

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

**Wirkungen einer chronischen Vorbehandlung
mit dem selektiven Adenosin-A1-Rezeptor-
Agonisten 2-Chloro-N6-Cyclopentyladenosin
(CCPA) auf die Nierenfunktion der Ratte**

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

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

**vorgelegt von
Jannis Justus Maaß
aus
Stuttgart**

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. Lang

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	3
1.1 Adenosin.....	5
1.1.1 Der Adenosin-A ₁ -Rezeptor.....	7
1.2 Adenosin in der Niere.....	8
1.2.1 Adenosinrezeptoren in der Niere.....	9
1.2.2 Autoregulation der Niere.....	10
1.2.3 Hämodynamische Regulation durch Adenosin.....	12
1.2.4 Adenosin und tubulo-glomeruläres Feedback (TGF).....	15
1.2.5 Einfluss von Adenosin auf die GFR.....	16
1.2.6 Einfluss von Adenosin auf den Flüssigkeits- und Elektrolyttransport.....	17
1.2.7 Adenosin und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS).....	18
1.2.8 Adenosin und Hypoxie in der Niere.....	20
1.2.9 Zusammenfassung: Renale Wirkungen von Adenosin in der Niere.....	21
1.2.10 Rolle von Adenosin beim Nierenversagen.....	21
1.3 Extrarenale Wirkungen des Adenosin-A ₁ -Rezeptors.....	23
1.4 Anwendungsmöglichkeiten für Adenosin-A ₁ -Rezeptor-Agonisten.....	25
1.4.1 Allosterische Modulation des Adenosin-A ₁ -Rezeptors.....	27
1.5 A ₁ -Antagonisten zur Behandlung des kardioresenalen Syndroms.....	27
1.6 2-Chloro-N ⁶ -cyclopentyladenosine (CCPA).....	29
1.7 Einfluss der Vorbehandlung.....	32
2 Fragestellung	35
3 Versuchsaufbau, Material und Methoden	37
3.1 Versuche.....	37
3.1.1 Gruppeneinteilung.....	37
3.1.2 Versuchsprotokoll Vorbehandlung.....	39
3.1.3 Versuchsprotokoll Clearance.....	39
3.2 Versuchstiere.....	42
3.2.1 Tierhaltung.....	42
3.2.2 Diät und Vorbehandlung.....	42
3.2.3 Vorbehandlung mit CCPA.....	43
3.2.4 Stoffwechselkäfig.....	44
3.2.5 Narkose und operative Eingriffe.....	44
3.2.6 Pharmaka / Lösungsmittel / Infusionen.....	47
3.3 Meßgrößen.....	49
3.3.1 Gewichtsverlauf.....	49
3.3.2 Trinkmenge.....	49
3.3.3 Glomeruläre Filtrationsrate.....	49
3.3.4 Renaler Blutfluss.....	50
3.3.5 Urinausscheidung, Elektrolytmessung.....	52
3.3.6 Elektrolytkonzentration im Plasma.....	53
3.3.7 Arterieller Blutdruck.....	54
3.3.8 Mittlerer arterieller Blutdruck.....	54
3.3.9 Herzfrequenz.....	55
3.3.10 Hämatokrit.....	55
3.3.11 Plasma-Renin-Aktivität.....	55

3.3.12 Genexpression A ₁ /A _{2A} -Rezeptoren	58
3.3.13 Rezeptor-Protein (Immuno-Blot).....	61
3.4 Statistische Analyse.....	62
4 Ergebnisse	63
4.1 Gewichtsverlauf	63
4.2 Trinkmenge, Urinmenge und Elektrolytausscheidung während der Vorbehandlung	64
4.3 Glomeruläre Filtrationsrate	68
4.4 Urinzeitvolumen	70
4.5 Elektrolytausscheidung	72
4.6 Elektrolytspiegel im Plasma	79
4.7 Herzfrequenz	82
4.8 Mittlerer arterieller Blutdruck.....	84
4.9 Renaler Blutfluss.....	86
4.10 Hämatokrit	90
4.11 Plasma-Renin-Aktivität.....	91
4.12 Genexpression A ₁ /A _{2A} -Rezeptoren	91
4.13 Rezeptor-Protein (Western-Blot).....	93
5 Diskussion	95
5.1 Hypothese.....	95
5.2 Diskussion der Ergebnisse	96
5.2.1 Gewichtsverlauf.....	96
5.2.2 Trinkmenge, Urinmenge und Elektrolytausscheidung während der Vorbehandlung	97
5.2.3 Glomeruläre Filtrationsrate	98
5.2.4 Urinzeitvolumen.....	99
5.2.5 Elektrolytausscheidung	100
5.2.6 Elektrolytspiegel im Plasma	101
5.2.7 Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck	102
5.2.8 Renaler Blutfluss	103
5.2.9 Plasma-Renin-Aktivität	104
5.2.10 Genexpression A ₁ /A _{2A} -Rezeptoren	104
5.2.11 Rezeptor-Protein	105
5.3 Diskussion der Methodik.....	106
5.3.1 Versuchsplanung.....	106
5.3.2 Vorbehandlung	107
5.3.1 Versuchsdurchführung	109
5.4 Schlussfolgerung	109
6 Zusammenfassung.....	112
7 Literaturverzeichnis	114
8 Abkürzungen	130
9 Danksagung.....	132
10 Lebenslauf	133

1 Einleitung

Adenosin übernimmt im Körper eine Vielzahl von Funktionen. Als Metabolit des ATP-Abbaus ist es an der Regulation des Energiestoffwechsels der Organe entscheidend beteiligt. In den vergangenen Jahren konnte der Einfluss von Adenosin bei vielen physiologischen und pathophysiologischen Mechanismen nachgewiesen werden (121). So wirkt Adenosin bei Ischämien kardio- und cerebroprotektiv (90, 175, 195). In der Niere reguliert es Durchblutung, Filtrations- und Resorptionsleistung (265). Ferner wirkt es antilipolytisch, antiinflammatorisch und antinozizeptiv (22, 47, 220). Auch bei der Regulation des Schlafes ist Adenosin von Bedeutung (202).

Lange bevor die Bedeutung von Adenosin für die Niere erkannt wurde, beschrieb Koschlakoff im Jahr 1864 die harntreibende und ödemausschwemmende Wirkung von Koffein (137). Er beobachtete eine gesteigerte Harnausscheidung nach wiederholter Gabe von Koffein bei zwei Patienten mit kardialen Ödemen und chronischem Nierenleiden. Allerdings kam es nach 14 Tagen zu einem Wirkungsverlust. In den letzten Jahren wurde gezeigt, dass dieser Effekt des Koffeins durch eine antagonistische Wirkung an Adenosin-A₁-Rezeptoren vermittelt wird (212).

In den letzten 40 Jahren wurden die vielfältigen Wirkungen von Adenosin genauer erforscht. Dabei wurden verschiedene selektive Agonisten und Antagonisten entwickelt, die spezifisch auf einen der vier Adenosin-Rezeptorsubtypen auf den Zelloberflächen verschiedener Organe (Herz, Niere, ZNS, Fettgewebe u.a.) wirken. So können unerwünschte Nebenwirkungen reduziert werden. Daraus haben sich neue therapeutische Ansatzpunkte ergeben. Erste Adenosin-Agonisten für den A_{2A}-Rezeptor (Regadenoson, Lexiscan®, CV Therapeutics, Palo Alto) waren in klinischen Studien bei der Bildgebung der Koronardurchblutung wirksam und haben 2008 eine Zulassung von der FDA erhalten (30, 44).

Die Forschung zur Therapie von kardiovaskulären Erkrankungen mit Adenosin-A₁-Agonisten und –Antagonisten befindet sich derzeit in klinischen Studien. Da diese Substanzen wirkungsvolle Therapiemöglichkeiten versprechen, erscheint

eine gezielte Untersuchung der Adenosin-A₁-Rezeptor-Funktion von großem Interesse. Durch verschiedene Arbeiten konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass der Adenosin-A₁-Rezeptor eine bedeutende Rolle bei der Regulation der Nierenfunktion spielt und an der Entwicklung des Nierenversagens beteiligt ist (265).

Ausgangspunkt für diese Arbeit waren klinische Studien mit Adenosin-A₁-Rezeptor-*Antagonisten*. Diese steigerten, so wie schon von Koschlakoff bei Koffein beobachtet, wirkungsvoll die Nierenfunktion bei Patienten mit Herzinsuffizienz. Daneben schützen A₁-Antagonisten auch vor Nierenversagen, das beispielsweise durch Kontrastmittel ausgelöst werden kann (66).

Gleichzeitig wird aber auch die Anwendung von Adenosin-A₁-*Agonisten* geprüft. Diese ermöglichen neue Therapien, die aktuell in klinischen Studien zu folgenden Krankheitsbildern untersucht werden: Vorhofflimmern, paroxysmale supraventrikuläre Tachykardien, Angina pectoris, Diabetes mellitus Typ 2, Hyperlipidämie und Schmerzsyndrome (64).

Dabei stellt sich die Frage, wie sich der Einsatz von A₁-Agonisten auf die Nierenfunktion auswirkt. Sollte es zu einer dauerhaften Beeinträchtigung der Nierenfunktion kommen, wäre die Anwendung von A₁-Agonisten stark eingeschränkt und gegebenenfalls kontraindiziert.

1.1 Adenosin

Das Nukleosid Adenosin besteht aus der Purinbase Adenin und dem Zucker β -D-Ribose (6-Aminopurin-9 β -D-ribofuranosid, Summenformel: $C_{10}H_{13}N_5O_4$) (siehe Abbildung 1). Adenin ist mit der Ribose über deren C1'-Atom N-glykosidisch verknüpft.

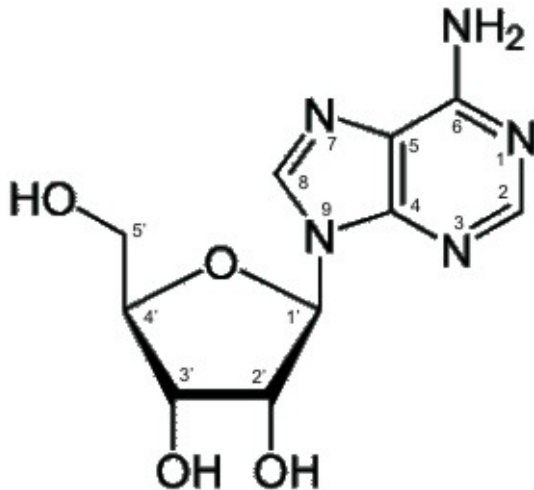


Abbildung 1: Strukturformel von Adenosin

Adenosin ist im Körper ubiquitär vorhanden. Als extrazelluläres Signalmolekül hat es eine große Bedeutung. Im Energiestoffwechsel spielen die 5'-Phosphatester des Adenosins eine besondere Rolle (Adenosin-5'-triphosphat (ATP), Adenosin-diphosphat (ADP) und Adenosin-monophosphat (AMP)). Als Nukleotid 2'-Desoxyadenosin-5'-monophosphat (desoxygeniertes AMP) ist es Teil des genetischen Codes. Cyclisches AMP (cAMP), welches durch das Enzym Adenylatcyclase aus ATP gebildet wird, ist als Botenstoff („second messenger“) Teil intrazellulärer Signalkaskaden. S-Adenosylmethionin, die aktive Form des Methionins, wird für die Übertragung von Methylgruppen benötigt (156).

Intrazellulär entsteht Adenosin überwiegend durch Dephosphorylierung von Adenosin-5-Monophosphat (AMP) durch die 5'-Nukleotidase und durch Hydrolyse von S-Adenosylhomocystein (SAH) durch die SAH-Hydrolase (262).

Durch Nucleosidtransporter (ENT) gelangen Adenin-Nucleoside aus den Zellen ins Interstitium und können dort Rezeptoren aktivieren. Die meisten Gewebe und Zellen setzen Adenosin extrazellulär frei.

Extrazelluläres ATP wird durch membranständige Ektoenzyme abgebaut (291). Adenosin entsteht aus AMP durch die 5'-Ectonucleotidase (CD73) und aus cAMP durch die Ecto-Phosphodiesterase.

Im Extrazellulärraum befindliches Adenosin wird wieder in Zelle aufgenommen oder erneut im Purinstoffwechsel verwendet oder durch die Adenosindesaminase (ADA) zu Inosin abgebaut.

Abbildung 2 veranschaulicht die verschiedenen Wege, auf welchen Adenosin entstehen und abgebaut werden kann.

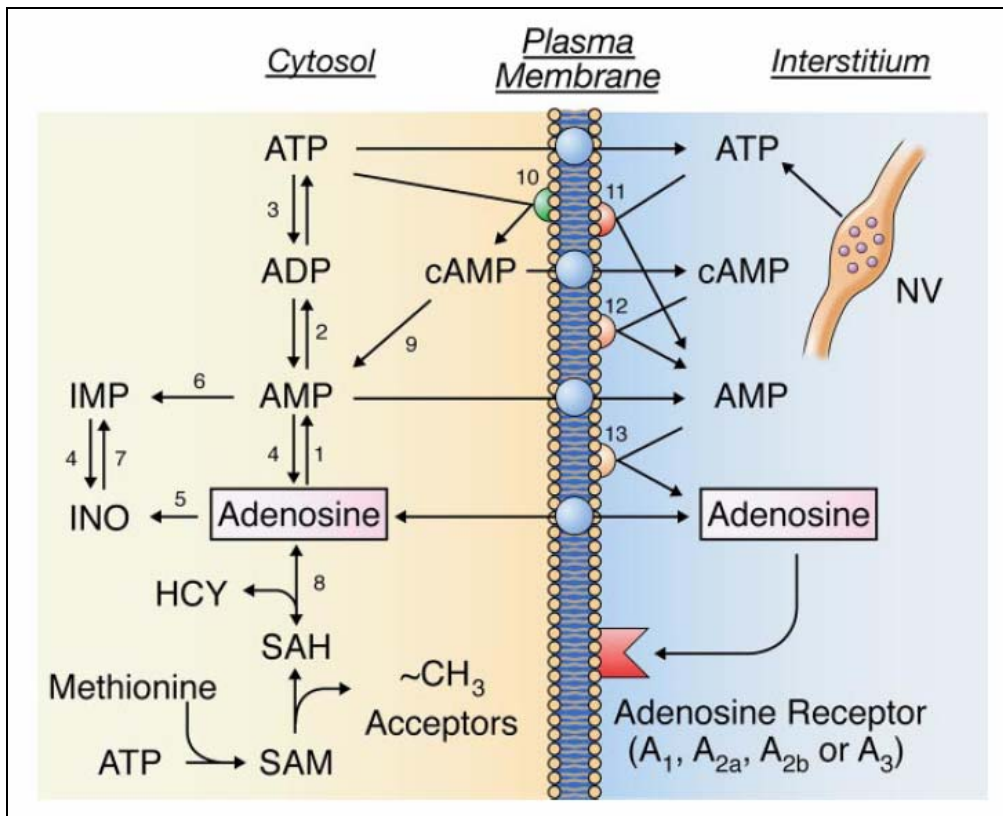


Abbildung 2: Adenosin-Bildung und Metabolismus nach Vallon et al. (265)
 (Abkürzungen: HCY=Homocystein, IMP=Inosinmonophosphat, INO=Inosin, SAH=S-Adenosyl-Homocystein, SAM=S-Adenosyl-Methionin, 1=Adenosinkinase, 2=Adenylylkinase, 3=ATPasen, 4=5'-Nucleotidase, 5=Adenosindesaminase, 6=AMP-Deaminase, 7=Inosinkinase, 8=SAH-Hydrolase, 9=Phosphodiesterase, 10=Adenylylcyclase, 11=ecto-ATPasen, 12=ecto-Phosphodiesterasen, 13=ecto-5'-Nucleotidase, NV=Neuronale Varikosität)

Adenosin ist an der metabolische Kontrolle in vielen Geweben beteiligt. Bei Energiemangel steigt die interstitielle Konzentration von Adenosin an. Über die Bindung an Rezeptoren auf der Zelloberfläche kann es die Stoffwechselaktivität regulieren. Die Aktivierung von A_{2A} -Rezeptoren bewirkt eine lokale Vasodilatation, damit kann ein erhöhter Sauerstoff- und Energiebedarf durch eine gesteigerte Durchblutung angepasst werden.

Auf Grund seiner extrem kurzen Halbwertszeit im Blut von wenigen Sekunden ist es überwiegend lokal wirksam (171). Die extrazelluläre Adenosin-Konzentration beträgt unter physiologischen Bedingungen zwischen 5 und 100 nM (Niere 5 nM, Gehirn 20 nM, Herz 100 nM), kann aber bei Ischämie, Hypoxie, Trauma, Stress oder Entzündung schnell auf das Hundertfache (10 μ M) ansteigen (227, 284).

Über mitogen aktivierte Protein-Kinase(MAPK)-Signalwege wird den Adenosinrezeptoren eine Rolle bei Zellproliferation, -tod und -differenzierung zugeschrieben (227).

Die beiden Methylxanthine Koffein und Theophyllin wirken als Adenosin-Antagonisten an A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren.

1.1.1 Der Adenosin- A_1 -Rezeptor

Man unterscheidet vier Adenosin-Rezeptoren (AR), welche die Klasse der P1-Purinorezeptoren bilden (75). Neben dem A_1 -Rezeptor existieren A_{2A} -, A_{2B} - und A_3 -Adenosin-Rezeptoren. Die Signaltransduktion des A_1 -Adenosin-Rezeptors wird über mehrere Wege vermittelt: über G_i -Proteine Hemmung der Adenylatcyclase, Aktivierung der Phospholipase C, Inhibition der Phospholipase A, Aktivierung eines G-Protein gekoppelten K^+ -Kanals, Inhibition eines Ca^{2+} -Kanals (77, 130, 173, 174, 268, 269). Die G_i -Proteine sind Pertussis-Toxinsensitiv. Die Sequenz-Homologie zwischen den Adenosin-Rezeptoren ist gering. Der A_1 -AR hat mit dem A_3 -AR noch die größte Ähnlichkeit, sie beträgt jedoch nur 49% (89).

Der A_1 -Rezeptor hat eine hohe (nanomolare) Affinität für Adenosin, während die

A_{2A}- und A_{2B}- Rezeptoren erst bei mikromolaren Konzentrationen stimuliert werden (75).

Bei der Entwicklung von selektiven Agonisten wurde festgestellt, dass eine N6-Substitution mit Alkyl-, Cycloalkyl- oder Arylalkyl-Gruppen die Selektivität für den A₁-Rezeptor steigert (63).

Der A₁-Rezeptor wird fast ubiquitär exprimiert, vor allem auf Adipozyten, Myokardzellen, auf Entzündungszellen wie Neutrophilen sowohl in der Niere und in fast allen Regionen des ZNS und im Rückenmark (22, 47, 76, 175, 266).

Trotz der wichtigen Funktionen des A₁-Rezeptors sind A₁-AR-Knockout-Mäuse lebensfähig (76, 285). Die Organfunktionen sind nicht hochgradig eingeschränkt. Die Tiere zeigen höhere Blutdruckwerte (272). Im Vordergrund stehen vor allem ZNS-Auffälligkeiten (86). Ihre Lebenserwartung ist verkürzt.

1.2 Adenosin in der Niere

In der normoxischen Niere kommt Adenosin sowohl intra- als auch extrazellulär vor (185, 188, 265). Über die extrazellulären Rezeptoren wirkt es auf das renale Gefäß- und Tubulussystem. Der Adenosingehalt der Niere steigt, wenn die ATP-Hydrolyse durch erhöhten Energiebedarf für Reabsorption gesteigert wird oder wenn bei Hypoxie vermindert ATP synthetisiert werden kann (185, 188). Bei Kaninchen konnte ein Anstieg der extrazellulären Adenosinkonzentration bei Sauerstoffmangel um den Faktor 6 bis 8 beobachtet werden (165).

Erheblichen Einfluss auf die interstitielle Adenosin-Konzentration hat auch die Natriumchlorid-Aufnahme (231). Eine kochsalzreiche Diät erhöht die Konzentration des Autakoids bis um den Faktor 7, bei NaCl-armer Diät fällt der Gehalt um bis zu 64% ab.

Es bestehen große regionale Konzentrationsunterschiede von Adenosin in der Niere. Der Adenosingehalt ist vom Sauerstoffangebot abhängig. Im Vergleich zur Rinde ist die Adenosin-Konzentration im Mark, wo das Sauerstoffangebot deutlich niedriger ist, um den Faktor 3-4 höher (165).

1.2.1 Adenosinrezeptoren in der Niere

Die im Folgenden beschriebenen Expressionsmuster wurden durch semiquantitative mRNA-Messungen in Rattennieren bestimmt (270, 283). Sie sind für Ratte und Maus sehr ähnlich. Ferner konnten ähnliche Muster auch durch In-Situ-Hybridisierung beobachtet werden (273).

Die höchste Expression in der gesamten Niere zeigen A_{2A} -Rezeptoren (Verhältnis A_1 -AR: A_{2A} -AR: A_{2B} -AR 1: 2,6: 0,6). Die Expression von A_1 -Rezeptoren ist im inneren Mark deutlich höher als im äußeren Mark und Kortex (Verhältnis Kortex: äußeres Mark: inneres Mark 1:6:29).

A_1 -Rezeptoren sind in allen Strukturen der Niere zu finden. Sie sind stark exprimiert in afferenten Arteriolen, im juxtaglomerulären Apparat, im dünnen absteigenden Teil der Henleschen Schleife und im Sammelrohr und etwas schwächer im medullären Teil des aufsteigenden Astes der Henleschen Schleife (siehe Abbildung 3). Vitzthum et al. konnten im proximalen Tubulus keine mRNA des A_1 -Rezeptors nachweisen (270). Dies widerspricht Studien von Yamaguchi et al. und funktionellen Studien, die eine starke natriuretische und diuretische Wirkung von A_1 -Antagonisten im proximalen Tubulus beobachteten (134, 167, 246, 278, 283). Ferner konnten durch Immunhistochemie A_1 -Rezeptoren im proximalen Tubulus dargestellt werden (234).

Die Expression von A_{2A} -Rezeptoren ist assoziiert mit den renalen Blutgefäßen und beschränkt sich auf Glomeruli und afferente Arteriolen (270). A_{2B} -Rezeptoren sind ebenfalls im renalen Gefäßbett zu finden, in der Niere sind sie jedoch deutlich weniger exprimiert als A_1 - und A_{2A} -Rezeptoren (99). A_3 -Rezeptoren konnten in den Nierentubuli nicht nachgewiesen werden (270).

Renoprotektiv wirken A_1 -Rezeptoren in glatten Muskelzellen der Gefäße und in proximalen Tubuluszellen über mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK), insbesondere extrazellulär-regulierte Kinasen (ERK) und den Akt-Signalweg via Proteinkinase B (Akt) (123). MAPK, ERK und Akt-Signalwege schützen vor endothelialer Apoptose (28, 126).

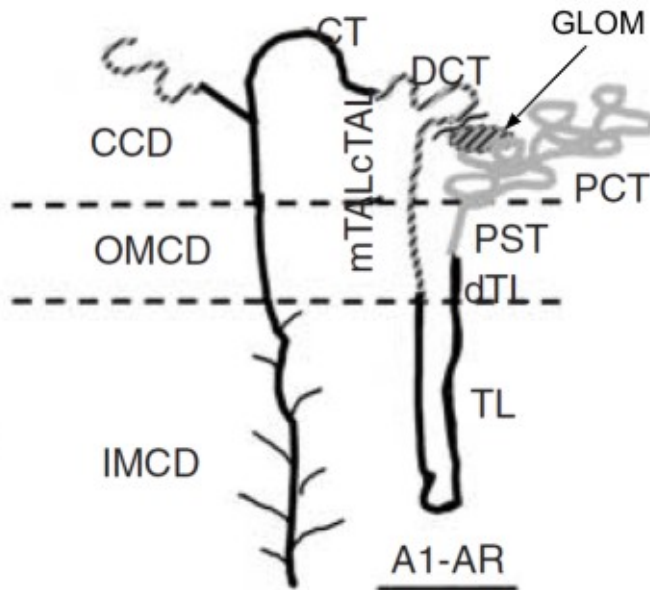


Abbildung 3: Genexpression des A₁-Rezeptors entlang des Nephrons in der Rattenniere nach (270) (schwarze Markierung bedeutet starke Expression des A₁-Rezeptors, Abkürzungen: GLOM= Glomerulum, PCT= proximaler Tubulus Pars convoluta, PST= proximaler Tubulus, Pars recta, dTL= absteigender Ast der Henleschen Schleife, TL= dünner Abschnitt der Henleschen Schleife, m/cTAL= medullärer / kortikaler dicker aufsteigender Ast der Henleschen Schleife, DCT= distaler Tubulus, Pars convoluta, CT= Verbindungstubulus, CCD= kortikales Sammelrohr, OMCD= äußerer medullärer Teil des Sammelrohres, IMCD= innerer medullärer Teil des Sammelrohres)

1.2.2 Autoregulation der Niere

Die Niere ist auf eine ausreichende Durchblutung angewiesen, damit sie ihre Organfunktion, das heißt Flüssigkeits-, Elektrolyt- und Fremdstoffausscheidung sowie Volumen- und Elektrolythomöostase, ausüben kann. So zählen die beiden Nieren mit 20% des Herzminutenvolumens (120ml/min) zu den am besten durchbluteten Organen des Körpers. Die Niere ist in der Lage, in einem Bereich systolischer Blutdrücke von 80 bis 160 mm Hg ihre Durchblutung und Filtrationsleistung (180l/Tag) weitgehend konstant zu halten. Dieses Prinzip nennt man Autoregulation. Die Durchblutung wird durch den Tonus der afferenten und efferenten Arteriolen kontrolliert. Bei einem moderaten Anstieg des arteriellen Druckes erhöht die Niere den Widerstand im Vas afferens, so

dass die Filtrationsleistung nicht beeinflusst wird. Die Filtrationsmenge unterliegt einer strengeren Autoregulation als die Nierendurchblutung.

Bei einem Anstieg der Nierendurchblutung käme es ohne Autoregulation zu einer Zunahme der GFR. Das Flüssigkeitsvolumen und die Elektrolytmenge, die rückresorbiert werden müssten, nähmen zu. Dadurch stiege der Energiebedarf der Niere. Dieser hängt entscheidend von der filtrierten Natrium-Menge im Primärharn ab, da der Na^+ -Transport vorwiegend über aktive Transportprozesse wie Na^+/K^+ -ATPasen erfolgt. Der Na^+ -Transport erzeugt einen Gradienten über die Tubulusmembran, der für Na^+ -Cotransporter und sekundär-aktive Transportmechanismen wie Reabsorption von Aminosäuren, Glukose und Phosphat benötigt wird.

Aus diesem Grund verfügt die Niere über Mechanismen, die sie vor gesteigertem Energiebedarf bei erhöhter Durchblutung schützen, man spricht von einer metabolischen Kontrolle der Organfunktion. Dieses Prinzip bedeutet, dass die Durchblutung an den Bedarf an Energiezufuhr angepaßt wird. So wird die Durchblutung der Muskulatur bei erhöhter Leistung gesteigert. Da in der Niere die metabolische Leistung von der Durchblutung abhängig ist, würde eine Steigerung der Durchblutung zu mehr Resorptionsarbeit führen, was einem positivem Feedback entspräche und mit der sehr guten Autoregulation nicht vereinbar wäre. Daher spricht man von einer metabolischen Konstriktion in der Niere, im Gegensatz zur metabolischen Dilatation der anderen Organe (265).

Die Autoregulation der Niere wird über myogene, neuronale und metabolische Mechanismen kontrolliert. Wird Druck auf glatte Gefäßmuskelzellen durch eine Erhöhung des Blutdrucks ausgeübt (Dehnungsreiz), so reagieren diese mit einer Kontraktion. In welchem Umfang diese myogene Komponente, auch als Bayliss-Effekt bezeichnet, in der Niere an der Autoregulation beteiligt ist, ist bisher unvollständig aufgeklärt.

Renkin et al. untersuchten den Einfluss neuronaler Regulation (208). Sie zeigten, dass denervierte Nieren ihre Durchblutung ebenso konstant halten können wie innervierte Nieren. Somit ist auch die neuronale Komponente nicht entscheidend für die Kontrolle der Durchblutung.

Das Konzept einer metabolischen Kontrolle der Organdurchblutung, wie zum Beispiel beim Herzmuskel, wurde früher für die Nierendurchblutung auf Grund der oben genannten positiven Rückkopplung abgelehnt (207, 252): Erhöhte Durchblutung → Erhöhte Filtration → Erhöhte Resorptionsarbeit der Tubuli → Vasodilatation mit weiter erhöhter Filtration.

Dass das Konzept einer metabolischen Konstriktion auf die Niere anwendbar ist, wurde durch Osswald et al. (182, 185, 189) gezeigt. Dazu passt, dass die Niere eine adenosinbedingte postokklusive Ischämie zeigt, im Gegensatz zur postokklusiven Hyperämie der Muskeldurchblutung. Diese vaskuläre Antwort der Niere auf Hypoxie wird durch Adenosin-A₁-Rezeptoren vermittelt (200).

A₁-Knockout-Mäuse weisen eine eingeschränkte Autoregulation auf (27, 106, 225, 241). Durch Absenkung des arteriellen Blutdruckes kommt es zu deutlich ausgeprägteren Abfällen der glomerulären Filtrationsrate (GFR) und des renalen Blutflusses (RBF) als bei Wildtyp-Tieren (106). Es fehlt eine effektive Kompensierung des tubuloglomerulären Feedbacks.

Demnach kommt der metabolischen Kontrolle eine entscheidende Rolle bei der Autoregulation der Niere zu.

1.2.3 Hämodynamische Regulation durch Adenosin

Drury and Szent-Gyorgi stellten bereits 1929 fest, dass Adenosin in der Niere eine Vasokonstriktion bewirkt (55). In verschiedenen Tierexperimenten konnte gezeigt werden, dass *Bolusinjektionen* von Adenosin in die Aorta abdominalis oder Arteria renalis den renalen Blutfluss für wenig Sekunden reduzieren (siehe Abbildung 4) (186, 215). Dieser Effekt lässt sich durch unselektive Adenosin-Antagonisten wie Theophyllin hemmen (183). Die Anwendung von selektiven Adenosin-A₁-Antagonisten hat gezeigt, dass die präglomeruläre Vasokonstriktion durch Aktivierung von A₁-Rezeptoren vermittelt wird (50, 51, 200)

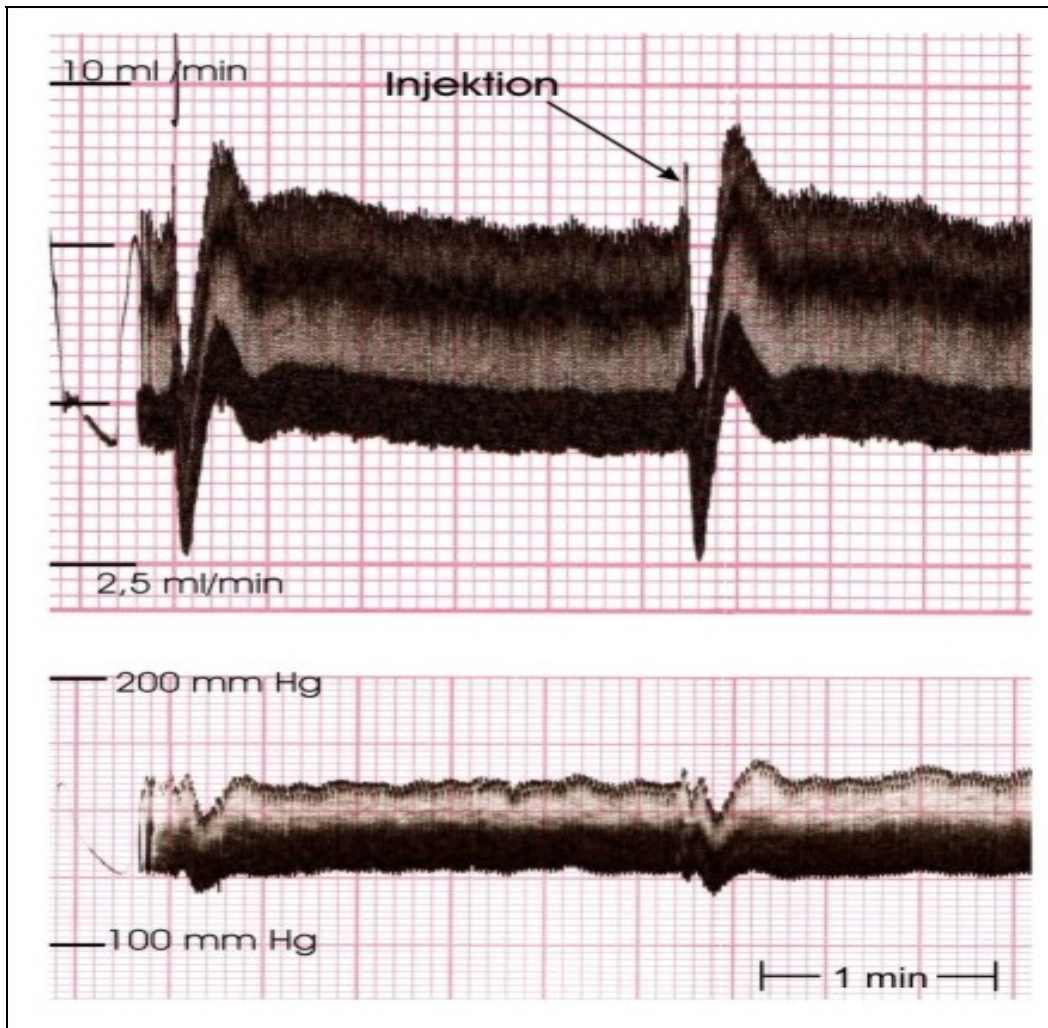


Abbildung 4: Adenosin-Einzelinjektion in die Aorta abdominalis: Synchrone Registrierung von RBF (oben) und Blutdruck (unten): Der RBF-Abfall geht dem Blutdruckabfall voraus. (Injektion von 10nmol Adenosin, Registrierungsgeschwindigkeit 25mm/min, Registrierung vom 10.03.08)

Bei einer *Dauerinfusion* von Adenosin in die Nierenarterie wird der renale Blutfluss zunächst vermindert und steigt dann nach wenigen Minuten auf oder über das Ausgangsniveau an (siehe Abbildung 5) (183, 186, 189). Zunächst überwiegt die kortikale Vasokonstriktion in allen Zonen (161, 194). In den oberflächlichen Zonen bleibt die Konstriktion, die durch den A_1 -AR vermittelt wird, erhalten. In tieferen kortikalen Zonen kommt es durch A_2 -AR und andere Autakoide (z. B. Prostaglandine) vermittelt zur Vasodilatation (161, 166). Die GFR nimmt ab und bleibt während der Adenosin-Infusion erniedrigt, während der renale Gefäßwiderstand kaum verändert ist. Nach Absetzen der Infusion kommt es zu einer überschießenden Durchblutung (189) (siehe Abbildung 5).

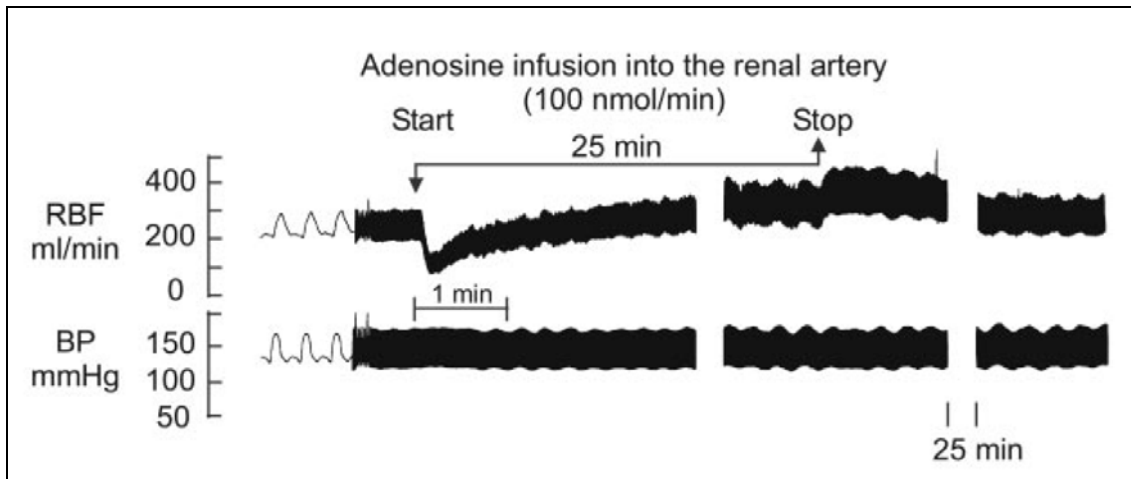


Abbildung 5: Einfluss einer 25minütigen Adenosin-Infusion auf den renalen Blutfluss: Nach wenigen Minuten erholt sich der RBF. Nach Absetzen der Infusion kommt es zu einer überschießenden Durchblutung (189)

John Hall et al. untersuchten die Wirkung von dauerhaft erhöhten Adenosin-Konzentrationen in der Niere (103). Dazu implantierten sie Hunden einen Katheter in die Nierenarterie und infundierten den wachen Tieren über sechs Tage Adenosin mit einer Rate von 2 µg/min und kg. Die Infusion senkte GFR und Filtrations-fraktion, hatte aber keinen Einfluss auf Elektrolyt- und Wasserausscheidung. Damit war gezeigt, dass an wachen Hunden intrarenale Adenosin-Infusionen die GFR senken ohne die Durchblutung zu vermindern, vergleichbar mit den Ergebnissen an narkotisierten Hunden

Durch Mikropunktionsmessungen an Hunden konnte gezeigt werden, dass eine kontinuierliche Adenosin-Infusion eine Umverteilung der Durchblutung bewirkt (188, 189). Eine Infusion von Adenosin in das Nierengewebe der kortikomedullären Zone bewirkte zunächst eine deutliche Abnahme des medullären Blutflusses, gefolgt von einem kräftigem Anstieg (4). Der Blutfluss oberflächlicher kortikaler Areale nimmt ab, in tieferen marknahen Arealen nimmt er zu (33, 161, 237). Die Vasokonstriktion oberflächlicher Nephronen wird durch den A₁-Rezeptor vermittelt. Selektive A₁-Agonisten wie N-Cyclopentyladenosin (CPA) bewirken eine Abnahme der Gesamtnierendurchblutung. Die Applikation des unselektiven Adenosin-Agonisten 2-Chloroadenosin bewirkt in niedriger Konzentration eine Vasokonstriktion juxtamedullärer afferenter Arteriolen. Hohe Konzentrationen bewirken dagegen eine Vasodilatation (116, 117).

A_{2A}-Agonisten wie beispielsweise CGS-21680C erzielen beinahe eine Verdopplung des medullären Blutflusses, wobei die kortikale Durchblutung nicht beeinflusst wird (4, 292).

Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die Vasokonstriktion durch hoch affine A₁- und die Dilatation durch niedrig affine A₂-Rezeptoren vermittelt wird.

Der genaue Mechanismus der A₁-vermittelten Vasokonstriktion in der Niere ist noch nicht komplett aufgeklärt. Untersuchungen von Walkowska et al. zeigen, dass die durch den A₁-Rezeptor vermittelte Vasokonstriktion sowohl durch Stickstoffmonoxid (NO) als auch Cyclooxygenase (COX) moduliert werden (271).

1.2.4 Adenosin und tubulo-glomeruläres Feedback (TGF)

Das tubulo-glomeruläre Feedback ist ein intrinsischer Mechanismus der GFR-Regulation (184, 224). Steigt durch eine Zunahme der GFR oder eine Abnahme der tubulären Reabsorption bis zum Ende der Henleschen-Schleife die NaCl-Konzentration in der Tubulusflüssigkeit an der Macula densa an, kommt es zu einer Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen. Dadurch wird die GFR reduziert, so dass dann die NaCl-Konzentration an der Macula densa sinkt. Es handelt sich also um eine negative Rückkopplung zwischen GFR und NaCl-Transportleistung des Nephronsegmentes zwischen Glomerulum und Macula densa. Beim tubulo-glomerulären Feedback handelt es sich um eine vaskuläre Antwort auf die tubuläre Transportleistung, die dafür sorgt, dass bei den distal der Macula densa gelegenen Nephronsegmenten stets eine relativ konstante Elektrolytmenge ankommt. In diesen Teilen des Nephrons erfolgt dann die Feinregulation der Flüssigkeits- und Elektrolytausscheidung (265).

Osswald et al. schlugen schon 1980 Adenosin als Mediator des TGF vor (185). Dafür sprach neben der vasokonstriktiven Wirkung von Adenosin auf afferente Arteriolen auch eine Inhibition der Renin-Freisetzung durch Adenosin. Weitere Hinweise auf eine Beteiligung des Adenosins am TGF waren dessen Stimulation durch Adenosin-Agonisten und dessen Hemmung durch Adenosin-

Antagonisten wie Theophyllin oder 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) (73, 125, 226).

Thomson et al. zeigten, dass der A₁-Rezeptor nicht nur ein Modulator, sondern der Mediator für das TGF ist (250). Die Ergebnisse, dass A₁-Knockout-Mäuse kein TGF haben, bestätigten dies deutlich (27, 223, 263, 264). Umgekehrt bewirkt eine A₁-Rezeptor-Überexpression eine Verstärkung des TGF (181).

A₂-Rezeptoren scheinen auch an der Transduktion des TGF beteiligt sein (34). Sie wirken der A₁-AR-vermittelten Vasokonstriktion entgegen.

Das TGF erfordert die NaCl-Aufnahme in die Macula densa Zellen (225). Das TGF ist bei NKCC2- und ROMK-Knockout-Mäusen (Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransport, ROMK = Renal Outer Medullary Potassium channel, Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks) blockiert. Eine pharmakologische Hemmung des Natrium-Kalium-Chlorid-Kotransports durch Schleifendiuretika wie Furosemid hebt ebenfalls das TGF auf (279).

Angiotensin II ist ein Kofaktor für die Vermittlung des TGFs. Mäuse mit fehlendem AT1-Rezeptor oder ACE-Defizienz zeigen eine reduzierte TGF-Antwort (225).

1.2.5 Einfluss von Adenosin auf die GFR

Adenosin senkt die glomeruläre Filtrationsrate über eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen und einer Vasodilatation der efferenten Arteriolen (265). Die Vasokonstriktion wird durch den A₁-AR vermittelt, die Vasodilatation durch A_{2A}- und A_{2B}-AR (51, 79, 113). Die oberflächlichen Nephronen reagieren mit einer deutlich stärkeren Abnahme der Single-nephron GFR (SNGFR) als die Gesamt-GFR (187, 189).

Bei salzarm ernährten Ratten bewirkt eine Infusion von Adenosin in die Aorta thoracica eine Abnahme der GFR um 56%, während der renale Blutfluss nur um 20% reduziert wurde (187).

Veröffentlichungen von Edlund et al. (60, 61) und Balakrishnan et al. (9) beschreiben Untersuchungen der Adenosinwirkungen nach intravenöser Infusion bei gesunden Probanden. Sie beobachteten eine Abnahme der GFR

um etwa 25 % bei unverändertem Blutdruck und renalem Blutfluss (RBF) bzw. renalem Plasmafluss (RPF). Ebenso nahmen durch die Adenosininfusionen Urinvolumen und freie Wasserclearance ab. Die Filtrationsfraktion wurde zwischen 18 und 39% gesenkt, der Sauerstoffverbrauch sank um 48%. Absolute und fraktionale Ausscheidung von Natrium, Chlorid, Lithium, Phosphat, Harnsäure und Harnstoff wurden reduziert. Das Verhältnis von ausgeschiedenem Kalium zu ausgeschiedenem Natrium stieg von 10 auf 42. Die Inhibition des A₁-Rezeptors durch einen Antagonisten bewirkt beim Menschen einen Anstieg der GFR um etwa 20% (10).

1.2.6 Einfluss von Adenosin auf den Flüssigkeits- und Elektrolyttransport

Neben seinen Einfluss auf RBF, GFR und Renin-Sekretion hat Adenosin auch direkten Einfluss auf den Flüssigkeits- und Elektrolyttransport entlang des Tubulus und Sammelrohrs (266). Adenosin und dessen agonistisch wirkende Analoga wirken antidiuretisch und antinatriuretisch (38, 183, 186, 189).

Proximaler Tubulus

Die Aktivierung von A₁-Rezeptoren im proximalen Tubulus stimuliert die Reabsorption von Flüssigkeit, Natrium, Bikarbonat, und Phosphat (32, 33, 246, 249). Adenosin stimuliert den Na-Bikarbonat–Cotransport. Dies konnte an isolierten Tubuluszellen von Ratten und Menschen gezeigt werden. Selektive A₁-Antagonisten (z.B. CVT-124, DPCPX, KW-3902, FK-453) wirken diuretisch und natriuretisch (32, 52, 88, 92, 93, 95). Sie werden deshalb auch für einen Einsatz ihrer eukaliuretischen natriuretischen Wirkung bei Herzinsuffizienz geprüft. Auf die klinische Relevanz von A₁-Antagonisten wird im *Kapitel 1.5 A₁-Antagonisten zur Behandlung des kardiorenenalen Syndroms* näher eingegangen. Unselektive Adenosin-Antagonisten wie Koffein oder Theophyllin erzeugen ebenfalls eine natriuretische und diuretische Wirkung. Diese diuretische Wirkung von Adenosin-Rezeptorantagonisten fehlt bei Mäusen, denen durch genetische Manipulation der A₁-Rezeptor inaktiviert wurde (212).

Überraschenderweise ist die Flüssigkeits-, Natrium- und Kaliumrückresorption im proximalen Tubulus bei A_1 -Knockout-Tieren nicht beeinträchtigt, da sie durch andere Mechanismen kompensiert werden kann (267).

Dicker aufsteigender Teil der Henleschen Schleife

Im dicken aufsteigenden Teil der Henleschen Schleife hemmt eine Aktivierung des A_1 -Rezepts die NaCl-Rückresorption (16, 31, 254, 267). In diesem Abschnitt ist die Adenosin-Freisetzung transportabhängig (13, 17). Besonders bei Hypoxie steigt hier der Adenosin-Spiegel stark an (17).

Beach et al. zeigten an isolierten Tubuluszellen des medullären dicken aufsteigenden Teils der Henleschen Schleife eine Hemmung der Chlorid-Reabsorption von 50% durch A_1 -Rezeptor-Aktivierung (16).

Distaler Tubulus, Pars convoluta

Im Aldosteron-sensitiven distalen Tubulus wird ein weiterer Einfluss von A_1 -Rezeptoren vermutet, da A_1 -Antagonisten im Gegensatz zu anderen proximalen wirkenden Diuretika keine erhöhte Kalium-Ausscheidung bewirken. Genaue Mechanismen sind noch nicht erforscht.

Medulläres Sammelrohr

Eine A_1 -AR-Aktivierung stimuliert die Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Aufnahme (111, 124). Adenosin hemmt im medullären Sammelrohr die Vasopressin vermittelte Natrium- und Flüssigkeits-Reabsorption (209, 281, 282). Außerdem senkt es die durch Vasopressin vermittelte elektrogene Sekretion von Chlorid-Ionen (172). Jedoch gibt es auch Adenosin-unabhängige Kompensationsmechanismen.

1.2.7 Adenosin und Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Die synergistischen Wechselwirkungen von Adenosin und dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems spielen eine wichtige Rolle bei der Regulation der glomerulären Filtrationsrate, Gefäßwiderstand und tubuloglomerulärem Feedback (74).

Renin wird von Zellen des juxtaglomerulären Apparates bei Abfall des Perfusionsdrucks, verminderter NaCl-Konzentration an der Macula densa und durch sympathische Stimuli freigesetzt. Renin spaltet von Angiotensinogen Angiotensin I ab. Aus Angiotensin I wird durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) Angiotensin II abgespalten, welches ein starker Vasokonstriktor ist. Angiotensin II vermittelt die Konstriktion am Vas afferens und Vas efferens. Dies führt zu einer Abnahme der GFR und des renalen Plasmaflusses.

Ferner steigert Angiotensin II die Natrium-Rückresorption im proximalen Tubulus.

Adenosin und Angiotensin II bewirken eine Vasokonstriktion der afferenten Arteriolen. Das Ausmaß der durch Adenosin vermittelten Vasokonstriktion hängt von der Aktivität des RAAS ab. Bei Aktivierung des RAAS durch salzarme Diät kommt es zu einer gesteigerten Vasokonstriktion durch Adenosin (187, 274). Obwohl die synergistischen Wirkungen von Adenosin und Angiotensin II schon vor 40 Jahren beobachtet wurden, ist der genaue Mechanismus noch nicht hinreichend bekannt. Vermutet wird ein Zusammenhang über die intrazelluläre Calcium-Konzentration (140), die durch beide Stoffe moduliert wird.

Wird das RAAS durch eine salzreiche Diät gehemmt, wird der vasokonstriktive Effekt von Adenosin abgeschwächt (186, 187). Auch eine Adenosin-Rezeptorblockade hemmt die Angiotensin II vermittelte Vasokonstriktion (72).

Bei isolierten afferenten Arteriolen kommt es nach 2 Minuten zu einer Tachyphylaxie der vaskonstriktiven Wirkung von Angiotensin II. Die Zugabe von Adenosin bewirkt keine zusätzliche Kontraktion, jedoch wird dadurch die kontraktile Wirkung von Angiotensin II wiederhergestellt (139). Dieser Effekt lässt sich auch umkehren. Eine Vorbehandlung isolierter und perfundierter Arteriolen mit Adenosin steigerte die Kontraktilität nach Zugabe von Angiotensin II. Darüber hinaus kam es zu keiner Desensitivierung, der Effekt blieb 30 Minuten erhalten (193).

Die synergistische Wirkung von Adenosin und Angiotensin II zeigt sich auch in Knockout-Tiermodellen: In A_1 -Knockout-Mäusen ist die Angiotensin II vermittelte Wirkung auf die Niere deutlich abgeschwächt (104). Auf der anderen Seite ist bei AT1-Knockout-Mäusen, denen der wichtigste Rezeptor für

Angiotensin II fehlt, die Adenosin-Wirkung deutlich verringert, das TGF fehlt (258).

Die Angiotensin II vermittelte Vasokonstriktion bewirkt die Neubildung von Adenosin entweder über eine verminderte Adenosin-Desaminase-Aktivität oder möglicherweise durch erhöhte 5'-Nukleotidase (74). Über die Phosphorylierung von leichten Myosinketten wird intrazellulär die Empfindlichkeit für Calcium erhöht (139, 193).

Bereits im Jahre 1970 wurde beobachtet, dass intrarenale Adenosin-Infusionen bei Hunden die Renin-Sekretion hemmen (245). Osswald et al. bestätigten diesen Effekt auch bei Ratten (187). In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von A₁-Rezeptoren die Renin-Sekretion hemmt (38, 119, 128, 159, 232, 275).

Auch beim Menschen wurde diese Hemmung der Renin-Sekretion durch den Adenosin-A₁-Rezeptor bestätigt (60). Im Gegenzug wird durch A₁-Antagonisten (z.B. FK 453) die Plasma-Renin-Konzentration erhöht (10). Bei A₁-Knockout-Mäusen werden eine erhöhte Plasma-Renin-Aktivität und Renin-mRNA-Expression beobachtet (27, 211, 228).

1.2.8 Adenosin und Hypoxie in der Niere

Schon 1898 konnte Bier zeigen, dass die Niere im Gegensatz zu anderen Organen nach einer Ischämie mit einer Durchblutungsverminderung reagiert (19). Grupp und Heimpel beobachteten nach einer 1-7 minütigen Abklemmung der Nierenarterie am Hund eine zweiphasige Blutflussreaktion: nach Reperfusion kommt es initial zur Reduktion des RBF, dann folgt eine Hyperämie (102). Osswald et al. maßen einen Adenosin-Anstieg im Nierengewebe von 5 nmol auf 31 nmol pro Gramm Feuchtgewicht bereits nach einer Minute Ischämie (188). Als Mediator der postokklusiven Ischämie identifizierten sie endogenes Adenosin, da dieser Effekt durch Theophyllin hemmbar ist. Nishiyama et al. zeigten, dass die durch Hypoxie hervorgerufene Vasokonstriktion auch durch den A₁-Antagonisten KW-3902 reduziert werden kann (178). Da Hypoxie und Ischämie an der Entstehung des

Nierenversagens beteiligt sind (248), ergeben sich hieraus therapeutische Ansatzpunkte.

1.2.9 Zusammenfassung: Renale Wirkungen von Adenosin in der Niere

Tabelle 1 fasst die Wirkung des Adenosine-A₁-Rezeptors in der Niere zusammen.

Tabelle 1: Übersicht über renale Wirkungen von Adenosin in der Niere (modifiziert nach Mc Coy (163))

Lokalisation	Wirkung	Rezeptor
GFR	Senkung Steigerung	A ₁ A _{2A/B}
Vas afferens	Vasokonstriktion	A ₁
Vas efferens	Vasodilatation	A _{2A/B}
Renin-Sekretion	Senkung Steigerung	A ₁ A _{2A/B}
Tubuläre H ₂ O-Rückresorption	Senkung Steigerung	A ₁ A _{2A/B}
NaCl-Reabsorption im proximalen Tubulus	Steigerung	A ₁
NaCl-Resorption im aufsteigenden Ast der Henleschen Schleife	Senkung Steigerung	A ₁ A _{2A/B}

1.2.10 Rolle von Adenosin beim Nierenversagen

Adenosin hat für das pathophysiologische Verständnis von Nierenerkrankungen eine bedeutende Funktion. Ihm wird eine wesentliche Rolle beim akuten Nierenversagen zugeschrieben (23). Auslösender Faktor für das akute Nierenversagen (ANV) ist meist eine unzureichende Sauerstoffversorgung, die durch verschiedene Faktoren wie Gefäßverengung, Minderdurchblutung oder zu geringer Sauerstoffgehalt des Blutes hervorgerufen werden kann. Dadurch kommt es zu einer Akkumulation von Adenosin in der Niere und zu einer Absenkung der GFR. In experimentellen Modellen des ANV kommt es zu einer gesteigerten Expression von A₁-Rezeptoren in den Glomerula (235). Inwiefern

eine Hemmung der A_1 -vermittelten Wirkungen sinnvoll ist, kann nur schwer abgeschätzt werden, da auf der anderen Seite eine Absenkung der GFR auch protektiv gegen eine Hypoxie oder Ischämie wirkt, besonders in der Medulla.

In der Klinik ist das Kontrastmittel induzierte Nierenversagen von Bedeutung. Bekannte Risikofaktoren sind Volumen- und Natrium-Mangel. Die Gabe von unselektiven Adenosin-Antagonisten wie Theophyllin oder selektiven A_1 -Antagonisten wirkt hier protektiv (65-68, 114, 115, 286). Der Einfluss des A_1 -Rezeptors beim ANV kann auch durch Versuche mit A_1 -Knockout-Mäusen gezeigt werden. Die Knockout-Mäuse überstehen eine Kontrastmittelgabe deutlich besser als entsprechende Wildtypen (146).

Im Gegensatz dazu wirkt auch eine Adenosin-Infusion protektiv bei Ischämie (142, 143, 145, 149). Der über den A_1 -Rezeptor vermittelte Effekt bewirkt neben niedrigeren Kreatinin- und Harnstoff-Blutspiegeln auch verringerte Entzündungsreaktionen, Nekrosen und Apoptosen. Dieser Effekt kann auch bei A_1 -Knockout-Mäusen gezeigt werden.

Neben dem A_1 -Rezeptor haben auch die A_{2A} - und A_{2B} -Rezeptoren protektiven Einfluss bei Ischämie (59, 99, 144). Die Funktion des A_3 -Rezeptors ist noch nicht komplett aufgeklärt. Arbeiten von Lee et al. (142, 147) deuten darauf hin, dass eine Aktivierung des A_3 -Rezeptors Ischämie-Schaden verstärken.

Bei Nierentransplantationen kommt es häufig zu Ischämie-Reperfusionsschäden. Die Aktivierung von A_1 -Rezeptoren wirkt hier protektiv (142). Hier schützt ein erhöhter renaler Adenosinspiegel die Niere (100, 101). Im Gegensatz dazu zeigt sich auch ein protektiver Effekt durch unselektive Adenosin-Antagonisten wie Theophyllin (97, 107, 153).

Eine Aktivierung von A_1 -Rezeptoren in der Niere schützt auch über den Akt-Signalweg bei Ischämie und Reperfusion der Leber protektiv vor akuter Nierenschädigung (191).

Interessant ist auch, dass es einen akuten und einen verzögerten protektiven Effekt bei Ischämie gibt (123). Eine Behandlung mit dem A_1 -Agonisten CCPA 24 Stunden vor einer 30 minütigen Ischämie bewirkt eine Akt-Aktivierung und HSP27-Induktion, eine akute Vorbehandlung vor der Ischämie ist Proteinkinase C und Akt-abhängig.

1.3 Extrarenale Wirkungen des Adenosin-A₁-Rezeptors

Im ZNS wirkt eine Aktivierung des A₁-Rezeptors anxiolytisch und sedierend, indem präsynaptisch die Ausschüttung verschiedener exzitatorischer Transmitter (v. a. Noradrenalin, Glutamat) gehemmt wird (57, 58). Die Erregung des A₁-Rezeptors wirkt antikonvulsiv und schützt so vor epileptischen Anfällen (56, 96, 105, 136). Mit A₁-Agonisten lassen sich im Tiermodell Krampfanfälle therapieren (2, 41). Durch eine A₁-Aktivierung werden Astrocyten vor Hypoxie geschützt (21, 135). Adenosin vermittelt im ZNS eine analgetische Wirkung (154, 220). Der Adenosin-A₁-Rezeptor ist an der Nozizeption und Temperaturempfindung beteiligt. Über A₁-Rezeptoren wird außerdem der Schlaf-Wach-Rhythmus vermittelt (202). Ferner wirkt der A₁-Rezeptor im Tiermodell der Multiplen Sklerose protektiv (261). Eine Beteiligung des A₁-Rezeptors bei der Entwicklung einer Schizophrenie wird diskutiert (141).

A₁-Knockout-Tiere sind ängstlicher und aggressiver, zeigen ein normales Lernverhalten, weisen einen reduzierten Muskeltonus auf und reagieren empfindlicher auf Schmerzreize (86). Außerdem weisen A₁-Knockout-Tiere höhere Blutdruck-Werte auf (272).

Adenosin spielt eine Rolle beim Asthma bronchiale (155). Bei Asthmatikern konnte eine erhöhte Konzentration von Adenosin in der bronchoalveolären Lavage gemessen werden. Adenosin vermittelt eine Bronchokonstriktion. Der Einsatz von A₁-antagonistischen Methylxanthinen wie Koffein und Theophyllin wirkt bronchodilatatorisch. Auf der anderen Seite wirkt Adenosin in der Lunge auch antiinflammatorisch (240, 253). Dieser Effekt wird über A₁-Rezeptoren auf Alveolarakrophagen vermittelt. A₁-Knockout-Mäusen zeigen bei erhöhten Adenosin-Konzentrationen deutlich verstärkte Entzündungsreaktionen mit Mucosametaplasien und Alveolarschäden. Durch die A₁-Rezeptor-Defizienz kommt es in der Lunge der Knockouttiere zu einer überschießenden Expression von Th2-Zytokinen wie Interleukin 4 und 13 sowie weiteren Chemokinen und Metalloproteinasen.

Kardial ist der A₁-Rezeptor im Atrium an der Vermittlung negativer Chronotropie, Inotropie und Dromotropie beteiligt (42, 180, 288). Kardioprotektiv wirkt Adenosin auch durch ischämische Präkonditionierung (40, 46). Ferner

wird das Herz durch Adenosin vor übermäßiger Katecholamin-Einwirkung, verminderter Endothelin-1-Produktion und Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems geschützt (37). Im Tiermodell reduzierten Adenosin-A₁-Agonisten eine ventrikuläre Hypertrophie (152). Adenosin steigert die ANP-Ausschüttung über den A₁-Rezeptor (288). Der A₁-Agonist R-PIA (N(6)-(R)-phenylisopropyladenosine) eignet sich im Tiermodell zur Beendigung von Torsade de Pointes-Tachykardien (247).

In der Kardiologie wird Adrekar® (Adenosin) bei symptomatischen AV-junktionalen und supraventrikulären Tachykardien zur Rhythmuskontrolle eingesetzt (219). Adenoscan® (Adenosin) wird bei Myokardszintigraphien als koronarer Vasodilatator eingesetzt.

Im Tierversuch konnte außerdem gezeigt werden, dass bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) eine verringerte Affinität zentralnervöser Adenosine-A₁-Rezeptoren vorliegt (162). Dies ist ein Hinweis darauf, dass Hypertension Folge einer defizienten purinergen Neurotransmission sein kann.

Die Aktivierung von A₁-Rezeptoren kann sowohl pro- als auch antiinflammatorisch wirken (71). A₁-Rezeptoren können neutrophile Granulozyten und Monocyten aktivieren (164, 217, 218). Auf der anderen Seite vermitteln A₁-Rezeptoren auch antiinflammatorische Effekte (145, 149, 152, 261). Durch eine Aktivierung von A₁-Rezeptoren kann das Tumorstadium von Glioblastomen gehemmt werden (244).

A₁-Rezeptoren sind auch im Fettgewebe stark exprimiert (47, 49). Bei Aktivierung der Rezeptoren wird über die Hemmung der Adenylatcyclase die Lipolyse inhibiert. Desweiteren wird eine Hemmung der hormon-sensitiven Lipase (HSL) und der Triglycerid-Lipase des Fettgewebes (ATGL) angenommen. Eine exzessive Aktivität des A₁-Rezeptors könnte ein Grund für Adipositas sein (11). Außerdem wird durch A₁-Rezeptor-Aktivierung die Insulin-Sensitivität in Muskel- und Fettgewebe gesteigert (29, 213). Eine Überexpression von A₁-Rezeptoren im Fettgewebe schützt Mäuse vor Insulin-Resistenz (54).

1.4 Anwendungsmöglichkeiten für Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten

Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten eröffnen neue Einsatzmöglichkeiten bei verschiedenen Krankheitsbildern. Derzeit laufen mehrere klinische Studien für folgende Indikationen (64, 85, 127):

- Vorhofflimmern (Tecadenoson (CVT-510), Selodenoson, Capadenoson (BAY-68-4986), PJ-875)
- Angina pectoris (Capadenoson (BAY-68-4986))
- Diabetes mellitus Typ 2 (GR79236, ARA, CVT-3619, GS9667, RPR-749)
- Schmerztherapie (SDZ WAG94, GW493838, T62 (allosterischer Modulator))
- Cerebroprotektion (NNC 21-0136)

Fast alle Agonisten haben ein Adenosin-Grundgerüst. Ausnahme ist Capadenoson.

Die Herausforderung bei der Entwicklung spezifischer A₁-Rezeptor-Agonisten besteht darin, das Zielgewebe spezifisch zu stimulieren und gleichzeitig Nebenwirkungen durch die Rezeptor-Aktivierung in anderen Geweben zu minimieren. Außerdem sollte eine Tachyphylaxie durch Desensibilisierung vermieden werden.

Um Nebenwirkungen zu reduzieren werden auch partielle Agonisten als Alternative untersucht (284). Diese vermitteln im Gegensatz zu vollen Agonisten nur eine submaximale Wirkung am Rezeptor.

Der A₁-Agonist Tecadenoson, von CV Therapeutics entwickelt, wurde in der Phase III-Studie TEMPEST (*Trial to Evaluate the Management of PSVT during Electrophysiological Study with Tecadenoson*, 2005; multizentrische, randomisierte, doppelt blinde und plazebokontrollierte Studie) untersucht (62, 197). Es reduzierte die Zahl paroxysmaler supraventrikuläre Tachykardien (PVST) dosisabhängig in bis zu 87% der Fälle. Klinische Studien laufen auch für Selodenoson von Aderis Pharma (3). Da die Aktivierung des A₁-AR die Refraktärzeit des AV-Knoten verlängert, die sinuatriale Schrittmacherrate reduziert und das Aktionspotential verkürzt, können Arrhythmien entstehen. Das

Risiko nach einer Kardioversion eine Rhythmusstörung zu entwickeln ist bei A₁-Agonisten deutlich niedriger als bei Adenosin (<1% vs. 11-15%) (62).

Für den antiarrhythmischen Einsatz wurden auch Partialagonisten untersucht. Sie wirken ebenfalls über eine Verlängerung der atrioventrikulären Überleitung, verursachten aber keine höhergradigen AV-Blöcke (280).

Capadenoson (BAY 68-4986), der erste nicht-nukleosidische A₁-Agonist, hat in ersten Studien erfolgversprechende Ergebnisse gezeigt. Er kann oral appliziert werden. Eine Phase II-Studie zum Einsatz bei Vorhofflimmern ist abgeschlossen (14). Eine geplante Phase II-Studie, welche die Wirkung von Capadenoson bei Angina pectoris untersuchte, wurde jedoch zurückgezogen (15).

Der Einsatz von A₁-Agonisten bei Diabetes mellitus Typ II beruht auf einer Steigerung der Insulinsensitivität und Senkung der Neutralfette, wird jedoch durch kardiovaskuläre Nebenwirkungen und Desensibilisierung bei kompletten Agonisten (GR79236, ARA und RPR 749) erschwert (48). Neuer entwickelte Partialagonisten (CVT-3619) sollen ohne diese Probleme auskommen (48). Sie wirken gewebe selektiv. Deshalb vermitteln sie einen stärkeren Effekt bei Adipocyten als im Herz und steigern so die Insulinsensitivität ohne Tachyphylaxie und kardiale Nebenwirkungen zu erzeugen. Die Substanz ARA zum Beispiel ist etwa 100 mal weniger wirksam bei A₁-AR vermittelter Bradykardie als bei A₁-AR vermittelter Lipolyse-Inhibition (289).

CVT-3619 wurde von Tecadenoson abgeleitet (48, 70). Die Substanz senkte die freien Fettsäuren um 30-60%, reduzierte Triglyceridspiegel und steigerte die Insulinsensibilität in Ratten. Durch die Modifikation konnten kardiovaskuläre Nebenwirkungen deutlich reduziert werden. Die maximale Wirkung auf cAMP-Reduktion entspricht vollen Agonisten wie Cyclopentyladenosin (CPA). Die Hemmung der Fettsäuren-Freisetzung ist weniger effektiv (nur 58% des CPA-Effektes). Erklären lässt sich dieser Unterschied durch eine große Rezeptorreserve oder eine erhöhte Effizienz bei Rezeptorbindung am A₁-AR in Adipocyten. Diese Effekte unterlagen keinem Wirkungsverlust über sechs Wochen (48).

SDZ WAG94 senkte bei diabetischen Ratten die Blut-Glukose-Konzentrationen. Ferner wurden Blutdruck, Herzfrequenz, Blutkonzentrationen von freien Fettsäuren, Triglyzeriden, Phospholipiden und Cholesterin gesenkt (118).

GR79236 inhibierte die Katecholamin-induzierte Lipolyse in Adipocyten und reduzierte die Fettsäure- und Triglycerid-Spiegel um 50% (205).

NNC-21-0136 wirkte im Tiermodell bei Ischämien neuroprotektiv (135). Die Substanz weist nur eine geringe Blutdrucksenkung auf.

1.4.1 Allosterische Modulation des Adenosin-A₁-Rezeptors

Eine andere Möglichkeit, den A₁-Rezeptor zu stimulieren, ist die allosterische Modulation (83, 89). Der Modulator verstärkt hierbei die Rezeptoraktivierung, wenn endogenes Adenosin gebunden wird. Von Vorteil ist hier, dass der Rezeptor nur bei Anwesenheit des orthosterischen Liganden, Adenosin, stimuliert wird. Man erhoffte sich dadurch, dass kardiovaskuläre Nebenwirkungen reduziert und eine Tachyphylaxie verhindert werden können.

Für den A₁-Rezeptor werden zwei Substanzen untersucht, T-62 (151, 179) und PD-81,723 (169). Diese allosterischen Modulatoren wirken Rezeptorspezifisch. Die beiden Stoffe können oral appliziert werden und sollen zur Behandlung neuropathischer Schmerzen eingesetzt werden. Li et al. zeigten, dass T-62 bei neuropathischen Schmerz im Tiermodell wirksam ist (150). Unerwünschte Nebenwirkungen wie Sedierung oder motorische Schwäche waren nur schwach, meist nur zu Beginn der Therapie, ausgeprägt. Jedoch kommt es auch hier zur Tachyphylaxie. Bereits nach 5 Tagen kam es zu einem ausgeprägten Wirkungsverlust. Die Tachyphylaxie konnte nur zu einem Teil durch Rezeptor-Down-Regulierung und Desensitivierung erklärt werden. T-62 wurde bereits in einer Phase II-Studie untersucht (129).

1.5 A₁-Antagonisten zur Behandlung des kardiorenenalen Syndroms

Eine Herzinsuffizienz geht oft mit einer renalen Dysfunktion einher und umgekehrt. Etwa 50% aller Patienten mit Herzinsuffizienz weisen gleichzeitig

auch eine Niereninsuffizienz auf. Dabei ist eine eingeschränkte Nierenfunktion, gemessen durch Absinken der GFR und Kreatinin-Anstieg, der stärkste Risikofaktor für Mortalität (siehe Abbildung 6) (69, 109). Das kardiorenale Syndrom zeichnet sich durch Volumenüberlastung, Diuretikaresistenz, Hypo-natriämie und ein hämodynamisch relevantes prärenales ANV aus. Es konnte gezeigt werden, dass Patienten mit Herzinsuffizienz deutlich erhöhte Adenosin-Blutspiegel aufweisen (78).

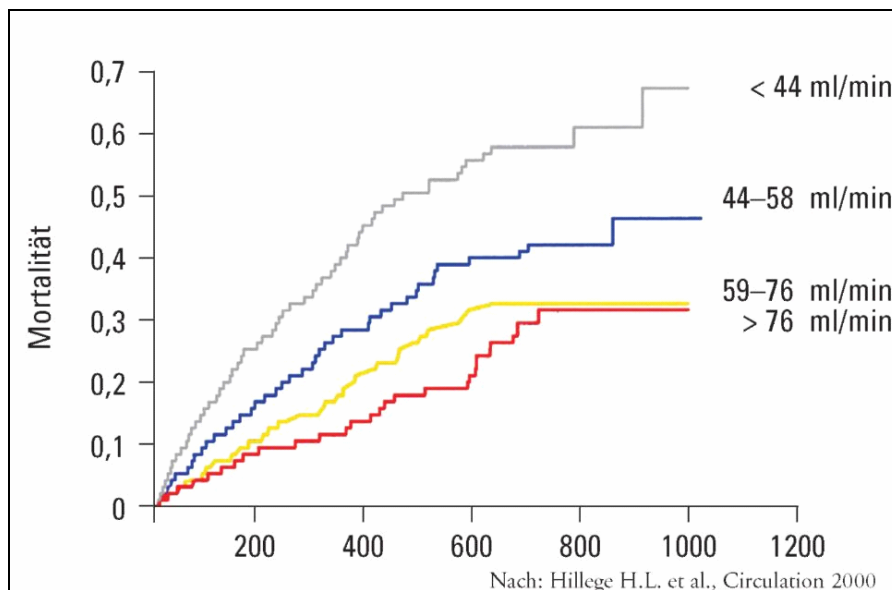


Abbildung 6: GFR als prognostischer Marker für Mortalität nach Hillege ((214)nach (109)) (Kaplan-Meier-Kurve: Mortalitätswahrscheinlichkeit (Ordinate) in Abhängigkeit der GFR und zeitlichem Verlauf in Tagen (Abszisse))

Da das kardiorenale Syndrom mit herkömmlicher Medikation nur schwer in den Griff zu bekommen ist, wird intensiv an neuen Therapiemöglichkeiten geforscht. Enorme Bedeutung haben deshalb Adenosin-A₁-Antagonisten gewonnen, die in ersten klinischen Studien erfolgsversprechende Resultate erzielen konnten (43, 52, 53, 87, 88, 91, 93, 95).

A₁-Antagonisten wirken protektiv auf die Nierenfunktion. Sie verhindern eine Vasokonstriktion und inhibieren Salz- und Wasserreabsorption. Für die Niere ist keine Substanzklasse bekannt, die so selektiv eine Vasodilatation am Vas afferens bewirkt. Die Ergebnisse werden in aktuellen Reviews zusammengefasst (12, 122). Ein Problem bei der Entwicklung von A₁-

Antagonisten ist die hohe Lipophilie und die damit verbundene geringe Löslichkeit in Wasser sowie begrenzte Bioverfügbarkeit (108). Befürchtungen, A₁-Antagonisten könnten bei Myokardischämien die Infarktzone vergrößern, konnten entkräftet werden (7).

Als A₁-Antagonisten wurden im Wesentlichen zwei Substanzen ausführlich geprüft: BG9719 (CVT-124) und KW-3902. Im Tiermodell für die chronische Herzinsuffizienz steigerte CVT-124 Kreatinin-Clearance, Urinvolumen und Na-Ausscheidung (160). Jackson et al. untersuchten Ratten mit dilatativer Kardiomyopathie unter Therapie mit Schleifendiuretika (120). Auch hier zeigte CVT-124 eine deutliche Besserung hinsichtlich Kaliumausscheidung, renaler Hämodynamik und linksventrikulärer Funktion. GFR, Urinvolumen und Na-Ausscheidung konnten durch die Gabe der Substanz gesteigert werden. Erste klinische Studien mit der Substanz CVT-124 zeigten bei Patienten mit Herzinsuffizienz (NYHA II-IV) vergleichbare Effekte (93, 95). Auch KW-3902 konnte in klinischen Studien ähnlich wirkungsvolle Ergebnisse vorweisen (52, 88). Bereits 1992 wurde die Substanz synthetisiert (243). KW-3902 ist ein an der Position 8 substituiertes Xanthin (8-(3-noradamantyl)-1,3-dipropylxanthin). Bei kochsalzsalzreich-ernährten Ratten wurde die Substanz oral appliziert und bewirkte eine ausgeprägte Diurese und Natriurese. Beim Glycerol-induzierten akuten Nierenversagen vermittelte es einen nephroprotektiven Effekt. Unter dem Namen Rolofylline wird KW-3902 in klinischen Studien der Phase 3 zum Einsatz bei chronischer Herzinsuffizienz untersucht. In den Studien PROTECT 1 und 2 konnte KW-3902 im Vergleich zur Standardtherapie Dyspnoe und Nierenfunktion deutlich bessern und die Diurese verstärken (43).

1.6 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA)

Zur Stimulation des Adenosin-A₁-Rezeptors wurde in dieser Arbeit 2-Chloro-N6-cyclopentyladenosine (CCPA) als hochspezifischer A₁-Agonist verwendet. Die Substanz wurde von Cristalli synthetisiert und erstmals im Jahre 1988 von Lohse et al. beschrieben (siehe Abbildung 7) (157). CCPA weist unter den

bisher publizierten A_1 -Agonisten die höchste Affinität am Adenosine- A_1 -Rezeptor auf (133). Es wirkt hochselektiv mit Bindungsaffinitäten von 0,8, 2300 und 42nM gegenüber humanen A_1 -, A_{2A} - und A_3 -Rezeptoren (132). Die Rezeptorselektivität von A_1 - gegenüber dem A_{2A} -Rezeptor beträgt 500:1 (170). Für den A_{2B} -Rezeptor wird für die Stimulation der Adenylatcyclase eine EC_{50} von 18800 nM angegeben. CCPA wirkt antagonistisch am A_3 -Rezeptor (81). CCPA hat ein Molekulargewicht von 374,31 g/mol (20).

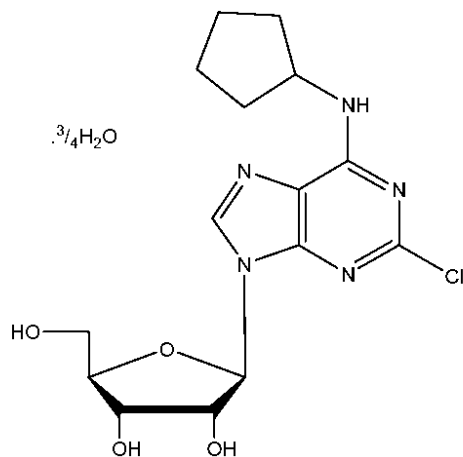


Abbildung 7: Chemische Struktur von CCPA (277)

Bei in-vitro Messungen bewirkt CCPA eine negative Chronotropie bei einer $EC_{50} = 8,2 \text{ nmol/l}$ und kann durch A_1 -selektive Antagonisten wie 8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin (DPCPX) antagonisiert werden (42). Es zeigen sich selbst bei mikromolekularen Konzentrationen keine vasodilatatorischen Effekte und keine Beeinflussung der Thrombozytenaggregation, die über A_{2A} -Rezeptoren vermittelt werden. Aus den Untersuchungen von Monopoli et al. kann eine Plasmahalbwertszeit von circa 20 Minuten abgeschätzt werden (170).

Casati et al. untersuchten Blutdruck und Herzfrequenz wacher spontan hypertensiver Ratten bei akuter und wiederholter Gabe von CCPA (35). Intraperitoneal injiziert bewirkte es eine Senkung des systolischen Blutdrucks und eine ausgeprägte Bradykardie ($ED_{30} = 0,128 \text{ mg/kg KG}$). Die Herzfrequenzsenkung hielt bei einmaliger Gabe von CCPA 4 bis 5 Stunden an.

Bei einer Dosierung von 0,1mg/kg KG zweimal täglich über 21 Tage kam es nach wenigen Tagen zur Toleranzentwicklung hinsichtlich Blutdruck und Puls. Mit dieser Applikationsform und -dosierung konnten auch antikonvulsive Effekte beobachtet werden. Dies spricht für eine Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (2, 170). Jedoch veränderte es nicht den Schlaf-Wach-Rhythmus. CCPA verringerte die lokomotorische Aktivität und erniedrigte den Muskeltonus. Bezüglich Rezeptorbindung konnte an Hirngewebe keine Veränderung hinsichtlich Zahl und Affinität der A₁-Rezeptoren beobachtet werden. Unklar bleibt, wie der Wirkungsverlust zu Stande kommt, insbesondere welche Konzentrationen von CCPA im ZNS erzielt wurden. Ferner wurde eine Entkopplung der Gi-Proteine nicht untersucht. In einer anderen Arbeit zeigten Casati et al., dass CCPA auch oral appliziert werden kann (36).

Sala et al. untersuchten die Wirkung von CCPA auf Plasma-Renin-Aktivität und Plasmakonzentrationen von ANP, cGMP und Endothelin-1 bei spontan hypertensiven Ratten (216). CCPA reduzierte die Plasma-Renin-Aktivität, steigert ANP und cGMP im Plasma. Endothelin-1-Spiegel wurden durch CCPA nicht beeinflusst.

Am Herzen zeigte CCPA in verschiedenen Studien einen protektiven Effekt bei Ischämie. So reduzierte CCPA die Myokardinfarktgröße (170, 251, 259) Thornton et al. zeigten, dass CCPA genauso wirksam wie eine ischämische Präkonditionierung ist und dass dieser Effekt nicht durch die ebenfalls hervorgerufene Hypotonie oder erniedrigte Herzfrequenz verursacht wird. Auch bei Skelettmuskeln kann CCPA den Ischämieschaden reduzieren (290).

Die CCPA vermittelte Senkung des Blutdruckes und der Herzfrequenz bewirkt einen Anstieg der renalen Sympathikusaktivierung (84). Jedoch fällt die Aktivierung deutlich geringer aus als bei einer vergleichbaren Blutdrucksenkung durch Nitroprussid. Dies spricht für eine Reduktion der Barorezeptoren-Empfindlichkeit durch CCPA.

Walkowska et al. untersuchten den Einfluss von CCPA auf die Nierendurchblutung (271). Bei kochsalz-reich und -arm ernährten Tieren reduziert CCPA den renalen Blutfluss (RBF), corticalen Blutfluss (CBF) und

äußeren medullären Blutfluss (OMBF). Antidiuretische Effekte konnten nur bei kochsalzreicher Diät beobachtet werden.

Es liegen keine Studien zum Einsatz von CCPA an Menschen vor. RPR749, ebenfalls ein A_1 -Rezeptor-Agonist, wurde bereits beim Menschen angewendet. Shah et al. untersuchten seine lipidsenkende Wirkung (229). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei oraler Applikation die Plasmakonzentrationen freier Fettsäuren effektiv gesenkt werden können. Zudem wurden keine schweren Nebenwirkungen beobachtet. Lediglich mäßige und in der Mehrzahl milde Ereignisse wurden erfasst. Am häufigsten war das Verdauungssystem (Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe) betroffen. Vitalparameter wie EKG oder Spirometrie zeigten keine Auffälligkeiten.

1.7 Einfluss der Vorbehandlung

NaCl-arme Diät

Eine kochsalzarme Diät (0,15%) über 5 Tage senkt die interstitielle Adenosin-Konzentration um 64% bzw. um den Faktor 2,8 (231) und Rezeptordichte (B_{max}) für den A_1 -Antagonisten DPCPX um 46% (236).

Kulick et al. zeigten, dass der A_1 -Rezeptor im proximalen Tubulus eine wichtige Rolle bei der Regulation der Flüssigkeits- und Natriumresorption spielt (138). Eine kochsalzarme Diät (0,03%) über sieben Tage bewirkt im proximalen Tubulus einen Anstieg der A_1 -Rezeptor-Protein-Menge und seine mRNA-Expression. Funktionell bestätigt wird diese Beobachtung durch eine gesteigerte Flüssigkeitsreabsorption in diesem Bereich. In den Sammelrohren im Bereich des inneren Markes nimmt die Rezeptordichte ebenfalls zu.

NaCl-reiche Diät

Bei akuter Hybernatriämie durch intraaortale Infusion hypertoner NaCl-Lösung zeigte sich, dass der ATP-Spiegel in der Niere in Folge der gesteigerten Transportleistung sinkt, während der renale Gewebsgehalt von Adenosin ansteigt (184).

Eine kochsalzreiche Diät (4%) steigert die interstitiellen Adenosin-Konzentration um den Faktor 18 im Vergleich zu den NaCl-arm ernährten Tieren bzw. um den Faktor 6,6 bei normaler Diät (231). Die durch den A₁-Rezeptor vermittelten Effekte sind abgeschwächt (177, 186):

Die NaCl-reiche Diät erzielt eine Down-Regulation von A₁-Rezeptoren (293). Die mRNA-Level werden um 65 % reduziert. Außerdem wird die maximale Bindungskapazität um 37% gesenkt (236).

CCPA

Über akute Wirkungen von A₁-Agonisten wie CCPA liegen mehrere Untersuchungen vor (216, 259, 290). Wenige Studien prüfen eine wiederholte Gabe von A₁-Agonisten wie CCPA in vivo (2, 35, 36, 216). Deshalb bleibt unklar, wie sich eine wiederholte Gabe von A₁-Agonisten auf die Nierenfunktion auswirkt.

In Zellkulturen ist eine Desensibilisierung des A₁-Rezeptors bei chronischer Stimulation gezeigt worden (1, 80, 98, 112, 176, 206). Abbraccio et al. demonstrierten einen raschen Wirkungsverlust für Cyclohexyladenosin bei Gehirnschnitten in vitro (1). Auch glatte Muskelzellen (DDT1MF-Zellkultur) zeigten eine Tachyphylaxie (176, 206). Nach 24 Stunden Inkubation mit dem A₁-Agonisten R-PIA ist die Aktivität der Adenylatcyclase um 50% reduziert (206). Die Dichte der A₁-Rezeptoren in Zellmembranen sinkt, wohingegen der Proteingehalt der Rezeptoren in intrazellulären Kompartimenten ansteigt. Die Rezeptor-Phosphorylierung nimmt zu. Gao et al. zeigten ebenfalls, dass nach 24 stündiger Stimulation mit dem A₁-Agonisten Cyclopentyladenosin eine Reduktion der Rezeptoranzahl und der Rezeptor-G-Protein-Komplexe um 50% beobachtet werden kann (80). Auch bei der A₁-vermittelten Lipolyse zeigt sich bereits nach 24 Stunden eine Tachyphylaxie (112, 158, 192).

Auch in vivo konnte eine Desensibilisierung des A₁-Rezeptors beobachtet werden (2, 35, 148, 158, 192). Casati et al. zeigten für CCPA eine Toleranzentwicklung für Blutdruck und Herzfrequenz nach wenigen Tagen (35). Auch bei induzierten konvulsiven Anfällen stellt sich eine Tachyphylaxie nach

mehrtägiger Applikation von CCPA ein (2). Dieser Wirkungsverlust lässt sich nicht nur auf Veränderungen der Rezeptordichte oder Affinität, gemessen im Hirngewebe, zurückführen. Im Gegensatz dazu wurde für A₂-Agonisten keine Toleranzentwicklung bei Blutdruck und Herzfrequenz beobachtet.

Lee et al. untersuchten eine chronische Stimulation mit dem A₁-Agonisten R-PIA an Ratten (148). Bereits nach drei Tagen hatten Blutdruck und Herzfrequenz wieder Ausgangswerte erreicht. Durch die Infusion von R-PIA wurden die Tiere lethargisch, nach drei bis vier Tagen normalisierte sich das Verhalten wieder. Am ehesten in Folge einer reduzierten Nahrungsaufnahme kam es zu einem Gewichtsverlust, der bei Kontrolltieren nicht beobachtet wird. Bei Myokardzellen konnte eine Desensitivierung im Bereich des Vorhofes, nicht aber im Ventrikel gezeigt werden. Die chronische Stimulation führte zu einem Verlust der negativ ino- und chronotropen Wirkung. In Bindungsstudien wurde eine Abnahme der Rezeptordichte um 52% beobachtet. Es kam zu einer deutlichen Abnahme der maximalen Rezeptorbindung und kompetitiven Bindung. Ferner wurde eine Downregulation von A₁-Rezeptoren, Entkopplung der G_i-Proteine vom A₁-Rezeptor und einer Abnahme von G_i-Proteinen beobachtet.

Auch für die ischämische Präkonditionierung zeigt sich ein Wirkungsverlust, wenn CCPA über 72 Stunden infundiert wird (260).

Molekulare Mechanismen der Desensibilisierung werden in einem Review von Klaase et al. diskutiert (131).

2 Fragestellung

Zahlreiche Adenosin-A₁-Agonisten werden derzeit in fortgeschrittenen klinischen Studien geprüft und stehen kurz vor ihrer Zulassung für den Einsatz bei Arrhythmien, Ischämien, Dyslipidämien chronischen Schmerzen, Epilepsie und Emesis .

Bisherige Untersuchungen zu renalen Adenosinwirkungen wurden nur nach kurzfristiger Gabe von Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten durchgeführt. Unklar ist bisher noch, welche Bedeutung Adenosin in der langfristigen Kontrolle der Nierenfunktion und Hämodynamik hat. Ob sich nach langfristiger Stimulation der Adenosinrezeptoren eine Tachyphylaxie entwickelt, bleibt offen.

Es gibt kaum Studien, die eine wiederholte Gabe von A₁-Agonisten in vivo prüfen (2, 35). In vitro konnte eine rasche Tachyphylaxie beobachtet werden (1). Effekte einer dauerhaften Anwendung selektiver Adenosin-A₁-Agonisten auf die Niere sind bis jetzt noch nicht ausreichend bekannt.

Diese Arbeit soll nun klären, wie sich eine chronische Stimulation der Adenosin-A₁-Rezeptoren auf die Nierenfunktion auswirkt. In den Versuchen wird geprüft, welche Effekte sich durch eine chronische Stimulation mit dem Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosin (CCPA) im Tierversuch an Ratten über sieben Tage erzielen lassen. Ob sich nach langfristiger Stimulation der Adenosinrezeptoren eine Tachyphylaxie (Wirkungsverlust) entwickelt, ist bisher nicht ausreichend geklärt. Da die Wirkung des Adenosin-A₁-Rezeptors in der Niere sehr stark von der Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems abhängt, wurde die Fragestellung sowohl bei minimaler RAAS-Aktivität unter kochsalzreicher Diät als auch bei stark erhöhter RAAS-Aktivität unter kochsalzreicher Diät untersucht.

Zur Bewertung der Tachyphylaxie werden herangezogen:

- 1) Trinkmenge während der siebentägigen Vorbehandlung mit CCPA
Gewichtsverlauf während der Vorbehandlung
- 2) Elektrolytausscheidung und Urinmenge an Tag 1 und 7

- 3) glomeruläre Filtrationsrate in Narkose nach Vorbehandlung mit CCPA und bei akuter Applikation von CCPA
- 4) renaler Blutfluss und Antwort der Niere auf Adenosin-Einzelinjektionen in die Aorta thoracica
- 5) Plasma-Renin-Aktivität
- 6) Genexpression der A₁- und A_{2A}-Rezeptoren in der Niere
- 7) Blutdruck und Herzfrequenz in Narkose

Eine dauerhafte Verschlechterung der Nierenfunktion durch selektive Adenosin-A₁-Agonisten würde die klinische Anwendung dieser Substanzklasse stark einschränken. Daher soll in dieser Arbeit geklärt werden, in welchem Maße die Nierenfunktion durch A₁-Agonisten beeinflusst wird.

3 Versuchsaufbau, Material und Methoden

3.1 Versuche

3.1.1 Gruppeneinteilung

Um den Einfluss der CCPA-Vorbehandlung auf die Nierenfunktion und Hämodynamik unter zwei physiologischen Extrembedingungen des Kochsalz-Haushaltes untersuchen zu können, wurden acht Versuchsgruppen gebildet. Eine Versuchsreihe untersucht den Einfluss der CCPA-Vorbehandlung unter kochsalzreicher Diät, eine andere den Einfluss unter kochsalzreicher Diät. Pro Versuchsreihe gab es jeweils einen Versuchsarm, in dem die Tiere mit CCPA vorbehandelt wurden, im anderen Arm, der Kontrollgruppe, wurde die Substanz CCPA nicht verabreicht (siehe Abbildung 8). In jedem Arm gab es wiederum zwei Gruppen. Bei einer Gruppe wurde die akute hämodynamische Reaktion der Niere auf Adenosin-Injektionen in die Aorta abdominalis untersucht, in der anderen Gruppe wurden die Clearance-Messungen und die Untersuchungen des Nierengewebes durchgeführt (siehe Abbildungen 9 und 10).

Die Tierversuche wurden durch das Regierungspräsidium Tübingen genehmigt.

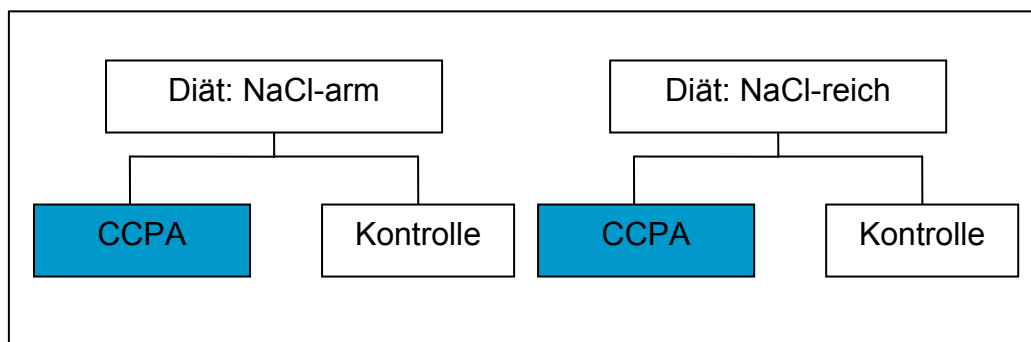


Abbildung 8: Übersicht über Versuchsgruppen

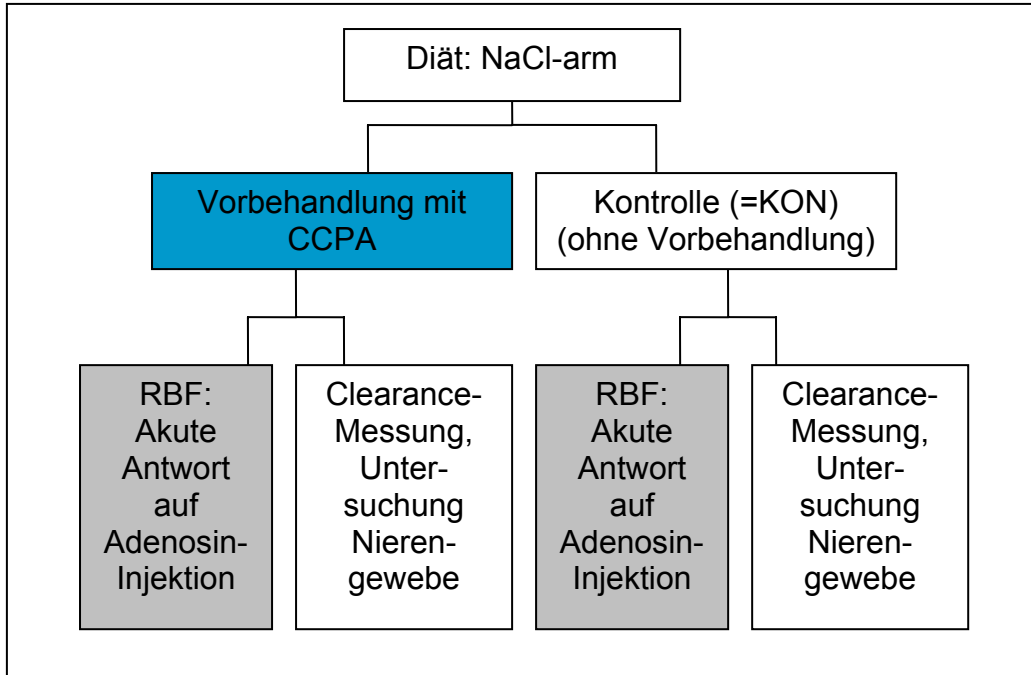


Abbildung 9: Versuchsgruppen in Versuchsreihe Kochsalz-arm (RBF = renaler Blutfluss)

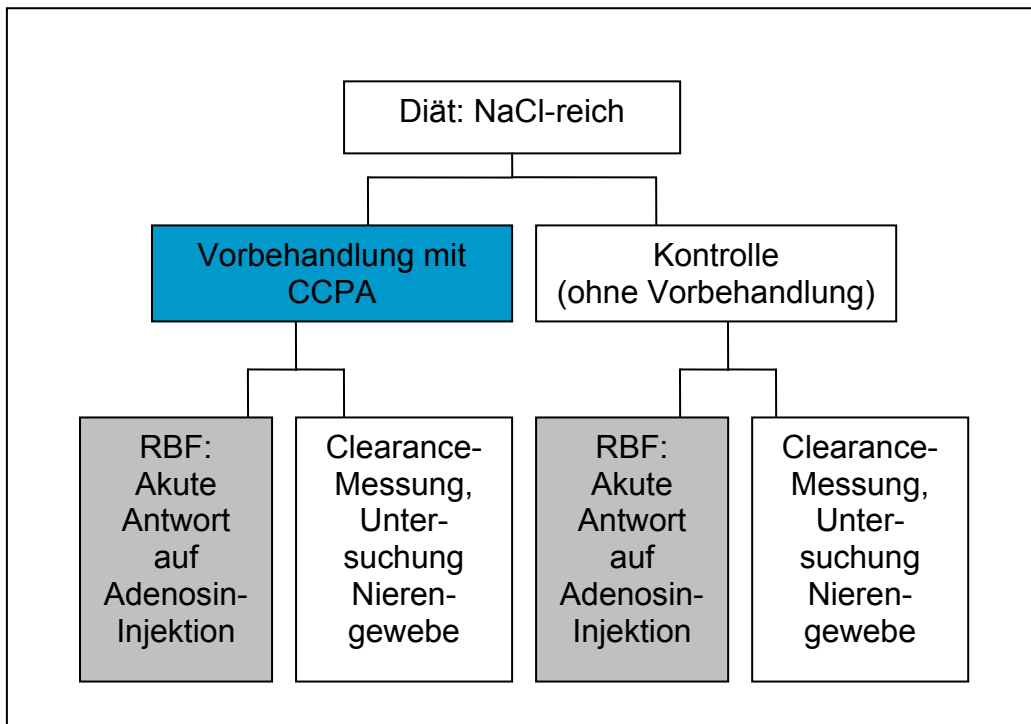


Abbildung 10: Versuchsgruppen in Versuchsreihe Kochsalz-reich (RBF = renaler Blutfluss)

Jede Versuchsgruppe bestand aus 8 Tieren. Die Stichprobengröße wurde mit dem Statistikprogramm NCSS 2007 abgeschätzt. Für die Irrtumswahrscheinlichkeit (α -Fehler) einer Aussage wurde ein Wert kleiner gleich 5%

gewählt, der Fehler 2. Art (β -Fehler) sollte maximal 5% betragen. Als primäre Variable wurde für den renalen Blutfluss und die glomeruläre Filtrationsrate eine Differenz von 25% bei einer der physiologischen Streuung entsprechenden Standardabweichung von 15% angenommen.

3.1.2 Versuchsprotokoll Vorbehandlung

Vier Tage vor Beginn der Vorbehandlung mit CCPA bzw. der Kontrollperiode wurde die Kochsalzdiät, je nach Gruppe Natriurese bzw. Natriumretention initiiert. Ab diesem Zeitpunkt erhielten die Tiere Spezialfutter, entweder Kochsalz-arm oder -reich (siehe Abbildung 11).

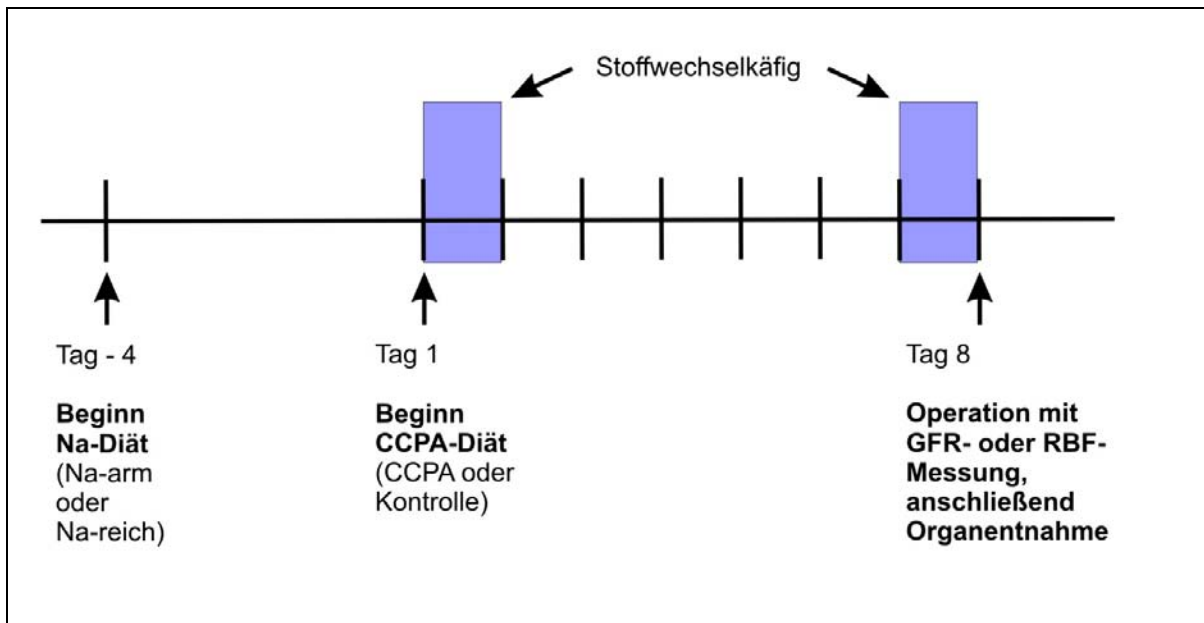


Abbildung 11: Versuchsprotokoll Vorbehandlung

3.1.3 Versuchsprotokoll Clearance

Die Clearance-Messungen wurden in Narkose nach Abschluss der operativen Eingriffe und einer Äquilibrationszeit von circa 30 bis 45 Minuten begonnen. Insgesamt wurde die Clearance in neun Sammelperioden (jeweils 3 Vor-, Haupt- und Nachperioden) gemessen, die jeweils 20 Minuten dauerten. Der in den 20 Minuten ausgeschiedene Urin wurde in Eppendorfgefäßen gesammelt.

Jeweils zur Mitte der Sammelperiode wurde eine Blutprobe abgenommen. Aus den pro Sammeleinheit (Vor-, Haupt- und Nachperiode) ermittelten drei Werten wurde der Mittelwert bestimmt.

Die Vorperioden dienten zur Erfassung der Ausgangsfunktion der glomerulären Filtration. Nach drei Vorperioden erhielten alle Tiere einen CCPA-Bolus intravenös injiziert gefolgt von einer einstündigen CCPA-Infusion. In den drei Hauptperioden wurde der Einfluss der CCPA-Infusion auf die Nierenfunktion bestimmt. Nach Beendigung der CCPA-Infusion wurden drei Nachperioden als Erholungsphase erfasst.

Der zeitliche Ablauf der Clearance-Messung ist in Abbildung 12 dargestellt.

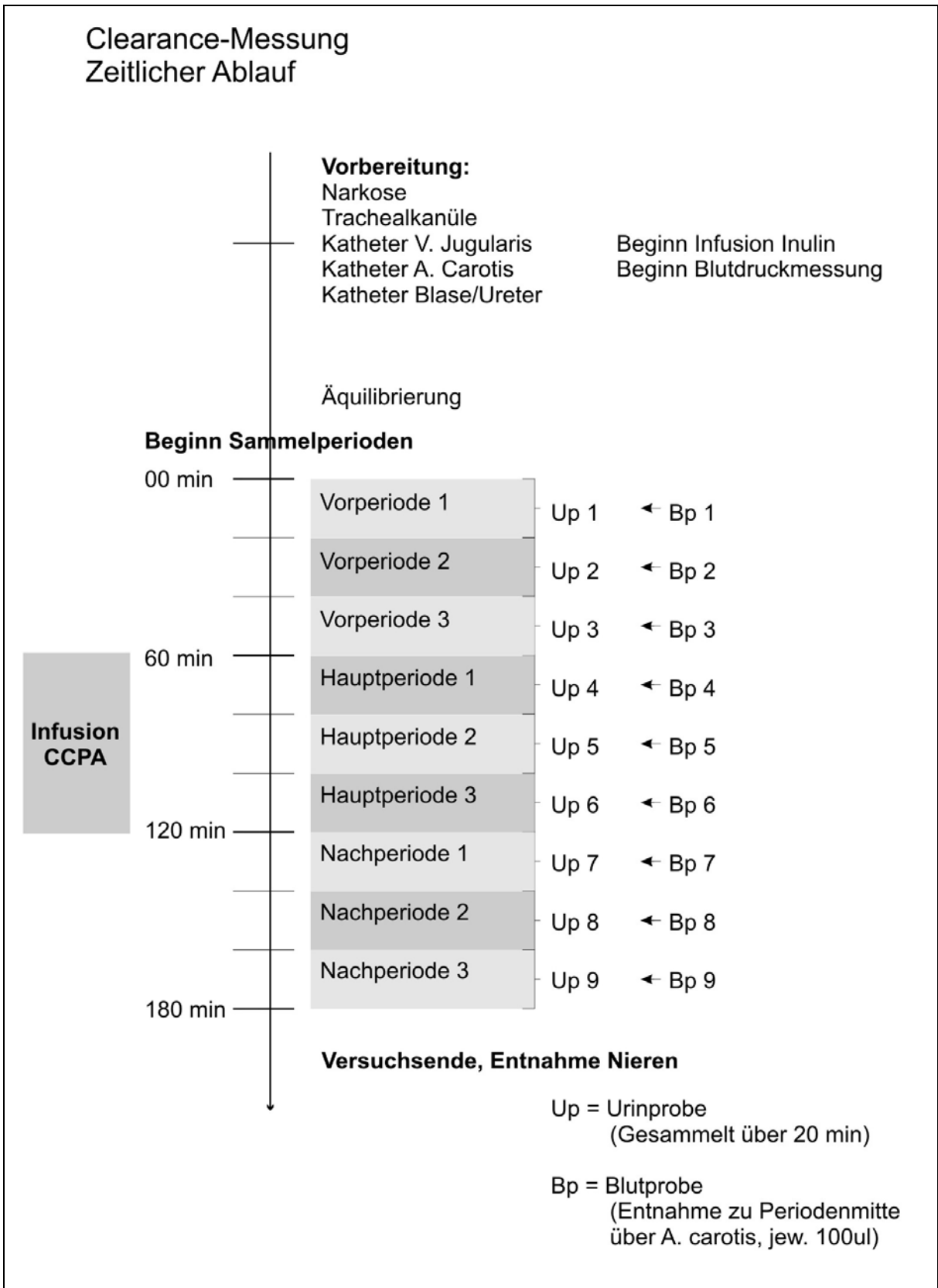


Abbildung 12: Versuchsprotokoll Clearance-Messung: Zeitlicher Ablauf

3.2 Versuchstiere

3.2.1 Tierhaltung

Die Versuche wurden an männlichen Sprague Dawley Ratten durchgeführt, die von Charles River, Sulzfeld, bezogen wurden. Die Tiere hatten bei den Messungen ein mittleres Gewicht von 300 ± 100 g.

Die Tiere wurden unter standardisierten Bedingungen (12 h Tag-Nacht-Rhythmus, Raumtemperatur $22,5^\circ$ C, Luftfeuchtigkeit von $22,5^\circ$ C) in den Tierhaltungsräumen des pharmakologischen Instituts gehalten.

Bis zur Beginn der speziellen NaCl-Diäten erhielten die Ratten pelletierte Standardnahrung und freien Zugang zu Leitungswasser. Zur Akklimatisierung wurden die Tiere eine Woche in den Tierhaltungsräumen gehalten, bevor die Diät umgestellt wurde.

3.2.2 Diät und Vorbehandlung

Um die Wirkungen von CCPA in der Niere unter unterschiedlichen Ausgangsbedingungen des Elektrolythaushaltes zu untersuchen, wurden zwei Gruppen gebildet. Bei einer Gruppe wurde eine erhöhte Kochsalzausscheidung durch Anreicherung von NaCl im Futter erzielt. Die andere Gruppe wurde maximaler Kochsalzretention unterzogen, indem NaCl-armes Futter eingesetzt wurde.

Für die kochsalzarme Diät wurde zu Beginn der Diät 10 mg/kg Körpergewicht Furosemid (Sigma Aldrich, Schnelldorf) intraperitoneal injiziert, um durch die starke Natriurese einen ausgeprägten Kochsalzverlust zu erzielen. Dann erhielten die Tiere natriumchloridarmes Spezialfutter mit einem Natrium- und Chloridgehalt von jeweils 0,015% (C1036, Altromin[®], Lippe). Die Tiere hatten Zugang zu Leitungswasser ad libitum.

Die salzreiche Diät begann mit einer einmaligen intraperitonealen Injektion von Desoxycorticonsteronacetat (DOCA, Sigma, Schnelldorf) in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht. Als langwirksames Mineralocorticoid bewirkt DOCA eine starke Natrium-Retention. Ab diesem Zeitpunkt erhielten die Tiere natriumreiches Spezialfutter mit einem Natriumgehalt von 3% (C1051, Altromin[®], Lippe). Die Tiere hatten ebenfalls freien Zugang zu Leitungswasser.

3.2.3 Vorbehandlung mit CCPA

Die Abschätzungen der CCPA-Dosierung zur chronischen Vorbehandlung der Tiere beruhen auf Untersuchungen von Monopoli et al. (170). Die Berechnungen beziehen sich pro Kilogramm Körpergewicht:

Die Dosis von CCPA wurde so gewählt, dass ein Blutspiegel von etwa 10 nM aufrechterhalten werden soll. Dies wird erreicht, wenn nach einer Initialdosis von 6 nmol (initial intraperitoneale Injektion, 2,2 µg/kg KG, in 1 ml 0,9% NaCl gelöst) immer soviel Substanz zugeführt wird, wie fortlaufend ausgeschieden bzw. metabolisiert wird.

Bei einer Halbwertszeit von 20 Minuten sind nach einer Stunde, also 3 Halbwertszeiten, noch 12,5% der Substanzmenge im Blut enthalten. Folglich werden bei einer CCPA-Konzentration von 10 nmol/l innerhalb von 60 Minuten 8,75 nmol aus dem Blut entfernt (Metabolisierung, renale Ausscheidung). 8,75 nmol entsprechen 3,24 µg. CCPA verteilt sich gleichmäßig im Körperwasser, also in etwa 60% des Körpergewichtes. Pro Kilogramm Körpergewicht müssen demnach 1,94 µg zugeführt werden, um die metabolisierte Menge von CCPA zu ersetzen.

Da bei der Vorbehandlung die Substanz oral über das Trinkwasser appliziert wird, muss zusätzlich die orale Bioverfügbarkeit berücksichtigt werden. Bei einer geschätzten Bioverfügbarkeit für CCPA von 60% errechnet sich eine Dosis von 3,24 µg pro Stunde. Demnach wurden den Tieren über 24 Stunden eine Dosis von etwa 80 µg/kg Körpergewicht zugeführt. Diese Dosis wurde in der erwarteten Trinkmenge von 1,25 ml pro Stunde (entspricht 30 ml in 24 Stunden) gelöst und über 7 Tage über das Trinkwasser zugeführt. Untersuchungen von Casati et al. (35) und Lee et al. (148) zeigten, dass es mit dieser Dosierung bereits nach wenigen Tagen zu einem Wirkungsverlust bei Herzfrequenz und Blutdruck kommt.

3.2.4 Stoffwechselkäfig

Um Urinmenge und Elektrolytkonzentrationen im Urin messen zu können, wurden die Tiere an Tag 1 und Tag 7 der Vorbehandlung in einem Stoffwechselkäfig gehalten.

3.2.5 Narkose und operative Eingriffe

Narkose

Die Ratten wurden mit 100 mg/kg Körpergewicht Inactin[®] (Thiobutabarbital, Sigma Aldrich, Schnelldorf) in einem Volumen von 2 ml/kg (NaCl-arm ernährte Tiere: 5% Glucose-Lösung, NaCl-reich ernährte Tiere: 0,85% NaCl-Lösung) per intraperitonealer Injektion narkotisiert. Eine ausreichende Narkosetiefe, erkennbar durch erloschene Schmerz- und Schutzreflexe (Zwischenzehen- und Cornealreflex), setzte nach circa 10 min ein. Gegebenenfalls wurden 10 bis 20 mg/kg KG Inactin nachinjiziert. Diese Narkoseart garantierte eine tiefe, lang anhaltende Narkose bei geringer Beeinflussung der Nierenfunktion.

Um die Körpertemperatur der Tiere während der Operation konstant bei 37° C zu halten, wurden die Operationen auf beheizten OP-Tischen (Operationstisch für Kleintiere, Klaus Effenberger Med-Tech. Gerätebau, Pfaffing) durchgeführt. Die Temperaturmessung erfolgte mit rektalen Temperatursonden. Eine konstante Körpertemperatur ist insofern wichtig, da eine erniedrigte Körpertemperatur die GFR deutlich reduziert (25).

Die Tiere wurden nach Versuchsende durch eine intravenöse Injektion einer gesättigten Kaliumchloridlösung, die zu einem sofortigen Herzstillstand führt, getötet.

Operative Eingriffe

Halsschnitt

Die Tiere wurden in Rückenlage auf die Heitzische gelegt. Zu Beginn der Operation wurde ein medianer Halsschnitt durchgeführt, um einen trachealen, einen venösen und einen arteriellen Zugang zu schaffen. Dazu wurde die Haut mit Paraffinöl bestrichen und das Fell zur Seite gekämmt. Suprasternal wurde

ein etwa 2 cm langer Hautschnitt gesetzt. Das subkutane Fett- und Bindegewebe sowie der Musculus sternocleidomastoideus wurden stumpf aufgeweitet. Nach Freilegung der Trachea wurde ein Faden vorgelegt, die Trachea zwischen zwei Knorpelspangen inzidiert, die Trachealkanüle, ein Polyethylenkatheter mit einem äußeren Durchmesser von 2,08 mm (Portex, Smiths Medical International), eingeführt und mit einem Faden fixiert. Der Trachealkatheter diente zur Sicherung der Spontanatmung.

Danach wurde ein Venenkatheter in die linke Vena jugularis eingeführt. Dazu wurde die Vene lateral des M. sternocleidomastoideus freipräpariert, mit einem Faden kranial verschlossen, caudal ein Faden vorgelegt, die Venenwand mit einer Federschere eingeschnitten, ein Polyethylenkatheter mit einem äußeren Durchmesser von 0,96 mm (Portex, Smiths Medical International) circa 15 mm weit in die Vene eingeführt und mit einem Knoten gesichert. Der Katheter wurde an eine Infusionspumpe (B. Braun, Melsungen) angeschlossen. Ab diesem Zeitpunkt erhielten die Tiere eine isotone Infusion mit einer Flussrate von 3 ml/h zur Aufrechterhaltung der Flüssigkeitshomöostase (siehe Kapitel 3.2.6 Pharmaka / Lösungsmittel / Infusionen).

Anschließend wurde der arterielle Katheter vorbereitet. Die linke Arteria carotis communis wurde dorsal des M. sternocleidomastodieus vorsichtig freigelegt und cranial mit einem Faden verschlossen. Caudal wurde die Arterie mit einer Gefäßklemme verschlossen, das Gefäß eingeschnitten, ein Polyethylenkatheter mit einem äußeren Durchmesser von 0,8 bzw. 0,96 mm (Portex[®], Smiths Medical International) in das Gefäß eingeführt und vorläufig mit einem Knoten gesichert. Dann wurde die Klemme gelöst, der Katheter etwa 20 bis 40 mm vorgeschoben und endgültig mit einem Knoten fixiert. Der arterielle Katheter diente zur Blutdruckregistrierung und der Entnahme von Blutproben. Bei den RBF-Messungen wurden über ihn Adenosin-Lösungen injiziert. Danach wurde der Halsschnitt mit einem Knoten verschlossen.

Diese operativen Eingriffe wurden zum Teil mit Hilfe eines Stereomikroskops unter vierfacher Vergrößerung durchgeführt.

Blasenkatheter

Um Harnvolumen, Elektrolytausscheidung und Inulin-clearance messen zu können, wurde der Urin über einen Blasenkatheter abgeleitet. Dazu wurde die Blase über einen medianen suprapubischen Bauchschnitt freigelegt und ein Katheter (äußerer Durchmesser von 0,96 mm (Portex[®], Smiths Medical International)) eingebunden. Damit der Katheter nicht aus der Blase rutschen konnte, war zuvor eine Seite über einer Flamme trichterförmig aufgeweitet worden.

Präparation der Niere

Für die RBF-Messungen wurden die Tiere auf die rechte Körperseite gelagert. Die Bauchhöhle wurde über einen linksseitigen, subcostal verlaufenden, circa 3cm langen Bauchschnitt eröffnet. Die Niere wurde vorsichtig freipräpariert, vom perihilärem Fettgewebe befreit und in eine Nierenschale gelegt. Um eine Austrocknung der Oberfläche zu vermeiden, wurde die Niere mit einem in Infusionslösung getränkten Tupfer bedeckt. Anschließend wurde die Arteria renalis vorsichtig zwischen Aorta und Abgang der Arteria suprarenalis freigelegt und von der Vena renalis getrennt. Dann wurde die Sonde des Flowmeters um die Nierenarterie gelegt (Abbildung 13).

Zum Schutz gegen Flüssigkeitsverlust und Abkühlung wurde die Operationsfläche mit Parafilm abgedeckt. Die Messungen der renalen Durchblutung wurden nach einer Erholungszeit von 30 bis 45 Minuten durchgeführt.

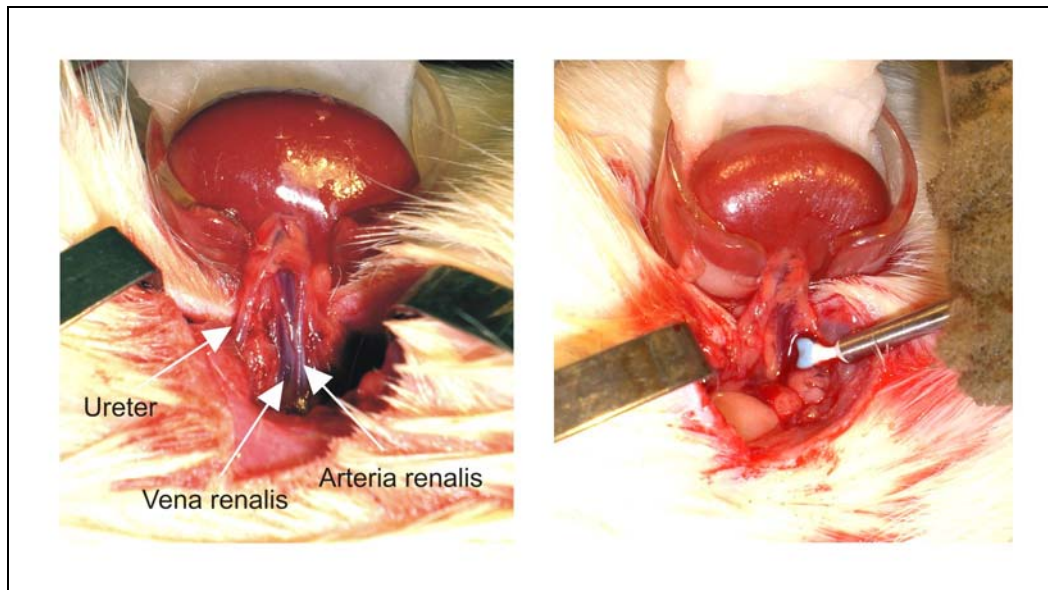


Abbildung 13: Links freipräparierter Ureter und Arteria renalis über Vena renalis, rechts Anordnung der RBF-Meßkopfes mit Ultraschallsonde

Entnahme der Niere

Die Nierenentnahme erfolgte im Anschluss an die Clearance-Messungen. Die linke Niere wurde per Bauchschnitt vom umliegenden Gewebe befreit. Nach einer Erholungszeit von 10 Minuten wurde sie am Nierenstiel abgesetzt und innerhalb von 1-3 Sekunden mit Hilfe einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Zange schockgefroren. Die Nieren wurden bis zur RNA-Extraktion bei -80°C aufbewahrt.

3.2.6 Pharmaka / Lösungsmittel / Infusionen

CCPA

2-Chloro- N^6 -cyclopentyladenosin (CCPA) ist ein hochselektiver Adenosin- A_1 -Rezeptor-Agonist. Sein Molekulargewicht beträgt $374,31\text{ g/mol}$ (20). Es wurde von Biotrend Chemicals (Wangen, Zürich, Schweiz) bezogen.

Adenosin

Die Adenosin-Lösungen wurden jeweils vor dem Versuch frisch aus einer Stammlösung angesetzt. Zur Herstellung der Stammlösung wurden 26,7 mg Adenosin (Molare Masse 267 g/mol, Sigma Aldrich, Schnelldorf) in 5 ml destilliertem Wasser gelöst. 50 µl dieser Lösung enthalten 1000 nM Adenosin. Die Injektionslösungen wurden entsprechend mit 0,85%iger NaCl-Lösung verdünnt.

Infusionen

Um während den Messungen einen konstanten Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt zu gewährleisten, erhielten die Tiere eine Infusion über die V. jugularis mit einer Rate von 3 ml/h. Gleichzeitig wurden über diese Infusionen Inulin zur GFR-Messung appliziert.

Die kochsalzreich ernährten Tiere bekamen 0,85% NaCl-Lösung infundiert. Die kochsalzarm ernährten Tiere erhielten eine Infusion mit 2,5% Glukose und 0,425% NaCl.

Die 0,85%ige NaCl-Lösung wurde aus 8,5 g NaCl (Sigma, Schnelldorf) und 1 l bidestilliertem Aqua hergestellt. Für die 0,425%ige NaCl- und 2,5%ige Glukose-Lösung wurden 4,25 g NaCl und 25 g Glukose (Sigma, Schnelldorf) in 1 l Aqua bidest. gelöst.

Bei den Clearance-Messungen erhielten alle Tiere zu Beginn der ersten Hauptperiode einen CCPA- Bolus von 10 nmol (3,24 µg/kg KG) gelöst in 100 µl 5% Glucose-Lösung, anschließend über die 3 Hauptperioden eine einstündige CCPA-Infusion mit 0,65 µg/kg KG bei einer Infusionsrate von 1 ml (16,7 µl/min). Die per Infusion zugeführte Menge entspricht der Menge, welche die Tiere während der Vorbehandlung über das Trinkwasser aufgenommen haben.

3.3 Meßgrößen

3.3.1 Gewichtsverlauf

Die Tiere wurden zu Beginn der Vorbehandlung gewogen. Die zweite Gewichtsmessung fand unmittelbar vor der Operation statt, um die genaue Dosierung der Anästhesie zu bestimmen.

3.3.2 Trinkmenge

Die Trinkmenge während der Vorbehandlungsphase wurde täglich durch Wiegen gemessen. Das Trinkwasser wurde jeden Tag ausgetauscht.

3.3.3 Glomeruläre Filtrationsrate

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) ist das pro Zeiteinheit aus dem filtrierten Blut gebildete Volumen (Primärharn). Die Messung der GFR ist das entscheidende Maß für die Nierenfunktion. Im klinischen Alltag gibt man sich meist mit einer Abschätzung der GFR über die Cockcroft-Gault-Formel oder die MDRD-Formel (*Modification of Diet in Renal Disease*) zufrieden (24, 203, 239).

Dem Tierversuch stehen deutlich genauere Methoden wie die Inulin-Clearance mittels radioaktiv markiertem Inulin zur Verfügung. Da Inulin frei filtriert und weder metabolisiert noch reabsorbiert noch sezerniert wird, entspricht die Inulin-Clearance der GFR (5, 233). Für eine zuverlässige Messung der Inulin-Clearance muss die Konzentration im Plasma in einem Gleichgewicht (steady state) sein, der Urin muss quantitativ gesammelt werden können.

Zur Messung der GFR wurde ^{14}C -Carboxyl-Inulin (NEC 164A, NEN, Perkin Elmer, Waltham, USA) mit einer Aktivität von 88,8 MBq/g ($\triangleq 2,4 \mu\text{Ci}/\text{mg}$) verwendet.

Für eine Messung wurden 2,08 mg ^{14}C -Carboxyl-Inulin eingesetzt (\triangleq circa 5 μCi). Die Menge wurde in 1 ml 0,85% NaCl-Lösung gelöst. Davon wurden 500 μl initial als Bolus intravenös injiziert, der Rest wurde in 12 ml gelöst und mit

einer Infusionsrate von 3 ml/h (± 50 $\mu\text{l}/\text{min}$) infundiert. Angestrebt wurde eine Aktivität von 300 cpm in 20 μl Plasma (^{14}C : Zählrate 95%, $1\mu\text{Ci} \pm 2\,000\,000$ cpm).

Nach Ende der Versuche wurde die ^{14}C -Aktivität der Blut- und Urinproben jeder Versuchsperiode bestimmt. Je 10 μl Urin bzw. Plasma wurden in Szintillationsgefäßen (Midi-Vial, Packard, Groningen, Niederlande) mit 2 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold, Packard, Groningen, Niederlande) gemischt. β -Strahlung, die bei Zerfall des ^{14}C -markierten Inulins freigesetzt wird, wird von der Szintillationsflüssigkeit in Lichtblitze umgewandelt und von einem Szintillationszähler (Packard Tri-Carb 2550 TR Liquid Szintillation Analyzer (Perkin Elmer, Waltham, USA) gemessen. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmungen, deren Mittelwert zur Berechnung der GFR verwendet wurde.

Die GFR, bezogen auf ein Körpergewicht (KG) von 100g, berechnet sich wie folgt:

$$\text{GFR} = \frac{\text{cpm}_{\text{Urin}}}{\text{cpm}_{\text{Plasma}}} \cdot \text{UZV} [\text{ml}/\text{min}/100\text{g KG}]$$

wobei: cpm_{Urin} = Mittlere ^{14}C -Zählrate im Urin / Minute
 $\text{cpm}_{\text{Plasma}}$ = Mittlere ^{14}C -Zählrate im Plasma / Minute
UZV = Urinzeitvolumen

3.3.4 Renaler Blutfluss

Der renale Blutfluss wurde mit einem Transonic Flowmeter gemessen. Die Messung erfolgt hierbei nach dem Doppler-Ultraschall-Prinzip. Diese Methode zeichnet sich durch eine besondere Genauigkeit und ein hohes Auflösungsvermögen bei einfacher Anwendung aus (276).

Für die Messungen wurden das Transonic Flowmeter TS 420 (Transonic 400 Series Multi-Channel, Transducer TS 420, Transonic Systems, Altron Medical

Electronics, Fürstenfeldbruck) und die Dopplersonden MA0.7VB bzw. MA1PRB (Transonic Flowprobe, Transonic Systems, siehe Abbildung 14) mit einem Innendurchmesser von 0,7 bzw 1mm eingesetzt. Die Sonden messen bei einer Frequenz 9,6 bzw. 7,2 MHz und können einen Fluss bis zu 100 ml/min erfassen(256). Sie haben eine Auflösung von 0,05 ml/min bei einer relativen Genauigkeit von 98%.

Die Registrierung erfolgte über denselben Schreiber (Linear Corder mark VII Watanabe WR 3101 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten), der auch für Herzfrequenz- und Blutdruck-Aufzeichnung verwendet wurde. Dieses Verfahren erfordert im Gegensatz zu elektromagnetischen Messungen keine Kalibrierung zu Beginn der Messung.

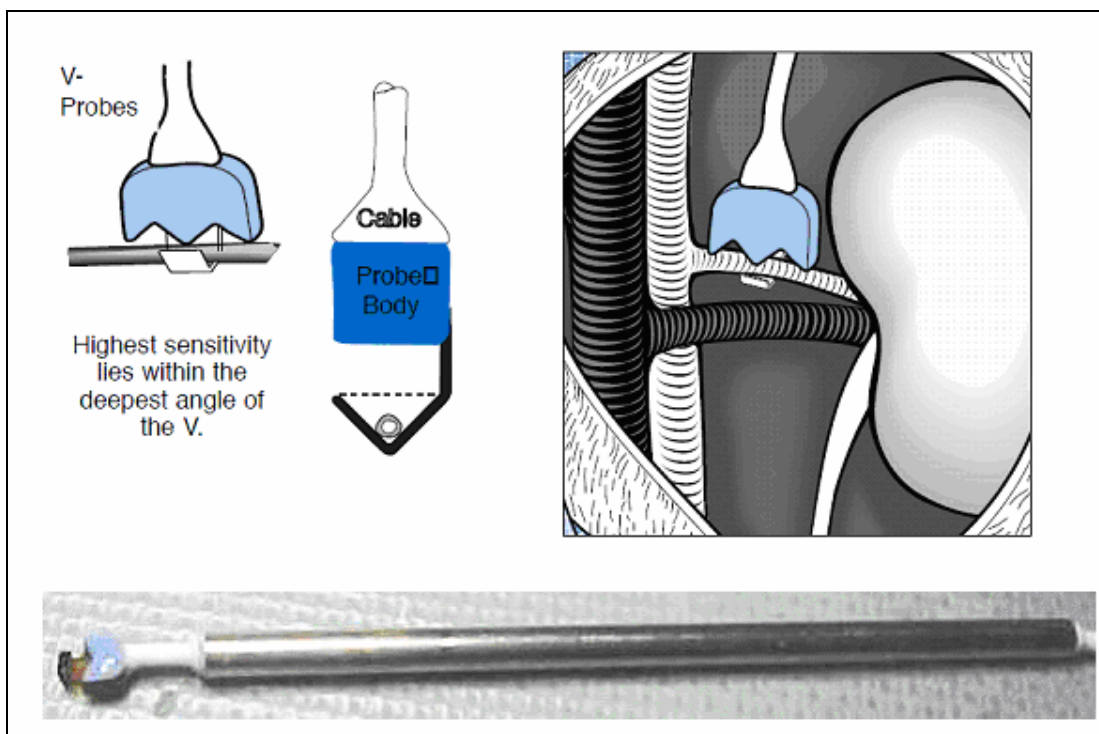


Abbildung 14: Schematische Darstellung und Abbildung der Ultraschallsonde (255, 257)

Ausgewertet wurden der initiale Blutfluss nach Äquilibrationsphase und ein Ansprechen der Niere auf Adenosin-Einzelinjektionen. Mit den Einzelinjektionen lassen sich Dosis-Wirkungskurven erstellen. Das Adenosin wurde schussartig in Dosierungen von 1, 3, 10, 30 und 100 nMol über den arteriellen Katheter in die Aorta abdominalis injiziert. Die Lösungen wurden in einem Volumen von

50µl mit einer Hamilton Mikroliter-Spritze (Hamilton, Bonaduz, Schweiz) appliziert. Pro Dosis wurden 3 Messungen durchgeführt. Vor Beginn der Adenosin-Einzelinjektionen wurden 50 µl 0,85% NaCl-Lösung injiziert, um Injektionsartefakte ausschließen zu können. Beobachtet wurde nur ein kurzzeitiger Anstieg der Durchblutung ohne darüber hinaus andauernde Veränderungen.

Δ RBF bezeichnet die maximale Abnahme des renalen Blutflusses (RBF) in Prozent des Ausgangswertes vor Injektion.

3.3.5 Urinausscheidung, Elektrolytmessung

Während der Vorbehandlung wurde an Tag 1 und Tag 7 der Urin im Stoffwechselkäfig gesammelt und direkt im Anschluss an die Sammelperiode von 24 Stunden abgewogen.

Bei den Messungen in Narkose wurde der Urin über den Blasenkatheter in vorher abgewogenen Eppendorfgefäßen (Safe Lock Cups 2,0ml, Eppendorf, Hamburg) abgeleitet. Die Sammelperioden dauerten je 20 min, danach wurde die Urinmenge gravimetrisch erfasst.

Aus dem in den Sammelperioden ausgeschiedenen Urinvolumen (UV) lässt sich das Urinzeitvolumen berechnen. Es bezieht sich auf ein Körpergewicht (KG) von 100g:

$$\text{Urinzeitvolumen} \quad \text{UZV} = \frac{\text{UV}}{20 \text{ min} \cdot \text{KG}} \text{ [}\mu\text{l/min]}]$$

Die Messung der Natrium- und Kaliumkonzentration im Urin erfolgte analog der Elektrolytmessung des Plasmas mit dem Flammenphotometer Eppendorf ELEX 6361. Bei natriumarm ernährten Tieren wurde der Urin 1:200 mit Lithiumlösung (Eppendorf, Hamburg) verdünnt (10 µl Urin auf 2 ml Lithiumlösung), bei natriumreich ernährten Tieren wurde der Urin 1:400 verdünnt (5 µl Urin, 5 µl ddH₂O auf 2 ml Lithiumlösung). Für die Eichung des Gerätes wurde eine Standard-Lösung mit einer Natrium- und Kalium-

Konzentration von 200 mM verwendet. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmungen.

Aus Elektrolytausscheidung und GFR lassen sich noch folgende Größen berechnen:

Absolute renale Natriumausscheidung:

$$E_{\text{Na}} = \text{Na}_{\text{Urin}} \cdot \text{UZV}$$

(Gleichung gilt analog auch für absolute Kaliumausscheidung)

Filtriertes Natrium:

Das filtrierte Natrium ist ein Maß für die glomerulär filtrierte Menge von Natrium.

$$F_{\text{Na}} = \text{GFR} \cdot \text{Na}_{\text{Plasma}}$$

Fraktionelle Natriumausscheidung

Die fraktionelle Natriumausscheidung ($F E_{\text{Na}}$) gibt an, wie viel Prozent des filtrierten Natriums ausgeschieden werden. Sie ist ein Maß für die tubuläre Resorptionsleistung der Niere. Vorteil dieses Parameters ist, dass er weitgehend unabhängig von der Urinmenge ist.

$$F E_{\text{Na}} = \frac{E_{\text{Na}}}{F_{\text{Na}}} \cdot 100 = \frac{\text{Na}_{\text{Urin}} \cdot \text{UZV}}{\text{Na}_{\text{Plasma}} \cdot \text{GFR}} \cdot 100$$

3.3.6 Elektrolytkonzentration im Plasma

Die Messung der Natrium- und Kaliumkonzentration im Plasma wurde mit dem Flammenphotometer Eppendorf ELEX 6361 durchgeführt. 10 µl Plasma wurden in 1 ml Lithiumlösung (Eppendorf 1:100 verdünnt) pipettiert. Für die Eichung des Gerätes wurde eine Standard-Lösung mit einer Natrium- und Kaliumkonzentration von 130 mM verwendet. Die Messung erfolgte in Doppelbestimmungen.

3.3.7 Arterieller Blutdruck

Systolischer und diastolischer Blutdruck wurden über einen Polyethylenkatheter, welcher in die Arteria carotis communis eingebracht wurde, gemessen. Die Polyethylenkatheter (Portex, Smiths Medical International) hatten bei den Clearance-Messungen einen inneren Durchmesser von 0,58 mm und einen äußeren Durchmesser von 0,96 mm. Sie wurden circa 2 bis 3 cm tief eingeführt. Bei den RBF-Messungen wurden dünnere Katheter mit Innendurchmesser 0,4 mm und Außendurchmesser 0,8 mm verwendet, da diese circa 4 cm bis in die Aorta abdominalis vorgeschoben wurden.

Bei den Clearance-Messungen wurden Katheter mit dem größeren Durchmesser gewählt, da diese eine größere Blutdruckamplitude abbilden. Die dünneren Katheter wurden bei den RBF-Messungen für die Adenosin-Einzelinjektionen eingesetzt, da diese deutlich weiter in die Aorta thoracica eingeführt werden konnten.

Um Messfehler zu reduzieren, durften nach der Äquilibrierungszeit keine größeren Blutdruckschwankungen mehr auftreten. Andernfalls wurden die Tiere von der Auswertung ausgeschlossen.

Die Katheter wurden an einen Druckaufnehmer angeschlossen, welcher an einem Schreiber (Linear Corder mark VII Watanabe WR 3101 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) oder Linear Corder WR 3001 (HSE Messbrücken-Koppler Typ 550 A, HSE Herz-Frequenz-Koppler Typ 552A, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) angeschlossen war.

Der Druckaufnehmer wurde regelmäßig mit dem HSE Druckeichgerät Typ 367 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten) kalibriert.

Die Katheter wurden bei Bedarf mit heparinierter Kochsalzlösung (100 IE/ml, B.Braun, Melsungen) freigespült.

3.3.8 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) berechnet sich aus den in Kapitel 3.3.7 "Arterieller Blutdruck" beschriebenen Messungen mit Hilfe folgender Formel:

$$\text{MAP} = \text{diast. Blutdruck} + 1/3 \cdot (\text{systol.} - \text{diast. Blutdruck}) \text{ [mmHg]}$$

3.3.9 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz konnte durch die Schreiber aus den Blutdruckamplituden abgeleitet werden. Eine Eichung der Schreiber erfolgte mit einem Frequenzgeber (Eigenbau Pharmakologisches Institut). Die Eichung wurde regelmäßig durch eine Blutdruckaufzeichnung mit schnellem Papiervorschub kontrolliert.

3.3.10 Hämatokrit

Bei den GFR-Messungen wurde jeweils zur Mitte einer zwanzigminütigen Sammelperiode Blut über den Blutdruckkatheter in ein Hämatokritröhrchen (60 µl, Brand, Wertheim) abgenommen. Die Hämatokritröhrchen waren mit Ammonium-Heparin beschichtet, so dass die Elektrolytkonzentrationen dadurch nicht verfälscht werden konnten. Die Hämatokritröhrchen wurden am Ende des Versuchs in einer Zentrifuge (Hettich Hämatokrit, Hettich, Tuttlingen) bei 12 000 U/min für 10 min zentrifugiert, so dass das Verhältnis korpuskulärer Anteil zu Plasma auf einer Tafel abgelesen werden konnte. Der Plasmaüberstand wurde abpipettiert und zur Szintillations-Messung (GFR-Versuche) und zur Elektrolytbestimmung verwendet.

3.3.11 Plasma-Renin-Aktivität

Für die Messung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) wurde ein Radioimmuno-Assay (RIA Diasorin RENCTK P2721, Diasorin, Dietzenbach) gewählt. Gemessen wird hier die proteolytische Bildung von Angiotensin I aus Angiotensinogen durch Renin. Der Radioimmunoassay misst die kompetitive Verdrängung von markiertem Angiotensin I in den mit Antikörpern beschichteten Röhrchen. Nach Inkubation der sogenannten Coated Tubes ist die Menge des gebundenen markierten Angiotensins I umgekehrt proportional zur Konzentration des freien Angiotensins der Proben (siehe Abbildung 15). Vorteil dieses Verfahrens ist, dass es mit einem Probenvolumen von nur 50 µl auskommt. Es erfasst Werte in einem Bereich von 0 bis 50 ng Angiotensin I /ml,

die Nachweisgrenze (analytische Spezifität) liegt bei 0,2 ng/ml. Es kommt zu keinen Kreuzreaktionen mit angiotensinähnlichen Peptiden.

Probenvorbereitung

Die Blutproben (100 µl) zur Messung der PRA wurden sofort nach Abnahme mit 10 µl 125 mmol EDTA-Lösung vermischt und für 10 min bei 4° C mit 3000 g zentrifugiert. Das Plasma wurde abpipettiert und bei -20° C bis zur Messung aufbewahrt.

Bildung von Angiotensin I

Zur Bildung von Angiotensin I wurden die Proben unter optimalen Bedingungen bei 37° C 90 Minuten inkubiert. Um eine höhere Empfindlichkeit der Proben mit niedriger Renin-Aktivität zu erzielen, wurden ein Reaktionspuffer (Zitratpuffer, pH=6,0) und PMSF-Enzymhemmer zugefügt. Probenleerwerte wurden in einem Eisbad aufbewahrt.

Angiotensin I-Radioimmunoassay

Die Proben und der Tracer wurden dann in die mit biotinylierten IgG gegen Angiotensinogen I beschichteten Röhrchen pipettiert. Als Tracer diente mit ¹²⁵J markiertes Angiotensinogen. Die Röhrchen wurden dann für 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, danach wurden die Inkubationslösungen abgesaugt. Anschließend wurde die Radioaktivität der Röhrchen gemessen (Szintillationszähler 2000CA TRI-CARB (Packard/ Perkin Elmer, Waltham, USA).

Eine Kalibrierung wurde mit Angiotensinogen I-Testlösungen mit Konzentrationen von 0-50 ng/ml durchgeführt. Eine Kontrollprobe mit bekannter PRA wurde ebenfalls mitgemessen.

Auswertung

Ermittelt wurde zunächst der Quotient B/B₀% mit folgender Formel:

$$B/B_0[\%] = \frac{\text{Zählrate Probe / Kalibrator}}{\text{Zählrate Nullkalibrator}} \cdot 100$$

Die Messergebnisse der Kalibratoren liefern folgende Kurve:

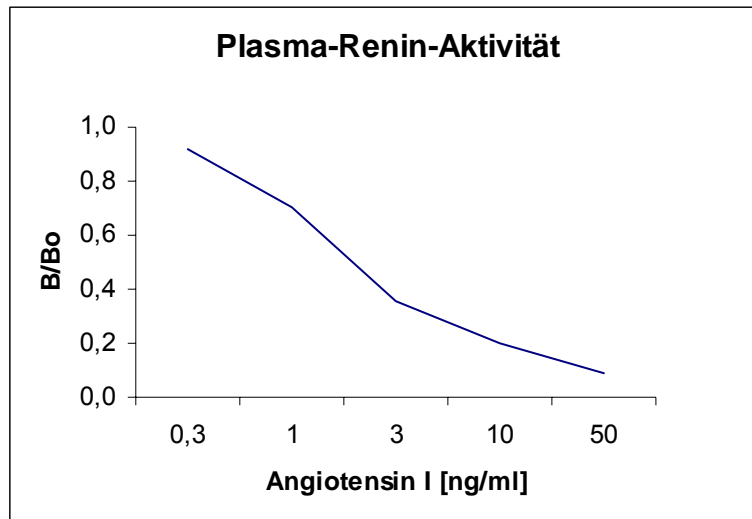


Abbildung 15: Kalibrierungskurve für Plasma-Renin-Aktivität

Mit dem Programm Excel wurde anhand dieser Werte eine Funktion für die Angiotensin-I-Bildung berechnet:

$$A = 4979 \cdot (B/B_0)^{-2,0828} \text{ [ng/ml]}$$

Die Plasma-Renin-Aktivität berechnet sich schließlich wie folgt:

$$\text{PRA} = \frac{(A \text{ [ng/ml]} 37^\circ\text{C} - A \text{ [ng/ml]} 4^\circ\text{C}) \cdot 1,12}{1,5 \text{ Inkubationssstunden}} \text{ [ng/ml/h]}$$

Der Faktor 1,12 berücksichtigt die Verdünnung der Proben durch den Reaktionspuffer.

3.3.12 Genexpression A₁/A_{2A}-Rezeptoren

Isolierung der RNA aus Nierengewebe

Das Nierengewebe wurde im Mörser in flüssigem Stickstoff pulverisiert. Davon wurden circa 50 mg Gewebe in einem Eppendorfcup mit 1 ml RNApure-Lösung (Peqlab, Erlangen) homogenisiert. Nach einer Wartezeit von 10 min wurden 200 µl Chloroform (Roth, Karlsruhe) dazugegeben und mit einem Vortexer kräftig durchmischt. Nach 5 min wurden die Proben zentrifugiert (10 min/ 12 000 g/ 4° C/ Eppendorf Centrifuge 5415R). Der wässrige Überstand wurde abpipettiert und mit 1 ml eiskaltem Ethanol (80%, Merck, Darmstadt) versetzt, um Phenolreste auszuwaschen und die RNA auszufällen. Nach einer Zentrifugation (10 min/ 12 000 g/ 4° C) wurden die Pellets mit 1 ml Ethanol (80%, Merck, Darmstadt) gewaschen und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurden die RNA-Pellets für circa 10 min getrocknet und in 60 µl RNase freiem Wasser (Invitrogen, Karlsruhe) gelöst. Die Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte photometrisch (Nanodrop, Peqlab). Die Proben wurden auf eine RNA-Konzentration von 125 ng/µl verdünnt.

RNA-Gel-Elektrophorese

Um die Qualität der RNA-Isolierung und Integrität der RNA zu überprüfen, wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Das Gel wurde aus 1,5 % Agarose (Agarose Qualex Gold (Hybaid, Heidelberg), Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe) und TBE-Puffer: 4,5 mM Tris Base (Sigma, Schnelldorf), Borsäure (4,5 mM, Merck Darmstadt) und 0,1 mM Na₂EDTA x H₂O (Dinatrium-ethylendiamin-tetraacetat, Sigma, Schnelldorf) hergestellt. Pro Tasche wurden 1 µg RNA und 4 µl Bromphenolblau (Merck, Darmstadt) aufgetragen. Zur Fragmentlängenkontrolle wurde eine RNA-Leiter (100 bp, Invitrogen) verwendet. Alle Proben erfüllten die Bedingung, dass nur zwei Banden (18s und 28s) nachweisbar waren.

Umschrieb der RNA in cDNA

Da die Quantifizierung der Genexpression nur auf DNA-Ebene möglich ist (Taq-Polymerase kann einzelsträngige RNA nicht als Vorlage nutzen), wurde die RNA mittels reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Für die Transkription wurde ein Quantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden) eingesetzt.

Semiquantitative real-time PCR

Die semiquantitative Messung der mRNA für die Adenosin-Rezeptoren erfolgte mit einer Real-Time PCR im LightCycler (Roche Diagnostics, Mannheim). Als Mastermix diente der Fast Start DNA Masters SYBR Green I (Roche Diagnostics). Das Housekeeping-Gen 18s (ribosomale RNA) wurde als Referenzgen verwendet. In mehreren Publikationen konnte nachgewiesen werden, dass 18s konstitutiv exprimiert wird und nur unwesentlich regulatorischen Einflüssen unterliegt (199, 222). Schmid et al. untersuchten die Eignung mehrerer Housekeeping-Gene speziell in Nierenbiopsien und zeigten, dass 18s als Referenzgen für Expressionsanalysen von Nierengewebe geeignet ist (222). Tabelle 2 listet die eingesetzten Primer auf.

Tabelle 2: Primer für die real-time PCR

18S	Sense	5'-CGGCTACCACATCCAAGGAA-3'	Produktgröße: 187 bp
	Antisense	5'-GCTGGAATTACCGCGGCT-3'	
A₁-Rez.	Sense	5'-CTCCATTCTGGCTCTGCTCG-3'	Produktgröße: 207 bp
	Antisense	5'-ACACTGCCGTTGGCTCTCC-3'	
A_{2A}-Rez.	Sense	5'-GAAGACCATGAGGCTGTTCC-3'	Produktgröße: 253 bp
	Antisense	5'-GAGTATGGGCCAATGGGAGT-3'	
A_{2B}-Rez.	Sense	5'-GGAAGGACTTCGTCTCTCCA-3'	Produktgröße: 322 bp
	Antisense	5'-GGGCAGCAACTCAGAAA-3'	

Die Lightcycler-Programme sehen wie folgt aus:

18s-Programm:

Denaturierung: 95°C / 10 min
Amplifizierung, Quantifizierung: 35 x
(95°C / 5 s
touch-down PCR 68°C – 58°C mit: 0,5°C / Zyklus für 5 s
72°C / 8 s)
Schmelzkurve: 65°C – 95°C mit Heizrate: 0,1°C / s mit kontinuierlicher
Fluoreszenz Messung
Abkühlen: 40°C

A1-Rezeptoren-Programm:

Denaturierung: 95°C / 10 min
Amplifizierung, Quantifizierung: 50 x
(95°C / 10 s
64°C / 10 s
72°C / 12 s)
Schmelzkurve: 66°C – 95°C mit Heizrate: 0,05°C / s mit kontinuierlicher
Fluoreszenz Messung
Abkühlen: 40°C

A2-Rezeptoren-Programm:

Denaturierung: 95°C / 10 min
Amplifizierung, Quantifizierung: 55 x
(95°C / 5 s
60°C / 5 s
72°C / 8 s
84°C / 2 s)
Schmelzkurve: 60°C – 95°C mit Heizrate: 0,1°C / s mit kontinuierlicher
Fluoreszenz Messung
Abkühlen: 40°C

Die Fluoreszenzmessung wurde mit der Software Light Cycler Data Analysis 3.5.3 (Roche Diagnostics, Mannheim) nach der Fitpoint-Methode ausgewertet.

Berechnung der semiquantitativen RNA-Menge

Die Berechnung der relativen mRNA-Menge beruht auf einer Gleichung, die von Pfaffl beschrieben und validiert wurde (198, 287):

$$\text{Rel.RNA} = \frac{\text{Eff}^{(Cp \text{ MW TG} - Cp \text{ Probe TG})}}{\text{Eff}^{(Cp \text{ MW HKG} - Cp \text{ Probe HKG})}}$$

wobei: $\text{Eff} = \text{Effizienz} = 10^{\frac{-1}{\text{Slope}}}$

CP = Crossing Point

MW = Mittelwert

TG = Targetgen

HKG = Housekeeping-Gen

Die Berechnung wurde mit dem Programm Rest 2009 überprüft (204). Die Steigung (=Slope) wird aus einer Verdünnungsreihe einer Probe berechnet. Der Schnittpunkt (=Crossing Point) gibt die Zyklusnummer an, in der die spezifische Fluoreszenz erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz übertrifft. Zu diesem Zeitpunkt findet eine exponentielle Amplifikation der cDNA statt.

3.3.13 Rezeptor-Protein (Immuno-Blot)

Um die Auswirkungen der Vorbehandlung auf Rezeptorebene zu erfassen, wurde ein Western-Blot mit Proteinextrakten ganzer Nieren durchgeführt. Die Proteinmengen der A₁-Rezeptoren in den Nieren wurden semiquantitativ mittels Immunoblot bestimmt. Pro Versuchsgruppe wurden die Proteinextrakte aus ganzen Nieren von jeweils zwei Tieren verwendet.

Die Proteinproben wurden auf eine SDS-Membran aufgetragen. Pro Tasche wurden 20 µg Proteinextrakt pipettiert. Die Auftrennung erfolgte durch Elektrophorese. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulose-Membran.

Zum Nachweis des Adenosin-A₁-Rezeptors wurde ein Anti-A₁-Antikörper (Sigma, Schnelldorf) verwendet, der über Nacht bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert wurde. Der Zweitantikörper Tropix T2191, welcher mit Alkalischer Phosphatase konjugiert ist, wurde anschließend in einer Verdünnung von 1:10 000 bei Raumtemperatur eine Stunde lang inkubiert. Detektiert wurden die Banden mit CDP-Star, einer phosphathaltigen Dioxetan-Verbindung, die beim Zerfall Licht emittiert. Die emittierte Chemilumineszenz wurde mit einer Kamera aufgenommen. Der Molekulargewichts-Marker stammt von Bio-Rad (pre-stained). Die Bande bei dem Molekulargewicht von 32,5 kDa entspricht dem A₁-Rezeptor.

3.4 Statistische Analyse

Die Daten wurden als Mittelwerte mit der Standardabweichung des Mittelwerts (SEM) dargestellt.

Eine statistische Signifikanz wurde angenommen, wenn die Nullhypothese mit einer Wahrscheinlichkeit von kleiner gleich 5% abgelehnt werden kann ($p < 0,05$). Die Nullhypothese nimmt an, dass Abweichungen in der zufälligen Streubreite liegen. Von einer statistischen Tendenz wurde ausgegangen, wenn die Nullhypothese mit p kleiner gleich 10% verworfen werden kann.

Zur statistischen Auswertung der Ergebnisse wurde der Student's-t-Test für abhängige bzw. unabhängige Stichproben herangezogen. Vor der Anwendung des Testes wurden die Daten auf Normalverteilung überprüft.

Zur Feststellung der Normalverteilung wurde der Shapiro-Wilk-Test angewendet, der für kleine Stichproben geeignet ist. Bei fehlender Normalverteilung wurden die Daten auf starke Ausreißer und asymmetrische Abweichungen von der Normalverteilung untersucht. Liegen diese nicht vor, kann der t-Test auf Grund seiner Stabilität trotz fehlender Normalverteilung angewendet werden (26).

Bei fehlender Normalverteilung wurde zusätzlich der Wilcoxon-Rangsummentest angewendet. Als verteilungsfreier Test ist er besonders für kleine Stichproben geeignet. Es wurde eine Chi-Quadrat-Approximation angewendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Office Excel 2002 und JMP 7.0 (SAS Institute).

4 Ergebnisse

4.1 Gewichtsverlauf

Die kochsalzarm ernährten Tiere mit CCPA-Vorbehandlung nahmen während der siebentägigen Vorbehandlung $42,1 \pm 5,4$ g zu (durchschnittliches Gewicht Tag 1: $246 \pm 18,8$ g, Tag 7 $293 \pm 20,6$ g (n=12)). Bei der Kontrollgruppe betrug die Gewichtszunahme $44,4 \pm 6,4$ g (durchschnittliches Gewicht Tag 1 $238 \pm 17,5$ g, Tag 7 $282 \pm 17,4$ g (n=10)).

Nach kochsalzreicher Diät mit CCPA-Vorbehandlung verzeichneten die Tiere eine Gewichtszunahme über sieben Tage von $54,1 \pm 3,5$ g. (Durchschnittliches Gewicht Tag 1: $223 \pm 13,6$ g, Tag 7 $277 \pm 13,0$ g (n=15)). Die Tiere der Kontrollgruppe nahmen um $51,3 \pm 4,0$ g zu (durchschnittliches Gewicht Tag 1 $226 \pm 13,6$ g, Tag 7 $277 \pm 12,8$ g (n=15)).

Weder bei kochsalzärmer noch bei -reicher Vorbehandlung gibt es einen signifikanten Unterschied beim Gewichtsverlauf (NaCl-arm: $p > 0,05$, NaCl-reich: $p > 0,05$).

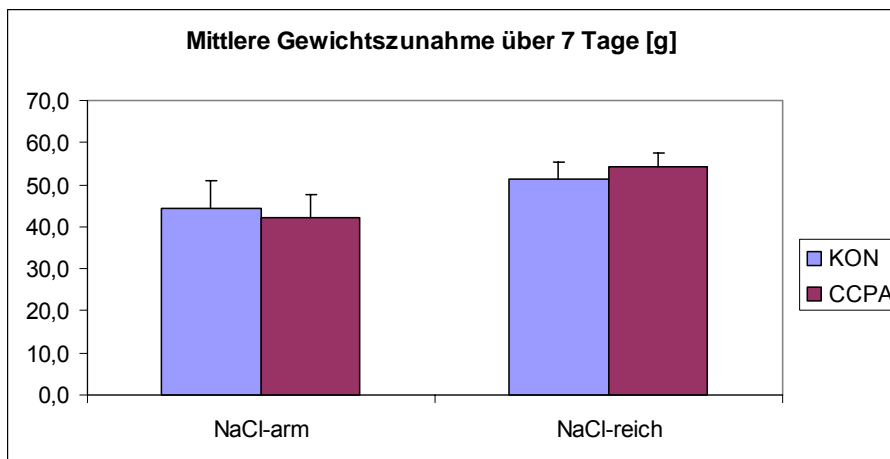


Abbildung 16: Gewichtszunahme über sieben Tage in den vier Gruppen NaCl-arm Kontrolle, NaCl-arm CCPA, NaCl-reich Kontrolle und NaCl-reich CCPA (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, NaCl-arm KON n=10, CCPA n=12, NaCl-reich KON n=15, CCPA n=15)

4.2 Trinkmenge, Urinmenge und Elektrolytausscheidung während der Vorbehandlung

NaCl-arme Diät

Unter den kochsalzarm ernährten Tieren weist die CCPA- gegenüber der Kontrollgruppe sowohl an Tag 1 als auch an Tag 7 eine höhere Trinkmenge auf. Die Werte sind in Tabelle 3 dargestellt. Jedoch sind diese Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$). Ähnlich verhält sich auch die Urinausscheidung an Tag 1 und Tag 7. Die CCPA-Gruppe hat jeweils eine höhere Ausscheidung ohne Signifikanz ($p > 0,05$).

Die Na-Ausscheidung an Tag 1 ist in der CCPA-Gruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe, verfehlt aber einen statistischen Unterschied ($p > 0,05$). An Tag 7 ist praktisch kein Unterschied in der Natriumausscheidung festzustellen ($p > 0,05$). Die K-Ausscheidung ist an Tag 1 in der Kontrollgruppe höher als in der CCPA-Gruppe. An Tag 7 verhält sich dieser Effekt genau umgekehrt, mit CCPA vorbehandelte Tiere scheiden mehr Kalium aus. Beide Unterschiede weisen keine Signifikanz auf ($p > 0,05$).

Tabelle 3: Trinkmenge, Urinmenge, Na- und K-Ausscheidung unter NaCl-armer Ernährung an Tag 1 und 7 in der Kontroll-Gruppe und nach siebentägiger Behandlung mit CCPA

	KON (n=6)		CCPA (n=6)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Trinkmenge Tag 1 [ml]	30,9	2,0	36,8	2,1
Trinkmenge Tag 7 [ml]	31,9	2,1	38,0	2,9
Mittlere tägliche Trinkmenge [ml]	31,7	1,2	36,1	1,7
Urinmenge Tag 1 [ml]	18,5	1,8	30,6	3,5
Urinmenge Tag 7 [ml]	21,6	1,5	24,6	3,3
Natrium-Ausscheidung Tag 1 [mg]	0,16	0,06	0,40	0,15
Natrium-Ausscheidung Tag 7 [mg]	0,19	0,07	0,17	0,04
Kalium-Ausscheidung Tag 1 [mg]	130,1	18,4	124,4	6,5
Kalium-Ausscheidung Tag 7 [mg]	127,2	9,8	155,1	20,8

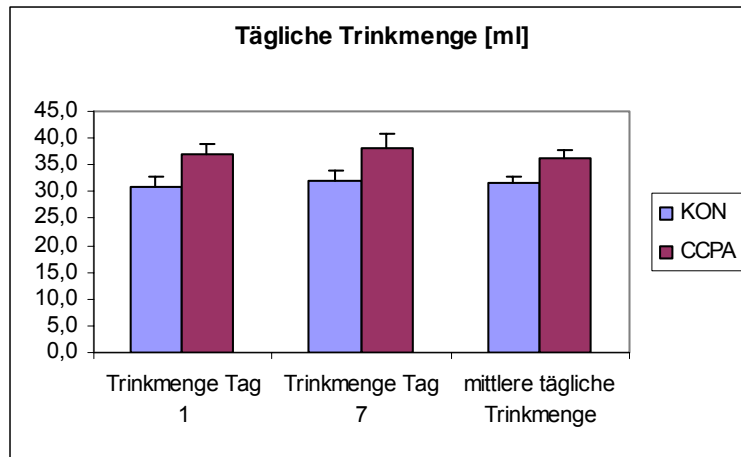


Abbildung 17: Durchschnittliche Trinkmenge in ml an Tag 1 und 7, mittlere tägliche Trinkmenge unter NaCl-armer Ernährung (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=6)

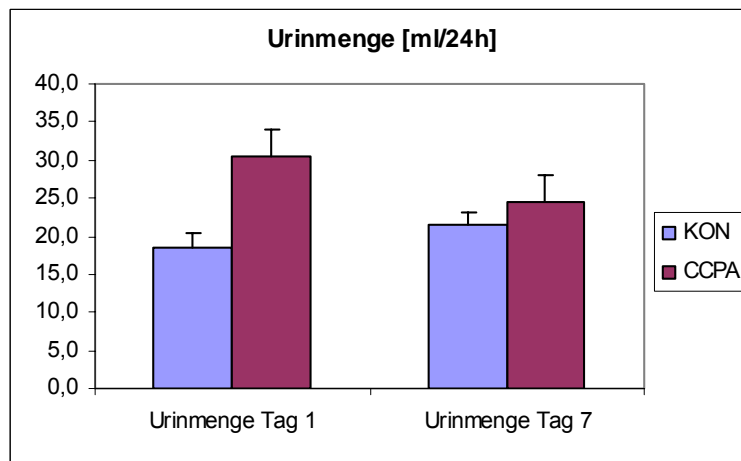


Abbildung 18: Durchschnittliche Urinmenge in ml an Tag 1 und 7 unter NaCl-armer Ernährung (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=6)

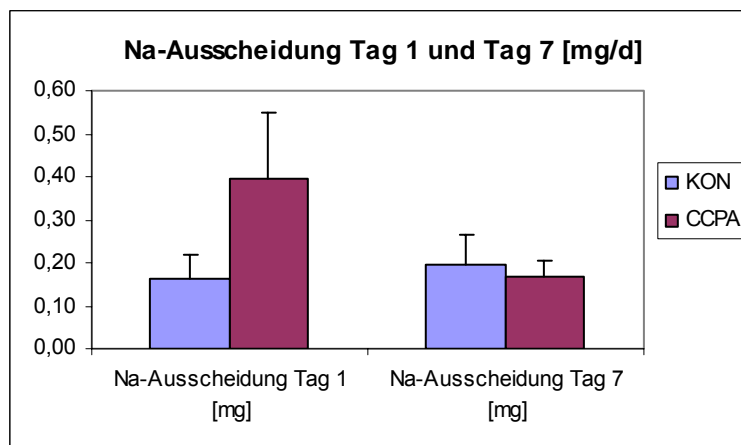


Abbildung 19: Durchschnittliche Na-Ausscheidung im Urin in mg/Tag unter NaCl-armer Ernährung an Tag 1 und Tag 7 (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=6)

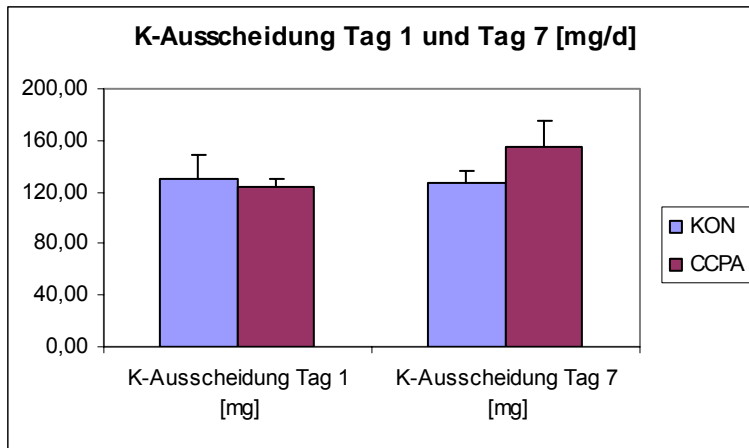


Abbildung 20: Durchschnittliche K-Ausscheidung im Urin in mg/Tag unter NaCl-armer Ernährung an Tag 1 und Tag 7 (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=6)

NaCl-reiche Diät

Bei kochsalzreicher Ernährung liegt die Trinkmenge an Tag 1 in der mit CCPA vorbehandelten Gruppe deutlich über der Kontrollgruppe. Der Unterschied ist nicht signifikant, hat jedoch eine statistische Tendenz ($p=0,09$). An Tag 7 ist dieser Trend nicht mehr zu beobachten. Auch bei der mittleren täglichen Trinkmenge zeigt sich kein Unterschied. Die Werte lassen sich Tabelle 4 entnehmen. Die Urinmenge ist in der CCPA-Gruppe sowohl an Tag 1 als auch an Tag 7 höher, weist jedoch keine Signifikanz auf ($p>0,05$).

Auch bei der Natrium- und Kaliumausscheidung ist an beiden Tagen kein Unterschied zwischen den beiden Gruppen festzustellen ($p>0,05$).

Tabelle 4: Trinkmenge, Urinmenge, Na- und K-Ausscheidung unter NaCl-reicher Ernährung an Tag 1 und 7 in der Kontroll-Gruppe und nach siebentägiger Behandlung mit CCPA

	KON (n=11)		CCPA (n=11)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Trinkmenge Tag 1 [ml]	96,2	7,3	107,8	4,9
Trinkmenge Tag 7 [ml]	102,2	7,3	101,3	5,7
Mittlere tägliche Trinkmenge [ml]	106,2	5,0	104,5	3,5
Urinmenge Tag 1 [ml]	72,1	7,0	81,0	7,4
Urinmenge Tag 7 [ml]	63,3	7,9	69,9	7,4
Natrium-Ausscheidung Tag 1 [mg]	621,8	63,8	698,8	87,9
Natrium-Ausscheidung Tag 7 [mg]	601,1	82,8	623,7	90,1
Kalium-Ausscheidung Tag 1 [mg]	152,0	17,0	166,8	27,7
Kalium-Ausscheidung Tag 7 [mg]	151,6	15,1	165,7	17,5

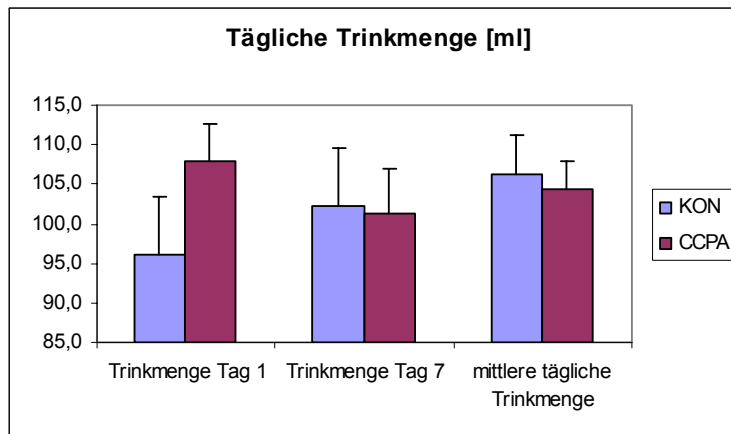


Abbildung 21: Trinkmenge in ml an Tag 1 und 7, mittlere tägliche Trinkmenge unter NaCl-reicher Ernährung (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=11)

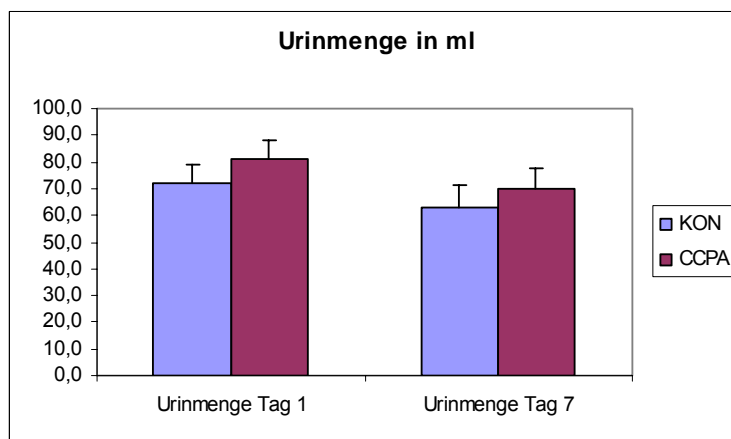


Abbildung 22: Urinmenge in ml an Tag 1 und 7 unter NaCl-reicher Ernährung (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=11)

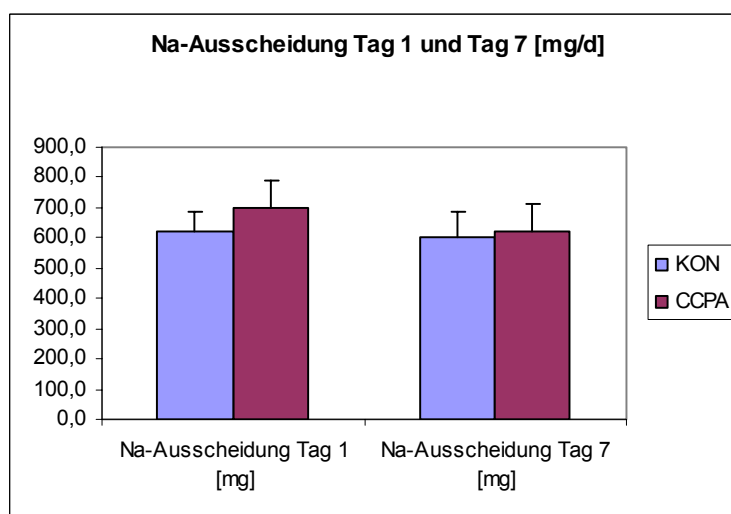


Abbildung 23: Na-Ausscheidung im Urin in mg/Tag unter NaCl-reicher Ernährung an Tag 1 und Tag 7 (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=11)

4.3 Glomeruläre Filtrationsrate

NaCl-arme Diät

Zwischen CCPA- und Kontrollgruppe ist kein Unterschied bei der GFR erkennbar. Nach CCPA-Vorbehandlung beträgt sie $1,12 \pm 0,04$ ml/min/100g, in der Kontrollgruppe liegt sie bei $1,09 \pm 0,06$ ml/min/100g. Es zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

Tabelle 5: GFR NaCl-arm ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in ml/min bezogen auf 100g Körpergewicht

	KON (n=5)		CCPA (n=6)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
GFR vor CCPA-Inf. [ml/min/100g]	1,09	0,06	1,12	0,04
GFR währ. CCPA-Inf. [ml/min/100g]	0,76	0,12	0,58	0,07
GFR nach CCPA-Inf. [ml/min/100g]	0,68	0,07	1,03	0,09

Die CCPA-Infusion bewirkt in beiden Gruppen eine signifikante Abnahme der GFR (CCPA: $p=0,0005$, KON: $p=0,015$). Der Abfall der GFR ist in der CCPA-Gruppe deutlicher ausgeprägt, hier beträgt er 48%, in der Kontrollgruppe 30%. Nach Absetzen der CCPA-Infusion kommt es in der vorbehandelten Gruppe zu einer raschen Erholung der GFR auf 92% des Ausgangswertes. In der Kontrollgruppe sinkt die GFR noch leicht ab und erreicht 62% des Ausgangswertes.

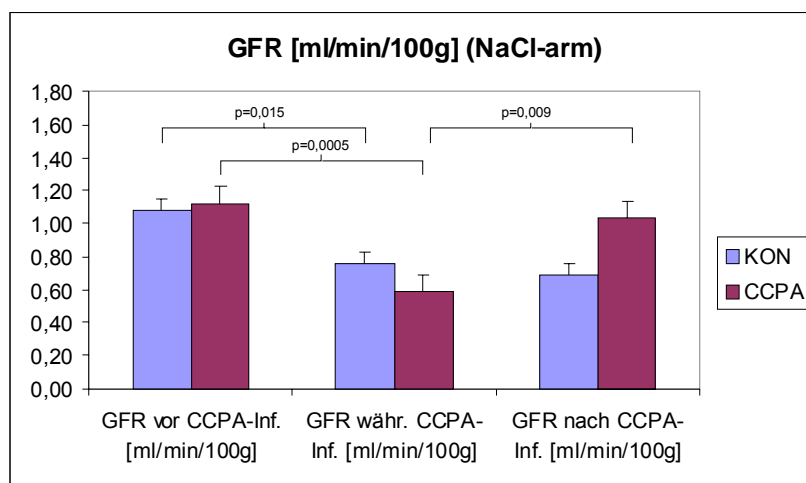


Abbildung 24: GFR NaCl-arm ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in ml/min bezogen auf 100g Körpergewicht (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=6; KON: Kontrollgruppe, n=5)

NaCl-reiche Diät

Auch bei den NaCl-reich ernährten Tieren unterscheidet sich die beiden Gruppen in der GFR der Vorperiode nicht signifikant ($p > 0,05$). In der mit CCPA vorbehandelten Gruppe beträgt die GFR $1,31 \pm 0,15$ ml/min/100g, in der Kontrollgruppe beträgt sie $1,25 \pm 0,11$ ml/min/100g.

Tabelle 6: GFR NaCl-reich ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in ml/min bezogen auf 100g Körpergewicht

	KON (n=6)		CCPA (n=5)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
GFR/100g vor CCPA-Inf. [ml/min, 100g]	1,25	0,15	1,31	0,11
GFR/100g währ. CCPA-Inf. [ml/min, 100g]	0,99	0,23	1,00	0,15
GFR/100g nach CCPA-Inf. [ml/min, 100g]	1,28	0,11	1,23	0,13

In der Kontrollgruppe bewirkt die CCPA-Infusion einen Abfall der GFR um 21% des Ausgangswertes. Dieser Effekt ist nicht signifikant ($p > 0,05$). Nach Vorbehandlung mit CCPA beträgt die Senkung 24%. Hierbei handelt es sich um eine signifikante Abnahme ($p = 0,007$).

Nach Absetzen der CCPA-Infusion kommt es zu einer Erholung der GFR, die in der Kontrollgruppe etwas stärker ausgeprägt ist als in der CCPA-Gruppe.

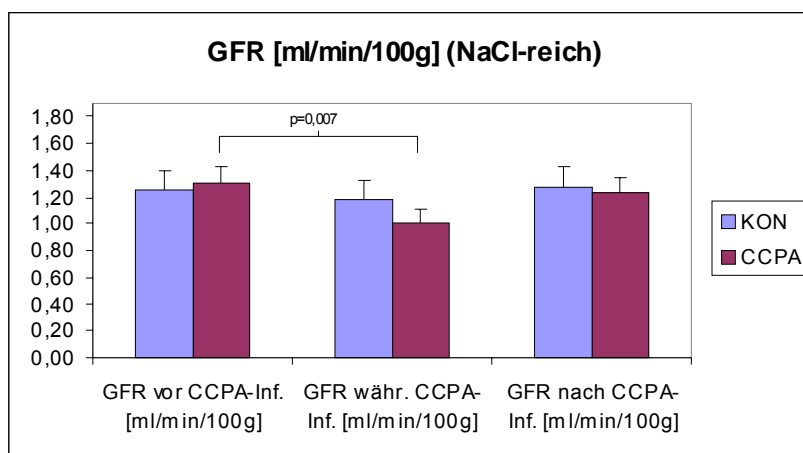


Abbildung 25: GFR NaCl-reich ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in ml/min bezogen auf 100g Körpergewicht (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=5; KON: Kontrollgruppe, n=6)

4.4 Urinzeitvolumen

NaCl-arme Diät

Mit CCPA vorbehandelte Tiere haben in allen 3 Versuchsperioden höhere Urinzeitvolumina (UZV). Trotz großer Unterschiede in der Vorperiode von $74,9 \pm 10,9 \mu\text{l}/\text{min}$ in der CCPA-Gruppe und $48,3 \pm 16,7 \mu\text{l}/\text{min}$ in der Kontrollgruppe lassen sich keine Signifikanzen nachweisen. In der Nachperiode ist die Abweichung signifikant ($p=0,05$).

Tabelle 7: Urinzeitvolumina vor, während und nach CCPA-Infusion bei NaCl-armer Ernährung

	KON (n=4)		CCPA (n=6)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Urinvolumen vor CCPA-Inf.[$\mu\text{l}/\text{min}$]	48,3	16,7	74,9	10,9
Urinvolumen währ. CCPA-Inf.[$\mu\text{l}/\text{min}$]	26,1	13,5	39,0	18,3
Urinvolumen nach CCPA-Inf.[$\mu\text{l}/\text{min}$]	37,8	16,9	114,3	15,1

Die CCPA-Infusion in der Hauptperiode bewirkt einen Abfall des UZV. In der CCPA-Gruppe beträgt die Abnahme durchschnittlich 48%, in der Kontrollgruppe 46%. Die Reduktion erweist sich nur in der CCPA-Gruppe als signifikant ($p=0,005$).

Nach Absetzen der CCPA-Infusion steigt das UZV wieder an. Die Zunahme fällt in der mit CCPA vorbehandelten Gruppe deutlicher aus. Mit $114,3 \pm 15,1 \mu\text{l}/\text{min}$ wird der Ausgangswert von $74,9 \pm 10,9 \mu\text{l}/\text{min}$ deutlich übertroffen. In der Kontrollgruppe liegt das UZV mit $37,8 \pm 16,9 \mu\text{l}/\text{min}$ unter dem Wert der Vorperiode ($48,3 \pm 16,7 \mu\text{l}/\text{min}$). Die Zunahme des UZV erweist sich in beiden Gruppen als signifikant (CCPA: $p=0,02$, KON $p=0,004$).

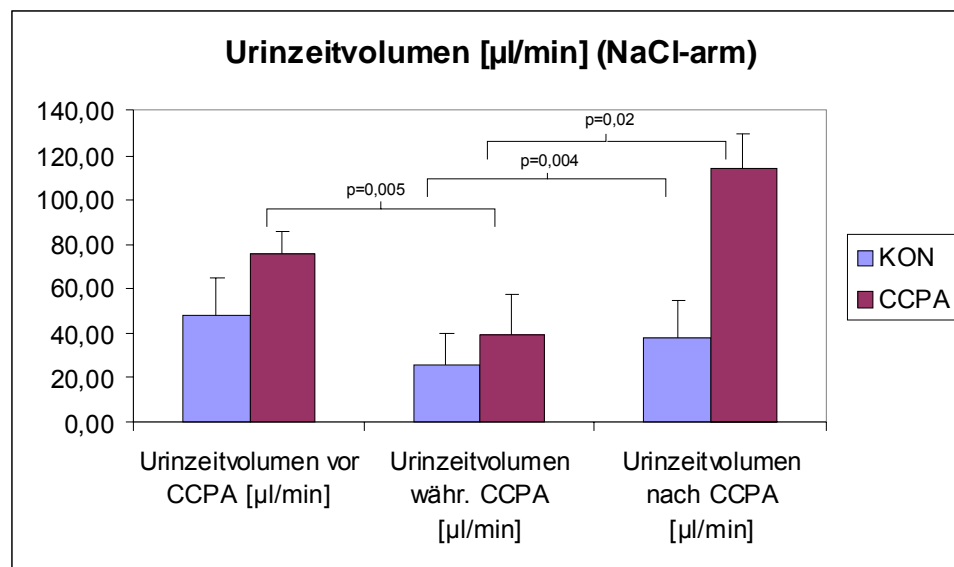


Abbildung 26: Urinzeitvolumen NaCl-arm ernährter Tiere in µl/min (aufgetragen sind Mittelwert ± SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=6; KON: Kontrollgruppe, n=4)

NaCl-reich

Beim Urinzeitvolumen kochsalzreich ernährter Tiere sind in allen 3 Versuchsperioden zwischen den beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Tabelle 8: Urinzeitvolumina vor, während und nach CCPA-Infusion bei NaCl-reicher Ernährung

	KON (n=5)		CCPA (n=4)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Urinvolumen vor CCPA-Inf.[µl/min]	97,9	17,2	112,6	17,4
Urinvolumen währ. CCPA-Inf.[µl/min]	90,8	19,9	94,8	14,2
Urinvolumen nach CCPA-Inf.[µl/min]	96,9	5,46	122,1	17,0

Die CCPA-Infusion bewirkt eine durchschnittliche Abnahme des UZV von 16% in der CCPA-Gruppe und von 7% in der Kontrollgruppe.

Nach Absetzen kommt es zu einem Anstieg des UZV. In der CCPA-Gruppe übertrifft das UZV den Ausgangswert, in der Kontrollgruppe wird der initiale Wert annähernd erreicht.

Alle Veränderungen des UZV durch die CCPA-Infusion weisen keine Signifikanz auf ($p > 0,05$).

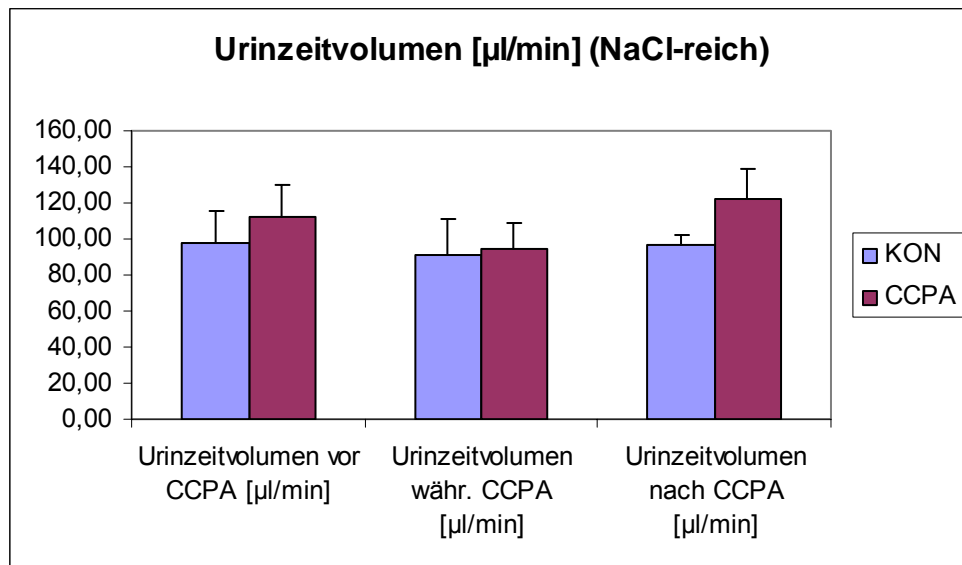


Abbildung 27: Urinzeitvolumen NaCl-reich ernährter Tiere in µl/min (aufgetragen sind Mittelwert ± SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=4; KON: Kontrollgruppe, n=5)

4.5 Elektrolytausscheidung

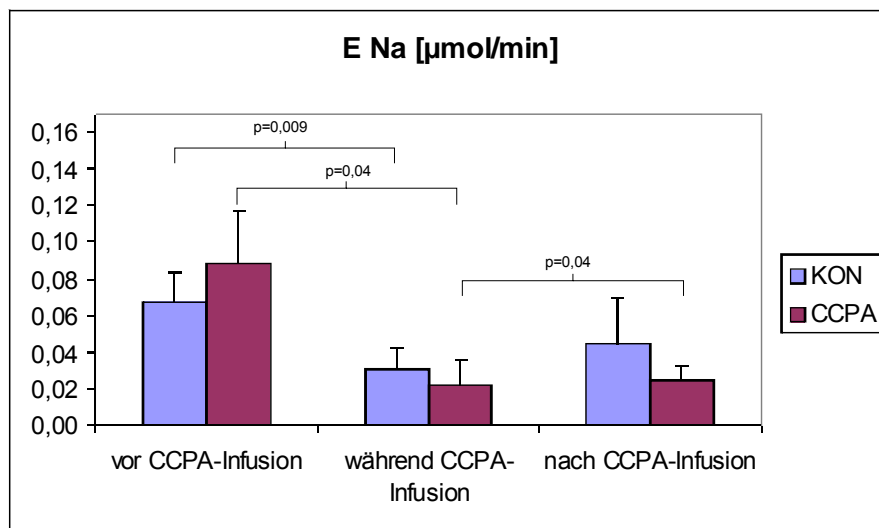
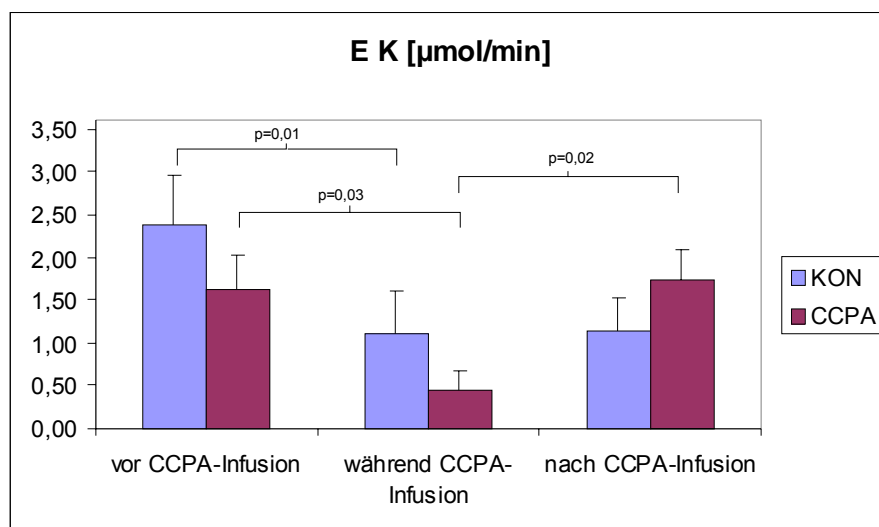
NaCl-arme Diät

Die absolute Natriumausscheidung unterscheidet sich zwischen CCPA- und Kontrollgruppe nicht signifikant. Durch die CCPA-Infusion kommt es zur Abnahme der Na-Ausscheidung, die in beiden Gruppen Signifikanz aufweist (CCPA: $p=0,04$, KON: $p=0,009$).

Auch bei der absoluten Kaliumausscheidung zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen CCPA- und Kontrollgruppe. Die CCPA-Infusion bewirkt ebenfalls in beiden Gruppen eine signifikante Abnahme der K-Ausscheidung (CCPA: $p=0,03$, KON: $p=0,01$). Nach Absetzen verändert sich die K-Ausscheidung in der Kontrollgruppe in Bezug zur Hauptperiode nicht, während in der CCPA-Gruppe es zu einem signifikanten Anstieg kommt ($p=0,02$).

Tabelle 9: Absolute Natrium- und Kaliumausscheidung bei NaCl-arm ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion

	KON (n=4)		CCPA (n=5)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
E Na vor CCPA-Inf [µmol/min]	0,07	0,02	0,09	0,03
E Na währ CCPA-Inf [µmol/min]	0,03	0,01	0,02	0,01
E Na nach CCPA-Inf [µmol/min]	0,04	0,02	0,02	0,02
E K vor CCPA-Inf [µmol/min]	2,36	0,61	1,63	0,41
E K währ CCPA-Inf [µmol/min]	1,11	0,51	0,44	0,23
E K nach CCPA-Inf [µmol/min]	1,15	0,38	1,73	0,37

**Abbildung 28:** Absolute Natriumausscheidung bei NaCl-arm ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=5; KON: Kontrollgruppe, n=4)**Abbildung 29:** Absolute Kaliumausscheidung bei NaCl-arm ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=5; KON: Kontrollgruppe, n=4)

Die filtrierte Natriummenge unterscheidet sich in Vor- und Hauptperiode nicht. In der Nachperiode ist die filtrierte Menge bei mit CCPA vorbehandelten Tieren signifikant höher als in der Kontrollgruppe ($p=0,04$).

Die Abnahme der filtrierten Natriummenge durch die CCPA-Infusion weist in beiden Gruppen Signifikanz auf (CCPA: $p=0,0002$, KON: $0,03$). Nach Absetzen der CCPA-Infusion steigt in der CCPA-Gruppe die filtrierte Na-Menge wieder an ($p=0,001$).

Auch bei der fraktionellen Natriumausscheidung ist zwischen den beiden Gruppen kein signifikanter Unterschied festzustellen. Zwar unterscheiden sich die Mittelwerte für CCPA- und Kontrollgruppe in der Vorperiode deutlich, jedoch weisen beide Gruppen große interindividuelle Schwankungen auf.

Tabelle 10: Filtriertes Natrium ($F(Na)$) und fraktionielle Natriumausscheidung bei NaCl-arm ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion

	KON (n=5)		CCPA (n=6)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
F(Na) vor CCPA-Inf [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	484	52,3	475	27,5
F(Na) während CCPA-Inf [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	342	62,8	246	51,4
F(Na) nach CCPA-Inf. [$\mu\text{mol}/\text{min}$]	307	39,8	458	52,8
$F E_{Na}$ (%) vor CCPA-Infusion	0,035	0,013	0,015	0,007
$F E_{Na}$ (%) während CCPA-Infusion	0,012	0,010	0,008	0,004
$F E_{Na}$ (%) nach CCPA-Infusion	0,020	0,014	0,005	0,002

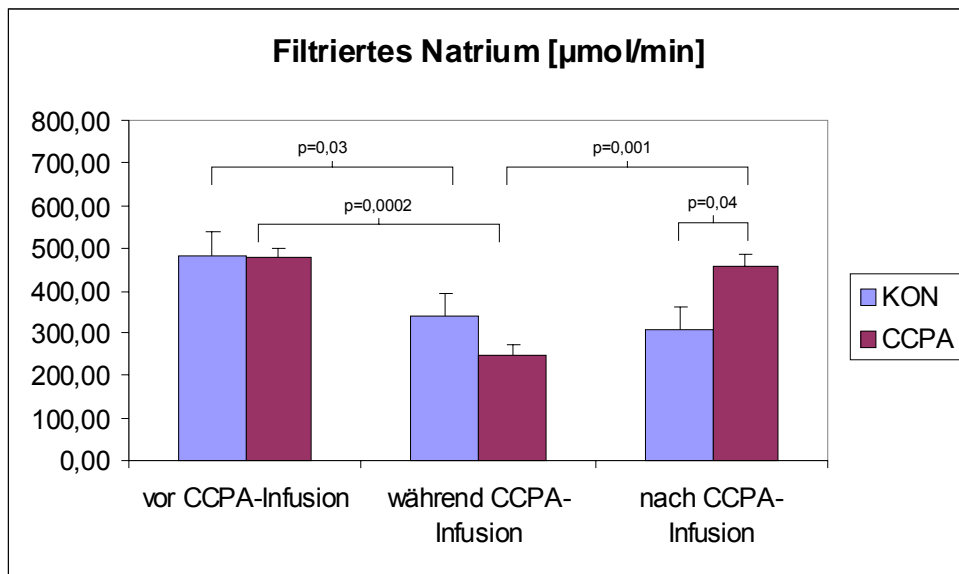


Abbildung 30: Filtriertes Natrium in $\mu\text{mol}/\text{min}$ bei NaCl-arm ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=6; KON: Kontrollgruppe, n=5)

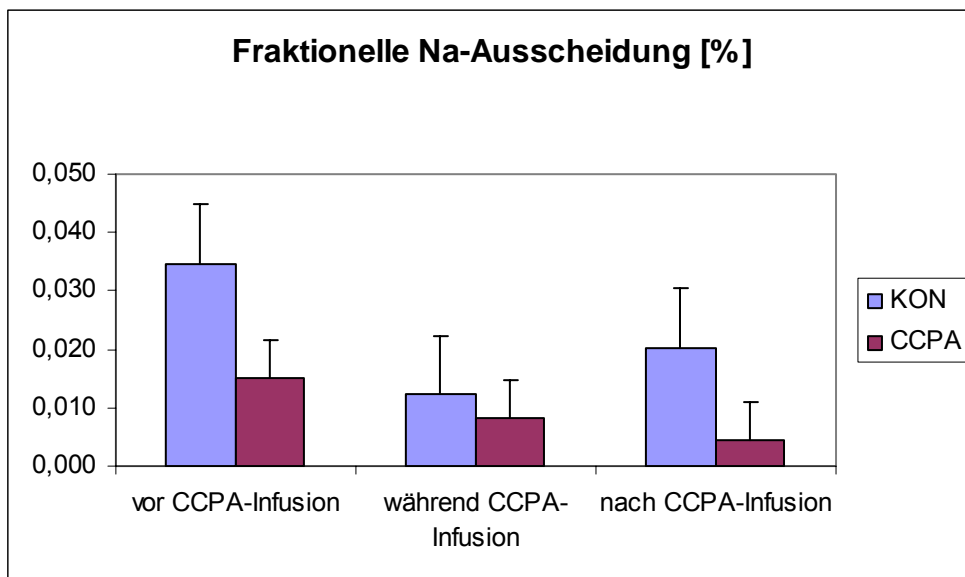


Abbildung 31: Fraktionelle Na-Ausscheidung in % bei NaCl-arm ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=6; KON: Kontrollgruppe, n=5)

NaCl-reiche Diät

Sowohl absolute Natrium- als auch Kaliumausscheidung unterscheiden sich in allen drei Versuchsperioden in der CCPA-Gruppe nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Die CCPA-Infusion bewirkt in beiden Gruppen keine signifikante Veränderung der Na- und K-Ausscheidung.

Tabelle 11: Absolute Natrium- und Kaliumausscheidung bei NaCl-reich ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion

	KON (n=5)		CCPA (n=4)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
E Na vor CCPA-Inf [μmol/min]	11,67	1,54	7,39	1,97
E Na währ CCPA-Inf [μmol/min]	10,46	3,53	9,09	3,32
E Na nach CCPA-Inf [μmol/min]	16,37	4,45	9,48	2,77

E K vor CCPA-Inf [μmol/min]	56,27	8,94	61,10	11,79
E K währ CCPA-Inf [μmol/min]	62,64	9,56	56,79	11,67
E K nach CCPA-Inf [μmol/min]	80,09	16,12	62,73	11,08

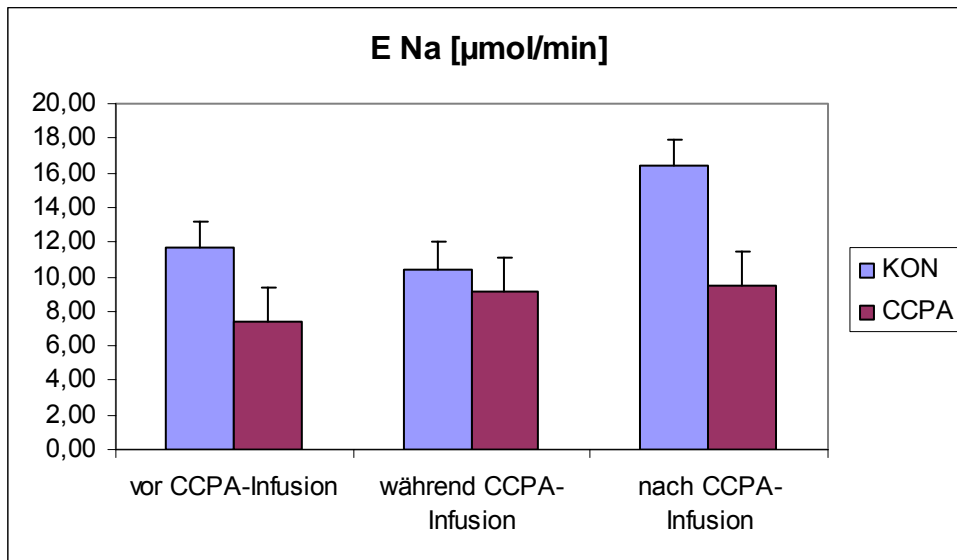


Abbildung 32: Absolute Natriumausscheidung bei NaCl-reich ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert ± SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=4; KON: Kontrollgruppe, n=5)

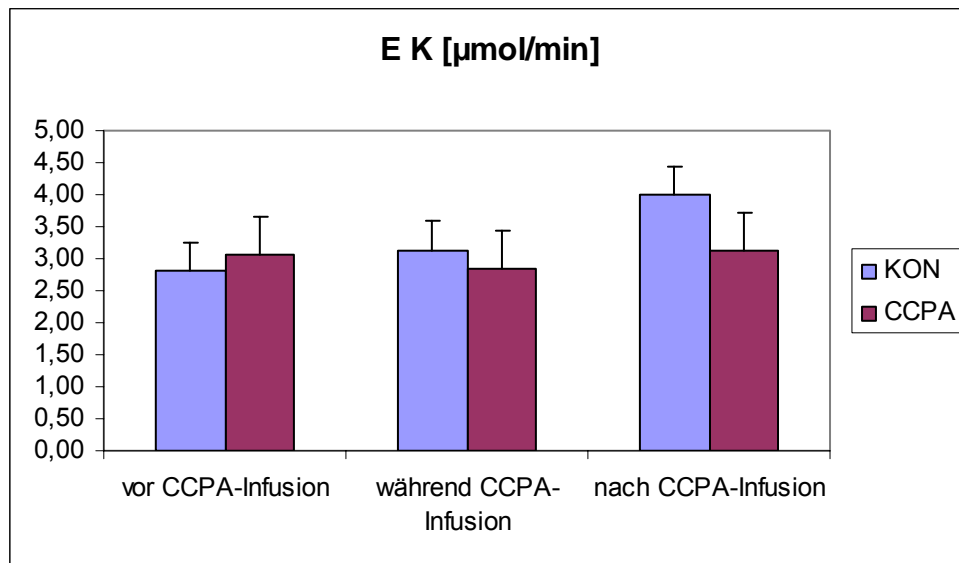


Abbildung 33: Absolute Kaliumausscheidung bei NaCl-reich ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=4; KON: Kontrollgruppe, n=5)

Durch die Vorbehandlung mit CCPA ändert sich die filtrierte Natriummenge in den drei Versuchsperioden nicht. Vorbehandelte Tiere und Kontrolltiere weisen keine signifikanten Unterschiede bei filtrierter Natriummenge auf.

Durch die CCPA-Infusion kommt es in beiden Gruppen zu einer Abnahme der filtrierten Natriummenge, eine Signifikanz kann nur für die CCPA-Gruppe nachgewiesen werden ($p=0,05$).

Bei der fraktionellen Natriumausscheidung ist zwischen den beiden Gruppen ein signifikanter Unterschied in der Vorperiode festzustellen. Die Kontrollgruppe weist im Durchschnitt gegenüber der CCPA-Gruppe eine deutlich niedrigere fraktionelle Na-Ausscheidung auf ($p=0,04$). Dieser Unterschied ist in den Haupt- und Nachperioden zwar noch vorhanden, aber weniger stark und nicht signifikant ausgeprägt.

4 Ergebnisse

Tabelle 12: Filtriertes Natrium (F(Na)), fraktionelle Natriumausscheidung bei NaCl-reich ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion

	KON (n=5)		CCPA (n=4)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
F(Na) vor CCPA-Inf [µmol/min]	586	57,3	637	21,1
F(Na) während CCPA-Inf [µmol/min]	565	41,1	502	51,3
F(Na) nach CCPA-Infusion [µmol/min]	595	27,2	596	28,0

F E _{Na} (%) vor CCPA-Infusion	2,08	0,34	1,14	0,28
F E _{Na} (%) während CCPA-Infusion	2,03	0,55	1,69	0,52
F E _{Na} (%) nach CCPA-Infusion	2,01	0,18	1,57	0,44

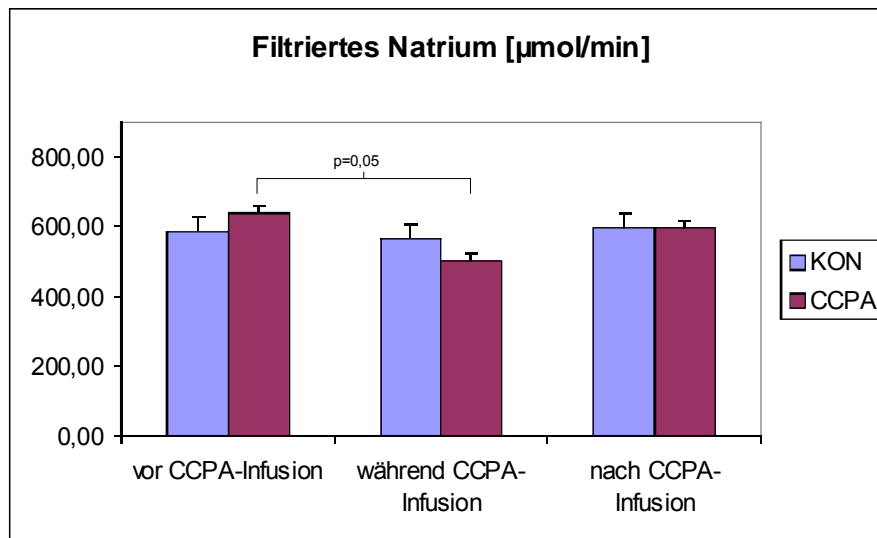


Abbildung 34: Filtriertes Natrium in µmol/min bei NaCl-reich ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert ± SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=4; KON: Kontrollgruppe, n=5)

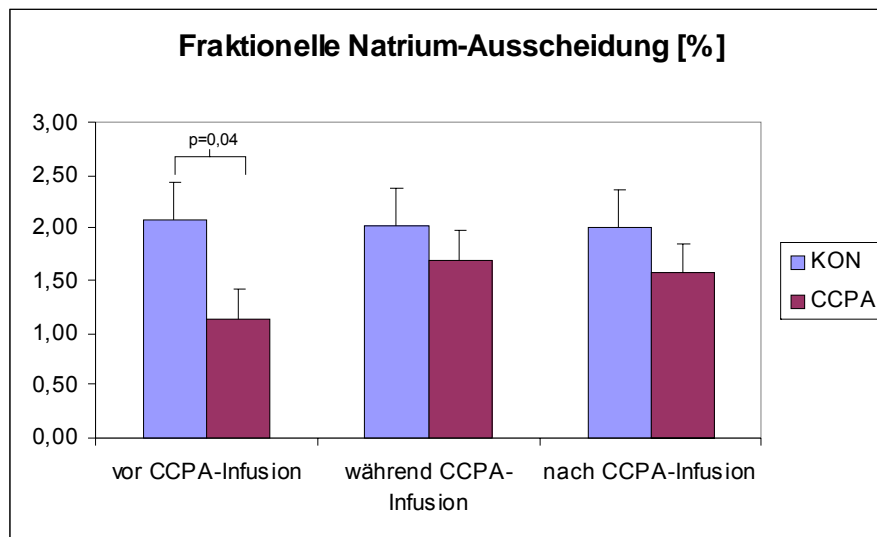


Abbildung 35: Fraktionelle Na-Ausscheidung in % bei NaCl-reich ernährten Tieren vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert ± SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=4; KON: Kontrollgruppe, n=5)

4.6 Elektrolytspiegel im Plasma

NaCl-arme Diät

In allen drei Versuchsperioden weisen Tiere der CCPA-Gruppe höhere Natriumspiegel im Plasma als die Kontrollgruppe auf. Diese Unterschiede sind aber nicht signifikant ($p > 0,05$).

Tabelle 13: Elektrolyte im Plasma NaCl-arm ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in mmol/l

	KON (n=6)		CCPA (n=8)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Na Plasma vor CCPA-Inf [mmol/l]	136,5	2,0	138,9	1,0
Na Plasma währ. CCPA-Inf [mmol/l]	133,6	1,8	136,0	1,3
Na Plasma nach CCPA-Inf. [mmol/l]	132,8	2,8	137,8	1,6
K Plasma vor CCPA-Inf [mmol/l]	5,6	0,5	5,0	0,3
K Plasma währ. CCPA-Inf [mmol/l]	5,5	0,5	4,9	0,2
K Plasma nach CCPA-Inf. [mmol/l]	5,4	0,5	5,0	0,3

In beiden Gruppen wird der Natriumspiegel durch die CCPA-Infusion signifikant gesenkt (CCPA: $p=0,004$, KON $p=0,006$). In der Nachperiode erholt sich der Na-Wert in der CCPA-Gruppe gegenüber der Hauptperiode, er steigt signifikant an ($p=0,02$). In der Kontrollgruppe sinkt der Na-Spiegel ab.

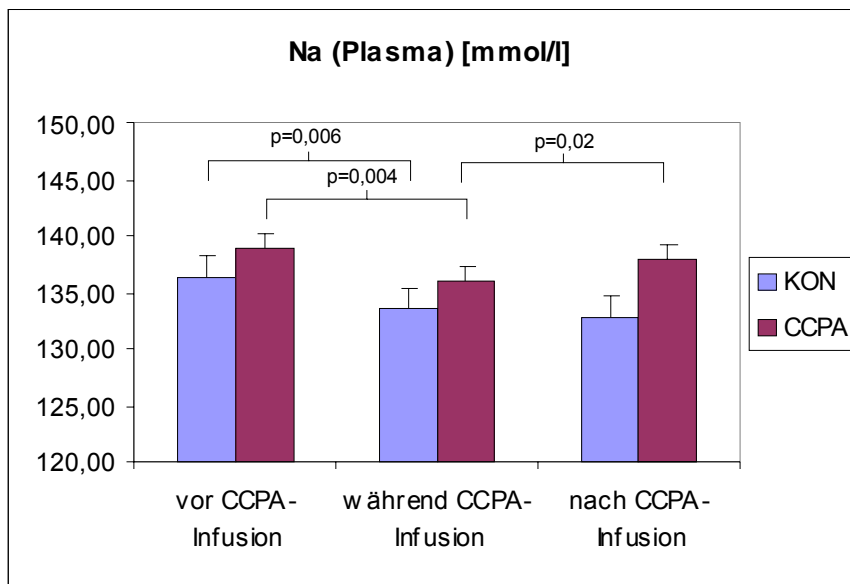


Abbildung 36: Natrium-Spiegel im Plasma NaCl-arm ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in mmol/l (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=8; KON: Kontrollgruppe, n=6)

Die NaCl-arme Ernährung bewirkt die Entwicklung einer Hyperkaliämie. Dieser Effekt ist in der Kontrollgruppe stärker ausgeprägt als in der CCPA-Gruppe. Der Kaliumspiegel liegt in allen Beobachtungszeiträumen in der Kontrollgruppe jeweils über dem der CCPA-Gruppe. Diese Abweichungen sind jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$).

Eine Beeinflussung des Kaliumspiegels durch die CCPA-Infusion konnte nicht beobachtet werden.

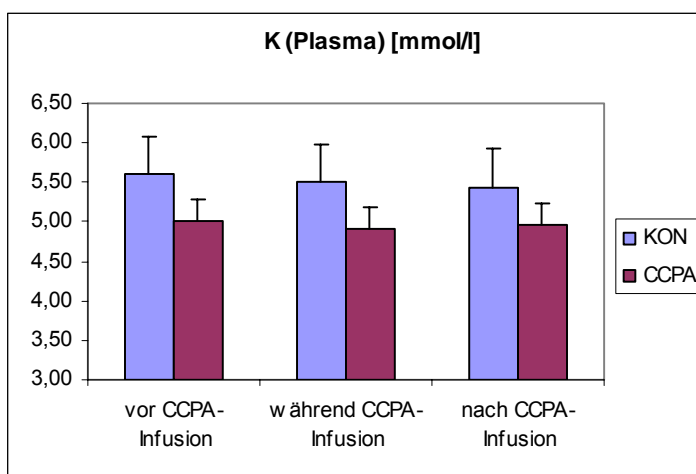


Abbildung 37: Kalium-Spiegel im Plasma NaCl-arm ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in mmol/l (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe)

NaCl-reiche Diät

In der Vorperiode liegt der Natrium-Spiegel im Plasma in der CCPA-Gruppe über dem der Kontrolle. Dieser Unterschied weist eine statistische Tendenz auf ($p=0,065$). In den beiden anderen Perioden unterscheiden sich die Natrium-Spiegel nur unwesentlich.

Tabelle 14: Elektrolyte im Plasma NaCl-reich ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in mmol/l

	KON (n=6)		CCPA (n=4)	
	Mittelwert	SEM	Mittelwert	SEM
Na Plasma vor CCPA-Inf [mmol/l]	147,4	0,3	149,7	1,0
Na Plasma währ. CCPA-Inf [mmol/l]	150,1	1,9	149,8	1,5
Na Plasma nach CCPA-Inf. [mmol/l]	147,1	0,9	147,5	1,5
K Plasma vor CCPA-Inf [mmol/l]	4,6	0,1	4,4	0,3
K Plasma währ. CCPA-Inf [mmol/l]	4,5	0,2	4,1	0,1
K Plasma nach CCPA-Inf. [mmol/l]	4,4	0,2	4,1	0,1

In beiden Gruppen bewirkt die CCPA-Infusion nach NaCl-reicher Ernährung keine wesentliche Veränderung des Na-Spiegels. In der Kontrollgruppe kommt es zu einer nicht signifikanten Erhöhung des Natriums ($p>0,05$), in der CCPA-Gruppe bleibt der Natrium-Wert gleich. Nach Absetzen der CCPA-Infusion kommt es in beiden Gruppen zu einem leichten Abfall des Na-Spiegels.

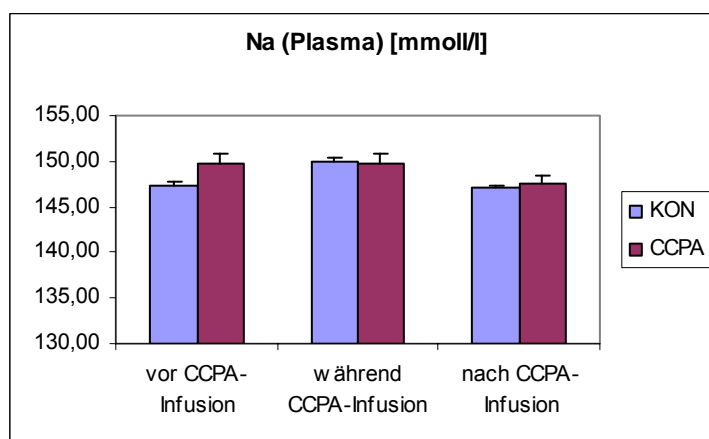


Abbildung 38: Natrium-Spiegel im Plasma NaCl-reich ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in mmol/l (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe)

Mit CCPA-vorbehandelte Tiere wiesen in allen Perioden niedrigere Kalium-Spiegel als die Kontrollgruppe auf. Die CCPA-Infusion bewirkt einen Abfall der K-Konzentration im Blut. In der Kontrollgruppe sinkt der Wert nur leicht. Alle Veränderungen sind nicht signifikant ($p > 0,05$).

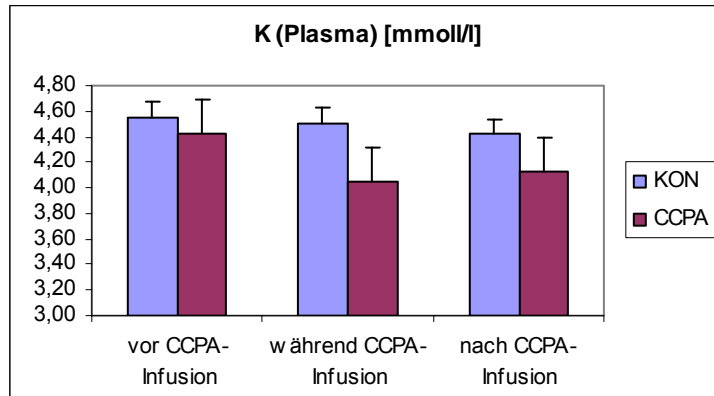


Abbildung 39: Kalium-Spiegel im Plasma NaCl-reich ernährter Tiere vor, während und nach CCPA-Infusion in mmol/l (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe)

4.7 Herzfrequenz

NaCl-arme Diät

Tiere mit CCPA-Vorbehandlung haben in allen drei Messzeiträumen keine signifikant unterschiedliche Herzfrequenz als Tiere der Kontrollgruppe (CCPA: $n=8$, KON $n=5$).

Die CCPA-Infusion bewirkt in beiden Gruppen eine deutliche Abnahme der Herzfrequenz. Bei CCPA-Vorbehandlung bewirkt die Applikation von CCPA eine Senkung um durchschnittlich 27% (von 449 auf 328 1/min), in der Kontrollgruppe fällt die Herzfrequenz um 29% (423 auf 301 1/min). Beide Abnahmen sind signifikant (CCPA: $p < 0,0001$, KON: $p = 0,0027$).

In der CCPA-Gruppe erholt sich die Frequenz signifikant von 328 auf 393 /min ($p = 0,0004$). In der Kontrollgruppe kommt es zu einer signifikanten Erholung von 301 auf 344 Schlägen ($p = 0,01$). Die Frequenz liegt in der Nachperiode noch signifikant unter dem Ausgangswert (CCPA: $p = 0,007$, KON: $p = 0,02$). In der

CCPA-Gruppe liegt sie im Durchschnitt 12%, in der Kontrollgruppe 19% unter dem Ausgangswert.

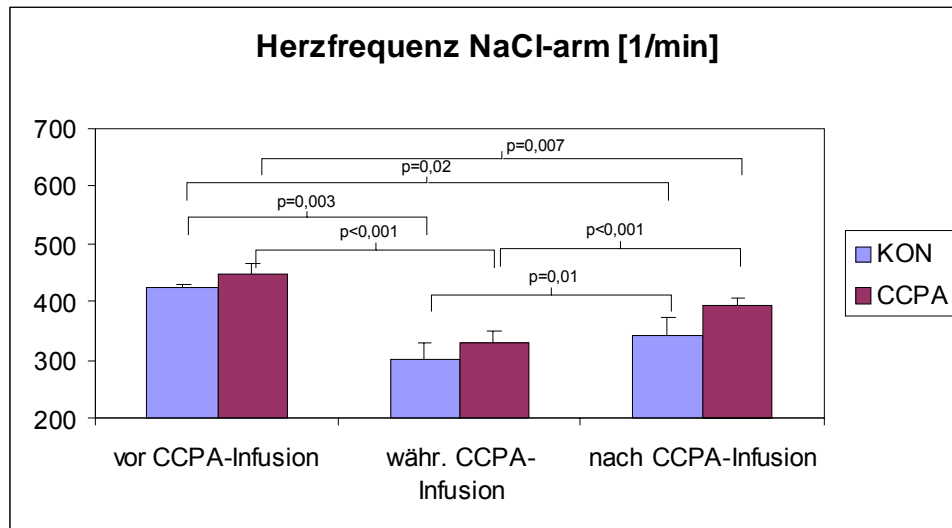


Abbildung 40: Herzfrequenz in 1/min bei NaCl-armer Ernährung vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe)

NaCl-reiche Diät

Bezüglich Herzfrequenz zeigt sich hier in der Vorperiode kein signifikanter Unterschied zwischen CCPA- und Kontroll-Gruppe (CCPA: 421 ± 14 1/min, KON: 423 ± 9 1/min, $p > 0,05$, CCPA: $n=8$, KON $n=5$)

In beiden Gruppen wird die Herzfrequenz durch die CCPA-Infusion deutlich gesenkt. Die mit CCPA vorbehandelten Tiere reagieren mit einer stärker ausgeprägten Senkung der Frequenz. Hier beträgt die Abnahme durchschnittlich 20%, in der Kontrollgruppe liegt sie bei 12%. Diese Unterschiede sind signifikant (CCPA: $p=0,01$, KON: $p=0,002$).

Nach Absetzen der Infusion kommt es zur Erholung der Herzfrequenz. In der Kontrollgruppe wird der Ausgangswert wieder erreicht, in der CCPA-Gruppe liegt die Frequenz noch 5% unter dem Ausgangswert.

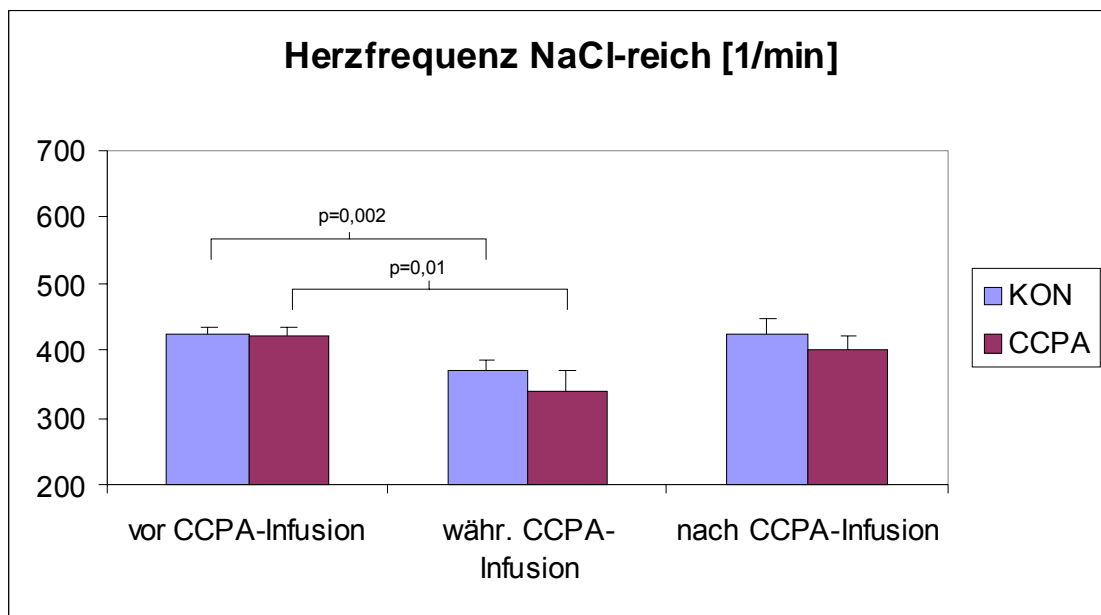


Abbildung 41: Herzfrequenz in 1/min bei NaCl-reicher Ernährung vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=8; KON: Kontrollgruppe, n=5)

4.8 Mittlerer arterieller Blutdruck

NaCl-arme Diät

Tiere der CCPA-Gruppe haben in der Vorperiode einen höheren mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) als die der Kontrollgruppe (CCPA: $127,6 \pm 5,6$ mm Hg, KON $118,8 \pm 7,2$ mm Hg, KON n=5, CCPA n=6). Auch in den beiden anderen Perioden ist der MAP nach CCPA-Vorbehandlung höher. Die Unterschiede sind jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$)

Die Infusion von CCPA bewirkt in beiden Gruppen eine signifikante Senkung des MAP. In der Kontrollgruppe beträgt der Unterschied durchschnittlich 31,5 mmHg bzw. 27%, in der CCPA-Gruppe durchschnittlich 33,1 mmHg bzw. 26% (KON $p=0,01$, CCPA $p=0,02$).

Die Erholung des MAP fällt in der mit CCPA vorbehandelten Gruppe deutlicher aus als in der Kontrollgruppe. In der Kontrollgruppe steigt der MAP um durchschnittlich 7,2 mmHg (von $87,3 \pm 7,5$ auf $94,5 \pm 8,8$ mmHg). In der CCPA-Gruppe steigt er um 16,9 mmHg (von $94,5 \pm 10,1$ auf $111,4 \pm 7,0$ mmHg).

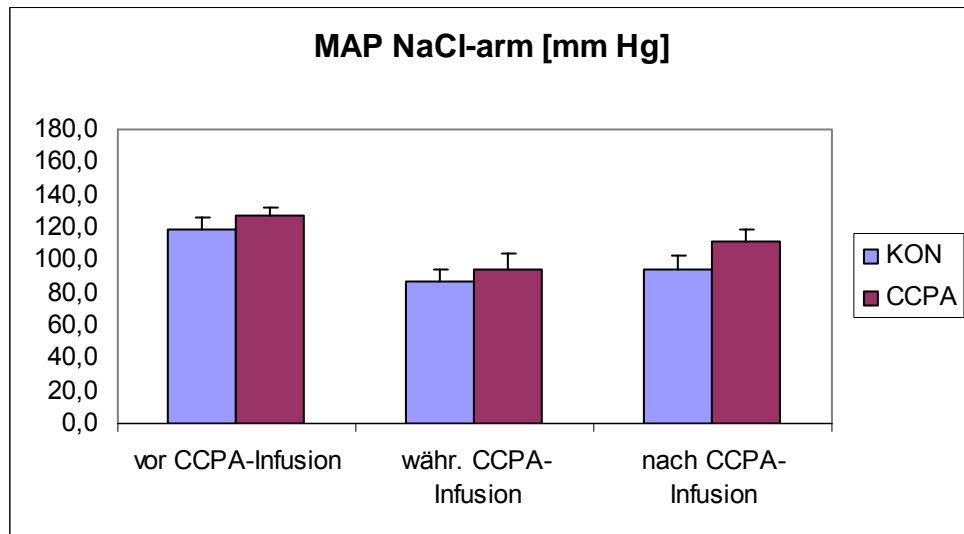


Abbildung 42: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) in mm Hg vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=6; KON: Kontrollgruppe, n=5)

NaCl-reiche Diät

Mit CCPA vorbehandelte Tiere haben in der Vorperiode mit durchschnittlich $118,9 \pm 1,9$ mm Hg einen signifikant niedrigeren Blutdruck als die Tiere der Kontrollgruppe von $128,2 \pm 2$ mm Hg ($p=0,075$, KON n=5, CCPA n=5). Dieser Unterschied beträgt 7%.

Die Infusion von CCPA während der Hauptperioden senkt den Blutdruck in beiden Gruppen. In der CCPA-Gruppe verringert die CCPA-Infusion den MAP um 20,6 mm Hg, was einer relativen Abnahme von 17 % entspricht. In der Kontrollgruppe beträgt die die Abnahme 13,3 mm Hg bzw. 10%. Diese Senkung ist in der CCPA-Gruppe signifikant ($p=0,03$), in der Kontrollgruppe annähernd signifikant ($p=0,06$).

Auch während der CCPA-Infusion unterscheidet sich der MAP signifikant (CCPA: $98,3 \pm 7,2$ mm Hg, KON $114,9 \pm 8,0$ mmg Hg ($p=0,02$)).

Nach CCPA-Infusion erholt sich der MAP nur in der CCPA-Gruppe von $98,3 \pm 7,2$ mm Hg auf $114,3 \pm 3,8$ mm Hg. In der Kontrollgruppe bleibt er nach Absetzen der CCPA-Infusion unverändert (Hauptperiode $114,9 \pm 8,0$ mm Hg, Nachperiode $112,3 \pm 10,4$ mm Hg).

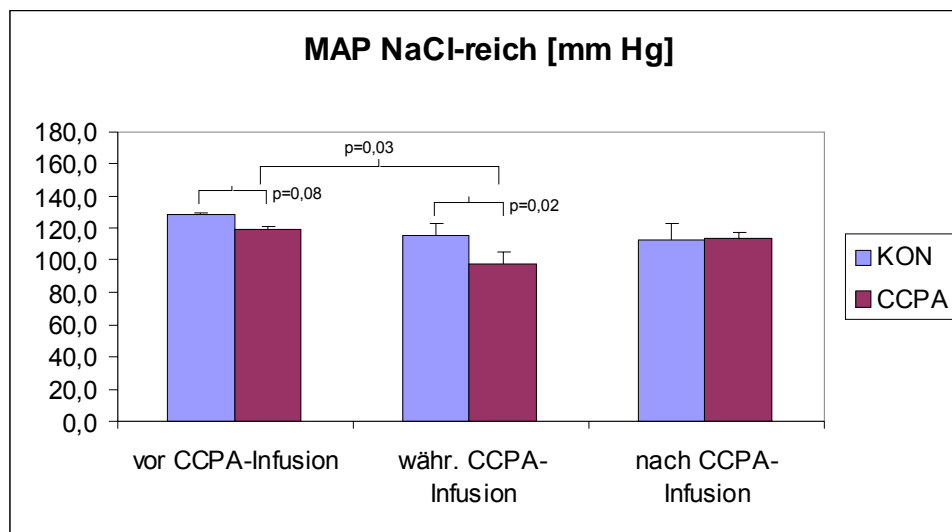


Abbildung 43: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP) in mm Hg vor, während und nach CCPA-Infusion (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=5; KON: Kontrollgruppe, n=5)

4.9 Renaler Blutfluss

Bei den kochsalzarm ernährten Tieren beträgt der renale Blutfluss in der Kontrollgruppe initial im Durchschnitt $5,28 \pm 0,64$ ml/ min, in der CCPA-Gruppe $6,01 \pm 0,79$ ml/ min (CCPA n=4, KON n=4).

Der initiale renale Blutfluss beträgt bei den kochsalzreich ernährten Tieren $5,40 \pm 1,39$ ml/min in der Kontrollgruppe, nach CCPA-Vorbehandlung $5,88 \pm 0,36$ ml/min (CCPA n=6, KON n=4)..

Sowohl unter NaCl-artermer als auch NaCl-reicher Vorbehandlung sind keine signifikanten Unterschiede zwischen Kontroll- und CCPA-Gruppe zu detektieren ($p > 0,05$).

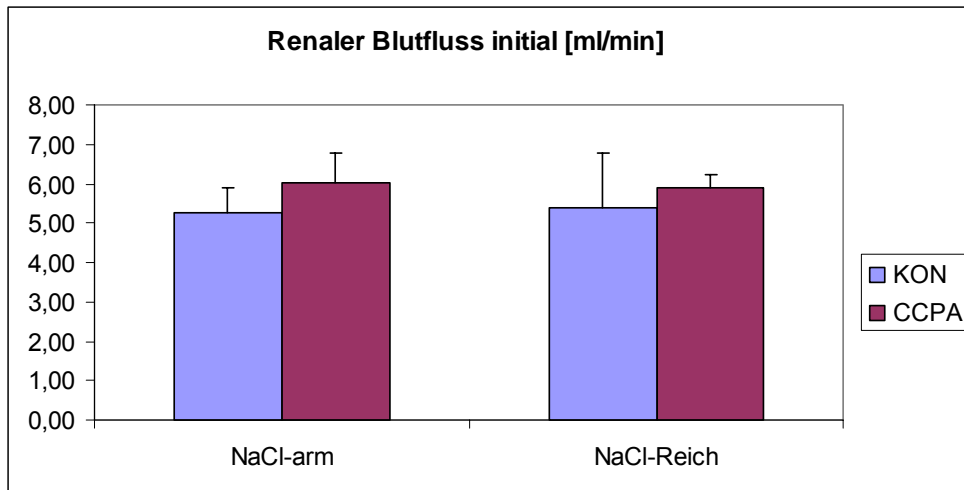


Abbildung 44: Renaler Blutfluss in ml/min initial vor Adenosin-Einzelinjektionen (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, NaCl-arm n=4, NaCl-reich n=6; KON: Kontrollgruppe NaCl-arm n=4, NaCl-reich n=4)

Die Ergebnisse der RBF-Messungen mit dem Ultraschall-Flowmeter entsprechen den typischen Reaktionen des renalen Blutflusses auf Adenosin-Einzelinjektionen (siehe Abbildung 45): Adenosin-Einzelinjektionen bewirken eine sofortige Reduktion des Blutflusses, gefolgt von einer hyperämischen Phase. Die Durchblutung erholt sich rasch auf den Ausgangswert.

Die Aufzeichnung ist sowohl pulsatil als auch gefiltert dargestellt. Die Adenosin-Injektion wird so rasch appliziert, dass sie mit ein bis zwei systolischen Pulswellen in der Niere ankommt.

Abbildung 46 zeigt Registrierungen des RBF von Adenosin-Einzelinjektionen unterschiedlicher Konzentrationen. Man erkennt eine eindeutige Dosis-Wirkungs-Beziehung: Je höher die Adenosin-Dosis, desto größer die Abnahme des RBF.

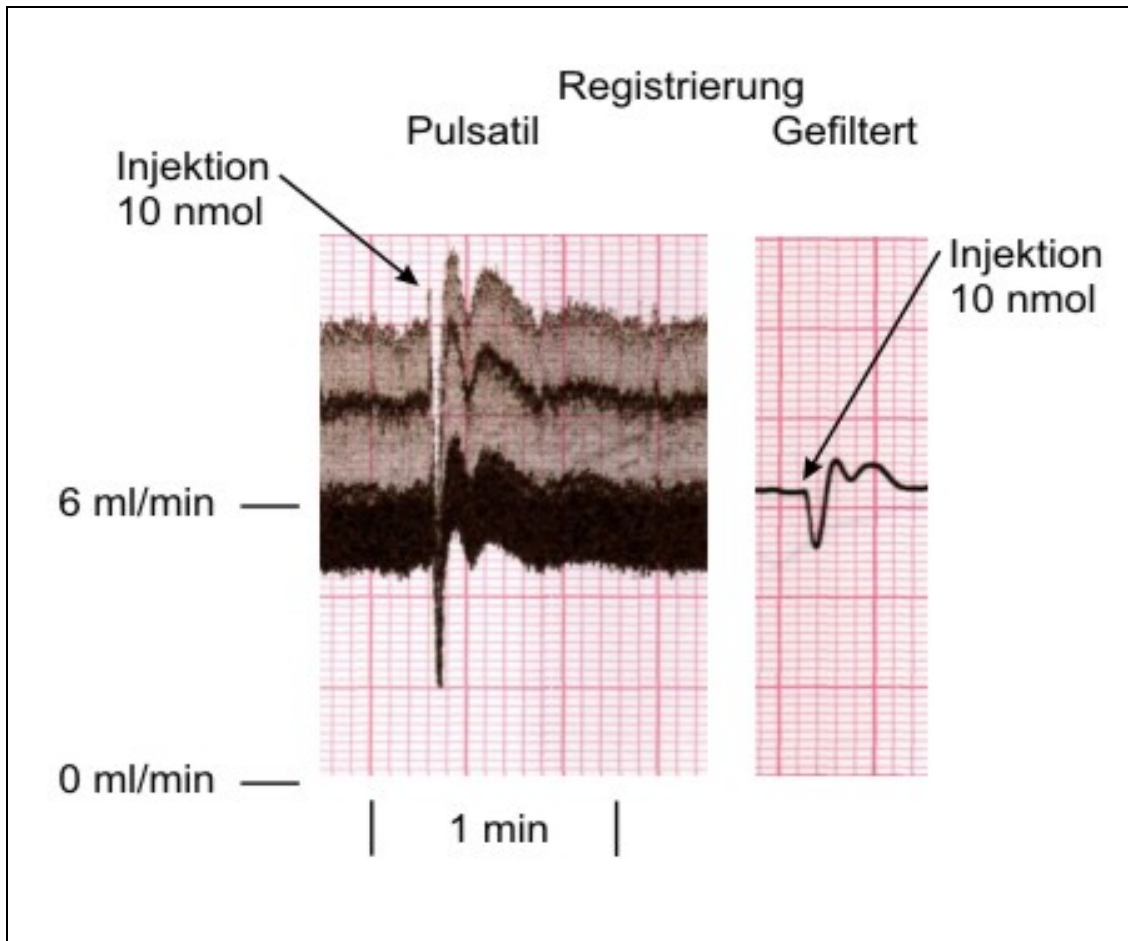


Abbildung 45: Pulsatile und gefilterte Registrierung des renalen Blutflusses. Einfluss einer Adenosin-Injektion von 10nmol (Registrierung vom 12.03.09, NaCl-arme Diät, CCPA-Vorbehandlung)

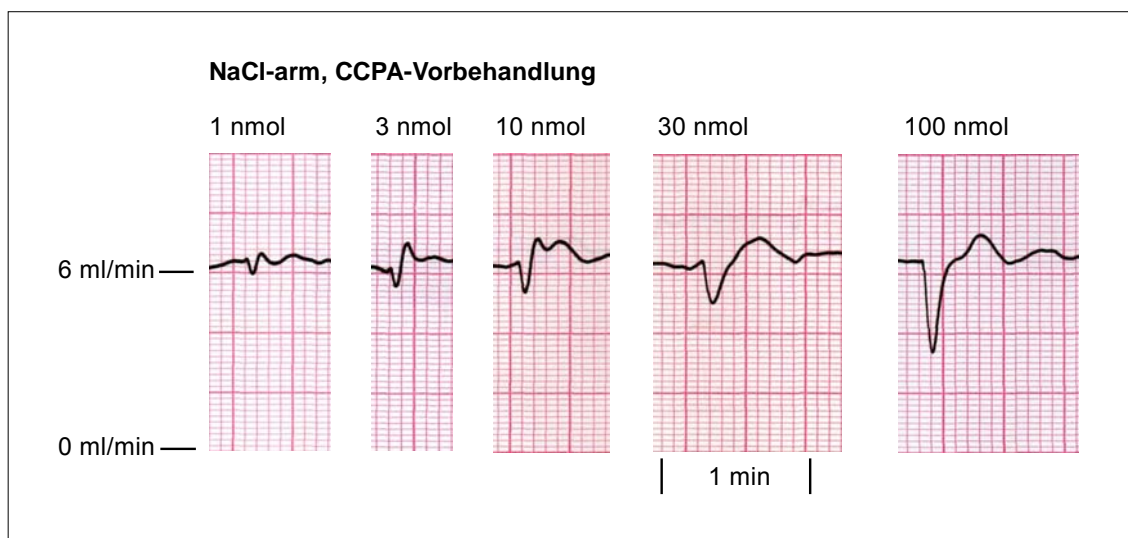


Abbildung 46: Gefilterte Registrierung des renalen Blutflusses. Einfluss von Adenosin-Einzelinjektionen (Registrierung vom 12.03.09, NaCl-arme Diät, CCPA-Vorbehandlung)

In Abbildung 47 ist die Dosis-Wirkungsbeziehung des RBF für die Adenosin-Einzelinjektionen bei NaCl-armer Diät dargestellt. Mit steigender Adenosinkonzentration kommt es zu einer deutlichen Zunahme von Δ RBF. Die Unterschiede zwischen Kontroll- und CCPA-Gruppe sind bei allen Konzentrationen nicht signifikant ($p > 0,05$, jeweils $n=4$). Die CCPA-Gruppe reagiert etwas empfindlicher auf die Adenosin-Injektionen.

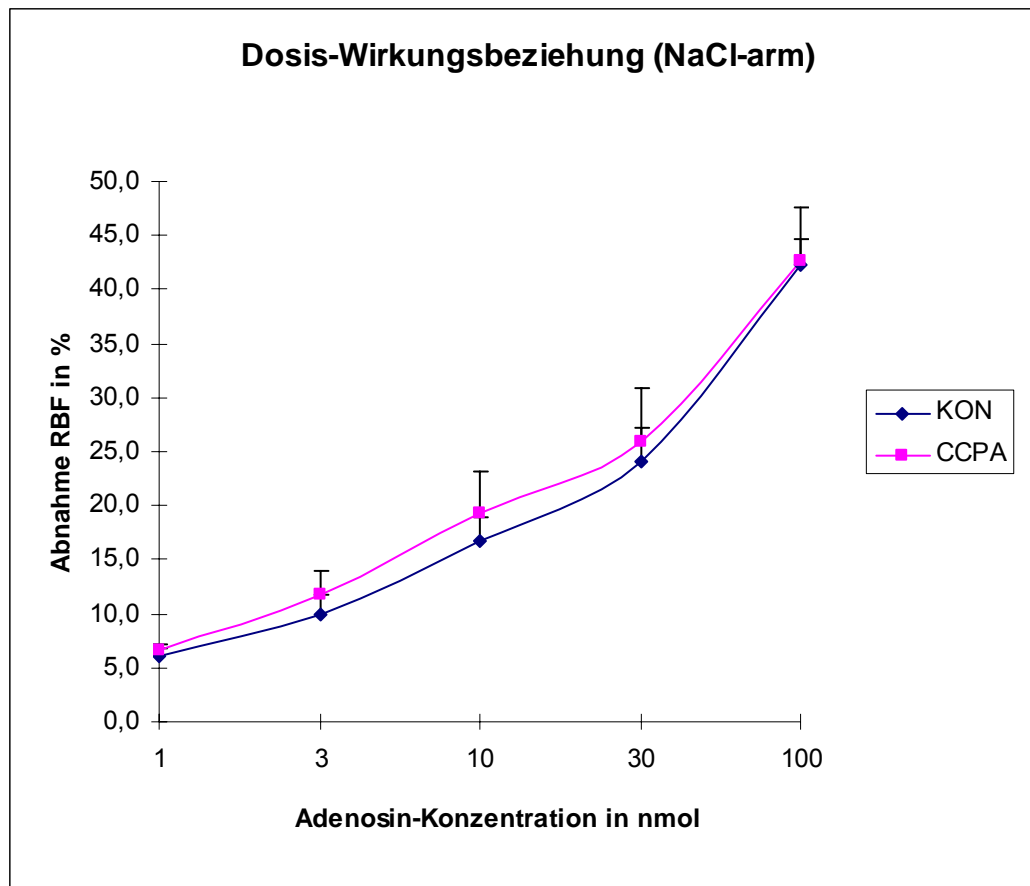


Abbildung 47: Dosis-Wirkungsbeziehung der Adenosin-Einzelinjektionen auf den renalen Blutfluss bei NaCl-armer Ernährung; Δ RBF Mittelwerte in % \pm SEM (CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe; jeweils $n=4$)

Eine ähnliche Dosis-Wirkungsbeziehung kann auch bei NaCl-reicher Diät beobachtet werden (KON $n=4$, CCPA $n=4$). Sie ist in Abbildung 48 dargestellt. Δ RBF unterscheidet sich bei 30 nmol signifikant von der Kontrollgruppe ($p=0,05$), bei den anderen Konzentrationen sind treten keine signifikanten Ergebnisse auf ($p > 0,05$).

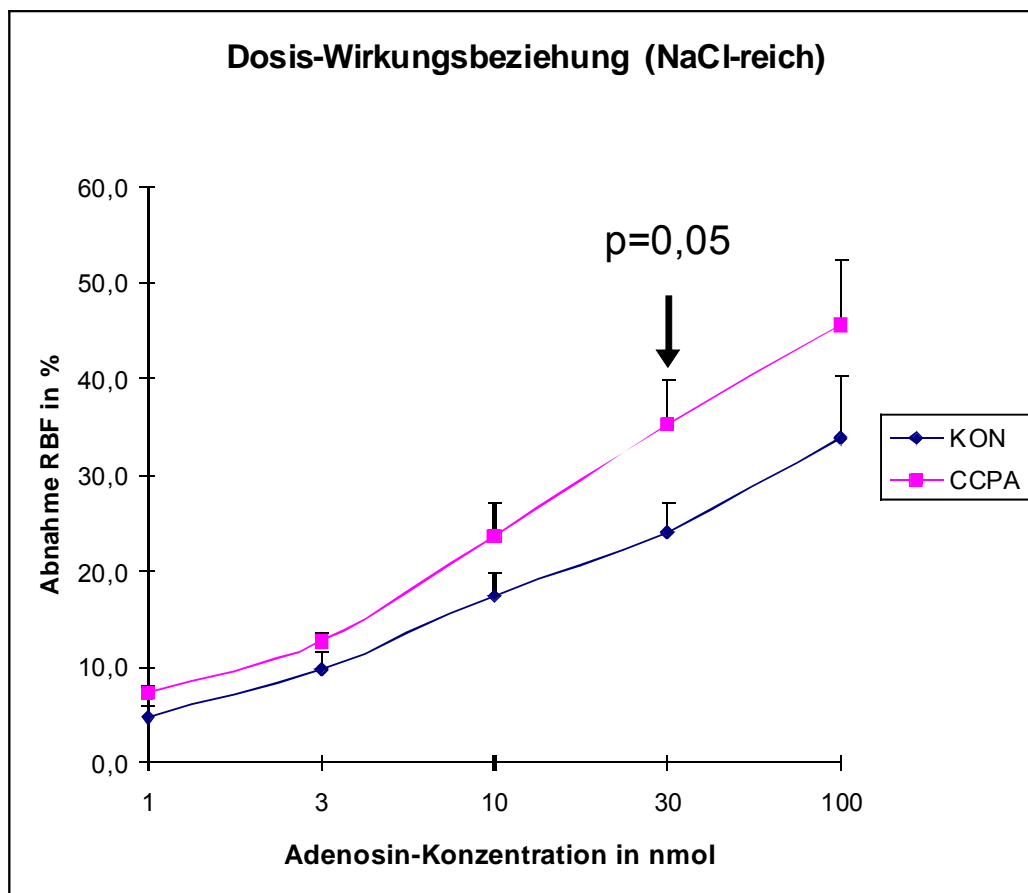


Abbildung 48: Dosis-Wirkungsbeziehung der Adenosin-Einzelinjektionen auf den renalen Blutfluss bei NaCl-reicher Ernährung: Δ RBF Mittelwerte in % \pm SEM (CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, n=4; KON: Kontrollgruppe, n=4)

4.10 Hämatokrit

Der Hämatokrit beträgt unter NaCl-armer Vorbehandlung in der Kontrollgruppe durchschnittlich $48,0 \pm 1,9\%$, in der CCPA-Gruppe $48,5 \pm 0,9\%$.

Nach NaCl-reicher Vorbehandlung liegt der Hämatokrit bei $42,7 \pm 0,8\%$ in der Kontrollgruppe und bei $42,7 \pm 0,9\%$ in der CCPA-Gruppe.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen sind bei beiden Diäten nicht signifikant ($p > 0,05$, jeweils n=7).

4.11 Plasma-Renin-Aktivität

Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) beträgt in der kochsalzarm ernährten Kontrollgruppe (n=5) $4,4 \pm 0,45$ ng Ang I /ml /h, in der CCPA-Gruppe (n=4) $3,5 \pm 0,38$ ng Ang I /ml /h. Der Unterschied zeigt einen statistischen Trend ($p = 0,08$).

In der NaCl-reich ernährten Kontrollgruppe beträgt die PRA $0,4 \pm 0,08$ ng Ang I /ml /h (n=5), in der CCPA-Gruppe beträgt sie $0,6 \pm 0,05$ ng Ang I /ml /h (n=6). Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p > 0,05$) (siehe Abbildung 49).

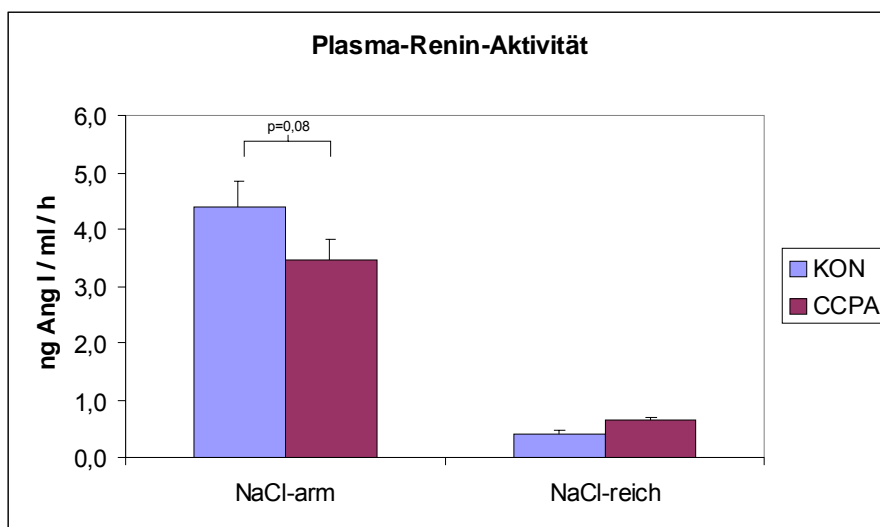


Abbildung 49: Plasma-Renin-Aktivität in ng Ang I/ml/h bei NaCl-arm und NaCl-reich ernährten Tieren (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, NaCl-arm n= 4, NaCl-reich n=6; KON: Kontrollgruppe, NaCl-arm n= 5, NaCl-reich n=5)

4.12 Genexpression A_1/A_{2A} -Rezeptoren

In der NaCl-arm ernährten Gruppe weist die CCPA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe für den Adenosin- A_1 -Rezeptor höhere mRNA-Level auf. Während bei der Kontroll-Gruppe der mRNA-Quotient $A_1/18s$ $0,97 \pm 0,14$ beträgt, liegt er in der CCPA-Gruppe bei $1,14 \pm 0,14$. Dieser Unterschied ist nicht signifikant ($p > 0,05$, n=6).

Bei der NaCl-reichen Vorbehandlung gibt es einen signifikanten Unterschied der mRNA-Menge ($p = 0,01$, n=6). In der Kontrollgruppe beträgt der Quotient $1,32 \pm 0,07$, in der CCPA-Gruppe $0,83 \pm 0,11$.

Ein statistischer Trend lässt sich auch durch die Vorbehandlung erkennen. In den Kontrollgruppen weisen die NaCl-reich ernährten Tiere höhere mRNA-Levels als die NaCl-arm ernährten auf. Eine Signifikanz wird mit $p=0,06$ knapp verfehlt (siehe Abbildung 50).

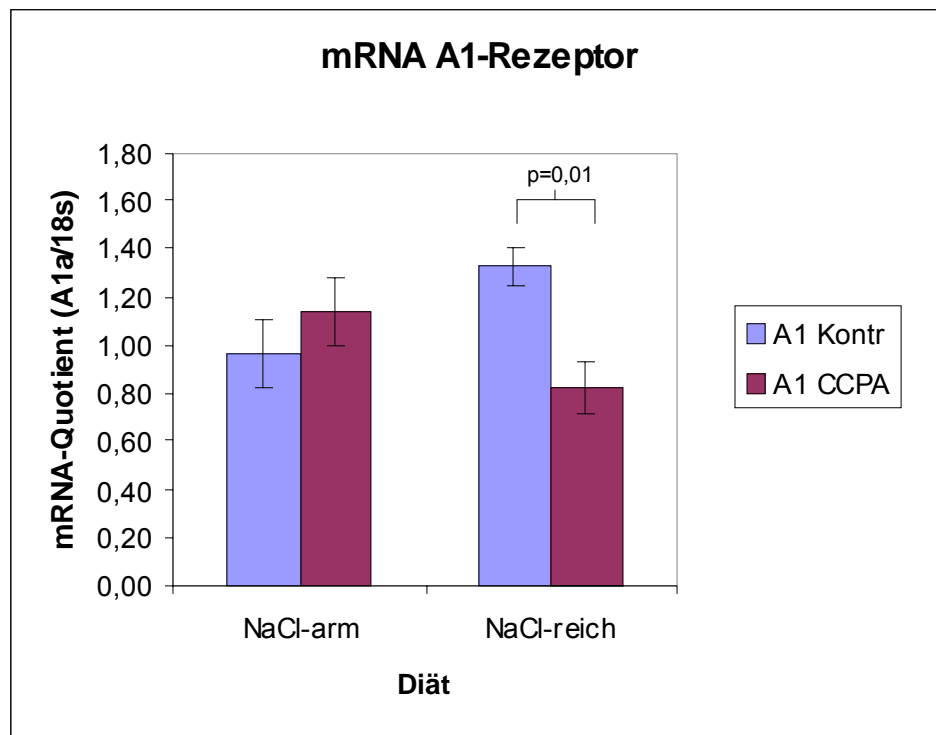


Abbildung 50: Einfluss der CCPA-Vorbehandlung auf mRNA-Expression des Adenosin-A₁-Rezeptors (aufgetragen sind Mittelwert ± SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=6)

Die Unterschiede der A_{2A}-Rezeptor-Expression sind nicht signifikant ($p>0,05$, jeweils n=3). Unter NaCl-armer Ernährung beträgt der Quotient in der Kontroll-Gruppe $1,01 \pm 0,08$, in der CCPA-Gruppe $0,95 \pm 0,10$. Die NaCl-reich ernährte Kontroll-Gruppe hat einen Quotienten von $1,03 \pm 0,17$, die CCPA-Gruppe von $1,03 \pm 0,15$ (siehe Abbildung 51).

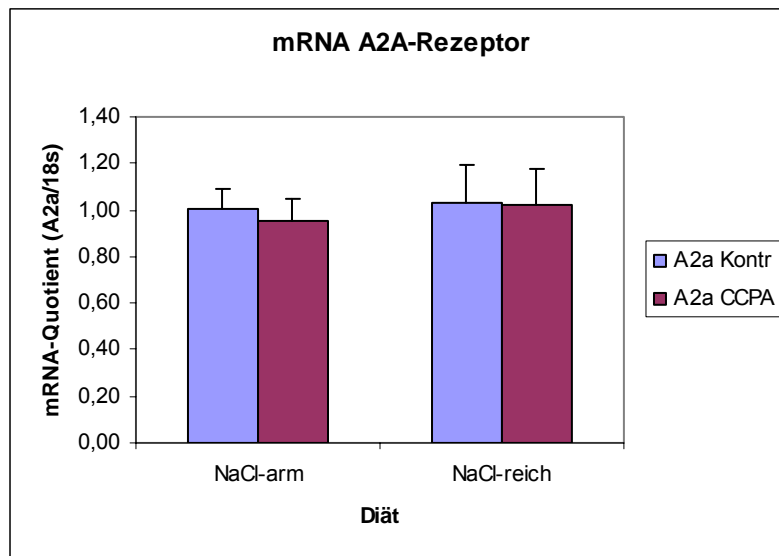


Abbildung 51: Einfluss der CCPA-Vorbehandlung auf mRNA-Expression des Adenosin-A_{2A}-Rezeptors (aufgetragen sind Mittelwert \pm SEM, CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=3)

4.13 Rezeptor-Protein (Western-Blot)

Bei dem Western Blot der Proteinextrakte ganzer Nieren lässt sich in allen Gruppen Protein des A₁-Rezeptors nachweisen. Durch die Vorbehandlung mit CCPA fand keine wesentliche Veränderung des Rezeptorproteins statt. Bei NaCl-reicher Diät ist die Bandenintensität diskret schwächer ausgeprägt als unter NaCl-armer Diät (siehe Abbildung 52).

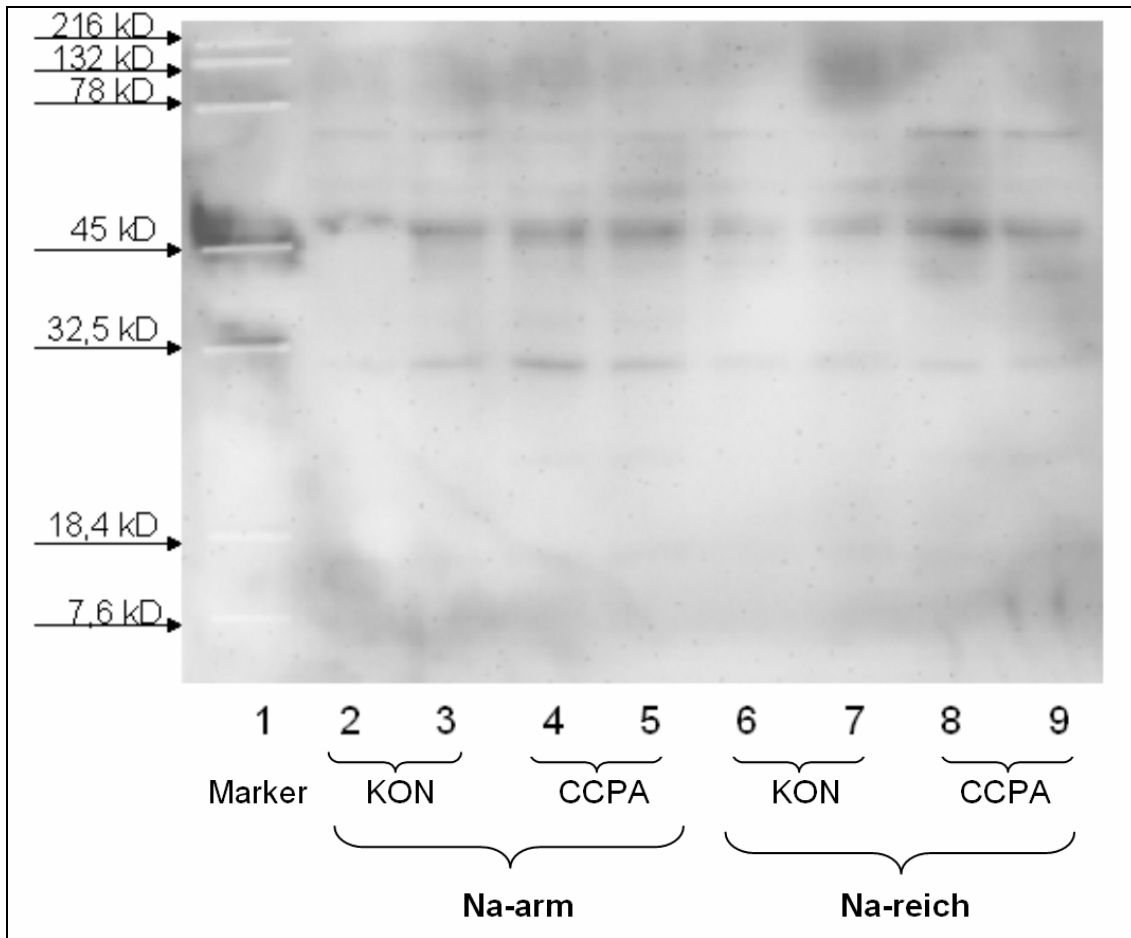


Abbildung 52: Western Blot für A₁-Rezeptor-Protein, Extraktionen ganzer Nieren
 Bahn 1: MW-Marker von Bio-Rad (pre-stained)
 Bahn 2 und 3: NaCl-arme Diät (Kontrolle)
 Bahn 4 und 5: NaCl-arme Diät (CCPA-Behandlung)
 Bahn 6 und 7: NaCl-reiche Diät (Kontrolle)
 Bahn 8 und 9 NaCl-reiche Diät (CCPA Behandlung)
 (CCPA: Vorbehandlung mit CCPA über 7d, KON: Kontrollgruppe, jeweils n=2)

5 Diskussion

5.1 Hypothese

Adenosin ist in der Niere einer der wichtigsten Mediatoren des Gefäßtonus sowie der metabolischen Kontrolle (265). In den letzten Jahren kam es zu einer starken Zunahme an klinischen Studien zum Einsatz von spezifischen Adenosin-A₁-Agonisten und –Antagonisten. Dabei ist die Frage, welchen Einfluss eine dauerhafte Stimulation des A₁-Rezeptors auf die Nierenfunktion hat, von aktueller Bedeutung (64, 82, 94, 110, 127, 201, 221). Auf Grund des besonderen Einflusses des A₁-Rezeptors beim Gesunden und beim Nierenkranken sollte bei der Anwendung von A₁-Agonisten, die in klinischen Studien für eine Vielzahl an Krankheitsbildern untersucht werden, die Nierenfunktion besonderer Prüfung unterzogen werden.

Diese Arbeit sollte klären, wie sich eine chronische Vorbehandlung mit dem selektiven Adenosin-A₁-Agonisten CCPA auf die globale Nierenfunktion auswirkt. Zahlreiche Studien beschreiben die Wirkungen des A₁-Rezeptors auf einzelne Nephronabschnitte. Bislang jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt ist die Frage, in welchem Maße die Niere eine chronische Stimulation des A₁-Rezeptors kompensieren kann. Nach unserem Kenntnisstand handelt es sich bei dieser Arbeit um die erste Untersuchung einer Tachyphylaxie bei chronischer Stimulation des Adenosin-A₁-Rezeptors in der Niere.

Bei akuter Anwendung bewirken A₁-Agonisten eine deutliche Senkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), der renalen Durchblutung (RBF) sowie eine starke Antidiurese (4, 38, 167). Eine dauerhafte Reduktion des Blutflusses beeinträchtigt die Nierenfunktion. Durch den antidiuretischen Effekt könnte der Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt aus dem Gleichgewicht geraten. Wenn die Verschlechterung der Nierenfunktion durch A₁-Agonisten bei chronischer Anwendung keiner Tachyphylaxie unterliegt, wäre die Nierenfunktion im klinischen Einsatz dieser Adenosin-A₁-Agonisten kritisch zu bewerten.

Bisherige Untersuchungen deuten darauf hin, dass der A₁-Rezeptor bei chronischer Stimulation einem Wirkungsverlust unterliegt (35, 127, 260). Für die Niere liegen jedoch noch keine Untersuchungen vor, welche dies bestätigen.

Um diese Fragestellung umfassend untersuchen zu können, wurden Experimente mit Sprague Dawley Ratten durchgeführt.

Die Ergebnisse der dazu untersuchten Parameter sind im *Kapitel 4 Ergebnisse* dargestellt.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Gewichtsverlauf

Der Gewichtsverlauf wurde herangezogen, um Aussagen über die Bilanz von Flüssigkeits- und Nahrungsaufnahme unter CCPA-Diät treffen zu können. Zum Gewichtsverlauf liegen Studien mit widersprüchlichen Ergebnissen vor. Lee et al. beobachteten, dass die Applikation des A₁-Agonisten R-PIA in den ersten Tagen zu einer geringeren Gewichtszunahme führt (148). Dieser Effekt wurde am ehesten auf eine reduzierte Nahrungsaufnahme als Folge einer Sedierung durch A₁-Agonisten zurückgeführt. Casati et al. beobachteten im Gegensatz dazu, dass Gewicht und Nahrungsaufnahme bei Gabe von CCPA über einen Zeitraum von 21 Tagen stabil bleiben (35). Verhaltensänderungen wurden hier nicht beobachtet.

In dieser Arbeit ist beim Gewichtsverlauf sowohl unter kochsalzärmer als auch – reicher kein Unterschied zwischen Kontroll- und CCPA-Gruppe zu aufgetreten. Am ehesten können die unterschiedlichen Studienergebnisse bezüglich des Gewichtsverlaufs auf unterschiedliche Dosierungen zurückgeführt werden, eventuell sind die Effekte auch auf die Wahl unterschiedlicher Agonisten zurückzuführen.

Die Beurteilung des Gewichtsverlaufs hat ihre Grenzen insofern, dass viele Faktoren das Gewicht beeinflussen. Eine Gewichtsreduktion könnte beispielsweise durch eine Zunahme des Extrazellulärvolumens verschleiert werden. Eine Alternative wäre das Wiegen des Futters gewesen. Doch auch hier sind Ergebnisse nur begrenzt aussagefähig, da ein Teil des Futters zerfällt und im Käfig liegen bleibt.

5.2.2 Trinkmenge, Urinmenge und Elektrolytausscheidung während der Vorbehandlung

Der Parameter Trinkmenge wurde verwendet, um die zugeführte CCPA-Menge zu kontrollieren. Ferner dient die Trinkmenge auch der Überprüfung der Vigilanz der Tiere. Sollte die Dosis zu stark sedierend wirken, hätte dies Auswirkung auf die Trinkmenge. Urinmenge und Elektrolytausscheidung wurden während der siebentägigen Vorbehandlungsphase als nichtinvasive Parameter für die Nierenfunktion herangezogen.

Unter kochsalzreicher Diät weisen die Tiere mit CCPA-Vorbehandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe sowohl zu Beginn an Tag 1 als auch am Ende der Vorbehandlung an Tag 7 eine höhere mittlere Trink- und Urinmenge auf, die jedoch bei großen interindividuellen Unterschieden keine Signifikanzen aufweisen. Dies ist vor allem hinsichtlich der Urinmenge ein unerwartetes Ergebnis, da A_1 -Agonisten antidiuretisch und antinatriuretisch wirken. Auch bei der Na-Ausscheidung zeigt sich ein auffallendes Ergebnis. In der Gruppe der CCPA-Vorbehandlung scheiden die Tiere an Tag 1 deutlich mehr Natrium aus. Eventuell könnten diese beiden Beobachtungen auf eine CCPA-vermittelte Hemmung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) zurückgeführt werden. Im Vergleich zur Verumgruppe könnte die Kontrollgruppe an Tag 1 eine höhere PRA aufweisen, welche die stärkere Volumen- und Natriumretention erklären könnte. Leider wurde an Tag 1 auf eine Blutentnahme verzichtet, so dass diese Überlegung nicht überprüft werden kann. An Tag 7 ist dieser Unterschied nicht mehr vorhanden. Dies spräche für eine Tachyphylaxie der durch CCPA gehemmten PRA. Gegen diese Hypothese spricht jedoch, dass an Tag 7 die PRA in der CCPA-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe immer noch erniedrigt ist und dass zu diesem Zeitpunkt kein Unterschied bei Urin- oder Natrium mehr auftritt. Für eine andere Ursache spricht auch die Tatsache, dass auch unter NaCl-reicher Diät und folglich maximal supprimierter PRA eine erhöhte Urinmenge und Na-Ausscheidung beobachtet wird.

Bei kochsalzreicher Diät lag die Trinkmenge deutlich über den erwarteten Werten. Sie war etwa dreimal so hoch wie unter NaCl-ärmer Diät. Da die Dosierung von CCPA auf 30ml ausgelegt war, erhielten die Tiere deutlich mehr

Substanz als kalkuliert. Im Vergleich zu den Arbeiten von Casati et al. handelt es sich jedoch noch immer um eine moderate Dosis von CCPA (35). Bei NaCl-reicher Diät zeigt sich eine ähnliche Tendenz wie bei NaCl-armer Diät. An Tag 1 ist die Trink- und Urinmenge in der CCPA-Gruppe deutlich größer als in der Kontrollgruppe. An Tag 7 sind die beiden Werte ebenfalls ausgeglichen. Auch die Na-Ausscheidung ist an Tag 1, aber nicht mehr an Tag 7 in der CCPA-Gruppe deutlich höher als in der Kontrollgruppe.

5.2.3 Glomeruläre Filtrationsrate

Durch die Vorbehandlung mit CCPA wird in unserer Arbeit die GFR nicht verändert. Die in Narkose gemessenen Ausgangswerte der GFR unterscheiden sich bei beiden Diäten nicht signifikant zwischen CCPA- und Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die GFR durch die Vorbehandlung mit CCPA nicht dauerhaft gesenkt wird und sich nach Absetzen der CCPA-Gabe wieder erholt, so dass in den Messzeiträumen kein Unterschied feststellbar ist. Tiere unter kochsalzreicher Diät weisen, wie bereits in der Literatur beschrieben, in Narkose eine höhere GFR auf als unter kochsalzarmer Ernährung (186).

Die deutliche Absenkung der GFR durch eine erneute Applikation von CCPA ist ein eindeutiger Hinweis darauf, dass die Vorbehandlung über sieben Tage mit CCPA zu keinem Wirkungsverlust von Adenosin in der Niere führt.

Die kochsalzarme Ernährung steigert die Empfindlichkeit der Niere für CCPA. So fällt unter dieser Diät der GFR-Abfall deutlich stärker aus als unter kochsalzreicher Ernährung. Nach Absetzen der CCPA-Infusion ist die Erholung der GFR in der CCPA- und der Kontrollgruppe unter NaCl-reicher Diät stärker ausgeprägt als unter NaCl-armer Diät. Hier zeigt sich der Synergismus von Angiotensin II und Adenosin. Die geringere Empfindlichkeit der Niere auf erneute Gabe von CCPA bei kochsalzreicher Diät kann durch eine Rezeptordownregulation sowie erhöhte intrarenale Adenosinwerte erklärt werden (186, 293).

5.2.4 Urinzeitvolumen

Die in der Literatur beschriebene antidiuretische Wirkung von Adenosin kann mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden (39, 167, 186, 187, 194). Ferner unterstützt unsere Arbeit die These, dass der antidiuretische Effekt von Adenosin durch den A_1 -Rezeptor vermittelt wird (134, 168, 278).

Bei den Urinvolumina zeigt sich in erster Linie ein Einfluss der Salzaufnahme. NaCl-reich ernährte Tiere scheiden etwa doppelt so viel Urin aus als nach NaCl-armer Ernährung. Auf die CCPA-Infusion reagieren die NaCl-reich ernährten Tiere mit einer deutlich schwächeren Absenkung des Urinvolumens. Panzacchi et al. beschreiben eine deutlich stärkere Abnahme des Urinzeitvolumens durch eine CCPA-Infusion bei vergleichbarer Reduktion des Blutdruckes (190). Bei den Urinzeitvolumina (UZV) zeigt sich zudem ein Effekt durch die Vorbehandlung mit CCPA: Die mittleren Urinzeitvolumina vor CCPA-Infusion weisen bei NaCl-armer Diät große Unterschiede zwischen CCPA- und Kontrollgruppe auf, während sich bei NaCl-reicher Diät kein Unterschied zeigt. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass durch chronische Stimulation des A_1 -Rezeptors die Diurese gehemmt wird und nach Absetzen der CCPA-Gabe reflektorisch ansteigt. Aufgrund großer interindividueller Schwankungen zeigen sich jedoch keine signifikanten Effekte. Die erneute Gabe von CCPA bewirkt in beiden Gruppen einen deutlichen Abfall des UZV. Dies spricht für eine erhaltene Funktion des durch den A_1 -Rezeptor vermittelten Effekts. Nach Absetzen der CCPA-Infusion kommt es bei Tieren mit CCPA-Vorbehandlung zu einer erneuten überschießenden Urinausscheidung. Bei Kontrolltieren hält die CCPA-vermittelte Senkung des UZVs noch an, was auf der anderen Seite Hinweis darauf sein könnte, dass es durch die CCPA-Vorbehandlung zu einer gewissen Toleranzentwicklung gegenüber CCPA, möglicherweise durch eine rasche Metabolisierung, gekommen ist.

5.2.5 Elektrolytausscheidung

NaCl-arme Diät

In unserer Studie hat die Vorbehandlung mit CCPA Einfluss auf die fraktionelle Natriumausscheidung. Im Vergleich zur Kontrollgruppe ist sie nach Vorbehandlung mit CCPA um circa die Hälfte reduziert. Der antinatriuretische Effekt des A_1 -Rezeptors bleibt folglich erhalten, hier zeigt sich keine Tachyphylaxie durch die Vorbehandlung. Dies spricht für die erhaltene Wirkung von CCPA auf die A_1 -Rezeptor-vermittelte Natriumrückresorption (32, 168, 246, 278). Bei einer Tachyphylaxie könnte theoretisch ein ähnlicher Effekt wie bei A_1 -Rezeptor-Defizienz durch Rezeptor-Knockout oder A_1 -AR-Antagonismus erwartet werden, nämlich eine erhöhte fraktionelle Natriumausscheidung. Dies ist aber nicht der Fall. Bei Blockierung der A_1 -Rezeptoren mit selektiven A_1 -Antagonisten wird ein Anstieg der fraktionellen Natriumausscheidung beobachtet (8, 201). Die besondere Bedeutung des A_1 -Rezeptors für die Natrium- und Flüssigkeitshomöostase wird in einer aktuellen Arbeit von Bell et al. beschrieben (18). Bei A_1 -Rezeptor-Knockout-Mäusen ist die glomeruläre tubuläre Rückkopplung („Glomerular Tubular Balance“) aufgehoben. Es kommt bei einer Volumenbelastung des proximalen Tubulus zu einer gesteigerten Natrium- und Flüssigkeitsausscheidung, da im proximalen Tubulus die A_1 -vermittelte Rückresorption eingeschränkt ist.

Die Vorbehandlung mit CCPA zeigt keinen Einfluss auf die filtrierte Natriummenge und die absolute Natriumausscheidung. Die verminderte Filtrationsfraktion könnte auch Zeichen einer verminderten Perfusion (196, 230, 238) sein, vermittelt durch die vasokonstriktive Wirkung des A_1 -Rezeptors. Dagegen sprechen jedoch die RBF-Messungen dieser Arbeit, die keine reduzierte Nierendurchblutung in der CCPA-Gruppe zeigen. Eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems bewirkt ebenfalls eine Abnahme der fraktionellen Natrium-Ausscheidung. Die in dieser Arbeit gemessenen Werte der Plasma-Renin-Aktivität, die in der CCPA-Gruppe unter denen der Kontrollgruppe liegen, sprechen ebenfalls gegen einen Einfluss des RAAS auf die Elektrolytausscheidung.

Die CCPA-Infusion führt sowohl nach CCPA-Vorbehandlung als auch in der Kontrollgruppe zu einer deutlichen Abnahme der filtrierten Natrium-Menge sowie der fraktionellen Natrium-Ausscheidung. In einer Arbeit von Osswald et al. konnte gezeigt werden, dass die verminderte Natrium-Ausscheidung nicht allein auf der blutdrucksenkenden Wirkung von Adenosin beruht (187). Panzacchi et al. bestätigen den in dieser Arbeit beschriebenen Effekt von CCPA auf Urinzeitvolumen sowie absolute und fraktionelle Natriumausscheidung (190). Die CCPA vermittelte Antidiurese ist unter NaCl-armer Diät deutlich stärker ausgeprägt als unter NaCl-reicher Diät und weitgehend unabhängig von der Vorbehandlung mit CCPA. Wahrscheinlich ist dieser Effekt auf eine synergistische Wirkung von Adenosin mit dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System zurückzuführen

NaCl-reiche Diät

Bei der Natriumausscheidung unter kochsalzreicher Diät ist ein Effekt durch die Vorbehandlung mit CCPA zu beobachten. Absolute und fraktionelle Natriumausscheidung werden durch die siebentägige Gabe von CCPA reduziert, während die filtrierte Natriummenge stabil bleibt. Die fraktionelle Natriumausscheidung wird durch die CCPA-Vorbehandlung annähernd halbiert. Diese Veränderungen können durch eine persistierende A₁-Rezeptor-Aktivierung erklärt werden (32, 168, 246, 278), die somit keiner Tachyphylaxie unterliegt. Die CCPA-Infusion hat in beiden Gruppen nur geringen Einfluss auf absolute und fraktionelle Natriumausscheidung.

5.2.6 Elektrolytspiegel im Plasma

Die NaCl-arme Ernährung erzeugt niedrignormale Natriumspiegel und hochnormale Kaliumspiegel mit Tendenz zur Hyperkaliämie. Tiere mit CCPA-Vorbehandlung weisen höhere Natrium-Werte und niedrigere Kalium-Werte auf. Dies lässt sich durch die antidiuretischen, antinatriuretischen Wirkung der A₁-Rezeptor-Aktivierung erklären (32, 246).

5.2.7 Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck

Herzfrequenz und Blutdruck wurden als weitere Parameter zur Beurteilung einer Tachyphylaxie durch eine dauerhafte Stimulation des A_1 -Rezeptors hinzugezogen, da der A_1 -Rezeptor eine negativ inotrope, chronotrope und dromotrope Wirkung vermittelt. Casati et al. zeigten in einer Arbeit, dass die hypotensive und bradykarde Wirkung von CCPA einem Wirkungsverlust unterliegt, allerdings erst nach einem Zeitraum von 21 Tagen (35).

In unserer Studie tritt bei Herzfrequenz und Blutdruck keine Tachyphylaxie ein, unabhängig von NaCl-armer oder -reicher Diät. Unter NaCl-armer Diät ist zu beobachten, dass die mit CCPA vorbehandelte Gruppe leicht erhöhte Herzfrequenzen und Blutdruckwerte aufweist. Dies könnte auf das Absetzen der oralen CCPA-Applikation zurückzuführen sein und es in Folge der entfallenen Blutdrucksenkung durch CCPA reflektorisch zu einem Anstieg des Blutdrucks kommt.

Bei NaCl-reicher Ernährung ist eine andere Tendenz zu erkennen. Mit CCPA vorbehandelte Tiere weisen hier in den ersten beiden Versuchsperioden einen signifikant niedrigeren Blutdruck auf. Es ist zu vermuten, dass die CCPA-vermittelte Blutdrucksenkung anhält. Da die Tiere unter NaCl-reicher Diät deutlich mehr Substanz aufnehmen, wird die CCPA-Konzentration im Plasma ausreichend für eine hypotensive Wirkung sein. Dies entspricht den hämodynamischen Beobachtungen von Casati et al. (35). In dieser Arbeit hielt der Effekt einer einmaligen CCPA-Gabe ebenfalls mehrere Stunden nach Applikation an. Auffallend ist, dass beim Blutdruck ein CCPA-Effekt sichtbar ist, bei der Herzfrequenz jedoch nicht.

In allen Gruppen bewirkt die CCPA-Infusion eine signifikante Abnahme der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Blutdruckes. Die Blutdrucksenkung erfolgt parallel zur Abnahme der Herzfrequenz.

Demgegenüber stehen Beobachtungen von Lee et al. (148), welche eine Tachyphylaxie bei Infusion des A_1 -Agonisten R-PIA mittels osmotischer Pumpen über 7 Tage beschreiben. In dieser Arbeit tritt nach zwei Tagen ein Wirkungsverlust von R-PIA bei Blutdruck und Herzfrequenz auf. Nach sechs Tagen kontinuierlicher Infusion werden annähernd die Ausgangswerte erreicht.

Als Ursache für diesen Wirkungsverlust konnte im Bereich der Vorhöfe eine Abnahme der Bindungsaffinität, der inhibitorischen G-Proteine und der A_1 -Rezeptormenge beobachtet werden. Gegen eine Tachyphylaxie bei unserer Studie spricht, dass die Wirkung einer erneuten Gabe von CCPA in der Verum-Gruppe keinen Unterschied zur Kontrollgruppe aufweist. Wäre eine Tachyphylaxie eingetreten, so wäre bei erneuter Gabe von CCPA ein Wirkungsverlust beobachtet erwartet worden.

Die Ergebnisse unserer Arbeit sind vereinbar mit der Studie von Casati et al. (35), in der an Tag 7 ebenfalls kein tachyphylaktischer Effekt durch die Vorbehandlung mit CCPA nachweisbar war.

5.2.8 Renaler Blutfluss

Die in dieser Arbeit vorgestellten Messungen zeigen, dass die vaskuläre Antwort der Niere auf Adenosin, gemessen in Form von unveränderten Dosis-Wirkungsbeziehungen von Adenosin-Einzelinjektionen, durch die Vorbehandlung mit CCPA nicht verändert wird. Diese Beobachtungen sprechen für das Vorhandensein von A_1 -Rezeptoren und deren hinreichende Funktion im Vas afferens und gegen eine Herabregulation der A_1 -Rezeptor-Dichte durch die dauerhafte Rezeptorstimulation. Auch die Signaltransduktion zur Vasokonstriktion am Vas afferens durch den A_1 -Rezeptor scheint durch die CCPA-Vorbehandlung funktionell nicht beeinträchtigt zu werden.

Die Gruppen mit NaCl-armer Ernährung reagieren mit einer etwas stärker ausgeprägten Abnahme des RBF. Eine stärkere konstriktive Wirkung von Adenosin bei hoher Plasma-Renin-Aktivität ist hinreichend bekannt (186, 187, 236). In den Flowmeter-Messungen zeigt sich bei den mit CCPA vorbehandelten Gruppen eine nicht signifikante Erhöhung des Blutflusses im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Interessant ist, dass die CCPA-Gruppen empfindlicher auf Adenosin-Einzelinjektionen reagieren als die Kontrollgruppen. Der gesteigerte Blutfluss in den CCPA-Gruppen könnte ein Hinweis darauf sein, dass eine reflektorisch überschießende Durchblutung nach Absetzen des A_1 -Agonisten eintritt. Bei Absetzen einer länger andauernden Infusion von

Adenosin in die Nierenarterie ist ebenfalls eine überschießende Durchblutung beobachtet worden (189).

5.2.9 Plasma-Renin-Aktivität

Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) wurde neben Elektrolytausscheidung zur Kontrolle der Elektrolytzufuhr im Rahmen der beiden Diäten hinzugezogen. Die kochsalzarme Ernährung vor und während der Vorbehandlung erzielt wie erwartet einen markanten Anstieg der PRA, während unter kochsalzreicher Diät die PRA deutlich abfällt. Damit kann die Zuverlässigkeit der NaCl-Diäten bestätigt werden. Unter NaCl-arter Diät weisen die Tiere nach CCPA-Vorbehandlung eine deutlich niedrigere PRA auf als die Kontrollgruppe. Dies spricht gegen eine Tachyphylaxie von CCPA. Diese Ergebnisse werden durch eine Studie von Sala et al. bestätigt (216). In dieser Arbeit wurde eine dosisunabhängige Senkung der PRA um etwa 50% durch CCPA beschrieben. Jedoch fällt in den Messungen von Sala et al. die Hemmung der PRA durch CCPA deutlich stärker aus als bei den hier beschriebenen Messungen. Diese Absenkung der PRA ist ein über den A_1 -Rezeptor vermittelter Effekt, der nicht allein auf einer blutdrucksenkenden Wirkung durch A_1 -Agonisten beruht (6). Diese anhaltende Absenkung der PRA spricht gegen eine Downregulation von A_1 -Rezeptoren durch die Vorbehandlung mit CCPA.

Bei NaCl-reicher Diät kann keine Senkung der PRA durch CCPA beobachtet werden. Bereits in früheren Studien wurde die Adenosin-vermittelte Reduktion der PRA nur bei kochsalzarter Diät beobachtet (187, 245).

5.2.10 Genexpression A_1/A_{2A} -Rezeptoren

Unter NaCl-reicher Vorbehandlung führt die Vorbehandlung mit CCPA über sieben Tage im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer Down-Regulation des A_1 -Rezeptor-Proteins bezogen auf mRNA-Extraktionen der gesamten Niere. Diese Herabregulation hat jedoch keine Auswirkung auf die Nierenfunktion. So zeigen

sich bei RBF und GFR keine Unterschiede zwischen Verum- und Kontrollgruppen.

Bei NaCl-armer Diät hat die Vorbehandlung mit CCPA keinen Einfluss auf den mRNA-Gehalt. Die Unterschiede zwischen NaCl-armer- und reicher Diät sind am ehesten durch unterschiedliche CCPA-Plasma-Spiegel zu erklären. Da die Trinkmenge unter NaCl-reicher Diät deutlich über der erwarteten Menge lag, nahmen die Tiere etwa dreimal so viel Substanz auf als unter NaCl-armer Ernährung.

Da CCPA hochselektiv auf A_1 -Rezeptoren, nicht aber auf A_2 -Rezeptoren, wirkt, war keine Veränderung bei der A_{2A} -mRNA-Expression erwartet worden. Dies entspricht unseren Ergebnissen, bei welchen die Expression des A_{2A} -Rezeptors bei beiden Diäten keinen Unterschied zwischen CCPA- und Kontrollgruppe erkennen ließ.

Weshalb NaCl-reich ernährte Tiere höhere mRNA-Werte für den A_1 -Rezeptor aufweisen als unter NaCl-armer Diät, bleibt unklar. Diese Beobachtung deckt sich nicht mit den Proteinnachweisen im Western blot. Dieser Effekt steht im Widerspruch zu Untersuchungen von Smith et al., die bei NaCl-reicher Ernährung eine Downregulation von A_1 -Rezeptoren beobachteten (236). Kulick et al. beobachteten im proximalen Tubulus eine Hochregulation von A_1 -Rezeptoren bei NaCl-armer Diät (138).

5.2.11 Rezeptor-Protein

Bei den Western Blots zeigt sich keine wesentliche Veränderung der A_1 -Rezeptormenge durch die Vorbehandlung mit CCPA. Dieses Ergebnis spricht gegen eine Downregulation von A_1 -Rezeptoren in der Niere und deckt sich mit den funktionellen Untersuchungen dieser Arbeit. Diese Beobachtung ist überraschend, da durch die Stimulation mit CCPA über sieben Tage eine Herunterregulation erwartet worden war. Mehrere Studien haben eine Reduktion der Rezeptor-Menge in Zellkulturen schon nach einer deutlich kürzeren Zeit beobachtet (80, 112). Gao et al. zeigten in Zellkulturen, dass die dauerhafte Stimulation des A_1 -Rezeptors bereits nach 24 Stunden die Zahl der

A₁-Rezeptoren um etwa die Hälfte senkt (80). Zudem wurde eine niedrigere Affinität der Rezeptoren beobachtet.

Bei NaCl-reicher Diät zeigt sich eine schwächere Bandenintensität als unter NaCl-armer Ernährung, was für eine Down-Regulation des A₁-Rezeptor-Proteins durch die kochsalzreiche Diät spricht. Dieses Ergebnis entspricht Beobachtungen von Smith et al. (236), die ebenfalls zeigten, dass eine NaCl-reiche Diät den A₁-Rezeptor downreguliert.

Bei diesem Western Blot wurden Proteinextraktionen ganzer Nieren verwendet. Da der A₁-Rezeptor bezogen auf die ganze Niere nur in sehr geringen Konzentrationen (wenige ng pro g Feuchtgewicht) vorkommt, ist diese Methode in ihrer Aussagekraft eingeschränkt. Dies könnte die widersprüchlichen Ergebnisse unserer Studie bezüglich der in der Literatur beschriebenen Rezeptordownregulation erklären. Deutlich sensitivere Ergebnisse hätte man durch Isolation einzelner Nephronsegmente beispielsweise isolierten Glomerula oder proximalen Tubulusabschnitten erzielen können, was jedoch sehr aufwändig gewesen wäre und auf Grund der hohen technischen Anforderungen den Rahmen dieser Studie gesprengt hätte.

5.3 Diskussion der Methodik

5.3.1 Versuchsplanung

Um die Wirkungen der CCPA-Vorbehandlung auf die Nierenfunktion umfassend untersuchen zu können, wurde ein Tierversuch mit Sprague Dawley Ratten ausgewählt. Diese Tierart stellt auf Grund der Ähnlichkeit des Aufbaus ihrer Niere mit der des Menschen weltweit das Standardmodell für die Nierenphysiologie und die Nephrologie dar (45, 242). Mit dieser Tierart gewonnene Daten lassen sich daher gut mit menschlichen Daten vergleichen und haben einen hohen prädiktiven Wert. Es ist davon auszugehen, dass beim Menschen ähnliche Veränderungen der glomerulären Filtration und renalen Durchblutung zu beobachten wären.

Bei der Versuchsplanung wurden die Gruppengrößen aus Gründen des Tier-schutzes und des umfangreichen Operationsaufwandes bewusst klein gehalten. Damit wurde in Kauf genommen, dass die statistische Aussagekraft der Ergebnisse auf Grund kleiner Fallzahlen eingeschränkt ist. Auf Grund großer inter-individuellen Unterschiede und kleiner Stichproben weisen deshalb manche Ergebnisse keine signifikanten Unterschiede auf.

Zur Beurteilung der Nierenfunktion wurden die Parameter renaler Blutfluss (RBF), glomeruläre Filtrationsrate (GFR) sowohl Flüssigkeits- und Elektrolytausscheidung herangezogen. Es handelt sich dabei um Werte, die einerseits in der Nephrologie zur Beurteilung der Nierenfunktion etabliert und anerkannt sind, andererseits auch direkt durch den A_1 -Rezeptor beeinflusst werden.

Die hämodynamischen Untersuchungen unterliegen dem Einfluss der Narkose. Um die CCPA-Wirkungen auf Herzfrequenz und Blutdruck bei wachen Tieren während der Vorbehandlungsphase näher untersuchen zu können, hätten Tail cuff-Messungen oder telemetrische Messungen an wachen Tieren durchgeführt werden müssen, was den Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte.

Bei der Auswertung der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Nierenfunktion in geringem Maße auch durch die Narkose beeinflusst wird. Das Barbiturat Thiobutabarbital (Inactin) wird in der Nierenphysiologie standardmäßig eingesetzt, da es im Vergleich zu anderen Narkotika die Nierenfunktion verhältnismäßig gering beeinflusst. Es sorgt für stabile Blutdruckwerte und eine beständige Nierenfunktion, es erhöht jedoch auch geringfügig die GFR und sorgt für eine Zunahme des Extrazellulärvolumens (210). Ferner kommt es während der Narkose zu einer Zunahme der fraktionellen Natrium-, Kalium- und Flüssigkeitsausscheidung.

5.3.2 Vorbehandlung

Die Versuche wurden unter zwei verschiedenen Ausgangsbedingungen des Elektrolythaushaltes und damit auch unter niedriger oder hoher Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) durchgeführt. Anerkannt ist,

dass die Adenosinwirkung in der Niere vom NaCl-Haushalt und der Plasma-Renin-Aktivität abhängt (186, 187, 236). Durch eine kochsalzreiche Diät steigt die Adenosin-Konzentration in der Niere, während sie bei kochsalzarmer Ernährung sinkt. Unter NaCl-reicher Ernährung nimmt die vasokonstriktive Wirkung des Adenosins ab, während sie bei NaCl-armer Diät zunimmt. Bei Stimulation des RAAS durch NaCl-arme Diät wird die vasokonstriktive Wirkung von Adenosin verstärkt (187).

Maximale Kochsalzretention bzw. -diurese wurde durch Spezialfutter erzielt. Die Kochsalzdiät wurde nach etablierten Protokollen durchgeführt.

Die Wirksamkeit der Diät lässt sich einfach am Parameter Elektrolyt-ausscheidung überprüfen. Die Natrium-Ausscheidung entspricht der Natrium-Aufnahme, sobald sich ein Gleichgewicht eingestellt hat. Dazu wurde die Natrium-Konzentration im Urin an Tag 1 und Tag 7 gemessen.

Die Applikation von CCPA über das Trinkwasser birgt einige Unsicherheiten. So muss gewährleistet sein, dass CCPA im Trinkwasser über 24 Stunden gelöst bleibt. Um ein Ausfallen von CCPA zu vermeiden, wurde als Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt. DMSO wurde ebenso dem Trinkwasser der Kontrollgruppe zugefügt, um eine mögliche Beeinflussung des Trinkverhaltens durch DMSO auszugleichen. Die tatsächlich im Trinkwasser gelöste Menge nach 24 Stunden wurde bei dieser Arbeit nicht bestimmt. Ferner liegen keine gesicherten Daten zur Bioverfügbarkeit von CCPA vor. Eine Arbeit von Casati et al. zeigte, dass die orale Gabe von CCPA hinsichtlich Blutdruck und Herzfrequenz annähernd die gleiche Verfügbarkeit wie intraperitoneale Injektionen aufweist (36). Bei der Dosierung von CCPA wurden die Ergebnisse von Monopoli et al. (170) zu Grunde gelegt. Ein weiterer Faktor, der Einfluss auf die CCPA-Blutspiegel hat, ist das Trinkverhalten. Sollte es große tageszeitliche Schwankungen geben, hätte dies Einfluss auf die Plasmaspiegel von CCPA. Nach eigenen Beobachtungen verteilte sich die Trinkmenge relativ gleichmäßig über 24 Stunden, so dass diese Art der oralen Applikation gerechtfertigt erschien.

Auf die Messung von CCPA-Plasmaspiegeln wurde in dieser Arbeit verzichtet, da sie im Institut nicht etabliert, technisch anspruchsvoll und aufwändig ist.

Insofern bestehen gewisse Unsicherheiten bei der Beurteilung der vorliegenden Ergebnisse. Mit der gewählten Dosierung konnte bei beiden Diäten gezeigt werden, dass CCPA-Blutspiegel erreicht werden, die einen signifikanten Effekt erzielen. Unter NaCl-armer Diät zeigt sich nach Vorbehandlung mit CCPA eine niedrigere Plasma-Renin-Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei NaCl-reicher Ernährung senkt die CCPA-Gabe die Adenosin-A₁-Rezeptor-mRNA-Expression. Um diese Unsicherheit für weitergehende Untersuchungen ausschließen zu können, wird auf jeden Fall die Bestimmung von CCPA-Blutspiegeln empfohlen.

Als Alternative zur oralen Applikation wurden bei der Studienplanung osmotische Minipumpen der Firma Alzet in Betracht gezogen. Die Pumpen werden in Kurznarkose suprasternal implantiert und in die Vena jugularis eingesetzt. Damit können gesicherte und konstante CCPA-Konzentrationen im Plasma erzielt werden. Um eine operative Implantation der Pumpen zu Beginn der Vorbehandlung und eine daraus resultierende Beeinträchtigung der Tiere zu vermeiden, wurde darauf verzichtet.

5.3.1 Versuchsdurchführung

Bei der Versuchsdurchführung, wurden die operativen Eingriffe zur Messung der GFR und des RBF immer streng nach demselben Schema durchgeführt, um Störfaktoren und nicht erfasste Einflussgrößen zu reduzieren. Abweichungen bei der Versuchsdurchführung wurden im Versuchsprotokoll erfasst und gegebenenfalls das betroffene Tier bei der Auswertung ausgeschlossen.

5.4 Schlussfolgerung

Die Anwendung von neu entwickelten Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten verspricht eine Vielzahl an neuen Therapiemöglichkeiten (127). Erste Wirkstoffe haben klinische Studien durchlaufen und stehen vor der Zulassung. Eingeschränkt werden könnte der Einsatz von A₁-Agonisten jedoch durch eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Sollte die bei akuter Anwendung

beobachtete Reduktion der glomerulären Filtrationsrate, der renalen Durchblutung sowie die starke Antidiurese bei chronischer Stimulation des A₁-Rezeptors anhalten, wäre der Einsatz von A₁-Agonisten deutlich eingeschränkt. Da die Frage, ob eine Behandlung mit einem spezifischen A₁-Agonisten über sieben Tage zu einem Wirkungsverlust des A₁-Rezeptors in der Niere führt, bisher noch nicht beantwortet werden konnte, wurde diese Studie durchgeführt. Nach unserem Kenntnisstand handelt es sich dabei um die erste Untersuchung einer Tachyphylaxie in vivo bei chronischer Stimulation des Adenosin-A₁-Rezeptors in der Niere.

In der Literatur zeigen sich Hinweise auf einen Wirkungsverlust des A₁-Rezeptors bei chronischer Stimulation in Herz und Fettgewebe (35, 127, 260). Für die Niere liegen jedoch noch keine Untersuchungen vor, welche dies bestätigen. Die in dieser Studie gewonnenen Ergebnisse zeigen bei Sprague Dawley Ratten keinen Hinweis auf eine Tachyphylaxie durch die chronische Applikation des Adenosin-A₁-Agonisten CCPA über sieben Tage in der Niere. Unter kochsalzreicher Ernährung bewirkt die Vorbehandlung mit CCPA eine anhaltende Reduktion der Plasma-Renin-Aktivität. Die fraktionelle Natriumausscheidung bleibt nach siebentägiger Behandlung mit CCPA reduziert. Des Weiteren zeigt die Niere nach Vorbehandlung mit CCPA keine wesentliche Veränderung der vaskulären Antwort auf Adenosineinzelinjektionen. Auf molekularer Ebene konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung mit CCPA die mRNA-Expression des A₁-Rezeptors nur leicht senkt. Ferner bewirkt eine erneute Gabe von CCPA bei Tieren nach siebentägiger CCPA-Vorbehandlung einen ähnlichen Abfall der glomerulären Filtrationsrate, Urinvolumen und Natriumausscheidung wie in den Kontrollgruppen ohne Vorbehandlung. Diese Beobachtungen sprechen gegen eine Tachyphylaxie der durch den A₁-Rezeptor vermittelten Effekte. Da die Adenosinwirkung in der Niere von der Elektrolytaufnahme und des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems beeinflusst wird, wurde die Vorbehandlung mit CCPA unter kochsalzreicher und –reicher Diät durchgeführt. Dabei zeigte sich kein Einfluss des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems auf eine mögliche Tachyphylaxie durch CCPA.

Diese hier vorgestellten *in vivo* gewonnenen Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Untersuchungen *in vitro*, bei denen eine rasche Tachyphylaxie beobachtet wurde (80, 112). Auf der anderen Seite sind die Ergebnisse dieser Arbeit vereinbar mit einer Studie von Casati et al., die eine Tachyphylaxie bezüglich Blutdruck und Herzfrequenz bei Gabe von Adenosin-A₁-Agonisten erst nach einer Anwendung über 21 Tage beschreiben (35).

Die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie zeigen bei chronischer Gabe eines Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten keine Tachyphylaxie, das heißt, es besteht eine anhaltende Reduktion der renalen Durchblutung, der glomerulären Filtrationsrate sowie eine persistierende Antidiurese. Dies würde den Einsatz der von A₁-Agonisten einschränken. Es sind jedoch vertiefende Untersuchungen erforderlich, um einen dosisabhängigen Effekt der Tachyphylaxie sowie den Einfluss der Applikationsdauer zu prüfen.

6 Zusammenfassung

Mehrere selektive Adenosin-A₁-Agonisten haben klinische Studien durchlaufen und stehen kurz vor ihrer Zulassung. Bislang unzureichend aufgeklärt ist die Frage, welche Folgen eine dauerhafte Stimulation der A₁-Rezeptoren auf die Nierenfunktion hat. Der A₁-Rezeptor ist in der Niere wesentlich an der Regulation der Durchblutung und der Resorptionsleistung beteiligt. Eine kurzfristige Stimulation der A₁-Rezeptoren bewirkt unter anderem eine Reduktion der Nierendurchblutung und glomerulären Filtrationsleistung. Wenn diese Beeinträchtigung bei Langzeitanwendung persistiert, wäre der klinische Einsatz von A₁-Agonisten kritisch zu bewerten.

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen einer chronischen Behandlung mit einem Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonisten auf die Nierenfunktion zu untersuchen. Dazu wurde in einer kontrollierten randomisierten Studie Ratten der hochselektive Adenosin-A₁-Rezeptor-Agonist 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosin (CCPA) sieben Tage lang über das Trinkwasser zugeführt. Die Gabe von CCPA wurde sowohl unter kochsalzreicher- als auch kochsalzärmer Diät durchgeführt. Für die funktionelle Charakterisierung wurde die Elektrolytausscheidung bei wachen Tieren im Stoffwechselkäfig gemessen. In Narkose wurden renale Hämodynamik (RBF), glomeruläre Filtration (GFR) vor und nach erneuter Gabe von CCPA, Flüssigkeits- und Elektrolytausscheidung und Plasma-Renin-Aktivität (PRA) untersucht. Die Messung von RBF und GFR erfolgte in unterschiedlichen Versuchsgruppen, um nicht erfasste Störfaktoren zu reduzieren. Ferner wurde die Adenosin-Rezeptorexpression in der Niere bestimmt. Die Versuchsgruppen bestanden jeweils aus sechs bis acht Tieren.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass die siebentägige Vorbehandlung mit CCPA sowohl bei NaCl-reicher als auch bei NaCl-ärmer Diät keinen Einfluss auf den Gewichtsverlauf hat. Die an Tag 1 und 7 im Stoffwechselkäfig gemessene Urinmenge sowie Elektrolytausscheidung unterscheidet sich in den mit CCPA vorbehandelten Gruppen nicht von den Kontrollgruppen. Die orale Gabe von CCPA über sieben Tage führt unter beiden Kochsalz-Diäten nicht zu einer andauernden Senkung der GFR. Unter kochsalzärmer Ernährung bewirkt

die Vorbehandlung mit CCPA eine anhaltende Reduktion der PRA. Die erneute Applikation (i.v.) von CCPA in Narkose führt bei den CCPA-Gruppen als auch bei den Kontrollgruppen zu einer vergleichbaren Reduktion der GFR. Die Vorbehandlung mit CCPA erzielt hierbei keine Tachyphylaxie. Das Ausmaß des GFR-Abfalls ist bei NaCl-armer Diät stärker ausgeprägt als bei NaCl-reicher Diät. Mit CCPA vorbehandelte Tiere weisen in Narkose höhere Urinzeitvolumina auf als Tiere der Kontrollgruppen. Mit CCPA vorbehandelte Tiere weisen eine geringere absolute fraktionelle Na-Ausscheidung auf. Unter kochsalzreicher Diät zeigt sich zudem nach Vorbehandlung mit CCPA eine reduzierte absolute Natriumausscheidung in Narkose. Die Vorbehandlung mit CCPA bewirkt leicht erhöhte Natrium-Plasma-Spiegel und erniedrigte K-Plasma-Spiegel. Die Vorbehandlung mit CCPA hat keinen Einfluss auf Herzfrequenz und mittlerem arteriellen Blutdruck (MAP) in Narkose. Die erneute Gabe von CCPA (i.v.) bewirkt bei CCPA-vorbehandelten Tieren eine ähnliche Absenkung von Herzfrequenz und MAP wie in der Kontrollgruppe. Der renale Blutfluss und das Ansprechen der Nieren auf Adenosin-Einzelinjektionen werden durch die Vorbehandlung mit CCPA nicht verändert. Die Werte der CCPA-Gruppen unterscheiden sich bei beiden Diäten nicht gegenüber den Kontrollgruppen. Unter NaCl-reicher Diät führt die Vorbehandlung mit CCPA zu einer Reduktion der A_1 -Rezeptor-Expression. Dieser Effekt kann bei NaCl-armer Diät nicht beobachtet werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse sprechen gegen eine Tachyphylaxie der Nierenfunktionsbeeinträchtigung durch eine chronische Vorbehandlung mit einem hochselektiven Adenosin- A_1 -Rezeptor-Agonisten. Jedoch führte die dauerhafte Stimulation des A_1 -Rezeptors mit CCPA über sieben Tage in der gewählten Dosierung zu keiner relevanten Beeinträchtigung der Nierenfunktion. Wenn mit der gewählten Dosierung therapeutische Effekte erzielt werden können, so wird der Einsatz von Adenosin- A_1 -Agonisten nicht durch die Nierenfunktion limitiert. Ob durch längere Behandlung oder höhere Plasmaspiegel des A_1 -Agonisten eine Tachyphylaxie verursacht wird, kann mit dieser Arbeit nicht beantwortet werden und muss Inhalt weiterführender Studien sein.

7 Literaturverzeichnis

1. **Abbracchio MP, Fogliatto G, Paoletti AM, Rovati GE, and Cattabeni F.** Prolonged in vitro exposure of rat brain slices to adenosine analogues: selective desensitization of adenosine A1 but not A2 receptors. *Eur J Pharmacol* 227: 317-324, 1992.
2. **Adami M, Bertorelli R, Ferri N, Foddi MC, and Ongini E.** Effects of repeated administration of selective adenosine A1 and A2A receptor agonists on pentylentetrazole-induced convulsions in the rat. *Eur J Pharmacol* 294: 383-389, 1995.
3. **AderisPharmaceuticals.** Safety and efficacy study of an a1-adenosine receptor agonist to slow heart rate in atrial fibrillation. <http://www.clinicaltrials.gov>. Abgerufen am 20.01.2010.
4. **Agmon Y, Dinour D, and Brezis M.** Disparate effects of adenosine A1- and A2-receptor agonists on intrarenal blood flow. *Am J Physiol* 265: F802-806, 1993.
5. **Andreucci VE, Dal Canton A, and Corradi A.** Reliability of radioactive inulin as a marker of glomerular filtration rate in the rat. *Pflugers Arch* 350: 347-358, 1974.
6. **Arend LJ, Haramati A, Thompson CI, and Spielman WS.** Adenosine-induced decrease in renin release: dissociation from hemodynamic effects. *Am J Physiol* 247: F447-452, 1984.
7. **Auchampach JA, Jin X, Moore J, Wan TC, Kreckler LM, Ge ZD, Narayanan J, Whalley E, Kiesman W, Ticho B, Smits G, and Gross GJ.** Comparison of three different A1 adenosine receptor antagonists on infarct size and multiple cycle ischemic preconditioning in anesthetized dogs. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 846-856, 2004.
8. **Bak M and Thomsen K.** Effects of the adenosine A1 receptor inhibitor FK 838 on proximal tubular fluid output in rats. *Nephrol Dial Transplant* 19: 1077-1082, 2004.
9. **Balakrishnan VS, Coles GA, and Williams JD.** Effects of intravenous adenosine on renal function in healthy human subjects. *Am J Physiol* 271: F374-381, 1996.
10. **Balakrishnan VS, Coles GA, and Williams JD.** A potential role for endogenous adenosine in control of human glomerular and tubular function. *Am J Physiol* 265: F504-510, 1993.
11. **Barakat H, Davis J, Lang D, Mustafa SJ, and McConnaughey MM.** Differences in the expression of the adenosine A1 receptor in adipose tissue of obese black and white women. *J Clin Endocrinol Metab* 91: 1882-1886, 2006.
12. **Baraldi PG, Tabrizi MA, Gessi S, and Borea PA.** Adenosine receptor antagonists: translating medicinal chemistry and pharmacology into clinical utility. *Chem Rev* 108: 238-263, 2008.
13. **Baudouin-Legros M, Badou A, Paulais M, Hammet M, and Teulon J.** Hypertonic NaCl enhances adenosine release and hormonal cAMP production in mouse thick ascending limb. *Am J Physiol* 269: F103-109, 1995.
14. **Bayer HealthCare AG.** Study to investigate the effect of the A1 agonist capadenoson on ventricular HR in patients with persistent or permanent atrial fibrillation. <http://www.clinicaltrials.gov>. Abgerufen am 07.01.2010.
15. **Bayer Schering Pharma AG.** Capadenoson in Angina Pectoris. <http://www.clinicaltrials.gov>. Abgerufen am 07.01.2010.
16. **Beach RE and Good DW.** Effects of adenosine on ion transport in rat medullary thick ascending limb. *Am J Physiol* 263: F482-487, 1992.
17. **Beach RE, Watts BA, 3rd, Good DW, Benedict CR, and DuBose TD, Jr.** Effects of graded oxygen tension on adenosine release by renal medullary and thick ascending limb suspensions. *Kidney Int* 39: 836-842, 1991.

18. **Bell TD, Luo Z, and Welch WJ.** Glomerular tubular balance is suppressed in adenosine type 1 receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 299: F1158-1163, 2010.
19. **Bier A.** Die Entstehung des Kollateralkreislaufs Theil II, Der Rückfluss des Blutes aus ischämischen Körperteilen *Virchows Arch, phat Anat.* 434 -465, 1898.
20. **Biotrend.** Produktinformation CCPA. Wangen/Zürich.
21. **Bjorklund O, Shang M, Tonazzini I, Dare E, and Fredholm BB.** Adenosine A1 and A3 receptors protect astrocytes from hypoxic damage. *Eur J Pharmacol* 596: 6-13, 2008.
22. **Blackburn MR, Vance CO, Morschl E, and Wilson CN.** Adenosine receptors and inflammation. *Handb Exp Pharmacol*: 215-269, 2009.
23. **Bohle A, Christensen J, Kokot F, Osswald H, Schubert B, Kendziorra H, Pressler H, and Marcovic-Lipkovski J.** Acute renal failure in man: new aspects concerning pathogenesis. A morphometric study. *Am J Nephrol* 10: 374-388, 1990.
24. **Botev R, Mallie JP, Couchoud C, Schuck O, Fauvel JP, Wetzels JF, Lee N, De Santo NG, and Cirillo M.** Estimating glomerular filtration rate: Cockcroft-Gault and Modification of Diet in Renal Disease formulas compared to renal inulin clearance. *Clin J Am Soc Nephrol* 4: 899-906, 2009.
25. **Broman M and Kallskog O.** The effects of hypothermia on renal function and haemodynamics in the rat. *Acta Physiol Scand* 153: 179-184, 1995.
26. **Brosius F.** SPSS 16. Frechen: Mitp Verlag, 2008.
27. **Brown R, Ollerstam A, Johansson B, Skott O, Gebre-Medhin S, Fredholm B, and Persson AE.** Abolished tubuloglomerular feedback and increased plasma renin in adenosine A1 receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 281: R1362-1367, 2001.
28. **Buckley S, Driscoll B, Barsky L, Weinberg K, Anderson K, and Warburton D.** ERK activation protects against DNA damage and apoptosis in hyperoxic rat AEC2. *Am J Physiol* 277: L159-166, 1999.
29. **Budohoski L, Challiss RA, McManus B, and Newsholme EA.** Effects of analogues of adenosine and methyl xanthines on insulin sensitivity in soleus muscle of the rat. *FEBS Lett* 167: 1-4, 1984.
30. **Buhr C, Gossl M, Erbel R, and Eggebrecht H.** Regadenoson in the detection of coronary artery disease. *Vasc Health Risk Manag* 4: 337-340, 2008.
31. **Burnatowska-Hledin MA and Spielman WS.** Effects of adenosine on cAMP production and cytosolic Ca²⁺ in cultured rabbit medullary thick limb cells. *Am J Physiol* 260: C143-150, 1991.
32. **Cai H, Batuman V, Puschett DB, and Puschett JB.** Effect of KW-3902, a novel adenosine A1 receptor antagonist, on sodium-dependent phosphate and glucose transport by the rat renal proximal tubular cell. *Life Sci* 55: 839-845, 1994.
33. **Cai H, Puschett DB, Guan S, Batuman V, and Puschett JB.** Phosphate transport inhibition by KW-3902, an adenosine A1 receptor antagonist, is mediated by cyclic adenosine monophosphate. *Am J Kidney Dis* 26: 825-830, 1995.
34. **Carlstrom M, Wilcox CS, and Welch WJ.** Adenosine A2 Receptors Modulate the Tubuloglomerular Feedback. *Am J Physiol*, 2010.
35. **Casati C, Monopoli A, Dionisotti S, Zocchi C, Bonizzoni E, and Ongini E.** Repeated administration of selective adenosine A1 and A2 receptor agonists in the spontaneously hypertensive rat: tolerance develops to A1-mediated hemodynamic effects. *J Pharmacol Exp Ther* 268: 1506-1511, 1994.
36. **Casati C, Monopoli A, Forlani A, Bonizzoni E, and Ongini E.** Telemetry monitoring of hemodynamic effects induced over time by adenosine agonists in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 275: 914-919, 1995.
37. **Chen Y and Bache RJ.** Adenosine: a modulator of the cardiac response to stress. *Circ Res* 93: 691-693, 2003.
38. **Churchill PC and Bidani A.** Renal effects of selective adenosine receptor agonists in anesthetized rats. *Am J Physiol* 252: F299-303, 1987.

39. **Churchill PC, Bidani AK, Churchill MC, and Prada J.** Renal effects of 2-chloroadenosine in the two-kidney Goldblatt rat. *J Pharmacol Exp Ther* 230: 302-306, 1984.
40. **Cohen MV and Downey JM.** Adenosine: trigger and mediator of cardioprotection. *Basic Res Cardiol* 103: 203-215, 2008.
41. **Concas A, Santoro G, Mascia MP, Maciocco E, Dazzi L, Ongini E, and Biggio G.** Anticonvulsant doses of 2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosine, an adenosine A1 receptor agonist, reduce GABAergic transmission in different areas of the mouse brain. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 844-851, 1993.
42. **Conti A, Monopoli A, Gamba M, Borea PA, and Ongini E.** Effects of selective A1 and A2 adenosine receptor agonists on cardiovascular tissues. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 348: 108-112, 1993.
43. **Cotter G, Dittrich HC, Weatherley BD, Bloomfield DM, O'Connor CM, Metra M, and Massie BM.** The PROTECT pilot study: a randomized, placebo-controlled, dose-finding study of the adenosine A1 receptor antagonist rolofylline in patients with acute heart failure and renal impairment. *J Card Fail* 14: 631-640, 2008.
44. **CV Therapeutics.** Press Release: CV Therapeutics and Astellas Announce FDA Approval for Lexiscan(TM) (regadenoson) Injection. <http://www.reuters.com/article/idUS252086+10-Apr-2008+PRN20080410>. 2008. Abgerufen am 20.01.2010.
45. **Dai C, Kiss LP, and Liu Y.** Animal Models of Kidney Diseases. in Con M: Sourcebook of Models for Biomedical Research. Totowa, New Jersey: Humana Press. 2008, p. 657-664.
46. **Dana A, Baxter GF, Walker JM, and Yellon DM.** Prolonging the delayed phase of myocardial protection: repetitive adenosine A1 receptor activation maintains rabbit myocardium in a preconditioned state. *J Am Coll Cardiol* 31: 1142-1149, 1998.
47. **Dhalla AK, Chisholm JW, Reaven GM, and Belardinelli L.** A1 adenosine receptor: role in diabetes and obesity. *Handb Exp Pharmacol*: 271-295, 2009.
48. **Dhalla AK, Santikul M, Smith M, Wong MY, Shryock JC, and Belardinelli L.** Antilipolytic activity of a novel partial A1 adenosine receptor agonist devoid of cardiovascular effects: comparison with nicotinic acid. *J Pharmacol Exp Ther* 321: 327-333, 2007.
49. **Dhalla AK, Shryock JC, Shreenivas R, and Belardinelli L.** Pharmacology and therapeutic applications of A1 adenosine receptor ligands. *Curr Top Med Chem* 3: 369-385, 2003.
50. **Dietrich MS, Endlich K, Parekh N, and Steinhausen M.** Interaction between adenosine and angiotensin II in renal microcirculation. *Microvasc Res* 41: 275-288, 1991.
51. **Dietrich MS and Steinhausen M.** Differential reactivity of cortical and juxtamedullary glomeruli to adenosine-1 and adenosine-2 receptor stimulation and angiotensin-converting enzyme inhibition. *Microvasc Res* 45: 122-133, 1993.
52. **Dittrich HC, Gupta DK, Hack TC, Dowling T, Callahan J, and Thomson S.** The effect of KW-3902, an adenosine A1 receptor antagonist, on renal function and renal plasma flow in ambulatory patients with heart failure and renal impairment. *J Card Fail* 13: 609-617, 2007.
53. **Dohadwala MM and Givertz MM.** Role of adenosine antagonism in the cardiorenal syndrome. *Cardiovasc Ther* 26: 276-286, 2008.
54. **Dong Q, Ginsberg HN, and Erlanger BF.** Overexpression of the A1 adenosine receptor in adipose tissue protects mice from obesity-related insulin resistance. *Diabetes Obes Metab* 3: 360-366, 2001.
55. **Drury AN and Szent-Gyorgyi A.** The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. *J Physiol* 68: 213-237, 1929.

56. **Dunwiddie TV.** The physiological role of adenosine in the central nervous system. *Int Rev Neurobiol* 27: 63-139, 1985.
57. **Dunwiddie TV and Masino SA.** The role and regulation of adenosine in the central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 24: 31-55, 2001.
58. **Dunwiddie TV and Worth T.** Sedative and anticonvulsant effects of adenosine analogs in mouse and rat. *J Pharmacol Exp Ther* 220: 70-76, 1982.
59. **Eckle T, Faigle M, Grenz A, Laucher S, Thompson LF, and Eltzschig HK.** A2B adenosine receptor dampens hypoxia-induced vascular leak. *Blood* 111: 2024-2035, 2008.
60. **Edlund A, Ohlsen H, and Sollevi A.** Renal effects of local infusion of adenosine in man. *Clin Sci (Lond)* 87: 143-149, 1994.
61. **Edlund A and Sollevi A.** Renal effects of i.v. adenosine infusion in humans. *Clin Physiol* 13: 361-371, 1993.
62. **Ellenbogen KA, O'Neill G, Prystowsky EN, Camm JA, Meng L, Lieu HD, Jerling M, Shreenivas R, Belardinelli L, and Wolff AA.** Trial to evaluate the management of paroxysmal supraventricular tachycardia during an electrophysiology study with tecedanoson. *Circulation* 111: 3202-3208, 2005.
63. **Elzein E, Kalla R, Li X, Perry T, Marquart T, Micklatcher M, Li Y, Wu Y, Zeng D, and Zablocki J.** N6-Cycloalkyl-2-substituted adenosine derivatives as selective, high affinity adenosine A1 receptor agonists. *Bioorg Med Chem Lett* 17: 161-166, 2007.
64. **Elzein E and Zablocki J.** A1 adenosine receptor agonists and their potential therapeutic applications. *Expert Opin Investig Drugs* 17: 1901-1910, 2008.
65. **Erley CM, Duda SH, Reh fuss D, Scholtes B, Bock J, Muller C, Osswald H, and Risler T.** Prevention of radiocontrast-media-induced nephropathy in patients with pre-existing renal insufficiency by hydration in combination with the adenosine antagonist theophylline. *Nephrol Dial Transplant* 14: 1146-1149, 1999.
66. **Erley CM, Duda SH, Schlepckow S, Koehler J, Huppert PE, Strohmaier WL, Bohle A, Risler T, and Osswald H.** Adenosine antagonist theophylline prevents the reduction of glomerular filtration rate after contrast media application. *Kidney Int* 45: 1425-1431, 1994.
67. **Erley CM, Heyne N, Burgert K, Langanke J, Risler T, and Osswald H.** Prevention of radiocontrast-induced nephropathy by adenosine antagonists in rats with chronic nitric oxide deficiency. *J Am Soc Nephrol* 8: 1125-1132, 1997.
68. **Erley CM, Heyne N, Rossmeier S, Vogel T, Risler T, and Osswald H.** Adenosine and extracellular volume in radiocontrast media-induced nephropathy. *Kidney Int Suppl* 67: S192-194, 1998.
69. **Farbom P, Wahlstrand B, Almgren P, Skrtic S, Lanke J, Weiss L, Kjeldsen S, Hedner T, and Melander O.** Interaction between renal function and microalbuminuria for cardiovascular risk in hypertension: the nordic diltiazem study. *Hypertension* 52: 115-122, 2008.
70. **Fatholahi M, Xiang Y, Wu Y, Li Y, Wu L, Dhalla AK, Belardinelli L, and Shryock JC.** A novel partial agonist of the A(1)-adenosine receptor and evidence of receptor homogeneity in adipocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 317: 676-684, 2006.
71. **Fishman P, Bar-Yehuda S, Synowitz M, Powell JD, Klotz KN, Gessi S, and Borea PA.** Adenosine receptors and cancer. *Handb Exp Pharmacol*: 399-441, 2009.
72. **Franco M, Bautista R, Perez-Mendez O, Gonzalez L, Pacheco U, Sanchez-Lozada LG, Santamaria J, Tapia E, Monreal R, and Martinez F.** Renal interstitial adenosine is increased in angiotensin II-induced hypertensive rats. *Am J Physiol* 294: F84-92, 2008.
73. **Franco M, Bell PD, and Navar LG.** Effect of adenosine A1 analogue on tubuloglomerular feedback mechanism. *Am J Physiol* 257: F231-236, 1989.

74. **Franco M, Perez-Mendez O, and Martinez F.** Interaction of intrarenal adenosine and angiotensin II in kidney vascular resistance. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 18: 63-67, 2009.
75. **Fredholm BB, AP IJ, Jacobson KA, Klotz KN, and Linden J.** International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. *Pharmacol Rev* 53: 527-552, 2001.
76. **Fredholm BB, Chen JF, Masino SA, and Vaugeois JM.** Actions of adenosine at its receptors in the CNS: insights from knockouts and drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 45: 385-412, 2005.
77. **Freissmuth M, Schutz W, and Linder ME.** Interactions of the bovine brain A1-adenosine receptor with recombinant G protein alpha-subunits. Selectivity for rGi alpha-3. *J Biol Chem* 266: 17778-17783, 1991.
78. **Funaya H, Kitakaze M, Node K, Minamino T, Komamura K, and Hori M.** Plasma adenosine levels increase in patients with chronic heart failure. *Circulation* 95: 1363-1365, 1997.
79. **Gabriels G, Endlich K, Rahn KH, Schlatter E, and Steinhausen M.** In vivo effects of diadenosine polyphosphates on rat renal microcirculation. *Kidney Int* 57: 2476-2484, 2000.
80. **Gao Z, Robeva AS, and Linden J.** Purification of A1 adenosine receptor-G-protein complexes: effects of receptor down-regulation and phosphorylation on coupling. *Biochem J* 338 (Pt 3): 729-736, 1999.
81. **Gao ZG and Jacobson KA.** 2-Chloro-N(6)-cyclopentyladenosine, adenosine A(1) receptor agonist, antagonizes the adenosine A(3) receptor. *Eur J Pharmacol* 443: 39-42, 2002.
82. **Gao ZG and Jacobson KA.** Emerging adenosine receptor agonists. *Expert Opin Emerg Drugs* 12: 479-492, 2007.
83. **Gao ZG, Kim SK, Ijzerman AP, and Jacobson KA.** Allosteric modulation of the adenosine family of receptors. *Mini Rev Med Chem* 5: 545-553, 2005.
84. **Genovesi S, Pieruzzi F, Camisasca P, Ragonesi G, Protasoni G, Golin R, Zanchetti A, and Stella A.** Effects of adenosine receptor agonists on efferent renal nerve activity in anesthetized rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 35: 189-194, 2000.
85. **Gilead.** Pipeline. <http://www.gilead.com/pipeline>. Abgerufen am 22.01.2010.
86. **Gimenez-Llort L, Fernandez-Teruel A, Escorihuela RM, Fredholm BB, Tobena A, Pekny M, and Johansson B.** Mice lacking the adenosine A1 receptor are anxious and aggressive, but are normal learners with reduced muscle strength and survival rate. *Eur J Neurosci* 16: 547-550, 2002.
87. **Givertz MM.** Adenosine A1 receptor antagonists at a fork in the road. *Circ Heart Fail* 2: 519-522, 2009.
88. **Givertz MM, Massie BM, Fields TK, Pearson LL, and Dittrich HC.** The effects of KW-3902, an adenosine A1-receptor antagonist, on diuresis and renal function in patients with acute decompensated heart failure and renal impairment or diuretic resistance. *J Am Coll Cardiol* 50: 1551-1560, 2007.
89. **Goblyos A and Ijzerman AP.** Allosteric modulation of adenosine receptors. *Purinergic Signal* 5: 51-61, 2009.
90. **Gomes CV, Kaster MP, Tome AR, Agostinho PM, and Cunha RA.** Adenosine receptors and brain diseases: neuroprotection and neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1808: 1380-1399, 2011.
91. **Gottlieb SS.** Adenosine A1 antagonists and the cardiorenal syndrome. *Curr Heart Fail Rep* 5: 105-109, 2008.
92. **Gottlieb SS.** Renal effects of adenosine A1-receptor antagonists in congestive heart failure. *Drugs* 61: 1387-1393, 2001.
93. **Gottlieb SS, Brater DC, Thomas I, Havranek E, Bourge R, Goldman S, Dyer F, Gomez M, Bennett D, Ticho B, Beckman E, and Abraham WT.** BG9719 (CVT-

- 124), an A1 adenosine receptor antagonist, protects against the decline in renal function observed with diuretic therapy. *Circulation* 105: 1348-1353, 2002.
94. **Gottlieb SS, Givertz MM, Metra M, Gergich K, Bird S, Jones-Burton C, Massie B, Cotter G, Ponikowski P, Weatherley B, O'Connor C, and Dittrich H.** The effects of adenosine A(1) receptor antagonism in patients with acute decompensated heart failure and worsening renal function: the REACH UP study. *J Card Fail* 16: 714-719, 2010.
95. **Gottlieb SS, Skettino SL, Wolff A, Beckman E, Fisher ML, Freudenberger R, Gladwell T, Marshall J, Cines M, Bennett D, and Liittschwager EB.** Effects of BG9719 (CVT-124), an A1-adenosine receptor antagonist, and furosemide on glomerular filtration rate and natriuresis in patients with congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 35: 56-59, 2000.
96. **Gouder N, Fritschy JM, and Boison D.** Seizure suppression by adenosine A1 receptor activation in a mouse model of pharmacoresistant epilepsy. *Epilepsia* 44: 877-885, 2003.
97. **Gouyon JB and Guignard JP.** Theophylline prevents the hypoxemia-induced renal hemodynamic changes in rabbits. *Kidney Int* 33: 1078-1083, 1988.
98. **Green A.** Adenosine receptor down-regulation and insulin resistance following prolonged incubation of adipocytes with an A1 adenosine receptor agonist. *J Biol Chem* 262: 15702-15707, 1987.
99. **Grenz A, Osswald H, Eckle T, Yang D, Zhang H, Tran ZV, Klingel K, Ravid K, and Eltzschig HK.** The reno-vascular A2B adenosine receptor protects the kidney from ischemia. *PLoS Med* 5: e137, 2008.
100. **Grenz A, Zhang H, Eckle T, Mittelbronn M, Wehrmann M, Kohle C, Kloor D, Thompson LF, Osswald H, and Eltzschig HK.** Protective role of ecto-5'-nucleotidase (CD73) in renal ischemia. *J Am Soc Nephrol* 18: 833-845, 2007.
101. **Grenz A, Zhang H, Weingart J, von Wietersheim S, Eckle T, Schnermann J, Kohle C, Kloor D, Gleiter CH, Vallon V, Eltzschig HK, and Osswald H.** Lack of effect of extracellular adenosine generation and signaling on renal erythropoietin secretion during hypoxia. *Am J Physiol* 293: F1501-1511, 2007.
102. **Grupp G and Heimpel H.** [Problem of reactive hyperemia of the kidneys.]. *Pflugers Arch* 267: 426-433, 1958.
103. **Hall JE and Granger JP.** Renal hemodynamics and arterial pressure during chronic intrarenal adenosine infusion in conscious dogs. *Am J Physiol* 250: F32-39, 1986.
104. **Hansen PB, Hashimoto S, Briggs J, and Schnermann J.** Attenuated renovascular constrictor responses to angiotensin II in adenosine 1 receptor knockout mice. *Am J Physiol* 285: R44-49, 2003.
105. **Haselkorn ML, Shellington DK, Jackson EK, Vagni VA, Janesko-Feldman K, Dubey RK, Gillespie DG, Cheng D, Bell MJ, Jenkins LW, Homanics GE, Schnermann J, and Kochanek PM.** Adenosine A1 receptor activation as a brake on the microglial response after experimental traumatic brain injury in mice. *J Neurotrauma* 27: 901-910, 2010.
106. **Hashimoto S, Huang Y, Briggs J, and Schnermann J.** Reduced autoregulatory effectiveness in adenosine 1 receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 290: F888-891, 2006.
107. **Helmlinger J.** *Das experimentell erzeugte akute ischämische Nierenversagen bei der Ratte.* (Dissertation): Universität Aachen, 1979.
108. **Hess S.** Recent advances in adenosine receptor antagonist research. *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 11: 1533-1561, 2001.
109. **Hillege HL, Girbes AR, de Kam PJ, Boomsma F, de Zeeuw D, Charlesworth A, Hampton JR, and van Veldhuisen DJ.** Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation* 102: 203-210, 2000.

110. **Hocher B.** Adenosine A1 receptor antagonists in clinical research and development. *Kidney Int* 78: 438-445, 2010.
111. **Hoenderop JG, Hartog A, Willems PH, and Bindels RJ.** Adenosine-stimulated Ca²⁺ reabsorption is mediated by apical A1 receptors in rabbit cortical collecting system. *Am J Physiol* 274: F736-743, 1998.
112. **Hoffman BB, Chang H, Dall'Aglio E, and Reaven GM.** Desensitization of adenosine receptor-mediated inhibition of lipolysis. The mechanism involves the development of enhanced cyclic adenosine monophosphate accumulation in tolerant adipocytes. *J Clin Invest* 78: 185-190, 1986.
113. **Holz FG and Steinhausen M.** Renovascular effects of adenosine receptor agonists. *Ren Physiol* 10: 272-282, 1987.
114. **Huber W, Ilgmann K, Page M, Hennig M, Schweigart U, Jeschke B, Lutinsky L, Weiss W, Salmhofer H, and Classen M.** Effect of theophylline on contrast material-nephropathy in patients with chronic renal insufficiency: controlled, randomized, double-blinded study. *Radiology* 223: 772-779, 2002.
115. **Huber W, Schipek C, Ilgmann K, Page M, Hennig M, Wacker A, Schweigart U, Lutinsky L, Valina C, Seyfarth M, Schomig A, and Classen M.** Effectiveness of theophylline prophylaxis of renal impairment after coronary angiography in patients with chronic renal insufficiency. *Am J Cardiol* 91: 1157-1162, 2003.
116. **Incho EW.** Purinoceptor-mediated regulation of the renal microvasculature. *J Auton Pharmacol* 16: 385-388, 1996.
117. **Incho EW, Carmines PK, and Navar LG.** Juxtamedullary afferent arteriolar responses to P1 and P2 purinergic stimulation. *Hypertension* 17: 1033-1037, 1991.
118. **Ishikawa J, Mitani H, Bandoh T, Kimura M, Totsuka T, and Hayashi S.** Hypoglycemic and hypotensive effects of 6-cyclohexyl-2'-O-methyl-adenosine, an adenosine A1 receptor agonist, in spontaneously hypertensive rat complicated with hyperglycemia. *Diabetes Res Clin Pract* 39: 3-9, 1998.
119. **Itoh S, Carretero OA, and Murray RD.** Possible role of adenosine in the macula densa mechanism of renin release in rabbits. *J Clin Invest* 76: 1412-1417, 1985.
120. **Jackson EK, Kost CK, Jr., Herzer WA, Smits GJ, and Tofovic SP.** A(1) receptor blockade induces natriuresis with a favorable renal hemodynamic profile in SHHF/Mcc-fa(cp) rats chronically treated with salt and furosemide. *J Pharmacol Exp Ther* 299: 978-987, 2001.
121. **Jacobson KA.** Introduction to adenosine receptors as therapeutic targets. *Handb Exp Pharmacol*: 1-24, 2009.
122. **Jacobson KA and Gao ZG.** Adenosine receptors as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 5: 247-264, 2006.
123. **Joo JD, Kim M, Horst P, Kim J, D'Agati VD, Emala CW, Sr., and Lee HT.** Acute and delayed renal protection against renal ischemia and reperfusion injury with A1 adenosine receptors. *Am J Physiol* 293: F1847-1857, 2007.
124. **Kang HS, Kerstan D, Dai LJ, Ritchie G, and Quamme GA.** Adenosine modulates Mg(2+) uptake in distal convoluted tubule cells via A(1) and A(2) purinoceptors. *Am J Physiol* 281: F1141-1147, 2001.
125. **Kemper R.** Die antagonistischen Wirkungen von Adenosin und Theophyllin auf die Nierenfunktion der Ratte [Dissertation]: Universität Aachen, 1976.
126. **Kennedy SG, Kandel ES, Cross TK, and Hay N.** Akt/Protein kinase B inhibits cell death by preventing the release of cytochrome c from mitochondria. *Mol Cell Biol* 19: 5800-5810, 1999.
127. **Kiesman WF, Elzein E, and Zablocki J.** A1 adenosine receptor antagonists, agonists, and allosteric enhancers. *Handb Exp Pharmacol*: 25-58, 2009.

128. **Kim SM, Mizel D, Huang YG, Briggs JP, and Schnermann J.** Adenosine as a mediator of macula densa-dependent inhibition of renin secretion. *Am J Physiol* 290: F1016-1023, 2006.
129. **KingPharmaceuticals.** Analgesic Efficacy and Safety Study of T-62 in Subjects With Postherpetic Neuralgia. 2008. <http://www.clinicaltrials.gov>. Abgerufen am 20.01.2010., 2008.
130. **Kirsch GE, Codina J, Birnbaumer L, and Brown AM.** Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A₁ receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol* 259: H820-826, 1990.
131. **Klaasse EC, Ijzerman AP, de Grip WJ, and Beukers MW.** Internalization and desensitization of adenosine receptors. *Purinergic Signal* 4: 21-37, 2008.
132. **Klotz KN.** Adenosine receptors and their ligands. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 382-391, 2000.
133. **Klotz KN, Hessling J, Hegler J, Owman C, Kull B, Fredholm BB, and Lohse MJ.** Comparative pharmacology of human adenosine receptor subtypes - characterization of stably transfected receptors in CHO cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 357: 1-9, 1998.
134. **Knight RJ, Bowmer CJ, and Yates MS.** The diuretic action of 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, a selective A₁ adenosine receptor antagonist. *Br J Pharmacol* 109: 271-277, 1993.
135. **Knutsen LJ, Lau J, Petersen H, Thomsen C, Weis JU, Shalmi M, Judge ME, Hansen AJ, and Sheardown MJ.** N-substituted adenosines as novel neuroprotective A₁(1) agonists with diminished hypotensive effects. *J Med Chem* 42: 3463-3477, 1999.
136. **Kochanek PM, Vagni VA, Janesko KL, Washington CB, Crumrine PK, Garman RH, Jenkins LW, Clark RS, Homanics GE, Dixon CE, Schnermann J, and Jackson EK.** Adenosine A₁ receptor knockout mice develop lethal status epilepticus after experimental traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab* 26: 565-575, 2006.
137. **Koschlakoff.** Beobachtungen über die Wirkungen des citronensauren Coffein's. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 31: 436-445, 1864.
138. **Kulick A, Panico C, Gill P, and Welch WJ.** Low salt intake increases adenosine type 1 receptor expression and function in the rat proximal tubule. *Am J Physiol* 295: F37-41, 2008.
139. **Lai EY, Martinka P, Fahling M, Mrowka R, Steege A, Gericke A, Sendeski M, Persson PB, Persson AE, and Patzak A.** Adenosine restores angiotensin II-induced contractions by receptor-independent enhancement of calcium sensitivity in renal arterioles. *Circ Res* 99: 1117-1124, 2006.
140. **Lai EY, Patzak A, Persson AE, and Carlstrom M.** Angiotensin II enhances the afferent arteriolar response to adenosine through increases in cytosolic calcium. *Acta Physiol (Oxf)* 196: 435-445, 2009.
141. **Lara DR, Dall'Igna OP, Ghisolfi ES, and Brunstein MG.** Involvement of adenosine in the neurobiology of schizophrenia and its therapeutic implications. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 30: 617-629, 2006.
142. **Lee HT and Emala CW.** Protective effects of renal ischemic preconditioning and adenosine pretreatment: role of A₁(1) and A₃(3) receptors. *Am J Physiol* 278: F380-387, 2000.
143. **Lee HT and Emala CW.** Protein kinase C and G(i/o) proteins are involved in adenosine- and ischemic preconditioning-mediated renal protection. *J Am Soc Nephrol* 12: 233-240, 2001.
144. **Lee HT and Emala CW.** Systemic adenosine given after ischemia protects renal function via A_{2a}(2a) adenosine receptor activation. *Am J Kidney Dis* 38: 610-618, 2001.

145. **Lee HT, Gallos G, Nasr SH, and Emala CW.** A1 adenosine receptor activation inhibits inflammation, necrosis, and apoptosis after renal ischemia-reperfusion injury in mice. *J Am Soc Nephrol* 15: 102-111, 2004.
146. **Lee HT, Jan M, Bae SC, Joo JD, Goubaeva FR, Yang J, and Kim M.** A1 adenosine receptor knockout mice are protected against acute radiocontrast nephropathy in vivo. *Am J Physiol* 290: F1367-1375, 2006.
147. **Lee HT, Ota-Setlik A, Xu H, D'Agati VD, Jacobson MA, and Emala CW.** A3 adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia- and myoglobinuria-induced renal failure. *Am J Physiol* 284: F267-273, 2003.
148. **Lee HT, Thompson CI, Hernandez A, Lewy JL, and Belloni FL.** Cardiac desensitization to adenosine analogues after prolonged R-PIA infusion in vivo. *Am J Physiol* 265: H1916-1927, 1993.
149. **Lee HT, Xu H, Nasr SH, Schnermann J, and Emala CW.** A1 adenosine receptor knockout mice exhibit increased renal injury following ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 286: F298-306, 2004.
150. **Li X, Bantel C, Conklin D, Childers SR, and Eisenach JC.** Repeated dosing with oral allosteric modulator of adenosine A1 receptor produces tolerance in rats with neuropathic pain. *Anesthesiology* 100: 956-961, 2004.
151. **Li X, Conklin D, Ma W, Zhu X, and Eisenach JC.** Spinal noradrenergic activation mediates allodynia reduction from an allosteric adenosine modulator in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 97: 117-125, 2002.
152. **Liao Y, Takashima S, Asano Y, Asakura M, Ogai A, Shintani Y, Minamino T, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Ogita H, Tomoike H, Hori M, and Kitakaze M.** Activation of adenosine A1 receptor attenuates cardiac hypertrophy and prevents heart failure in murine left ventricular pressure-overload model. *Circ Res* 93: 759-766, 2003.
153. **Lin JJ, Churchill PC, and Bidani AK.** Effect of theophylline on the initiation phase of postischemic acute renal failure in rats. *J Lab Clin Med* 108: 150-154, 1986.
154. **Liu XJ and Salter MW.** Purines and pain mechanisms: recent developments. *Curr Opin Investig Drugs* 6: 65-75, 2005.
155. **Livingston M, Heaney LG, and Ennis M.** Adenosine, inflammation and asthma--a review. *Inflamm Res* 53: 171-178, 2004.
156. **Löffler G and Petrides P.** Biochemie & Pathobiochemie. Berlin: Springer, 2002.
157. **Lohse MJ, Klotz KN, Schwabe U, Cristalli G, Vittori S, and Grifantini M.** 2-Chloro-N⁶-cyclopentyladenosine: a highly selective agonist at A1 adenosine receptors. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337: 687-689, 1988.
158. **Longabaugh JP, Didsbury J, Spiegel A, and Stiles GL.** Modification of the rat adipocyte A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system during chronic exposure to an A1 adenosine receptor agonist: alterations in the quantity of G_s alpha and G_i alpha are not associated with changes in their mRNAs. *Mol Pharmacol* 36: 681-688, 1989.
159. **Lorenz JN, Weihprecht H, He XR, Skott O, Briggs JP, and Schnermann J.** Effects of adenosine and angiotensin on macula densa-stimulated renin secretion. *Am J Physiol* 265: F187-194, 1993.
160. **Lucas DG, Jr., Hendrick JW, Sample JA, Mukherjee R, Escobar GP, Smits GJ, Crawford FA, Jr., and Spinale FG.** Cardiorenal effects of adenosine subtype 1 (A1) receptor inhibition in an experimental model of heart failure. *J Am Coll Surg* 194: 603-609, 2002.
161. **Macias JF, Fiksen-Olsen M, Romero JC, and Knox FG.** Intrarenal blood flow distribution during adenosine-mediated vasoconstriction. *Am J Physiol* 244: H138-141, 1983.
162. **Matias A, Zimmer FJ, Lorenzen A, Keil R, and Schwabe U.** Affinity of central adenosine A1 receptors is decreased in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol* 244: 223-230, 1993.

163. **McCoy DE, Bhattacharya S, Olson BA, Levier DG, Arend LJ, and Spielman WS.** The renal adenosine system: structure, function, and regulation. *Semin Nephrol* 13: 31-40, 1993.
164. **Merrill JT, Shen C, Schreiber D, Coffey D, Zakharenko O, Fisher R, Lahita RG, Salmon J, and Cronstein BN.** Adenosine A1 receptor promotion of multinucleated giant cell formation by human monocytes: a mechanism for methotrexate-induced nodulosis in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 40: 1308-1315, 1997.
165. **Miller WL, Thomas RA, Berne RM, and Rubio R.** Adenosine production in the ischemic kidney. *Circ Res* 43: 390-397, 1978.
166. **Miyamoto M, Yagil Y, Larson T, Robertson C, and Jamison RL.** Effects of intrarenal adenosine on renal function and medullary blood flow in the rat. *Am J Physiol* 255: F1230-1234, 1988.
167. **Mizumoto H and Karasawa A.** Effects of adenosine A1-agonist and -antagonist on urinary volume and Na excretion in IAP-treated and non-treated rats. *Jpn J Pharmacol* 63: 257-259, 1993.
168. **Mizumoto H and Karasawa A.** Renal tubular site of action of KW-3902, a novel adenosine A1-receptor antagonist, in anesthetized rats. *Jpn J Pharmacol* 61: 251-253, 1993.
169. **Mizumura T, Auchampach JA, Linden J, Bruns RF, and Gross GJ.** PD 81,723, an allosteric enhancer of the A1 adenosine receptor, lowers the threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Circ Res* 79: 415-423, 1996.
170. **Monopoli A, Conti A, Dionisotti S, Casati C, Camaioni E, Cristalli G, and Ongini E.** Pharmacology of the highly selective A1 adenosine receptor agonist 2-chloro-N6-cyclopentyladenosine. *Arzneimittelforschung* 44: 1305-1312, 1994.
171. **Moser GH, Schrader J, and Deussen A.** Turnover of adenosine in plasma of human and dog blood. *Am J Physiol* 256: C799-806, 1989.
172. **Moyer BD, McCoy DE, Lee B, Kizer N, and Stanton BA.** Adenosine inhibits arginine vasopressin-stimulated chloride secretion in a mouse IMCD cell line (mIMCD-K2). *Am J Physiol* 269: F884-891, 1995.
173. **Munshi R, Pang IH, Sternweis PC, and Linden J.** A1 adenosine receptors of bovine brain couple to guanine nucleotide-binding proteins Gi1, Gi2, and Go. *J Biol Chem* 266: 22285-22289, 1991.
174. **Murthy KS and Makhlof GM.** Adenosine A1 receptor-mediated activation of phospholipase C-beta 3 in intestinal muscle: dual requirement for alpha and beta gamma subunits of Gi3. *Mol Pharmacol* 47: 1172-1179, 1995.
175. **Mustafa SJ, Morrison RR, Teng B, and Pelleg A.** Adenosine receptors and the heart: role in regulation of coronary blood flow and cardiac electrophysiology. *Handb Exp Pharmacol*: 161-188, 2009.
176. **Nie Z, Mei Y, and Ramkumar V.** Short term desensitization of the A1 adenosine receptors in DDT1MF-2 cells. *Mol Pharmacol* 52: 456-464, 1997.
177. **Nies AS, Beckmann ML, and Gerber JG.** Contrasting effects of changes in salt balance on the renovascular response to A1-adenosine receptor stimulation in vivo and in vitro in the rat. *J Pharmacol Exp Ther* 256: 542-546, 1991.
178. **Nishiyama A, Miyatake A, Aki Y, Fukui T, Rahman M, Kimura S, and Abe Y.** Adenosine A(1) receptor antagonist KW-3902 prevents hypoxia-induced renal vasoconstriction. *J Pharmacol Exp Ther* 291: 988-993, 1999.
179. **Obata H, Li X, and Eisenach JC.** Spinal adenosine receptor activation reduces hypersensitivity after surgery by a different mechanism than after nerve injury. *Anesthesiology* 100: 1258-1262, 2004.
180. **Olsson RA and Pearson JD.** Cardiovascular purinoceptors. *Physiol Rev* 70: 761-845, 1990.

181. **Oppermann M, Qin Y, Lai EY, Eisner C, Li L, Huang Y, Mizel D, Fryc J, Wilcox CS, Briggs J, Schnermann J, and Castrop H.** Enhanced tubuloglomerular feedback in mice with vascular overexpression of A1 adenosine receptors. *Am J Physiol* 297: F1256-1264, 2009.
182. **Osswald H.** Metabolic control of organ function—does it apply to the kidney? . *AEG Persson and U Boberg, Editors, The Juxtaglomerular Apparatus, Elsevier Science Publ (Biomedical Division):* 155–166, 1988.
183. **Osswald H.** Renal effects of adenosine and their inhibition by theophylline in dogs. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 288: 79-86, 1975.
184. **Osswald H, Muhlbauer B, and Schenk F.** Adenosine mediates tubuloglomerular feedback response: an element of metabolic control of kidney function. *Kidney Int Suppl* 32: S128-131, 1991.
185. **Osswald H, Nabakowski G, and Hermes H.** Adenosine as a possible mediator of metabolic control of glomerular filtration rate. *Int J Biochem* 12: 263-267, 1980.
186. **Osswald H, Schmitz HJ, and Heidenreich O.** Adenosine response of the rat kidney after saline loading, sodium restriction and hemorrhagia. *Pflugers Arch* 357: 323-333, 1975.
187. **Osswald H, Schmitz HJ, and Kemper R.** Renal action of adenosine: effect on renin secretion in the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 303: 95-99, 1978.
188. **Osswald H, Schmitz HJ, and Kemper R.** Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation. *Pflugers Arch* 371: 45-49, 1977.
189. **Osswald H, Spielman WS, and Knox FG.** Mechanism of adenosine-mediated decreases in glomerular filtration rate in dogs. *Circ Res* 43: 465-469, 1978.
190. **Panzacchi G, Demarchi B, Busca G, Protasoni G, Golin R, and Stella A.** Effects of adenosine receptor agonists on renal function in anaesthetized rats. *J Hypertens* 15: 1785-1789, 1997.
191. **Park SW, Chen SW, Kim M, Brown KM, D'Agati VD, and Lee HT.** Protection against acute kidney injury via A1 adenosine receptor-mediated Akt activation reduces liver injury after liver ischemia and reperfusion in mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 2010.
192. **Parsons WJ and Stiles GL.** Heterologous desensitization of the inhibitory A1 adenosine receptor-adenylate cyclase system in rat adipocytes. Regulation of both Ns and Ni. *J Biol Chem* 262: 841-847, 1987.
193. **Patzak A, Lai EY, Fahling M, Sendeski M, Martinka P, Persson PB, and Persson AE.** Adenosine enhances long term the contractile response to angiotensin II in afferent arterioles. *Am J Physiol* 293: R2232-2242, 2007.
194. **Pawlowska D, Granger JP, and Knox FG.** Effects of adenosine infusion into renal interstitium on renal hemodynamics. *Am J Physiol* 252: F678-682, 1987.
195. **Peart JN and Headrick JP.** Adenosinergic cardioprotection: multiple receptors, multiple pathways. *Pharmacol Ther* 114: 208-221, 2007.
196. **Pepin MN, Bouchard J, Legault L, and Ethier J.** Diagnostic performance of fractional excretion of urea and fractional excretion of sodium in the evaluations of patients with acute kidney injury with or without diuretic treatment. *Am J Kidney Dis* 50: 566-573, 2007.
197. **Peterman C and Sanoski CA.** Tecadenoson: a novel, selective A1 adenosine receptor agonist. *Cardiol Rev* 13: 315-321, 2005.
198. **Pfaffl MW.** A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45, 2001.
199. **Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, and Neuvians TP.** Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* 26: 509-515, 2004.

200. **Pflueger AC, Schenk F, and Osswald H.** Increased sensitivity of the renal vasculature to adenosine in streptozotocin-induced diabetes mellitus rats. *Am J Physiol* 269: F529-535, 1995.
201. **Ponikowski P, Mitrovic V, O'Connor CM, Dittrich H, Cotter G, Massie BM, Givertz MM, Chen E, Murray M, Weatherley BD, Fujita KP, and Metra M.** Haemodynamic effects of rolofylline in the treatment of patients with heart failure and impaired renal function. *Eur J Heart Fail* 12: 1238-1246, 2010.
202. **Porkka-Heiskanen T, Alanko L, Kalinchuk A, and Stenberg D.** Adenosine and sleep. *Sleep Med Rev* 6: 321-332, 2002.
203. **Prigent A.** Monitoring renal function and limitations of renal function tests. *Semin Nucl Med* 38: 32-46, 2008.
204. **Qiagen.** Rest 2009 Software. Hilden.
205. **Qu X, Cooney G, and Donnelly R.** Short-term metabolic and haemodynamic effects of GR79236 in normal and fructose-fed rats. *Eur J Pharmacol* 338: 269-276, 1997.
206. **Ramkumar V, Olah ME, Jacobson KA, and Stiles GL.** Distinct pathways of desensitization of A1- and A2-adenosine receptors in DDT1 MF-2 cells. *Mol Pharmacol* 40: 639-647, 1991.
207. **Renkin EM and Gilmore JP.** Glomerular filtration. *Handbook of Physiology, Section 8 : Renal Physiology*. Chap. 9, p. 220., 1973.
208. **Renkin EM and Robinson RR.** Glomerular filtration. *N Engl J Med* 290: 785-792, 1974.
209. **Rieg T, Pothula K, Schroth J, Satriano J, Osswald H, Schnermann J, Insel PA, Bunday RA, and Vallon V.** Vasopressin regulation of inner medullary collecting ducts and compensatory changes in mice lacking adenosine A1 receptors. *Am J Physiol* 294: F638-644, 2008.
210. **Rieg T, Richter K, Osswald H, and Vallon V.** Kidney function in mice: thiobutobarbital versus alpha-chloralose anesthesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 370: 320-323, 2004.
211. **Rieg T, Schnermann J, and Vallon V.** Adenosine A1 receptors determine effects of caffeine on total fluid intake but not caffeine appetite. *Eur J Pharmacol* 555: 174-177, 2007.
212. **Rieg T, Steigele H, Schnermann J, Richter K, Osswald H, and Vallon V.** Requirement of intact adenosine A1 receptors for the diuretic and natriuretic action of the methylxanthines theophylline and caffeine. *J Pharmacol Exp Ther* 313: 403-409, 2005.
213. **Rolband GC, Furth ED, Staddon JM, Rogus EM, and Goldberg AP.** Effects of age and adenosine in the modulation of insulin action on rat adipocyte metabolism. *J Gerontol* 45: B174-178, 1990.
214. **Rudnicki M.** Kardioresnales vs. renokardiales Syndrom. http://www.medmedia.at/medien/nephroscript/artikel/2008/12/6155_03-08_Kardioresnales.php. NephroScript 03/08. Abgerufen am 20.01.2010.
215. **Sakai K, Aono J, and Haruta K.** Species differences in renal vascular effects of dipyridamole and in the potentiation of adenosine action by dipyridamole. *J Cardiovasc Pharmacol* 3: 420-430, 1981.
216. **Sala C, Monopoli A, Alberti C, Casati C, Ongini E, Zanchetti A, and Morganti A.** Humoral effects of selective adenosine agonists in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 14: 75-79, 1996.
217. **Salmon JE, Brogle N, Brownlie C, Edberg JC, Kimberly RP, Chen BX, and Erlanger BF.** Human mononuclear phagocytes express adenosine A1 receptors. A novel mechanism for differential regulation of Fc gamma receptor function. *J Immunol* 151: 2775-2785, 1993.

218. **Salmon JE and Cronstein BN.** Fc gamma receptor-mediated functions in neutrophils are modulated by adenosine receptor occupancy. A1 receptors are stimulatory and A2 receptors are inhibitory. *J Immunol* 145: 2235-2240, 1990.
219. **SanofiSynthelabo.** Fachinformation Adrekar (Adenosin). Frankfurt.
220. **Sawynok J.** Adenosine receptor activation and nociception. *Eur J Pharmacol* 347: 1-11, 1998.
221. **Schenone S, Brullo C, Musumeci F, Bruno O, and Botta M.** A1 receptors ligands: past, present and future trends. *Curr Top Med Chem* 10: 878-901, 2010.
222. **Schmid H, Cohen CD, Henger A, Irrgang S, Schlondorff D, and Kretzler M.** Validation of endogenous controls for gene expression analysis in microdissected human renal biopsies. *Kidney Int* 64: 356-360, 2003.
223. **Schnermann J.** Adenosine mediates tubuloglomerular feedback. *Am J Physiol* 283: R276-277; discussion R278-279, 2002.
224. **Schnermann J and Briggs JP.** Reduktion des Glomerulumfiltrates (GFR) bei akuter Hypernatriämie (Hyper-Na) durch tubulo-glomeruläre Rückkopplung. *. XIII Symposium der Gesellschaft für Nephrologie, Berlin, 1979.*
225. **Schnermann J and Briggs JP.** Tubuloglomerular feedback: mechanistic insights from gene-manipulated mice. *Kidney Int* 74: 418-426, 2008.
226. **Schnermann J, Osswald H, and Hermle M.** Inhibitory effect of methylxanthines on feedback control of glomerular filtration rate in the rat kidney. *Pflugers Arch* 369: 39-48, 1977.
227. **Schulte G and Fredholm BB.** Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases. *Cell Signal* 15: 813-827, 2003.
228. **Schweda F, Wagner C, Kramer BK, Schnermann J, and Kurtz A.** Preserved macula densa-dependent renin secretion in A1 adenosine receptor knockout mice. *Am J Physiol* 284: F770-777, 2003.
229. **Shah B, Rohatagi S, Natarajan C, Kirkesseli S, Baybutt R, and Jensen BK.** Pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of a lipid-lowering adenosine A1 agonist, RPR749, in healthy subjects. *Am J Ther* 11: 175-189, 2004.
230. **Singri N, Ahya SN, and Levin ML.** Acute renal failure. *JAMA* 289: 747-751, 2003.
231. **Siragy HM and Linden J.** Sodium intake markedly alters renal interstitial fluid adenosine. *Hypertension* 27: 404-407, 1996.
232. **Skott O and Baumbach L.** Effects of adenosine on renin release from isolated rat glomeruli and kidney slices. *Pflugers Arch* 404: 232-237, 1985.
233. **Smith HW.** The reliability of inulin as a measure of glomerular filtration. *The Kidney: Structure and Function in Health and Disease* 231-238, 1951.
234. **Smith JA, Sivaprasadarao A, Munsey TS, Bowmer CJ, and Yates MS.** Immunolocalisation of adenosine A(1) receptors in the rat kidney. *Biochem Pharmacol* 61: 237-244, 2001.
235. **Smith JA, Whitaker EM, Bowmer CJ, and Yates MS.** Differential expression of renal adenosine A(1) receptors induced by acute renal failure. *Biochem Pharmacol* 59: 727-732, 2000.
236. **Smith JA, Whitaker EM, Yaktubay N, Morton MJ, Bowmer CJ, and Yates MS.** Regulation of renal adenosine A(1) receptors: effect of dietary sodium chloride. *Eur J Pharmacol* 384: 71-79, 1999.
237. **Spielman WS, Britton SL, and Fiksen-Olsen MJ.** Effect of adenosine on the distribution of renal blood flow in dogs. *Circ Res* 46: 449-456, 1980.
238. **Steiner RW.** Interpreting the fractional excretion of sodium. *Am J Med* 77: 699-702, 1984.
239. **Stevens LA and Levey AS.** Measured GFR as a confirmatory test for estimated GFR. *J Am Soc Nephrol* 20: 2305-2313, 2009.

240. **Sun CX, Young HW, Molina JG, Volmer JB, Schnermann J, and Blackburn MR.** A protective role for the A1 adenosine receptor in adenosine-dependent pulmonary injury. *J Clin Invest* 115: 35-43, 2005.
241. **Sun D, Samuelson LC, Yang T, Huang Y, Paliege A, Saunders T, Briggs J, and Schnermann J.** Mediation of tubuloglomerular feedback by adenosine: evidence from mice lacking adenosine 1 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 9983-9988, 2001.
242. **Susztak K, Bitzer M, Meyer TW, and Hostetter TH.** Animal models of renal disease. *Kidney Int* 73: 526-528, 2008.
243. **Suzuki F, Shimada J, Mizumoto H, Karasawa A, Kubo K, Nonaka H, Ishii A, and Kawakita T.** Adenosine A1 antagonists. 2. Structure-activity relationships on diuretic activities and protective effects against acute renal failure. *J Med Chem* 35: 3066-3075, 1992.
244. **Synowitz M, Glass R, Farber K, Markovic D, Kronenberg G, Herrmann K, Schnermann J, Nolte C, van Rooijen N, Kiwit J, and Kettenmann H.** A1 adenosine receptors in microglia control glioblastoma-host interaction. *Cancer Res* 66: 8550-8557, 2006.
245. **Tagawa H and Vander AJ.** Effects of adenosine compounds on renal function and renin secretion in dogs. *Circ Res* 26: 327-338, 1970.
246. **Takeda M, Yoshitomi K, and Imai M.** Regulation of Na(+)-3HCO₃⁻ cotransport in rabbit proximal convoluted tubule via adenosine A1 receptor. *Am J Physiol* 265: F511-519, 1993.
247. **Tan HL, Hou CJ, and Sung RJ.** Effects of adenosine A1-receptor activation on torsade de pointes in rabbits. *Cardiovasc Drugs Ther* 13: 441-447, 1999.
248. **Tanaka T and Nangaku M.** The role of hypoxia, increased oxygen consumption, and hypoxia-inducible factor-1 alpha in progression of chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 19: 43-50, 2010.
249. **Tang Y and Zhou L.** Characterization of adenosine A1 receptors in human proximal tubule epithelial (HK-2) cells. *Receptors Channels* 9: 67-75, 2003.
250. **Thomson S, Bao D, Deng A, and Vallon V.** Adenosine formed by 5'-nucleotidase mediates tubuloglomerular feedback. *J Clin Invest* 106: 289-298, 2000.
251. **Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, and Downey JM.** Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation* 85: 659-665, 1992.
252. **Thurau K.** Renal Hemodynamics. *Am J Med* 36: 698-719, 1964.
253. **Tilley SL and Boucher RC.** A1 antagonism in asthma: better than coffee? *J Clin Invest* 115: 13-16, 2005.
254. **Torikai S.** Effect of phenylisopropyladenosine on vasopressin-dependent cyclic AMP generation in defined nephron segments from rat. *Ren Physiol* 10: 33-39, 1987.
255. **Transonic.** Mouse blood flow. <http://www.transonic.com/mice.shtml>. Abgerufen am 20.01.2010.
256. **Transonic.** Probe specification. <http://www.transonic.com/2008ProbeAcc-SpecsRevB8-08.pdf>. Abgerufen am 20.01.2010.
257. **Transonic.** Renal Arterial Blood Flow Measurement in the Rat. http://www.transonic.com/sp_5_rat-renal_7-03.pdf. Abgerufen am 20.01.2010.
258. **Traynor T, Yang T, Huang YG, Arend L, Oliverio MI, Coffman T, Briggs JP, and Schnermann J.** Inhibition of adenosine-1 receptor-mediated preglomerular vasoconstriction in AT1A receptor-deficient mice. *Am J Physiol* 275: F922-927, 1998.
259. **Tsuchida A, Liu GS, Wilborn WH, and Downey JM.** Pretreatment with the adenosine A1 selective agonist, 2-chloro-N⁶-cyclopentyladenosine (CCPA), causes a sustained limitation of infarct size in rabbits. *Cardiovasc Res* 27: 652-656, 1993.
260. **Tsuchida A, Thompson R, Olsson RA, and Downey JM.** The anti-infarct effect of an adenosine A1-selective agonist is diminished after prolonged infusion as is

- the cardioprotective effect of ischaemic preconditioning in rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 26: 303-311, 1994.
261. **Tsutsui S, Schnermann J, Noorbakhsh F, Henry S, Yong VW, Winston BW, Warren K, and Power C.** A1 adenosine receptor upregulation and activation attenuates neuroinflammation and demyelination in a model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 24: 1521-1529, 2004.
262. **Turner MA, Yang X, Yin D, Kuczera K, Borchardt RT, and Howell PL.** Structure and function of S-adenosylhomocysteine hydrolase. *Cell Biochem Biophys* 33: 101-125, 2000.
263. **Vallon V.** Tubuloglomerular feedback and the control of glomerular filtration rate. *News Physiol Sci* 18: 169-174, 2003.
264. **Vallon V.** Tubuloglomerular feedback in the kidney: insights from gene-targeted mice. *Pflugers Arch* 445: 470-476, 2003.
265. **Vallon V, Muhlbauer B, and Osswald H.** Adenosine and kidney function. *Physiol Rev* 86: 901-940, 2006.
266. **Vallon V and Osswald H.** Adenosine receptors and the kidney. *Handb Exp Pharmacol*: 443-470, 2009.
267. **Vallon V, Richter K, Huang DY, Rieg T, and Schnermann J.** Functional consequences at the single-nephron level of the lack of adenosine A1 receptors and tubuloglomerular feedback in mice. *Pflugers Arch* 448: 214-221, 2004.
268. **van Calker D, Muller M, and Hamprecht B.** Adenosine inhibits the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *Nature* 276: 839-841, 1978.
269. **van Calker D, Muller M, and Hamprecht B.** Adenosine regulates via two different types of receptors, the accumulation of cyclic AMP in cultured brain cells. *J Neurochem* 33: 999-1005, 1979.
270. **Vitzthum H, Weiss B, Bachleitner W, Kramer BK, and Kurtz A.** Gene expression of adenosine receptors along the nephron. *Kidney Int* 65: 1180-1190, 2004.
271. **Walkowska A, Dobrowolski L, Kompanowska-Jezierska E, and Sadowski J.** Role of NO and COX pathways in mediation of adenosine A1 receptor-induced renal vasoconstriction. *Exp Biol Med (Maywood)* 232: 690-694, 2007.
272. **Wang Y, Yang JN, Arner A, Boels PJ, and Fredholm BB.** Adenosine A(1) receptors and vascular reactivity. *Acta Physiol (Oxf)* 199: 211-220, 2010.
273. **Weaver DR and Reppert SM.** Adenosine receptor gene expression in rat kidney. *Am J Physiol* 263: F991-995, 1992.
274. **Weihprecht H, Lorenz JN, Briggs JP, and Schnermann J.** Synergistic effects of angiotensin and adenosine in the renal microvasculature. *Am J Physiol* 266: F227-239, 1994.
275. **Weihprecht H, Lorenz JN, Schnermann J, Skott O, and Briggs JP.** Effect of adenosine1-receptor blockade on renin release from rabbit isolated perfused juxtaglomerular apparatus. *J Clin Invest* 85: 1622-1628, 1990.
276. **Welch WJ, Deng X, Snellen H, and Wilcox CS.** Validation of miniature ultrasonic transit-time flow probes for measurement of renal blood flow in rats. *Am J Physiol* 268: F175-178, 1995.
277. **WHO Drug Information.** International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances (INN) http://whqlibdoc.who.int/druginfo/INN_2007_list57.pdf. Abgerufen am 20.01.2010. 21, 2007.
278. **Wilcox CS, Welch WJ, Schreiner GF, and Belardinelli L.** Natriuretic and diuretic actions of a highly selective adenosine A1 receptor antagonist. *J Am Soc Nephrol* 10: 714-720, 1999.
279. **Wright FS and Schnermann J.** Interference with feedback control of glomerular filtration rate by furosemide, triflocin, and cyanide. *J Clin Invest* 53: 1695-1708, 1974.

280. **Wu L, Belardinelli L, Zablocki JA, Palle V, and Shryock JC.** A partial agonist of the A(1)-adenosine receptor selectively slows AV conduction in guinea pig hearts. *Am J Physiol* 280: H334-343, 2001.
281. **Yagil C, Katni G, and Yagil Y.** The effects of adenosine on transepithelial resistance and sodium uptake in the inner medullary collecting duct. *Pflugers Arch* 427: 225-232, 1994.
282. **Yagil Y.** Interaction of adenosine with vasopressin in the inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* 259: F679-687, 1990.
283. **Yamaguchi S, Umemura S, Tamura K, Iwamoto T, Nyui N, Ishigami T, and Ishii M.** Adenosine A1 receptor mRNA in microdissected rat nephron segments. *Hypertension* 26: 1181-1185, 1995.
284. **Yan L, Burbiel JC, Maass A, and Muller CE.** Adenosine receptor agonists: from basic medicinal chemistry to clinical development. *Expert Opin Emerg Drugs* 8: 537-576, 2003.
285. **Yang JN, Chen JF, and Fredholm BB.** Physiological roles of A1 and A2A adenosine receptors in regulating heart rate, body temperature, and locomotion as revealed using knockout mice and caffeine. *Am J Physiol* 296: H1141-1149, 2009.
286. **Yao K, Heyne N, Erley CM, Risler T, and Osswald H.** The selective adenosine A1 receptor antagonist KW-3902 prevents radiocontrast media-induced nephropathy in rats with chronic nitric oxide deficiency. *Eur J Pharmacol* 414: 99-104, 2001.
287. **Yuan JS, Reed A, Chen F, and Stewart CN, Jr.** Statistical analysis of real-time PCR data. *BMC Bioinformatics* 7: 85, 2006.
288. **Yuan K, Cao C, Han JH, Kim SZ, and Kim SH.** Adenosine-stimulated atrial natriuretic peptide release through A1 receptor subtype. *Hypertension* 46: 1381-1387, 2005.
289. **Zannikos PN, Rohatagi S, and Jensen BK.** Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of the antilipolytic effects of an adenosine receptor agonist in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 41: 61-69, 2001.
290. **Zheng J, Wang R, Zambraski E, Wu D, Jacobson KA, and Liang BT.** Protective roles of adenosine A1, A2A, and A3 receptors in skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol* 293: H3685-3691, 2007.
291. **Zimmermann H.** Extracellular metabolism of ATP and other nucleotides. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 299-309, 2000.
292. **Zou AP, Nithipatikom K, Li PL, and Cowley AW, Jr.** Role of renal medullary adenosine in the control of blood flow and sodium excretion. *Am J Physiol* 276: R790-798, 1999.
293. **Zou AP, Wu F, Li PL, and Cowley AW, Jr.** Effect of chronic salt loading on adenosine metabolism and receptor expression in renal cortex and medulla in rats. *Hypertension* 33: 511-516, 1999.

8 Abkürzungen

A ₁ -AR	Adenosin-A ₁ -Rezeptor
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ADA	Adenosindesaminase
ADP	Adenosin-diphosphat
Akt	Akt-Signalweg via Proteinkinase B
AMP	Adenosin-monophosphat
ANP	Atriales Natriuretisches Peptid
ANV	Akute Nierenversagen
ATGL	Adipozyten-Triglycerid-Lipase
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatasen
cAMP	Cyclisches Adenosin-monophosphat
CBF	Renaler Corticaler Blutfluss
CCD	Kortikales Sammelrohr
CCPA	2-Chloro-N ₆ -Cyclopentyladenosin
COX	Cyclooxygenase
CP	Crossing Point
CPA	N-Cyclopentyladenosin
Cpm	Zählrate / Minute
CT	Verbindungstubulus
DCT	Distaler Tubulus, Pars convoluta
DDT1MF	Zelllinie glatter Muskelzellen aus Ductus deferens des Hamsters
DMSO	Dimethylsulfoxid
DOCA	Desoxycorticosteronacetat
DPCPX	8-Cyclopentyl-1,3-dipropylxanthin
dTL	Absteigender Ast der Henleschen Schleife
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
ED ₃₀	Equipotente Dosis für 30% des Maximaleffektes
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
E _{Na}	Absolute Natrium-Ausscheidung
E _K	Absolute Kalium-Ausscheidung
ENT	Equilibrierende Nukleosidtransporter
ERK	Extrazellulär-regulierte Kinasen
FDA	US Food and Drug Administration
F E _{Na}	Fraktionelle Natrium-Ausscheidung
F _{Na}	Filtrierte Natrium-Menge
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HKG	Housekeeping Gen
HCY	Homocystein
HSL	Hormon-sensitive Lipase
HSP	Hitzeschockprotein
IMCD	Innerer medullärer Teil des Sammelrohres
IMP	Inosinmonophosphat
INO	Inosin

i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
JGA	Juxtaglomerulärer Apparat
KG	Körpergewicht
KON	Kontrollgruppe
MAP	Mittlerer Arterieller Blutdruck
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinasen
m/cTAL	Medullärer/ Kortikaler dicker aufsteigender Ast der Henleschen Schleife
mRNA	messenger RNA
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NEFA	Freie unveresterte Fettsäuren
NKCC2	Natrium-Kalium-2-Chlorid-Kotransport
NO	Stickstoffmonoxid
OMBF	Äußerer medullärer Blutfluss
OMCD	Äußerer medullärer Teil des Sammelrohres
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PCT	Proximaler Tubulus, Pars Convoluta
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
PST	Proximaler Tubulus, Pars Recta
PSVT	Paroxysmale Supraventrikuläre Tachykardie
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RBF	Renaler Blutfluss
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel, Kaliumkanal des äußeren Nierenmarks
R-PIA	N(6)-(R)-phenylisopropyladenosin
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SHR	Spontan Hypertensive Ratten
SNGFR	Single-nephron GFR
TGF	Tubulo-glomeruläres Feedback
TG	Target Gen
TL	Dünner Abschnitt der Henleschen Schleife
UV	Urinvolumen
UZV	Urinzeitvolumen

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald danke ich besonders für die Überlassung des Themas, die umfangreiche Hilfestellung bei Versuchsplanung, -durchführung und -auswertung und die persönliche Betreuung. Die vielen Gespräche, die des Öfteren auch über die Dissertation hinausgingen, waren eine interessante Bereicherung und werden mir in guter Erinnerung bleiben.

Mein Dank geht auch an Christine Piesch, die mir mit vielen hilfreichen Tips zur Seite stand, die Real-time PCR durchführte und Korrekturlesen half.

Dr. Danyuang Huang gebührt Dank für die Beantwortung zahlreicher Fragen und das Ausleihen von Geräten und Materialien.

Dr. Christoph Köhle vom Toxikologischen Institut beteiligte sich bei der Real-Time PCR durch hilfreiche Hinweise. Er entwarf die Primer und das Lightcycler-Protokoll.

Danke sagen möchte ich auch Frau Prof. Dr. Kloor und Renate Riehle für die Durchführung des Western Blots und die Unterstützung bei den leider erfolglos verlaufenen Rezeptorbindungsstudien.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei den Tierpflegern im Tierstall, die mir bei der Versorgung der Tiere immer hilfreich zur Seite standen.

Ein besonderer Dankeschön geht auch an meine Familie, besonders an meine Eltern und meine Schwestern Myra, Kendra und Chaya, die mich immer liebevoll und großzügig auf meinem Lebensweg unterstützt haben und immer für mich da waren, wenn ich sie gebraucht habe.

Silke Kohler gilt auch ein ganz besonderer Dank für unzählige Aufmunterungen, viele Tips zur Statistik und Verfassung der Arbeit, das Korrekturlesen, zahlreiche Entbehrungen und nicht zuletzt die Geduld bis zum Abschluss der Arbeit.

10 Lebenslauf