

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

**Abteilung Innere Medizin IV
Sektion Nieren- und Hochdruckerkrankungen
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.-U. Häring**

**Beeinflussung der renalen und systemischen
Hämodynamik durch L-NAME mit und ohne Gabe von
oralem Tetrahydrobiopterin (BH₄) bei gesunden
Probanden**

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

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

**vorgelegt von
Nilgün Artunç
aus Reutlingen**

2012

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Professor Dr. T. Rislér
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. B. Friedrich

In Liebe meiner Familie

Die Ergebnisse dieser Arbeit wurden unter dem Titel

**„Effects of tetrahydrobiopterin on nitric oxide bioavailability
and renal hemodynamics in healthy volunteers“**

**von Artunc F, Essig M, Artunc N, Plachtzik C, Reich M,
Boehmer G, Haering HU, Erley CM, Risler T. im Journal Of
Nephrology 2008 (Nov-Dec;21(6):850-60) veröffentlicht.**

ABKÜRZUNGEN	V
I. EINLEITUNG	1
I.1. Stickstoffmonoxid (NO).....	1
I.1.1. Geschichte des NO	1
I.1.2. Biosynthese, Vorkommen und Rolle des NO	2
I.1.3. Wirkungen von NO	2
I.2. Tetrahydrobiopterin (BH₄).....	6
I.2.1. Synthese von BH ₄	6
I.2.2. BH ₄ und die Endotheldysfunktion	7
I.3. L-NAME (N^G-Nitro-L-Arginin-methylester)	9
I.4. ADMA (Asymmetrisches dimethylarginin)	9
I.5. Studienziel.....	10
II. STUDIENDESIGN UND METHODEN.....	11
II.1. Probanden.....	11
II.2. Teilnahmekriterien	11
II.2.1. Einschlusskriterien	11
II.2.2. Ausschlusskriterien	11
II.2.3. Abbruchkriterien	12
II.3 Studiendesign	12
II.3.1. Studienentwurf – Graphische Darstellung und Messpunkte.....	14
II.3.2. Praktische Durchführung.....	14
II.3.3. Zusammensetzung der einzelnen Infusionen.....	17
II.4. Laboranalysen	18
II.4.1. Probenaufarbeitung.....	18
II.4.2. Inulin.....	19
<i>II.4.2.1. Benötigte Reagenzien</i>	<i>19</i>
<i>II.4.2.2. Herstellung der Reagenzien</i>	<i>19</i>

II.4.2.3. Inulin-Messung	19
II.4.3. PAH.....	20
II.4.3.1. Benötigte Reagenzien	20
II.4.3.2. Herstellung der Reagenzien	20
II.4.3.3. PAH-Messung.....	20
II.4.4. Übrige Laborparameter	21
II.4.5. Andere Untersuchungsmethoden.....	21
II.4.5.1. Bestimmung des Blutdrucks	21
II.4.5.2. Bestimmung der Herzfrequenz (HF)	22
II.5. Formeln.....	22
II.6. Statistische Auswertung.....	23
III. ERGEBNISSE	25
III.1. Systolischer Blutdruck.....	25
III.2. Diastolischer Blutdruck.....	26
III.3. Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	27
III.4. Herzfrequenz (HF).....	28
III.5. Renale Hämodynamik.....	29
III.5.1. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR).....	29
III.5.2. Effektiver renaler Plasmafluss (ERPF).....	30
III.5.3. Filtrationsfraktion (FF)	31
III.6. cGMP.....	32
III.7. Sonstige Untersuchungen	33
III.7.1. Hämatokrit (Hkt)	33
III.7.2. Fraktionelle Natrium-Clearance (FE_{Na}).....	34
III.7.3. Absolute Natrium-Ausscheidung	35
III.7.4. Fraktionelle Kalium-Clearance (FE_K).....	36
III.7.5. Absolute Kalium-Ausscheidung.....	37
III.7.6. Elektrokardiogramm	38
III.8. Nebenwirkungen	38
III.8.1. Nebenwirkungen der PAH- und Inulin-Infusion	38

III.8.2. Nebenwirkungen von L-NAME	38
IV. DISKUSSION	39
IV.1. cGMP	39
IV.2. Veränderung der systemischen Hämodynamik.....	41
IV.3. Veränderung der renalen Hämodynamik.....	43
IV.4. Na- und K-Ausscheidung.....	45
IV.5. Hämatokrit.....	46
V. ZUSAMMENFASSUNG	47
VI. ANHANG.....	49
VI.1. Infusionsplan von L-NAME und BH4	49
VI.2. Studienprotokoll – Übersicht der Messwerte.....	50
VI.3. Literaturnachweis.....	52
VI.4. Danksagung	61

Abkürzungen

ACE	Angiotensin- Converting- Enzyme
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BB	Blutbild
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl	Clearance
ED	endotheliale Dysfunktion
eNOS	endotheliale NO- Synthase
ERDF	Endothelial Derived Relaxing Faktor
ERPF	effektiver renaler Plasmafluss
FF	Filtratiosfraktion
GC	Guanylatcyclase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
GTP-CH	GTP- Cyclohydrolase I
Hb	Hämoglobin
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
iNOS	induzierbare NO- Synthase
JGA	Juxtaglomerulären Apparates
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzerkrankung
KS- Test	Kolmogorov- Smirnov Test
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
M ₃ -Rezeptor	muskarinischer Acetylcholin-Rezeptor vom Typ 3
MD	Macula Densa
MW	Mittelwert
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO- Synthase
nNOS	neuronale NO- Synthase

NNR	Neben- Nieren- Rinde
PAH	para-Aminohippursäure
PKU	Phenylketonurie
RAAS	Renin- Angiotensin- Aldosteron- System
RPF	renaler Plasmafluss
RT	Raumtemperatur
RVR	Renovaskulärer Widerstand
SD	Standardabweichung (Standard Deviation)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (Standard Error of the Mean)
SR	Sepiapterin Reduktase
ZNS	Zentrales Nervensystem

I. Einleitung

I.1. Stickstoffmonoxid (NO)

I.1.1. Geschichte des NO

Stickstoffmonoxid (NO) ist ein wichtiger und vielseitiger Botenstoff des Organismus. Neben dem Vorkommen im Nervensystem als Kotransmitter und im Immunsystem als zytotoxische Substanz ist es ein äußerst bedeutsamer Mediator im Endothel und reguliert dessen antikoagulierende Eigenschaften und den Gefäßtonus.

Anfang der achtziger Jahre beobachtete der Pharmakologe Robert Furchgott in New York, dass viele vasodilatierende Stoffe (Peptide, Adeninnucleotide u.a.) ihre Wirkung verlieren, wenn man die Endothelzellen der untersuchten Blutgefäße entfernt (Furchgott et al., 1978). Er kam zu dem Ergebnis, dass diese gefäßerweiternden Stoffe nicht direkt die glatten Gefäßmuskulatur dilatieren, sondern die Endothelschicht zur Freisetzung einer unbekanntes, gefäßerweiternden Substanz anregen, die er „Endothelium Derived Relaxing Factor“ (EDRF) nannte. In den folgenden Jahren zeigte sich, dass der Wirkungsmechanismus von EDRF vergleichbar mit den therapeutisch seit langem eingesetzten Nitro-Vasodilatoren ist. Ende der achtziger Jahre konnte Palmer zeigen, dass NO identisch ist mit EDRF (Palmer et al., 1987).

Aufgrund dieser bedeutenden Entdeckungen wurde im Jahr 1998 der Nobelpreis für Physiologie und Medizin an die Amerikaner Robert Furchgott, Ferid Murad und Louis J. Ignarro verliehen. Diesen Forschern gelang es erstmals, die große Bedeutung des NO für die Blutversorgung von Organen und dessen Rolle als Botenstoff im Organismus nachzuweisen. Mit den Erkenntnissen über NO erschließen sich somit neue Möglichkeiten bei der Behandlung von Gefäßerkrankungen und den dadurch bedingten Organschäden.

I.1.2. Biosynthese, Vorkommen und Rolle des NO

NO ist das kleinste endogen gebildete bioaktive Molekül. Es wird aus der Aminosäure L-Arginin und O₂ unter Beteiligung mehrerer Kofaktoren, unter anderem Tetrahydrobiopterin (BH₄), durch drei Isoformen der NO-Synthase synthetisiert: neuronale NO-Synthase I (nNOS), induzierbare NO-Synthase II (iNOS) und endotheliale NO-Synthase III (eNOS), wobei die Aminosäure L-Citrullin als Produkt entsteht.

Die drei NOS-Isoformen haben die katalytische Umwandlung von L-Arginin zu L-Citrullin gemeinsam, bei der Stickstoffmonoxid (NO) entsteht. Hierfür wird eine terminale Guanidino-Gruppe des L-Arginins oxidiert. Kosubstrate der Reaktion sind molekularer Sauerstoff und NADPH (Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat). Als Redoxfaktoren dienen Tetrahydrobiopterin (BH₄), Eisen-(II)-haltiges Häm, reduzierte Thiole, Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Mononukleotid (FMN). Die NO-Produktion durch die NOS ist abhängig von der Bindung des Enzyms an das Ca²⁺-Regulatorprotein Calmodulin. Die Bindung der NOS-Isoformen nNOS und eNOS an Calmodulin erfordert erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen, sodass die NO-Produktion über den Einfluss von Ca²⁺ in die Zelle reguliert wird (Michel et al., 1997).

NO ist ein flüchtiges Gas und Radikal, welches in biologischen Flüssigkeiten innerhalb von einer Sekunde mit O₂ und H₂O zu einem Gemisch aus Nitrit (NO₂⁻) und Nitrat (NO₃⁻) reagiert. Mit dem Superoxid-Radikal-Anion O²⁻ kann NO zu Peroxynitrit (ONO²⁻) reagieren, welches durch intramolekulare Umlagerung zu NO₃⁻ wird, inaktiviert. Anorganisches NO₂⁻ und NO₃⁻ sind biologisch 1000fach weniger wirksam als NO, so dass eine Oxidation von NO einer Inaktivierung gleichkommt.

I.1.3. Wirkungen von NO

NO ist der wichtigste endogene Vasodilatator, es wird kontinuierlich vom Gefäßendothel produziert. Dabei wird es von den Endothelzellen sowohl auf die Basalseite in die Gefäßmuskelschicht als auch zur Lumenseite abgegeben. Durch die basale leichte Diffusion in die umgebende Gefäßmuskelschicht bindet

es an die Häm-Gruppe der löslichen Isoform der Guanylatcyclase (GC-S) in den glatten Gefäßmuskelzellen und aktiviert diese, die den second messenger cGMP aus GTP bildet. cGMP wiederum führt über eine Erniedrigung der intrazellulären Ca^{2+} -Spiegel durch erhöhte Rückaufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum unter Vermittlung der cGMP-abhängigen Proteinkinase G (PKG). Es resultiert hierdurch eine Gefäßrelaxation.

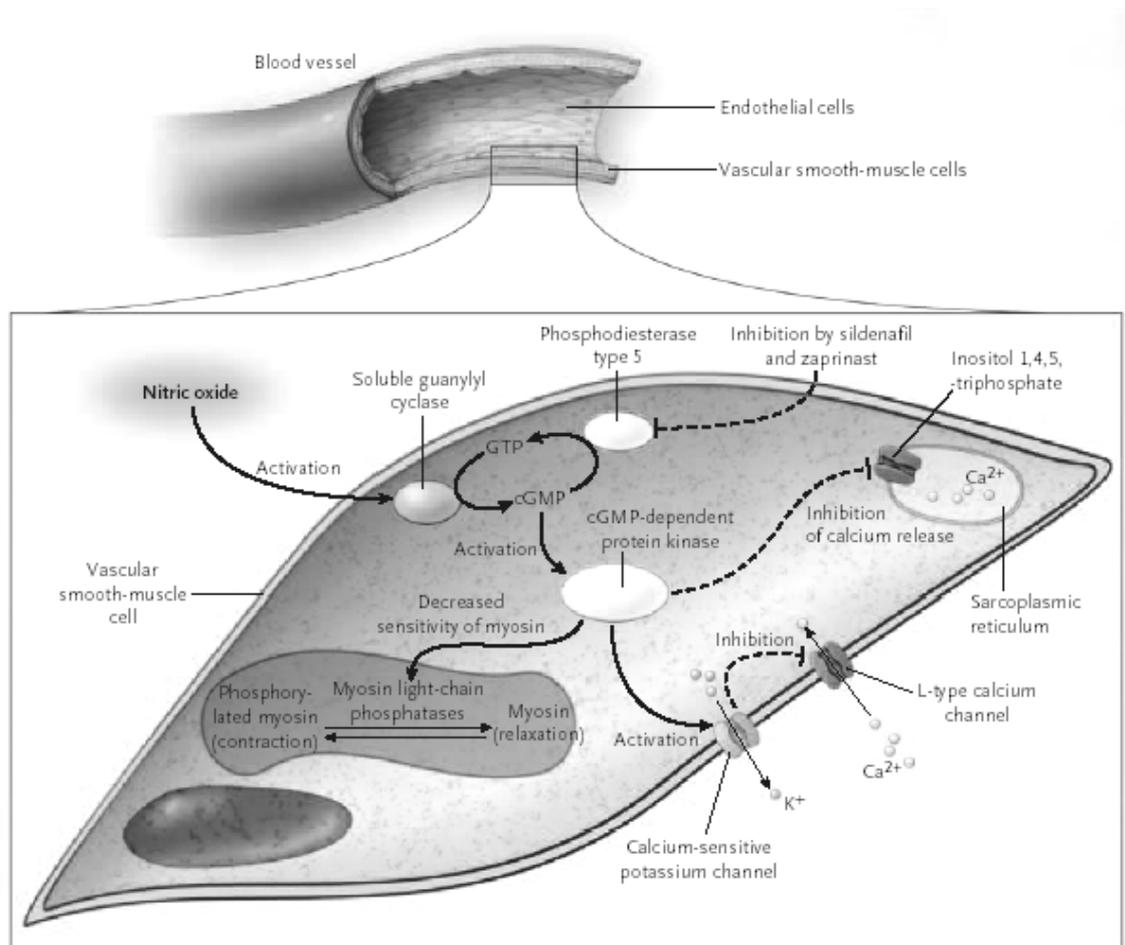


Abb. 1.1: Regulation der Relaxation der glatten Gefäßmuskelzelle durch NO (aus Mark et al., 2005). Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert die Guanylatcyclase (GTP), steigert somit die Synthese von cGMP, aktiviert hierdurch die Poteinkinase und bewirkt über die Reduktion der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration eine Relaxierung der glatten Muskelzelle mit dem Ergebnis einer Vasodilatation.

Als endotheliale Aktivierung versteht man die Veränderung der Genexpression und der Morphologie von Endothelzellen auf inflammatorische Reize. Diese Reize werden entweder durch Risikofaktoren der Arterioskleroseentwicklung wie z. Bsp. arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie oder Nikotinabusus ausgelöst. Auch können mechanische Reize wie turbulente Strömungsverhältnisse eine Rolle in der endothelialen Aktivierung spielen. Eine Folge hierfür ist eine erhöhte Oberflächenadhäsivität der Endothelzelle, die in zahlreichen Untersuchungen gesehen werden konnte (Gimbrone et al., 1980, Sitia et al., 2010, Gkaliagkousi et al., 2011).

Die endotheliale Dysfunktion beschreibt eine fehlende Relaxation der Gefäße auf NO. Dabei erzeugt Acetylcholin eine paradoxe Vasokonstriktion, beispielsweise bei Patienten mit Koronarer Herzkrankheit (Ludmer et al., 1986) Lefer et al. (1991) erklärten die endotheliale Dysfunktion mit der verminderten Bioverfügbarkeit von Stickstoffmonoxid (NO). Die endotheliale Dysfunktion findet sich früh bei arteriosklerotischen Läsionen (Davignon et al., 2004).

NO vermittelt zudem gefäßprotective Effekte. Durch luminale Abgabe von NO kommt es zu einer Stimulation der löslichen Guanylatcyclase in den Thrombozyten, wobei deren Aggregation und Adhäsion gehemmt werden (Kleinbongard et al., 2006). Darüber hinaus vermindert es die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand und bremst die Proliferation von glatten Gefäßmuskelzellen. Diese Prozesse spielen bei atherosklerotischen Gefäßerkrankungen eine große Rolle, wodurch NO als ein protektives Molekül im Gefäßsystem angesehen wird (Voetsch et al., 2004). Es konnte in vergleichenden Untersuchungen an gesunden und arteriosklerotisch veränderten Gefäßwänden des Menschen gezeigt werden, dass eNOS in Endothelzellen nur gesunder Gefäßwände exprimiert wird. In arteriosklerotischen Läsionen hingegen nimmt die eNOS-Expression der Endothelzelle ab (Wilcox et al., 1997). Gleichzeitig wird über eine verminderte NO-Bioverfügbarkeit bei z. Bsp. Hypercholesterinämie berichtet (Feron et al., 1999).

Es wurde gesehen, dass die endotheliale Produktion von NO bei primärer arterieller Hypertonie vermindert ist; dies legt die Vermutung nahe, dass eine Störung der NO-vermittelten Vasodilatation an der Pathogenese der arteriellen Hypertonie beteiligt ist.

In der Niere spielt NO eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der renalen Perfusion und glomerulären Filtrationsrate; bei niedrig dosierter systemischer NO-Inhibition kann bereits eine renale Vasokonstriktion beobachtet werden, bevor sich der systemische Blutdruck erhöht (Wolzt et al., 1997). Weiterhin ist NO am tubuloglomerulären Feedback (Thorup und Persson, 1994) und an der druckbedingten Natriuresis (Fenoy et al., 1995) beteiligt.

Zur Inhibition der NO-Produktion kann es über verschiedene Wege kommen: durch z. Bsp. einer Hemmung der Aufnahme von L-Arginin in die Zelle mit Ornithin oder Lysin. Auch kann die NO-Synthese durch Inhibition der NOS-Synthase durch die Gabe von L-Arginin-Analoga gehemmt werden. Diese intrazellulär wirkenden Substanzen sind der in dieser Arbeit verwendete kompetitive NO-Synthase-Hemmer L-NAME (N_G-Nitro-L-Arginin-Methylester), ADMA (asymmetrisches Dimethylarginin) oder L-NMMA (N_G-Monomethyl-L-Arginin). Der Einsatz dieser Analoga führt zu einem signifikant erhöhten Blutdruck in vivo (Moncada et al., 1992). Ebenso konnte bei eNOS-knockout-Mäusen eine Entwicklung einer arteriellen Hypertonie gesehen werden (Huang et al., 1995). Asymmetrisches Dimethylarginin, ein Metabolit des Protein-Stoffwechsels, ist ein endogen im Blutplasma nachzuweisender Inhibitor der NO-Synthase. Die Effekte einer ADMA-Infusion sind mit den Effekten einer L-NAME oder L-NMMA-Gabe vergleichbar (Kielstein et al., 2006). ADMA ist an der Entstehung der Arteriosklerose beteiligt, besonders bei Niereninsuffizienz, da es dort vermehrt kumuliert (Ravani et al., 2005). Bislang ist keine pharmakologische Antagonisierung des ADMA-Effekts bekannt.

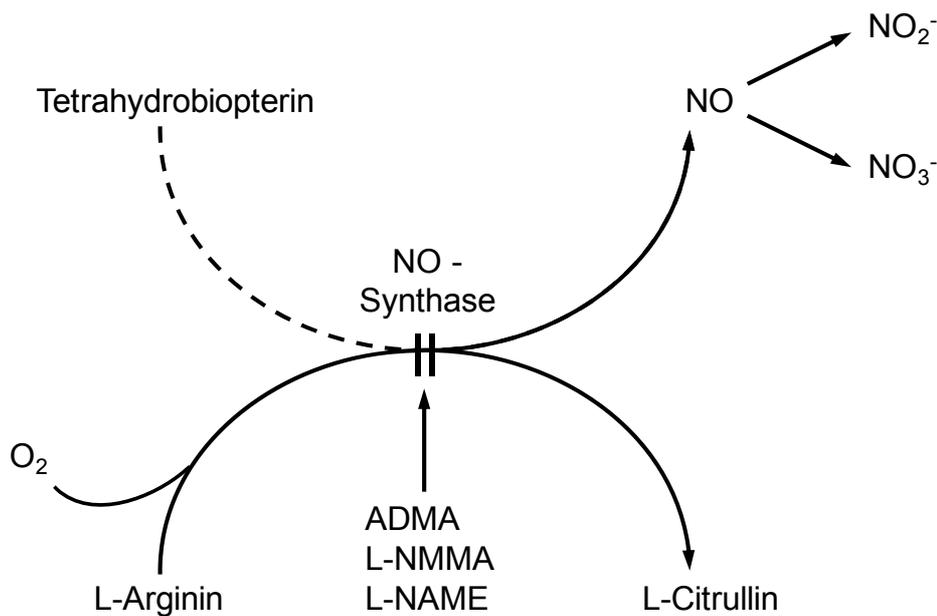


Abb. 1.2: Vereinfachte schematische Darstellung des L-Arginin/NO-Stoffwechselweges, wobei aus L-Arginin und Sauerstoff durch NO-Synthasen L-Citrullin unter Freisetzung von NO entsteht. Die NO-Synthasen sind durch ADMA, L-NMMA und L-NAME inhibierbar.

I.2. Tetrahydrobiopterin (BH₄)

I.2.1. Synthese von BH₄

Der Elektronendonator BH₄ ist als Kofaktor zur Synthese von NO essentiell; daneben kann es als Radikalfänger fungieren. Es wird aus GTP de-novo synthetisiert oder aus oxidierten Formen regeneriert (sog. salvage pathway). Intrazelluläre BH₄-Spiegel werden durch Kontrolle des Schrittmacherenzym der BH₄-Biosynthese, der GTP-Cyclohydrolase (GTP-CH), reguliert. Bei Entzündungen mit gesteigerter NO-Synthese durch die induzierbare NO-Synthase iNOS wird der erhöhte Bedarf an BH₄ durch Induktion der GTP-CH-Aktivität kompensiert (Thony et al., 2000).

Unter BH₄-Mangelzuständen kommt es auch zu einer erhöhten Bildung von Superoxidanionen durch die NO-Synthase (Vasquez-Vivar et al., 1998). In vitro-Studien konnte gezeigt werden, dass eine reziproke Beziehung zwischen der H₂O₂- und der NO-Synthese besteht, wobei zunehmende Konzentrationen

von BH₄ oder der Ausgangssubstanz L-Arginin eine Verschiebung zugunsten der NO-Synthese bewirken (Heinzel et al., 1992).

Angeborene Störungen in der BH₄-Synthese führen klinisch zu einer Phenylketonurie (PKU), da neben der NO-Synthase Enzyme des Aminosäuren-Stoffwechsels (z.B. hier die Phenylalaninhydroxylase) BH₄ als essentiellen Cofaktor benötigen. Diese Sonderform der PKU, die in diesen Breiten ca. 1-2% aller Hyperphenylalaninämien ausmacht, wird jedoch nicht konventionell mit einer phenylalanin-armen Diät, sondern mit einer Substitution von BH₄ behandelt. Das bedeutet, dass lebenslang exogenes BH₄ in Tablettenform zugeführt werden muss (Blau und Duran, 2003).

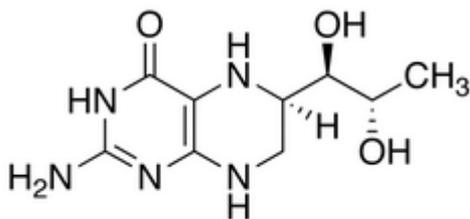


Abb. 1.3: Strukturformel von BH₄ (6R-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin)

I.2.2. BH₄ und die Endotheldysfunktion

Dem Endothel kommt eine immer größere Funktion in der Regulation des Gefäßtonus über Freisetzung von vasoaktiven Substanzen zu. Es ist an der Produktion und Ausschüttung vasodilatierender (NO, Kinine, Histamin, Prostaglandine der Gruppe A und E, PgA₁, PgA₂, PgE₂) und vasokonstringierender Substanzen (Thromboxan, Serotonin, Endothelin, ET-1, TXA₂, und PgF₂) und somit sehr stark an der Regulation der Mikro- und Makrozirkulation beteiligt (Schnackenberg, 2002, Drexler und Hornig, 1999, Hick, 1996).

Daher spielt das NO-System eine entscheidende Rolle in der Entstehung von Gefäßerkrankungen. Verschiedene Faktoren können zur Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion führen. Dabei verliert das Endothel die Fähigkeit, antiaggregatorische und vasodilatierende Faktoren freizusetzen. Durch

atherosklerotische Plaques bedingte Endothelschäden und damit einhergehender Verlust dieser Faktoren führen zur Ablagerung und Aggregation von Thrombozyten, welche durch Freisetzung von aggregatorischen und vasokonstriktorisches Faktoren wie Thromboxan A₂, ADP, PAF (=Platelet activating factor) den Aggregationsprozess weiter verstärken. Durch Bildung freier O₂-Radikale wird zusätzlich der endotheliale NO-Abbau verstärkt.

Als Risikofaktoren für die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion werden systemische Hypertonie, Diabetes mellitus, Rauchen, genetische Disposition, Adipositas und Hypercholesterinämie angesehen, die zu einer Erniedrigung des wichtigen vasoaktiven Metabolites NO führt (Tiefenbacher, 2001).

Die Gabe von BH₄ könnte eine therapeutische Option zur Behandlung der Endotheldysfunktion sein (Tiefenbacher, 2001). Dies beruht auf der Hypothese, dass der NO-Verarmung ein Mangel an BH₄ zugrunde liegen könnte. In Zellkulturen von Endothelzellen aus diabetischen Ratten konnte eine stark erniedrigte intrazelluläre BH₄-Konzentration gemessen werden, die durch exogene Substitution mit der Ausgangssubstanz Sepiapterin reversibel war (Meininger et al., 2000).

In kleinen klinischen Studien konnte BH₄ eine verminderte Aktivität des endothelialen NO-Systems wiederherstellen: so hob die intrakoronare BH₄-Gabe bei KHK-Patienten die paradoxe Vasokonstriktion auf Acetylcholin-Infusion auf (Fukuda et al., 2002, Maier et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse wurden bei Patienten mit Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie und chronischer Herzinsuffizienz sowie bei Rauchern beobachtet (Heitzer und Munzel, 1998, Setoguchi et al., 2002, Stroes et al., 1997).

Aus den bisherigen Erfahrungen mit der Substanz aus der Pädiatrie weiß man, dass sie ohne Langzeittoxizität oder akuten Nebenwirkungen bei Kindern mit BH₄-defizienter PKU lebenslang substituiert werden kann/muss (Blau und Blaskovics, 2002). Die dabei angegebene Höchstdosis liegt bei 20 mg/kg KG/Tag. Daneben sind in den oben erwähnten Studien intraarterielle, sogar intrakoronare Infusionen ohne Komplikationen erfolgt. In einer Studie wurde 800mg BH₄ systemisch über eine inhalative Aufnahme verabreicht, was gut vertragen wurde (Walter et al., 1997).

I.3. L-NAME (N^G-Nitro-L-Arginin-methylester)

L-NAME (N^G-Nitro-L-Arginin-methylester, C₇H₁₅N₅O₄,HCl) ist ein Analogon der auch im menschlichen Organismus produzierten nicht-essentiellen Aminosäure L-Arginin und blockiert als kompetitiver Antagonist alle drei Isoformen der NO-Synthetasen (I-III). Durch die Hemmung der Produktion des Vasodilatators NO führt L-NAME zu einer Blutdrucksteigerung sowie einer Senkung der Pulsfrequenz und der Nierendurchblutung.

Verschiedene NO-Syntheseantagonisten wie z.B. das körpereigene L-NMMA wurden in diversen Studien intraarteriell in den Unterarm sowie systemisch intravenös appliziert (Hansen et al., 1994). In einer Pilotstudie von Haynes et al. (1993) stellte sich eine Gabe von 3 mg/kg Körpergewicht als die Dosierung mit der günstigsten Dosis-Wirkungsbeziehung heraus. Neuere Untersuchungen von Sander et al. zeigten, dass bei einer Applikation von 2 mg/kg KG des synthetischen NO-Syntheseinhibitors L-NAME über 30 Minuten mit vergleichbaren Effekten wie bei der Gabe von 3 mg/kg KG L-NMMA über 10 Minuten zu rechnen ist. An unerwünschten Nebenwirkungen sind bei L-NAME eine vorübergehende Übelkeit und Müdigkeit (14% bzw. 23%) beschrieben (Sander et al. 1999).

I.4. ADMA (Asymmetrisches dimethylarginin)

Durch zahlreiche Versuche konnte gezeigt werden, dass die Hemmung von NO-Synthese durch endogene Inhibitoren der NO-Synthase (NOS) möglicherweise eine Rolle bei der endothelialen Dysfunktion spielt (Cooke et al., 2000). Im Jahr 1992 konnte erstmals Vallance et al. deutlich erhöhte Plasmaspiegel des NOS-Inhibitors ADMA (asymmetrisches dimethylarginin) in Patienten mit renaler Erkrankung im Endstadium zeigen (Vallance et al., 1992). In den darauf folgenden Jahren wurden eine ganze Reihe von Studien an Patienten mit renalen und nicht-renalen Erkrankungen durchgeführt die eine enge Beziehung zwischen ADMA-Blutspiegeln und erhöhter kardiovaskulärer Morbidität und Mortalität aufzeigten (Boger et al., 1997, Kielstein et al., 1999, Miyazaki et al., 1999, Valkonen et al., 2001, Yoo et al., 2001, Zoccali et al.,

2001). Daraus resultierend wird ADMA nicht nur als ein biochemischer Marker gesehen, sondern spielt eine kausale Rolle in der Atherosklerose (Vallance et al., 2004). In experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass reduzierte Bioverfügbarkeit von NO eine kritische Rolle in der Progression von renalen Erkrankungen spielt (Baylis et al., 1992, Benigni et al., 1999), zu diesem Prozess könnten erhöhte ADMA-Blutspiegel beisteuern (Wagner et al., 2002). Die Wirkung von ADMA konnte bis 2006 nur in-vitro Studien und an Tiermodellen gezeigt werden (Wagner et al., 2002, Faraci et al., 1995, Gardiner et al., 1993, Jin et al., 1996, Segarra et al., 2001, Tojo et al., 1997, Xiong et al., 2001), in-vivo-Untersuchungen an Probanden zeigten, dass die systemische intravenöse Gabe von ADMA signifikante Effekte auf die kardiovaskuläre und renale Funktion hat und glomeruläre Filtrationsrate reduziert, den Blutdruck, den renal-vaskulären Widerstand erhöht sowie die Natrium-Ausscheidung hemmt (Kielstein et al., 2006). Bislang existiert keine Möglichkeit, die endogenen ADMA-Wirkung zu antagonisieren.

I.5. Studienziel

Zielsetzung dieser Studie war es, an gesunden Probanden die systemische und renale Hämodynamik nach Hemmung der endogenen NO-Synthese mittels dem exogen intravenös appliziertem NO-Synthase-Antagonisten L-NAME in Abhängigkeit von einer oralen Vorbehandlung mit BH₄ zu untersuchen. Insbesondere interessierte die Fragestellung, ob und inwieweit eine Vorbehandlung mit BH₄ die Effekte von L-NAME antagonisieren oder abschwächen kann.

II. Studiendesign und Methoden

II.1. Probanden

An der Studie nahmen 10 gesunde männliche Probanden im Alter zwischen 23 und 32 Jahren freiwillig teil, bei denen ein familiärer Hypertonus sowie Diabetes mellitus Typ 2 ausgeschlossen wurde. Alle Probanden waren Nichtraucher.

II.2. Teilnahme Kriterien

II.2.1 Einschlusskriterien

- normale Nierenfunktion, d.h. Normwerte (0,5-1,2 mg/dl) für Serum-Kreatinin
- keine kardialen oder renalen Vorerkrankungen
- männlich
- Alter: 18-40 Jahre
- Body-mass-Index zwischen 20 und 25 kg/m²
- kein Elternteil mit bekannter, therapiebedürftiger arterieller Hypertonie oder Diabetes mellitus
- Echokardiographie: Ausschluss einer strukturellen Herzerkrankung

II.2.2. Ausschlusskriterien

- weibliches Geschlecht
- Nikotinkonsum
- Strukturelle kardiale Erkrankungen
- pulmonale Erkrankungen
- manifester Diabetes mellitus
- Durchblutungsstörungen
- Herzrhythmusstörungen

- angioneurotisches Ödem, C₁-Esterase-Inhibitormangel
- manifeste arterielle Hypertonie gemäß WHO-Kriterien
- bekannte Allergie oder Unverträglichkeit gegen Vit.C
- pathologische Laborparameter bei der Erstuntersuchung
- dauerhafte Medikation

II.2.3. Abbruchkriterien

- überschießender Blutdruckanstieg auf Werte über 200 / 100 mmHg
- Blutdruckabfall auf <100 / 60 mmHg
- Anstieg der Herzfrequenz auf >100/min
- EKG-Veränderung
- Schmerzen in der Brust
- Luftnot
- Übelkeit
- sonstige Beschwerden seitens des Probanden

II.3 Studiendesign

Bei dieser Untersuchung handelte es sich um eine klinische Studie, bei der die Wirkung des NO-Syntheseantagonisten L-NAME (Clinalfa AG, Läufelfingen, Schweiz) in einem placebo-kontrollierten Cross-Over-Design an n=10 Probanden getestet wurden. Die beiden Untersuchungen fanden an zwei getrennten Tagen im Abstand von mindestens 14 Tagen statt.

Dem Studientag ging eine ausführliche ambulante Eingangsuntersuchung voraus, die eine Anamnese, körperliche Untersuchung, eine laborchemische

Untersuchung von Blut und Urin, ein EKG und ein Echokardiogramm beinhaltete, um mögliche Ausschlusskriterien aufzudecken.

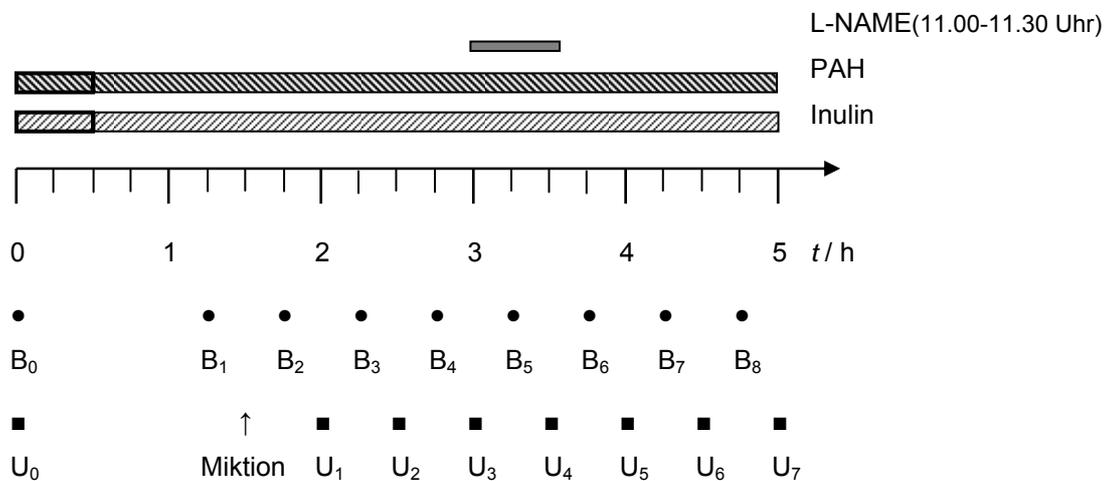
Alle Teilnehmer, die die Einschlusskriterien erfüllten, erhielten eine umfassende Aufklärung über die Studie und deren Durchführung, über mögliche Risiken und unerwünschte Nebenwirkungen der eingesetzten Substanzen, bevor sie ihr schriftliches Einverständnis gaben. Für alle Versuchspersonen wurde eine spezielle Studienversicherung abgeschlossen. Das Studienprotokoll wurde von der Tübinger Ethikkommission geprüft und genehmigt.

Die Probanden erhielten ein Merkblatt zur Einhaltung spezieller Maßnahmen 12, 24 und 48 Stunden vor Studienbeginn. Es beinhaltete sowohl eine Nahrungs- und Trinkkarenz, insbesondere coffeinhaltiger Getränke, als auch eine Alkohol- und passive Nikotinkarenz. Auch wurde in dem Merkblatt aufgeführt, wie man die BH₄-Tabletten einnehmen soll.

Die Vorbehandlung mit oralem Tetrahydrobiopterin (BH₄) erfolgte über 2 Tage vor dem Verum-Studientag in einer Dosierung von 10mg/kg KG, entsprechend 800mg/Tag. Diese Dosis wurde auf 4 Gaben verteilt. Bei einer BH₄-Dosis von 50mg/Tablette wurden 4 x 4 Tabletten/Tag eingenommen, die letzte Dosis am Morgen des Studientags. Da BH₄-Tabletten das Antioxidans Vitamin C enthalten, wurde es ebenfalls 2 Tage vor dem Placebo-Studientag oral in der gleichen Dosierung wie im Verum-Arm verabreicht (10mg Vit. C/kg KG), entsprechend 800mg/Tag. Dazu wurde das Präparat Cebion[®], (50mg Vit. C, Fa. Merck) in einer Dosierung von 4 x 4 Tabletten eingesetzt.

Das BH₄ in Tablettenform wird über die Schweizer Firma Schircks vertrieben. Eine Tablette mit 50mg Tetrahydrobiopterin enthält als Antioxidans 50mg Vitamin C.

II.3.1. Studienentwurf – Graphische Darstellung und Messpunkte



B ₀ , B ₈	BB	(2 x 2 ml EDTA)	4 ml
B ₀₋₈	Inulin, PAH	(9 x 9 ml Serum)	81 ml
B ₂₋₈	Na, K	(7 x 2 ml Li-Heparin)	14 ml
B _{2,3,7,8}	cGMP	(4 x 2 ml EDTA)	8 ml
		Summe	ca. 110 ml
U ₀	PAH, Inulin	(1 x 10ml)	
U ₁₋₇ , U _{mix1,mix2}	PAH, Inulin, Na, K	(7 x 10ml)	
U _{mix1,mix2}	cGMP	(2 x 5ml)	

II.3.2. Praktische Durchführung

Vor Beginn des Studientages mussten die Teilnehmer eine 12-stündige Nahrungskarenz einhalten. Alkohol und passiver Nikotinrauch waren 24 h vor der Untersuchung nicht erlaubt. In den 12 Stunden vor dem Versuchstag durfte weder Kaffee noch Schwarztee oder andere koffeinhaltigen Getränke eingenommen werden.

Nach Eintreffen der Probanden in die Medizinische Klinik wurden die Einverständniserklärungen von seitens der Teilnehmer als auch vom Arzt unterschrieben. Danach wurde von den Studienteilnehmern zum Zeitpunkt 0

eine Blutabnahme (B_0) sowie eine Urinprobe (U_0) als Leerwert vor Beginn der Bolusinfusion abgenommen.

Die Teilnehmer mussten am Verum-Tag die letzte Dosis der BH_4 -Tabletten einnehmen (insgesamt 4 Stück á 50 mg), bei dem Placebo-Tag entsprechend 4 Vitamin-C-Tabletten. Sie wurden an ein Monitor angeschlossen, der im Zehn-Minuten-Takt den Blutdruck maß und das EKG bzw. die Herzfrequenz anzeigte. Anschließend wurde in beide Unterarme ein Venenverweilkatheter der Firma Braun gelegt. Über den intravenösen Zugang wurde dann mit der 30-minütigen Infusion der Boluslösung begonnen, die am gleichen Morgen zubereitet wurden. In der 250ml Boluslösung (5%-ige Glucose-Lösung) waren 1,1g p-Aminohippursäure (PAH) und 7,5g Inulin gelöst. Die Infusion der Boluslösung erfolgte bei einer Laufgeschwindigkeit von 500 ml/ h mit dem Infusomat[®] der Firma Braun Melsungen AG.

Direkt im Anschluss daran wurde die Erhaltungsinfusion appliziert, die bis zum Ende der fünf-stündigen Untersuchung infundiert wurde. Diese 5%-ige Glucose-Lösung enthielt 2,2g PAH und 8,5g Inulin und wurde mit einer Laufgeschwindigkeit von 55ml/h infundiert (Gesamtvolumen 250ml). Dies diente dem Erhalt eines konstanten Plasmaspiegels von PAH und Inulin. Anhand der Clearance dieser beiden Stoffe konnte der renale Plasmafluss (RPF) und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt werden.

Die Probanden mussten nicht mehr nüchtern sein, sie bekamen ein coffeinfreies und salzarmes Frühstück. Sie wurden angehalten, während des gesamten Versuchs, aber insbesondere ab dem Zeitpunkt des Urinsammelns alle halbe Stunde viel Flüssigkeit im Sinne von mindestens 350ml natriumchloridarmes Mineralwasser pro Stunde zu trinken, um eine ausreichende Diurese zu gewährleisten.

Eineinhalb Stunden nach Beginn der Untersuchung mussten die Studienteilnehmer ihre Blase vollständig entleeren. Dieser Urin wurde verworfen. Da nun ein steady state vorausgesetzt wurde, konnte mit den Clearance-Experimenten begonnen werden. Die erste Sammelperiode war zwischen 9.30-10.00 Uhr. In der Mitte dieses Intervalls erfolgte die Blutentnahme entsprechend 105 Minuten nach dem Start der Bolusinfusion. Sie

dient zur Untersuchung der PAH- und Inulin-Spiegels sowie des Natrium- und Kaliumspiegels. Fünfzehn Minuten später wurde den Probanden Urin abgenommen (U1). Im 15-Minuten-Takt erfolgten nun abwechselnd Blutabnahmen und Urinabgaben bis zum Ende des Studientages. Dabei kamen 10 Urinproben und 9 Blutproben für die Messung von PAH und Inulin zusammen; ins Labor wurden 8 Blut- und 9 Urinproben für die Messung von u.a. Blutbild, Kalium, Natrium geschickt. Auch wurden mehrere Proben (EDTA-Blut) zu verschiedenen Zeitpunkten für die spätere Bestimmung von cGMP entnommen.

Nach 3 Sammelperioden zu jeweils 30 Minuten wurde 180 Minuten nach dem Beginn der Bolusinfusion die L-NAME-Infusion über 30 Minuten gestartet zusätzlich zur Inulin/PAH-Infusion. Die Konzentration betrug 1,5mg L-NAME/kg KG und wurde mit einer Laufgeschwindigkeit von 99,9ml/h über einen Perfusor injiziert. Die L-NAME-Lösung wurde für jeden Probanden am Studientag präpariert und bis zum Einsatz auf Eis gekühlt gelagert. Der in der Applikationszeit zwischen 11.00 und 11.30 Uhr gewonnene Urin wurde verworfen.

Die Probanden mussten während des kompletten Versuchs über insgesamt fünf Stunden liegen und sollten die Urinproben durch spontane Miktion in Urinflaschen liegend im Bett abgeben. Da es bei den meisten Abgabezeitpunkten auf Anhieb klappte, musste keiner der Probanden aufstehen, was den möglicherweise den Blutdruck verfälscht hätte. Die einzelnen Urinvolumina wurden mit Messzylindern abgemessen, dokumentiert und Proben in Eppendorf-Küvetten entnommen. Zusätzlich wurden die drei halbstündigen Sammelperioden zwischen 9.30-11.00 Uhr und 11.30-13.00 Uhr jeweils gepoolt (Umix 1, Umix2).

Nach jeder Blutentnahme wurde ein jeweils neues Mandrin (Vasofix[®]-Vasocan[®] Braunüle der Firma Braun) in die Venenverweilkanüle geschoben, um deren Verschließen zu verhindern.

Das Blut der PAH und Inulin- Bestimmung wurde in 7,5ml Serum- Röhrchen, das cGMP wurde in 3ml EDTA-Monovetten abgenommen und auf Eis gelagert.

Nach Beendigung der Studie wurden die Proben bei ca. 2500 g über 10 min zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und ebenso wie die Urine in Eppendorf-Küvetten bei -20°C bis zu ihrer Aufarbeitung und Bestimmung aufbewahrt.

II.3.3. Zusammensetzung der einzelnen Infusionen

Die Substanzmengen, die den Probanden verabreicht wurden, ergaben sich aus der Berechnung der einzelnen Körperoberflächen der Probanden. Da die Körperoberfläche bei allen Teilnehmern zwischen 1,9 und 2,1 m² betrug, wurden allen Probanden bei der Inulin- und PAH-Infusion die gleiche absolute Dosis verabreicht. Die L-NAME-Infusionsmenge wurde jedoch individuell für jeden Probanden einzeln bestimmt (1,5 mg/ kg KG).

Bolusinfusion:

Aufsättigungsdosis zur Durchführung der Inulin- und PAH-Clearance:

- 25 ml Inutest®-Lösung entsprechend 6,25g Sinistrin, Firma: Fresenius Kabi, 1 Ampulle zu 20ml enthält 5 g Sinistrin
- 5,1 ml PAH- Lösung entsprechend 1,1g PAH, Firma Clinalfa AG, 1 Ampulle zu 5,1ml enthält 1,1g PAH
- Zugabe beider Substanzen in 250 ml 5%-Glucose-Lösung der Firma Fresenius
- Infusionsgeschwindigkeit: 500 ml/h
- Infusionsdauer 30 Minuten

Erhaltungsinfusion:

- 35 ml Inutest® entsprechend 8,75g Sinistrin
- 10,2 ml PAH- Lösung entsprechend 2,2g PAH
- Zugabe der Substanzen in 250 ml 5%-Glucose- Lösung
- Infusionsgeschwindigkeit: 55ml/h
- Infusionsdauer: 270 Minuten

L-NAME-Infusionslösung:

- L-NAME: 1 Durchstechampulle enthält 110mg Trockensubstanz
- L-NAME-Trockensubstanz auflösen in 5 ml Aqua dest. ad iniectabilia, entsprechend $110\text{mg}/5\text{ml} = 22\text{mg/ml}$
- Dosierung: 1,5mg L-NAME/ kg Körpergewicht
- Überführen in Perfusorspritze und Auffüllen mit Aqua dest. ad iniectabilia (Firma Fresenius) bis auf 50ml
- Infusionsgeschwindigkeit: 99,9ml/h
- Infusionsdauer: 30 Minuten

II.4. Laboranalysen

II.4.1. Probenaufarbeitung

Die Urin- und Serum-Proben wurden nach der Methode von Roe et al. (1949) (ref. Einfügen) und von Smith et al. (1938) auf ihre PAH- und Inulin-Konzentrationen untersucht, woraus sich die entsprechende Clearance berechnen ließen.

Die Serum- bzw. Urin-Proben mussten im Wasserbad (nicht über 37°C) oder über Nacht im Kühlschrank aufgetaut werden. Die Proben wurden im Vortexer gut geschüttelt und anschließend für 10 Minuten bei 4000 UpM zentrifugiert (ca. 2500g). Als nächstes erfolgte Enteiweißung der Proben in 10ml Röhrchen. Dabei wurden 0,5ml Probe (Plasma/Urin) mit 0,5ml 10%ige ZnSO₄, 0,5ml 0,5N NaOH und 1ml H₂O versetzt. Nach jeder zugegebenen Lösung wurde mit dem Vortexer gut geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen gelassen und dann bei 4000 UpM (ca. 2500g) 10 min lang zentrifugiert. Der Überstand wurde in die Messung eingesetzt.

II.4.2. Inulin

II.4.2.1. Benötigte Reagenzien

- 1) 30%ige HCl
- 2) Resorcin

II.4.2.2. Herstellung der Reagenzien

- Resorcin: 0,1g Resorcin + 0,25g Thioharnstoff in 100 ml Essigsäure in dunkler Flasche lösen

II.4.2.3. Inulin-Messung

- 1) Herstellung einer Standardverdünnungsreihe, ausgehend von Inutest®-Ampullen mittels 1:2 Verdünnung: 5 - 2,5 - 1,25 - 0,625 - 0,312 - 0,16 mg/dl
- 2) Urinverdünnung der enteiweißten Urinproben; Verdünnung 1:10
- 3) Zugabe von 125µl Resorcin-Reagenz und 1000µl 30%ige HCl zu jeweils 250µl der enteiweißten Serum- bzw. 1:10-Urinverdünnungsproben: nach Zugabe jeweils Durchmischung der Probe
- 4) Erhitzen der Proben im Wasserbad bei einer Temperatur von 80°C für ca 6-8 Minuten
- 5) bei leichter Färbung der niedrigsten Standardkonzentration sofortige Abkühlung im Eiswasser
- 6) Umfüllen der Proben in Plastikküvetten
- 7) Photometrische Messung bei 546 nm gegen die Inulin-Standardverdünnungsreihe; H₂O dest. als Leerwert

Aus den gemessenen Extinktionen ließen sich die Inulin-Konzentrationen anhand der Ergebnisse der Standardreihen ermitteln. Für die Urinproben wurden die erhaltenen Konzentrationen mit dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert.

II.4.3. PAH

II.4.3.1. Benötigte Reagenzien

- 1) 0,1 %ige NaNO₂
- 2) 0,5 %ige Amidosulfonsäure
- 3) 0,1N N-Ethyl- α - Naphthylaminhydrobromid

II.4.3.2. Herstellung der Reagenzien

- 0,1%ige NaNO₂: 0,1g NaNO₂ in 100 ml H₂O dest. lösen
- 0,5% Amidosulfonsäure: 0,5g Amidosulfonsäure in 100ml H₂O dest. Lösen, bis 3 Wochen kühl gelagert haltbar
- 0,1 N N- Ethyl- α - Naphtylaminhydrobromid: 0,1g in 10 ml warmen Methanol lösen und mit 90ml H₂O dest auffüllen

II.4.3.3. PAH-Messung

- 1) Herstellung der Standardverdünnungsreihe, ausgehend von PAH®-Ampullen mittels 1:2 Verdünnung: 5,44 - 2,72 - 1,36 - 0,68 - 0,34 - 0,18 mg/dl
- 2) Urinverdünnung der enteiweißten Urinproben; Verdünnung 1:100
- 3) zu jeweils 500 μ l der enteiweißten Serum- bzw. 1:100-Urinverdünnungsproben Zugabe von:
 - I) + 100 μ l 0,1N HCl; schütteln
 - II) + 50 μ l NaNO₂; schütteln, 5 Minuten stehen lassen
 - III) + 50 μ l 0,5%ige Amidosulfonsäure; schütteln, 5 Minuten stehen lassen
 - IV) + 50 μ l 0,1%ige N-ethyl- α -naphthylaminhydrobromid, schütteln, 40 Minuten stehen lassen
- 4) Umfüllen der Proben in Plastikküvetten
- 5) Photometrische Messung bei 528 nm gegen die PAH-Standardverdünnungsreihe; H₂O dest. als Leerwert

Aus den gemessenen Extinktionen ließen sich die PAH-Konzentrationen anhand der Ergebnisse der Standardreihen ermitteln. Für die Urinproben wurden die erhaltenen Konzentrationen mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert.

II.4.4. Übrige Laborparameter

1) Hämatologie:

Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozytenzahl (Culter Counter Modell S Plus der Firma Culter, Krefeld).

2) Serum-Elektrolyte:

Natrium, Kalium (ionenselektive Elektroden).

3) Urin-Elektrolyte:

Natrium, Kalium (ionenselektive Elektroden).

4) Serum-cGMP:

Das cGMP wurde mit einem RIA-Kit der Firma IBL GmbH Hamburg aus EDTA-Blut gemessen. (Referenzbereich des cGMP: Plasma: $4,9 \pm 1,3$ pmol/ml).

II.4.5. Andere Untersuchungsmethoden

II.4.5.1. Bestimmung des Blutdrucks

Der Blutdruck wurde mittels einer automatischen Druckmanschette regelmäßig alle 10 Minuten bestimmt. Die Messung erfolgte bei jedem Studienteilnehmer unter standardisierten Bedingungen:

- gleiches Gerät, Manschette auf den Armumfang des Patienten abgestimmt
- stets am gleichen unbedeckten Arm
- stets beim ruhig liegenden Probanden

II.4.5.2. Bestimmung der Herzfrequenz (HF)

Die HF wurde fortlaufend aus dem EKG (Ableitung II) bestimmt.

II.5. Formeln

Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die glomeruläre Filtrationsrate ist eine Funktion von Ultrafiltrationskoeffizient und effektivem Filtrationsdruck im Glomerulus; der Filtrationsdruck ist von Blutdruck und Widerständen in Vas afferens und Vas efferens abhängig.

Zur Bestimmung der GFR wurde das Polysaccharid Inulin gewählt, da es bei parenteraler Zufuhr nicht metabolisiert wird, praktisch frei filtrierbar ist und in den Nierentubuli weder rückresorbiert noch sezerniert wird. Folglich verhält sich die Inulinmenge im Urin direkt proportional zum glomerulär filtriertem Primärharn.

Folgende Formel dient zur Berechnung der auf die Standardkörperoberfläche von 1,73 m² bezogenen GFR [in ml/min/1,73m²):

$$GFR = \frac{U_{Inulin} \cdot V \cdot 1,73m^2}{P_{Inulin} \cdot KOF}$$

Effektiver renaler Plasmafluss (ERPF)

Zur Bestimmung des effektiven renalen Plasmaflusses (ERPF) wurde p-Aminohippursäure (PAH) verwendet, da diese vollständig glomerulär filtriert und in den proximalen Tubulus sezerniert wird.

Folgende Formel dient zur Bestimmung der auf die Standardkörperoberfläche von 1,73 m² bezogenen ERPF:

$$ERPF [ml / min / 1,73m^2] = \frac{U_{PAH} \cdot V \cdot 1,73}{P_{PAH} \cdot KOF}$$

Filtrationsfraktion (FF)

Die Filtrationsfraktion (FF) ist der prozentuale Anteil des renalen Plasmaflusses, der im Glomerulum filtriert wird.

$$FF[\%] = \frac{GFR}{ERPF} \cdot 100$$

Absolute Natrium- bzw. Kalium-Ausscheidung

Die absolute Na- bzw. K-Ausscheidung ist die Menge an Na⁺ bzw. K⁺, die innerhalb eines Zeitraums über die Nieren ausgeschieden wird. Sie ist das Produkt aus Urinvolumen/Zeit und der gemessenen Urinkonzentration:

$$UV_{Na\ bzw.\ K} = U_{Na\ bzw.\ K} \cdot V$$

Fraktionelle Natrium- bzw. Kalium-Clearance (FE_{Na} bzw. FE_K)

Die fraktionelle Clearance einer Substanz ist definiert als der Anteil der ausgeschiedenen an der glomerulär filtrierte Menge. Die fraktionelle Natrium- bzw. Kalium-Clearance gibt Auskunft über die renale Natrium- bzw. Kaliumausscheidung in Relation zur GFR.

$$FE_{Na\ bzw.\ K} [\%] = \frac{U_{Na / K}}{P_{Na / K}} \cdot \frac{P_{Inulin}}{U_{Inulin}} \cdot 100$$

II.6. Statistische Auswertung

In der vorliegenden Studie wurden insgesamt n=10 Probanden im crossover-Verfahren untersucht. Dabei nahm jeder Proband sowohl Verum als auch Placebo ein. Die Studie wurde bei beiden Versuchsgruppen offen und unverblindet durchgeführt.

Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm InStat Version 3.05 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com durchgeführt.

Alle Messdaten wurden unter Anwendung des Kolmogorov-Smirnov-Tests (KS-Test) auf Normalverteilung geprüft. Dabei zeigte ein $p > 0,5$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung an, ein p -Wert $< 0,05$ keine Anpassung.

Die Daten sind als arithmetische Durchschnittswerte \pm SEM angegeben, n steht für die Anzahl der Probanden. Alle Daten wurden auf Signifikanz getestet mittels gepaartem oder ungepaarter t-Test bei Normalverteilung oder mittels Mann-Whitney-Test oder dem Wilcoxon-Test bei nicht-normalverteilten Werten. Für wiederholte (gepaarte) Messungen wurde eine einfache Varianzanalyse (One-Way ANOVA with repeated measures) in Kombination mit einem Post-Test nach Dunnet durchgeführt, Ein p -Wert $< 0,05$ wurde als statistisch signifikant gewertet.

III. Ergebnisse

III.1. Systolischer Blutdruck

In der Placebogruppe betrug der systolische Blutdruck vor Gabe von L-NAME 120 ± 2 mmHg und stieg nach Gabe signifikant auf 127 ± 4 mmHg an ($p=0,0112$). In der Verumgruppe betrug er anfangs 121 ± 3 mmHg und stieg signifikant auf 130 ± 3 mmHg ($p=0,0006$).

Der absolute systolische Blutdruckanstieg in der Placebogruppe von $+6,8 \pm 2,4$ mmHg war im Vergleich zum absoluten systolischen Blutdruckanstieg in der Verumgruppe von $+8,7 \pm 1,8$ mmHg statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,4622$).

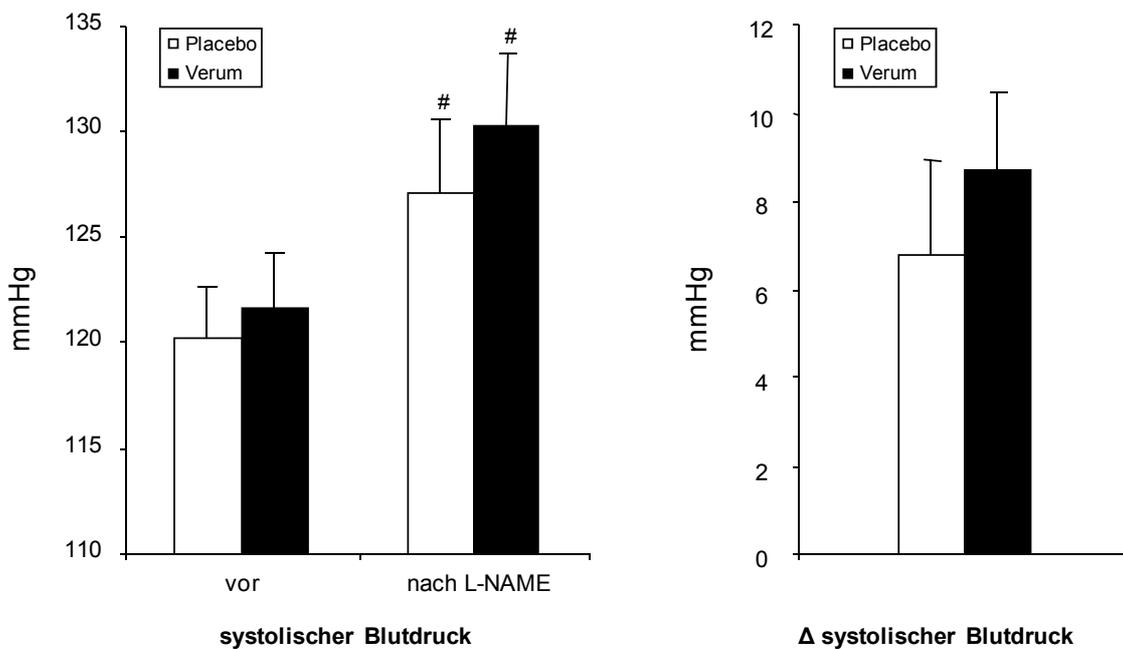


Abb.3.1: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM des absoluten systolischen Blutdrucks vor und nach Gabe von L-NAME sowie des absoluten Anstiegs (jeweils $n=10$), # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME.

III.2. Diastolischer Blutdruck

In der Placebogruppe betrug der diastolische Blutdruck vor Gabe von L-NAME 72 ± 2 mmHg; dieser stieg nach Gabe signifikant auf 87 ± 3 mmHg an ($p=0,0001$). In der Verumgruppe betrug dieser anfangs 72 ± 3 mmHg und stieg signifikant auf 87 ± 3 mmHg an ($p=0,0006$).

Der absolute diastolische Blutdruckanstieg in der Placebogruppe von $+15,4 \pm 2,4$ mmHg war im Vergleich zum absoluten diastolischen Blutdruckanstieg in der Verumgruppe von $+14,9 \pm 1,9$ mmHg statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,8368$).

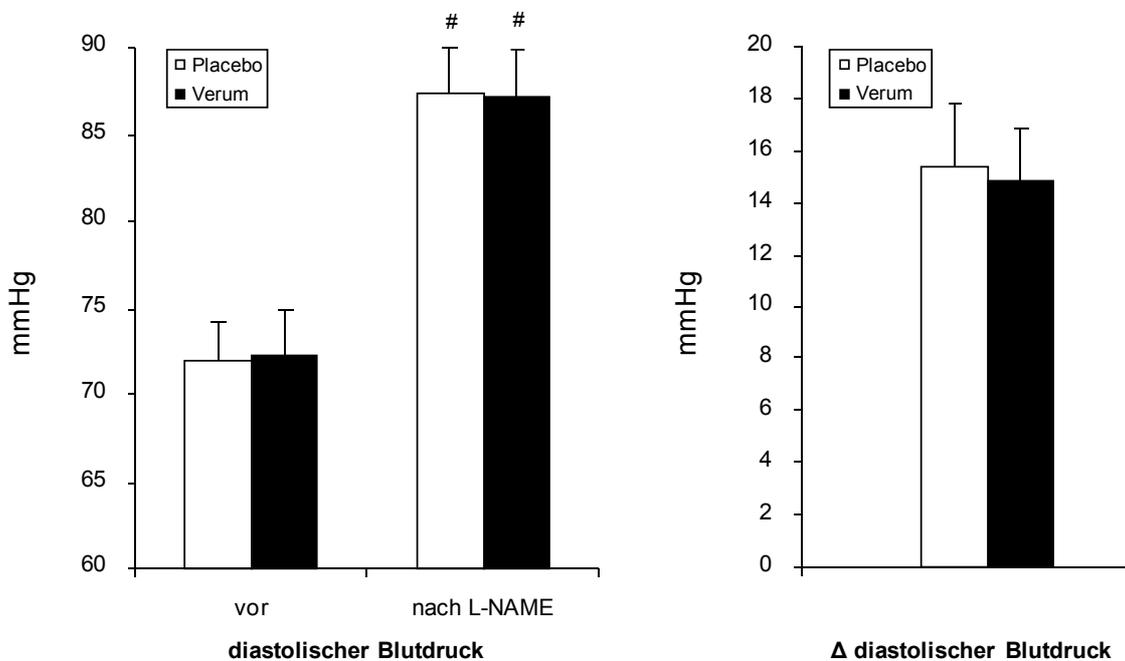


Abb. 3.2: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM des diastolischen Blutdrucks vor und nach Gabe von L-NAME sowie des absoluten Anstiegs (jeweils $n=10$), # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME.

III.3. Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

In der Placebogruppe betrug der mittlere arterielle Blutdruck vor Gabe von L-NAME 104 ± 2 mmHg; dieser stieg nach Gabe signifikant auf 114 ± 3 mmHg an ($p=0,0016$). In der Verumgruppe betrug dieser anfangs 105 ± 2 mmHg und stieg signifikant auf Werte von 116 ± 3 mmHg an ($p=0,0002$).

Der absolute Anstieg des MAP betrug in der Placebogruppe $+9,4 \pm 2,1$ mmHg. Dieser Wert war im Vergleich zur Verumgruppe ($+10,5 \pm 1,8$ mmHg) nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,64$).

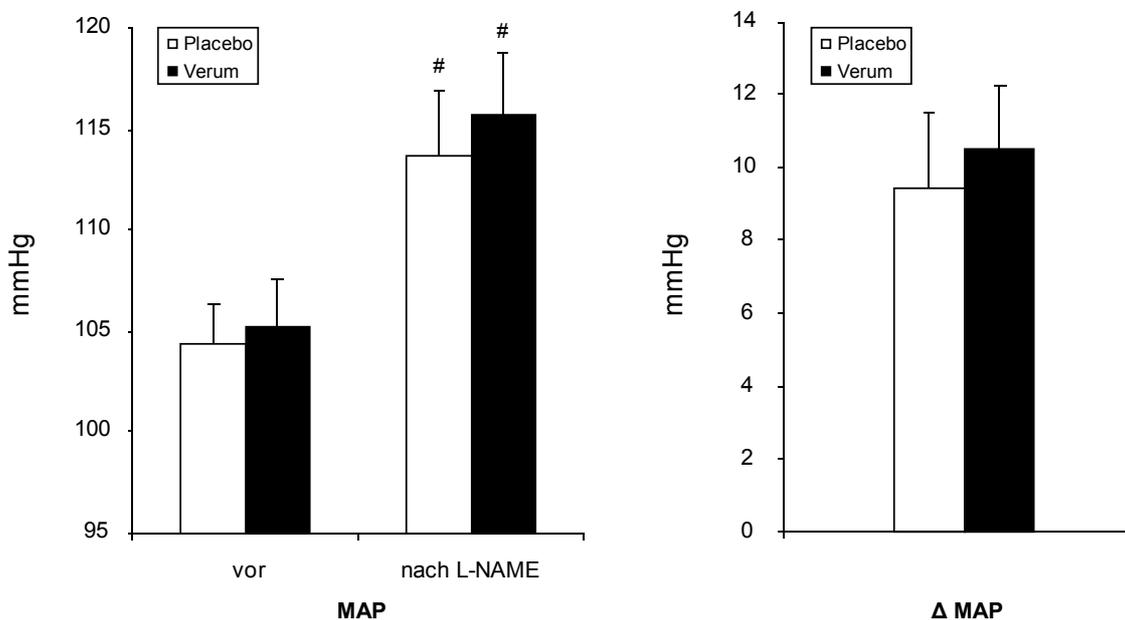


Abb. 3.3: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM des MAP vor und nach Gabe von L-NAME sowie des absoluten Anstiegs (jeweils $n=10$), # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME.

III.4. Herzfrequenz (HF)

In der Placebogruppe betrug die Herzfrequenz vor Gabe von L-NAME $65 \pm 4/\text{min}$ und fiel signifikant nach Gabe auf $52 \pm 2/\text{min}$ ab ($p=0,0008$). In der Verumgruppe betrug die Herzfrequenz anfangs $67 \pm 2/\text{min}$ und fiel signifikant auf $51 \pm 1/\text{min}$ ($p<0,0001$).

Der absolute Herzfrequenzabfall in der Placebogruppe von $-13,2 \pm 2,7/\text{min}$ war im Vergleich zum absoluten Herzfrequenzabfall in der Verumgruppe von $-16,2 \pm 1,3/\text{min}$ statistisch nicht signifikant unterschiedlich ($p=0,3081$).

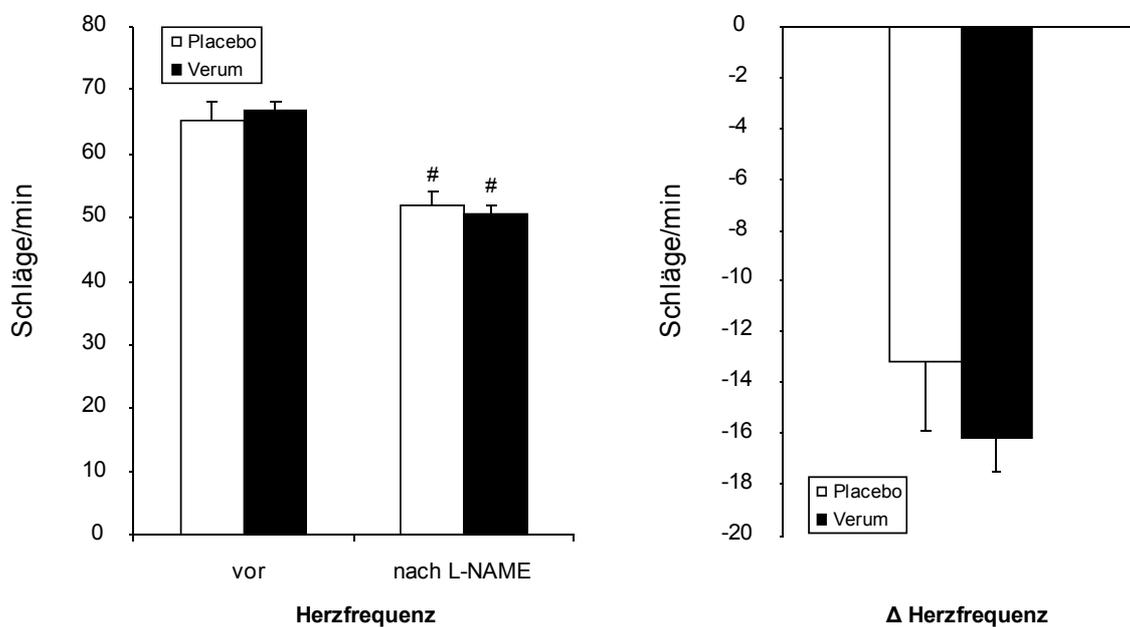


Abb. 3.4: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM der Herzfrequenz vor und nach Gabe von L-NAME sowie des absoluten Abfalls (jeweils $n=10$), # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME.

III.5. Renale Hämodynamik

III.5.1. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

In der Placebogruppe betrug die glomeruläre Filtrationsrate vor Gabe von L-NAME $117 \pm 10 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Diese fiel nach Gabe von L-NAME signifikant auf $87 \pm 7 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ab ($p=0,0004$). In der Verumgruppe betrug diese anfangs $111 \pm 9 \text{ ml/min/1,73m}^2$ und fiel signifikant auf $91 \pm 10 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ab ($p=0,0067$).

Der absolute Abfall der GFR in der Placebogruppe war mit $-30,1 \pm 5,5 \text{ ml/min/1,73m}^2$ signifikant höher als in der Verumgruppe mit $-16,8 \pm 5,7 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ($p=0,03$).

Der relative Abfall der GFR in der Placebogruppe von $-25,5 \pm 3,3\%$ war im Vergleich zum relativen Abfall der GFR in der Verumgruppe von $-16,15 \pm 5,6\%$ ebenfalls statistisch signifikant ($p=0,0497$).

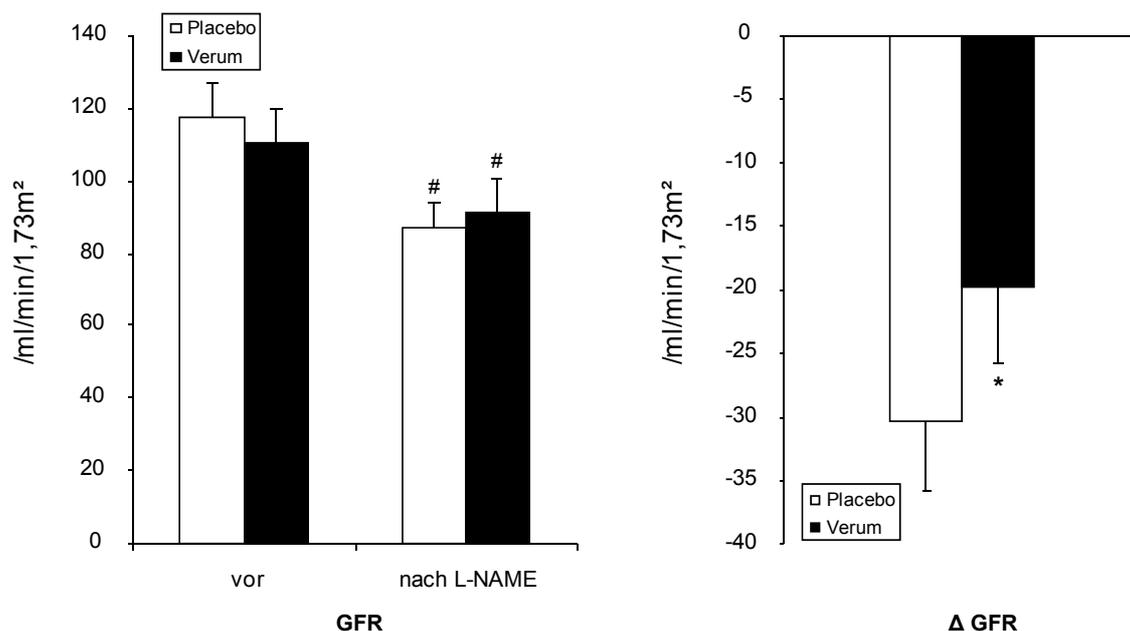


Abb. 3.5: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM der GFR vor und nach Gabe von L-NAME sowie des absoluten Abfalls (jeweils $n=10$), # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME, * signifikanter Unterschied zwischen Placebo und Verum.

III.5.2. Effektiver renaler Plasmafluss (ERPF)

In der Placebogruppe betrug der effektive renale Plasmafluss vor Gabe von L-NAME $536 \pm 47 \text{ ml/min/1,73m}^2$ und fiel nach L-NAME-Gabe signifikant auf $269 \pm 27 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ab ($p=0,0009$).

In der Verumgruppe betrug der ERPF anfangs $479 \pm 36 \text{ ml/min/1,73m}^2$ und fiel signifikant auf $227 \pm 19,4 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ab ($p<0,0001$).

Der absolute Abfall der ERPF war in der Placebogruppe tendenziell höher mit $-287 \pm 39 \text{ ml/min/1,73m}^2$ als in der Verumgruppe mit $-252 \pm 38 \text{ ml/min/1,73m}^2$, verfehlte jedoch das Signifikanzniveau knapp ($p=0,07$).

Der relative Abfall des ERPF in der Placebogruppe von $-52,4 \pm 3,5\%$ war im Vergleich zum relativen Abfall des ERPF in der Verumgruppe von $-51,0 \pm 4,9\%$ statistisch nicht signifikant verschieden ($p=0,45$).

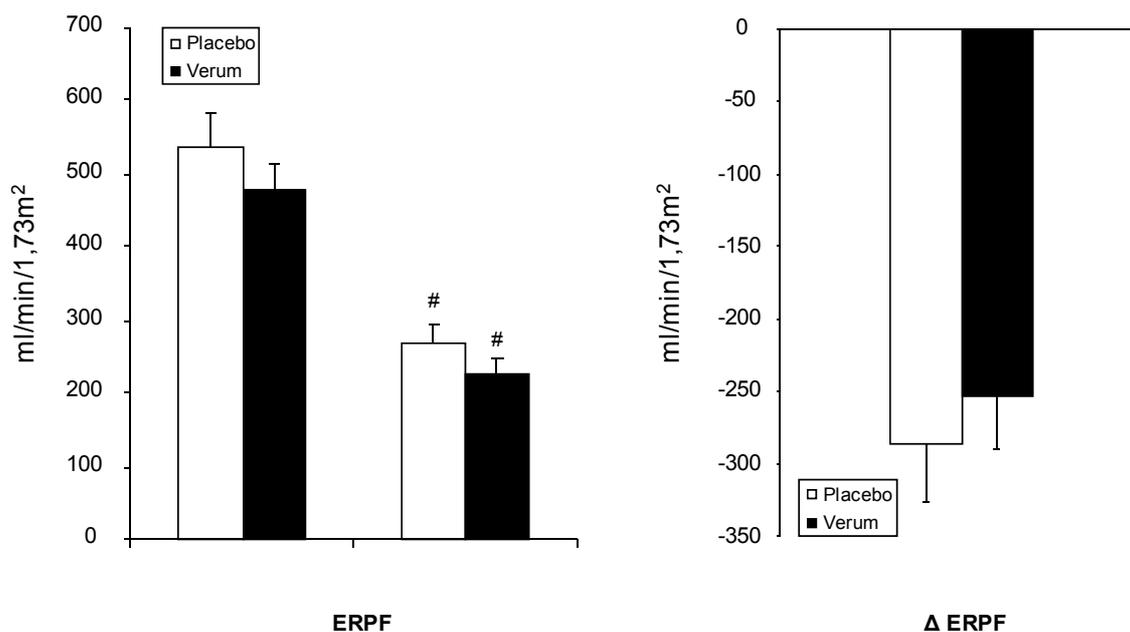


Abb. 3.6: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM des ERPF vor und nach Gabe von L-NAME sowie des absoluten Abfalls (jeweils $n=10$). * signifikanter Unterschied zwischen Placebo und Verum, # signifikanter Unterschied vor und nach Gabe von L-NAME

III.5.3. Filtrationsfraktion (FF)

In der Placebogruppe betrug die Filtrationsfraktion vor Gabe von L-NAME $21,0 \pm 1,4\%$ und stieg signifikant nach Gabe von L-NAME auf $33,1 \pm 2,2\%$ an ($p < 0,0001$). In der Verumgruppe betrug diese anfangs $23,9 \pm 2,8\%$ und stieg signifikant auf $40,8 \pm 3,2\%$ an ($p < 0,0001$). Verglichen mit der Placebogruppe, war die FF in der Verumgruppe nach L-NAME-Gabe signifikant höher.

Der absolute Anstieg der Filtrationsfraktion war in der Placebogruppe tendenziell niedriger mit $12,9 \pm 1,5\%$ als in der Verumgruppe mit $16,9 \pm 1,7\%$, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau ($p = 0,21$).

Der relative Anstieg der Filtrationsfraktion in der Placebogruppe von $64,1 \pm 9,4\%$ war im Vergleich zum relativen Abfall der FF in der Verumgruppe von $79 \pm 11,1\%$ statistisch nicht signifikant verschieden ($p = 0,51$).

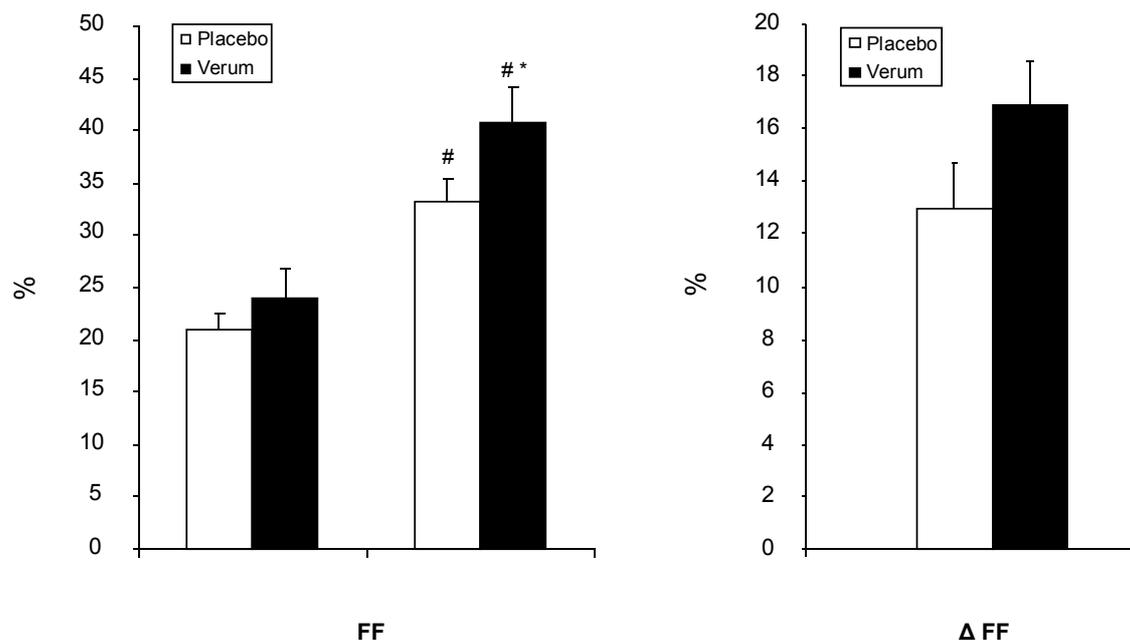


Abb. 3.7: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM der FF vor und nach Gabe von L-NAME sowie des absoluten Unterschieds (jeweils $n=10$), # signifikanter Unterschied vor und nach Gabe von L-NAME.

III.6. cGMP

Der Ausgangswert für die Serum-cGMP-Konzentration betrug $6,1 \pm 0,62\text{nM}$. Nach Placebobehandlung betrug die cGMP-Konzentration vor der L-NAME-Gabe $7,54 \pm 0,40\text{nM}$ und fiel unwesentlich nach Gabe von L-NAME auf $6,90 \pm 0,62\text{nM}$ ab ($p=0,41$). Nach Behandlung mit Verum stieg die Serum-cGMP-Konzentration signifikant auf $11,67 \pm 1,85\text{nM}$ ($p=0,011$) an und blieb auch nach L-NAME-Gabe erhöht ($11,32 \pm 1,31$).

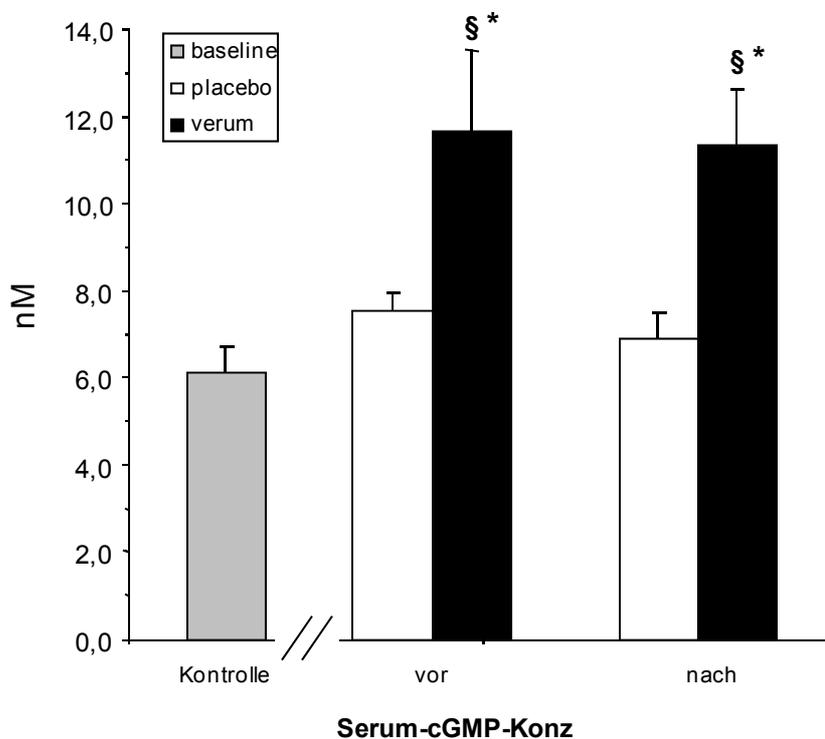


Abb. 3.8: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM von cGMP vor und nach Gabe von L-NAME (jeweils $n=10$). § signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle und Verum, * signifikanter Unterschied zwischen Placebo und Verum.

III.7. Sonstige Untersuchungen

III.7.1. Hämatokrit (Hkt)

In der Placebogruppe betrug der Hämatokrit vor Gabe von L-NAME $45,0 \pm 0,7\%$; und fiel signifikant auf $41,4 \pm 0,6\%$ ab ($p < 0,0001$). In der Verumgruppe betrug dieser $44,0 \pm 0,6\%$ und fiel ebenfalls signifikant auf $40,8 \pm 0,8\%$ ab ($p < 0,0001$).

Der absolute Abfall des Hämatokrit in der Placebogruppe von $-3,6 \pm 0,44\%$ war im Vergleich zum relativen Abfall des Hämatokrit in der Verumgruppe von $-3,2 \pm 0,36$ statistisch nicht signifikant ($p = 0,5309$).

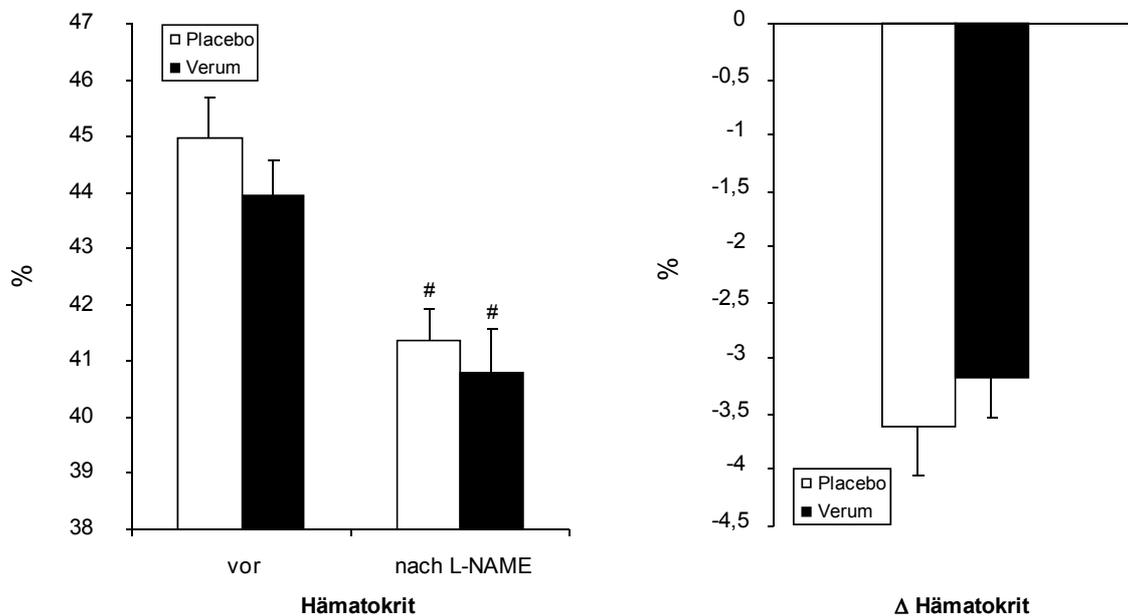


Abb. 3.9: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM des Hämatokrit vor und nach Gabe von L-NAME sowie des absoluten Hämatokritabfalls (jeweils $n=10$), # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME.

III.7.2. Fraktionelle Natrium-Clearance (FE_{Na})

In der Placebogruppe betrug die fraktionelle Natrium-Clearance vor Gabe von L-NAME $2,1 \pm 0,2\%$; diese fiel nach Gabe von L-NAME signifikant auf Werte von $1,1 \pm 0,1\%$ ab ($p=0,0003$). In der Verumgruppe betrug diese anfangs $2,3 \pm 0,4\%$ und fiel signifikant auf Werte von $0,9 \pm 0,1\%$ ab ($p=0,0005$).

Der absolute Abfall der fraktionellen Natrium-Clearance war in der Placebogruppe tendenziell niedriger mit $-1,01 \pm 0,18\%$ als in der Verumgruppe mit $-1,5 \pm 0,28\%$, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau ($p=0,26$).

Der relative Abfall der fraktionellen Natrium-Clearance in der Placebogruppe von $-45,9 \pm 5,9\%$ war im Vergleich zum relativen Abfall der Natrium-Clearance in der Verumgruppe von $-61,7 \pm 4,2\%$ statistisch signifikant ($p=0,03$).

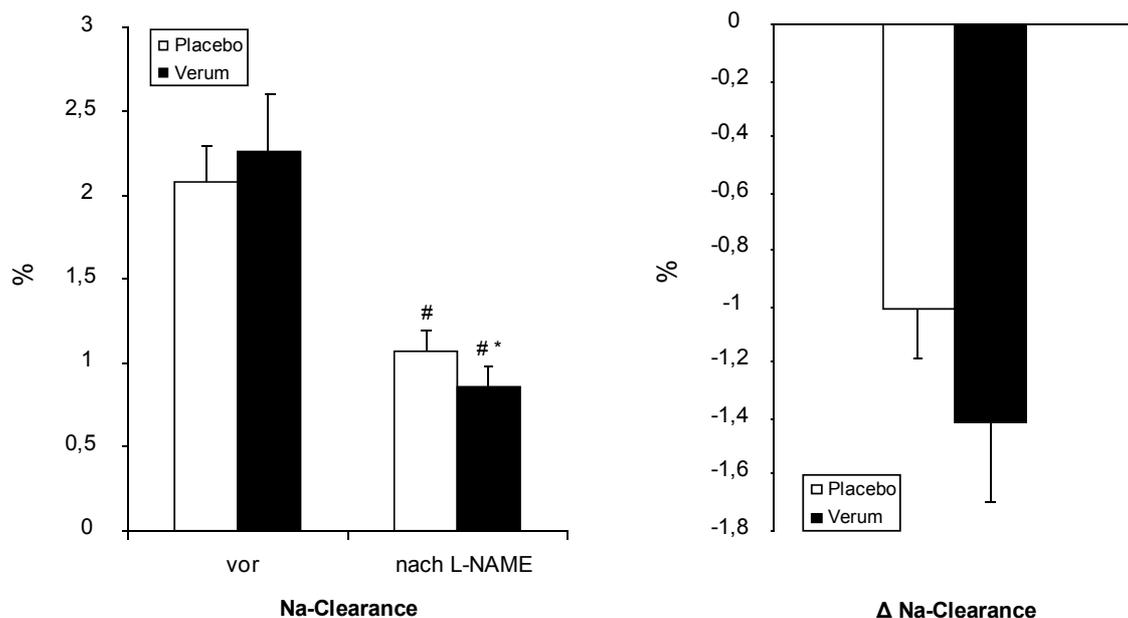


Abb. 3.10: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM der fraktionellen Natrium-Clearance vor und nach Gabe von L-NAME sowie der absolute Unterschied (jeweils $n=10$). * signifikanter Unterschied zwischen Placebo und Verum, # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME.

III.7.3. Absolute Natrium-Ausscheidung

In der Placebogruppe betrug die absolute Natrium-Ausscheidung vor L-NAME-Gabe $15,4 \pm 1,5$ mmol/90min und fiel signifikant nach Gabe auf $6,3 \pm 1,1$ mmol/90min ab ($p < 0,0001$).

In der Verumgruppe betrug diese anfangs $15,0 \pm 2,3$ mmol/90min und fiel signifikant auf $5,3 \pm 1,4$ mmol/90min ab ($p = 0,0014$).

Der absolute Abfall der Natrium-Clearance betrug in der Placebogruppe $-9,0 \pm 1,2$ mmol/90min, in der Verumgruppe mit $-9,7 \pm 2,1$ mmol/90min ($p = 0,656$).

Der relative Abfall der absoluten Natrium-Clearance in der Placebogruppe von $-58 \pm 6\%$ war im Vergleich zum relativen Abfall der absoluten Natrium-Clearance in der Verumgruppe von $-64 \pm 7\%$ statistisch nicht signifikant ($p = 0,24$).

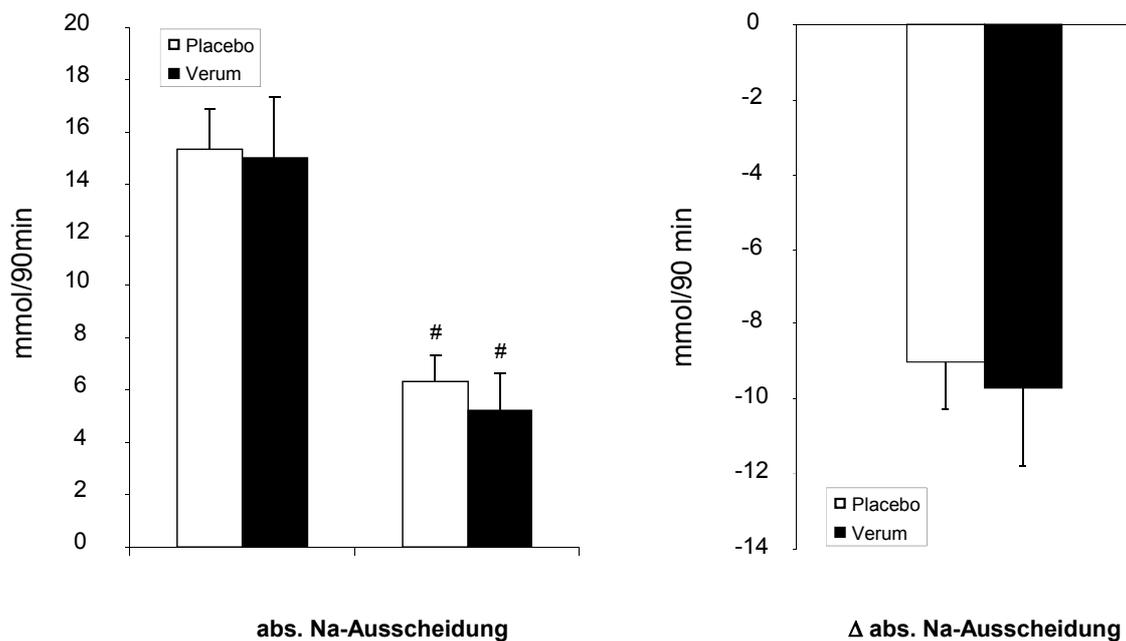


Abb. 3.11: Arithmetischer Mittelwert ± SEM der absoluten Natrium-Ausscheidung vor und nach Gabe von L-NAME (jeweils n=10), # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME.

III.7.4. Fraktionelle Kalium-Clearance (FE_K)

In der Placebogruppe betrug die fraktionelle Kalium-Clearance vor Gabe von L-NAME $13,5 \pm 1,5\%$; diese stieg nach Gabe von L-NAME tendenziell auf $17,6 \pm 2,5\%$ an ($p=0,0923$). In der Verumgruppe betrug diese anfangs $13,49 \pm 1,6\%$ und stieg signifikant auf Werte von $19,35 \pm 3,8\%$ an ($p=0,0388$).

Der absolute Abfall der Kalium-Clearance war in der Placebogruppe tendenziell niedriger mit $4,1 \pm 2,18\%$ als in der Verumgruppe mit $5,2 \pm 2,7\%$, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau ($p>0,5$).

Der relative Abfall der Kalium-Clearance in der Placebogruppe von $36,3 \pm 6,3\%$ war im Vergleich zum relativen Abfall der Kalium-Clearance in der Verumgruppe von $38,4 \pm 14,7\%$ statistisch nicht signifikant ($p>0,5$).

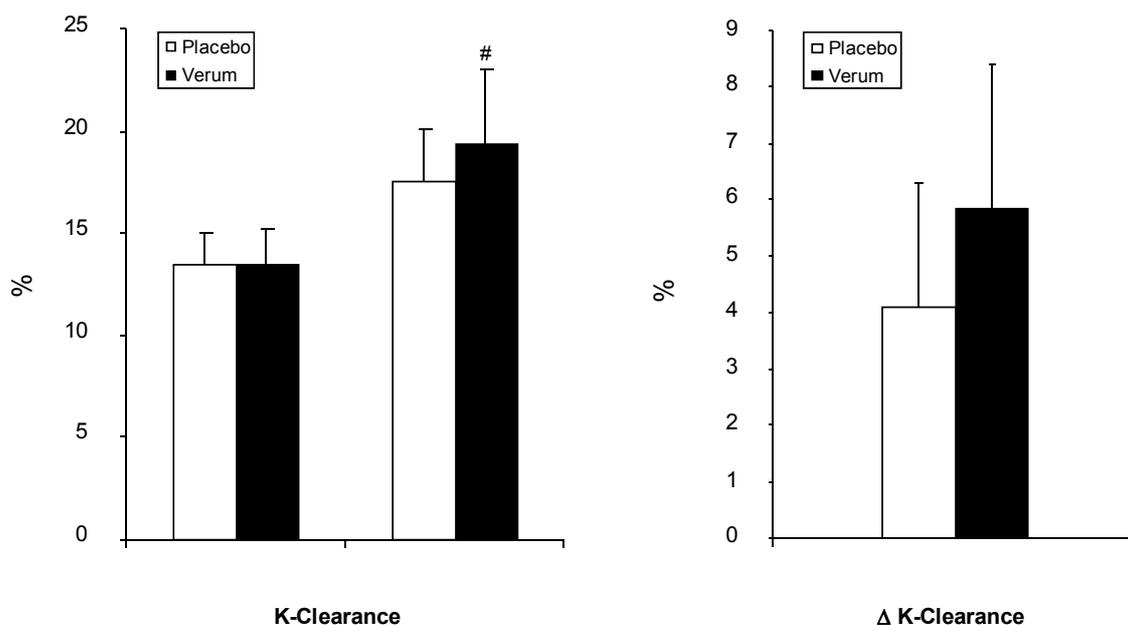


Abb. 3.12: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM der Kalium-Ausscheidung vor und nach Gabe von L-NAME sowie die absolute Veränderung (jeweils $n=10$). * signifikanter Unterschied zwischen Placebo und Verum, # signifikanter Unterschied zwischen vor und nach Gabe von L-NAME.

III.7.5. Absolute Kalium-Ausscheidung

In der Placebogruppe betrug die absolute Kalium-Clearance vor Gabe von L-NAME $3,3 \pm 0,29$ mmol/90min; diese blieb nach Gabe von L-NAME unverändert ($3,19 \pm 0,49$ mmol/90min; $p=0,7869$).

In der Verumgruppe betrug diese anfangs $2,84 \pm 0,28$ mmol/90min und blieb ebenfalls unverändert ($2,79 \pm 0,41$ mmol/90min; $p=0,8222$).

Der absolute Abfall der Kalium-Clearance war in der Placebogruppe tendenziell höher mit $-0,11 \pm 0,39\%$ als in der Verumgruppe mit $-0,05 \pm 0,234\%$, erreichte aber nicht das Signifikanzniveau ($p=0,883$).

Der relative Abfall der absoluten Kalium-Clearance in der Placebogruppe von $-1,8 \pm 11,5\%$ war im Vergleich zum relativen Abfall der absoluten Kalium-Clearance in der Verumgruppe von $-3,24 \pm 8,11\%$ statistisch nicht signifikant ($p=0,904$).

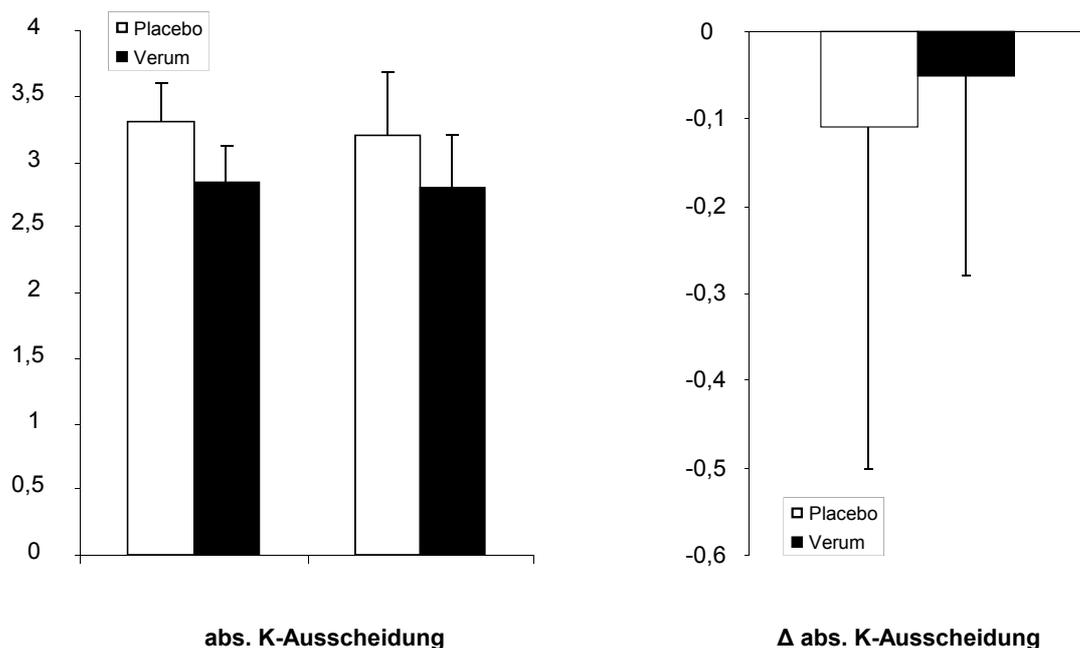


Abb. 3.13: Arithmetischer Mittelwert \pm SEM der absoluten Kalium-Ausscheidung vor und nach Gabe von L-NAME sowie die absolute Änderung (jeweils $n=10$).

III.7.6. Elektrokardiogramm

Im EKG zeigte sich bei allen Patienten eine Sinusbradykardie nach Beginn der L-NAME-Infusion. Ansonsten wurden keine Veränderungen registriert.

III.8. Nebenwirkungen

III.8.1. Nebenwirkungen der PAH- und Inulin-Infusion

Bei allen zehn Probanden traten keine unerwünschten Nebenwirkungen auf, die Infusionen waren gut verträglich und es zeigten sich keine allergischen Reaktionen.

III.8.2. Nebenwirkungen von L-NAME

Die L-NAME-Infusion wurde von allen Probanden gut toleriert. Es traten weder Übelkeit noch Schwindel auf, jedoch zeigten die meisten Teilnehmer als einzige Nebenwirkung an beiden Untersuchungstagen eine deutliche Müdigkeit auch lange nach Beendigung des Studientages.

IV. Diskussion

Das Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen von intravenös appliziertem L-NAME in Kombination mit und ohne exogen zugeführtem Tetrahydrobiopterin (BH₄) auf die systemische und renale Hämodynamik zu untersuchen.

IV.1. cGMP

Die Behandlung mit Tetrahydrobiopterin (BH₄) erzeugte einen Anstieg des Serum-cGMP-Spiegels auf annähernd das doppelte der Ausgangswerte, was eine erhöhte Aktivität der Guanylatcyclase (GC) impliziert, die cGMP aus GTP katalysiert. Dieses Enzym liegt entweder als Membran gebundene Isoform vor, welches durch natriuretische Peptide oder andere bisher noch unbekannte Liganden aktiviert wird, oder es liegt als lösliche Isoform frei im Zytosol vor, welches durch NO aktiviert wird (Lucas et al., 2000). Von den natriuretischen Peptiden aktiviert das vom Ventrikel stammende brain-natriuretic-peptide (BNP) die membranständige GC (Tietgen, 2004, Yoshimura et al., 1993, Nakao et al., 1991, Doyama et al., 1998), woraufhin eine extrazelluläre Freisetzung von cGMP ins Blut erfolgt. Es konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass die Aktivierung der zytosolischen löslichen GC durch NO-Derivate nicht zu einem Anstieg der Serum-cGMP-Spiegel führt (Thomas et al., 2000). In der Doktorarbeit von Essig konnte ebenfalls ein deutlicher Anstieg von cGMP nach intravenöser Gabe von BH₄ gesehen werden. In jener Studie zeigte sich ein Anstieg der Stickstoffabbauprodukte NO_x, welches als Aktivierung der NO-Synthase gesehen werden konnte. Allerdings konnte nicht geklärt werden, in welchem Kompartiment dies geschah. Neben der Aktivierung der endothelialen NO-Synthase durch BH₄ kommt eine Aktivierung der NO-Synthase von Erythrozyten in Frage (Conran et al., 2004), die auch signifikante Mengen an NO freisetzt.

Eine Aktivierung der membrangebundenen GC durch natriuretische Peptide ist ebenfalls denkbar, zumal die im Plasma messbare cGMP-Konzentration von

der Aktivität der membranständigen GC (Thomas, 2000) abhängig ist. Eine Erhöhung der natriuretischen Peptide durch die hohe Flüssigkeitszufuhr und Volumenbelastung der Probanden erschien denkbar, konnte in der Doktorarbeit von Essig ausgeschlossen werden.

Die genaue Ursache der gesteigerten cGMP-Produktion konnte mit Hilfe dieser Studie weiterhin nicht ermittelt werden. Welche der drei Isoformen für die Bildung der NO verantwortlich ist, lässt sich ferner nicht ableiten. Am ehesten gehen wir von der Aktivierung endothelialer NOS aus, da sie die mutmaßlich größte Quelle für die körpereigenen NO-Produktion ist (Braam, 1999, Schrickler, 1996, Setoguchi et al., 2002).

Neueste Erkenntnisse belegen eine wichtige funktionelle Rolle des endothelialen NOs bezüglich der Elastizität von Erythrozytenmembranen und der Aggregationshemmung von Thrombozyten (Kleinbongard et al., 2006). Erythrozyten sind in der Lage, cGMP durch die lösliche GC zu produzieren (Conran et al., 2004). Es ist denkbar, dass BH₄ die erythrozytäre endotheliale NO-Synthase stimuliert und somit die Bildung von zytosolischem cGMP fördert. Der größte Teil des in Erythrozyten befindlichen cGMPs wird über Kanäle aus der Zelle befördert (Wu et al., 2005).

In der Arbeitsgruppe um Fiege (2004) konnte gezeigt werden, dass man den Serumspiegel von BH₄ mindestens 40-fach erhöhen muss, um einen bedeutsamen cGMP-Anstieg im Serum zu erzielen; Vitamin C allein appliziert hatte keinen Effekt auf den cGMP-Spiegel wie auch in dieser Studie. Obwohl keine Plasmaspiegel von BH₄ vorliegen, kann anhand der Erhöhung der cGMP-Spiegel indirekt von einer Wirksamkeit der gewählten BH₄-Dosis ausgegangen werden.

IV.2. Veränderung der systemischen Hämodynamik

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass der systolische und der diastolische Blutdruck sowohl in der Placebogruppe nach alleiniger Gabe von L-NAME als auch in der Verumgruppe nach Vorbehandlung mit BH₄ signifikant anstieg. Somit hatte BH₄ keine wesentlichen antagonisierende Wirkungen auf den vasokonstringierenden Effekt von L-NAME. Es existieren bisher keine gesicherten Beweise dafür, dass Tetrahydrobiopterin selbst direkt vasodilatative Effekte hat und somit Einfluss auf die systemische Hämodynamik nehmen könnte.

In einer ähnlichen Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine intravenöse Behandlung mit Tetrahydrobiopterin (19 mg/kg KG) eine Erhöhung des Serum-cGMP-Spiegels bewirkt, ohne jedoch die systemische und renale Hämodynamik zu beeinflussen (Essig et al., 2006). In einer Studie von Schaffner et al. aus dem Jahr 1994 konnte unter hochdosierter Infusion von BH₄ in die Arteria brachialis eine massive Hyperämie der Extremität beobachtet werden, während Blutdruck und Herzfrequenz weiterhin unverändert blieben. Diese Beobachtung könnte dadurch erklärt werden, dass durch die arterielle Gabe lokal sehr hohe, unphysiologische Konzentrationen an BH₄ entstanden sein könnten, welches in jener Arbeit zu einer Vasodilatation geführt haben könnte. In weiteren Studien von Setoguchi et al., 2002, bei der 14 Probanden mit chronischer Herzinsuffizienz und 7 Kontrollprobanden Tetrahydrobiopterin intraarteriell appliziert wurde, und von Walter et al., 2001, bei der 15 gesunden Probanden ebenfalls BH₄ (10 mg/kg) intravenös appliziert und mittels Positron-Emissions-Tomographie (PET) die myokardiale Durchblutung gemessen wurde, zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen bezüglich der systemischen Hämodynamik.

In der Zusammenschau verhält sich BH₄, sich unabhängig von der Art der Applikation neutral auf die systemische Hämodynamik und die Herzfrequenz, eine Hypotonie durch zu starke NOS- Aktivierung ist nicht beobachtet worden.

Die hämodynamische Reaktion auf L-NAME zeigte sich wie erwartet in einem Anstieg des systemischen Blutdruckes begleitet von einem Abfall der Herzfrequenz. Die Herzfrequenz der Probanden sank signifikant in beiden Versuchsreihen infolge der L-NAME-Infusion deutlich ab, dabei konnte BH_4 weder dem Blutdruckanstieg noch dem dem Abfall der Herzfrequenz entgegenwirken.

Zahlreiche Studien sowohl am Tiermodell als auch bei Menschen haben mehrfach gezeigt, dass die NO-Blockade zu einer allgemeinen Vasokonstriktion und Bradykardie führt (Aisaka et al. 1989, Hansen et al. 1994, Haynes et al. 1993, Rees et al. 1990, Bech et al. 1996). Die naheliegende Erklärung für diese Auswirkungen ist die Inhibition der verschiedenen NO-Synthasen lokalisiert in den Endothelzellen der Gefäße, die zu einer allgemeinen Vasokonstriktion und reflektorischen Bradykardie führt; denkbar wäre auch, dass diese Bradykardie durch direkte Effekte am Sinusknoten ausgelöst wird. Die Bradykardie konnte bei den Probanden sehr schnell beobachtet werden, bevor der Blutdruck anstieg. Dies macht eine druckbedingte Reflexbradykardie unwahrscheinlich. Die vasodilatierende Eigenschaft von NO beruht auf einem Anstieg von intrazellulärem cGMP (Murad et al. 1979). Folglich ist die durch die systemische NO-Blockade hervorgerufene Vasokonstriktion das Ergebnis des Wegfalls der NO-Wirkung mit konsekutiver Abnahme der intrazellulären cGMP-Konzentration der Gefäßwand. Die Dosierung von L-NAME wurde ähnlich wie in den vorangegangenen Studien gewählt (Bech et al. 1996, Haynes et al. 1993).

IV.3. Veränderung der renalen Hämodynamik

In verschiedenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Produktion von NO in Gefäßendothelien renaler Gefäße (v.a. Vasa afferentia und efferentia) an bestimmte Strukturen gebunden ist. Mittels immunhistochemischer Verfahren konnte eine spezifische Verteilung der einzelnen NOS-Formen gezeigt werden (Tojo et al., 1994). Die endotheliale NOS (NOS I) und neuronale NOS (NOS II) findet man an der Macula densa; die induzierbare NOS (NOS III) findet man am proximalen Tubulus, Sammelrohren und mesingalen Zellen. Diese NOS haben eine bedeutsame Rolle in der Regulation der glomerulären Hämodynamik. Eine Dysfunktion dieser beiden Enzyme könnte einen glomerulären Hochdruck oder eine gesteigerte intraglomeruläre Aggregation von Thrombozyten zur Folge haben.

Die iNOS weist eine höhere Aktivität als die eNOS auf. Daraus kann gefolgert werden, dass die NO-Produktion im Markbereich besonders hoch ist, da hier fast ausschließlich die iNOS in den tubulären Zellen zu finden ist (Peer et al., 1996). Auch die Bildung von cGMP ist im inneren Markbereich am höchsten und nimmt nach außen hin ab (Ruilope et al., 1994).

Vaskuläres Hauptziel der NO-Wirkung in der Niere sind das Vas afferens und die Mesangiumzellen. Die dadurch vermittelten Effekte sind eine Vasodilatation mit nachfolgend erhöhtem RBF im Glomerulum und eine Erhöhung des Filtrationskoeffizienten. Diese beiden Mechanismen wirken synergistisch und erhöhen die GFR und den Urinfluss. Es konnte in tierexperimentellen Versuchsreihen gezeigt werden, dass eine Blockade der NO-Synthasen eine Kontraktion in den Mesangiumzellen verursacht, und dies wiederum zu einer Reduktion des Ultrafiltrationskoeffizienten führt (Zatz et al., 1991, Deng et al., 1993). Dies konnte in unserer Arbeit bestätigt werden, denn der renale Plasmafluss (RPF) fiel nach Gabe von L-NAME auf ca. die Hälfte des Ursprungswerts in der Placebogruppe ab. Dies verdeutlicht die hohe NO-Aktivität in der Aufrechterhaltung der Nierenperfusion in Ruhe, die durch einen niedrigen renalen Gefäßwiderstand charakterisiert ist.

Die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) fiel nach Gabe von L-NAME ebenfalls ab. Dabei war die Abnahme weniger ausgeprägt als die Abnahme des RPF, was in einer höheren Filtrationsfraktion resultierte und auf einen gesteigerten effektiven Filtrationsdruckes beruhen könnte.. Die relative Konservierung der GFR bezogen auf die RPF kann durch einen vasokonstringierenden Effekt von L-NAME vornehmlich am Vas efferens erklärt werden (Treeck et al., 1997). Ähnliche Effekte einer NO-Inhibition auf die renale Hämodynamik wurden auch in anderen Studien gesehen (Bech et al., 1996, Guarasci et al., 1996, Raij et al. 1995).

Unter Vorbehandlung mit BH₄ war der Abfall der RPF ähnlich hoch wie in der Placebogruppe, allerdings war der Abfall der GFR signifikant abgeschwächt und betrug nur 17ml/min/1,73m². Dies ging mit einer signifikant höheren Filtrationsfraktion einher (41 ± 3%), was einen moderaten vasodilatierenden Effekt von BH₄ am Vas afferens vermuten lässt, die der L-NAME-Wirkung entgegenwirkt. Unter Ruhebedingungen zeigte eine akute intravenöse Gabe von BH₄ keinen Effekt auf die GFR in gesunden Probanden (Essig, 2005), obwohl ein ähnlicher Anstieg der Serum-cGMP-Spiegel zu beobachten war. Dieser Unterschied lässt vermuten, dass BH₄ in der Lage ist, eine reduzierte GFR zu stabilisieren, während es eine normal hohe GFR nicht darüber hinaus steigert.

Ein erhöhter Spiegel des endogenen NO-Inhibitors ADMA wurde in der kardiovaskulären Medizin als neuer Risikofaktor identifiziert, insbesondere bei Niereninsuffizienz, bei der es kumuliert (Ravani et al., 2005). Die Wirkung von L-NAME ist vergleichbar mit dem Effekt einer ADMA-Infusion (Kielstein et al., 2006). Obwohl das körpereigene ADMA im Vergleich zu L-NAME deutlich schwächer in seiner Wirkung ist, muss es im Gegensatz zu L-NAME nicht durch Metabolisierung aktiviert werden und reagiert somit schneller. Die Studie wurde auch vor diesem Hintergrund unternommen, um therapeutische Möglichkeiten zu finden, die ADMA-Wirkungen zu antagonisieren. Durch den protektiven Effekt auf die GFR scheint hier tatsächlich eine Effektivität der BH₄-Gabe zu bestehen,

evtl. müssten auch höhere Dosierungen eingesetzt werden, um auch Effekte auf die systemische Hämodynamik auszuüben.

IV.4. Na- und K-Ausscheidung

Unter Applikation von L-NAME kam es zu einer verminderten Natrium-Ausscheidung bei neutralem Effekt auf die Kaliumausscheidung. Dabei zeigte sich ein signifikanter Abfall der absoluten und fraktionellen Natrium-Clearance. Die Vorbehandlung mit BH₄ konnte diesem Effekt nicht entgegenwirken.

Auch in anderen Studien konnte der hemmende Effekt einer NOS-Blockade auf die Natrium-Ausscheidung (FE_{Na}) beobachtet werden (Bech et al. 1996, Haynes et al., 1997, Broere et al., 1998). Die Arbeitsgruppe um Stoos et al. (1992) demonstrierte eine direkte Hemmung des Natriumtransportes durch L-NAME in Sammelrohrzellen, in denen der Natriumtransport hauptsächlich vom epithelialen Natrium-Kanal ENaC getragen wird. Andere Arbeitsgruppen fanden eine Stimulation der Na⁺-Resorption in Zellkulturen vom proximalen Tubulus durch NO, was auf eine Erhöhung der cGMP-Spiegel infolge einer Aktivierung der GC zurückgeführt werden konnte. (De Nicola et al., 1992, Roczniak und Burns, 1996). NO stimulierte die Aktivität des für dieses Segment typischen Na⁺/H⁺-Austauschers (NHE3), wobei eine Hemmung der GC die stimulatorischen Effekte von NO wieder aufhob (Roczniak und Burns, 1996).

Insgesamt zeigen diese Daten, dass NO mit seinem second Messenger cGMP in Ruhe einen starken Effekt auf die Salzausscheidung hat und vornehmlich auf den proximalen Tubulus zu wirken scheint..

IV.5. Hämatokrit

Sowohl in der Placebo- als auch in der Verumgruppe fiel der Hämatokrit statistisch signifikant ab. Erklärend hierfür kann die hohe Trinkmenge von bis zu fünf Litern natriumarmes Wasser innerhalb von sechs Stunden sein, welches das intravasale Volumen vergrößert und hierdurch den Hämatokrit erniedrigt.

V. Zusammenfassung

Das endotheliale Stickstoffmonoxid (NO)-System spielt eine zentrale Rolle in der Regulation des Gefäßtonus. Die endotheliale Dysfunktion ist eng verbunden mit einer reduzierten Aktivität des NO-Systems. Ursächlich kann hierfür unter anderem die Akkumulation des endogenen Inhibitors des NO-Synthase ADMA sein, insbesondere bei niereninsuffizienten Patienten. Tetrahydrobiopterin (BH₄) ist ein essenzieller Kofaktor aller NO-Synthase-Isoformen und erhöht die NO-Bioverfügbarkeit in vivo.

Das Ziel dieser Studie war es, die Auswirkung einer Hemmung der NO-Sekretion auf die systemische und renale Hämodynamik mit oder ohne Vorbehandlung mit BH₄ zu untersuchen. An n=10 männlichen, gesunden Probanden wurde in einem Crossover-Design der NO-Synthase-Hemmstoff L-NAME intravenös (1,5mg/kg) mit oder ohne Vorbehandlung mit oralem BH₄ (800mg/Tag) appliziert und die Auswirkung auf die systemische und renale Hämodynamik mittels Inulin-/PAH- Clearance untersucht.

Nach Gabe von L-NAME kam es zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks um 9 ± 2 mmHg und Abfall der renalen Durchblutung um $52 \pm 4\%$. Die GFR fiel um 30 ± 6 ml/min/1,73m² ab. Unter Vorbehandlung mit BH₄ zeigte sich ein ähnlicher Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks sowie ein ähnlicher Abfall der renalen Durchblutung, allerdings war der Abfall der GFR signifikant abgeschwächt und betrug nur 17 ± 6 ml/min/1,73m², was mit einer signifikant höheren Filtrationsfraktion einherging. Die Serum-cGMP-Spiegel stiegen unter BH₄-Vorbehandlung auf das ca. 3-fache des Ausgangswerts an.

Diese Pilotstudie zeigt, dass BH₄ den hemmenden Effekt von L-NAME auf die GFR partiell antagonisieren kann, was eine vasodilatierende Wirkung auf das V. afferens vermuten lässt. BH₄ könnte daher eine therapeutische Option zur Verbesserung der renalen Dysfunktion, insbesondere unter erhöhter ADMA-Konzentration, darstellen.

VI. Anhang

VI.1. Infusionsplan von L-NAME und BH4

Infusionsplan für Proband Datum:

Körpergewicht:.....kg

1. L-NAME (1 Durchstech-Ampulle zu enthält 110mg Trockensubstanz)

Herstellungsdatum:.....

auflösen 5 ml Aqua dest. ad iniectabilia, entsprechend 110mg/5ml = 22mg/ml

Benötigte Menge an L-NAME:

2mg L-NAME/ kg KG xkg =mg L-NAME

entsprechendmg/ (22mg/ml) =ml L-NAME-Lösung

Überführen in Perfusorspritze mit (50 -) ml Aqua dest. ad iniectabilia

Laufgeschw. (unabh. von KG und KÖF): **99,9ml/h**

2. Inulin (1 Amp. zu 20ml enthält 25%iges Inulin, d.h. 5g Inulin /Amp.)

Herstellungsdatum:.....

a) Bolus:

25ml Inulin-Lösung (1,25 Amp)

Lösungsvolumen: 250 ml 5% Glc-Lsg., Laufgeschw. **500 ml/h**

b) Erhaltung:

35 ml Inulin-Lösung (1,75 Amp)

Lösungsvolumen: 250 ml 5% Glc-Lsg., Laufgeschw. **55 ml/h**

3. PAH (1 Amp. zu 5,1ml enthält 21,6%iges PAH, d.h. 1,1g PAH / Amp.)

Herstellungsdatum:.....

c) Bolus:

5,1 ml PAH-Lösung (1 Amp.)

Lösungsvolumen: 250 ml 5% Glc-Lsg., Laufgeschw. **500 ml/h**

d) Erhaltung:

15,3 ml PAH-Lösung (3 Amp.)

Lösungsvolumen: 250 ml 5% Glc-Lsg., Laufgeschw. **55 ml/h**

VI.2. Studienprotokoll – Übersicht der Messwerte

Proband:

Datum:

Uhrzeit	Zeit in min	B _x	2 ml EDTA	5 ml Serum	2 ml Li-Hep.	3 ml EDTA	2 ml EDTA	U _x	Urin, 3 Eppis	Urin-Mono-vette	Urin, 4 Eppis
8:00	0:00	B ₀	BB	Inulin, PAH				U ₀	Inulin, PAH		
9.15	1.15	B ₁		Inulin, PAH							
9.45	1.45	B ₂		Inulin, PAH	Na, K	cGMP	BH4				
10:00	2:00							U ₁	Inulin, PAH	Na, K	
	2.15	B ₃		Inulin, PAH	Na, K	cGMP	BH4				
	2:30							U ₂	Inulin, PAH	Na, K	
	2:45	B ₄		Inulin, PAH	Na, K						
11:00	3:00							U ₃	Inulin, PAH	Na, K	cGMP aus Umix
	3:15	B ₅		Inulin, PAH	Na, K						
	3:30							U ₄	Inulin, PAH	Na, K	
	3:45	B ₆		Inulin, PAH	Na, K						
12:00	4:00							U ₅	Inulin, PAH	Na, K	
	4:15	B ₇		Inulin, PAH	Na, K	cGMP	BH4				
	4:30							U ₆	Inulin, PAH	Na, K	
	4:45	B ₈	BB	Inulin, PAH	Na, K	cGMP	BH4				
13:00	5:00							U ₇	Inulin, PAH	Na, K	cGMP aus Umix

Uhrzeit	Zeit, min	RR, mmHg	MAP, mmHg	HF, /min	Urinvolumen, ml		
8:00	0:00				U 0		8.00 PAH/ Inulin-Start
8:30	0:30						
9:00	1:00						
9:20	1:15						
9:30	1:30				U 1 9.30-10.00	U mix 1 9.30-11.00	9:30
9:40	1:40			ml		Miktion
9:50	1:50						
10:00	2:00				U 2 10.00-ml	
10:10	2:10				10.30		
10:20	2:20			ml		
10:30	2:30				U 3 10.30-		
10:40	2:40				11.00		
10:50	2:50			ml		
11:00	3:00				U 4 11.00-		11.00
11:10	3:10				11.30		L-Name
11:20	3:20			ml		
11:30	3:30				U 5 11.30-	U mix 2 11.30- 13.00	
11:40	3:40				12.00		
11:50	3:50			ml		
12:00	4:00				U 6 12.00-ml	
12:10	4:10				12.30		
12:20	4:20			ml		
12:30	4:30				U 7 12.30-		
12:40	4:40				13.00		
12:50	4:50			ml		
13:00	5:00						

VI.3. Literaturnachweis

- Aisaka,K., Gross,S.S., Griffith,O.W., and Levi,R. (1989). L-arginine availability determines the duration of acetylcholine-induced systemic vasodilation in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **163**, 710-717.
- Aisaka,K., Gross,S.S., Griffith,O.W., and Levi,R. (1989). NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure in vivo? *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **160**, 881-886.
- Artunc,F., Essig,M., Artunc,N., Plachtzik,C., Reich,M., Boehmer,G., Haering,H.U., Erley,C.M., and Risler,T. (2008). Effects of tetrahydrobiopterin on nitric oxide bioavailability and renal hemodynamics in healthy volunteers. *J. Nephrol.*, **21**, 850-860.
- Artunc,F.H., Fischer,I.U., Risler,T., and Erley,C.M. (2005). Improved estimation of GFR by serum cystatin C in patients undergoing cardiac catheterization. *Int. J. Cardiol.*, **102**, 173-178.
- Baylis,C., Mitruka,B., and Deng,A. (1992). Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J. Clin. Invest.*, **90**, 278-281.
- Bech,J.N., Nielsen,C.B., and Pedersen,E.B. (1996). Effects of systemic NO synthesis inhibition on RPF, GFR, UNa, and vasoactive hormones in healthy humans. *Am. J. Physiol*, **270**, F845-F851.
- Benigni,A., Zoja,C., Noris,M., Corna,D., Benedetti,G., Bruzzi,I., Todeschini,M., and Remuzzi,G. (1999). Renoprotection by nitric oxide donor and lisinopril in the remnant kidney model. *Am. J. Kidney Dis.*, **33**, 746-753.
- Blau,N., Duran,M., Blaskovics,M.E., and Gibson,K.M. (2003). Physician`s Guide to the Laboratory Diagnosis of Metabolic Diseases. *Springer*, Heidelberg.
- Boger,R.H., Bode-Boger,S.M., Thiele,W., Junker,W., Alexander,K., and Frolich,J.C. (1997). Biochemical evidence for impaired nitric oxide synthesis in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Circulation*, **95**, 2068-2074.
- Bolotina,V.M., Najibi,S., Palacino,J.J., Pagano,P.J., and Cohen,R.A. (1994). Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle. *Nature*, **368**, 850-853.
- Braam,B. (1999). Renal endothelial and macula densa NOS: integrated response to changes in extracellular fluid volume. *Am. J. Physiol*, **276**, R1551-R1561.

- Broere,A., Van Den Meiracker AH., Boomsma F., Derkx FH., Veld AJ., Schalekamp MA. (1998). Human renal and systemic hemodynamic, natriuretic, and neurohumoral responses to different doses of L-NAME. *Am J Physiol.* 275(6 Pt 2):F870-7.
- Cai,H. and Harrison,D.G. (2000). Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. *Circ. Res.*, **87**, 840-844.
- Conran,N., Oresco-Santos,C., Acosta,H.C., Fattori,A., Saad,S.T., and Costa,F.F. (2004). Increased soluble guanylate cyclase activity in the red blood cells of sickle cell patients. *Br. J. Haematol.*, **124**, 547-554.
- Cooke,J.P. (2000). Does ADMA cause endothelial dysfunction? *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **20**, 2032-2037.
- Davignon,J., Ganz P., (2004) Role of Endothelial Dysfunction in Atherosclerosis. *Circulation* 109[suppl III]: III27-III32,.
- Deng,A.; Baylis C. (1993). Locally produced EDRF controls preglomerular resistance and ultrafiltration coefficient. *Am J Physiol*; 264: F212-215
- Doyama,K., Fukumoto,M., Takemura,G., Tanaka,M., Oda,T., Hasegawa,K., Inada,T., Ohtani,S., Fujiwara,T., Itoh,H., Nakao,K., Sasayama,S., and Fujiwara,H. (1998). Expression and distribution of brain natriuretic peptide in human right atria. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **32**, 1832-1838.
- Drexler,H. and Hornig,B. (1999). Endothelial dysfunction in human disease. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **31**, 51-60.
- Essig,M. (2005). Beeinflussung der renalen und systemischen Hämodynamik durch Infusion von Tetrahydrobiopterin (BH4) bei gesunden Probanden. *Dissertation*, Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen.
- Faraci,F.M., Brian,J.E., Jr., and Heistad,D.D. (1995). Response of cerebral blood vessels to an endogenous inhibitor of nitric oxide synthase. *Am. J. Physiol*, **269**, H1522-H1527.
- Fenoy,F.J., Ferrer,P., Carbonell,L., and Garcia-Salom,M. (1995). Role of nitric oxide on papillary blood flow and pressure natriuresis. *Hypertension*, **25**, 408-414.
- Feron,O., Dessy,C., Moniotte,S., Desager,JP., Balligand, JL. (1999). Hypercholesterolemia decreases nitric oxide production by promoting the interaction of caveolin and endothelial nitric oxide synthase. *J Clin Invest* **103**: 897-905.

- Fiege,B., Ballhausen,D., Kierat,L., Leimbacher,W., Goriounov,D., Schircks,B., Thony,B., and Blau,N. (2004). Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration. *Mol. Genet. Metab*, **81**, 45-51.
- Fukuda,Y., Teragawa,H., Matsuda,K., Yamagata,T., Matsuura,H., and Chayama,K. (2002). Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolaemia. *Heart*, **87**, 264-269.
- Furchgott,R.F. and Zawadzki,J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*, **288**, 373-376.
- Gardiner,S.M., Kemp,P.A., Bennett,T., Palmer,R.M., and Moncada,S. (1993). Regional and cardiac haemodynamic effects of NG, NG,dimethyl-L-arginine and their reversibility by vasodilators in conscious rats. *Br. J. Pharmacol.*, **110**, 1457-1464.
- Giels,JF., Lin,JY., Wingler,K., Van Schil,PE.,Schmidt,HH., Moens,AL. (2011). Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radic Biol Med* 1;50(7):765-76.
- Gimbrone, MA Jr.. (1980). Endothelium Dysfunction and the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Atherosclerosis V. Proceedings of the Fifth International Symposium on Atherosclerosis*. edited by Gotto A, Smith LC, and Allen B. New York: Springer-Verlag, 415-425,.
- Gkaliagkousi,E., Ferro, A. (2011). Nitric oxide signalling in the regulation of cardiovascular and platelet function. *Front Biosci.* 1;16:1873-97.
- Guarasci,GR.; Kline,RL. (1996). Pressure natriuresis following acute and chronic inhibition of nitric oxide synthase in rats. *Am J Physiol*; 270: R469-478.
- Hansen,J., Jacobsen,T.N., and Victor,R.G. (1994). Is nitric oxide involved in the tonic inhibition of central sympathetic outflow in humans? *Hypertension*, **24**, 439-444.
- Haynes,W.G., Noon,J.P., Walker,B.R., and Webb,D.J. (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J. Hypertens.*, **11**, 1375-1380.
- Heinzel,B., John,M., Klatt,P., Bohme,E., and Mayer,B. (1992). Ca²⁺/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase. *Biochem. J.*, **281 (Pt 3)**, 627-630.
- Heitzer,T., Krohn,K., Albers,S., and Meinertz,T. (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation by increasing nitric oxide

- activity in patients with Type II diabetes mellitus. *Diabetologia*, **43**, 1435-1438.
- Hick,C. (1996). Physiologie-Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1, 1.Auflage. *Jungjohann Verlagsgesellschaft*.
- Hong,H.J., Hsiao,G., Cheng,T.H., and Yen,M.H. (2001). Supplementation with tetrahydrobiopterin suppresses the development of hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, **38**, 1044-1048.
- Huang,PL., Huang,Z., Mashimo,H., Bloch,KD., Moskowitz,MA., Bevan,JA., Fishman,MC (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**: 239-242.
- Jin,J.S. and D'Alecy,L.G. (1996). Central and peripheral effects of asymmetric dimethylarginine, an endogenous nitric oxide synthetase inhibitor. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **28**, 439-446.
- Kielstein,J.T., Boger,R.H., Bode-Boger,S.M., Schaffer,J., Barbey,M., Koch,K.M., and Frolich,J.C. (1999). Asymmetric dimethylarginine plasma concentrations differ in patients with end-stage renal disease: relationship to treatment method and atherosclerotic disease. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **10**, 594-600.
- Kielstein, J.T., Tsikas, D., and Fliser,D. (2006). Effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) infusion in humans. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **62**, 39-44.
- Kleinbongard,P., Schulz,R., Rassaf,T., Lauer,T., Dejam,A., Jax,T., Kumara,I., Gharini,P., Kabanova,S., Ozuyaman,B., Schnurch,H.G., Godecke,A., Weber,A.A., Robenek,M., Robenek,H., Bloch,W., Rosen,P., and Kelm,M. (2006). Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase. *Blood*, **107**, 2943-2951.
- Ludmer,PL., Selwyn,AP., Shook,TL., Wayne,RR., Mudge,GH., Alexander,RW., Ganz,P. (1986). Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* **315**(17): 1046-1051.
- Lefer,AM., Tsao,PS., Lefer,DJ., Ma X-L. (1991) Role of endothelial dysfunction in the pathogenesis of reperfusion injury after myocardial ischemia. *FASEB J* **5**: 2029-2034.
- Lucas,K.A., Pitari,G.M., Kazerounian,S., Ruiz-Stewart,I., Park,J., Schulz,S., Chepenik,K.P., and Waldman,S.A. (2000). Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol. Rev.*, **52**, 375-414.
- Maier,W., Cosentino,F., Lutolf,R.B., Fleisch,M., Seiler,C., Hess,O.M., Meier,B., and Luscher,T.F. (2000). Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **35**, 173-178.

- Maytin, M., Leopold, J., and Loscalzo, J. (1999). Oxidant stress in the vasculature. *Curr. Atheroscler. Rep.*, **1**, 156-164.
- Meininger, C.J., Marinos, R.S., Hatakeyama, K., Martinez-Zaguilan, R., Rojas, J.D., Kelly, K.A., and Wu, G. (2000). Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to tetrahydrobiopterin deficiency. *Biochem. J.*, **349**, 353-356.
- Michel, T., Feron, O. (1997). Perspective Series: Nitric Oxide and Nitric Oxide Synthases. Nitric Oxide Synthases: Which, Where, How, and Why? *J Clin Invest* 100: 2146-2152.
- Miyazaki, H., Matsuoka, H., Cooke, J.P., Usui, M., Ueda, S., Okuda, S., and Imaizumi, T. (1999). Endogenous nitric oxide synthase inhibitor: a novel marker of atherosclerosis. *Circulation*, **99**, 1141-1146.
- Moncada, S., Palmer, R.M., and Higgs, E.A. (1991). Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.
- Moncada, S. (1992). The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine : nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* **145**: 201-227.
- Murad, F., Arnold, W.P., Mittal, C.K., and Braughler, J.M. (1979). Properties and regulation of guanylate cyclase and some proposed functions for cyclic GMP. *Adv. Cyclic. Nucleotide. Res.*, **11**, 175-204.
- Murad, F., Rapoport, R.M., and Fiscus, R. (1985). Role of cyclic-GMP in relaxations of vascular smooth muscle. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **7 Suppl 3**, S111-S118.
- Nakao, K., Mukoyama, M., Hosoda, K., Suga, S., Ogawa, Y., Saito, Y., Shirakami, G., Arai, H., Jougasaki, M., and Imura, H. (1991). Biosynthesis, secretion, and receptor selectivity of human brain natriuretic peptide. *Can. J. Physiol Pharmacol.*, **69**, 1500-1506.
- Palmer, R.M., Ferrige, A.G., and Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature*, **327**, 524-526.
- Panza, J.A., Garcia, C.E., Kilcoyne, C.M., Quyyumi, A.A., and Cannon, R.O., III (1995). Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with essential hypertension. Evidence that nitric oxide abnormality is not localized to a single signal transduction pathway. *Circulation*, **91**, 1732-1738.
- Peer, G., Blum, M. and Iaina A. (1996). Nitric oxide and acute renal failure. *Nephron*. 1996;73(3):375-81.
- Raij, L., Baylis, C. (1995). Glomerular actions of nitric oxide. *Kidney Int.* 48(1):20-32.

- Ravani,P., Tripepi,G., Malberti, F., Testa,S., Mallamaci, F., Zoccali, C (2005). Asymmetrical dimethylarginine predicts progression to dialysis and death in patients with chronic kidney disease: a competing risks modeling approach. *J Am Soc Nephrol.* **16**:2449-2455.
- Rees,D.D., Palmer,R.M., Schulz,R., Hodson,H.F., and Moncada,S. (1990). Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br. J. Pharmacol.*, **101**, 746-752.
- Roczniak,A., Burns, KD. (1996) Nitric oxide stimulates guanylate cyclase and regulates sodium transport in rabbit proximal tubule. *Am J Physiol.* 270(1 Pt 2):F106-15.
- Roe,J.H., Epstein,J.H., and Goldstein,N.P. (1949). A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine. *J. Biol. Chem.*, **178**, 839-845.
- Ruilope LM., Lahera V., Rodicio JL., Romero JC. (1994). Participation of nitric oxide in the regulation of renal function: possible role in the genesis of arterial hypertension. *J Hypertens.* 12(6):625-31.
- Sander,M., Chavoshan,B., and Victor,R.G. (1999). A large blood pressure-raising effect of nitric oxide synthase inhibition in humans. *Hypertension*, **33**, 937-942.
- Schnackenberg,C.G. (2002). Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature. *Am. J. Physiol Regul. Integr. Comp Physiol*, **282**, R335-R342.
- Schricker,K., Potzl,B., Hamann,M., and Kurtz,A. (1996). Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (b-NOS) mRNA levels in rat kidneys. *Pflugers Arch.*, **432**, 394-400.
- Segarra,G., Medina,P., Vila,J.M., Chuan,P., Domenech,C., Torondel,B., and Lluch,A. (2001). Inhibition of nitric oxide activity by arginine analogs in human renal arteries. *Am. J. Hypertens.*, **14**, 1142-1148.
- Setoguchi,S., Hirooka,Y., Eshima,K., Shimokawa,H., and Takeshita,A. (2002). Tetrahydrobiopterin improves impaired endothelium-dependent forearm vasodilation in patients with heart failure. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **39**, 363-368.
- Sitia,S., Tomasoni,L., Atzeni,F. (2010).From endothelial dysfunction to atherosclerosis. *Autoimmun Rev.*, **9**(12):830-4.
- Smith,H.W., Goldring,W., and Casis,H. (1938). The measurement of the tubular excretory mass, effective blood flow and filtration rate in the normal human kidney. *J. Clin. Invest.*, **17**, 263.

- Stoos,BA., Carretero,OA., Farhy,RD., Scicli,G., Garvin,JL. (1992). Endothelium-derived relaxing factor inhibits transport and increases cGMP content in cultured mouse cortical collecting duct cells. *J Clin Invest.* 89(3):761-5.
- Stroes,E., Kastelein,J., Cosentino,F., Erkelens,W., Wever,R., Koomans,H., Luscher,T., and Rabelink,T. (1997). Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia. *J. Clin. Invest*, **99**, 41-46.
- Thomas,L. Labor und Diagnose, 5.(2000). *Thieme-Books*, ISBN:3980521532, p. 119-120.Ref Type: Generic
- Thony,B., Auerbach,G. and Blau,N. (2000). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochem. J.*, **347 Pt 1**, 1-16.
- Thorup,C. and Persson,A.E. (1994). Inhibition of locally produced nitric oxide resets tubuloglomerular feedback mechanism. *Am. J. Physiol*, **267**, F606-F611.
- Tiefenbacher,C.P., Bleeke,T., Vahl,C., Amann,K., Vogt,A., and Kubler,W. (2000). Endothelial dysfunction of coronary resistance arteries is improved by tetrahydrobiopterin in atherosclerosis. *Circulation*, **102**, 2172-2179.
- Tiefenbacher,C.P. (2001). Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction? *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, **280**, H2484-H2488.
- Tietgen,K. (2004). Bestimmung von Brain Natriuretic Peptide (BNP) bei gesunden Hunden Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians- Universität München.
- Tojo A., Gross SS., Zhang L., Tisher CC., Schmidt HH., Wilcox CS., Madsen KM. (1994). Immunocytochemical localization of distinct isoforms of nitric oxide synthase in the juxtaglomerular apparatus of normal rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.*; 4(7):1438-47.
- Tojo,A., Welch,W.J., Bremer,V., Kimoto,M., Kimura,K., Omata,M., Ogawa,T., Vallance,P., and Wilcox,C.S. (1997). Colocalization of demethylating enzymes and NOS and functional effects of methylarginines in rat kidney. *Kidney Int.*, **52**, 1593-1601.
- Treeck B; Aukland K. (1997). Effect of L-NAME on glomerular filtration rate in deep and superficial layers of rat kidney. *Am J Physiol*; 272: F312-318
- Valkonen,V.P., Paiva,H., Salonen,J.T., Lakka,T.A., Lehtimaki,T., Laakso,J., and Laaksonen,R. (2001). Risk of acute coronary events and serum concentration of asymmetrical dimethylarginine. *Lancet*, **358**, 2127-2128.
- Vallance,P., Leone,A., Calver,A., Collier,J., and Moncada,S. (1992). Accumulation of an endogenous inhibitor of nitric oxide synthesis in chronic renal failure. *Lancet*, **339**, 572-575.

- Vallance,P. and Leiper,J. (2004). Cardiovascular biology of the asymmetric dimethylarginine:dimethylarginine dimethylaminohydrolase pathway. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **24**, 1023-1030.
- Vasquez-Vivar,J., Kalyanaraman,B., Martasek,P., Hogg,N., Masters,B.S., Karoui,H., Tordo,P., and Pritchard,K.A., Jr. (1998). Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **95**, 9220-9225.
- Wagner,L., Riggelman,A., Erdely,A., Couser,W., and Baylis,C. (2002). Reduced nitric oxide synthase activity in rats with chronic renal disease due to glomerulonephritis. *Kidney Int.*, **62**, 532-536.
- Walter,R., Blau,N., Schaffner,A., Schneemann,M., Speich,R., Stocker,R., Naujeck,B., and Schoedon,G. (1997). Inhalation of the nitric oxide synthase cofactor tetrahydrobiopterin in healthy volunteers. *Am. J. Respir. Crit Care Med.*, **156**, 2006-2010.
- Wilcox,JN., Subramanian,RR., Sundell,CL., Tracey,WR., Pollock,JS., Harrison,DG., Marsden,PA. (1997). Expression of multiple isoforms of nitric oxide synthase in normal and atherosclerotic vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 2479-88.
- Wolzt,M., Schmetterer,L., Ferber,W., Artner,E., Mensik,C., Eichler,H.G., and Krejcy,K. (1997). Effect of nitric oxide synthase inhibition on renal hemodynamics in humans: reversal by L-arginine. *Am. J. Physiol*, **272**, F178-F182.
- Wu,C.P., Woodcock,H., Hladky,S.B., and Barrand,M.A. (2005). cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) transport across human erythrocyte membranes. *Biochem. Pharmacol.*, **69**, 1257-1262.
- Xiong,Y., Yuan,L.W., Deng,H.W., Li,Y.J., and Chen,B.M. (2001). Elevated serum endogenous inhibitor of nitric oxide synthase and endothelial dysfunction in aged rats. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol*, **28**, 842-847.
- Yoo,J.H. and Lee,S.C. (2001). Elevated levels of plasma homocyst(e)ine and asymmetric dimethylarginine in elderly patients with stroke. *Atherosclerosis*, **158**, 425-430.
- Yoshimura,M., Yasue,H., Okumura,K., Ogawa,H., Jougasaki,M., Mukoyama,M., Nakao,K., and Imura,H. (1993). Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure. *Circulation*, **87**, 464-469.
- Zatz R.; de Nucci G. (1991). Effects of acute nitric oxide inhibition on rat glomerular microcirculation. *Am J Physiol*; 261: F360-363.

Zoccali,C., Bode-Boger,S., Mallamaci,F., Benedetto,F., Tripepi,G., Malatino,L., Cataliotti,A., Bellanuova,I., Fermo,I., Frolich,J., and Boger,R. (2001). Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet*, **358**, 2113-2117.

VI.4. Danksagung

Das Gelingen dieser Arbeit wäre ohne die Hilfe vieler Personen nicht möglich gewesen. Ihnen möchte ich auf diese Weise meinen Dank aussprechen:

- Herrn Prof. Dr. med. Teut Rissler für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas,
- meinem Bruder PD Dr. med. Ferruh Artunc für die motivierende und sehr geduldige Betreuung und die fachliche Unterstützung, besonders während der praktischen Ausführung der Studien sowie in der Ausarbeitungsphase,
- Frau Dr. C. Plachtzik für die uneigennützig Hilfe bei der sonographischen Voruntersuchung meiner Probanden,
- Frau Dipl. chem. J. Smykowski für die freundliche Anleitung während der Laborarbeit sowie der Problemlösung bei allen labortechnischen Schwierigkeiten,
- allen Probanden für ihre Teilnahme, Zuverlässigkeit und Geduld bei der Studiendurchführung, die diese Studie erst ermöglicht haben.

Ganz besonderen Dank gilt meiner Familie und Dr. rer. nat. Michael Reich für Ihre verständnis- und liebevolle Unterstützung.