1659-71.
- Rump, L. C., K. Amann, et al. (2000). "Sympathetic overactivity in renal disease: a window to understand progression and cardiovascular complications of uraemia?" Nephrol Dial Transplant **15**(11): 1735-8.
- Rump, L. C. and V. Oberhauser (1999). "[Chronic renal failure--taming the sympathetic nervous system! New approach to delaying progression]." MMW Fortschr Med **141**(46): 39-41.
- Rump, L. C., E. Schwertfeger, et al. (1993). "Dopamine DA2-receptor activation inhibits noradrenaline release in human kidney slices." Kidney Int **43**(1): 197-204.
- Schwartz, D. D. and K. U. Malik (1989). "Renal periarterial nerve stimulation-induced vasoconstriction at low frequencies is primarily due to release of a purinergic transmitter in the rat." J Pharmacol Exp Ther **250**(3): 764-71.
- Starke, K. (1977). "Regulation of noradrenaline release by presynaptic receptor systems." Rev Physiol Biochem Pharmacol **77**: 1-124.
- Starke, K. (2001). "Presynaptic autoreceptors in the third decade: focus on alpha2-adrenoceptors." J Neurochem **78**(4): 685-93.

- Styrna, J., W. Kilarski, et al. (2003). "Influence of the CBA genetic background on sperm morphology and fertilization efficiency in mice with a partial Y chromosome deletion." Reproduction **126**(5): 579-88.
- Takeuchi, K., K. Shinozuka, et al. (1994). "Methoxamine-induced release of endogenous ATP from rabbit pulmonary artery." Eur J Pharmacol **254**(3): 287-90.
- Todorov, L. D., S. Mihaylova-Todorova, et al. (1996). "Evidence for the differential release of the cotransmitters ATP and noradrenaline from sympathetic nerves of the guinea-pig vas deferens." J Physiol **496 (Pt 3)**: 731-48.
- Trendelenburg, A. U., W. Klebroff, et al. (2001). "A study of presynaptic alpha2-autoreceptors in alpha2A/D-, alpha2B- and alpha2C-adrenoceptor-deficient mice." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **364**(2): 117-30.
- Trendelenburg, A. U., M. Philipp, et al. (2003). "All three alpha2-adrenoceptor types serve as autoreceptors in postganglionic sympathetic neurons." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **368**(6): 504-12.
- Vizi, E. S., B. Sperlagh, et al. (1992). "Evidence that ATP released from the postsynaptic site by noradrenaline, is involved in mechanical responses of guinea-pig vas deferens: cascade transmission." Neuroscience **50**(2): 455-65.
- Vonend, O., T. Apel, et al. (2004). "Modulation of gene expression by moxonidine in rats with chronic renal failure." Nephrol Dial Transplant **19**(9): 2217-22.
- Vonend, O., T. Grote, et al. (2003). "P2Y-receptors stimulating the proliferation of human mesangial cells through the MAPK42/44 pathway." Br J Pharmacol **139**(6): 1119-26.
- Vonend, O., P. Marsalek, et al. (2003). "Moxonidine treatment of hypertensive patients with advanced renal failure." J Hypertens **21**(9): 1709-17.
- Vonend, O., V. Oberhauser, et al. (2002). "ATP release in human kidney cortex and its mitogenic effects in visceral glomerular epithelial cells." Kidney Int **61**(5): 1617-26.
- Vonend, O., A. Okonek, et al. (2005). "Renovascular effects of sympathetic cotransmitters ATP and NPY are age-dependent in spontaneously hypertensive rats." Cardiovasc Res **66**(2): 345-52.
- Vonend, O., J. Stegbauer, et al. (2005). "Noradrenaline and extracellular nucleotide cotransmission involves activation of vasoconstrictive P2X(1,3)- and P2Y6-like receptors in mouse perfused kidney." Br J Pharmacol **145**(1): 66-74.

- Wolff, D. W., V. M. Buckalew, Jr., et al. (1984). "Renal alpha 1- and alpha 2- adrenoceptor mediated vasoconstriction in dogs: comparison of phenylephrine, clonidine, and guanabenz." J Cardiovasc Pharmacol **6 Suppl 5**: S793-8.
- Xu, J., G. Li, et al. (2005). "Renalase is a novel, soluble monoamine oxidase that regulates cardiac function and blood pressure." J Clin Invest **115**(5): 1275-80.
- Ziganshin, A. U., C. H. Hoyle, et al. (1993). "PPADS selectively antagonizes P2X-purinoceptor-mediated responses in the rabbit urinary bladder." Br J Pharmacol **110**(4): 1491-5.
- Zoccali, C., F. Mallamaci, et al. (2002). "Plasma norepinephrine predicts survival and incident cardiovascular events in patients with end-stage renal disease." Circulation **105**(11): 1354-9.
- Zoccali, C., F. Mallamaci, et al. (2003). "Neuropeptide Y, left ventricular mass and function in patients with end stage renal disease." J Hypertens **21**(7): 1355-62.

8. Danksagung

Ich danke sehr herzlich Herrn Prof. Dr. Rump für die Überlassung des Themas dieser Dissertation. Ein großer Dank gilt seiner großzügigen Unterstützung.

Zudem möchte ich Herrn Prof. Dr. Roth für seine umfangreiche Hilfe und Unterstützung bei der Erstellung meiner Arbeit danken.

Herrn Jun. Prof. Dr. Vonend danke ich für sein Engagement und die wertvolle Betreuung meiner Arbeit. Durch seine Anleitung und seine wissenschaftliche Erfahrung war es mir möglich diese Arbeit zu einer sehr erfolgreichen Vollendung zu bringen.

Ein großes Dankeschön gilt auch Herrn Dr. Stegbauer, der mir bei den Versuchen und der Erstellung der Arbeit hilfreich zur Seite stand.

Weiterhin möchte ich auch Frau Bettina Priesch, unserer MTA, danken, dass sie als Ansprechpartner immer für mich da war und mir eine Unterstützung in jeder Hinsicht war.

Vor allem bei allen graphischen und Software Problemen unterstützte mich Herr Moritz Micus und stand mir immer hilfreich zur Seite. Auch ihm einen großen Dank.

Ein besonderes Dankeschön gilt auch meiner Schwester Nadine Habel, die mir bei der Korrektur der Arbeit zur Seite stand.

Zudem möchte ich meinen Eltern danken, die mich Zeit meines Lebens immer unterstützt und bestärkt haben. Ohne ihre Hilfe wäre es mir nicht möglich gewesen meinen Berufs- und Studienwunsch zu verfolgen, und schließlich auch noch eine Dissertation anzustreben.

9. Erklärung

Ich erkläre:

Ich habe die vorliegende Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen sind als solche kenntlich gemacht. Bei denen von mir durchgeführten und in der Dissertation beschriebenen Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5174-2



9 7 8 3 8 3 5 9 5 1 7 4 7

