

**Funktionelle Untersuchungen zur
Nebenwirkung des
Antiepileptikums Carbamazepin
auf den
Wasser- und Elektrolythaushalt
der Ratte**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität
zu Kiel

vorgelegt von

Birte Sievers

Kiel
2008

Referent/in:

Korreferent/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt: Kiel,

Der Dekan

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	6
EXPERIMENTALLÖSUNGEN	9
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes im Körper... 12	12
1.1.1 Zellulärer Transport	13
1.1.2 Aufbau von Epithelien	14
1.1.3 Der epitheliale Stofftransport und seine Bausteine	15
1.1.3.1 Niere	15
1.1.3.2 Kolon	16
1.1.3.3 Zwei wichtige Botenstoffe: cAMP und Ca ²⁺	18
1.1.3.4 Prinzip der NaCl-Resorption (elektrogen)	19
1.1.3.5 Prinzip der Cl ⁻ -Sekretion (elektrogen)	20
1.1.3.6 Prinzip der NaCl-Resorption in der TAL	22
1.1.3.7 Prinzip des AQP-2 regulierten H ₂ O-Transportes im Sammelrohr	23
1.1.3.8 Übergeordnete Regulationsmechanismen	24
1.1.3.9 Zentral bedingte Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt	25
1.2 Epilepsie	26
1.3 Das Antiepileptikum Carbamazepin (Tegretal[®], Timonil[®]).....	27
1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit	29
2 MATERIAL & METHODEN.....	30
2.1 In-vitro Versuchsdurchführungen	30
2.1.1 Die Ussing-Kammer Messtechnik	30
2.1.1.1 Der Aufbau der Ussing-Kammer	32
2.1.1.2 Die Gewebepreparation	35
2.1.1.3 Die Versuchsabläufe in der Ussing-Kammer	36
2.1.2 Elektrophysiologische Messungen	37
2.1.2.1 Die Patch-Clamp Messtechnik	37
2.1.2.2 Membranpotenziale, -ströme und -leitwerte	37
2.1.2.3 Der Patch-Clamp Messstand	40
2.1.2.4 Die Präparation und der Transfer der Kolonkrypten	43
2.1.2.5 Messprotokoll und Auswertung der Patch-Clamp Experimente	45
2.1.3 Messung der intrazellulären freien Ca ²⁺ -Konzentration mit Fura-2/AM	47
2.1.3.1 Allgemeines zur Methodik	47
2.1.3.2 Ca ²⁺ -Messplatz und Messprotokoll	49
2.1.3.3 Beladung der Krypten mit Fura-2/AM	50

2.1.4	Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration in isolierten Kolonkrypten	51
2.1.4.1	Allgemeines	51
2.1.4.2	Vorbereitung und Versuchsprotokoll	52
2.2	In-vivo Versuchsdurchführungen.....	53
2.2.1	Allgemeines	53
2.2.1.1	Versuchstiere, Training, metabolische Käfige	53
2.2.1.2	Bestimmung der Trinkmenge	54
2.2.1.3	Bestimmung der Futtermenge	55
2.2.1.4	Bestimmung der Urinmenge	55
2.2.1.5	Bestimmung der Kotmenge	55
2.2.1.6	Blutabnahme	55
2.2.2	Analytik der Proben	56
2.2.2.1	Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen	56
2.2.2.2	Bestimmung der Osmolalität	58
2.2.2.3	Bestimmung der Kreatininkonzentration	58
2.2.2.4	Berechnung von Kreatinin-Clearance, fraktioneller Elektrolytausscheidung und Elektrolytbilanz	60
2.2.3	Carbamazepinwirkung <i>in-vivo</i>	62
2.2.3.1	Einfluss einer 7-tägigen CBZ-Behandlung auf den Metabolismus der Ratte	62
2.2.3.2	Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes unter CBZ und unter einer kurzfristigen Wasserrestriktion	63
2.2.3.3	Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes unter CBZ und unter einer oralen Wasserbelastung	65
2.2.3.4	Einfluss von 100 mg CBZ /kg KG auf den Metabolismus der Ratte	67
2.2.3.5	Diuretische Wirkung von CBZ unter dem Einfluss des V2-Antagonisten Satavaptan	69
2.2.3.6	Messung von ADH im Plasma nach CBZ-Behandlung	72
2.2.4	Statistik	73
3	ERGEBNISSE.....	74
3.1	In-vitro Untersuchungen	74
3.1.1	CBZ-Wirkung auf das transepitheliale Potenzial und den transepithelialen Widerstand im intakten Kolongewebe	74
3.1.1.1	Keine Inhibition des epithelialen Na ⁺ -Kanals durch CBZ	74
3.1.1.2	Hemmung der basolateralen Cl ⁻ -Sekretion durch CBZ	77
3.1.1.3	Konzentrations-Wirkungsbeziehung von CBZ	81
3.1.1.4	Induktion der basolateralen Cl ⁻ -Sekretion durch CBZ in Anwesenheit von 293 B	85
3.1.2	Patch-Clamp Messungen an isolierten Kolonkrypten	92
3.1.3	Ca ²⁺ -Messung an isolierten Kolonkrypten	98
3.1.4	cAMP Messungen an isolierten Kolonkrypten	100
3.2	In-vivo Untersuchungen.....	101

3.2.1	Der Einfluss einer 7-tägigen CBZ-Behandlung auf den Metabolismus der Ratte	101
3.2.2	Der Einfluss einer CBZ-Behandlung unter Wasserrestriktion	109
3.2.3	Der Einfluss einer 4-tägigen CBZ-Behandlung unter Wasserbelastung	116
3.2.4	Der Einfluss einer 3-tägigen CBZ-Behandlung auf den Metabolismus der Ratte	126
3.2.5	Diuretischer Effekt des V2-Antagonisten Satavaptan unter CBZ	136
3.2.6	CBZ induziert ADH-unabhängige Diurese	144
4	DISKUSSION	146
4.1	Methodik	146
4.1.1	Gewebepräparation und Isolation von Kolonkrypten	146
4.1.2	Ussing-Kammer Messtechnik	147
4.1.3	Patch-Clamp Technik	148
4.1.4	Ca ²⁺ -Messung an isolierten Kolonkrypten	150
4.1.5	cAMP-Messung an isolierten Kolonkrypten	150
4.1.6	<i>In-vivo</i> Untersuchungen auf metabolischen Käfigen	151
4.2	Einfluss von CBZ auf den Elektrolyttransport im Rattenkolon	152
4.2.1	Keine Inhibition von ENaC und CFTR durch CBZ	152
4.2.2	Inhibition der luminalen Cl ⁻ -Sekretion durch CBZ	153
4.2.3	Einfluss von CBZ auf die basolaterale K ⁺ -Leitfähigkeit	155
4.2.4	Aktivierung der Ca ²⁺ -vermittelten K ⁺ -Leitfähigkeit durch CBZ	155
4.2.5	Zusammenfassung: Einfluss der CBZ-Wirkung auf den transepithelialen Elektrolyttransport im Kolonepithel der Ratte	156
4.3	CBZ-Wirkung an isolierten Kolonkrypten	158
4.3.1	Verminderung der [cAMP] _i durch CBZ	158
4.3.2	Induktion der [Ca ²⁺] _i -Freisetzung durch CBZ	159
4.3.3	Hyperpolarisation durch CBZ	162
4.4	Einfluss von CBZ auf den Metabolismus der Ratte	163
4.4.1	Metabolische Käfige und orale CBZ-Applikation: Dosisfindung	163
4.4.2	CBZ induziert keine Hyponatriämie	164
4.4.3	CBZ führt zur Diurese und zu renalen Elektrolytverlusten	166
4.4.3.1	Akute Wasserbelastung	168
4.4.3.2	Akute Wasserrestriktion	171
4.4.4	ADH-unabhängige Wirkung von CBZ	173
4.4.5	Vergleich der CBZ-Wirkung zwischen Mensch und Ratte	175
5	ZUSAMMENFASSUNG	177
6	SUMMARY	179

7	LITERATURVERZEICHNIS	181
8	ANHANG	197
8.1	Erklärung	197
8.2	Publikation	198
8.2.1	Originalarbeiten	198
8.2.2	Kongressbeiträge (Abstracts)	198
8.3	Danksagung	200
8.4	Lebenslauf	201

Abkürzungsverzeichnis

AC	Adenylatzyklase
ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ADH	Antidiuretisches Hormon
ADP	Adenosindiphosphat
Am	Amilorid
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
AQP	Aquaporin (Wasserkanal)
ATP	Adenosintriphosphat
BNP	Brain Natriuretic Peptide
BSA	Bovine Serum Albumin
C	Clearance (ml/min)
$[Ca^{2+}]_e$	Extrazelluläre Calciumaktivität
$[Ca^{2+}]_i$	Intrazelluläre Calciumaktivität
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
$[cAMP]_i$	Intrazelluläre cAMP-Konzentration
CaSR	Calcium Sensing Receptor
CBZ	Carbamazepin
CC-Modus	Current-Clamp Modus
CCh	Carbachol
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
ClCa	Ca^{2+} -activated Chloride Channel
CREB	cAMP responsive element binding protein
CYP P450	Cytochrom P450; Enzym zum Abbau von Pharmaka
CYP 3A4	Subtyp der CYP P450-Familie
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethylsulfoxid
E_x	Gleichgewichtspotenzial (V) für ein Ion x

Abkürzungsverzeichnis

ENaC	Epithelialer Natriumkanal
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis-(β -aminoethylether)-N,N,N',N'- Tetraacetat
E_M	Membranpotenzial
f	Fraktioneller Leitwert
FE	Fraktionelle Ausscheidung (%)
FSK	Forskolin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate (ml/min)
GIT	Gastrointestinaltrakt
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid
IBMX	3-Isobutyl-1-methyl-xanthin
IC ₅₀	Konzentration für halbmaximale Inhibierung
ip	Intraperitoneal
IP ₃	Inositol-1,4,5-triphosphat
I_{inj}	Injektionsstrom
I_{sc}	Äquivalenter Kurzschlussstrom ($\mu A/cm^2$)
K	Kontrollösung (modifizierte Ringerlösung)
KCNE1	Kaliumkanal β -Untereinheit (kodierendes Gen); früher: IsK; Protein: minK
KCNE3	Kaliumkanal β -Untereinheit (kodierendes Gen)
KCNN4	Ca ²⁺ -aktivierter Kaliumkanal (kodierendes Gen), früher: SK4
KCNQ1	Kaliumkanal α -Untereinheit (kodierendes Gen); früher: KvLQT1
KG	Körpergewicht
Lsg.	Lösung
MDR1	Multidrug resistance Protein
NHE	Na ⁺ /H ⁺ -Exchanger
NKCC1	Na ⁺ , K ⁺ , 2Cl ⁻ -Cotransporter, Typ 1
NKCC2	Na ⁺ , K ⁺ , 2Cl ⁻ -Cotransporter, Typ 2
PE	Polyethylen
PGE ₂	Prostaglandin E2

Abkürzungsverzeichnis

PKA	Protein Kinase A
PLC	Phospholipase C
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
ROMK	Renal Outer Medullary Potassium Channel
R_{te}	Transepithelialer Widerstand (Ωcm^2)
SFO	Subfornical Organ
SIADH	Syndrom of inappropriate antidiuretic hormone secretion
Substanz 293 B	<i>trans</i> -6-cyano-4-(<i>N</i> -ethylsulfonyl- <i>N</i> -methylamino)-3-hydroxy-2,2-dimethyl-chromane]
VC-Modus	Voltage-Clamp Modus
VIP	Vasoaktives Intestinales Peptid
VSCC	Voltage-Sensitive Calcium Channel
V_{te}	Transepitheliales Potenzial (mV)
ZNS	Zentrales Nervensystem

Experimentallösungen

Kontrolllösung

Substanz	Konzentration (mM)	
NaCl	145	
KH ₂ PO ₄	0,4	
K ₂ HPO ₄	1,6	
Glukose	5	
MgCl ₂	1	
Ca-Glukonat	1,3	pH 7,4 (NaOH; HCl)

Kolonaufbewahrungslösung

Substanz	Konzentration (mM)	
NaCl	127	
KCl	5	
Glukose	5	
MgCl ₂	1	
Na-Pyruvat	5	
HEPES	10	
CaCl ₂	1,25	pH 7,4 (NaOH)

Ca²⁺-freie Lösung (Isolation von Kolonkrypten)

Substanz	Konzentration (mM)	
NaCl	127	
KCl	5	
Glukose	5	
MgCl ₂	1	
Na-Pyruvat	5	
HEPES	10	
EDTA	5	pH 7,4 (NaOH)

Ca²⁺-haltige Lösung (Isolation von Kolonkrypten)

Rezept wie Kolonaufbewahrungslösung mit zusätzlich 0,5% BSA

Interne Pipettenlösung (Patch-Clamp)

Substanz	Konzentration (mM)	
K-Glukonat	95	
KCl	30	
NaH ₂ PO ₄	1,2	
Na ₂ HPO ₄	4,8	
Glukose	5	
MgCl ₂	1,034	
EGTA	1	
Ca-Glukonat	0,726	
ATP	1	pH 7,2 (KOH)

Stammlösungen

Substanz	Lösungsmittel	Stamm-Konzentration (mM)
Amilorid	DMSO	50
FSK	Ethanol	5
IBMX	DMSO	100
CCh	H ₂ O	100
293 B	DMSO	10
CBZ	DMSO	100
Indomethacin	Ethanol	10

Alle Stammlösungen wurden bei -21°C eingefroren und bei Gebrauch mit Kontrolllösung verdünnt (1:1000), Indomethacin wurde bei 4°C gelagert und 1:100 000 verdünnt.

1 Einleitung

Ein ausgeglichener Wasser- und Elektrolythaushalt ist für den Organismus von entscheidender Bedeutung. Der Körper besteht zu 60% des Körpergewichtes aus Wasser, wovon sich 2/3 auf den Intrazellulärraum und 1/3 auf den Extrazellulärraum (Interzellulärraum, Blutvolumen) verteilen. Die wichtigsten Elektrolyte sind Natrium (Na^+), Kalium (K^+), Calcium (Ca^{2+}), Magnesium (Mg^{2+}), Chlorid (Cl^-), Hydrogenphosphat ($\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$) und Hydrogencarbonat (HCO_3^-). Es gibt zahlreiche Regulationsmechanismen im Körper, die dafür sorgen, dass die Homöostase durch Aufnahme und Abgabe von Wasser und Elektrolyten aufrechterhalten wird.

Die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes im Körper erfolgt über aktive und passive Transportvorgänge in Epithelien. Die Plasmamembran stellt zusammen mit den Zwischenzellkontakten (Tight Junctions, Schlussleisten) eine Barriere für Ionen, Wasser und hydrophile Moleküle dar. Für deren geregelten Transport in die und aus der Zelle sind bestimmte Membranproteine nötig. Zu der Gruppe der Transportproteine gehören Ionenkanäle, Carrier und Ionenpumpen, die die Membran teilweise oder vollständig durchziehen. Die Steuerung der Transportmechanismen erfolgt durch intrazelluläre Botenstoffe wie z.B. zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) oder Ca^{2+} , die wiederum über die Bindung von extrazellulären Botenstoffen (Hormone) an Rezeptorproteine kontrolliert werden.

Die präzise Regulation des Volumenhaushaltes und der Osmolalität im Körper ist lebensnotwendig. Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt sind vielfältig und können z.B. durch Erbrechen oder Durchfall, durch Fehlfunktion endokriner Drüsen oder aber durch Einnahme von Medikamenten entstehen. Arzneistoffe wirken dabei direkt auf epitheliale Transportmechanismen oder indirekt auf die zentralen Steuermechanismen im Hypothalamus.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit einer Störung des Salz- und Wasserhaushaltes, welche im Zusammenhang mit der Einnahme des Antiepileptikums Carbamazepin (CBZ) beobachtet werden kann.

1.1 Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes im Körper

Die Osmolalität beschreibt die Menge osmotisch wirksamer Teilchen pro kg H₂O, die frei im Plasmawasser diffundieren. Die Osmolalität des Blutplasmas beträgt in der Regel 290 mosmol/kg. Sie liegt etwas unter der Konzentration der Teilchen (300 mmol/kg), da ein Teil von ihnen nicht osmotisch wirksam ist, d.h. nicht vollständig dissoziiert vorliegt oder an Proteine gebunden ist. Natriumchlorid ist der wichtigste Osmolyt der Extrazellulärflüssigkeit.

Die Osmolalität wird bei Säugetieren durch hypothalamische Rezeptoren registriert, die direkt die Plasmaosmolalität oder die Na⁺-Konzentration messen. Indirekt wird die Osmolalität über die Volumen- und Druckrezeptoren des Kreislaufs erfasst, deren Signale ebenfalls in diesen Regelkreis einfließen. Bereits eine Osmolalitätserniedrigung um z.B. 2 mosmol/kg wird in bestimmten Bereichen des zentralen Nervensystems, wie dem anteroventralen Teil des dritten Ventrikels und dem Subfornicalorgan analysiert und mit entsprechenden Reaktionen beantwortet. Diese, und die entsprechenden Volumen- und Druckänderungen im Kreislauf münden in folgenden Effektormechanismen:

1. Anpassung von Durst und Salzappetit
2. Veränderungen in der sympathischen Nervenaktivität
3. Sekretion von Antidiuretischem Hormon (ADH) und Oxytocin aus der Neurohypophyse
4. Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS)
5. Modulation der Sekretion von natriuretischen Peptiden aus dem Herzen.

Die verschiedenen Möglichkeiten dienen der Feinabstimmung der Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes und damit dem reibungslosen Ablauf der Körperfunktionen unter verschiedenen Lebensbedingungen.

1.1.1 Zellulärer Transport

Die Zellmembran besteht aus einer Lipiddoppelschicht, die von Gasen wie O_2 , CO_2 und N_2 mittels Diffusion überwunden werden kann. Die Richtung des Transportes und die Energie sind durch den entsprechenden chemischen Gradienten vorgegeben. Ionen können die Membran aufgrund der Ladung und der Hydratation nicht passieren. Hierfür sind Transportmechanismen notwendig, die aktiv oder passiv sein können. Entsprechende Membranproteine bilden dann sog. Transportwege, die in Ionenkanäle, Carrier und Pumpen eingeteilt werden.

Ionenkanäle sind selektive Poren, die den transmembranären Transport von Ionen entlang ihres elektrischen (Potenzialdifferenz) bzw. chemischen (Konzentrationsdifferenz) Gradienten ermöglichen. Sie werden häufig durch das Membranpotenzial, durch Agonisten (z.B. Acetylcholin) und andere Regelprozesse (Phosphorylierungszustand des Kanalproteins) gesteuert.

Carrier transportieren bestimmte Substrate gemäß ihres elektrochemischen Gradienten von einer Seite der Membran auf die andere (cis-trans-Konformation). Entscheidend für den Transport sind die Affinität des Transportproteins zum Substrat sowie die Anzahl der Bindungsstellen am Carrier. Die meisten Carrierproteine nutzen den Na^+ -Gradienten, um ein anderes Substrat im Symport oder Antiport zu transportieren. Diese Form des Transportes ist damit sekundär aktiv.

Ionenpumpen arbeiten primär aktiv unter ATP Verbrauch. Die Na^+/K^+ -Pumpe (Na^+/K^+ -ATPase) kommt in allen Zellen vor und sitzt in hoher Dichte in der basolateralen Zellmembran von Epithelzellen. Das Transportprotein ist eine ATPase, die an der Innenseite der Membran ATP in ADP und Phosphat spaltet. Die daraus gewonnene Energie ermöglicht

es der Zelle, 3 Na⁺-Ionen aus der Zelle und 2 K⁺-Ionen in die Zelle zu transportieren. So hält die Zelle die intrazellulär niedrige Na⁺-Konzentration und die hohe K⁺-Konzentration für die sekundären Transportvorgänge aufrecht.

1.1.2 Aufbau von Epithelien

Epithelien bilden die inneren und äußeren Auskleidungen des Körpers wie z.B. Haut, Darmtrakt, Nierentubulussystem, Urogenitaltrakt sowie exokrine Drüsen und Respirationstrakt.

Eine Epithelzelle ist polarisiert, d.h. sie besitzt eine luminale und eine basolaterale Membran. Die Ausstattung mit Ionenkanälen und Transportern (Anzahl, Spezifität) in diesen beiden Membranen ist unterschiedlich. Beide Membranen weisen häufig Vergrößerungen der Oberflächen auf, die den Stoffaustausch einer Zelle oder eines Zellverbands mit der Umgebung erleichtern. Im Falle der Epithelien findet gerichteter Stofftransport von z.B. verschiedenen Elektrolyten wie Na⁺, K⁺, Ca²⁺ und Cl⁻ statt. Wasser kann entsprechend des osmotischen Gradienten passiv durch Wasserkanäle, sogenannte Aquaporine (AQP), in die und aus der Zelle diffundieren (transzellulär) oder den Weg zwischen den Zellen (parazellulär) einschlagen. Der parazelluläre Weg steht auch den Ionen zur Verfügung. Allerdings hängt die Durchlässigkeit von den Eigenschaften der Schlussleisten (Schlussleisten) ab, die außerdem dafür sorgen, dass die Polarität der Zellen nicht durch laterale Diffusion der Membranproteine verloren geht. Eine hohe Dichte der Schlussleisten findet sich z.B. im Sammelrohr und im Kolon, weil dort große Ionengradienten geschaffen und aufrechterhalten werden müssen. Im proximalen Nierentubulus und im Dünndarm, wo niedrige Gradienten zu finden sind, müssen die Epithelien weniger dicht sein.

In Epithelien sind meist der parazelluläre und der transzelluläre Weg so kombiniert, dass sich für einen gegebenen Gradienten der energetisch günstigste Transportmechanismus einsetzen lässt. Hohe Transportraten stellen besondere Anforderungen an die Abstimmung der luminalen und

basolateralen Transportprozesse. Bei einer Steigerung der luminalen Aufnahme von Wasser, Elektrolyten oder organischen Substanzen muss auf der basolateralen Seite eine vermehrte Abgabe zustande kommen. Beteiligt an dieser Regulation sind die intrazellulären Konzentrationen von ATP, von Substraten, von Botenstoffen wie cAMP oder Ca^{2+} und der zytosolische pH-Wert.

1.1.3 Der epitheliale Stofftransport und seine Bausteine

In der vorliegenden Arbeit werden Daten zum Salz- und Wassertransport in der Niere und im Kolon vorgestellt. In den folgenden Abschnitten sollen die Organe und die dort ablaufenden Transportmechanismen genauer erläutert werden, die zum Verständnis der Daten dienen.

1.1.3.1 Niere

Die Niere ist das entscheidende Organ des Wasser- und Elektrolythaushaltes und ihre Aufgaben sind vielfältig: Kontrolle des Volumens und der Elektrolytzusammensetzung des Extrazellulärraumes, Ausscheidung harnpflichtiger Substanzen, Beeinflussung von Blutdruck und Knochenmineralisierung und Regulation der Blutbildung.

Die Niere besitzt ca. eine Million Nephrone, die wiederum aus zu- und abführenden Gefäßen, einem Glomerulus und einem Tubulus bestehen. Der Tubulus wird unterteilt in einen proximalen Tubulus, eine Henle-Schleife mit dünnem absteigendem, dünnem und dickem aufsteigendem Teil, ein distales Konvolut, ein Verbindungsstück und ein Sammelrohr (siehe Abbildung 1). Beim Menschen werden täglich 180 l Plasma durch die Glomeruli filtriert. Die Transportmechanismen der Epithelien entlang des Tubulus entscheiden über den Anteil des Filtrates, der schließlich ausgeschieden wird. Die Durchblutung der Nieren beträgt ca. 20 % des Herzminutenvolumens, wobei die Nierenrinde gut und das Nierenmark schlecht durchblutet sind. Durch das dichte Netz sympathischer Innervation wird die Nierendurchblutung und die Reninfreisetzung und

damit auch die Wasser- und Elektrolytausscheidung beeinflusst. Zusätzlich sind die renale Durchblutung und die glomeruläre Filtration autoreguliert. Die Harnmenge kann zwischen 0,5 und 20 l/Tag betragen.

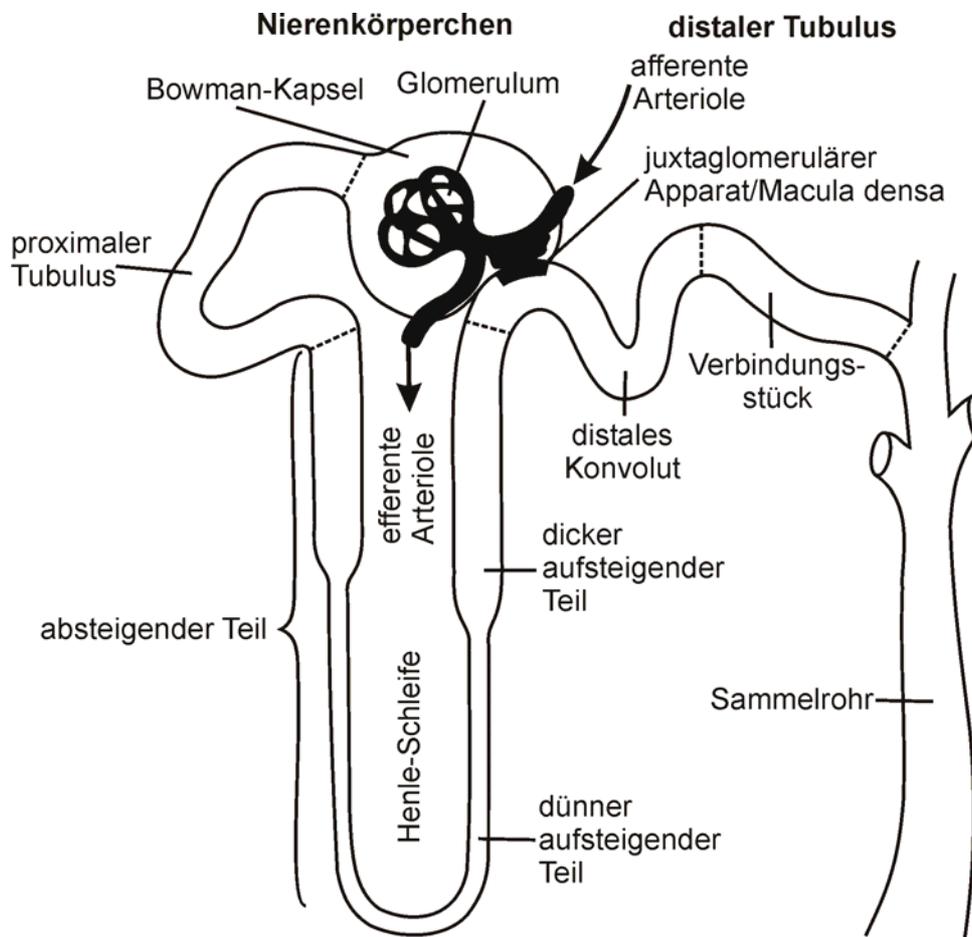


Abbildung 1:
Funktionelle Anatomie des Nephrons (modifiziert nach: (Schubert & Schauf, 1993)).

1.1.3.2 Kolon

Das Kolon am Ende des Gastrointestinaltraktes spielt ebenfalls eine Rolle bei der Regulation des Flüssigkeitshaushaltes. Es ist in der Lage, Wasser und Elektrolyte aufzunehmen oder abzugeben und zahlreiche Transportprozesse sind denen der Niere ähnlich.

Beim Menschen gelangen täglich ca. 2 l Wasser mit der Nahrung in den Verdauungstrakt, von denen nur ca. 100 ml mit dem Kot ausgeschieden

werden. Der restliche Wasseranteil wird zusammen mit den Elektrolyten über das Darmepithel resorbiert. Die tägliche Na^+ -Aufnahme beträgt ca. 200 mmol, die für Cl^- ca. 100 mmol. Davon werden 1-5 mmol Na^+ /Tag und 1-2 mmol Cl^- /Tag über den Stuhl ausgeschieden. Der Darm hat also in der Gesamtbilanz für Wasser und Salz beim Gesunden eine geringere Bedeutung als die Niere. Bei bestimmten Erkrankungen kann eine Störung des gastrointestinalen Transportes jedoch selbst bei intakter Nierenfunktion lebensbedrohlich werden.

Die Darmwand besteht aus mehreren Schichten: Die Schleimhaut (*Tunica mucosa*) kleidet die Innenseite des Darms aus und ist für den Wasser- und Elektrolyttransport verantwortlich. Die Kolonkrypten, tiefe einschichtige Epitheleinfaltungen des Kolons, sind 400-500 μm lang und haben einen Durchmesser von ca. 50 μm (adulte Ratte). Sie stellen die funktionelle Einheit des Kolonepithels dar. Die Krypten sind durch morphologische Unterschiede in den Zelltypen (Stammzellen, Becherzellen, enteroendokrine Zellen und Enterozyten) charakterisiert. In der Kryptbasis befinden sich die Stammzellen, aus denen alle anderen Zelltypen durch Mitose hervorgehen. Die undifferenzierten Zellen wandern im Verlauf der Entwicklung in den Mittel- und den Oberflächenbereich einer Krypte und werden im luminalen Bereich durch Apoptose eliminiert (Strater *et al.*, 1995). Die Enterozyten entlang der Kryptachse haben je nach Umgebung unterschiedliche Aufgaben. Die undifferenzierten Zellen in der Kryptbasis sind in der Lage, NaCl zu sekretieren, wohingegen die Oberflächenzellen zusätzlich in der Lage sind, Na^+ zu resorbieren. Diese Resorption erfolgt, wie im Sammelrohr der Niere, über epitheliale Na^+ -Kanäle. Normalerweise findet in der Kolonkrypte NaCl -Absorption statt, die durch Aldosteron reguliert wird (Singh *et al.*, 1995). Während die Enterozyten für die Resorption und Sekretion zuständig sind, werden die Produktion von Schleim von den Becherzellen und die Synthese von Hormonen von den enteroendokrinen Zellen übernommen.

Der Elektrolyttransport am Darm wird durch das autonom arbeitende enterale Nervensystem reguliert. Dabei spielt der Meißnersche Plexus (*Plexus submucosus*), der in enger Beziehung zu den Epithelzellen steht

und dadurch die sekretorischen und resorptiven Prozesse beeinflusst (Biesalski *et al.*, 2005) eine entscheidende Rolle (Surprenant *et al.*, 2000). Des Weiteren kontrolliert das enterale Nervensystem die Durchblutung der Schleimhaut (Evans & Surprenant, 1992).

1.1.3.3 Zwei wichtige Botenstoffe: cAMP und Ca^{2+}

Zwei Botenstoffe spielen bei der Steuerung des epithelialen Transportes eine besonders wichtige Rolle: cAMP (zyklisches Adenosinmonophosphat) und Ca^{2+} .

cAMP ist ein intrazellulärer Botenstoff, der aus der Spaltung von ATP durch die Adenylatzyklase (AC) freigesetzt wird. Die Aktivierung der AC erfolgt pharmakologisch durch Forskolin (FSK) oder ist die Antwort auf die Bindung von extrazellulären Botenstoffen wie z.B. Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP), Prostaglandin E₂ (PGE₂) oder Adenosin an einen G-Protein gekoppelten Rezeptor in der Zellmembran. cAMP bindet an die regulatorische Untereinheit der Proteinkinase A (PKA), was dazu führt, dass die katalytische von der regulatorischen Untereinheit abgespalten und aktiviert wird. Dadurch können bestimmte Proteine phosphoryliert werden (Alberts *et al.*, 1995). Basolaterale K^+ - und luminalen Cl^- -Kanäle im Kolon werden auf diese Weise aktiviert (Greger, 2000). Auch zyklisches Guaninmonophosphat beeinflusst die Cl^- -Sekretion. Es kann direkt an den luminalen Cl^- -Kanal binden (Vaandrager *et al.*, 2000) oder aber seine Wirkung wird indirekt über die Erhöhung von cAMP, welche durch die Hemmung der Phosphodiesterase (Typ V) zustande kommt (Nobles *et al.*, 1991), ausgelöst.

Ca^{2+} : Die intrazelluläre freie Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) von 0,12 $\mu\text{mol/l}$ wird vorwiegend durch eine Ca^{2+} -ATPase und einen $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Antiporter (3:1) niedrig gehalten (Lang *et al.*, 2005). Die Aktivierung des Ca^{2+} -Einstroms kann durch die Stimulation muskarinergere Rezeptoren z.B. über Acetylcholin oder Carbachol (CCh), einem stabilen Acetylcholinderivat, erfolgen. Dabei wird über ein G-Protein die Phospholipase C (PLC) aktiviert, die die Umsetzung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat

(PIP₂) in Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) katalysiert. IP₃ kann an die ionotropen IP₃-Rezeptoren an den intrazellulären Ca²⁺-Speichern binden und die Freisetzung von Ca²⁺ aus diesen Speichern bewirken (Parekh & Putney, Jr., 2005; Hille, 2001).

Die intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration kann durch zusätzlichen Einstrom aus dem Extrazellulärraum erhöht werden. Dieser Einstrom wird indirekt durch die Speicherfreisetzung bedingt und als I_{CRAC} (Parekh & Putney, Jr., 2005; Parekh & Penner, 1997; Hoth & Penner, 1992; Hille, 2001) bezeichnet. Seine molekulare Grundlage sind die Ca²⁺-Kanäle TRPC (transient receptor potential channels) (Montell, 2005; Nilius *et al.*, 2007; Pedersen *et al.*, 2005) und die Orai Proteine (Liao *et al.*, 2007; Hewavitharana *et al.*, 2007). Basolaterale K⁺- und wahrscheinlich auch luminaire Cl⁻-Kanäle im Kolon werden durch Bindung von Ca²⁺ aktiviert. Zur Normalisierung der [Ca²⁺]_i tragen sowohl Na⁺/Ca²⁺-Austauscher und Ca²⁺-ATPasen in der Plasmamembran als auch Ca²⁺-Pumpen des endoplasmatischen Retikulums und Ca²⁺-Kanäle der Mitochondrien bei, die Ca²⁺ aktiv nach extrazellulär oder in die intrazellulären Speicher transportieren (Hille, 2001).

1.1.3.4 Prinzip der NaCl-Resorption (elektrogen)

Die basolaterale Na⁺/K⁺-ATPase schafft einen Gradienten (siehe Abbildung 2), dessen Triebkraft den transzellulären Na⁺-Transport von der luminalen zur basolateralen Seite ermöglicht (Lang *et al.*, 2005). Die Potenzialdifferenz über die luminaire Membran liegt bei ca. -50 mV, die der basolateralen bei -80 mV. D.h. die Na⁺-Permeabilität depolarisiert die luminaire Membran. K⁺, welches basolateral über die Na⁺/K⁺-ATPase in die Zelle aufgenommen wurde, wird entweder luminal über den K⁺-Kanal sezerniert oder basolateral rezirkuliert (Schultheiss *et al.*, 2003). Dies hyperpolarisiert die basolaterale Membran. Durch die elektrische Trennung von luminaler und basolateraler Seite durch die Schlussleisten entsteht ein lumen negatives transepitheliales Potenzial (V_{te}) von ca. -30 mV. Die Ausprägung der luminalen K⁺-Permeabilität bestimmt das

Ausmaß der K^+ -Sekretion, die mit der Na^+ -Resorption einhergeht. Das V_{te} ist die Triebkraft für die parazelluläre Cl^- -Resorption.

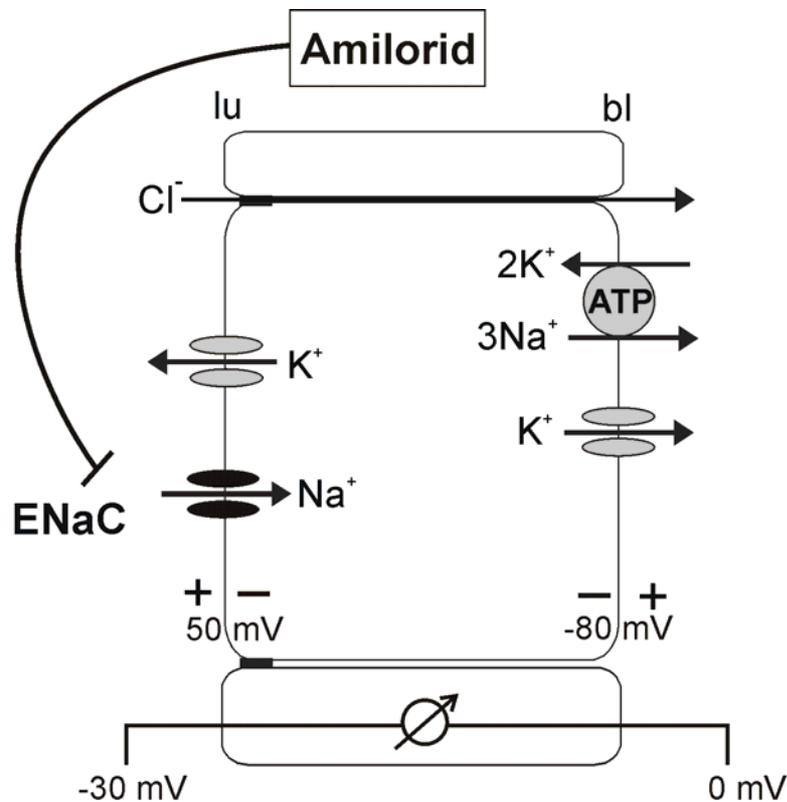


Abbildung 2:

Schematisches Zellmodell der elektrogenen $NaCl$ -Resorption. ENaC (epithelialer Natriumkanal), lu (luminal), bl (basolateral). Amilorid ist ein spezifischer Hemmstoff von ENaC. Das transepitheliale Potenzial ist lumen-negativ.

1.1.3.5 Prinzip der Cl^- -Sekretion (elektrogen)

Die intrazelluläre Cl^- -Konzentration (30 mmol/l) ist kleiner als die extrazelluläre (98-106 mmol/l). Aufgrund dieses Gradienten muss das Membranpotenzial negativer als -31 mV sein, damit Cl^- die Zelle verlassen kann. Daher muss die luminale Cl^- -Sekretion durch die Aktivität von K^+ -Kanälen getrieben werden, die die Zellmembran hyperpolarisieren (Schultheiss & Diener, 1998).

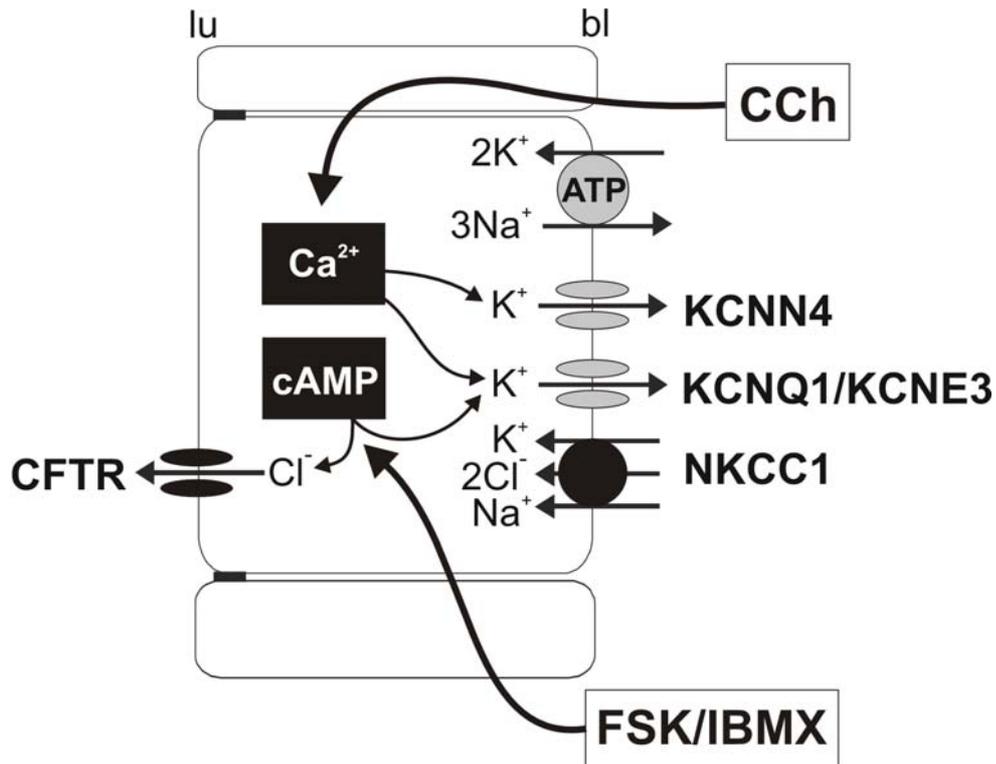


Abbildung 3:

Schemazeichnung zur Veranschaulichung der elektrogenen Cl^- -Sekretion. FSK/IBMX erhöht die cAMP Konzentration, Carbachol (CCh) wirkt als Ca^{2+} -Agonist. Beide Signalwege münden in einer Aktivierung von basolateralen (bl) K^+ -Kanälen. Diese erzeugen die Triebkraft für die Cl^- -Sekretion auf der luminalen (lu) Seite der Membran über CFTR unter der Voraussetzung seiner Aktivierung über den cAMP-Weg. Aufrechterhaltung der Ionengradienten durch die Na^+/K^+ -ATPase.

Die Cl^- -sezernierenden Enterozyten besitzen in der basolateralen Membran einen hohen K^+ -Leitwert, wodurch die Triebkraft für die luminale Cl^- -Sekretion erzeugt wird (Greger, 1996). In der Kolonkrypte der Ratte wurden mittels Patch-Clamp Messungen zwei K^+ -Kanaltypen mit unterschiedlicher Leitfähigkeit identifiziert: Der eine ist ein Ca^{2+} -aktivierter Kanal (IsK, 16 pS) (Bleich *et al.*, 1996) und der andere ein cAMP-aktivierter K^+ -Kanal (KCNQ1/KCNE3, <3 pS) (Warth *et al.*, 1996; Greger *et al.*, 1997). Nur der zweite Kanal lässt sich spezifisch durch das Chromanol 293 B hemmen (Greger *et al.*, 1997; Bleich *et al.*, 1997).

Die Cl^- -Sekretion ist Motor der Sekretion von Wasser im Gastrointestinaltrakt. Basolateral wird Cl^- durch den NKCC1-Transporter in die Zelle aufgenommen und luminal über CFTR Cl^- -Kanäle (Cystic Fibrosis

Transmembrane Conductance Regulator) ins Lumen abgegeben (siehe Abbildung 3).

Die Aktivität von NKCC1 wird durch cAMP reguliert. Bei einem Anstieg der $[cAMP]_i$ wird dessen Aktivität durch direkte Phosphorylierung durch PKA oder anderen Proteinkinasen und Phosphatasen gesteigert (Haas & Forbush, III, 1998).

Der CFTR steht in enger Beziehung zu ENaC (Kunzelmann, 2003), d.h. sie hemmen sich gegenseitig in ihrer Aktivität (Ecke *et al.*, 1996a; Kunzelmann *et al.*, 1997). Damit ist es möglich, dass die Zelle zwischen Absorption und Sekretion von Wasser und Elektrolyten wechseln kann (Greger, 2000), ohne Gefahr zu laufen, dass sie durch intrazelluläre Anhäufung von NaCl anschwillt. CFTR wird durch verschiedene Kinasen wie z.B. PKA und PKC aktiviert (Mall *et al.*, 1998; Kunzelmann *et al.*, 1997). Der wichtigste Stimulus für die Öffnung der CFTR Cl⁻-Kanäle läuft über den Botenstoff cAMP.

1.1.3.6 Prinzip der NaCl-Resorption in der TAL

Der Ionentransport in der wasserimpermeablen dicken aufsteigenden Henle Schleife (TAL, thick ascending limb) mindert die Osmolarität im Tubuluslumen und steigert die Osmolarität im Interstitium. Der dadurch aufgebaute osmotische Gradient stellt die Voraussetzung für die Harnkonzentrierung der Niere dar. Die Na⁺-Resorption erfolgt hier zu 66% transzellulär durch den luminalen Na⁺2Cl⁻K⁺-Cotransporter (NKCC2). Während K⁺ die Zelle wieder über luminale K⁺-Kanäle (ROMK) verlässt, wird Cl⁻ über basolaterale Cl⁻-Kanäle (ClCKb) aus der Zelle transportiert. Dadurch entsteht ein lumenpositives Potenzial, welches Kationen wie Na⁺, Mg²⁺ und Ca²⁺ parazellulär auf die basolaterale Seite treibt. Dieser Anteil trägt die verbleibenden 33% des Na⁺ Transportes. Die Na⁺/K⁺-ATPase in der basolateralen Seite der Membran pumpt Na⁺ im Austausch gegen K⁺ aus der Zelle (siehe Abbildung 4).

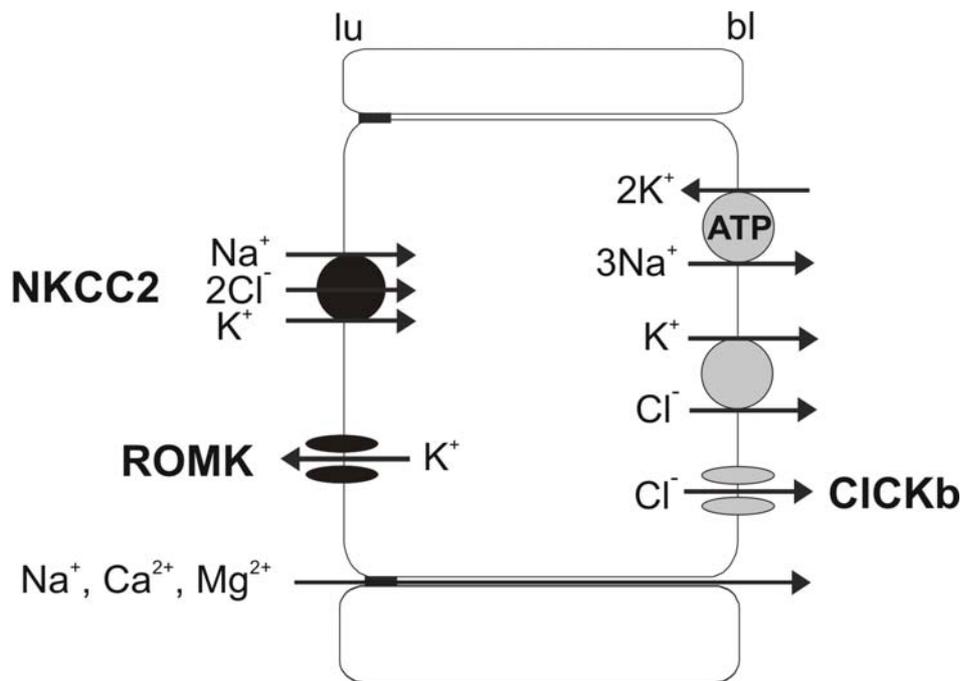


Abbildung 4:

Schematisches Zellmodell der NaCl-Resorption in der TAL. Die Bildbeschreibung ist im Text enthalten. lu (luminal), bl (basolateral).

1.1.3.7 Prinzip des AQP-2 regulierten H₂O-Transportes im Sammelrohr

Der über die Henle Schleife erzeugte osmotische Gradient zwischen Interstitium und Tubulusflüssigkeit im Sammelrohr stellt die Triebkraft für die Wasserresorption in diesem Nephronsegment dar. Sie erfolgt transzellulär über Wasserkanäle und ist durch ADH reguliert. Der wichtigste Angriffspunkt für ADH (Halbwertszeit: 15-20 min) in der Niere ist die Hauptzelle des Sammelrohrs. ADH bindet an den basolateralen V2-Rezeptor, der an das G_s/Adenylatzyklasesystem gekoppelt ist (Birnbaumer *et al.*, 1992) und für den Einbau von AQP-2 (Aquaporin-2) in die luminalen Zellmembran verantwortlich ist. Für die Umverteilung von AQP-2 aus intrazellulären Vesikeln in die Membran ist die Phosphorylierung des Serinrestes S256 am AQP-2 essentiell. Mutationen an dieser Stelle (S256A) oder die Inhibition der PKA verhindern die Translokation von

AQP-2 (Brown *et al.*, 1998; Klusmann *et al.*, 1999), die wiederum entscheidend für die Wasserrückresorption (Nielsen *et al.*, 1993; Klusmann *et al.*, 2000) und die Einstellung der Urinosmolalität (50-1400 mosmol/kg H₂O) ist. Die Translokation der AQP-2 Kanäle wird als Kurzzeitregulation bezeichnet. Die Langzeitregulation umfasst die AQP-2 Genexpression und wird ebenfalls durch den Anstieg von cAMP reguliert (Matsumura *et al.*, 1997; Marples *et al.*, 1999).

Die Anzahl der AQP-2-Kanäle nimmt vom Nierenkortex zur inneren Medulla zu (Nielsen *et al.*, 1993), was vermuten lässt, dass die durch NaCl aufgebaute Tonizität die Ausbildung von AQP-2 *in-vivo* beeinflusst (Storm *et al.*, 2003).

1.1.3.8 Übergeordnete Regulationsmechanismen

An der Regulation des Wasser- und des Elektrolythaushaltes der Säugetiere sind hauptsächlich der Hypothalamus, die Volumenrezeptoren im Herzen und die Niere von entscheidender Bedeutung. Zielorgane dieser Regulation sind der GIT und vor allem die Niere. Dementsprechend führen typischerweise Darmerkrankungen mit Durchfall oder Erbrechen, Verhaltensstörungen bei der Ernährung und Nierenerkrankungen zu pathologischen Zuständen der Elektrolyt- und Volumenbilanz. Diese Zustände können lebensbedrohlich sein.

Im Hypothalamus registrieren Neurone geringste Veränderungen der Osmolalität des Blutes. Bereits eine geringe Zunahme der Plasmaosmolalität von 1% führt zu einem Anstieg der ADH-Ausschüttung. Die Volumenänderungen im Körper werden über Dehnungsrezeptoren im Kreislauf, vor allem im Herzen, wahrgenommen. Die Folge einer Dehnung der volumensensitiven Rezeptoren vermindert die ADH-Freisetzung (*N. Vagus*-Aktivität, Gauer-Henry-Reflex) und hemmt die sympathische Nervenaktivität zur Niere, so dass eine vermehrte Harnausscheidung (Diurese) die Folge ist. Des Weiteren induziert eine Erhöhung des zentralvenösen Drucks die Freisetzung von natriuretischen Peptiden, zu denen das atriale natriuretische Peptid (ANP), das BNP (Brain Natriuretic

Peptide) und das CNP (C-Typ Natriuretisches Peptid) gehören. ANP und BNP sind Antagonisten des RAAS (Renin-Angiotensin-Aldosteron System) und unterdrücken über Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase die renale Na^+ -Resorption im Sammelrohr und somit die Harnausscheidung (Natriurese). Gleichzeitig können sie durch cGMP-Anstieg die luminalen Na^+ -Kanäle in den Sammelrohrepiethelien hemmen und haben über den gleichen Signalweg eine vasodilatorische Wirkung.

Das RAAS reguliert den Blutdruck und das Extrazellulärvolumen. Renin wird durch sympathische Nierenervenaktivität, renalen Blutdruckabfall und über die Rückkopplung der tubulären NaCl Konzentration aus den juxtaglomerulären Zellen freigesetzt und bildet aus Angiotensinogen das Angiotensin I, welches wiederum durch das ACE (Angiotensin Converting Enzyme) in Angiotensin II umgesetzt wird. Angiotensin ist ein starker Vasokonstriktor und stimuliert die renale Na^+ -Resorption. Es löst über zentralnervöse Wirkung Durst und Salzappetit aus. Des Weiteren führt die Bindung dieses Moleküls an die AT1-Rezeptoren der Nebennierenrinde zur Freisetzung von Aldosteron. Aldosteron verstärkt über Transkriptionsregulation die Na^+ -Rückresorption in der Niere und im Kolon. Im Sammelrohr erhöht es die Aktivität der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase sowie die des luminalen ENaC (Rajendran *et al.*, 1989) und ist somit von entscheidender Bedeutung für die Natrium- und Wasserbilanzierung.

1.1.3.9 Zentral bedingte Störungen im Wasser- und Elektrolythaushalt

Betrachtet man die übergeordneten Regulationsmechanismen ist es nicht überraschend, dass Störungen im Natriumhaushalt häufig bei Patienten mit Krankheiten des ZNS vorkommen. In Bezug auf die Hyponatriämie ($[\text{Na}^+]_{\text{Plasma}} < 135 \text{ mmol/l}$) ist bekannt, dass sie vorwiegend bei Patienten mit neurologischer/psychiatrischer Erkrankung auftreten (Gandelman, 1994). Das Auftreten einer Hyponatriämie charakterisiert z.B. das SIADH (Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion). Im Verhältnis zur Plasmaosmolalität werden hier zu große Mengen von ADH sekretiert,

was dazu führt, dass Wasser vermehrt im Körper gehalten wird und eine Hyponatriämie auslöst.

Das Auftreten einer Hyponatriämie kann zu permanenten Hirnschädigungen führen, denn Verschiebungen des Plasma Na^+ -Haushaltes gehen mit einer transzellulären Wasserverschiebung einher und führen durch Wassereintritt im Gehirn zu Hirnschwellung. Eine Hyponatriämie kann daher unbehandelt lebensbedrohlich sein.

Nicht nur Erkrankungen des ZNS, sondern auch ihre Behandlungen, können an der Entstehung von Störungen des Salz- und Wasserhaushaltes beteiligt sein. Hierzu gehört u.a. die Behandlung der Epilepsie mit dem Medikament Carbamazepin (CBZ). Das Risiko einer auftretenden Hyponatriämie bei der Verwendung von CBZ hängt von der Dosis, der Serum CBZ-Konzentration sowie von Alter und Geschlecht ab (Kuz & Manssourian, 2005).

1.2 Epilepsie

Unter Epilepsie (Krampfleiden) versteht man spontan auftretende Krampfanfälle. Die unkontrollierte synchrone Erregung von Nervenzellen führt dabei zu plötzlichen, unwillkürlichen, stereotypen Verhaltens- oder Befindungsstörungen. Es wird vermutet, dass ein Ungleichgewicht von Erregung und Hemmung in neuronalen Netzen die Krampfanfälle entstehen lässt. Verstärkte Erregungen oder verminderte Hemmungen können sowohl durch Veränderungen in den Membraneigenschaften der Nervenzellen als auch in der Erregungsübertragung von Nervenzelle zu Nervenzelle durch die Neurotransmitter bewirkt werden. Ziel der Behandlung bei Epilepsien ist die völlige Anfallsfreiheit mit möglichst wenigen oder ohne Nebenwirkungen. Diese Therapieziele werden in erster Linie durch eine geeignete Pharmakotherapie erreicht. Hierbei spielen der Wirkstoff Carbamazepin und das strukturähnliche Oxcarbazepin immer noch die Hauptrolle unter den therapeutischen Möglichkeiten.

1.3 Das Antiepileptikum Carbamazepin (Tegretal[®], Timonil[®])

Carbamazepin ist ein Antiepileptikum mit antikonvulsiver und psychotroper Wirkung. In der klinischen Medizin wurde es 1962 als Antikonvulsivum bekannt gemacht (BLOM, 1962). Der Wirkungsmechanismus von CBZ beruht hauptsächlich auf einer Blockade der neuronalen spannungsgesteuerten Na⁺-Kanäle, wodurch repetitive neuronale Entladungen gehemmt werden (McLean & Macdonald, 1988; Willow *et al.*, 1984; Willow & Catterall, 1982; Lingamaneni & Hemmings, Jr., 2003; Remy *et al.*, 2003). Diese Hemmung geschieht spannungsselektiv und dosisabhängig (Courtney & Etter, 1983; Willow *et al.*, 1984; Matsuki *et al.*, 1984). Wie Phenytoin hat CBZ im therapeutisch relevanten Konzentrationsbereich (8-14 µg/ml) keinen Einfluss auf die postsynaptische GABA Antwort (Macdonald & McLean, 1986). Die Blockade von L-Typ Calciumkanälen durch CBZ ist ebenso beschrieben worden (Schirmacher *et al.*, 1993; Walden *et al.*, 1993; Remy *et al.*, 2003; Ambrosio *et al.*, 1999).

CBZ kann zur Monotherapie oder zur Kombinationsbehandlung mit anderen Antikonvulsiva eingesetzt werden. Auch schmerzlindernde Wirkungen werden dem CBZ zugeschrieben, weshalb es u.a. bei der Behandlung der schmerzhaften diabetischen Neuropathie angewendet wird. Die Krampfschwelle des ZNS wird durch CBZ angehoben und somit das Anfallsrisiko beim Alkohol-Entzugssyndrom vermindert. Bei Diabetes insipidus centralis oder bei Polyurie durch Polydipsie hat Carbamazepin einen antidiuretischen Effekt und bewirkt eine rasche Verminderung der Harnmenge und des Durstgefühls (Soelberg & Hammer, 1984; Van *et al.*, 1994). Der antidiuretische Effekt von CBZ bei Diabetes insipidus wurde 1966 von (Braunhofer & Zicha, 1966) beschrieben.

Carbamazepin gehört in die Klasse der trizyklischen Aromaten (siehe Abbildung 5).

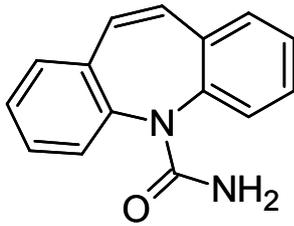


Abbildung 5:
Strukturformel von Carbamazepin.

Es wird während oder nach einer Mahlzeit oral meist in Form von Tabletten mit etwas Flüssigkeit appliziert. Die Richtdosis für Erwachsene liegt zwischen 400-1600 mg/Tag und die für Kinder zwischen 10-20 mg/kg KG/Tag. CBZ erreicht seine maximale Plasmakonzentration 4-24 Stunden nach Einnahme. Die therapeutisch wirksame Plasmakonzentration von CBZ liegt zwischen 21-42 $\mu\text{mol/l}$ (5-10 $\mu\text{g/ml}$).

Carbamazepin ist zu 70-80% an Plasmaproteine gebunden. Die Eliminationshalbwertszeit der Substanz durch die Leber verkürzt sich durch die Autoinduktion von Leberenzymen wie z.B. Cytochrom P450 bei mehrmaliger Einnahme von 36 Stunden auf 16-24 Stunden. Nur 2-3% werden unverändert im Urin ausgeschieden. Cytochrom P450 (Yamashita *et al.*, 2002) kommt in allen Organen vor und ist in der Leber z.B. für die Elimination von Medikamenten verantwortlich.

CBZ führt auch zur Induktion weiterer Gene und Proteine: hepatisches CYP3A4 (Gibson *et al.*, 2002), intestinale MDR1 und MRP2 mRNA sowie intestinales MRP2-Protein und intestinales P-gp (Geick *et al.*, 2001; Giessmann *et al.*, 2004). Die Mechanismen der Wirkstoffresistenz bei Epilepsitherapie mit CBZ sollen aufgrund dieser Induktionen und deren Interaktionen miteinander zustande kommen (Owen *et al.*, 2006; Sakaeda *et al.*, 2002; Hoffmeyer *et al.*, 2000).

CBZ hat zahlreiche Metabolite. Als Primärmetabolit gilt das pharmakologisch aktive 10,11-Epoxid, welches ebenfalls antiepileptische Wirkung haben soll und in 10-Hydroxycarbamazepin umgewandelt wird.

Es gibt zahlreiche Nebenwirkungen, die bei der Verwendung von Carbamazepin auftreten können. Gerade zu Beginn der Therapie mit CBZ oder bei einer Überdosierung (Plasmakonzentration $> 14 \mu\text{g/ml}$) können

Wirkungen auf das ZNS (Schwindel, Ataxie, Erschöpfung) sowie auf den GIT (Erbrechen) beobachtet werden, die bei optimaler Dosierung wieder verschwinden.

In Bezug auf das endokrine System und den Salz-Wasserhaushalt ist bemerkenswert, dass das Auftreten von Ödemen, Hyponatriämie und verminderte Plasmaosmolalität häufig beschrieben wurde. Diese Symptome haben Ähnlichkeiten zum Effekt des Antidiuretischen Hormons. Das Wirk- und Nebenwirkungsprofil sowie die therapeutisch notwendige Wirkstoffkonzentration von CBZ legen nahe, dass es sich nicht um eine hochspezifische Substanz handelt. Dies macht die Suche nach weiteren Angriffspunkten schwierig aber auch notwendig, um die Behandlung zu verbessern und Risiken abzuschätzen.

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hat das Ziel, den Einfluss von CBZ auf den epithelialen Transport im Darm und in der Niere zu überprüfen und die Wirkung auf den Wasser- und Elektrolythaushalt der Ratte zu analysieren.

Es sollte geklärt werden,

1. ob CBZ prototypische epitheliale Transportmechanismen beeinflusst,
2. welche zellulären Mechanismen die epithelialen Wirkungen vermitteln,
3. in welcher Weise sich CBZ im Tiermodell unter definierten Ausgangsbedingungen des Wasserhaushaltes auswirkt und
4. in welchem Zusammenhang diese Wirkungen mit ADH stehen.

Die Ergebnisse sollen dazu dienen, das Entstehen von Störungen im Salz- und Wasserhaushalt von Patienten unter CBZ-Therapie besser verstehen und gegebenenfalls Hinweise auf neue Therapieansätze geben zu können.

2 Material & Methoden

2.1 *In-vitro* Versuchsdurchführungen

2.1.1 Die Ussing-Kammer Messtechnik

In der Ussing-Kammer können transepitheliale elektrische Potenziale und Ströme über Epithelien gemessen werden (Li *et al.*, 2004). Diese entstehen, wenn Ionen über Epithelien transportiert werden (KOEFOED-JOHNSEN & USSING, 1958).

Sofern die Lösungen auf beiden Seiten bzgl. ihrer Konzentration gleich sind, beruht die Potenzialdifferenz zwischen den Kammerhälften auf epithelialen Transportprozessen. Durch Kurzschließen der beiden Kammerhälften wird das transepitheliale Potenzial (V_{te}) auf Null geklemmt. Der dann messbare Kurzschluss-Strom (I_{sc}) entspricht dem aktiven elektrogenen Ladungstransport über das Epithel.

Eine alternative Methode, den Transport ohne Kurzschluss zu messen, besteht darin, das transepitheliale Potenzial durch ein parallel geschaltetes Spannungsmessgerät mit einem hohen Innenwiderstand zu registrieren. Über einen Pulsgenerator (Dr. Fröbe, Physiologisches Institut Freiburg, D) werden kurze Strominjektionen über das Epithel geleitet und erzeugen einen, vom Widerstand des Epithels (R_{te}) und vom Kammerwiderstand abhängigen Spannungsabfall (ΔV_{te}). Der Widerstand der Kammerlösung (R_{Kammer}), der zu Beginn der Messungen über den Spannungsabfall am leeren Gewebeträger bestimmt wurde, und der Widerstand des Epithels (R_{te}) sind in Serie geschaltet. Der epitheliale Widerstand (1) kann unter Anwendung des Ohmschen Gesetzes aus dem Spannungsabfall und dem Injektionsstrom (I_{inj}) ermittelt werden:

$$R_{te} = \frac{\Delta V_{te}}{I_{inj}} - R_{Kammer} \quad (\Omega\text{cm}^2) \quad (1)$$

Zu beachten ist, dass sich der gesamte transepitheliale Widerstand aus den Widerständen der luminalen (R_{lu}) bzw. basolateralen Membran (R_{bl}) und dem parazellulären Widerstand (R_p) zusammensetzt (siehe Abbildung 6).

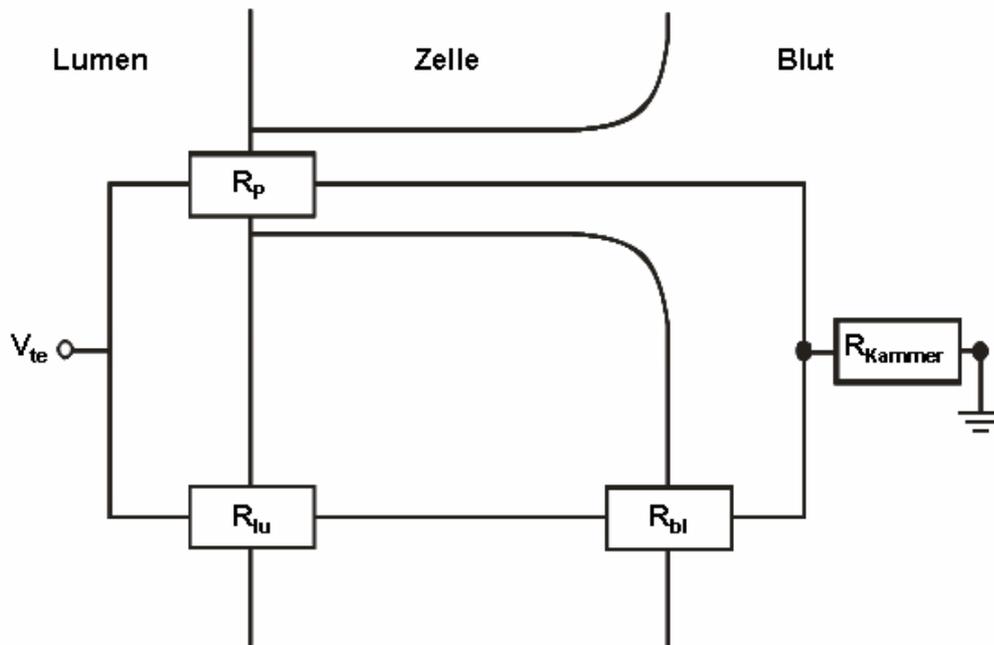


Abbildung 6:

Schemazeichnung des elektrischen Schaltbildes für die Ussing-Kammer Messung. R_{Kammer} : Widerstand der Kammerlösung, R_{bl} : Widerstand der basolateralen Membran, R_{lu} : Widerstand der luminalen Membran, R_p : Widerstand des parazellulären Weges, V_{te} : transepitheliales Potenzial.

Dementsprechend hat die Änderung eines einzelnen Widerstandes, z.B. durch die Hemmung von Ionenkanälen einen relativ kleinen Effekt auf R_{te} . Aus diesem Grund spiegelt der Verlauf von V_{te} der Originalabbildung den Verlauf von I_{sc} annähernd wieder. Im Ergebnisteil werden V_{te} , R_{te} und I_{sc} in Tabellenform angegeben.

Der äquivalente Kurzschluss-Strom (I_{sc}), d.h. der Strom, der bei einem Kurzschluss des Epithels fließen würde, wird nach dem Ohmschen Gesetz berechnet (2):

$$I_{sc} = \frac{V_{te}}{R_{te}} \quad (\mu A/cm^2) \quad (2)$$

Die basolaterale Seite ist als Bezugspunkt für die Spannungsmessung definiert, d.h. es gibt lumen-positive und lumen-negative Potenziale. In Abbildung 7 ist ein Originalausschnitt einer Ussing-Kammer Schreiberaufzeichnung gezeigt, der den Verlauf von V_{te} und ΔV_{te} (Abszisse: Zeit (s); Ordinate: Spannung (mV)) veranschaulichen soll.

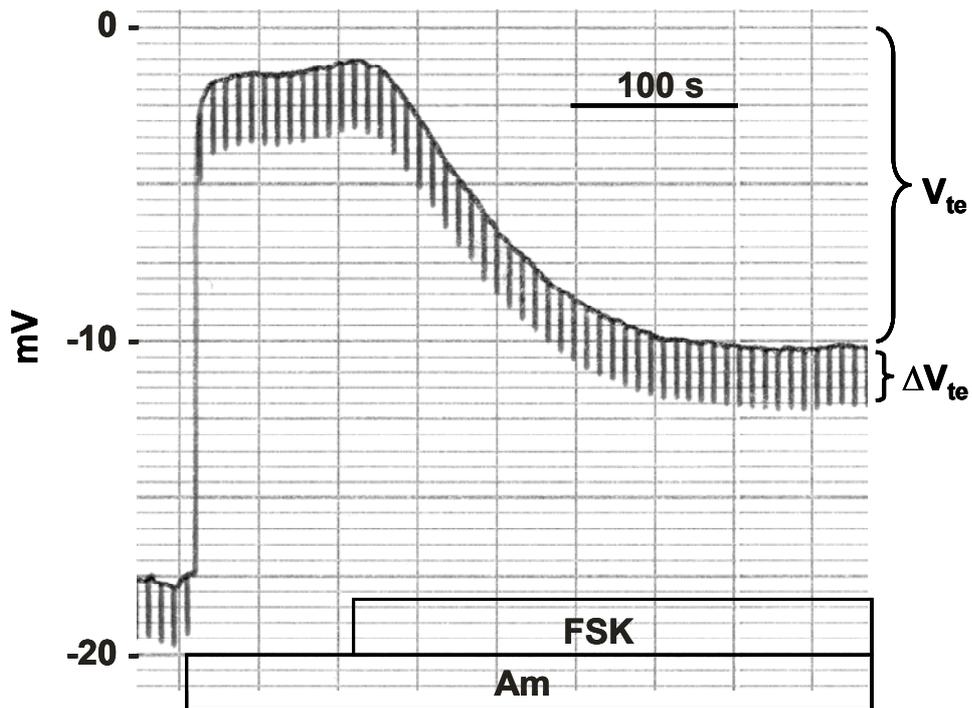


Abbildung 7:

Originalabbildung (Ausschnitt) eines Ussing-Kammer Experimentes. Gezeigt sind das transepitheliale Potenzial (V_{te}) und die Spannungspulse (ΔV_{te}), die durch Konstantstrominjektion ($1,8 \mu\text{A}$) erzeugt wurden. $50 \mu\text{M}$ Amilorid (Am) ist ein reversibler Na^+ -Kanalblocker mit schneller Wirkung, während $0,1 \mu\text{M}$ Forskolin (FSK) über die Steigerung der cAMP-Synthese eine langsamere Kinetik aufweist.

2.1.1.1 Der Aufbau der Ussing-Kammer

Die Ussing-Kammer (siehe Abbildung 8) besteht aus zwei Kammerhälften zwischen die der Gewebeträger (siehe Abbildung 10) incl. Kolonepithel eingespannt wird und so die beiden Kammerhälften voneinander isoliert

(luminale und basolaterale Seite). In der Mitte des des Gewebeträgers ist eine Aussparung von $0,096 \text{ cm}^2$, welche durch das Kolongewebe abgedeckt wird und über die der epitheliale Strom gemessen werden kann.

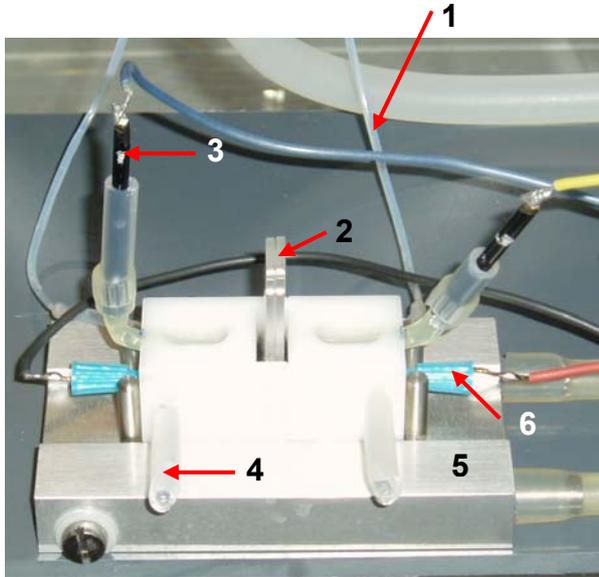


Abbildung 8:

Originalphoto einer Ussing-Kammer Messapparatur.

1) Zulauf der vorgewärmten Experimentallösung; 2) Gewebeträger; 3) in 1 M KCl-Lösung eintauchende Ag-AgCl-Elektrode, die auf einer mit 1 M KCl-Lösung hergestellten Agarbrücke sitzt; 4) Ablauf für Experimentallösung; 5) Heizblock zur Erwärmung der Kammer auf 37°C ; 6) Silberdrahtelektrode zur Strominjektion

Eine schematische Darstellung der Ussing-Kammer Messtechnik ist in Abbildung 9 gezeigt. Sie zeigt die beiden Kammerhälften, die durch das Kolongewebe voneinander getrennt sind. Die luminale und die basolaterale Seite des Epithels können mit unterschiedlichen, erwärmten Experimentallösungen umspült werden. Durch elektrogenen Ionentransport über Kanäle und Transporter kommt es zu einer Ladungsumverteilung, welche das Epithel auf der einen Seite positiv und auf der anderen Seite negativ polarisiert. Das entsprechende elektrische Potenzial über das Epithel wird gemessen und von einem Schreiber aufgezeichnet.

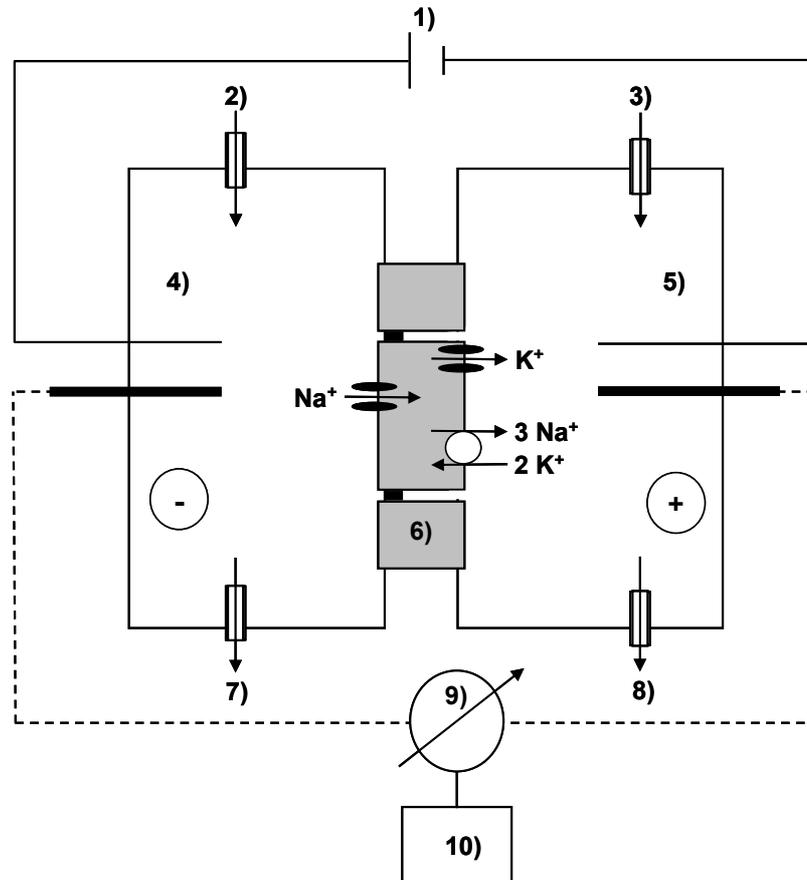


Abbildung 9:

Schematische Abbildung der Ussing-Kammer Messtechnik.

- 1) Strominjektion, 2) luminaler Zulauf, 3) basolateraler Zulauf, 4) 1. Kammerhälfte, 5) 2. Kammerhälfte, 6) Kolongewebe, 7) luminaler Ablauf, 8) basolateraler Ablauf, 9) Spannungsmessgerät, 10) Schreiber.

Der Injektionsstrom von 1,8 μA wird alle 5 s für eine Dauer von 1 s über einen Pulsgenerator injiziert. Ein über Drei-Wege-Hähne verbundenes Zuflusssystem mit Zu- und Ablauf auf jeder Kammerseite ermöglicht den kontinuierlichen Austausch der Badlösungen um das Epithel. Die Fließgeschwindigkeit liegt bei 6-7 ml/min. Die Badflüssigkeiten und die Kammer selbst werden über ein Wasserbad auf 37°C erwärmt. Das Kammervolumen beträgt 2 ml.

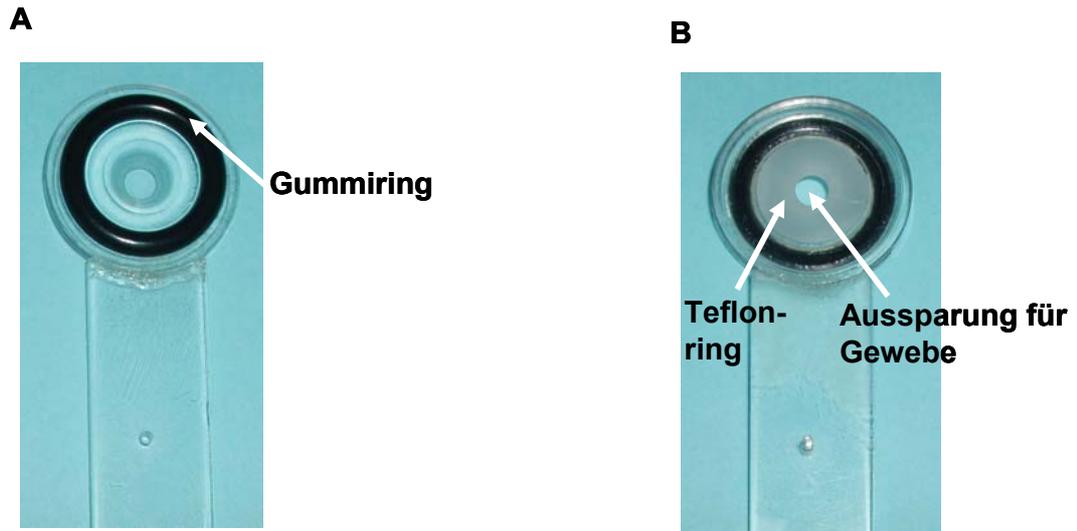


Abbildung 10:

Originalphotos der beiden Gewebeträgerhälften zwischen die das Kolongewebe gespannt wird. Außenseite mit Gummiring (A) und Innenseite mit Teflonring (B).

2.1.1.2 Die Gewebepräparation

Als Versuchstiere dienten Wistarratten aus eigener Zucht beiderlei Geschlechtes mit einem Körpergewicht zwischen 200-300 g. Die Tiere wurden mit 3,5 Vol% Isofluran und anschließender Narcoreinjektion (Wirkstoff: Pentobarbital-Natrium, 160 mg/ml, ip.) narkotisiert. Die Bauchhöhle wurde geöffnet und das Kolon vorsichtig freigelegt. Nach einem Schnitt zwischen dem distalen und dem proximalen Teil wurde es vom Rektum aus mit kalter Aufbewahrungslösung gespült und danach auf einen Glasstab aufgezogen. Das Abpräparieren des Mesenteriums erfolgte mit Hilfe einer feinen Schere. Anschließend wurde das auf den Glasstab aufgezogene Kolon kurz vor dem Rektum durchtrennt und zur weiteren Präparation in kalte Aufbewahrungslösung gelegt. Das Tier wurde durch Entbluten getötet.

Um Kolongewebestücke in die Ussing-Kammer einzuspannen, war es nötig, das Kolon vorsichtig von der *Tunica serosa* und *Tunica muscularis* zu befreien. Dies geschah durch eine feine radiäre Inzision am proximalen Teil des Kolongewebes, die mit einem stumpfen Skalpell gesetzt wurde. Anschließend konnten diese Schichten vorsichtig abgestreift werden. Das

Gewebe auf dem Glasstab bestand danach nur noch aus Mukosa und Submukosa. Ein kleines Gewebestück wurde mit einer feinen Schere vom Glasstab abgeschnitten, vorsichtig über die eine Gewebeträgerhälfte abgerollt und durch das Auflegen der anderen Hälfte im Gewebeträger gespannt. Es wurde besonders darauf geachtet, das Gewebe nicht unnötig mechanischen Störungen auszusetzen, da es dadurch beschädigt und für die Messung unbrauchbar würde. Der Gewebeträger konnte nun in die Ussing-Kammer eingespannt werden und die transepithelialen Messungen konnten beginnen.

2.1.1.3 Die Versuchsabläufe in der Ussing-Kammer

Allgemeines

Die Badlösung sowie die Experimentallösungen waren auf 37°C erwärmt. Die Fließgeschwindigkeit betrug 6-7 ml/min. Die Kammer wurde mit isotoner modifizierter Ringerlösung (Kontrolllösung) gespült. Die Kontrolllösung enthielt 1 µM Indomethacin. Alle Substanzen, die im Experiment appliziert wurden, wurden immer frisch der Kontrolllösung zugesetzt und der pH-Wert wurde gegebenenfalls neu eingestellt.

Grundsätzlich folgte nach dem Einsetzen des Kolonpräparates in die Ussing-Kammer eine Äquilibrierung des Gewebes über mehrere Minuten. Nach dem Eintreten eines konstanten Potenzials wurde die Na⁺-Resorption zur Schonung des Gewebes mit der luminalen Applikation von 50 µM Amilorid gehemmt. Die Cl⁻-Sekretion wurde durch basolaterale Applikation von 0,1 µM Forskolin (FSK) und 100 µM 3-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) aktiviert. Durch zusätzliche basolaterale Gabe von 100 µM Carbachol (CCh) konnte die Cl⁻-Sekretion weiter gesteigert werden. Die Applikation von Carbamazepin (CBZ) erfolgte sowohl auf der luminalen als auch auf der basolateralen Seite des Kolonepithels.

Für CBZ wurde zuerst eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung aufgestellt, die folgende Konzentrationen beinhaltete: 1 µM, 10 µM, 30 µM, 100 µM, 300 µM. Die Konzentration mit der höchsten Effektivität wurde für alle weiteren Untersuchungen verwendet.

2.1.2 Elektrophysiologische Messungen

2.1.2.1 Die Patch-Clamp Messtechnik

Die deutschen Wissenschaftler Erwin Neher und Bert Sakmann erhielten 1991 für die Entdeckung der Patch-Clamp Technik den Nobel-Preis für Medizin und Physiologie. Ihnen war es zum ersten Mal gelungen, Membranströme mit hoher Amplituden- und Zeitauflösung zu messen, die die Aktivität einzelner Ionenkanäle widerspiegeln (Sakmann & Neher, 1984). Mit dieser Messmethode ist es möglich, die Funktion von Ionenkanälen unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu analysieren und zu dokumentieren.

Ein entscheidender Faktor für eine erfolgreiche Messung ist die feste Verbindung zwischen Glaspipette und Membran, durch die es zu einem hohen elektrischen Abdichtwiderstand kommt (Gigaseal). Dadurch besteht ein sehr geringes elektrisches Rauschen, was die Auflösung der Ströme einzelner Ionenkanäle zulässt (Brau *et al.*, 1996).

Das Membranpotenzial eines bestimmten Membranstücks (Patch) kann durch eine Spannungsklemme auf beliebigen Werten gehalten oder auch sprunghaft geändert werden. Gemessen wird hierbei der Kompensationsstrom, der das Öffnen eines Kanals bzw. aller Kanäle in dem Patch anzeigt. Es gibt verschiedene Patchkonfigurationen: die cell-attached-, die inside-out-, die outside-out- und die whole cell-Konfiguration.

In dieser Arbeit wurden whole cell-Messungen (Ganzzellmessungen) durchgeführt. Das bedeutet, dass nach der Gigasealbildung die Zellmembran unter der Pipette eingerissen wurde und die Pipette damit Kontakt zum Zellinneren bekamen. Das Einreißen der Membran konnte durch das Anlegen eines kurzfristigen Unterdrucks an der Pipette erfolgen.

2.1.2.2 Membranpotenziale, -ströme und -leitwerte

Durch die unterschiedliche ionale Zusammensetzung des Extrazellulärraumes und des Intrazellulärraumes (Zytosol) entsteht ein Konzentrationsunterschied, der wiederum zu einer chemischen Triebkraft

von der höheren zur niedrigeren Konzentration führt. Ist die Zellmembran für ein bestimmtes Ion permeabel, so folgt dieses Ion seiner chemischen Triebkraft und baut einen elektrischen Gradienten (elektrisches Potenzial) auf. Das Umkehrpotenzial (Null-Strompotenzial) beschreibt das Potenzial, bei dem ein Gleichgewicht zwischen der chemischen und der elektrischen Triebkraft besteht und somit der Nettostrom über der Membran gleich Null ist. Mit Hilfe der Nernst-Gleichung (3) kann dieser Zustand beschrieben werden:

$$E = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \cdot \ln\left(\frac{[Ion]_a}{[Ion]_i}\right) \quad (\text{mV}) \quad (3)$$

E = Gleichgewichtspotenzial

R = allgemeine Gaskonstante ($8,3143 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$)

T = Versuchstemperatur (Kelvin); (310 K)

Z = Ladung des betreffenden Ions

F = Faraday-Konstante ($96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$)

$[Ion]_a/[Ion]_i$ = Konzentration der freien Ionen auf der Außen- bzw. Innenseite der Membran (mmol/l).

Aus den Gradienten für die relevanten Ionen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , und Cl^-) ergeben sich folgende Nernstpotenziale: $E_{\text{Na}^+} \approx +61 \text{ mV}$, $E_{\text{K}^+} \approx -93 \text{ mV}$, $E_{\text{Ca}^{2+}} \approx +120 \text{ mV}$ und $E_{\text{Cl}^-} \approx -40 \text{ mV}$.

Die Zellmembran ist für verschiedene Ionen unterschiedlich permeabel, so dass das Membranpotenzial (E_M) sowohl von den Konzentrationsunterschieden als auch von den Membranpermeabilitäten (P) der einzelnen Ionen abhängig ist.

Die Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung für einwertige Ionen (4) beschreibt das Null-Strompotenzial, bei dem die Summe aller Ströme der Zelle gleich Null ist.

$$E_M = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \frac{P_{K^+} \cdot [K^+]_a + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_a + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_j}{P_{K^+} \cdot [K^+]_j + P_{Na^+} \cdot [Na^+]_j + P_{Cl^-} \cdot [Cl^-]_a} \quad (\text{mV}) \quad (4)$$

Ionenkonzentrationsänderungen durch Ströme werden letztendlich durch kontinuierlichen aktiven Transport über Pumpen in der Zellmembran verhindert oder wieder ausgeglichen.

In den Patch-Clamp Messungen im Ganzzellmodus können nicht nur Membranpermeabilitäten, sondern auch Membranleitwerte gemessen werden. Der Membranleitwert ergibt sich aus der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung über die Permeabilität und die entsprechende Ionenkonzentration. Die Abhängigkeit des Membranpotenzials einer Zelle von den Leitwerten lässt sich nach Umformung der Goldman-Hodgkin-Katz-Gleichung mit den fraktionellen Leitwerten (f) sehr anschaulich beschreiben (5):

$$E_M = f_{K^+} \cdot E_{K^+} + f_{Na^+} \cdot E_{Na^+} + f_{Cl^-} \cdot E_{Cl^-} + \dots + f_n \cdot E_n \quad (\text{mV}) \quad (5)$$

mit f_n = fraktioneller Leitwert eines beliebigen Ions n
und E_n = Nernst-Potenzial für das beliebige Ion n.

Der fraktionelle Leitwert (f_n) der Membran für ein Ion n ergibt sich aus der Gleichung (6):

$$f_n = \frac{G_n}{G_m}; \quad (\text{nS}) \quad \text{es gilt: } \sum f_n = 1 \quad (6)$$

mit G_n = Leitwert des entsprechenden Ions n
und G_m = Gesamtleitwert der Membran.

Daraus ergibt sich, dass E_M durch die Leitwerte und Gleichgewichtspotenziale aller Ionen n beschrieben wird.

Der Leitwert ist der Kehrwert des Widerstandes ($G=1/R$) und durch Anwendung des Ohmschen Gesetzes ($U=R \cdot I$) ergibt sich folgende Formel zur Berechnung des Leitwertes (7):

$$G = \frac{I}{U} \quad (\text{S}) \quad (7)$$

Das Ruhemembranpotenzial einer Zelle wird im sogenannten Stromklemmmodus (*Current Clamp*, CC-Modus) des Verstärkers bei Null-Strom (CC_0) gemessen.

Die Zelle kann im Spannungsklemmmodus (*Voltage Clamp*, VC-Modus) auf ein bestimmtes Membranpotenzial geklemmt und der entsprechende Membranstrom kann gemessen werden. Hiermit ist es auch möglich, den Anteil der betreffenden Ionen zum Membranstrom zu definieren. Dazu wählt man ein Haltepotenzial aus, welches nahe dem Umkehrpotenzial des betreffenden Ions liegt. Misst man im VC-Modus bei verschiedenen Haltepotenzialen die Ströme durch die Zelle und trägt diese Werte anschließend in Abhängigkeit vom Potenzial auf, erhält man eine sogenannte Stromspannungskurve (I/V-Kurve).

2.1.2.3 Der Patch-Clamp Messstand

Der Messplatz (siehe Abbildung 11) war zum Schutz vor elektrischen Störungen aus der Umgebung, von einem Faraday-Käfig umgeben. Zusätzlich war er vor mechanischen Störungen geschützt, indem das inverse Mikroskop (Axiovert 135, Zeiss, Deutschland) die Mikromanipulatoren und der Vorverstärker mit dem Pipettenhalter auf einem schwingungsgedämpften Tisch montiert wurden.

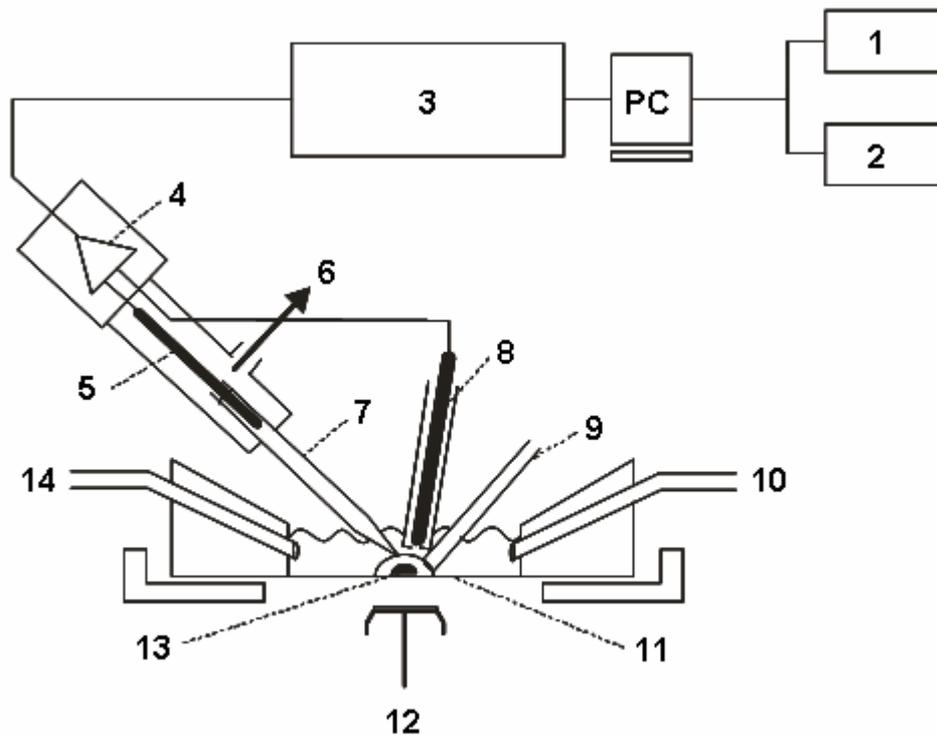


Abbildung 11

Schematische Darstellung des Patch-Clamp Messstands. Oszilloskop (1), Schreiber (2), EPC-9 (3), Vorverstärker (4), Messelektrode/Pipettenhalter (5), Über-/Unterdruck (6), Patchpipette (7), Referenzelektrode (8), Haltepipette (9), Badabsaugung (10), Deckglas (11), Objektiv (12), Kolonkrypte (13), Badzulauf (14).

Die Mikromanipulatoren dienen der fein abgestimmten Bewegung von Halte- und Patchpipette. Die Patch- sowie die Haltepipette waren aus Borsilikatglas (Außendurchmesser: 1,5 mm, Innendurchmesser: 1,2 mm, Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland). Die Enden der 7 cm langen Rohlinge wurden hitzepoliert, um scharfe Kanten zu vermeiden, die den Silberchloriddraht und die Dichtungsgummiringe im Pipettenhalter beschädigen konnten. Die Glasrohlinge wurden in einem Ziehgerät (DMZ-Universal Puller, Zeitz-Instrumente GmbH, München, Deutschland) zu den für die Patch-Clamp Messungen geeigneten Pipetten gezogen. Sie hatten einen Widerstand von 4 M Ω und einen Spitzendurchmesser von < 1 μ m. Die Haltepipette wurde auf dem Glasboden des Objektglases leicht abgebrochen und anschließend durch einen Polierungsschritt auf einen Durchmesser von ca. 50 μ m geschmolzen.

Die Patchpipette wurde mit sterilfiltrierter interner Lösung gefüllt und über eine Schlauchverbindung am Pipettenhalter konnte ein Unter- bzw. Überdruck an der Pipette angelegt werden. Beim Eintauchen der Patchpipette in die Badlösung lag ein Überdruck von ca. 20 cm H₂O an.

Die elektrische Verbindung zwischen Pipette und Vorverstärker erfolgte über einen Ag/AgCl-Draht. Der Kontakt zwischen Vorverstärker und Badlösung wurde über eine Ag/AgCl-KCl (1 M)-Brücke hergestellt. Der Widerstand der Patchpipette wurde mit Hilfe des Ohmschen Gesetzes aus der Höhe des angelegten rechteckigen Spannungspulses und dem sich daraus ergebenden Strom bestimmt.

Im Objektisch des Mikroskops konnte ein speziell angefertigtes Messkammersystem (rund, Ø 3,8 cm) eingesetzt und erwärmt werden. Die Messkammer bestand aus einer 10 mm dicken Plexiglasscheibe, die einen konischen Verlauf zur Mitte aufwies. In der Mitte war eine Aussparung von Ø 1 cm. Auf der Unterseite der Kammer konnte ein Objektglas (rund, Ø 22 mm) mit Silikonfett befestigt werden. An der Messkammer wurden Zu- und Ablaufschläuche befestigt, durch die kontinuierlich die erwärmten Lösungen (37°C) ins Bad flossen (Fließgeschwindigkeit: 7 ml/min). Des Weiteren wurde die Referenzelektrode in die Badlösung getaucht.

Die Referenzelektrode bestand aus einem Silberchloridpellet, welches in einen mit 1M KCl-Lösung gefüllten Polyethylenschlauch tauchte. Die Referenzelektrode war an ihrer Spitze fein ausgezogen (Ø 0,5 mm) und mit Watte gestopft. Damit wurde ein gleichmäßig niedriger KCl-Fluss (1 ml/24 h) in das Bad erreicht. Diese Art der elektrischen Brücke erzeugte keine Diffusionspotenziale.

Zur Messung der Membranströme und –potenziale diente ein Patch-Clamp Verstärker (EPC-9, HEKA Elektronik, Deutschland) der mit dem Vorverstärker, verbunden war. Das Signal wurde im Hauptverstärker weiter verstärkt und gefiltert und konnte über eine Computersoftware (Pulse v8.74, HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Deutschland) aufgezeichnet und bearbeitet werden. Um analoge Signale in digitale und umgekehrt zu übersetzen, war ein AD-DA-Wandler im Verstärker enthalten und vor den Computerausgang geschaltet. Ein Oszilloskop (HAMEG

Instruments) war ebenfalls an den Verstärker angeschlossen und diente der direkten Darstellung von Strom und Spannung. Die graphische Darstellung von Strom- und Spannungssignalen lieferte ein Schreiber (GOULD, RS3200).

2.1.2.4 Die Präparation und der Transfer der Kolonkrypten

Als Versuchstiere dienten männliche und weibliche Wistrarratten mit einem Gewicht von 120-200 g. Nach Dekapitation wurde das Kolon freigelegt, am distalen Abschnitt durchtrennt und mit eiskalter Ca^{2+} -haltiger Ringerlösung (siehe Experimentallösungen) gespült. Nach Entfernen des Mesenteriums konnte das Kolon mit Hilfe eines Glasstabes transrektal evertiert und kurz vor dem Rektum durchtrennt werden. Hierdurch entstand ein ca. 4 cm langer distaler Abschnitt. Die beiden Kolonenden wurden mit Klemmen in Form gehalten, der Glasstab entfernt und ein Katheter in das Darmstück eingeführt. Anschließend wurde das Darmstück über den Katheter mit Ca^{2+} -freier Lösung (siehe Experimentallösungen) prall gefüllt und die beiden Kolonenden mit Bindfäden abgebunden. Diese Behandlungen erfolgten auf einer eisgekühlten Unterlage. Nach Entfernen des Katheters erfolgte eine ca. zehnmünütige Inkubation des Darmstückes in einer 37°C warmen Ca^{2+} -freien Lösung, wobei sich die Zellverbindungen zwischen Epithel und Submukosa lösten. Nach der Inkubation im Schüttelbad kam der Kolonsack in eine 4°C frische Ca^{2+} -haltige Lösung, in der durch schnelles, starkes Schütteln einzelne Krypten abgelöst wurden. Die Krypten wurden in einem gekühlten Petrischälchen in Ca^{2+} -haltiger Lösung aufbewahrt. Sie konnten unter einem Binokular für die Experimente ausgewählt werden. Mit Hilfe einer Transferpipette wurden sie ins Experimentierbad überführt und dort mit einer Haltepipette auf dem Petrischalenboden fixiert. Die Basalregion der Krypte stand mit der Badlösung in Kontakt. Die Patch-Clamp Experimente wurden an der basolateralen Membran von Zellen aus dem Bereich der Kryptebasis durchgeführt (siehe Abbildung 12).

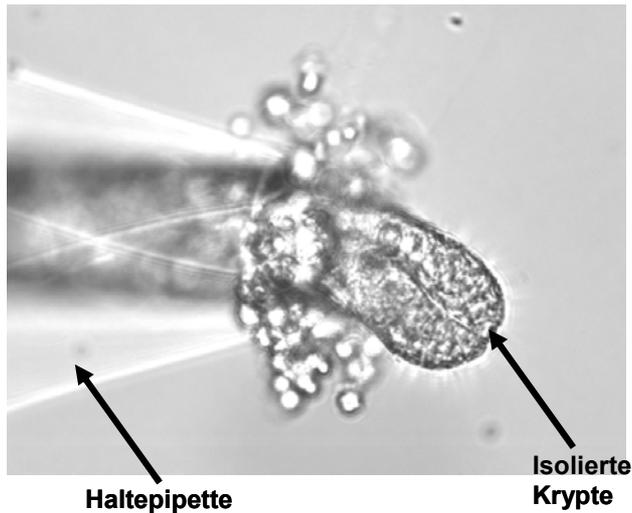


Abbildung 12:
Eine isolierte
Kolonkrypte, die mit der
lumenoffenen Seite in
eine Haltepipette
eingesaugt und über die
Basalregion mit der
Badlösung in Kontakt
steht.

Nach dem Fixieren der Krypte auf dem Petrischalenboden erfolgte die Sealbildung zwischen der mit interner Lösung gefüllten Patchpipette und der basolateralen Membran der Kryptzellen. Am Oszilloskop war die Gigasealbildung durch eine Verminderung des Strompulses zu erkennen. Nach der Kompensation der Pipettenkapazität und dem Abgleich von Elektroden- und Liquid-Junction Potenzialen (Zellabgleich) wurde ein negatives Haltepotenzial am Verstärker eingestellt und versucht, durch Anlegen eines leichten Unterdrucks, die Zellmembran unterhalb der Pipette zu durchbrechen, um einen elektrischen Zugang zur Zelle zu erhalten (whole cell). Nach gelungenem Zugang veränderte sich der Stromimpuls auf dem Oszilloskop in charakteristischer Weise. Da nun bei jedem Spannungsimpuls die gesamte Zellmembranfläche umgeladen werden musste, nahmen die kapazitiven Ströme stark zu. Gleichzeitig nahm der Widerstand ab.

Im Current-Clamp Modus konnte nun das Membranpotenzial gemessen werden.

2.1.2.5 Messprotokoll und Auswertung der Patch-Clamp

Experimente

Unter Ruhebedingungen weisen Zellen der Kolonkryptbasis ein Membranpotenzial in der Nähe des K^+ -Gleichgewichtspotenziales (-90 mV) auf. Sie depolarisieren unter Stimulation des cAMP Weges durch die Öffnung von Cl^- Kanälen auf Werte etwas negativer als das Gleichgewichtspotenzial für Cl^- (-40 mV). Des Weiteren zeigen sie einen entsprechenden Anstieg des Membranleitwertes.

Das Patch-Clamp Messprotokoll (siehe Abbildung 13) wurde mit Hilfe der Computersoftware Pulse v8.74 (HEKA Elektronik, Dr. Schulze GmbH, Deutschland) an Zellen der Kryptbasis angewendet. Das Haltepotenzial betrug -80 mV und wurde in rechteckigen Spannungssprüngen (20 mV-Schritte) auf +20 mV erhöht. Die Pulsdauer betrug 200 ms. Zwischen den einzelnen Spannungsschritten wurde immer wieder auf das Haltepotenzial geklemmt. Das Membranpotenzial wurde zwischen den einzelnen I/V-Kurven durch Umschalten in den CC-Modus (50 ms) überprüft und notiert. Die Auswertung der in den Patch-Clamp Experimenten ermittelten Leitwerte erfolgte mittels linearer Regression der I/V-Kurven.

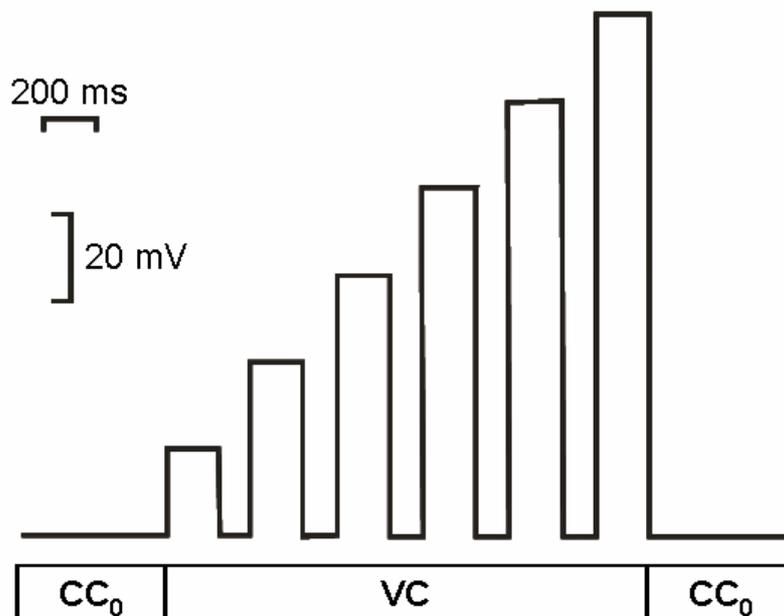


Abbildung 13:

Schematische Darstellung des verwendeten Patch-Clamp Messprotokolls an isolierten Kolonkrypten. Abbildungserläuterungen siehe Text.

Die Messungen erfolgten in Ganzzelleableitungen an Zellen der Basis von 30 isolierten Kolonkrypten. Zunächst wurde das Membranpotenzial bestimmt. Zellen, die ein Membranpotenzial $V_m > -50$ mV unter Kontrollbedingungen aufwiesen, wurden nicht weiter untersucht.

Dann erfolgte die Gabe von FSK/IBMX ($0,1 \mu\text{M}/100 \mu\text{M}$) und alle Zellen, die ein Membranpotenzial $V_m < -15$ mV und einen Anstieg von G_{total} aufwiesen, wurden auf die Wirkung von CBZ ($100 \mu\text{M}$) in Anwesenheit von FSK/IBMX untersucht. Schließlich wurde CBZ ausgewaschen und die Wirkung von CCh ($100 \mu\text{M}$) in Anwesenheit von FSK/IBMX getestet.

Nach dem Umlegen des 3-Wege-Hahns erreichten die jeweiligen Experimentallösungen die Krypte mit einer Verzögerung von ca. 20 s. Nach weiteren 40 s, d.h. nach vollständigem Badlösungsaustausch, wurden die Messwerte der ersten drei bis vier Spannungsrampen zu jeder Versuchsbedingung gemittelt und für die Erstellung der I/V-Kurve verwendet. Der Leitwert (G_{total}) wurde aus der Steigung der I/V-Kurve ($\Delta I/\Delta U$) im Bereich ihres Schnittpunktes mit der Abszisse ermittelt. Der Gesamtleitwert (G_{total}) bzw. der Gesamtwiderstand (R_{ges}) des Messsystems werden durch die in Serie geschalteten Widerstände der Pipette zur Zelle (R_a) und der Zellmembran (R_m) beeinflusst (siehe Abbildung 14).

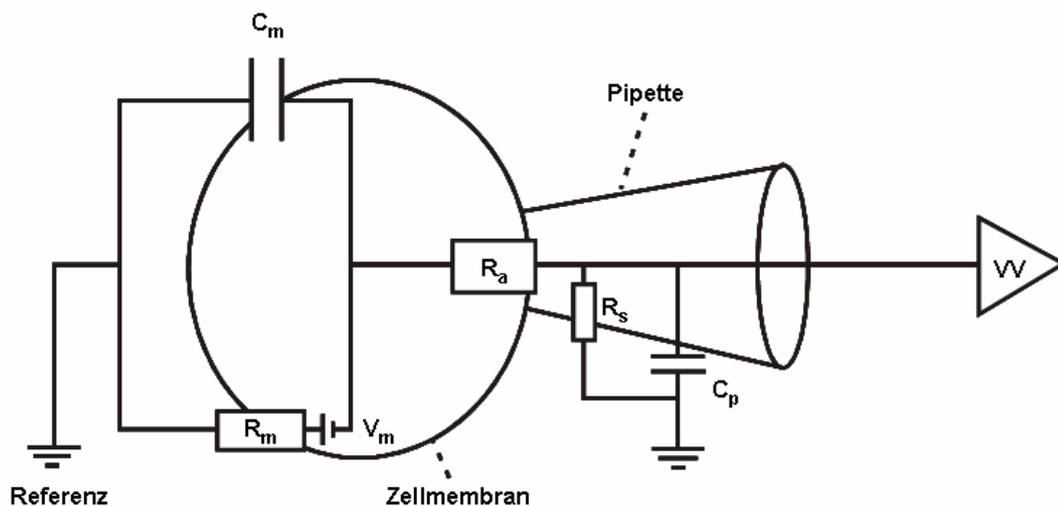


Abbildung 14:

Schaltbild der Ganzzelleableitung. Zellmembrankapazität (C_m); Membranwiderstand (R_m); Membranpotenzial (V_m); Eingangswiderstand der Patchpipette (R_a); Abdichtwiderstand (R_s); Eigenkapazität der Patchpipette (C_p); Vorverstärker (VV).

Nach dem Umformen des Kirchhoffschen Gesetz (8):

$$R_{ges} = R_a + R_m \quad (\text{M}\Omega) \quad (8)$$

erhält man folgende Gleichung für die Berechnung der Leitwerte (9):

$$G_m = \frac{G_{total} * G_a}{G_a - G_{total}} \quad (\text{nS}) \quad (9).$$

Der berechnete Membranleitwert der Zelle (G_m) hängt also vom Eingangswiderstand der Pipette (R_a) und dem Gesamtleitwert (G_{total}) ab. R_a kann über eine Impedanzanalyse, dem sogenannten Abgleich, ermittelt werden, da der Eingangswiderstand der Pipette mit der Membrankapazität in Serie geschaltet ist.

Da der Zellabgleich nur zu Beginn der Patch-Clamp Messungen durchgeführt wurde und sich dieser Wert im Laufe des Experimentes ändern kann, konnten für die Berechnung von G_m nur die ersten drei bis vier I/V-Kurven verwendet werden. Aus diesem Grund erfolgt in dieser Arbeit die Darstellung aller Leitwertmessungen als G_{total} . Diese Werte liegen systematisch niedriger als G_m . Außerdem kann eine Abnahme von G_a im Verlauf des Experimentes zu einer Abnahme von G_{total} und zu einer Begrenzung der maximal messbaren G_{total} -Werte führen.

2.1.3 Messung der intrazellulären freien Ca^{2+} -Konzentration mit Fura-2/AM

2.1.3.1 Allgemeines zur Methodik

Zur Bestimmung der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) wurde die Technik der Mikrofluorimetrie eingesetzt. Dabei werden Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die bei Beleuchtung, abhängig von der Ionenkonzentration, ihre Fluoreszenzintensität und Farbe ändern. Diese Farbstoffe müssen sich schonend in die Zelle einbringen lassen und dürfen für die Zelle nicht toxisch sein. Für die Ca^{2+} -Messung müssen sie

eine hohe Affinität zu Ca^{2+} -Ionen haben und eine sehr geringe bzw. keine Empfindlichkeit gegenüber anderen Ionen aufweisen. Fura-2 ist ein solcher Fluoreszenzfarbstoff, mit dessen Hilfe $[\text{Ca}^{2+}]_i$ gemessen werden kann. Die Dissoziationskonstante liegt bei etwa $0,25 \mu\text{M}$ und damit genau im Bereich zellulärer Ca^{2+} -Signale ($0,1-1 \mu\text{M}$). Der Farbstoff besitzt vier Carboxylatgruppen, in die sich die Ca^{2+} -Ionen einlagern können. Dabei verändert sich die Struktur des Farbstoffs so, dass sich das Absorptions/Emissionsspektrum verändert (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Die Anregungswellenlänge für Fura-2 wird durch die Bildung des Chelatkomplexes in den kurzwelligen Bereich hin verschoben (Moore *et al.*, 1990) (siehe Abbildung 15).

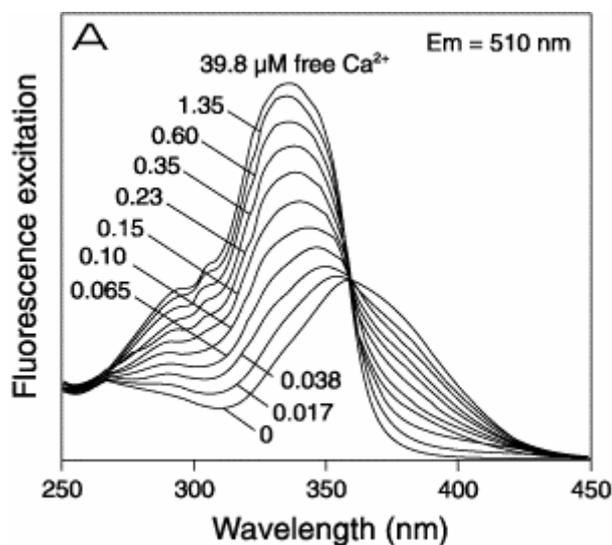


Abbildung 15:
 Änderung der Fluoreszenzintensität von Fura-2 bei unterschiedlicher Anregungswellenlänge und freier Ca^{2+} -Konzentration modifiziert nach (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Bei 360 nm ist die Fluoreszenz unabhängig von der Ca^{2+} -Aktivität (isobestischer Punkt).

Um eine quantitative Aussage über die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in einer Zelle machen zu können, regt man den Fluoreszenzfarbstoff mit zwei unterschiedlichen Wellenlängen (340 nm/380 nm) an: Wird der Farbstoff mit der kürzeren Wellenlänge angeregt, so verstärkt sich mit zunehmender $[\text{Ca}^{2+}]_i$ die Fluoreszenzintensität. Die Intensität nimmt aber ab, wenn der Farbstoff der längeren Anregungswellenlänge bei zunehmender $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ausgesetzt ist. Für die Anwendung von Fura-2 bedeutet das, dass der Farbstoff bei einer Anregungswellenlänge von 340 nm bzw. 380 nm grünes Licht emittiert. Bildet man den Quotienten der Emissionsintensitäten 340 nm/380 nm (Ratio), bekommt man ein Signal, das proportional zur Ca^{2+} -Aktivität, aber unabhängig von der Farbstoffkonzentration ist.

2.1.3.2 Ca^{2+} -Messplatz und Messprotokoll

Die Messungen der $[\text{Ca}^{2+}]_i$ wurden mit einem VisiChrome High Speed Polychromator System (Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) durchgeführt. Der Aufbau des Ca^{2+} -Messplatzes ist in Abbildung 16 dargestellt.

Als Anregungslichtquelle für Fura-2 (300 ms bei 340 nm, 360 ms bei 380 nm) diente eine Xenonlampe (75 W), deren Licht durch ein optisches Gitter gefiltert wurde. Eine Blende kontrollierte den Lichtweg und ein Graufilter begrenzte die Lichtintensität. Das Licht wurde an einem dichroischen Spiegel (415-570 nm, Semrock, USA) durch ein 40x Objektiv zum Objekt hin reflektiert.

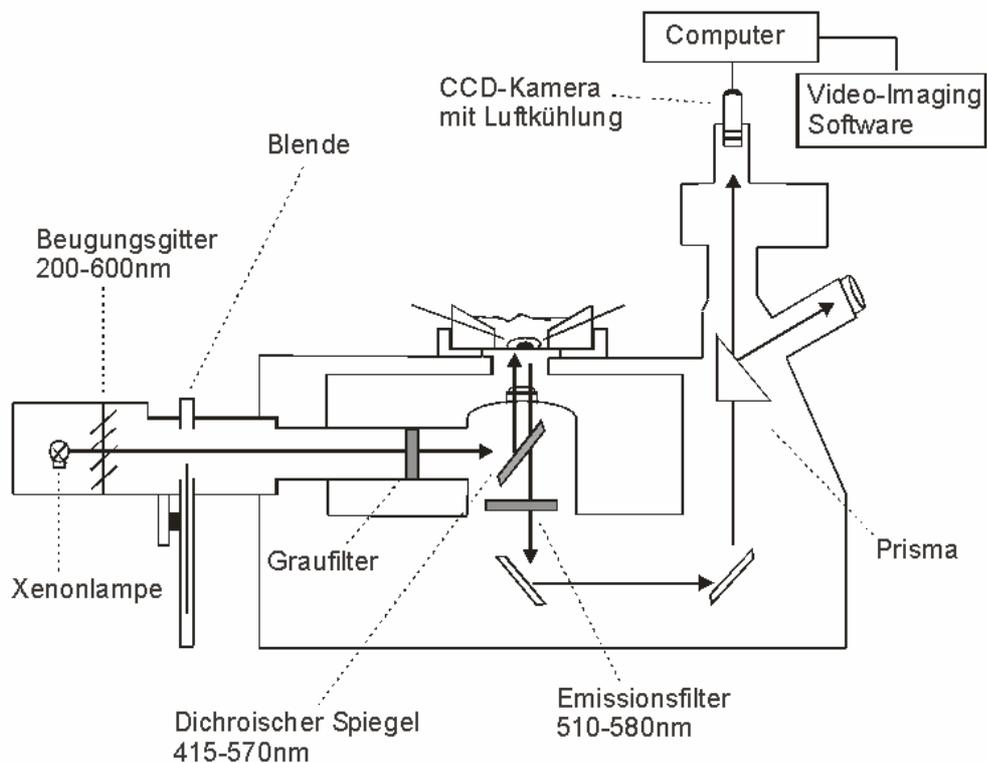


Abbildung 16:
Der Fluoreszenzmessplatz zur Ca^{2+} -Messung an isolierten Kolonkrypten.

Das Fluoreszenzlicht des Objekts (Fura-2-Emission) passierte das 40x Objektiv, den durchlässigen dichroischen Spiegel und ein Emissionsfilter (510-580 nm, Semrock, USA). Eine luftgekühlte CCD-Kamera mit

1,92 Mill. Pixel (Spot RT-SE, Diagnostic Instruments Inc., USA) nahm das Intensitätsbild auf.

Durch die Zusammenfassung mehrerer Pixel (Binning; 2x2 Pixel) wurde das Rauschen auf Kosten der räumlichen Auflösung vermindert. Ein Computerprogramm (MetaFluor, Visitron Systems GmbH, Puchheim, Deutschland) diente der Datendarstellung und Analyse. Während des Experimentes waren sowohl die Daten der einzelnen Wellenlängen als auch die der Quotienten auf zwei angeschlossenen Bildschirmen sichtbar. Der Fluoreszenzquotient (340 nm/380 nm) als Maß für die $[Ca^{2+}]_i$ in isolierten Kolonkrypten wurde alle 2 s bestimmt. Die Applikation der Inkubationslösungen erfolgte additiv. Zu Beginn wurden die Krypten in Kontrolllösung und unter FSK/IBMX (0,1 μ M/100 μ M) analysiert. Danach erfolgte die Applikation von 0,1 % DMSO (Lösungsmittel) oder 100 μ M CBZ in Anwesenheit von FSK/IBMX und schließlich die Applikation von 100 μ M CCh.

Für die statistische Auswertung wurden sowohl unter DMSO als auch unter CBZ jeweils Experimente an fünf Einzelkrypten durchgeführt. An jeder Krypte wurden mehrere Bereiche für die Fluoreszenzmessungen ausgewählt und gemittelt.

2.1.3.3 Beladung der Krypten mit Fura-2/AM

Für die Farbstoffbeladung der isolierten Kolonkrypten wurde ein lipophiler membranpermeabler Acetoxymethylester von Fura-2 verwendet (Fura-2/AM) (invitrogen, F 1221).

Intrazellulär werden die Esterbindungen hydrolytisch von unspezifischen Esterasen gespalten, so dass Fura-2 lipophob wird und in der Zelle eingeschlossen bleibt (Moore *et al.*, 1990).

Fura-2/AM wurde als 1 mM Stammlösung mit Dimethyl-Sulfoxid (DMSO, Roth, Cat. No. 4720-2) hergestellt und in Aliquots lichtgeschützt bei -21°C aufbewahrt.

Nach der Bestimmung der Autofluoreszenz wurden die Einzelkrypten mit 10 μ M Fura-2 beladen. Dafür wurden sie für 30-90 min unter

Lichtausschluss in Ca^{2+} -haltiger Lösung in einer Mikrotiterplatte (Sarstedt, Cat. No. 83.1837) inkubiert. Danach erfolgte die Übertragung einzelner Krypten mit Hilfe einer Transferpipette in Kontrolllösung unter das Mikroskop. Um die Messungen mittels Calcium Imaging durchführen zu können, wurde die Krypte mit ihrer lumenoffenen Seite in eine Haltepipette eingesaugt und mit der Basalregion auf dem Petrischalenboden fixiert.

2.1.4 Messung der intrazellulären cAMP-Konzentration in isolierten Kolonkrypten

2.1.4.1 Allgemeines

Zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP) ist ein ubiquitärer intrazellulärer Botenstoff. Die membrangebundene Adenylatzyklase (AC), die durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren reguliert wird, bildet aus ATP cAMP. Die Phosphodiesterase beendet das cAMP-Signal durch Hydrolyse des Moleküls zu AMP.

In isolierten Kolonkrypten wurde die zelluläre cAMP-Konzentration mit Hilfe eines enzymatischen Antikörpertests (ELISA) (Cyclic AMP EIA Kit, No. 58 100 1, Cayman Chemical Company, USA) photometrisch bestimmt. Dieser Test basiert auf einer Konkurrenzreaktion zwischen freiem cAMP und Acetylcholinesterase-gebundenem cAMP um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen eines cAMP-spezifischen Antikörpers. Die Konzentration von cAMP, welches an die Acetylcholinesterase gebunden ist, ist aufgrund vorgegebener cAMP-Standardkonzentrationen bekannt und wird konstant gehalten, während die des zu bestimmenden (freien) cAMP variiert. Der an den Antikörper gebundene cAMP-Acetylcholinesterase-Anteil ist umgekehrt proportional zur unbekannt Menge an freiem cAMP. Der cAMP-spezifische Antikörper bindet an einen sekundären Antikörper auf der Mikrotiterplatte. Gemessen wird die Aktivität der Acetylcholinesterase, die Cholin in Thiocholin spaltet, welches wiederum mit 5,5'-dithio-bis-2-Nitrobenzoesäure zu 5-Thio-2-Nitrobenzoesäure reagiert. Die resultierende Gelbfärbung kann

photometrisch durch die Absorption bei 405-412 nm bestimmt werden und ihre Farbintensität ist ein Maß für die cAMP-Konzentration der Probe.

2.1.4.2 Vorbereitung und Versuchsprotokoll

Als Grundlage für die Durchführung der Experimente zur cAMP-Bestimmung diente eine Suspension isolierter Kolonkryptzellen. Hierfür wurden für jede Messung die Kryptzellensuspensionen aus zwei weiblichen Wistarratten verwendet.

Die Kryptsuspensionen beider Ratten wurden gemischt und je 15 ml wurden in sterile Petrischalen (Ø 100 mm, IWAKI, code 3020-100) pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 37°C für 10 min auf einem Schüttler. Das Inkubationsprotokoll ist in Abbildung 17 dargestellt. Als Kontrolllösung der verschiedenen Versuchsbedingungen diente die erwärmte Ca^{2+} -haltige Lösung (Petrischale 1, Kontrolle). In zwei weiteren Petrischalen (2, 3) wurde zu der Ca^{2+} -haltigen Lösung Forskolin (FSK, 0,1 μM) pipettiert, um die Aktivität der Adenylatzyklase zu steigern. Die Inkubation der Krypten in dieser Lösung betrug in der 2. Petrischale insgesamt 10 min. In der 3. Petrischale wurden die Krypten für 5 min 0,1 μM FSK ausgesetzt und danach für weitere 5 min zusätzlich mit 100 μM Carbamazepin (CBZ) inkubiert.

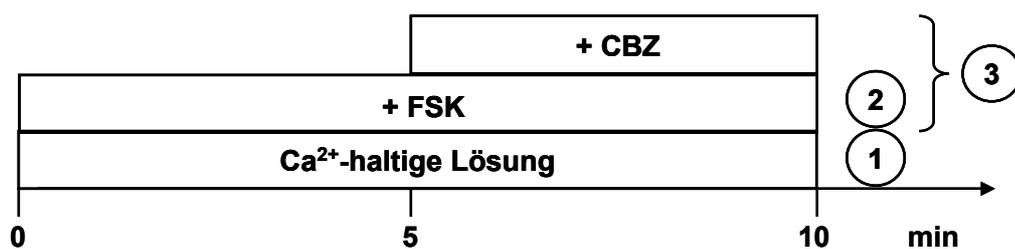


Abbildung 17:

Schemazeichnung des Inkubationsprotokolls zur Messung der zellulären cAMP-Konzentration in isolierten Kolonkrypten. 1-3 stellen die drei Petrischalen mit unterschiedlich zusammengesetzter Inkubationslösung dar. 0,1 μM Forskolin (FSK), 100 μM Carbamazepin (CBZ).

Nach der 10-minütiger Inkubation wurden die Kryptosuspensionen bei 7,500 x g (4°C, 10 min) in einer Ultrazentrifuge (Thermo, TGA-65) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Pellet in einem definierten Volumen von 5% Trichloressigsäure resuspendiert, die Krypten mit Hilfe eines Ultra-Turrax (Jahnke & Kunkel KG, TP 18/2N) auf Eis homogenisiert und wieder bei 7,500 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Das Zellpellet wurde bis zur Proteinbestimmung nach Lowry bei -21°C eingefroren. Die weitere Bearbeitung des Homogenats wurde gemäß der Anleitung des cAMP-Kits durchgeführt. Verdünnungen der Proben erfolgten mit dem EIA-Buffer aus dem cAMP-Messkit. Die Absorptionmessungen der belegten Mikrotiterplatten (96 well, Sarstedt, Cat. No. 83.1837) erfolgte in einem Mikrotiterplatten Reader (Tecan, GENios) bei 405 nm.

Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden entsprechend der Eichkurven in cAMP-Konzentrationen umgewandelt und die cAMP-Menge daraus berechnet. Um die Änderungen beurteilen zu können, erfolgte die Berechnung der relativen cAMP Menge bezogen auf das Zellprotein für die 5 einzelnen Messreihen. Der maximale Wert unter Stimulation mit FSK wurde als Bezugsgröße verwendet (100%).

2.2 *In-vivo* Versuchsdurchführungen

2.2.1 Allgemeines

2.2.1.1 Versuchstiere, Training, metabolische Käfige

Als Versuchstiere dienten weibliche Wistarratten (200-300 g) aus eigener Zucht. Die Tiere wurden unter konstanten Bedingungen mit abwechselnden Hell- und Dunkelperioden von jeweils 12 Stunden gehalten und erhielten gemahlene Standardfutter (ssniff R/M-H, 10 mm, V 1534-000, sniff Spezialitäten GmbH, Soest) und Wasser *ad libitum*. Die Tiere wurden final durch Entbluten getötet. Alle Untersuchungen waren

genehmigt und wurden unter Beachtung des Deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt.

Da Carbamazepin (CBZ) nicht wasserlöslich ist, diente 2% Tylose (Tylose[®] MH 300, Fluka Bio Chemika 93800, Schweiz) als Trägermaterial für eine Suspension. Tyloسلösung (2%) ohne CBZ diente als Kontrollsubstanz. Die Ratten erhielten CBZ (1 ml/kg KG) aus einer Stammlösung (50 mg/ml). Die orale Applikation (po.) von Carbamazepin oder 2% Tylose erfolgte über zwei verschiedene Schlundsonden (Fine Science Tools GmbH, No. 18061-50, Heidelberg, Deutschland) derselben Größe, um sicher zu stellen, dass die Kontrolltiere keinen Kontakt zu CBZ hatten und die CBZ-Tiere die gezielte Dosis von 50 mg CBZ/kg KG/Tag erhielten. Die Schlundsonden hatten eine Länge von 50 mm und einen Durchmesser von 2,25 mm.

Um einen stressfreien Umgang der Wistarratten bei der oralen Applikation über die Schlundsonde zu erzielen, wurden die Ratten einige Wochen vor der eigentlichen Versuchsdurchführung an die Prozedur gewöhnt. Zur Applikation während dieser Zeit wurde 2% Tyloسلösung verwendet.

Die Untersuchungen im Stoffwechsellkäfig (Standard, TECNIPLAST, Deutschland) wurden bei jeder Ratte für jeweils 24 Stunden vorgenommen. Abweichende Messperioden sind im jeweiligen Versuchskapitel explizit aufgeführt.

Der besondere Aufbau der Käfige ermöglichte es, Urin und Kot getrennt zu sammeln und die Parameter wie Futter- und Wasseraufnahme jedes Tieres zu analysieren. Der Versuch startete nach einer Trainingsphase der Tiere.

2.2.1.2 Bestimmung der Trinkmenge

Die Trinkflaschen wurden zu Beginn der Untersuchung gefüllt, gewogen und in unterschiedlichen Zeitintervallen erneut gewogen. Aus der Gewichts Differenz konnte die Trinkmenge berechnet werden, wobei 1 ml = 1 g gesetzt wurde.

2.2.1.3 Bestimmung der Futtermenge

Die Futterbehälter wurden mit gemahlenem Standardfutter gefüllt, gewogen und je nach Versuch nach unterschiedlichen Zeitintervallen erneut gewogen. Die Gewichts Differenz ergab die Futtermenge in Gramm. Das Futter wurde jeden Morgen erneuert und das neue Gewicht des Futterbehälters ermittelt.

Der Vorteil von gemahlenem Futter lag darin, dass die Tiere keine Pellets aus der Futterkammer tragen und durch Futterreste die Urin- und Kotproben verunreinigen konnten.

2.2.1.4 Bestimmung der Urinmenge

Die Urinmenge innerhalb von 24 h wurde aus der Gewichts Differenz des vollen Urinbehälters abzüglich dem des Leerwertes bestimmt. Analog zu der Trinkmengenbestimmung wurde das Uringewicht in Milliliter umgerechnet. Der Urin wurde in 10 ml Reaktionsgefäße gefüllt und bis zur weiteren Analyse (Elektrolyte, Kreatinin, Osmolalität) bei -21°C eingefroren.

Bei dem Versuchsansatz mit der Wasserbelastung wurde zusätzlich 2 h und 5 h nach der Wasserbelastung Urin gesammelt. Auch diese Proben wurden bei -21°C eingefroren und später analysiert.

2.2.1.5 Bestimmung der Kotmenge

Die Bestimmung der Kotmenge folgte entsprechend dem Ablauf der Urinmengenermittlung.

2.2.1.6 Blutabnahme

Das Blutvolumen einer adulten Ratte beträgt ca. 50-70 ml/kg KG, wovon ungefähr 1 % bei einem gesunden Tier abgenommen werden können, ohne die Homöostase des Tieres nachhaltig zu beeinträchtigen. Die Blutabnahme erfolgte aus dem retrobulbären Venenplexus oder final aus der *Vena cava* bzw. der *Aorta abdominalis*.

Zur Durchführung der Blutentnahme wurden die Tiere durch eine Inhalationsnarkose von 3,5 Vol% Isofluran (Isofluran Curamed, CuraMED Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland) in einer Narkosebox betäubt.

Anschließend wurde vorsichtig ein kurzes Stück einer heparinisierten (Na-Heparin) Mikro-Hämatokritkapillare (BRAND GmbH, Wertheim, Cat. No. 749311) über den medialen Augenwinkel am Bulbus entlang in den retrobulbären Venenplexus eingeführt. Der retrobulbäre Venenplexus wurde mit einer drehenden Bewegung eröffnet und 1-2 ml Blut (aus dem anderen Ende der Kapillare) in ein Eppendorfreaktionsgefäß aufgefangen und mit EDTA versetzt (1,6 mg Kalium-EDTA/ml Blut).

Die Plasmagewinnung erfolgte durch Zentrifugation für die Dauer von 10 min bei 2.000 x g (HERAEUS Biofuge vito, Kendro Laboratory Products, Deutschland). Das Plasma wurde abpipettiert und die Proben bis zur weiteren Analyse (Elektrolyte, Kreatinin, Osmolalität) bei -21°C gelagert.

Arteriell Blut wurde aus der *Aorta abdominalis* gewonnen und ebenfalls wie oben beschrieben behandelt.

2.2.2 Analytik der Proben

Die Urinkonzentrationen der Elektrolyte, des Harnstoffs und des Kreatinins sind Voraussetzungen für eine Beurteilung der Nierenfunktion. Ihre absoluten Werte haben erst eine Aussagekraft im Zusammenhang mit der jeweiligen Plasmakonzentration und der Harnflussrate.

2.2.2.1 Bestimmung der Elektrolytkonzentrationen

Zur Bestimmung der Na⁺-, K⁺- und Ca²⁺-Konzentrationen (mmol/l) in Plasma und Urin wurde ein für kleine Probenvolumina (20 - 100 µl) umgebautes Flammenphotometer (EFOX 5053, Fa. Eppendorf, Hamburg, Deutschland) verwendet. Die Grundlage der Flammenphotometrie besteht darin, dass Atome bei Anregung Licht in spezifischer Farbe emittieren. Nach Einsprühen einer Elektrolytlösung in eine Flamme wird das emittierte Licht durch ein Interferenzfilter (Bandpass) geleitet und trifft auf einen Photoempfänger, der das Licht in ein elektrisches Signal umwandelt. Dieses Signal ist proportional der Anzahl der angeregten Atome und somit der Konzentration der eingesprühten Elektrolytlösung bei konstanter

Volumenstromstärke. Um die Konzentration störungsfrei messen zu können, bedient man sich bei der Flammenphotometrie zusätzlich des so genannten Leitlinienprinzips (Thomas & Walb, 1988): Sowohl den Proben- als auch den Eichlösungen war Lithium in einer bestimmten Konzentration (5 mmol/l) beigefügt. Mit Kenntnis der Lithiumemission kann durch Quotientenbildung die Elektrolytkonzentration in den Probenlösungen unabhängig von der Volumenstromstärke errechnet werden.

2.2.2.1.1 Analyse der Plasmaproben

Die Plasmaproben aus einem Experiment wurden jeweils an einem Tag gemeinsam analysiert. Nach dem Auftauen der Proben erfolgte die Elektrolytbestimmung, indem die Proben mit Lithiumstandard (5 mmol/l) vermischt wurden. Das Flammenphotometer wurde vor der Messung und alle 10 min während der Messungen mit Plasma-Standardlösung (Na^+ : 143,5 mmol/l; K^+ : 3,84 mmol/l; Ca^{2+} : 2,5 mmol/l) kalibriert.

Aus Doppel- bis Vierfachbestimmungen wurde der Mittelwert gebildet und zur weiteren Berechnung eingesetzt.

2.2.2.1.2 Analyse der Urinproben

Die Elektrolytbestimmung im Urin erfolgte ebenfalls mit dem Flammenphotometer, in gleicher Weise wie die Bestimmung im Plasma. Der aufgetaute Urin wurde vor der Messung kurz zentrifugiert (8,000 x g; 5 min; Biofuge vito; Kendro Laboratory Products) und der Überstand zur Messung gegebenenfalls mit demineralisiertem Wasser (*Aqua dest.*) vorverdünnt. Doppelbestimmungen jeder Probe wurden durchgeführt, die Konzentrationsangaben erfolgten in mmol/l. Das Flammenphotometer wurde vor und alle 10 min während der Messungen mit zugehöriger Urin-Standardlösung (Na^+ : 143,5 mmol/l; K^+ : 100,0 mmol/l; Ca^{2+} : 5,0 mmol/l) kalibriert.

2.2.2.1.3 Analyse der Fäzesproben

Zur Bestimmung der Elektrolyte wurden die zuvor in einem Trockenschrank (60°C) bis zur Gewichtskonstanz getrockneten Fäzesproben homogenisiert. Dies erfolgte durch Lyse von getrockneten

Kotproben in *Aqua dest.* (15 ml *Aqua dest.* / 1 g Fäzestrockengewicht). Zur Homogenisation diente ein Ultra-Turrax (Typ TP18/2N, Janke und Kunkel KG, Staufen i. Breisgau). Aus dem homogenisierten Brei wurden 1,5 ml in Eppendorfgefäße (2 ml) pipettiert und zentrifugiert (12,000 x g; 3 min). Aus dem resultierenden Überstand wurden 200 µl/Probe im Flammenphotometer in gleicher Weise wie die Urinproben analysiert.

2.2.2.2 Bestimmung der Osmolalität

Mit Hilfe der Gefrierpunktserniedrigung lässt sich die Osmolalität einer Lösung bestimmen. Diese Methode hängt nur vom Lösungsmittel und der Anzahldichte der gelösten Teilchen ab und daher gilt, dass die Gefrierpunktserniedrigung nahezu proportional zur Stoffmengendichte der gelösten Substanz ist (Harten, 2002). Im Fall von Körperflüssigkeiten sind die gelösten Teilchen zum einen die Elektrolyte und zum anderen Kreatinin, Harnstoff, Glukose usw.

Die Osmolalitäten der Plasma- und Urinproben wurden mit Hilfe eines Micro-Osmometers (Fiske[®] Associates, Model 210, Massachusetts 02062, USA) gemessen. Das Gerät wurde vor und während der Analyse der Proben mit Standardlösungen kalibriert. Die Plasma- und Urinproben wurden aufgetaut, gemischt und vor der Osmolalitätsmessung kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde für die Messungen eingesetzt. Aus Doppelbestimmungen (20 µl Probe/Messung) wurde der Mittelwert gebildet und zur weiteren Datenanalyse eingesetzt.

2.2.2.3 Bestimmung der Kreatininkonzentration

Kreatinin ist ein endogener Metabolit des Muskelstoffwechsels. Es wird kontinuierlich ins Blut abgegeben (Plasmakonzentration beim Menschen 88 µM) und wird bei normaler Nierenfunktion durch glomeruläre Filtration ausgeschieden. Die endogene Kreatinin-Clearance kann als Bezugsgröße für die Beurteilung der renalen Filtrationsleistung herangezogen werden, da Kreatinin von der Niere kaum resorbiert oder sezerniert wird. Die Ausscheidung steht in einer konstanten Beziehung zur Muskelmasse.

Analyse der Plasmaproben

Die Bestimmung des Kreatinins im Plasma erfolgte mittels eines enzymatischen Testkits (Creatinin PAP, Biocon[®] Diagnostik, Vöhl/Marienhagen, Deutschland). Hierbei entstand aus dem Ausgangsstoff Kreatinin über verschiedene enzymatische Reaktionen Wasserstoffperoxid, welches wiederum mit 4-Aminophenazon und 2,4,6-Trijod-3-hydroxybenzoesäure zu einem Chinoniminfarbstoff reagierte. Die Farbintensität dieses Komplexes war direkt proportional zur Kreatininkonzentration und wurde durch eine Extinktionsmessung bei 552 nm bestimmt.

Analyse der Urinproben

Die Bestimmung von Kreatinin im Urin erfolgte indirekt über die sog. Jaffé-Reaktion. In dieser Reaktion wird Pikrinsäure (2,4,6-Trinitrophenol) durch Kreatinin im alkalischen Medium zu einem Kreatinin-Pikrat-Komplex reduziert. Diese Verbindung kann anhand ihrer roten Farbe photometrisch bestimmt werden.

Die Messansätze bestanden aus einem Gemisch von 250 µl der zu messenden Probe (Urin/Eichlösung), 250 µl Trichloressigsäurelösung (TCE) und 500 µl einer Mischung aus gleichen Teilen einer 1,2 %-Pikrinsäurelösung und Natronlauge (1,6 mmol/l). Damit die Bedingungen der temperaturempfindlichen Farbreaktion für alle Proben gleich waren, wurde das Gemisch für 20 Minuten bei 25 °C inkubiert. Für die photometrische Bestimmung bei 546 nm wurde ein Eppendorf-Photometer (1101 M) verwendet. Zur Erstellung einer Eichgeraden wurden statt des Urins 250 µl einer Kreatininlösung in drei verschiedenen Konzentrationen (2 mg, 1 mg, 0,5 mg in je 100 ml H₂O) gemessen. Um die Eigenfarbe von Pikrinsäure abzugleichen, wurde ein Leerwert ermittelt, der Wasser anstelle des Kreatinins enthielt.

2.2.2.4 Berechnung von Kreatinin-Clearance, fraktioneller Elektrolytausscheidung und Elektrolytbilanz

Unter dem Begriff „Clearance“ versteht man das Plasmavolumen, das von einer harnpflichtigen Substanz in einem bestimmten Zeitraum vollständig befreit wird. Ist die Menge der filtrierten Substanz z.B. Kreatinin (Krea) gleich mit der ausgeschiedenen Menge, ist die renale Clearance gleich der glomerulären Filtrationsrate (GFR). Bei Substanzen, die teilweise resorbiert werden, ist die renale Clearance kleiner als die GFR; bei Substanzen, die sezerniert werden, ist die renale Clearance größer als die GFR.

Die Berechnung der Kreatinin-Clearance erfolgt nach folgender Formel (10):

$$C_{\text{Krea}} = \frac{(U_{\text{Krea}} * V)}{P_{\text{Krea}}} \quad (\text{ml/min}) \quad (10)$$

C_{Krea} = Kreatininclearance;

P_{Krea} = Kreatininkonzentration im Plasma;

U_{Krea} = Kreatininkonzentration im Urin;

V = Harnzeitvolumen.

Die Fraktionelle Ausscheidung (FE) einer Substanz gibt das Verhältnis zwischen der im Urin ausgeschiedenen Menge und der in den Primärharn filtrierten Menge an. Die FE ist unabhängig vom Harnzeitvolumen und erlaubt so auch die Beurteilung von Spontanurinproben. Die Berechnung der FE (11) erfolgt aus den Konzentrationen für das Ion und für Kreatinin in Urin (U) und Plasma (P).

$$FE_{\text{Ion}} = \frac{(\text{Ion})_{\text{U}} * (\text{Krea})_{\text{P}}}{(\text{Ion})_{\text{P}} * (\text{Krea})_{\text{U}}} * 100 \quad (\%) \quad (11)$$

Neben der Kreatinin-Clearance gibt es die sog. osmotische Clearance (C_{Osm}), die die Clearance aller osmotisch aktiven Substanzen wiedergibt (12):

$$C_{Osm} = \frac{(U_{Osm} * V)}{P_{Osm}} \quad (\text{ml/min}) \quad (12)$$

Die freie Wasser-Clearance (C_{H_2O}) (13) erhält man aus der Differenz von Harnzeitvolumen und osmotischer Clearance:

$$C_{H_2O} = V * \frac{(1 - U_{Osm})}{P_{Osm}} \quad (\text{ml/min}) \quad (13)$$

Ist der Wert der freien Wasser-Clearance positiv, bedeutet das, dass die Plasmaosmolarität größer als die Urinosmolarität ist.

Um eine Bilanz des Elektrolythaushaltes der Tiere berechnen zu können, wurden sowohl die Elektrolytkonzentrationen von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} aus dem Standardfutter (ssniff, V1534) als auch aus dem Kieler Trinkwasser (Wasserwerk Schulensee) nachgeschlagen (siehe Tabelle 1) und bei den aufgenommenen Futter- und Trinkmengen berücksichtigt.

Tabelle 1:
Berechnete Elektrolytkonzentrationen im Standardfutter (ssniff, V1534) und im Kieler Trinkwasser (Wasserwerk Schulensee).

	Na^+	K^+	Ca^{2+}
Futter (mmol/g)	0,1044	0,2327	0,2495
Trinkwasser ($\mu\text{mol/ml}$)	0,77	0,074	2,45

2.2.3 Carbamazepinwirkung *in-vivo*

2.2.3.1 Einfluss einer 7-tägigen CBZ-Behandlung auf den Metabolismus der Ratte

Die Wirkung einer 7-tägigen CBZ-Behandlung (50 mg/kg KG/Tag) auf den Salz- und Wasserhaushalt wurde an 14 weiblichen Wistarratten, die zufällig in Kontrollgruppe (n=7) und CBZ-Gruppe (n=7) eingeteilt wurden, auf metabolischen Käfigen beobachtet. Eine Übersicht des Versuches ist in Abbildung 18 schematisch dargestellt.

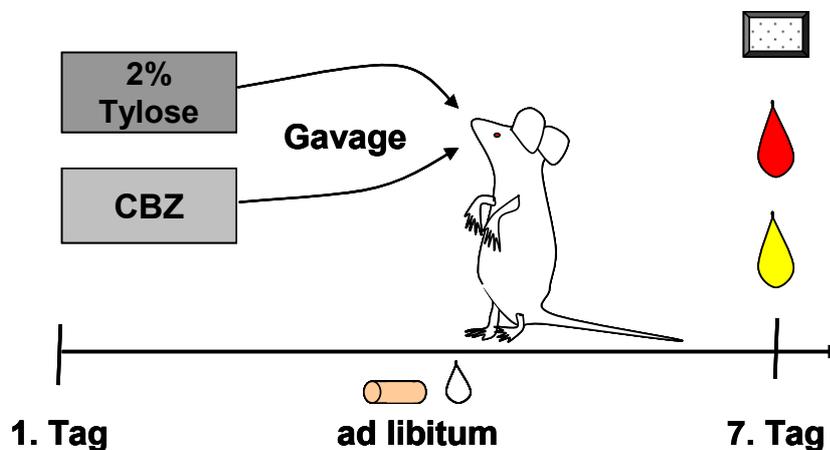


Abbildung 18:

Schemazeichnung zum Versuchsablauf während der 7-tägigen Tylose/CBZ-Behandlung, orale Applikation über eine Schlundsonde (Gavage). Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. 24 h Sammelurin (gelber Tropfen), Blutabnahme (roter Tropfen) und Kolongewebepräparation (gepunkteter Kasten) am 7. Tag.

Die Tiere wurden zu Beginn und am Ende des Versuchs gewogen und befanden sich den gesamten Zeitraum auf metabolischen Käfigen. Vom 6. auf den 7. Tag wurden sie auf neue Stoffwechselkäfige gesetzt, um die Urinmenge nach 24 h möglichst genau ermitteln zu können. Die gesammelten Urinproben wurden bis zur weiteren Analyse (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} und Kreatinin) bei -21°C eingefroren. Nach Beendigung des Versuchs wurden die Tiere im Labor durch 3,5 Vol% Isofluraninhalation und anschließender Narcoreninjektion (80 mg/kg KG, ip.) narkotisiert. Zur

Blutabnahme wurde der Schwanz in warmes Leitungswasser gelegt, um die Durchblutung anzuregen. Die Schwanzspitze wurde abgeschnitten und das Blut in einer heparinisierten Kapillare zur Blutgasanalyse (Ecosys II, Eschweiler, Deutschland) verwendet. Des Weiteren wurde Blut aus der *Aorta abdominalis* gewonnen, heparinisiert, bei 8,000 x g; 10 min abzentrifugiert und das Plasma bis zur Kreatinin- und Elektrolytbestimmung (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) bei -21°C eingefroren.

Auch in diesen Versuchen wurden Ussing-Kammer Messungen zur Erfassung der chronischen Wirkung von CBZ auf den epithelialen Transport durchgeführt (vgl. Kapitel 2.1.1). Das Kolon der Ratten wurde sofort nach der Eröffnung des Bauchraumes vorsichtig präpariert und in der Ussing-Kammer in Bezug auf das transepitheliale Potenzial und den transepithelialen Widerstand unter verschiedenen Experimentallösungen untersucht.

2.2.3.2 Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes unter CBZ und unter einer kurzfristigen Wasserrestriktion

Die Untersuchungen auf metabolischen Käfigen erfolgten an weiblichen Wistarratten (n=9/Gruppe), die zu Beginn und am Ende des Versuchs gewogen wurden. Der Versuchsablauf ist in Abbildung 19 dargestellt.

Nach der Eingewöhnungsphase (24 h, Tag 0) auf dem metabolischen Käfig wurden die Futter-, Trink- sowie die Urin- und Kotmengen vor dem Entzug der Trinkwasserflasche am Käfig bestimmt (siehe Kapitel 2.2.1). Die Kotproben wurden verworfen.

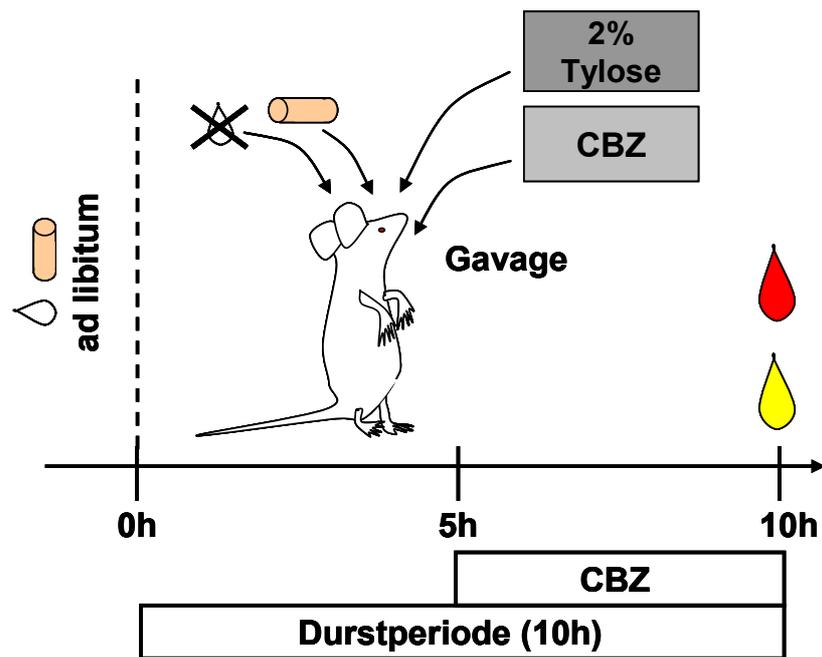


Abbildung 19:

Schemazeichnung zum Versuchsablauf der einmaligen Tylose/CBZ-Behandlung während einer 10-stündigen Wasserrestriktion, orale Applikation über eine Schlundsonde (Gavage). Futter stand den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Am Versuchsende (10 h) wurde eine Urinsammelprobe (gelber Tropfen) und eine finale Blutabnahme (roter Tropfen) genommen.

Der Zeitpunkte der Wasserrestriktion (Tag 1) begann um 3 Uhr morgens, um einen Teil der nachtaktiven Phase der Tiere mit einzubeziehen und zu erreichen, dass sich die Tiere in einem vergleichbaren Ausgangstadium bezüglich ihres Volumenhaushaltes befanden. Nach 5 h wurden die Futteraufnahme sowie die Urin- und Kotmengen erneut bestimmt und die Kotproben verworfen. Danach erfolgte die orale Applikation von 2 % Tylose oder CBZ (50 mg/kg KG) über die Schlundsonde und die Tiere kamen für weitere 5 h zurück auf die metabolischen Käfige. Nach dieser Messperiode erfolgte wieder die Bestimmung der Futter-, Urin- und Kotmengen.

Am Ende der Versuchsperiode auf den metabolischen Käfigen wurden die Tiere narkotisiert (3,5 Vol% Isofluraninhalation und Narcoreninjektion, 80 mg/kg KG, ip.) und es folgte eine retrobulbäre Blutabnahme

(siehe 2.2.1.6). Sie wurde zum einen zur Bestimmung des Säure-Basen-Status der Tiere verwendet und zum anderen zur Plasmagewinnung zentrifugiert (5,000 x g; 10 min). Das Plasma wurde bis zur weiteren Analyse eingefroren (-21°C).

Die Urinproben wurden zentrifugiert (2,000 x g; 5 min) und der Überstand aliquotiert. Die restlichen Urinproben wurden bis zur weiteren Analyse (Kapitel 2.2.2) bei -21°C eingefroren. Die Bestimmungen der Harnstoffkonzentrationen im Plasma und im Urin erfolgten mittels eines enzymatischen Kits (UV-Test, Best.-Nr. 10542946035, Boehringer Mannheim/R-Biopharm AG). Die Konzentrationen von Glukose, Cl⁻ und Carbamazepin im Plasma wurden im Zentrallabor (UKSH-Campus Kiel) gemessen.

Zur statistischen Auswertung der metabolischen Parameter wurden die verschiedenen Zeitintervalle: vor Durstperiode („0 h“), nach 5-stündiger Durstperiode („5 h“) und nach 10-stündiger Durstperiode unter Tylose oder CBZ („10 h“) analysiert. Da auf eine Blutabnahme zum Zeitpunkte „0 h“ verzichtet wurde, wurden Mittelwerte der Plasmaparameter Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Kreatinin und der Osmolalität von Kontrolltieren aus dem Versuch 3.2.4 gebildet und für beide Behandlungsgruppen als Ausgangswerte eingesetzt.

2.2.3.3 Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes unter CBZ und unter einer oralen Wasserbelastung

In diesem Versuch wurde der Einfluss von CBZ auf den Elektrolyt- und Wasserhaushalt in unterschiedlichen Zeitintervallen (5 h, 8 h und 24 h nach CBZ-Applikation) analysiert. Es erfolgte an zwei Tagen jeweils 3 h nach oraler Applikation von 2%Tylose oder CBZ (50 mg/kg KG/Tag) eine orale Wasserbelastung (12 ml/kg KG) der Tiere über eine Schlundsonde.

Der Versuch startete mit weiblichen Wistarraten, nachdem die Tiere an die Applikation mit der Schlundsonde und an die metabolischen Käfige gewöhnt waren. Die Tiere saßen insgesamt sechs Tage auf den Käfigen

und hatten Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. Eine schematische Versuchsbeschreibung ist in Abbildung 20 dargestellt.

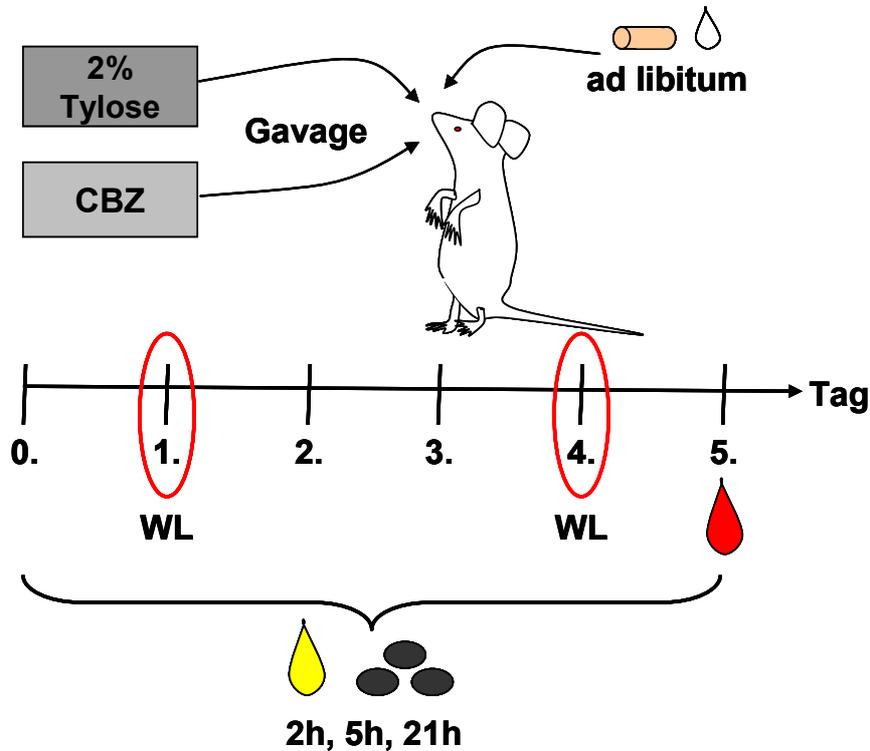


Abbildung 20:

Schemazeichnung zum Versuchsablauf während der 4-tägigen Tylose/CBZ-Behandlung (Tage 1-4) mit Wasserbelastung (12 ml/kg KG; rot eingekreist), orale Applikation über eine Schlundsonde (Gavage). Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Es erfolgten Sammelproben von Urin (gelber Tropfen) und Fäzes (dunkle Punkte) sowie eine Blutabnahme (roter Tropfen) am Versuchsende.

„Tag 0“ bezeichnet den Tag (24 h) vor der Behandlung. „Tag 1“ den Tag nach der Behandlung mit Tylose (n=5) oder CBZ (n=5) usw. An „Tag 5“ erhielten die Tiere kein CBZ mehr, sondern es erfolgte eine finale Blutabnahme am narkotisierten Tier (3,5 Vol% Isofluraninhalation und Narcoreninjektion, 80 mg/kg KG, ip.). Die Analyse der Versuchsparameter erfolgte wie zuvor in Kapitel 2.2.2 beschrieben.

Allgemeiner Versuchsablauf:

- Gewicht, Futter- und Trinkmengen wurden jeweils über 24 h ausgewertet.
- Schlundsondierung mit 2% Tylose oder CBZ jeweils um 9 Uhr.
- Urin- und Kotproben wurden 5 h, 8 h und 24 h nach der Substanzapplikation gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -21°C eingefroren.
- Die Wasserbelastung (WL) erfolgte an „Tag 1“ und „Tag 4“ jeweils 3 h nach der Applikation von 2% Tylose oder CBZ ebenfalls über eine Schlundsonde.
- Urin- und Kotproben wurden 2 h, 5 h und 21 h nach der Wasserbelastung gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -21°C eingefroren.
- Finale Blutabnahme aus der *Aorta abdominalis*.

2.2.3.4 Einfluss von 100 mg CBZ /kg KG auf den Metabolismus der Ratte

In diesem Protokoll wurden weibliche Wistarraten mit einer höheren Dosis CBZ (100 mg /kg KG/Tag) oral behandelt und dessen Einfluss auf den Salz- und Wasserhaushalt über drei Tage auf metabolischen Käfigen untersucht (siehe Abbildung 21).

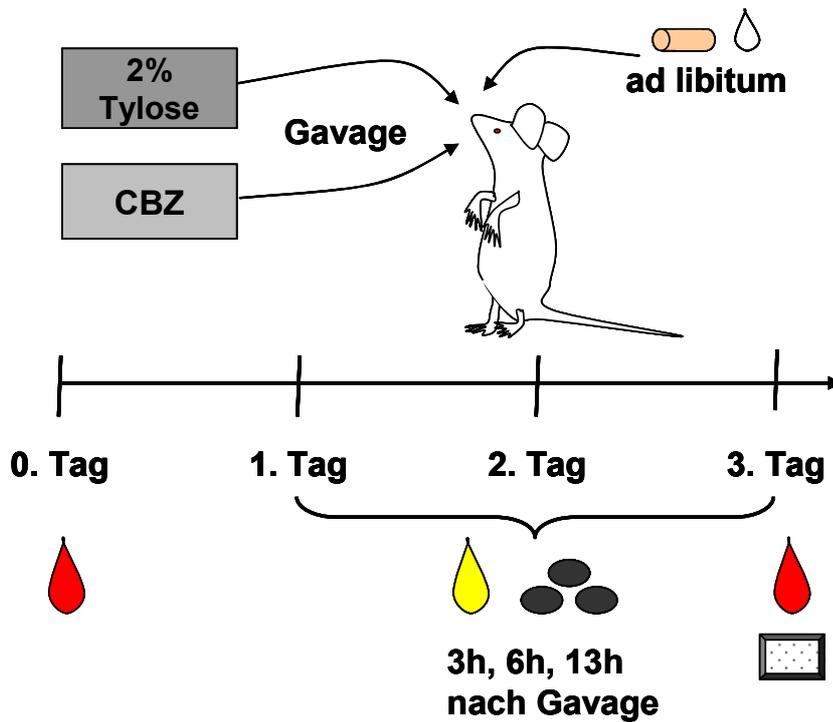


Abbildung 21:

Schemazeichnung zum Versuchsablauf vor (0. Tag) und während einer 3-tägigen Tylose/CBZ-Behandlung, orale Applikation über eine Schlundsonde (Gavage). Futter und Wasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Es erfolgten Sammelproben von Urin (gelber Tropfen) und Fäzes (dunkle Punkte) sowie Blutabnahmen (roter Tropfen) am 0. Tag und am 3. Tag und eine Kolongewebebeprparation (gepunkteter Kasten) am Versuchsende.

Die Tiere hatten Futter und Wasser *ad libitum* zur Verfügung. In diesem Versuch wurden ungepaarte und gepaarte Versuche durchgeführt. D.h., es wurden sowohl die Behandlungen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Tylose und CBZ) als auch die Behandlung innerhalb einer Versuchsgruppe (Tylose oder CBZ) in Beziehung gesetzt.

„Tag 0“ bezeichnet den Tag vor der Behandlung. An dem Tag wurde den Tieren unter einer kurzen Isofluraninhalationsnarkose retrobulbär Blut abgenommen, der Säure-Basen-Haushalt im Blutgasmessgerät analysiert und die Proben zur Plasmagewinnung bei 3,000 x g für 10 min zentrifugiert. Das Plasma wurde anschließend bis zur weiteren

Verwendung bei -21°C eingefroren. Des Weiteren erfolgte die Bestimmung des Körpergewichtes. Danach kamen die Tiere für drei Tage (1. Tag, 2. Tag, 3. Tag) auf metabolische Käfige. Das Versuchsprotokoll verlief folgendermaßen:

- Futter- und Trinkmengen wurden jeweils über 24 h ausgewertet.
- Schlundsondierung mit 2% Tylose oder CBZ jeweils um 9 Uhr.
- Urin- und Kotproben wurden 3 h, 6 h und 13 h nach der Substanzapplikation gesammelt und bis zur weiteren Verwendung bei -21°C eingefroren.

Nach der dreitägigen Behandlung wurden die Tiere erneut gewogen und eine retrobulbäre Blutentnahme wie zu Versuchsbeginn durchgeführt, um den Säure-Basen-Status der Tiere zu bestimmen. Zusätzlich wurde das Kolon entfernt, um den amiloridhemmbaren I_{sc} dieser Experimentalserie in Ussing-Kammer Experimenten zu messen. Die Messwerte vor und nach der Applikation von Amilorid wurden in den Ussing-Kammer Experimenten zu einem Kontrollwert zusammengefasst.

Die Bestimmungen der Futter-, der Trink-, der Urin- und der Fäzesmengen erfolgten wie in Kapitel 2.2.1 aufgeführt. Die Analysen der Elektrolyte, der Osmolalität und des Kreatinins erfolgten wie im Kapitel 2.2.2 beschrieben. Zusätzlich wurde eine Bilanzierung der Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Ca^{2+}) von Aufnahme und –abgabe berechnet. Bei der Bilanzierung wurden die Elektrolytkonzentrationen aus dem Trinkwasser und aus dem Standardfutter ermittelt und mit der Futter- und Wasseraufnahme sowie deren Ausscheidungen eines jeden Tieres in Beziehung gesetzt.

2.2.3.5 Diuretische Wirkung von CBZ unter dem Einfluss des V2-Antagonisten Satavaptan

In welchem Ausmaß die diuretische Wirkung von CBZ durch einen zentralen (ADH-Freisetzung) oder renalen Angriffspunkt bedingt ist, wurde

mit Hilfe des Vasopressin (V2)-Antagonisten Satavaptan untersucht. In Abbildung 22 ist der Versuchsablauf schematisch aufgezeigt. Der Beginn des Messprotokolls ist mit dem Zeitpunkt „0 min“ gekennzeichnet. Die Kontrollperiode dauerte 30 min an und das Messintervall unter dem V2-Antagonisten Satavaptan weitere 120 min. Insgesamt lagen die Ratten 270 min unter Narkose, bevor die finale Blutabnahme erfolgte. Ihre Körperfunktionen wurden durch Messung des mittleren systolischen arteriellen Blutdrucks, der Atemfrequenz und der Körpertemperatur kontinuierlich überwacht.

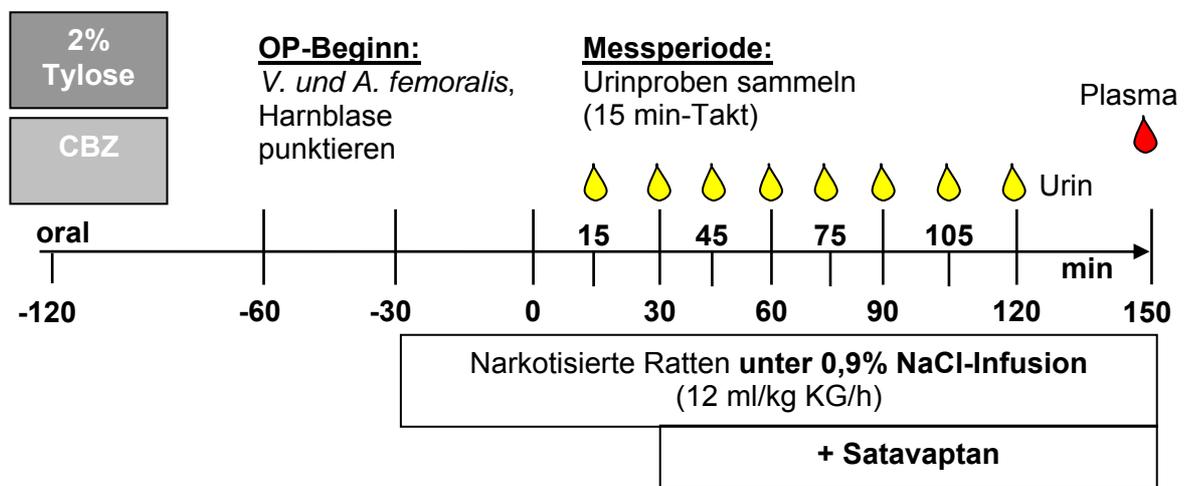


Abbildung 22:

Schematische Darstellung der Versuchsbeschreibung zur Untersuchung der Diurese unter CBZ (50 mg /kg KG) und Satavaptan (0,3 mg/kg KG/h). Probennahme von Urin (gelbe Tropfen) und Blut (roter Tropfen) sind angezeigt.

Die weiblichen Wistarratten erhielten eine Stunde vor Beginn der Operation eine orale Applikation von CBZ (50 mg/kg KG). Die Ratten wurden gewogen, erhielten CBZ (n=5) oder die 2%-tige Tyloسلösung (Kontrolle, n=4) über eine Schlundsonde unter einer kurzen Inhalationsnarkose mit 3,5 Vol% Isofluran. Danach kamen sie bis zum OP-Start in einen Großkäfig und hatten Wasser und Futter *ad libitum* zur Verfügung.

Nach einer Stunde im Großkäfig wurden die Tiere narkotisiert (Isofluran und Narcoreninjektion, 80 mg/kg KG, ip.) und lagen während der OP auf

einer Wärmeplatte, die kontinuierlich über einen Temperaturregler (TKM-0903, FMI GmbH) die Körpertemperatur der Ratte um 37°C hielt. Der Körpertemperaturmessfühler wurde rektal fixiert. Anschließend wurden die *Vena* und *Arteria femoralis* in der Leistengegend des Tieres freigelegt und der Infusionsschlauch (Polypropylen) in die *V. femoralis* eingeführt und mit Bindfäden fixiert. Die Infusion mit 0,9% NaCl-Lösung erfolgte nun (ca. 20 min nach OP Beginn) mit einer Rate von 24 ml/kg KG/h für 10 min, um den Volumenstatus des Tieres nach Beginn der Narkose und vor Anlegen der Infusion wieder auszugleichen. Dann wurde die Infusion mit 12 ml/kg KG/h fortgesetzt. Inzwischen wurde der Schlauch zur Blutdruckmessung in die *A. femoralis* eingeführt und mit Fäden fixiert. Der Schlauch war mit einer NaCl-Lösung (0,9%) gefüllt und enthielt zusätzlich Na-Heparin (1:50). Der mittlere arterielle Blutdruck wurde über einen Blutdruckmesser (DMG 100) angezeigt und kontinuierlich auf einem Schreiber (Recorder 220, GOULD) aufgezeichnet. Als nächstes wurde das OP-Feld abgedeckt und der Blasenkatheter gelegt, um in 15 min-Abschnitten Urinproben sammeln zu können. Um die Körpertemperatur des Tieres möglichst konstant zu halten und die Wärmeabgabe an die Umgebung zu reduzieren, wurde das Tier mit Zellulosepapier bedeckt. Nachdem alle Messparameter (Blutdruck, Körpertemperatur und Atemfrequenz) erfolgreich notiert werden konnten, startete die eigentliche Versuchsreihe unter fortlaufender NaCl-Infusion mit 12 ml/kg KG/h. Eine Messperiode umfasste immer 15 min, dann wurden die Urinsammelgefäße gewechselt und die o.g. Messparameter notiert. Nach der 30-minütigen Kontrollperiode wurde auf die Infusionslösung Satavaptan umgeschaltet (12 ml/kg KG/h) und die Messparameter für weitere 2 h notiert. Satavaptan (SR 121463B) ist ein sehr potenter V2-Antagonist und wurde uns freundlicherweise von der Firma Sanofi Aventis zur Verfügung gestellt. Die Substanz ist lichtempfindlich und wird für *in-vivo* Studien in isotoner 0,9% NaCl-Lösung (B.BRAUN, Melsungen AG) gelöst (0,025 mg/ml). Die Tiere erhielten entsprechend 0,3 mg Satavaptan/kg KG/h über die Perfusionspumpe (Perfusor segura, Typ 871

702/8, B.BRAUN, Melsungen AG). Die Satavaptanlösung wurde jeden Tag neu angesetzt.

Am Versuchsende erfolgten die Überprüfung des Säure-Basen-Status des Tieres und die Hämatokritbestimmung (Schwanzarterienpunktion). Die Messungen von Kreatinin, der Osmolalität und der Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) erfolgten im Plasma, welches aus dem Vollblut der *Aorta abdominalis* stammte.

In den Urinproben wurden neben den Volumina die Elektrolyte (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-), die Osmolalität und die Harnstoffkonzentration bestimmt. Die Harnflussraten und die Elektrolytausscheidungen wurden berechnet.

2.2.3.6 Messung von ADH im Plasma nach CBZ-Behandlung

Die weiblichen Wistarratten (n=5/Gruppe) erhielten über die Schlundsonde 2% Tylose oder CBZ (50 mg/kg KG) appliziert. Dafür wurden sie einer sehr kurzen Isoflurannarkose (3,5 Vol%) unterzogen, um den Eingriff stressfrei durchführen zu können. Die Tiere kamen für 5 h zurück in die Großkäfige und hatten Wasser und Pelletfutter *ad libitum* zur Verfügung. Die Wahl der Zeitperiode von 5 h ergab sich aus den Vorversuchen, wo zu erkennen war, dass nach dieser Zeitspanne die durch CBZ verursachten metabolischen Störungen am deutlichsten hervortraten.

Die Blutabnahme aus der *Aorta abdominalis* erfolgte am narkotisierten Tier (3,5 Vol% Isofluran und Narcoren, 80 mg/kg KG, ip.), um EDTA-Plasma für die ADH-Bestimmung zu erhalten. Das Vollblut wurde in einer Heraeus Biofuge pico zentrifugiert (5,000 x g, 10 min, RT). Der Überstand wurde erneut zentrifugiert und das gewonnene Plasma in neue Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert und bis zum Transport bei -21°C eingefroren. Die Bestimmung des ADH-Spiegels im Plasma erfolgte per RIA (Radio Immuno Assay) (Medizinisches Labor Bremen GmbH, Deutschland).

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte entsprechend dem Versuchsaufbau mittels des zweiseitigen ungepaarten oder gepaarten t-Tests.

3 Ergebnisse

3.1 *In-vitro* Untersuchungen

Ziel der *in-vitro* Messungen am intakten Kolongewebe (Ussing-Kammer) und an isolierten Kolonkrypten (Patch-Clamp Methode, Ca^{2+} Messung, cAMP-Bestimmung) der Ratte war die Überprüfung der akuten CBZ-Wirkung auf die Epithelzellfunktion und den elektrogenen Ionentransport.

3.1.1 CBZ-Wirkung auf das transepitheliale Potenzial und den transepithelialen Widerstand im intakten Kolongewebe

Die Untersuchung am distalen Kolonepithel der Ratte im Gewebeverband erfolgte mit Hilfe der Ussing-Kammer Messtechnik. Gemessen wurden das transepitheliale Potenzial (V_{te}) und der transepitheliale Widerstand (R_{te}) über das Gewebe, aus denen dann der äquivalente Kurzschlussstrom (I_{sc}) berechnet werden konnte. V_{te} und R_{te} sind Parameter, die das Zusammenwirken unterschiedlicher Ionentransportprozesse in der Zellmembran bzw. zwischen den Zellen widerspiegeln. Die Veränderungen im I_{sc} unter Amilorid, FSK/IBMX sowie CCh dienten dazu, luminale Na^+ -Resorption, luminale Cl^- -Sekretion und basolaterale K^+ -Sekretion zu differenzieren.

3.1.1.1 Keine Inhibition des epithelialen Na^+ -Kanals durch CBZ

Da Carbamazepin (CBZ) neuronale Na^+ -Kanäle blockiert, wurde diesem Abschnitt mit dem Ussing-Kammer Messverfahren am Kolon der Ratte überprüft, ob CBZ ebenfalls in der Lage war, den epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC) zu inhibieren und so die Na^+ -Resorption im Kolon zu stören.

Die aufgeführten Ergebnisse stammen aus sechs separat in der Ussing-Kammer gemessenen Kolongewebestücken. In ist Abbildung 23 ein Ausschnitt aus einem Ussing-Kammer Experiment gezeigt.

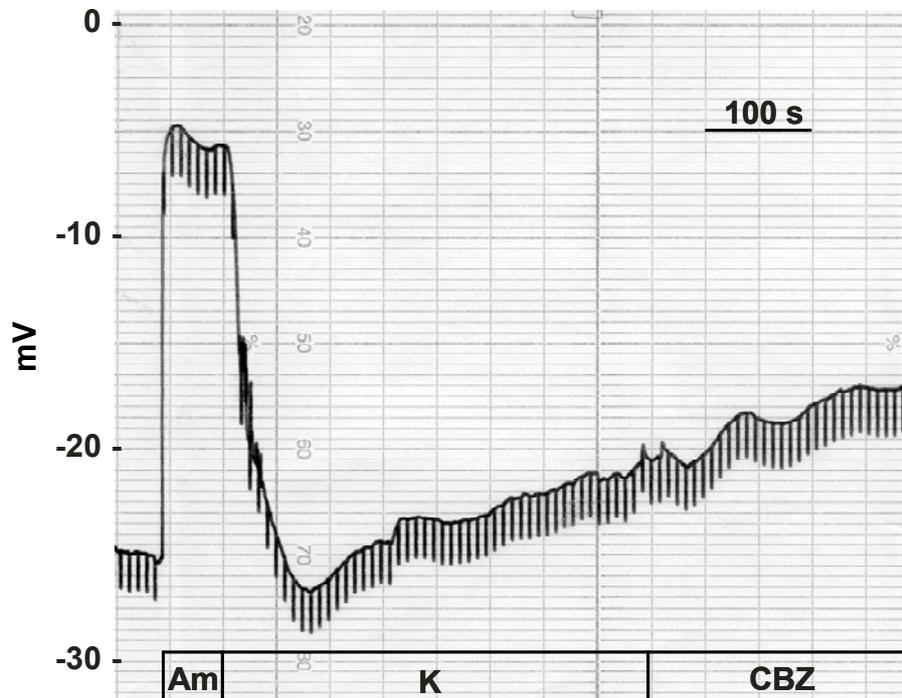


Abbildung 23:

Originalabbildung (Ausschnitt) eines Ussing-Kammer Experimentes. Gezeigt sind das transepitheliale Potenzial (V_{te}) und die Spannungspulse (ΔV_{te}), die durch Konstantstrominjektion erzeugt wurden. 50 μM Amilorid (Am) hemmt V_{te} reversibel, 100 μM Carbamazepin (CBZ) hat keine akute Wirkung bei luminaler Applikation. K (Kontrolllösung).

Als Vergleichssubstanz diente Amilorid, ein spezifischer Hemmstoff des epithelialen Na^+ -Kanals. Die Amiloridwirkung ist reversibel.

Nach dem Einspannen des Gewebeträgers in die Kammer wurde das Erreichen eines stabilen transepithelialen Potentials über das Kolongewebe abgewartet, welches nach ca. 5 min bei $-12,6 \pm 2,9$ mV lag. Dann wurde luminal 50 μM Amilorid appliziert und wieder ausgewaschen. $|V_{te}|$ sank nach dem Einwaschen von Amilorid sofort um 57,2%. Gleichzeitig stieg der transepitheliale Widerstand an (siehe Tabelle 2). Der verbleibende Transport in Anwesenheit von Amilorid spiegelt eine parallel stattfindende Cl^- -Sekretion wider, die z.B. mit Bumetanid gehemmt werden

kann. Die schnelle Wirkungsweise von Amilorid ist typisch für einen Kanalblocker, der direkt am Membranprotein angreift.

Tabelle 2:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Wirkung von 50 μM Amilorid auf die luminale Na^+ -Resorption im Rattenkolongewebe zeigen. V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM. n (Anzahl der Messungen). * $p < 0,05$ zu Kontrolle.

Experimental-Lösung	V_{te} (mV)	R_{te} (Ωcm^2)	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Kontrolle	$-12,6 \pm 2,9$	$50,7 \pm 4,0$	$-241,1 \pm 44,7$
Amilorid	$-5,4 \pm 1,0$ *	$52,5 \pm 4,1$	$-100,1 \pm 17,2$ *
n	6	6	6

Nach dem Auswaschen von Amilorid mit Kontrolllösung aus der Badlösung, erfolgte die luminale Applikation von 100 μM CBZ. CBZ hatte keine vom langsamen Abfall des I_{sc} unterscheidbare oder mit Amilorid vergleichbare akute Wirkung auf den epithelialen Transport. Die Messwerte sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Wirkung von 100 μM Carbamazepin (CBZ) auf die luminale Na^+ -Resorption im Rattenkolongewebe zeigen. V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM. n (Anzahl der Messungen).

Experimental-Lösung	V_{te} (mV)	R_{te} (Ωcm^2)	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Kontrolle	$-10,2 \pm 2,5$	$53,1 \pm 2,8$	$-189,2 \pm 39,7$
CBZ	$-9,2 \pm 2,4$	$52,9 \pm 3,1$	$-169,8 \pm 35,9$
n	6	6	6

Der neuronale Na^+ -Kanalblocker CBZ ist demnach nicht in der Lage, den epithelialen Na^+ -Kanal (ENaC) zu blockieren.

3.1.1.2 Hemmung der basolateralen Cl⁻-Sekretion durch CBZ

In einer weiteren Serie erfolgte die Untersuchung der Sekretionsmechanismen im distalen Rattenkolon unter dem Einfluss von CBZ.

In diesem Abschnitt sind die Ergebnisse aus Ussing-Kammer Experimenten an Kolongewebe gezeigt, die die akute basolaterale Wirkung von CBZ auf die cAMP und die Ca²⁺-induzierte Cl⁻-Sekretion überprüfen. In Anwesenheit von Forskolin (FSK) wird die cAMP Synthese der Zelle verstärkt. Die Signaltransduktion führt zu einer gesteigerten Cl⁻-Sekretion über die Aktivierung luminaler Cl⁻-Kanäle und basolateraler K⁺-Kanäle. Dies resultiert in einem entsprechenden V_{te} und I_{sc}

(siehe Abbildung 24). Die Messwerte sind in Tabelle 4 zusammengefasst.

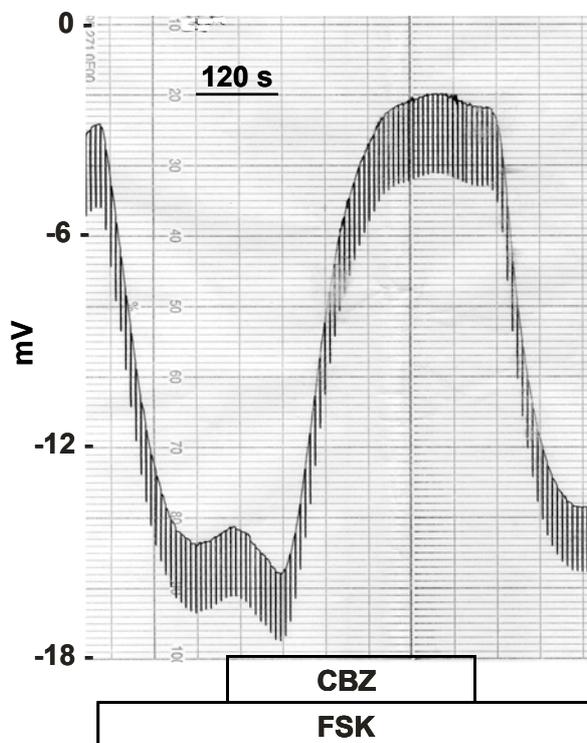


Abbildung 24:
Ausschnitt einer Original-Ussing-Kammer Messung am Rattenkolongewebe während der basolateralen Applikation von 0,1 µM Forskolin (FSK) und 100 µM Carbamazepin (CBZ) unter FSK. Abgebildet sind das transepitheliale Potenzial (V_{te}) und die Spannungspulse (ΔV_{te}). 50 µM Amilorid (luminal) ist kontinuierlich anwesend. CBZ vertärkt V_{te} transient und führt dann zu einer starken Hemmung der luminalen Cl⁻-Sekretion.

Nach der Hemmung der Na⁺ Resorption mit Amilorid führte FSK zu einer Steigerung des absoluten I_{sc}. CBZ verminderte die durch FSK induzierte cAMP-vermittelte Cl⁻-Sekretion signifikant (n=7).

Tabelle 4:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Wirkung von 100 μM Carbamazepin (CBZ) auf die cAMP-abhängige Chloridsekretion im Rattenkolongewebe zeigen. 50 μM Amilorid (Am) kontinuierlich luminal (lu) und 0,1 μM Forskolin (FSK) basolateral (bl) anwesend. V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der Messungen), * $p < 0,05$ zur Vorbehandlung.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	V_{te} (mV)	R_{te} (Ωcm^2)	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Kontrolle	-5,7 \pm 1,1	51 \pm 3,8	-107 \pm 17
Amilorid (lu)	-3,7 \pm 0,9 *	58 \pm 4,4 *	-65 \pm 15 *
FSK (bl)	-8,0 \pm 0,9 *	57 \pm 3,7	-143 \pm 17 *
CBZ (bl)	-2,5 \pm 0,5 *	58 \pm 4,1	-45 \pm 10 *
n	7	7	7

Während die Wirkung von Amilorid auch an einer Widerstandserhöhung sichtbar war, führte CBZ zu keiner Änderung des transepithelialen Widerstandes. Die Veränderungen im äquivalenten Kurzschlussstrom (I_{sc}) während des gesamten Experimentes sind in Abbildung 25 dargestellt. Wie in Abbildung 26 zu sehen ist, war der Einfluss von CBZ auf die Cl^- -Sekretion zweigeteilt. Erst kam es zu einer schnellen weiteren Negativierung von V_{te} und I_{sc} , die dann aber schnell in eine Verminderung der absoluten Parameter überging. Das Auswaschen von CBZ war in der Mehrzahl der Experimente möglich. Die Ca^{2+} -vermittelte Cl^- -Sekretion durch CCh war auch nach der Anwendung von CBZ induzierbar (siehe Abbildung 25).

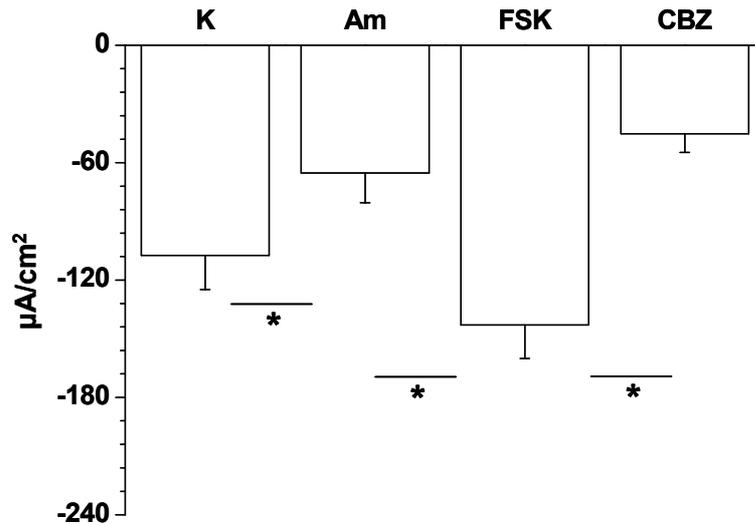


Abbildung 25:

Der äquivalente Kurzschlussstrom (I_{sc}) unter Kontrollbedingungen und nach der additiven Gabe von 50 μM Amilorid (Am) luminal und 0,1 μM Forskolin (FSK) und 100 μM Carbamazepin (CBZ) basolateral. K (Kontrolllösung). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$, (n=7).

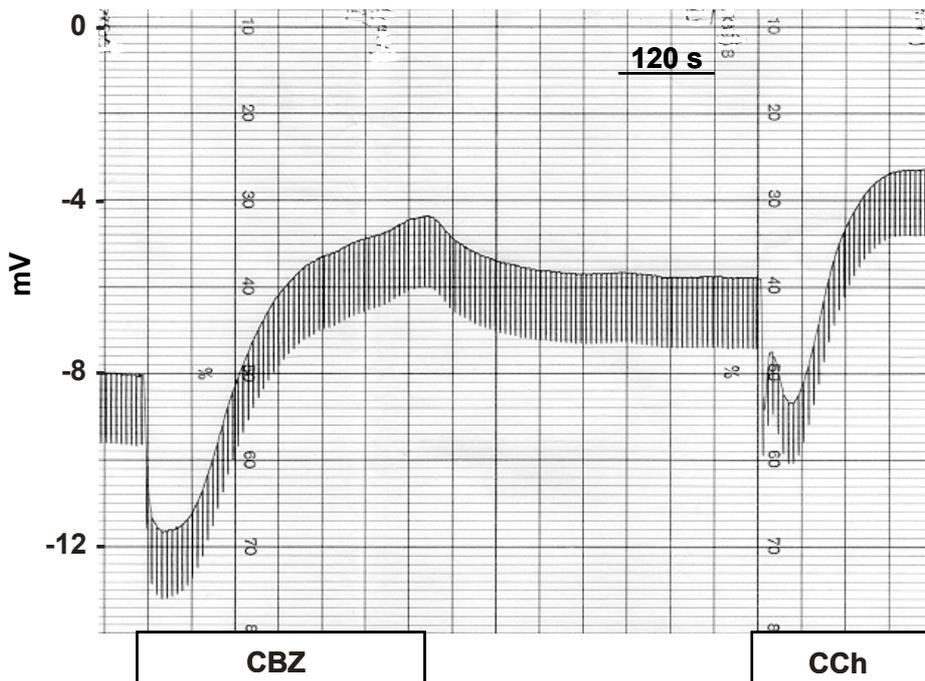


Abbildung 26:

Originalabbildung (Ausschnitt) des transepithelialen Potenzials während der basolateralen Applikation von 100 μM Carbamazepin (CBZ) und 100 μM Carbachol (CCh) in der kontinuierlichen Anwesenheit von 0,1 μM Forskolin basolateral und 50 μM Amilorid luminal.

Die oben beschriebene zweiphasige Reaktion von V_{te} auf die Gabe von CBZ nach Stimulation mit FSK wurde getrennt analysiert. In Tabelle 5 sind die Ergebnisse aus den Ussing-Kammer Messungen (n=6) aufgelistet, während Abbildung 27 die Messwerte in Bezug auf den äquivalenten Kurzschlussstrom (I'_{sc}) zusammenfasst. Die Na^+ -Resorption wurde durch 50 μM Amilorid (luminal) blockiert und die Cl^- -Sekretion durch die Applikation von 0,1 μM FSK (basolateral) angeregt.

Tabelle 5:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Wirkung von 100 μM Carbamazepin (CBZ) und 100 μM Carbachol (CCh) auf die cAMP-abhängige Cl^- -Sekretion im Rattenkolongewebe zeigen. 50 μM Amilorid (Am) luminal (lu) und 0,1 μM Forskolin (FSK) basolateral (bl) kontinuierlich anwesend. Top (T), Plateau (P), V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I'_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der Messungen), * $p < 0,05$ zur Vorbehandlung. $^{\$}$ $p < 0,05$ bei Vgl. von CCh (T) mit CBZ (T).

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	V_{te} (mV)	R_{te} (Ωcm^2)	I'_{sc} ($\mu A/cm^2$)
Kontrolle	-11,7 \pm 2,6	90 \pm 13,7	-127,0 \pm 10,8
Amilorid (lu)	-10,1 \pm 2,6	98 \pm 15,9 *	-105,5 \pm 11,0 *
FSK (bl)	-12,0 \pm 2,8	95 \pm 13,9	-123,1 \pm 14,9
CBZ (T) (bl)	-14,1 \pm 3,3 *	92 \pm 14,1 *	-149,8 \pm 19,7 *
CBZ (P) (bl)	-4,7 \pm 1,1*	100 \pm 15,4 *	-47,0 \pm 8,9 *
FSK (bl)	-7,9 \pm 1,6 *	91 \pm 13,3 *	-85,2 \pm 9,7 *
CCh (T) (bl)	-12,0 \pm 2,6 * $^{\$}$	77 \pm 12,0 * $^{\$}$	-151,3 \pm 13,5 *
n	6	6	6

In der kontinuierlichen Anwesenheit von Amilorid und FSK stellte sich ein stabiler I'_{sc} ein, der durch CBZ transient verstärkt wurde und einen Spitzenwert (Top, T) erreichte. Dieser wurde von einer leichten Abnahme des Widerstandes begleitet. Danach kam es zu der bereits beobachteten Hemmung von I'_{sc} auf einen Plateauwert (P) mit einem deutlichen Anstieg des Widerstandes. Nach Auswaschen von CBZ stellte sich ein etwas niedrigerer Cl^- -Sekretionsstrom ein. Die nachfolgende Applikation von CCh

fürte zu einem für Ca^{2+} -Agonisten typischen transienten Anstieg der Cl^- -Sekretion (CCh (T)), die mit einer Rte-Reduktion um 15% einherging. Die transiente Stimulation der luminalen Cl^- -Sekretion durch CBZ und CCh war gleich groß und von ähnlicher Kinetik. Dieser Befund legt nahe, dass die initiale, transiente Wirkung von CBZ möglicherweise Ca^{2+} -vermittelt ist.

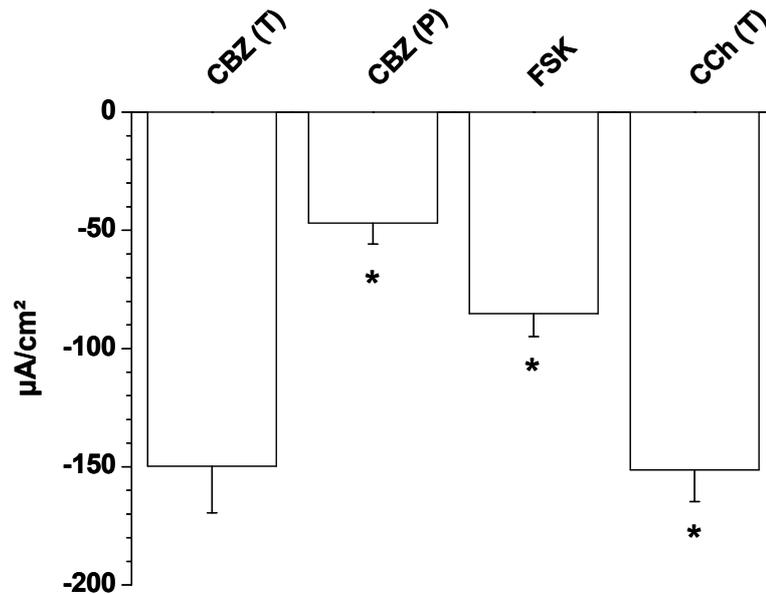


Abbildung 27:

Der äquivalente Kurzschlussstrom (I_{sc}) nach Gabe von 100 μM Carbamazepin (CBZ) oder 100 μM Carbachol (CCh). T (Top), P (Plateau). 50 μM Amilorid luminal und 0,1 μM FSK basolateral kontinuierlich anwesend. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ zum Vorwert, (n=6).

3.1.1.3 Konzentrations-Wirkungsbeziehung von CBZ

Für die hemmende Wirkung von CBZ auf den I_{sc} der cAMP-stimulierten Cl^- -Sekretion wurde eine Konzentrations-Wirkungsbeziehung erstellt. In Anwesenheit von 50 μM Amilorid (luminal) wurde das Gewebe basolateral mit 0,1 μM FSK stimuliert. Danach wurde CBZ in ansteigenden Konzentrationen in der FSK-Lösung für jeweils 4-5 min perfundiert. Getestet wurden die CBZ Konzentrationen 1 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM und 300 μM . Insgesamt wurden 12 Einzelerperimente durchgeführt. Bei

stufenweiser Steigerung der CBZ-Konzentration konnte die akute transiente Steigerung der Cl^- -Sekretion nicht beobachtet werden.

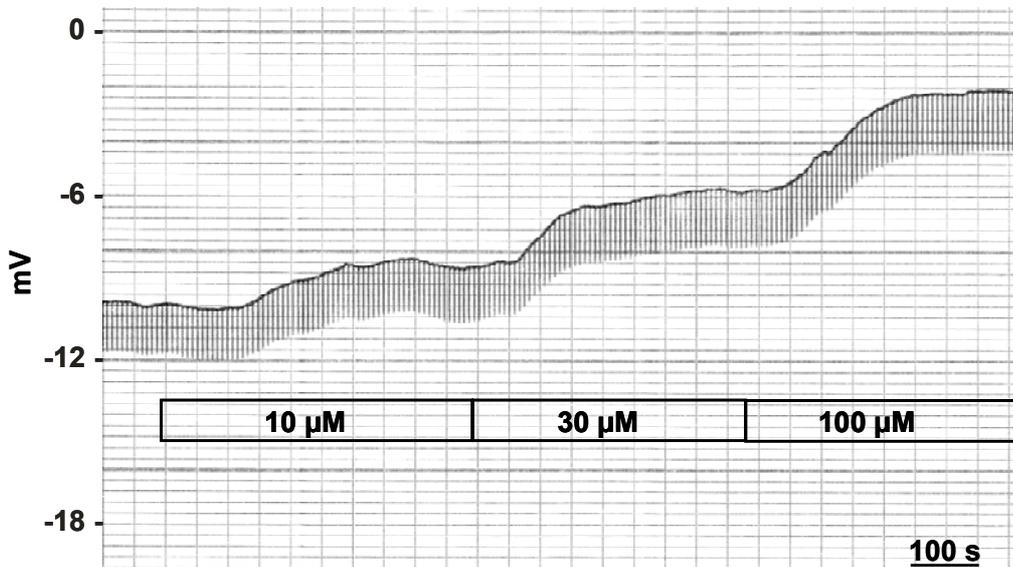


Abbildung 28:

Ausschnitt einer Originalregistrierung der Konzentrations-Wirkungskurve von Carbamazepin (CBZ). Gezeigt ist das transepitheliale Potenzial V_{te} (mV) über das Kolonepithel. 50 µM Amilorid luminal und 0,1 µM FSK basolateral sind kontinuierlich anwesend. CBZ führt zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung von V_{te} .

Aus dem Kurvenverlauf in Abbildung 28 ist ersichtlich, dass die cAMP-stimulierte Cl^- -Sekretion im Rattenkolonepithel durch CBZ konzentrationsabhängig gehemmt wurde. Eine Zusammenfassung aller Ussing-Kammer Messdaten zeigt Tabelle 6. Amilorid reduzierte $|I_{sc}|$ und erhöhte R_{te} , während FSK den gegenteiligen Effekt hatte. Die verschiedenen CBZ Konzentrationen (10 µM, 30 µM, 100 µM und 300 µM) führten sowohl im Vergleich zu FSK als auch im Vergleich untereinander zu einer stufenweisen Reduktion von $|V_{te}|$ und $|I_{sc}|$. R_{te} erhöhte sich unter 30 µM und 100 µM CBZ im Vergleich zu FSK um ca. 9%. 1 µM CBZ zeigte keine Veränderung in den Parametern $|V_{te}|$, R_{te} und $|I_{sc}|$.

Tabelle 6:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Konzentrations-Wirkungsbeziehung von Carbamazepin (CBZ) zeigen. 50 μM Amilorid (Am) luminal (lu) und 0,1 μM Forskolin (FSK) basolateral (bl) kontinuierlich anwesend. Plateau (P), V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der Messungen), * $p < 0,05$ zur Vorbehandlung. $\$ p < 0,05$ bei Vgl. von CBZ (P) mit FSK Ausgangswert.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	V_{te} (mV)	R_{te} (Ωcm^2)	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Kontrolle	-11,4 \pm 2,2	74 \pm 5,6	-166,2 \pm 35,6
Amilorid (lu)	-2,6 \pm 0,7 *	82 \pm 6,0 *	-35,0 \pm 9,2 *
FSK (bl)	-6,0 \pm 0,7 *	73 \pm 4,9 *	-84,0 \pm 8,5 *
1 μM CBZ (P) (bl)	-6,3 \pm 0,8	73 \pm 5,3	-86,3 \pm 8,4
10 μM CBZ (P) (bl)	-5,2 \pm 3,4 * $\$$	77 \pm 6,0 *	-68,4 \pm 9,9 * $\$$
30 μM CBZ (P) (bl)	-3,4 \pm 0,8 * $\$$	80 \pm 6,5 * $\$$	-42,7 \pm 9,0 * $\$$
100 μM CBZ (P) (bl)	-1,5 \pm 0,4 * $\$$	80 \pm 7,1 $\$$	-19,6 \pm 4,8 * $\$$
300 μM CBZ (P) (bl)	-0,8 \pm 0,3 * $\$$	79 \pm 7,2	-10,8 \pm 4,0 * $\$$
n	12	12	12

Die Abbildung 29 zeigt eine graphische Darstellung des I_{sc} unter kontinuierlicher Anwesenheit von FSK und den additiv verabreichten CBZ-Lösungen unterschiedlicher Konzentration.

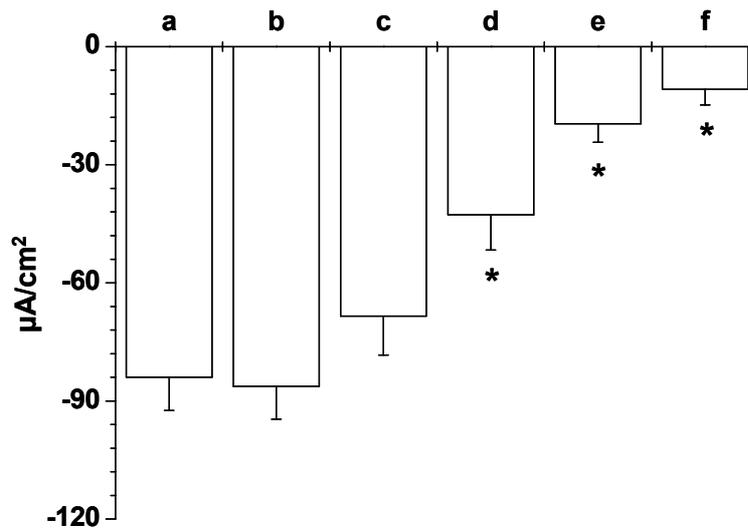


Abbildung 29:

Konzentrations-Wirkungsbeziehung von CBZ in Bezug auf den äquivalenten Kurzschlussstrom (I_{sc} , n=12). 0,1 μM FSK kontinuierlich anwesend, a-f: CBZ (0 μM, 1 μM, 10 μM, 30 μM, 100 μM, 300 μM), basolaterale Applikation. Mittelwerte ± SEM, * p<0,05 zur vorangehenden Konzentration. 50 μM Amilorid luminal kontinuierlich anwesend.

Die unter Anwendung des Hill-Plots daraus berechnete halbmaximale Hemmkonzentration (IC_{50}) lag mit 26 μM (im therapeutischen Wirkungsspektrum von CBZ). Die Konzentration von 100 μM CBZ wurde in allen folgenden *in-vitro* Versuchen eingesetzt.

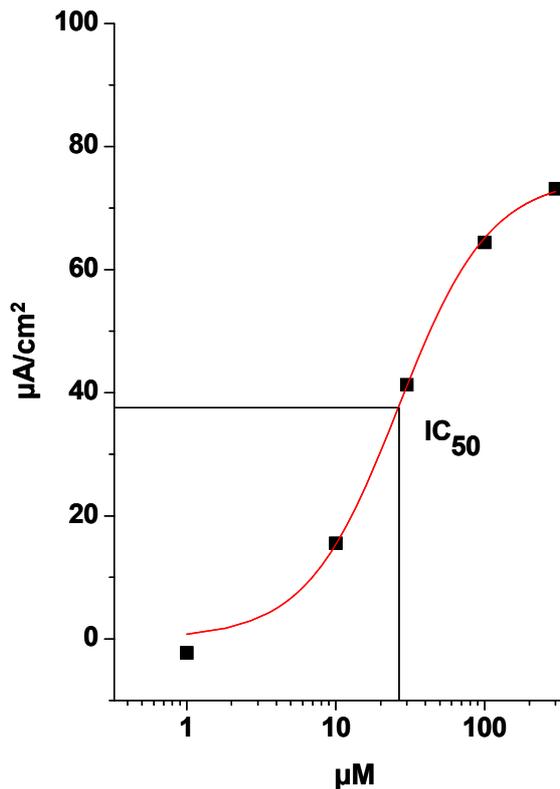


Abbildung 30:
Konzentrations-Wirkungs-
Beziehung von CBZ (μM).
Darstellung der Änderung
des äquivalenten
Kurzschlussstromes I_{sc} .
Ermittlung der IC_{50} für CBZ
mittels Hill-Plot.

3.1.1.4 Induktion der basolateralen Cl^- -Sekretion durch CBZ in Anwesenheit von 293 B

Das Ausmaß der Cl^- -Sekretion unter cAMP-Stimulation bzw. unter zusätzlicher Ca^{2+} -Aktivierung hängt von der jeweiligen Verfügbarkeit von luminalen Cl^- -Kanälen und basolateralen K^+ -Kanälen ab. In diesem Versuchsabschnitt wurden durch 0,1 μM FSK (Forskolin) und 100 μM Phosphodiesterasehemmer IBMX (3-Isobutyl-1-methyl-xanthin) stabile cAMP-Konzentrationen erreicht. Dies führte zur Öffnung von luminalen Cl^- - und basolateralen K^+ -Kanälen.

Um den möglichen Einfluss von CBZ auf die an der Ca^{2+} -gesteuerten Cl^- -Sekretion (CCh-Effekt) beteiligten Ionenkanäle zu beurteilen, wurden die cAMP-aktivierten basolateralen K^+ -Kanäle (KCNQ1/KCNE3) durch den Wirkstoff 293 B (10 μM) kontinuierlich gehemmt und anschließend mit CCh oder CBZ stimuliert. Zwei Aufzeichnungen aus Ussing-Kammer Experimenten sind in Abbildung 31 für CCh und für CBZ aufgeführt.

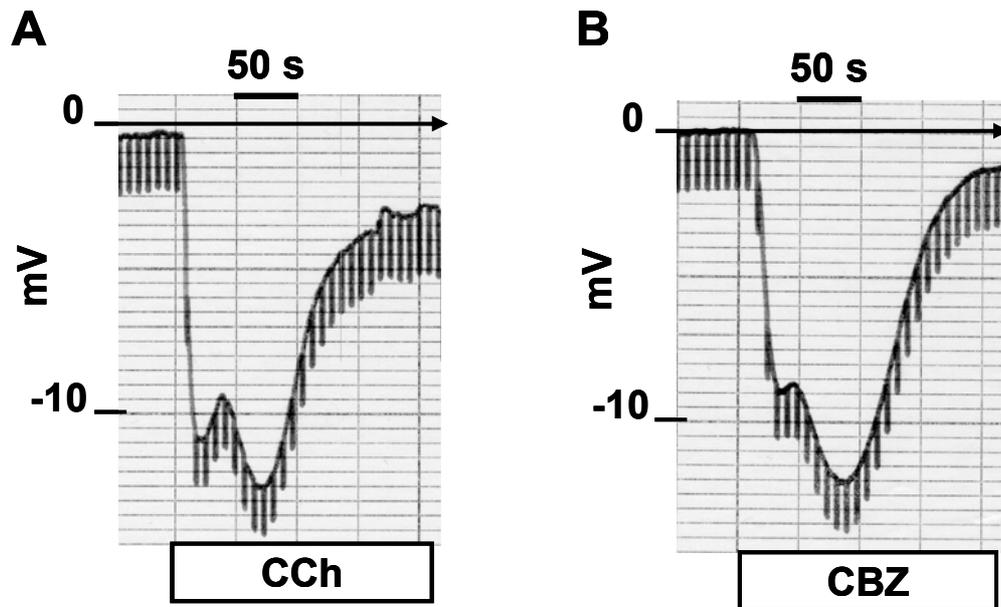


Abbildung 31:

Originalabbildungen (Ausschnitte) der transepithelialen Potenziale während der basolateralen Applikation von A: 100 μM Carbachol (CCh) und B: 100 μM Carbamazepin (CBZ) in Anwesenheit von 10 μM 293 B. 50 μM Amilorid luminal und Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μM FSK/100 μM IBMX) basolateral kontinuierlich anwesend.

CBZ induzierte unter diesen Bedingungen eine CCh-ähnliche I_{sc} -Antwort im Rattenkolongewebe (Abbildung 31B). Für CCh ist bekannt, dass die zusätzliche Rekrutierung von Ca^{2+} -aktivierbaren, aber 293 B unempfindlichen K^+ -Kanälen für die transiente Zunahme des I_{sc} verantwortlich ist. Dies legt nahe, dass auch CBZ Ca^{2+} -abhängige K^+ -Kanäle aktivieren könnte. Tabelle 7, Tabelle 8 und Abbildung 32 fassen die Ergebnisse dieser Serie zusammen. In beiden Versuchsreihen konnten CCh bzw. CBZ einen deutlichen I_{sc} induzieren, wobei der CCh-induzierte Strom 34% größer war als der CBZ-induzierte Strom.

Ergebnisse

Tabelle 7:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Wirkung von 100 μM Carbachol (CCh) in Anwesenheit von 10 μM 293 B basolateral zeigt. 50 μM Amilorid (Am) luminal (lu) und Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μM FSK/100 μM IBMX) basolateral (bl) kontinuierlich anwesend. (T): Top, V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der Messungen), * $p < 0,05$ zur Vorbehandlung.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	V_{te} (mV)	R_{te} (Ωcm^2)	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Kontrolle	$-10,0 \pm 2,1$	$67 \pm 4,9$	$-144,5 \pm 24,6$
Amilorid (lu)	$-4,7 \pm 0,6^*$	$73 \pm 6,8^*$	$-67,9 \pm 8,8^*$
FSK/IBMX (bl)	$-8,3 \pm 1,0^*$	$62 \pm 4,8^*$	$-134,5 \pm 11,2^*$
293 B (bl)	$-0,5 \pm 0,2^*$	$63 \pm 5,7$	$-10,5 \pm 3,8^*$
CCh (T) (bl)	$-10,2 \pm 0,9^*$	$54 \pm 4,4^*$	$-191,7 \pm 13,0^*$
n	11	11	11

Tabelle 8:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Wirkung von 100 μM Carbamazepin (CBZ) in Anwesenheit von 10 μM 293 B basolateral zeigt. 50 μM Amilorid (Am) luminal (lu) und Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μM FSK/100 μM IBMX) basolateral (bl) kontinuierlich anwesend. (T): Top, V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der Messungen), * $p < 0,05$ zur Vorbehandlung.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	V_{te} (mV)	R_{te} (Ωcm^2)	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Kontrolle	$-10,4 \pm 2,8$	$73 \pm 6,9$	$-148,0 \pm 38,0$
Amilorid (lu)	$-4,2 \pm 0,6^*$	$81 \pm 8,7^*$	$-58,6 \pm 16,7^*$
FSK/IBMX (bl)	$-8,8 \pm 0,7^*$	$67 \pm 7,5^*$	$-135,4 \pm 7,5^*$
293 B (bl)	$-0,3 \pm 0,2^*$	$72 \pm 9,5^*$	$-6,4 \pm 4,6^*$
CBZ (T) (bl)	$-7,8 \pm 1,0^*$	$67 \pm 8,8^*$	$-126,1 \pm 20,0^*$
n	6	6	6

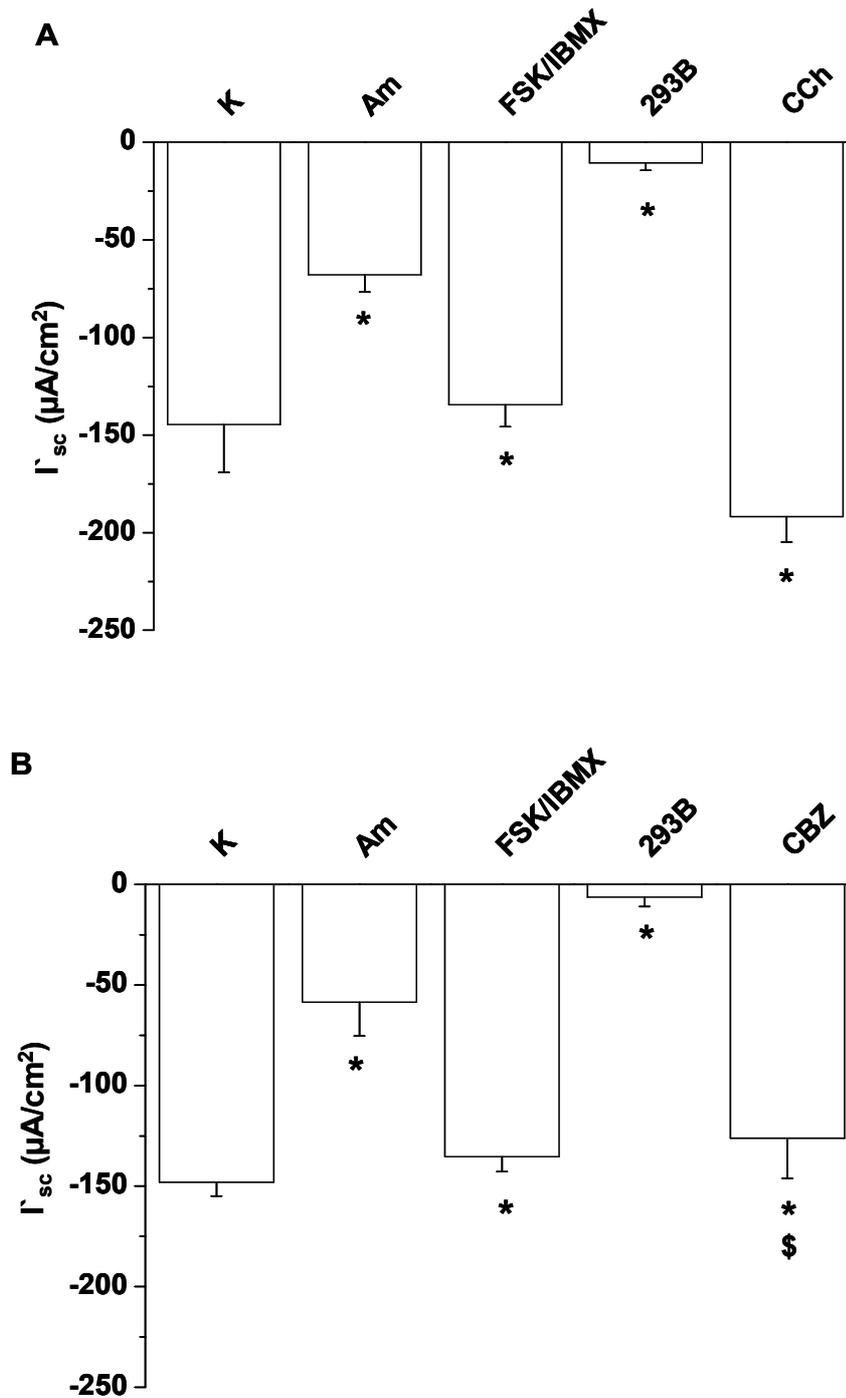


Abbildung 32:

Der äquivalente Kurzschlussstrom (I_{sc}) während der basolateralen Applikation von A: 100 μM Carbachol (CCh, n=11) und B: 100 μM Carbamazepin (CBZ, n=6) in Anwesenheit von 10 μM 293 B. Additive Gabe von 50 μM Amilorid (Am) und Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μM FSK/100 μM IBMX) basolateral. (K) Kontrolllösung. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ getestet gegen Vorbehandlung. \$ $p < 0,05$ getestet gegen CCh.

Da die Freisetzung von Ca^{2+} zur Aktivierung von Ionenkanälen über verschiedene zelluläre Speicher oder über Membraneinstromwege erfolgen kann, sollte im folgenden Versuch überprüft werden, ob CBZ in der Lage war, die CCh-induzierte luminal Cl^- -Sekretion zu beeinflussen. Hierfür wurde die Wirkung von CCh auf die Ca^{2+} -induzierte Cl^- -Sekretion in Ab- und Anwesenheit von CBZ untersucht. Der Versuch fand in der kontinuierlichen Anwesenheit von Amilorid, FSK/IBMX und 293 B statt.

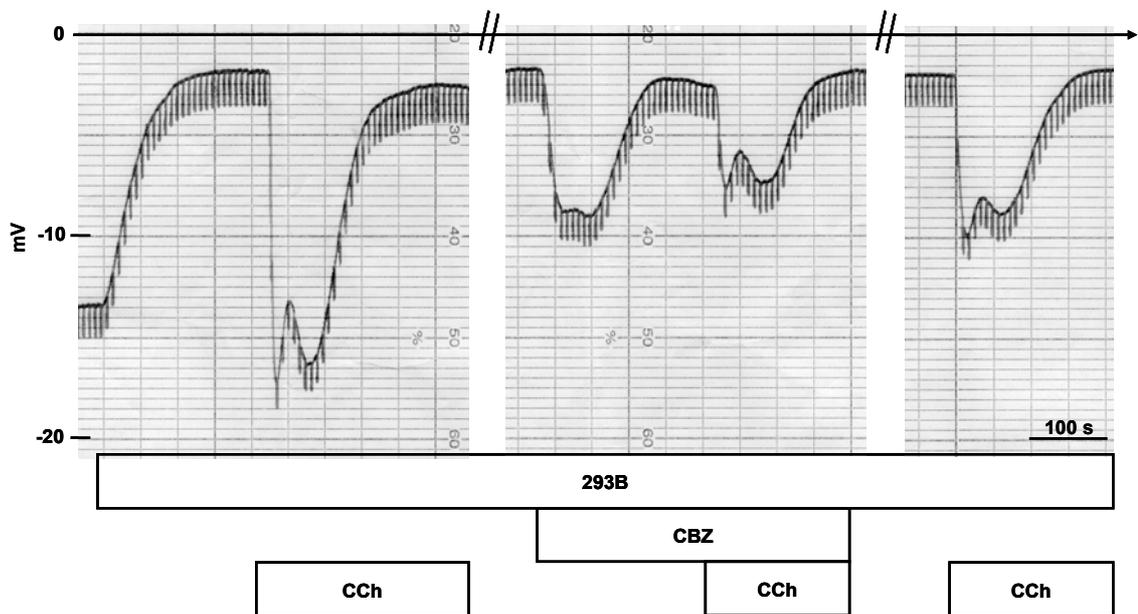


Abbildung 33:

Originalabbildung (Ausschnitt) des transepithelialen Potentials während der basolateralen Applikation von $100 \mu\text{M}$ Carbamazepin (CBZ) und $100 \mu\text{M}$ Carbachol (CCh) in Anwesenheit von $10 \mu\text{M}$ 293 B. $50 \mu\text{M}$ Amilorid luminal und Forskolin/3-Isobutyl-1-methyl-xanthin ($0,1 \mu\text{M}$ FSK/ $100 \mu\text{M}$ IBMX) basolateral kontinuierlich anwesend.

Die Messwerte dieser Ussing-Kammer Experimente sind in Tabelle 9 aufgelistet. Die Daten und Abbildung 33 sowie Abbildung 34B zeigen, dass die Ca^{2+} -abhängige Cl^- -Sekretion durch CCh in Anwesenheit von CBZ kleiner ausfiel und in Abwesenheit von CBZ wieder anstieg. Dabei wurde der äquivalente Kurzschlussstrom (I_{sc}) durch FSK/IBMX auf $-126,0 \pm 8,0 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ erhöht und durch die Applikation des spezifischen Kaliumkanalblockers 293 B auf $-8,5 \pm 2,6 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ reduziert (siehe Abbildung 34A).

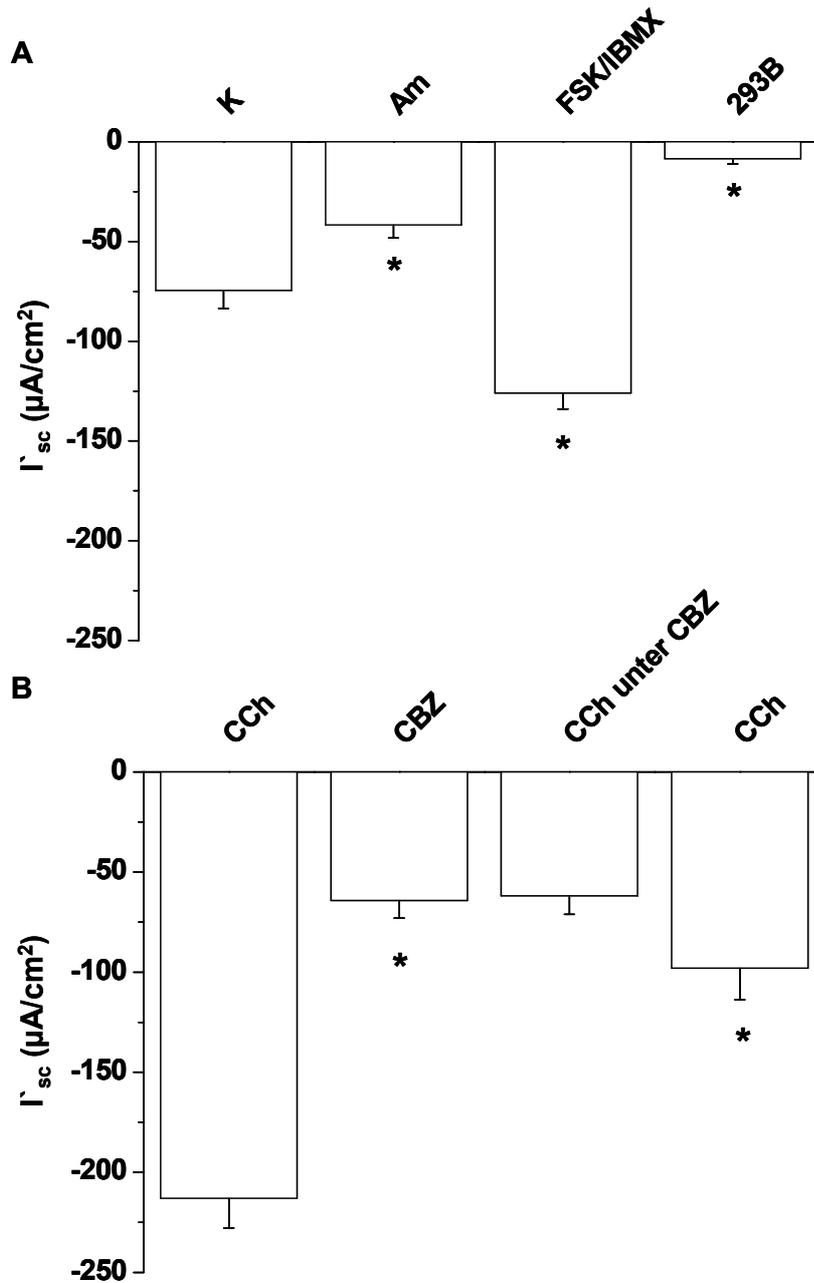


Abbildung 34:

A: Veränderungen des äquivalenten Kurzschlussstroms (I_{sc}) durch die additive Gabe von 50 μM Amilorid (Am), Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μM FSK/100 μM IBMX) basolateral und 10 μM 293 B. B: Fortsetzung des Versuches in der kontinuierlichen Anwesenheit der Wirkstoffe von A und der abwechselnden bzw. gleichzeitigen Gabe von 100 μM CCh und 100 μM CBZ. Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ zum Vorwert, (n=21).

Tabelle 9:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Wirkung von 100 μM Carbachol (CCh) in Ab- und Anwesenheit von 100 μM Carbamazepin (CBZ) zeigen. Δ = Änderung bei Gabe des entsprechenden Wirkstoffes. 50 μM Amilorid (Am) luminal (lu), Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μM FSK/100 μM IBMX) basolateral (bl) und 10 μM 293 B basolateral (bl) nach ihrer Gabe kontinuierlich anwesend. (T): Top, V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der Messungen), * $p < 0,05$ zur Vorbehandlung.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	ΔV_{te} (mV)	ΔR_{te} (Ωcm^2)	ΔI_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
Amilorid (lu)	2,2 \pm 0,5 *	2 \pm 1,2 *	32,8 \pm 6,5 *
FSK/IBMX (bl)	-4,4 \pm 0,6 *	-11 \pm 1,8 *	-84,3 \pm 8,1 *
293 B (bl)	6,7 \pm 0,5 *	3 \pm 1,2 *	117,5 \pm 6,9 *
CCh (T) (bl)	-9,9 \pm 0,7 *	-10 \pm 1,5 *	-204,5 \pm 14,3 *
CBZ (T) (bl)	-2,5 \pm 0,4 *	-2 \pm 0,9 *	-49,5 \pm 8,4 *
CCh (T) / CBZ (bl)	-2,5 \pm 0,5	0,4 \pm 1,0 *	-45,0 \pm 7,8
CCh (T) (bl)	-3,9 \pm 0,6 *	-4 \pm 1,4 *	-82,1 \pm 14,8 *
n	21	21	21

Aus den Versuchen ging klar hervor, dass CCh und CBZ nicht additiv auf die Cl^- -Sekretion wirkten bzw. dass CBZ die Wirkung von CCh beeinträchtigte.

Um die zeitliche Abnahme des CCh-Effektes im Experiment zu berücksichtigen, wurden die Messwerte für V_{te} , R_{te} und I_{sc} der beiden CCh-Effekte in Abwesenheit von CBZ summiert und Mittelwerte gebildet (siehe Tabelle 10). Diese berechneten Werte für V_{te} , R_{te} und I_{sc} wurden mit den Mittelwerten der CCh-Wirkung unter CBZ verglichen (n=21). Daraus ergab sich, dass CBZ die Wirkung von CCh auf I_{sc} um etwa 72% verminderte (siehe Tabelle 10).

Tabelle 10:

Zusammenfassung der Ussing-Kammer Messdaten, die die Wirkung von 100 μM Carbachol (CCh) in Ab- und Anwesenheit von 100 μM Carbamazepin (CBZ) zeigen. Gemittelte Werte des I_{sc} aus der ersten CCh Gabe und aus der Gabe von CCh nach Auswaschen von CBZ. 50 μM Amilorid (Am) luminal, Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μM FSK/100 μM IBMX) basolateral (bl) und 10 μM 293 B basolateral (bl) kontinuierlich anwesend. (T): Top, V_{te} (transepitheliales Potenzial), R_{te} (transepithelialer Widerstand), I_{sc} (äquivalenter Kurzschlussstrom). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der Messungen), * $p < 0,05$ zur Vorbehandlung.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	ΔV_{te} (mV)	ΔR_{te} (Ωcm^2)	ΔI_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
CCh (T) (bl)	$-11,8 \pm 0,9$	$12 \pm 2,0$	$-245,5 \pm 19,8$
CCh (T) / CBZ (T) (bl)	$-2,5 \pm 0,5 *$	$0,4 \pm 1,0 *$	$-45,0 \pm 7,8 *$
n	21	21	21

Aus den Messergebnissen, die in Anwesenheit von 293 B erzielt wurden, lässt sich schließen, dass CBZ einerseits über den gleichen Signalweg oder die gleiche Endstrecke wie CCh auf die Cl^- -Sekretion wirkte, andererseits aber die Fähigkeit des Gewebes zur Cl^- -Sekretion unter CCh-Einfluss hemmte.

3.1.2 Patch-Clamp Messungen an isolierten Kolonkrypten

Alle elektrophysiologischen Patch-Clamp Messungen wurden an den Zellen der Kolonkryptbasis erhoben. Insgesamt wurden 30 Krypten elektrophysiologisch untersucht, von denen 23 erfolgreich abgeglichen werden konnten und die zugleich die Voraussetzung erfüllten, dass sie unter FSK/IBMX eine Depolarisation und einen Anstieg des Leitwertes zeigten (siehe Abbildung 35). Der obere Teil der Abbildung 35 gibt den Strom (I) und der untere das Membranpotenzial (V) der Zellen an. Gezeigt ist der Einfluss von FSK/IBMX (0,1 μM /100 μM), CBZ (100 μM) und CCh (100 μM) auf den Ionenstrom und das Membranpotenzial einer Krypte.

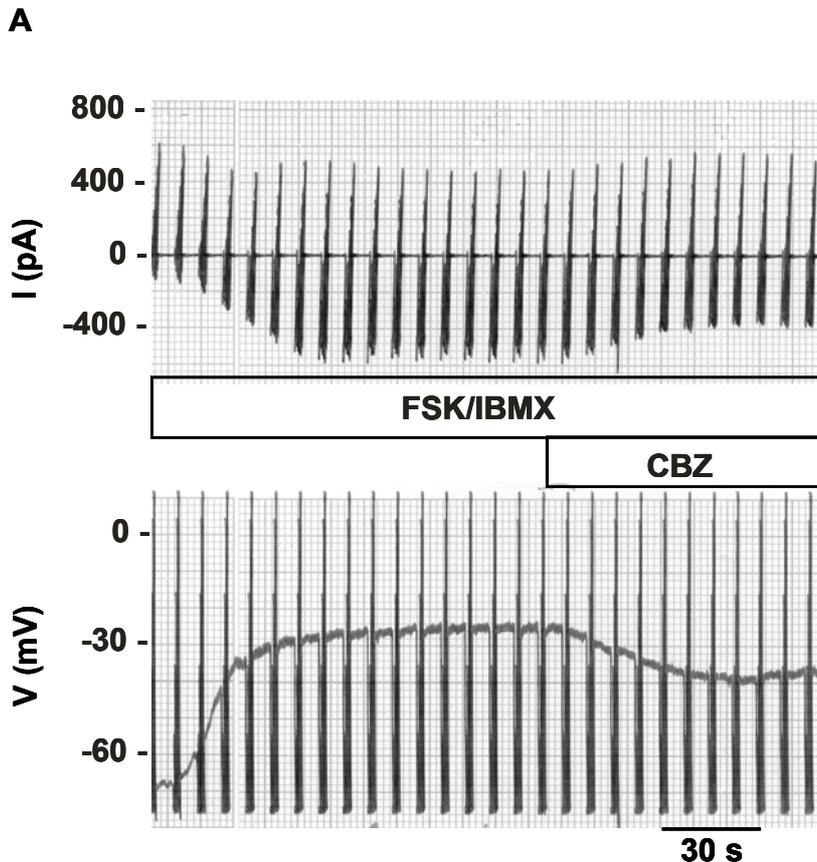
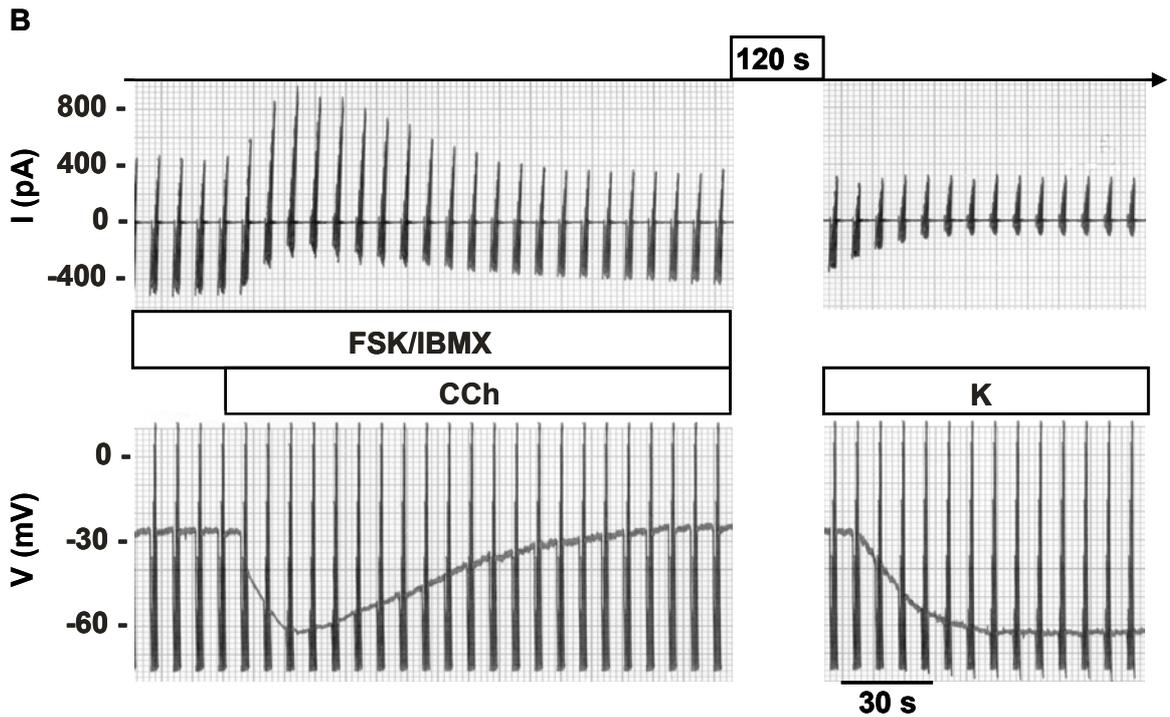


Abbildung 35:

A: Originalaufzeichnung eines Ganzzell-Patch-Clamp Versuchs an einer Kryptzelle. Strom (I) und Membranpotenzial (V) der Krypte gegen die Zeit. Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μM FSK/100 μM IBMX) depolarisierte und erhöhte den Strom, 100 μM Carbamazepin (CBZ) dagegen hyperpolarisierte und senkte den Strom.

Die Analyse der Membranpotenzialdaten (siehe Tabelle 11) ergab, dass die untersuchten Zellen der Krypten unter Kontrollbedingungen (K) ein Membranpotenzial von ca. $-70,8 \pm 1,4$ mV (n=23) aufwiesen. FSK/IBMX führte durch das Öffnen der cAMP-abhängigen K^+ -Kanäle auf der basolateralen Seite und der Cl^- -Kanäle auf der luminalen Seite der Membran zu einer deutlichen und schnellen Depolarisation um ca. 60% (n=21). CBZ hyperpolarisierte die Kryptzellen in Anwesenheit von FSK/IBMX um ca. 34% (n=17). Die Wirkung von CBZ war reversibel.



Fortsetzung der Abbildung 35:

B: nach einer Auswaschperiode von CBZ für 120 s führte die Applikation von 100 μ M Carbachol (CCh) zu einer transienten Hyperpolarisation. Nach dem Auswaschen von FSK/IBMX (0,1 μ M/100 μ M) und CCh für 120 s mit Kontrolllösung (K) hyperpolarisierte die Membran wieder auf Ausgangswerte und der Leitwert der untersuchten Zelle reduzierte sich.

Nach dem Auswaschen von CBZ für ca. 120 s ging das Membranpotenzial annähernd auf den Vorwert zurück ($-28,7 \pm 1,9$ mV, $n=13$). Der muskarinerge Agonist Carbachol hyperpolarisierte die Kryptzelle kurzfristig um 62% ($n=8$), der nachfolgende Auswasch von CCh depolarisierte V_m wieder um ca. 39% ($n=5$). Am Ende des Versuchs wurde ein stabiles und physiologisches Membranpotenzial von $-62,2 \pm 5,7$ mV ($n=5$) erreicht (siehe Fortsetzung der Abbildung 35).

Die Leitwertänderungen (G_{total}) unter dem Einfluss von FSK/IBMX, CBZ und CCh sind ebenfalls in Tabelle 11 aufgeführt. Unter Kontrollbedingungen lag G_{total} bei $5,8 \pm 0,7$ nS ($n=23$). Dieser Wert ist bei einem mittleren Zugangsleitwert G_a von $54,3 \pm 13,7$ nS ($n=16$) ausreichend niedrig, um zumindest eine qualitative Aussage zu den Leitwertänderungen der Zelle auch über G_{total} zu erlauben.

Tabelle 11:

Ergebnisse der Ganzzell-Patch-Clamp Messungen an isolierten Kolonkrypten. Wirkung von 100 μ M Carbamazepin (CBZ) und 100 μ M Carbachol (CCh) in Anwesenheit von Forskolin/ 3-Isobutyl-1-methyl-xanthin (0,1 μ M FSK/100 μ M IBMX), Mittelwerte \pm SEM. (n) Anzahl der Krypten, * $p < 0,05$ zum Vorwert.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	Membranpotenzial (mV)	G _{total} (nS)
Kontrolle	-70,8 \pm 1,4 (23)	5,8 \pm 0,7 (23)
FSK/IBMX	-28,1 \pm 1,3 (21) *	7,1 \pm 0,9 (21) *
FSK/IBMX/CBZ	-37,5 \pm 2,4 (17) *	6,1 \pm 0,9 (17) *
FSK/IBMX	-28,7 \pm 1,9 (13) *	5,7 \pm 1,3 (13)
FSK/IBMX/CCh	-46,5 \pm 5,9 (8) *	9,3 \pm 2,1 (8) *
FSK/IBMX	-28,5 \pm 4,3 (5) *	5,8 \pm 2,1 (5) *
Nachkontrolle	-62,2 \pm 5,7 (5) *	3,9 \pm 1,9 (5)

FSK/IBMX erhöhte den Leitwert um ca. 22% (n=21), wohingegen CBZ ihn um 14% (n=17) senkte. Der Leitwert der Zellen nahm nach dem Auswaschen von CBZ weiter ab, konnte durch 100 μ M CCh jedoch kurzfristig um ca. 63% auf 9,3 \pm 2,1 nS (n=8) erhöht werden. Das Entfernen von CCh aus der Badlösung ließ G_{total} wieder um 38% (n=5) sinken. Insgesamt nahm der Leitwert im Verlauf des Experimentes ab. Unter diesem Aspekt ist es wahrscheinlich, dass CBZ die Zelle reversibel durch Hemmung von Ionenkanälen hyperpolarisierte.

Zur Darstellung der I/V-Kurve (siehe Abbildung 36) unter dem Einfluss von FSK/IBMX und CBZ wurden die Mittelwerte der Ströme für die entsprechenden Klemmspannungen aus drei bis vier Spannungsrampen gebildet. Die Messwerte sind in Tabelle 12 aufgelistet.

Tabelle 12:

Ergebnisse der Patch-Clamp Messungen an isolierten Kolonkrypten im Ganzzell-Modus zur Erstellung der I/V-Kurve, Abkürzungserläuterungen und Konzentrationsangaben siehe Text. Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungen beim gleichen Potenzial.

Spannung V (mV)	Kontrolle I (pA)	FSK/IBMX I (pA)	FSK/IBMX/CBZ I (pA)
-80	-42,1 \pm 3,7	-381,3 \pm 25,9 *	-256,5 \pm 19,8 *
-60	65,2 \pm 7,5	-233,9 \pm 16,6 *	-129,8 \pm 11,4 *
-40	181,3 \pm 13,6	-91,2 \pm 8,1 *	-6,5 \pm 7,3 *
-20	301,3 \pm 21,0	48,6 \pm 4,7 *	117,2 \pm 11,6 *
0	423,5 \pm 28,5	187,2 \pm 11,5 *	242,0 \pm 19,7 *
20	549,0 \pm 35,7	329,6 \pm 20,3 *	368,1 \pm 28,7 *
n	23	21	17

Abbildung 36 zeigt die I/V-Kurven der Patch-Clamp Messungen an isolierten Kolonkrypten. Sie lässt erkennen, dass das Umkehrpotenzial unter Kontrollbedingungen mit ca. -73 mV in der Nähe des K⁺-Gleichgewichtspotenzials (-90 mV) lag. Unter FSK/IBMX entsprach das Umkehrpotenzial ca. -30 mV und lag somit in der Nähe des Cl⁻-Gleichgewichtspotenzials (-40 mV). Aus der Steigung der I/V-Kurve unter FSK/IBMX (siehe Abbildung 37A) war erkennbar, dass der Leitwert angestiegen war.

In Anwesenheit von CBZ wurde das Umkehrpotenzial von -30 mV auf -40 mV verschoben und der Leitwert reduziert (siehe Abbildung 37B).

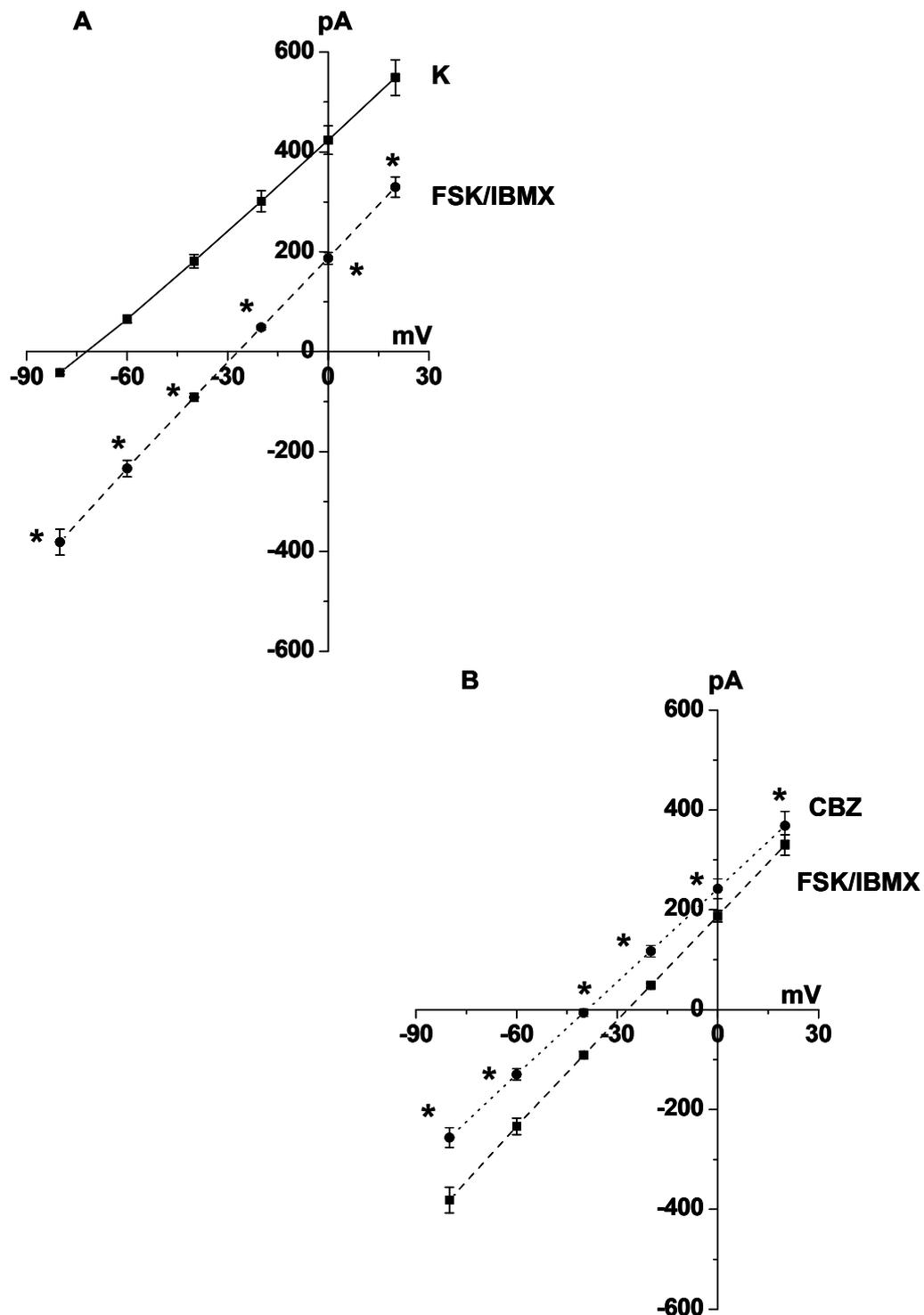


Abbildung 36:

Darstellung der I/V-Kurven zu den Patch-Clamp Experimenten an isolierten Kolonkrypten.

A: Wirkung von FSK/IBMX.

B: Wirkung von CBZ in Anwesenheit von FSK/IBMX.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungen beim gleichen Potenzial.

3.1.3 Ca²⁺-Messung an isolierten Kolonkrypten

Die Beobachtungen am Kolonepithel in der Ussing-Kammer zeigten u.a., dass CBZ eine Ca²⁺-abhängige Cl-Sekretion induzieren konnte. Der Einfluss von Carbachol (CCh) war in Anwesenheit von CBZ reduziert. Die Wirkung von CBZ auf die intrazelluläre Freisetzung von Ca²⁺ wurde in isolierten Kolonkrypten untersucht. Hierzu wurde diese für 30-90 min mit 10 µM Fura-2/AM beladen. Anschließend wurde die Fluoreszenzquotient (340 nm/380 nm) als Maß der intrazellulären Ca²⁺-Aktivität berechnet. Die Abbildung 37 zeigt zwei Experimente an Fura-2/AM beladenen Kolonkrypten als Originalregistrierungen unter 0,1 % DMSO (siehe Abbildung 37A) und CBZ (siehe Abbildung 37B). DMSO war das Lösungsmittel für die CBZ-Stammlösung und diente als Negativkontrolle.

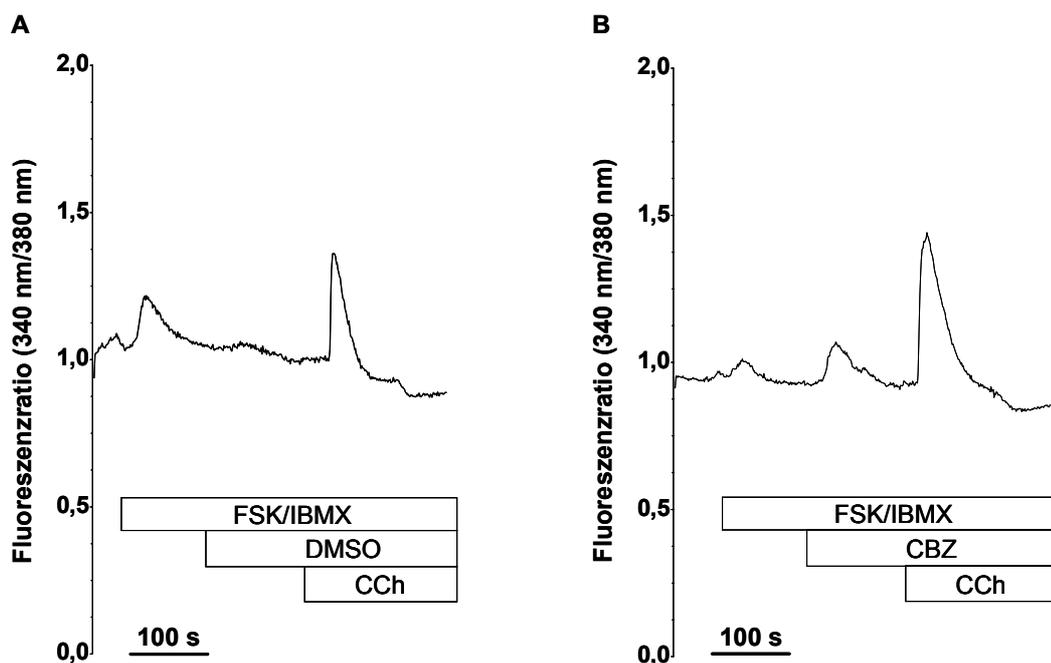


Abbildung 37:

Originalregistrierungen der Wirkung von 0,1% DMSO (A) und 100 µM CBZ (B) in Anwesenheit von FSK/IBMX (10 µM/100 µM) auf den Fluoreszenzquotienten als Maß für die intrazelluläre Ca²⁺-Aktivität in mit Fura-2/AM (10 µM) beladenen isolierten Kolonkrypten.

Das Einwaschen von FSK/IBMX (10 μ M/100 μ M) führte in beiden Versuchsprotokollen (siehe Abbildung 37) zu einem kurzfristigen transienten Anstieg des intrazellulären Ca^{2+} in den Zellen der isolierten Kolonkrypten. FSK/IBMX blieb während des gesamten Versuchs kontinuierlich anwesend. Die anschließende Applikation von CBZ induzierte einen signifikanten Ca^{2+} -Anstieg (siehe Abbildung 37B), der deutlich größer ausfiel, als die Änderung durch das Lösungsmittel DMSO allein. Dieser gipfelte in einem Peak und kehrte dann langsam auf den Ausgangswert zurück. In beiden Versuchsprotokollen erreichte der Fluoreszenzquotient unter CCh mit ca. 1,4 sein Maximum, bevor er wieder auf einen konstanten Wert absank. Das heißt, auf der Ebene der Ca^{2+} -Freisetzung konnte CBZ die Wirkung von CCh nicht beeinträchtigen. Abbildung 38 zeigt die Zusammenfassung der Ca^{2+} -Messdaten aus jeweils fünf Messungen pro Versuchsprotokoll.

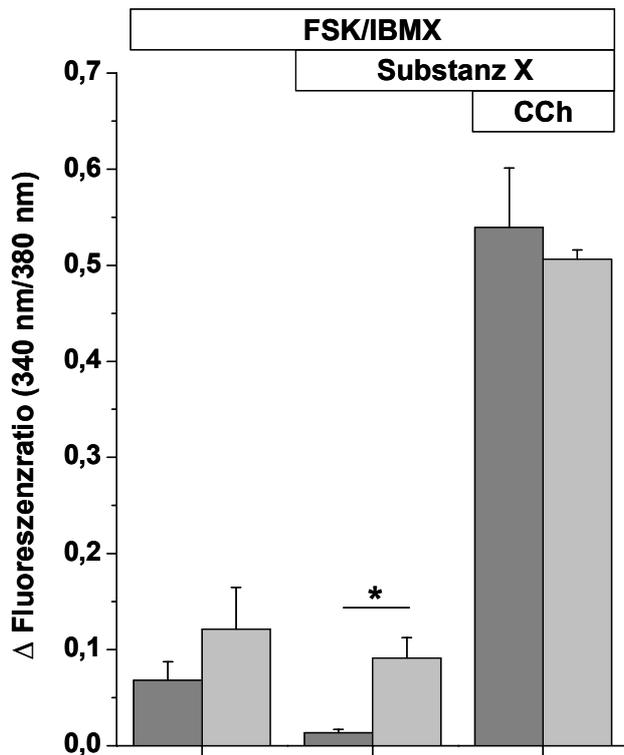


Abbildung 38:
Zusammenfassung der Ca^{2+} -Messdaten an Fura-2/AM beladenen Zellen isolierter Kolonkrypten. Gezeigt sind die Fluoreszenzänderungen (Δ) durch die additive Gabe von 0,1 μ M FSK/ 100 μ M IBMX, 100 μ M CBZ oder durch das Lösungsmittel 0,1% DMSO und von 100 μ M CCh. Substanz X bezeichnet DMSO (grau, n=5) bzw. CBZ (hellgrau, n=5). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen.

3.1.4 cAMP Messungen an isolierten Kolonkrypten

Die Wirkung von Forskolin und Carbamazepin auf die zelluläre cAMP-Menge in isolierten Kolonkrypten ist in Tabelle 13 zusammengefasst. Es handelt sich dabei um Daten von fünf unterschiedlichen cAMP-Messungen, die jeweils unter Kontrollbedingungen, unter 0,1 µM Forskolin und unter 100 µM Carbamazepin in Anwesenheit von Forskolin vorgenommen wurden. Die Wirkung von CBZ wurde analog zu den *in-vitro*-Experimenten auf die zuvor durch FSK-stimulierte cAMP-Produktion hin untersucht.

Tabelle 13:

Zelluläre cAMP-Menge unter Kontrollbedingungen, unter 0,1 µM Forskolin (FSK) und unter 100 µM Carbamazepin (CBZ) in der Anwesenheit von FSK in isolierten Kolonkrypten der Ratte (n=5 Messungen). Dargestellt sind Messwerte und die Werte in Bezug auf den Maximalwert nach Stimulation mit FSK (%). Mittelwerte ± SEM. * p<0,05 zum Vorwert bzw. zu FSK (100%).

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	cAMP-Menge (pmol/mg Protein)	cAMP-Menge (%)
Kontrolle	6,0 ± 1,1	26,6 ± 7,4 *
FSK	29,1 ± 9,7 *	100 ± 33,5
FSK/CBZ	20,2 ± 8,1	66,3 ± 8,9 *
n	5	5

Die Inkubation der isolierten Kolonkrypten für 5 min in 0,1 µM FSK führte zu einem Anstieg des zellulären cAMP-Menge. 100 µM CBZ senkte den cAMP-Gehalt in den Krypten in Anwesenheit von FSK.

Um die Wirkung bei der vorhandenen Streuung der Absolutwerte besser einschätzen zu können, wurden die relativen Änderungen der cAMP-Werte in Bezug auf den Maximalwert unter FSK (100%) berechnet (siehe Tabelle 13) und in Abbildung 39 graphisch dargestellt.

Ausgehend von einem basalen cAMP-Gehalt unter Kontrollbedingungen (6,0 ± 1,1 pmol cAMP/mg Protein), konnte durch FSK-Stimulation die

zelluläre cAMP-Menge um 73% deutlich angehoben werden. Währenddessen senkte CBZ in Anwesenheit von FSK den cAMP-Gehalt um 34%.

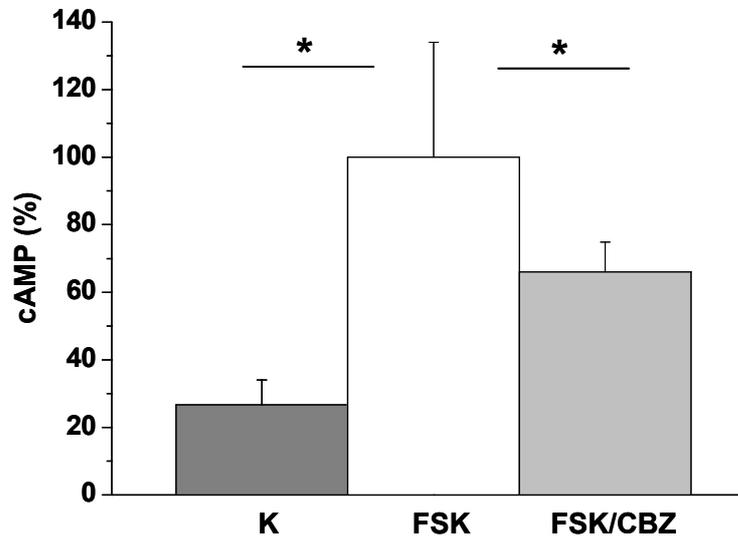


Abbildung 39:

Einfluss von 100 μ M Carbamazepin (CBZ) auf die zelluläre cAMP-Konzentration isolierter Kolonkrypten der Ratte (n=5 Messungen) in Anwesenheit von FSK. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM in %. * $p < 0,05$ zwischen Kontrolllösung (K) bzw. CBZ und FSK.

3.2 *In-vivo* Untersuchungen

In diesem Kapitel sind die metabolischen Parameter von Ratten aufgeführt, die unter verschiedenen Bedingungen auf metabolischen Käfigen unter Einfluss von Carbamazepin (CBZ) untersucht wurden. Die Tiere wurden den Versuchsgruppen zufällig zugeteilt.

3.2.1 Der Einfluss einer 7-tägigen CBZ-Behandlung auf den Metabolismus der Ratte

Die Ratten wurden in dieser Serie mit 2% Tylose oder mit Carbamazepin (50 mg/kg KG/Tag) behandelt. Die Plasmamesswerte sind in Tabelle 14

dargestellt. Die Behandlung führte nicht zu Elektrolytstörungen. Allerdings kam es bei den CBZ-Tieren (n=7) im Vergleich zu den Kontrolltieren (n=7) zu einer leichten Erhöhung des Plasma pH ($7,42 \pm 0,01$ vs. $7,36 \pm 0,02$) sowie zu einem Anstieg in der Plasmaosmolalität ($304,0 \pm 1,7$ vs. $298 \pm 1,8$ mosmol/kg H₂O).

Tabelle 14:
Vergleich der Plasmaparameter zwischen Kontrolltieren (K, n=7) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=7). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen.

Parameter	K	CBZ
Na ⁺ (mmol/l)	145,3 \pm 0,8	145,0 \pm 0,8
K ⁺ (mmol/l)	3,5 \pm 0,1	3,8 \pm 0,4
Ca ²⁺ (mmol/l)	3,8 \pm 0,1	3,7 \pm 0,2
Kreatinin (μ mol/l)	43,4 \pm 4,0	42,7 \pm 4,8
pH	7,36 \pm 0,02	7,42 \pm 0,01 *
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	298 \pm 1,8	304 \pm 1,7 *
n	7	7

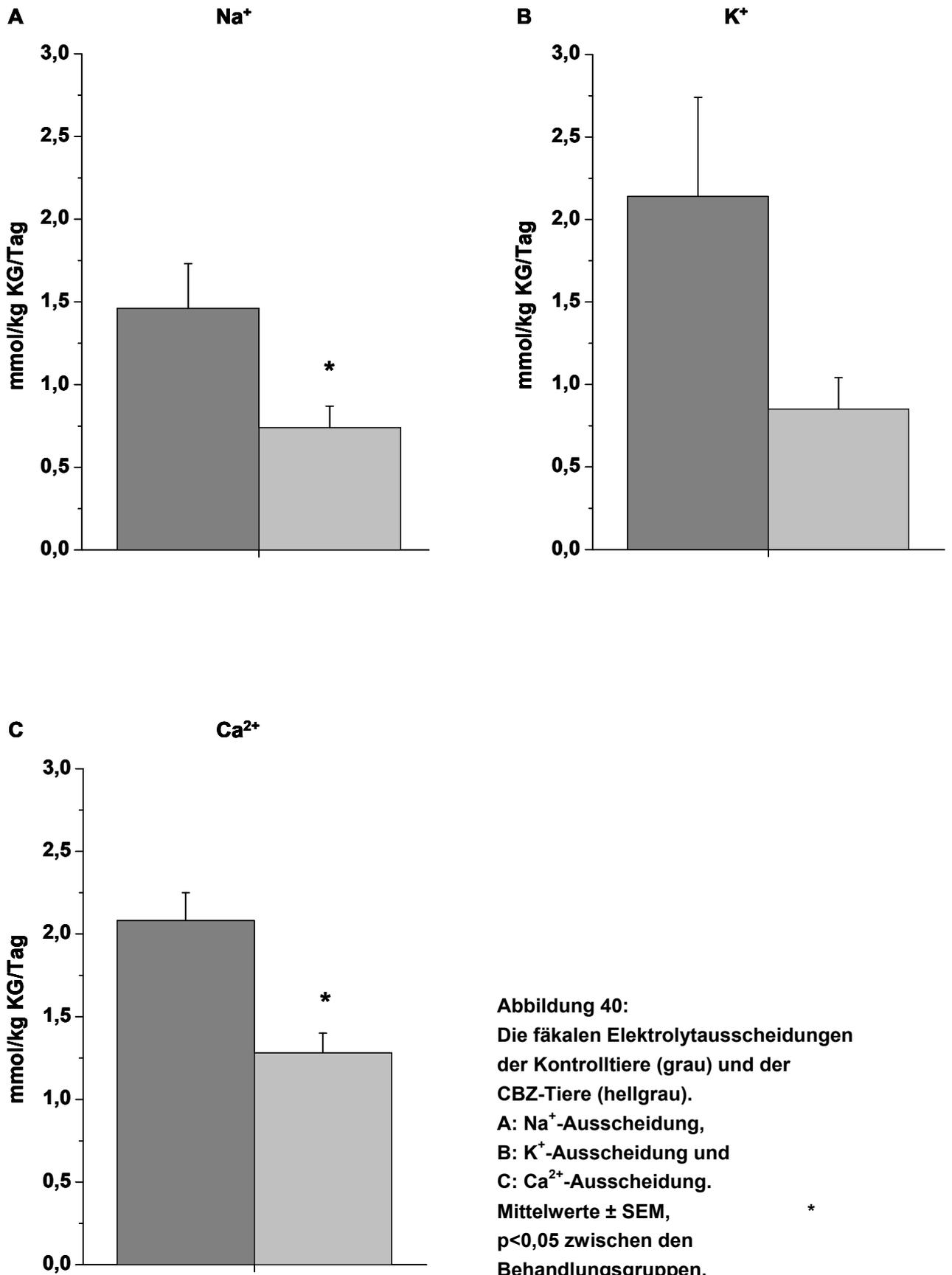
Obwohl die Tiere eine klare Erhöhung der Plasmaosmolalität aufwiesen, waren die in dieser Serie gemessenen Urinparameter am Ende der Behandlungswoche praktisch ausgeglichen (siehe Tabelle 15). Der Urinfluss und auch die GFR (Kreatinin-Clearance) beider Versuchstiergruppen waren gleich und es lagen auch keine Unterschiede in den renalen Elektrolytausscheidungen von Na⁺, K⁺ und Ca²⁺ vor. Die Fähigkeit der Niere, den Urin angemessen zu konzentrieren, war durch die 7-tägige CBZ-Behandlung ebenfalls nicht beeinträchtigt. Die Urinosmolalität der Kontrolltiere betrug $936,0 \pm 110,58$ mosmol/kg H₂O und die der mit CBZ-behandelten Tiere $1141,7 \pm 133,9$ mosmol/kg H₂O.

Tabelle 15:

Vergleich der Urinparameter zwischen Kontrolltieren (K, n=7) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=7). Mittelwerte \pm SEM, (n) Anzahl der Tiere, KG (Körpergewicht).

Parameter	K	CBZ
Kreatinin (mmol/l)	6,41 \pm 0,8 (7)	5,82 \pm 0,6 (7)
Harnfluss (ml/min/kg KG)	0,04 \pm 0,003 (6)	0,05 \pm 0,004 (6)
Kreatinin-Clearance (ml/min/kg KG)	5,24 \pm 1,3 (7)	5,56 \pm 1,2 (7)
Na ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	3,94 \pm 0,6 (6)	4,71 \pm 0,3 (6)
K ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	9,71 \pm 1,4 (6)	12,21 \pm 0,5 (6)
Ca ²⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	0,21 \pm 0,04 (6)	0,23 \pm 0,04 (6)
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	936,0 \pm 110,6 (7)	1141,7 \pm 133,9 (7)

In dieser ersten Serie wurden die Gewichte der Tiere nicht dokumentiert. Für die Berechnungen der Werte, die wegen der Vergleichbarkeit mit den folgenden Serien auf das Körpergewicht (KG) bezogen sind, wurden ein durchschnittliches Körpergewicht von 255 g und ein durchschnittliches Kottrockengewicht von 6 g/Tag eingesetzt. In allen weiteren Serien wurden die gemessenen Körper- und Kotgewichte für die Einzeltiere den Berechnungen zugrundegelegt. Interessanterweise ergaben sich in dieser Serie Unterschiede bei den fäkalen Ausscheidungsparametern (siehe Abbildung 40). Im Vergleich zu den CBZ-Tieren schieden die Kontrolltiere mehr Na⁺ (0,8 \pm 0,1 mmol/kg KG/Tag vs. 1,5 \pm 0,3 mmol/kg KG/Tag) und Ca²⁺ (1,3 \pm 0,1 mmol/kg KG/Tag vs. 2,1 \pm 0,2 mmol/kg KG/Tag) aus. Die fäkalen Ausscheidungen von K⁺ waren zwischen Kontrolltieren und CBZ-Tieren nicht unterschiedlich (2,2 \pm 0,6 mmol/kg KG/Tag vs. 0,9 \pm 0,2 mmol/kg KG/Tag).



Die Ionentransportprozesse im distalen Kolon können Spiegelbild eines renalen Salz- und Wasserverlustes sein oder selbst die Ursache dafür darstellen. Deshalb wurden Kolongewebestücke der zuvor verschieden behandelten Ratten in der Ussing-Kammer hinsichtlich ihrer epithelialen Ionentransportprozesse untersucht.

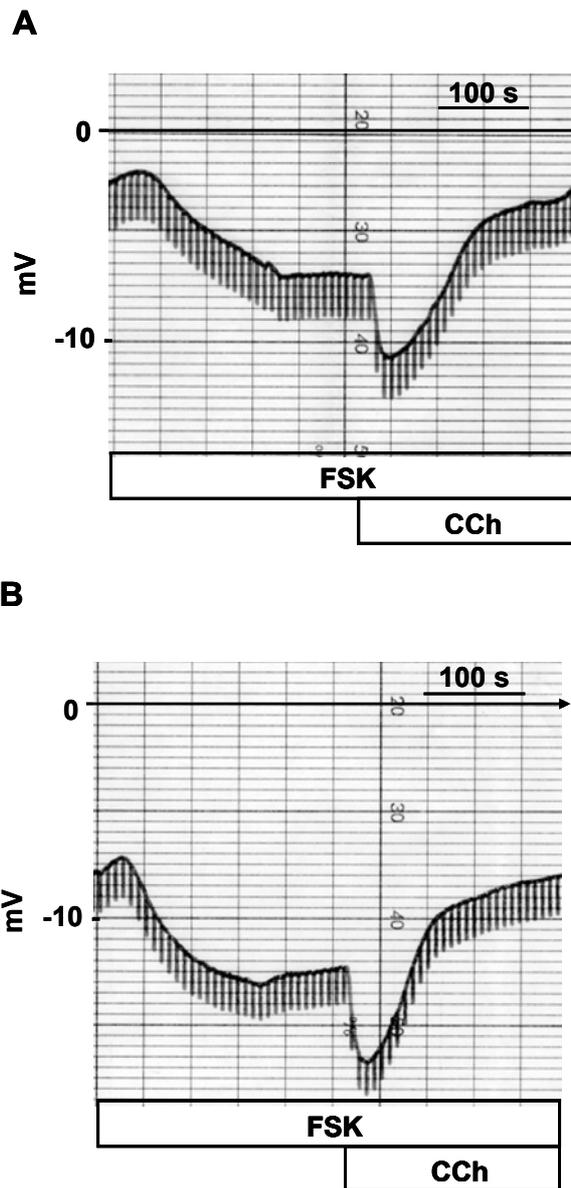


Abbildung 41:

Originalregistrierungen (Ausschnitt) des transepithelialen Potentials V_{te} und der Spannungspulse, die durch Konstantstrominjektion erzeugt wurden, über das Kolongewebe der Ratte. A: Kontrolltier, B: CBZ-Tier. Basolateral sind $0,1 \mu\text{M}$ Forskolin (FSK) und $100 \mu\text{M}$ Carbachol (CCh) anwesend. Luminal ist $50 \mu\text{M}$ Amilorid kontinuierlich anwesend.

Die Abbildung 41 zeigt jeweils einen Ausschnitt des transepithelialen Potenzialverlaufes über das Kolongewebe von einem Kontroll- und einem CBZ-Tier in Anwesenheit von 0,1 μM Forskolin (FSK) und dann additiv 100 μM Carbachol (CCh). 50 μM Amilorid war luminal kontinuierlich während des gesamten Experimentes anwesend. Insgesamt wurden 24 Kolongewebestücke der Kontrolltiere und 31 Kolongewebestücke der CBZ-Tiere hinsichtlich ihres transepithelialen Potenzials (V_{te}), des transepithelialen Widerstandes (R_{te}) und des äquivalenten Kurzschlussstroms (I_{sc}) untersucht. Die Messergebnisse sind in Tabelle 16 bis Tabelle 18 zusammengefasst und in der Abbildung 42 graphisch dargestellt.

Tabelle 16:

Vergleich des transepithelialen Potenzials (V_{te}) über das Kolonepithel zwischen Kontrolltieren (K, n=7) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=7) unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Mittelwerte \pm SEM. n (Anzahl der Messungen). 50 μM Amilorid (Am) luminal und 0,1 μM Forskolin (FSK) sowie 100 μM Carbachol (CCh) basolateral anwesend.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	V_{te} (mV)	V_{te} (mV)
	K	CBZ
Kontrolle	-5,1 \pm 1,0	-5,3 \pm 0,6
Am	-2,5 \pm 0,4	-3,3 \pm 0,4
FSK	-4,2 \pm 0,5	-5,0 \pm 0,5
CCh	-6,7 \pm 0,7	-7,6 \pm 0,8
n	24	31

Hinsichtlich des transepithelialen Potenzials und des transepithelialen Widerstandes bestanden keine Unterschiede zwischen den untersuchten Kolongewebestücken der Kontroll- und der mit CBZ-behandelten Tiere. Amilorid reduzierte das negative V_{te} (Tabelle 16) und erhöhte R_{te} (Tabelle 17), wohingegen FSK und CCh den gegenteiligen Effekt hatten. Im Vergleich zu den Kontrolltieren fiel der $|I_{sc}|$ unter FSK bei den CBZ-Tieren um ca. 23% höher aus (Tabelle 18).

Tabelle 17:

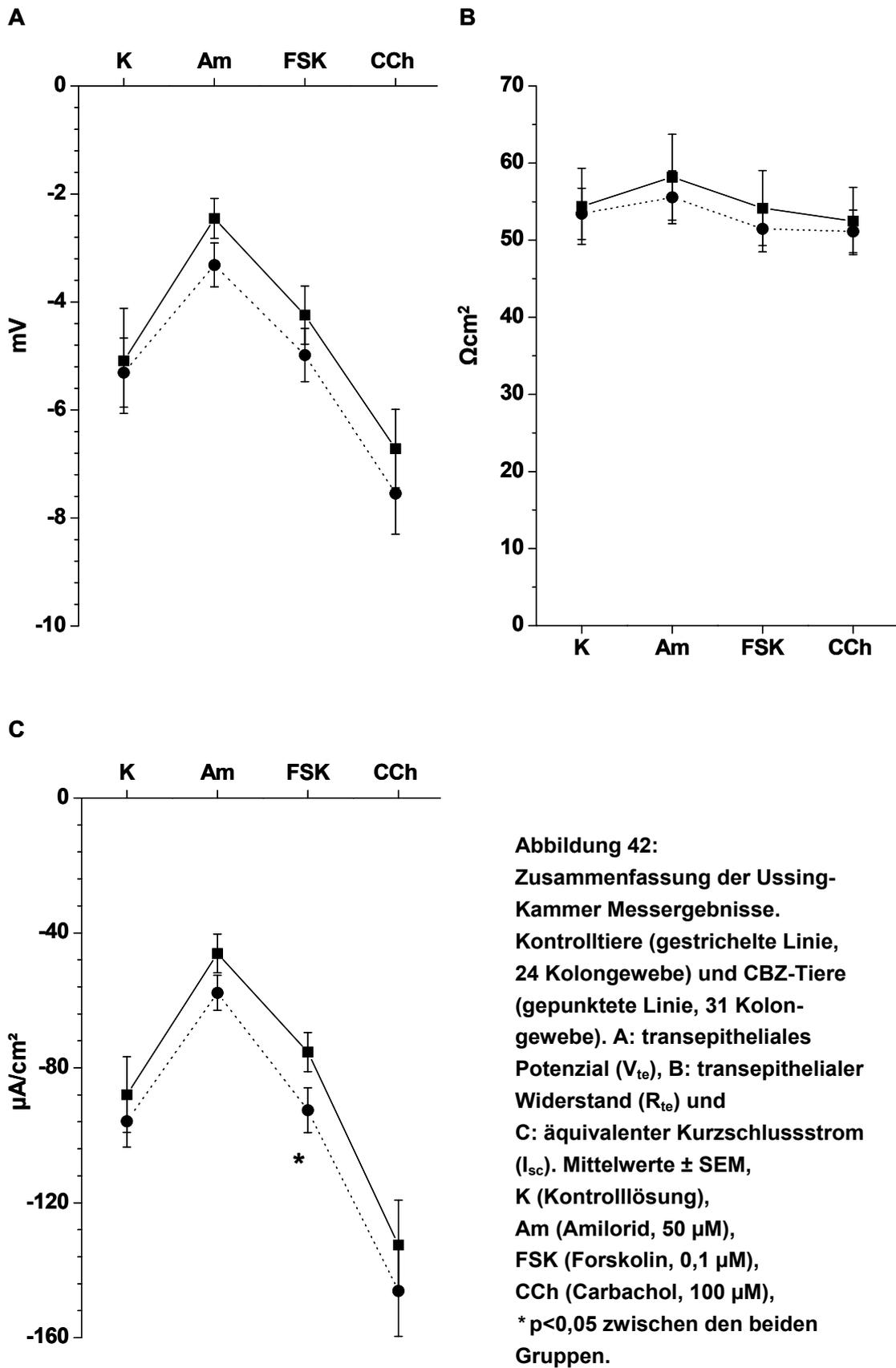
Vergleich des transepithelialen Widerstandes (R_{te}) über das Kolonepithel zwischen Kontrolltieren (K, n=7) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=7) unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Mittelwerte \pm SEM. n (Anzahl der Messungen). 50 μ M Amilorid (Am) luminal und 0,1 μ M Forskolin (FSK) sowie 100 μ M Carbachol (CCh) basolateral anwesend.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	R_{te} (Ωcm^2)	R_{te} (Ωcm^2)
	K	CBZ
Kontrolle	54,4 \pm 4,9	53,4 \pm 3,3
Am	58,2 \pm 5,6	55,6 \pm 3,4
FSK	54,2 \pm 4,9	51,5 \pm 3,0
CCh	52,5 \pm 4,4	51,1 \pm 2,8
n	24	31

Tabelle 18:

Vergleich der äquivalenten Kurzschlussstromänderung (I_{sc}) über das Kolonepithel zwischen Kontrolltieren (K, n=7) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=7) unter verschiedenen Versuchsbedingungen. Mittelwerte \pm SEM. n (Anzahl der Messungen). 50 μ M Amilorid (Am) luminal und 0,1 μ M Forskolin (FSK) sowie 100 μ M Carbachol (CCh) basolateral anwesend.

Reihenfolge der kumulativ applizierten Lösungen	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)	I_{sc} ($\mu\text{A}/\text{cm}^2$)
	K	CBZ
Kontrolle	-87,9 \pm 11,2	-95,9 \pm 7,6
Am	-46,1 \pm 5,8	-57,8 \pm 5,2
FSK	-75,4 \pm 5,9	-92,6 \pm 6,6 *
CCh	-132,5 \pm 13,3	-146,1 \pm 13,5
n	24	31



Zusammenfassend lässt sich für diesen Versuch sagen, dass eine 7-tägige CBZ-Behandlung von 50 mg/kg KG/Tag mit dem Salz- und Wasserhaushalt der Ratten interferierte. Dies war sowohl am Anstieg des Plasma pH und der Osmolalität des Plasmas als auch an den verminderten fäkalen Na^+ - und Ca^{2+} -Ausscheidungen zu erkennen. Der elektrogene Na^+ -Transport im Kolon war unverändert. Interessanterweise konnte auch eine höhere cAMP-vermittelte Cl^- -Sekretion nach Stimulation mit FSK nachgewiesen werden.

3.2.2 Der Einfluss einer CBZ-Behandlung unter Wasserrestriktion

Vor der Wasserrestriktion durch Entfernen der Trinkflasche am Käfig (Zeitpunkt „0 h“) unterschieden sich die Tiere der Kontrollgruppe und der CBZ-Gruppe in Bezug auf die Futter-, die Trinkaufnahme, die Urin-, die Kot- und die renalen Elektrolytausscheidungen nicht voneinander. Die Tiere beider Gruppen tranken ungefähr 42 ml/Tag und fraßen 25 g/Tag. Ihre Harnproduktionen lagen bei 24 ml/Tag und ihre Kotproduktionen bei 11 g/Tag. Die Kreatinin-Clearance betrug ungefähr 8 ml/min/kg KG. Die renale Ausscheidung von Na^+ war 6 mmol/kg KG/Tag, die von K^+ 16 mmol/kg KG/Tag und die von Ca^{2+} und Cl^- betrug 0,3 mmol/kg KG/Tag und 6 mmol/kg KG/Tag. Die Ausscheidung von Harnstoff lag bei 52-53 mmol/kg KG/Tag und war ebenfalls zwischen den Behandlungsgruppen gleich. Die Messwerte der Plasmaparameter Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Kreatinin und der Osmolalität zu Beginn des Experimentes wurden aus dem Versuch 3.2.4 (Mittelwerte unter Normalbedingungen) für alle Tiere beider Gruppen für die Berechnungen eingesetzt, da in diesem Versuch zur Vermeidung einer zusätzlichen Belastung der Tiere auf eine Blutabnahme unter Kontrollbedingungen verzichtet wurde.

Ergebnisse

Tabelle 19:

Vergleich der Urinmessparameter der Ratten nach einer Wasserrestriktion von 5 h (Zeitintervall „5 h“) und nach der Applikation von 2% Tylose (K) oder CBZ (50 mg/kg KG) unter andauernder Durstperiode für weitere 5 h (Zeitintervall „10 h“). Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. KG (Körpergewicht). * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen. § $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe (n=9), § $p < 0,05$ innerhalb der CBZ-Gruppe (n=9).

Parameter	Zeitintervall „5 h“ K	Zeitintervall „5 h“ CBZ	Zeitintervall „10 h“ K	Zeitintervall „10 h“ CBZ
Kreatinin (mmol/l)	3,9 \pm 0,6	4,1 \pm 0,6	10,6 \pm 1,3 §	6,3 \pm 0,5 * §
Harnfluss (ml/min/kg)	0,04 \pm 0,006	0,03 \pm 0,004	0,02 \pm 0,002 §	0,03 \pm 0,002 *
Kreatinin-Clearance (ml/min/kg)	4,6 \pm 0,6	4,5 \pm 0,5	6,0 \pm 0,7	6,2 \pm 0,5 §
Renale Na ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	6,5 \pm 1,0	5,6 \pm 0,8	2,0 \pm 0,4 §	3,8 \pm 0,5 *
Renale K ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	8,1 \pm 1,2	8,6 \pm 1,0	6,1 \pm 0,9	9,1 \pm 0,6 *
Renale Ca ²⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	0,2 \pm 0,04	0,2 \pm 0,02	0,18 \pm 0,05	0,22 \pm 0,06
Renale Cl ⁻ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	6,3 \pm 1,0	5,6 \pm 0,6	3,1 \pm 0,5 §	5,9 \pm 0,6 *
Renale Harnstoff-Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	29,5 \pm 3,8	30,1 \pm 2,9	26,4 \pm 3,9	33,9 \pm 2,6 *
Freiwasser-Clearance (µl/min/kg KG)	-14 \pm 0,02	-14 \pm 0,02	-79 \pm 0,01 §	-101 \pm 0,01 * §
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	1607 \pm 108	1933 \pm 174	2046 \pm 146 §	1707 \pm 118 *
n	9	9	9	9

Nach der 5-stündigen Durstperiode (Zeitintervall „5 h“) gab es ebenfalls keine Unterschiede in den metabolischen Parametern beider Behandlungsgruppen. Zu erkennen war aber, dass unter Wasserentzug vor Behandlung die Nahrungsaufnahme und damit die Fäzesmenge sanken. Aus der Tabelle 19, der Abbildung 43 und der Abbildung 44 ist zu sehen, dass sich die Urinflussraten, die Freiwasser-Clearance und die Kreatinin-Clearance (GFR) verminderten, wohingegen die Osmolalität des Urins anstieg. Außerdem sank die renale Ausscheidung von K^+ und Harnstoff.

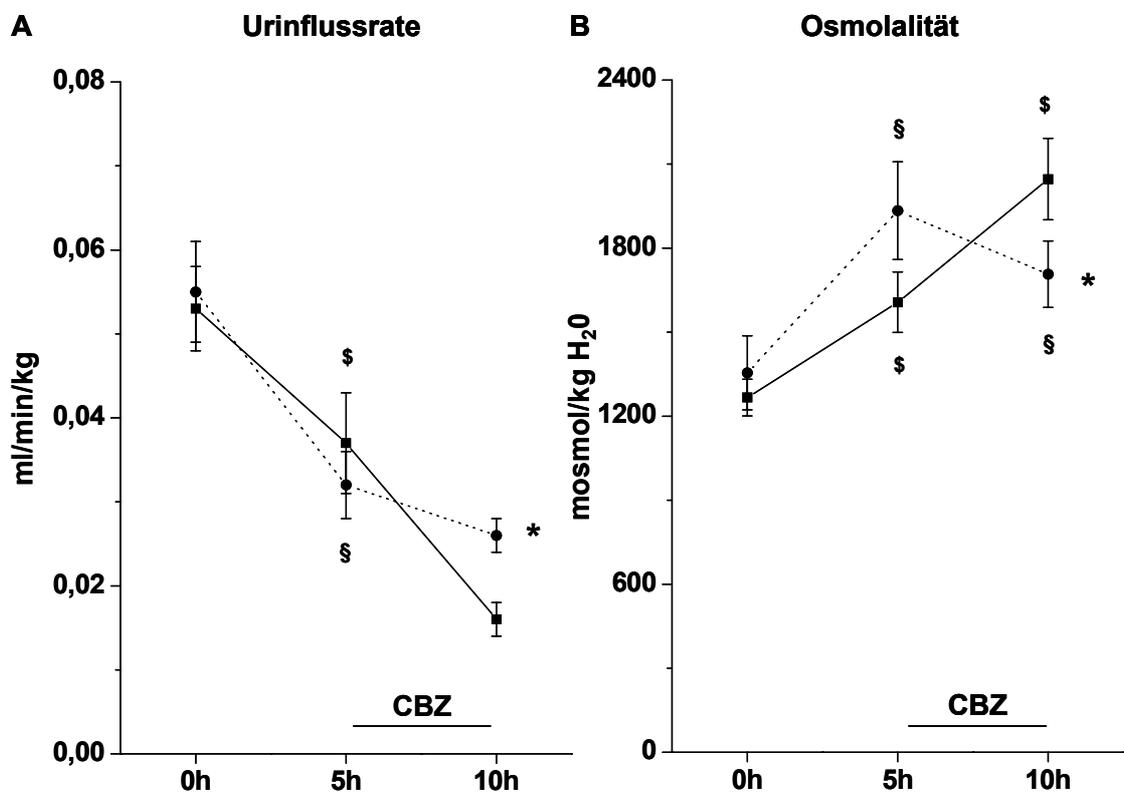


Abbildung 43:

Urinflussrate (A) und Urinosmolalität (B) vor (0 h), nach 5-stündiger (5 h) und nach 10-stündiger Wasserrestriktion (10 h). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen. § $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe (gestrichelte Linie, $n=9$), § $p < 0,05$ innerhalb der CBZ-Gruppe (gepunktete Linie, $n=9$).

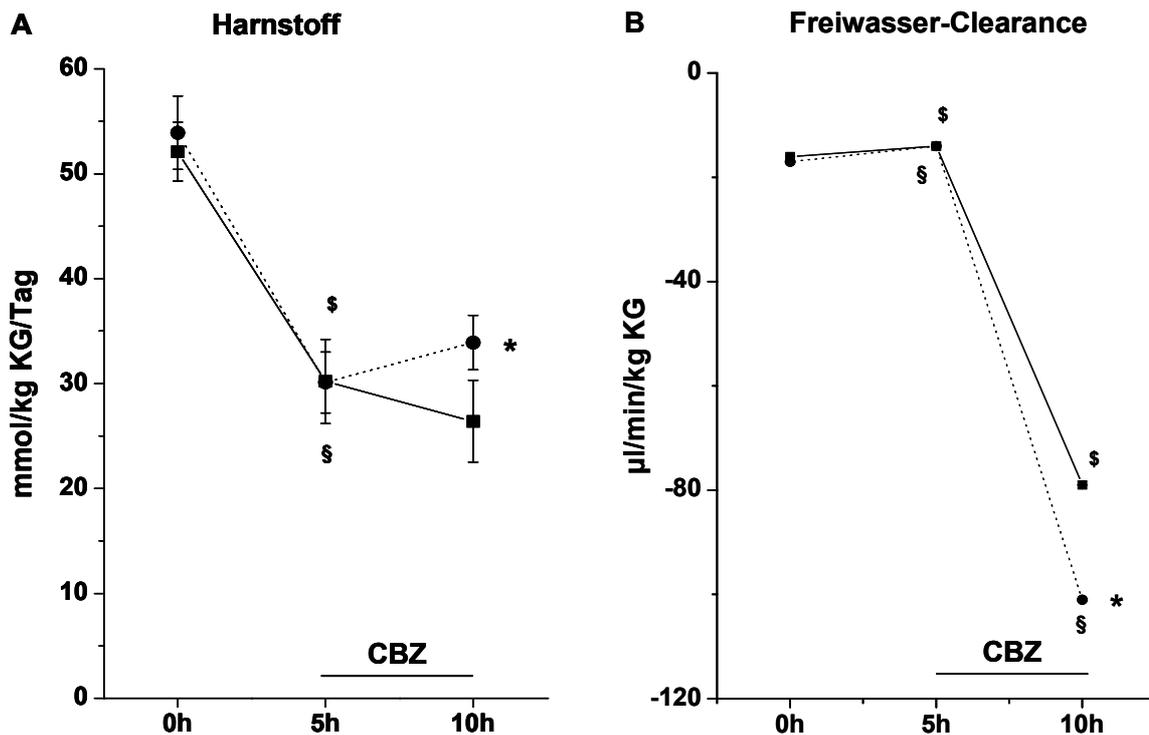


Abbildung 44:

Renale Harnstoffausscheidung (A) und Freiwasser-Clearance (B) vor (0 h), nach 5-stündiger (5 h) und nach 10-stündiger Wasserrestriktion (10 h). Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen. § $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe (getrichelte Linie, n=9), § $p < 0,05$ innerhalb der CBZ-Gruppe (gepunktete Linie, n=9).

Nach der Applikation von 2% Tylose oder CBZ (50 mg/kg KG) und der fortlaufenden Durstperiode von weiteren 5 h (Zeitintervall „5-10 h“) war auffallend, dass die Kontrolltiere ihre Urinflussrate um die Hälfte senkten und die Osmolalität ihres Urins deutlich steigerten. Die CBZ-Tiere waren nicht in der Lage, ihren Wasserhaushalt an die zunehmende Durstperiode anzupassen (siehe Abbildung 43), obwohl sie renal vermehrt Harnstoff ausschieden (siehe Abbildung 44).

Die renalen Ausscheidungen von Na^+ , K^+ , Cl^- und Harnstoff waren am Ende des Experimentes zwischen den Kontrolltieren und den CBZ-Tieren verschieden (siehe Abbildung 45 und Abbildung 44). CBZ verminderte die Fähigkeit zur Elektrolytretention unter Wasserrestriktion und führte zu weit negativeren Werten der Freiwasser-Clearance (siehe Abbildung 44).

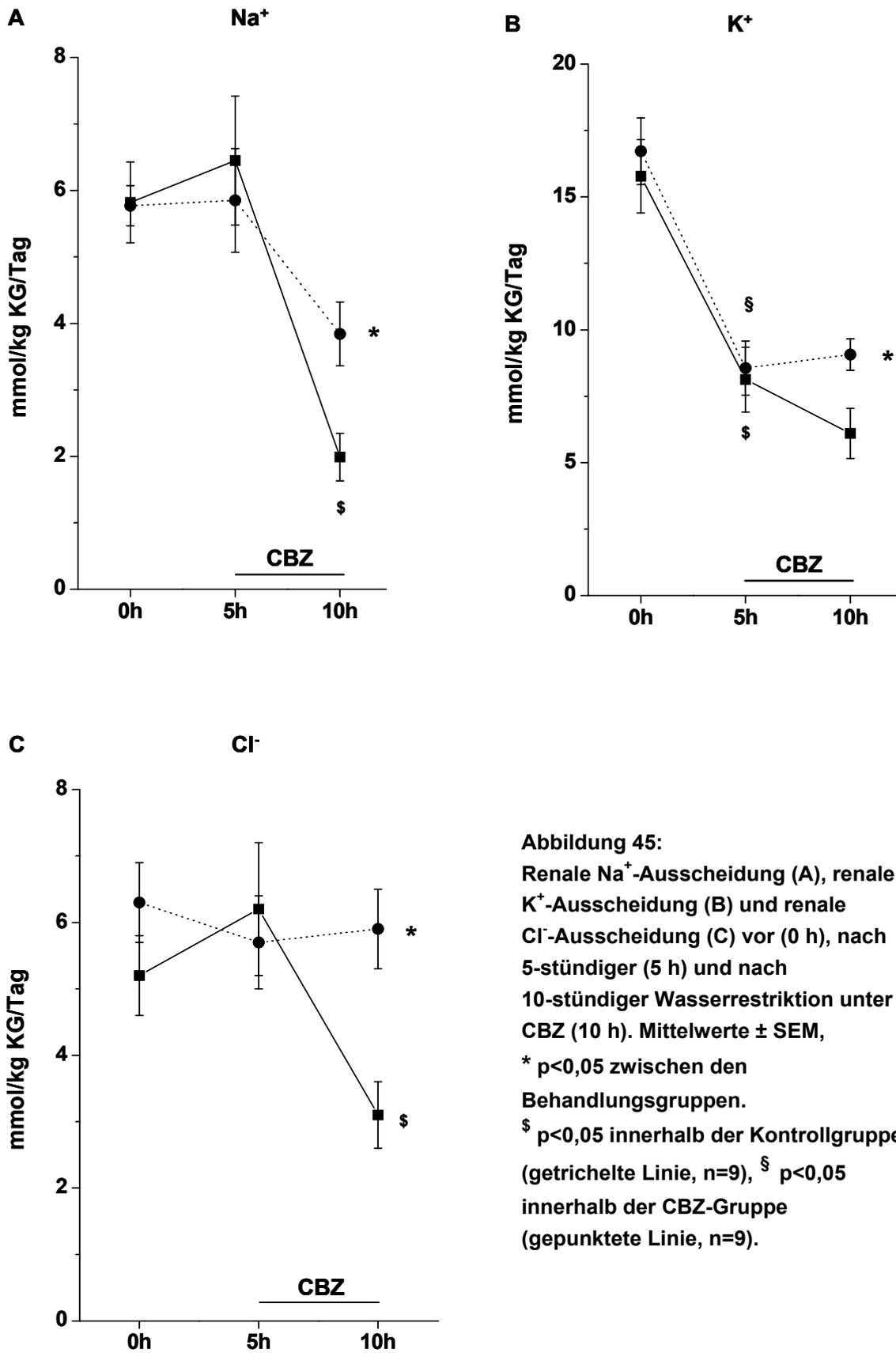


Abbildung 45:
 Renale Na⁺-Ausscheidung (A), renale K⁺-Ausscheidung (B) und renale Cl⁻-Ausscheidung (C) vor (0 h), nach 5-stündiger (5 h) und nach 10-stündiger Wasserrestriktion unter CBZ (10 h). Mittelwerte ± SEM, * p<0,05 zwischen den Behandlungsgruppen. \$ p<0,05 innerhalb der Kontrollgruppe (getrichelte Linie, n=9), § p<0,05 innerhalb der CBZ-Gruppe (gepunktete Linie, n=9).

In den ersten 5 h der Wasserrestriktion reduzierte sich die Kreatinin-Clearance (GFR) sowohl bei den Kontrolltieren ($7,9 \pm 0,6$ ml/min/kg KG vs. $4,6 \pm 0,6$ ml/min/kg KG) als auch innerhalb der CBZ-Behandlungsgruppe ($8,3 \pm 0,5$ ml/min/kg KG vs. $4,5 \pm 0,5$ ml/min/kg KG, siehe Abbildung 46)

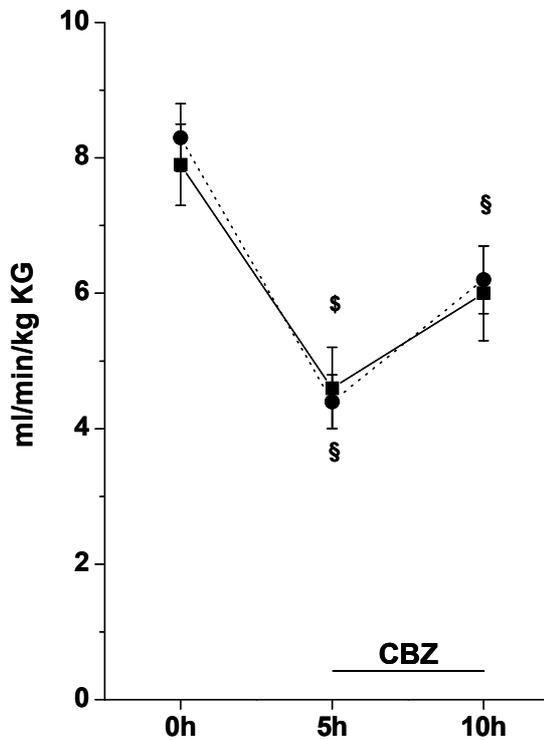


Abbildung 46:
 Kreatinin-Clearance vor (0 h), nach 5-stündiger (5 h) und nach 10-stündiger Wasser-restriktion (10 h) unter CBZ. Mittelwerte \pm SEM. \$ $p < 0,05$ innerhalb der Kontrolltiergruppe (getrichelte Linie, n=9), § $p < 0,05$ innerhalb der CBZ-Gruppe (gepunktete Linie, n=9).

Im Verlauf der Versuchsperiode stieg die Kreatinin-Clearance in beiden Gruppen wieder und es ergab sich kein Unterschied durch die Behandlung mit CBZ. Im Endeffekt blieb die Kreatinin-Clearance (GFR) aber zwischen den beiden Behandlungsgruppen unter allen Versuchsbedingungen gleich (siehe Tabelle 19 und Abbildung 46).

Die Plasmawerte der Kontroll- und CBZ-Tiere am Ende des Versuchs waren hinsichtlich der Parameter pH, pO_2 , pCO_2 , HCO_3^- sowie Hämatokrit gleich (siehe Tabelle 20).

Bei den CBZ-Tieren war die Plasmaosmolalität ($337,1 \pm 1,9$ mosmol/kg H_2O vs. $329,9 \pm 2,2$ mosmol/kg H_2O) erhöht (siehe Tabelle 20). Die erhöhte Plasmaosmolalität ist nicht durch einen Anstieg einzelner Osmolyte wie Na^+ , Cl^- , HCO_3^- oder Harnstoff verursacht worden. Die CBZ-

Ergebnisse

Konzentration im Plasma der Ratten lag mit $13,9 \pm 1,3 \mu\text{g/ml}$ im oberen therapeutischen Bereich.

Tabelle 20:

Vergleich der Plasmaparameter von Kontrolltieren (K, n=9) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=9) am Ende des Experimentes. Mittelwerte \pm SEM, (n) Anzahl der Tiere, * $p < 0,05$ zwischen den beiden Gruppen.

Parameter	K	CBZ
pH	$7,5 \pm 0,02$ (8)	$7,5 \pm 0,01$
pO ₂ (mmHg)	$56,5 \pm 5,6$ (8)	$59,6 \pm 7,7$
pCO ₂ (mmHg)	$42,1 \pm 2,0$ (8)	$41,9 \pm 1,3$
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	$29,5 \pm 0,6$ (8)	$28,9 \pm 0,7$
Hämatokrit (%)	$39,3 \pm 0,7$	$40,0 \pm 0,8$
Na ⁺ (mmol/l)	$143,0 \pm 0,7$	$142,5 \pm 0,7$
K ⁺ (mmol/l)	$4,0 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,1$
Ca ²⁺ (mmol/l)	$2,7 \pm 0,03$	$2,7 \pm 0,03$
Cl ⁻ (mmol/l)	$100,0 \pm 0,6$	$99,9 \pm 0,4$
Glukose (mmol/l)	$187 \pm 7,3$	$192,9 \pm 3,5$
Harnstoff (mmol/l)	$6,1 \pm 0,3$	$6,0 \pm 0,3$
CBZ ($\mu\text{g/ml}$)	Nicht nachweisbar	$13,9 \pm 1,3$
Kreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	$25,8 \pm 0,7$	$25,6 \pm 0,8$
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	$329,9 \pm 2,2$	$337,1 \pm 1,9$ *
n	9	9

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die Ratten sich innerhalb der ersten 5 h der Wasserrestriktion nicht unterschieden. Die Tiere passten sich der Situation an, indem sie ihren Urinfluss, die GFR

(Kreatinin-Clearance) und damit ihre Urinausscheidung verminderten. Gleichzeitig erhöhten sie die Urinosmolalität und verminderten die renale Ausscheidung von Na^+ , K^+ und Harnstoff. Erst unter der oralen Applikation von 2% Tylose oder CBZ (50 mg/kg KG) zeigten sich Unterschiede in den untersuchten metabolischen Parametern. Während die Kontrolltiere sowohl ihren Urinfluss und als auch ihre renale Na^+ -Ausscheidung weiter minimierten, war dies den mit CBZ-behandelten Tieren nur eingeschränkt möglich. Ihr Urinfluss wurde nicht weiter reduziert und die renalen Elektrolytverluste von Na^+ , K^+ und Cl^- blieben wie die Freiwasser-Clearance im Vergleich zu den Kontrolltieren erhöht. Die renale Elektrolytausscheidung von Ca^{2+} war durch die CBZ-Behandlung nicht gestört. In Bezug auf die Plasmaparameter fiel erneut die erhöhte Plasmaosmolalität auf.

3.2.3 Der Einfluss einer 4-tägigen CBZ-Behandlung unter Wasserbelastung

Um zu überprüfen, wie die Wirkung von CBZ unter diuretischen Bedingungen ausfallen würde, wurde in einem weiteren Versuch eine akute Wasserbelastung (12 ml/kg KG, po.) an den Tieren durchgeführt. Die Tabelle 21 zeigt, dass sich die Tiere beider Behandlungsgruppen an Tag 0 in den Ausgangsparametern (Futter-, Trink-, Urin- und Kotmengen) nicht unterschieden.

Eine finale Blutabnahme am Ende des Versuchs (Tag 5) zeigte in Bezug auf die untersuchten Plasmaparameter keine Unterschiede zwischen den Kontrollieren (n=5) und den CBZ-Tieren (n=5) (siehe Tabelle 22).

Tabelle 21:

Vergleich der Futter-, Trink-, Urin- und Kotmengen von Kontrolltieren (K, n=5) und CBZ-Tieren (CBZ, n=5) an „Tag 0“. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Parameter	K	CBZ
Futtermenge (g/Tag)	19,9 \pm 1,9	18,4 \pm 1,2
Trinkmenge (ml/Tag)	27,9 \pm 3,9	31,7 \pm 2,7
Urinmenge (ml/Tag)	13,0 \pm 3,8	16,6 \pm 1,7
Kotmenge (g/Tag)	7,4 \pm 1,3	5,5 \pm 0,6
n	5	5

Tabelle 22:

Vergleich der Plasmaparameter von Kontrolltieren (K, n=5) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=5) am Ende des Experimentes (Tag 5). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Parameter	K	CBZ
Na ⁺ (mmol/l)	140,96 \pm 0,52	138,44 \pm 2,08
K ⁺ (mmol/l)	3,32 \pm 0,06	3,31 \pm 0,20
Ca ²⁺ (mmol/l)	2,43 \pm 0,01	2,36 \pm 0,04
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	308,8 \pm 1,23	308,2 \pm 1,92
n	5	5

Die Applikation von CBZ führte am 1. Tag zu einer diuretischen Wirkung (siehe Abbildung 47 A). Auch am 2. Tag war die Harnflussrate bei den CBZ-Tieren höher als in der Kontrolltiergruppe. Dementsprechend war die Urinosmolalität bei den CBZ-Tieren niedriger und blieb bis zum Ende des Versuchs geringer als die der Kontrolltiere (siehe Abbildung 47 B).

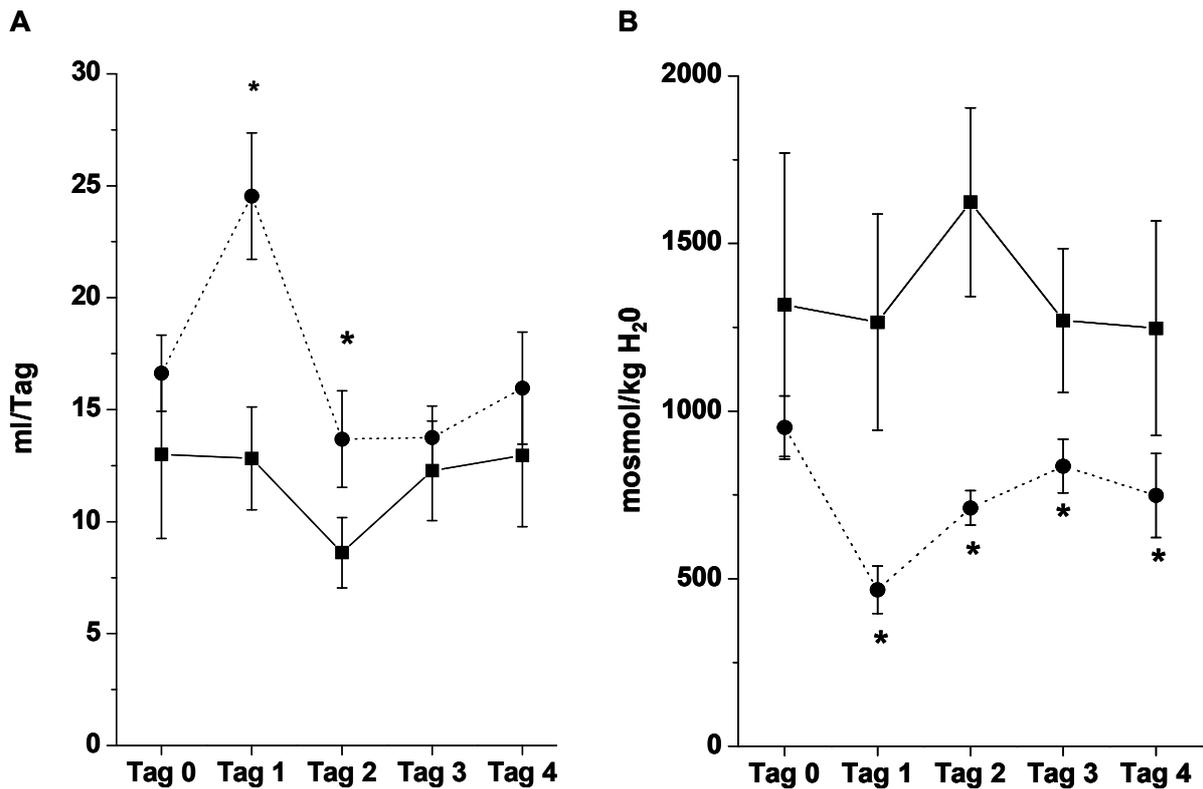


Abbildung 47:

Urinmenge (A) und Urinosmolalität (B) vor (Tag 0, 24 h-Intervall) und während der CBZ-Behandlung (Tag 1-4, 50 mg/kg KG/Tag, 21 h-Intervall). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen. Kontrolle (gestrichelte Linie, $n=5$), CBZ (gepunktete Linie, $n=5$). Orale Wasserbelastung (12 ml/kg KG/Tag) an Tag 1 und an Tag 4.

Im Folgenden werden die Ergebnisse nach der ersten Wasserbelastung (Tag 1) beschrieben. Zur vereinfachten Darstellung der Urinmenge, des Urinflusses und der Urinflussrate unter dem Einfluss einer Wasserbelastung und CBZ zeigen die Ergebnisse Werte, die 2 h, 5 h und 21 h nach der Volumenbelastung gemessen wurden. Die renalen und fäkalen Elektrolytauscheidung wurden als „0-5 h“ und „5-21 h“-Intervalle nach der Wasserbelastung unter CBZ dargestellt (siehe Tabelle 25).

In Abbildung 48 sind die Urinmengen an Tag 1 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Kontrolltiere 21 h nach der Wasserbelastung (12 ml/kg KG) $12,8 \pm 2,5$ ml und die CBZ-Tiere $24,5 \pm 2,8$ ml Urin produzierten. Die Diurese war bei den CBZ-Tieren schon nach 2 h höher als bei den

Kontrolltieren ($5,5 \pm 0,6$ ml vs. $1,0 \pm 0,5$ ml) und blieb auch nach 5 h mit $8,3 \pm 0,7$ ml höher als die der Kontrolltiere ($2,4 \pm 0,5$ ml).

Deutlich wurde auch, dass die Kontrolltiere durch die orale Wasserbelastung von 12 ml/kg KG nicht stark beeinflusst wurden, denn sie schieden im Vergleich zum Vortag ($13 \pm 3,8$ ml/24 h, Tag 0) durch die Volumenbelastung nicht mehr Urin aus. Die CBZ-Tiere schieden vor der Behandlung am Tag 0 eine Urinmenge von $16,6 \pm 1,7$ ml/24 h aus.

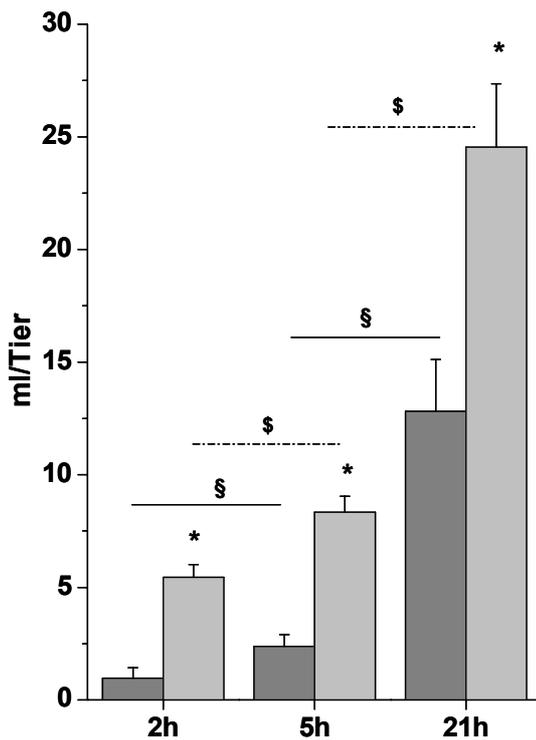


Abbildung 48:
Urinmengen nach der ersten Wasserbelastung (Tag 1).
Mittelwerte \pm SEM .
*** $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen,**
§ $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe (grau, $n=5$),
innerhalb der CBZ-Gruppe (hellgrau, $n=5$). Orale Wasserbelastung (12ml/kg KG).

Die aus den Urinmengen berechneten Harnflussraten sowie die Osmolalitäten der Urinproben sind in Abbildung 49 dargestellt. Die mit CBZ-behandelten Tiere zeigten unter Wasserbelastung eine deutliche Diurese und eine entsprechend niedrige Urinosmolalität.

Dieser Unterschied in der Konzentrierung des Urins blieb zwischen den Behandlungsgruppen auch nach 21 h erhalten.

Das Trinkverhalten war zwischen Kontroll- und CBZ-Tieren nicht verschieden ($24 \pm 2,5$ ml/Tag vs. $30 \pm 3,2$ ml/Tag). Die Kontrolltiere wiesen über den gesamten Zeitraum von 2 h, 5 h und 21 h nach der Wasserbelastung eine kontinuierliche Urinflussrate auf (siehe Abbildung 49).

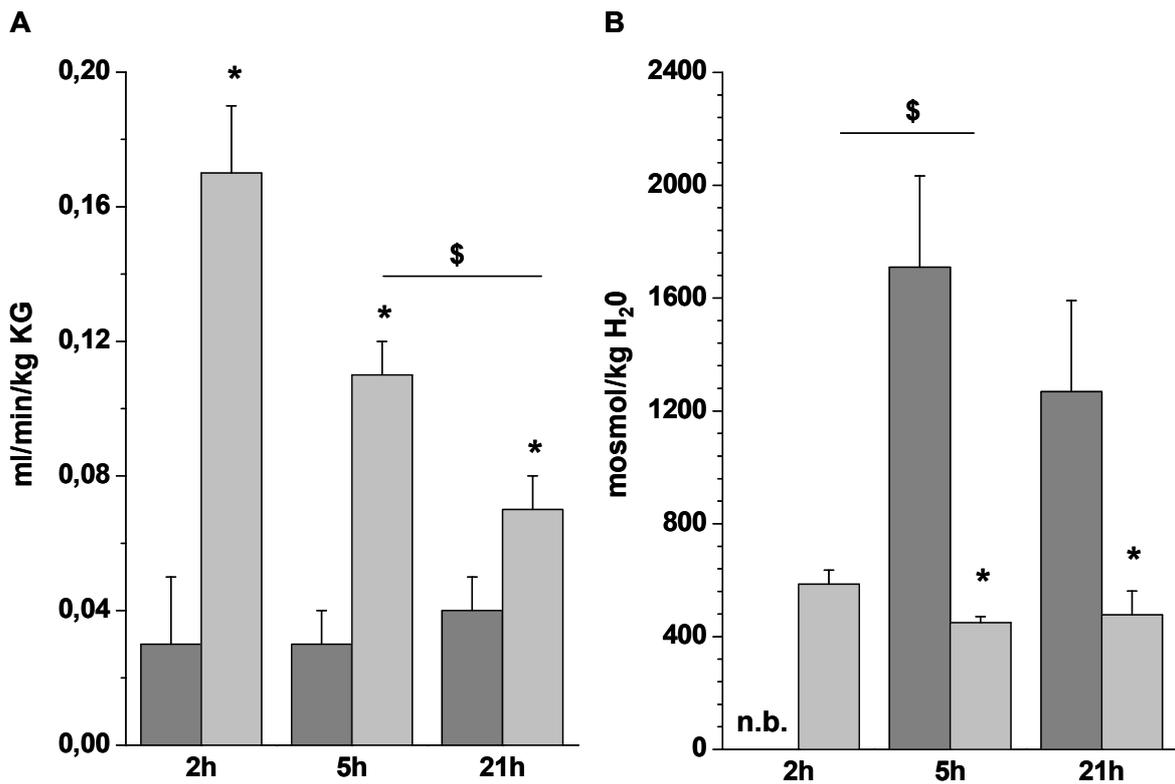


Abbildung 49:

Urinflussrate (A) und Urinosmolalität (B) nach der ersten Wasserbelastung (Tag 1) in den verschiedenen Urinsammelperioden. Mittelwerte \pm SEM. In (B) ist kein 2 h-Wert für die Kontrolltiere vorhanden. * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen. $^{\$}$ $p < 0,05$ innerhalb der Kontrollgruppe (grau, $n=5$), $^{\$}$ innerhalb der CBZ-Gruppe (hellgrau, $n=5$). Orale Wasserbelastung (12 ml/kg KG).

Die Diurese in den Behandlungsgruppen war begleitet von einer verstärkten Ausscheidung von Na^+ und Ca^{2+} über die ersten 5 h nach der Volumenbelastung. Tabelle 23 und Abbildung 50 zeigen die Werte der renalen Elektrolytausscheidungen 5 h und 21 h nach der Wasserbelastung der Tiere. Nach 21 h war die Ca^{2+} -Ausscheidung wieder ausgeglichen, während die von Na^+ und K^+ nach diesem Zeit sogar niedriger waren als in der Kontrollgruppe.

Ergebnisse

Tabelle 23:

Vergleich der Messparameter von Kontrolltieren (K, n=5) und CBZ-Tieren (CBZ, n=5) 5 h und 21 h nach der Wasserbelastung an Tag 1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. KG (Körpergewicht). * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen, $^{\$}$ $p < 0,05$ innerhalb der Gruppen.

Parameter	K (5 h)	CBZ (5 h)	K (21 h)	CBZ (21 h)
Urinmenge (ml)	2,4 \pm 0,5	8,3 \pm 0,7 *	12,8 \pm 2,3 $^{\$}$	24,5 \pm 2,8 *
Urinflussrate (ml/min/kg KG)	0,03 \pm 0,01	0,11 \pm 0,01 *	0,04 \pm 0,01	0,07 \pm 0,01 * $^{\$}$
Urinomolalität (mosmol/kg H ₂ O)	1710 \pm 497,5	449,2 \pm 21,7 *	1268,1 \pm 322,9	476,7 \pm 84,7 *
Kreatinin-Clearance (ml/min/kg KG)	4,6 \pm 0,6	4,6 \pm 0,3	3,8 \pm 0,4	2,8 \pm 0,2 * $^{\$}$
n	5	5	5	5

Interessanterweise fiel die Kreatinin-Clearance im Beobachtungszeitraum von 21 h in der CBZ-Gruppe deutlich ab.

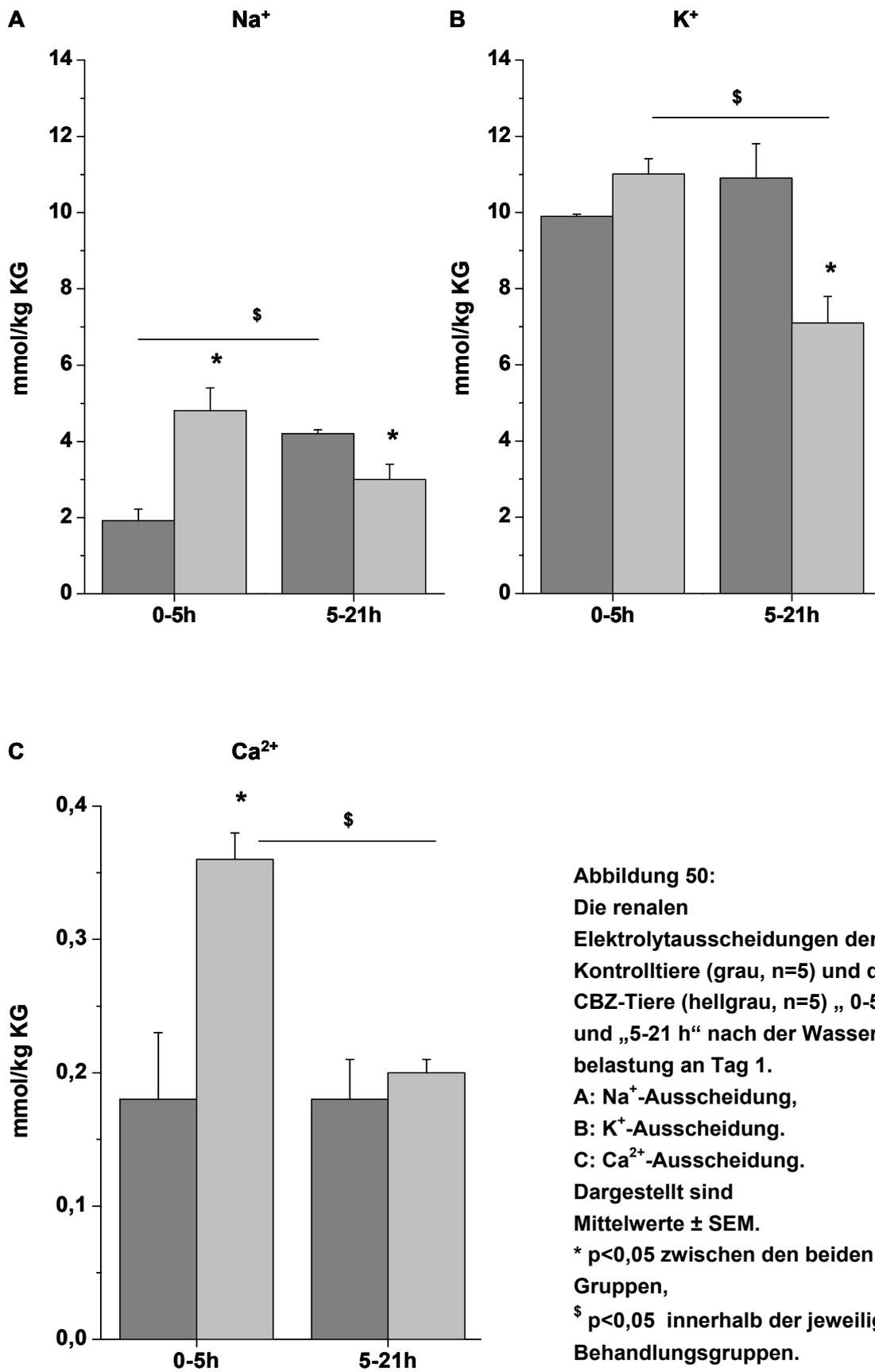


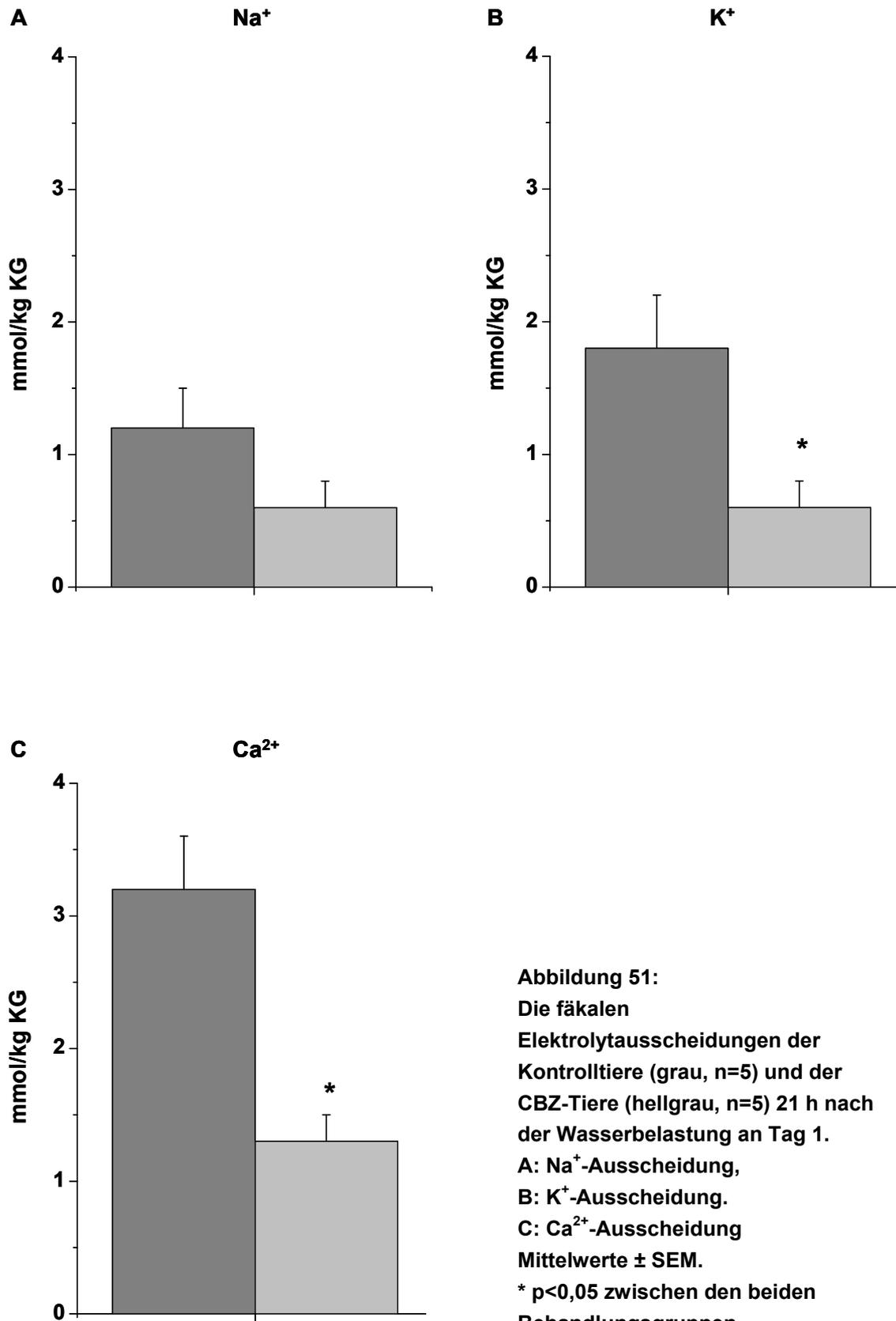
Abbildung 50:
 Die renalen
 Elektrolytausscheidungen der
 Kontrolltiere (grau, n=5) und der
 CBZ-Tiere (hellgrau, n=5) „0-5 h“
 und „5-21 h“ nach der Wasser-
 belastung an Tag 1.
A: Na⁺-Ausscheidung,
B: K⁺-Ausscheidung.
C: Ca²⁺-Ausscheidung.
 Dargestellt sind
 Mittelwerte ± SEM.
 * p<0,05 zwischen den beiden
 Gruppen,
 § p<0,05 innerhalb der jeweiligen
 Behandlungsgruppen.

Tabelle 24:

Vergleich der Elektrolytausscheidungen von Kontrolltieren (K, n=5) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=5) 5 h (0-5 h) und 21 h (5-21 h) nach der Wasserbelastung an Tag 1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, KG (Körpergewicht). * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen, $^{\$}$ $p < 0,05$ innerhalb der Gruppen.

Parameter	K (0-5 h)	CBZ (0-5 h)	K (5-21 h)	CBZ (5-21 h)
Renale Na ⁺ - Ausscheidung (mmol/kg KG)	1,9 \pm 0,3	4,8 \pm 0,6 *	4,2 \pm 0,1 $^{\$}$	3,0 \pm 0,4 *
Renale K ⁺ - Ausscheidung (mmol/kg KG)	9,9 \pm 1,9	11,0 \pm 0,4	10,9 \pm 0,9	7,1 \pm 0,7 * $^{\$}$
Renale Ca ²⁺ - Ausscheidung (mmol/kg KG)	0,2 \pm 0,05	0,4 \pm 0,02 *	0,2 \pm 0,03	0,2 \pm 0,01 $^{\$}$
Fäkale Na ⁺ - Ausscheidung (mmol/kg KG)	Kein Wert	Kein Wert	1,2 \pm 0,3	0,6 \pm 0,2
Fäkale K ⁺ - Ausscheidung (mmol/kg KG)	Kein Wert	Kein Wert	1,8 \pm 0,4	0,6 \pm 0,2 *
Fäkale Ca ²⁺ - Ausscheidung (mmol/kg KG)	Kein Wert	Kein Wert	3,2 \pm 0,4	1,3 \pm 0,2 *
n	5	5	5	5

Aus der Abbildung 50 und aus der Abbildung 51 ist zu erkennen, dass die CBZ-Tiere ihre renalen Elektrolytverluste in den ersten 5 h nach der Volumenbelastung (0-5 h-Intervall) zum einen durch eine Reduktion der renalen Ausscheidungen in den nachfolgenden Stunden (5-21 h) und zum anderen über die verminderten fäkalen Elektrolytausscheidungen kompensierten.



Ergebnisse

Die Elektrolytbilanzen, d.h. die Aufnahme von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} durch Trinkwasser und Futter und deren Ausscheidungen über den Urin und den Stuhl, wurden ebenfalls zur Beurteilung des Elektrolythaushaltes berechnet (siehe Tabelle 25).

Tabelle 25:
Bilanzen des Elektrolythaushaltes von Kontrolltieren (K, n=5) und CBZ-Tieren (CBZ, n=5) 21 h nach der Wasserbelastung an Tag 1. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen.

Parameter	Behandlungs- gruppe	Na^+	K^+	Ca^{2+}
Aufnahme (mmol/Tag):	K	1,83 \pm 0,09	4,04 \pm 0,21	4,38 \pm 0,22
	CBZ	1,07 \pm 0,16 *	2,34 \pm 0,37 *	2,58 \pm 0,39 *
Ausscheidung (mmol/Tag):	K	1,37 \pm 0,08	3,23 \pm 0,34	0,86 \pm 0,10
	CBZ	0,92 \pm 0,13 *	2,02 \pm 0,17 *	0,38 \pm 0,04 *
Bilanz (mmol/Tag):	K	0,46 \pm 0,12	0,81 \pm 0,45	3,53 \pm 0,17
	CBZ	0,15 \pm 0,11	0,32 \pm 0,25	2,20 \pm 0,37 *

Die Bilanzierung der Elektrolyte zeigte, dass sowohl die renale als auch die intestinale Elektrolytkompensation im Beobachtungszeitraum ausreichte, um die Tiere ohne Elektrolytstörungen (Na^+ und K^+) aus der Behandlung hervorgehen zu lassen. Lediglich in der Ca^{2+} -Bilanzierung wiesen die CBZ-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren ein Kompensationsdefizit auf (siehe Tabelle 25).

Die Ergebnisse des gesamten Experimentes (Tag 0 bis Tag 4) zeigten auf, dass die Trinkmengen zwischen den Kontrolltieren und den CBZ-Tieren unverändert blieben (20-30 ml/Tag), die Futtermengen bei den CBZ-Tieren jedoch erniedrigt waren (10-12 g/Tag vs. 14-17 g/Tag).

Die Urinmengen der CBZ-Tiere waren an Tag 1 und Tag 2 fast doppelt so hoch wie die der Kontrolltiere und wiesen im Gegensatz zu den Kontrolltieren eine geringere Osmolalität (Tag 1 bis Tag 4) auf

(siehe Abbildung 49). Außerdem waren an Tag 1 und Tag 2 die renalen und fäkalen Ausscheidungen der Elektrolyte (Na^+ , K^+ und Ca^{2+}) bei den Kontrolltieren höher.

An Tag 3 und Tag 4 waren keine Unterschiede mehr in den renalen und fäkalen Ausscheidungen von Na^+ und K^+ zwischen den Behandlungsgruppen zu erkennen. Die renale und fäkale Ca^{2+} -Ausscheidung blieb mit Ausnahme des 3. Behandlungstages bei den CBZ-Tieren erniedrigt. Die Kreatinin-Clearance war vom 1. bis 3. Behandlungstag bei den CBZ-Tieren niedriger als bei den Kontrolltieren.

3.2.4 Der Einfluss einer 3-tägigen CBZ-Behandlung auf den Metabolismus der Ratte

In dieser Studie wurde zum einen der Phänotyp einer 3-tägigen CBZ-Behandlung bei einer höheren CBZ-Dosis (100 mg/kg KG/Tag) untersucht. Zum anderen wurde der Verlauf der metabolischen Parameter über die Behandlungsperiode (Tag 0 bis Tag 3) dokumentiert. Es wurden pro Behandlungsgruppe (2% Tylose bzw. CBZ) 7 Tiere eingesetzt.

Die Tiere unterschieden sich am Tag 0 (Vorkontrolle) nicht in den gemessenen metabolischen Parametern (siehe Tabelle 26).

Carbamazepin (100 mg/kg KG/Tag) führte zu keinem Unterschied in der Futtermittelaufnahme. Die CBZ-Tiere reduzierten allerdings ihre Futteraufnahme nach der 1. und 2. CBZ-Behandlung um ca. 60%, wobei sie vom 2. auf den 3. Behandlungstag ihre Futteraufnahme wieder um 34% erhöhten. Am 3. Behandlungstag bestand kein Unterschied im Fressverhalten mehr zwischen den CBZ-Tieren und den Kontrolltieren (siehe Abbildung 52B).

Die CBZ-Therapie führte zu keiner Änderung im Trinkverhalten (siehe Tabelle 26 und Abbildung 52A).

Tabelle 26:

Vergleich der Futter-, Trink-, Urin- und Kotmengen von Kontrolltieren (K, n=7) und CBZ-Tieren (CBZ, n=7) vor (Tag 0) und nach 3-tägiger CBZ-Behandlung (Tag 3). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen.

Parameter	Tag 0 K	Tag 0 CBZ	Tag 3 K	Tag 3 CBZ
Futtermenge (g/Tag)	14,0 \pm 0,7	15,0 \pm 0,7	13,8 \pm 1,5	10,0 \pm 1,6
Trinkmenge (ml/Tag)	30,0 \pm 2,3	27,1 \pm 1,5	28,7 \pm 3,5	26,2 \pm 1,7
Urinmenge (ml/Tag)	18,9 \pm 2,4	17,0 \pm 1,2	14,3 \pm 2,6	9,0 \pm 1,2
Kotmenge (g/Tag)	6,6 \pm 0,7	8,1 \pm 0,7	5,2 \pm 0,7	2,2 \pm 0,7 *
n	7	7	7	7

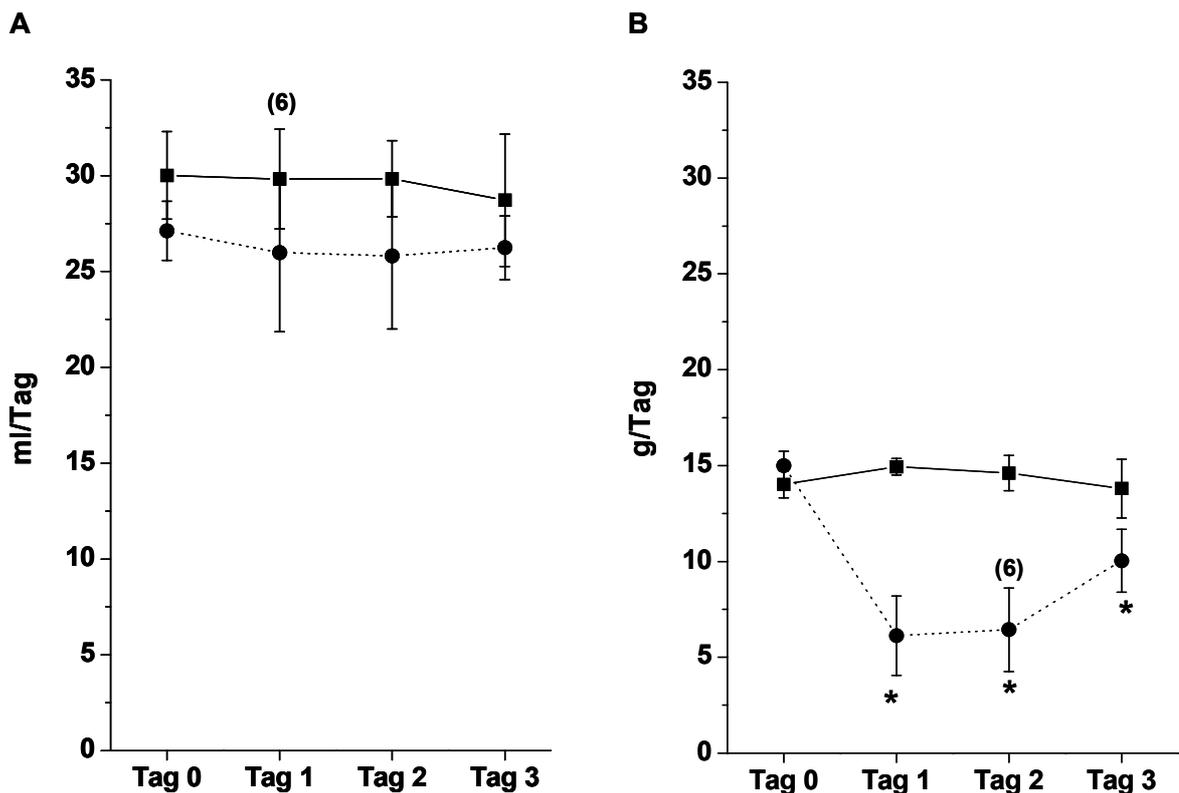


Abbildung 52:

Trinkmenge (A) und Futtermenge (B) vor (Tag 0) und während der CBZ-Behandlung (Tag 1-3, 100 mg/kg KG/Tag). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ zwischen den Gruppen. Kontrolle (gestrichelte Linie, n=7), CBZ (gepunktete Linie, n=7). (n)=abweichende Probenzahl.

Eine hochdosierte kurzzeitige Behandlung mit CBZ (100 mg/kg KG/Tag) führte weder zu einer Elektrolytstörung (z.B. Hyponatriämie) noch zu einer Veränderung der Osmolalität (siehe Tabelle 27), obwohl bereits Nebenwirkungen auf das Fressverhalten und auf die Kotmengen beobachtet werden konnten (siehe Tabelle 26 und Abbildung 52).

Eine weitere Analyse des Stoffwechsels und der Nierenfunktion zeigte jedoch bereits deutliche Wirkungen (siehe Tabelle 28 und Abbildung 53 sowie Abbildung 54).

Tabelle 27:

Vergleich der Plasmaparameter von Kontrolltieren (K, n=7) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=7) zu Beginn (Tag 0) und am nach 3-tägiger CBZ-Behandlung mit 100 mg/kg KG/Tag (Tag 3). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Parameter	Tag 0 K	Tag 0 CBZ	Tag 3 K	Tag 3 CBZ
Na ⁺ (mmol/l)	136 \pm 1,3	138 \pm 1,3	138 \pm 1,5	137 \pm 0,4
K ⁺ (mmol/l)	3,6 \pm 0,2	3,9 \pm 0,3	3,7 \pm 0,1	3,8 \pm 0,1
Ca ²⁺ (mmol/l)	3,2 \pm 0,07	3,1 \pm 0,03	3,0 \pm 0,04	3,0 \pm 0,02
pH	7,4 \pm 0,03	7,4 \pm 0,01	7,4 \pm 0,01	7,4 \pm 0,02
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	301 \pm 2,9	301 \pm 3,5	302 \pm 7,7	307 \pm 5,8
n	7	7	7	7

Die Körpergewichte der Kontroll- und der mit CBZ-behandelten Tiere vor (Tag 0) und nach Behandlung (Tag 3) wurden zu einem Mittelwert zusammengefasst und für die weiteren Berechnungen des Urinflusses, der Kreatinin-Clearance und der renalen und fäkalen Elektrolytauscheidungen verwendet. Die Kontrolltiere wogen 246 \pm 3,5 g und die CBZ-Tiere 256 \pm 4,4 g.

24 h nach der ersten Behandlung mit CBZ (Tag 1) fiel auf, dass sich die Futter- und Fäzesmengen bei den CBZ-Tieren verringert hatten (siehe Abbildung 52 und Tabelle 26). Des Weiteren reduzierten sich die Kreatinin-Clearance, die renalen Ausscheidungen für Na^+ und K^+ und die Urinosmolalität der CBZ-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Abbildung 53 und Abbildung 54). Über den Stuhl wurde vermindert Ca^{2+} ausgeschieden (siehe Abbildung 55).

Nach der zweiten Behandlung (Tag 2) blieben die Futtermenge und die Fäzesmenge der CBZ-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren verringert. Gleiches galt für die Kreatinin-Clearance, die renale Ausscheidung für Na^+ und K^+ und die Urinosmolalität. Die renale Ca^{2+} -Ausscheidung war ebenfalls bei den CBZ-Tieren reduziert. Über den Stuhl verminderte sich neben der Ca^{2+} -Ausscheidung ebenfalls die für K^+ .

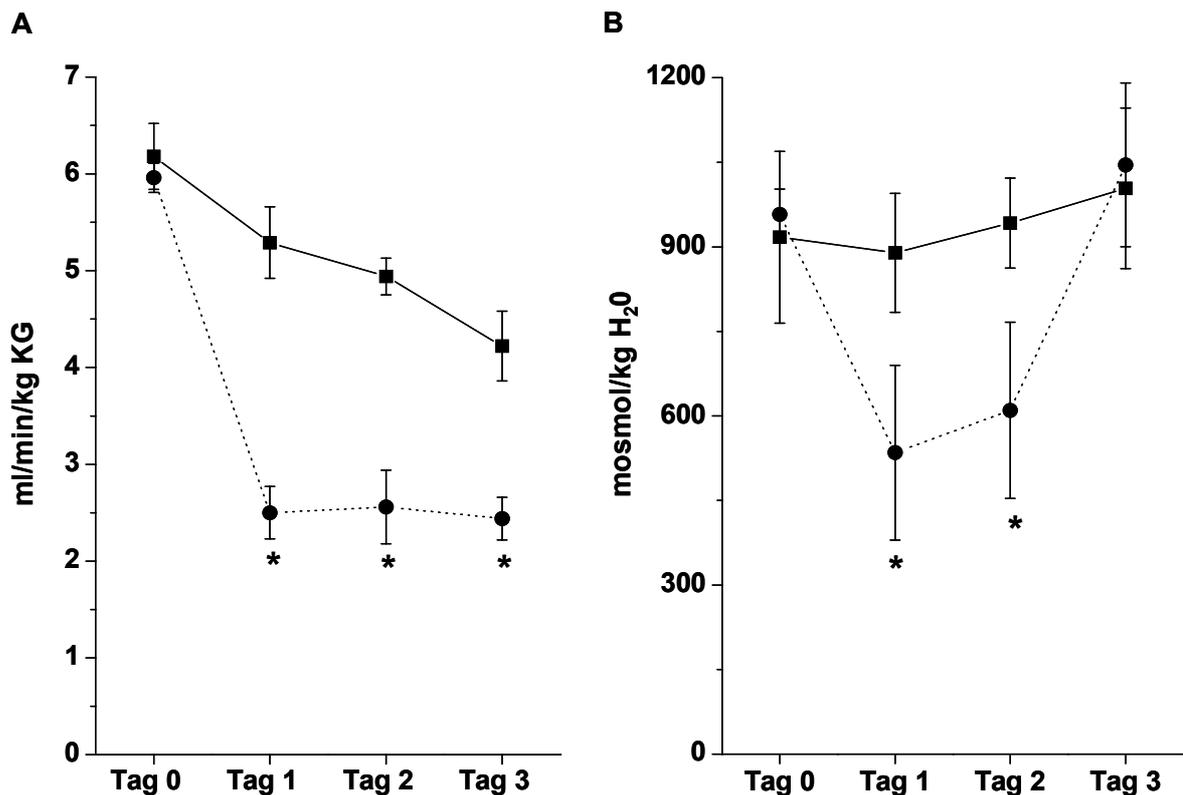


Abbildung 53:

Kreatinin-Clearance (A) und Urinosmolalität (B) vor (Tag 0) und während der CBZ-Behandlung (Tag 1-3, 100 mg/kg KG/Tag). Mittelwerte \pm SEM. * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen. Kontrolle (gestrichelte Linie, $n=7$), CBZ (gepunktete Linie, $n=7$).

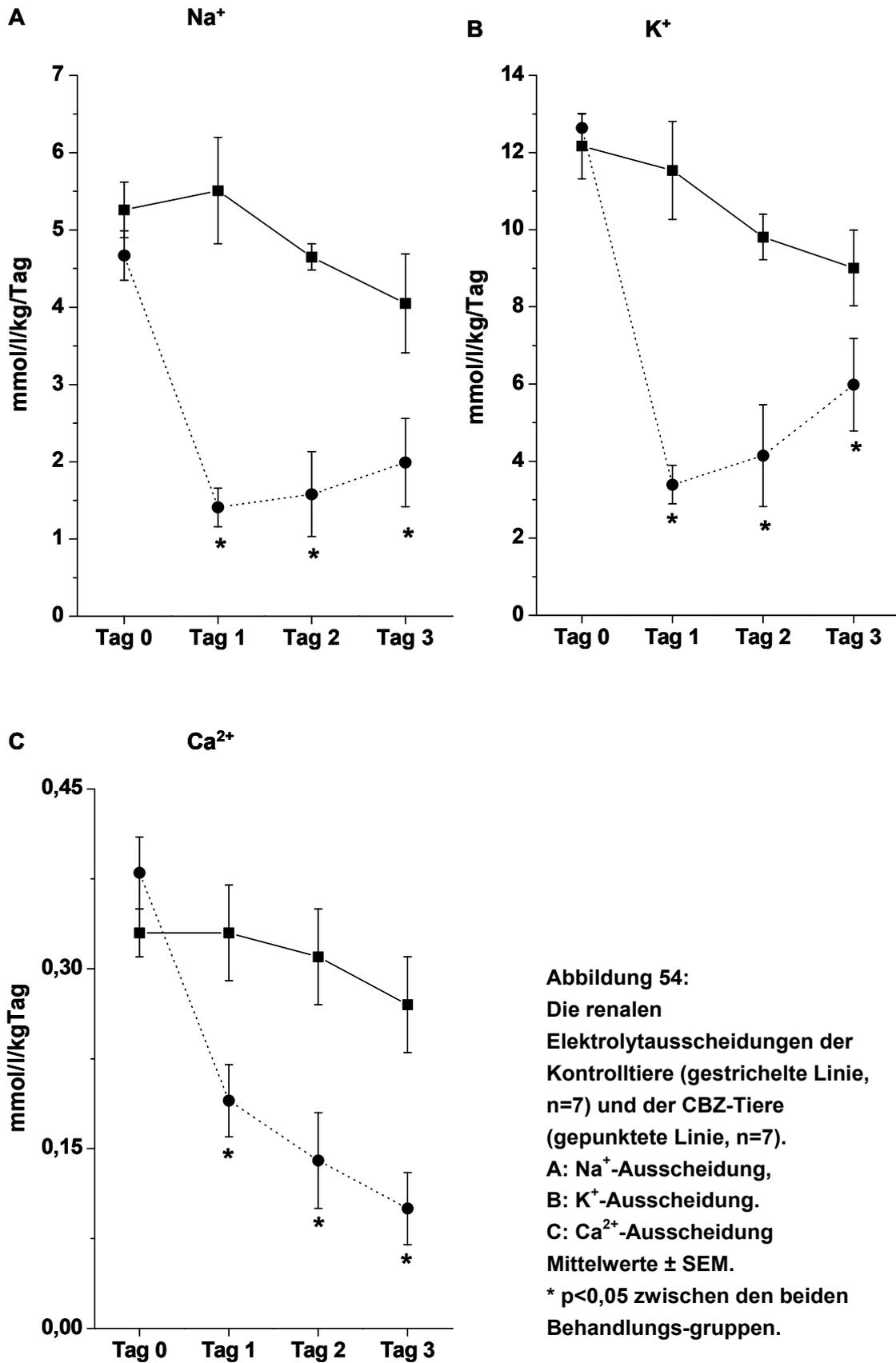


Abbildung 54:
 Die renalen
 Elektrolytausscheidungen der
 Kontrolltiere (gestrichelte Linie,
 n=7) und der CBZ-Tiere
 (gepunktete Linie, n=7).
A: Na⁺-Ausscheidung,
B: K⁺-Ausscheidung.
C: Ca²⁺-Ausscheidung
 Mittelwerte ± SEM.
 * p<0,05 zwischen den beiden
 Behandlungsgruppen.

Nach der 3. Behandlung (Tag 3) schieden die CBZ-Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren weiterhin weniger Kot aus. Die Kreatinin-Clearance, die renale Ausscheidung für Na^+ und Ca^{2+} war ebenfalls wie die fäkale Ca^{2+} -Ausscheidung in den CBZ-Tieren reduziert (siehe Abbildung 54 und Abbildung 55). Es bestand an Tag 3 kein Unterschied mehr in der Futtermenge und der Urinosmolalität.

Die fäkale Na^+ -Ausscheidung blieb von der 3-tägigen CBZ-Behandlung unbeeinflusst und blieb zwischen den beiden Behandlungsgruppen gleich (siehe Abbildung 55A). Dafür sanken die fäkalen K^+ - und Ca^{2+} -Ausscheidungen in den CBZ behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren (siehe Abbildung 55B und Abbildung 55C).

Ergebnisse

Tabelle 28:

Vergleich der Messparameter von von Kontrolltieren (K, n=7) und den mit CBZ-behandelten Tieren (CBZ, n=7) vor (Tag 0) und am Ende des Experimentes (Tag 3). Mittelwerte \pm SEM, KG (Körpergewicht). (n) Anzahl der Tiere, * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen.

Parameter	Tag 0 K	Tag 0 CBZ	Tag 3 K	Tag 3 CBZ
Urin-Kreatinin (mmol/l)	6,50 \pm 1,09 (7)	6,63 \pm 0,25 (7)	6,41 \pm 0,93 (7)	5,79 \pm 0,83 (7)
Harnfluss (ml/min/kg KG)	0,05 \pm 0,007 (7)	0,05 \pm 0,003 (7)	0,04 \pm 0,007 (7)	0,02 \pm 0,003 (7) *
Kreatinin-Clearance (ml/min/kg KG)	6,18 \pm 0,34 (7)	5,96 \pm 0,15 (7)	4,22 \pm 0,36 (7)	2,44 \pm 0,22 (7) *
Renale Na ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	5,26 \pm 0,36 (7)	4,67 \pm 0,32 (7)	4,05 \pm 0,64 (7)	1,99 \pm 0,57 (7) *
Renale K ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	12,17 \pm 0,85 (7)	12,64 \pm 0,36 (7)	9,01 \pm 0,98 (7)	5,98 \pm 1,20 (7) *
Renale Ca ²⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	0,33 \pm 0,02 (7)	0,38 \pm 0,03 (7)	0,27 \pm 0,04 (7)	0,10 \pm 0,01 (7) *
Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	917 \pm 152,44 (7)	957 \pm 45,06 (7)	1004 \pm 142,48 (7)	1046 \pm 145,07 (7)
Fäkale Na ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	0,85 \pm 0,14 (7)	1,83 \pm 0,59 (6) *	0,96 \pm 0,27 (7)	0,41 \pm 0,17 (5)
Fäkale K ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	1,82 \pm 0,51 (7)	2,05 \pm 0,53 (6)	2,25 \pm 0,60 (7)	0,51 \pm 0,22 (5) *
Fäkale Ca ²⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	2,30 \pm 0,35 (7)	2,05 \pm 0,44 (6)	1,93 \pm 0,38 (7)	0,59 \pm 0,23 (5) *

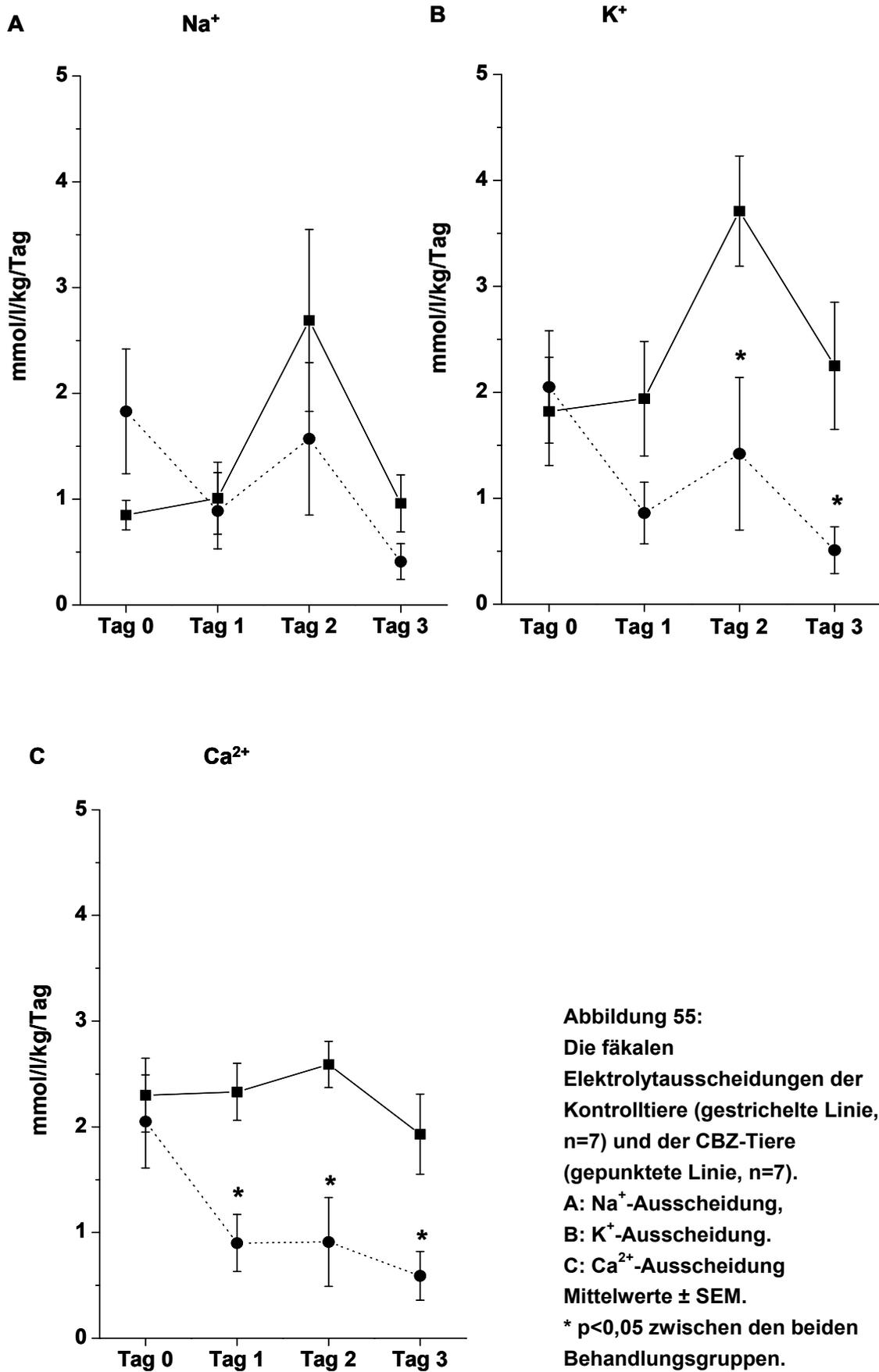


Abbildung 55:
 Die fäkalen Elektrolytausscheidungen der Kontrolltiere (gestrichelte Linie, n=7) und der CBZ-Tiere (gepunktete Linie, n=7).
 A: Na⁺-Ausscheidung,
 B: K⁺-Ausscheidung.
 C: Ca²⁺-Ausscheidung
 Mittelwerte ± SEM.
 * p<0,05 zwischen den beiden Behandlungsgruppen.

Um den Einfluss der 3-tägigen CBZ-Behandlung auf die Na⁺-Resorption im Rattenkolonepithel zu überprüfen, wurden distale Kolongewebestücken der Ratten am Ende des Versuchs (Tag 3) mit Hilfe der Ussing-Kammer Messtechnik untersucht. Die Experimente ergaben, dass es in Bezug auf das transepitheliale Potenzial (V_{te}), den transepithelialen Widerstand (R_{te}) und den daraus berechneten äquivalenten Kurzschlussstrom (I_{sc}) keine Unterschiede zwischen den Kontrolltieren (n=10 Kolongewebestücke) und den CBZ-Tieren (n=12 Kolongewebestücke) gab. Die Messwerte sind in Tabelle 29 bis Tabelle 31 aufgelistet und in Abbildung 56 graphisch dargestellt.

Tabelle 29:

Vergleich des transepithelialen Potentials (V_{te}) über das Kolonepithel zwischen Kontroll-(K, n=7) und CBZ-Tieren (CBZ, n=7) nach 3-tägiger CBZ-Behandlung (100 mg/kg KG/Tag). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der untersuchten Kolongewebe), Amilorid (50 μ M).

Experimental-Lösung	V_{te} (mV)	V_{te} (mV)
	K	CBZ
Kontrolle	-12,9 \pm 2,3	-12,0 \pm 2,1
Amilorid	-4,2 \pm 0,6	-5,1 \pm 1,0
n	10	12

Tabelle 30:

Vergleich des transepithelialen Widerstandes (R_{te}) über das Kolonepithel zwischen Kontroll-(K, n=7) und CBZ-Tieren (CBZ, n=7) nach 3-tägiger CBZ-Behandlung (100 mg/kg KG/Tag). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der untersuchten Kolongewebe), Amilorid (50 μ M).

Experimental-Lösung	R_{te} (Ω cm ²)	R_{te} (Ω cm ²)
	K	CBZ
Kontrolle	60,6 \pm 1,5	64,6 \pm 2,4
Amilorid	65,5 \pm 1,0	68,5 \pm 2,7
n	10	12

Tabelle 31:

Vergleich des äquivalenten Kurzschlussstroms (I_{sc}) über das Kolonepithel zwischen Kontroll-(K, n=7) und CBZ-Tieren (CBZ, n=7) nach 3-tägiger CBZ-Behandlung (100 mg/kg KG/Tag). Mittelwerte \pm SEM, n (Anzahl der untersuchten Kolongewebe), Amilorid (50 μ M).

Experimental-Lösung	I_{sc} (μ A/cm ²)	I_{sc} (μ A/cm ²)
	K	CBZ
Kontrolle	-220,2 \pm 42,1	-189,6 \pm 35,4
Amilorid	-64,8 \pm 8,7	-75,6 \pm 13,4
n	10	12

Aus Abbildung 56 ist zu sehen, dass die luminale Applikation von 50 μ M Amilorid zu einer Inhibition der Na⁺-Resorption in beiden Behandlungsgruppen führte und dass dieser Effekt innerhalb beider Behandlungsgruppen verschieden war. Unabhängig von der Behandlung reduzierte sich der I_{sc} bei luminaler Applikation von 50 μ M Amilorid bei den Kontrolltieren um 71% und bei den CBZ-Tieren um 60%.

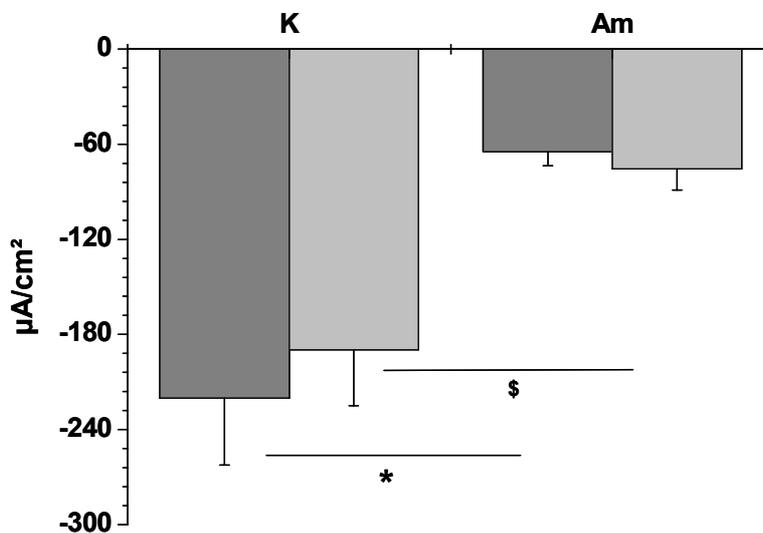


Abbildung 56:

Wirkung einer 3-tägigen CBZ-Behandlung (100 mg/kg KG/Tag) auf die luminale Na⁺-Resorption im distalen Kolon. Gezeigt ist der äquivalente Kurzschlussstrom I_{sc} . Kontrolltiere (dunkelgrau, n=10 Gewebe), CBZ-Tiere (hellgrau, n=12 Gewebe). K (Kontrolllösung), Am (Amilorid, 50 μ M). Mittelwerte \pm SEM, *, \$ p<0,05 Wirkung von Amilorid.

3.2.5 Diuretischer Effekt des V2-Antagonisten Satavaptan unter CBZ

In welchem Ausmaß die diuretische Wirkung von CBZ durch einen zentralen (ADH-Freisetzung) oder renalen Angriffspunkt bedingt ist, wurde mit Hilfe des Vasopressin (V2)-Antagonisten Satavaptan an narkotisierten Ratten untersucht. 50 mg/kg KG Carbamazepin (CBZ-Tiere, n=5) bzw. 2% Tylose (Kontrolltiere, n=4) wurde 3 h vor Beginn der Messperiode oral über eine Schlundsonde verabreicht, um eine effektive CBZ-Plasmakonzentration zu erzielen.

Zur Veranschaulichung der erhobenen Daten wurden jeweils zwei aufeinander folgenden Messperioden (15 min) zu einem Datenpunkt (30 min) zusammengefasst. Der Zeitpunkt „0 min“ bezieht sich auf die Anwesenheit von CBZ und auf die Abwesenheit von Satavaptan. Die darauf folgenden Zeitpunkte bezeichnen die Dauer der Satavaptaninfusion. Die Messparameter sind in Tabelle 32 zusammengefasst.

In Abbildung 57 A ist die Urinflussrate der Kontroll- und CBZ-Tiere dargestellt. CBZ erhöhte die Urinflussrate. Unter Satavaptan stieg die Diurese sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den mit CBZ-behandelten Tieren an. Das Maximum der Diurese war nach 90 min Satavaptaninfusion erreicht und fiel bei den CBZ-Tieren deutlich höher aus ($302 \pm 16 \mu\text{l}/\text{min}$ vs. $243 \pm 2 \mu\text{l}/\text{min}$). Schließlich erreichten beide Gruppen eine vergleichbare Diurese.

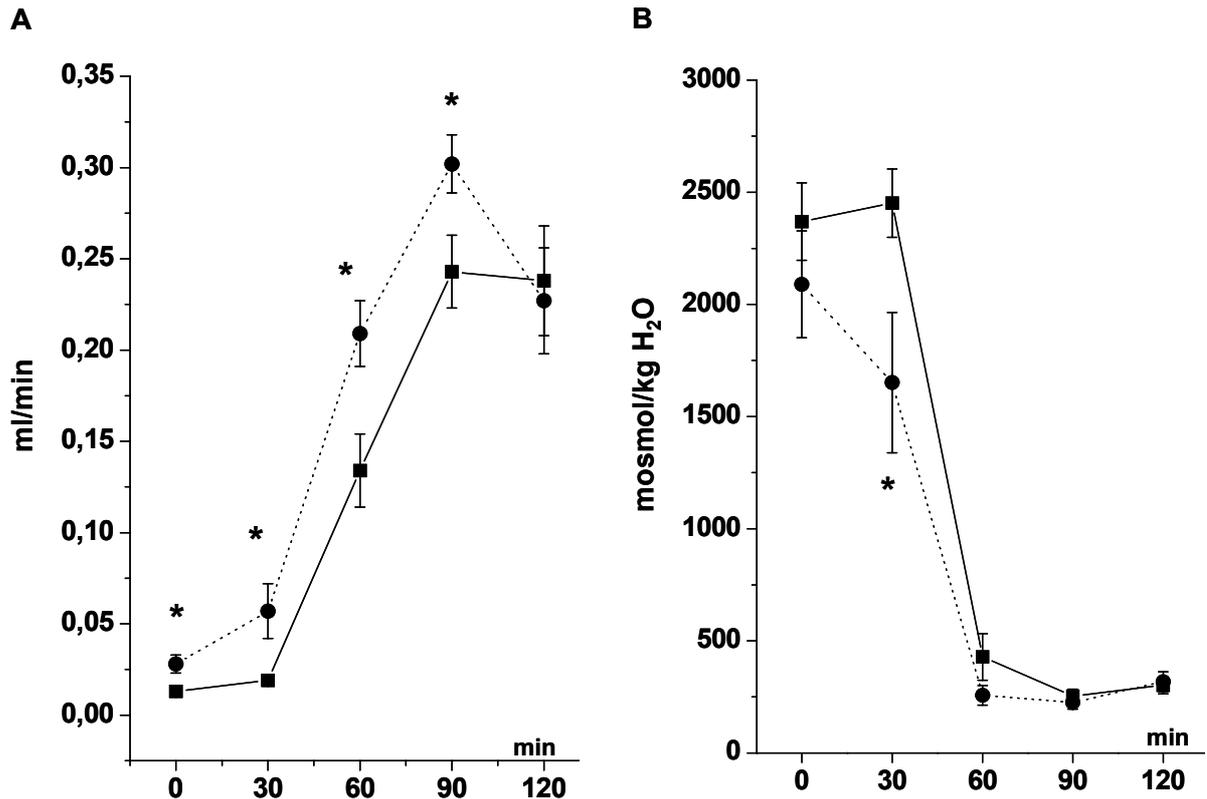


Abbildung 57:

Urinflussrate (A) und Urinosmolalität (B) in Anwesenheit von CBZ („0 min“) und in Anwesenheit von CBZ und Satavaptan (30-120 min). Kontrolltiere (gestrichelte Linie, n=4) und CBZ-Tiere (gepunktete Linie, n=5). Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM, * $p < 0,05$ zwischen den Behandlungsgruppen.

Die Urinosmolalität (siehe Abbildung 57B) sank sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den CBZ-Tieren synchron zur steigenden Urinflussrate. Die Abnahme der Urinosmolalität ist bei den Kontrolltieren auch in der Reduktion der Harnstoffausscheidung zu erkennen (siehe Abbildung 58). Dabei reagierten die CBZ-behandelten Tiere deutlich schneller und stärker. Die Vorbehandlung mit CBZ führte zu einer erhöhten Harnstoffausscheidung, die bei den Kontrolltieren erst durch die Gabe von Satavaptan erreicht wurde. Im weiteren Verlauf gleichen sich die Harnstoffausscheidungen wieder an.

Ergebnisse

Tabelle 32:

Vergleich der Urinparameter der Ratten vor (0 min) und nach (30-120 min) Satavaptaninfusion unter CBZ (50 mg/kg KG). Dargestellt als Mittelwerte \pm SEM. KG (Körpergewicht). * $p < 0,05$ zwischen der Kontrollgruppe (K, n=4) und der CBZ-Gruppe (CBZ, n=5).

Parameter	Gruppe	0 min	30 min	60 min	90 min	120 min
Harnfluss (ml/min/kg KG)	K	0,05 \pm 0,01	0,08 \pm 0,01	0,5 \pm 0,09	1,0 \pm 0,1	0,9 \pm 0,1
	CBZ	0,1 \pm 0,02*	0,3 \pm 0,07*	0,9 \pm 0,1*	1,3 \pm 0,1*	1,0 \pm 0,1
Renale Na ⁺ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	K	8,2 \pm 2,2	16,5 \pm 10,5	17,5 \pm 4,9	46,6 \pm 6,7	78,7 \pm 20,9
	CBZ	27,1 \pm 7,9*	37,7 \pm 16,6	34,4 \pm 11,5	69,7 \pm 17	78,8 \pm 10,3
Renale K ⁺ Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	K	24,2 \pm 4,0	24,1 \pm 4,0	23,1 \pm 5,6	23,0 \pm 1,1	23,1 \pm 3,5
	CBZ	32,4 \pm 6,4	25,6 \pm 4,3	18,3 \pm 3,2	19,3 \pm 1,9	21,7 \pm 1,4
Renale Ca ²⁺ - Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	K	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,8 \pm 0,2	1,4 \pm 0,4	1,3 \pm 0,4
	CBZ	0,5 \pm 0,2	0,9 \pm 0,3*	1,2 \pm 0,3	1,6 \pm 0,3	1,2 \pm 0,2
Renale Cl ⁻ -Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	K	11,8 \pm 5,0	14,7 \pm 4,0	26,2 \pm 3,9	55,5 \pm 5,9	90,9 \pm 23,5
	CBZ	43,1 \pm 8,7*	55,1 \pm 18,0*	46,3 \pm 11,7	83,8 \pm 18	94,8 \pm 14,9
Renale Harnstoff- Ausscheidung (mmol/kg KG/Tag)	K	43,6 \pm 8,6	81,1 \pm 3,9	105,1 \pm 12	85,8 \pm 4,9	68,8 \pm 4,3
	CBZ	91,7 \pm 12,3*	92,2 \pm 7,5	84,7 \pm 8,1	71,4 \pm 4,7*	69,8 \pm 7,5
Urin Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	K	2369 \pm 173	2451 \pm 152	428 \pm 104	253,9 \pm 31,3	302 \pm 37,9
	CBZ	2089 \pm 238	1651 \pm 312*	257 \pm 44	226 \pm 30,1	319 \pm 43,7
Freiwasser Clearance (μ l/min/kg KG)	K	-0,3 \pm 0,1	-0,3 \pm 0,03	0,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
	CBZ	-0,4 \pm 0,1*	-0,3 \pm 0,04	0,5 \pm 0,1*	0,8 \pm 0,1	-0,4 \pm 0,1

Neben dem diuretischen Effekt zeigt die CBZ-Behandlung der Ratten wieder einen renalen Elektrolytverlust von vor allem Na⁺ und Cl⁻ (siehe Abbildung 58A und Abbildung 58B)

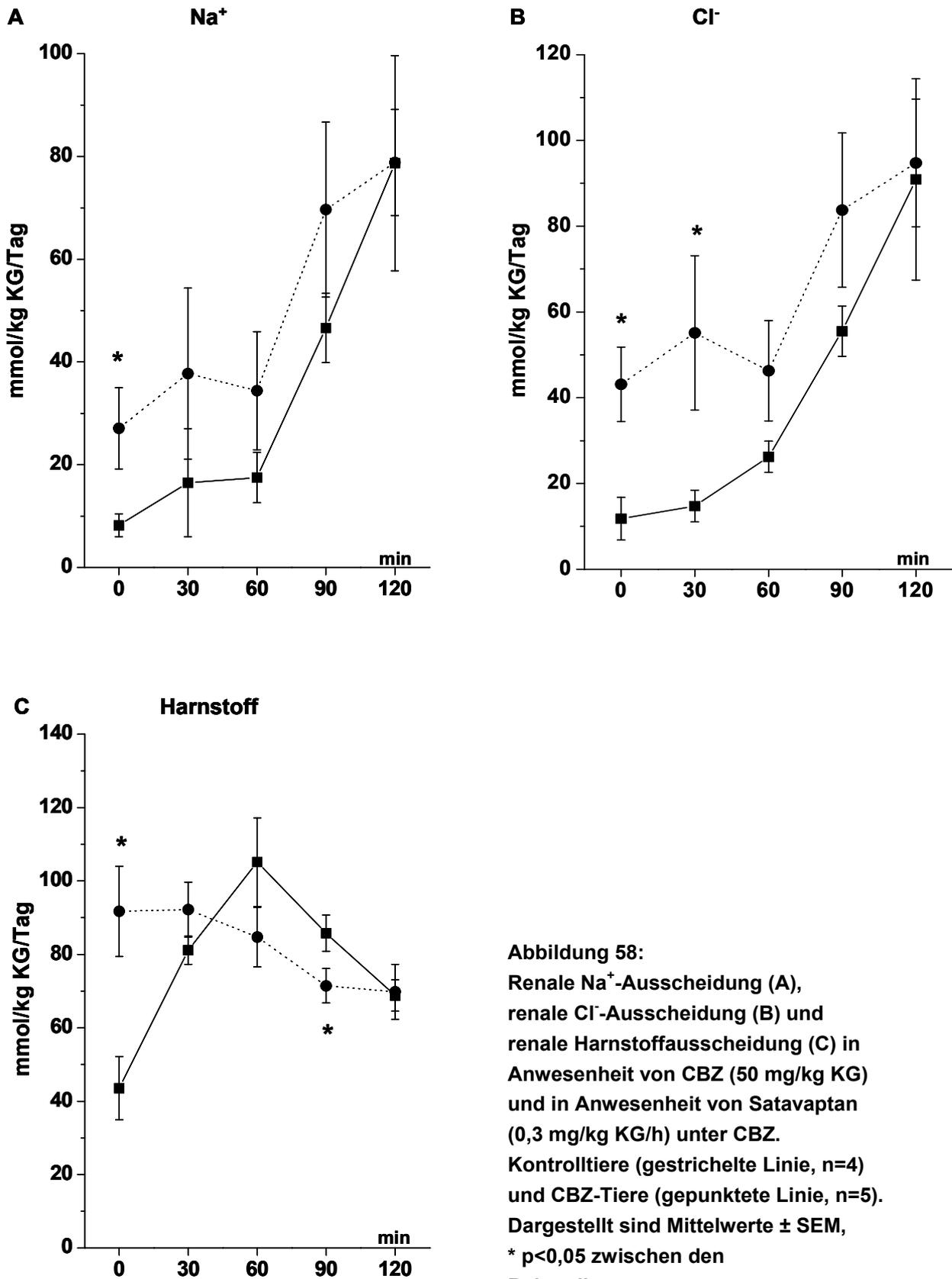


Abbildung 58:
 Renale Na⁺-Ausscheidung (A),
 renale Cl⁻-Ausscheidung (B) und
 renale Harnstoffausscheidung (C) in
 Anwesenheit von CBZ (50 mg/kg KG)
 und in Anwesenheit von Satavaptan
 (0,3 mg/kg KG/h) unter CBZ.
 Kontrolltiere (gestrichelte Linie, n=4)
 und CBZ-Tiere (gepunktete Linie, n=5).
 Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM,
 * p<0,05 zwischen den
 Behandlungsgruppen.

Im Verlauf des Experimentes stieg in beiden Gruppen die Ausscheidung für Na^+ weiter an, unterschied sich aber nicht mehr zwischen den Behandlungsgruppen. Nach 120 min Satavaptaninfusion war die renalen Ausscheidung für Na^+ in beiden Gruppen fast identisch. Die Cl^- -Ausscheidung war ebenfalls unter CBZ erhöht und stieg in Anwesenheit von Satavaptan weiter an, wobei sich die Behandlungsgruppen nicht mehr unterschieden.

Die Ausscheidung für K^+ blieb bei den Kontrolltieren im Bereich von 23-24 mmol/kg KG/Tag und unterschied sich nicht von der der mit CBZ-behandelten Tiere (siehe Abbildung 59). Diese schwankten mit der renalen K^+ -Ausscheidung zwischen 19-32 mmol/kg KG/Tag.

Die renale Ca^{2+} -Ausscheidung war nach 30 min Satavaptaninfusion bei den CBZ-Tieren erhöht, stieg danach aber in beiden Versuchsgruppen vergleichbar an (siehe Abbildung 59).

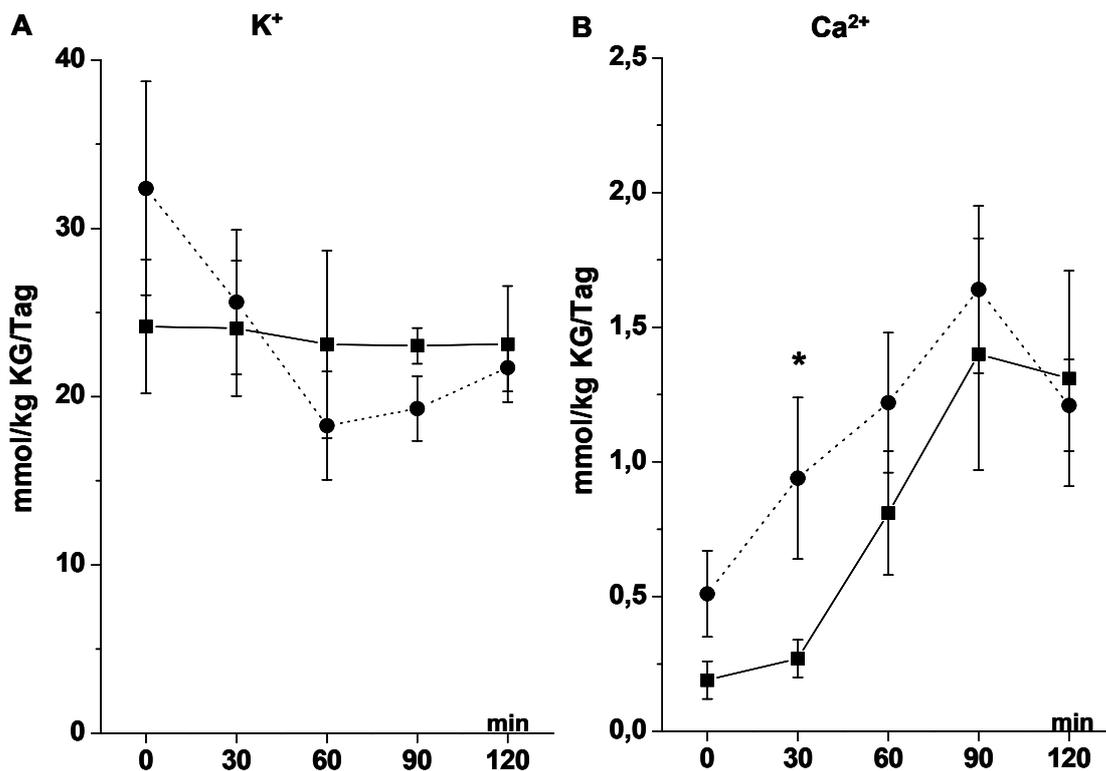


Abbildung 59:

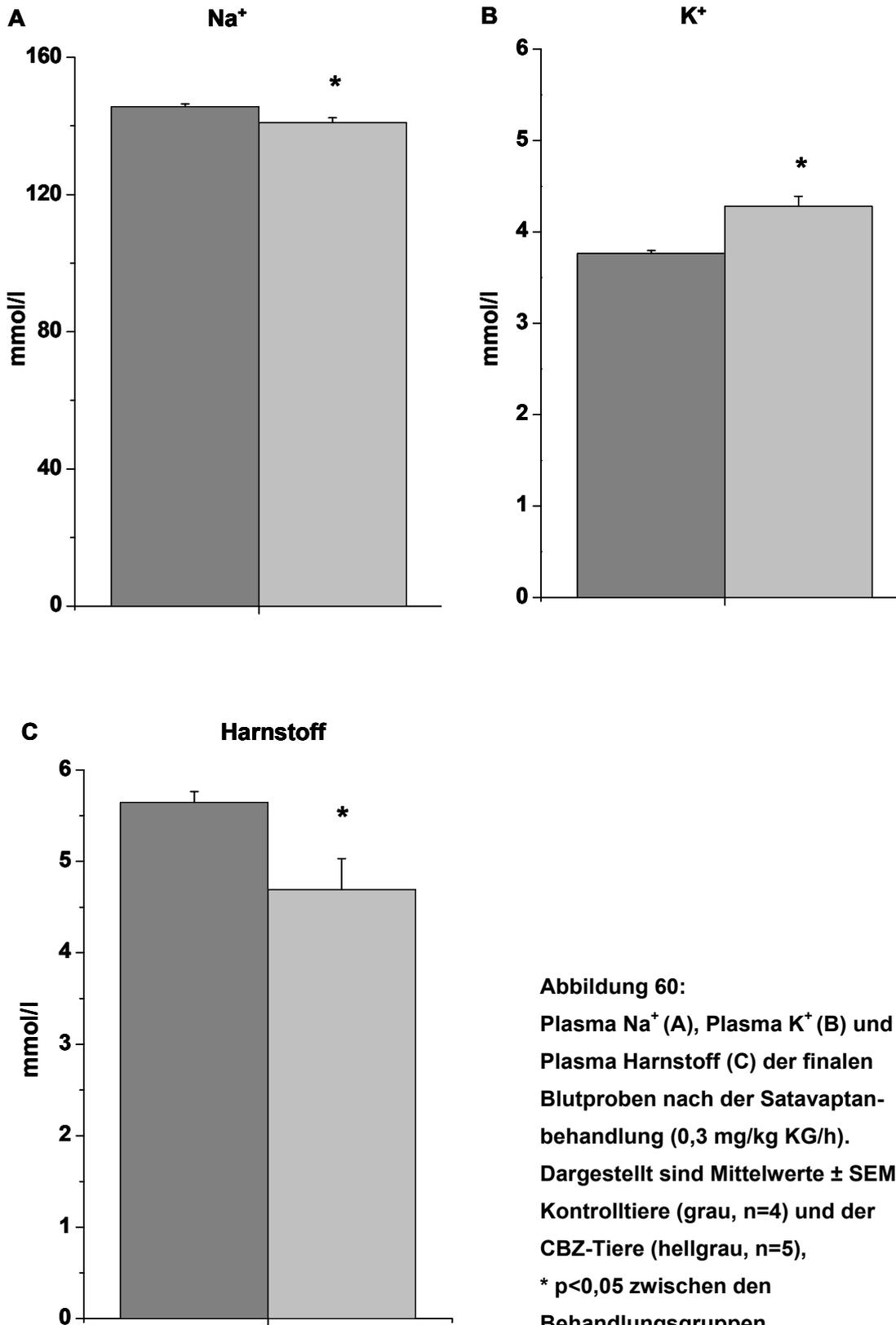
Renale K^+ - (A) und renale Ca^{2+} -Ausscheidung (B) in Anwesenheit von CBZ (50 mg/kg KG) und in Anwesenheit von Satavaptan (0,3 mg/kg KG/h) unter CBZ. Kontrolltiere (gestrichelte Linie, n=4) und CBZ-Tiere (gepunktete Linie, n=5). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, *p<0,05 zwischen den Behandlungsgruppen.

Bei der Betrachtung der Plasmaparameter (siehe Tabelle 33 und Abbildung 60) nach der Behandlung mit CBZ und dem V2-Antagonisten Satavaptan fiel auf, dass die Na⁺-Konzentration im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen gesunken war (siehe Abbildung 60A). Des Weiteren sank die Harnstoffkonzentration (siehe Abbildung 60C), wohingegen das Plasma K⁺-Konzentration anstieg (siehe Abbildung 60B). Der Säure-Basen-Status war unverändert und auch die Plasmaosmolalität sowie der Hämatokrit waren zwischen den CBZ- (n=3) und den Kontrolltieren (n=2) gleich (48,8 ± 3,4 % vs. 50,6 ± 5,3%).

Tabelle 33:

Vergleich der Plasmaparameter der Ratten nach 2-stündiger Satavaptaninfusion (0,3 mg/kg KG/h) unter CBZ (50 mg/kg KG). Dargestellt sind Mittelwerte ± SEM. KG (Körpergewicht). * p<0,05 zwischen der Kontrollgruppe (K, n=4) und der CBZ-Gruppe (CBZ, n=5).

Parameter	K	CBZ
Plasma Na ⁺ (mmol/l)	146 ± 0,8	141 ± 1,5 *
Plasma K ⁺ (mmol/l)	3,8 ± 0,03	4,3 ± 0,1 *
Plasma Cl ⁻ (mmol/l)	113 ± 2,5	118 ± 2,0
Plasma Harnstoff (mmol/l)	5,6 ± 0,1	4,7 ± 0,3 *
Plasma Osmolalität (mosmol/kg H ₂ O)	316 ± 2,6	324 ± 2,6
n	4	5



Um den Gesundheitszustand der Tiere während der Narkose zu überprüfen, wurden alle 15 min die physiologischen Parameter wie Körpertemperatur, mittlerer systolischer arterieller Blutdruck und die Atemfrequenz gemessen und ebenfalls zu 30 min-Intervallen zusammengefasst (siehe Abbildung 61).

Daraus ergab sich, dass die Körpertemperatur der Tiere zwischen 37,0-37,5°C lag. Die Atemfrequenz betrug zwischen 58-68 Atemzüge/min, welches aufgrund der Narkose etwas unterhalb des Frequenzbereiches (70-110 Atemzüge/min) lag, der für ein waches Tier angegeben ist. Der mittlere systolische arterielle Blutdruck schwankte zwischen 104-115 mmHg und lag im wachen Tier um die 116 mmHg. Es gab keine Unterschiede in diesen drei Parametern zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Der Verlauf des Experimentes legt eine Additivität von CBZ und Satavaptan nahe.

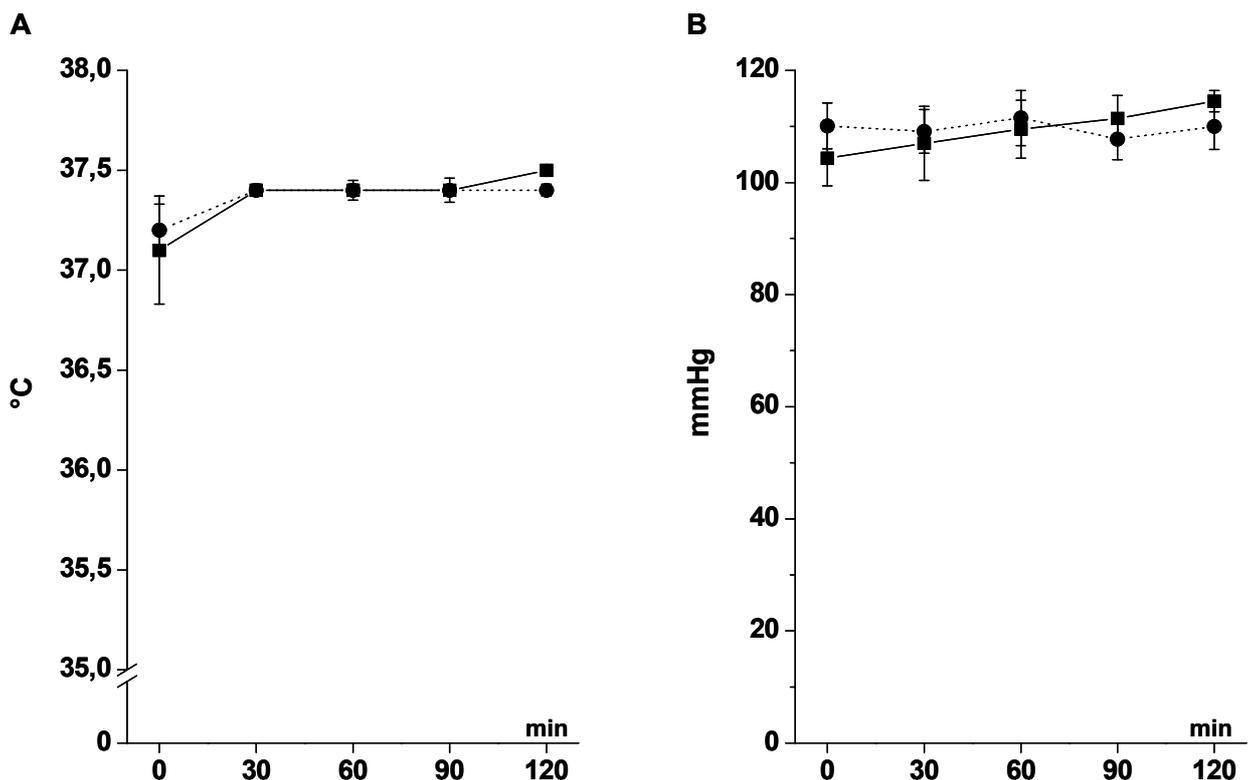
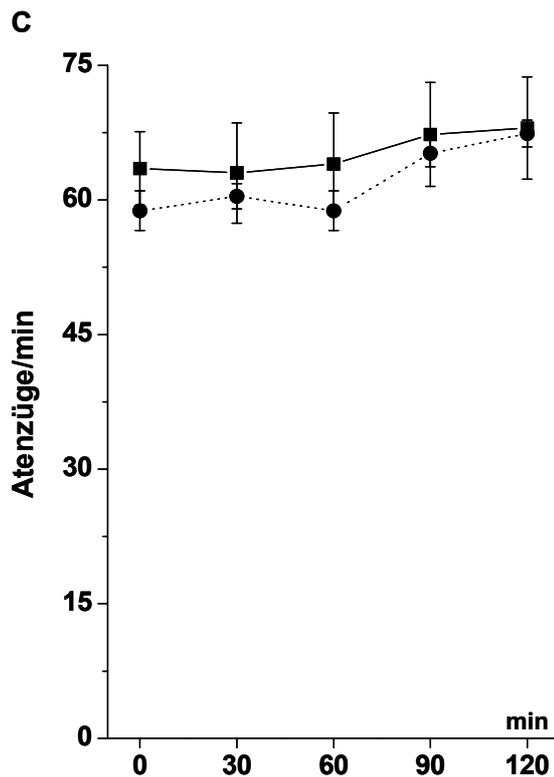


Abbildung 61:

Die physiologischen Parameter wie Körpertemperatur (A) und mittlerer systolischer arterieller Blutdruck (B) während des Versuchs. Kontrolliere (gestrichelte Linie, n=4), CBZ-Tiere (gepunktete Linie, n=5). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.



Fortsetzung der
Abbildung 61:
Die Atemfrequenz (C)
während des Versuchs.
Kontrolltiere (gestrichelte
Linie, n=4), CBZ-Tiere
(gepunktete Linie, n=5).
Dargestellt sind
Mittelwerte \pm SEM.

3.2.6 CBZ induziert ADH-unabhängige Diurese

Auf dem Hintergrund der Beobachtungen im Satavaptanexperiment wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob die Wirkung von CBZ durch einen Abfall der ADH-Freisetzung bewirkt worden war. In Übereinstimmung mit der Additivität von Satavaptan und CBZ war die ADH-Konzentration unter CBZ-Behandlung nicht erniedrigt.

Die Abbildung 62 zeigt das Ergebnis aus den ADH-Messungen im Plasma der mit CBZ behandelten Tiere.

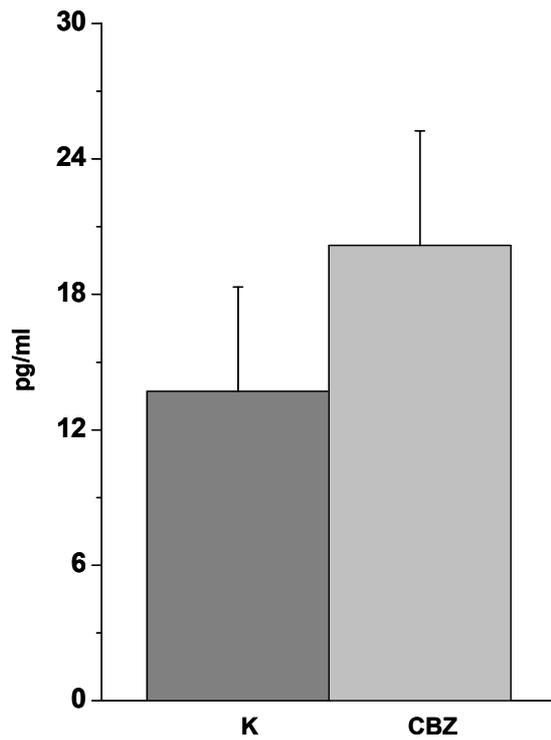


Abbildung 62:

ADH-Plasmakonzentration 5 h nach einmaliger oraler Applikation von Carbamazepin (50 mg CBZ/kg KG). Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM. Kontrolltiere (K, n=5) und CBZ-Tiere (CBZ, n=5).

4 Diskussion

4.1 Methodik

4.1.1 Gewebepräparation und Isolation von Kolonkrypten

Bei der Präparation des Kolongewebes ist es sehr wichtig, die Operation zur Dissektion des Gewebes möglichst sauber und schnell durchzuführen. Des Weiteren ist es entscheidend, das Kolon mechanisch wenig zu beanspruchen und die Mukosaschichten sehr schonend abzupräparieren. Überall, wo das Gewebe mechanisch verletzt wurde, ist der Zellverband zerstört und das Gewebe elektrisch nicht mehr intakt, so dass transepitheliale Untersuchungen fehlerhaft werden. Zusätzlich kann es bei Gewebeschädigung zu einer Zellschwellung, und damit zur Aktivierung von volumensensitiven K^+ - und Cl^- -Kanälen (Diener et al., 1992) kommen, die die elektrischen Eigenschaften der Kryptzellen beeinflussen.

Um die Vitalität des Gewebes zu erhalten, wurde die Vorbereitung der Gewebeproben auf Eis und in gekühlten Lösungen durchgeführt. Die experimentellen Arbeiten erfolgten dagegen bei 37°C.

Dieser Temperatursprung und die Prostaglandinfreisetzung im subepithelialen Gewebe (Craven & DeRubertis, 1986) durch die mechanische Präparation des Kolongewebes (Beubler & Juan, 1978) führen z.B. in der Ussing-Kammer dazu, dass sich das transepitheliale Potenzial (V_{te}) beim Einspannen des Gewebes zunächst stark erhöht und nach einigen Minuten durch Reduktion der Prostaglandinfreisetzung auf einen dann stabilen Wert abfällt. Wenn sich ein stabiles Niveau von V_{te} eingestellt hat, kann mit den experimentellen Untersuchungen begonnen werden. Diese Stabilisierungsphase kann durch Hemmung der Cyclooxygenase, welche an der Prostaglandinbildung beteiligt ist, verkürzt werden (Nobles *et al.*, 1991). In den Versuchen wurde Indomethacin verwendet, um diesen Zeitabschnitt zu verkürzen.

Bei der Isolation der Kolonkrypten gilt das gleiche saubere und schnelle Vorgehen auf Eis bzw. in gekühlten Lösungen wie oben beschrieben. Die

Isolation von Kolonkrypten aus dem intakten Epithel des Kolons erfolgt mit Ca^{2+} -freien/haltigen Lösungen (siehe 2.1.2.4) und ist der Methode der enzymatischen Kryptenisolation, die sich den enzymatischen Verdau des Bindegewebes zunutze macht, vorzuziehen. Die Isolation der Krypten durch die Kombination von mechanischer Einwirkung (Abschütteln der Krypten) und der Anwendung von Ca^{2+} -freien und Ca^{2+} -haltigen Lösungen, liefert im Gegensatz zum enzymatischen Verdau eine höhere Kryptenausbeute mit vitaler Funktion und intakter Zellmembran. Die Vitalität der Krypte ist am Erscheinungsbild ihres Zellverbands unter dem Mikroskop zu erkennen. Die Abnahme der Kryptqualität ist durch das Abrunden der Einzelzellen zu erkennen. Dieser Vorgang kommt durch das Lösen der Tight Junctions zustande (Bjorkman et al., 1986). Die Intaktheit der Krypten bleibt bei Kühlung über mehrere Stunden erhalten. Sie wurden daher bis zur elektrophysiologischen Ableitung auf Eis gelagert. Die Patch-Clamp Messungen wurden hingegen bei 37°C durchgeführt.

4.1.2 Ussing-Kammer Messtechnik

Bei der Ussing-Kammer Messtechnik wird das Darmepithel in eine Messkammer eingespannt. Die Methode erlaubt die gezielte Applikation von Experimentallösungen auf die luminale und basolaterale Seite der Membran, um deren Wirkung auf den Elektrolyttransport getrennt voneinander zu untersuchen. Zu beachten ist, dass das zu untersuchende Darmepithel noch subepitheliale Strukturen aufweisen kann, so dass ein Einfluss des enteralen Nervensystems nicht vollständig auszuschließen ist. Außerdem bildet das Kolonpräparat basolateral eine Diffusionsbarriere. Die applizierten Substanzen müssen erst die subepithelialen Strukturen und die Basalmembran durchdringen, bevor sie die basolaterale Seite der Epithelzellmembran erreichen. Auf der luminalen Seite wird die Diffusion durch die Schleimschicht leicht behindert.

Im Gegensatz zu dem hohen Auflösungsvermögen der Patch-Clamp Messmethode ist die Auflösung der Ussing-Kammer Messung bei elektrischen Vorgängen am Epithel sehr viel geringer, jedoch befinden

sich die Enterozyten in einem Zellverband und spiegeln eine funktionelle physiologische Einheit wider.

4.1.3 Patch-Clamp Technik

Mit Hilfe der Patch-Clamp Messtechnik ist es möglich, isolierte Kolonkrypten hinsichtlich ihrer elektrischen Eigenschaften zu untersuchen, um ein besseres Verständnis für die beteiligten Leitfähigkeiten der Membran unter dem Einfluss verschiedener Experimentallösungen zu bekommen. Aus der Literatur ist bekannt, dass es in der Achse der Kolonkrypte eine Differenzierung und Spezialisierung der Kryptzellen gibt (Ecke *et al.*, 1996b), währenddessen sie auch ihre elektrischen Eigenschaften verändern. In der Kryptbasis findet die Proliferation der Kryptzellen (DNA-Synthese/Mitose) statt. Diese Vorgänge werden durch einen Anstieg von intrazellulärem cAMP oder Prostaglandinen (PGE₂) gehemmt (Craven & DeRubertis, 1981). Von der Kryptbasis aus wandern die Zellen zum Lumen und differenzieren sich dabei zu vollentwickelten Oberflächenzellen, die schließlich durch Apoptose absterben und von neuen Zellen ersetzt werden (Strater *et al.*, 1995). Die Zellen in der Kryptbasis können aufgrund der Aktivierung von nichtselektiven Kationenkanälen in der basolateralen Membran depolarisiert werden. Die Zellen in der Kryptbasis, -mitte und in kleinerem Maße die Oberflächenzellen depolarisieren durch die Aktivierung von Chloridkanälen (Siemer & Gogelein, 1993). Die Oberflächenzellen exprimieren schließlich epitheliale Natriumkanäle, die mit Amilorid gehemmt werden können. Diese Änderungen der elektrischen Eigenschaften sind bei der Wahl der zu untersuchenden Zellen zu beachten. In dieser Arbeit wurden die Zellen an der Kryptbasis untersucht.

Bei der Durchführung von Patch-Clamp Experimenten an isolierten Kolonkrypten ist es wichtig, dass sie mit einer Haltepipette unbeweglich auf dem Petrischalenboden gehalten werden, ohne die Zellen zu beeinträchtigen. So wird vermieden, dass der Kontakt der Zellmembran mit der Patchpipette durch Bewegung abreißt. Die Lagerung auf Eis

hemmt die Schleimproduktion, die den sauberen Zugang zur Zellmembran ebenso erschweren würde.

Zu beachten ist bei dieser Messmethode außerdem, dass Zellen der Kolonkrypten gekoppelt sein können. Die Zellen entlang der Kryptachse stehen dabei durch elektrische Verbindungen (gap-junctions) miteinander in Kontakt und bilden einen elektrischen Verband. Diese Kopplung erschwert den sog. kapazitiven Abgleich zur Bestimmung von Membrankapazität und Zugangsleitwert.

Die gewählte Patchpipettengröße von ca. 4 M Ω ergibt sowohl eine hochohmige Membranabdichtung (Seal), als auch einen ausreichenden Zugangsleitwert. Dieser lag bei den vorliegenden Experimenten bei 54 nS. Die Gesamtleitwerte, die im Spannungsklemmprotokoll ermittelt wurden, lagen zwischen 5 nS und 10 nS. Da der Abgleich und damit die genaue Ermittlung des Zugangsleitwertes nicht in allen Experimenten und Experimentabschnitten erfolgreich war, wurde die Darstellung der Leitwerte als Gesamtleitwert gewählt. Hieraus ergibt sich eine theoretische systematische Unterschätzung der eigentlichen Zellmembranleitwerte, die jedoch weniger als 20% ausmacht.

Für die Datenanalyse wurden nur Messungen verwendet, die aus einer Gigaseal-Konfiguration hervorgingen. Dies ist die Voraussetzung für eine verlustfreie Spannungsmessung. Um auszuschließen, dass bei der Bildung der Ganzzellkonfiguration ein Leck entstanden war, wurden nur solche Messungen weiterverfolgt, die ein stabiles Ausgangspotenzial von < -50 mV nach Erstellung der Ableitung ergaben.

Die Lebensdauer der Einzelkrypten unter Patch-Clamp Bedingungen ist geringer als die des Gewebeverbandes in der Ussing-Kammer, so dass die Versuchsprotokolle bei den whole-cell Messungen kürzer gehalten wurden. Die Vitalität der Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit anhand des Membranpotenzials und durch die Reaktion der Krypte auf Stimulation mit FSK/IBMX beurteilt. Auf FSK/IBMX reagiert die Kryptzelle mit einer Depolarisation, die durch das Öffnen von luminalen Cl⁻-Kanälen getragen wird (Warth *et al.*, 1996). Die Depolarisation auf FSK/IBMX war deshalb ein weiteres Einschlusskriterium.

4.1.4 Ca²⁺-Messung an isolierten Kolonkrypten

Bei der Ca²⁺-Messung wurde Fura-2/AM verwendet. Dieser Fluoreszenzfarbstoff ermöglicht es, die intrazelluläre Ca²⁺-Aktivität [Ca²⁺]_i aus dem Fluoreszenzquotienten bei zwei unterschiedlichen Anregungswellenlängen zu ermitteln. Für die quantitative Bestimmung von [Ca²⁺]_i steht ein aufwändiges Eichverfahren zur Verfügung (Grynkiewicz *et al.*, 1985). Da die Bindungskurve von Ca²⁺ an Fura-2 einen sigmoidalen Verlauf hat und nur im Bereich der Dissoziationskonstanten (K_D) linear verläuft, können exakte Werte der [Ca²⁺]_i nur bestimmt werden, wenn sie in diesen Bereich fallen.

In dieser Arbeit werden die Änderungen des Fluoreszenzquotienten dargestellt (Fischer *et al.*, 1996) und die relativen Veränderungen des [Ca²⁺]_i miteinander verglichen. Auf die Angabe von Absolutwerten wurde verzichtet.

Vor den Messungen wurden die Fluoreszenzintensitäten von Hintergrund und Präparat (Eigenfluoreszenz) bestimmt und bei der Bildung der Fluoreszenzquotienten berücksichtigt.

4.1.5 cAMP-Messung an isolierten Kolonkrypten

Die Bestimmung von intrazellulärem cAMP in isolierten Kolonkrypten erfolgte unter Anwendung eines enzymatischen Testkits. Dieser Test basiert auf einer Konkurrenzreaktion zwischen freiem cAMP und Acetylcholinesterase-gebundenem cAMP um eine limitierte Anzahl von Bindungsstellen eines cAMP-spezifischem Antikörpers. Ein cAMP-Standard dient zum Erstellen einer Eichkurve (0,3-83,3 pmol/ml), anhand derer die cAMP-Konzentration der Probe abgelesen werden kann. Die Nachweisgrenze des Testkits liegt bei 0,1 pmol/ml und bestimmt die Menge des eingesetzten Gewebes. Die Erniedrigung von cAMP durch CBZ kann sowohl durch Hemmung der Synthese als auch auf der Ebene des cAMP-Abbaus erfolgen. Im cAMP-Messprotokoll dieser Arbeit wurde die Startkonzentration durch Gabe von FSK angehoben. Da FSK die AC (Adenylatzyklase) kontinuierlich stimuliert konkurriert CBZ in beiden Fällen

mit der FSK-Wirkung, d.h. die eigentliche CBZ-Wirkung könnte unterschätzt werden.

4.1.6 *In-vivo* Untersuchungen auf metabolischen Käfigen

Bei der Durchführung von experimentellen Untersuchungen an Ratten auf metabolischen Käfigen ist zu bedenken, dass die Tiere zum einen aus ihrer gewohnten Umgebung (Großkäfig mit Einstreu, Gruppenhaltung, Tierpfleger) mit anderen Umwelteinflüssen (Ortswechsel, Einzelkäfig, Gitterboden, Versuchsleiter) in Berührung kommen und zum anderen der Umgang mit dem Tier (Nackengriff, Schlundsondierung) einen Stressfaktor für die Tiere darstellt. Durch starken Stress werden die metabolischen Parameter verändert und es können keine eindeutigen Aussagen über eine Behandlung erfolgen. Um den Stress der Versuchstiere möglichst gering zu halten, wurden die Tiere über mehrere Wochen an die neuen Umwelteinflüsse gewöhnt und erst als das Applizieren der Experimentallösungen mit der Schlundsonde stressfrei funktionierte, wurden die Tiere auf die metabolischen Käfige gesetzt und die Parameter (Futter- und Trinkmenge sowie Urin- und Kotproduktion) erfasst und ausgewertet. Die Tiere saßen maximal 7 Tage auf metabolischen Käfigen. Am Ende der Versuche erfolgte die Entnahme arteriellen Blutes zur Bestimmung der Plasmaparameter, die den Zustand des Wasser- und Elektrolythaushaltes des Körpers widerspiegeln.

Die Plasmakonzentrationen von Na^+ und K^+ werden in engen Grenzen konstant gehalten und sind abhängig von der Salzaufnahme über die Nahrung, der Flüssigkeitsbilanz des Körpers sowie von ihrer Ausscheidung über die Niere und den Gastrointestinaltrakt. Die Regulation der Plasma Na^+ -Konzentration erfolgt direkt, die des Plasma K^+ indirekt über Aldosteron.

Die fraktionellen Ausscheidungen (FE) der Elektrolyte stellen ein Maß für die Summe der verschiedenen Ionentransportprozesse in der Niere dar. Kreatinin ist ein Abbauprodukt des Muskelstoffwechsels und wird über die Niere ausgeschieden. Das Plasmakreatinin ist im gesunden Organismus sehr konstant. Eine signifikante Erhöhung des Plasmakreatinins ist erst bei

einer Einschränkung der GFR um mindestens 50 % zu finden. Kleine Änderungen der GFR können daher nur über die Kreatinin-Clearance erfasst werden.

Die Untersuchungen mit metabolischen Käfigen ohne pharmakologische Werkzeuge erfassen also immer die integrative Organfunktion und die Bilanz des Organismus. Dennoch können aus den Änderungen der einzelnen Parameter Rückschlüsse auf den Wirkungsort von CBZ gezogen werden, denn die Transportprozesse für Na^+ , K^+ und Wasser sind entlang des Nephrons verschiedenen.

4.2 Einfluss von CBZ auf den Elektrolyttransport im Rattenkolon

Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die Beobachtung, dass das Antiepileptikum CBZ neben seiner typischen Wirkung auf die neuronale Erregbarkeit auch Störungen des Salz- und Wasserhaushaltes verursachen kann. Da CBZ mit Ionenkanälen im ZNS interagiert, wurde zunächst überprüft, ob es ebenfalls eine Wirkung auf epitheliale Ionenkanäle besitzt. Das Kolonepithel verfügt als Prototyp über alle relevanten Kanäle für die Cl^- -Sekretion und Na^+ -Resorption. Aus diesem Grund wurden die Untersuchungen an diesem Gewebe begonnen.

4.2.1 Keine Inhibition von ENaC und CFTR durch CBZ

Mit Hilfe der Ussing-Kammer Messtechnik konnte an distalen Rattenkolongeweben gezeigt werden, dass CBZ nicht in der Lage war, den epithelialen Natriumkanal zu blockieren.

Da der neuronale und der epitheliale Natriumkanal keinerlei Ähnlichkeiten in ihrem Kanalbau aufweisen (Ulbricht, 2005; Kellenberger & Schild, 2002), ist dieses Ergebnis nicht verwunderlich. Die einzige Gemeinsamkeit der beiden Kanäle ist der Transport von Na^+ , eine potenzielle Wirkung musste aber trotzdem überprüft werden. Die direkte Hemmung der Na^+ -Resorption im GIT ist somit nicht der Auslöser für die durch CBZ-auffretende Hyponatriämie.

Um den ENaC spezifisch zu hemmen und somit die Größenordnung des Na^+ -Transportes am transepithelialen Strom zu erkennen, wurde mit dem Pyrazin-Derivat Amilorid gearbeitet (Benos *et al.*, 1992; Benos, 1982). Der Effekt von Amilorid zeichnete sich durch eine Reduktion von V_{te} und einer Zunahme von R_{te} aus.

Bei der luminalen Applikation von CBZ in Anwesenheit von Amilorid auf der luminalen Seite des Kolonepithels bei vorhandener Cl^- -Sekretion zeigte sich keine Veränderung von V_{te} oder R_{te} des untersuchten Kolangewebes. Daraus war erkennbar, dass CBZ keinen direkten Einfluss auf den luminalen Cl^- -Kanal CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) hatte. Dieser Kanal ist in den meisten Epithelien verantwortlich für die Cl^- -Sekretion (Greger, 2000). CFTR ist aktiv, wenn das Kanalprotein z.B. cAMP-abhängig phosphoryliert wird.

Aus diesen beiden Befunden ergab sich, dass CBZ weder durch Blockade des ENaC noch durch die Blockade des CFTR Einfluss auf die luminalen Membran am Rattenkolon nimmt.

4.2.2 Inhibition der luminalen Cl^- -Sekretion durch CBZ

Im Gegensatz zur luminalen Gabe von CBZ führte es, von der basolateralen Seite gegeben, zu einer Hemmung der Cl^- -Sekretion, nachdem ein transients Anstieg des Sekretionsstromes messbar war. Zur Trennung (Eingrenzung) der beiden beteiligten Mechanismen wurden folgende experimentelle Ansätze gemacht:

1. Prüfung der Wirkung von CBZ auf das Epithel nach cAMP-Stimulation über FSK (Warth *et al.*, 1996; Lohrmann & Greger, 1993).
2. Vergleich der Wirkung von CBZ mit der Wirkung von CCh (Greger *et al.*, 1997) und Prüfung der Additivität mit CCh.

In diesen Experimenten war die cAMP-Konzentration durch die Gabe von IBMX geklemmt, d.h. IBMX blockierte die Phosphodiesterase und verhinderte somit den Abbau von intrazellulärem cAMP.

Zusätzlich wurde pharmakologisch der K^+ -Kanal KCNQ1/KCNE3 kontrolliert.

Bei der Applikation von CBZ in kontinuierlicher Anwesenheit von FSK auf der basolateralen Seite der Membran wurde ein sog. Doppelleffekt sichtbar. CBZ führte zuerst zu einer schnellen, aber kurzfristigen Aktivierung der Chloridsekretion, die danach langsam und stetig inhibiert wurde. Die kurzfristige Zunahme von V_{te} in Anwesenheit von CBZ könnte durch Ca^{2+} -Freisetzung zustande gekommen sein, da die Kinetik schnell und transient war. Im weiteren Verlauf nahmen die Sekretion ab und der Widerstand zu, was darauf schließen lässt, dass Ionenkanäle geschlossen wurden. Der relativ langsame Verlauf der Hemmung legt eine Hemmung der Sekretion über eine Wirkung auf die cAMP-Produktion oder eine Aktivierung des cAMP-Abbaus nahe. Da in beiden Fällen zunächst ein vorhandener cAMP-Bestand abgebaut werden müsste, würde dies die Kinetik erklären.

Die cAMP-abhängige Cl^- -Sekretion ließ sich dosisabhängig durch CBZ hemmen. Der IC_{50} von CBZ lag mit 26 μM im therapeutisch wirksamen Bereich von CBZ, d.h. die Beobachtungen an der Ratte können durchaus Relevanz für die Beurteilung von therapeutischen Nebenwirkungen haben. Der Effekt von CBZ auf das transepitheliale Potenzial und den transepithelialen Widerstand war reversibel.

Die Hemmung der Cl^- -Sekretion ist aufgrund der Beobachtungen am ehesten auf eine Verminderung der cAMP-Konzentration und die damit verbundene Abnahme der Cl^- -Leitfähigkeit zurückzuführen. Allerdings könnte die gleiche Wirkung auch durch eine direkte Hemmung der basolateralen K^+ -Kanäle und dem damit verbundenen Triebkraftverlust erklärt werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob die alternative Stimulation der Sekretion über den Ca^{2+} -Weg auch in Anwesenheit von CBZ möglich war. Dieser Weg aktiviert basolaterale K^+ -Kanäle und ist auf bereits geöffnete cAMP-regulierte Cl^- -Kanäle angewiesen. In der Tat war die Sekretion unter diesen Bedingungen vermindert, aber nicht aufgehoben. Damit bleibt eine kombinierte Hemmung über cAMP und über basolaterale K^+ -Kanäle wahrscheinlich.

Die Interpretation aller Ergebnisse führte zusammen mit den Untersuchungen an Epithelzellen zu dem Schluss, dass CBZ

1. Die Sekretion über einen Ca^{2+} -Transienten steigert
2. Die Sekretion langfristig über eine Senkung von cAMP unterdrückt
3. Die Wirkung nicht allein auf die direkte Hemmung von Ionenkanälen (K^+ , Cl^-) zurückzuführen ist.

4.2.3 Einfluss von CBZ auf die basolaterale K^+ -Leitfähigkeit

Weitere Ussing-Kammer Experimente wurden durchgeführt, um die Frage zu untersuchen, ob auch der Ca^{2+} -aktivierte K^+ -Kanal auf der basolateralen Seite des Kolonepithels durch CBZ aktiviert werden könnte und somit für die transiente Stimulation der luminalen Cl^- -Sekretion verantwortlich sein könnte.

Der ENaC wurde wiederum bei allen durchgeführten Versuchen durch Amilorid kontinuierlich blockiert und die Cl^- -Sekretion durch die Applikation von FSK/IBMX stabil induziert. Danach wurde mit Hilfe des Blockers 293 B, der spezifisch KCNQ-Kanäle blockiert (Bleich *et al.*, 1997), der basolaterale KCNQ1/KCNE3 inhibiert und somit die Triebkraft für die cAMP-abhängige Cl^- -Sekretion unterbunden. Der Blocker reduzierte das V_{te} des Gewebes auf fast 0 mV. Nun wurde basolateral entweder CCh oder CBZ appliziert und der Einfluss auf V_{te} und R_{te} beobachtet. Sowohl CCh als auch CBZ führten unter 293 B zu einem kurzfristigen Anstieg der Cl^- -Sekretion. Die Kurvenverläufe von CCh und CBZ waren nahezu identisch, und das deutet darauf hin, dass CBZ ähnlich wie CCh über die intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung eine Erhöhung der basolateralen Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Leitfähigkeit (SK4) hervorruft und die luminalen Cl^- -Sekretion dadurch gefördert wird (Warth *et al.*, 1999).

4.2.4 Aktivierung der Ca^{2+} -vermittelten K^+ -Leitfähigkeit durch CBZ

Wenn CBZ in der Lage ist, die Ca^{2+} -abhängige K^+ -Leitfähigkeit zu induzieren und darüber die Erhöhung der luminalen Cl^- -Sekretion zu aktivieren, dann könnte auch der KCNQ1/KCNE3-Kanal Angriffspunkt für die CBZ-Wirkung im Rattenkolonepithel darstellen. Um diese Hypothese zu überprüfen wurden die Wirkungen von CBZ und CCh sowohl separat

als auch additiv am selben Kolongewebe unter Hemmung dieses Kanals untersucht.

Durch die Applikation von 293 B, kam es nach voriger Stimulation der Cl^- -Sekretion durch FSK/IBMX, zu einer schnellen Reduktion des V_{te} auf wenige Millivolt. CCh induzierte über die Erhöhung der Ca^{2+} -abhängigen K^+ -Leitfähigkeit (SK4) eine kurzfristige luminale Cl^- -Sekretion. Nach dem Auswaschen von CCh über mehrere Minuten konnte durch CBZ ein ähnlicher Effekt induziert werden. Die Applikation von CCh in Anwesenheit von CBZ fiel kleiner aus. CBZ- und CCh-Wirkung waren also nicht additiv. Das könnte wiederum mit einer partiellen Hemmung der verfügbaren Cl^- -Leitfähigkeit über einen cAMP-Abfall, oder aber über eine durch CBZ-induzierte Entleerung des verfügbaren intrazellulären Ca^{2+} -Speichers erklärt werden.

Nach einer weiteren Auswaschperiode von CBZ und CCh über mehrere Minuten fiel die Ca^{2+} -vermittelte luminale Cl^- -Sekretion durch CCh wieder größer aus, womöglich dadurch bedingt, dass die intrazellulären Speicher für Ca^{2+} z.T. wieder aufgefüllt waren.

Aus diesem Experiment lässt sich schließen, dass CBZ bei der Blockade des cAMP-abhängigen K^+ -Kanals (KCNQ1/E3) in der Lage ist, die Ca^{2+} -abhängige K^+ -Leitfähigkeit zu induzieren und den Effekt des CCh zu kopieren. Die reduzierte Cl^- -Sekretion unter CCh in Anwesenheit von CBZ zeigt, dass die beiden Agonisten über das gleiche second-messenger System (Ca^{2+}) agieren und CBZ zusätzlich die beiden notwendigen Signalwege Ca^{2+} -Freisetzung oder cAMP-abhängige Leitfähigkeit beeinträchtigt.

4.2.5 Zusammenfassung: Einfluss der CBZ-Wirkung auf den transepithelialen Elektrolyttransport im Kolonepithel der Ratte

Aus den Ussing-Kammer Versuchen ist deutlich zu erkennen, dass CBZ in der Lage ist, die luminale Chloridsekretion dosisabhängig zu blockieren, jedoch keinen Einfluss auf den ENaC oder den CFTR hat. CBZ kann jedoch unter der Blockade von KCNQ1/KCNE3 auch eine Cl^- -Sekretion auslösen, die Ca^{2+} -vermittelt zu sein scheint. Die Kinetik der

inhibitorischen CBZ-Wirkung spricht für die Beeinträchtigung von second-messenger-Systemen wie cAMP, schließt aber eine Wirkung auf den basolateral cAMP-regulierten K^+ -Kanal nicht aus. CBZ ist im Vergleich zu Amilorid kein luminaler Kanalblocker im Kolon.

Der Kurvenverlauf des transepithelialen Potentials unter CBZ, der in den Messungen am Kolonepithel in der Ussing-Kammer beobachtet wurde, zeigt sowohl einen aktivierenden als auch einen inhibitorischen Effekt auf die zuvor stimulierte Cl^- -Sekretion. Unter den Bedingungen, dass sowohl cAMP als auch Ca^{2+} als second messenger in dem Messsystem zur Verfügung stehen, wird deutlich, dass CBZ in beide Systeme eingreift, wobei die inhibitorische die aktivierende Wirkung überlagert. Da der aktivierende Effekt von CBZ dem Kurvenverlauf von CCh ähnlich ist und dieser CCh-vermittelte Anstieg mit der Freisetzung von Ca^{2+} aus intrazellulären Speichern beschrieben wurde (Schultheiss *et al.*, 2005a), kann angenommen werden, dass CBZ Ca^{2+} freisetzt und einen Ca^{2+} -vermittelten K^+ -Kanal öffnet, der dadurch die Membran hyperpolarisiert und die Triebkraft für die apikale Cl^- -Sekretion liefert. Der inhibitorische Effekt von CBZ auf die Cl^- -Sekretion überlagert den aktivierenden, was durch die Reduktion von $[cAMP]_i$ erfolgen kann. Da CBZ auch neuronale Ca^{2+} -Kanäle inhibiert, könnte die verminderte Wirkung von CCh unter CBZ auch über eine Hemmung des kapazitiven Ca^{2+} -Einstroms erklärt werden. Hierzu wurden bisher allerdings keine Daten an entsprechenden TRP-Kanälen erhoben.

Es wäre auch denkbar, dass CBZ einen Einfluss auf den apikalen Ca^{2+} -abhängigen Cl^- -Kanal (Cl_{Ca}) nimmt, der auch im Rattenkolon funktionell und immunhistochemisch nachgewiesen wurde (Schultheiss *et al.*, 2005), allerdings praktisch keine Rolle für den Sekretionsstrom spielt. Das erste Mitglied aus der Familie der Cl_{Ca} (human Cl_{Ca1}) konnte auch im menschlichen Kolon kloniert und molekular sowie funktionell charakterisiert werden (Gruber *et al.*, 1998). Der Cl_{Ca} wird durch Ca^{2+} oder ATP aktiviert, ist aber nicht durch die PKA regulierbar und würde für einen Eingriff von CBZ in eine andere Signalkaskade als die der PKA sprechen.

Die Wirkung von lumenalem CBZ auf die Ca^{2+} -induzierte Cl^- -Sekretion wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Ausgeschlossen werden kann, dass CBZ einen Einfluss auf den basolateralen NKCC1 oder die Na^+/K^+ -ATPase hat, da bei deren Blockade der gesamte Elektrolyttransport zusammenbräche.

Transepitheliale Messungen an isoliert perfundierten Nierentubuli zeigten ebenfalls keine Beeinflussung des NKCC2 durch CBZ (Daten nicht gezeigt) und unterstützen diese Vermutung.

4.3 CBZ-Wirkung an isolierten Kolonkrypten

4.3.1 Verminderung der $[\text{cAMP}]_i$ durch CBZ

Die Daten der Experimente am intakten Epithel wären vereinbar mit verschiedenen Angriffspunkten von CBZ in der cAMP Signaltransduktionskette. CBZ könnte entweder über eine direkte Hemmung der PKA (Protein Kinase A), der AC (Adenylatzyklase) oder auch durch Stimulation der Phosphodiesterase auf die $[\text{cAMP}]_i$ wirken. Die Wirkung von CBZ auf $[\text{cAMP}]_i$ wurde in einer Zellkultur von C6-Zellen eines neuroepithelialen Hirntumors der Ratte untersucht. Dabei hat sich gezeigt, dass CBZ dosisabhängig die basale und die FSK-induzierte cAMP-Produktion in diesen Zellen hemmt (Chen *et al.*, 1996). Das geschieht nicht über das inhibitorische G-Protein, welches die AC reguliert. CBZ inhibiert die cAMP-Produktion scheinbar direkt an der AC und/oder indirekt über die nachfolgenden Faktoren in der Signalkaskade. CBZ hemmt die FSK-induzierte Phosphorylierung des CREB (cAMP response element binding protein), welches für die Aktivierung der AC notwendig ist, wobei CBZ nicht mit FSK um dessen Bindungsstelle konkurriert (Chen *et al.*, 1996).

Die inhibitorischen Effekte von CBZ auf die AC repräsentieren möglicherweise einen Mechanismus, über den CBZ die Freisetzung von Catecholaminen abschwächt und darum antikonvulsiv therapeutisch wirksam ist (Chen *et al.*, 1996). Dass CBZ die Catecholaminsekretion

inhibiert, indem CBZ mit nikotinergen Acetylcholinrezeptoren von Ionenkanälen interferiert, konnte *in-vitro* an einer Zellkultur von Nebennierenzellen gezeigt werden (Yoshimura et al., 1995).

Die antikonvulsive Wirkung kommt durch die Reduktion der intrazellulären cAMP-Konzentration zustande, die wiederum für die Regulation neuronaler Ionenkanäle entscheidend ist.

Auch bei der Untersuchung der $[cAMP]_i$ in isolierten Kolonkrypten hat sich gezeigt, dass CBZ zu einer Reduktion des cAMP-Gehaltes führt. Die Reduktion des $[cAMP]_i$ in den verschiedenen *in-vitro* Systemen scheint eine potentielle Wirkung von CBZ zu sein, durch die es seine therapeutische Wirksamkeit entfaltet. Im Falle der Epithelwirkung von CBZ würden also Transportprozesse, die cAMP-abhängig sind, beeinträchtigt werden. Hierzu zählen neben der Cl^- -Sekretion im Kolon die Na^+ -Resorption in der Niere sowie die Wasserresorption im Sammelrohr unter Kontrolle von ADH.

4.3.2 Induktion der $[Ca^{2+}]_i$ -Freisetzung durch CBZ

Wie schon die Ussing-Kammer Messergebnisse nahelegen, zeigt sich bei den Ca^{2+} -Messungen, dass unter CBZ eine intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung im Kolonepithel erfolgt, die mit der Wirkung des muskarinergen Agonisten Carbachol (CCh) vergleichbar ist. Das Ausmaß der $[Ca^{2+}]_i$ -Erhöhung durch CBZ fällt jedoch kleiner aus. Dieser Befund deckt sich mit der Wirkung von CBZ auf die Sekretion, die ebenfalls schwächer als die Wirkung von CCh war. In Nerven- und Muskelzellen gibt es die Ca^{2+} -induzierte Ca^{2+} -Freisetzung. Hier bewirkt der Ca^{2+} -Einstrom über die Zellmembran eine Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen in zytosolischen Speichern (ER) und führt damit zu einer Erhöhung von $[Ca^{2+}]_i$ aus zwei Quellen.

CBZ hemmt im ZNS Ca^{2+} -Kanäle, die in der Zellmembran sitzen und damit diesen Ca^{2+} -Anstieg triggern (Schirmacher *et al.*, 1993; Walden *et al.*, 1993). Während der epileptischen Aktivität von Neuronen kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_i$) (Wiemann et al., 1996) und zu einer Reduktion der extrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ($[Ca^{2+}]_e$) (Heinemann et al., 1977). Dieses System wird für die

Neurotransmitterfreisetzung während epileptischer Anfälle verantwortlich gemacht (Okada et al., 1998). Der Umverteilung von Ca^{2+} durch das ICRC-System wirkt CBZ durch die Blockade der spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle (VSCC) entgegen (Yoshida et al., 2007). Der Eintritt von Ca^{2+} aus dem Extrazellulärraum in Folge der Freisetzung von Ca^{2+} aus den intrazellulären Speichern hat den Namen ICRC (Ca^{2+} -release activated Ca^{2+} current) bekommen (Berridge, 1998). Bei der Ca^{2+} -Freisetzung in der Epithelzelle bewirkt zunächst die rezeptorvermittelte Bildung von IP_3 (Inositol-1,4,5-triphosphat) die Öffnung von Ca^{2+} -Kanälen des ER. Sie bilden die Ca^{2+} -Quelle für die Spitze des Transienten, der dann membranständige Ca^{2+} -Kanäle öffnet. Diese Kanäle tragen den weiteren Ca^{2+} -Einstrom, bilden das Plateau des Transienten und liefern indirekt Ca^{2+} für die Füllung der Speicher. Die Form des Ca^{2+} -Transienten in der Kolonepithelzelle und die Verminderung der CCh-Antwort unter CBZ wäre mit der Hemmung des ICRC zu vereinbaren, da der Transient kurz ist und kein Plateau enthält. In jedem Fall aber wirkt CBZ zunächst Ca^{2+} -agonistisch, möglicherweise sogar über den muskarinergen Rezeptor.

Von CCh ist bekannt, dass es die Cl^- -Sekretion durch das Öffnen von basolateralen Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen (16 pS) induziert (Bleich *et al.*, 1996; Warth *et al.*, 1999). Parallel kommt es zum verstärkten Einstrom von extrazellulärem Ca^{2+} (Matthews et al., 1989), da der Ca^{2+} -Einstrom auch durch das Membranpotenzial bestimmt wird (Leipziger et al., 1994).

In den vorliegenden Experimenten konnte beobachtet werden, dass CBZ epitheliale Ca^{2+} -Einstromkanäle (ICRC) hemmt (verminderte CCh-Antwort in Anwesenheit von CBZ) und das bedeutet, dass sowohl die $[\text{Ca}^{2+}]_i$ als second messenger für die Cl^- -Sekretion als auch die Triebkraft dafür indirekt betroffen sind.

Auch in einer experimentellen Studie an Blutkörperchen, die keine spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanäle exprimieren (Rink & Sage, 1990), konnte gezeigt werden, dass die akute Wirkung von CBZ in therapeutischen Konzentrationen zu einem Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Aktivität (Ulrich et al., 2003) führte. Der genaue Mechanismus konnte

nicht geklärt werden, aber es musste eine Beeinflussung des Phosphatidyl-Inositol-Regulationskreises beteiligt sein, der über IP₃ die Freisetzung von intrazellulärem Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern induziert (Berridge, 1993). Übertragen auf die Kolonepithelzelle könnte die transiente CBZ-Wirkung ihren Ausgang in einer IP₃-Erhöhung nehmen, der rezeptorunabhängig ist.

Ein weiterer Kandidat, den CBZ beeinflussen könnte, wäre der extrazelluläre Calcium Sensing Receptor (CaSR) (Riccardi *et al.*, 1995; Brown *et al.*, 1993; Hebert, 1996; Hebert *et al.*, 2004). Dieses Rezeptorprotein und dessen Transkripte wurden in Säugetieren, Vögeln und Fischen identifiziert (Cheng *et al.*, 2004). Der CaSR spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der Ca²⁺-Homöostase (Hofer & Brown, 2003). In der Niere kommt der CaSR sowohl in der apikalen als auch in der basolateralen Membran der verschiedenen Tubulussegmente vor (Hoenderop *et al.*, 2005). Der Rezeptor reguliert die renale Ca²⁺-Ausscheidung und verhindert das Auftreten einer Hypercalciämie, indem er den NKCC2 hemmt und die Ca²⁺-/Mg²⁺-Reabsorption vermindert (Ward & Riccardi, 2002).

Auch im Rattenkolon existiert der CaSR in der apikalen und basolateralen Membran (Cheng *et al.*, 2002). Der CaSR wird in Oberflächen- und Kryptzellen durch Ca²⁺, Gd³⁺ oder Antibiotika (Neomycin) aktiviert, deren Bindungen an den Rezeptor zu einem Anstieg der [Ca²⁺]_i führen (Cheng *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2002). Dieser Anstieg führt PKC-vermittelt zu einer Verminderung der cAMP- und cGMP-Produktion, welche wiederum die Hemmung der Flüssigkeitssekretion nach sich zieht. Der CaSR spielt somit eine sehr wichtige Rolle in der Absorption und Sekretion von Elektrolyten im Kolon und könnte demnach ein wichtiger Modulator bei der Prävention oder Behandlung von verschiedenen mit Diarrhö assoziierten Krankheiten, wie z.B. Cholera sein, bei denen eine erhöhte cAMP-Konzentration vorliegt (Cheng *et al.*, 2002). Zu der Funktionsweise von CaSR würden die Befunde dieser Arbeit passen:

CBZ führt in isolierten Kolonkrypten sowohl zu einem Anstieg von [Ca²⁺]_i als auch zu einer Verminderung von [cAMP]_i und aus den Daten der

in-vivo-Experimente an Ratten hat sich ergeben, dass CBZ zu einer Diurese und zu renalen Elektrolytverlusten führt. Damit ist es denkbar, dass CBZ in einer ähnlichen Weise wie der CaSR in die Flüssigkeitsregulation des Kolons eingreift.

4.3.3 Hyperpolarisation durch CBZ

Alle Daten aus den Patch-Clamp Messungen stammen von Kolonkrypten, die im whole-cell Modus untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigten, dass das Membranpotenzial der unstimulierten Krypten hauptsächlich durch die K⁺-Leitfähigkeit bestimmt (Ecke *et al.*, 1996b) wurde.

Unter FSK/IBMX depolarisierten die Krypten und der Leitwert nahm zu (Strabel & Diener, 1995; Warth *et al.*, 1999; Warth *et al.*, 1996) . Diesen Effekten liegt das zuvor beschriebene Öffnen von K⁺- und Cl⁻-Kanälen zugrunde. Da die Zunahme der Cl⁻-Leitfähigkeit über die der K⁺-Leitfähigkeit dominiert, kommt es zu einer Depolarisation (Bleich *et al.*, 1996; Greger *et al.*, 1997).

Unter der Applikation des muskarinergen Agonisten Carbachol hyperpolarisierte die Kolonkrypten kurzfristig, was auf das Öffnen der basolateralen Ca²⁺-abhängigen K⁺-Kanäle und der damit verbundenden Erhöhung der K⁺-Leitfähigkeit zurückzuführen ist (Bleich *et al.*, 1996; Warth *et al.*, 1999). Die luminale Cl⁻-Leitfähigkeit wird dadurch ebenfalls beeinflusst. Diese Vorgänge konnten sowohl am Rattenkolon (Bohme *et al.*, 1991) als auch am humanen Kolon (Mall *et al.*, 1998) nachgewiesen werden, ihr Anteil am Gesamtleitwert ist aber eher gering.

CBZ hyperpolarisierte die Zellen der Kolonkrypten in Anwesenheit von FSK/IBMX und reduzierte den Leitwert. Dieser Befund wäre am ehesten mit einer Hemmung der Cl⁻-Leitfähigkeit, z.B. indirekt über den Abfall von cAMP erklärbar, unterstützt von einer Aktivierung Ca²⁺-abhängiger K⁺-Kanäle. Im Vergleich zur CBZ-Wirkung in der Ussing-Kammer fiel die Wirkung im Patch-Clamp Experiment sehr gering aus. Eine Erklärung dafür wäre die Begrenzung des cAMP-Abfalls in Anwesenheit von IBMX.

4.4 Einfluss von CBZ auf den Metabolismus der Ratte

4.4.1 Metabolische Käfige und orale CBZ-Applikation:

Dosisfindung

Die Untersuchung auf metabolischen Käfigen birgt das Risiko von Artefakten, die nicht durch das Pharmakon selbst, sondern durch äußere Umstände bedingt sind. Aus diesem Grund wurden vor dem eigentlichen Experiment beide Versuchstiergruppen auf metabolischen Käfigen ohne Pharmakon untersucht. Die physiologischen Bereiche von täglicher Futter- und Wasseraufnahme einer adulten Ratte wurden vor der oralen Applikation von CBZ in beiden Versuchstiergruppen eingehalten. Die tägliche Futteraufnahme einer adulten Ratte liegt bei 5 g/100 g KG und die tägliche Trinkmenge bei 8-10 ml/100 g KG. Auch die täglichen Ausscheidungen der Urin- (8-10 ml/100 g KG) und Kotmengen (10-15 g, Feuchtgewicht) lagen im physiologischen Bereich (www.jhu.edu/animalcare/).

Diese Ergebnisse zeigen, dass die Tiere durch den Einsatz der metabolischen Käfige, keine Einschränkungen in ihren metabolischen Parametern hatten.

Eine Dosierung von 50 mg CBZ/kg KG/Tag wurde von den Tieren gut vertragen und resultierte in einer Plasma CBZ-Konzentration von ca. 14 µg/ml. Diese Konzentration lag im oberen therapeutischen Bereich von CBZ.

Auf eine orale Applikation von 100 mg CBZ/kg KG/Tag reagierten die Tiere trotz unveränderter Plasmaparameter mit verminderter Futteraufnahme und stark reduzierter Harnflussrate, was darauf hinwies, dass diese Dosis zu hoch gewählt war. Eine Erhöhung der CBZ-Dosis trug nicht zur weiteren Aufklärung der CBZ-Wirkung auf den Wasser- und Elektrolythaushalt bei, d.h. die beobachteten Veränderungen aus den Versuchen mit einer Dosierung von 50 mg CBZ/kg KG/Tag wurden mit einer höheren CBZ-Dosis nicht stärker, sondern stellten sich komplett anders dar. Diese Änderungen im Metabolismus der Ratten, die in den Bereich der Toxikologie gehen, sind in humanen Probanden nicht zu

finden, so dass auf weitere Untersuchungen metabolischer Parameter und auf eine Bestimmung der CBZ-Konzentration im Plasma bei dieser Dosierung verzichtet wurde.

4.4.2 CBZ induziert keine Hyponatriämie

Neben der antiepileptischen Wirkung von CBZ, führt es in Menschen zu zahlreichen Nebenwirkungen wie z.B. Schwindel, Ohnmacht und Hyponatriämie (Plasma $\text{Na}^+ < 135 \text{ mmol/l}$). Diese Nebenwirkungen treten in 33-50% der Fälle auf und sind meist transient und reversibel, wenn die Dosis von CBZ reduziert wird (Gandelman, 1994). Die Nebenwirkungen weisen daraufhin, dass CBZ nicht nur eine zentrale Wirkung hat, sondern auch mit dem Salz- und Wasserhaushalt des Körpers interferiert.

Die häufigste und potenziell gefährlichste Störung, die in Klinikpatienten bei der Behandlung mit dem Antiepileptikum CBZ auftritt, ist die Hyponatriämie (Verbalis, 2003). Sie entsteht fast immer durch eine gestörte Wasserausscheidung durch die Niere, wobei eine inadäquate GFR, eine defekte Na^+ -Rückresorption im distalen Nierentubulus und eine Hemmung der ADH-Sekretion als Ursachen gelten. Dabei sind Aldosteron und ADH (Canessa *et al.*, 1994; Snyder, 2002; Funder, 1993) Einflussfaktoren, die die Na^+ -Resorption im Körper hochregulieren.

In der Literatur wird seit Jahren kontrovers darüber diskutiert, wo genau CBZ oder das Keto-Analog Oxcarbazepin im Organismus eingreifen, um eine Hyponatriämie zu induzieren. (Diringer & Zazulia, 2006) und (Sachdeo *et al.*, 2002) vermuten, dass sie in der Niere entweder einen direkten Einfluss auf die Permeabilität des Sammelrohrs nehmen oder die Sensitivität im renalen Tubulussystem zu ADH erhöhen. Des Weiteren könnte CBZ einen Einfluss auf die Osmolalitätsmessung im Hypothalamus nehmen.

Ein Krankheitsbild, das als die häufigste Ursache einer Hyponatriämie in Zusammenhang mit ADH beschrieben worden ist, ist das SIADH-Syndrom (Syndrome of inappropriate antidiuretic hormone secretion). In diesem Krankheitsbild werden im Vergleich zur Plasmaosmolalität zu hohe Konzentrationen von ADH sekretiert. Das Hormon führt dazu, dass

vermehrt Wasser im Körper gehalten wird, so dass das Plasmavolumen ansteigt und die Serumnatriumkonzentration sinkt (Hyponatriämie durch endokrine Erkrankung).

Die in dieser Arbeit durchgeführten *in-vivo*-Versuche an Ratten zeigen eine klare Wirkung von CBZ auf den Salz- und Wassermetabolismus. Sie zeigen aber auch, dass es unter den verschiedenen Versuchsbedingungen zu keiner dauerhaften Verschiebung der Plasma-Elektrolytkonzentrationen (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^-) oder zu Störungen im Säure-Basen-Haushalt in der Ratte kommt.

Diese Ergebnisse zeigen weiter, dass das Wirkungsspektrum von CBZ und dessen Begleiterscheinungen im Menschen und in der Ratte z.T. unterschiedlich sein kann. Die gezielte Untersuchung des epithelialen Na^+ -Transportes über ENaC ergab keine direkte Wirkung von CBZ.

Die Ratten behielten die Fähigkeit, Na^+ über den GIT zu resorbieren. Dieser *in-vivo* Befund unterstützte die *in-vitro* Daten, die zeigten, dass eine akute Applikation von CBZ an Kolongewebestücken keinen Einfluss auf den epithelialen Natriumkanal (ENaC) und somit auf den äquivalenten Kurzschlussstrom in der Ussing-Kammer hatte. Da der ENaC von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Na^+ -Homöostase im Körper ist (Rossier *et al.*, 2002; Garty & Palmer, 1997), könnte eine Hemmung des ENaC, eine durch CBZ induzierte Hyponatriämie im humanen Probanden erklären.

Allerdings war die Plasmaosmolalität in den CBZ-behandelten Tieren erhöht, was ein Hinweis auf eine gestörte (verminderte) ADH-Ausschüttung aus dem Hypophysenhinterlappen sein könnte. Da der Effekt von ADH auf den Wassertransport über V2-Rezeptoren vermittelt wird (Tian *et al.*, 2004), könnte CBZ ebenfalls auf diese Einfluss nehmen, indem es z.B. die Bindung von ADH an den Rezeptor inhibiert. CBZ würde so zu einer Resistenz der renalen V2-rezeptorregulierten Nierensegmente für ADH führen. Diese Resistenz liegt dem Krankheitsbild des renalen Diabetes insipidus zugrunde (Nielsen *et al.*, 1999), bei dem der Defekt durch eine Mutation des V2-Vasopressin-Rezeptorgens zustande kommt (Bichet, 1996).

4.4.3 CBZ führt zur Diurese und zu renalen Elektrolytverlusten

Eine Störung in der Regulation des Volumenhaushaltes könnte in Verbindung mit ADH durch die Diurese und Salurese begründet sein, die nach einer CBZ-Behandlung der Ratten unter den verschiedenen Versuchsbedingungen beobachtet werden konnte.

Wasser wird, getrieben von der V2-rezeptorregulierten Na⁺-Resorption, im dicken Teil der aufsteigenden Henle Schleife, durch luminale Wasserkanäle (Aquaporin-2) im Sammelrohr rückresorbiert. Diese ermöglichen und begrenzen den Transport. AQP-2 ist unter Standardbedingungen in intrazellulären Vesikeln eingeschlossen und wird bei Bedarf in die luminale Membran im Sammelrohr der Niere eingebaut. Der AQP-2-Kanal ist der einzige Kanal zur Wasserrückresorption (Urinkonzentrierung), der ausschließlich durch ADH reguliert wird.

ADH kann die Wasserpermeabilität im Sammelrohr der Niere auf unterschiedliche Weise regulieren. Die akute Erhöhung der Permeabilität geschieht innerhalb weniger Minuten und umfasst die Exocytose von AQP-2 Kanälen aus den intrazellulären Vesikeln in die luminale Plasmamembran der Sammelrohrzellen. Die Zirkulation von AQP-2 (Shuttle Hypothese) wird von Nielsen et al. (2002) und (Brown *et al.*, 1998) detailliert beschrieben. Dabei bindet ADH an V2-Rezeptoren, die wiederum mit einer Adenylatcyklase (AC) verbunden sind, so dass letztendlich cAMP als second messenger fungiert (Simonds, 1999). D.h., dass es durch einen intrazellulären Anstieg von cAMP zu einem Anstieg der luminalen Wasserpermeabilität und damit zur Antidiurese kommt. Der zweite Angriffspunkt ist die Bereitstellung von AQP-2-Protein durch Transkriptionsregulation und Translation. (Ecelbarger *et al.*, 1997) nehmen an, dass die Abnahme von intrazellulärem cAMP zu einer verminderten Expression von AQP-2 in diuretischen Störungen (Polyurie) beiträgt.

Da das AQP-2-Gen ein cAMP regulatorisches Element (CRE) in seiner Sequenz enthält, wird angenommen, dass Transkriptionsregulation an der ADH-abhängigen Erhöhung der AQP-2-Expression im Sammelrohr beteiligt ist (Uchida *et al.*, 1994). Diese Vermutung wird u.a. von (Klussmann *et al.*, 2000; Hozawa *et al.*, 1996) bestätigt, die zeigen

konnten, dass das cAMP-abhängige Protein CREB (cAMP-responsive element binding protein) durch PKA phosphoryliert wird und somit zur Langzeitregulation der AQP-2 Expression beiträgt.

Die Diurese, die in der vorliegenden Arbeit an Ratten nach einer durchgeführten CBZ-Therapie auftrat, und die gemessene Reduktion von cAMP in isolierten Kolonkrypten könnten die Hypothese stützen, dass die renale Wirkung von CBZ in der Ratte über eine Verminderung von cAMP vermittelt wird.

Die Elektrolyt- und Wasserrückresorption im Kolon spielt ebenfalls eine Rolle für die Aufrechterhaltung der Volumenhomöostase des Körpers. Da das Kolonepithel wie das Nierenepithel zahlreiche Transporter besitzt, die für die Resorption von Elektrolyten verantwortlich sind (siehe 1.1.3), wurde es nach einer CBZ-Behandlung in der Ussing-Kammer hinsichtlich seiner Transporteigenschaften untersucht. Es wäre durchaus denkbar, dass diese durch die CBZ-Behandlung der Ratten ursächlich für die Störung oder im Rahmen einer Kompensation verändert sein könnten. Die Ussing-Kammer Experimente wiesen jedoch keine Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen in Bezug auf die Resorption von Na^+ und die Sekretion von K^+ und Cl^- auf. Nur die stimulierbare cAMP-abhängige Cl^- -Sekretion war leicht erhöht. Dies könnte reaktiv auf eine kontinuierliche Unterdrückung der cAMP-Bildung durch CBZ in der Vorbehandlung bedingt sein (während des Experimentes war CBZ ausgewaschen). Da die Ussing-Kammer Untersuchungen immer am Versuchsende, nach einer mehrtägigen Behandlung mit CBZ, durchgeführt wurden, können mögliche Störungen im transepithelialen Transport in den ersten Versuchstagen nicht ausgeschlossen werden.

Die Regulation der Salz- und Wasserhomöostase im Körper ist aufgrund der verschiedenen Einflussfaktoren wie Aufnahme und Abgabe von Wasser- und Elektrolyten ein dynamischer Vorgang. Dadurch spielt der aktuelle Volumenstatus des Körpers eine ausschlaggebende Rolle für die verschiedenen Regulationsmechanismen wie z.B. Transport, Durst oder Appetit. Der aktuelle Volumenstatus des Körpers könnte für die Wirkungsweise von CBZ entscheidend sein und würde eine Erklärung für

die unterschiedliche Wirkungsweise von CBZ in Menschen (antidiuretisch) und Ratten (diuretisch) liefern.

Deshalb wurde die Behandlung der Ratten mit CBZ (50 mg/kg KG/Tag) in Abhängigkeit zu einem akut diuretischen und antidiuretischen Zustand untersucht.

4.4.3.1 Akute Wasserbelastung

In dieser Arbeit wurden die Ratten durch eine akute Wasserbelastung (p.o.) von 12 ml/kg KG in einen diuretischen Zustand überführt und die Wirkung von CBZ unter dieser Bedingung analysiert.

Im Vergleich zu den Kontrolltieren reagierten die CBZ-Tiere mit einer verstärkten Diurese, die schon 2 h nach der Volumenbelastung deutlich ausgeprägt war und bis zu 21 h danach anhielt. Der diuretische Zustand war an der erhöhten Urinflussrate und an der verminderten Urinosmolalität zu erkennen. Die renalen Ausscheidungen von Na^+ , K^+ und Ca^{2+} waren 5 h nach der Wasserbelastung erhöht, nach 21 h jedoch reduziert, welches auf einen einsetzenden Kompensationsmechanismus schließen lässt. Die CBZ-Tiere konnten durch die Reduktion der renalen und fäkalen Elektrolytausscheidungen am Ende des Tages eine ausgeglichene Elektrolytbilanz verzeichnen. Die gewählte experimentelle Wasserbelastung war relativ gering.

Die Kontrolltiere reagierten auf die akute Wasserbelastung mit keinem Anstieg der Wasserdiurese. Bereits unter diesen Bedingungen verdeutlichte sich die diuretische Wirkung von CBZ.

Auffallend blieb während der ganzen Behandlungsdauer jedoch, dass die Ratten unter CBZ auch in Abwesenheit einer akuten Wasserbelastung nicht in der Lage waren, ihren Urin in angemessener Weise zu konzentrieren. Im Vergleich dazu konzentrierten die Kontrolltiere ihren Urin um das 4-fache.

Auf den ersten Blick stehen die diuretischen Wirkungen von CBZ im Widerspruch zu einem Einsatz von CBZ beim Menschen als Antidiuretikum bei der Behandlung von Diabetes insipidus (Braunhofer & Zicha, 1966b). Allerdings steht in diesem Fall als Ausgangspunkte eine

Erkrankung, bei der ein Mangel an ADH-Hormon besteht, der möglicherweise durch CBZ günstig beeinflusst wird und die diuretische Wirkung bei weitem übersteigt.

Die in der Literatur berichteten Studien zur klinischen und tierexperimentellen Wirkung von CBZ werden sehr unterschiedlich interpretiert und erlauben keine klaren Aussagen über die genauen Mechanismen. Gemeinsam ist allen Studien eine ADH-artige Wirkung von CBZ.

Die Studie von (Soelberg & Hammer, 1984) beschreibt den Einfluss von CBZ (600-800 mg/Tag) unter einer akuten Wasserbelastung (20 ml/kg KG) auf den Metabolismus von sieben Patienten. Sie zeigt ebenfalls auf, dass die Patienten während der CBZ-Behandlung die zugeführte Wasserbelastung nicht ausscheiden konnten, dass der Quotient von Urin- und Plasmaosmolalität höher und dass die Freiwasser-Clearance niedriger als in den Kontrollpatienten war.

Klinische Studien über CBZ-Applikationen an gesunden humanen Probanden zeigten aber auch, dass CBZ im therapeutischen Bereich (2-14 mg/l) zu keiner Verschiebung der Elektrolyte, der Osmolalität und der ADH-Konzentration im Plasma führte (Stephens et al., 1978). Allerdings war in dieser Studie die Urinausscheidung und die Freiwasser-Clearance nach einer Wasserbelastung (20 ml/kg KG) erniedrigt und die Urinosmolalität erhöht. Die Plasma ADH-Konzentration sank nach der Wasserbelastung. Die Autoren waren der Meinung, dass eine CBZ-Behandlung die Sensitivität der Osmorezeptoren zu ADH herabsetzt (Steilheit der ADH-Antwort), so dass sie z.B. bei einer Wasserbelastung zu viel ADH sekretieren und bei einer Dehydratation zu wenig ADH freisetzen.

Es gab in der Studie von (Soelberg & Hammer, 1984) keinen Hinweis darauf, dass CBZ die ADH-Sekretion stimulierte. (Stephens et al., 1978) sowie (Gold et al., 1983) und (Thomas et al., 1978) vermuteten, dass CBZ die Schwelle der Osmorezeptoren neu eingestellt und die renale Sensitivität zu ADH erhöht hatte. Sie setzten eine direkte Interaktion von CBZ in der Niere voraus bzw. vermuteten, dass CBZ den renalen Effekt

von ADH z.T. potenzieren konnte. Diese Hypothesen wurden von (Meinders *et al.*, 1974) und (Wales, 1975) unterstützt. (Kimura *et al.*, 1974) hatten den Verdacht, dass die antidiuretische Wirkung von CBZ bei der Behandlung von Patienten mit Diabetes insipidus durch die erhöhte Ausschüttung von ADH zustande kommt und dass die Patienten deshalb nicht in der Lage waren, die Wasserlast (20 ml/kg KG) auszuscheiden. Der Anstieg von ADH im Plasma durch CBZ wurde von (Smith *et al.*, 1977) bestätigt. Es existieren aber auch Artikel, in denen aufgeführt wird, dass CBZ eine Reduktion des ADH-Spiegels im Plasma von Patienten hervorruft (Stephens *et al.*, 1978; Gold *et al.*, 1983).

Die zitierten klinischen Befunde widersprechen den Beobachtungen, die an Wistarratten in dieser Arbeit gemacht wurden. Diese Tiere reagierten auf eine CBZ-Applikation in allen Versuchen mit einer Diurese und einer Abnahme der Urinosmolalität. Ein Aspekt, der bisher in den Studien nicht berücksichtigt wurde, ist das Zusammenspiel von Osmo- und Volumenregulation. Die Freisetzung von ADH und die Wirkung auf dessen Gentranskription steht unter der Kontrolle von Osmo- und Volumenrezeptoren (Arima *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 1973; Stricker & Verbalis, 1986), wobei sie eine unterschiedliche Sensivität besitzen. Während die Osmoregulation so genau ist, dass eine Änderung der Osmolalität um 1% eine Wirkung auf die Freisetzung und Gentranskription von ADH hat, ist die Messung des Blutvolumens über Volumenrezeptoren unempfindlicher. Sie reagiert erst bei einer Abnahme im Plasmavolumen zwischen 10-20% (Dunn *et al.*, 1973; Kakiya *et al.*, 2000; Stricker & Verbalis, 1986).

Würde CBZ das Verhältnis in diesen beiden Regulationswegen beeinflussen, hätte der Ausgangszustand des Volumenhaushaltes einen Einfluss auf die Wirkung. Diese Parameter wurden aber in keiner Studie berücksichtigt.

4.4.3.2 Akute Wasserrestriktion

Um den Einfluss von CBZ an Wistarratten in dieser Arbeit unter einem antidiuretischen Gesichtspunkt zu betrachten, wurde eine Wasserrestriktion (10 h) vor der Behandlung mit CBZ durchgeführt.

Generell sollte eine Wasserrestriktion zu einer Steigerung der ADH-Freisetzung führen, um den AQP-2-Einbau in der Niere und somit die Wasserrückresorption zu induzieren. Eine reduzierte Harnflussrate und die Ausscheidung eines konzentrierten Urins sollten als Gegenregulation auf eine Wasserrestriktion beobachtet werden können.

Diese Kompensationsmechanismen des Körpers auf eine Wasserrestriktion konnten in dieser Arbeit zu Beginn der Wasserrestriktion (5 h) und vor der Behandlung mit CBZ an den Ratten beobachtet werden. Sie reagierten mit einer Verminderung der Harnflussrate, einer Reduktion der ausgeschiedenen Urinmenge und mit einer Erhöhung der Urinosmolalität.

Nach der oralen CBZ-Applikation (50 mg/kg KG) und fortlaufender Wasserrestriktion für weitere 5 h zeigten sich Unterschiede in der Kompensation der metabolischen Störung zwischen den Kontroll- und den CBZ-Tieren. Während die Kontrolltiere ihre Harnflussrate und die Urinausscheidung weiter reduzierten, schafften die CBZ-Tiere diese Art der Kompensation nicht und reagierten mit einer verstärkten Diurese (Wasserdiurese), renalen Elektrolytverlusten (Na^+ , K^+ und Ca^{2+}) und im Vergleich zu den Kontrolltieren mit einer weiteren Reduktion der Urinosmolalität. Die Beobachtungen zeigen, dass der Regulationsmechanismus zur Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolythaushaltes durch die CBZ-Behandlung gestört war.

Die Natriurese zusammen mit der Diurese und der verminderten Urinosmolalität entspricht einem Phänomen, das in der Literatur als „renal escape from antidiuresis“ bezeichnet wird. Damit ist gemeint, dass es trotz hoher ADH-Konzentrationen zu einer vermehrten Urinflussrate und einer abnehmenden Urinosmolalität kommt. Die Natriurese und die zusätzliche Diurese sorgen dafür, dass sich das extrazelluläre Flüssigkeitsvolumen, welches zuvor aufgrund hoher ADH-Konzentrationen angestiegen war,

stabilisieren kann (Verbalis, 2006). Dabei wurde gezeigt, dass die verminderte Expression von AQP-2 im Sammelrohr durch eine Abnahme der transkriptionellen AQP-2-Synthese zustande kam (Ecelbarger *et al.*, 1997), die von einer Reduktion der V2-Rezeptorexpression (Tian *et al.*, 2000) und einer Reduktion von cAMP (Ecelbarger *et al.*, 1998) begleitet wurde.

Die Reduktion von cAMP durch CBZ konnte in dieser Arbeit an isolierten Kolonkrypten bestätigt werden und würde ebenfalls für einen verminderten Einbau der AQP-2-Kanäle in die Plasmamembran der Niere sprechen. Damit könnte keine adäquate Wasserrückresorption stattfinden und die CBZ-behandelten Tiere bleiben diuretisch.

In der Literatur wird beschrieben, dass eine Wasserrestriktion > 24 h bei Ratten normalerweise zu einer Zunahme der AQP-2 Transkripte führt, die sehr eng mit der Proteinsynthese gekoppelt ist (Michimata *et al.*, 2000). Dieser Mechanismus ist an der Langzeitregulation der Wasserpermeabilität in der Niere beteiligt (Michimata *et al.*, 2000). Die Gentranskription von ADH steigt in chronisch dehydrierten Ratten (72 h) auch durch die Abnahme im Plasmavolumen an, selbst wenn kein Anstieg in der Plasmaosmolalität vorangeht. Daraus lässt sich schließen, dass die Signaltransduktionswege in der Regulation der ADH Gentranskription für die Volumen- und Osmoregulation unterschiedlich sind (Hayashi *et al.*, 2006) und passt zu der unterschiedlichen Sensivität der Osmo- und Volumenregulation wie sie bereits von (Arima *et al.*, 1999; Dunn *et al.*, 1973; Stricker & Verbalis, 1986) beschrieben wurde.

Dieser Befund passt ebenfalls ebenfalls zu der Beobachtung, dass eine Hypo-Osmolalität selbst nicht für eine reduzierte Expression von V2-Rezeptoren oder AQP-2 nötig ist (Verbalis, 2006). Auch (Storm *et al.*, 2003) konnten in einer Primärkultur mit Zellen der inneren Medulla des Sammelrohrs zeigen, dass die Kurzzeitregulation der AQP-2 Expression nicht von der Osmolalität abhängig war, dass jedoch eine isolierte Erhöhung extrazellulären NaCl-Konzentration deren Expression erhöhte. (Murase *et al.*, 1999) vertreten ebenfalls die Meinung, dass die AQP-2-Expression in der Niere während des „renal escape from antidiuresis“ nicht

an die Plasma- und Gewebeosmolalität gekoppelt ist, sondern von Faktoren reguliert wird, die an der Zunahme des Extrazellulärvolumens beteiligt sind. Mögliche Einflussfaktoren wären Prostaglandine oder Stickstoffoxide (Noland *et al.*, 1992; Garcia *et al.*, 1996).

Bei dem Vergleich von den Ergebnissen aus den *in-vivo*-Versuchen dieser Arbeit mit den Literaturstudien wird deutlich, dass die pharmakologische Wirkung von CBZ multifaktoriell ist und möglicherweise einen Einfluss sowohl auf die ADH-abhängigen Osmoregulationsprozesse als auch auf die Volumenregulationsprozesse im Körper nimmt.

4.4.4 ADH-unabhängige Wirkung von CBZ

Um zu klären, ob ADH bei der durch CBZ ausgelösten Diurese in den Ratten eine Rolle spielt, wurde ein potenter V2-Antagonist (Satavaptan) in Kombination mit CBZ im narkotisierten Tier eingesetzt.

V2-Antagonisten werden bei der Therapie verschiedener Erkrankungen wie Leberzirrhose (Bichet *et al.*, 1982; Schrier, 1988) oder SIADH (Saito *et al.*, 1997) eingesetzt, bei denen eine verstärkte Wasserretention z.B. zu Hyponatriämie führt. Die erste klinische Studie an Menschen bei der Behandlung von SIADH mit dem V2-Antagonisten OPC- 31260 wurde von (Saito *et al.*, 1997) erfolgreich durchgeführt. Auch andere V2-Antagonisten wie Lixivaptan, Conivaptan und Tolvaptan korrigieren eine Hyponatriämie effizient und sicher, wobei diese klinischen Studien nur 4-28 Tage lang durchgeführt wurden und es bis jetzt keine Langzeitstudien gibt (Palm *et al.*, 2006).

Bei dem in dieser Arbeit durchgeführten *in-vivo* Versuch an Ratten mit dem V2-Antagonisten Satavaptan unter dem Einfluss von CBZ konnte an Ratten gezeigt werden, dass CBZ in An- und Abwesenheit von Satavaptan zu einem deutlichen Anstieg der Diurese führte. Aufgrund der Additivität der beiden Substanzen kann geschlossen werden, dass neben einem potenziellen Angriff im ZNS zumindest ein Teil der Wirkung von CBZ über einen Wirkungsmechanismus in der Niere, unabhängig von ADH erfolgte. Diese Schlussfolgerung wurde von einem weiteren *in-vivo* Versuch dieser Arbeit, bei dem die Plasma ADH-Konzentration 5 h nach einer

CBZ-Behandlung gemessen wurde, unterstützt. Darin zeigte sich kein Unterschied in der ADH-Plasmakonzentration zwischen den Kontroll- und den CBZ-behandelten Ratten. Diese Beobachtungen widersprechen der These, dass CBZ im ZNS wirkt und somit einen Einfluss auf die Osmoregulation im Hypothalamus nimmt. Diese These findet sich in Studien wieder, die im Review von Gandelman (1994) aufgeführt sind. Die Beobachtungen sind auch nicht mit den Befunden an einem Modell des Diabetes insipidus vereinbar: In Brattleboro-Ratten, bei denen die Synthese für ADH gestört ist, hatte die CBZ-Applikation keinen Einfluss auf die Diurese und auf die Urinosmolalität, während die Wistarratten auf eine CBZ-Behandlung mit einer reversiblen Reduktion der Diurese und einem Anstieg der Urinosmolalität reagierten (Uhlich *et al.*, 1972).

In der Literatur gibt es ebenfalls die Hypothesen, dass es einen ADH-unabhängigen Mechanismus zur Regulation der Wasserpermeabilität geben muss (Lankford *et al.*, 1991; Ecelbarger *et al.*, 1998), denn auch bei einer Abnahme der ADH-Konzentration können die AQP-2 Kanäle (Proteine) in der apikalen Membran verteilt werden (Marple *et al.*, 1998). Mit Hilfe des V2-Antagonisten OPC-31260 konnte an Ratten gezeigt werden, dass die AQP-2 Steuerung auch funktionierte, wenn der V2-Rezeptor blockiert war und die Autoren schlossen daraus, dass es noch einen weiteren Regulator der AQP-2 Expression in der Niere geben muss. Ein Favorit wären die Prostaglandine. Sie sind in der Lage, AQP-2-Endocytose aus der apikalen Plasmamembran zu stimulieren, ohne dass eine Dephosphorylierung von AQP-2 für diesen Vorgang notwendig ist (Maeda *et al.*, 1992; Zelenina *et al.*, 2000). Maeda *et al.* (1992) weisen darauf hin, dass Prostaglandin E₂ (PGE₂) in Anwesenheit von ADH keinen Effekt auf die cAMP Produktion in den primär kultivierten Hauptzellen der inneren Nierenmedulla von Ratten hat. PGE₂ interagiert mit vier E-prostanoid (EP) Rezeptorsubtypen (EP₁₋₄), von denen der EP₁ im Sammelrohr und in osmotisch sensitiven Bereichen des Hypothalamus exprimiert ist und bei der Urinkonzentrierung eine entscheidende Bedeutung spielt (Kennedy *et al.*, 2007). PGE₂ und Dopamin sind in der Lage, wenn die cAMP-Produktion im Vorfeld ansteigt, die AQP-2 Kanäle

zu internalisieren. Hierfür ist es nicht notwendig, dass eine Dephosphorylierung des Kanals stattfindet. Phosphorylierung (an S256 im COOH-Terminus) durch die PKA ist aber zur Exocytose von AQP-2 in die apikale Membran des Sammelrohrs entscheidend (Nejsum *et al.*, 2005).

Die Wirkungsweisen von PGE₂ und ADH scheinen gegensätzlich zu sein und ihre bidirektionalen Regulation der Wasserpermeabilität im Sammelrohr konnte sowohl in Ratten und Kaninchen (Nadler *et al.*, 1992; Schuster, 1985) als auch in Menschen (Dixey *et al.*, 1986) beobachtet werden. Die Prostaglandine der Niere könnten auch eine Rolle bei der ADH-unabhängigen Wirkung von CBZ spielen.

Ein potenter Marker für die Diagnose von Störungen in der Wasser-Homöostase in Zusammenhang mit der CBZ-Therapie könnte die AQP-2 Ausscheidung sein (Saito *et al.*, 1998; Kanno *et al.*, 1995). Die Ausscheidung für AQP-2 ist positiv mit der Urinosmolalität korreliert und zwischen Männern und Frauen nicht unterschiedlich (Rai *et al.*, 1997). Sie ist proportional zu der Menge in der apikalen Plasmamembran der Sammelrohrzellen. Dies gibt zwar keinen Aufschluss über die Gesamtexpression in der Niere (Rai *et al.*, 1997; Wen *et al.*, 1999), ermöglicht jedoch eine Einschätzung der ADH-unabhängigen kurzfristigen CBZ-Wirkung über die AQP-2 Expression.

Es besteht jedoch weiterhin die Frage, wo genau CBZ oder das Keto-Analog Oxcarbazepin im Organismus eingreifen, um eine Hyponatriämie zu induzieren. (Diringer & Zazulia, 2006) und (Sachdeo *et al.*, 2002) vermuten, dass sie in der Niere entweder einen direkten Einfluss auf die Permeabilität des Sammelrohrs nehmen oder die Sensitivität im renalen Tubulussystem zu ADH erhöhen.

4.4.5 Vergleich der CBZ-Wirkung zwischen Mensch und Ratte

Das Wirkungsspektrum von CBZ und dessen Begleiterscheinungen scheinen im Menschen und in der Ratte z.T. unterschiedlich und widersprüchlich zu sein. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Elektrolyt- und Volumenstörung durch CBZ-Therapie bei der Ratte im Gegensatz zum Menschen zu keiner Hyponatriämie führt.

Die unterschiedlichen Beobachtungen in den verschiedenen metabolischen Parametern legen nahe, dass die pharmakologische Wirkung von CBZ multifaktoriell ist und dass der Volumenstatus des Organismus zu Beginn der CBZ-Therapie eine entscheidende Rolle spielt. Die Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Körperhomöostase in Bezug auf den Wasser- und Elektrolythaushalt beinhalten ein Zusammenspiel verschiedener Faktoren. Eine wichtige Rolle spielt ADH sowie verschiedene gewebespezifische epitheliale Transportsysteme für Ionen und Wasser (AQP-2), die wiederum durch second messenger (cAMP, Ca^{2+}) reguliert werden. Von entscheidender Bedeutung ist ebenfalls die Osmolalitätsmessung im Hypothalamus.

Die Komplexität, die sich aus der Vielfalt der CBZ-Wirkungen ergibt, erlaubt keine direkten Übertragungen zur Vorhersage von CBZ-Wirkungen zwischen Ratte und Mensch. Der Einblick in die zu Grunde liegenden Mechanismen erlaubt aber den Einsatz verschiedener diagnostischer Maßnahmen bei der Behandlung von Patienten mit CBZ, um rechtzeitig eine Nebenwirkung von CBZ zu erfassen und ggf. die Dosis anzupassen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Wirkung des Antiepileptikums Carbamazepin (CBZ) auf den Wasser- und Elektrolythaushalt der Ratte untersucht. CBZ blockiert neuronale spannungsgesteuerte Na^+ -Kanäle, um die durch die neuronale Übererregbarkeit ausgelösten Krampfanfälle (Epilepsie) zu unterbrechen. In 48% der Fälle tritt, meist asymptomatisch, eine Hyponatriämie als Begleiterscheinung der Therapie auf. Die Ursachen für deren Entstehen sind unbekannt. Die Aufklärung der zu Grunde liegenden Mechanismen ist von hoher Bedeutung, da Hyponatriämie zum Therapieabbruch zwingt und lebensbedrohlich sein kann.

In der Literatur wird seit Jahren diskutiert, ob die Hyponatriämie durch eine Sollwert-Verstellung der Osmorezeptoren im Hypothalamus zustande kommt oder ob Störungen in anderen Organen (z.B. der Niere, dem Verdauungstrakt) vorliegen.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die Wirkung von CBZ auf den epithelialen Transport zu analysieren. Mit Ussing-Kammer Messungen *in-vitro* an isolierten Kolongewebestücken konnte erstmals gezeigt werden, dass CBZ auch direkt auf Epithelien wirkt. Es führte zu einer dosisabhängigen Inhibition der luminalen, cAMP-abhängigen Chloridsekretion (IC_{50} : 26 μM im therapeutisch wirksamen Bereich). Unter cAMP-Stimulation konnte initial eine kurzfristige Aktivierung beobachtet werden. Diese Wirkung ähnelte in ihrem Verlauf dem von Carbachol (CCh), einem Agonisten, der die intrazelluläre Ca^{2+} -Aktivität erhöht. Schließlich war die durch CCh ausgelöste Aktivierung der Cl^- -Sekretion in Anwesenheit von CBZ deutlich gehemmt. Die Analyse der zellulären Mechanismen der CBZ-Wirkung ergab eine Verminderung der cAMP-Konzentration und eine kurzfristige Steigerung der Ca^{2+} -Aktivität. Im zeitlichen Verlauf trat der aktivierende Effekt durch CBZ aufgrund der raschen Freisetzung von Ca^{2+} aus den internen Ca^{2+} -Speichern vor dem inhibitorischen Effekt auf. CBZ hatte keine direkte Wirkung auf die am Transport beteiligten Ionenkanäle ENaC und CFTR.

Die Untersuchungen der Membranpotenziale und der Leitwerte mit der Patch-Clamp Technik zeigte eine Hyperpolarisation einhergehend mit einer Abnahme des Leitwertes unter CBZ. Die *in-vitro* Befunde ergaben eine klare Wirkung von CBZ auf die Epithelfunktion, die in die cAMP- und Ca^{2+} -vermittelte Regulation des epithelialen Transportes eingreift.

Auf diesem Hintergrund wurde im zweiten Teil dieser Arbeit die Wirkung von CBZ auf den Wasser- und Elektrolythaushalt der Ratte *in-vivo* charakterisiert. Interessanterweise zeigten die Messungen, dass CBZ in der Ratte ein unterschiedliches Wirkungsprofil im Vergleich zum Menschen hatte. Während beim Menschen die Hyponatriämie und eine Wasserretention im Vordergrund stehen, kam es bei den Tieren zu einem kombinierten Verlust von Salz und Wasser, die Plasmaosmolalität war schließlich erhöht. Ratten reagierten auf eine orale CBZ-Behandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren sowohl unter Kontrollbedingungen als auch unter Wasserbelastung und unter Dehydratation diuretisch (Wasserdiurese). Der Elektrolytverlust unter CBZ konnte von den Tieren bereits innerhalb eines Tages kompensiert werden. Schließlich wurde mit Hilfe des spezifischen ADH V2-Antagonisten Satavaptan überprüft, ob die CBZ-Wirkung auf den Wasser- und Elektrolythaushalt wesentlich von der Epithelwirkung von CBZ abhängt. Additivität zur Satavaptanwirkung und der fehlende Einfluss auf die ADH-Konzentration legen nahe, dass die Wirkung von CBZ auf den Wasser- und Salzhaushalt zumindest in der Ratte über einen renalen Angriffspunkt erfolgt, der unabhängig von einer zentralen Änderung der ADH-Freisetzung ist.

Die Unterschiede in der CBZ-Wirkung zwischen Mensch und Ratte ergeben sich mit großer Wahrscheinlichkeit aus den vielfältigen Angriffspunkten von CBZ und den unterschiedlichen Kompensationsmöglichkeiten der Organismen.

Die vorliegenden Daten zeigen erstmals, dass eine wesentliche Nebenwirkung von CBZ auf den Salz- und Wasserhaushalt durch epithelialen Angriff der Substanz unabhängig von ihrer ZNS-Wirkung erfolgen kann.

6 Summary

The present work describes the effects of the antiepileptic drug carbamazepine (CBZ) on salt- and water metabolism in rat. CBZ is an antiepileptic drug and it inhibits neuronal voltage gated Na^+ channels to interrupt seizures (epilepsy) caused by neuronal hyper excitability. Mostly without symptoms, hyponatremia is a side effect of therapy in 48% of treated patients. The reasons for its development are unknown. However, the knowledge about the underlying mechanisms is of high relevance since hyponatremia requires interruption of therapy and can be life threatening.

In literature, it is controversially discussed whether hyponatremia is caused by a shift in hypothalamic set point for osmosensing, or if the underlying mechanisms are located in other organs like the kidney or gastrointestinal tract.

The aim of the present study was to characterize the effect of CBZ on epithelial transport. *In vitro*, in Ussing chamber experiments on isolated colon mucosa it was shown for the first time that CBZ was able to act directly on epithelia. It caused inhibition of cAMP dependent Cl^- secretion in a concentration dependent manner. The IC_{50} of $26\mu\text{M}$ was in the therapeutic concentration range. In cAMP stimulated colon epithelium CBZ caused a transient stimulation of secretion. The effect was similar in kinetics compared to the effect of CCh. In addition, CBZ attenuated the CCh dependent activation of Cl^- secretion significantly. Analysis of cellular mechanisms revealed the reduction of cellular cAMP concentration and a transient increase in Ca^{2+} activity. The sequence was activation by CBZ as a result of rapid Ca^{2+} release from intracellular stores, followed by the inhibitory effect via cAMP decrease. CBZ did not act via direct blockade of the ion channels ENaC and CFTR which are involved in epithelial transport. Measurements of membrane voltage and conductance by patch clamp technique showed hyperpolarisation accompanied by a reduction of conductance in the presence of CBZ. In summary the findings *in vitro* clearly indicate an epithelial action of CBZ which interferes with the cAMP

and Ca^{2+} second messenger systems, involved in epithelial transport regulation.

On this background the second part of the work characterized the effect of CBZ on salt- and water balance in rat *in vivo*. Interestingly, the measurements showed an action profile of CBZ which was different from the effects in humans. In human therapy, hyponatremia and water retention are predominant symptoms while in rat, a combined loss of salt and water was observed which finally increased plasma osmolality. The diuretic response (water diuresis) in rats was observed in any of the experimental conditions used, like water load, dehydration, and control. The loss of electrolytes by CBZ therapy was compensated within a few days. Finally, the specific inhibitor of V2 receptors satavaptan was used to test whether the effects of CBZ on salt- and water metabolism were depending on the action of ADH. CBZ acted additively to satavaptan and in additional experiments no effect of CBZ on ADH plasma concentrations could be detected. These results suggest, at least in the rat, the presence of a renal target for CBZ action and a renal effect independent of ADH.

The differences in CBZ action between man and rat are might be explained by the variety of targets of CBZ and the difference in compensation mechanisms between species.

The present data show for the first time that a relevant side effect of CBZ on salt- and water metabolism may be explained by an epithelial action which is independent of the action of CBZ in the central nervous system.

7 Literaturverzeichnis

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, & Watson JD (1995). Signalübertragungen in der Zelle. In *Molekularbiologie der Zelle*, ed. Jeanicke L, pp. 853-928. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo.

Ambrosio AF, Silva AP, Malva JO, Soares-da-Silva P, Carvalho AP, & Carvalho CM (1999). Carbamazepine inhibits L-type Ca²⁺ channels in cultured rat hippocampal neurons stimulated with glutamate receptor agonists. *Neuropharmacology* **38**, 1349-1359.

Arima H, Kondo K, Kakiya S, Nagasaki H, Yokoi H, Yambe Y, Murase T, Iwasaki Y, & Oiso Y (1999). Rapid and sensitive vasopressin heteronuclear RNA responses to changes in plasma osmolality. *J Neuroendocrinol* **11**, 337-341.

Benos DJ (1982). Amiloride: a molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* **242**, C131-C145.

Benos DJ, Cunningham S, Baker RR, Beason KB, Oh Y, & Smith PR (1992). Molecular characteristics of amiloride-sensitive sodium channels. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **120**, 31-113.

Berridge MJ (1993). Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature* **361**, 315-325.

Berridge MJ (1998). Neuronal calcium signaling. *Neuron* **21**, 13-26.

Beubler E & Juan H (1978). PGE-release, blood flow and transmucosal water movement after mechanical stimulation of the rat jejunal mucosa. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **305**, 91-95.

Bichet D, Szatalowicz V, Chaimovitz C, & Schrier RW (1982). Role of vasopressin in abnormal water excretion in cirrhotic patients. *Ann Intern Med* **96**, 413-417.

Bichet DG (1996). Vasopressin receptors in health and disease. *Kidney Int* **49**, 1706-1711.

Biesalski HK, Vaupel P, Persson PB, Boutellier U, Ulmer H-V, Nikolaus Th, & Zglinicki Tv (2005). Stoffwechsel, Arbeit, Altern. In *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*, eds. Schmidt RF, Lang F, & Thews G, pp. 825-947. Springer Medizin Verlag, Heidelberg.

Birnbaumer M, Antaramian A, Themmen AP, & Gilbert S (1992). Desensitization of the human V2 vasopressin receptor. Homologous effects in the absence of heterologous desensitization. *J Biol Chem* **267**, 11783-11788.

Bjorkman DJ, Allan CH, Hagen SJ, & Trier JS (1986). Structural features of absorptive cell and microvillus membrane preparations from rat small intestine. *Gastroenterology* **91**, 1401-1414.

Bleich M, Briel M, Busch AE, Lang HJ, Gerlach U, Gogelein H, Greger R, & Kunzelmann K (1997). KVLQT channels are inhibited by the K⁺ channel blocker 293B. *Pflugers Arch* **434**, 499-501.

Bleich M, Riedemann N, Warth R, Kerstan D, Leipziger J, Hor M, Driessche WV, & Greger R (1996). Ca²⁺ regulated K⁺ and non-selective cation channels in the basolateral membrane of rat colonic crypt base cells. *Pflugers Arch* **432**, 1011-1022.

BLOM S (1962). Trigeminal neuralgia: its treatment with a new anticonvulsant drug (G-32883). *Lancet* **1**, 839-840.

Bohme M, Diener M, & Rummel W (1991). Calcium- and cyclic-AMP-mediated secretory responses in isolated colonic crypts. *Pflugers Arch* **419**, 144-151.

Brau ME, Vogel W, & Hempelmann G (1996). [Possible applications of the "patch-clamp" method in anesthesiologic research; comment]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* **31**, 537-542.

Braunhofer J & Zicha L (1966). [Does Tegretal offer new possibilities of therapy in several neurologic and endocrine diseases? A clinical electroencephalographic and thin-layer chromatographic study]. *Med Welt* 1875-1880.

Brown D, Katsura T, & Gustafson CE (1998). Cellular mechanisms of aquaporin trafficking. *Am J Physiol* **275**, F328-F331.

Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, & Hebert SC (1993). Cloning and characterization of an extracellular Ca²⁺-sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature* **366**, 575-580.

Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, & Rossier BC (1994). Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* **367**, 463-467.

Chen G, Pan B, Hawver DB, Wright CB, Potter WZ, & Manji HK (1996). Attenuation of cyclic AMP production by carbamazepine. *J Neurochem* **67**, 2079-2086.

Cheng SX, Geibel JP, & Hebert SC (2004). Extracellular polyamines regulate fluid secretion in rat colonic crypts via the extracellular calcium-sensing receptor. *Gastroenterology* **126**, 148-158.

Cheng SX, Okuda M, Hall AE, Geibel JP, & Hebert SC (2002). Expression of calcium-sensing receptor in rat colonic epithelium: evidence for modulation of fluid secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **283**, G240-G250.

Courtney KR & Etter EF (1983). Modulated anticonvulsant block of sodium channels in nerve and muscle. *Eur J Pharmacol* **88**, 1-9.

Craven PA & DeRubertis FR (1986). Profiles of eicosanoid production by superficial and proliferative colonic epithelial cells and sub-epithelial colonic tissue. *Prostaglandins* **32**, 387-399.

Craven PA & DeRubertis FR (1981). Cyclic nucleotide metabolism in rat colonic epithelial cells with different proliferative activities. *Biochim Biophys Acta* **676**, 155-169.

Diener M, Nobles M, & Rummel W (1992). Activation of basolateral Cl⁻ channels in the rat colonic epithelium during regulatory volume decrease. *Pflugers Arch* **421**, 530-538.

Diringer MN & Zazulia AR (2006). Hyponatremia in neurologic patients: consequences and approaches to treatment. *Neurologist* **12**, 117-126.

Dixey JJ, Williams TD, Lightman SL, Lant AF, & Brewerton DA (1986). The effect of indomethacin on the renal response to arginine vasopressin in man. *Clin Sci (Lond)* **70**, 409-416.

Dunn FL, Brennan TJ, Nelson AE, & Robertson GL (1973). The role of blood osmolality and volume in regulating vasopressin secretion in the rat. *J Clin Invest* **52**, 3212-3219.

Ecelbarger CA, Chou CL, Lee AJ, DiGiovanni SR, Verbalis JG, & Knepper MA (1998). Escape from vasopressin-induced antidiuresis: role of vasopressin resistance of the collecting duct. *Am J Physiol* **274**, F1161-F1166.

Ecelbarger CA, Nielsen S, Olson BR, Murase T, Baker EA, Knepper MA, & Verbalis JG (1997). Role of renal aquaporins in escape from vasopressin-induced antidiuresis in rat. *J Clin Invest* **99**, 1852-1863.

Ecke D, Bleich M, & Greger R (1996a). The amiloride inhibitable Na⁺ conductance of rat colonic crypt cells is suppressed by forskolin. *Pflügers Arch* **431**, 984-986.

Ecke D, Bleich M, Schwartz B, Fraser G, & Greger R (1996b). The ion conductances of colonic crypts from dexamethasone-treated rats. *Pflügers Arch* **431**, 419-426.

Evans RJ & Surprenant A (1992). Vasoconstriction of guinea-pig submucosal arterioles following sympathetic nerve stimulation is mediated by the release of ATP. *Br J Pharmacol* **106**, 242-249.

Fischer KG, Leipziger J, Rubini-Illes P, Nitschke R, & Greger R (1996). Attenuation of stimulated Ca²⁺ influx in colonic epithelial (HT29) cells by cAMP. *Pflügers Arch* **432**, 735-740.

Funder JW (1993). Aldosterone action. *Annu Rev Physiol* **55**, 115-130.

Gandelman MS (1994). Review of carbamazepine-induced hyponatremia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* **18**, 211-233.

Garcia NH, Pomposiello SI, & Garvin JL (1996). Nitric oxide inhibits ADH-stimulated osmotic water permeability in cortical collecting ducts. *Am J Physiol* **270**, F206-F210.

- Garty H & Palmer LG (1997). Epithelial sodium channels: function, structure, and regulation. *Physiol Rev* **77**, 359-396.
- Geick A, Eichelbaum M, & Burk O (2001). Nuclear receptor response elements mediate induction of intestinal MDR1 by rifampin. *J Biol Chem* **276**, 14581-14587.
- Gibson GG, el-Sankary W, & Plant NJ (2002). Receptor-dependent regulation of the CYP3A4 gene. *Toxicology* **181-182**, 199-202.
- Giessmann T, May K, Modess C, Wegner D, Hecker U, Zschiesche M, Dazert P, Grube M, Schroeder E, Warzok R, Cascorbi I, Kroemer HK, & Siegmund W (2004). Carbamazepine regulates intestinal P-glycoprotein and multidrug resistance protein MRP2 and influences disposition of talinolol in humans. *Clin Pharmacol Ther* **76**, 192-200.
- Gold PW, Robertson GL, Ballenger JC, Kaye W, Chen J, Rubinow DR, Goodwin FK, & Post RM (1983). Carbamazepine diminishes the sensitivity of the plasma arginine vasopressin response to osmotic stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* **57**, 952-957.
- Greger R (2000). Role of CFTR in the colon. *Annu Rev Physiol* **62**, 467-491.
- Greger R (1996). The membrane transporters regulating epithelial NaCl secretion. *Pflugers Arch* **432**, 579-588.
- Greger R, Bleich M, Riedemann N, van DW, Ecke D, & Warth R (1997). The role of K⁺ channels in colonic Cl⁻ secretion. *Comp Biochem Physiol A Physiol* **118**, 271-275.
- Gruber AD, Eible RC, Ji HL, Schreur KD, Fuller CM, & Pauli BU (1998). Genomic cloning, molecular characterization, and functional analysis of human CLCA1, the first human member of the family of Ca²⁺-activated Cl⁻ channel proteins. *Genomics* **54**, 200-214.
- Grynkiewicz G, Poenie M, & Tsien RY (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* **260**, 3440-3450.
- Haas M & Forbush B, III (1998). The Na-K-Cl cotransporters. *J Bioenerg Biomembr* **30**, 161-172.

- Harten U (2002). Wärmelehre. In *Physik für Mediziner* pp. 125-162. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Hayashi M, Arima H, Goto M, Banno R, Watanabe M, Sato I, Nagasaki H, & Oiso Y (2006). Vasopressin gene transcription increases in response to decreases in plasma volume, but not to increases in plasma osmolality, in chronically dehydrated rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **290**, E213-E217.
- Hebert SC (1996). Extracellular calcium-sensing receptor: implications for calcium and magnesium handling in the kidney. *Kidney Int* **50**, 2129-2139.
- Hebert SC, Cheng S, & Geibel J (2004). Functions and roles of the extracellular Ca²⁺-sensing receptor in the gastrointestinal tract. *Cell Calcium* **35**, 239-247.
- Heinemann U, Lux HD, & Gutnick MJ (1977). Extracellular free calcium and potassium during paroxysmal activity in the cerebral cortex of the cat. *Exp Brain Res* **27**, 237-243.
- Hewavitharana T, Deng X, Soboloff J, & Gill DL (2007). Role of STIM and Orai proteins in the store-operated calcium signaling pathway. *Cell Calcium* **42**, 173-182.
- Hille B (2001). Calcium Dynamics, Epithelial Transport, and Intercellular Coupling. In *Ion Channels of Excitable Membranes* pp. 269-306. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hoenderop JG, Nilius B, & Bindels RJ (2005). Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* **85**, 373-422.
- Hofer AM & Brown EM (2003). Extracellular calcium sensing and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 530-538.
- Hoffmeyer S, Burk O, von RO, Arnold HP, Brockmoller J, John A, Cascorbi I, Gerloff T, Roots I, Eichelbaum M, & Brinkmann U (2000). Functional polymorphisms of the human multidrug-resistance gene: multiple sequence variations and correlation of one allele with P-glycoprotein expression and activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 3473-3478.

- Hoth M & Penner R (1992). Depletion of intracellular calcium stores activates a calcium current in mast cells. *Nature* **355**, 353-356.
- Hozawa S, Holtzman EJ, & Ausiello DA (1996). cAMP motifs regulating transcription in the aquaporin 2 gene. *Am J Physiol* **270**, C1695-C1702.
- Kakiya S, Arima H, Yokoi H, Murase T, Yambe Y, & Oiso Y (2000). Effects of acute hypotensive stimuli on arginine vasopressin gene transcription in the rat hypothalamus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **279**, E886-E892.
- Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, Ishikawa S, Fushimi K, Nakanishi S, Bichet DG, & Marumo F (1995). Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med* **332**, 1540-1545.
- Kellenberger S & Schild L (2002). Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev* **82**, 735-767.
- Kennedy CR, Xiong H, Rahal S, Vanderluit J, Slack RS, Zhang Y, Guan Y, Breyer MD, & Hebert RL (2007). Urine concentrating defect in prostaglandin EP1-deficient mice. *Am J Physiol Renal Physiol* **292**, F868-F875.
- Kimura T, Matsui K, Sato T, & Yoshinaga K (1974). Mechanism of carbamazepine (Tegretol)-induced antidiuresis: evidence for release of antidiuretic hormone and impaired excretion of a water load. *J Clin Endocrinol Metab* **38**, 356-362.
- Klussmann E, Maric K, & Rosenthal W (2000). The mechanisms of aquaporin control in the renal collecting duct. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **141**, 33-95.
- Klussmann E, Maric K, Wiesner B, Beyermann M, & Rosenthal W (1999). Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells. *J Biol Chem* **274**, 4934-4938.
- KOEFOED-JOHNSEN V & USSING HH (1958). The nature of the frog skin potential. *Acta Physiol Scand* **42**, 298-308.

Kunzelmann K (2003). ENaC is inhibited by an increase in the intracellular Cl(-) concentration mediated through activation of Cl(-) channels. *Pflugers Arch* **445**, 504-512.

Kunzelmann K, Kiser GL, Schreiber R, & Riordan JR (1997). Inhibition of epithelial Na⁺ currents by intracellular domains of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *FEBS Lett* **400**, 341-344.

Kuz GM & Manssourian A (2005). Carbamazepine-induced hyponatremia: assessment of risk factors. *Ann Pharmacother* **39**, 1943-1946.

Lang F, Kurtz A, Persson PB, & Murer H (2005). Regulation des Inneren Milieus. In *Physiologie des Menschen-mit Pathophysiologie*, eds. Schmidt RF, Lang F, & Thews G, pp. 667-737. Springer Medizin Verlag Heidelberg.

Lankford SP, Chou CL, Terada Y, Wall SM, Wade JB, & Knepper MA (1991). Regulation of collecting duct water permeability independent of cAMP-mediated AVP response. *Am J Physiol* **261**, F554-F566.

Leipziger J, Fischer KG, & Greger R (1994). Voltage-dependent Ca²⁺ influx in the epithelial cell line HT29: simultaneous use of intracellular Ca²⁺ measurements and nystatin perforated patch-clamp technique. *Pflugers Arch* **426**, 427-432.

Li H, Sheppard DN, & Hug MJ (2004). Transepithelial electrical measurements with the Ussing chamber. *J Cyst Fibros* **3 Suppl 2**, 123-126.

Liao Y, Erxleben C, Yildirim E, Abramowitz J, Armstrong DL, & Birnbaumer L (2007). Orai proteins interact with TRPC channels and confer responsiveness to store depletion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 4682-4687.

Lingamaneni R & Hemmings HC, Jr. (2003). Differential interaction of anaesthetics and antiepileptic drugs with neuronal Na⁺ channels, Ca²⁺ channels, and GABA(A) receptors. *Br J Anaesth* **90**, 199-211.

Lohrmann E & Greger R (1993). Isolated perfused rabbit colon crypts: stimulation of Cl⁻ secretion by forskolin. *Pflugers Arch* **425**, 373-380.

Macdonald RL & McLean MJ (1986). Anticonvulsant drugs: mechanisms of action. *Adv Neurol* **44**, 713-736.

Maeda Y, Terada Y, Nonoguchi H, & Knepper MA (1992). Hormone and autacoid regulation of cAMP production in rat IMCD subsegments. *Am J Physiol* **263**, F319-F327.

Mall M, Bleich M, Schurlein M, Kuhr J, Seydewitz HH, Brandis M, Greger R, & Kunzelmann K (1998). Cholinergic ion secretion in human colon requires coactivation by cAMP. *Am J Physiol* **275**, G1274-G1281.

Marples D, Christensen BM, Frokiaer J, Knepper MA, & Nielsen S (1998). Dehydration reverses vasopressin antagonist-induced diuresis and aquaporin-2 downregulation in rats. *Am J Physiol* **275**, F400-F409.

Marples D, Frokiaer J, & Nielsen S (1999). Long-term regulation of aquaporins in the kidney. *Am J Physiol* **276**, F331-F339.

Matsuki N, Quandt FN, Ten Eick RE, & Yeh JZ (1984). Characterization of the block of sodium channels by phenytoin in mouse neuroblastoma cells. *J Pharmacol Exp Ther* **228**, 523-530.

Matsumura Y, Uchida S, Rai T, Sasaki S, & Marumo F (1997). Transcriptional regulation of aquaporin-2 water channel gene by cAMP. *J Am Soc Nephrol* **8**, 861-867.

Matthews G, Neher E, & Penner R (1989). Second messenger-activated calcium influx in rat peritoneal mast cells. *J Physiol* **418**, 105-130.

McLean MJ & Macdonald RL (1988). Benzodiazepines, but not beta carbolines, limit high frequency repetitive firing of action potentials of spinal cord neurons in cell culture. *J Pharmacol Exp Ther* **244**, 789-795.

Meinders AE, Cejka V, & Robertson GL (1974). The antidiuretic action of carbamazepine in man. *Clin Sci Mol Med* **47**, 289-299.

Michimata M, Nogae S, Ohta M, Kaizuma S, Imai Y, Ito S, & Matsubara M (2000). Topographic distribution of aquaporin 2 mRNA in the kidney of dehydrated rats. *Exp Nephrol* **8**, 28-36.

Montell C (2005). The TRP superfamily of cation channels. *Sci STKE* **2005**, re3.

Moore ED, Becker PL, Fogarty KE, Williams DA, & Fay FS (1990). Ca²⁺ imaging in single living cells: theoretical and practical issues. *Cell Calcium* **11**, 157-179.

Murase T, Ecelbarger CA, Baker EA, Tian Y, Knepper MA, & Verbalis JG (1999). Kidney aquaporin-2 expression during escape from antidiuresis is not related to plasma or tissue osmolality. *J Am Soc Nephrol* **10**, 2067-2075.

Nadler SP, Zimpelmann JA, & Hebert RL (1992). PGE₂ inhibits water permeability at a post-cAMP site in rat terminal inner medullary collecting duct. *Am J Physiol* **262**, F229-F235.

Nejsum LN, Zelenina M, Aperia A, Frokiaer J, & Nielsen S (2005). Bidirectional regulation of AQP2 trafficking and recycling: involvement of AQP2-S256 phosphorylation. *Am J Physiol Renal Physiol* **288**, F930-F938.

Nielsen S, DiGiovanni SR, Christensen EI, Knepper MA, & Harris HW (1993). Cellular and subcellular immunolocalization of vasopressin-regulated water channel in rat kidney. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 11663-11667.

Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM, Promeneur D, Frokiaer J, & Marples D (1999). Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J Am Soc Nephrol* **10**, 647-663.

Nilius B, Owsianik G, Voets T, & Peters JA (2007). Transient receptor potential cation channels in disease. *Physiol Rev* **87**, 165-217.

Nobles M, Diener M, Mestres P, & Rummel W (1991). Segmental heterogeneity of the rat colon in the response to activators of secretion on the cAMP-, the cGMP- and the Ca²⁺-pathway. *Acta Physiol Scand* **142**, 375-386.

Noland TD, Carter CE, Jacobson HR, & Breyer MD (1992). PGE₂ regulates cAMP production in cultured rabbit CCD cells: evidence for dual inhibitory mechanisms. *Am J Physiol* **263**, C1208-C1215.

Okada M, Kawata Y, Mizuno K, Wada K, Kondo T, & Kaneko S (1998). Interaction between Ca²⁺, K⁺, carbamazepine and zonisamide on hippocampal extracellular glutamate monitored with a microdialysis electrode. *Br J Pharmacol* **124**, 1277-1285.

- Owen A, Goldring C, Morgan P, Park BK, & Pirmohamed M (2006). Induction of P-glycoprotein in lymphocytes by carbamazepine and rifampicin: the role of nuclear hormone response elements. *Br J Clin Pharmacol* **62**, 237-242.
- Palm C, Pistrosch F, Herbrig K, & Gross P (2006). Vasopressin antagonists as aquaretic agents for the treatment of hyponatremia. *Am J Med* **119**, S87-S92.
- Parekh AB & Penner R (1997). Store depletion and calcium influx. *Physiol Rev* **77**, 901-930.
- Parekh AB & Putney JW, Jr. (2005). Store-operated calcium channels. *Physiol Rev* **85**, 757-810.
- Pedersen SF, Owsianik G, & Nilius B (2005). TRP channels: an overview. *Cell Calcium* **38**, 233-252.
- Rai T, Sekine K, Kanno K, Hata K, Miura M, Mizushima A, Marumo F, & Sasaki S (1997). Urinary excretion of aquaporin-2 water channel protein in human and rat. *J Am Soc Nephrol* **8**, 1357-1362.
- Rajendran VM, Kashgarian M, & Binder HJ (1989). Aldosterone induction of electrogenic sodium transport in the apical membrane vesicles of rat distal colon. *J Biol Chem* **264**, 18638-18644.
- Remy S, Gabriel S, Urban BW, Dietrich D, Lehmann TN, Elger CE, Heinemann U, & Beck H (2003). A novel mechanism underlying drug resistance in chronic epilepsy. *Ann Neurol* **53**, 469-479.
- Riccardi D, Park J, Lee WS, Gamba G, Brown EM, & Hebert SC (1995). Cloning and functional expression of a rat kidney extracellular calcium/polyvalent cation-sensing receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 131-135.
- Rink TJ & Sage SO (1990). Calcium signaling in human platelets. *Annu Rev Physiol* **52**, 431-449.
- Rossier BC, Pradervand S, Schild L, & Hummler E (2002). Epithelial sodium channel and the control of sodium balance: interaction between genetic and environmental factors. *Annu Rev Physiol* **64**, 877-897.

Sachdeo RC, Wasserstein A, Mesenbrink PJ, & D'Souza J (2002). Effects of oxcarbazepine on sodium concentration and water handling. *Ann Neurol* **51**, 613-620.

Saito T, Ishikawa S, Abe K, Kamoi K, Yamada K, Shimizu K, Saruta T, & Yoshida S (1997). Acute aquaresis by the nonpeptide arginine vasopressin (AVP) antagonist OPC-31260 improves hyponatremia in patients with syndrome of inappropriate secretion of antidiuretic hormone (SIADH). *J Clin Endocrinol Metab* **82**, 1054-1057.

Saito T, Ishikawa SE, Ando F, Okada N, Nakamura T, Kusaka I, Higashiyama M, Nagasaka S, & Saito T (1998). Exaggerated urinary excretion of aquaporin-2 in the pathological state of impaired water excretion dependent upon arginine vasopressin. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 4034-4040.

Sakaeda T, Nakamura T, & Okumura K (2002). MDR1 genotype-related pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Biol Pharm Bull* **25**, 1391-1400.

Sakmann B & Neher E (1984). Patch clamp techniques for studying ionic channels in excitable membranes. *Annu Rev Physiol* **46**, 455-472.

Schirmacher K, Mayer A, Walden J, Dusing R, & Bingmann D (1993). Effects of carbamazepine on action potentials and calcium currents in rat spinal ganglion cells in vitro. *Neuropsychobiology* **27**, 176-179.

Schrier RW (1988). Pathogenesis of sodium and water retention in high-output and low-output cardiac failure, nephrotic syndrome, cirrhosis, and pregnancy (1). *N Engl J Med* **319**, 1065-1072.

Schubert E & Schaaf CL (1993). *Medizinische Physiologie* de Gruyter, Berlin.

Schultheiss G & Diener M (1998). K⁺ and Cl⁻ conductances in the distal colon of the rat. *Gen Pharmacol* **31**, 337-342.

Schultheiss G, Ribeiro R, Schafer KH, & Diener M (2003). Activation of apical K⁺ conductances by muscarinic receptor stimulation in rat distal colon: fast and slow components. *J Membr Biol* **195**, 183-196.

- Schultheiss G, Siefjediers A, & Diener M (2005). Muscarinic receptor stimulation activates a Ca(2+)-dependent Cl(-) conductance in rat distal colon. *J Membr Biol* **204**, 117-127.
- Schuster VL (1985). Mechanism of bradykinin, ADH, and cAMP interaction in rabbit cortical collecting duct. *Am J Physiol* **249**, F645-F653.
- Siemer C & Gogelein H (1993). Effects of forskolin on crypt cells of rat distal colon. Activation of nonselective cation channels in the crypt base and of a chloride conductance pathway in other parts of the crypt. *Pflugers Arch* **424**, 321-328.
- Simonds WF (1999). G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci* **20**, 66-73.
- Singh SK, Binder HJ, Boron WF, & Geibel JP (1995). Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J Clin Invest* **96**, 2373-2379.
- Smith NJ, Espir ML, & Baylis PH (1977). Raised plasma arginine vasopressin concentration in carbamazepine-induced water intoxication. *Br Med J* **2**, 804.
- Snyder PM (2002). The epithelial Na⁺ channel: cell surface insertion and retrieval in Na⁺ homeostasis and hypertension. *Endocr Rev* **23**, 258-275.
- Soelberg SP & Hammer M (1984). Effects of long-term carbamazepine treatment on water metabolism and plasma vasopressin concentration. *Eur J Clin Pharmacol* **26**, 719-722.
- Stephens WP, Coe JY, & Baylis PH (1978). Plasma arginine vasopressin concentrations and antidiuretic action of carbamazepine. *Br Med J* **1**, 1445-1447.
- Storm R, Klussmann E, Geelhaar A, Rosenthal W, & Maric K (2003). Osmolality and solute composition are strong regulators of AQP2 expression in renal principal cells. *Am J Physiol Renal Physiol* **284**, F189-F198.
- Strabel D & Diener M (1995). Evidence against direct activation of chloride secretion by carbachol in the rat distal colon. *Eur J Pharmacol* **274**, 181-191.

Strater J, Koretz K, Gunthert AR, & Moller P (1995). In situ detection of enterocytic apoptosis in normal colonic mucosa and in familial adenomatous polyposis. *Gut* **37**, 819-825.

Stricker EM & Verbalis JG (1986). Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *Am J Physiol* **250**, R267-R275.

Surprenant A, Schneider DA, Wilson HL, Galligan JJ, & North RA (2000). Functional properties of heteromeric P2X(1/5) receptors expressed in HEK cells and excitatory junction potentials in guinea-pig submucosal arterioles. *J Auton Nerv Syst* **81**, 249-263.

Thomas L & Walb D (1988). Wasser- und Elektrolythaushalt. In *Labor und Diagnose*, ed. Thomas L, pp. 257-294. Die Medizinische Verlagsgesellschaft, Marburg.

Thomas TH, Ball SG, Wales JK, & Lee MR (1978). Effect of carbamazepine on plasma and urine arginine-vasopressin. *Clin Sci Mol Med* **54**, 419-424.

Tian Y, Sandberg K, Murase T, Baker EA, Speth RC, & Verbalis JG (2000). Vasopressin V2 receptor binding is down-regulated during renal escape from vasopressin-induced antidiuresis. *Endocrinology* **141**, 307-314.

Tian Y, Serino R, & Verbalis JG (2004). Downregulation of renal vasopressin V2 receptor and aquaporin-2 expression parallels age-associated defects in urine concentration. *Am J Physiol Renal Physiol* **287**, F797-F805.

Uchida S, Sasaki S, Fushimi K, & Marumo F (1994). Isolation of human aquaporin-CD gene. *J Biol Chem* **269**, 23451-23455.

Uhlich E, Loeschke K, & Eigler J (1972). [Antidiuretic effect of carbamazepin in diabetes insipidus]. *Klin Wochenschr* **50**, 1127-1133.

Ulbricht W (2005). Sodium channel inactivation: molecular determinants and modulation. *Physiol Rev* **85**, 1271-1301.

Ulrich ML, Rotzinger S, Asghar SJ, Jurasz P, Tanay VA, Dunn SM, Radomski M, Greenshaw A, & Silverstone PH (2003). Effects of

dextroamphetamine, lithium chloride, sodium valproate and carbamazepine on intraplatelet Ca²⁺ levels. *J Psychiatry Neurosci* **28**, 115-125.

Vaandrager AB, Bot AG, Ruth P, Pfeifer A, Hofmann F, & De Jonge HR (2000). Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. *Gastroenterology* **118**, 108-114.

Van AT, Bakshi R, Devaux CB, & Schwabe S (1994). Hyponatremia associated with carbamazepine and oxcarbazepine therapy: a review. *Epilepsia* **35**, 181-188.

Verbalis JG (2006). Whole-body volume regulation and escape from antidiuresis. *Am J Med* **119**, S21-S29.

Verbalis JG (2003). Disorders of body water homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **17**, 471-503.

Walden J, Grunze H, Mayer A, Dusing R, Schirmacher K, Liu Z, & Bingmann D (1993). Calcium-antagonistic effects of carbamazepine in epilepsies and affective psychoses. *Neuropsychobiology* **27**, 171-175.

Wales JK (1975). Treatment of diabetes insipidus with carbamazepine. *Lancet* **2**, 948-951.

Ward DT & Riccardi D (2002). Renal physiology of the extracellular calcium-sensing receptor. *Pflugers Arch* **445**, 169-176.

Warth R, Hamm K, Bleich M, Kunzelmann K, von HT, Schreiber R, Ullrich E, Mengel M, Trautmann N, Kindle P, Schwab A, & Greger R (1999). Molecular and functional characterization of the small Ca²⁺-regulated K⁺ channel (rSK4) of colonic crypts. *Pflugers Arch* **438**, 437-444.

Warth R, Riedemann N, Bleich M, van DW, Busch AE, & Greger R (1996). The cAMP-regulated and 293B-inhibited K⁺ conductance of rat colonic crypt base cells. *Pflugers Arch* **432**, 81-88.

Wen H, Frokiaer J, Kwon TH, & Nielsen S (1999). Urinary excretion of aquaporin-2 in rat is mediated by a vasopressin-dependent apical pathway. *J Am Soc Nephrol* **10**, 1416-1429.

Wiemann M, Jones D, Straub H, Altrup U, & Speckmann EJ (1996). Simultaneous blockade of intracellular calcium increases and of neuronal epileptiform depolarizations by verapamil. *Brain Res* **734**, 49-54.

Willow M & Catterall WA (1982). Inhibition of binding of [3H]batrachotoxinin A 20-alpha-benzoate to sodium channels by the anticonvulsant drugs diphenylhydantoin and carbamazepine. *Mol Pharmacol* **22**, 627-635.

Willow M, Kuenzel EA, & Catterall WA (1984). Inhibition of voltage-sensitive sodium channels in neuroblastoma cells and synaptosomes by the anticonvulsant drugs diphenylhydantoin and carbamazepine. *Mol Pharmacol* **25**, 228-234.

Yamashita H, Kazawa T, Minatogawa Y, Ebisawa T, & Yamauchi T (2002). Time-course of hepatic cytochrome p450 subfamily induction by chronic carbamazepine treatment in rats. *Int J Neuropsychopharmacol* **5**, 47-52.

Yoshida S, Okada M, Zhu G, & Kaneko S (2007). Carbamazepine prevents breakdown of neurotransmitter release induced by hyperactivation of ryanodine receptor. *Neuropharmacology* **52**, 1538-1546.

Yoshimura R, Yanagihara N, Terao T, Minami K, Abe K, & Izumi F (1995). Inhibition by carbamazepine of various ion channels-mediated catecholamine secretion in cultured bovine adrenal medullary cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **352**, 297-303.

Zelenina M, Christensen BM, Palmer J, Nairn AC, Nielsen S, & Aperia A (2000). Prostaglandin E(2) interaction with AVP: effects on AQP2 phosphorylation and distribution. *Am J Physiol Renal Physiol* **278**, F388-F394.

8 Anhang

8.1 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass die vorliegende Dissertation

„Funktionelle Untersuchungen zur Nebenwirkung des Antiepileptikums Carbamazepin auf den Wasser- und Elektrolythaushalt der Ratte“,

abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, von mir eigenständig verfasst wurde. Ich habe keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt. Die Arbeit hat an keiner anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Teile dieser Arbeit sind bereits in Abstractform veröffentlicht.

Kiel, den

B. Sievers

8.2 Publikation

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

8.2.1 Originalarbeiten

- in Vorbereitung

8.2.2 Kongressbeiträge (Abstracts)

- M. Bleich, B. Sievers, N. Himmerkus, T. Licher, A. Hofmeister
Acute inhibition of NHE3 and kidney function
Pflügers Arch. 2005 449 (Suppl1):S24
- B. Sievers, Q. Shan, N. Himmerkus, A. Hofmeister, M. Bleich
Renal compensation of pharmacological NHE3 knockout
Pflügers Arch. 2005 449 (Suppl1):S95
- B. Sievers, N. Himmerkus, Q. Shan, M. Bleich
Effect of the anti-epileptic drug carbamazepine on epithelial function in rat distal colon
Acta Physiologica 2006 186 (Suppl1):S235
- B. Sievers, M. Bleich
Effect of the anti-epileptic drug carbamazepine- an *in vivo* model
Acta Physiologica 2006 186 (Suppl1):S244
- M. Bleich, N. Himmerkus, Q. Shan, B. Sievers, O. Jagodin
Pathophysiology of carbamazepine induced hyponatremia
(Sandbjerg Meeting on membrane transport, Mai 2006, DK)
- B. Sievers, N. Himmerkus, O. Jagodin, M. Bleich
The renal effect of carbamazepine in rat
Nieren- und Hochdruckkrankheiten 2006 35/9:S42
- V. Vaßen, B. Sievers, N. Himmerkus, J. Harder, M. Bleich
Antimicrobial peptides and epithelial function
Acta Physiologica 2007 189 (Suppl 653):S112
- B. Sievers, N. Himmerkus, M. Bleich
The renal effect of carbamazepine in rat under water retention
Nieren- und Hochdruckkrankheiten 2007 36/9:S408
- B. Sievers, N. Himmerkus, M. Bleich
The renal effect of carbamazepine in rat under water retention
Nephro-News, Forum für Nephrologie und Hypertensiologie, Sep 2007:
S69

- B. Sievers, M. Bleich
Additive effect of carbamazepine on diuresis under the V2-antagonist
Satavaptan in rat
Acta Physiologica March 2008 192 (663):S121

8.3 Danksagung

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die mich in den letzten Jahren bei der Anfertigung meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. M. Bleich für die Hilfe bei der Erstellung der vorliegenden Dissertation, darin inbegriffen die Bereitstellung der Aufgabenstellung, der Arbeitsbedingungen, die finanzielle Unterstützung und die Bereitschaft zur Diskussion der wissenschaftlichen Arbeit.

Prof. Dr. W. Wünnenberg danke ich ebenfalls für die freundliche Unterstützung während meiner Promotion.

Allen Mitarbeitern des Physiologischen Institutes möchte ich sehr für die freundliche Atmosphäre im Institut danken. Ein großer Dank gilt natürlich der gesamten Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Bleich.

Ein ganz besonderer Dank gilt Herrn T. Stegmann, der mich bei der Durchführung der experimentellen Arbeiten sehr unterstützt hat. Des Weiteren danke ich ihm für den „anständigen“ Kaffee und die netten Gespräche.

Natürlich danke ich auch sehr meiner Familie, die mich seit Beginn meines Studiums enorm unterstützt.

Allen meinen Freunden ein „herzliches Dankeschön“ für die Freundschaft, die trotz wenig „Sichtkontakt“ in den letzten Jahren bestehen blieb.

Last but not least möchte ich Eggert Coff aus DK danken, in dessen Gesellschaft ich mich im Laufe der letzten Jahre immer wieder erholen durfte.

8.4 Lebenslauf

Persönliche Daten

Heimatort Bad Oldesloe
Staatsangehörigkeit deutsch

Hochschulstudium

WS 1998/99-SS 2004 Studium der Biologie (Diplom) an der CAU zu Kiel
Hauptfach: Zoologie
Nebenfächer: Zellbiologie, Biochemie
04/2000 Vordiplomsprüfung
04/2003 Diplomprüfung
SS 2003-SS 2004 Anfertigung der Diplomarbeit im Physiologischen Institut der CAU bei PD Dr. J. Schmidtmayer, Abteilung Interdisziplinäre Membranfunktionsanalyse
Thema: Etablierung einer mit rekombinanten Calciumkanälen transfizierten Zelllinie zur elektrophysiologischen Untersuchung ionenkanalspezifischer Neurotoxine

Promotionsstudium

08/2004- Dissertation am Physiologischen Institut der CAU zu Kiel bei Prof. Dr. M. Bleich, Abteilung Physiology of Intake and Excretion, Physiology of Epithelial Transport
Dissertationsthema: Funktionelle Untersuchungen zur Nebenwirkung des Antiepileptikums Carbamazepin auf den Wasser- und Elektrolythaushalt der Ratte

Berufliche Erfahrungen

SS 2002-WS 2003/04 Wissenschaftliche Hilfskraft in der Basisveranstaltung: Zoophysiologie für Fortgeschrittene, Teil: Neurophysiologie am Zoologischen Institut der CAU zu Kiel bei Prof. Dr. W. Wünnenberg
08/2004-03/2009 Wissenschaftliche Angestellte bei Prof. Dr. M. Bleich am Physiologischen Institut der CAU zu Kiel,
Kursleitung der Themen Reflexsysteme, EKG, Arbeitsphysiologie und Säure-Basen-Haushalt sowie Niere im Physiologischen Praktikum für Human- und Zahnmediziner