

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Universität
Tübingen**

Abteilung Pharmakologie und Experimentelle Therapie

Leiter: Professor Dr. H. Oßwald

**Die Rolle von Homocystein bei der Kohlenmonoxid-
induzierten Erythropoetinsekretion in der Niere**

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

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

vorgelegt von

Peter Hammel

aus

Aalen

2008

Dekan:

Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter:

Professor Dr. H. Oßwald

2. Berichterstatter:

Professor Dr. T. Risler

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. GEGENSTAND DER ARBEIT	1
1.2. BISHERIGER KENNNTNISSTAND	1
1.2.1. ERYTHROPOETIN (EPO)	1
1.2.1.1. Geschichte	1
1.2.1.2. Struktur und Metabolismus	2
1.2.1.3. Wirkung	4
1.2.2. HOMOCYSTEIN (HCY)	5
1.2.2.1. Allgemeines	5
1.2.2.2. Physiologie des Homocysteinstoffwechsels	7
1.2.2.3. Das Methylierungspotential (MP)	11
1.2.2.4. Hyperhomocysteinämie	13
1.2.3. CARBONMONOXID (CO)	15
1.3. EIGENE FRAGESTELLUNG	18
2. MATERIAL UND METHODEN	19
2.1. VERSUCHSTIERE UND HALTUNGSBEDINGUNGEN	19
2.2. PRÄPARATION UND PROBENGEWINNUNG	19
2.2.1. NARKOSE	19
2.2.2. PRÄPARATION	19
2.2.3. BLUTENTNAHME	22
2.3. EXPERIMENTELLER AUFBAU	22
2.3.1. HYPOXIEKASTEN	22
2.4. VERSUCHSGRUPPEN UND EXPERIMENTELLER ABLAUF	23
2.4.1. INACTIN-CO-EPO-DOSISWIRKUNGSKURVE	23
2.4.2. CARBOXYHÄMOGLOBIN UND SAUERSTOFFPARTIALDRUCK	23
2.4.3. DIE GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE	23
2.4.4. HCY-INFUSION: DOSISFINDUNG	25
2.4.5. HCY-INFUSION: DER RENALE GEWEBEGEHALT VON SAM, SAH UND ADENOSIN	26
2.5. ANALYTIK	26
2.5.1. HÄMATOKRIT	26
2.5.2. OXYMETRIE UND BLUTGASANALYSE	26
2.5.3. ³ H-AKTIVITÄT IN PLASMA UND URIN	27
2.5.4. BESTIMMUNG VON HOMOCYSTEIN IM SERUM MITTELS HPLC	27
2.5.5. BESTIMMUNG VON SAM, SAH UND ADENOSIN MITTELS HPLC	28
2.5.6. BESTIMMUNG VON EPO MITTELS ENZYMIMMUNOASSAY	28
2.6. ABGELEITETE GRÖßEN	29
2.6.1. MITTLERER ARTERIELLER BLUTDRUCK (MAP)	29
2.6.2. GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE (GFR)	29
2.7. STATISTIK	30

3. ERGEBNISSE	31
3.1. INACTIN-CO-EPO-DOSISWIRKUNGSKURVE	31
3.2. CARBOXYHÄMOGLOBIN UND SAUERSTOFFPARTIALDRUCK	32
3.3. DIE GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE	35
3.4. HOMOCYSTEININFUSION	36
3.4.1. DOSISFINDUNG	36
Kontrolle	37
3.4.2. DIE ERYTHROPOETIN-SEKRETION	42
3.4.3. DER GEWEBEGEHALT VON SAM, SAH UND ADENOSIN	43
4. DISKUSSION	46
4.1. VERSUCHSBEDINGUNGEN UND METHODE	46
4.2. CO-EPO-DOSISWIRKUNGSKURVE: DER EINFLUSS VON THIOBUTABARBITAL (INACTIN®)	47
4.3. CARBOXYHÄMOGLOBIN UND SAUERSTOFFPARTIALDRUCK	48
4.4. GLOMERULÄRE FILTRATIONSRATE (GFR): DER EINFLUSS VON HYPOXIE	49
4.5. HOMOCYSTEININFUSION: DOSISFINDUNG	50
4.6. DER MITTLERE ARTERIELLE BLUTDRUCK: EINFLÜSSE VON HOMOCYSTEIN UND HYPOXIE	51
4.7. DER GEWEBEGEHALT VON SAM, SAH UND ADO: EINFLÜSSE AUF DAS METHYLIERUNGSPOTENTIAL UND DIE SEKRETION VON EPO	52
5. ZUSAMMENFASSUNG	60
6. LITERATURVERZEICHNIS	62
7. ANHANG	76
7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	76

1. EINLEITUNG

1.1. Gegenstand der Arbeit

Die Hyperhomocysteinämie gilt als eigenständiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen (Malinow, 1994; Nygard et al. 1997; Resch, 1996). Als möglicher Mechanismus für die schädigende Wirkung von erhöhtem Homocystein wird nach neueren Untersuchungen eine Senkung des zellulären Methylierungspotentials (SAM/SAH) vermutet (Castro et al. 2005; Zaina et al. 2005). Auch in der Niere vermindert Homocystein das Methylierungspotential durch Steigerung der S-Adenosyl-Homocystein (SAH)-Bildung. Das SAH seinerseits hemmt Transmethylierungsreaktionen. Diese Transmethylierungen sind wiederum wichtig für die erhöhte Produktion der mRNA in den renalen Erythropoetin-sezernierenden Zellen (Caudill et al. 2001; Yi et al. 2000).

Die induzierte Hyperhomocysteinämie soll als Modell benutzt werden, um durch eine Veränderung des Methylierungspotentials eine mögliche Beeinflussung der Erythropoetin-Sekretion unter Normoxie und CO-induzierter Hypoxie zu erzielen.

1.2. Bisheriger Kenntnisstand

1.2.1. Erythropoetin (EPO)

1.2.1.1. Geschichte

Die Existenz von EPO wurde erstmals 1906 von Carnot und Deflandre beschrieben. Sie glaubten damals, es handle sich um einen humoralen Faktor, der die Bildung von roten Blutzellen reguliere, und nannten es infolgedessen „Hämatopoetin“. Erst vierzig Jahre später (1950) konnte diese Annahme von

Reissmann und Erslev bestätigt werden. 1957 erkannte Jacobsen, dass EPO hauptsächlich in der Niere synthetisiert wird.

Ein weiterer Meilenstein in der EPO-Forschung gelang Miake et al. (1977). Diese Arbeitsgruppe konnte EPO aus dem Urin von Patienten mit aplastischer Anämie isolieren. Dies war die Voraussetzung für die Klonierung des Erythropoetin-Gens und ermöglichte die gentechnische Herstellung des Hormons, welche 1985 den beiden Arbeitsgruppen Jacobsen et al. und Lin et al. gleichzeitig gelang. 1989 erhielt rekombinantes EPO als erstes rekombinantes Protein überhaupt die Zulassung als Therapeutikum in den USA zur Behandlung der chronischen Anämie bei Patienten mit terminaler Niereninsuffizienz (Greer et al. 1999; Winearls, 1998).

1.2.1.2. Struktur und Metabolismus

Erythropoetin ist ein vierfach glykolisiertes Sialoprotein und besteht aus 166 Aminosäuren. Es besitzt ein Molekulargewicht von ca. 34.500 Dalton (Goodnough, 1993). Das EPO-Gen befindet sich auf dem langen Arm von Chromosom 7 und besteht aus 5 Exons und 4 Introns. Vier Kohlenhydratketten sind über drei N- und eine O-glykosidische Bindung mit dem Protein verknüpft. Der Kohlenhydratanteil mit den endständigen Sialinsäuren und zwei Disulfidbrücken-Verbindungen zwischen den Aminosäuren 29 und 33 sowie 7 und 161 sind für die biologische Aktivität von EPO entscheidend. Die terminalen Sialinsäuren schützen das Hormon vor einem raschen Abbau in der Leber (Hirth et al. 1988).

Die EPO-Synthese findet in der Fetalzeit hauptsächlich in der Leber statt. Innerhalb der ersten Lebenswochen wird die Synthese dann überwiegend von der Niere übernommen (Erslev et al. 1980). EPO wird beim Erwachsenen zu 80-90% in den peritubulären Fibroblasten der Niere (Acker, 1994) und zu einem geringen Anteil in Hepatozyten (Jelkmann, 1994; Maxwell, 1990), Kupfferschen Sternzellen der Leberzellen (Eckhardt, 1994), Makrophagen des Knochenmarks (Jelkmann, 1992), interstitiellen Venenzellen (Powers, 1995), Astrozyten des zentralen Nervensystems (Masuda, 1994), Lunge, Milz, Thymus sowie im Hoden (Semenza, 1994) gebildet.

Vorstufen oder Speicherformen des Hormons konnten bislang keine nachgewiesen werden, so dass von einer ausschließlichen Neu-Synthese ausgegangen wird (Jelkmann, 1986). Als Hauptstimulus für die EPO-Synthese gilt die Gewebhypoxie. Die physiologische Bildungsrate von EPO wird durch die Faktoren Sauerstoffbedarf, -angebot und Transportkapazität gesteuert. Die genannten Einflüsse verursachen eine Hypoxie in den erythropoetinbildenden Geweben. Entscheidend ist dabei der Sauerstoffpartialdruck im Nierengewebe (Fried, 1975; Jelkmann, 1986). Es besteht eine umgekehrte Proportionalität zwischen der EPO-Konzentration im Blut und dem Hämoglobin- bzw. Hämatokritwert (Jelkmann, 1994).

Durch den hohen Blutfluss ist die Niere besonders gut als Sensororgan geeignet. Normalerweise liegen die EPO-Werte bei 5 bis 25 IE/l (ELISA-Messung). Sie können bei Hypoxie und/oder Anämie innerhalb von Stunden auf Werte von bis zu 10.000 IE/l ansteigen (Jelkmann, 1991). Im Alter nimmt die Fähigkeit, auf Anämiereize adäquat zu antworten, ab, während die EPO-Basalkonzentration zunimmt (Wang, 1995). Insgesamt unterliegt die Serum-EPO-Konzentration einem zirkadianen Rhythmus mit einem Maximum am Nachmittag. Die Halbwertszeit von EPO beträgt circa 6 bis 8 Stunden (Abraham, 1990). Bei exogen zugeführtem EPO ist sie von der Applikationsform abhängig.

Die Elimination erfolgt durch hepatische Metabolisierung oder Aufnahme ins Knochenmark (Spivak & Hogans, 1989). Die Niere spielt bei der Metabolisierung und Ausscheidung von EPO nur eine untergeordnete Rolle.

Der Reiz für die EPO-Sekretion erfolgt in den einzelnen EPO-produzierenden Zellen durch eine Gewebhypoxie nach einem Alles-oder-Nichts-Muster (Koury et al. 1994). Trotz zunehmender Erkenntnisse über die zellulären Reaktionen auf Hypoxie gibt es verschiedene Hypothesen über den genauen Mechanismus, wie Zellen die Änderungen in der Sauerstoffkonzentration detektieren und diese in eine physiologische Antwort umwandeln. Eine Schlüsselrolle spielt dabei ein Proteinkomplex, der als HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer-Faktor) bezeichnet wird (Srinvas et al. 1998). HIF-1 ist ein

Transkriptionsfaktor, dessen Struktur eine heterodimere Doppelhelix bildet und welcher durch eine reduzierte Sauerstoffspannung stabilisiert wird (Wenger & Gassmann, 1997). Der HIF-1-Komplex besteht aus zwei Untereinheiten: die HIF-1 β /ARNT-Untereinheit (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und eine Isoform der α -Untereinheiten (HIF-1 α , HIF-2 α , HIF-3 α). Die HIF-1 α -Untereinheit wird unter normoxischen Bedingungen kontinuierlich synthetisiert und über das Ubiquitin-Proteasom-System wieder abgebaut. Unter Hypoxie reichert sich die HIF-1 α -Untereinheit vermehrt an (Salceda & Caro, 1997; Semenza, 2001). Hypoxie induziert die Stabilisation der HIF-1 α -Untereinheit, was zu einer Aktivierung der Transkription oben genannter Zielgene führt (Carraro et al. 2000).

Es ist jedoch noch nicht abschließend geklärt, welche molekularen Mechanismen die Aktivität von HIF-1 beeinflussen.

1.2.1.3. Wirkung

Der bei Anämie oder Hypoxie erhöhte EPO-Spiegel führt im Knochenmark zu einer beschleunigten Ausreifung von unreifen BFU-e (burst forming unit-erythroid) zu reifen BFU-e und weiter zu CFU-e-Zellen (colony forming unit-erythroid, erythroide Vorläuferzellen), Erythroblasten und Retikulozyten, die dann frühzeitiger in das periphere Blut abgegeben werden (Cipolleschi et al. 1997).

Die Wirkung von EPO wird durch die Bindung des Hormons an einen Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen des BFU-e- und CFU-e-Zellen-Kompartiments vermittelt (Jelkmann, 1994; Samtleben & Gurland, 1990; Adamson, 1996). Durch die Bindung an den Rezeptor wird eine Zunahme der RNA II-Polymerase-Aktivität bewirkt, gefolgt von einer Steigerung der DNA- und RNA-Synthese. Die Transkription der Globin-mRNA wird induziert (Samtleben & Gurland, 1990). Der EPO-Effekt im Knochenmark auf die EPO-abhängigen Zellen wird durch Prostaglandine vom Typ E verstärkt (Fisher et al. 1980). Vermutlich wird durch die Bindung von EPO ein Anstieg des intrazellulären Kalziums induziert (Miller et al. 1990; Yelamarty et al. 1990) und die Tyrosinkinase C aktiviert (Mason-Garcia et al. 1990). Das erste Hämoglobin

kann bereits 5 Stunden nach der Bindung des EPO an seinen Rezeptor nachgewiesen werden. Jelkmann (1994) beschreibt einen Anstieg der Retikulozyten etwa 3 bis 4 Tage nach einem akuten Anstieg der Serum-EPO-Werte.

Die Erythropoese selbst wird nicht beschleunigt. Die Gesamtreifungsdauer bleibt bei 4,5 Tagen (Singbartl et al 1995). Retikulozyten und Erythrozyten besitzen keinen EPO-Rezeptor (Jelkmann, 1994). Die Ausschwemmung der Zellen aus dem Knochenmark wird möglicherweise wieder durch EPO gefördert (Samtleben & Gurland, 1990).

EPO hat außerdem noch weitere, nicht erythropoetische Wirkungen, die teilweise auch Orte außerhalb des hämatopoetischen Systems beeinflussen.

Es gibt Hinweise auf Auswirkungen von EPO auf lymphoide (Yoshimura et al. 1996), myeloide (Abe et al. 1996) und auf megakaryozytische (Cardier et al. 1997; Kaushansky et al. 1995; Kobayashi et al. 1995; Paulus et al. 1995) Zellreihen sowie Einflüsse auf die Diurese (Nushiro et al. 1995) und auf Endothelzellen, als möglicher Faktor für vaskuläre Veränderungen bei der Entwicklung einer essentiellen Hypertonie (Langenfeld et al. 1997).

1.2.2. Homocystein (Hcy)

1.2.2.1. Allgemeines

Kardiovaskuläre Erkrankungen wie Herzinfarkt, Apoplex und arterielle Verschlusskrankheit sind die häufigste Todesursache in den westlichen Industrieländern. In 90% der Fälle besteht ein statistischer Zusammenhang zwischen der Gefäßerkrankung und Risikofaktoren wie Rauchen, Bluthochdruck, Diabetes mellitus und Hypercholesterinämie. Weiterhin gibt es heute vermehrt Hinweise dafür, dass Hyperhomocysteinämie einen eigenständigen Risikofaktor für Artherosklerose darstellt (Welch & Loscalzo, 1998).

Auf die pathobiochemische Bedeutung der Aminosäure Hcy, die de Vigneaud 1932 als Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels entdeckte, war man erstmals 1962 aufmerksam geworden. Damals beschrieben Carson (Carson & Neill, 1962) und Gerritsent (Gerritsent et al. 1968) unabhängig voneinander die Krankheit Homocysteinurie, die durch einen marfanoiden Körperbau mit Hochwuchs und Arachnodaktylie, Linsenluxation, Osteoporose und geistige Retardierung gekennzeichnet ist und häufig schon im Kindesalter zu thromboembolischen Ereignissen wie Herzinfarkt oder Schlaganfall mit oft tödlichem Ausgang führt.

1969 machte McCully bei der Obduktion von Kindern, die unterschiedliche Stoffwechseldefekte mit dem gemeinsamen Merkmal einer erhöhten Hcy-Ausscheidung im Urin gehabt hatten, die Beobachtung, dass diese arteriosklerotische Gefäßveränderungen aufwiesen, wie man sie sonst nur bei älteren Individuen findet. Damit hatte er als erster den Zusammenhang zwischen erhöhten Hcy-Konzentrationen im Blut bzw. Urin und Arteriosklerose erkannt und veröffentlichte diese Erkenntnis 1975 als „homocysteine theory of arteriosclerosis“ (McCully, 1993).

Den Durchbruch für die Anerkennung von Homocystein als Risikofaktor für Herz-Kreislauf-Erkrankungen brachte 1992 die Physicians Health Study (McCully, 1996). In einem Untersuchungskollektiv von 22071 nordamerikanischen Ärzten war hier ein dreifach erhöhtes Herzinfarkttrisiko für diejenigen Personen gefunden worden, deren Hcy-Werte über der 95. Perzentile der Gesamtheit lagen, was einer Konzentration von 15,9 $\mu\text{mol/l}$ entsprach.

Als normal gelten Hcy-Werte im Bereich von 5 bis 15 $\mu\text{mol/l}$. Werte über 15 $\mu\text{mol/l}$ werden als Hyperhomocysteinämie bezeichnet. Kang und Co-Autoren haben Konzentrationen von 15-30 $\mu\text{mol/l}$ als moderate Hcy-Konzentration bezeichnet, 30 $\mu\text{mol/l}$ bis 100 $\mu\text{mol/l}$ als intermediäre Hcy-Erhöhung und Werte darüber als schwere Homocysteinämie bezeichnet (Welch & Loscalzo, 1998).

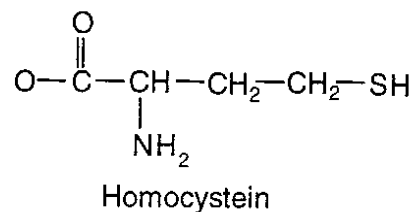
Tabelle 1: Referenzwerte von Homocystein im Plasma nach Malinow (1998)

Normbereich	<15 µmol/l
Leichte Erhöhung (z. B. durch Vitaminmangel)	15-30 µmol/l
Mittlere Erhöhung (z. B. nach Methioninbelastung oder heterozygote Homocysteinämie)	30-100 µmol/l
Starke Erhöhung (z. B. homozygote Homocysteinämie)	>100 µmol/l

1.2.2.2. Physiologie des Homocysteinstoffwechsels

Hcy ist eine schwefelhaltige Aminosäure, die nicht an der Proteinsynthese beteiligt ist, sondern im menschlichen Organismus als Zwischenprodukt des Methioninstoffwechsels vorkommt. Sie ist toxisch und wird daher umgehend in Cystein umgewandelt oder zu Methionin remethyliert.

Die wichtigste bisher bekannte Aufgabe von Homocystein liegt in der Bereitstellung von Methylgruppen, die bei der Bildung essentieller Aminosäuren eine wichtige Rolle spielen.

**Abb. 1:** Strukturformel von Homocystein

Methionin, die einzige Quelle von Hcy, ist eine essentielle Aminosäure, von der ein Erwachsener pro Tag durchschnittlich 2 g mit der Nahrung (v.a. durch Fleisch) zu sich nimmt (Malinow, 1994). Im Körper wird daraus ATP-abhängig S-Adenosyl-Methionin (SAM) gebildet, welches den wichtigsten Methylgruppendonator in unserem Stoffwechsel darstellt. Wenn SAM seine Methylgruppe z. B. bei der Synthese von Nukleinsäuren und Neurotransmittern abgibt, entsteht Hcy. Im Stoffwechsel von Hcy werden der Remethylierungsweg, mit dem Hcy zu Methionin umgebaut wird, und der Transsulfurierungsweg, bei dem Cystein und Sulfat entstehen, unterschieden.

Die 5,10-Methylenetetrahydrofolatreduktase (MTHFR) ist ein Enzym des Folsäurestoffwechsels und hat somit bei der folatabhängigen Remethylierung von Hcy zu Methionin eine zwar indirekte, aber wichtige Funktion. Sie reduziert N(5),N(10)-Methylenetetrahydrofolat zu N(5)-Methyltetrahydrofolat. N(5)-Methyltetrahydrofolat ist ein wichtiger Methylgruppendonator. Seine Methylgruppe wird auf Hcy übertragen, das dadurch zu Methionin umgewandelt wird. Ein weiteres wichtiges Enzym für die Remethylierung zu Methionin ist die Methionin-Synthase (5-Methyltetrahydrofolat-Homocystein-Methyl-Transferase), die in allen Körperzellen vorkommt (Bostom & Lathrop 1997 und Ueland et al. 1993). Sie benötigt Folsäure und Vitamin B12 als Cosubstrat bzw. Cofaktor. Auch die Betain-Homocystein-Methyl-Transferase wandelt Hcy unter Bildung von Dimethylglycin in Methionin um. Da diese Reaktion aber nur in der Leber stattfindet und ihre Aktivität auch bei hohem Substratangebot kaum steigt, spielt sie im Hcy-Stoffwechsel eine untergeordnete Rolle (Jacobson, 1993).

Der irreversible Abbau von Hcy zu Cystein wird Transsulfurierung genannt. Das aus dem Methionin-Zyklus entstehende Hcy kann über die Vitamin-B6-abhängige Cystathionin- β -Synthase zu Cystathionin konvertiert werden. Cystathionin wird durch die ebenfalls Vitamin B6-abhängige Cystathionase in die schwefelhaltige Aminosäure Cystein umgewandelt, die im katabolen Aminosäurestoffwechsel abgebaut werden kann. Der Abbau von Hcy (Transsulfurierung) ist beschränkt auf bestimmte Gewebe wie Leber, Niere, Pankreas und Gehirn (Jacobson 1998).

Normalerweise findet die Metabolisierung von Hcy zu etwa gleichen Teilen über den Weg der Remethylierung und der Transsulfurierung statt. Bei Methioninmangel steigt die Aktivität der Methionin-Synthase, so dass die essentielle Aminosäure Methionin vermehrt aus Hcy regeneriert und dem Körper zur Verfügung gestellt wird (Malinow, 1994). Die Transsulfurierung dient eher der Elimination von Hcy aus dem Körper, da das dabei entstehende überschüssige Cystein zu Sulfat oxidiert und dann über die Nieren ausgeschieden werden kann (Bostom & Lathrop, 1997).

Die Bedeutung der Nierenfunktion für den Hcy-Spiegel ist darauf zurückzuführen, dass die Reaktion der Hcy abbauenden Cystathionin- β -

Synthese (CBS) hauptsächlich in der Niere stattfindet (Bostom & Lathrop, 1997).

Aus der Reaktion von SAM mit Methyltransferase entsteht S-Adenosylhomocystein (SAH), welches durch die SAH-Hydrolase zu Hcy und Adenosin hydrolysiert wird.

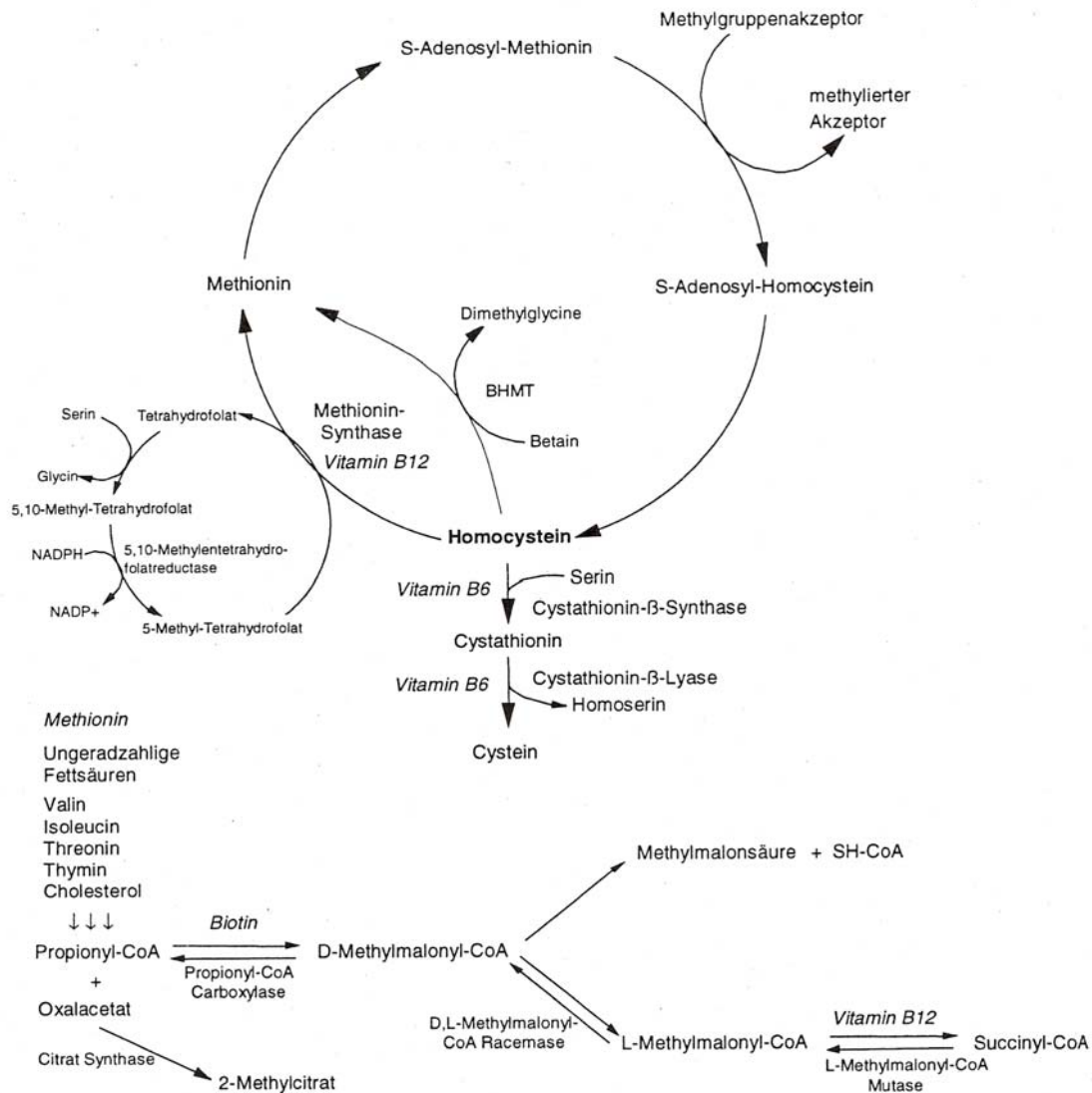
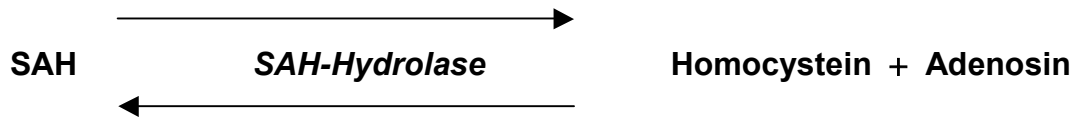


Abb. 2: Übersicht über die Stoffwechselwege von Hcy und Metaboliten



Die Hauptaufgabe der SAH-Hydrolase besteht in der reversiblen Hydrolyse von SAH zu Adenosin und L-Homocystein, die bereits 1959 von De la Haba und Cantoni beschrieben wurde. Dies ist in Vertebraten der einzige bekannte Abbauweg des SAH (Cantoni & Chiang, 1980). Die SAH-Hydrolase ist ein wichtiges Schlüsselenzym im Zytosol-Stoffwechsel, der Transmethylierungs- und Transsulfationsprozesse und den Purin-Metabolismus miteinander verbindet. Das thermodynamische Gleichgewicht der Reaktion liegt in vitro mit einer Gleichgewichtskonstanten von $K_{eq}=10^{-6}$ M auf der Seite der Synthese von SAH aus Adenosin und Homocystein (De la Haba & Cantoni, 1959). In vivo erfolgt die Reaktion jedoch hauptsächlich in Richtung der Hydrolyse, was darauf zurückzuführen ist, dass Adenosin und Hcy in der Zelle schnell verstoffwechselt werden (De la Haba & Cantoni, 1959; Cortese et al. 1974; Crooks et al. 1979; Eloranta, 1977).

Das intrazellulär produzierte Hcy kann das Zytosol durch Auswärtsdiffusion verlassen. Da die Plasmamembran für Homocystein permeabel ist, hängt die intrazelluläre SAH-Konzentration von der extrazellulären Hcy-Konzentration ab. (Perna et al. 1996). Das Plasma-Hcy wird hauptsächlich über die Nieren oder durch Exkretion in den Urin eliminiert. Das chronische Nierenversagen (CRF) wird assoziiert mit erhöhten Hcy-Plasmakonzentrationen, ausgelöst nicht durch eine abgeschwächte Urinexkretion, sondern durch einen verminderten Metabolismus in der Niere (Massy, 1996; Bostom & Lathrop, 1997).

Das gebildete Adenosin kann auf zwei verschiedenen Wegen abgebaut werden:

Es wird entweder durch die Adenosindesaminase zu Inosin desaminiert, das dann zu Harnsäure abgebaut wird, oder es wird mit Hilfe der Adenosinkinase phosphoryliert und so zu AMP umgewandelt (Fox & Kelley, 1978). Adenosin bewirkt am Herzen durch die Hemmung der Adenylatzyklase eine Vasodilatation der Koronararterien (Schrader et al. 1981; Schütz et al. 1981; Webster & Olsson, 1981; Berne et al. 1983; Kitakaze et al. 1993). In der Niere

erzeugt Adenosin eine Vasokonstriktion (Oßwald & Gleiter, 1993) und reguliert verschiedene Nierenfunktionen wie die glomeruläre Filtrationsrate, die Elektrolyte-Exkretion und die Freisetzung von Renin und EPO (Oßwald, 1984; Oßwald et al. 1991).

1.2.2.3. Das Methylierungspotential (MP)

Als ein möglicher Mechanismus für die schädigende Wirkung von erhöhtem Hcy wird nach neueren Untersuchungen eine Senkung des Methylierungspotentials (SAM/SAH) diskutiert. Unter dem Methylierungspotential (MP) versteht man das Verhältnis der beiden Stoffwechselprodukte S-Adenosylmethionin (SAM) zu S-Adenosylhomocystein (SAH) (American Journal of Kidney Dis. 2001; Biol. Chem., 2000).

Das Methylierungspotential ist ein wichtiger Stoffwechselindikator für den zellulären Stoffwechselstatus. Die Abnahme des MP, verursacht durch einen signifikanten Anstieg von SAH, ist assoziiert mit einer DNA-Hypomethylierung (Caudill et al. 2001; Yi et al. 2000) und einem Rückgang der Methyltransferase-Aktivität (Hofmann et al. 1980). Überdies hat eine Veränderung des MP durch die Hemmung der SAH-Hydrolase die Hemmung von Lipid-Methylierung, Protein-Carboxymethylierung und RNA-Methylierung zur Folge (Backlund et al. 1986; Bartel & Borchard, 1984).

Zum einen vermindert Hcy das Methylierungspotential (MP) durch Steigerung der S-Adenosyl-Homocystein (SAH)-Bildung. SAH wiederum hemmt Transmethylierungsreaktionen, die wichtig sind für die erhöhte Produktion der mRNA, z. B. in den EPO-sezernierenden Zellen in Niere.

Eine hemmende Wirkung auf die Hydrolyse von SAH *in vitro* haben sowohl Adenosin als auch Hcy. Unter physiologischen Bedingungen jedoch werden diese Produkte in der Zelle sofort metabolisiert, so dass dieser hemmende Effekt nicht auftritt (De la Haba & Cantoni, 1959). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann es jedoch zur Akkumulation von Adenosin oder Hcy in der Zelle kommen. Eine dieser möglichen Bedingungen kann der Anstieg von

Adenosin ausgelöst durch Gewebehypoxie oder durch eine Hyperhomocysteinämie sein. Ein Anstieg dieser Metabolite führt zur Synthese von SAH. Dadurch steigt in der Zelle der SAH-Spiegel (Johnston & Kredich, 1979; Kredich & Hershfield, 1979; Kredich & Martin, 1980) auf Werte von 30-60 μM (Kloor et al., 2002).

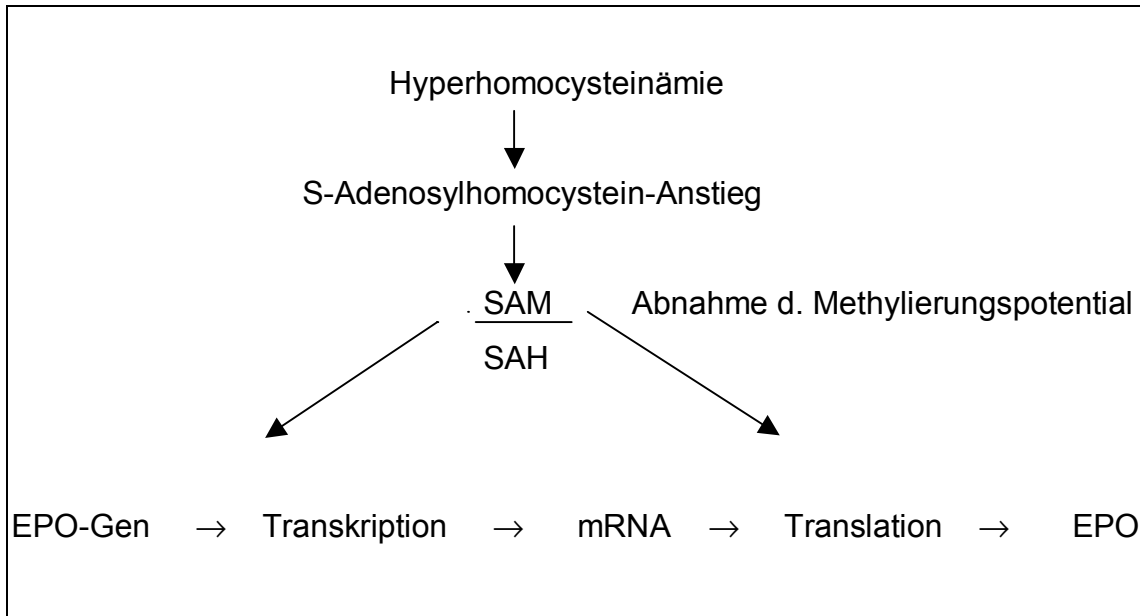


Abb 3: Schematische Darstellung der Verknüpfung zwischen Hyperhomocysteinämie, Methylierungspotential der Zelle und der Methylierungsreaktionen bei Transkription und Translation am Beispiel der EPO-Bildung.

SAH entsteht jedoch nicht nur aus der Synthese durch die SAH-Hydrolase, sondern ist auch Produkt bei allen S-Adosylmethionin (SAM)-abhängigen Transmethylierungsreaktionen. Dabei wird eine aktivierte Methylgruppe von SAM auf verschiedenste Makromoleküle wie Proteine, RNA, DNA und Polysaccharide sowie auf kleine Moleküle wie Histamine, Phospholipide, Norepinephrin und Katecholamine übertragen (Keller & Borchardt, 1988).

Aufgrund des hohen Potentials des SAM, Methylgruppen zu übertragen, ist dies der wichtigste biologische Transmethylierungsweg (Cantoni, 1975). Da SAH diese Methyltransferasen in Form einer Produkthemmung beeinflussen kann, reguliert die Aktivität der SAH-Hydrolase indirekt alle SAM-abhängigen Methyltransferasen (Deguchi & Barchas, 1971; Pugh et al. 1977; Hasobe et al. 1989). Da die SAH-Hydrolase als einziges Enzym den Abbau von SAH katalysiert (Cantoni, 1986), ist dies ein wichtiger Rückkopplungsmechanismus.

Durch Hemmung der SAH-Hydrolase und nachfolgende Erhöhung des intrazellulären SAH-Gehalts können u.a. antivirale (Wolfe & Borchardt, 1991; Patil et al. 1992; Liu et al. 1993; Villalon et al. 1993; Wnuk et al. 1994), antiparasitische (Bitonti et al. 1990; Henderson et al. 1992), antiarthritische und immunosuppressive Effekte (Wolos et al. 1993 a; Wolos et al. 1993 b) erzielt werden.

Weiter kann der chronische Anstieg von SAH, z.B. als Folge einer durch Hcy vermittelten Umkehrung der SAH-Hydrolase-Reaktion in Richtung der Synthese, die Methylierung von DNA, RNA, Proteinen oder Phospholipiden reduzieren. Eine hohe Bindungsaffinität von SAH zur aktiven Seite zellulärer Methyltransferasen hat deren Produkthemmung zur Folge (Ping et al. 2000). Ping et al. zeigten außerdem, dass der SAH-Plasmaspiegel positiv mit dem intrazellulären lymphozytären SAH-Gehalt und der lymphozytären DNA-Hypomethylierung korreliert. Eine globale Hypomethylierung in Lymphozyten-DNA kann ein früher Biomarker abnormer Methylierung anderer Gewebe sein (Ping et al. 2000).

Die Verbindung von Adenosin und Hcy hat nicht nur den Anstieg von intrazellulärem SAH und die Abnahme des Methylierungspotentials zur Folge, sondern bewirkt so auch eine Reduktion der Protein-Methylierung. Die durch Adenosin und Hcy entstehende Retardierung des Zellwachstums ist ganz allgemein und betrifft eine Vielzahl von humanen Zelltypen. Es scheint aber so, als ob besonders schnell wachsende Zellen, wie etwa das EPO, verwundbarer für eine Hypomethylierung seien (Hultberg et al. 2000).

1.2.2.4. Hyperhomocysteinämie

Erhöhte Plasma-Hcy-Spiegel können durch eine ungenügende Aufnahme der in den Methioninstoffwechsel involvierten Vitamine (Vitamin B6, Vitamin B12 und Folsäure) mit der Nahrung verursacht werden (Stabler et al. 1988). Die Messung der Plasma- bzw. Serumkonzentrationen beschreibt den Vitaminstatus im Gewebe nur unzureichend, d.h. auch bei normwertigen Plasma- bzw. Serumkonzentrationen kann ein intrazellulärer Vitaminmangel

vorliegen, welcher sich über einen erhöhten Hcy-Spiegel manifestiert. Der Hcy-Spiegel im Plasma ist somit als ein sensitiver Marker für ein intrazelluläres Defizit an Vitamin B12 und Folsäure anzusehen (Nilsson et al. 1999).

Darüber hinaus können genetische Defekte der am Methioninstoffwechsel beteiligten Enzyme, wie Cystathionin- β -Synthase (CBS) oder Methylentetrahydrofolatreduktase (MTHFR), zu einer Hyperhomocysteinämie unterschiedlicher Ausprägung führen. Ein autosomal-rezessiv vererbter CBS-Defekt verursacht die klassische Homocysteinurie. Polymorphismen der thermolabilen MTHFR finden sich bei 5 bis 16% (homozygot, 677TT) bzw. 32 bis 40% (heterozygot, C677T) der europäischen Bevölkerung (Rozen, 2000; Frosst et al. 1995; Rady et al. 2002).

Bei dieser MTHFR-Mutation mit Austausch der Aminosäure Alanin gegen Valin in Position 667 kommt es zu einer thermolabilen Variante des Enzyms, welche bei 37°C zu einem Funktionsverlust von etwa 50% und konsekutiv zu einer Erhöhung des Hcy-Spiegels führt. Patienten mit der heterozygoten Form haben moderat erhöhte, Patienten mit der homozygoten Form moderat bis intermediär erhöhte Hcy-Spiegel. Das Ausmaß der Höhe des Hcy-Spiegels ist dabei stark abhängig von der Folsäure-Konzentration im Blut.

Außerdem findet man erhöhte Hcy-Plasmaspiegel bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz (am ehesten durch eine verminderte renale Exkretion), bei Rauchern, erhöhtem Alkoholkonsum sowie Alkoholismus (Bleich et al. 2000 und 2001), erhöhtem Kaffeekonsum und unter der Behandlung mit verschiedenen Medikamenten wie Methotrexat, Phenytoin oder Theophyllin (durch substanzspezifische Interferenzen mit den involvierten Vitaminen) (Varela-Moreiras, 2001). Schließlich ist der Hcy-Spiegel positiv mit dem Lebensalter und männlichen Geschlecht korreliert (Selhub et al. 2001; Nilsson et al. 1996; Ueland et al. 2001).

1.2.3. Carbonmonoxid (CO)

Bei Carbonmonoxid handelt es sich um ein Stoffwechselendprodukt, das im Organismus nicht weiter metabolisiert wird. Physiologisch entsteht es beim Hämabbau aus den Methylengruppen des Häms (Coburn et al. 1966).

Die Aufnahme von exogenem CO erfolgt über Inhalation. Das mit den Lungen aufgenommene CO wird rasch ins Blut aufgenommen, wodurch seine Sauerstofftransportkapazität eingeschränkt wird. Die Affinität von CO zum zweiwertigen Eisen des Hämoglobins ist unter sonst physiologischen Bedingungen ca. 250 Mal höher als die des Sauerstoffs. Diese hohe Affinität ist durch die außerordentlich langsame Dissoziationsgeschwindigkeit von CO aus HbCO (Carboxyhämoglobin) bedingt (ca. 3 Größenordnungen langsamer als bei Oxyhämoglobin), während die Assoziationsgeschwindigkeit von CO an Hb sogar langsamer ist als die von Sauerstoff (Henschler, D., 1975).

Die biologische Halbwertszeit des HbCO-Komplexes beim Menschen wird mit 5 Stunden angegeben. Die Elimination von CO erfolgt ausschließlich durch Abatmung. Eine Beschleunigung der Abatmung wird erreicht durch die Inhalation von reinem Sauerstoff, noch stärker durch Beatmung mit O₂ + 5 – 7% CO₂ (British Occupational Hygiene Society, 1975). Aufgrund des Massenwirkungsgesetzes ergeben sich folgende Zusammenhänge:

$$\text{HbCO}/\text{HbO}_2 = 250 \times \text{pCO}/\text{pO}_2$$

Das bedeutet, dass bei einer CO-Konzentration von 0,1% in der Atemluft über die Hälfte des Hämoglobins als HbCO vorliegt.

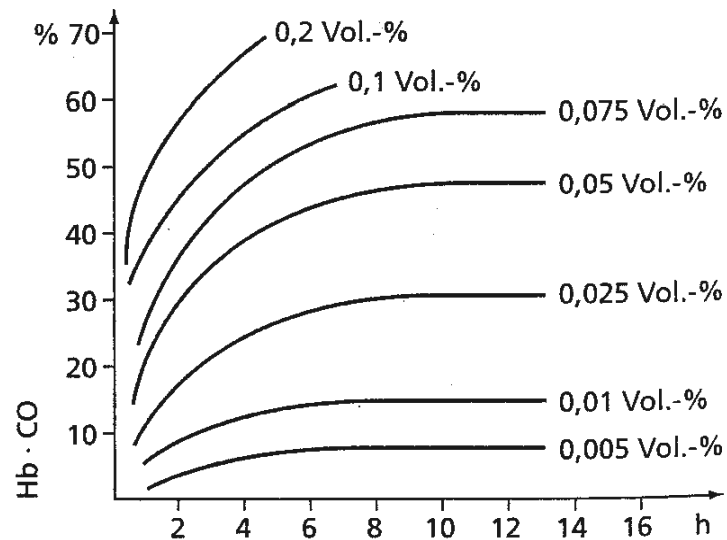


Abb. 4: Anteil von Carbonmonoxid-Hämoglobin *in vivo* bei verschiedenen CO-Konzentrationen (Lehrbuch der Toxikologie, Marquardt, S. 822)

Die Toxizität von CO wird durch Faktoren beeinflusst wie Dauer der Exposition, Herzminutenvolumen, Sauerstoffverbrauch des Gewebes und Hämoglobingehalt des Blutes. CO mindert die Sauerstoffversorgung des Gewebes noch über einen weiteren Mechanismus: Die Affinität des Sauerstoffs zum tetrameren Hämoglobineisen nimmt bekanntlich mit schrittweiser Desoxygenierung ab, da die Konformation von Desoxyhämoglobin eine erheblich geringere Affinität zu Liganden aufweist als voll gesättigtes Hb. Dieses Phänomen bewirkt die sigmoide Form der normalen Sauerstoffbindungskurve. Die Affinität von Sauerstoff zu partiell beladenem Hämoglobin nimmt nach Abgabe des ersten Sauerstoffmoleküls um etwa den Faktor 10 ab, nach Abgabe des zweiten Moleküls erneut um etwa den Faktor 10. Dadurch liegt beim Sauerstoffpartialdruck des Gewebes im Wesentlichen ein Gemisch von $\text{Hb}(\text{O}_2)_4$ und Desoxyhämoglobin vor.

Hämoglobin, das partiell mit CO beladen ist, weist eine erheblich höhere Sauerstoffaffinität auf als $\text{Hb}(\text{O}_2)_3$. Die Sauerstoffdissoziationskurve ist weniger sigmoid und die effektive Sauerstoffabgabe an das Gewebe noch weiter vermindert. Dies wird auch als Haldane-Effekt beschrieben.

Neben der Beschleunigung der Sauerstoffaffinität hat CO nach neueren Untersuchungen auch Einfluss auf die Geschwindigkeit der

Sauerstoffdissoziation. Sie ist verlangsamt bei partiell mit CO beladenem Hb. Dieser Effekt verschlechtert die Sauerstoffabgabe zusätzlich. Das Phänomen tritt bei monomerem Myoglobin nicht auf, so dass man erwarten würde, dass die Sauerstoffabgabe von Myoglobin (vor allem in der Herzmuskelzelle) an die mitochondriale Atmungskette weniger gravierend beeinträchtigt ist, zumal die Affinität von CO an Myoglobin nur etwa 40 Mal größer ist als zu O₂. Weil die Konzentration des konkurrierenden Sauerstoffs in der Herzmuskelzelle jedoch erheblich niedriger als im Blut ist, findet man höhere Anteile von Carboxymyoglobin als von Carboxyhämoglobin.

Die Affinität von CO₂ zu N-terminalen Aminogruppen des Hämoglobins ist im HbCO gegenüber Desoxyhämoglobin deutlich vermindert. Andere Hämverbindungen, die intermediär zweiwertiges Eisen enthalten wie Cytochrom P450, Cytochrom c und die Cytochromoxidase, werden erst bei supraletalen CO-Konzentrationen stärker gehemmt.

Schließlich könnte CO auch eine Transmitterfunktion haben, ähnlich wie NO. In verschiedenen Geweben wurden zwei Isoformen einer Hämoxigenase gefunden, die bei Oxidation des Methylenkohlenstoffs CO produzieren, das ähnlich wie NO eine Guanylatcyclase stimuliert und Vasodilatation bewirkt. Schließlich steigert CO massiv die NO-Freisetzung aus Blutblättchen.

1.3. Eigene Fragestellung

Erhöhte Hcy-Konzentrationen im Blut führen zu einer Senkung des Methylierungspotentials (SAM/SAH). Die Abnahme des Methylierungspotentials führt zu einer DNA-Hypomethylierung und einem Rückgang der Methyltransferase-Aktivität. Die Methylierung wiederum ist notwendig für die Reproduktion von Genen. In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, ob durch Homocysteingabe die renale EPO-Sekretion nach Stimulation mit Kohlenmonoxid verändert wird.

Dafür sollen in der vorliegenden Arbeit folgende Aspekte untersucht werden:

1. Einfluss der Inactin-Narkose auf die EPO-Sekretion im Vergleich zur EPO-Sekretion bei wachen Ratten.

2. Bestimmung der Blutgase nach Kohlenmonoxid-Exposition.

3. Einfluss der Exposition von Kohlenmonoxid auf die Nierenfunktion.

4. Einfluss von Homocysteininfusion und CO-induzierter Hypoxie auf den arteriellen Blutdruck.

5. Einfluss von Homocysteininfusion und CO-induzierter Hypoxie auf das Methylierungspotential und damit auf die EPO-Sekretion.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Bei allen Versuchen wurden männliche Sprague–Dawley-Ratten der Firma Charles River (Wiga GmbH, Sulzfeld) verwendet. Die Tiere wurden mit einem Gewicht von 200-225 g geliefert und in Käfigen (Standardkäfig, Ehret Emmendingen; Streu: Weichholzfaser 3-4, Typ: 99190200, Altromin GmbH, Lage) mit maximal vier Tieren pro Käfig gehalten. Im Tierstall herrschte ein künstlicher Tag-Nachtrhythmus in 12-stündigen Zyklen mit einer Dunkelphase zwischen 18.30 und 6.30 Uhr. Die Raumtemperatur lag konstant bei 21°C, die Luftfeuchtigkeit bei 60g%/m³. Die Tiere hatten freien Zugang zu pelletierter Standardnahrung der Firma Altromin (C1 324, Altromin GmbH, Lage) und zu Leitungswasser.

2.2. Präparation und Probengewinnung

2.2.1. Narkose

Bei Versuchsbeginn hatten die Tiere ein Gewicht von 280-300 g. Sie erhielten Thiobutabarbital (Inactin[®], RBI, USA) in einer Dosis von 120 mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

2.2.2. Präparation

Die narkotisierten Tiere wurden in Rückenlage auf einen Präparationstisch (Effenberger, med.-techn. Gerätebau, München) gelegt. Über einen Temperaturregler wurde die Körpertemperatur des Tieres konstant gehalten

über die Dauer des Experimentes. Über einen 3 cm langen medialen Zervikalschnitt erfolgte nach Durchtrennung der oberflächlichen Halsfaszie die stumpfe Präparation der infrahyalinen Muskulatur bis auf die Faszia praetrachealis. Die darunterliegende Trachea wurde freipräpariert, stumpf unterminiert und etwa 1 cm proximal des Schildknorpels mit einem Faden angeschlungen. Etwa 0,5 cm proximal des Schildknorpels wurden die Ligamenta annularia zwischen 2 Knorpelspangen durchtrennt, so dass ein Polyäthylenkatheter (Labokron, Sinsheim) eingeführt und mit dem vorgelegten Faden fixiert werden konnte. Diese Katheterisierung diente der Vorbeugung einer Aspiration und Verlegung der oberen Atemwege.

Auf der linken Halsseite wurde nun durch stumpfe Präparation die V. jugularis externa aufgesucht und auf ca. 1 cm Länge dargestellt. Nach einer distalen Ligatur und proximaler Anschlingung erfolgte eine Schräginzision proximal der Ligatur. Zwei flüssigkeitsgefüllte Polyäthylenkatheter wurden in das Lumen eingeführt und mit Hilfe des vorliegenden Fadens ligiert. Über diesen Katheter konnten über ein Verbindungsstück entsprechende Infusionen verabreicht werden.

Auf der medianen linken Oberschenkelseite erfolgte ein etwa 3 cm langer Schnitt auf Höhe des Ligamentum inguinale. Nach stumpfer Präparation der Muskulatur wurde die A. femoralis im Gefäß-Nerven-Strang dargestellt und distal ligiert. Ca. 1 cm proximal der Ligatur wurde die Arterie mit einer Gefäßklemme abgeklemmt und ca. 5-7 mm distal davon inzidiert. Ein Polyäthylenschlauch wurde bis zur Klemme eingeführt und mit einem vorgelegten Faden ligiert.

Der Katheter diente zur Blutentnahme mit Mikrohämatokritröhrchen und zur kontinuierlichen Messung des systemischen arteriellen Blutdruckes. Er befand sich dafür in Verbindung mit einem an einen Verstärker (BLRR, World Precision Instruments, Sarasota, USA) angeschlossenen Druckelement (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten). Der Blutdruck wurde während des ganzen Versuchs kontinuierlich von einem Zweikanalschreiber aufgezeichnet (Hellige, Freiburg).

Für die Aufzeichnung des mittleren arteriellen Blutdrucks während induzierter Hypoxie und Hyperhomozysteinämie wurden folgende Versuchsgruppen gebildet: Unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (0, 400, 600, 800, 1000 und 1200 ppm) wurde jeweils Hcy (Hcy groß) bzw. nur Kochsalz über 4 Stunden kontinuierlich infundiert. Die Präparation und der experimentelle Ablauf wurden hierfür wie im Vorversuch „2.4.4. Homocysteininfusion: Dosisfindung“ beschrieben identisch durchgeführt.

Für die Bestimmung der EPO-Konzentrationen im Plasma nach induzierter Hypoxie und Hyperhomozysteinämie wurden folgende Versuchsgruppen gebildet: Unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen (0, 600 und 1200 ppm) wurden jeweils verschiedene Hcy-Konzentrationen (Kontrolle nur mit NaCl, Hcy klein, Hcy groß) über 4 Stunden kontinuierlich infundiert. Die Präparation und der experimentelle Ablauf wurden wie im Vorversuch „2.4.4. Homocysteininfusion: Dosisfindung“ beschrieben identisch durchgeführt.

Bei den Clearance-Untersuchungen wurde zusätzlich die Harnblase katheterisiert. Dazu wurde nach medianer suprapubischer Hautinzision die Bauchmuskelschicht auf einer Länge von ca. 1 mm entlang der Linea alba durchtrennt. Die Harnblase wurde aufgesucht, gefasst und an die Oberfläche luxiert. Nach Anschlingen wurde der Harnblasenpol inzidiert und ein Harnblasenkatheter aus Polyäthylen, dessen Totraumvolumen weniger als 30µl betrug, eingeführt. Der Katheter wurde mit isotoner Kochsalzlösung gespült, um die Durchgängigkeit und korrekte Lage zu prüfen. Die Harnblase wurde in ihre ursprüngliche Lage reponiert. Nach Abschluss der Präparation wurden alle Wunden mit 1-2 Stichen verschlossen. Anschließend wurde das Tier in Rückenlage in den Hypoxiekasten gelegt.

Um den präparationsbedingten Flüssigkeitsverlust der Ratte auszugleichen, wurde über den venösen Katheter kontinuierlich 1,0ml/100g/h 0,85%-ige NaCl-Lösung mittels Perfusor (B. Braun, Melsungen) infundiert.

Die oben beschriebene Vorbereitung bzw. Durchführung der Narkose und Präparation wurden den nachfolgenden Experimenten angepasst. Abweichungen in der Präparationsweise werden in den einzelnen Experimenten beschrieben.

2.2.3. Blutentnahme

Die Tiere erhielten eine Narkose mit Diethylether (Merck, Darmstadt) und wurden auf einem beheizten Präparationstisch (Effenberger, med.-techn. Gerätebau, Pfaffing/Attel) gelagert. Das Fell wurde mit Paraffinöl geölt und die Bauchdecke median sagittal eröffnet. Die Vena cava inferior wurde mit einer Einmalkanüle (Sterican[®] Nadeln, Gr.18, Braun, Melsungen) punktiert und ca. 3-4 ml Blut entnommen. Danach wurden die Tiere durch Ausbluten getötet. Die Blutprobe wurde sofort in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorf-Gefäß (2 ml, Eppendorf, Hamburg) überführt und bei 4000 U/min zentrifugiert (Hettich Zentrifugen Mikro 12-24, Tuttlingen). Das so gewonnene Serum wurde in 1,5 ml Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur Bestimmung der EPO-Serumkonzentration bei -80°C tiefgefroren.

2.3. Experimenteller Aufbau

2.3.1. Hypoxiekasten

Die Versuche an wachen und narkotisierten Ratten in funktioneller Hypoxie wurden in einem Hypoxiekasten durchgeführt. Der Hypoxiekasten wurde während des Versuchs mit einem Gasgemisch, bestehend aus Atemluft und unterschiedlichen Konzentrationen Kohlenmonoxid (0 bis 1200 ppm), durchströmt. Während der CO-Exposition wurde die CO-Konzentration im Hypoxiekasten anhand eines Messgerätes (Rauchgasmessgerät testo 300 M,

Testo GmbH & Co, Lenzkirch) in 15-minütigem Zeitabstand kontrolliert und aufgezeichnet (Tischdrucker, Testo GmbH & Co, Lenzkirch).

2.4. Versuchsgruppen und experimenteller Ablauf

2.4.1. Inactin-CO-EPO-Dosiswirkungskurve

Für die Erstellung der Inactin-CO-EPO-Dosiswirkungskurve wurden narkotisierte (Inactin[®]) mit wachen Tieren verglichen. Es wurden 7 Versuchsgruppen gebildet. Diese unterschieden sich in der Höhe der CO-Konzentration (0, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 ppm) über 4 Stunden. Messung der Konzentration von EPO im Serum nach 4 Stunden CO-Exposition.

2.4.2. Carboxyhämoglobin und Sauerstoffpartialdruck

Für die oxymetrische Messung des HbCO- und des PO₂-Gehaltes im arteriellen Blut der narkotisierten Ratten wurden 6 Versuchsgruppen gebildet. Diese unterschieden sich in der Höhe der CO-Konzentration (0, 400, 600, 800, 1000, 1200 ppm) über 4 Stunden. Messung der Parameter arterieller HbCO und PO₂ nach 4 Stunden.

2.4.3. Die glomeruläre Filtrationsrate

Für die Messung der glomerulären Filtrationsrate bei narkotisierten Tieren wurden 4 Versuchsgruppen gebildet. Diese unterschieden sich wiederum in der Höhe der CO-Konzentration (0, 400, 800, 1000 ppm).

Tabelle 2: Schema zum zeitlichen Ablauf der Clearanceuntersuchung

Präparation	Äquilibration	Clearance	Dauer insgesamt
30 min.	30 min	4 h	ca. 5 h

An die ca. 30 Minuten dauernde Präparation schloss sich eine Äquilibrationsperiode von 30 Minuten an, um dem Organismus die Stabilisierung der physiologischen Funktionen zu ermöglichen. Mit den Clearanceperioden wurde begonnen, sobald die Versuchstiere eine gleichmäßige Urinausscheidung entwickelten und Blutdruck sowie Atmung ein stabiles Niveau erreichten.

Der Versuchsablauf war in 5 Perioden à 20 Minuten untergliedert. Mit der ersten Clearanceperiode wurde 10 Minuten vor dem Zeitpunkt 0h begonnen, an die sich 4 weitere Perioden anschlossen, die jeweils eine weitere Stunde später zu den Zeitpunkten 1h, 2h, 3h, 4h durchgeführt wurden. Die 20 Minuten dauernden Urin-Sammelperioden begannen jeweils 10 Minuten vor Beginn der vollen Stunde und endeten entsprechend 10 Minuten danach. Mit der kontinuierlichen CO-Gabe über 4 Stunden wurde nach Abschluss der ersten Periode begonnen.

Verwendete Infusionslösungen:

Zur Bestimmung der Glomerulären Filtrationsrate (GFR) wurden ab dem Beginn der Äquilibrationsphase folgende Lösungen über die beiden Katheter in die V. jugularis kontinuierlich über 4 Stunden infundiert:

Tabelle 3: Schema zu den verwendeten Infusionslösungen bei Clearanceuntersuchungen

Lösung	Infusionsgeschwindigkeit
0,85%ige NaCl-Lösung	ca. 2,8-3,0 ml/h (entspricht 1 ml/100g KG/h)
³ H-markiertes Inulin gelöst in 0,85% NaCl-Lösung	0,6 ml/h

Probenentnahme:

Über den in der A. femoralis liegenden Katheter wurden nach der Hälfte einer Sammelperiode drei heparinisierte Glaskapillaren (Mikro-Hämatokritröhrchen®, Fa. Brand, Wertheim) à 75 µl Volumen entnommen. Für die Dauer einer 20-minütigen Sammelperiode wurde der Urin in Kunststoffgefäßen (Safe-Lock 2,0 ml, Eppendorf, Hamburg) gesammelt. Der während der Äquilibration und den Zwischenperioden produzierte Urin wurde verworfen. Messung der Parameter Urinvolumen, Inulin im Plasma und im Urin zur Berechnung der GFR.

2.4.4. Hcy-Infusion: Dosisfindung

Zunächst wurde in einem Vorversuch die Höhe der Homocystein-Dosis ermittelt, welche notwendig ist, um Serum-Hcy-Spiegel im Bereich einer mittleren (zwischen 30 µmol/l bis 100 µmol/l) bzw. einer schweren Homocysteinämie (über 100 µmol/l) experimentell im Rattenmodell zu induzieren. Dazu wurden zwei unterschiedlich hohe Hcy-Dosen (Hcy klein/Hcy groß) über 4 Stunden infundiert.

Tabelle 4: Übersicht zu den verwendeten Konzentrationen von Hcy zur Dosisfindung.

	Bolus (einmalig initial) gelöst in 2 ml NaCl 0,85%	Erhaltungsdosis (über 4 h) gelöst in 12 ml NaCl 0,85%
Hcy klein	4,14 mg/300g/KG	5,18 mg/300g/KG
Hcy groß	16,56 mg/300g/KG	15,59 mg/300g/KG

Zunächst erfolgte die chirurgische Präparation wie in 2.2.2. beschrieben. Über den venösen Zugang wurden 1,0 ml/100 g KG/h einer 0,85%-igen NaCl-Lösung infundiert. Anschließend wurde das Tier in den Hypoxiekasten gelegt. Darauf

folgend wurde die NaCl-Infusion beendet und mit der Hcy-Infusion begonnen. Dafür wurde zunächst über einen an das Infusionssystem angeschlossenen Dreiwegehahn ein Hcy-Bolus langsam über 2 Minuten venös infundiert und anschließend mit der kontinuierlichen Hcy-Dauerinfusion und der CO-Exposition über 4 Stunden bis zum Versuchsende begonnen.

2.4.5. Hcy-Infusion: Der renale Gewebegehalt von SAM, SAH und Adenosin

Am Ende des Experimentes nach vierstündiger Infusion und Hypoxie wurde die freipräparierte Niere mittels einer in flüssigem Stickstoff vorgekühlten Zange schockgefroren. Die weitere Aufarbeitung und Messung von SAH, SAM und ADO mittels HPLC erfolgte direkt im Anschluss.

2.5. Analytik

2.5.1. Hämatokrit

Blut zur Hämatokritbestimmung wurde in Glaskapillaren (75µl) entnommen, einseitig verschlossen und für zehn Minuten in einer Hämatokrit-Zentrifuge (micro haematocrit centrifuge, Hawksley, England) zentrifugiert.

2.5.2. Oxymetrie und Blutgasanalyse

Die beidseits mit Knetmasse verschlossenen Probenröhrchen wurden in Eiswasser gekühlt (0-4°C) und innerhalb von 30 Minuten mit einem Hemoximeter der ABL 700 Serie (Radiometer, Kopenhagen) gemessen. Die hierfür benötigten 95 µl der Probe wurden vollautomatisch analysiert. Die mit dem Gerät ausgeführten Analysen basieren auf Messungen der

Lichtdurchlässigkeit durch die Proben im Verhältnis zu der von Wasser. Die einzelnen Parameter wurden mit einem 128 Wellenlänge Spektrometer gemessen. Die Referenzwerte für HbCO liegen beim Erwachsenen zwischen 0,5 und 1,5%, für pO₂ zwischen 83-108 mmHg (11,1-14,4kPa).

2.5.3. ³H-Aktivität in Plasma und Urin

Zur Berechnung der GFR wurden die Aktivitäten des ³H-markierten Inulins in Plasma und Urin ermittelt. Dazu wurden Doppelproben jeweils von 20 µl Plasma und Urin jeder Sammelperiode angesetzt und in Szintillationsmeßgefäße (MIDI-VIAL[®], Packard Groningen/Niederlande) gegeben und mit 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold[®], Packard, Groningen/Niederlande) verdünnt. Die Szintillationsflüssigkeit diente dazu, die beim radioaktiven Zerfall von ³H freiwerdende Energie in Lichtimpulse, die vom Szintillationszähler erfasst werden konnten, umzuwandeln. Die Gefäße wurden verschlossen und in einem automatischen Flüssigkeitsszintillationszähler (2550TR[®], Packard, Meriden, USA) eingebracht. Die Messdauer der Proben richtete sich nach deren Aktivität und war so programmiert, dass der zu erwartende zufällige Messfehler unter 3% lag. Wegen der im Vergleich zu den Urinproben geringeren Aktivität der Plasmaproben wurden diese regelmäßig länger gemessen. Die Messzeit der Urinproben betrug damit unter einer Minute, die der Plasmaproben etwa 20 Minuten. Aus den Einzelwerten der Doppelproben wurden Mittelwerte gebildet, welche für die folgenden Berechnungen verwendet wurden.

2.5.4. Bestimmung von Homocystein im Serum mittels HPLC

Die Bestimmung wurde mittels Reversed Phase HPLC im Zentrallabor des Klinikums Tübingen (Medizinische Klinik IV, Prof. Dr. Häring) durchgeführt. (Homocysteine by HPLC, Reagent Kit, 100 tests, Catalog Number 195-4075, Bio-Rad Laboratories GmbH, München).

Testprinzip:

Zu 50 μl Plasma oder Serum werden 100 μl Interner Standard, 50 μl Reduktionsreagenz und 100 μl Derivatisierungsreagenz zugegeben und 5 Minuten bei 50 °C inkubiert. Nach Abkühlen werden die Proteine durch Zugabe von 100 μl Fällungreagenz ausgefällt und der Niederschlag abzentrifugiert. Der Überstand wird mittels eines isokratischen HPLC-Systems auf einer Reversed Phase-Kartusche aufgetrennt und durch nachfolgende Fluoreszenzdetektion ($\lambda_{\text{ex}} = 385\text{nm}$, $\lambda_{\text{em}} = 515\text{nm}$) quantifiziert.

2.5.5. Bestimmung von SAM, SAH und Adenosin mittels HPLC

Diese Bestimmung wurde mittels HPLC-Methode durchgeführt.

Testprinzip:

Die tiefgefrorenen Nieren wurden mit Hilfe von flüssigem Stickstoff pulverisiert und anschließend wurde das darin enthaltene Gewebeprotein mit 0.6 N eiskalter Perchlorsäure denaturiert. Nach Zentrifugation über 30 Minuten bei konstanter Temperatur von 4 °C wurde der Überstand abgetrennt und mit 2M Kaliumcarbonat und 1M Kalium-Dihydrogen-Phosphat neutralisiert. SAM, SAH und Adenosin (Delabar et al. 1999) wurden mittels HPLC unter Verwendung einer Nukleosil 100 C18-Trennsäule (3 μm , 125x4 mm I.D.) weiter analysiert. Eluent A bestand aus 10 mM Ammonium-Dihydrogen-Phosphat und 0.6 mM Na-Heptansulfonat. Solvent B enthielt zusätzlich 10% Acetonitril.

2.5.6. Bestimmung von EPO mittels Enzymimmunoassay

Die Bestimmung der EPO-Serumkonzentration wurde mit dem kommerziellen Enzymimmunoassay der Firma medac (medac, Gesellschaft für klinische Spezialpräparate mbH, Wedel) durchgeführt.

Prinzip: Im EPO-ELISA wurden zwei monoklonale Antikörper (aus Mäusen) zur Bestimmung der EPO-Serumkonzentration (mU/ml) eingesetzt. Ein Antikörper ist auf der Mikrotiterplatte fixiert und bindet im ersten Reaktionsschritt das im Serum vorliegende EPO. Im zweiten Reaktionsschritt wird ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Antikörper zugegeben und bindet an den bereits vorhandenen EPO–Antikörper–Komplex. Die Phosphataseaktivität des gebundenen Konjugats modifiziert das Substrat p–Nitrophenylphosphat zu einer intensiv gelb gefärbten p–Nitrophenol-Lösung. Die Extinktion wird bei 405 nm bestimmt und folgt dem Lambert-Beerschen Gesetz: $E = {}^{10}\log I_0/I = \epsilon \times c \times d$. Die EPO-Aktivität im Serum wird in mU/ml angegeben.

2.6. Abgeleitete Größen

2.6.1. Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Die Mittelwerte des systolischen (P_{systol}) und des diastolischen (P_{diastol}) Blutdruckes wurden graphisch aus den Aufzeichnungen des Schnellschreibers ermittelt. Der MAP wurde nach folgender Formel berechnet:

$$\text{MAP} = P_{\text{diastol}} + (P_{\text{systol}} - P_{\text{diastol}})/3 \quad [\text{MAP}] = \text{mmHg}$$

2.6.2. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die GFR jeder Sammelperiode wurde nach der Standardformel berechnet:

$$\text{GFR} = [\text{Inulin}]_{\text{Urin}} \cdot \text{Urinvolumen (ml)} / [\text{Inulin}]_{\text{Plasma}} \quad [\text{GFR}] = \text{ml/min}$$

Da intravenös infundiertes Inulin vollständig filtriert wird, aber vom Tubulussystem weder sezerniert noch rückresorbiert wird, stellt es einen idealen Indikatorstoff zur Bestimmung der GFR dar.

2.7. Statistik

Alle Werte werden als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Mittelwertdifferenzen zwischen den einzelnen Gruppen wurden mittels Varianzanalyse (ANOVA mit Bonferroni-Korrektur) und entsprechenden Post-Tests (Student t-Test für gepaarte Proben) auf Unterschiede geprüft. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Inactin-CO-EPO-Dosiswirkungskurve

Untersucht wurde der Einfluss auf die EPO-Konzentration von narkotisierten Tieren (Inactin) im Vergleich zu nicht narkotisierten Tieren (Wach) bei unterschiedlichen CO-Konzentrationen (Tab. 5 und Abb. 5). Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der EPO-Werte bei den verschiedenen CO-Konzentrationen.

Tabelle 5: Erythropoetin (EPO in mU/ml) bei wachen vs. narkotisierten Ratten (Inactin) bei unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition über 4 Stunden, dargestellt sind Mittelwerte±SEM.

CO-Konzentration	EPO-Inactin Konzentration	n	EPO-Wach Konzentration	n
0 ppm	10,0±1,0	4	7,8±0,5	6
200 ppm	30,2±1,5	5	35,4±2,8	5
400 ppm	55,4±2,7	7	65,8±10,1	5
600 ppm	216,9±24,2	10	250,5±27,3	9
800 ppm	890,0±63,5	4	1103,0±123,3	8
1000 ppm	1068,8±56,3	5	1218,8±67,3	10
1200 ppm	2254,8,0±278,6	6	2156,9±154,8	13

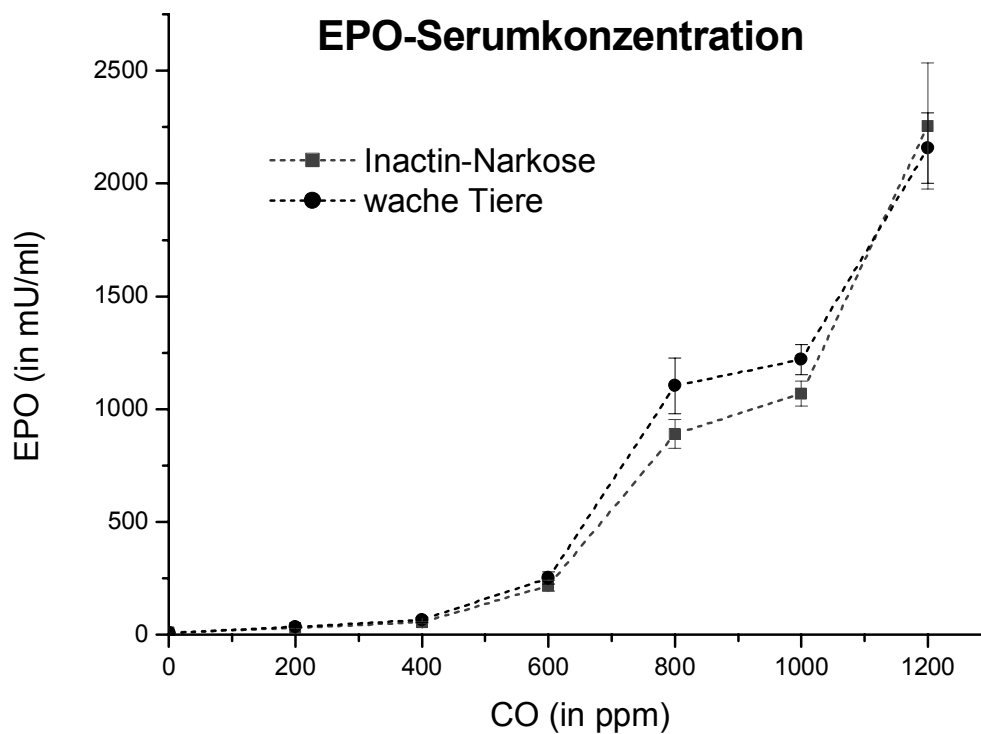


Abbildung 5: Dosis-Wirkungskurve der EPO-Spiegel (EPO in mU/ml) in Abhängigkeit von der CO-Konzentration (0 bis 1200 ppm CO über 4 Stunden) bei wachen vs. narkotisierten Ratten (Inactin).

3.2. Carboxyhämoglobin und Sauerstoffpartialdruck

Die Exposition von CO führt zur Bildung von Carboxyhämoglobin (HbCO). Dargestellt sind die HbCO-Werte nach 4 Stunden. Der HbCO-Wert der normoxischen Kontrollen lag bei $0,9 \pm 0,4$ %Hb. Die HbCO-Konzentration stieg mit Zunahme der CO-Konzentration kontinuierlich an. Ihr Maximalwert wurde bei der CO-Konzentration 1200 ppm mit einem Wert von $64,7 \pm 1,7$ %Hb erreicht (Tab. 6 und Abb. 6).

Gegenläufig zum Anstieg der CO- und der HbCO-Konzentration nahm der arterielle Sauerstoffpartialdruck kontinuierlich ab. Der art. PO_2 der normoxischen Kontrollen lag bei $88,7 \pm 2,3$ mmHg. Sein Minimalwert betrug bei 1200 ppm $16,1 \pm 7,4$ mmHg (Tab. 6 und Abb. 7).

Tabelle 6: HbCO (in %Hb) und arterieller Sauerstoffpartialdruck (art. PO₂ in mmHg) bei unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm bis 1200 ppm über 4 Stunden) bei narkotisierten Tieren, dargestellt sind Mittelwerte ± SEM.

CO-Konzentration	HbCO	n	art. PO₂	n
0 ppm	0,9±0,4	6	88,7±2,3	3
400 ppm	33,7±0,9	8	73,5±3,5	7
600 ppm	48,5±1,6	9	63,9±5,5	9
800 ppm	59,0±3,4	3	34,9±7,1	4
1000 ppm	61,5±0,9	8	28,8±4,7	8
1200 ppm	64,7±1,7	5	16,1±7,4	4

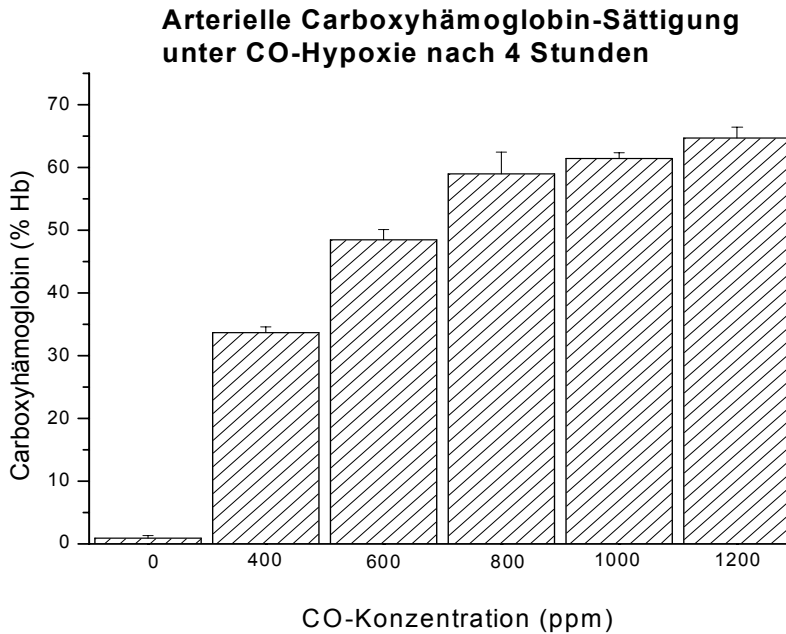


Abbildung 6: HbCO (in %Hb) bei unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm bis 1200 ppm nach 4 Stunden) bei narkotisierten Tieren.

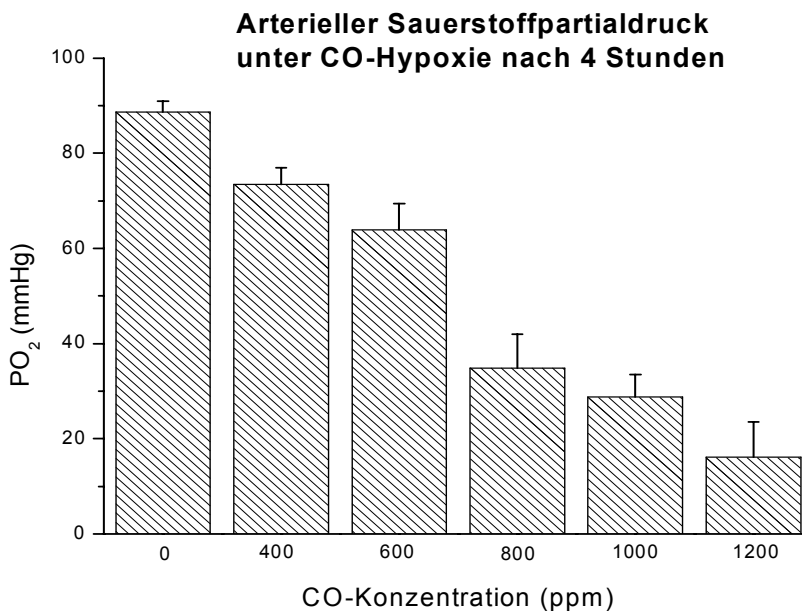


Abbildung 7 Arterieller Sauerstoffpartialdruck (art. PO₂ in mmHg) bei unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm bis 1200 ppm nach 4 Stunden) bei narkotisierten Tieren.

3.3. Die Glomeruläre Filtrationsrate

Zu Beginn der Untersuchung lag die GFR unter Normoxie durchschnittlich bei $0,91 \pm 0,05$ ml/min/100gKG. Nach 4 Stunden sank die GFR um 18% auf $0,75 \pm 0,06$ ml/min/100gKG ab. Unter hypoxischen Bedingungen fand sich im zeitlichen Verlauf nach 4 h bei allen CO-Konzentrationen ein deutlicherer Abfall der GFR. Dieser Abfall betrug 35% bei 400 ppm, 44% bei 800 ppm und 64% bei 1000 ppm (signif.) des Ausgangswertes (Tab. 7 und Abb. 8).

Vergleicht man den Einfluss der steigenden CO-Konzentrationen mit der Normoxie-Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten, so fanden sich ebenfalls in allen Gruppen ein Abfall der GFR. Dieser fiel um so stärker aus, je höher die expositionierte CO-Konzentration war. So zeigte sich nach 4 Stunden unter Hypoxie im Vergleich zu Normoxie ein GFR-Abfall von 8% bei 400 ppm, 34% bei 800 ppm und 58% bei 1000 ppm. Besonders deutlich stellte sich dieser Abfall der GFR bei der höchsten CO-Konzentration 1000 ppm dar. Hier zeigte sich eine signifikante Abnahme der GFR im Vergleich zum entsprechenden Zeitpunkt der Normoxie-Gruppe nach 2 Stunden um 32%, nach 3 Stunden um 40% und nach 4 Stunden um 58% (Tab. 7 und Abb. 8).

Tabelle 7: Glomeruläre Filtrationsrate (in ml/min/100gKG) unter unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm bis 1200 ppm) im zeitlichen Verlauf über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * = $p < 0,05$ vs. 0h derselben CO-Konzentration, ** = $p < 0,05$ vs. 0ppm zum selben Zeitpunkt.

CO-Konz.	GFR 0h	GFR 1h	GFR 2h	GFR 3h	GFR 4h	n
0 ppm	0,91 \pm 0,05	0,82 \pm 0,05	0,88 \pm 0,05	0,83 \pm 0,06	0,75 \pm 0,06	5
400 ppm	1,05 \pm 0,21	0,87 \pm 0,01	0,86 \pm 0,01	0,85 \pm 0,01	0,69 \pm 0,03	3
800 ppm	0,88 \pm 0,01	0,83 \pm 0,03	0,77 \pm 0,13	0,63 \pm 0,11	0,50 \pm 0,13	3
1000ppm	0,88 \pm 0,01	0,73 \pm 0,02 (*0,0173)	0,60 \pm 0,05 (*0,0304) (**0,0252)	0,50 \pm 0,05 (*0,0169) (**0,0383)	0,32 \pm 0,08 (*0,0198) (**0,0227)	2

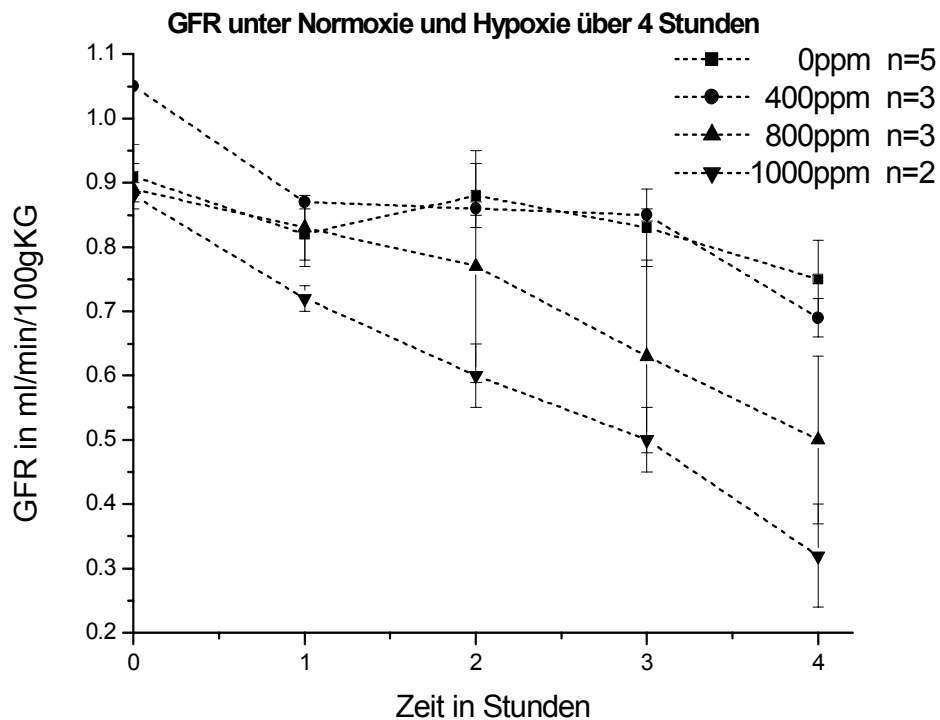


Abbildung 8: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR in ml/min/100gKG) im zeitlichen Verlauf bei unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm bis 1200 ppm über 4 Stunden) bei narkotisierten Tieren.

3.4. Homocysteininfusion

3.4.1. Dosisfindung

Zur experimentellen Herstellung einer mittleren und schweren Hyperhomocysteinämie wurden zwei unterschiedlich hohe Hcy-Dosen über 4 Stunden infundiert. Die Serum-Hcy-Spiegel der verabreichten höheren Dosis (gr.Hcy) lag bei $300,8 \pm 23,7 \mu\text{mol/l}$, die Serum-Hcy-Spiegel der niedrigeren Dosis (kl.Hcy) bei $87,4 \pm 6,2 \mu\text{mol/l}$ (Tab. 8 und Abb. 9). Der Kontrollwert wurde mit $7,7 \pm 0,6 \mu\text{mol/l}$ gemessen (Tab. 8) und befindet sich damit im Bereich der für den Menschen geltenden Normalwerte von 5 bis $15 \mu\text{mol/l}$.

Tabelle 8: Homocystein-Konzentration (in $\mu\text{mol/l}$) unter unterschiedlicher i.v. Homocysteininfusion (kl. Hcy: Bolus 4,14 mg/300gKG, ED 5,18 mg/300gKG vs. gr. Hcy: Bolus 16,56 mg/300gKG, ED 15,59 mg/300gKG vs. Kochsalzkontrolle) über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM.

Hcy-Dosis	Serum Hcy-Spiegel	n
Kontrolle	7,7 \pm 0,6	11
kl. Hcy	87,4 \pm 6,2	12
gr. Hcy	300,8 \pm 23,7	11

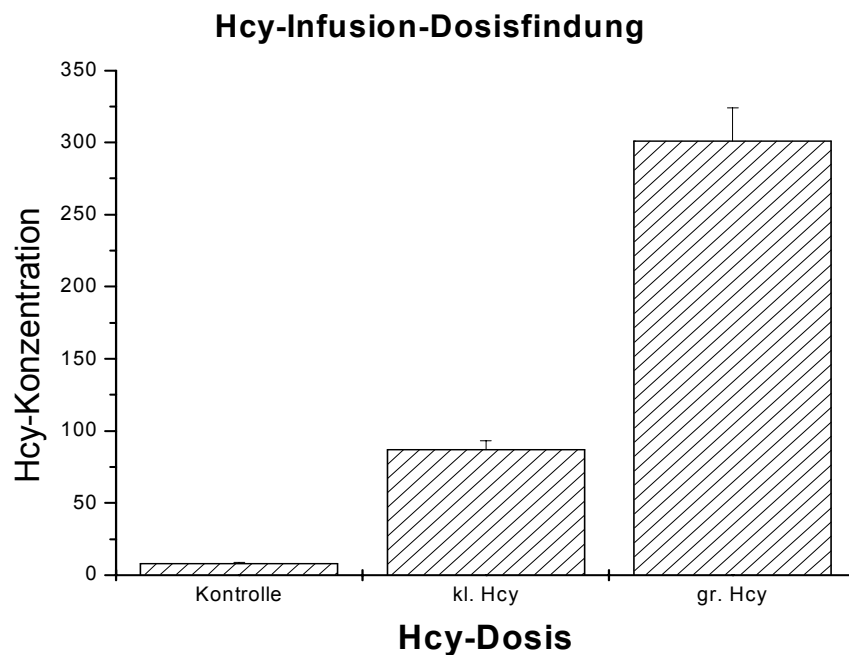


Abbildung 9: Homocystein-Konzentration (in $\mu\text{mol/l}$) unter unterschiedlicher i.v. Homocysteininfusion (kl. Hcy: Bolus 4,14 mg/300gKG, ED 5,18 mg/300gKG vs. gr. Hcy: Bolus 16,56 mg/300gKG, ED 15,59 mg/300gKG vs. Kochsalz-Kontrolle) über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren.

3.4.2. Der mittlere arterielle Blutdruck

Zu Beginn der Untersuchung lag der MAP unter Normoxie ohne Hcy-Infusion durchschnittlich bei $96,9 \pm 1,9$ mmHg. Nach 4 Stunden wurden etwa dieselben Blutdruckwerte aufgezeichnet ($96,3 \pm 1,4$ mmHg). Unter hypoxischen Bedingungen fand sich im zeitlichen Verlauf nach 4 h bei allen CO-Konzentrationen ein signifikanter Abfall des MAP. Dieser Abfall betrug bei 400 ppm 25%, bei 600 und 800 ppm jeweils 22%, bei 1000 ppm 32% und bei 1200 ppm 48% des Ausgangswertes (Tab. 9 und Abb. 10). Weiter lässt sich beschreiben, dass es bei höheren CO-Konzentrationen im zeitlichen Verlauf signifikant bereits früher zu einem Abfall des MAP kam. Vergleicht man den Einfluss der steigenden CO-Konzentrationen mit der Normoxie-Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten, so fand sich in allen Gruppen ein signifikanter Abfall des MAP. Dieser fiel um so stärker aus, je höher die expositionierte CO-Konzentration war. So zeigt sich nach 4 Stunden im Vergleich zur Normoxie ein MAP-Abfall von 19% bei 400 ppm, 24% bei 600 ppm, 30% bei 800 ppm, 33% bei 1000 ppm und 49% bei 1200 ppm (Tab. 9 und Abb. 10). Diese signifikante CO-abhängige MAP-Abnahme zeigte sich bereits nach einer Stunde.

Zu Beginn der Untersuchung lag der MAP bei Normoxie unter Hcy-Infusion durchschnittlich bei $97,7 \pm 5,4$ mmHg. Nach 4 Stunden waren die Blutdruckwerte um 9,7% ($88,3 \pm 3,6$ mmHg) des Ausgangswertes abgefallen. Unter hypoxischen Bedingungen fand sich im zeitlichen Verlauf nach 4 h bei allen CO-Konzentrationen ein Abfall des MAP. Dieser Abfall betrug bei 400 ppm 20%, 23% bei 600 ppm, 21% bei 800 ppm, 33% bei 1000 ppm (signif.) und 53% bei 1200 ppm (signif.) des Ausgangswertes (Tab. 10 und Abb. 11). Vergleicht man den Einfluss der steigenden CO-Konzentrationen mit der Normoxie-Gruppe zu verschiedenen Zeitpunkten, so findet sich in allen Gruppen ein Abfall des MAP. Dieser fiel um so stärker aus, je höher die expositionierte CO-Konzentration war. So zeigte sich nach 4 Stunden im Vergleich zur Normoxie ein MAP-Abfall von 16% bei 400 ppm, 16% bei 600 ppm, 21% bei 800 ppm (signif.), 31% bei 1000 ppm (signif.) und 40% bei 1200 ppm (signif.). Diese signifikante CO-

abhängige MAP-Abnahme zeigte sich bei 1200 ppm bereits nach einer Stunde, bei 1000 ppm nach 2 Stunden und bei 800 ppm nach 4 Stunden (Tab. 10 und Abb. 11). Die Infusion von Homocystein führte zu keinen Veränderungen des MAP.

Tabelle 9: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP in mmHg) unter unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm bis 1200 ppm) ohne Homocysteininfusion im Verlauf über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * = $p < 0,05$ vs. 0h derselben CO-Konzentration, ** = $p < 0,05$ vs. 0ppm zum selben Zeitpunkt.

CO-Konzentration	MAP 0h	MAP 1h	MAP 2h	MAP 3h	MAP 4h	n
0 ppm	96,9 \pm 1,9	95,8 \pm 1,4	95,0 \pm 2,0	93,6 \pm 1,9	96,3 \pm 1,4	6
400 ppm	92,7 \pm 2,1	88,7 \pm 2,5 (**0,0298)	86,3 \pm 3,2 (**0,0437)	81,0 \pm 2,5 (*0,0077) (**0,0029)	78,8 \pm 3,1 (*0,0069) (**0,0024)	5
600 ppm	94,4 \pm 2,0	87,8 \pm 3,3 (**0,0351)	84,4 \pm 4,7 (**0,0450)	81,1 \pm 5,5 (**0,0304)	73,9 \pm 4,4 (*0,014) (**0,0028)	4
800 ppm	87,3 \pm 3,3	84,2 \pm 3,0 (**0,0051)	78,8 \pm 2,7 (**0,0013)	74,6 \pm 3,0 (*0,028) (**0,0005)	68,3 \pm 3,3 (*0,098) (**0,0004)	5
1000 ppm	95,0 \pm 3,4	82,9 \pm 3,6 (**0,0053)	73,3 \pm 4,9 (*0,011) (**0,0016)	69,2 \pm 3,7 (*0,0023) (**0,0002)	65,0 \pm 2,8 (*0,006) (**0,0001)	4
1200ppm	95,0 \pm 0,9	60,0 \pm 3,4 (*0,0001) (**0,0003)	55,6 \pm 7,8 (*0,0075) (**0,0003)	53,3 \pm 5,0 (*0,0013) (**0,0001)	49,7 \pm 5,3 (*0,0017) (**0,0003)	4

Tabelle 10: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP in mmHg) unter unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm bis 1200 ppm) mit Homocysteininfusion (kl. Hcy: Bolus 4,14 mg/300gKG, ED 5,18 mg/300gKG) im Verlauf über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * = $p < 0,05$ vs. 0h derselben CO-Konzentration, ** = $p < 0,05$ vs. 0ppm zum selben Zeitpunkt.

CO-Konzentration	MAP 0h	MAP 1h	MAP 2h	MAP 3h	MAP 4h	n
0 ppm	97,7 \pm 5,4	94,3 \pm 4,4	92,3 \pm 3,9	89,7 \pm 3,4	88,33 \pm 3,6	5
400 ppm	93,3 \pm 3,3	85,0 \pm 5,0	83,3 \pm 5,0	78,3 \pm 5,0	74,2 \pm 5,8	2
600 ppm	96,7 \pm 3,3	93,3 \pm 1,6	83,3 \pm 3,3	77,5 \pm 4,2	75,0 \pm 3,3	2
800 ppm	88,3 \pm 5,0	88,3 \pm 3,3	83,3 \pm 3,3	77,5 \pm 4,1	70,0 \pm 6,6 (**0,0484)	2
1000 ppm	91,7 \pm 5,0	78,3 \pm 1,6	66,7 \pm 3,3 (**0,013)	64,2 \pm 0,8 (*0,0323) (**0,0068)	61,7 \pm 1,6 (*0,0295) (**0,0076)	2
1200 ppm	93,3 \pm 0	55,0 \pm 1,6 (*0,0019) (**0,0033)	55,0 \pm 1,6 (*0,0019) (**0,0025)	53,3 \pm 0 (*0,00) (**0,001)	53,3 \pm 0 (*0,00) (**0,0173)	2

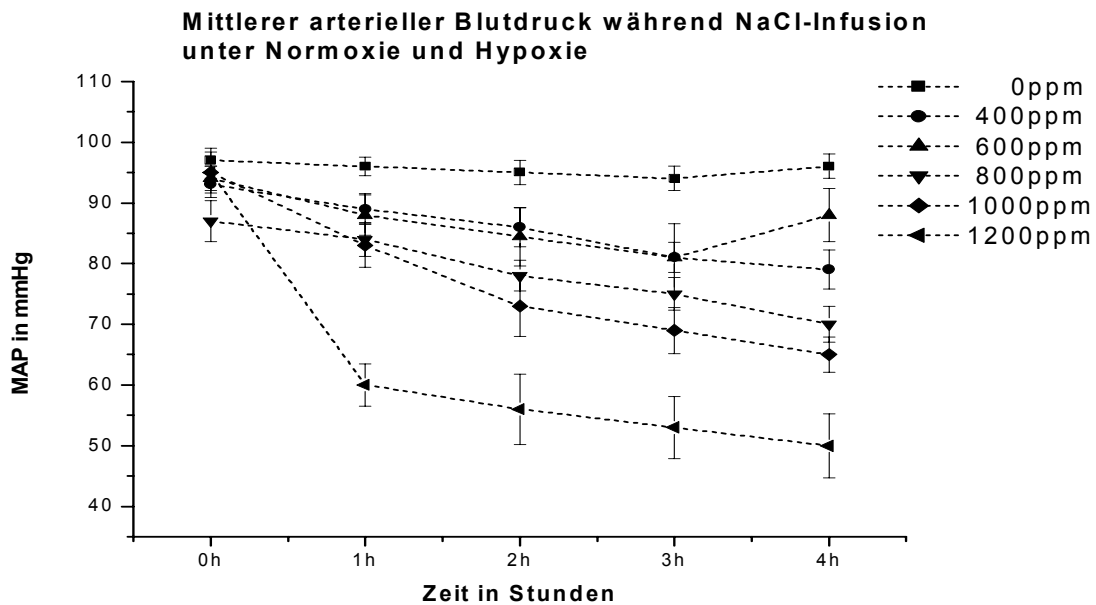


Abbildung 10: Mittlere arterielle Blutdruck (MAP in mmHg) im zeitlichen Verlauf über 4 Stunden unter unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition ohne Homocysteininfusion bei narkotisierten Tieren.

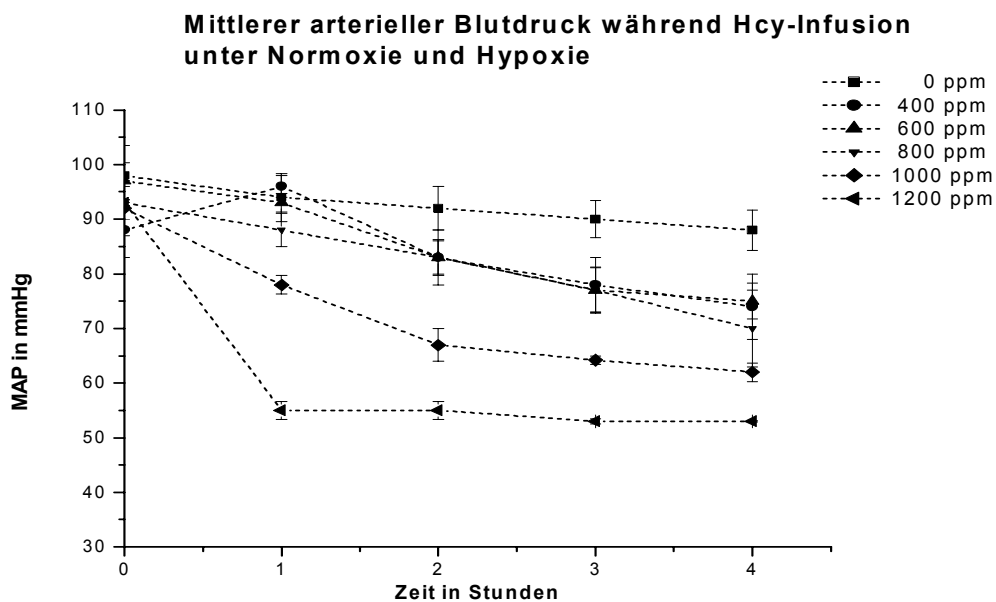


Abbildung 11: Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP in mmHg) im zeitlichen Verlauf über 4 Stunden unter unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm bis 1200 ppm) mit Homocysteininfusion (gr. Hcy: Bolus 6,56 mg/300gKG und Dauerinfusion 15,59 mg/300gKG) bei narkotisierten Tieren.

3.4.2. Die Erythropoetin-Sekretion

Unter Kontrollbedingungen betrug die EPO-Konzentration bei Normoxie $13,7 \pm 0,4$, $216,9 \pm 24,2$ bei 600 ppm und $2254,8 \pm 278,3$ mU/ml bei 1200 ppm (Tab. 11). Unter Normoxie kam es durch Hcy-Infusion zu keiner signifikanten Veränderung der EPO-Konzentrationen (ohne Hcy $13,7 \pm 0,4$ vs. kl. Hcy $10,0 \pm 2,8$ und gr. Hcy $12,0 \pm 5,5$ mU/ml). Unter der CO-Konzentration 600 ppm zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderung der EPO-Konzentrationen durch eine Hcy-Gabe (ohne Hcy $216,9 \pm 24,2$ vs. kl. Hcy $250,0 \pm 21,6$ und gr. Hcy $190 \pm 30,8$ mU/ml (Tab. 11 und Abb. 12).

Hingegen kam es unter der höchsten CO-Konzentration von 1200 ppm bei der gr. Hcy-Dosis zu einem signifikanten Abfall der EPO-Serumkonzentration um 61% auf $1375,3 \pm 98,1$ mU/ml vs. $2254,8 \pm 278,3$ der Kontrolle ohne Hcy (Tab. 11). Dieselbe CO-Konzentration wirkt sich bei der kl. Hcy-Dosis nicht signifikant aus. Der EPO-Abfall betrug lediglich 14% (auf $1972,3 \pm 327,1$ mU/ml vs. $2254,8 \pm 278,3$ der Kontrolle ohne Hcy).

Tabelle 11: Erythropoetin (EPO in mU/ml) bei unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm, 600 ppm, 1200 ppm) und unterschiedlicher i.v. Hcy-Infusion (kl. Hcy: Bolus 4,14 mg/300gKG, ED 5,18 mg/300gKG vs. gr. Hcy: Bolus 16,56 mg/300gKG, ED 15,59 mg/300gKG vs. Kochsalzkontrolle) über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle der gleichen CO-Konzentration.

	Normoxie	Hypoxie 600ppm	Hypoxie 1200ppm
Kontrolle	$13,7 \pm 0,4$ (n=4)	$216,9 \pm 24,2$ (n=10)	$2254,8 \pm 278,3$ (n=6)
kl. Hcy	$10,0 \pm 2,8$ (n=6)	$250,0 \pm 21,6$ (n=5)	$1972,3 \pm 327,1$ (n=6)
gr. Hcy	$12,0 \pm 5,5$ (n=2)	$190 \pm 30,8$ (n=5)	$1375,3 \pm 98,1$ (n=6) (*0,0138)

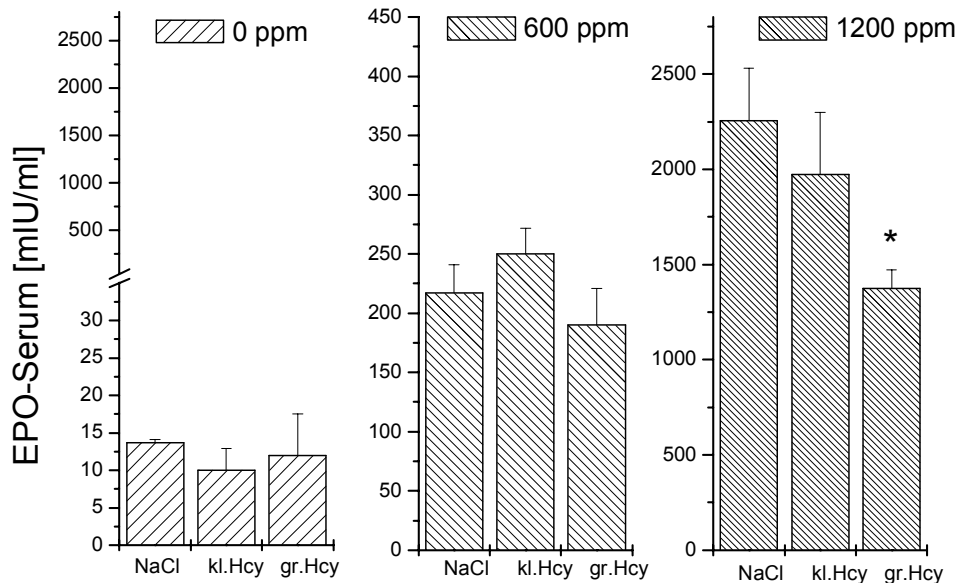


Abbildung 12: Erythropoietin (EPO in mIU/ml) bei unterschiedlicher Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (0 ppm, 600 ppm, 1200 ppm) und unterschiedlicher i.v. Hcy-Infusion (kl. Hcy: Bolus 4,14 mg/300gKG, ED 5,18 mg/300gKG vs. gr. Hcy: Bolus 16,56 mg/300gKG, ED 15,59 mg/300gKG vs. Kochsalzkontrolle) über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren, dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle der gleichen CO-Konzentration.

3.4.3. Der Gewebegehalt von SAM, SAH und Adenosin

Unter Kontrollbedingungen betrug in der Normoxie-Gruppe der Gewebegehalt von SAM, SAH, SAM/SAH und Adenosin $21,0 \pm 2,3$, $0,58 \pm 0,19$, $40,2 \pm 7,3$ sowie $3,28 \pm 0,91$ nmol/g Feuchtwicht. Die Infusion von kl. Hcy unter Normoxie führte zu einem signifikanten Anstieg ($p=0,0275$) von SAH auf $0,91 \pm 0,08$, was einem Anstieg von 57% entspricht. Das MP fiel dabei um 40% ab. Im Gegensatz dazu waren die Werte von SAM und ADO annähernd unverändert (Tab. 12).

In der Hypoxie-Gruppe betrug unter Kontrollbedingungen der Gewebegehalt von SAM, SAH, SAM/SAH und Adenosin $21,8 \pm 2,4$, $1,05 \pm 0,45$, $24,2 \pm 8,0$ sowie $1,85 \pm 0,35$ nmol/g. Dies bedeutet im Vergleich zur normoxischen Kontrolle einen unveränderten Wert für SAM, eine Zunahme von SAH um 81%, damit eine Abnahme des MP um 60% und eine Zunahme von ADO um 27%.

Unter hypoxischen Bedingungen führte die zusätzliche Hcy-Infusion im Vergleich zu NaCl vor allem zu einer Zunahme von SAH (3-fach) und einer Halbierung von SAM/SAH, SAM hat um den Faktor 1,5 zugenommen (Tab. 12 und Abb. 13).

Vergleicht man den Einfluss von Hypoxie unter Hcy-Gabe auf SAM, SAH, SAM/SAH und Adenosin, so zeigte sich im Vergleich zur normoxischen Hcy-Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg ($p=0,013$ und $0,0042$) von SAH um das 3-fache und damit eine Abnahme von SAM/SAH um das 2,5-fache. In dieser Gruppe waren die Veränderungen auf SAM und Adenosin nicht signifikant verändert (Tab. 12 und Abb. 13).

Tabelle 12: Gewebegehalt der Niere von SAM, SAH, SAM/SAH und ADO (jeweils in nmol/g) unter i.v. Homocysteininfusion (kl. Hcy: Bolus 4,14 mg/300gKG, ED 5,18mg/300gKG) vs. Kontrolle (Kochsalzinfusion) bei Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (1200 ppm) vs. Normoxie über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle Normoxie/kl.Hcy, ** = $p < 0,05$ vs. Kontrolle ohne Hcy/Normoxie.

	Hcy	SAM	SAH	SAM/SAH	ADO
Normoxie	Kontr. (n=5)	21,0±2,3	0,58±0,19	40,2±7,3	3,20±0,9
	kl. Dosis (n=6)	26,2±2,5	0,91±0,08 (** p=0,028)	29,3±2,5	3,27±0,6
Hypoxie (1200 ppm)	Kontr. (n=2)	21,8±2,4	1,05±0,45	24,2±8,08	1,85±0,35
	kl. Dosis (n=3)	32,3±6,6	3,06±0,97 (* p=0,013)	12,2±2,7 (* p=0,0042)	4,16±1,6

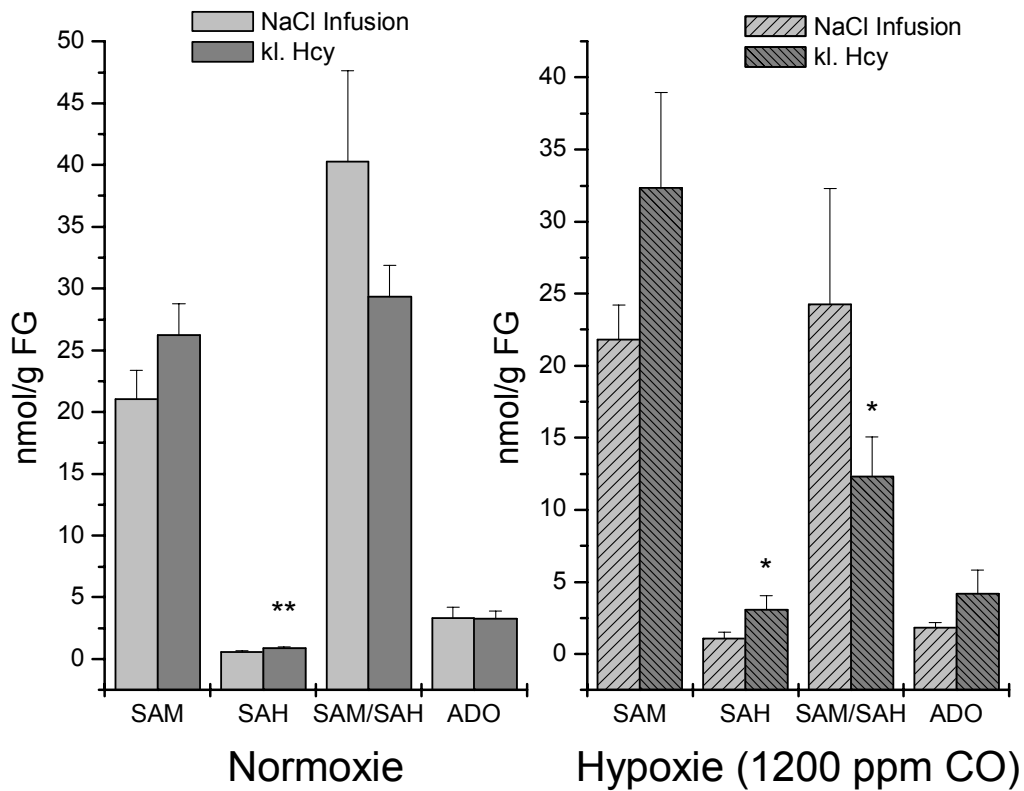


Abbildung 13: Gewebebegehalt der Niere von SAM, SAH, SAM/SAH und ADO (jeweils in nmol/g) unter i.v. Homocysteininfusion (kl. Hcy: Bolus 4,14 mg/300gKG, ED 5,18mg/300gKG) vs. Kontrolle (Kochsalzinfusion) bei Kohlenmonoxid (CO)-Exposition (1200 ppm) vs. Normoxie über 4 Stunden bei narkotisierten Tieren, * = $p < 0,05$ vs. Kontrolle Normoxie/kl.Hcy, ** = $p < 0,05$ vs. Kontrolle ohne Hcy/Normoxie.

4. DISKUSSION

4.1. Versuchsbedingungen und Methode

In Experimenten an narkotisierten Ratten können die Versuchsbedingungen gut standardisiert werden. Die Überwachung von Blutdruck und Körpertemperatur, eine standardisierte Reihenfolge sowie genetische Identität durch Verwendung von Inzuchtstämmen erlauben eine gute Vergleichbarkeit der Daten in den verschiedenen Versuchsgruppen. Außerdem kann mit Hilfe der Inulin-clearance die glomeruläre Filtrationsrate genau bestimmt werden und Veränderungen können in kleinen Beobachtungszeiträumen auf akute Interventionen exakt ermittelt werden. Die einzelnen Präparationsschritte sowie die experimentelle Ausführung des Versuches, einschließlich der Organentnahme, erfolgten nach einer standardisierten Reihenfolge. An das Ende der Präparation schloss sich stets eine Äquilibrationsperiode an. Dadurch konnten gleichbleibende Versuchsbedingungen im Sinne eines „steady state“ erzielt werden. Geringe interindividuelle Unterschiede der Werte sind auf die Narkose und den chirurgischen Eingriff zurückzuführen. Um konstante hypoxische Bedingungen garantieren zu können, wurde die CO-Konzentration im Versuchskäfig in 15-minütigen Abständen gemessen und gegebenenfalls angepasst. Überdies wurden zur Quantifizierung der Hypoxämie die arteriellen Blutgase dargestellt. Bei Versuchen mit Homocysteininfusion wurde jeweils am Versuchsende die Hcy-Plasma-Konzentration bestimmt, um zu kontrollieren, ob die erwünschten Spiegel erreicht wurden. Für die Bestimmung des renalen Gewebegehalts von SAM, SAH und ADO wurde mit einer speziell angefertigten Klemme die Niere in weniger als einer Sekunde entnommen und dann schockgefroren.

4.2. CO-EPO-Dosiswirkungskurve: Der Einfluss von Thiobutabarbital (Inactin®)

Für die Bestimmung der Nierenfunktion sowie des renalen Gewebegehalts von SAM, SAH und ADO unter Hypoxie waren Experimente unter Narkose notwendig. Ein häufig verwendetes Anästhetikum ist dabei Thiobutabarbital (Inactin®). Inwieweit dieses Barbiturat einen Einfluss auf die Nierenfunktion und folglich eine Auswirkung auf die EPO-Sekretion unter Hypoxie in der Niere hat, sollte untersucht werden. Als Stimulus für die EPO-Produktion wurde eine vierstündige Exposition bei unterschiedlichen CO-Konzentrationen durchgeführt.

Die basalen EPO-Konzentrationen der narkotisierten Tiere bewegten sich innerhalb des zu erwartenden Normbereichs für Ratten (Gleiter et al. 1997).

Der deutlichste Anstieg von EPO wurde zwischen 750 ppm und 1200 ppm CO gemessen. So betrug beispielsweise der EPO-Wert bei 1000 ppm etwa ein 70-faches des normoxischen Kontrollwerts.

Vergleicht man die EPO-Werte von Inactin-betäubten Ratten mit denen wacher Versuchstiere, so gibt es keine Unterschiede.

Wie schon von Eckardt et al. (1987) und Gleiter et al. (1997) gezeigt, ist der Anstieg der EPO-Konzentration abhängig von der Höhe der CO-Gabe.

Bei narkotisierten Mäusen untersuchten Rieg et al. (2004) Nierenfunktion, Kreislaufparameter und Elektrolytausscheidung. Als Narkotikum wurde Thiobutabarbital versus α -Chloralose jeweils in Kombination mit Ketamin verwendet. Dabei lag die GFR in einem vorher beschriebenen Bereich (Meneton et al. 2000). Im Rattenmodell konnte Thiobutabarbital die renale Autoregulation beeinträchtigen, was mit den renal vasodilatorischen Eigenschaften von Thiobutabarbital erklärt wird (Conger & Burke 1976). In tierexperimentellen Studien, die den Einfluss von Barbituraten auf die Nierenfunktion untersuchten, werden unterschiedliche Effekte auf die GFR

beschrieben (Knight et al. 1980; Linas et al. 1978). Walter et al. (1989) postulieren einen GFR-Anstieg bei mit Thiobutabarbital anästhesierten Ratten durch eine gemessene Ausdehnung des extrazellulären Flüssigkeitsvolumens. Elmer et al. (1972) beschreiben, dass Thiobutabarbital die Reabsorption im proximalen Nierentubulus und die Reninaktivität beeinflussen.

Buelke et al. (1978) konnten bei mit Thiobutabarbital anästhesierten Ratten keine Veränderung von Pulsfrequenz und arteriellem Blutdruck messen. Jedoch wird in der arteriellen Blutgasanalyse eine Hypoxämie (arterieller $PO_2 < 70$ mmHg) sowie eine geringfügige Hyperkapnie festgestellt. Nathan et al. (1975) fanden ebenfalls unter Thiobutabarbital Veränderungen der arteriellen Blutgase und des pH-Wertes, allerdings mit zeitgleichen Veränderungen der kardiovaskulären Parameter. Möglicherweise wird bei narkotisierten Ratten im Vergleich zu wachen Versuchstieren die Fähigkeit, auf den Hypoxiereiz mit respiratorischer Gegenregulation zu reagieren, eingeschränkt. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um diese Frage hinreichend zu klären.

4.3. Carboxyhämoglobin und Sauerstoffpartialdruck

Die Exposition der Versuchstiere in mit CO-angereicherter Raumluft führt zur Bildung von Carboxyhämoglobin (HbCO) im Blut. Der HbCO-Wert der normoxischen Kontrollen lag bei $0,9 \pm 0,39$ %HbCO und damit innerhalb vorbeschriebener Werte (Ronald & Forman). Der prozentuale HbCO-Anteil stieg mit Zunahme der CO-Konzentration kontinuierlich an. Ihr Maximalwert wurde bei der CO-Konzentration 1200 ppm mit einem Wert von $64,7 \pm 1,72$ %HbCO erreicht.

Zusätzlich wurde der arterielle Sauerstoffpartialdruck (art. PO_2) gemessen. Der art. PO_2 der normoxischen Kontrollen lag bei $88,7 \pm 2,33$ mmHg. Gegenläufig zum Anstieg der HbCO-Konzentration nahm der arterielle Sauerstoffpartialdruck kontinuierlich ab. Sein Minimalwert betrug bei 1200 ppm $16,1 \pm 7,40$ mmHg.

Arbeitsgruppen, die eine vergleichbare Methode zur Induktion einer funktionellen Hypoxie mittels CO-Exposition anwandten, haben ähnliche Werte für HbCO beschrieben. Beispielsweise gibt Eyer (2004) den HbCO-Anteil am

Gesamthämoglobingehalt in vivo bei 500 ppm CO mit 40 % und bei 1000 ppm CO mit 58 % an. Bei Peterson und Stewart (1975) befand sich der HbCO-Anteil bei 500 ppm CO bei 45 % bzw. 61% bei 1000 ppm und damit ebenfalls im Bereich der vorliegenden Arbeit.

4.4. Glomeruläre Filtrationsrate (GFR): Der Einfluss von Hypoxie

Untersucht wurde der Einfluss von Hypoxie auf die glomeruläre Filtrationsrate. Die Kontrollwerte der GFR unter Normoxie lagen bei $0,91 \pm 0,05$ ml/min/100gKG, vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen (Luippold et al. 2002). Nach 4 Stunden war die GFR um 18% des Ausgangswertes auf $0,75 \pm 0,06$ ml/min/100gKG abgefallen. Unter Hypoxie reduzierte sich die GFR bei allen CO-Konzentrationen. Dieser Abfall betrug 35% bei 400 ppm, 44% bei 800 ppm und 64% bei 1000 ppm im Vergleich zum Ausgangswert ($p=0,0198$). Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass zwischen dem Abfall der GFR und der Höhe der CO-Konzentration ein direkter Zusammenhang besteht.

Für den Einfluss von Hypoxie auf die renale Hämodynamik und Exkretion gibt es unterschiedliche Untersuchungsergebnisse (Galat et al. 1988; Nir et al. 1994; Walker et al. 1982). Diese Abweichungen sind möglicherweise auf die verschiedene Stärke, Dauer und Methode der hervorgerufenen Hypoxie zurückzuführen. Hypoxie wurde entweder durch CO-Exposition – wie beim hier beschriebenen Versuch - oder durch hypobarische Hypoxie ausgelöst.

Neylon et al. (1995) beschreiben bei einer moderat induzierten Hypoxämie im Rattenmodell (durch 12% O₂ in der Einatemluft) eine maximale Abnahme der GFR um 48%. Dabei scheint der renale Perfusionsdruck auf direkte Weise die Nierenfunktion zu beeinflussen. Systemische Hypoxie induziert einen vasodilatatorischen Effekt in der Niere auf die efferenten, aber besonders auf die afferenten Arteriolen. Eine bedeutende Rolle als lokaler Mediator spielt dabei Adenosin. Durch systemische Hypoxie wird Adenosin in der Niere freigesetzt, was zu einer Konstriktion der afferenten Arteriolen führt. Außerdem wird Carbonmonoxid selbst als ein vasodilatatorischer Regulator des Gefäßtonus beschrieben, der zur Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur führt und darüber

einen eigenständigen Einfluss auf die renale Perfusion hat (Matterlini et al. 2002). Schließlich hat CO auch eine eigenständige Transmitterfunktion, ähnlich wie NO. In verschiedenen Geweben wurden zwei Isoformen einer Hämoxygenase gefunden, die bei Oxidation des Methylenkohlenstoffs CO produzieren, das ähnlich wie NO eine Guanylatcyclase stimuliert und Vasodilatation bewirkt.

4.5. Homocysteininfusion: Dosisfindung

Zur experimentellen Induktion einer mittleren sowie einer schweren Hyperhomocysteinämie wurden zwei unterschiedlich hohe Hcy-Dosen gemäß dem Dosis- und Infusionsschema nach House et al. (1998) über 4 Stunden infundiert. House et al. zeigten, dass diese Infusionsraten bereits 30 Minuten nach Infusionsbeginn eine konstante und ausreichend stabile Erhöhung der Plasma-Hcy-Konzentration herstellen.

Die gemessenen Plasma-Hcy-Spiegel lagen mit $300,82 \pm 23,72 \mu\text{mol/l}$ bei gr. Hcy und $87,42 \pm 6,25 \mu\text{mol/l}$ bei kl. Hcy im Bereich einer in der Literatur beschriebenen schweren bzw. mittleren Hyperhomocysteinämie. Der Kontrollwert wurde mit $7,73 \pm 0,63 \mu\text{mol/l}$ gemessen und befindet sich im Bereich der für den Menschen geltenden Normalwerte von 5 bis $15 \mu\text{mol/l}$.

Es bleibt jedoch grundsätzlich zu bedenken, dass Untersuchungsergebnisse aus der tierexperimentell erzeugten Hyperhomocysteinämie nicht quantitativ auf die menschliche Nierenphysiologie übertragen werden können. Ein wichtiger Unterschied im Homocysteinestoffwechsel bei Ratten und Menschen besteht darin, dass bei Ratten Hcy hauptsächlich in ungebundener Proteinform vorliegt (House et al. 2000), wohingegen es bei Menschen überwiegend in proteingebundener Form vorkommt (Refsum et al. 1985). Hingegen findet der Metabolismus von Hcy bei beiden Spezies auf gleiche Weise statt.

4.6. Der mittlere arterielle Blutdruck: Einflüsse von Homocystein und Hypoxie

Eine moderate Hyperhomocysteinämie wurde in einer Vielzahl von Untersuchungen (Refersum et al. 1998; De Bree et al. 2002; Boers et al. 2000) als ein weit verbreiteter und unabhängiger Risikofaktor für Artherosklerose beschrieben. Dabei wurde der Mechanismus, durch den Hcy artherogenetisch wirkt, noch nicht völlig geklärt. In diesem Zusammenhang scheint die endotheliale Dysfunktion eine Hauptrolle zu spielen (Lentz et al. 1996; Eberhardt et al. 2000; Weiss et al. 2002). Die Ergebnisse mehrerer klinischer Studien postulieren, dass eine geringfügige Erhöhung von Plasma-Hcy einen Anstieg des arteriellen Blutdrucks bewirken kann. Dabei könnten die kardiovaskulären Veränderungen, die durch Hcy verursacht werden, eine Mitursache für den Blutdruckanstieg sein.

Um die Auswirkungen einer akuten Hyperhomocysteinämie sowie einer induzierten Hypoxie auf den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) zu untersuchen, wurde das folgende Teilexperiment durchgeführt: Unter normoxischen Kontrollbedingungen wurde über 4 Stunden ein konstanter MAP aufgezeichnet. Unter Hypoxie reduzierte sich der MAP bei allen CO-Konzentrationen. Bei ansteigender CO-Konzentration setzte der Blutdruckabfall bereits früher ein und erreichte niedrigere Absolutwerte. Dieser Abfall betrug maximal 52% bei 1200 ppm. Daraus folgt, dass der MAP abhängig von der Höhe der CO-Konzentration ist. Hingegen erzeugte die Infusion von Homocystein weder unter Normoxie noch unter Hypoxie messbare Unterschiede in Bezug auf den arteriellen Blutdruck im Vergleich zu den Kontrollen.

Andere Arbeitsgruppen kamen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Muntzel et al. (2005) fanden keinen Einfluss der akuten Hyperhomocysteinämie (induziert durch eine 105 Minuten dauernde Homocysteininfusion) auf den arteriellen Blutdruck, die Herzfrequenz sowie die sympathische Nervenaktivität. Klinische

Studien zeigten jedoch positive Zusammenhänge zwischen Plasma-Hcy-Spiegel und Blutdruck (Grassi et al. 1995; Nygard et al. 1995) als auch ein erhöhtes Hcy bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu normotensiven Kontrollen (Wocial et al. 2002). Einerseits stimmt dieses Ergebnis mit anderen Studien überein, die ebenfalls bei einer akut induzierten Homocysteinämie (Fu et al. 2002) keine Veränderung des arteriellen Blutdrucks feststellen konnten. Andererseits verzeichneten Chen et al. (2002) einen diskreten Blutdruckanstieg, begleitet von einem Abfall der glomerulären Filtrationsrate bei anästhesierten Ratten unter Hcy-Gabe. Der Grund für diese unterschiedlichen Untersuchungsergebnisse ist unklar, besonders da Chen et al. die gleiche Hcy-Dosis ($1,5 \mu\text{mol}/\text{min kg}$) verabreichten wie in vorherigen Experimenten (Fu et al. 2002). Möglicherweise verursacht nur die chronische Form der Hyperhomocysteinämie eine Veränderung des arteriellen Blutdrucks. Doch selbst hier gibt es widersprüchliche Untersuchungen. Betrachtet man z. B. die langfristige Applikation von Homocystein ins Trinkwasser, so wurden auch hier diskrepante Untersuchungsergebnisse gefunden. Fischer et al. (2003) sowie Miller et al. (2000) zeigten einen Blutdruckanstieg, während Langzeit-Methionin-Gaben, die ebenfalls zu einer messbaren Hyperhomocysteinämie führen, einen wechselnden Anstieg (Rolland et al. 1995), keine Veränderung (Matthias et al. 1996) oder gar einen Abfall des arteriellen Blutdrucks (Robin et al. 2004) bewirkten.

Demnach kann anhand des bisherigen Kenntnisstandes noch nicht mit Sicherheit gesagt werden, ob Hcy einen akuten Einfluss auf den Anstieg des arteriellen Blutdrucks im Tierexperiment oder beim Menschen hat. Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um diese Frage hinreichend beantworten zu können.

4.7. Der Gewebegehalt von SAM, SAH und ADO: Einflüsse auf das Methylierungspotential und die Sekretion von EPO

S-Adenosyl-Homocystein (SAH) ist ein Produkt und gleichzeitig Inhibitor bei S-Adenosyl-Methionin(SAM)-abhängigen Methylierungsreaktionen. Ein rascher

Abbau von SAH durch die S-Adenosyl-Homocystein-Hydrolase (SAH-Hydrolase) ist für die effektive Regulation von Methylierungsreaktionen von großer Bedeutung. SAH-Hydrolase ist das einzige in Vertebraten bekannte Enzym, das die reversible Hydrolyse von SAH zu Adenosin und Homocystein katalysiert. Unter physiologischen Bedingungen herrscht die Hydrolyse von SAH zu ADO und Hcy vor.

Das als Methylierungspotential beschriebene Verhältnis des Enzyms SAM zu SAH ist dabei der bestimmende Faktor von Transmethylierungsreaktionen. (Hoffman et al. 1979; Cantoni & Chiang 1980; Barber & Clarke 1984). Das Methylierungspotential stellt einen bedeutsamen metabolischen Indikator des zellulären Methylierungsstatus dar (Usdin et al. 1979).

Eine akute Abnahme des MP durch den Anstieg von SAH ist assoziiert mit mRNA- und DNA-Hypomethylierung und könnte auch akute Auswirkungen auf die Sekretion von Erythropoetin haben.

Zunächst wurde versucht, das Methylierungspotential durch die Umkehrung der SAH-Hydrolase-Reaktion in Richtung SAH-Bildung zu senken. Dies kann entweder durch Hcy-Belastung oder durch Hypoxie erreicht werden. Hierfür wurde der akute Einfluss von infundiertem Homocystein auf den Gewebegehalt von SAH, SAM und Adenosin unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen in der Rattenniere untersucht. Unter Kontrollbedingungen in der Normoxie-Gruppe betrug der Gewebegehalt von SAM, SAH, Adenosin und MP $21,07 \pm 2,3$; $0,58 \pm 0,09$; $3,28 \pm 0,91$ nmol/g Feuchtgewicht bzw. $40,25 \pm 7,39$. Die Infusion von Hcy erzeugte unter Normoxie eine signifikante Erhöhung von SAH auf das 2-fache und damit eine Abnahme des MP um 27%.

Im Vergleich dazu betrug in der Hypoxie-Gruppe unter Kontrollbedingungen der Gewebegehalt von SAM, SAH, Adenosin und MP $21,8 \pm 2,4$; $1,05 \pm 0,45$; $1,85 \pm 0,35$ nmol/g Feuchtgewicht bzw. $24,22 \pm 8,08$. Bei identischem SAM kam es somit unter Hypoxie zu einer Verdoppelung von SAH und nachfolgender Halbierung des MP.

Unter Hypoxie fanden sich signifikante Veränderungen durch die Hcy-Infusion. SAH verdreifachte sich und gleichzeitig halbierte sich dadurch das MP.

Dagegen waren die Veränderungen von SAH unter Hypoxie ohne Hcy-Gabe geringer.

Die erzielten Untersuchungsergebnisse stimmen größtenteils mit den Daten von Kloor et al. (2002) überein. Diese Arbeitsgruppe untersuchte den renalen Gewebegehalt von SAH, SAM und ADO in der ischämischen Rattenniere. Die Ischämie wurde induziert durch einen vollständigen Verschluss der Nierenarterie innerhalb bestimmter Zeitintervalle sowie durch Infusion von Hcy und ADO. Unter normoxischen Bedingungen lag der Gewebegehalt von SAH, SAM und ADO ($0,7 \pm 0,05$, $44,1 \pm 0,01$ und $3,8 \pm 0,1$ nmol/g) in einem ähnlichen Bereich wie in der vorliegenden Arbeit. Jedoch führte bei Kloor et al. renale Ischämie bereits nach 30 Minuten zu einer drastischen Abnahme des MP von $65,1 \pm 5,6$ auf $2,8 \pm 0,2$, was vermutlich durch den methodischen Unterschied zu erklären ist, vor allem, da der Blutfluss komplett unterbunden wird.

Die Infusion von Hcy in die ischämische Niere führte bei Kloor et al. bereits nach 60 Sekunden zu einem deutlichen (5-fachen) Anstieg von SAH. SAM und ADO blieben unverändert, was dem Ergebnis der vorliegenden Arbeit entspricht. Interessanterweise kam es bei Kloor et al. erst bei infundierten Hcy-Konzentrationen, die größer als $100 \mu\text{M}$ waren, zu einem SAH-Anstieg. Außerdem führt die systemische Hcy-Belastung zu einer Reduktion des Methylierungspotentials sowohl unter ischämischen als auch unter normoxischen Bedingungen in der Niere.

Im Gegensatz zu Kloor et al. war in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg von ADO unter Hypoxie nicht messbar. Hingegen kam es unter hypoxischen Bedingungen bei gleichzeitiger Hcy-Gabe zu einem ADO-Anstieg auf etwa das 2,3-fache (von $1,85 \pm 0,35$ auf $4,16 \pm 1,67$ nmol/g). Nach Oßwald et al. (1977) liegt der Gewebegehalt von Adenosin unter normoxischen Bedingungen bei 5 nmol/g Feuchtgewicht. Der renale Adenosinspiegel steigt bereits nach einer Minute anhaltender Ischämie steil an. Weiterhin wurde gezeigt, dass hypoxische Bedingungen zu einem deutlichen Anstieg der renalen Adenosinkonzentration führen (Oßwald et al. 1977). Dieser Nachweis wurde

jedoch in Modellen erbracht, in denen entweder die Niere durch Ligatur der Arteria renalis einer kompletten Ischämie ausgesetzt wurde oder durch Erhöhung der Natriumbelastung die energieverbrauchende Reabsorptionsarbeit der Tubuli erheblich gesteigert worden war (Oßwald & Gleiter 1993). Für das hier verwendete Modell der funktionellen Hypoxie liegen jedoch bisher noch keine Daten über die Adenosinkonzentration vor.

Nach Wolfe und Borchardt (1991) führt Adenosin *in vitro* in Konzentrationen zwischen 3 und 10 μM zu einer Inaktivierung der SAH-Hydrolase. Dieser Prozess basiert auf der Oxidation von C-3' am Riboserest von Adenosin mit zeitgleicher Reduktion der NAD^+ zu NADH.

Eine weitere Erklärung für die Akkumulation des SAH-Gewebegehalts unter Hypoxie könnte die gesteigerte Rate der SAH-Synthese durch das gleichzeitige Vorhandensein von Homocystein und ADO sein. Kloor et al. (2002) beschreiben, dass Hcy unter ischämischen Bedingungen, wenn ADO erhöht ist, der limitierende Faktor für die SAH-Synthese ist. Diese *in vivo*-Ergebnisse stimmen mit *in vitro*-Studien dahingehend überein, dass das thermodynamische Gleichgewicht der SAH-Hydrolasereaktion auf der Seite der SAH-Synthese liegt (de la Haba und Cantoni 1959; Kloor et al. 1996).

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass unter Normoxie der SAH-Anstieg während Hcy-Infusion weniger stark ist als unter Hypoxie, wenn SAM und ADO gleich bleiben. Daraus lässt sich ableiten, dass die Anwesenheit von freiem ADO der limitierende Faktor für die SAH-Synthese unter normoxischen Bedingungen ist. Im Gegensatz zu hypoxischen Bedingungen, wenn Adenosin ansteigt und das Vorhandensein von Hcy der limitierende Faktor für die SAH-Synthese wird.

Im Unterschied zur chronischen Hyperhomocysteinämie, zu der bereits eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen vorliegen, sind renale Veränderungen bei einer akuten Hyperhomocysteinämie und insbesondere deren Einflüsse auf das Methylierungspotential weit weniger erforscht. Sowohl Hypoxie als auch chronisch erhöhte Hcy-Konzentrationen führten in einer Vielzahl von

Experimenten zu einer wesentlichen Verminderung des Methylierungspotentials in der Zelle. So korrelieren z. B. in klinischen Untersuchungen bei Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz die erhöhten Hcy-Plasmakonzentrationen mit erhöhten SAH-Konzentrationen in roten Blutkörperchen und einem reduzierten Methylierungspotential (Perna et al. 1993 und 1996). Folglich kann angenommen werden, dass bei diesen Patienten auch in der Niere das Methylierungspotential während einer Hyperhomocysteinämie reduziert ist.

Wie bereits beschrieben, stellt das Methylierungspotential einen bedeutsamen metabolischen Indikator des zellulären Methylierungsstatus dar. Eine akute Abnahme des MP ist assoziiert mit mRNA- und DNA-Hypomethylierung und könnte auch akute Auswirkungen auf die Sekretion von Erythropoetin haben, was bisher unter funktioneller Hypoxie im Rattenmodell noch nicht dargestellt wurde. Deshalb wurden in einem weiteren Versuch zwei unterschiedlich hohe Hcy-Konzentrationen infundiert, um einen akuten Einfluss auf die EPO-Sekretion unter Normoxie und Hypoxie zu messen. Unter Kontrollbedingungen betrug die EPO-Konzentration bei Normoxie ohne Hcy-Infusion $13,7 \pm 0,45$, bei 600 ppm $16,9 \pm 24,22$ und bei der CO-Konzentration 1200 ppm $2254,8 \pm 278,3$ mU/ml. Durch die Infusion von Hcy kam es unter Normoxie zu keinen signifikanten Veränderungen der EPO-Konzentration (kl. Hcy $10,0 \pm 2,89$ vs. gr. Hcy $12,0 \pm 5,50$ mU/ml). Unter 600 ppm CO zeigten sich ebenfalls keine signifikanten Veränderungen der EPO-Konzentration durch die Hcy-Gabe (ohne Hcy $216,9 \pm 24,2$ vs. kl. Hcy $250,0 \pm 21,6$ und gr. Hcy $190 \pm 30,8$ mU/ml). Dagegen kam es bei 1200 ppm CO und zusätzlicher Infusion von gr. Hcy zu einem hochsignifikanten ($p=0,0138$) EPO-Abfall um 61% ($1375,3 \pm 98,1$ vs. $2254,8 \pm 278,3$ mU/ml) im Vergleich zur hypoxischen Kontrolle ohne Hcy. Die gleiche CO-Konzentration wirkte sich bei der kl. Hcy-Dosis schwächer aus. Der EPO-Abfall betrug lediglich 14 % ($1972,3 \pm 327,1$ vs. $2254,8 \pm 278,3$ mU/ml).

Obwohl wie oben beschrieben bereits unter normoxischen Bedingungen eine Verminderung des MP durch Hcy-Infusion messbar war, wirkt sich die Abnahme der EPO-Sekretion erst bei einem Hypoxiereiz von 1200 ppm CO und der

gleichzeitigen maximalen Hcy-Belastung aus. Die Abnahme der EPO-Produktion scheint abhängig zu sein von der Höhe der infundierten Hcy-Konzentration und der gleichzeitigen Hypoxie. Bereits Tinton und Buc-Calderon (1995) beschrieben die Potenzierung der durch Adenosin hervorgerufenen Hemmung der Proteinsynthese durch Homocystein. Es scheint einen Schwellenwert für das Methylierungspotential zu geben, der unterschritten werden muss, damit sich messbare Effekte auf die EPO-Sekretion ergeben.

Innerhalb von Zellkulturen untersuchten Hermes et al. (2004) über 24 Stunden den Einfluss von Hypoxie und selektiver Hemmung der SAH-Hydrolase auf das Methylierungspotential in HepG2-Zellen. Ferner wurden die Auswirkungen eines veränderten MP auf mRNA- und DNA-Methylierung sowie auf Expression von ausgewählten Genen, wie z. B. von Erythropoetin untersucht. Hier steigerte Hypoxie die EPO-mRNA-Expression auf das 2,7-fache. Unter einem reduzierten MP wurde die EPO-mRNA-Expression unter Normoxie und Hypoxie um 70% reduziert. Erstaunlicherweise kamen Hermes et al. zu dem Ergebnis, dass unter hypoxischen Bedingungen das MP um etwa das 4-fache ansteigt. Die selektive Hemmung der SAH-Hydrolase (durch Adenosin-2',3'-Dialdehyd) führte zu einem 40-fachen Anstieg des MP sowohl unter normoxischen als auch unter hypoxischen Bedingungen. Ferner führte ein vermindertes MP zu einer signifikanten Reduktion der gesamten mRNA-Methylierung. Wobei gezeigt wurde, dass die untersuchten Gene unterschiedlich auf die MP-Veränderung reagierten. Dies impliziert, dass Genen mit einer langsameren Transkriptionsrate und mRNA mit einem langsameren Turnover unempfindlicher für kurzfristige Veränderungen des MP sind.

Sicherlich lassen sich diese in vitro-Daten nur eingeschränkt auf Tierexperimente übertragen. Doch unterstützen sie die hier aufgestellte Hypothese, dass ein reduziertes MP auch unter akuten Bedingungen einen direkten Einfluss auf die EPO-Sekretion hat. Wesentliche Unterschiede liegen vor allem darin, dass unter in vitro-Bedingungen auf den isolierten Hypoxiereiz mit einer Zunahme des MP reagiert wurde. Möglicherweise liefert die deutlich längere Hypoxiedauer (4 h vs. 24 h) eine Erklärung. Außerdem führte ein

reduziertes MP bei Hermes et al. (2004) sowohl unter Hypoxie als auch unter Normoxie zu einer Verminderung der EPO-mRNA-Expression um 70%.

Diese Unterschiede müssen außerdem unter dem Aspekt betrachtet werden, dass die Untersuchung bei Hermes et al. bei chronischer und in der vorliegenden Versuchsanordnung bei akuter Hyperhomocysteinämie durchgeführt wurden. Im Gegensatz zur chronischen Hyperhomocysteinämie, wozu bereits eine Vielzahl von Untersuchungsergebnissen vorliegen, sind die Einflüsse der akuten Hyperhomocysteinämie auf renale Veränderungen und insbesondere auf das Methylierungspotential weit weniger erforscht. Eine klinische Studie (Fux et al. 2005) untersuchte den Einfluss akuter Hyperhomocysteinämie auf das MP von Erythrozyten und auf die DNA-Methylierung. Dabei war eine achtstündige Hcy-Belastung mit erreichten Plasmawerten von über 20 $\mu\text{mol/l}$ nicht ausreichend, um eine Veränderung des MP und die DNA-Hypomethylierung in Lymphozyten zu induzieren.

Weitere Untersuchungen werden notwendig sein, um die Frage hinreichend beantworten zu können, inwieweit eine kurzzeitige Hyperhomocysteinämie und Hypoxie akute Einflüsse auf das Methylierungspotential und nachfolgend auch auf die Erythropoetin-Sekretion haben können.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Erhöhte Hcy-Konzentrationen im Blut führen zu einer Senkung des Methylierungspotentials (SAM/SAH). Die Abnahme des Methylierungspotentials führt zu einer DNA-Hypomethylierung und einem Rückgang der Methyltransferase-Aktivität. Die Methylierung wiederum ist notwendig für die Reproduktion von Genen. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob durch Homocysteingabe die renale EPO-Sekretion nach Stimulation mit Kohlenmonoxid verändert wird.

Dafür wurden folgende Aspekte untersucht:

1. Einfluss der Inactin-Narkose auf die EPO-Sekretion im Vergleich zur EPO Sekretion bei wachen Ratten.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede der EPO-Werte zwischen narkotisierten Tieren (Inactin) im Vergleich zu nicht narkotisierten Tieren (Wach) bei unterschiedlichen CO-Konzentrationen.

2. Bestimmung der Blutgase nach Kohlenmonoxid-Exposition.

Der HbCO-Wert stieg mit Zunahme der CO-Konzentration kontinuierlich an. Gegenläufig zum Anstieg der CO- und der HbCO-Konzentration nahm der arterielle Sauerstoffpartialdruck kontinuierlich ab.

3. Einfluss der Exposition von Kohlenmonoxid auf die Nierenfunktion.

Es besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der CO-Konzentration und dem Abfall der GFR.

4. Einfluss von Homocysteininfusion und CO-induzierter Hypoxie auf den arteriellen Blutdruck.

Der Abfall des MAP war direkt abhängig von der Höhe der CO-Konzentration. Hingegen hatte die Infusion von Homocystein weder unter Normoxie noch unter Hypoxie einen Einfluss auf den arteriellen Blutdruck.

5. Einfluss von Homocysteininfusion und CO-induzierter Hypoxie auf das Methylierungspotential und damit auf die EPO-Sekretion.

Unter Normoxie erzeugte die Infusion von Hcy eine signifikante Erhöhung von SAH und damit eine Abnahme des MP. Unter Hypoxie fanden sich im Vergleich zu Normoxie eine signifikante Erhöhung von SAH und eine Abnahme des MP durch Hcy-Infusion.

Die vorliegende Untersuchung zeigt, dass unter Normoxie der SAH-Anstieg während Hcy-Infusion weniger stark ist als unter Hypoxie. Unter Hypoxie fanden sich im Vergleich zu Normoxie eine signifikante Erhöhung von SAH und eine Abnahme des MP durch die Hcy-Infusion.

Ein signifikanter Anstieg von ADO war weder unter Normoxie noch unter Hypoxie messbar.

Eine Verminderung der EPO-Sekretion im Serum war bei maximalem Hypoxiereiz (1200 ppm CO) und zusätzlicher Infusion von Hcy (gr. Hcy) signifikant messbar.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abe T, Takaue Y, Kawano Y, Kuroda Y. Effect of recombinant erythropoietin in interaction with stromal factors on cord blood hematopoiesis. *Blood* 1996 April 15;87(8):3212-7.
2. Abraham PA. Practical approach to initiation of recombinant human erythropoietin therapy and prevention and management of adverse effects. *Am J Nephrol* 1990;10 Suppl 2:7-14.
3. Acker H. Cellular oxygen sensors. *Ann N Y Acad Sci* 1994 April 15;718:3-10.
4. Adamson JW. Regulation of red blood cell production. *Am J Med* 1996 August 26;101(2A):4S-6S.
5. Backlund PS, Jr., Carotti D, Cantoni GL. Effects of the S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors 3-deazaadenosine and 3-deazaaristeromycin on RNA methylation and synthesis. *Eur J Biochem* 1986 October 15;160(2):245-51.
6. Barber JR, Clarke S. Inhibition of protein carboxyl methylation by S-adenosyl-L-homocysteine in intact erythrocytes. Physiological consequences. *J Biol Chem* 1984 June 10;259(11):7115-22.
7. Bartel RL, Borchardt RT. Effects of adenosine dialdehyde on S-adenosylhomocysteine hydrolase and S-adenosylmethionine-dependent transmethylations in mouse L929 cells. *Mol Pharmacol* 1984 May;25(3):418-24.
8. Berne RM, Knabb RM, Ely SW, Rubio R. Adenosine in the local regulation of blood flow: a brief overview. *Fed Proc* 1983 December;42(15):3136-42.
9. Bitonti AJ, Byers TL, Bush TL, Casara PJ, Bacchi CJ, Clarkson AB, Jr., McCann PP, Sjoerdsma A. Cure of *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense* infections in mice with an irreversible inhibitor of S-adenosylmethionine decarboxylase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990 August;34(8):1485-90.
10. Bleich S, Degner D, Wiltfang J, Maler JM, Niedmann P, Cohrs S, Mangholz A, Porzig J, Sprung R, Ruther E, Kornhuber J. Elevated homocysteine levels in alcohol withdrawal. *Alcohol Alcohol* 2000 July;35(4):351-4.

11. Bleich S, Bleich K, Kropp S, Bittermann HJ, Degner D, Sperling W, Ruther E, Kornhuber J. Moderate alcohol consumption in social drinkers raises plasma homocysteine levels: a contradiction to the 'French Paradox'? *Alcohol* 2001 May;36(3):189-92.
12. Cantoni L, Maggi G, Mononi G, Preti G. [Relations between protidopoiesis and biological transmethylations: action of S-adenosylmethionine on protein crisis in chronic hepatopathies]. *Minerva Med* 1975 May 2;66(33):1581-9.
13. Cardier JE, Foster DC, Lok S, Jacobsen SE, Murphy MJ, Jr. Megakaryocytopoiesis in vitro: from the stem cells' perspective. *Stem Cells* 1996;14 Suppl 1:163-72.
14. Carrero P, Okamoto K, Coumailleau P, O'Brien S, Tanaka H, Poellinger L. Redox-regulated recruitment of the transcriptional coactivators CREB-binding protein and SRC-1 to hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol* 2000 January;20(1):402-15.
15. Carson NA, Neill DW. Metabolic abnormalities detected in a survey of mentally backward individuals in Northern Ireland. *Arch Dis Child* 1962 October;37:505-13.
16. Castro R, Rivera I, Martins C, Struys EA, Jansen EE, Clode N, Graca LM, Blom HJ, Jakobs C, de A, I. Intracellular S-adenosylhomocysteine increased levels are associated with DNA hypomethylation in HUVEC. *J Mol Med* 2005 October;83(10):831-6.
17. Caudill MA, Wang JC, Melnyk S, Pogribny IP, Jernigan S, Collins MD, Santos-Guzman J, Swendseid ME, Cogger EA, James SJ. Intracellular S-adenosylhomocysteine concentrations predict global DNA hypomethylation in tissues of methyl-deficient cystathionine beta-synthase heterozygous mice. *J Nutr* 2001 November;131(11):2811-8.
18. Chen SH, Ban ZP, Cao JL. [Clinical observation on effect of yishen jiedu recipe in retarding the course of chronic renal failure]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi* 2002 August;22(8):584-6.
19. Cipolleschi MG, D'Ippolito G, Bernabei PA, Caporale R, Nannini R, Mariani M, Fabbiani M, Rossi-Ferrini P, Olivotto M, Dello SP. Severe hypoxia enhances the formation of erythroid bursts from human cord blood cells and the maintenance of BFU-E in vitro. *Exp Hematol* 1997 October;25(11):1187-94.
20. Coburn RF, Williams WJ, Kahn SB. Endogenous carbon monoxide production in patients with hemolytic anemia. *J Clin Invest* 1966 April;45(4):460-8.

21. Conger JD, Burke TJ. Effects of anesthetic agents on autoregulation of renal hemodynamics in the rat and dog. *Am J Physiol* 1976 March;230(3):652-7.
22. Cortese R, Landsberg R, Haar RA, Umbarger HE, Ames BN. Pleiotropy of hisT mutants blocked in pseudouridine synthesis in tRNA: leucine and isoleucine-valine operons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1974 May;71(5):1857-61.
23. Crooks PA, Dreyer RN, Coward JK. Metabolism of S-adenosylhomocysteine and S-tubercidinylhomocysteine in neuroblastoma cells. *Biochemistry* 1979 June 12;18(12):2601-9.
24. Davis WM, Bedford JA, Buelke JL, Guinn MM, Hatoum HT, Waters IW, Wilson MC, Braude MC. Acute toxicity and gross behavioral effects of amphetamine, four methoxyamphetamines, and mescaline in rodents, dogs, and monkeys. *Toxicol Appl Pharmacol* 1978 July;45(1):49-62.
25. De BA, Verschuren WM, Kromhout D, Mennen LI, Blom HJ. Homocysteine and coronary heart disease: the importance of a distinction between low and high risk subjects. *Int J Epidemiol* 2002 December;31(6):1268-72.
26. DE LA HABA, CANTONI GL. The enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-homocysteine from adenosine and homocysteine. *J Biol Chem* 1959 March;234(3):603-8.
27. Deguchi T, Barchas J. Inhibition of transmethylations of biogenic amines by S-adenosylhomocysteine. Enhancement of transmethylation by adenosylhomocysteinase. *J Biol Chem* 1971 May 25;246(10):3175-81.
28. Eberhardt RT, Forgione MA, Cap A, Leopold JA, Rudd MA, Trolliet M, Heydrick S, Stark R, Klings ES, Moldovan NI, Yaghoubi M, Goldschmidt-Clermont PJ, Farber HW, Cohen R, Loscalzo J. Endothelial dysfunction in a murine model of mild hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 2000 August;106(4):483-91.
29. Eckardt KU, Boutellier U, Kurtz A, Schopen M, Koller EA, Bauer C. Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia. *J Appl Physiol* 1989 April;66(4):1785-8.
30. Eckardt KU, Pugh CW, Meier M, Tan CC, Ratcliffe PJ, Kurtz A. Production of erythropoietin by liver cells in vivo and in vitro. *Ann N Y Acad Sci* 1994 April 15;718:50-60.
31. Elmer M, Eskildsen PC, Kristensen LO, Leyssac PP. A comparison of renal function in rats anesthetized with inactin and sodium amytal. *Acta Physiol Scand* 1972 September;86(1):41-58.

32. Eloranta TO. Tissue distribution of S-adenosylmethionine and S-adenosylhomocysteine in the rat. Effect of age, sex and methionine administration on the metabolism of S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and polyamines. *Biochem J* 1977 September 15;166(3):521-9.
33. Erslev AJ, Caro J, Birgegard G, Silver R, Miller O. The biogenesis of erythropoietin. *Exp Hematol* 1980;8 Suppl 8:1-13.
34. Eyer F, Felgenhauer N, Jetzinger E, Pfab R, Zilker TR. Acute endosulfan poisoning with cerebral edema and cardiac failure. *J Toxicol Clin Toxicol* 2004;42(6):927-32.
35. Fischer PA, Dominguez GN, Cuniberti LA, Martinez V, Werba JP, Ramirez AJ, Masnatta LD. Hyperhomocysteinemia induces renal hemodynamic dysfunction: is nitric oxide involved? *J Am Soc Nephrol* 2003 March;14(3):653-60.
36. Fisher JW, Radtke HW, Jubiz W, Nelson PK, Burdowski A. Prostaglandins activation of erythropoietin production and erythroid progenitor cells. *Exp Hematol* 1980;8 Suppl 8:65-89.
37. Fox IH, Kelley WN. The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. *Annu Rev Biochem* 1978;47:655-86.
38. Fried W. Erythropoietin and the kidney. *Nephron* 1975;15(3-5):327-49.
39. Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, Sheppard CA, Matthews RG, Boers GJ, den HM, Kluijtmans LA, van den Heuvel LP, . A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995 May;10(1):111-3.
40. Fu WY, Dudman NP, Perry MA, Wang XL. Homocysteine attenuates hemodynamic responses to nitric oxide in vivo. *Atherosclerosis* 2002 March;161(1):169-76.
41. Fux R, Kloor D, Hermes M, Rock T, Proksch B, Grenz A, Delabar U, Bucheler R, Igel S, Morike K, Gleiter CH, Osswald H. Effect of acute hyperhomocysteinemia on methylation potential of erythrocytes and on DNA methylation of lymphocytes in healthy male volunteers. *Am J Physiol Renal Physiol* 2005 October;289(4):F786-F792.
42. Galat JA, Robinson AV, Rhodes RS. The contribution of hypoxia to postischemic renal dysfunction. *Surgery* 1988 August;104(2):257-65.
43. Gerritsen T, Vaughn JG, Waisman HA. The identification of homocystine in the urine. *Biochem Biophys Res Commun* 1962 December 19;9:493-6.
44. Gleiter CH, Becker T, Wenzel J. Erythropoietin production in healthy volunteers subjected to controlled hypobaric hypoxia: further evidence

- against a role for adenosine. *Br J Clin Pharmacol* 1997 August;44(2):203-5.
45. Goodnough LT, Price TH, Parvin CA, Friedman KD, Vogler WR, Khan N, Sacher R, Johnston M, Wissel M, Ciavarella D. Erythropoietin response to anaemia is not altered by surgery or recombinant human erythropoietin therapy. *Br J Haematol* 1994 August;87(4):695-9.
 46. Grassi G, Mancia G. [Arterial hypertension, sympathetic nervous system, and organ lesion]. *Cardiologia* 1995 December;40(12 Suppl 1):245-8.
 47. Greer JW, Milam RA, Eggers PW. Trends in use, cost, and outcomes of human recombinant erythropoietin, 1989-98. *Health Care Financ Rev* 1999;20(3):55-62.
 48. Greim H, Bonse G, Radwan Z, Reichert D, Henschler D. Mutagenicity in vitro and potential carcinogenicity of chlorinated ethylenes as a function of metabolic oxiran formation. *Biochem Pharmacol* 1975 November 1;24(21):2013-7.
 49. Guitton MC, Keller BT, Part D, De GJ, Borchardt RT, Veron M. S-adenosylmethionine, S-adenosylhomocysteine and S-adenosylhomocysteine hydrolase variations during differentiation of *Dictyostelium discoideum*. *Cell Differ* 1988 February;22(3):203-10.
 50. Hasobe M, McKee JG, Borchardt RT. Relationship between intracellular concentration of S-adenosylhomocysteine and inhibition of vaccinia virus replication and inhibition of murine L-929 cell growth. *Antimicrob Agents Chemother* 1989 June;33(6):828-34.
 51. Hermes M, Osswald H, Mattar J, Kloor D. Influence of an altered methylation potential on mRNA methylation and gene expression in HepG2 cells. *Exp Cell Res* 2004 April 1;294(2):325-34.
 52. Hirth P, Wieczorek L, Scigalla P. Molecular biology of erythropoietin. *Contrib Nephrol* 1988;66:38-53.
 53. Hoffman DR, Marion DW, Cornatzer WE, Duerre JA. S-Adenosylmethionine and S-adenosylhomocystein metabolism in isolated rat liver. Effects of L-methionine, L-homocystein, and adenosine. *J Biol Chem* 1980 November 25;255(22):10822-7.
 54. House AA, Wells GA, Donnelly JG, Nadler SP, Hebert PC. Randomized trial of high-flux vs low-flux haemodialysis: effects on homocysteine and lipids. *Nephrol Dial Transplant* 2000 July;15(7):1029-34.
 55. House JD, Brosnan ME, Brosnan JT. Renal uptake and excretion of homocysteine in rats with acute hyperhomocysteinemia. *Kidney Int* 1998 November;54(5):1601-7.

56. House JD, March SB, Ratnam S, Ives E, Brosnan JT, Friel JK. Folate and vitamin B12 status of women in Newfoundland at their first prenatal visit. *CMAJ* 2000 May 30;162(11):1557-9.
57. Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Hypomethylation as a cause of homocysteine-induced cell damage in human cell lines. *Toxicology* 2000 June 8;147(2):69-75.
58. Jacobsen DW. Cardiovascular disorders (risk assessment). *Anal Chem* 1993 June 15;65(12):367R-73R.
59. Jacobsen DW. Homocysteine and vitamins in cardiovascular disease. *Clin Chem* 1998 August;44(8 Pt 2):1833-43.
60. Jelkmann W. Renal erythropoietin: properties and production. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1986;104:139-215.
61. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev* 1992 April;72(2):449-89.
62. Jelkmann W, Wolff M, Fandrey J. Inhibition of erythropoietin production by cytokines and chemotherapy may contribute to the anemia in malignant diseases. *Adv Exp Med Biol* 1994;345:525-30.
63. Jelkmann W, Fandrey J, Frede S, Pagel H. Inhibition of erythropoietin production by cytokines. Implications for the anemia involved in inflammatory states. *Ann N Y Acad Sci* 1994 April 15;718:300-9.
64. Johnston JM, Kredich NM. Inhibition of methylation by adenosine in adenosine deaminase-inhibited, phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *J Immunol* 1979 July;123(1):97-103.
65. Kaushansky K, Broudy VC, Grossmann A, Humes J, Lin N, Ren HP, Bailey MC, Papayannopoulou T, Forstrom JW, Sprugel KH. Thrombopoietin expands erythroid progenitors, increases red cell production, and enhances erythroid recovery after myelosuppressive therapy. *J Clin Invest* 1995 September;96(3):1683-7.
66. Kitakaze M, Hori M, Kamada T. Role of adenosine and its interaction with alpha adrenoceptor activity in ischaemic and reperfusion injury of the myocardium. *Cardiovasc Res* 1993 January;27(1):18-27.
67. Kloor D, Danielyan L, Osswald H. Characterization of the cAMP binding site of purified S-adenosyl-homocysteine hydrolase from bovine kidney. *Biochem Pharmacol* 2002 October 15;64(8):1201-6.
68. Kloor D, Kurz J, Fuchs S, Faust B, Osswald H. S-adenosylhomocysteine-hydrolase from bovine kidney: enzymatic and binding properties. *Kidney Blood Press Res* 1996;19(2):100-8.

69. Knight TF, Senekjian HO, Sansom SC, Weinman EJ. Proximal tubule glucose efflux in the rat as a function of delivered load. *Am J Physiol* 1980 June;238(6):F499-F503.
70. Kobayashi M, Laver JH, Kato T, Miyazaki H, Ogawa M. Recombinant human thrombopoietin (Mpl ligand) enhances proliferation of erythroid progenitors. *Blood* 1995 October 1;86(7):2494-9.
71. Koury MJ, Kelley LL, Bondurant MC. The fate of erythroid progenitor cells. *Ann N Y Acad Sci* 1994 April 15;718:259-67.
72. Kredich NM, Hershfield MS. S-adenosylhomocysteine toxicity in normal and adenosine kinase-deficient lymphoblasts of human origin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979 May;76(5):2450-4.
73. Kredich NM, Hershfield MS. Perturbations in S-adenosylhomocysteine and S-adenosylmethionine metabolism: effects on transmethylolation. *Adv Enzyme Regul* 1980;18:181-91.
74. Langenfeld MR, Veelken R, Schobel HP, Friedrich A, Schmieder RE. Is endogenous erythropoietin a pathogenetic factor in the development of essential hypertension? *Nephrol Dial Transplant* 1997 June;12(6):1155-60.
75. Lentz SR, Sobey CG, Piegors DJ, Bhopatkar MY, Faraci FM, Malinow MR, Heistad DD. Vascular dysfunction in monkeys with diet-induced hyperhomocyst(e)inemia. *J Clin Invest* 1996 July 1;98(1):24-9.
76. Lin FK, Suggs S, Lin CH, Browne JK, Smalling R, Egrie JC, Chen KK, Fox GM, Martin F, Stabinsky Z, . Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1985 November;82(22):7580-4.
77. Linas SL, Miller PD, McDonald KM, Stables DP, Katz F, Weil R, Schrier RW. Role of the renin-angiotensin system in post-transplantation hypertension in patients with multiple kidneys. *N Engl J Med* 1978 June 29;298(26):1440-4.
78. Liu S, Wnuk SF, Yuan C, Robins MJ, Borchardt RT. Adenosine-5'-carboxaldehyde: a potent inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. *J Med Chem* 1993 April 2;36(7):883-7.
79. Loffing J, Pietri L, Aregger F, Bloch-Faure M, Ziegler U, Meneton P, Rossier BC, Kaissling B. Differential subcellular localization of ENaC subunits in mouse kidney in response to high- and low-Na diets. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 August;279(2):F252-F258.
80. Luippold G, Pech B, Schneider S, Osswald H, Muhlbauer B. Age dependency of renal function in CD-1 mice. *Am J Physiol Renal Physiol* 2002 May;282(5):F886-F890.

81. Malinow MR. Homocyst(e)ine and arterial occlusive diseases. *J Intern Med* 1994 December;236(6):603-17.
82. Malinow MR, Duell PB, Hess DL, Anderson PH, Kruger WD, Phillipson BE, Gluckman RA, Block PC, Upson BM. Reduction of plasma homocyst(e)ine levels by breakfast cereal fortified with folic acid in patients with coronary heart disease. *N Engl J Med* 1998 April 9;338(15):1009-15.
83. Malinow MR, Stampfer MJ. Role of plasma homocyst(e)ine in arterial occlusive diseases. *Clin Chem* 1994 June;40(6):857-8.
84. Marti HH, Gassmann M, Wenger RH, Kvietikova I, Morganti-Kossmann MC, Kossmann T, Trentz O, Bauer C. Detection of erythropoietin in human liquor: intrinsic erythropoietin production in the brain. *Kidney Int* 1997 February;51(2):416-8.
85. Mason-Garcia M, Weill CL, Beckman BS. Rapid activation by erythropoietin of protein kinase C in nuclei of erythroid progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990 April 30;168(2):490-7.
86. Massy ZA. Hyperhomocyst(e)inaemia in renal failure--what are the implications? *Nephrol Dial Transplant* 1996 December;11(12):2392-3.
87. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M, Ueda M, Sasaki R. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem* 1994 July 29;269(30):19488-93.
88. Matthias D, Becker CH, Riezler R, Kindling PH. Homocysteine induced arteriosclerosis-like alterations of the aorta in normotensive and hypertensive rats following application of high doses of methionine. *Atherosclerosis* 1996 May;122(2):201-16.
89. Maxwell AP, Lappin TR, Johnston CF, Bridges JM, McGeown MG. Erythropoietin production in kidney tubular cells. *Br J Haematol* 1990 April;74(4):535-9.
90. McCully KS. Chemical pathology of homocysteine. I. Atherogenesis. *Ann Clin Lab Sci* 1993 November;23(6):477-93.
91. McCully KS. Homocysteine and vascular disease. *Nat Med* 1996 April;2(4):386-9.
92. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia: implications for the pathogenesis of arteriosclerosis. *Am J Pathol* 1969 July;56(1):111-28.
93. Meneton P. Comparative roles of the renal apical sodium transport systems in blood pressure control. *J Am Soc Nephrol* 2000 November;11 Suppl 16:S135-S139.

94. Meneton P, Ichikawa I, Inagami T, Schnermann J. Renal physiology of the mouse. *Am J Physiol Renal Physiol* 2000 March;278(3):F339-F351.
95. Miller AL. The methionine-homocysteine cycle and its effects on cognitive diseases. *Altern Med Rev* 2003 February;8(1):7-19.
96. Miller CB, Jones RJ, Piantadosi S, Abeloff MD, Spivak JL. Decreased erythropoietin response in patients with the anemia of cancer. *N Engl J Med* 1990 June 14;322(24):1689-92.
97. Motterlini R, Clark JE, Foresti R, Sarathchandra P, Mann BE, Green CJ. Carbon monoxide-releasing molecules: characterization of biochemical and vascular activities. *Circ Res* 2002 February 8;90(2):E17-E24.
98. Muntzel MS, Joseph T, Onwumere O. Acute homocysteine administration does not elevate sympathetic nerve activity in rats. *Atherosclerosis* 2006 February;184(2):290-4.
99. Nathan MA, Reis DJ. Hypoxemia, atelectasis, and the elevation of arterial pressure and heart rate in paralyzed artificially ventilated rat. *Life Sci* 1975 April 1;16(7):1103-20.
100. Neylon M, Marshall JM, Johns EJ. The effects of systemic hypoxia on renal function in the anaesthetized rat. *J Physiol* 1995 September 1;487 (Pt 2):497-511.
101. Nilsson K, Gustafson L, Faldt R, Andersson A, Brattstrom L, Lindgren A, Israelsson B, Hultberg B. Hyperhomocysteinaemia--a common finding in a psychogeriatric population. *Eur J Clin Invest* 1996 October;26(10):853-9.
102. Nilsson K, Gustafson L, Hultberg B. Plasma homocysteine is a sensitive marker for tissue deficiency of both cobalamines and folates in a psychogeriatric population. *Dement Geriatr Cogn Disord* 1999 November;10(6):476-82.
103. Nir A, Clavell AL, Heublein D, Aarhus LL, Burnett JC, Jr. Acute hypoxia and endogenous renal endothelin. *J Am Soc Nephrol* 1994 May;4(11):1920-4.
104. Nushiro N, Sakamaki T, Hoshino J, Nakamura T, Sakamoto H, Imai Y, Seino M, Omata K, Sekino H, Abe K. Recombinant human erythropoietin stimulates tubular reabsorption of sodium in anesthetized rabbits. *Hypertens Res* 1995 September;18(3):203-7.
105. Nygard O, Nordrehaug JE, Refsum H, Ueland PM, Farstad M, Vollset SE. Plasma homocysteine levels and mortality in patients with coronary artery disease. *N Engl J Med* 1997 July 24;337(4):230-6.

106. Nygard O, Vollset SE, Refsum H, Stensvold I, Tverdal A, Nordrehaug JE, Ueland M, Kvale G. Total plasma homocysteine and cardiovascular risk profile. The Hordaland Homocysteine Study. *JAMA* 1995 November 15;274(19):1526-33.
107. Osswald H, Schmitz HJ, Kemper R. Tissue content of adenosine, inosine and hypoxanthine in the rat kidney after ischemia and postischemic recirculation. *Pflugers Arch* 1977 October 19;371(1-2):45-9.
108. Osswald H, Mühlbauer B, Schenk F. Adenosine mediates tubuloglomerular feedback response: an element of metabolic control of kidney function. *Kidney Int Suppl.* 1991 June;32:128-31.
109. Osswald H, Gleiter C. Hyponatremia and kidney function. *Zentralbl Chir* 1993;118(5):267-72.
110. Osswald H, Gleiter C. Renal effects of adenosine: possible consequences for kidney transplantation. *Zentralbl Chir* 1993;118(2):90-102.
111. Paulus JM, Grosdent JC, Prenant M, Fernandez-Delgado R, Albert A. Factors regulating megakaryocyte progenitor commitment to polyploidization. *C R Acad Sci III* 1995 July;318(7):779-84.
112. Perna AF, Ingrosso D, Galletti P, Zappia V, De Santo NG. Membrane protein damage and methylation reactions in chronic renal failure. *Kidney Int* 1996 August;50(2):358-66.
113. Perna AF, Ingrosso D, Zappia V, Galletti P, Capasso G, De Santo NG. Enzymatic methyl esterification of erythrocyte membrane proteins is impaired in chronic renal failure. Evidence for high levels of the natural inhibitor S-adenosylhomocysteine. *J Clin Invest* 1993 June;91(6):2497-503.
114. Peterson JE, Stewart RD. Predicting the carboxyhemoglobin levels resulting from carbon monoxide exposures. *J Appl Physiol* 1975 October;39(4):633-8.
115. Refsum H, Helland S, Ueland PM. Radioenzymic determination of homocysteine in plasma and urine. *Clin Chem* 1985 April;31(4):624-8.
116. Refsum H, Ueland PM, Nygard O, Vollset SE. Homocysteine and cardiovascular disease. *Annu Rev Med* 1998;49:31-62.
117. Reissmann KR. Studies on the mechanism of erythropoietic stimulation in parabiotic rats during hypoxia. *Blood* 1950 April;5(4):372-80.

118. Rieg T, Richter K, Osswald H, Vallon V. Kidney function in mice: thiobutabarbital versus alpha-chloralose anesthesia. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2004 October;370(4):320-3.
119. Robin S, Courderot-Masuyer C, Nicod L, Jacqueson A, Richert L, Berthelot A. Opposite effect of methionine-supplemented diet, a model of hyperhomocysteinemia, on plasma and liver antioxidant status in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *J Nutr Biochem* 2004 February;15(2):80-9.
120. Rolland PH, Friggi A, Barlatier A, Piquet P, Latrille V, Faye MM, Guillou J, Charpiot P, Bodard H, Ghiringhelli O, . Hyperhomocysteinemia-induced vascular damage in the minipig. Captopril-hydrochlorothiazide combination prevents elastic alterations. *Circulation* 1995 February 15;91(4):1161-74.
121. Rozen R. Genetic modulation of homocysteinemia. *Semin Thromb Hemost* 2000;26(3):255-61.
122. Salceda S, Caro J. Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 1997 September 5;272(36):22642-7.
123. Schrader J, Schutz W, Bardenheuer H. Role of S-adenosylhomocysteine hydrolase in adenosine metabolism in mammalian heart. *Biochem J* 1981 April 15;196(1):65-70.
124. Selhub J, Jacques PF, Bostom AG, Wilson PW, Rosenberg IH. Relationship between plasma homocysteine and vitamin status in the Framingham study population. Impact of folic acid fortification. *Public Health Rev* 2000;28(1-4):117-45.
125. Semenza GL. Erythropoietin gene expression in transgenic mice and human hepatoma cells. *Ann N Y Acad Sci* 1994 April 15;718:41-7.
126. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol* 2001 April;13(2):167-71.
127. Spivak JL. The in vivo metabolism of recombinant human erythropoietin. *Contrib Nephrol* 1989;76:67-75.
128. Stabler SP, Marcell PD, Podell ER, Allen RH, Savage DG, Lindenbaum J. Elevation of total homocysteine in the serum of patients with cobalamin or folate deficiency detected by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *J Clin Invest* 1988 February;81(2):466-74.

129. Tinton S, Buc-Calderon P. Homocysteine enhances the inhibitory effect of extracellular adenosine on the synthesis of proteins in isolated rat hepatocytes. *Biochem J* 1995 September 15;310 (Pt 3):893-6.
130. Ueland PM, Nygard O, Vollset SE, Refsum H. The Hordaland Homocysteine Studies. *Lipids* 2001;36 Suppl:S33-S39.
131. Ueland PM, Refsum H, Stabler SP, Malinow MR, Andersson A, Allen RH. Total homocysteine in plasma or serum: methods and clinical applications. *Clin Chem* 1993 September;39(9):1764-79.
132. Ult-Riche DB, Lee Y, Yuan CS, Hasobe M, Wolfe MS, Borcharding DR, Borchardt RT. Effects of 4'-modified analogs of aristeromycin on the metabolism of S-adenosyl-L-homocysteine in murine L929 cells. *Mol Pharmacol* 1993 June;43(6):989-97.
133. Villalba M, Varela I, Merida I, Pajares MA, Martinez del PA, Mato JM. Modulation by the ratio S-adenosylmethionine/S-adenosylhomocysteine of cyclic AMP-dependent phosphorylation of the 50 kDa protein of rat liver phospholipid methyltransferase. *Biochim Biophys Acta* 1985 December 12;847(3):273-9.
134. Villalon MD, Gil-Fernandez C, De CE. Activity of several S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibitors against African swine fever virus replication in Vero cells. *Antiviral Res* 1993 February;20(2):131-44.
135. Walker BR. Diuretic response to acute hypoxia in the conscious dog. *Am J Physiol* 1982 November;243(5):F440-F446.
136. Walter SJ, Zewde T, Shirley DG. The effect of anaesthesia and standard clearance procedures on renal function in the rat. *Q J Exp Physiol* 1989 November;74(6):805-12.
137. Wang RY, Tung YF, Wang PS. Age-related difference in the response of plasma erythropoietin to hemorrhage in ovariectomized rats. *Gerontology* 1995;41(2):77-81.
138. Webster S, Olsson RA. Adenosine regulation of canine cardiac adenylate cyclase. *Biochem Pharmacol* 1981 February 15;30(4):369-73.
139. Weiss N, Keller C, Hoffmann U, Loscalzo J. Endothelial dysfunction and atherothrombosis in mild hyperhomocysteinemia. *Vasc Med* 2002 August;7(3):227-39.
140. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Engl J Med* 1998 April 9;338(15):1042-50.

141. Winearls CG. Recombinant human erythropoietin: 10 years of clinical experience. *Nephrol Dial Transplant* 1998;13 Suppl 2:3-8.
142. Wnuk SF, Yuan CS, Borchardt RT, Balzarini J, De CE, Robins MJ. Nucleic acid related compounds. 84. Synthesis of 6'-(E and Z)-halohomovinyl derivatives of adenosine, inactivation of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, and correlation of anticancer and antiviral potencies with enzyme inhibition. *J Med Chem* 1994 October 14;37(21):3579-87.
143. Wocial B, Berent H, Kostrubiec M, Kuczynska K, Kuch-Wocial A, Nieweglowska N. Homocysteine, adrenergic activity and left ventricular mass in patients with essential hypertension. *Blood Press* 2002;11(4):201-5.
144. Wolfe MS, Borchardt RT. S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase as a target for antiviral chemotherapy. *J Med Chem* 1991 May;34(5):1521-30.
145. Wolos JA, Frondorf KA, Esser RE. Immunosuppression mediated by an inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase. Prevention and treatment of collagen-induced arthritis. *J Immunol* 1993 July 1;151(1):526-34.
146. Wolos JA, Frondorf KA, Babcock GF, Stripp SA, Bowlin TL. Immunomodulation by an inhibitor of S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase: inhibition of in vitro and in vivo allogeneic responses. *Cell Immunol* 1993 July;149(2):402-8.
147. Yelamarty RV, Miller BA, Scaduto RC, Jr., Yu FT, Tillotson DL, Cheung JY. Three-dimensional intracellular calcium gradients in single human burst-forming units-erythroid-derived erythroblasts induced by erythropoietin. *J Clin Invest* 1990 June;85(6):1799-809.
148. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000 September 22;275(38):29318-23.
149. Yi P, Melnyk S, Pogribna M, Pogribny IP, Hine RJ, James SJ. Increase in plasma homocysteine associated with parallel increases in plasma S-adenosylhomocysteine and lymphocyte DNA hypomethylation. *J Biol Chem* 2000 September 22;275(38):29318-23.
150. Yoshimura A, Ichihara M, Kinjyo I, Moriyama M, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Hara T, Miyajima A. Mouse oncostatin M: an immediate early gene induced by multiple cytokines through the JAK-STAT5 pathway. *EMBO J* 1996 March 1;15(5):1055-63.

151. Yuan CS, Yeh J, Liu S, Borchardt RT. Mechanism of inactivation of S-adenosylhomocysteine hydrolase by (Z)-4',5'-didehydro-5'-deoxy-5'-fluoroadenosine. *J Biol Chem* 1993 August 15;268(23):17030-7.
152. Zaina S, Lindholm MW, Lund G. Nutrition and aberrant DNA methylation patterns in atherosclerosis: more than just hyperhomocysteinemia? *J Nutr* 2005 January;135(1):5-8.

7. ANHANG

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ADO	Adenosin
AMP	Adenosinmonophosphat
BFU-e	burst forming unit erythroid
CBS	Cystathionin- β -Synthase
CFU-e	Colony forming unit erythroid
CO	Kohlenmonoxid
CO ₂	Kohlendioxid
COHb	Carboxyhämoglobin
DNA	Desoxyribonucleid acid
ED	Erhaltungsdosis
EPO	Erythropoetin
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
gr.	groß
Hb	Hämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HCl	Hydrogeniumchlorid (Salzsäure)
Hcy	Homocystein
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
Hkt	Hämatokrit
HPLC	high performance liquid chromatography
KCl	Kaliumchlorid
KG	Körpergewicht
kl.	klein

log	Logarithmus
M	molar
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
mmol	Millimol
MP	Methylierungspotential
MTHFR	5,10-Methylentetrahydrofolatreduktase
μmol	Mikromol
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-adeninucleotidphosphat
nmol	Nanomol
pCO	Kohlendioxidpartialdruck
pH	Potentielle Hydroniumionenkonzentration
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
ppm	parts per million
RIA	Radioimmunoassay
RNA	ribonucleid acid
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosylhomocystein
SAM	S-Adenosylmethionin
SEM	Standardfehler vom Mittelwert
Tab.	Tabelle
V.	Vena
Vol	Volumen
vs.	versus

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Hartmut Oßwald danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine konstruktive Beratung und das Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Almut Grenz für ihr persönliches Engagement, ihre Hilfsbereitschaft und vorbildliche Betreuung während der gesamten Arbeit.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. Fotios Petroktistis für die Betreuung und engagierte Hilfe während des experimentellen Teils der Studie.

Des weiteren danke ich Frau PD Dr. Doris Kloor und ihrer Arbeitsgruppe für die Bestimmung von SAM, SAH und ADO mittels HPLC. Herrn Klaus Stieler danke ich für seine Unterstützung beim Aufbau des Projektes und das Erstellen von Skizzen und Schemata dieser Arbeit. Bei Herrn Walter Beer bedanke ich mich für die Hilfe bei der Durchführung von Probenmessungen.

Weiterhin gilt mein Dank den Mitarbeitern des Pharmakologischen Instituts für die freundliche Aufnahme sowie für die gute Arbeitsatmosphäre während der experimentellen Phase meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern sowie meinen Freunden für die Geduld und Unterstützung während der vergangenen Jahren. Besonderer Dank gilt ebenfalls meiner Mitstreiterin und Kommilitonin Cathérine Gebhard für die Hilfe beim Erstellen meiner Dissertation.

Lebenslauf

Peter Hammel

23.07.1974	geboren in Aalen
1981 - 1985	Grundschule Waldhausen
1985 - 1994	Theodor-Heuss-Gymnasium Aalen
Juni 1994	Allgemeine Hochschulreife
April 1994 – Okt. 1995	Zivildienst: Rettungsdienst Rotes Kreuz Aalen Ausbildung zum Rettungssanitäter
April 1996 – Feb. 1998	Studium der Psychologie an der Universität Würzburg
April 1998	Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard- Karls-Universität Tübingen
März 2000	Ärztliche Vorprüfung
März 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2003	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
April 2003 - März 2004	Praktisches Jahr 1. Tertial: Wahlfach Pädiatrie, Kinderklinik Esslingen 2. Tertial: Chirurgie, Spital Altstätten/Schweiz 3. Tertial: Innere Medizin, Spital Altstätten/Schweiz
13. Mai 2004	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
seit Nov. 2004	Assistenzarzt in der Kinderklinik St. Annastift, Ludwigshafen am Rhein