

Aus der Medizinischen Klinik und Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin IV
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.- U. Häring
Sektion Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Leiter: Professor Dr. T. Risler

**Beeinflussung der renalen und systemischen
Hämodynamik durch Infusion von Tetrahydrobiopterin
(BH₄) bei gesunden Probanden**

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard- Karls- Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Kai Michael Essig
aus Böblingen
2006

Aus der Medizinischen Klinik und Universitätsklinik Tübingen

Abteilung Innere Medizin III
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. H.- U. Häring
Sektion Nieren- und Hochdruckkrankheiten
Leiter: Professor Dr. T. Risler

**Beeinflussung der renalen und systemischen
Hämodynamik durch Infusion von Tetrahydrobiopterin
(BH₄) bei gesunden Probanden**

INAUGURAL- DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
der Eberhard- Karls- Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Kai Michael Essig
aus Böblingen
2006

Dekan: Professor. Dr. I. B. Authenrieth
1. Berichterstatter: Professor. Dr. C. Erley
2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. A. Fritsche

gedruckt 2006 bei Copy & Druck Center, Tübingen

Meinen Eltern gewidmet

Abkürzungen

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACh	Acetylcholin
ADH	Antidiuretisches Hormon
ANOVA	analysis of variance
BH ₄	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body- Mass- Index
BNP	Brain- Natriuretic- Peptide
CaMs	Calmoduline
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
Cl	Clearance für eine Substanz (ml/min)
Co- Int	Konfidenz- Intervall
ED	endotheliale Dysfunktion
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale NO- Synthase
EPO	Erythropoietin
ERDF	Endothelial Derived Relaxing Factor
ERPF	effektiver renaler Plasmafluss
FAD	Flavinadenindinucleotid
FF	Filtrationsfraktion
FMN	Flavinadeninmononucleotid
GC	Guanylatcyclase
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GTP	Guanosintriphosphat
GTPCH- I	GTP- Cyclohydrolase I
Hb	Hämoglobin
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
iNOS	induzierbare NO- Synthase
eNOS	endotheliale NO- Synthase

JGA	Juxtaglomeruläre Apparat
kg	Kilogramm
KHK	Koronare Herzkrankheit
KG	Körpergewicht
KOF _{indiv}	individuelle Körperoberfläche
KS- Test	Kolmogorov- Smirnov- Test
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
M ₃ - Rezeptor	muskarinischer Acetylcholin- Rezeptor vom Typ 3
MD	Macula Densa
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NADP (H)	Nicotinamiddiphosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO- Synthase
nNOS	neuronale NO- Synthase
NNR	Nebennierenrinde
NO _x	Stickoxide NO ₂ und NO ₃
ONOO ⁻	Peroxyinitrit
PAH	Para- Aminohippursäure
PKU	Phenylketonurie
RAAS	Renin- Angiotensin- Aldosteron- System
RBF	Renaler Blutfluss
RPF	renaler Plasmafluss
RT	Raumtemperatur
RVR	Renovaskulärer Widerstand
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SR	Sepiapterin Reduktase
TGF	Tubuloglomerulärer Feedback
U	Urinkonzentration einer Substanz
ZNS	Zentrales Nervensystem

Inhaltsverzeichnis Doktorarbeit

	Seite
I. Einleitung	1
I.1. Stickstoffmonoxid	1
I.1.1. Die Geschichte des NO	1
I.1.2. Biosynthese und Vorkommen von NO	1
I.1.3. Wirkungen von NO	4
I.2. Tetrahydrobiopterin (BH₄)	5
I.2.1. Strukturformel von BH ₄	5
I.2.2. Synthese von Tetrahydrobiopterin (BH ₄)	5
I.2.3. Funktionen von BH ₄	7
I.2.4. Pathophysiologische Bedeutung von BH ₄	8
I.3. BH₄/ NO und Endotheliale Dysfunktion	10
I.4. Bisherige BH₄- Studien	11
I.4.1. Intravenöse Studien	12
I.4.2. Intraarterielle Studien	12
I.4.3. Intracoronare Studien	12
I.4.4. Inhalative Studien	12
I.5. Renin- Angiotensin- Aldosteron- System	13
I.6. Zielsetzung der Studie	14
II. Studiendesign und Methoden	15
II.1. Teilnahmekriterien	15
II.1.1. Einschlusskriterien	15
II.1.2. Abbruchkriterien	16
II.1.3. Ausschlußkriterien	16
II.2. Studiendesign	16
II.2.1. Studienentwurf– Graphische Darstellung	17
II.2.2. Praktische Durchführung	18
II.2.3. Zusammensetzung der einzelnen Infusionen	21
II. 3. Methoden	22

II.3.1. Untersuchungsmethoden	22
II.3.2. PAH- und Inulin-clearance	23
II.3.3. Übrige Laborparameter	26
II.3.4. Berechnete Größen	27
II.4. Statistische Methoden	29
III. Ergebnisse:	30
III.1. Ergebnisdarstellung	30
III.2. Systemische Hämodynamik	31
III.2.1. Blutdruck	31
III.2.2. Mittelarterieller Druck (MAP)	32
III.2.3. Herzfrequenz	33
III.3. Renale Hämodynamik	34
III.3.1. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)	34
III.3.2. Renaler Plasmafluß (RPF)	35
III.3.3. Filtrationsfraktion (FF)/ Renovaskulärer Widerstand (RVR)	36
III.4. Abbauprodukte des Stickstoffmonoxids: NO_x	38
III.4.1. NO _x im Serum	38
III.4.2. NO _x im Urin	39
III.5. cGMP	40
III.5.1. cGMP im Serum	40
III.5.2. cGMP im Urin	41
III.6. Hormone	42
III.6.1. BNP	42
III.6.2. Renin	43
III.6.3. Aldosteron	44
III.6.4. Erythropoietin	45
III.7. Sonstige Untersuchungen	46
III.7.1. Hämatokrit	46
III.7.2. Fraktionierte Natrium-/ Kalium- Clearance	47
III.7.3. Verträglichkeit	48
III.7.4. Elektrokardiogramm	48

IV. Diskussion	49
IV.1. cGMP, Abbauprodukte von NO sowie BNP	49
IV.2. Systemische Hämodynamik	52
IV.2.1. Blutdruck, MAP und Herzfrequenz	52
IV.3. Renale Hämodynamik	53
IV.3.1. Glomeruläre Filtrationsrate und renaler Blutfluss	53
IV.3.2. Filtrationsfraktion und Renovaskulärer Widerstand	55
IV.4. Hormone	56
IV.4.1. Renin und BNP	56
IV.4.2. Aldosteron	56
IV.4.3. Erythropoietin	56
IV.5. Fraktionierte Na⁺- und K⁺- Clearance	57
IV.6. Hämatokrit	57
IV.7. Verträglichkeit	57
V. Zusammenfassung	58
VI. Anhang	60
VI.1. Dokumentationsbögen	60
VI.1.1. Studienprotokoll	60
VI.1.2. Studienprotokoll - Übersicht der Messwerte	61
VI.2. Zusammenfassung der Messwerte	62
VI.2.1. Systemische Hämodynamik	62
VI.2.2. Renale Hämodynamik	64
VI. 2.3. cGMP und NO	65
VI. 2.4. Hormone	68
VI.2.5. Natrium, Kalium und Hämatokrit	69
VI.3. Literaturnachweis	70
VI.4. Danksagungen	
VI.5. Lebenslauf	

I. Einleitung

I.1. Stickstoffmonoxid

I.1.1. Die Geschichte des NO

1980 entdeckte der Pharmakologe Furchgott bei seinen Experimenten an präparierten Kaninchenarterien, dass Acetylcholin, welches in vivo ein potenter Vasodilatator ist, in vitro nicht immer zu einer Relaxation der Blutgefäße führte. In weiteren Untersuchungen fand er heraus, dass eine Schädigung der Endothelzellen, die während der Präparation stattgefunden hat, die Ursache für diese Beobachtung ist. 1980 stellte er fest, dass Acetylcholin über einen muskarinergen Rezeptor der Endothelzellen zur Ausschüttung eines Stoffes stimuliert, welcher die Gefäßmuskulatur relaxiert (Furchgott und Zawadzki, 1980). Dieser Stoff wurde dann als „endothelium- derived relaxing factor“ (EDRF) bekannt. Es gelang Palmer et al. erstmals im Jahr 1987, diesen Stoff als Stickstoffmonoxid (NO) zu identifizieren. Zurzeit wird NO als wichtigster Mediator des Endothels verstanden, der den Gefäßtonus, die Proliferation und die Gerinnung beeinflusst.

I.1.2. Biosynthese und Vorkommen von NO

Als Substrate für die Synthese von Stickstoffmonoxid dienen zum einen die Aminosäure L- Arginin und Sauerstoff, als auch der essentielle Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4). Unter katalytischer Wirkung des Enzyms NO-Synthase (NOS), von der bisher drei verschiedene Isoformen bekannt sind (Förstermann et al., 1994), werden so die Produkte L- Citrullin und NO erhalten (Abbildung 1a).

Die NO- Synthasen sind dimere Enzyme bestehend aus zwei NOS-Monomeren, die mit zwei Calcium- Calmodulin- Monomeren (CaMs) assoziiert sind, was bedeutet, dass sie genau genommen Tetramere sind. Sie benötigen die Kofaktoren (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH_4), NADPH, FAD, FMN sowie Protoporphyrin IX (Schoedon et al., 1993; Seiji Ueda et al., 2000) und katalysieren die Reaktion von L- Arginin, NADPH und Sauerstoff zu NO, Citrullin und NADP.

Man unterscheidet drei Isoenzyme der NO- Synthase (NOS1- 3, Förstermann et al., 1994), welche hinsichtlich ihrer Struktur und funktionellen Einheiten ähnlich sind (Chen Pei- Feng et al., 1995), sich aber in ihrer Primärstruktur, ihren unterschiedlichen Wirkungsorten und ihrer Expression unterscheiden. Die Reduktase- Einheit, die die Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH enthält, hat sequenzielle Übereinstimmung mit der Cytochrom P- 450 Reduktase. Die Oxygenase- Einheit, die keine Ähnlichkeit mit bisher bekannten Proteinen hat, weist Bindungsstellen für Häm-, BH_4 - und L-Arginin auf; ansonsten weisen die drei Isoenzyme keine Sequenzanalogien auf (Thöny et al., 2000).

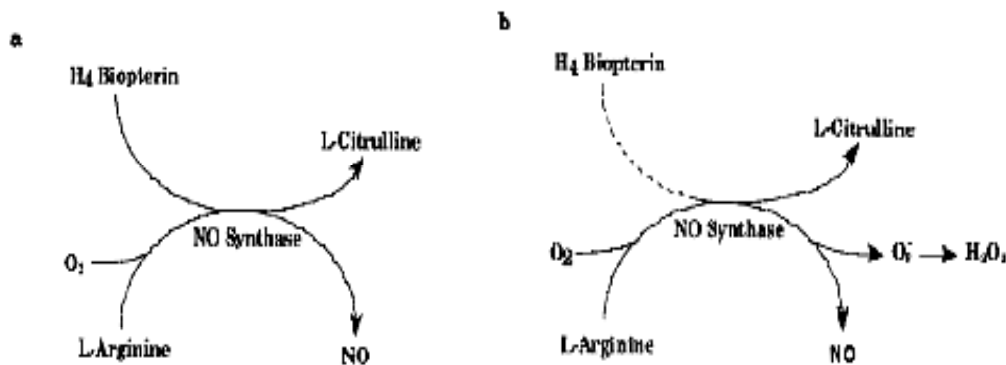


Abb. 1

(a) Schematisch Darstellung der durch NOS katalysierten Reaktion, wobei aus L- Arginin und Sauerstoff (O_2) L- Citrullin und Stickstoff (NO) wird.

(b) Unter suboptimalen Konzentrationen an (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (BH_4 , gestrichelte Linie) generiert die NOS Superoxidanionen (O_2^-), welche durch rasche Reaktion mit O_2^- und NO zur Produktion von Hydrogenperoxid (H_2O_2) und/oder Peroxynitrat ($ONOO^-$) führt (aus: Cosentino et al., 1998).

NO-Synthase 1 (NOS1, neuronal NOS oder nNOS genannt):

Die NOS1 ist sowohl im zentralen und peripheren Nervensystem als auch in der Lunge (Kelm, 1996) und auch stark exprimiert in der MD der Niere nachweisbar (Bachmann et al., 1995; Tojo et al., 1995; Wilcox et al., 1992). Das durch sie gebildete NO wirkt als Neurotransmitter (Franklin und Epstein, 1993).

NO-Synthase 2 (NOS2, inducible NOS oder iNOS genannt):

Die NOS2 findet sich in einer Vielzahl von Zellen und Geweben. Nach Stimulation durch bakterielle Endotoxine wird die NOS2 vermehrt von glatten Gefäßmuskelzellen sowie Myo- und Epikardzellen exprimiert, was vermutlich zu dem häufig mit Endotoxinämie assoziierten venösen Pooling und der kardialen Dysfunktion beiträgt (Schulz et al., 1992). Sie wird ebenfalls von Lymphozyten und Makrophagen exprimiert (Kirk et al., 1990), was auf eine Beteiligung des NO Stoffwechsels an der Immunabwehr schließen lässt (Franklin et al., 1993). Hepatozyten können ebenfalls NO bilden. Bei Lebererkrankungen kann der NO-Spiegel erhöht sein (Barner et al., 1993). In der Niere ist die NOS2 vor allem im aufsteigenden Teil der Henle- Schleife zu finden (Morrissey et al., 1994).

NO-Synthase 3 (NOS3, endothelial NOS oder eNOS genannt):

NOS3 wird in Gefäßen, im Endothel von Glomerulumkapillaren (Terada et al., 1992; Tojo et al., 1995) und in Thrombo- und Kardiomyozyten exprimiert (Kelm, 1996). Sie ist mit einem Kompartiment der Plasmamembran der Endothelzellen assoziiert (Busse et al., 1998). Nach Aktivierung läuft eine Signalkaskade ab, die über einen Ca^{2+} / Calmodulin- abhängigen Mechanismus zu einer Aktivierung der NOS3 und damit zu einer vermehrten NO- Freisetzung führt (Uematsu et al., 1995). Wichtigster Stimulus ist eine erhöhte luminale Wandspannung bzw. Scherkraft (Amal et al., 1999) aber auch eine Vielzahl an anderen Substanzen wie z.B. Insulin, Acetylcholin, ATP, ADP, Substanz P, Bradykinin, Histamin, Thrombin oder Serotonin (Furchgott und Vanhoutte, 1989). Die Gabe von L- Arginin, dem Substrat der NOS, hat dagegen vermutlich keinen Einfluss auf die Bildung von endotheliale Stickstoffmonoxid (Baudouin et al., 1993). In der Niere sind alle drei Isoformen der NOS zu finden.

I.1.3. Wirkungen von NO

NO ist ein leicht diffusibles Gas, welches die Zellmembran leicht überwindet. Es wird vom Endothel nach basal in die Gefäßwand und nach luminal abgegeben. In den glatten Gefäßmuskelzellen entfaltet NO seine intrazelluläre Wirkung. Es aktiviert die lösliche Guanylatcyclase (GC), indem es sich an die Häm- Gruppe bindet und erhöht damit die Bildung des „second messengers“ Guanosin- 3'5'- Monophosphat (cGMP) aus Guaninosintri-phosphat (GTP) (Karow und Lang, 1999). Durch cGMP werden Proteinkinase G19 und andere, teilweise noch unbekannte Kinasen aktiviert, die durch Phosphorylierung verschiedener Zielproteine eine Erniedrigung des zytoplasmatischen Kalziumspiegels durch vermehrte Rückaufnahme in das Sarkoplasmatische Retikulum bewirken (Schmidt, 1993; Schmidt, 1996). Dies führt zu einer Vasodilatation des Gefäßes und zu einer Proliferationshemmung der Gefäßmuskelzellen. Luminal bewirkt NO über denselben Mechanismus einen Anstieg von cGMP in den Thrombozyten, wodurch Adhäsion und Aggregation gehemmt werden (Radoski und Moncada, 1991).

Die Aktivierung der Signalkaskade hat eine gesteigerte NOS3- Aktivierung zur Folge, wodurch der NO Spiegel weiter ansteigt und ein Plateau ausbildet, solange dieser Stimulus anhält (Busse und Fleming, 1998). NO hat im Organismus eine Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden, da es durch Sauerstoffradikale (z.B. durch das Superoxidanion O_2^-) und H_2O_2 zu Nitrit und dann weiter zu Nitrat oxidiert (Kelm et al., 1992; Welch, Tojo und Wilcox, 2000), oder durch Hämoglobin inaktiviert wird (Furchgott und Vanhoutte, 1989).

In der Niere spielt NO eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der renalen Perfusion und der GFR; bei niedrig dosierter, systemischer NO- Inhibition kann bereits eine renale Vasokonstriktion beobachtet werden bevor der systemische Blutdruck ansteigt (Woltz et al., 1997). Dies deutet darauf hin, dass NO im renalen Gefäßbett eine stärkere Rolle einnimmt als in der systemischen Zirkulation. Weiterhin ist NO am Tubuloglomerulären Feedback (TGF) (Thorup und Persson, 1994) und an der druckbedingten Natriuresis beteiligt (Fenoy et al., 1995; Kone und Baylis, 1997).

I.2. Tetrahydrobiopterin (BH₄)

I.2.1. Strukturformel von BH₄

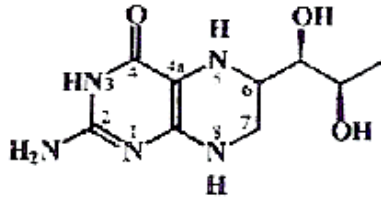


Abb. 2 Strukturformel von BH₄ (6R-5,6,7,8-Tetrahydro-L-biopterin)

I.2.2. Synthese von Tetrahydrobiopterin (BH₄)

Man unterscheidet zwei Synthesewege von BH₄. Es kann zum einen aus GTP durch „de-novo-Synthese“ hergestellt, zum anderen aus oxidierten Formen im „salvage pathway“ regeneriert werden. Intrazelluläre BH₄-Spiegel werden durch Kontrolle des Schrittmacherenzymes der BH₄-Biosynthese, der GTP-Cyclohydrolase- I (GTP-CH), reguliert. Bei Entzündungen kommt es durch inflammatorische Zytokine zu einer gesteigerten NO-Synthese durch die NOS2 (oder iNOS). Der erhöhte Bedarf an BH₄ wird durch Induktion der GTP-CH-Aktivität gedeckt (Thöny et al., 2000). Das Gefäßendothel sezerniert BH₄ basolateral in Richtung der glatten Gefäßmuskelzellen, die allerdings selbst kein BH₄ synthetisieren (Schaffner et al., 1994).

Der „de-novo-Pathway“

Die BH₄-Synthese verläuft beim „de-novo-Pathway“ über eine Mg²⁺-, Zn²⁺- und NADPH-abhängige Reaktion von GTP über die zwei Zwischenprodukte: 7,8-Dihydroneopterintriphosphat und 6-pyruvyl-5,6,7,8-Tetrahydropterin (Abb. 3). Die drei Enzyme GTP-Cyclohydrolase- I, 6-Pyruvyl-Tetrahydropterin-Synthase und die Sepiapterin-Reduktase werden benötigt, um eine völlige stereospezifische Reaktion zu 6R-L-erythro-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin zu ermöglichen.

Der „Salvage Pathway“

Als Vorstufen für die Synthese von BH₄ dienen entweder Sepiapterin oder 7,8-Dihydrobiopterin. Dabei wird Sepiapterin durch das Enzym Sepiapterin-Reduktase (SR) zu 7,8-Dihydrobiopterin umgewandelt, woraus nach NADPH-abhängiger enzymatischer Wirkung der Dihydrofolatreduktase BH₄ entsteht. Über die Expression und Regulation des Enzyms SR ist bisher nicht viel bekannt. Es gibt jedoch bisher keinen Hinweis, dass SR die Reaktionsrate von BH₄ beeinflusst. Der „Salvage Pathway“ scheint keine kompensatorische Rolle bei BH₄- Mangelzuständen zu spielen. Zumindest kann dieser „alternative Syntheseweg“ einen angeborenen BH₄- Mangel in Säugetieren nicht kompensieren (Thöny et al. , 2000). Beide oben genannten Synthese- Formen von BH₄ sind in der folgenden Abbildung (Abb. 3) graphisch zusammengefasst.

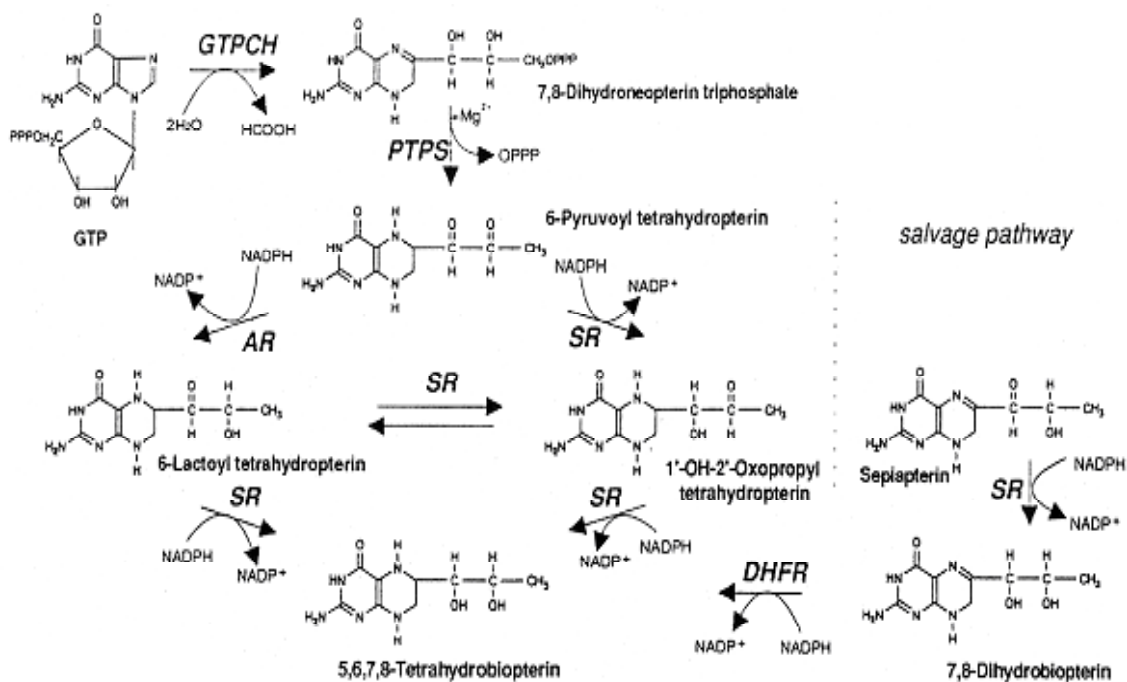


Abb.3: „De-novo- Synthese“ aus GTP und Salvage Pathway.

Die geschwindigkeitsbestimmenden Schritte sind GTP-Cyclohydrolase in niederen Säugetieren oder Pyruvat-Tetrahydropterin-Synthetase, beim Menschen. AR= Aldose Reduktase (identisch mit 6-pyruvat-Tetrahydropterin Reduktase); DHFR= Dihydrofolat Reduktase; GTPCH= GTP-Cyclohydrolase- I; PTPS= 6-pyruvat-Tetrahydropterin-Synthase; SR= Sepiapterin Reduktase (aus: Schoedon et al., 1993).

I.2.3. Funktionen von BH₄

Eine der bestuntersuchten Funktionen von BH₄ ist seine Funktion als natürlicher Kofaktor von Hydroxylasen der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin, welche die regulierenden Enzyme für die Synthese von Katecholaminen und Serotonin (5- Hydroxytryptamine) sind.

Darüber hinaus ist BH₄ auch ein essentieller Kofaktor der Glyceryl- Ether-Monooxygenase (Thöny et al., 2000) und spielt zudem mit Phenylalanin eine zentral regulierende Rolle im Phenylalanin- 4- Hydroxylase- System. Dabei wirkt Phenylalanin als positiv allosterischer Effektor, welcher das Enzym aktiviert, während BH₄ den negativen Effektor darstellt, der mit der Phenylalanin- Aktivierung konkurriert (Mitnault et al., 1995). Es wird auch postuliert, dass BH₄ antiinflammatorische Effekte besitzt und die ischämiebedingte Schädigung vor allogener Lungentransplantation reduziert (Schmidt et al., 2000 a+b). Zudem schützt es die Gefäße vor Cyclosporin A-induzierten Schäden (Ishii et al., 2003).

BH₄ dient weiterhin als Wachstums- und Proliferationsfaktor von hämatopoetischen und anderen Zellenreihen von Säugetieren. Durch eine Erhöhung des intrazellulären BH₄ in Anwesenheit von epidermalen- und nervalen Wachstumsfaktoren konnte ein Proliferationszuwachs an PC12- Zellen von Ratten festgestellt werden (Anastasiadis et al., 1997).

Im Nervensystem hat BH₄ darüber hinaus die Funktion eines allgemeinen Neuroprotektors und dient zudem als Neurotransmitter- Releasing Factor (Thöny et al., 2000). Intrazelluläres BH₄ dient als starker Radikalfänger insbesondere von Superoxidanionen (Kojima et al., 1995).

Welchen Wirkmechanismus BH₄ in seiner Funktion als Kofaktor der NO-Synthese hat, ist allerdings bislang nicht eindeutig geklärt. Es wurden verschiedenste Hypothesen postuliert. Einerseits stabilisiert BH₄ die

Dimerformation der NOS. Andererseits könnte BH_4 allosterisch die Aktivität NOS modulieren. Es könnte aber auch in Form eines Elektronendonators als Redox- Agens fungieren oder die Kopplung der Oxidation von NADPH und die NO- Synthese verbessern und somit die Superoxid- und Hydrogensynthese mindern (Alderton et al., 2001).

I.2.4. Pathophysiologische Bedeutung von BH_4

Unter in-vitro Bedingungen hemmt ein Mangel von BH_4 nicht nur die NO- Synthese, es kommt auch zu einer erhöhten Bildung von Superoxidanionen durch die NO- Synthase (Vasquez- Vivar et al., 1998; Setoguchi et al., 2002; Stroes et al., 1998 a+b; Hong- Jye Hong, 2001). Die Superoxidanionen könnten in-vivo den oxidativen Stress am Endothel verstärken. Dadurch würde sowohl vorhandenes NO als auch BH_4 verbraucht.

In in-vitro- Studien konnte gezeigt werden, dass eine reziproke Beziehung zwischen der H_2O_2 - und der NO- Synthese besteht, wobei zunehmende Konzentrationen von BH_4 oder der Ausgangssubstanz L- Arginin eine Verschiebung zugunsten der NO- Synthese bewirken (vgl. Abb.: 4, Heinzel et al., 1992).

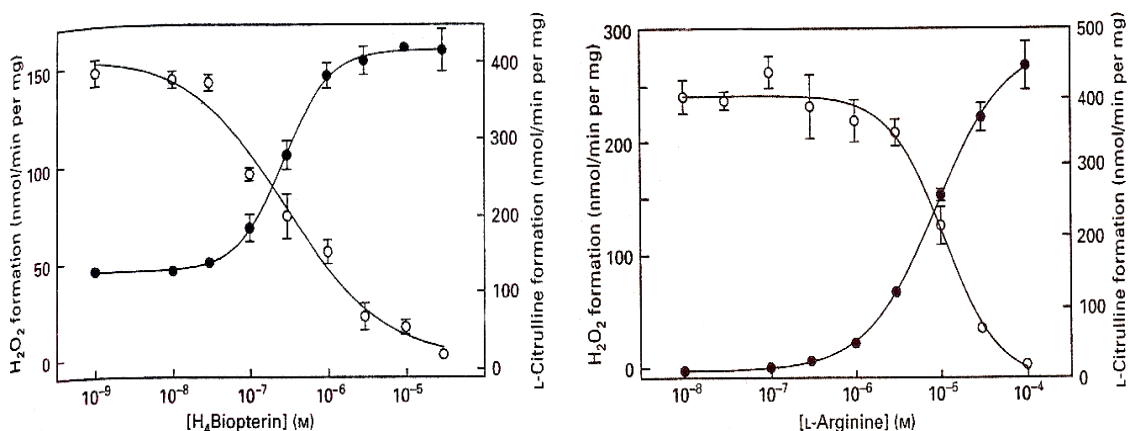


Abb.: 4 Effekt von BH_4 (links) bzw. L- Arginine (rechts) auf die Formation von H_2O_2 und Citrullin durch die NOS. (aus: Heinzel et al., 1992)

Darüber hinaus oxidiert Peroxynitrat das BH_4 sehr rasch zu inaktiven Pterinen wie 7,8- Dihydrobiopterin (Milstein et al., 1999). Dieses oxidierte BH_2 , kann wiederum die Bildung von Superoxidanionen durch eNOS verstärken (Tiefenbacher, 2001).

In Geweben von Diabetikern wurden auch in erhöhten Konzentrationen Nitrotyrosin- Reste gefunden, denen man die Wirkung von Peroxynitrat zuschreibt (Lyll et al., 1998). Die endotheliale Dysfunktion bei Typ II Diabetikern könnte somit wenigstens teilweise auf einen relativen Mangel an BH_4 zurückgeführt werden.

Angeborene Störungen der BH_4 - Synthese sind mit einer seltenen Form der Phenylketonurie (PKU) assoziiert (Schaub et al., 1978, Thöny et al., 2000), da abgesehen von den Enzymen der NO- Synthase auch Enzyme des Aminosäuren- Stoffwechsels (z.B. hier die Phenylalaninhydroxylase) BH_4 als essentiellen Kofaktor benötigen. Diese Sonderform der PKU, die in unseren Breiten nur ca. 1-2% aller Hyperphenylalaninämien ausmacht, wird jedoch nicht konventionell mit einer phenylalaninarmen Diät, sondern mit einer lebenslangen peroralen Substitution von BH_4 behandelt (Blau und Blasskovics, 2002).

Verminderte BH_4 - Konzentrationen wurden auch im Liquor zahlreicher anderer neurologischer Krankheiten, die ohne Hyperphenylalaninämie einhergingen, dokumentiert. Zu den letzteren zählen z.B. Parkinson- Krankheit (Curtius et al., 1984; Autismus Tani et al., 1994), Depression (Bottiglieri et al., 1992) und die der Morbus Alzheimer (Barford et al., 1984). Bei einigen dieser Krankheiten bewirkte die Gabe von BH_4 eine Besserung der klinischen Symptome (Curtius et al., 1984; Curtius et al., 1983; Fernell et al., 1997). Bei anderen Krankheiten konnten jedoch diese Ergebnisse nicht bestätigt werden (Woggon et al., 1984), sodass der Nutzen der BH_4 - Therapie zumindest für diese Krankheiten fraglich bleibt (Thöny et al., 2000).

I.3. BH₄/ NO und die endotheliale Dysfunktion

In den letzten Jahren rücken zunehmend das Endothel und dessen NO-Stoffwechsel in den Mittelpunkt der Forschung. Das Gefäßendothel ist durch die Produktion und Ausschüttung vasodilatierender (NO, Kinine, Histamin, Prostaglandine der Gruppe A und E, PgA₁, PgA₂, PgE₂) und vasokonstringierender Substanzen (Thromboxan, Serotonin, Endothelin, TXA₂, und PgF₂) maßgeblich an der Regulation der Mikro- und Makrozirkulation beteiligt (Schnackenberg, 2002; Drexler und Hornig, 1999; Hick, 1996) .

Alle bisher bekannten Risikofaktoren für Atherosklerose wie Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, Hypertonie, Rauchen, genetische Disposition und höheres Alter, führen in der Summe zur Verarmung des wichtigsten Mediators NO und einem Anstieg an vasotoxischen Radikalen (Tiefenbacher et al., 2001).

Die endotheliale Dysfunktion (ED) kann in-vivo durch eine intravasale Gabe von Acetylcholin aufgezeigt werden, was zu einer paradoxen Vasokonstriktion durch direkte Stimulation von M₃- Rezeptoren der Gefäßmuskelschicht führt (Tiefenbacher et al., 2000). In gesunden Gefäßen hingegen wird eine physiologische Vasorelaxation beobachtet, die auf einer sekundären Freisetzung von NO aus dem intakten Endothel beruht (Furchgott und Zawadzki, 1980).

Viele Untersuchungen haben gezeigt, dass die ED bereits früh in der Entwicklung einer kardiovaskulären Krankheit auftritt, lange bevor sich makroskopische strukturelle Veränderungen im Sinne einer Atherosklerose (Fukada et al., 2002). Dem liegt eine verminderte Verfügbarkeit des wichtigsten endothelabhängigen Mediators NO zugrunde (Panza et al., 1995). Ursache dafür könnte einerseits eine verminderte NO- Synthese und oder ein vermehrter NO-Abbau durch oxidativen Stress sein (Schnackenberg, 2002), welcher bei Vorliegen von atherogenen Faktoren stark zunimmt (Maytin et al., 1999; Cai und Harrison, 2000; Maier et al., 2000).

Die verminderte NO- Synthese kann dabei entweder durch einen Mangel an essentiellm Kofaktor BH₄ oder durch eine verminderte Bioverfügbarkeit an Substrat (L- Arginin), einen Defekt des Endothelzellrezeptors oder der membranständigen Signalkaskade, welche die NOS3 aktiviert, bedingt sein. Tatsächlich konnte in Zellkulturen von Endothelzellen aus diabetischen Ratten eine stark erniedrigte intrazelluläre BH₄- Konzentration gemessen werden, die durch exogene Substitution mit der Ausgangssubstanz Sepiapterin reversibel war (Meininger et al., 2000). Diese Hypothese wird weiterhin durch Beobachtungen aus kleinen klinischen Studien gestützt, bei welchen exogenes BH₄ eine verminderte Aktivität im endothelialen NO- System wiederherstellen konnte. So hob die intrakoronare BH₄- Gabe bei Patienten mit KHK die paradoxe Vasokonstriktion auf ACh- Infusion auf (Fukada et al., 2002).

Eine andere Studie berichtet, dass Superoxid die induzierbare NOS (iNOS) stimulieren und so zu einer massiven Überproduktion des Mediators NO führen kann, welcher in zu hohen Dosen einen potentiellen zytotoxischen, in geringen Mengen aber einen zytoprotektiven Effekt hat. Diese exzessiven NO-Dosen könnten durch chronische Schädigung des kardiovaskulären Systems, vor allem des Endothels, zur Bildung einer Hypertonie beitragen (Hong et al., 2001). Alle genannten Arbeiten haben jedoch nur die lokale arterielle Applikation von BH₄ untersucht. Bisher liegt keine Arbeit über die systemische BH₄- Applikation vor.

I.4. Bisherige BH₄- Studien

Aus den bisherigen Erfahrungen aus der Pädiatrie weiß man, dass die Langzeitgabe von BH₄ ohne Nachweis von Toxizität oder akuten Nebenwirkungen bei Kindern mit BH₄- defizienter PKU lebenslang erfolgen kann (Blau, 1994). Die dabei angegebene Höchstdosis liegt bei 20mg/kg KG/Tag. In anderen Studien sind intraarterielle und sogar intrakoronare Infusionen und inhalative Applikation ohne Komplikationen erfolgt.

I.4.1. Intravenöse Studien

Die myokardiale Durchblutung konnte bei gesunden Probanden durch systemische i.v. BH₄- Gabe signifikant gesteigert werden. Interessanterweise berichteten einige Probanden über eine gesteigerte Diurese (Walter et al., 2001).

I.4.2. Intraarterielle Studien

BH₄ wurde bereits intraarteriell in kleinen Dosen verabreicht, ohne dass sich Veränderungen des mittleren arteriellen Drucks noch der Unterarmdurchblutung zeigten (Stroes et al., 1997). Andererseits führten hohe lokale intraarterielle (8-32 mg/min) Dosen zu einer umschriebenen Vasodilatation der betroffenen Extremität. Der Blutfluß der anderen, unbehandelten Extremität, der systemische RR und die HF blieb unverändert (Schaffner et al., 1994).

I.4.3. Intrakoronare Studien

Die intrakoronare BH₄- Gabe hob bei KHK- Patienten die paradoxe Vasokonstriktion auf Acetylcholin- Infusion auf (Tiefenbacher et al., 2000; Fukuda et al., 2002; Maier et al., 2000). Ähnliche Ergebnisse mit Verbesserung der endothelabhängigen Vasorelaxation wurden bei Patienten mit Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie, chronischer Herzinsuffizienz, sowie bei Rauchern beobachtet (Heitzer et al., 2000; Setoguchi et al., 2002; Stroes et al., 1997).

I.4.4. Inhalative Studien

In einer Studie wurden 500mg wässrige BH₄- Dihydrochlorid- Lösung inhalativ appliziert. Post inhalationem traten weder Veränderungen der Lungenfunktion und des Lungenwiderstandes noch der systemischen Hämodynamik auf (Schoedon, 1997).

I.5. Renin- Angiotensin- Aldosteron- System

Das RAAS spielt eine wesentliche Rolle in der Regulation des Blutdrucks, des Plasmavolumens und der Osmolarität. Im Organismus findet man ein humorales, im Plasma lokalisiertes und ein gewebsständiges RAAS, welches im Myokard, Nieren, Gefäßwänden und anderen Organen lokalisiert ist.

Die Reninfreisetzung aus den Zellen des juxtaglomerulären Apparats (JGA) wird sowohl durch einen Abfall des Perfusionsdrucks im Vas afferens, bei herabgesetzter Nierenperfusion, Anstieg sympatotoner β_1 - Adrenorezeptoren im JGA als auch durch eine verminderte NaCl- Konzentration im distalen Tubulus im Bereich der Macula Densa (Karow und Lang, 1999) stimuliert. Katecholamine und andere humorale Faktoren wie Prostaglandine, Histamine, Angiotensin- II und Kalium als auch eine Unterbrechung der afferenten vagalen Fasern (Greminger et al., 1994) wirken stimulierend auf die Reninsekretion. Vasopressin (Ausiello et al., 1980; Dzau und Pratt, 1986; Greminger et al., 1994; Keeton et al., 1981; Klett et al., 1993; Reid et al., 1985; Vallotton et al., 1987) und Endothelin- I (Rossi et al., 1999) scheinen die Reninausschüttung zu hemmen.

Angiotensin- II ist das Effektorpeptid des RAAS und der stärkste Stimulus für die Aldosteronausschüttung aus der Nebennierenrinde (NNR, Schmidt et al., 2000 a+b; Dzau und Pratt, 1986; Greminger et al., 1994). Es löst im Hypothalamus den Durstmechanismus aus und spielt zudem eine wichtige Rolle in der Regulation des Salzhaushaltes. Hypothesen zufolge fördert es die Sekretion von Vasopressin (ADH) und Corticotropin (Girndt, 1990; Greminger et al., 1994; Klett et al., 1993; Wedler, 1991).

Das Mineralokortikoid Aldosteron ist an der Regulation des Elektrolyt- und Wasserhaushalts beteiligt, indem es die Natrium- und Wasserrückresorption in den distalen Nierentubuli steigert und gleichzeitig die Kalium- und Protonenausscheidung fördert. Die Aldosteronproduktion wird über zwei

Mechanismen reguliert. Natriummangel und Kaliumanstieg im Blut wirken direkt stimulierend auf die Zellen der Zona glomerulosa, während eine vermehrte Reninaktivität diese hemmt.

Die Interaktion zwischen NO und dem RAAS werden gegenwärtig noch kontrovers diskutiert. So könnte NO die Reninfreisetzung einerseits eventuell hemmen (Vidal et al., 1988), andererseits aber auch die Reninausschüttung stimulieren oder ein biphasischer Verlauf bestehen. Bei Letzterem hätte eine initial hemmende Wirkung langfristig eventuell eine Stimulation der Reninausschüttung zur Folge (Navar et al., 1996).

I.6. Zielsetzung der Studie

Da das NO- System wesentlich an der Regulierung des systemischen Blutdrucks beteiligt ist, soll in der vorliegenden Arbeit die intravenöse Applikation von BH₄ und dessen Einfluss auf das NO- System Aufschluss auf eine Beeinflussung systemischer Parameter als auch der renalen Hämodynamik liefern.

Die hämodynamischen Parameter werden dabei durch den renalen Plasmafluss RPF und die glomeruläre Filtrationsrate GFR repräsentiert. Zugleich wurde die Aktivität des NO- Systems indirekt durch Endprodukte des NO- Metabolismus (Nitrat und Nitrit) im Blut und Urin erfasst. Zudem sollen die Auswirkungen der BH₄- Applikation auf den second messenger cGMP im Blut und Urin, die Hormone des RAAS- Systems und das Erythropoietin untersucht werden.

II. Studiendesign und Methoden

II.1. Teilnahme-kriterien

II.1.1. Einschlusskriterien

Teilnahmebedingung für die Studie waren männliches Geschlecht, normale Nierenfunktion, d.h. Normwerte (0,5- 1,2 mg/dl) für Kreatinin. Die Probanden sollten keinerlei kardiale oder renale Vorerkrankungen haben und zwischen 18 und 40 Jahre alt sein, ihr Body Mass Index (BMI) sollte zwischen 20 und 24,9 kg/m² betragen.

Die Eignung der Probanden wurde gemäß den Teilnahme-kriterien anhand einer ausführlichen ambulanten körperlichen Eingangsuntersuchung, der Krankenakte, laborchemischen Befund, Echokardiogramm, EKG und dem subjektiven Befinden festgestellt.

Diejenigen Probanden, welche die Einschlusskriterien erfüllten, erhielten eine ausführliche Aufklärung über mögliche Risiken und wurden umfassend über die Durchführung der Untersuchungen informiert, bevor sie ihr schriftliches Einverständnis gaben. Für alle Studienteilnehmer wurde eine Studienversicherung abgeschlossen.

Zuvor hatte die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls- Universität das Studienprotokoll überprüft und ihre Zustimmung zur Durchführung der Studie gegeben.

II.1.2. Abbruchkriterien

Zu den Abbruchkriterien der Studie gehörten überschießender Blutdruckanstieg auf Werte über 200/100 mmHg, ein Blutdruckabfall auf <100/60 mmHg, ein Anstieg der Herzfrequenz auf >100/min, EKG- Veränderung, Schmerzen in der Brust, Luftnot, Übelkeit als auch sonstige Beschwerden.

II.1.3. Ausschlußkriterien

Ausschlußkriterien waren sekundäre oder maligne Hypertonieformen, Herz- und Kreislauf- Erkrankungen, zerebrovaskuläre und pulmonale Erkrankungen, manifester Diabetes mellitus, Nieren- und Leberschäden, Malabsorption, Herzrhythmusstörungen Adipositas, Durchblutungsstörungen, positive HIV oder Hepatitis B Serologie, medikamentöse Begleittherapien, Atopien, Allergien, angioneurotisches Ödem sowie C₁- Esterase- Inhibitormangel, weibliches Geschlecht, sowie die gleichzeitige Teilnahme an anderen klinischen Studien. Die Familienanamnese der Probanden musste bezüglich eines therapiebedürftigen arteriellen Hypertonus oder Diabetes mellitus blande sein. Während der gesamten Studiendauer durften die Probanden keine Begleitmedikation erhalten, die den Blutdruck oder die Nierenfunktion beeinflussen könnte.

II.2. Studiendesign

Die Studie bestand aus zwei Teilen. Im ersten Teil der Studie sollte den Studienteilnehmern neben den Stoffen PAH und Inulin auch BH₄ infundiert werden. Im zweiten Teil wurden 6 Studienteilnehmern, die bereits am ersten Teil teilgenommen hatten, statt des BH₄ Placebo infundiert (Kontrollserie).

II.2.1. Studienentwurf – Graphische Darstellung und Messpunkte

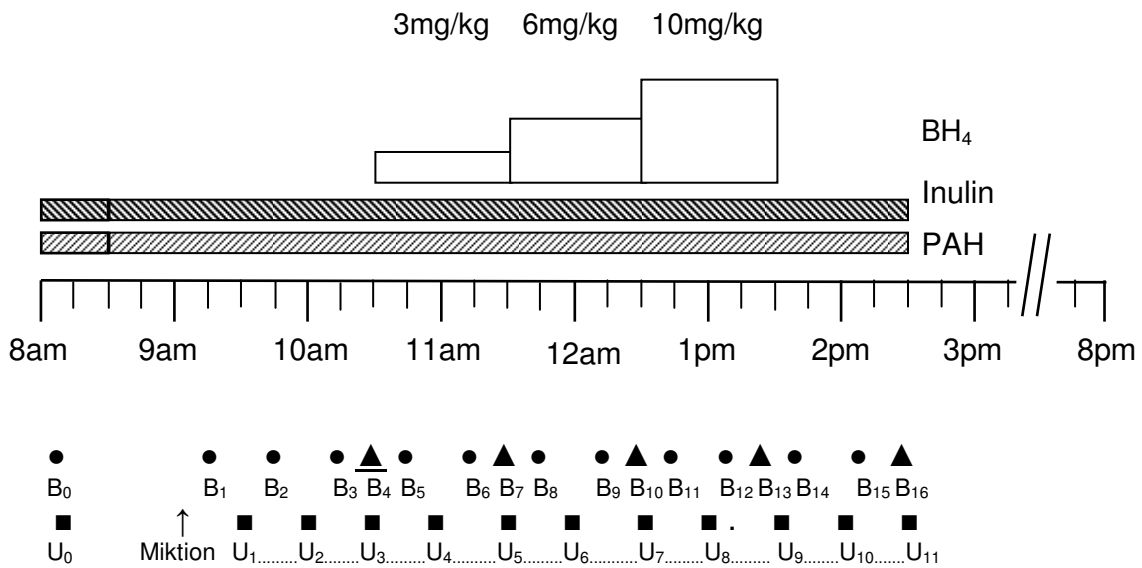


Abb. 5: Studienentwurf, B= Blutentnahme, U= Uringewinnung

●	B ₀ , B ₄ , B ₁₆	BB	(3 x 2 ml EDTA)	6 ml
●	B ₀ , B ₁ , B ₃ , B ₅ , B ₆ , B ₈	Inulin, PAH	(11 x 5 ml Serum)	55 ml
	B ₉ , B ₁₁ , B ₁₂ , B ₁₄ , B ₁₅	Na, K	(11 x 2 ml Li- Heparin)	22 ml
▲	B ₄ , B ₇ , B ₁₀ , B ₁₃ , B ₁₆	cGMP	(5 x 2 ml EDTA)	10 ml
		NO _x	(5 x 3 ml Citrat)	15 ml
▲	B ₄ , B ₁₃	EPO + Aldosteron	(2 x 7 ml Serum)	14 ml
		Renin + Ang II	(2 x 10 ml EDTA)	20 ml
▪	B ₀ , B ₄ , B ₁₆	BH ₄	(3 x 2 ml EDTA)	6 ml
				Summe: ca. 140ml
■	U ₀	PAH, Inulin		(1 x 10ml)
	U ₁₋₁₁	PAH, Inulin, Na, K		(5 x 10ml)
	U _{3,9}	cGMP, NO _x		(2 x 5ml)

II.2.2. Praktische Durchführung

Vor Beginn des Studientages mussten die Teilnehmer eine 12- stündige Nahrungskarenz einhalten. Alkohol und Nikotin waren 24h vor der Untersuchung nicht erlaubt. Am Morgen des Versuchstages durfte weder Kaffee noch Schwarztee oder andere koffeinhaltigen Getränke eingenommen werden. Zudem wurden die Teilnehmer dazu angehalten, körperliche Anstrengung vor Beginn des Experiments zu meiden und bei nicht völligem körperlichen Wohlbefinden den Studientag abzusagen.

Nach Eintreffen der Teilnehmer in der Klinik wurde von den Studienteilnehmern zum Zeitpunkt 0 eine Blutabnahme (B_0) sowie einen Urin (U_0) als Leerwert vor Beginn der Bolusinfusion abgegeben. Anschließend wurde in beide Unterarme je ein Venenverweilkatheter der Firma Braun gelegt. Über den intravenösen Zugang wurde dann mit der 30- minütigen Infusion der Boluslösung begonnen. In der 250ml Boluslösung waren 1,1g p-Aminohippursäure (= PAH, 0.6g/m², Clinalfa AG, Läuelfingen, Schweiz) und 7,5g Inulin (4.5g/m² body surface area, Inutest[®], Fresenius Kabi, Graz, Österreich) gelöst. Die Infusion der Boluslösung erfolgte bei einer Laufgeschwindigkeit von 500 ml/h mit dem Infusomat[®] der Firma Braun Melsungen AG.

Im Anschluss daran wurde die Erhaltungsinfusion appliziert, die bis zum Ende der sechsständigen Untersuchung infundiert wurde. Sie enthielt 12,5g Inulin und 2,2g PAH und wurde mit einer Laufgeschwindigkeit von 42ml/h infundiert (Gesamtvolumen 250ml). Dies diente dem Aufbau und Erhalt eines konstanten Plasmaspiegels, dem so genannten „steady- state“ während der gesamten Studiendauer bis einschließlich 14.30 Uhr mit Serum- Konzentration von 0.2- 0.4 mg/ml für Inulin und 0.7– 1.2mg/dl für PAH. Anhand der Clearance dieser beiden Stoffe konnten der renale Plasmafluß (RPF) und die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) bestimmt werden.

Eine Stunde nach Beginn der Untersuchung mussten die Studienteilnehmer ihre Blase vollständig entleeren. Dieser Urin wurde verworfen. Da nun ein Gleichgewicht vorausgesetzt wurde, konnte mit der Bestimmung der Clearance begonnen werden. Die erste Blutentnahme (B_1) erfolgte 75 Minuten nach dem Start der Bolusinfusion zur Leerwertbestimmung für PAH und Inulin. Eine Viertel Stunde später wurde den Probanden Urin abgenommen (U_1), aus welchem Inulin, PAH, Natrium und Kalium bestimmt wurde. Im 15- Minuten-Takt erfolgten nun abwechselnd Blutabnahmen und Urinabgaben für die Bestimmung der Inulin- und PAH- sowie der fraktionellen Na^+ - und K^+ - Clearance. 150 Minuten nach Studienbeginn wurde das erste Hormonprofil, bestehend aus Renin, Angiotensin, Erythropoietin, Aldosteron, cGMP und den Stickoxiden NO_2 und NO_3 (zusammengefasst als NO_x) abgenommen.

Daraufhin wurde mit der Infusion der Tetrahydrobiopterin- Lösung (19mg kg/KG in 50ml) begonnen, welche mittels Sterilfiltration hergestellt worden war. Die BH_4 - Lösung wurde in einer braunen lichtundurchlässigen Perfusorspritze aufgezogen und mittels eines Perfusors der Firma Braun über drei Stunden appliziert. Dabei wurde die Laufgeschwindigkeit stündlich von anfangs 7ml/h auf 15 ml/h und in der dritten Stunde auf 25 ml/h gesteigert.

Zu den Zeitpunkten der Dosiserhöhung wurde jeweils Blut gewonnen zur Messung von Serum- cGMP und NO_x (B_7 - B_{10}). Nach Abschluß der BH_4 - Infusion wurde Blut zur Bestimmung des zweiten Hormonprofils (B_{13}) abgenommen, welches exakt dem ersten Hormonprofil entsprach.

Die Probanden mussten während des 12- stündigen (bzw. im zweiten Versuchsteil sechsstündigen) Versuchs liegen und sollten die Urinproben durch spontane Miktion in Urinflaschen im Bett abgeben. Falls dies nicht möglich war durften die Probanden aufstehen. Die Urinabgabe erfolgte zu festgesetzten Zeitpunkten, wobei die Probanden auf eine jeweils vollständige Entleerung der Blase zu achten hatten. Die einzelnen Volumina wurden mit Messzylindern abgemessen und notiert.

Während des Versuchs wurden die Studienteilnehmer dazu angehalten, mindestens 0.5-0.7l natriumarmes Mineralwasser (Natriumkonzentration ca. 3 mM) pro Stunde zu trinken, um eine ausreichende Diurese zu gewährleisten. Alle Blutabnahmen wurden mit Monovetten der Firma Sarstedt durchgeführt. Nach jeder Blutentnahme wurde ein Mandrin (Vasofix[®] - Vasocan[®] Braunüle der Firma Braun) in die Venenverweilkanüle geschoben, um die Offenheit zu gewährleisten.

Das Blut für die PAH und Inulin- Bestimmung wurde in 5ml Serum- Röhrchen, die Hormone Erythropoietin und Aldosteron in 7ml Serum- Monovetten, das cGMP in 3ml EDTA- Monovetten und das NO_x in 3ml Citrat- Monovetten abgenommen. Alle Proben wurden auf Eis gestellt und spätestens zwei Stunden nach ihrer Abnahme 10 Minuten lang bei ca. 4000g in einer Zentrifuge der Firma Heraeus Megafuge 1.0 R zentrifugiert.

Anschließend wurde das Serum abpipettiert und ebenso wie die Urine in Eppendorf- Cups bei -20°C bis zu ihrer Aufarbeitung und Bestimmung aufbewahrt.

Die 10ml EDTA- Monovetten für Renin und Angiotensin- II enthielten zusätzlich 50µl Phenantrolin (mit Konzentration 0,25g/l; 2,5mg in 10ml Methanol) und 100µl Trasylol (Konzentration von 1,4g/l Aprotinin in H₂O ≈ 500.000 KIE Aprotinin in 50ml H₂O). Die Proben zur Bestimmung der Enzyme Renin-, Angiotensin- II, Erythropoietin und Aldosteron wurden sofort nach Gewinnung auf Eis gestellt und innerhalb von 15 Minuten in der auf 4°C gekühlten Zentrifuge der Firma Heraeus Megafuge 1.0 R zentrifugiert. Das Serum wurde anschließend abpipettiert und bis zur Aufarbeitung bei -20°C eingefroren.

II.2.3. Zusammensetzung der einzelnen Infusionen

Bolusinfusion

18ml Inulinlösung/m² KO, Inutest[®] 25%- Ampullen (Wirkstoff: Sinistrin der Firma Fresenius Kabi) sowie 3ml 20% PAH- Lösung/m² Körperoberfläche PAH (1,1g in 5,1ml H₂O bidest.) der Firma Clinalfa AG wurden in 250ml 5% Glucose-Lösung (Glucosteril[®] 5% der Firma Fresenius Kabi) gelöst und mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 500ml/h innerhalb 30 Minuten infundiert.

Erhaltungsinfusion

25ml Inulinlösung/m² KO, Inutest[®] 25%- Ampullen sowie 8ml 20% PAH- Lösung/m² Körperoberfläche PAH (1,1g in 5,1 ml H₂O bidest.) wurden in 250ml 5% Glucose- Lösung (Glucosteril[®] 5%) gelöst und mit einer Infusionsgeschwindigkeit von 42ml/h innerhalb 6 Stunden infundiert.

Tetrahydrobiopterin- Lösung

BH₄ wird in Ampullen der Firma Dr. Schircks Laboratories, Jona in der Schweiz vertrieben. Da BH₄ als Pulver geliefert wurde, musste die intravenöse Lösung eigens hergestellt und mittels Sterilfiltration steril aufbereitet werden.

Durchführung der Sterilfiltration:

Wir haben eine Lösung mit 19mg/kg KG Tetrahydrobiopterin hergestellt, da Konzentrationen bis zu 19mg/kg KG in vorangegangenen Studien als sicher beschrieben wurde (Kauffmann et al., 1978 und Schaub et al., 1978).

Das BH₄-Pulver wurde im Becherglas abgewogen und mit ca. 45 ml Ampuwa[®] unter Verwendung eines Magnetrührers in Lösung gebracht. Dabei war eine zügige Arbeitsweise aufgrund der Luftempfindlichkeit des BH₄ einzuhalten. Da die gewonnene BH₄- Lösung annähernd einen pH von 0 hat, musste eine pH-Wert- Korrektur mit 8,4% Bikarbonat (= NaHCO₃, ca. 5ml) auf pH4 vorgenommen werden (Walter et al., 2001; Ueda et al., 2000), um die Lösung später intravenös applizieren zu können. Die pH- Messung wurde mittels Indikatorpapier oder pH- Meter durchgeführt. Das Gesamtvolumen der Lösung betrug 50ml. Anschließend wurde die BH₄- Lösung in eine 50ml Perfusor-

Spritze aufgezogen und unter einer sterilen Werkbank in eine 100ml Flasche nach Filtration durch einen 0,22µm Sterilfilter transferiert und nach Transport in die Klinik eingefroren.

Die Anfangs klare Lösung wurde nach dem Transport in das nephrologische Labor leicht gelb, was auf eine Autooxidation zu Biopterin zurückzuführen war. Eigene Messungen in der Universitätsapotheke mittels High Performance Liquid Chromatography (HPLC) erbrachten eine Wiederfindungsrate von mindestens >84% der gelösten BH₄- Menge. Die Stabilität des BH₄ wurde in der Studie von Walter et al., (1997) ebenfalls mittels HPLC- Methode geprüft. Dabei wurden nach 30-minütigem Rühren unter Raumluft mehr als 95% des BH₄ als unoxidiert detektiert.

II. 3. Methoden

II.3.1. Untersuchungsmethoden

Bestimmung des Blutdrucks

Der Blutdruck wurde mittels einer automatischen Druckmanschette durch das Messgerät Surveyor der Firma Mortara regelmäßig alle 15 min bestimmt. Die Messungen erfolgten bei jedem Studienteilnehmer unter standardisierten Bedingungen:

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

Bestimmung der Herzfrequenz (HF)

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

II.3.2. PAH- und Inulinclearance

Die renale Hämodynamik wurde durch kontinuierliche Messung der PAH- und Inulinclearance über sechseinhalb Stunden bestimmt. Die Substanzmengen, die den einzelnen Probanden verabreicht wurden, ergaben sich nach Berechnung der individuellen Körperoberfläche der Probanden.

Probenaufarbeitung

Die Urin- und Serum Proben wurden nach der Methode von Smith et al. (1938) auf ihre PAH- Konzentrationen und Roe et al. (1949) auf ihre Inulin-Konzentrationen untersucht. Daraus ließen sich die entsprechende Clearance- und hämodynamischen Parameter berechnen (siehe Kapitel II.3.4). Vor der eigentlichen PAH und Inulin- Bestimmung mussten die im Wasserbad (nicht über 37 °C) oder im Kühlschrank aufgetauten Serum- bzw. Urinproben zunächst enteiweißt werden. Dazu wurden 0,5ml Plasma/ Urin mit 0,5ml 10% ZnSO₄, 0,5ml 0,5N NaOH und 1ml destilliertem Wasser gemischt. Nach jeder Zugabe wurde die Lösung gut geschüttelt. Anschließend wurden die Proben bei Raumtemperatur 10 Minuten stehen gelassen und dann 10 Minuten lang bei 2500g zentrifugiert. Der Überstand wurde in die Messung eingesetzt.

Herstellung der Reagenzien:

- 10% ZNSO₄: 20g ZNSO₄ gelöst in 200 ml destilliertes Wasser
- Resorcin: 0,1g Resorcin und 0,25g Thioharnstoff werden in 100ml 96% Essigsäure gelöst (dunkle Flasche)
- 0,5% Amidosulfonsäure (AS): 0,5g AS in 100ml destilliertem Wasser.
- 0,1 N N-Ethyl- α -Naphtylaminhydrobromid: 0,1g gelöst in 10ml warmen Methanol und ad 100ml Aqua dest. aufgefüllt.
- NaNO₂: 0,1g werden in 100ml destilliertem Wasser gelöst.

Messung der PAH- Konzentration

Reagenzien:

- 1) 10 % ige ZnSO_4
- 2) 0,5 N NaOH
- 3) 0,1 N HCl
- 4) 0,1% ige NaNO_2
- 5) 0,5 % ige wässrige Lösung der Aminosulfonsäure
- 6) 0,1N wässrige Lösung der N-Ethyl- α - naphthylaminhydrobromid
- 7) PAH- Standardlösung

Testdurchführung:

- 1) Herstellung einer Standardreihe, die unter Berücksichtigung der Probenverdünnung folgenden Konzentrationen entspricht:
6mg/dl- 2,5mg/dl- 1,25mg/dl- 0,625mg/dl- 0,3mg/dl- 0,15mg/dl
- 2) Verdünnung der enteiweißten Urine mit destillierten Wasser auf 1:100
- 3) 0,5ml enteiweißtes Serum/ Urin mit 0,1ml 0,1N HCl mischen und schütteln
- 4) 50 μ l NaNO_2 - Lösung zufügen, Reagenzglas schütteln und bei Raumtemperatur 5 min stehen lassen.
- 5) 50 μ l Amidosulfonsäure- Lsg. zufügen, schütteln, bei RT 5 min ruhen lassen.
- 6) 50 μ l N-Ethyl- α -naphthylaminhydrobromid Lösung zufügen, schütteln und bei RT 40 Minuten stehen lassen.
- 7) Photometrische Messung bei 528nm gegen destilliertes Wasser als Leerwert.

Aus den gemessenen Extinktionen ließen sich die Konzentrationen anhand der Ergebnisse der Standardreihen ermitteln. Die erhaltenen Konzentrationen (mg/dl) wurden mit dem Verdünnungsfaktor 100 multipliziert.

Messung der Inulin- Konzentration

Reagenzien:

- 1) Resorcin– Reagenz (0,1g Resorcin + 0,25g Thioharnstoff in 100 ml 96% iger Essigsäure lösen. (Cave: Ansatz muss in dunklen Flaschen erfolgen.)
- 2) 30%ige HCl
- 3) Inulin- Standardlösung

Testdurchführung:

- 1) Herstellung einer Standardreihe, die unter Berücksichtigung der Probenverdünnung folgenden Konzentrationen entspricht:
6mg/ml- 2,5mg/ml- 1,25mg/ml- 0,625 mg/ml- 0,3 mg/ml- 0,15 mg/ml
- 2) Verdünnung der enteiweißten Urine mit H₂O auf 1: 10
- 3) 0,25ml enteiweißtes Serum/ verdünnter enteiweißter Urin mit 125µl Resorcin, mischen und schütteln
- 4) 1ml 30% Hydrochlorid (HCl) zugeben und wiederum schütteln
- 5) 5-7min ins Wasserbad bei 80°C stellen und anschließend sofort im Eiswasser abkühlen lassen.
- 6) Photometrische Messung bei 546nm gegen destilliertes Wasser als Leerwert.

Aus den gemessenen Extinktionen ließen sich die Konzentrationen anhand der Ergebnisse der Standardreihen ermitteln. Die erhaltenen Konzentrationen (mg/ml) wurden mit dem Verdünnungsfaktor 10 multipliziert.

II.3.3. Übrige Laborparameter

Folgende Laborparameter wurden bei den beobachteten Patienten durch das Zentrallabor des Klinikums der Universität Tübingen mit Geräten der Firma Bayer (Leverkusen, Deutschland) bestimmt.

a) Hämatologie

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

b) Elektrolyte

Natrium, Kalium (ionenselektive Elektroden).

c) NOx und cGMP

Das Gesamt Stickstoff- Monoxid wurde kolorimetrisch mit einem Kit der Firma Immundiagnostik, Benzheim, Deutschland gemessen.

Die Messung von NO im Blut ist technisch sehr aufwändig und hat keine wesentlichen Vorteile gegenüber der Messung seiner stabilen Abbauprodukte. Die Menge an in-vivo produziertem NO wurde in der vorliegenden Studie folglich indirekt durch seine Abbauprodukte (Nitrat, Nitrit) gemessen. Auch im Urin sind die Abbauprodukte ein verlässliches Maß für das in-vivo produzierte Stickstoffmonoxid (Qiu et al., 1995; Shultz und Rajj, 1992).

Das cGMP wurde mit einem RIA- Kit der Firma IBL Hamburg gemessen.

d) Erythropoietin, Hormone des RAAS

Das Erythropoietin wurde mittels ELISA der Firma Medac, Hamburg gemessen.

Das Aldosteron wurde mit einem Kit der Firma DSL- Sinsheim, RIA gemessen.

Das Renin wurde mit einem Kit der Firma MAIA Biochem Immunosystem Freiburg, RIA gemessen. Das Angiotensin- II wurde mit einem Kit der Firma IBL GmbH Hamburg, RIA gemessen.

II.3.4. Berechnete Größen

Clearance

Für sämtliche Clearance- Berechnungen gilt die Grundformel (links). Dieser Wert wurde auf die Standardkörperoberfläche (KOF_{indiv}) von $1,73 \text{ m}^2$ bezogen (rechts).

$$Cl = \frac{U \cdot V}{P} \text{ in } \frac{\text{ml}}{\text{min}} \qquad Cl_{1,73\text{m}^2} = \frac{Cl \cdot 1,73}{KOF_{\text{indiv}}}$$

Legende:

- Cl = Clearancewert für die Substanz (ml/min)
- P = Plasmakonzentration der Substanz
- U = Urinkonzentration der Substanz
- V = Urinzeitvolumen (ml/min)
- KOF_{indiv} = individuelle Körperoberfläche (m^2), die über Körpergewicht und- Größe aus einem Normogramm ermittelt wurde

Die den Berechnungen der GFR und des ERPF zugrunde liegenden Plasma- und Urinkonzentration sowie die Urinvolumina von PAH und Inulin wurden aus den Mittelwerten 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 270, 300, 330, 360, 390 Minuten nach Beginn der Untersuchung gemessenen und die Konzentrationen ermittelt. Der Clearancewert von Inulin Cl_{Inulin} ist ein Maß für die glomeruläre Filtrationsrate GFR und derjenige für PAH (= Para- Amino- Hippursäure), Cl_{PAH} ein Maß für den effektiven realen Plasmafluß ERPF.

$$\text{GFR} \left(\frac{\text{ml} \cdot 1,73\text{m}^2}{\text{min}} \right) = \frac{U \cdot V \cdot 1,73}{P_{\text{Inulin}} \cdot KOF_{\text{indiv}}} \qquad \text{ERPF} \left(\frac{\text{ml} \cdot 1,73\text{m}^2}{\text{min}} \right) = \frac{U_{\text{PAH}} \cdot V \cdot 1,73}{P_{\text{PAH}} \cdot KOF_{\text{indiv}}}$$

Filtrationsfraktion (FF)

Die Filtrationsfraktion ist der prozentuale Anteil des renalen Plasmaflusses, der im Glomerulum filtriert wird. Sie wird aus der GFR und dem ERPF bestimmt.

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

Renovaskulärer Widerstand (RVR)

Über die Gomez- Formel wird der renovaskuläre Widerstand RVR ermittelt

$$RVR = \left(\frac{MAP}{RBF} \right) \cdot 80000 \left[\text{dynes} \cdot \text{sec} \cdot \text{cm}^{-5} \right]$$

Fraktionierte Natrium- bzw. Kaliumclearance (FE_{Na} bzw. FE_K)

Die fraktionierte Clearance einer bestimmten Substanz ist der Anteil der ausgeschiedenen Substanz in Relation zu der glomerulär filtrierten Menge.

$$FE = \frac{U_{\text{Natrium bzw. Kalium}}}{P_{\text{Natrium bzw. Kalium}}} \cdot \frac{P_{\text{Inulin}}}{U_{\text{Inulin}}} \cdot 100$$

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP)

Der MAP berechnet sich aus Mittelwerten des systolischen und diastolischen Blutdrucks (P_s , P_d), die zu Beginn einer jeden Untersuchung gemessen wurden:

$$MAP = \left(\frac{2P_d + P_s}{3} \right) \quad \text{bzw.} \quad MAP = P_d + \left(\frac{P_s - P_d}{3} \right)$$

II.4. Statistische Methoden

In der Verumgruppe wurden $n=12$ unter Administration von BH_4 und in der Kontrollgruppe $n=6$ Probanden unter Administration von Placebo untersucht. Die Studie wurde bei beiden Versuchsgruppen offen und unverblindet durchgeführt. Die gesamte Studie wurde in stündliche Messintervalle unterteilt. 9.30-10.30 (Ausgangswert 0), 10.30- 11.30 (BH_4 Stufe 1), 11.30- 12.30 (BH_4 Stufe 2), 12.30- 13.30 (BH_4 Stufe 3) und 13.30- 14.30 (Erholung).

Die Werte für RR, HF, GFR und RPF wurden für diesen Zeitraum mehrfach bestimmt ($n=3-4$) und arithmetisch gemittelt. Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm Prism Version 4.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego California, USA (www.graphpad.com) durchgeführt.

Im Einzelnen wurden alle Messdaten 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 $p\text{-Wert} < 0,05$ keine Anpassung. In Abhängigkeit davon wurden parametrische für normalverteilte Variablen bzw. nicht-parametrische Tests für nicht-normalverteilte Variablen angewandt. Um Unterschiede in den einzelnen Messintervallen zu untersuchen, wurden die einzelnen Ergebnisse der Verumgruppe mittels einfacher Varianzanalyse für wiederholte (gepaarte) Messungen (ANOVA with repeated measures) auf statistische Signifikanz geprüft, dabei wurde ein $p\text{-Wert} < 0,05$ als statistisch signifikant gewertet. Bei signifikantem Ergebnis wurde ein Post- Test nach Tukey durchgeführt, um Unterschiede zwischen den einzelnen Messintervallen aufzuspüren. Daneben wurde eine Varianzanalyse der 6 Probanden durchgeführt, die sowohl Verum als auch Placebo erhalten hatten, um einen intraindividuellen Vergleich zu erhalten. Bei signifikantem Ergebnis wurde auch hier der Post-Test nach Tukey durchgeführt.

Zur Auswertung der Hormonwerte (EPO, Renin, Aldosteron, Urin- cGMP, Urin- NO_x , BNP) wurden gepaarte zweiseitige t- Tests verwendet. Bei der Messung von NO_x und cGMP waren die Ausgangswerte der Placebogruppe signifikant höher als bei der Verumgruppe, sodass für die vergleichende Auswertung die relevante Änderung in Prozent zum Ausgangswert verwendet wurde.

III. Ergebnisse

III.1. Ergebnisdarstellung

Die graphische Darstellung der systemischen Hämodynamik zeigt den zeitlichen Verlauf von Blutdruck, MAP und Herzfrequenz vor, während und nach der Tetrahydrobiopterin bzw. Placebo- Gabe. Den Abbildungen wurden die sechs Mittelwerte aus jeweils 4 Einzelmessungen der viertelstündlichen Messintervalle vor, während und nach der BH₄- bzw. Placebo- Applikation zu Grunde gelegt.

In den Diagrammen der renalen Hämodynamik und der fraktionellen Natriumclearance werden die fünf Mittelwerte der gepoolten halbstündlichen Messungen vor, während und nach der Verum bzw. Placebo- Gabe abgebildet. In den Diagrammen der renalen Hämodynamik entfällt das Intervall 6 (14:30–15:30), da die Inulin/ PAH- Clearance zum Zeitpunkt 6 beendet wurde.

Die Abbildungen zur Darstellung der Hormonplasmaspiegel zeigen jeweils zwei Mittelwerte aus einer Messung direkt zu Anfang und Ende der BH₄- bzw. Placebo- Applikation. Die Abbildungen zur Darstellung der Plasma cGMP- Spiegel zeigen jeweils fünf Mittelwerte die direkt vor Beginn, während und nach Ende der BH₄- bzw. Placebo- Applikation. Die Abbildungen zur Darstellung der Urin- cGMP Spiegel stellt jeweils zwei Werte direkt vor Beginn und nach Ende der BH₄- bzw. Placebo- Applikation dar. In den Diagrammen zur Darstellung der einzelnen Messwerte sind auf der Abszisse die Messintervalle aufgetragen und auf der Ordinate die Einheit der jeweilig gemessenen Substanz.

Alle im Text erwähnten Vergleichswerte beziehen sich auf Intervall 4, da zu diesem Zeitpunkt die Applikation des Tetrahydrobiopterins bzw. des Placebos beendet war und ein maximaler Effekt zu erwarten gewesen wäre.

III.2. Systemische Hämodynamik

III.2.1. Blutdruck

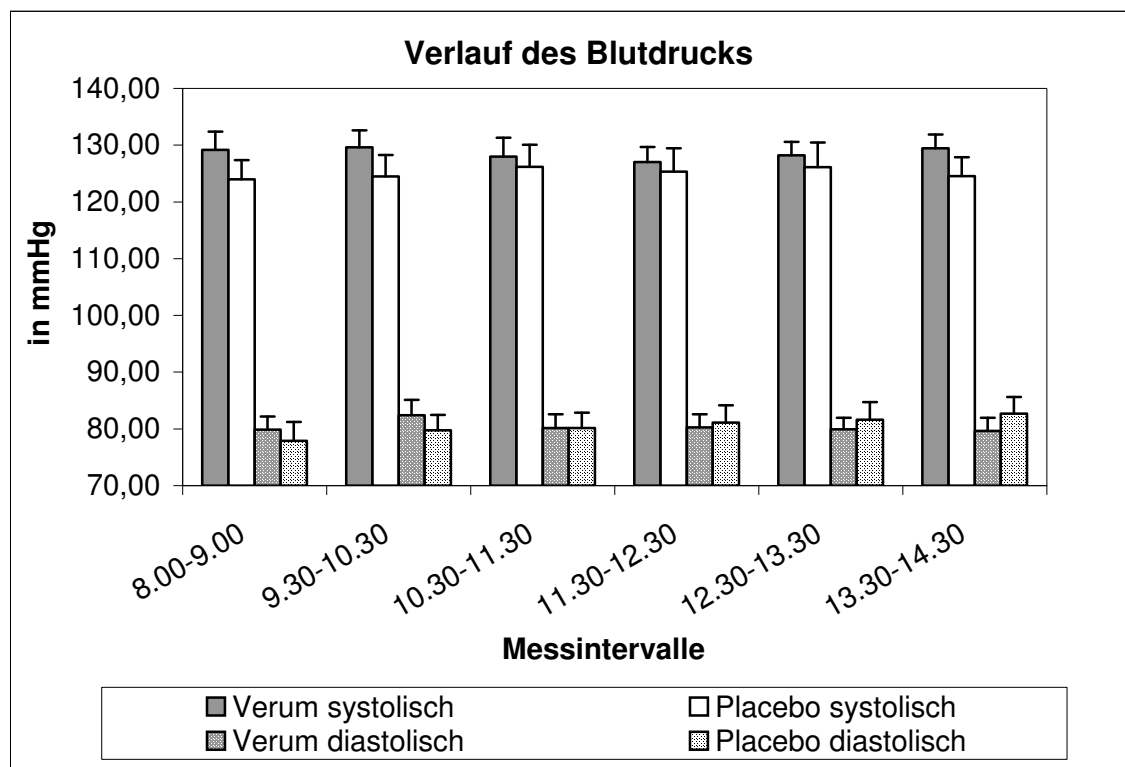


Abb. 6: Verlauf des Blutdrucks

Der systolische Blutdruck der Verumgruppe betrug anfangs 129 ± 3 mmHg, gegen Ende der Applikation 128 ± 2 mmHg (Messintervall 12.30-13.30). In der Placebogruppe betrug er anfangs 124 ± 3 mmHg und 126 ± 4 mmHg zu Ende der Applikation. Die systolischen Werte sind in der Verumgruppe mit einem p-Wert von 0,3858 statistisch nicht signifikant unterschiedlich. Der diastolische Blutdruck der Verumgruppe betrug anfangs 80 ± 2 und 80 ± 2 mmHg zu Ende der BH_4 -Applikation ($p > 0.05$). In der Placebogruppe betrug er von anfangs 78 ± 3 mmHg und 82 ± 3 mmHg zu Ende der Applikation ($p > 0.05$, vgl.: Abb. 7 und Tabelle 1: Blutdruck systolisch und diastolisch in Kapitel III.9.1.).

Bei allen Testpersonen zeigten die Mittelwerte der Ruhemessungen der Parameter für die systemische Hämodynamik keine statistisch signifikanten Unterschiede. Damit konnte eine neutrale Wirkung der BH_4 -Infusion auf den Blutdruck gezeigt werden.

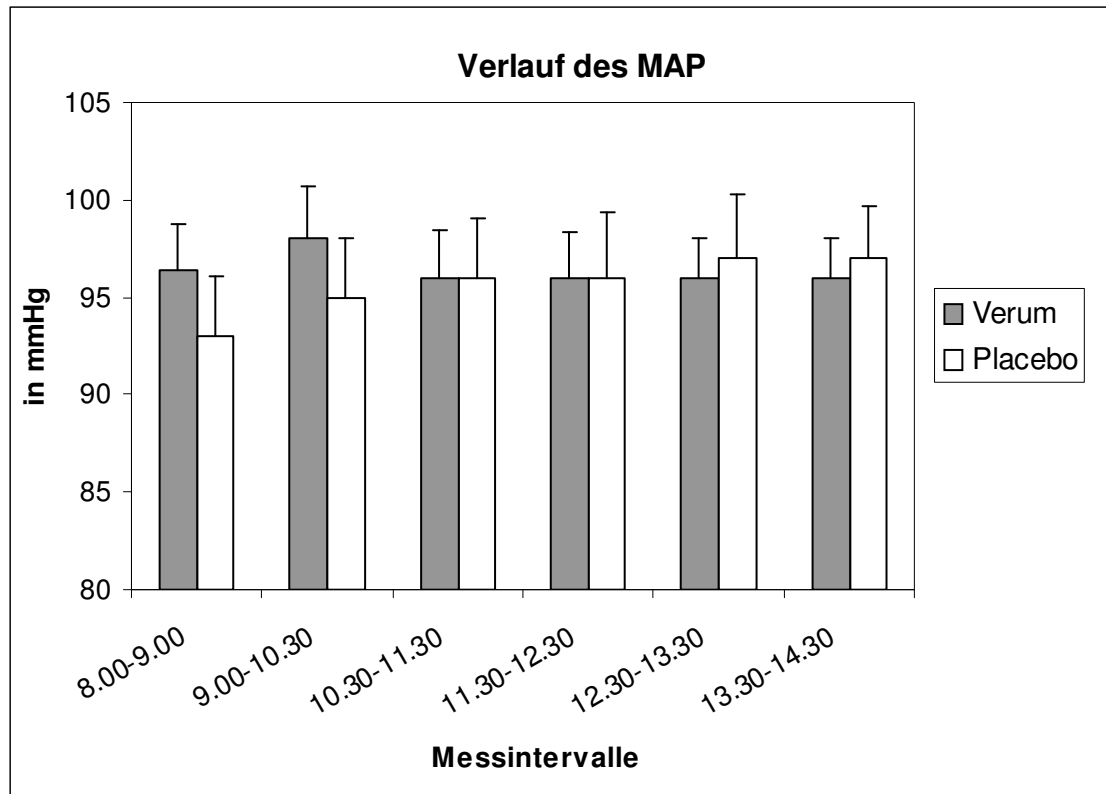
III.2.2. Mittlerer arterieller Druck (MAP)

Abb. 7: Mittlerer arterieller Blutdruck

Unter Applikation von BH₄ betrug der MAP zu Anfang 96±2 und zu Ende der Applikation 96±2 mmHg. In der Placebogruppe betrug der MAP anfangs 93±3 und gegen Ende 97±3 mmHg ohne signifikanten Unterschied. Da die Blutdruckwerte bei beiden Gruppen sich nicht statistisch signifikant voneinander unterscheiden, ist der MAP statistisch ebenfalls nicht signifikant verschieden (vgl.: Abb. 7).

III.2.3. Herzfrequenz

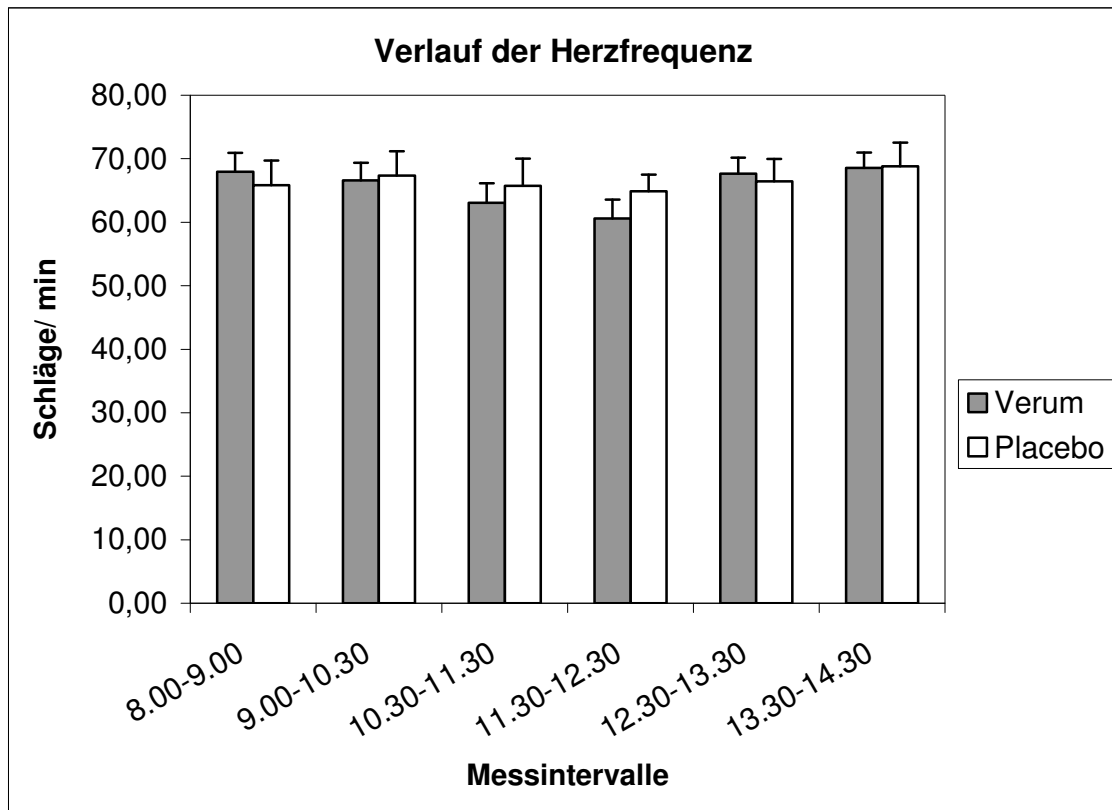


Abb. 8: Herzfrequenz

Die Herzfrequenz blieb unter Tetrahydrobiopterin- Infusion in der Verum Gruppe konstant: 68 ± 3 Schläge pro Minute zu Beginn wie zu Ende. Unter Placebo-Infusion blieb die Herzfrequenz konstant.

Die Herzfrequenz war innerhalb der Verumgruppe mit $n=12$ Probanden in der ANOVA- Analyse mit $p < 0,0001$ statistisch signifikant unterschiedlich, was am geringen Abfall auf 61 ± 10 Schläge/min zum Messintervall 11.30-12.30 lag. Allerdings war dieser Unterschied in der gepaarten Varianzanalyse zwischen der Verum und Placebogruppe (mit je 6 Probanden) mit einem p-Wert von 0,2244 nicht signifikant (vgl. Abb. 8, Tabellen 2, 3: Herzfrequenz der Verumgruppe und Herzfrequenz der Verum- und der Placebogruppe in Kapitel III.9.1).

III.3. Renale Hämodynamik

III.3.1. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

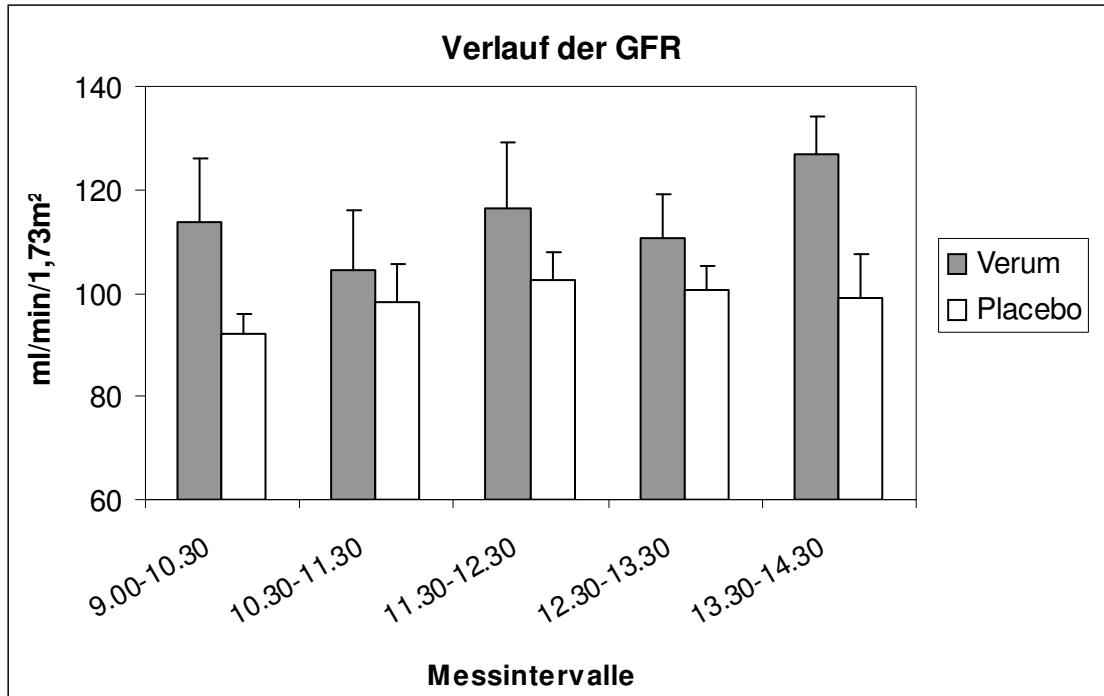


Abb. 9a: Glomeruläre Filtrationsrate

Im Folgenden sind die GFR- Daten als Prozent des Ausgangswerts dargestellt.

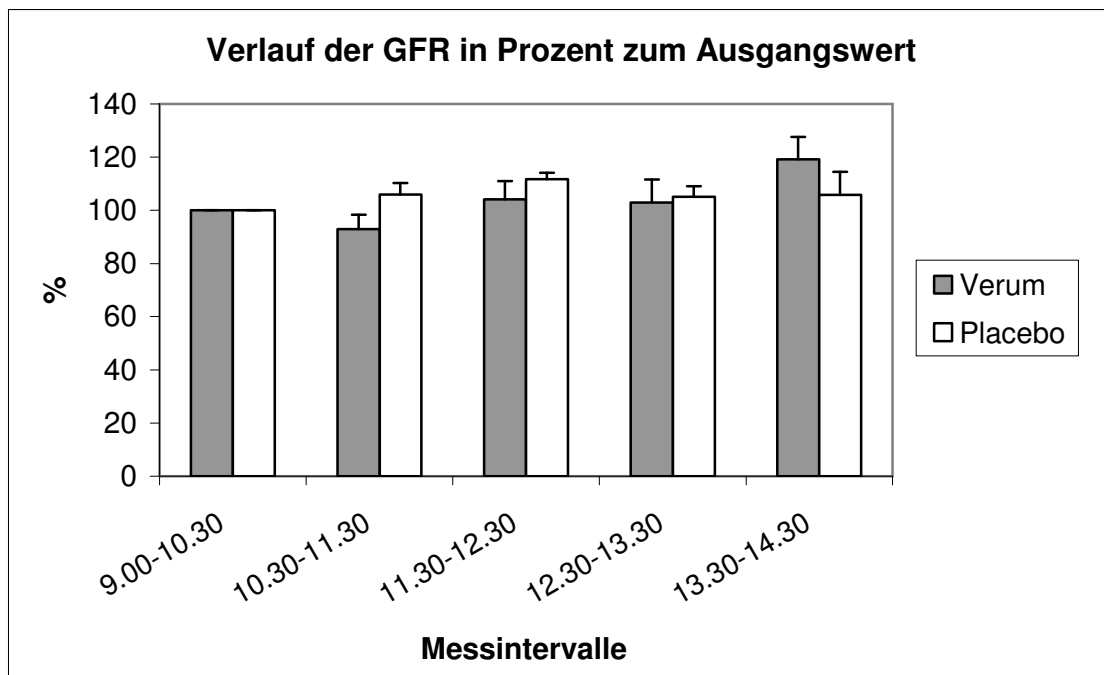


Abb. 9b: GFR in Prozent des Ausgangswertes

Die mittels der Inulin- Clearance ermittelte GFR veränderte sich weder unter BH_4 - noch unter Placebo- Applikation. Sie betrug unter BH_4 - Infusion 113 ± 12 bzw. 111 ± 9 ml/min/ $1,73m^2$ (Messintervall 1 bzw. 4). Unter Placebo- Infusion betrug sie 92 ± 4 bzw. 100 ± 4 ml/min/ $1,73m^2$ (Messintervall 1 bzw. 4). Die Veränderungen der GFR waren innerhalb der Verumgruppe mit einem p-Wert von 0,1705 statistisch nicht signifikant unterschiedlich (vgl.: Abb. 9a, b und Tabelle 4: RBF, GFR in Kapitel III.9.2.).

III.3.2. Renaler Plasmafluß (RPF)

Der RPF sank unter BH_4 - Infusion von anfangs 570 ± 47 auf 516 ± 57 ml/min/ $1,73m^2$ zu Ende der BH_4 - Applikation ($p > 0.05$), während er unter Placebo- Infusion von 485 ± 52 auf 387 ± 37 ml/min/ $1,73m^2$ fiel ($p > 0.05$; vgl.: Abb. 10a, b; Tabelle 4: RPF, GFR in Kapitel VI.2.). Vergleicht man den Verlauf des RPF in Prozent zum Ausgangswert so fiel er bei der Verumgruppe von anfangs 100 auf 91,4% und bei Placebogruppe von 100 auf 92,4% ab.

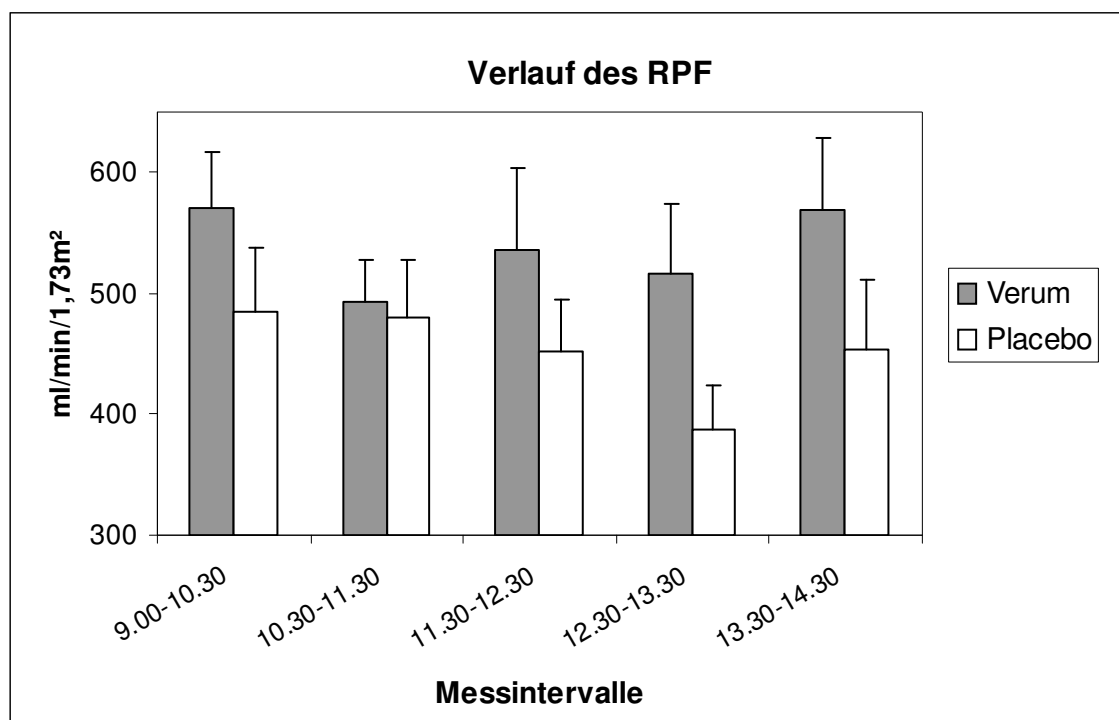


Abb. 10a: Renaler Plasmafluß

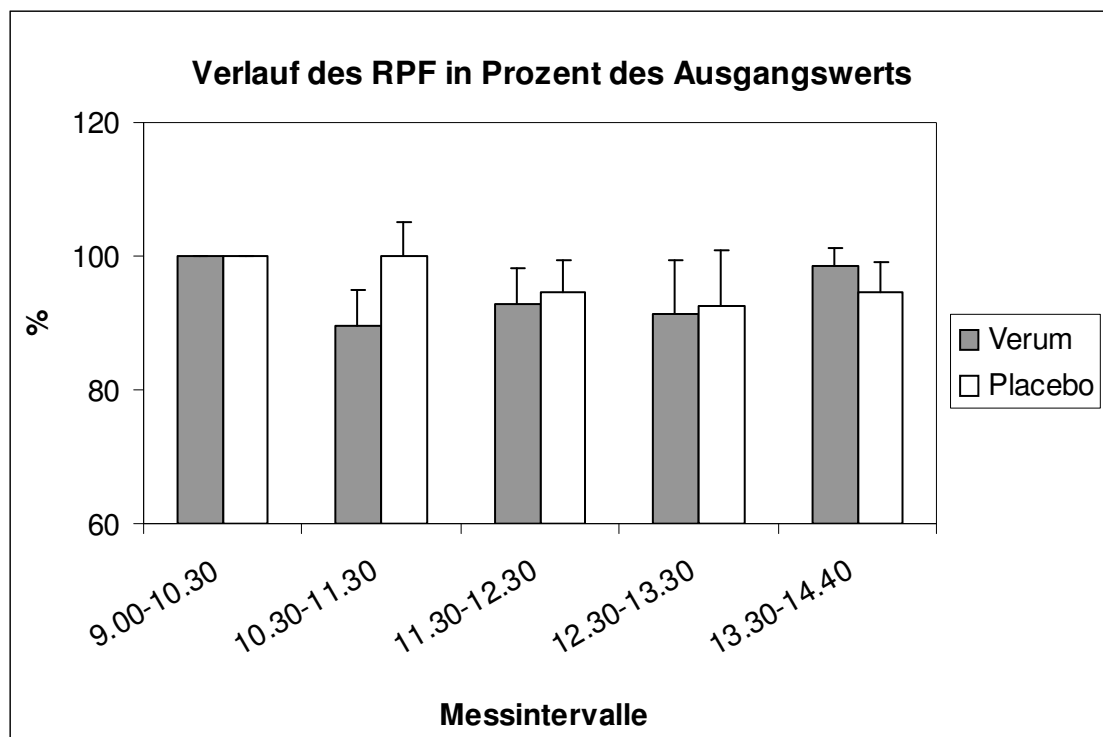


Abb. 10b: RPF in Prozent des Ausgangswertes

III.3.3. Filtrationsfraktion (FF)/ Renovaskulärer Widerstand (RVR)

Da sich die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und der effektive renaler Plasmafluß (ERPF) nicht jeweils statistisch signifikant von ihren Ausgangswerten unterscheiden, ist die Filtrationsfraktion zu den Messintervallen ebenfalls nicht statistisch signifikant verschieden. Da der RVR wesentlich vom MAP und RPF abhängig ist, ist dieser ebenfalls nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Die Filtrationsfraktion (FF) betrug im Messintervall 4 bei der Verumgruppe $25 \pm 2\%$ im Vergleich zu $22 \pm 2\%$ (Messintervall 1); bei der Placebogruppe $30 \pm 2\%$ bzw. $22 \pm 2\%$ (Messintervall 1 bzw. 4; vgl.: Abb. 11).

Der renovaskuläre Widerstand (RVR) stieg um 16,7% von 858 ± 63 auf 1001 ± 105 dynes \cdot sec \cdot cm⁻⁵ bei der BH₄- Gruppe und von 983 ± 118 auf 1252 ± 156 dynes \cdot sec \cdot cm⁻⁵ bei der Placebogruppe (vgl.: Abb. 12).

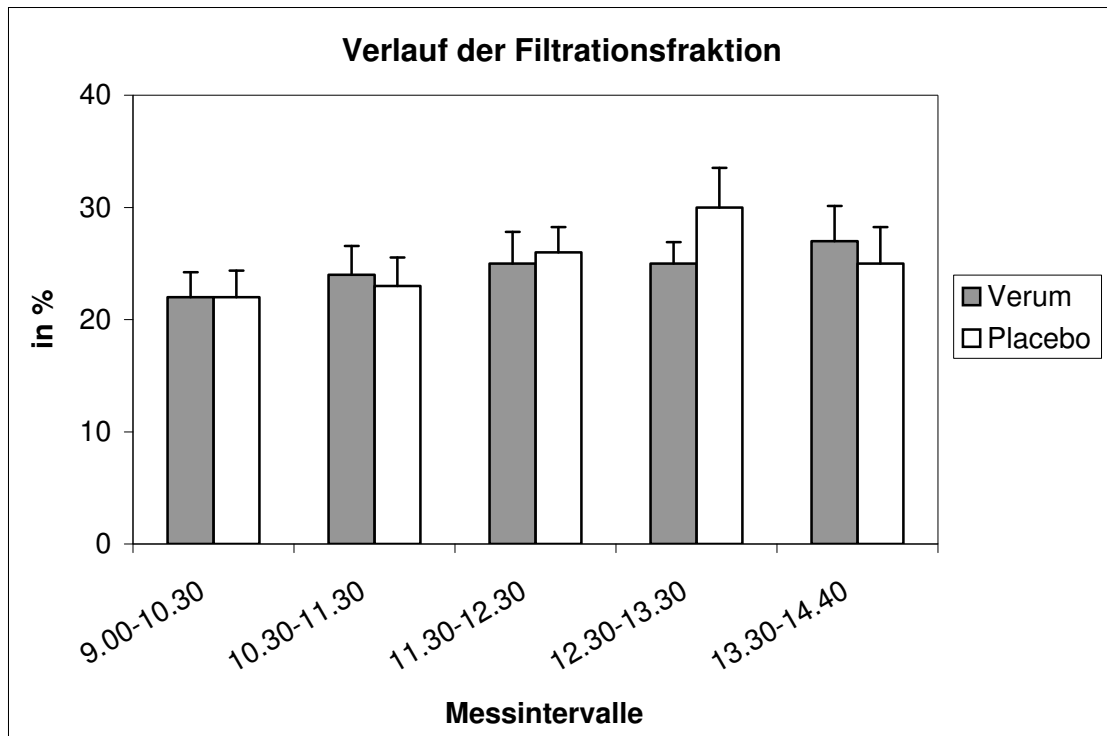


Abb. 11: Filtrationsfraktion

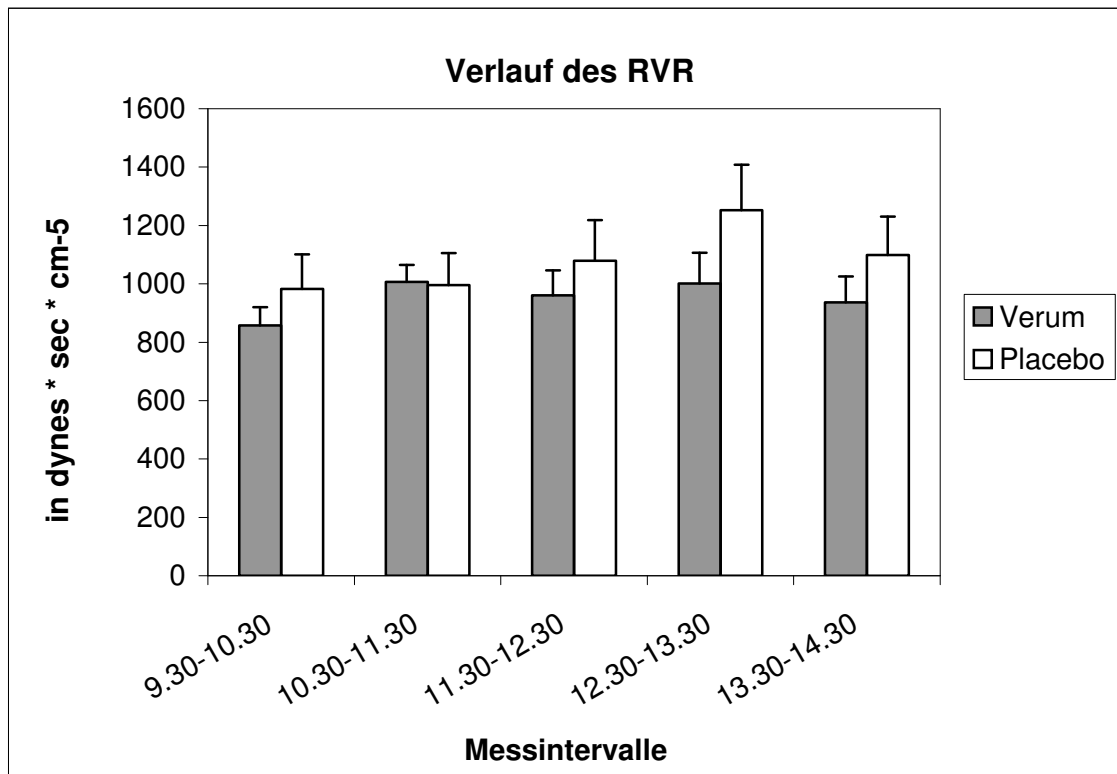


Abb. 12: Renovasulärer Widerstand

III.4. Abbauprodukte des Stickstoffmonoxids: NO_x

III.4.1. NO_x im Serum

Die Abbauprodukte des NO im Serum stiegen bei der Verumgruppe unter BH₄-Infusion im Messintervall 4 von $49,71 \pm 1,44$ auf $63,75 \pm 2,31$ μM . Mit einem p-Wert von 0,058 waren die Absolutwerte der Verumgruppe mit n=12 Probanden gerade nicht signifikant unterschiedlich. Bei Analyse der Daten in Prozent des Ausgangswertes zeigte sich jedoch eine signifikante Steigerung der NO_x-Spiegel in der Verumgruppe um $34 \pm 4\%$ (Abb. 13, $p < 0,05$). Unter Placebo-Infusion blieben die NO_x-Spiegel konstant ($93,53 \pm 6,36$ vs. $97,18 \pm 9,57$ μM).

Da die Werte der Placebogruppe signifikant höher als die der Verumgruppe sind, werden sie ebenfalls in Prozent des Ausgangswertes dargestellt.

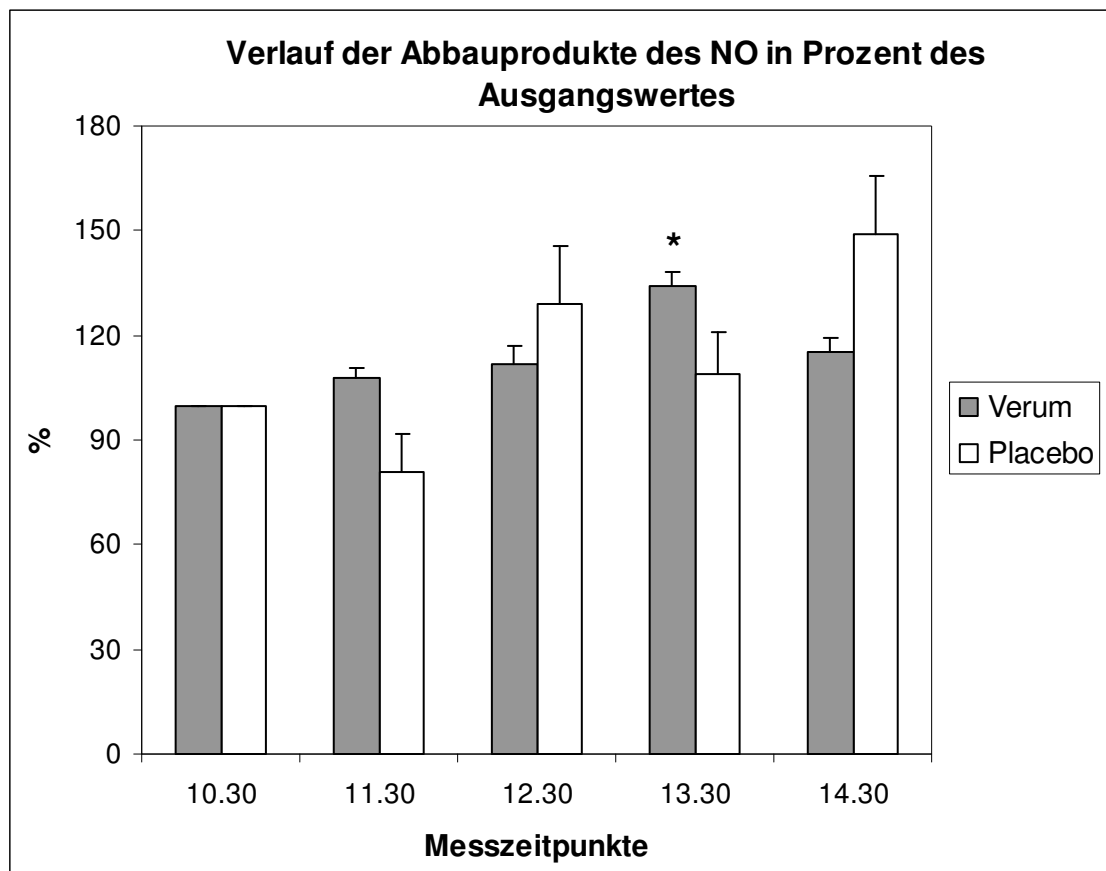


Abb. 13: Abbauprodukte des Stickstoffmonoxids (* $p < 0,05$)

III.4.2. NO_x im Urin

Die Abbauprodukte des NO im Urin der Verumgruppe fielen um 23,9% von anfangs (10.30- 11.00) von $93,59 \pm 14,91$ auf $71,24 \pm 12,74$ $\mu\text{mol}/30\text{min}$ (13.00- 14.00), während sie bei der Placebogruppe um 28,5% von $59,62 \pm 6,31$ auf $42,60 \pm 2,12$ μM fielen.

Die Veränderungen der Abbauprodukte im Urin der Verumgruppe sind mit einem p-Wert von $p=0,23$ innerhalb der Verumgruppe statistisch nicht signifikant verschieden. (vgl. Abb.16, Tabelle 9: „NO und cGMP des Urins“ in Kapitel VI.2.3.).

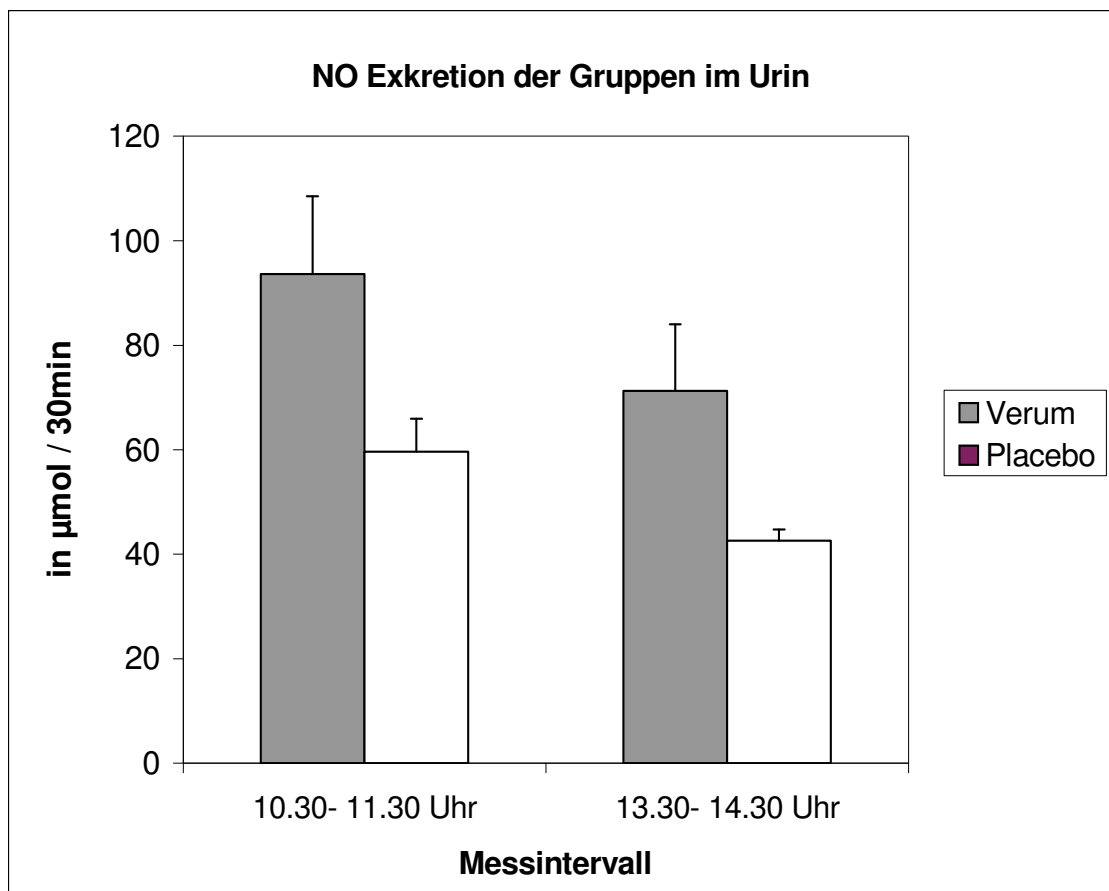


Abb.: 14: NO- Exkretion in $\mu\text{mol}/30$ min beider Gruppen im Urin

III.5. cGMP

III.5.1. cGMP im Serum

Die Serum cGMP- Werte der Verumgruppe (n=11 Probanden) stiegen signifikant von anfangs $3,0 \pm 0,7$ auf $6,8 \pm 1,6$ nM zu Ende der BH_4 Applikation an. Das entspricht einer Steigerung auf das $2,7 \pm 0,1$ - fache des Ausgangswertes. Nach 6,5h nach Beendigung der BH_4 -Applikation fielen sie auf etwa Ausgangsniveau ab. Die cGMP- Werte der Verumgruppe sind bei der statistischen Analyse innerhalb der Gruppe sowohl im Messintervall 3 als auch 4 statistisch signifikant von einander verschieden (Messintervall 3: * $p < 0,05$; Messintervall 4: ** $p < 0,01$; Abb. 15, Tabelle 6b, 7 in Kapitel IV.3.). Vergleichend waren die Veränderungen der Serum cGMP- Werte der Placebogruppe von $9,6 \pm 1,9$ auf $6,7 \pm 1,2$ nM statistisch nicht signifikant. Die Varianzanalyse der Ausgangswerte beider Gruppen sind mit einem p-Wert von 0,03 statistisch signifikant voneinander verschieden.

Die Werte sind daher in Prozent des Ausgangswertes angegeben.

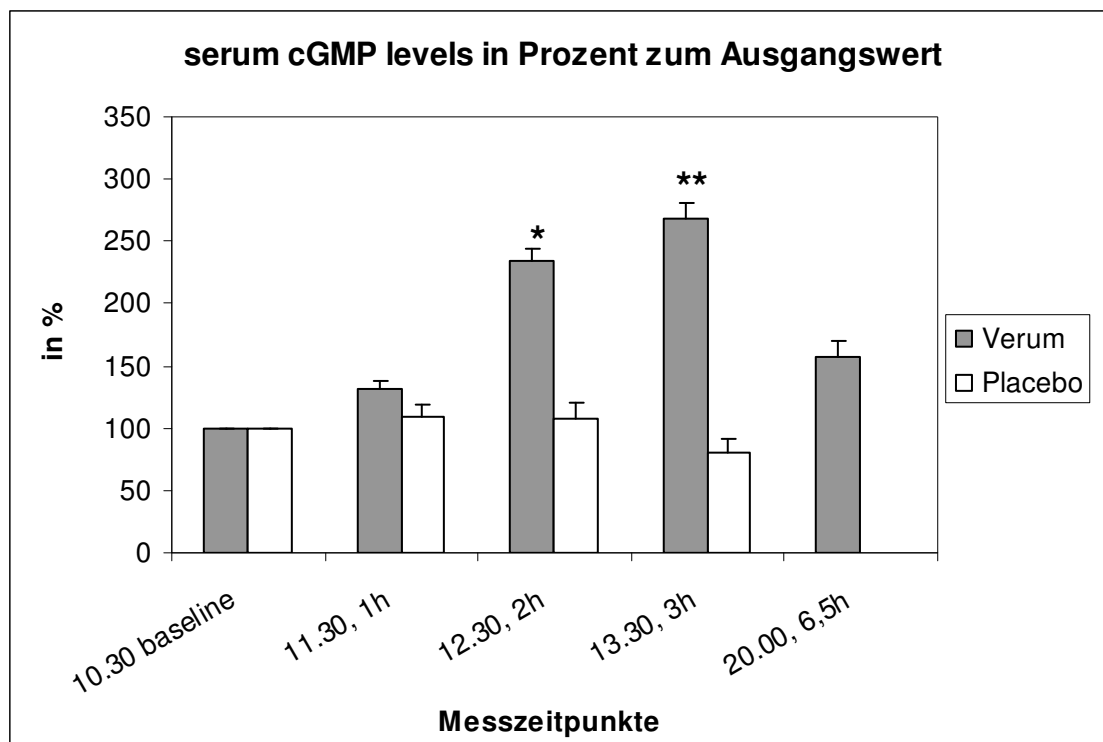
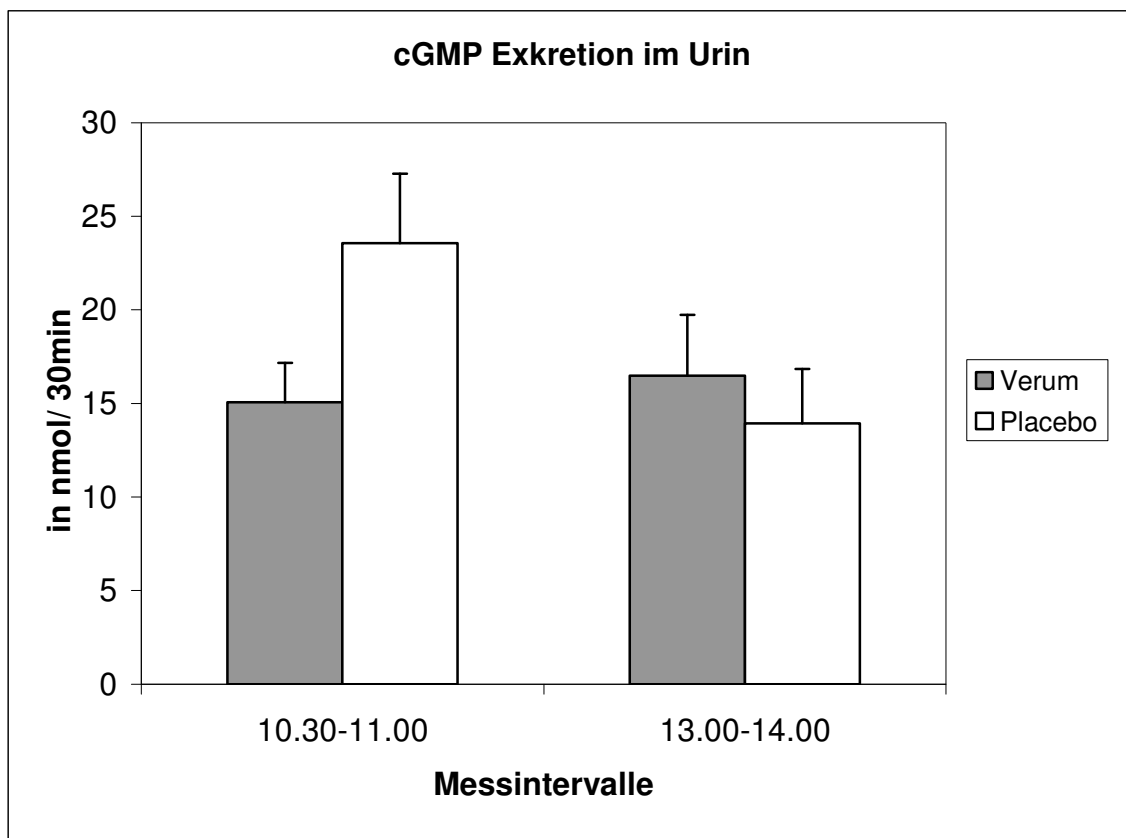


Abb. 15: Serum cGMP in Prozent des Ausgangswertes (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$)

III.5.2. cGMP im Urin

Die cGMP- Ausscheidung im Urin zeigte keine Änderung: bei der Verumgruppe steigen die Werte von $15,07 \pm 2,10$ auf $16,48 \pm 3,25$ nmol/30 min, während die der Placebogruppe mit $23,57 \pm 3,69$ auf $13,94 \pm 2,89$ nmol/30 min konstant blieben.

Die cGMP- Ausscheidung im Urin war mit einem p-Wert von 0,23 gegenüber denen der Placebogruppe statistisch nicht signifikant verschieden. (vgl.: Abb. 18 und Tabelle 8 in Kapitel VI.2.3.).



16: Urin cGMP Exkretion in nmol/ 30min der Gruppen

III.6. Hormone

III.6.1. BNP

Das BNP stieg bei der Verum- Gruppe von $1,17 \pm 0,17$ auf $2,25 \pm 0,73$ ng/ml. Bei der Placebogruppe stieg das BNP von $2,67 \pm 1,67$ auf $5,17 \pm 3,78$ ng/ml (vgl.: Abb. 17 und Tabelle 10 in Kapitel VI.2.4.). In der Analyse der Verumgruppe mit $n=12$ Probanden ergab ein p-Wert von 0,12 einen statistisch nicht signifikanten Unterschied innerhalb der Verumgruppe. Die Analyse der Placebogruppe mit $n=6$ Probanden ergab mit einem p-Wert von 0,23 einen ebenfalls statistisch nicht signifikanten Unterschied innerhalb der Placebogruppe.

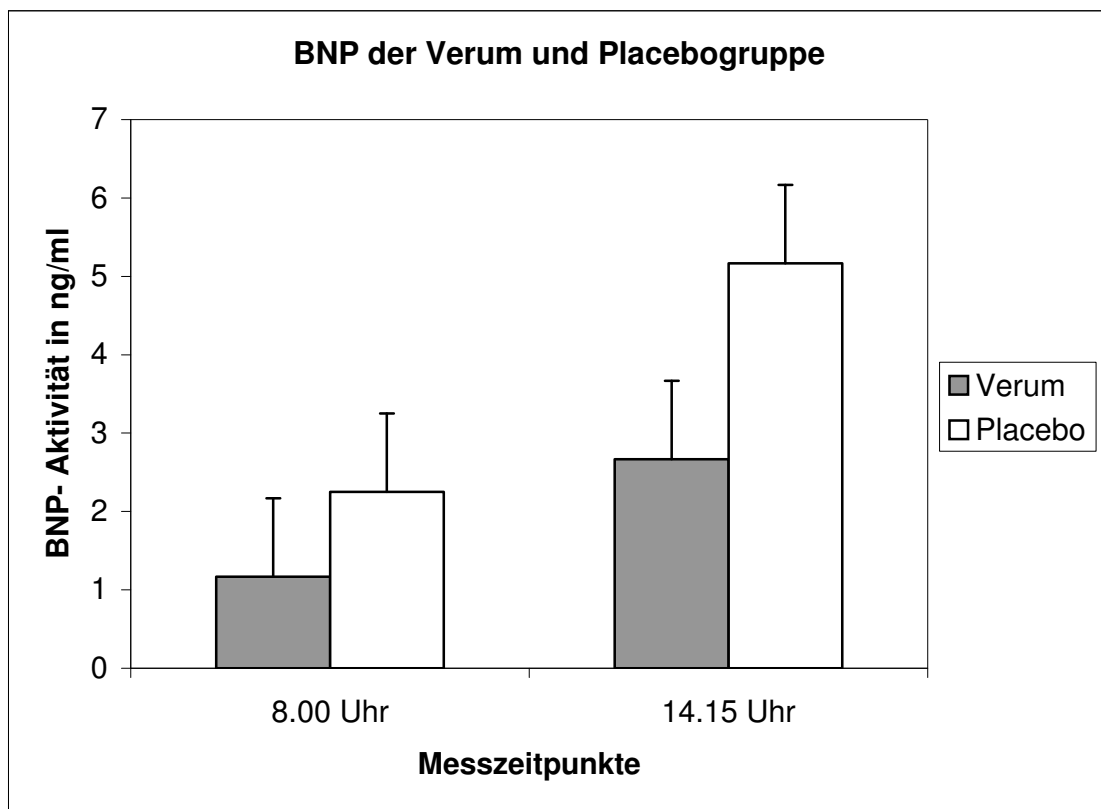


Abb. 17: BNP der Verum und der Placebogruppe

III.6.2. Renin

Das Renin stieg statistisch signifikant innerhalb der Verum- Gruppe von $2,05 \pm 0,45$ to $2,54 \pm 0,40$ ng Ang I/ml/h ($p= 0,0453$), welches einem Anstieg von 23,9% entspricht.

Bei der Placebogruppe bleibt die Renin- Aktivität unverändert $2,02 \pm 0,53$ vs. $2,21 \pm 0,53$ ng Ang I/ml/h ($p > 0,05$, vgl.: Abb. 18 und Tabelle 9 in Kapitel VI.2.4.).

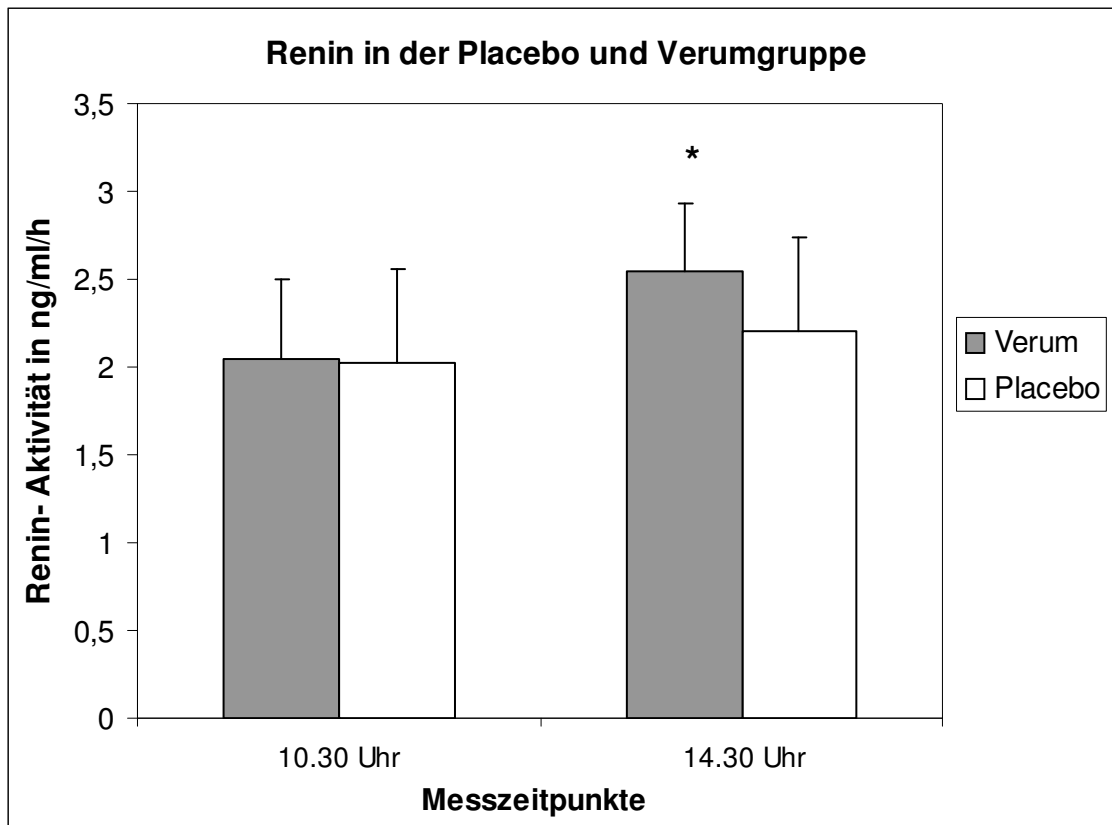


Abb. 18: Renin- Aktivität (*p- Wert 0,0453)

III.6.3. Aldosteron

Die Aldosteronwerte beider Gruppen blieben konstant (82 ± 35 vs. 80 ± 36 pg/ml bzw. 93 ± 28 vs. 90 ± 32 pg/ml). In der Analyse der Verumgruppe mit 11 Probanden, konnten mit einem $p=0,8471$ keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt werden (vgl. Abb. 19, Tabelle 11 in Kapitel VI.2.4.).

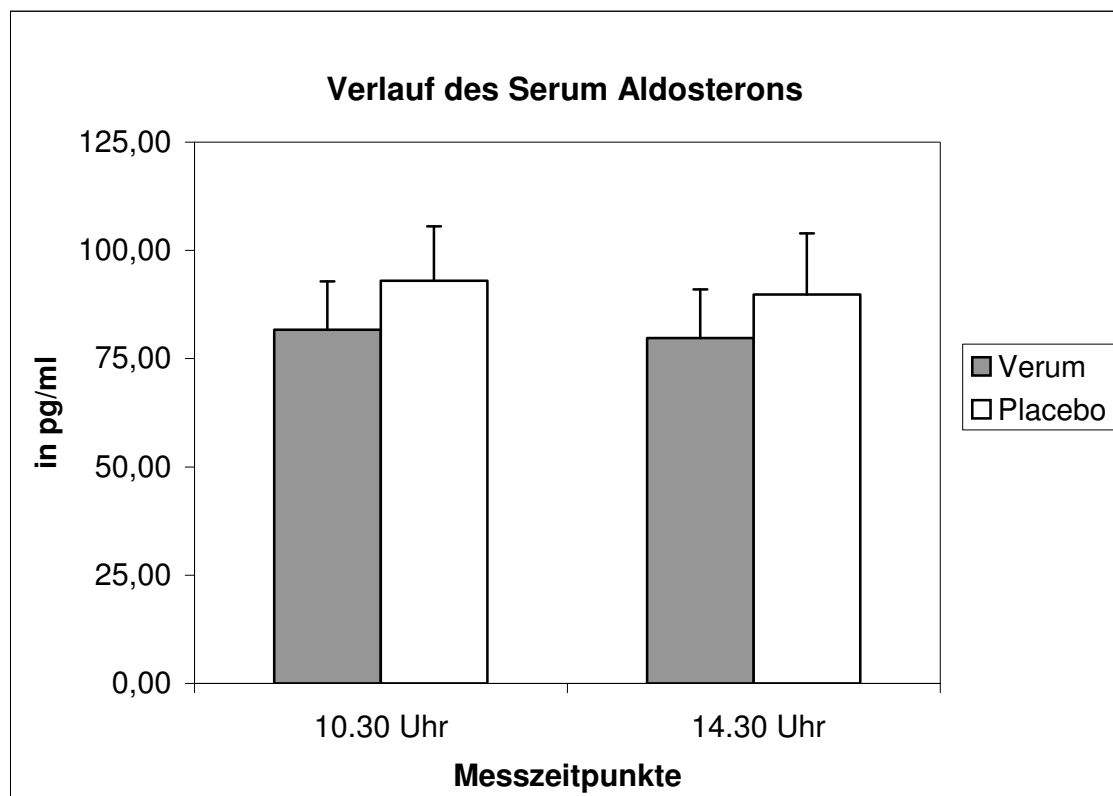


Abb. 19: Serum Aldosteron- Konzentrationen

III.6.4. Erythropoietin (EPO)

Das EPO blieb innerhalb beider Gruppen konstant. Im Vergleich zwischen den Gruppen sind die Werte der Placebogruppe 43% niedriger als bei Verumgruppe (vgl. Abb.20). Mit $p=0,1369$ waren keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Verumgruppe fest zu stellen (vgl. Tabelle 10 in Kapitel VI.2.4.).

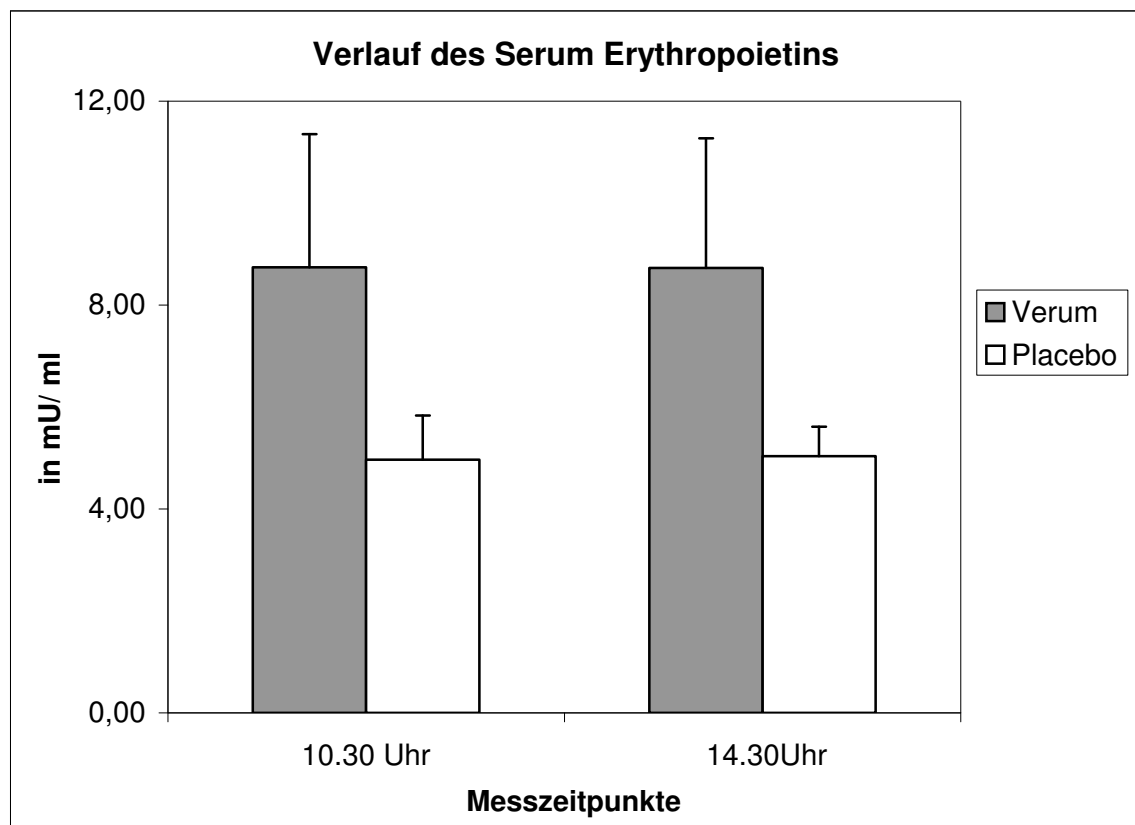


Abb. 20: Serum Erythropoietin- Konzentrationen

III.7. Sonstige Untersuchungen

III.7.1. Hämatokrit

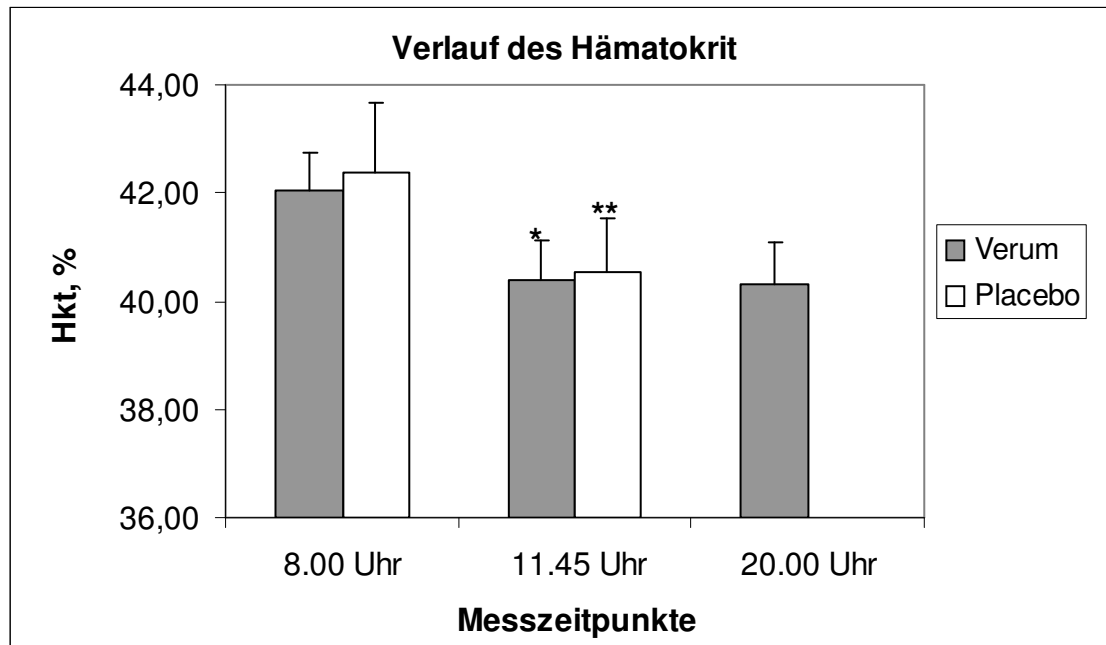


Abb. 21: Hämatokrit (*, ** p-Wert =0,04)

Der Hämatokrit sank signifikant innerhalb der Verumgruppe um 4,3% von $42,1 \pm 0,6$ auf $40,3 \pm 0,6\%$. Dieser Abfall wurde allerdings auch innerhalb der Placebogruppe beobachtet (von $42,4 \pm 1,3$ auf $40,5 \pm 1,0\%$).

Die Veränderung des Hämatokrit ist bei beiden Gruppen mit $p=0,04$ statistisch signifikant (vgl. Abb. 21, Tabelle 12 in Kapitel VI.2.5.).

III.7.2. Fraktionelle Natrium-/ Kalium- Clearance

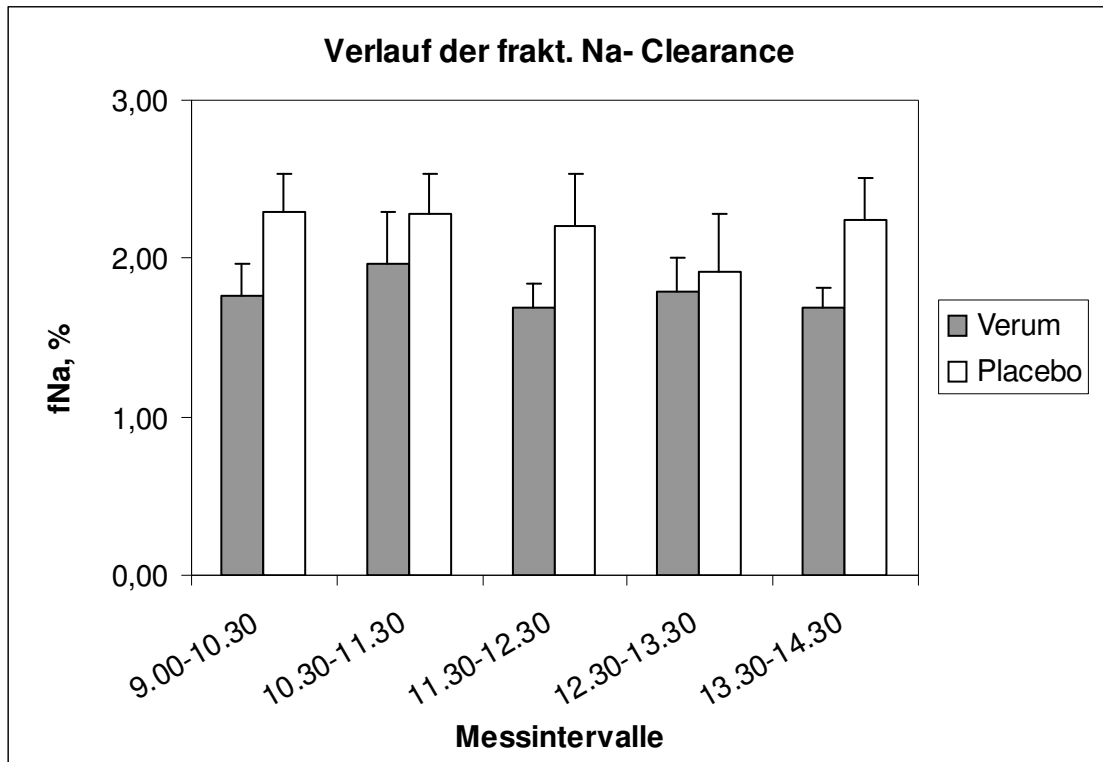


Abb. 22: Fraktionierte Natrium Clearance

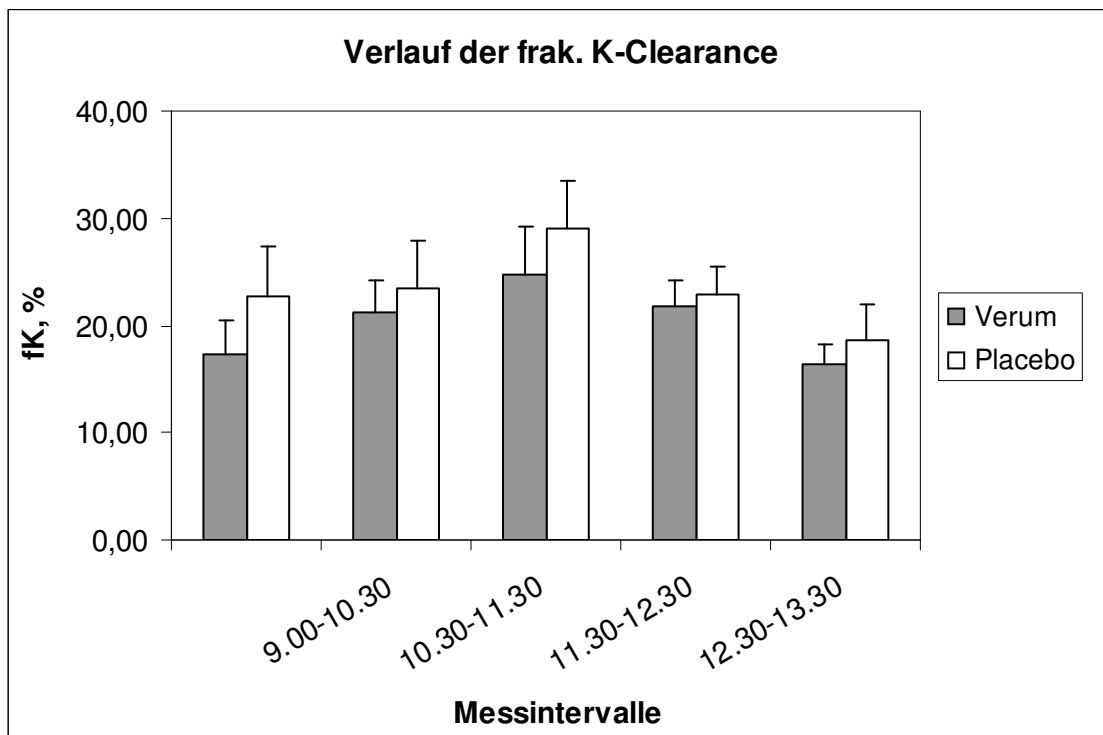


Abb. 23: Verlauf der fraktionierten Kalium- Clearance

Die fraktionelle Natrium- Clearance betrug bei der Verumgruppe (n=11) anfangs $1,77\pm 0,20$ später $1,79\pm 0,21\%$ ($p=0,7559$ statistisch nicht signifikant). Bei der Placebogruppe fiel sie hingegen von $2,29\pm 0,24$ auf $1,92\pm 0,37\%$ ($p>0,05$; damit nicht statistisch signifikant).

Die fraktionelle Kalium-Clearance stieg bei der Verumgruppe von $17,39\pm 3,05$ auf $21,81\pm 2,43\%$ um $22,91\%$ ($p=0,085$). Bei der Placebogruppe fiel sie um $0,7\%$ von $22,75\pm 4,67$ auf $22,91\pm 2,60\%$ Insgesamt ist die Kalium- Clearance statistisch nicht signifikant verschieden (vgl.: Abb.22, 23; Tab.12 in Kapitel VI.2.5).

III.7.2. Verträglichkeit

Alle Probanden zeigten unter Infusion der mit Bikarbonat auf pH 3,8-4 gepufferten BH_4 - Lösung keine unerwünschten Nebenwirkungen, wie Thrombophlebitis, Übelkeit, Anaphylaxie, oder Sonstiges. Die Substanz war bei allen Studienteilnehmern gut verträglich. Auch nach Ablauf der Studie wurden keine Gefäßwandreizungen berichtet.

III.7.3. Elektrokardiogramm

Im EKG zeigte keiner der Patienten klinisch bedeutsame Auffälligkeiten und Veränderungen während des Studienzeitraums.

IV. Diskussion

IV.1. cGMP, Abbauprodukte von NO sowie BNP

Der Hauptbefund der vorliegenden Studie war der Anstieg des Serum cGMP-Spiegels auf das maximal 2.7 ± 0.1 fache der Ausgangswerte. Es muss daher zu einer Aktivierung von Guanylatzyklasen (GC) gekommen sein. Man unterscheidet die zytosolische, lösliche Guanylatcyclase und die membranständige GC. Erstere wird durch freies NO aktiviert, letztere durch natriuretische Peptide oder bislang noch unbekannte Liganden (Lucas et al., 2000). Von den natriuretischen Proteinen aktiviert das vom Ventrikel stammende BNP (Tietgen, 2004; Yoshimura et al., 1993; Nakao et al., 1991; Doyama et al., 1998) die membranständige GC, woraufhin eine extrazelluläre Freisetzung von cGMP ins Blut erfolgt. Die Aktivierung der cytosolischen GC durch NO-Derivate, führt nicht zu einem Anstieg der Serum cGMP-Spiegel (Thomas, 2000).

Da man bisher davon ausging, dass die im Plasma messbare cGMP-Konzentration eher von der Aktivität der membranständigen GC (Thomas, 2000) herrührt, wurden die BNP-Spiegel stellvertretend für die natriuretischen Peptide bestimmt. Dies geschah auch im Hinblick auf die mögliche Volumenbelastung der Probanden durch die hohe Flüssigkeitszufuhr, die zu einem Abfall der Hämatokrit führte. Insgesamt konnte kein signifikanter Anstieg der BNP-Spiegel verzeichnet werden, wobei zu erwähnen ist, dass die gemessenen Spiegel an der unteren Detektionsgrenze der Messmethode lagen (1,17 bis 5,17ng/ml).

In der vorliegenden Studie stiegen die Serumwerte des NO unter Applikation von BH₄ signifikant an. Dies deutet auf eine Aktivierung der NOS hin, welche zu einer vermehrten Bildung von NO führte (vgl. Abb.13 in Kapitel III.4.1.). Die biologische Halbwertszeit und die beschränkte Diffusionsstrecke des NO ist wegen der Inaktivierung durch Sauerstoffradikale und der raschen Oxidation zu Nitrit und Nitrat sehr kurz (Grylewski et al., 1986; Rubanyi und Vanhoutte, 1986). Daher ist die Erfassung der NO-Aktivität im Körper durch die Bestimmung der Abbauprodukte NO_x limitiert.

Die Ausscheidung des cGMP beider Gruppen im Urin blieb unverändert, womit eine verstärkte renale Produktion von cGMP eher unwahrscheinlich ist. Gegen eine Aktivierung der membranständigen GC spricht in dieser Studie ebenfalls, dass die Serum cGMP- Werte der Placebogruppe trotz gleicher Volumenzufuhr nicht ansteigen. Demgegenüber führte die eskalierte Infusion von BH₄ in der Verumgruppe zu einem kumulativen Anstieg der Serum- cGMP Spiegel im Messintervall 4. Nach Beenden der BH₄ Infusion sanken die Serum cGMP- Werte auf das Ausgangsniveau ab (vgl. Abb. 15 in Kapitel III.5.1.).

In der vorliegenden Studie spricht vieles dafür, dass der cGMP- Anstieg durch die Aktivierung der NOS und anschließend der zytosolischen Guanylatzyklase bedingt ist. Welche der drei Isoformen für die Bildung der NO verantwortlich ist, lässt sich allerdings 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; Schricker, 1996; Setoguchi et al., 2002).

Neueste Erkenntnisse haben eine in Erythrozyten lokalisierte funktionelle endotheliale NOS identifiziert, welche eine Rolle in der Verformbarkeit der Zellmembran der roten Blutkörperchen als auch in der Hemmung der Thrombozytenaggregation eine Rolle spielen soll (Kleinbongard et al., 2006). Erythrozyten sind ebenfalls in der Lage cGMP durch die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase zu produzieren (Conran et al., 2004). Man kann daher annehmen, dass BH₄ möglicherweise die erythrozytäre eNOS stimuliert hat, was konsekutiv zu einer Vermehrten Bildung von zytosolischem cGMP geführt hat, welches in einem Eliminationsprozess dann aus den Erythrozyten ausgeschieden wird (Wu et al. , 2005).

Eine Verbesserung der NO- Verfügbarkeit im Endothel ist ein wichtiges therapeutisches Ziel in der kardiovaskulären Medizin. Verschiedene Wirkstoffklassen wie beispielsweise ACE- Hemmer und Statine sind hier zu erwähnen, welche auch langfristig die Prognose der Patienten verbessern (Consensus

Trial Study Group, 1987; Swedberg et Kjekshus, 1988; Folkeringa, 2006). Bislang gibt es nur wenige direkte Aktivatoren der NOS, zu denen klassischerweise die Nitroglycerin- Präparate zählen, welche allerdings nur sehr kurz wirken und aufgrund des hypotensiven Effekts eine geringe therapeutische Breite haben. Eine chronische Gabe von Nitroliberatoren ist wegen der Toleranzentwicklung ebenfalls nicht in der Lage, die Prognose der atherosklerotischen Patienten zu verbessern (Munzel et al., 2005). Es gibt sogar Hinweise, dass sie durch Erzeugung von Peroxynitrat eine NO-Verarmung hervorrufen können (Milstein et al., 1999). Somit steht in der klinischen Medizin kein Wirkstoff zur Verfügung, der das protektive NO- System direkt stimulieren kann.

In diesem Zusammenhang erscheint der Befund dieser Studie vielversprechend, da BH₄ diese Wirkung entfalten könnte. Zahlreiche Vorarbeiten an atherosklerotischen Patienten hatten dieser Substanz positive Auswirkung auf die Gefäßfunktion bescheinigt (Setoguchi et al., 2002; Walter et al., 1997; Fukada et al., 2002; Tiefenbacher et al., 2001). Dies könnte durch mehrere Angriffspunkte erklärt werden. Neben einer Aktivierung der NOS könnte die BH₄- Gabe auch endogene Mangelzustände ausgleichen, die ursächlich für eine NO- Verarmung sein könnten (Heinzel et al., 1992; Kojima et al., 1995; Thöny et al., 2000; Anastasiadis et al., 1997; Vasquez- Vivar et al., 1998; Setoguchi et al., 2002; Stroes et al., 1998 a+b; Hong- Jye Hong, 2001).

Daneben hat es als Antioxidans das Potential oxidativen Stress abzufangen, der bei der Atherosklerose eine bedeutende Rolle spielt (Tiefenbacher, 2001; Tiefenbacher et al., 2000; Thöny et al., 2000; Hong et al., 2001; Fukada et al., 2002). Eine langfristige therapeutische Anwendung von BH₄ bei atherosklerotischen Patienten liegt bisher nicht vor. Die Befunde dieser Studie liefern jedoch eine gute Rationale für eine derartige Anwendung.

IV.2. Systemische Hämodynamik

IV.2.1. Blutdruck, MAP und Herzfrequenz

In der vorliegenden Studie sollten unter anderem die Auswirkungen von exogenem, systemischen BH₄ auf die systemische Hämodynamik den MAP und die Herzfrequenz untersucht werden. Die neutrale Wirkung von Tetrahydrobiopterin in einer Dosis von 19 mg/kg/KG auf die systemische Hämodynamik und das EKG konnte in dieser Studie reproduziert werden.

Es existierten bisher keine gesicherten Beweise dafür, dass Tetrahydrobiopterin selbst direkt vasodilatative Effekte hat und somit Einfluss auf die systemische Hämodynamik nehmen könnte. Bisher konnte lediglich in einer einzigen Beobachtung der Arbeitsgruppe von Schaffner (Schaffner et al, 1994) zeigen, dass unter hoch dosierter Infusion von 8-32 mg/min BH₄ in die Arteria brachialis eine massive Hyperämie der Extremität beobachtet werden konnte, während Blutdruck und Herzfrequenz 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. Zudem reagiert BH₄ in hoher Konzentration stark sauer, wir mussten dementsprechend unsere Lösung vom initialen pH von annähernd 0 auf einen pH-Wert von 4 puffern. Es ist durchaus denkbar, dass die Applikation dieser hohen Dosen von BH₄ eine lokale Azidose bewirkt haben könnte, was bekanntlich eine starke Vasodilatation bewirkt (Hick, 1996).

In einer Studie von Setoguchi et al. (Setoguchi et al., 2002), bei der 14 Probanden mit chronischer Herzinsuffizienz und 7 Kontrollprobanden BH₄ intraarteriell infundiert wurde, machten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen des arteriellen Drucks, der Unterarmdurchblutung und der Herzfrequenz bemerkbar. Auch in der Arbeitsgruppe von Walter et al. (2001) wurden keine Änderungen der Hämodynamik und des EKGs berichtet. In Ihrer Studie wurde 15 gesunden Probanden ebenfalls 10mg/kg BH₄ intravenös

appliziert und dabei die myokardiale Durchblutung mittels Positron Emissions-Tomographie gemessen. Diese Studienergebnisse haben abgesehen von der Einzelbeobachtung in der Arbeitsgruppe von Schaffner (Schaffner et al., 1994) gemein, dass BH₄, unabhängig von der Art der Applikation, neutral auf die systemische Hämodynamik und die Herzfrequenz ist.

Man kann daraus folgern, dass Tetrahydrobiopterin entweder selbst nicht direkt vasodilatativ wirkt, oder dass die bisher applizierten Dosen zu gering waren. Dies bedeutet auch, dass der verzeichnete cGMP- Anstieg infolge einer GC-Aktivierung nicht mit Veränderungen des RR einhergegangen ist. Dies macht eine langfristige therapeutische Anwendung bei Patienten sicher. Eine Hypotonie durch zu starke NOS- Aktivierung ist nicht zu befürchten.

IV.3. Renale Hämodynamik

IV.3.1. Glomeruläre Filtrationsrate und renaler Blutfluss

Der Fokus der vorliegenden Studie ist der Einfluss von Tetrahydrobiopterin auf die renale Hämodynamik und auf das RAAS. Die Nieren nehmen die zentrale Rolle in der Regulierung des Flüssigkeitshaushalts und des Blutdrucks ein.

Da die GFR und der RBF sowohl von der intrinsischen Eigenschaft des renalen Gefäßsystems (myogene Antwort) als auch durch den Tubulo- Glomerulären-Feedback - Mechanismus (TGF) stark autoreguliert werden (Blantz et al., 1990; Braam et al., 1993; Schnermann et al., 1984), gibt es nur wenige Substanzen, welche die GFR direkt beeinflussen können. Zu diesen Substanzen gehören zum Beispiel Lipopolysaccharide, welche zu einer Minderung der GFR führen (Schwartz, Mendonca, Schwartz, Xia, Satriano, Wilson, Blantz, 1997) und gewisse Aminosäuren, die zu einer Zunahme der GFR führen (Castellino et al., 1986; Baylis, Collins, 1986; Baylis et al., 1990). In der vorliegenden Studie blieb die GFR und der RPF unter Infusion von BH₄ konstant.

In der Niere sind alle drei Isoformen der NOS zu finden. Vor einigen Jahren wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen festgestellt, dass sowohl im Zytosol der Macula Densa Zellen als auch in den efferenten Arteriolen nNOS im Überfluss vorliegt (Mundel et al., 1992; Wilcox et al., 1992; Thorup et al., 1993; Tojo et al., 1995), während an den afferenten Arteriolen keine nNOS zu finden ist. Da die eNOS vor allem im Endothel der medullären Nierengefäße gefunden wird, liegt es nahe, dass die NOS Enzyme und ihre unterschiedliche Lokalisation gegensätzliche Effekte haben.

Laut Braam (Braam 1999) ist die eNOS ein schnell wirkendes System, welches durch Stress und oder druckbedingte Dehnung und erhöhte Spiegel von Angiotensin- II stimuliert wird. Sie soll akute Veränderungen des Durchblutungsdrucks abfangen und gilt daher als Modulator der Gefäßantwort; insbesondere der renalen Autoregulation. Im Gegensatz dazu betrachtet er die neuronal NOS der Macula Densa (MD) als ein System, welches einen adaptiven Mechanismus an Langzeitveränderungen, beispielsweise an veränderte Natriumaufnahme oder Perfusionsdrücke, darstellt.

Studien von Thomson und Deng (2003) berichteten, dass NO von nNOS der MD Zellen durch seinen "second messenger" cGMP zur Desensibilisierung des TGF führt, während die systemische Applikation eines selektiven nNOS-Inhibitors in einer Studie von Ollerstam (Ollerstam et al., 1997) zu einem empfindlicheren TGF- Mechanismus führt, wodurch die GFR sank.

Eine Studie von Persson et al. (Persson et al., 2002) zeigt, dass NO den TGF Mechanismus reguliert, indem es dessen die Sensitivität mindert. In der Studie führte eine Applikation eines unspezifischen NOS- Inhibitors zu einem Anstieg des Blutdrucks und einer niedrigeren GFR sowohl bei der normo- als auch bei der hypertensiven Rattenpopulation. Thorup und Persson (Thorup et Persson, 1998) berichteten ebenfalls, dass eine Inhibition der nNOS wahrscheinlich für den modulierenden Effekt auf den TGF verantwortlich ist. Diese Studien haben mit den Ergebnissen der Studie von Sigmon und Beierwaltes (Sigmon und

Beierwaltes, 2000) gemein, dass NO, welches von der nNOS in der Nierenrinde produziert wird, wahrscheinlich einen bedeutenden Einfluss auf den Gefäßtonus der MD- assoziierten Arteriolen als auch in der Regulation der GFR hat.

Die Tatsache, dass BH₄ nicht zu einer merklichen Änderung der renalen Hämodynamik geführt hat, kann durch eine Studie der Arbeitsgruppe um Shiraishi (Shiraishi et al., 2002) erklärt werden. Er beschreibt, dass eine Stimulation der NO- cGMP Achse zu einer Vasodilatation führt. Gleichzeitig wird die GTPCH- I posttranslational modifiziert und das Enzym dadurch gehemmt. Er geht davon aus, dass die BH₄ Synthese durch negative Feedbackmechanismen zwischen dem Endothel und den Gefäßmuskelzellen reguliert wird, um eine überschießende Vasodilatation zu verhindern. Durch die exogene Applikation und die dadurch vermehrte Verfügbarkeit des Kofaktors BH₄ wird die NO- Synthese und damit auch die NO- cGMP Achse stimuliert. Die Hemmung der GTP-CH- I würde wiederum in einer verminderten BH₄ Synthese resultieren. Die vielfältigen und oft kontroversen Ergebnisse zeigen, dass die Regulation der renalen Parameter sehr komplex ist.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass die Applikation von Tetrahydrobiopterin tendenziell keinen Einfluss auf die renale Hämodynamik hat. Allerdings sollte in weiteren Studien die genauen Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Isoformen der NOS beleuchtet werden, um einen tieferen Einblick in die physiologischen Abläufe zu bekommen.

IV.3.2. Filtrationsfraktion (FF) und Renovaskulärer Widerstand (RVR)

Da die GFR und der RPF sich nicht statistisch signifikant unterschieden, war die Filtrationsfraktion ebenfalls nicht statistisch signifikant. Da der RVR vom MAP und vom RBF abhängig ist (siehe Kapitel II.3.4.), welche sich beide ebenfalls nicht statistisch signifikant von den jeweiligen Ausgangswerten unterscheiden, blieb die Applikation von Tetrahydrobiopterin auch hier neutral.

IV.4. Hormone

IV.4.1. Renin und BNP

Die Plasma- Renin- Aktivität ist in dieser Studie innerhalb der Verumgruppe signifikant gestiegen, erreichte aber im Paarvergleich nicht das statistische Signifikanzniveau (vgl. Abb. 18). Die hohe Flüssigkeitsbelastung der Probanden führte zu einer Steigerung des Extrazellulärvolumens, worunter bekannter Weise die Reninsekretion der juxtaglomerulären Zellen sinkt (Ollerstam et al., 2001; Persson et al., 2002). Es ist also daher nicht sicher auszuschließen, dass der im Plasma messbare Anstieg des Renins durch die systemische BH₄-Applikation hervorgerufen wird. Er könnte beispielsweise durch eine BH₄-induzierte Stimulation der neuronalen NOS erklärt werden, welche hauptsächlich in der Macula Densa gefunden wird und welche an der Reninsekretion wesentlich beteiligt ist (He et al., 1995). Mäuse mit einem "knockout" für die nNOS zeigen eine verminderte Reninsekretion (Paliege et al., 2004). Andererseits könnten ein Anstieg des zirkulierenden cGMP auch die Reninfreisetzung direkt stimulieren. Dieser Mechanismus der Reninfreisetzung wurde kürzlich in einer Studie an Ratten beschrieben (Beierwaltes, 2006).

IV.4.2. Aldosteron

Das Aldosteron zeigt keine signifikante Änderung während der Studie. Die Aldosteronsekretion wird einerseits durch Natriummangel oder Kaliumüberschuss andererseits auch durch die Reninsekretion stimuliert. Da weder signifikante Änderungen der Elektrolyte Na⁺ und K⁺, noch eine Hypovolämie bei beiden Gruppen zu verzeichnen waren, war mit einem Anstieg des Aldosteron unter Infusion von BH₄ nicht zu rechnen (vgl. Abb. 19 in Kapitel III.6.3.).

IV.4.3. Erythropoietin

Unter Applikation von BH₄ blieb das Erythropoietin innerhalb beider Gruppen konstant. Somit scheint die akute Gabe von BH₄ ohne Wirkung auf die Erythropoietin- Sekretion zu sein (vgl. Abb. 20 in Kapitel III.6.4.).

IV.5. Fraktionelle Na- und K- Clearance

Unter Applikation von BH_4 konnten trotz deutlicher Erhöhung der systemischen cGMP- Spiegel weder natriu- noch kaliuretischen Effekte beobachtet werden (vgl. Abb. 22, 23). Braam (Braam, 1999) beschreibt, dass die Natriumexkretion in Abhängigkeit vom renalen Perfusionsdruck entscheidend von NO und seinem „second messenger“ cGMP abhängt. Andere Studien in der Arbeitsgruppe von Jin (Jin et al., 2001) beschreiben eine Abhängigkeit der Natriuresis vom Wirkungsort des cGMP. So führte eine cGMP- Applikation in die Nierenarterie zu gesteigerter Natriuresis, erhöhtem RBF und GFR, während dessen intestinale Applikation zwar ebenfalls zu einer gesteigerten Natriuresis jedoch ohne Einfluss auf den RBF oder GFR blieb. Die medulläre Applikation von cGMP hatte weder auf die Natriuresis, den renalen Blutfluss noch die glomeruläre Filtrationsrate Einfluss.

IV.6. Hämatokrit

Der Hämatokrit sank in beiden Gruppen statistisch signifikant ab. Dies kann dadurch erklärt werden, dass die Probanden während der Studienzeit eine hohe Trinkmenge von bis zu 5 Litern natriumarmen Wassers innerhalb von 6 Stunden zu sich genommen haben, worauf das intravasale Volumen zunahm und der relative Zuwachs an Flüssigkeit konsekutiv in einem erniedrigten Hämatokrit resultierte (vgl.: Abb. 21 in Kapitel III.7.3.).

IV.7. Verträglichkeit

Bei allen unseren Probanden traten unter der Tetrahydrobiopterin- Applikation keine unerwünschten Begleiterscheinungen auf. In der Zwischenzeit wurde die Sicherheit und Verträglichkeit von Tetrahydrobiopterin in mehreren Studien geprüft. In allen Studien zeigte BH_4 bisher eine sehr gute Verträglichkeit.

V. Zusammenfassung

Innerhalb der letzten zehn Jahre ist die Funktion des Endothels als wichtigstem Regulationsorgan der systemischen und renalen Hämodynamik bekannt geworden. Einer Reihe von vasoaktiven Substanzen, darunter auch der „endothelium- derived- relaxing- factor“ (EDRF), nunmehr als NO bekannt, kommt eine besondere Bedeutung zu. Er spielt die bisher wichtigste Rolle in der Aufrechterhaltung des basalen Gefäßtonus und beeinflusst somit sowohl die systemische als auch die renale Hämodynamik.

Ziel dieser Studie war es, Fragen zu beantworten, wie sich die intravenöse Gabe von Tetrahydrobiopterin auf die systemische- und renale Hämodynamik auswirkt, und ob eine kurzzeitige exogene Zufuhr die Funktion des Endothels wesentlich beeinflusst. Außerdem wurde die Auswirkungen auf Hormone, die wesentlich an der Blutdruckregulation mitwirken, wie beispielsweise Renin und Aldosteron als auch die Abbauprodukte des Stickstoffmonoxids und dessen second messenger cGMP untersucht.

Die Studie wurde in zwei Teile gegliedert. Im ersten Teil wurden 12 männlichen, gesunden Probanden die Testsubstanz von insgesamt jeweils 10 mg/kg KG Tetrahydrobiopterin intravenös appliziert. Die Applikation wurde über drei Stunden durchgeführt, wobei man jede Stunde die zu applizierende Konzentration erhöhte. Blutdruck und Puls wurde in regelmäßigen Abständen von 15 Minuten, GFR und ERPF alle 30 Minuten mittels Inulin-/ PAH- Clearance bestimmt. Im zweiten Teil wurde 6 zufälligen Probanden, die aus dem ersten Kollektiv entstammten, statt des Tetrahydrobiopterins Placebo infundiert.

Die Studie konnte zeigen, dass unter Infusion von Tetrahydrobiopterin ein deutlicher Anstieg der Serum cGMP- Spiegel auftrat, der in der Zusammenschau der Befunde auf eine Aktivierung der löslichen GC und somit Folge einer Aktivierung der NOS zurückzuführen zu sein scheint.

Welche der drei Isoformen der NOS für die Bildung der NO verantwortlich ist, lässt sich allerdings nicht ableiten. Somit ist BH₄ in verabreichter hoher Dosierung ein Aktivator der NOS in vivo, was ein interessantes therapeutisches Potential bei atherosklerotischen Patienten hinsichtlich der Verbesserung der endothelialen Funktion innehaben könnte. Bei Patienten mit Diabetes, Hypertonie und Arteriosklerose wurde eine verminderte NO Verfügbarkeit festgestellt, die wiederum für die endotheliale Dysfunktion verantwortlich gemacht wird. Dabei kann auch ein Mangel an essentiellen Kofaktoren zu einer verminderten NO Produktion beitragen.

Tetrahydrobiopterin könnte demnach eine wichtige neue therapeutische Option in der Behandlung endothelialer Dysfunktion sein.

VI. Anhang

VI.1. Dokumentationsbögen

VI.1.1. Studienprotokoll Verumexperimente- Übersicht der Messwerte

Zeit	Zeit in min	B _x	2 ml EDTA	5 ml Verum	2 ml Li-Hep.	3 ml EDTA	3 ml Citrat	7 ml Serum	10ml EDTA	2 ml EDTA	U _x	Urin, 3 Eppis	Urin-Monovette	Urin cGMP
8:00	0:00	B ₀	BB	Inulin PAH						BH ₄	U ₀	Inulin, PAH		NO _x
9:15	1:15	B ₁		Inulin, PAH	Na, K									
9:30	1:30										U ₁	Inulin, PAH	Na, K	
9:45	1:45	B ₂		Inulin PAH	Na, K									
10:00	2:00										U ₂	Inulin, PAH	Na, K	
	2:15	B ₃		Inulin, PAH	Na, K									
	2:30	B ₄				cGMP	NO _x	Epo, Aldo	Renin Ang II	BH ₄	U ₃	Inulin, PAH	Na, K	cGMP NO _x
	2:45	B ₅		Inulin PAH	Na, K									
11:00	3:00										U ₄	Inulin, PAH	Na, K	
	3:15	B ₆		Inulin, PAH	Na, K									
	3:30	B ₇				cGMP	NO _x			BH ₄	U ₅	Inulin, PAH	Na, K	
	3:45	B ₈	BB	Inulin PAH	Na, K									
12:00	4:00										U ₆	Inulin, PAH	Na, K	
	4:15	B ₉		Inulin, PAH	Na, K									
	4:30	B ₁₀				cGMP	NO _x			BH ₄	U ₇	Inulin, PAH	Na, K	
	4:45	B ₁₁		Inulin PAH	Na, K									
13:00	5:00										U ₈	Inulin, PAH	Na, K	
	5:15	B ₁₂		Inulin, PAH	Na, K									
	5:30	B ₁₃				cGMP	NO _x	Epo, Aldo	Renin Ang II	BH ₄	U ₉	Inulin, PAH	Na, K	cGMP NO _x
	5:45	B ₁₄		Inulin, PAH	Na, K					BH ₄				
14:00	6:00										U ₁₀	Inulin, PAH	Na, K	
	6:15	B ₁₅		Inulin PAH	Na, K					BH ₄				
	6:30										U ₁₁	Inulin, PAH	Na, K	
15:00	7:00	B ₁₆								BH ₄				
	7:30	B ₁₇								BH ₄				
16:00	8:00	B ₁₈								BH ₄				
	8:30	B ₁₉								BH ₄				
17:00	9:00	B ₂₀								BH ₄				
	9:30	B ₂₁								BH ₄				
18:00	10:00	B ₂₂								BH ₄				
	10:30	B ₂₃								BH ₄				
19:00	11:00	B ₂₄								BH ₄				
	11:30	B ₂₅								BH ₄				
20:00	12:00	B ₂₆	BB			cGMP	NO _x			BH ₄				
Summe			6 ml	55ml	22ml	15ml	15ml	14ml	20ml	36ml				

VI.1.2. Studienprotokoll - Übersicht der Messwerte

Proband: Datum:

Uhrzeit	Zeit, min	RR, mmHg	MAP, mmHg	HF, /min	Urinvolumina, ml		
8:00	0:00				U 0		PAH/ Inulin-Start
9:00	1:00				U 1 9.00- 9.30ml	U 1-3 9.00-10.30 ml	9:00 Miktion
9:30	1:30			U 2 9.30-10.00ml			
10:00	2:00			U 3 10.00-10.30ml			
10:30	2:30				U 4 10.30-11.00ml	U 4-5 10.30-11.30 ml	BH4 3 mg /kg KG
10:45	2:45						
11:00	3:00			U 5 11.00-11.30ml			
11:15	3:15						
11:30	3:30				U 6 11.30-12.00ml	U 6-7 11.30-12.30 ml	BH4 6 mg/kg KG
11:45	3:45						
12:00	4:00			U 7 12.00-12.30ml			
12:15	4:15						
12:30	4:30				U 8 12.30-13.00ml	U 8-9 12.30-13.30 ml	BH4 10 mg/ kg KG
12:45	4:45						
13:00	5:00			U 9 13.00-13.30ml			
13:15	5:15						
13:30	5:30				U 10 13.30-14.00ml	U 10-11 13.30-14.30 ml	
13:45	5:45						
14:00	6:00			U 11 14.00-14.30ml			
14:15	6:15						
14:30	6:30						

VI.2. Zusammenfassung der Messwerte

VI.2.1. Systemische Hämodynamik

Der systolische und diastolische Blutdruck als auch die Herzfrequenz wurde innerhalb der Messintervalle jeweils viertelstündlich gemessen und arithmetisch gemittelt. Die Messintervalle des systolischen und diastolischen Blutdrucks und die Herzfrequenz setzten sich wie folgt zusammen. RR_0: 8.00, RR_1:8.00-9.30, RR_2:9.30-10.30, RR_3: 10.30-11.30, RR_4: 11.30-12.30, RR_5: 12.30-13.30, RR_6: 13.30-14.30.

Tabelle 1: Blutdruck (RR) der Verumgruppe systolisch und diastolisch (in mmHg)

	RR sys_0	RR sys_1	RR sys_2	RR sys_3	RR sys_4	RR sys_5	RR sys_6	RR dia_0	RR dia_1	RR dia_2	RR dia_3	RR dia_4	RR dia_5	RR dia_6
Mean	129,2	129,6	128	127	128,2	129,4	127,6	79,9	82,4	80,2	80,3	79,9	79,6	74,9
SD	10,6	10,0	11,1	8,7	7,9	8,1	10,2	7,6	8,9	7,9	7,6	6,7	7,8	10,4
SEM	3,2	3,0	3,3	2,6	2,3	2,5	3,4	2,3	2,7	2,4	2,3	2,0	2,3	3,5
95% CI	122,1- 136,2	122,9- 136,2	120,6- 135,3	121,3- 132,8	122,8- 133,0	124,0- 134,8	120,2- 132,9	74,8- 84,9	76,5- 88,4	74,9- 85,4	75,2- 85,3	75,5- 84,4	74,5- 84,8	69,2- 82,1

SD= Standardabweichung, SEM= Standardfehler des Mittelwerts, 95% CI= 95%Konfidenzintervall

Alle Werte zeigten beim Kolmogorov- Smirnov Test mit $p > 0,05$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung.

Tabelle 2: Herzfrequenz (HF) der Verumgruppe (Schläge/ min, n=12 Probanden)

	HF_0 Verum	HF_1 Verum	HF_2 Verum	HF_3 Verum	HF_4 Verum	HF_5 Verum	HF_6 Verum
Mean	67,9	66,6	63,1	60,6	67,7	68,6	63,6
SD	10,3	9,6	10,5	10,2	8,7	8,3	9,5
SEM	3,0	2,8	3,0	2,9	2,5	2,4	2,8
95% Co- Int	61,4- 74,4	60,5- 72,7	56,4- 69,7	54,1- 67,1	62,1- 73,2	63,3- 73,8	59,7- 71,8

Alle HF Werte zeigten beim KS- Test innerhalb der Verumgruppe mit $p > 0,05$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung. Die Messintervalle der Herzfrequenz entsprechen denen des Blutdrucks (siehe vorige Seite).

Tabelle 3: Herzfrequenz der Verum- und der Placebogruppe (Schläge/ min, n=6 Probanden)

	HF_0 Verum	HF_1 Verum	HF_2 Verum	HF_3 Verum	HF_4 Verum	HF_5 Verum	HF_0 Placebo	HF_1 Placebo	HF_2 Placebo	HF_3 Placebo	HF_4 Placebo	HF_5 Placebo
Mean	67,9	66,6	63,1	60,6	67,6	68,5	65,8	67,3	65,7	64,8	66,4	68,8
SD	9,8	9,2	10	9,8	8,3	6,0	8,6	8,5	9,6	5,9	7,9	8,3
SEM	3,9	3,8	3,9	3,7	2,9	2,5	4,8	3,9	3,8	4,3	2,7	3,6
95% Co- Int	58,9- 78,8	59,1- 78,4	54,7- 75,0	53,7- 72,8	62,7- 77,8	65,1- 77,8	55,9- 80,3	55,9- 75,7	57,5- 77,1	54,7- 76,7	58,0- 71,7	57,3- 75,5

VI.2.2. Renale HämodynamikTabelle 4: Glomeruläre Filtrationsrate (in ml/min/1,73m²) und Renaler Plasmafluß (in ml/min/1,73m²) der Verumgruppe

	GFR_1 Verum	GFR_2 Verum	GFR_3 Verum	GFR_4 Verum	GFR_5 Verum	RPF_1 Verum	RPF_2 Verum	RPF_3 Verum	RPF_4 Verum	RPF_5 Verum
Mean	113,8	104,6	116,4	110,5	126,8	570,3	493,8	535,9	516,4	568,3
SD	40,5	37,7	41,9	29,2	24,7	156,5	100,2	226,7	189,5	201,8
SEM	12,2	11,4	12,6	8,8	7,5	47,2	34,0	68,4	57,1	60,8
95% Co-Int	86,9- 140,7	79,8- 129,6	88,6- 144,2	91,1- 129,9	110,4- 143,2	466,4- 674,1	418,9- 568,7	385,5- 686,4	390,7- 642,2	434,4- 702,2

Einige der GFR Werte der Verum- Gruppe zeigen beim Kolmogorov- Smirnov Test mit $p < 0,05$ keine gute Anpassung an die Normalverteilung.

Die Glomeruläre Filtrationsrate und der Renale Plasmafluß wurde innerhalb der Messintervalle jeweils halbstündlich gemessen und arithmetisch gemittelt. Die Messintervalle der Glomeruläre Filtrationsrate und der Renale Plasmafluß setzten sich wie folgt zusammen. Meßintervall_1: 9.00-10.30, Meßintervall_2:10.30-11.30, Meßintervall_3:11.30-12.30, Meßintervall_4:12.30-13.30, Meßintervall_5: 13.30-14.30.

VI.2.3. NO und cGMP

Die Messintervalle für Stickstoffmonoxid und das cGMP der Verum und der Placebogruppe setzten sich wie folgt zusammen.

Messintervall 1: 10.30, Messintervall 2: 11.30, Messintervall 3: 12.30, Messintervall 4: 13.30, Messintervall 5: 14.30.

Tabelle 5: NO (in $\mu\text{mol/L}$) der Verumgruppe (n=12)

	NO_1 Verum	NO_2 Verum	NO_3 Verum	NO_4 Verum	NO_5 Verum
Mean	49,7	50,7	51,1	63,8	53,0
SD	17,3	19,7	11,8	27,8	20,3
SEM	5,0	5,7	3,5	8,2	5,9
95% Confidenz- Intervall	38,7- 60,7	38,8- 63,3	35,1 58,6	46,1- 81,4	40,1- 65,9

Alle Werte zeigten beim KS- Test mit $p > 0,05$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung.

Tabelle 6a: Analyse der cGMP (in nmol) der Verumwerte (n=11)

	cGMP_1 Verum	cGMP_2 Verum	cGMP_3 Verum	cGMP_4 Verum	cGMP_5 Verum
Mean	3,02	3,68	6,31	6,83	2,67
SD	2,3	2,9	4,9	5,4	1,8
SEM	0,68	0,88	1,48	1,62	0,52
95%Konfidenz-Intervall	1,5- 4,5	1,7- 5,7	3,0- 9,6	3,2- 10,5	1,6- 4,0

Alle cGMP Werte der Verumgruppe mit n=11 Probanden zeigen beim Kolmogorov- Smirnov Test mit $p>0,05$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung.

Tabelle 6b: cGMP Verlaufswerte der Verum- und der Placebogruppe (in pmol/ml; mit je n=6)

	cGMP_1 Verum	cGMP_2 Verum	cGMP_3 Verum	cGMP_4 Verum	cGMP_5 Verum	cGMP_1 Placebo	cGMP_2 Placebo	cGMP_3 Placebo	cGMP_4 Placebo	cGMP_5 Placebo
Mean	3,6	4,6	8,5	9,2	2,4	9,6	10,4	9,3	6,7	8,2
SD	2,5	3,6	5,7	6,4	2,1	4,5	6,0	4,1	2,9	2,9
SEM	1,0	1,5	2,3	2,6	0,9	1,8	2,5	1,7	1,2	1,2
95%Confindenz-Intervall	0,9- 6,2	0,8- 8,4	2,5-14,5	2,5- 15,9	0,2- 4,7	4,9- 14,4	4,1- 16,7	4,9- 13,6	3,6- 9,8	5,1- 11,3

In der folgenden Varianzanalyse der Verum- und Placebogruppe mit je 6 Probanden, zeigen beim KS- Test mit $p>0,05$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung.

Tabelle 7: cGMP- Werte in Prozent des Ausgangswertes der Verum- und der Placebogruppe (in %, mit je n=6)

	cGMP_1 in %, Verum	cGMP_2 in %, Verum	cGMP_3 in %, Verum	cGMP_4 in %, Verum	cGMP_5 in %, Verum	cGMP_1 in %, Placebo	cGMP_2 in %, Placebo	cGMP_3 in %, Placebo	cGMP_4 in %, Placebo	cGMP_5 in %, Placebo
Mean	100	216,1	271,2	297,0	103,7	100	109,4	107,1	80,9	98,9
SD	0	213,9	75,9	82,6	70,4	0	38,6	50,4	42,5	48,9
SEM	0	87,3	31,0	33,7	28,7	0	15,8	20,6	17,3	20
95% Confidenz-Intervall	100-100	8.4-440,5	191,6-350,8	210,4-383,7	29,8-177,6	100- 100	68,9-150,0	54,2-160,0	36,3-125,5	47,6-150,2

Auch in der Varianzanalyse in Prozent des Ausgangswertes der Verum- und der Placebogruppe zeigen alle cGMP Werte der Verum- und Placebo Gruppe beim Kolmogorov- Smirnov Test mit $p > 0,05$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung.

Tabelle 8: NO im Urin (Exkretion, $\mu\text{mol}/30\text{min}$) und cGMP im Urin ($\text{nmol}/30\text{min}$)

	Urin- NO Verum vorher	Urin- NO Verum nacher	Urin- cGMP Verum vorher	Urin- cGMP Verum nacher
Mean	93,6	71,2	15,1	16,5
SD	51,6	44,1	7,3	11,3
SEM	14,9	12,7	2,1	3,3
95% Confidenz-Intervall	60,8- 126,4	43,2- 99,3	10,5- 19,7	9,3- 23,6

Die NO Werte des Urins der Verum Gruppe zeigten beim Kolmogorov- Smirnov Test mit $p < 0,05$ keine gute Anpassung an die Normalverteilung.

VI.2.4. Hormone- Renin, BNP, Aldosteron EPO

Renin, Aldosteron und EPO der Verum und Placebogruppe wurden in Messintervall 1: 10.30 und Messintervall 2: 13.30 abgenommen. Das BNP wurde im Messintervall 1: 8.00 und im Messintervall 2: 14.15 abgenommen.

Tabelle 9: Reninwerte der Verumgruppe (n=11 in ng/ml/h) und Varianzanalyse der Verum- und Placebogruppe (je n=6)

	Renin_1 Verum n=11	Renin_2 Verum n=11	Renin_1 Verum n=6	Renin_2 Verum n=6	Renin_1 Placebo n=6	Renin_2 Placebo n=6
Mean	2,0	2,5	2,1	2,9	2,0	2,2
SD	1,5	1,3	1,2	1,1	1,3	1,3
SEM	0,4	0,4	0,5	0,4	0,5	0,5
95% Co- Int	1,1- 3,0	1,7- 3,4	0,9- 3,4	1,8- 4,0	0,6- 3,4	0,9- 3,6

Die Reninwerte der Verumgruppe n=11 zeigen beim KS-Test mit $p > 0,05$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung.

Tabelle 10: BNP (n=12, n=6 in ng/ml) und Epo (n=10, n=6 in mU/ml) der Verum und Placebogruppe

	BNP_1 Verum n=12	BNP_2 Verum n=12	BNP_1 Placebo n=6	BNP_2 Placebo n=6	Epo Verum vorher n=10	Epo Verum nacher n=10	Epo Placebo Vorher n=6	Epo Placebo nacher n=6
Mean	1,17	2,25	2,67	5,17	8,7	8,1	5,0	5,0
SD	0,55	2,42	3,73	8,45	6,4	6,2	1,9	1,3
SEM	0,17	0,73	1,67	3,78	2,0	2,0	0,9	0,6
95% Co- Int	0,8- 2,9	0,7- 2,7	---	---	4, 2- 13,3	3,7- 12,6	2,9- 12,0	3,6- 13,9

Tabelle 11: Aldosteron (in pg/ml; n=11) der Verum und Placebogruppe

	Aldosteron Verum Vorher	Aldosteron Verum Nacher	Aldosteron Placebo Vorher	Aldosteron Placebo Nacher
Mean	81,7	79,8	93,0	89,8
SD	36,9	37,4	28,1	31,6
SEM	11,1	11,3	12,6	14,1
95% Co- Int	57,0- 107,0	54,6- 104,9	65,4- 237,0	58,7- 219,1

Die Aldosteron und Epowerte der Verum Gruppe zeigen mit $p > 0,10$ eine gute Anpassung an die Normalverteilung.

VI.2.5 Natrium, Kalium und Hämatokrit

Die fraktionierte Na^+/K^+ Clearance der Gruppen setzten sich aus Messintervall1: 9.15-10.15, Messintervall2:10.15- 11.15, Messintervall3: 11.15-12.15, Messintervall4: 12.15-13.15, Messintervall 5:13.15-14.15. Die Messintervalle für den Hämatokrit, waren: Messintervall1: 8.00, Messintervall2: 11.45, Messintervall3: 20.00.

Tabelle 12: Fraktionelle Natrium- und Kalium Clearance und Hämatokrit (jeweils in %)

	Na_1 Verum	Na_2 Verum	Na_3 Verum	Na_4 Verum	Na_5 Verum	K_1 Verum	K_2 Verum	K_3 Verum	K_4 Verum	K_5 Verum	Hkt_1 Verum	Hkt_2 Verum	Hkt_3 Verum
Mean	1,8	2,0	1,7	1,8	1,7	17,4	21,2	24,8	21,8	16,3	42,1	40,4	40,3
SD	0,7	1,1	0,5	0,7	0,4	10,6	10,6	15,6	8,4	6,3	2,2	2,2	2,5
SEM	0,2	0,3	0,2	0,2	0,1	3,0	3,0	4, 5	2,4	1,8	0,7	0,7	0,8
95% Co- Int	1,3-2,2	1,2-2,7	1,4-2,0	1,3-2,3	1,4-2,0	10,7-24,1	14,5-27,9	14,9-34,7	16,5-27,2	12,3-20,3	40,5-43,6	38,7-42,1	38,7-42,

Einige Natrium- und Kalium-Werte zeigten beim KS- Test mit $p < 0,05$ keine gute Anpassung an die Normalverteilung.

VI.3. Literaturnachweis

ALDERTON, Wendy. K.; COOPER, Chris E.; KNOWLES, Richard G. (2001)
Nitric oxide synthases: structure, function und inhibition.
Biochem. J. (2001) 357, 593- 615

ALP, N.J.; McATTEER, M.A.; KHOO, J.; CHOUDHURY, R.P.; CHANNON, K.M.
(2004)
Increased endothelial tetrahydrobiopterin synthesis by targeted transgenic GTP-
cyclohydrolase I over expression reduces endothelial dysfunction and
atherosclerosis in ApoE- knockout mice
Thromb Vasc Biol 2004 Mar; 24(3): 445-50

ANASTASIADIS; P.Z., BEZIN, L., IMERMAN, B.A., KUHN, D.M., LOUIE, M.C.
and LEVINE, R.A. (1997)
Eur. J. Neurosci. 9, 1831-1837
Arch. Intern. Med. 144, 2037- 2041, 1997

ARNAL, J.F.; DINH-XUAN A.T.; PUEYO, M.; DARBLADE, B.; RAMI, J. (1999)
Endothelial derived nitric oxide and vascular physiology and pathology.
Cell Mol Life Sci 1999 Jul; 55 (8-9):1078-87

AUSIELLO, D.A., KREISBERG, J.I., ROY, C., KARNOVSKY, M.J. (1980)
Contraction of cultured rat glomerular cells of apparent mesangial origin after
stimulation with angiotensin- II and arginine vasopressin
J. Clin. Invest. 65, 754-760

BACHMANN, S.; BOSSE, H.M.; MUNDEL, P. (1993)
Topography of nitric oxide synthesis by localizing constitutive NO synthases in
mammalian kidneys.
Am J. Physiol. 1995 May 268, (5 PT 2): F885- 98

BARFORD PA, BLAIR JA, EGGAR C, HAMON C, MORAR C, WHITBURN SB.
(1984)
Tetrahydrobiopterin metabolism in the temporal lobe of patients dying with
senile dementia of Alzheimer type.
J Neurol Neurosurg Psychiatry. 1984 Jul; 47(7):736-8.

BARNER, C; SORIANO, G, THOMAS, A; et al. (1993)
Increased serum nitrite and nitrate levels in patients with cirrhosis: relationship
to endotoxemia.
Hepatology 1993; 18: 1139-43

BAUDOUIIN, SV; BATH, P; MARTIN, FJ; DUBOIS, R; EVANS, T.W. (1993)
L- arginin infusion has no effect on systemic haemodynamics in normal
volunteers, or systemic and pulmonary haemodynamics in patients with
elevated pulmonary vascular resistance.
BR J Pharmacol 1993; 36:45-9

BAYLIS, C.; COLLINS, R.C. (1986)
Angiotensin- II inhibition on blood pressure and renal hemodynamics in pregnant rats.
Am J Physiol.1986; 250:F308-F314

BAYLIS, C.; FREDERICKS, M.; WILSON, C.; MUNGER, K.; COLLINS, R.C. (1990)
Renal vasodilatory response to intravenous glycine in the aging rat kidney.
Am J Kidney Dis. 1990; 15:244- 251,

BEIERWALTES, W.H. (1997)
Macula densa stimulation of renin is reversed by selective inhibition of neuronal nitric oxide synthase.
Am J Physiol 272, Regulatory Integrative Comp Physiol41, R1359±R1364, 1997

BLANTZ, R.C.; THOMSON, S.C.; PETERSON, O.W., and GABBAI, F.B. (1990)
Physiologic adaptations of tubuloglomerular feedback mechanism.
Kidney Int.38:577-583,1990

BLAU Nenad (1994).
Selektives Screening auf angeborene Stoffwechselerkrankungen: Differentialdiagnose der Hyperphenylalaninien.
Labolife Nr. 5/94

BLAU Nenad; BLASKOVICS M; DURAN, M (1996).
Hyperphenylalaninemia. Physician` s guide to the laboratory diagnosis of metabolic diseases.
London: Chapman & Hall S.65-78.

BOTTIGLIERI, T., HYLAND, K., LAUNDRY, M., GODFREY, P., CARNEY, M.W.P., TOONE, B.K. and REYNOLDS, E.H. (1992)
Folate deficiency, bipterin and monoamine metabolism in depression.
Psychol Med. 1992 Nov; 22(4):871-6.

BRAAM, B.; MITCHELL, K.D.; KOOMANS, H.A.; and NAVAR. (1993)
Relevance of the tubuloglomerular feedback mechanism in pathophysiology.
J Am Soc Nephrol. 1993 Dec; 4(6):1257-74

BRAAM, Branko (1999)
Renal endothelial and macula densa NOS: integrated response to changes in extracellular fluid volume
Am J Physiol. 276 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 45): R1551-R1561, 1999

- BRIGGS, J.P. and SCHNERMANN, J. (1995)
Control of renin release and glomerular vascular tone by the juxtaglomerular apparatus.
Hypertension: Pathophysiology. Diagnosis and Management, edited by Laragh JH and Brenner BM. New York: Raven, 1995, p.1359-1384
- CHEN, Pei- Feng; TSAI, Ah- Lim and WU, Kenneth K. (1995)
Cystein 99 of Endothelial Nitric oxide synthase (NOS-III) is critical for Tetrahydro-biopterin-dependent NOS-III stability and Activity
Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.215, No.3, October 24, 1995, Pages 1119-1129
- CONRAN, N.; ORESCO-SANTOS, C.; ACOSTA, H.C.; FATTORI, A.; SAAD, S.T. ; COSTA, F. F. (2004)
Increased soluble guanylate cyclase activity in the RBCs of sickle cell patients.
Br J Haematol. 2004; 124: 547- 54.
- CONSENSUS Trial Study Group (1987)
Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure. Results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS). The. N Engl J Med. 1987 Jun 4; 316(23):1429-35.
- CURTIUS, H.C., NIEDERWIESER,A., LEVINE, R., LOVENBERG,W., WOGGON, B. ANGST, J. (1983)
Successful treatment of depression with tetrahydrobiopterin.
Lancet. 1983 Mar 19; 1(8325):657-8.
- CURTIUS, H.C., NIEDERWIESER, A., LEVINE, R., and MULDER, H. (1984)
Therapeutic efficacy of tetrahydrobiopterin in Parkinson's disease.
Adv Neurol 1984; 40: 463 466
- COSENTINO, Francesco ; PATTON, Stephen; D'USCIO, Livius V. ; WERNER, Ernst R.; WERNER- FELMAYER, Gabriele; MOREAU, Pierre; MALINSKI, Tadeusz and LÜSCHER, Thomas F. (1998)
Tetrahydrobiopterin Alters Superoxide and NO Release in Prehypertensive Rats
J. Clin. Invest., 1998; 101: 1530–1537
- CASTELLINO P, CODA, B.; De FRONZO, R.A. (1986)
Effect of amino acid infusion on renal hemodynamics in humans.
Am J Physiol. 1986; 251: F132-F140.
- DE LEEUW, P.W.; KHO, T.L.; FALKE, H.E.; BRKENHÄGER W.H.; WESTER, A. (1978)
Haemodynamic and endocrinological profile of essential hypertension;
Acta Med. Scand. 204 (Suppl. 622), 1-86

DOYAMA K, FUKUMOTO M, TAKEMURA G, TANAKA M, ODA T, HASEGAWA K, et al. (1998)
Expression and distribution of brain natriuretic peptide in human right atria. J Am Coll Cardiol 1998; 32(7):1832-8.

DREXLER, H.; HORNIG, B. (1999)
Endothelial dysfunction in human disease
Journal of molecular and cellular cardiology, 1999 Jan; 31(1)51-60

DZAU, V.J. (1986)
Significance of the vascular renin-angiotensin pathway
Hypertension 8, 553-559, 1986

DZAU, V. J., PRATT, R. E. (1986)
Renin- Angiotensin System: biology, physiology, and pharmacology, 1631-1662
in: Fozzard, H.A., Haber, E., Jennings, R. B., Katz, A.M., Morgan, H. E.:
The heart and cardiovascular system (scientific Foundations),
Volume 2 1. Auflage, Raven Press, New York F885-98, 1986

FENOY, F. J., FERRER, P., CARBONELL; L. und GARCIA-SALOMON (1995).
Role of nitric oxide on papillary blood flow and pressure natriuresis.
Hypertension 25:408-14, 1995

FERNELL, E., WATANABE, Y., Adolfsson, I., TANI,Y.; BERGSTRÖM, M.; HARTVIG,P.; LILJA, A.; von KNORRING, A.; GILLBERG, C. and LANGSTRÖM, B. (1997)
Dev. Med. Child. Neurol. 39, 313-318, 1997

FOLKERINGA, R.J.; VAN KRAAIJ, D.J.; TIELEMAN, R.G.; NIEMAN, F.H.; PINTO, Y.M.; CRIJNS, H.J. (2006)
Statins associated with reduced mortality in patients admitted for congestive heart failure.
J Card Fail. 2006 Mar; 12(2):134-8.

FÖRSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE,M. SCHWARZ,P.; GATH, I.; KLEINERT, H. (1994)
Nitric oxide synthase isoenzymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions
Hypertension 1994; 23(6 Pt 2):1121-1131

FUKADA, Y., TERAGAWA, H.; MATSUDA, K.; YAMAGATA, T.; MATSUURA, H.; und CHAYAMA, K. (2002).
Tetrahydrobiopterin restores endothelial function of coronary arteries in patients with hypercholesterolemia
Heart 87:264-269; 2002

- FURCHGOTT, R.F.; VANHOUTTE, P.M. (1989)
Endothelium-derived relaxing and contracting factors.
FASEB J 1989 Jul; 3(9): 2007-18
- FURCHGOTT R.F. (1995)
A research trail over half a century.
Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1995; 35: 1-27
- FURCHGOTT R.F.; ZAWADZKI J.V. (1980)
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.
Nature 1980 Nov 27;288(5789):373-6
- FRANKLIN, H., EPSTEIN, M.D. (1993)
The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway.
The New England Journal of Medicine 1993 Dec, 2003-11
- GIRNDT, J. (1990)
Hochdruckkrankheiten, 243-277 in Girndt, J.
Nieren- und Hochdruckkrankheiten
1. Auflage., Schattauer Verlag, Stuttgart, New York,
- GÓMEZ, D.M. (1951)
Evaluation of renal resistances, with special reference to changes in essential hypertension
J. Clin. Invest. 30, 1143-1155, 1951
- GREMINGER, P., VETTER, W., SIEGENTHALER, W. (1994)
Blutdruck, 535-550
in Siegenthaler, W.: Klinische Pathophysiologie;
7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart- New York, 1994
- GRYLEWSKI, R.J.; PALMER, R.M.J.; and MONCADA, S. (1986)
Superoxide anion is involved in breakdown of endothelium-derived vascular relaxation factor
Nature 320: 454-456, 1986
- HE, X.R.; GREENBERG, S.G.; BRIGGS, J.P.; SCHNERMANN, J.B. (1995)
Effect of nitric oxide on renin secretion. II. Studies in the perfused juxtaglomerular apparatus.
Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol 1995; 268: F953–F959.
- HEINZEL B.; JOHN, M.; KLATT P.; BÖHME E.; MAYER, B. (1992)
Ca²⁺/ Calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase.
Biochem J (1992) 281: 627-30

HEITZER T.; KROHN K.; MEINERTZ T. (2000)
BH4 improves endothelium-dependent vasodilation increasing nitric oxide activity in patients with Type II diabetes mellitus,
Diabetologia (2000) 43: 1435-1438

HEROLD G. (1997)
Endokrinologie, p. 576-643
In Herold G., *Innere Medizin* Herausgeber Dr. Gerd Herold

HICK, C. (1996)
Physiologie- Kurzlehrbuch zum Gegenstandskatalog 1, 1. Auflage
Jungjohann Verlagsgesellschaft, Neckarsulm, Lübeck, Ulm

Hyland (1985)
Estimation of tetrahydro-, dihydro- and fully oxidised pterins by high-performance liquid chromatography using sequential electrochemical and fluorometric detection
J Chromatogr. 1985 Sept 13; 343(1):35-41

HONG- JYE HONG, GEORGE HSIAO; TZU- HURNG CHENG; MAO- HSIUNG YEN (2001)
Supplementation with Tetrahydrobiopterin Suppresses the Development of Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats
Hypertension 2001; 38: 1044-8

ISHII Masakazu, SHIMIZU Shunichi, SHIOTA Kazuhiro, Shinichiro Yamamoto, KIUCHI Yuji, YAMAMOTO Toshinori. (2003)
Stimulation of Tetrahydrobiopterin synthesis by cyclosporin A in mouse brain microvascular endothelial cells.
The International Journal of Biochemistry and Cell biology 34 (2003) 1134-1141

JIN, X.H., SIRAGY, H.M.; CAREY, R.M. (2001)
Renal intestinal c GMP mediates natriuresis by direct tubule mechanism
Hypertension 2001 Sep; 38(3):309-16

KAKOKI, M.; ZOU, A.P.; MATTSON D.L. (2001)
The influence of NOS 1 on blood flow and interstitial nitric oxide in the kidney.
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2001 Jul; 281(1): R91-7

KAUFMAN S, BERLOW S, SUMMER GK, MILSTIEN S, SCHULMAN JD, ORLOFF S, SPIELBERG S, PUESCHEL S. (1978)
Hyperphenylalaninemia due to a deficiency of biopterin. A variant form of phenylketonuria.
N Engl J Med. 1978 Sep 28; 299(13):673-9.

- KAROW, T.; LANG, R. (1999)
Einführung NO/ Nitrate.
Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 126- 126a.
7. Aufl. T. Karow und R. Lang, Köln, 1999
- KEETON, T.K., CAMPBELL, W.B. (1981)
The pharmacologic alteration of renin release.
Pharmacol. Rev. 31, 81-227, 1981
- KELM, H. (1996)
Kardiovaskuläre Wirkungen von Stickstoffmonoxid und ihrer Bedeutung für die arterielle Hypertonie
Schattauer, Stuttgart, New York 1996: 120-2
- KELM, M.; FEELISCH, M.; GRUBE, R.; MOTZ, W.; STRAUER, B.E. (1992)
Metabolism of endothelium-derived nitric oxide in human blood.
In Moncada, S.; Marletta, M.; Higgs, J.B.; Higgs, E.A., eds. The biology of nitric oxide. Vol 1. London: Portland Press 1992: 319-22
- 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.; KELM, M. (2005)
Red blood cells express a functional endothelial nitric oxide synthase.
Blood 2006 Apr 1; 107(7): 2943- 51. Epub 2005 Dec 20.
- KIRK, S.J.; REGAN, M.C.; BARBUL, A. (1990)
Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide.
Biochem Biophys Res Commun 1990; 173:660-5
- KLETT, C., PAUL, M., HACKENTHAL, E., GANTEN, D. (1993)
Pathophysiologie des Renin- Angiotensin-Systems, 9-74
in: Bönner, G., Rahn, K.H.: ACE- Hemmer Handbuch
1. Aufl., Schattauer Verlag, Stuttgart, New York,
- KOJIMA, S.; ONA, S.; LIZUKA, I.; ARAI, T.; MORI, H. and KUBOTA, K. (1995)
Antioxidative activity of 5,6,7,8-tetrahydrobiopterin and its inhibitory effect on induced cell toxicity in cultured rat hepatocytes.
Free Radical 1995; Res. 23: 419-430
- KONE, B.C. and BAYLIS, C. (1997)
Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide in the normal kidney.
Am J Physiol Renal Physiol 272: F561- 578, 1997

LUCAS, K.A.; PITARI, G.M.; KAZEROUNIAN, S., RIUZ-STEWART, I., PARK, J., SCHULZ, S., CHEPENIK, K.P., WALDMAN, S.A. (2000)
Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP.
Pharmacological reviews. 2000, 52:375-413.

LYALL, F.; GIBSON, J.L.; GREER, I.A.; BROCKMAN, D.E.; EIS, A.L.; MYATT, L. (1998).
Increased nitrotyrosine in the diabetic placenta: evidence for oxidative stress.
Diabetes Care 21:1753-1758

MAIER, W.; COSENTINO, F.; LÜTOLF R.B., FLEISCH, M., SEILER, C., HESS O.M., MEIER, B. UND LÜSCHER, T.F. (2000)
Tetrahydrobiopterin improves endothelial function in patients with coronary artery disease
J Cardiovasc Pharm 35: 173-8

MEININGER, C.J.; MARINOS, R.S.; HATAKEY, K.; MARTINEZ- ZAGUILAN, R.; ROJAS, J.D.; KELLY, K.A. und WU, G. (2000).
Impaired nitric oxide production in coronary endothelial cells of the spontaneously diabetic BB rat is due to Tetrahydrobiopterin deficiency. Biochem J 349:353-6.

MILSTEIN S., KATUSIC Z., (1999)
Oxidation of tetrahydrobiopterin by peroxynitrate: implications for vascular endothelial function.
Biochem Biophys Res Commun 263:681-684

MITNAUL LJ, SHIMAN R. (1995)
Coordinate regulation of tetrahydrobiopterin turnover and phenylalanine hydroxylase activity in rat liver cells.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 Jan 31;92(3):885-9.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; HIGGIS, E.A. (1991)
Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology.
Pharmacol Rev. 1991;43:109-142

MORRISSEY, J.J.; McCracken, R.; KANETO, H.; VEHASKARI, M.; MONTANI, D.; KLAHR, S. (1994)
Location of an inducible nitric oxide synthase mRNA in the normal kidney.
Kidney Int 1994; 45:998-1005

MUNDEL, P.; BACHMANN, S.; BADER, M.; KUMMER, W.; MAYER, B. and KRIZ, (1992).
Expression of nitric oxide synthase in kidney macula densa cells.
Kidney Int 42, 1017±1019.

MUNZEL, T. ; DAIBER, A. ; MULSCH, A. (2005)
Explaining the phenomenon of nitrate tolerance.
Circ Res. 2005; 97:618-28.

NAKAO K, MUKOYAMA M, HOSODA K, SUGA S, OGAWA Y, SAITO Y, et al.
(1991)
Biosynthesis, secretion, and receptor selectivity of human brain natriuretic peptide.
Can J Physiol Pharmacol 1991;69(10):1500-6.

NAVAR L.G.; INSCHO E.W.; MAJID S.A., IMIG D.J.; HARRISON- BERNARD L.M.; MITCHELL K.D. (1996)
Paracrine regulation of the renal microcirculation.
Physiol Rev.1996 Apr: 76(2):425-536

OLLERSTAM,A.; SKØTT, O.; EK, J.; PERSSON, A.E.G. and THORUP,C .
(2001)
Effects of long-term inhibition of neuronal nitric oxide synthase on blood pressure and renin release
Acta Physiol Scand 2001, 173, 351±358

PALMER R.M.; FERRIGE A.G.; MONCADA S. (1987)
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium- derived relaxing factor.
Nature 1987 Jun 11-17; 327(6122):524-6

PEI- FENG CHEN, AH-LIM TSAI and KENNETH K. WU (1995)
Cysteine 99 of Endothelial Nitric Oxide Synthase (NOS-III) is critical for Tetrahydrobiopterin-dependent NOS-III stability and activity
Biochemical and Biophysical Research Communications Vol.215, No.3, 1995, October 24, 1995, p. 1119-1129;

PERSSON, A. E. G . ; GUTIERREZ , A . ; PITTNER , J ; RING , A ; OLLERSTAM , A . ; BROWN, R. ; LIU, R . and THORUP, C . (2000)
Renal NO production and the development of hypertension
Acta Physiol Scand 2000, 168, 169-174

PERSSON, A.E.G.; BROWN, R. ; LIU, R. and OLLERSTAM, A. (2002)
Nitric oxide modulates and adenosine mediates the tubuloglomerular feedback mechanism
Acta Physiol Scand 2002, 176, 91–94)

QIU, Chanbin; ENGELS, Kevin ; SAMSELL, Lennie; BAYLIS, Chris (1995)
Renal Effects of Acute Amino Acid Infusion in Hypertension Induced by Chronic Nitric Oxide blockade
Hypertension 1995; 25(1): 61-66

- RANDOMSKI, M.W.; MONCADA, S. (1991)
Biological role of NO in platelet function. In: Moncada; Higgs, Berrazuete;
eds. Clinical relevance of nitric oxide in the cardiovascular system.
EPICOMLET 1991: 45- 56
- RE, R.N.(1984)
Cellular biology of the renin- angiotensin systems
Arch. Intern. Med. 144, 2037-2041, 1984
- REID, I.A. (1985)
The renin- angiotensin system and body function
Arch. Intern. Me. 145, 1475-1479, 1885
- ROE, J.H.; EPSTEIN, J.H.; GOLDSTEIN, N.P. (1949)
A photometric method for the determination of inulin in plasma and urine.
J Biol Chem 1949; 178: 839-45.
- ROSSI, G. P.; SACCKETTO, A.; CESARI, M.; PESSINA, A. C. (1999)
Interactions between endothelin- I and the renin- angiotensin- aldosterone
system.
Cardiovascular Research 43, 1999, 300-307
- RUBANYI, G.M. and VANHOUTTE, P.M.; (1986)
Superoxide anions and hypoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor
Am J Physiol Heart Circ Physiol 250: H822- H827, 1986
- SCHAFFNER, Andreas; BLAU, Nenad; SCHNEEMANN, Markus; STEURER,
Johann; EDGELL, Cora-Jean S.; and SCHOEDON, Gabriele. (1994)
Tetrahydrobiopterin as another EDRF in man.
Biochemical and Biophysical Research Communications, Vol.205, No.1,1994
November 30, 1994, Pages 516- 523)
- SCHAUB, J.; DAUMLING, S.; CURTIUS, H.C.; NIEDERWIESER, A.;
BARTHOLOME, K.; VISCONTINI, M.; SCHIRCKS, B.; and BIERI, J.H. (1978)
Tetrahydrobiopterin therapy of atypical phenylketonuria due to defective
dihydrobiopterin biosynthesis
Arch. Dis. Child. 1978; 53: 674-676.
- SCHMIDT, H.H.H.W.; LOHMANN, S.M.; WALTER, S.U. (1993)
The Nitric oxide and cGMP signal transduction system: regulation and
mechanism of action.
Biochem Biophys Acta. 1993,1178:153-175
- SCHMIDT, H.H.H.W.; HOFMANN, H.; SCHINDLER, U.; et al. (1996)
No NO from NO synthase.
Proc. Natl Acad Sci USA. 1996, 93: 14492-14497

SCHMIDT; THEWS; LANG; (2000 a)
Physiologie des Menschen, 28. Auflage 2000,
Springer Verlag Berlin Heidelberg p.396

SCHMIDT; THEWS; LANG; (2000 b)
Physiologie des Menschen, 28. Auflage 2000,
Springer Verlag Berlin Heidelberg p. 405, 420, 765

SCHNACKENBERG, C. (2002)
Physiological and pathophysiological roles of oxygen radicals in the renal microvasculature
AM J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol 282:R335-R342,2002

SCHNERMANN, J.; BRIGGS, J.P.; and WEBER, P.C. (1984)
Tuberglomerular feedback, prostaglandins, and angiotensin in the autoregulation of glomerular filtration rate.
Kidney Int. 25:53-64,1984

SCHNERMANN, J. (1988)
Effect of adenosine analogues on tubuloglomerular feedback responses.
Am J Physiol 255,F33–F42, 1988

SCHRICKER, K., B. POTZL, M. HAMANN, AND A. KURTZ (1996)
Coordinate changes of renin and brain-type nitric-oxide-synthase (b-NOS) mRNA levels in rat kidneys.
Pflügers Arch. 432: 394–400,1996.

SCHOEDON, Gabriele; SCHNEEMANN, Markus; HOFER, Simone; GUERRERO, Lourdes; BLAU, Nenad; SCHAFFNER, Andreas (1993)
Regulation of the L-arginine-dependent and tetrahydrobiopterin-dependent biosynthesis of nitric oxide in murine macrophages
Eur J. Biochem. 213, 833- 839, 1993

SCHOEDON, Gabriele. (1997)
Inhalation of the Nitric Oxide Synthase Cofactor Tetrahydrobiopterin in Healthy Volunteers.
Am J Respir Crit Care Med Vol 156. pp 2006–2010, 1997

SCHULZ, R.; NAVA, E.; MONCADA, S. (1992)
Induction and potential biological relevance of a Ca^{2+} -independent nitric oxide synthase in the myocardium.
Br J Pharmacol 1992; 105: 575- 80

SCHWARTZ, D.; MENDONCA, M.; SCHWARTZ, I.; XIA, Y.; SATRIANO, J.; WILSON, C.B.; and BLANTZ, R.C. (1997)
Inhibition of constitutive nitric oxide synthase (NOS) by nitric oxide generated by inducible NOS after lipopolysaccharide administration provokes renal dysfunction in rats. J. Clin. Invest. 100:439-448, 1997

SWEDBERG, K.; KJEKSHUS, J. (1988)

Effects of enalapril on mortality in severe congestive heart failure: results of the Cooperative North Scandinavian Enalapril Survival Study (CONSENSUS).
Am J Cardiol. 1988 Jul 11;62(2):60A-66A.

SEIJI UEDA; HIDEHIRO MATSUOKA; HIROSHI MIYAZAKI; MICHIAKI USUI;
SEIYA OKUDA; TSUTOMU IMAIZUMI (2000)

Tetrahydrobiopterin Restores Endothelial Function in Long-Term Smokers;
Journal of American College of Cardiology, 1999, Vol 35, No.1, 2000; PII
SO735-1097(99)00523-9

SETOGUCHI SOKO, YOSHITAKA HIROOKA, KENICHI ESHIMA, HIROAKI
SHIMOKAWA AND AKIRA TAKESHITA (2002).

Tetrahydrobiopterin improves impaired endothelium- dependent forearm
vasodilation in patients with heart failure.
Journal of Cardiovascular Pharmacology 39:363-368.

SHIRAIISHI, H.; OHTSUKI M.; SUMI-ICHINOSE, C.; NOMURA, T. (2002)

Regulations and pathophysiological significance of the biosynthesis of
tetrahydrobiopterin in human endothel cells
Nippon Yakurigaku Zasshi 2002 Nov; 120(1):73P-75P

SHULTZ, P.J. ; RAIJ, L. (1992)

Endogenously synthesized nitric oxide prevents endotoxin- induced glomerular
thrombosis
J Clin Invest. 1992; 90: 1718-1725

SHULTZ, P.J. ; TOLINS, J.P.(1993)

Adaptation to increased dietary salt intake in rat: role of endogenous NO.
J Clin Invest. 1993; 91: 642- 650

SIGMON, D.H.; BEIERWALTES, W.H. (2000)

Influence of nitric oxide from neuronal NO synthase on glomerular filtration
Gen Pharmacol 2000 Feb, 34(2):95-1000 (ISSN: 0306-3623)

SKØTT, O. and BRIGGS, J.P. (1987)

Direct demonstration of macula densa-mediated renin secretion.
Science 237, 1618±1620, 1987

SMITH, H.W.; GOLDRING, W.; CASIS, H. (1938)

The measurement of the tubular excretory mass, effective blood flow and
filtration rate in the normal human kidney. J Clin Invest 1938;17:263

SOKO SETOGUCHI, YOSHITAKA HIROOKA, KENICHI ESHIMA, HIROAKI
SHIMOKAWA, AND AKIRA TAKESHITA (2002)

Tetrahydrobiopterin improves impaired endothelial- dependent forearm
Vasodilation in patients with heart failure.
Journal of Cardiovascular Pharmacol (2002),39: 363-368

STROES E.S., KASTELEIN J., COSENTINO F., ERKELENS W., WEVER R., KOOMANS H. und LÜSCHER T. (1997).

Tetrahydrobiopterin restores endothelial function in hypercholesterolemia.
J Clin Invest 1997, 99:41-6

STROES E.S., HIJMERING, M., VAN ZANDVOORT, M.; WEVER, R., RABELINK, T.J.; and VAN FAASSEN, E.E. (1998 a).

Origin of superoxide production by endothelial nitric oxide synthase function
FEBS Lett 438:161-164,1998

STROES E.S., VAN FAASSEN E.E.; VAN LONDEN G.J., et al. (1998 b)

Oxygen radical stress in vascular disease: the role of endothelial NO synthase.
J of Cardiovasc Pharmacol 1998,94: 1423-9

TERADA, Y.; TOMITA, K., NONOGUCHI, H. and MARUMO F. (1992)

Polymerase chain reaction localization of constitutive NO synthase and soluble guanylat cyclase messenger RNAs in micro dissected rat nephron segments.
J Clin Invest 90: 659-665, 1992

THÖNY Beate, AUERBACH Günther and BLAU Nenad (2000)

Review Article Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions.
Biochem.J. (2000) 347,1-16)

THOMAS, L (2000)

Labor und Diagnose, 5. erweiterte Auflage 2000
Th- Books, ISBN:3980521532, p. 119-120

THORUP, C., SUNDLER, F., EKBLAD, E. & PERSSON, A.E.G. (1993)

Resetting of the tubuloglomerular feedback mechanism by blockade of NO-synthase.
Acta Physiol Scand 148, 359±360.

THORUP und PERSSON A.E. (1994).

Inhibition of locally produced NO resets tubuloglomerular feedback mechanism.
Am J Physiol 267 (Renal Physiol 36)F606-11

TIEFENBACHER,C.P.; BLEEKE,T.; VAHL,C. AMANN,K.; VOGT,A.; KÜBLER; W. (2000)

Dysfunction of Coronary Resistance Arteries is improved by Tetrahydrobiopterin in Atherosclerosis
Circulation. 2000;102:2172-2179

TIEFENBACHER, C.P. (2001)

Special Medical Editorial: Tetrahydrobiopterin: a critical cofactor for eNOS and a strategy in the treatment of endothelial dysfunction?
Am J Physiol. Heart Circ Physiol 280: H2484- H2488, 2001

- Tietgen, K. (2004)
Bestimmung von Brain Natriuretic Peptide (BNP) bei gesunden Hunden
Dissertation der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig- Maximilians- Universität München
- TOJO, A.; MADSEN, K.M.; and WILCOX, C.S. (1995)
Expression of immunoreactive nitric oxide synthase isoforms in rat kidney: effects of dietary salt and lorsatan
Jpn Heart J36: 389-398, 1995
- TOLINS JP, SHULTZ PJ, RAIJ L, BROWN DM, MAUER SM. (1993)
Abnormal renal hemodynamic response to reduced renal perfusion pressure in diabetic rats: role of NO.
Am J Physiol. 1993;265:F886-F895.
- UEMATSU, M.; OHARA, Y.; NAVAS, J.P.; NISHIDA, K.; MURPHY, T.J.; ALEXANDER, T.W.; NEREM, R.M.; Harrison, D.G. (1995)
Regulation of endothelial cell NO synthase mRNA expression by shear stress.
Am J Physiol 1995 Dec; 269 (6PT1): C1371-8
- VALLOTTON, M.B. (1987)
The renin- angiotensin system.
Trends Pharmacol. Sci. TiPS 8,69-74, 1987
- VASQUEZ-VIVAR, J.; KALAYANARAMAN, B.; MARTASEK, P.; HOGG, N.; MASTERS, B.S.; KAROUI H., TORDO P. und PRITCHARD K.A. (1998).
Superoxide generation by endothelial NO synthase: the influence of cofactors.
Proc Nat Acad Sci USA 95: 9220-9225, 1998
- VAZIRI, N.D.; WANG, X.Q. (1999)
cGMP- mediated negative feedback regulation of endothelial nitric oxide synthase expression by nitric oxide.
Hypertension 1999 Dec; 34(6): 1237-41
- VIDAL, M.J.; ROMERO, J.C.; VANHOUTTE P.M. (1988)
Endothelium- derived relaxing factor inhibits renin release.
Eur J Pharmacol, 1988 May 10; 149 (3): 401-2
- WALSER M, DAVIDSON DG, ORLOFF J. (1955)
The renal clearance of alkali-stable inulin.
J Clin Invest. 1955 Oct;34(10):1520-3..
- WALTER R., BLAU N., SCHAFFNER A., SCHNEEMANN M., SPEICH R., STOCKER R., NAUJECK B. UND SCHOEDON G. (1997).
Brief Communications: Inhalation of the nitric oxide cofactor Tetrahydrobiopterin in healthy volunteers .
Am J Respir Crit Care Med, Vol 156, pages:2006-10, 1997

WALTER R., KAUFMANN P.A., BUCK A., BERTHOLD T., WYSS C., SCHULTHESS G.K., SCHAFFNER A. und SCHOEDON G. (2001).

Tetrahydrobiopterin increases myocardial blood flow in healthy volunteers: a double-blind, placebo-controlled study.

Swiss Med Wkly 2001;131: 91-4

WANG D.H.; DU Y. (1998)

Regulation of vascular type 1 angiotensin-II receptor in hypertension and sodium loading: role of Angiotensin- II

J Hypertens 1998; 16: 467- 475

WEDLER, B. (1991)

Allgemeine Pathophysiologie der arteriellen Hypertonie, 54-99 in LING, WEDLER, B. Arterielle Hypertonie- Nachschlagewerk für die Praxis

1. Auflage, Akademie Verlag, Berlin)

WELCH, William J.; TOJO, Akihiro and WILCOX, Christopher S. (2000)

Roles of NO and oxygen radicals in tubuloglomerular feedback in SHR

Am J Physiol Renal Physiol 287: F769- F776, 2000

WILCOX, C.S.; WELCH, W.J.; MURAD, F. ; GROSS S.S.; TAYLOR, G.; LEVI, R. and SCHMIDT H.H. (1992)

Nitric oxide synthase in macula densa regulates glomerular capillary pressure.

Proc Natl Acad Sci USA 89: 11993-11997,1992

WOLTZ M., SCHMETTERERL, FERBER W., ARTNER E., MENSCHKE H., EISHLER G , KREJCY K. (1997).

Effect of nitric oxide synthase inhibition on renal hemodynamics in man: reversal with L-arginine. Am Physiol 272 (Renal Physiol. 41) F 178- 84

WU, C.P.; WOODCOCK, H., HLADKY, S.B., BARRAND, M.A. (2005)

cGMP (guanosine 3',5'-cyclic monophosphate) transport across human erythrocyte membranes.

Biochem Pharmacol 2005; 69:1257-62

YOSHIMURA M, YASUE H, OKUMURA K, OGAWA H, JOUGASAKI M, MUKOYAMA M, et al. (1993)

Different secretion patterns of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in patients with congestive heart failure.

Circulation 1993;87(2):464-9.

I.4. Danksagung

Die Erstellung meiner Arbeit wäre mir nicht möglich gewesen ohne tatkräftige Unterstützung und Mithilfe vieler Personen. Ihnen möchte ich auf diesem Wege meinen Dank aussprechen:

- Herrn Prof. Dr. med. T. Risler für die freundliche Überlassung des Promotionsthemas,
- Frau Prof. Dr. med. M. Erley für die motivierende Betreuung und die fachliche Unterstützung, besonders während der praktischen Ausführung der Studien sowie in der Ausarbeitungsphase, sowie für die Durchsicht des Manuskripts,
- Herrn Dr. F. Artunc für die Betreuung meiner Doktorarbeit und die stets kooperative und freundliche Zusammenarbeit,
- Frau Dr. C. Plachtzik für die uneigennützig Hilfe bei der sonographischen Voruntersuchung meiner Probanden,
- Frau J. Smykowski für die freundliche Hilfe und Anleitung während der Laborarbeit und der Bestimmung unzähliger Laborproben sowie der Problemlösung bei allen labortechnischen und chemischen Schwierigkeiten,
- Frau Raiser für die Bestimmung der Reninwerte
- Herrn Dr. Heyne für die Erklärung der Clearance- Untersuchungen,
- Frau Dr. Fischer vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung (IMI) für die Beratung bei der statistischen Auswertung,
- Frau Dr. Böhmer von der Abteilung für Klinische Pharmakologie für die freundliche Überlassung der Räumlichkeiten auf der Probandenstation,
- Frau B. Lutze für die engagierte Hilfe bei unzähligen Problemen und Fragestellungen sowie der Einführung der Geräte,
- Allen Probanden für die Teilnahme an der Studie, Ihre Zuverlässigkeit bei der Studiendurchführung, die diese Studie erst ermöglicht hat,
- Meiner Freundin Nicole Pishgah für die Hilfe bei der Laborarbeit
- Meiner Familie für Ihre verständnisvolle Unterstützung.

Weiterhin möchte ich allen denjenigen Leuten danken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit in irgendeiner Form unterstützt haben.

I.5. Lebenslauf

Kai Michael ESSIG

geboren am 14. Juni 1980 in Böblingen
Eltern Dr. med. vet. Carl Joachim Essig, Fachtierarzt für Kleintiere
Monika Essig (geb. Stadler), Lehrerin (Biologie,
Kunst, Realschulen)

Schulischer und beruflicher Werdegang

1986- 1990 Grundschule Eichholz, Sindelfingen
1990- 1999 Stiftsgymnasium, Sindelfingen
06/99 Abitur
07/99-04/00 Wehrdienst als Gebirgssanitäter in Kempten, Allgäu
08/00-04/01 Krankenpflegedienst am Städtischen Krankenhaus
Sindelfingen

Studium

04/00 Eberhard- Karls- Universität, Tübingen
ab 04/00 **Zahnmedizin**
03/01 Zahnärztliche Vorprüfung: 03/01
ab 4/01 **Medizin**
03/02 Ärztliche Vorprüfung (Physikum):
03/03 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
08/05 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
24/11/06 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen

- 09-10/02 Kreiskrankenhaus, Böblingen
Abteilung Innere Medizin, Prof. Dr. Leser, Dr. H. Nebelsieck
- 10/03 Städtischen Krankenhaus Bogenhausen, München,
Abteilung für Rekonstruktive und Plastische Chirurgie
Prof. Dr. Mühlbauer
- 03/04 Niedergelassenen- Praxis, Rottweil, Pädiatrie, Dr. Kraus
- 04/04 Kreiskrankenhaus Sindelfingen
Abteilung Gynäkologie, Prof. Dr. M. Cornely
- 02-04/04 Kantonspital Luzern, Schweiz
Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgie, Prof. Dr. Dr. N. Hardt
- 08/04 Beth Israel Medical Center, New York, NY, USA
Department of Surgery- Head & Neck-, Vascular-, Abdominal,
Plastic and Reconstructive Surgery, Chamberlain MD, PhD
- 09/04 Long Island Jewish Hospital, New Hyde Park, New York, USA
Emergency Medicine
Kwiatkowski, MD, FACEP

Praktisches Jahr

- 10/05- 01/06 Spital Uster, Uster, Schweiz
Chirurgie- Abdominal-, Urologische-, Orthopädische und
Traumatologische- Chirurgie, Prof. Dr. Melcher
- 01/-04/06 Kreiskrankenhaus, Böblingen, Deutschland
Innere Medizin: Gastroenterologie: Prof. Dr. H.-G. Leser;
Kardiologie: Dr. H. Nebelsieck
- 04/-06/06 Stadtpital Triemli, Zürich, Schweiz
Diagnostische Radiologie, Prof. Dr. Brühlmann
- 07/-9/06 Spital Olten, Olten, Schweiz
Diagnostische Radiologie, Prof. Dr. G. Menges

