

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie der
Universität Tübingen
Abteilung Klinische Pharmakologie
Leiter: Prof. Dr. C. H. Gleiter**

**Regulation der Erythropoetin-Sekretion:
Einfluss des endogenen Angiotensins unter salzarmer
und salzreicher Ernährung**

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

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

**vorgelegt von
Thomas Herbert Schmidt
aus Stuttgart**

2004

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen

1. Berichterstatter: Professor Dr. C. H. Gleiter

2. Berichterstatter: Professor Dr. V. Kühlkamp

*Meiner Frau Flona Christine
und meinen Eltern gewidmet.*

Inhaltsverzeichnis

1.	Verzeichnis der Abkürzungen	4
2.	Einleitung	6
2.1	Grundlagen	6
2.2	Ziele der Studie	14
2.2.1	Bedeutung für die Heilkunde	16
3.	Material und Methoden	18
3.1	Formale Voraussetzungen	18
3.1.1	Probandenkollektiv	18
3.1.2	Voruntersuchung	20
3.1.3	Einschlusskriterien	20
3.1.4	Ausschlusskriterien	21
3.2	Clearance-Begriff	22
3.2.1	Glomeruläre Filtrationsrate	22
3.2.2	Inulin-Clearance	23
3.2.3	Renaler Plasmafluss	24
3.3	Studienmedikation	25
3.4	Studiendurchführung	26
3.4.1	Probenaufbereitung	32
3.5	Biochemische Analysen	33
3.5.1	Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität im Serum	33

3.5.2	Bestimmung der Erythropoetinkonzentration im Serum	34
3.5.3	Bestimmung der Angiotensin II-Konzentration im Serum	35
3.5.4	Bestimmung von PAH und Inulin im Urin / Serum	36
3.6	Statistik	41
3.6.1	Studiendesign	41
3.6.2	Fallzahlschätzung	41
3.6.3	Randomisierung	41
3.6.4	Konfirmatorische statistische Analyse	42
3.7	Berechnungen	43
4.	Ergebnisse	47
4.1	Kreislaufparameter	47
4.1.1	Herzfrequenz	47
4.1.2	Mittlerer arterieller Blutdruck	48
4.2	Hämatologische Parameter	49
4.2.1	Hämatokrit	50
4.2.2	Hämoglobin	51
4.3	Glomeruläre Filtrationsrate	52
4.4	Renaler Plasmafluss	53
4.5	Urinatriummenge	54
4.6	Plasma-Renin-Aktivität	55
4.7	Angiotensin II-Konzentration	57
4.8	Erythropoetin-Konzentration	59
4.8.1	Fläche unter der Kurve der Erythropoetinkonzentration	60
5.	Diskussion	61

		Inhalt
6	Zusammenfassung	72
7	Literaturverzeichnis	74
8	Anhang	83
8.1	Danksagung	83
8.2	Lebenslauf	84

1. Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-converting-enzyme
ANOVA	analysis of variance
ARNT	Aryl Hydrocarbon Rezeptor Nuclear Translocator
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the plasma concentration vs. time curve)
AWP	Auswaschphase
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BMI	Body-Mass-Index
CFU-e	colony forming units erythroid
C	Konzentration
Cl	Clearance
CO	Kohlenmonoxid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (chronic obstructive pulmonary disease)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	enzyme-linked immuno sorbent assay
EPO	Erythropoetin
⁵⁹ Fe	Eisen
F _{NA}	Natriumausscheidungsfraktion
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate

HB _S -Ag	Hepatitis B surface antigen
HCV	Hepatitis C Virus
HF	Herzfrequenz
HIF	Hypoxie-induzierter Faktor
HIV	human immuno deficiency virus
KO	Körperoberfläche
L	Körperlänge
M	Körpermasse
MAD	Mittlerer arterieller Druck
MW	arithmetischer Mittelwert
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
PRA	Plasmareninaktivität
PTE	Posttransplantationserythrozytose
RHuEPO	rekombiniertes Erythropoetin
RAS	Renin-Angiotensin-System
RIA	Radio immuno assay
RPF	renaler Plasmafluss
RR	Blutdruck
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
Tab.	Tabelle
V	Volumen

2 Einleitung

2.1 Grundlagen

Das Glykoproteinormon Erythropoetin (EPO) besteht aus einer Eiweißkette von 165 Aminosäuren. In physiologisch vorkommenden Konzentrationen wirkt EPO auf die Neubildung roter Blutzellen. Für erythropoetische Vorläuferzellen im Knochenmark (CFU-e, colony forming units erythroid) ist das Hormon ein essentieller Wachstums- und Differenzierungsfaktor.

EPO wird beim erwachsenen Menschen zu > 95 % in der Niere produziert (Jelkmann, 1992). Daneben gibt es auch extrarenales Gewebe, welches in der Lage ist, EPO zu produzieren. Zum Beispiel sind im zentralen Nervensystem die Astrozyten wichtige EPO-produzierende Zellen (Sasaki, 2003). Es erfährt keine Speicherung am Sekretionsort. Ansteigende Plasmakonzentrationen reflektieren so immer eine de novo Synthese (Herkens et al., 1993). Im Bereich der Nieren wurde EPO mRNA in peritubulären Fibroblasten nachgewiesen, sodass beim Erwachsenen diese Zellen als Sekretionsort des EPO gelten (Maxwell et al., 1993), wohingegen bei Feten und Säuglingen die Hepatocyten der wichtigste Produktionsort von EPO sind (Fisher, 2003).

Die Expression des Erythropoetins wird durch DNA-bindende Proteine kontrolliert, die auf einem Transkriptionskomplex basieren, den

man als hypoxieinduzierten Faktor (HIF) bezeichnet (Jelkmann, 1992; Jelkmann und Metzen, 1996).

Setzt man Gewebe einem hypoxischen Umfeld aus, steigen einige wichtige Hormone oder Gene in ihrer Konzentration oder Aktivität stark an. So zum Beispiel auch das Erythropoetin. Der Schlüssel dieser sauerstoffabhängigen Regulation ist der sogenannte HIF (Hypoxie-induzierter-Faktor). Dabei handelt es sich um ein DNS-bindendes Protein, welches aus einer alpha- und einer beta-Untereinheit besteht. Während die Beta-Untereinheit, die auch als ARNT (Aryl Hydrocarbon Rezeptor Nuklear Translokator) bezeichnet wird, in erster Linie sauerstoffunabhängigen Mechanismen unterliegt, kann HIF1-alpha oberhalb eines bestimmten Sauerstoffpartialdruckes aufgrund seines schnellen Abbaus nicht mehr nachgewiesen werden. Hypoxie führt zu einer Stabilisation des HIF1-alpha-Proteins und der Aktivierung der HIF1-alpha-abhängigen Zielgene. Dazu gehört unter anderem die Aktivierung der Transkription der Erythropoetingene in Hep3B-Zellen (Hofer et al., 2002; Wang und Semenza, 1995).

Bedingt durch die Verfügbarkeit von gentechnisch hergestelltem EPO (rHuEPO), ist über die Wirkung von EPO auf sein Zielorgan und seinen therapeutischen Einsatz eine Vielzahl von Daten vorhanden.

Aufgrund seiner Wirkung auf die Erythropoese hat die Verfügbarkeit von rHuEPO die Behandlung von Anämien in Folge von chronischem Nierenversagen, Chemotherapie oder perioperativem Blutverlust revolutioniert.

Der Erythropoetinrezeptor ist weit über das kardiovaskuläre System verteilt. So ist er auch auf Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Herzmuskelzellen zu finden. Dadurch hat rHuEPO nützliche Effekte auf das Endothel, wie zum Beispiel Regulation des Gefäßwiderstandes oder Proliferation und Migration der Endothelzellen. Als weitere wichtige Funktion konnte eine Hemmung der zellulären Apoptose nachgewiesen werden (Smith et al., 2003; Chong et al., 2002). Bei Patienten mit Herzerkrankungen reduzierte die Therapie mit rHuEPO die Linksherzhypertrophie, verbesserte die Herzarbeit und erhöhte die Ejektionsfraktion (Smith et al., 2003).

Die Regulation der endogenen EPO-Sekretion ist allerdings bisher nicht ausreichend untersucht und verstanden. Grundsätzlich müssen verschiedene Möglichkeiten in Betracht gezogen werden, die sich nicht notwendigerweise gegenseitig ausschließen. Zum einen ist denkbar, dass im Sinne eines direkten Sauerstoffsensors für die Signalerfassung relevante Moleküle ihre Konformation sauerstoffabhängig verändern. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass durch eine Hydroxylierung von bestimmten Prolyl- und Asparinylenen in der Alpha-Untereinheit des HIF, eine Modifikation von verschiedenen Proteinen ausgelöst wurde, wodurch dann das hypoxie-sensible Signal übermittelt wurde (Ratcliffe, 2002).

Auf Grund indirekter Evidenz in Hep G2-Zellen wurde postuliert, dass ein Hämprotein als die EPO-Produktion steuerndes Sensormolekül fungieren könnte (Goldberg et al., 1988). Ein solches Hämprotein ist aber bislang

nicht zweifelsfrei indentifiziert worden und andere Experimente in isolierten Hepatozyten sprechen gegen diese Hypothese (Eckardt et al., 1993).

Zum Anderen ist denkbar, dass die EPO-Produktion durch biochemische Transmitter an den zellulären Energiestoffwechsel gekoppelt ist, und beispielsweise Veränderungen des Phosphorylierungspotentials die EPO-Produktion kontrollieren.

Ein Charakteristikum der Regulation der EPO-Sekretion ist, dass dessen Plasmakonzentration vom Sauerstoffangebot des Organismus gesteuert werden kann und invers mit dem Sauerstoffangebot des arteriellen Blutes korreliert. In Folge dessen kann die Produktionsrate von EPO unter Hypoxie bis zum Tausendfachen ansteigen. Dadurch kommt eine negative Feedback-Regulation zustande, die auf die Aufrechterhaltung eines konstanten Blutsauerstoffgehaltes abzielt (Abb.1).

Verschiedene Vorarbeiten konnten zeigen, dass möglicherweise auch das Renin-Angiotensin-System (RAS) eine Rolle bei der Regulation der EPO-Produktion spielen könnte. So ließ sich beispielsweise bei narkotisierten Hunden, die eine Angiotensin II-Infusion erhalten hatten, in der Folge ein Anstieg der EPO-Plasmakonzentration beobachten (Fisher et al., 1967). Als man mit Hilfe einer „Goldblatt-Klemme“ an der Nierenarterie den Blutfluss reduzierte und dadurch reaktiv einen Anstieg des Angiotensin II provozierte, ließ sich ein ähnlicher Effekt auf die EPO-Konzentration beobachten (Fisher et al., 1967).

Obwohl das Gewebesauerstoffangebot ein wesentlicher, die EPO-Sekretion steuernder Faktor ist, scheinen die obigen Arbeiten Hinweise auf zusätzliche Faktoren, wie zum Beispiel das Renin-Angiotensin-System zu liefern. Diese scheinen ebenso eine wichtige modulierende Rolle im Bereich der EPO-Regulation zu haben.

Indirekte Hinweise ergaben sich aus Untersuchungen an gesunden Freiwilligen, denen nach einer Basisstimulation der EPO-Produktion durch einen Aderlass (Gleiter et al., 1996 a) bzw. durch hypobare Hypoxie (Gleiter et al., 1997 a) Theophyllin infundiert wurde. Bei diesen Probanden zeigte sich unter Theophyllin eine signifikante Erhöhung der EPO-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe, die den Basisstimulus allein erhalten hatte. Auffällig war, dass in den Gruppen mit Theophyllingabe ein deutlicher Anstieg der Plasmareninaktivität (PRA) zu verzeichnen war. Dies könnte für den Anstieg der EPO-Sekretion unter Theophyllin verantwortlich sein. Außerdem konnte durch Gabe des β_2 -Adrenozeptoragonisten Salbutamol in vitro in Knochenmarkkulturen eine Stimulation der Erythropoese nachgewiesen werden (Fink und Fisher, 1977 a). Ferner wurde von diesen Autoren gezeigt, dass bei Kaninchen mit Salbutamol eine Stimulation der EPO-Produktion zu erzielen ist. In diesen Experimenten wurde aber die EPO-Konzentration nur indirekt mit einem polyzythämischen Mäuseassay gemessen. Unter Verwendung von exhypoxischen, polyzythämischen Mäusen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die EPO-Sekretion unter Salbutamol zunimmt (Ueno et al., 1988; Fink und Fisher, 1977 b). Dabei wurden die EPO-Konzentrationsveränderungen nur indirekt über Inkorporation von

⁵⁹Fe in Erythrozyten gemessen. Tierversuche mit Ratten, die unter funktioneller Hypoxie (durch Beimischung von 0,075 % CO zur Atemluft) standen, zeigten einen Anstieg der EPO-Konzentration im Serum. Dieser Anstieg konnte noch signifikant weiter gesteigert werden, wenn die Ratten zusätzlich mit Salbutamol vorbehandelt wurden (Gleiter et al., 1997 b). Die Bestimmungen der EPO-Konzentrationen in diesen Untersuchungen wurden mit einem für Ratten-EPO spezifischen Assay durchgeführt.

Weitere Untersuchungen konnten in der Folge zeigen, dass unter Gabe von Fenoterol, einem selektiven β_2 -Sympathomimetikum, das die Reninsekretion steigert, auch eine Steigerung der EPO-Sekretion, sowohl in der Situation der Tokolyse bei Schwangeren, als auch bei gesunden Freiwilligen, zu erzielen war (Gleiter et al., 1997 c; Gleiter et al., 1998).

Auch diese Wirkung von Fenoterol auf die EPO-Blutkonzentration könnte durch die Erhöhung der PRA und des Angiotensin II bedingt sein. Folgerichtig ließ sich mit dem selektiven Angiotensin-AT₁-Rezeptorblocker Losartan der Anstieg der EPO-Konzentration hemmen (Freudenthaler et al., 1999 a). In Studien zur direkten Stimulation der EPO-Sekretion mit Angiotensin II-Infusion erwies sich die EPO-Sekretion als dosisabhängig steigerbar und ließ sich durch den Angiotensinrezeptorblocker Losartan hemmen, unabhängig ob ein Basisstimulus in Form eines Aderlasses verwendet wurde (Freudenthaler et al., 1999 b), oder nicht (Freudenthaler et al., 2000). Dieser Nachweis von Angiotensin als modulierendem Faktor der EPO-Sekretion beim Menschen war neu. Diese Ergebnisse wurden durch andere

Arbeitsgruppen bestätigt (Gossmann et al., 2001; Donnelly und Miller., 2001).

Die aus oben genannten Untersuchungen gefolgerte Beziehung zwischen RAS und EPO-Sekretion scheint klinische Bedeutung zu haben. So konnte gezeigt werden, dass ACE-Hemmer und AT1-Rezeptor-Blocker eine Wirkung auf Hämatokrit und Hämoglobin sowie auf die EPO-Plasmakonzentrationen haben: Bei gesunden Freiwilligen konnte eine Reduktion der EPO-Plasmakonzentrationen unter mehrwöchiger Gabe von ACE-Inhibitoren gezeigt werden (Pratt et al., 1992). Patienten, bei denen der ACE-Hemmer Enalapril verordnet wurde, wiesen nach längerer Behandlung eine Anämie auf (Griffing und Melby, 1982). Bei Patienten mit Posttransplantationserythrozytose (PTE), die bei ca. 10 – 20% aller Nierentransplantierten auftritt, können die genannten Stoffe zur therapeutischen Absenkung von EPO-Konzentration, Hämoglobin und Hämatokrit verwendet werden (Gleiter, 1996 b; Perazella et al., 1995; Torregrosa et al., 1994; Perazella und Bia, 1992). Damit können regelmäßig notwendige Aderlässe bei solchen Patienten vermieden werden. Ein Wirkmechanismus der ACE-Hemmer, der in diesem Zusammenhang eine Rolle spielen könnte, ist die Hemmung der sympathoadrenergen Aktivität (Goodfriend et al., 1996).

Bei Dialysepatienten konnte beobachtet werden, dass Volumendepletion, gefolgt von ansteigenden PRA-Werten einen Anstieg zur Folge hat. Captoprilgabe vor der Hämodialyse hemmte den Anstieg der EPO-Werte (Vlahakos et al., 1995). Dies wird unterstützt durch Beobachtungen, dass

Anämie und hyporeninämischer Hypoaldosteronismus bei Typ1-Diabetikern mit niedrigen EPO-Konzentrationen einhergeht (Donnelly und Shah, 1999). Die sekundäre Erythrozytose bei obstruktiver chronischer Lungenerkrankungen (COPD) wurde auf eine Aktivierung des RAS zurückgeführt (Vlahakos et al., 1999). Weiter wurde nachgewiesen, dass Patienten unter Hämodialyse und ACE-Hemmern höhere Dosen von exogenem EPO benötigten, um einen bestimmten Zielhämatokrit aufrechtzuerhalten (Matsumara et al., 1997).

Bislang ist der Wirkmechanismus von Angiotensin auf die EPO-Sekretion noch ungeklärt. Auch die klinische Wertigkeit dieser Befunde ist nicht ausreichend gesichert. Aus diesem Grund erscheinen weitere Untersuchungen insbesondere auch des Einflusses des endogenen Angiotensins auf die menschliche EPO-Produktion angezeigt.

2.2 Ziele der Studie

Neben klinischer Evidenz mit eher kasuistischem Charakter hat sich aus den bereits oben erwähnten Arbeiten eine experimentelle Evidenz für eine Interaktion zwischen RAS und EPO-Sekretion ergeben. Die vorliegende Studie ist ein Beitrag zur Klärung der zugrundeliegenden Mechanismen und der daraus ableitbaren Bedeutung von Angiotensin und Angiotensinantagonisten für anämische und polyzythämische Zustände beim Menschen. Die bessere Behandlung der oben genannten Zustände ist von großem medizinischem Interesse mit Hinblick auf die

betroffenen Patienten, die in der Regel eine ohnehin komplexe Pharmakotherapie ihres Grundleidens benötigen.

Der Mechanismus der Modulation der EPO-Sekretion durch das RAS ist ungeklärt. Eine Reihe von Erklärungen für die Verknüpfung von RAS und EPO-Sekretion ist denkbar:

- (1) Eine Veränderung der renalen Hämodynamik, die zu einer regionalen Hypoxie durch Vasokonstriktion in kortikalen Anteilen der Niere führt, in denen sich die EPO-produzierenden Fibroblasten befinden.
- (2) Eine direkte Modulation der EPO-Sekretion über Angiotensinrezeptoren auf der Oberfläche von EPO-produzierenden Zellen.
- (3) Eine indirekte Signalübertragung durch Angiotensin im Zusammenspiel mit weiteren Autacoiden, wie zum Beispiel Noradrenalin, Dopamin, Adenosin oder Eicosanoiden.

Denkbar ist auch eine Freisetzung von Endothelin durch Angiotensin mit nachfolgender Wirkung auf die EPO-Sekretion. Es wurde gezeigt, dass Angiotensin II die Expression von Präproendothelin und die Freisetzung von Endothelin I (auch beim Menschen) um bis zu 90 % steigert (Jilma et al., 1997).

Das Ziel der vorliegenden Studie war die Untersuchung des Einflusses von *endogenem* Angiotensin II, nachdem in den Vorarbeiten gezeigt werden konnte, dass *exogen* zugeführtes Angiotensin II in der Lage ist, die EPO-Produktion dosisabhängig zu steigern (Freudenthaler et al., 2000). Infusionsraten von Angiotensin II, die keine Änderung des mittleren arteriellen Druckes (MAD) bedingten, waren in der Lage, eine

signifikante EPO-Produktionssteigerung um ca. 230 % zu bewirken. Die dabei ermittelten Angiotensin II-Konzentrationen betragen ca. das 3-fache der Basalwerte.

Eine ähnliche Steigerung der Angiotensin II-Konzentrationen durch eine Aktivierung des Renin-Angiotensin-Systems ist durch eine NaCl-Restriktion bei gesunden Probanden gezeigt worden (Brown et al., 1972). Daher sollte in der vorliegenden Studie durch eine unterschiedliche Salzbeladung der Versuchspersonen eine protrahierte und physiologische Stimulation (bei salzarmer Kost) bzw. eine Aktivitätsminderung (bei salzreicher Kost) des Renin-Angiotensin-Systems erreicht werden und der Einfluss der Konzentrationsänderungen des endogen produzierten Angiotensin II auf die renale EPO-Sekretion untersucht werden.

2.2.1 Bedeutung für die Heilkunde

Ein Nachweis RAS-vermittelter Regulationsmechanismen durch Änderungen der endogenen Angiotensin II-Konzentration würde die physiologische Kontrolle der Erythropoetinproduktion beim Menschen verständlicher machen. Therapeutisch könnte sich hieraus die Möglichkeit ergeben, Krankheitszustände mit erhöhter EPO-Produktion, wie sie beispielsweise bei Patienten mit Posttransplantationserythrozytose (PTE) gefunden werden können, mit ACE-Hemmern oder AT₁-Rezeptorantagonisten zu behandeln. Hierdurch

könnte eine Normalisierung eines vorher aktivierten RAS und damit möglicherweise eine Senkung der EPO-Produktion bewirkt werden. Dadurch könnte bei Patienten mit PTE auf die belastenden regelmässigen Aderlässe verzichtet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Formale Voraussetzungen

Das Vorhaben wurde vor der Durchführung durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Eberhardt-Karls-Universität Tübingen geprüft (Projektnummer 169/2000). Nachdem kein Einwand erhoben wurde, konnte die Studie durchgeführt werden. Sie wurde entsprechend der gesetzlichen Bestimmungen mit positivem Ethikkommissionsvotum dem BfArM vorgelegt und dem Regierungspräsidium in Tübingen gemeldet. Eine Probandenversicherung wurde abgeschlossen. Ebenso wurde ein schriftliches Einverständnis von jedem Probanden vor Aufnahme in die Studie eingeholt.

3.1.1 Probandenkollektiv

Es wurden 12 männliche gesunde Probanden im Alter von 24 – 33 Jahren untersucht.

Das durchschnittliche Lebensalter betrug 27 ± 3 Jahre (Bandbreite: 24 – 33 Jahre), die Körpergröße betrug im Durchschnitt 182 ± 6 cm (Bandbreite von 170 – 190 cm), das Gewicht lag durchschnittlich bei $81 \pm$

12 kg (Bandbreite von 60 – 97 kg) und die mittlere Körperoberfläche 2,0 m² (Bandbreite 2,24 - 1,69 m²). Die detaillierten demographischen Daten sind aus Tabelle 1 zu entnehmen.

Tabelle 1: Demographische Daten der Probanden.

Proband	Alter [J]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	KO [m²]	BMI [kg/m²]
02	30	190	92	2,2	25,48
03	29	178	62	1,78	19,57
07	25	170	60	1,69	20,76
08	26	179	78,5	1,97	24,5
09	24	181	78	1,98	23,81
10	27	182	76,5	1,97	23,1
11	24	189	97	2,24	27,15
12	27	180	76,5	1,96	23,61
13	33	187	86	2,12	24,59
16	25	184	86	2,09	25,4
17	25	182	96	2,17	28,98
18	26	183	83	2,05	24,78
MW	27	182	81	2	24
SD	2,7	5,4	11,9	0,16	2,5
Minimum	24	170	60	1,69	19,57
Maximum	33	190	97	2,24	28,98

KO = Körperoberfläche,
MW = arithmetischer Mittelwert

SD = Standardabweichung,
BMI = Body-Mass-Index

3.1.2 Voruntersuchung

Die Voruntersuchung bestand aus dem Erstellen einer Anamnese, einer körperlichen Untersuchung und einem Elektrokardiogramm in Ruhe. Außerdem wurden folgende klinisch-chemische Laborparameter bestimmt: Natrium, Kalium, Chlorid, Kalzium, Bilirubin gesamt, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Gamma-Glutamyl-Transferase, kleines Blutbild, Kreatinin, Harnstoff/Stickstoff, alkalische Phosphatase, Quickwert, Erythropoietin sowie Hepatitis-C-Antikörpertiter, Hepatitis-B-Antigen und HIV-Test. Eine Urinuntersuchung erfolgte mittels Urinstix (Combur®-Test). Diese Untersuchung fand innerhalb eines Zeitraumes von 4 Wochen vor der Studienteilnahme statt.

3.1.3 Einschlusskriterien

- Nichtraucher
- Männliche, gesunde Probanden im Alter von 18 – 35 Jahren
- Body-Mass-Index 18 – 29 kg/m²
- Keine Erkrankungen wichtiger Organsysteme, insbesondere des renalen, kardiovaskulären, pulmonalen und hämatopoetischen Systems
- Keine wesentlichen pathologischen Befunde bei der Eingangsuntersuchung

- Negativer HIV und Hepatitis-B-Antigen-Test, keine Hepatitis-C-Antikörper
- Schriftlich niedergelegtes Einverständnis nach ausführlicher Aufklärung

3.1.4 Ausschlusskriterien

- Anzeichen einer Erkrankung des Herz-Kreislaufsystems, der Lunge, der Nieren, der Leber, des Verdauungssystems, des Endokrinsystems, des Stoffwechsels, der Psyche oder anderer klinisch relevanter Systeme
- Hyperurikämie, Harnsteinleiden
- Hämoglobinkonzentration < 14g/dl
- Blutspende vor weniger als 3 Monaten
- Aufenthalt in großen Höhen oder Flug innerhalb eines Monats vor Aufnahme in die Studie
- Allergien gegen Medikamente, die in der Studie eingesetzt werden
- Einnahme von Medikamenten innerhalb der letzten 14 Tage vor Studienbeginn, nach Maßgabe des Prüfarztes
- Positiver HBs-Ag-, HCV-, und/oder HIV-Test
- Laborwerte außerhalb des Normalbereichs, nach Maßgabe des Prüfarztes
- Teilnahme an anderen Studien innerhalb der letzten zwei Monate vor Studienbeginn

- Begründeter Verdacht oder Nachweis einer Suchterkrankung
- Fehlende Compliance
- Jede weitere Begründung, die in den Augen der durchführenden Ärzte den Probanden ungeeignet erscheinen lässt

3.2 Clearance-Begriff

Die renale Clearance einer Substanz gibt an, wie die Niere diese Substanz behandelt. Sie drückt aus, wieviel von der betreffenden Substanz die Niere im Verhältnis zur Plasmakonzentration dieses Stoffes ausscheidet:

Die Clearance gibt dasjenige Plasmavolumen an, das pro Minute von der Messsubstanz vollständig gereinigt wird.

Hieraus ergibt sich die Möglichkeit, bestimmte physiologische Parameter mit Hilfe der Clearance von Stoffen mit bestimmten bekannten Eigenschaften zu ermitteln.

3.2.1 Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Die GFR ist direkt nicht messbar, kann aber über die Clearance eines Stoffes bestimmt werden, für den folgende Kriterien zutreffen:

- a) ungehinderte Filtration
- b) keine tubuläre Resorption

- c) keine tubuläre Sekretion
- d) Substanz darf nicht toxisch sein
- e) kein Abbau oder Neubildung in der Niere
- f) Substanz muss analytisch gut nachweisbar sein

Dies bedeutet, dass die gesamte filtrierte Menge des Stoffes mit dem Urin ausgeschieden wird.

Es gilt:

filtrierte Menge = ausgeschiedene Menge

Als Messsubstanz werden verwendet:

- 1) Exogene (zugeführte) Marker wie Inulin, Polyfructosan, Polyethylenglykol, radioaktiv markiertes Vitamin B12 oder EDTA, Iothalamat und Diethylentriaminopentaazetat (DTPA).
- 2) Endogene Marker sind Kreatinin und β 2-Mikroglobulin.

3.2.2 Inulin-Clearance

Am zuverlässigsten für die Messung der GFR ist das Inulin. Da Inulin jedoch eine körperfremde Substanz ist, muss man es durch Infusion zuführen. Dabei muss darauf geachtet werden, dass während der Urinsammelperioden die Plasmakonzentration von Inulin konstant gehalten wird. Um dieses zu erreichen, muss man zunächst mit der Infusion einer größeren Menge Inulin beginnen, ehe ein Gleichgewicht

zwischen Zufuhr und renaler Ausscheidung (deren Größe man nicht kennt, sondern bestimmen will) erreicht wird und eine Erhaltungsdosis weiter infundiert werden kann. Außerdem muss zur exakten Erfassung des Urinzeitvolumens bei den Urinabgaben jeweils die Blase vollständige entleert werden.

Die Inulin-Clearance ist von Körpergewicht und Körpergröße abhängig. Um zu vergleichbaren Normalwerten zu kommen, werden die gemessenen Werte auf die Körperoberfläche bezogen.

Der Normalwert für die Inulin-Clearance beträgt $80 - 140 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$ (Pummer, 1996).

3.2.3 Renaler Plasmafluß (RPF)

Wie die GFR ist auch die Nierendurchblutung meist nicht direkt messbar. Sie wird durch die Clearance einer Messsubstanz bestimmt, für die folgendes zutrifft:

Die in das Nierenparenchym einströmende Plasmamenge wird bei einmaligem Durchfluss vollständig von der Messsubstanz gereinigt. Dieser Stoff muss daher folgende Anforderungen erfüllen: vollständige Extraktion der Messsubstanz bei einmaliger Nierenpassage (d.h. Konzentration im abströmenden Venenblut muss 0 sein) durch

- a) Filtration und
- b) vollständige Sekretion bei
- c) fehlender Resorption.

Sind diese Kriterien erfüllt, so gilt für die Clearance:

in die Nieren einströmende = ausgeschiedene Stoffmenge

Als Meßsubstanz eignet sich die p-Aminohippursäure (PAH).

Normalbereich (Pummer, 1996):

$$Cl_{PAH} = 480 - 800 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1} \cdot 1,73 \text{ m}^{-2}$$

3.3 Studienmedikation

Es wurden die beiden Markersubstanzen Inulin (Inutest[®], Fresenius Pharma Austria, Linz, Österreich) als 25 %ige Lösung und PAH (Para-Aminohippursäure; p-aminohippuric acid sodium salt[®], Clinalfa AG, Merck, Läfelfingen, Schweiz) als 20 %ige Lösung verwendet. Die Dosierung der Substanzen war abhängig von der Körperoberfläche (KO), die mit Hilfe der Formel von DuBois und DuBois (1916) aus Körpergewicht und Größe des jeweiligen Probanden ermittelt wurde (siehe unter „Berechnung“).

Inulin und PAH wurden nach folgendem Schema verabreicht:

Boluslösung (250ml), Infusionsrate 500ml/h:

Inulin (25%ig): 18 ml/m² KO über 30min

PAH (20%ig): 4 ml/m² KO über 30min

Hauptinfusionslösung (150ml), Infusionsrate 50ml/h:

Inulin (25%ig): 15 ml/m² KO über 3 Std

PAH (20%ig): 5 ml/m² KO über 3 Std

Kochsalz

Das Kochsalz wurde von dem Doktoranden in Zusammenarbeit mit der Apotheke des Universitätsklinikums Tübingen entsprechend den Vorgaben des Deutschen Arzneimittelbuches in magensaftresistente Gelatinekapseln abgefüllt. Dabei enthielt eine Kapsel 500 mg Kochsalz. Anschließend wurden die Kapseln in Dosen abgefüllt, die nach dem Arzneimittelgesetz beschriftet wurden.

3.4 Studiendurchführung

Eine Woche vor Beginn der Studie durften die Probanden keine coffein- oder alkoholhaltigen Getränke mehr konsumieren.

Um zu sichern, dass zwischen Aufnahmeuntersuchung und Studiendurchführung keine akute Veränderung des Gesundheitsstatus

stattgefunden hat, wurden unmittelbar vor Beginn der Studie nochmals die Ein- und Ausschlusskriterien überprüft.

Die Probanden erhielten über jeweils eine Woche offen und randomisiert eine Diätphase mit normaler Kochsalzbeladung, kochsalzreicher Diät bzw. kochsalzreicher Diät im dreifach cross-over-Design (siehe Abb.2). Die einzelnen Diätphasen wurden durch jeweils einwöchige Auswaschphasen voneinander getrennt.

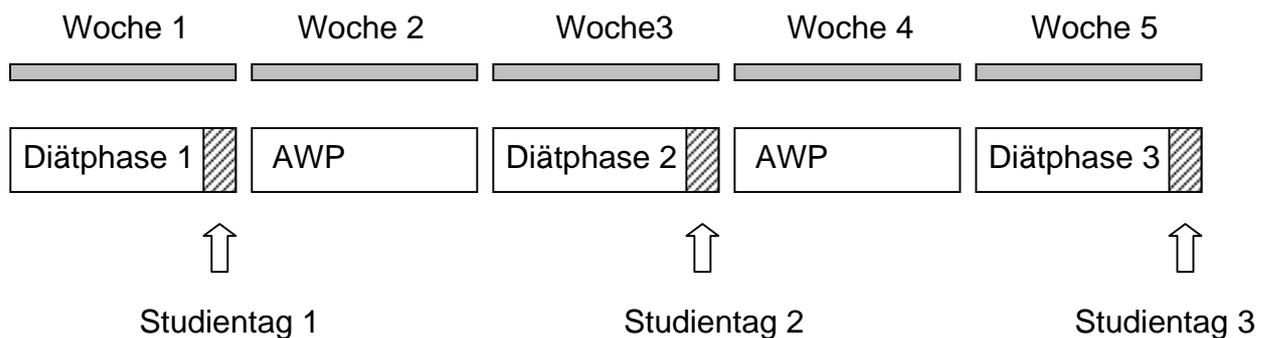


Abbildung 2: Flow-Chart / Studiendesign

AWP = Auswaschphase

Im Einzelnen sind folgende Diäten durchgeführt worden:

Normale Kost:

Normale Kost (die Probanden ernährten sich entsprechend ihren Gewohnheiten) ohne Salzrestriktion oder zusätzliche Zufuhr (ca. 8 – 10 g/die).

Natriumchloridarme Kost:

Die salzreduzierte Kost (1 – 3 g/Tag) musste entsprechend den Vorgaben zubereitet werden: Kein Zusalzen, Gemüse nur in Wasser dünsten, ausschließlich natriumarmes Mineralwasser oder Leitungswasser trinken, fleischhaltige Kost auf ein Minimum reduzieren; striktes Meiden von stark kochsalzhaltigen Lebensmitteln, wie Konserven, geräucherten oder gepökelten Fleischwaren, Teig- und Backwaren.

Natriumchloridreiche Kost:

Normale Kost ohne Salzrestriktion, zusätzlich tägliche Einnahme von verkapseltem NaCl (100 mg/kg KG/Tag). Je nach individueller Kochsalzzufuhr mit der normalen Kost entspricht dies einer Erhöhung der täglichen Kochsalzmenge auf das eineinhalb- bis zweifache der normalen Menge (ca. 15 g/die).

Da die Probanden sich in allen drei Diätphasen das Essen selbst im häuslichen Umfeld zubereiteten, sammelten sie am vorletzten Tag (= Tag 6 der Diätphase) der jeweiligen Studienperiode zur Kontrolle der Compliance, beginnend um 8.00 Uhr, über 24 Stunden ihren Urin. Darin wurde die fraktionellen Natriumausscheidung (F_{Na}) bestimmt, anhand

derer besonders die Einhaltung der Ernährung in der salzarmen Diätphase überprüft werden konnte.

Am jeweils letzten Tag der Studienperioden (insgesamt 3 mal) erschienen die Probanden um 8.00 Uhr auf der Probandenstation und gaben ihren Sammelurin ab. Am Vorabend der Studientage durften die Probanden nach 22.00 Uhr nur noch kochsalzarmes Mineralwasser zu sich nehmen. Am Studientag (Tag 7; siehe Flow-Chart) blieben die Probanden nüchtern. Nach Abschluß der Untersuchungen erhielten sie ein Mittagessen.

An den drei Untersuchungstagen wurde jeweils eine Clearance-Untersuchung zur Bestimmung der glomerulären Filtrationsrate und des renalen Plasmaflusses durchgeführt. Zudem wurden die Plasmakonzentrationen von Erythropoietin, Angiotensin II, sowie die Plasmareninaktivität bestimmt.

Hierzu wurde an beiden Unterarmen der Probanden eine dünne Verweilkanüle in eine Unterarmvene platziert, über die auf der einen Seite die Markersubstanzen (Inulin und PAH) infundiert und kontralateral die Blutproben entnommen werden konnten. Diese Kanülen verblieben für die Dauer der Untersuchung (ca. 5 Std) an den Studientagen in der Vene, so dass keine zusätzlichen Punktionen im Laufe der Studientage durchgeführt werden mussten.

Detailliert wird die Clearance-Untersuchung wie folgt durchgeführt (vgl. Abb.3):

Der Proband leerte gleich zu Beginn seine Blase vollständig, wobei der Urin gesammelt und als Urinleerwert abgefüllt wurde. Unmittelbar danach

wurden die bereits beschriebenen Verweilkanülen gelegt. Nach einer 30-minütigen Ruhepause wurde der Serumleerwert abgenommen und die PAH/Inulin-Boluslösung angehängt. Diese musste innerhalb von 30 min vollständig infundiert werden.

Anschließend wurde die PAH/Inulin-Hauptinfusion angehängt. Diese wurde mit einer Infusionsrate von 50 ml/Std appliziert. Während der gesamten Clearance-Untersuchung (Beginn der Bolusinfusion bis Ende der Hauptinfusion) musste der Proband halbstündlich 350 ml natriumchloridarmes Mineralwasser zu sich nehmen. Vor Beginn der Hauptinfusion musste der Proband seine Blase vollständig entleeren. Nach weiteren 30 Minuten erfolgte eine Blutentnahme. Nach weiteren 15 Minuten wurde erneut der Urin gesammelt. Ab diesem Zeitpunkt wurden Blut und Urin alternierend in 15-minütigem Wechsel gesammelt, wobei die letzten Blut-/Urinproben zeitlich den doppelten Abstand zu den vorherigen Abnahmen hatten (Blutentnahme 60, 90, 120, 180 Minuten // Urinproben: 75, 105, 135, 195 Minuten). 195 Minuten nach Beginn der Hauptinfusion waren die Clearance-Untersuchungen abgeschlossen. Blutdruck und Herzfrequenz wurden während der Studientage stündlich bestimmt (vgl. Abb. 3). Die Messungen des Blutdrucks erfolgten oszillometrisch, die Herzfrequenz wurde mit EKG-Monitoren gemessen, welche Bestandteil des stationären Monitoringsystems der Probandenstation sind. Während des gesamten Studientages befanden sich die Probanden in bequemer liegender Position.

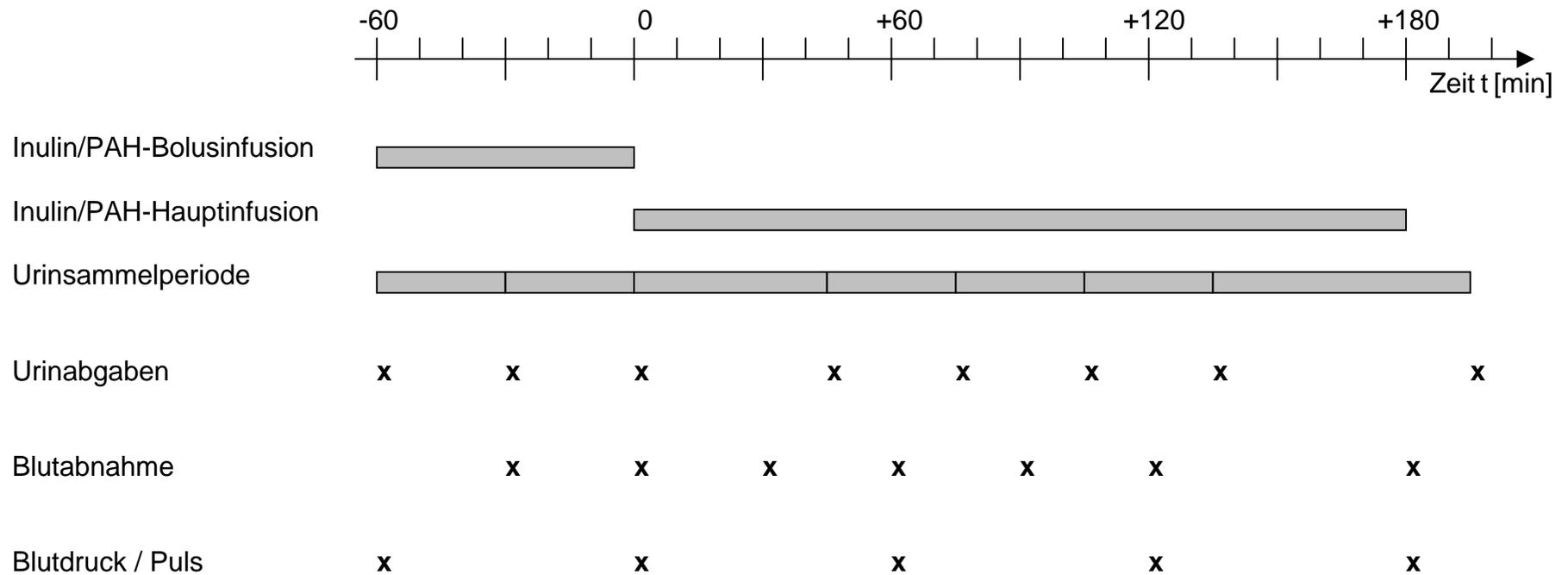


Abbildung 3: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes eines Studientages
(Der Beginn der Hauptinfusion wurde als Zeitpunkt 0 definiert.)

3.4.1 Probenaufbereitung

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Blutproben unmittelbar nach der Abnahme zentrifugiert und das überstehende Plasma abpipettiert.

Erythropoietin (EPO):

Im Laufe der Diätphasen wurde den Probanden jeden Morgen um 8.30 Uhr 4 Aliquots mit jeweils 5 ml Blut in eine EDTA-Monovette entnommen. Diese wurden danach bis zur EPO-Analyse bei -20°C eingefroren. Zu Beginn jeder Diätphase wurde zusätzlich ein kleines Blutbild abgenommen.

Angiotensin II:

Am Ende der Diätphasen wurde an den Studientagen einmalig mit vorgekühlten (in Eiswasser) EDTA-Monovetten, zusammen mit dem Leerwert für die Clearance-Bestimmungen, Blut zur Bestimmung der Angiotensin II-Konzentration abgenommen. Um den enzymatischen Abbau zu verhindern, wurde in jede Monovette vor der Abnahme 60 μl Bestatin®-Lösung pipettiert. Die Zentrifugation erfolgte in einer vorgekühlten Zentrifuge bei $+4^{\circ}\text{C}$. Danach wurden 3 Aliquots, abpipettiert und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren.

Plasma-Renin-Aktivität (PRA):

An den Studientagen, einmalige Abnahme zusammen mit dem Leerwert für die Clearance-Bestimmungen. Mit vorgekühlten (in Eiswasser) EDTA-

Monovetten. Die Zentrifugation erfolgte in einer vorgekühlten Zentrifuge bei +4 °C. Im Anschluß daran wurden 3 Aliquots abpipettiert und bis zur Analyse bei –80 °C eingefroren.

3.5 Biochemische Analysen

Die Bestimmung des kleinen Blutbildes, der Elektrolyte, des Kreatinins und des Harnstoffes wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums der Eberhard-Karls-Universität Tübingen vorgenommen.

3.5.1 Bestimmung der Plasma-Renin-Aktivität im Serum

Die Plasmapreninaktivität wurde mit dem Radioimmunoassay (RIA) Angiotensin I (GammaCoat®, DiaSorin Stillwater, Minnesota, USA) bestimmt, wobei der Umsatz von Renin zu Angiotensin I gemessen wurde. Das Prinzip dieses Radioimmunoassays basiert auf der kompetitiven Verdrängung zwischen markiertem Angiotensin I und Angiotensin I aus den Proben um eine begrenzte Zahl an die Röhrenwand gebundener Antikörperbindungsstellen. Nach der Inkubation bei 37°C ist die Menge des wandgebundenen markierten Angiotensin I umgekehrt proportional zu der Menge des freien Angiotensins in den Proben. Als Trennmethode wurde die „Coated-Tube-Technik“ verwendet,

bei der die Antikörper an der Röhreninnenfläche fixiert sind. Der Überstand enthielt das überschüssige Angiotensin.

3.5.2 Bestimmung der Erythropoetinkonzentration im Serum

Die Bestimmung der Erythropoietinkonzentration erfolgte mit einem ELISA (Medac GmbH, 22083 Hamburg). Die Mikrotiterplatte (1 Halterahmen mit 12 Streifen, jeweils 8 Vertiefungen pro Streifen) war mit Anti-EPO-Antikörpern (Maus, monoklonal) gebrauchsfertig vorbeschichtet. Das Testverfahren erfolgte nach dem Sandwich-Prinzip. Das auf 1:2 verdünnte Serum wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert. Serum-EPO wurde durch den Antikörper an die Platte gebunden. Nach dreimaligem Auswaschen der Mikrotiterplatte ist Anti-EPO-Antikörper-ALP-Konjugat (Anti-EPO-Antikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert) in die Vertiefungen pipettiert worden. Durch die Bindung des enzymkonjugierten Antikörpers wurde der Sandwichkomplex komplettiert. Nach nochmaligem Auswaschen ist nach Zugabe von Substrat p-Nitrophenylphosphat die Extinktion bei 405 nm die EPO-Konzentration bestimmt worden.

3.5.3 Bestimmung der Angiotensin-II-Konzentration im Serum

Die Konzentration von Angiotensin II im Serum wurde mit einem Radioimmunoassay (Bühlmann Laboratories AG, Allschwil, Schweiz) bestimmt. Bereits bei der Blutabnahme wurde das Blut mit Bestatin® versetzt, um den enzymatischen Abbau des Angiotensins II zu verhindern (siehe oben). Der Angiotensin-II-Radioimmuno-assay misst immunreaktives Angiotensin II mit Hilfe eines doppelten Antikörper-radioimmunoassays. Phasenextrahierte EDTA-Plasma-, Standard- und Kontrollproben werden zuerst 16 Stunden mit einem Anti-Angiotensin-II-Antikörper vorinkubiert. Im Anschluß daran konkurriert ¹²⁵I-Angiotensin-II mit Angiotensin II in den Proben um die gleichen Antikörperbindungsstellen. Nach einer zweiten Inkubation von 6 Stunden wird eine feste Phase mit einem zweiten Antikörper dazugegeben. Der gebundene Teil der Antikörperkomplexe ist auf der festen Phase fixiert und wird mit Hilfe einer Gamma-Zählkammer ausgezählt.

3.5.4 Bestimmung von PAH und Inulin im Urin / Serum

Benötigte Reagenzien und deren Zusammensetzung:

- 0,5N NaOH : Aqua bidest. mit 1N NaOH im Verhältnis 1:1 mischen
- 30%ige HCl : 405ml 37% HCl in 500ml Aqua bidest.
- 10%ige ZnSO₄-Lsg : 20g ZnSO₄ auf 200ml Aqua bidest.
- Resorcin : 0,1g Resorcin und 0,25g Thioharnstoff gelöst in 100ml Essigsäure
- 0,1N HCl : gebrauchsfertig
- 0,1%ige NaNO₂ : 0,1g NaNO₂ in 100ml Aqua bidest. lösen
- 0,5%ige Amidosulfonsäure:
vollständig in Aqua bidest. lösen
- 0,1N N-Ethyl- α -Naphthylaminhydrobromid:
0,1g N-Ethyl- α -Naphthylaminhydrobromid in 10 ml warmem Methanol lösen und mit 90ml Aqua bidest. auffüllen.

Enteiweißung

Zunächst wurden die Blut- und Urinproben aufgetaut, gut geschüttelt und zehn Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert.

Im Anschluss daran wurden zu jeweils 0,5 ml Serum bzw. Urin 0,5 ml 10%ige ZnSO₄-Lösung, 0,5 ml 0,5N NaOH und 1 ml Aqua bidest. gegeben. Diese Behandlung führte zur Eiweißdenaturierung und -ausfällung. Nach jeder Zugabe wurde der Ansatz im Vortex geschüttelt. Nach Zugabe aller Substanzen waren alle Proben im Verhältnis 1:5 verdünnt.

Abschließend wurden die Proben zehn Minuten bei 4000 U/min zentrifugiert.

Urinverdünnung

Für die Bestimmung der Inulinkonzentration wurden die enteiweißten Urinproben mit Aqua bidest. auf 1:10 verdünnt (jeweils 1,8ml Aqua bidest. + 200 µl des Überstandes der Urinenteiweißung).

Für die PAH-Bestimmung wurden die Urinproben auf 1:100 verdünnt (jeweils 1980 µl Aqua bidest. + 20 µl des Enteiweißungsüberstandes).

Durch diese Verdünnung sollte ein zu starkes Anfärben durch hohe Inulin- bzw. PAH-Konzentrationen im Urin und dadurch bedingte Messfehler vermieden werden.

Fortan wurden sämtliche Proben doppelt bestimmt.

Inulinbestimmung

Vorab wurde eine Eichkurve erstellt (siehe Abb. 4). Diese wurde mit Hilfe einer Standardverdünnungsreihe ermittelt, die den folgenden Inulinkonzentrationen entsprach: 5 mg/dl; 2,5 mg/dl; 1,25 mg/dl; 0,63 mg/dl; 0,32 mg/dl und 0,16 mg/dl.

Die Testreihe wurde wie folgt angesetzt:

Jeweils 250 µl (Doppelwerte) der 1:10 verdünnten Urinproben, der Serumenteiweißung und der Standardreihe wurden versetzt mit

- 125 µl Resorcinreagenz, schütteln (Vortex[®])
- 1 ml 30%iger HCl, schütteln

Anschließend wurden die Proben im 80°C warmen Wasserbad inkubiert. Nach ca. 12 min und/oder wenn der Standardwert mit der Konzentration 0,16 mg/dl leicht gefärbt ist, wurden alle Proben sofort im Eisbad abgekühlt.

Die Extinktionszunahmen wurden im Photometer (Dynatech MR500) bei $\lambda = 490$ nm gegen den Reagenzienleerwert gemessen, die Urinextinktionen wurden mit 10 multipliziert.

Aus den Ergebnissen der Standardverdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt, anhand derer dann die Inulinkonzentrationen der Proben ermittelt werden konnten. Die Doppelbestimmungen der Standards und der Proben dienen zur Berechnung des arithmetischen Mittels.

PAH-Bestimmung

Wie bei der Inulin-Bestimmung wurde auch hier eine Standard-verdünnungsreihe angefertigt, die die folgenden Konzentrationen beinhaltet: 5 mg/dl; 2,5 mg/dl; 1,25 mg/dl; 0,63 mg/dl; 0,32 mg/dl; 0,16 mg/dl

Jeweils 500 µl der 1:100 Urinverdünnung, der Serumenteiweißung und der Standardreihe wurden der folgenden Behandlung zugeführt:

- 100 µl 0,1N HCl zugeben; schütteln (Vortex[®])
- 50 µl 0,5N NaNO₂ zugeben; schütteln – dann 5min stehen lassen
- 50 µl 0,5%iger Amidosulfonsäure zugeben; schütteln – dann 5min stehen lassen.

50 µl 0,1%iger N-Ethyl- α -Naphthylaminhydrobromid-Lösung; vortexen und 40 min bei Raumtemperatur inkubieren.

Im Photometer (Dynatech MR500) wurde die Extinktionszunahme bei $\lambda = 550$ nm gegen den Leerwert gemessen und die Urinextinktion mit dem Faktor 100 multipliziert.

Aus der Eichkurve der Standardverdünnungsreihe konnten dann die PAH-Konzentrationen der Proben ermittelt werden.

Die Aminogruppe des Paraaminohippurats wird bei dieser Bestimmung mit Natriumnitrit diazotiert und das überschüssige Nitrit mit Amidosulfuronsäure gebunden. Durch den Zusatz von bromwasserstoffarmem α -Naphthylamin entsteht mit der diazotierten Paraaminohippursäure eine rote Färbung, deren Absorption der PAH-Konzentration der Proben proportional ist und photometrisch bestimmt werden kann.

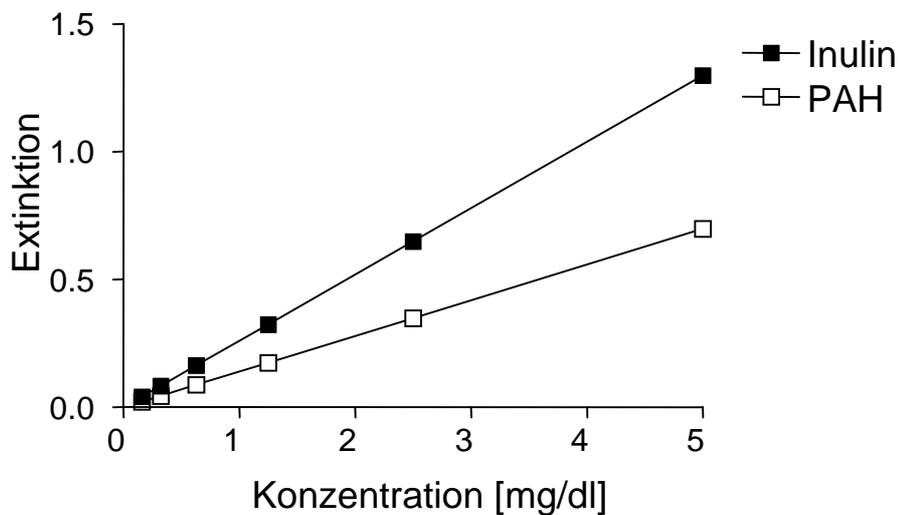


Abbildung 4: Beispiel für eine Inulin-/PAH-Eichkurve

3.6 Statistik

3.6.1 Studiendesign

Die Studie wurde randomisiert, offen, im cross-over Design angelegt.

3.6.2 Fallzahlschätzung

Zur Ermittlung der Anzahl der Versuchspersonen wurde angenommen, dass unter salzarmer Diät die kleinste zu erwartende Differenz der EPO-Konzentration 50 % beträgt. Dies wäre eine klinisch relevante Veränderung der EPO-Konzentration. Die Standardabweichung wurde mit 33 % angenommen. Um den zu erwartenden Unterschied auf einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$ mit einem Power von 0,9 nachweisen zu können, werden 12 Probanden im cross-over Design benötigt.

3.6.3 Randomisierung

Die Zuteilung der Studiensequenzen erfolgte randomisiert im dreifach cross-over. Die Randomisierung wurde mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2000 (Microsoft[®], Inc.) durch einen

Mitarbeiter der Abteilung Klinische Pharmakologie des Universitätsklinikums Tübingen durchgeführt, der nicht an der Studie beteiligt war.

3.6.4 Konfirmatorische statistische Analyse

Die primäre Zielvariable waren die Differenzen der EPO-Konzentration innerhalb der einzelnen Studienperioden zwischen Tag 1 und Tag 7. Daneben wurden die EPO-Konzentrationen am Tag 7 zwischen den Studienperioden verglichen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen der EPO-Konzentrationen der unterschiedlichen Diätphasen wurden bestimmt. Der statistische Vergleich der Konzentrationen erfolgte mittels einer ANOVA. Zwischen den Untersuchungsgruppen wurden Post-Tests durchgeführt. Hierfür wurde ein zweiseitiger, verbundener t-Test mit α -Adjustierung nach Bonferroni durchgeführt (Korrigierte Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$).

Die sekundären Zielvariablen Plasminogenaktivität (PRA) und Angiotensin II, bestimmt an den Untersuchungstagen, wurden mittels einer ANOVA und ggf. anschließenden Post-Tests untersucht.

Um eine mögliche Korrelation zwischen den Plasmakonzentrationen von Erythropoietin gegenüber Angiotensin II aufzuzeigen, wurden lineare Regressionsanalysen der Konzentrationen an den Studientagen der verschiedenen Diätphasen durchgeführt.

Die Inulin- und PAH-Clearance wurde mittels eines Zwei-Kompartiment-Modelles nach einer Bolusinfusion und anschließender Dauerinfusion von Inulin und PAH berechnet. Der Vergleich zwischen den einzelnen Untersuchungsgruppen erfolgte mittels ANOVA und post-t-Tests mit Korrektur nach Bonferroni.

3.7 Berechnungen

1) Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) :

Für Inulin gilt:

Filtrierte Menge = Ausgeschiedene Menge

$$\Rightarrow \text{GFR} = \frac{C_{Iu}}{C_{Ip}} \cdot \frac{V_u}{t} \text{ [ml/min]}$$

C_{Iu} = Inulinkonzentration im Urin

V_u = Urinvolumen [ml]

C_{Ip} = Inulinkonzentration im Plasma

t = Sammelzeit [min]

Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Probanden muss die GFR auf die Körperoberfläche bezogen werden.

$$\Rightarrow \text{GFR}_{\text{STAND}} = \text{GFR} \cdot \frac{1,73}{\text{KO}} \text{ [ml/min]}$$

KO = Körperoberfläche [m²]

GFR_{STAND} = Auf 1,73 m² KO standardisierte GFR.

2) Renaler Plasmafluss (RPF):

Für PAH gilt:

In die Niere einströmende Menge = Ausgeschiedene Menge

$$\Rightarrow \text{RPF} = \frac{C_{pu}}{C_{pp}} \cdot \frac{V_u}{t} \text{ [ml/min]}$$

C_{pu} = PAH-Konzentration im Urin

V_u = Urinvolumen [ml]

C_{pp} = PAH-Konzentration im Plasma

t = Sammelzeit [min]

Zur besseren Vergleichbarkeit zwischen den einzelnen Probanden muss die RPF auf die Körperoberfläche bezogen werden.

$$\Rightarrow RPF_{\text{STAND}} = RPF \cdot \frac{1,73}{KO} \text{ [ml/min]}$$

KO = Körperoberfläche [m²]

RPF_{STAND} = Auf 1,73 m² KO standardisierter RPF.

Die Berechnung des arteriellen Mitteldruckes (MAD) erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$MAD = RR_{\text{syst}} + (2 \cdot RR_{\text{diast}}) \cdot \frac{1}{3}$$

Im Verlauf eines Studientages wurde den Probanden fünfmal der Puls, bzw. der Blutdruck gemessen (vgl. Abb. 3). Um den Einfluss der unterschiedlichen Diätphasen auf das Herz-, Kreislaufsystem zu dokumentieren, wurde nur der Wert verwendet, der unmittelbar vor Beginn des Studientages bestimmt wurde. Die anderen vier dienten der Überwachung des Probanden im Verlauf des Studientages und könnten durch Manipulationen (z.B. Legen der Infusionsnadeln) oder andere Ursachen verändert sein.

Die Bestimmung der Körperoberfläche (KO) in Tabelle 1 erfolgte nach folgender Formel (Du Bois und Du Bois, 1916):

$$KO = M^{0,425} \cdot L^{0,725} \cdot 0,007184$$

KO = Körperoberfläche [m²]

M = Körpermasse [kg];

L = Körperlänge [cm]

Die AUC_{EPO} wurde mit der Trapezregel berechnet. Dafür wurde das Programm Prism (Version 2.01) der Firma Graphpad benutzt.

In den folgenden Grafiken wurden die Ergebnisse als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) der einzelnen Diätphasen (normal, salzarm, salzreich) dargestellt.

4 Ergebnisse

Die Abbildungen 4-16 geben einen Überblick über die Daten der einzelnen Versuchsgruppen.

4.1 Kreislaufparameter

Unter diesem Punkt wurden die Herzfrequenz und der mittlere Blutdruck zusammengefasst.

4.1.1 Herzfrequenz

Die Abb. 4 stellt die mittlere Herzfrequenz aller Probanden am Ende der jeweiligen Diätphasen dar.

Innerhalb der drei Studienwochen kam es im Vergleich zwischen den verschiedenen Diätphasen zu keiner statistisch signifikanten Änderung der Herzfrequenz.

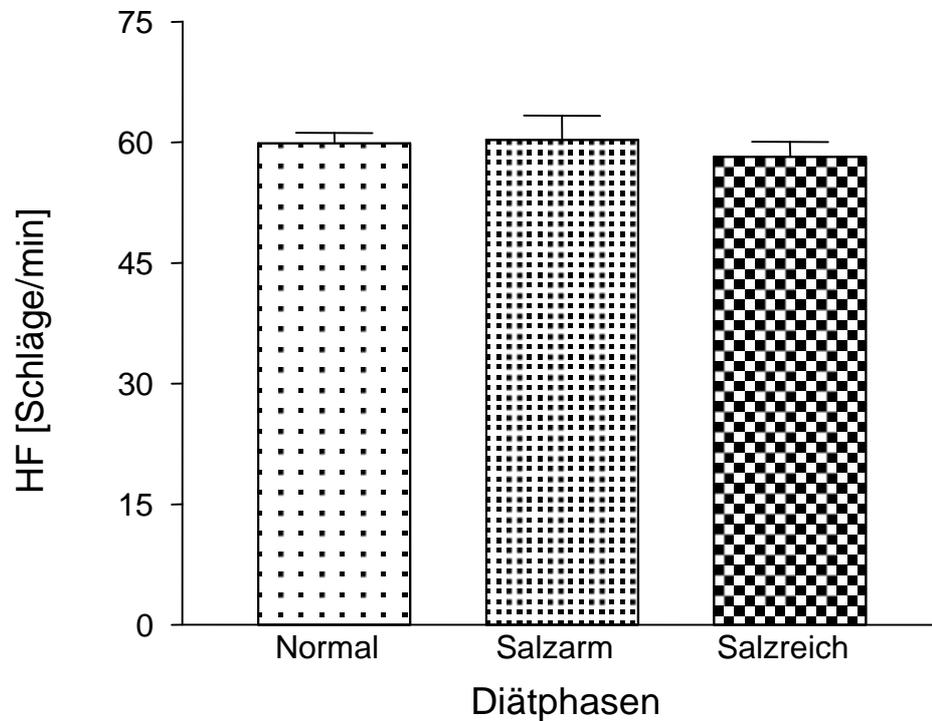


Abbildung 4: Darstellung der Herzfrequenz (HF)
(Mittelwert \pm SEM)

4.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck

In Abb. 5 wird der mittlere arterielle Blutdruck vergleichend für alle drei Diätphasen dargestellt. Es konnte keine statistisch signifikante Änderung des Blutdruckes in den Diätphasen festgestellt werden.

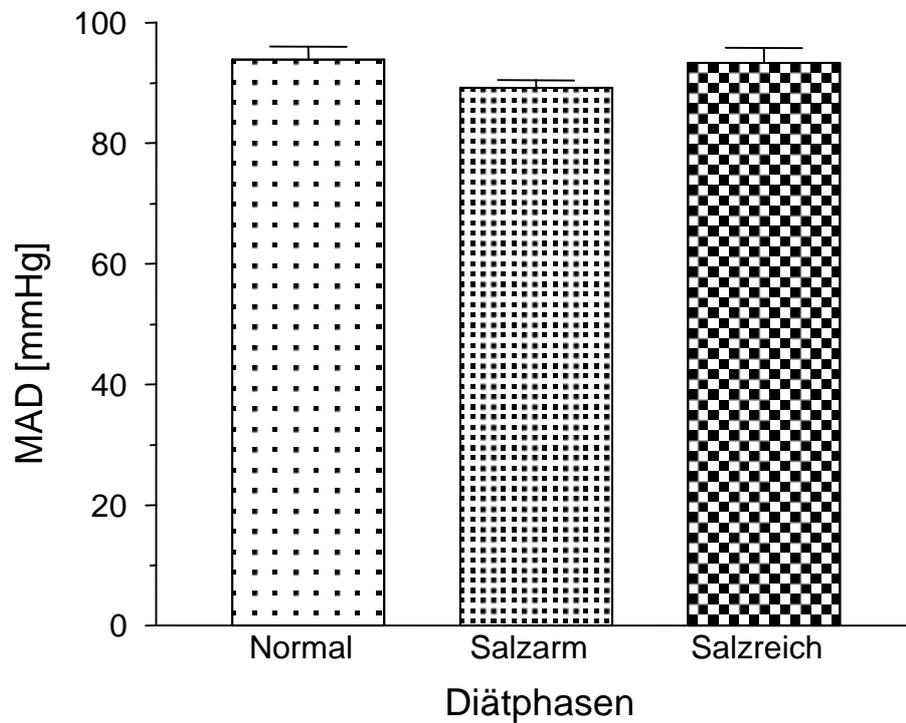


Abbildung 5: Darstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAD)
(Mittelwerte \pm SEM)

4.2 Hämatologische Parameter

Hierunter sind der Hämoglobinwert und der Hämatokritwert zusammengefasst worden.

4.2.1 Hämatokrit

Abb. 6 zeigt einen Überblick über die Hämatokritwerte zu Beginn und zu Ende jeder Studienwoche. An den Untersuchungstagen brachten die unterschiedlichen Diätphasen keine statistisch signifikante Änderung der Hämatokritwerte.

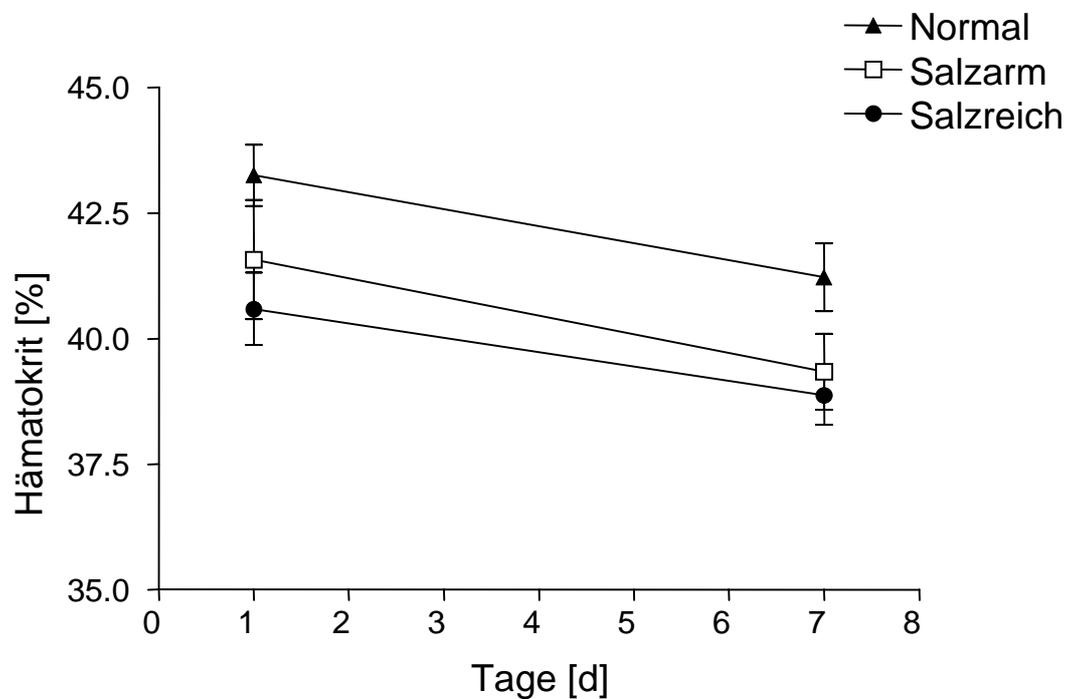


Abbildung 6: Darstellung der Hämatokritwerte
(Mittelwerte \pm SEM)

4.2.2 Hämoglobin

In Abb. 7 lässt sich die Hämoglobinkonzentration an Tag 1 und Tag 7 der verschiedenen Diätphasen ablesen. Eine signifikante Veränderung, die sich auf den unterschiedlichen Salzgehalt der Ernährung zurückführen lässt, ist nicht nachweisbar.

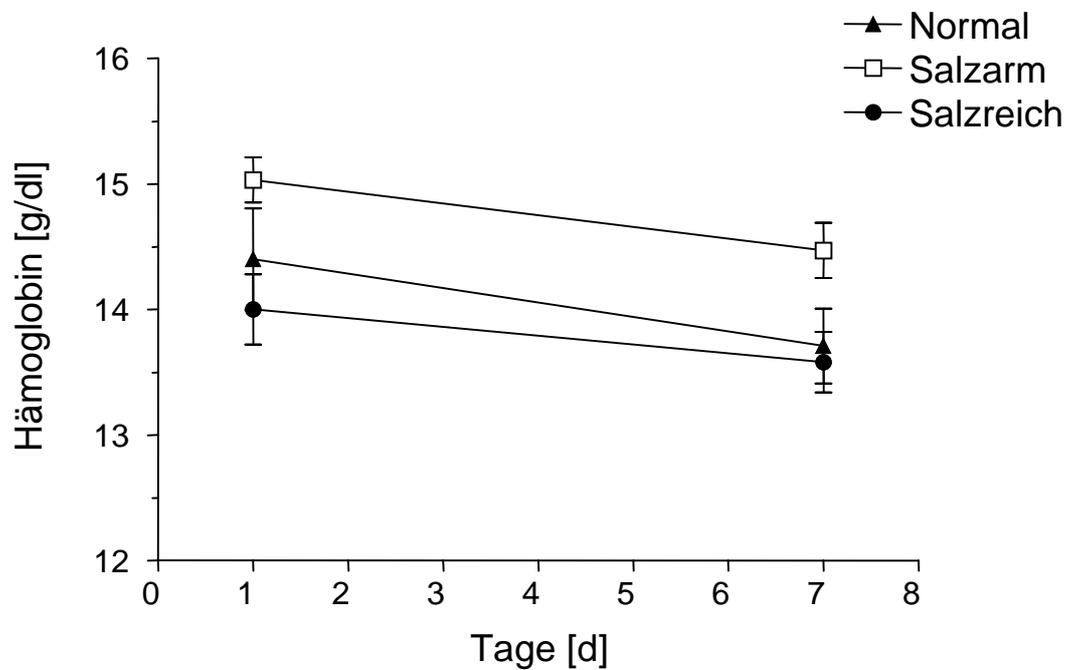


Abbildung 7: Hämoglobinwerte
(Mittelwerte \pm SEM)

4.3 Glomeruläre Filtrationsrate

Abb. 8 zeigt die glomeruläre Filtrationsrate, vergleichend für alle drei Diätphasen. Unter normaler Ernährung wurde eine Filtrationsrate von $86,9 \pm 4,1$ [ml/min/1,73m² KO] gemessen. Am Ende der salzarmen Diätphase lag die GFR bei $80,4 \pm 3,2$ [ml/min/KO], während die salzreiche Ernährung die glomeruläre Filtrationsrate auf $101,7 \pm 3,4$ [ml/min/1,73m² KO] signifikant erhöhte.

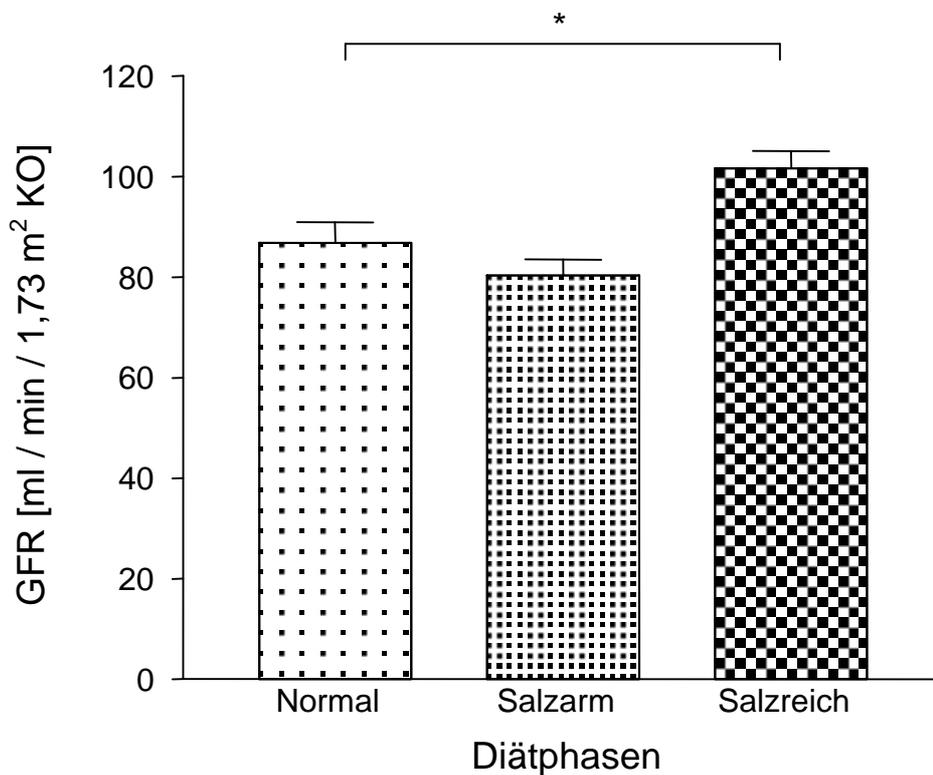


Abbildung 8: Glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

(Mittelwert ± SEM; * = $p < 0,05$)

(KO = Körperoberfläche)

4.4 Renaler Plasmafluss

In Abb. 9 ist der Renale Plasmafluss aller drei Diätphasen dargestellt. Aus der Grafik lässt sich entnehmen, dass der renale Plasmafluss unter der salzreichen Ernährung auf $528,1 \pm 14,3$ [ml/min] signifikant angestiegen ist. Wohingegen der RPF am Ende der salzarmen Diätphase bei $428,5 \pm 13,5$ [ml/min] lag und sich am Ende der normalen Ernährungsphase auf einem ähnlichen Niveau bei $428,1 \pm 22,0$ [ml/min] befand.

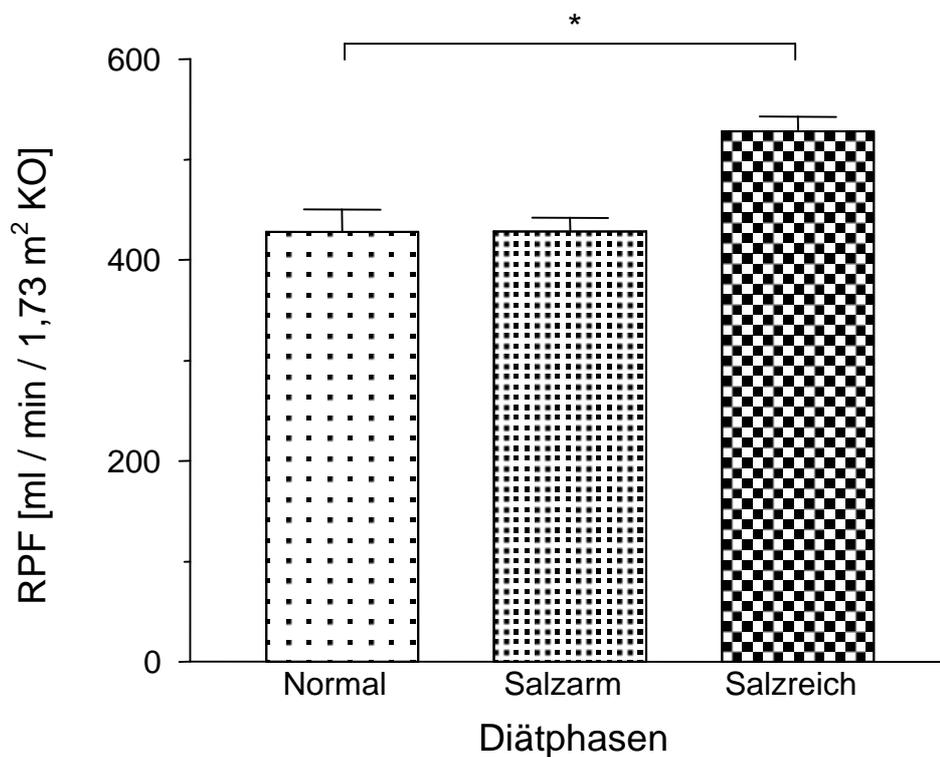


Abbildung 9: Renaler Plasmafluss (RPF)

(Mittelwert \pm SEM; * = $p < 0,05$)

(KO = Körperoberfläche)

4.5 Urinnatriummenge

Die Abb. 10 zeigt die Menge Natrium, die mit dem 24Std-Sammelurin ausgeschieden wurde. Dieser wurde in den letzten 24 Stunden vor Beginn des Studientages der jeweiligen Diätphase gesammelt. Mit normaler Salzzufuhr konnte eine Urinnatriummenge von $177,4 \pm 19,8$ [mmol/24Std] gemessen werden. In der salzarmen Diätphase wurden $13,3 \pm 2,9$ [mmol/24Std] Urinnatrium ausgeschieden. Am Ende der Studienwoche mit salzreicher Diät lag der Wert für das Urinnatrium bei $382,4 \pm 42,7$ [mmol/24Std].

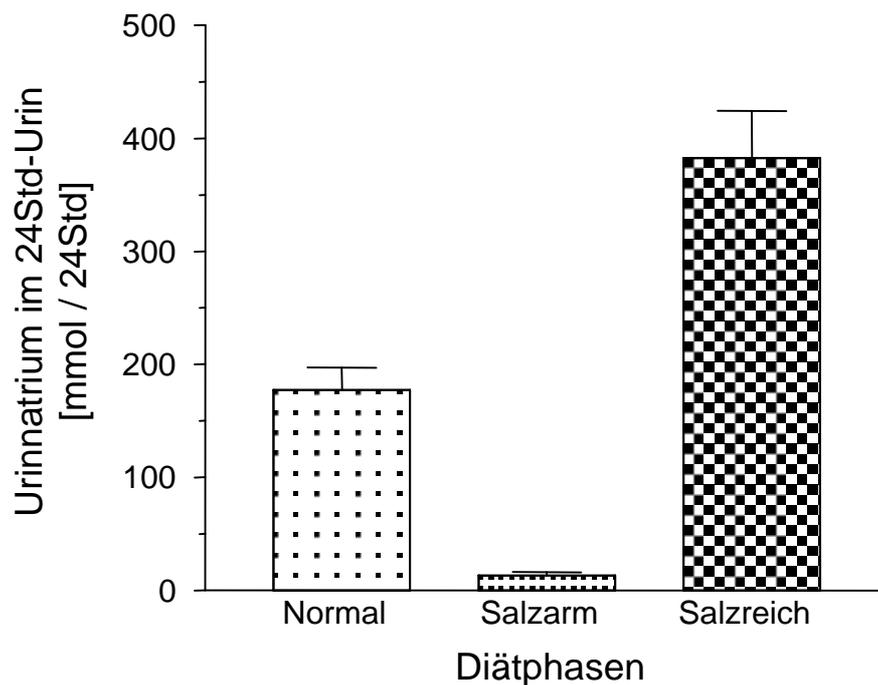


Abbildung 10: Darstellung des Urinnatriums im 24Std-Sammelurin
(Mittelwert \pm SEM; * = $p < 0,001$)

4.6 Plasma-Renin-Aktivität

Abb. 11 zeigt die Änderung der Plasma-Renin-Aktivität während der unterschiedlichen Ernährungsphasen. Zu Beginn der jeweiligen Studienwochen lagen die Werte alle auf einem ähnlichen Niveau (Salzreich: $0,9 \pm 0,1$; Normal $0,9 \pm 0,2$; Salzarm: $0,9 \pm 0,2$ [ng/ml/h]). Im Laufe der Diätphase mit normaler Salzzufuhr sank die Plasma-Renin-Aktivität auf $0,7 \pm 0,1$ [ng/ml/h] ab. Der Wert am Ende der Studienwoche mit erhöhter Salzzufuhr ging bis auf $0,4 \pm 0,07$ [ng/ml/h] zurück. Die Veränderungen im Verlauf dieser Diätphasen sind so gering, dass sich keine statistische Signifikanz nachweisen lässt.

Demgegenüber erhöhte sich jedoch die Plasma-Renin-Aktivität im Verlauf der Studienwoche mit salzarmer Diät signifikant ($p < 0,05$) um mehr als das dreieinhalbfache auf $3,5 \pm 0,7$ [ng/ml/h].

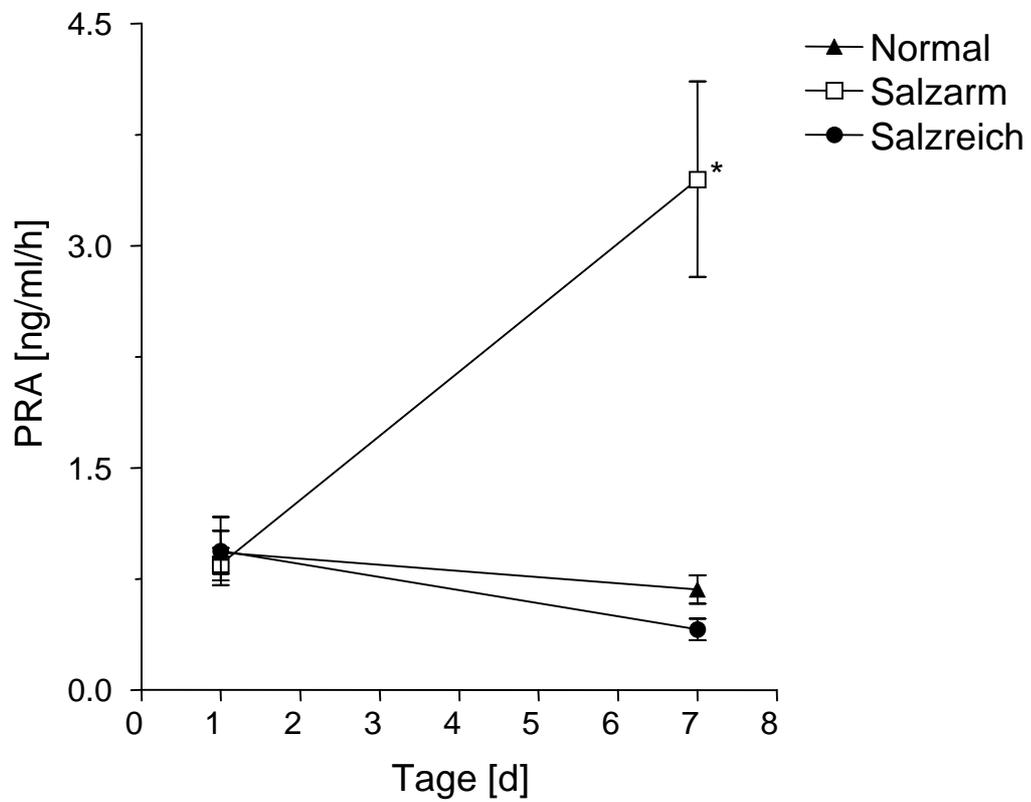


Abbildung 11: Darstellung der Plasma-Renin-Aktivität (PRA)
(Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$)

4.7 Angiotensin-II-Konzentration

In Abb. 12 ist die Angiotensin-II-Konzentration in Abhängigkeit der drei Diätphasen dargestellt. Zu Beginn der drei verschiedenen Studienwochen sind die Konzentrationen sehr ähnlich. Die Diätphase mit normaler Ernährung beginnt mit einer Konzentration von $5,2 \pm 0,8$ [pg/ml], die Diätphase mit salzarmer Ernährung mit $4,7 \pm 0,6$ [pg/ml] und die Woche mit salzreicher Ernährung beginnt mit einer Konzentration von $5,6 \pm 0,99$ [pg/ml]. Im Laufe der jeweiligen Woche sinkt die Konzentration unter normaler bzw. salzreicher Ernährung auf $4,96 \pm 0,52$ [pg/ml] bzw. $2,76 \pm 0,56$ [pg/ml] ab.

Die Konzentration in der salzarmen Diätphase steigt jedoch auf $14,5 \pm 1,1$ [pg/ml] signifikant ($p < 0,05$) an.

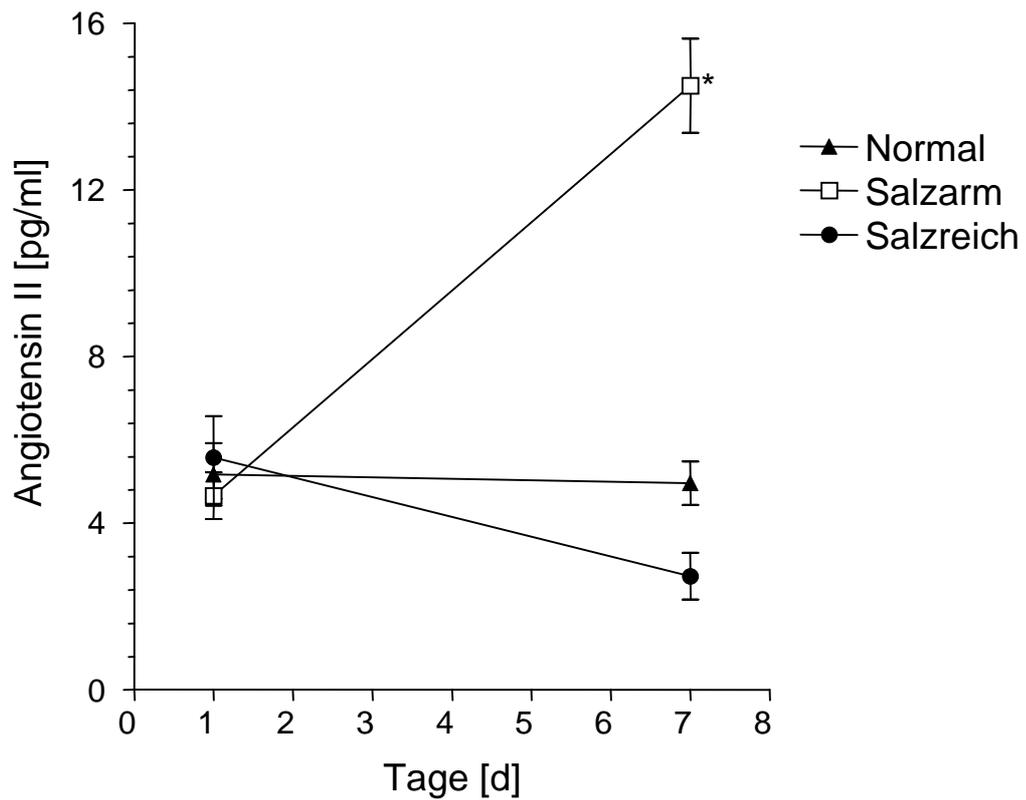


Abbildung 12: Darstellung der Angiotensin-II-Konzentration
(Mittelwert \pm SEM; * = $p < 0,05$)

4.8 Erythropoetin-Konzentration

In Abb. 13 ist der Verlauf der Erythropoetinkonzentration über die verschiedenen Ernährungsphasen dargestellt worden. Aus dem Diagramm lässt sich entnehmen, dass durch die verschiedenen Arten der Ernährung keine signifikante Änderung der Erythropoietin-Konzentration im Plasma erzielt werden konnte.

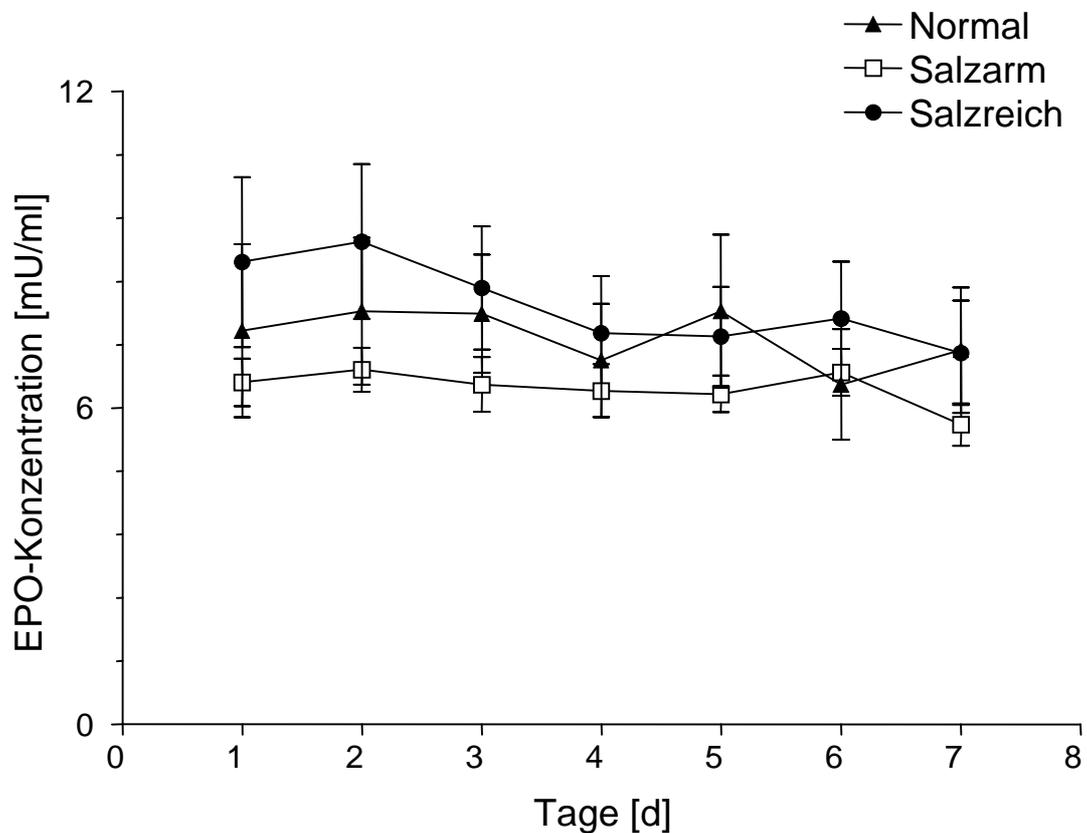


Abbildung 13: Verlauf der Erythropoietin-Konzentration
(Mittelwert \pm SEM)

4.8.1 Fläche unter der Kurve der Erythropoetin-Konzentration

Abb. 14 zeigt die Flächen unter den Kurven der Abbildung 13. Auch hier lässt sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der jeweiligen Ernährungsphasen erkennen.

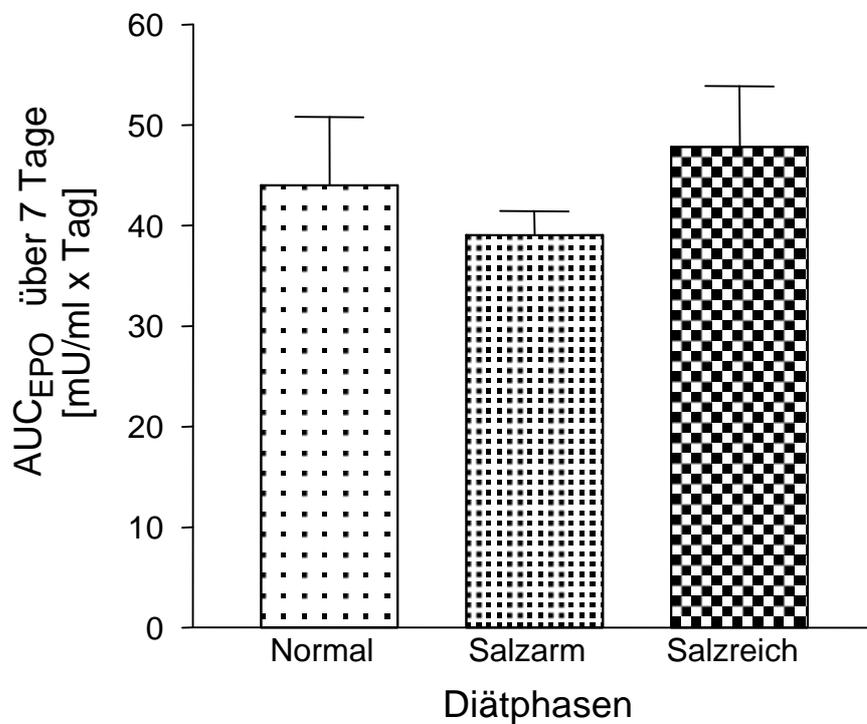


Abbildung 14: Fläche unter der Erythropoetin-Kurve (AUC_{EPO} über 7 Tage)
(Mittelwert ± SEM)

5 Diskussion

Verschiedene klinische Studien lieferten sehr detaillierte, aber leider mehrdeutige Hinweise, dass das Renin-Angiotensin-System (RAAS) beim Menschen im Rahmen verschiedener Erkrankungen bei der Regulation der endogenen EPO-Produktion beteiligt ist (Gleiter, 1996 b). So wurden beispielsweise 1994 Patienten mit Posttransplantationserythrozytose (PTE) über 12 Monate mit Captopril, einem Inhibitor des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE), behandelt. Das Medikament wurde in einer Dosierung von 25 mg / 24 Std verabreicht. Bereits nach drei Monaten ließ sich ein signifikanter Abfall des Hämatokrits und des Hämoglobins beobachten. Auch die Erythropoetinkonzentration fiel signifikant (Torregrosa et al., 1994).

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass auch der AT₁-Rezeptor Antagonist Losartan bei Patienten mit (PTE) bei einer Behandlungsdauer von 14 Wochen und einer Dosierung von 50 mg zu einer Reduzierung des Hämoglobins, des Hämatokrits und der EPO-Konzentration führt (Klaassen et al., 1997). Bereits im Rahmen einer Behandlung von nur 4 Wochen mit einer wöchentlich um 25 mg ansteigenden Dosierung von Losartan (25 / 50 / 75 / 100 mg) zeigten sich obige Ergebnisse (Vlahakos et al., 2001).

Weitere Studien konnten die genannten Ergebnisse verifizieren (Donnelly et al., 2001; Plata et al., 2002).

2002 wurde eine vergleichende Studie durchgeführt, die zum einen die Wirkung des ACE-Hemmers Enalapril (5 mg pro Tag über 24 Wochen)

auf Hämoglobin, Hämatokrit und EPO-Konzentration mit der des AT1-Inhibitors Losartan (50 mg pro Tag über 24 Wochen) verglichen. Außerdem wurden die Präparate sowohl gesunden Probanden, als auch Patienten, die an PTE litten verabreicht.

Im Laufe der Studie zeigte sich, dass das Hämoglobin bei den Patienten mit PTE, die unter Enalapriltherapie standen deutlich stärker abfiel als unter der Losartantherapie. Gleichzeitig wurde noch der insulin-like-growth-factor-1 untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich dieser nur im Rahmen der Therapie mit dem ACE-Hemmer signifikant veränderte. EPO blieb unter beiden Wirkstoffen unverändert. Bei den gesunden Probanden ließ sich keine signifikante Veränderung aller gemessenen Parameter beobachten (Wang et al., 2002). Das Ergebnis dieser Studie zeigt die Komplexität der Regulation der Erythropoetinkonzentration. Es gibt Hinweise, dass noch völlig andere Mechanismen hierbei eine wichtige Rolle spielen.

In einer vergleichenden Studie zwischen dem β_2 -Sympathomimetikum Fenoterol ($1,5 \mu\text{g min}^{-1}$ über 6 Std) und dem β_1 -Sympathomimetikum Dobutamin ($5 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ über 6 Std) zeigte sich, dass allein die Verabreichung von Fenoterol die Erythropoetinproduktion steigerte (Gleiter et al., 1997 c).

In einer weiteren Studie konnte gezeigt werden, dass sich die Erythropoetinproduktion bei einer Kombinationsgabe von Fenoterol ($1,5 \mu\text{g min}^{-1}$ über 6 Std i.v.) und Losartan (50 mg p.o.) nicht veränderte, wohl aber bei alleiniger Fenoteroltherapie ($1,5 \mu\text{g min}^{-1}$ über 6 Std) eine

deutliche Erhöhung der Erythropoetinkonzentration zu beobachten war. (Freudenthaler et al., 1999 a).

Aus diesen und anderen Ergebnissen kann geschlossen werden, dass Angiotensin II bei gesunden Freiwilligen ein direktes Stimulans der EPO-Produktion sein kann.

In weiterführenden Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass Angiotensin II ($1 - 3 \mu\text{g min}^{-1}$ über 6 Std) in der Lage ist, die EPO-Produktion zu steigern. Diese Wirkung lässt sich durch den AT_1 -Rezeptorantagonisten Losartan inhibieren. Der ACE-Hemmer Captopril ist dazu jedoch nicht in der Lage (Freudenthaler et al., 1999 b; Gossmann et al., 2001). In einer folgenden Studie konnte gezeigt werden, dass Angiotensin II einen dosis-abhängigen Effekt auf die EPO-Produktion hat, welcher mit Hilfe von AT_1 -Rezeptor Antagonisten blockiert werden konnte (Freudenthaler et al., 2000). Dazu wurde 60 gesunden Probanden Angiotensin II in zwei unterschiedlichen Konzentrationen ($1 - 3 \mu\text{g min}^{-1}$ oder $0,0375 - 0,15 \mu\text{g min}^{-1}$ über jeweils 6 Std) infundiert, wobei die niedrigere Dosierung den mittleren arteriellen Blutdruck (MAB) der Probanden nicht veränderte. Jede der beiden Dosierungen wurde einmal alleine und einmal in Kombination mit Losartan verabreicht. Unter Angiotensin II-Konzentrationen, die im Vergleich zu den Ausgangswerten durch die Infusion bis zum Dreifachen erhöht waren, konnten die EPO-Konzentrationen ebenfalls auf bis zu 230 % gesteigert werden. (Freudenthaler et al., 2000). Die Größenordnung der Zunahme der EPO-Konzentrationen bei Menschen unter intravenöser Angiotensin II-Gabe, ist mit der bei Hypoxie (bei 13 % O_2 bzw. auf 4000 m Höhe) vergleichbar (Gleiter et al., 1997; Freudenthaler et al., 2002; Eckardt et al., 1989).

Im Rahmen unserer Studie konnte die Angiotensin II-Konzentration endogen im Verlauf der salzarmen Diätphase in einem ähnlichen Ausmaß wie durch die exogene Zuführung mit Hilfe von Infusionen auf über das Dreifache gesteigert werden.

Es bleibt jedoch unklar, ob dieser nachgewiesene Effekt von *exogenem* Angiotensin II auf die EPO-Produktion über eine direkte Vermittlung über AT₁-Rezeptoren auf die EPO-produzierenden Zellen erklärt werden kann. Eine andere Möglichkeit wären Signalwege, die über eine erhöhte Angiotensin II-Konzentration verändert werden können. In diesem Zusammenhang wäre im Besonderen an eine Vasokonstriktion zu denken, welche über eine nachfolgende lokale, intrarenale Hypoxie ein Signal für die EPO-produzierenden Zellen der Niere darstellt.

In aktuellen Forschungsergebnissen wurde narkotisierten Ratten eine intravenöse Angiotensin II-Infusion ($30 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ über 30 min) verabreicht. Dabei wurde ein Einfluss des Angiotensin II auf den gesamten Blutfluss in der Niere, in der Corticalis und der Medulla der Niere gemessen. Es zeigte sich, dass der renale Blutfluss nach Angiotensin II-Gabe sank, wohingegen der medulläre Blutfluss gestiegen war. Nach Gabe Blockade der Angiotensin II-Rezeptoren mit Saralasin ($3 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i.v.) stieg der renale Blutfluss an, während der medulläre Blutfluss gesunken war. Nach einer selektiven Blockade der AT₁-Rezeptoren mit Losartan (10 mg kg^{-1}) konnte ein Anstieg des kortikalen Blutflusses beobachtet werden, wohingegen der medulläre Blutfluss sich nicht veränderte. Im Verlauf der Studie konnte keine Veränderung des systemischen Blutdruckes beobachtet werden.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigten, dass ein erhöhter Angiotensin II-Spiegel bei narkotisierten und chirurgisch präparierten Ratten, unabhängig davon ob dieser durch exogene oder endogene Mechanismen gesteigert wurde, zu keiner Reduktion des medullären Blutflusses der Niere führt (Badzyska et al., 2002).

Solche Messungen können jedoch nicht in vivo am Menschen durchgeführt werden.

Deshalb wurde unsere Studie durchgeführt, um zu ermitteln, ob physiologisch veränderte Konzentrationen von *endogenem* Angiotensin II die EPO-Sekretion beeinflussen und die renale Hämodynamik verändern könnten.

Die basalen EPO-Konzentrationen der vorliegenden Studie lagen bei allen Probanden in einem ähnlichen Bereich und zeigten eine weitestgehende Übereinstimmung mit den Werten früherer Studien (Gleiter et al., 1996 b; Gleiter et al., 1997 a, Freudenthaler et al., 1999 a; Freudenthaler et al., 2000).

Unser EPO-ELISA-Test, den wir in der Studie verwendeten, gibt für die Erythropoetinkonzentration einen Normalbereich von 4 – 25 mU ml⁻¹ an. Demnach lagen die Ausgangswerte von EPO mit 7,46 – 8,76 mU ml⁻¹ im erwarteten Bereich. Die Werte der Plasma-Renin-Aktivität (PRA) für gesunde Probanden in bequemer liegender Position (0,85 – 0,94 ng ml⁻¹ h⁻¹) stimmten mit denen aus der Literatur weitgehend überein (Karlberg und Tolagen, 1977). Auch die Ausgangswerte von Angiotensin II (4,66 –

5,58 pg ml⁻¹) befanden sich gemäß dem verwendeten Testverfahren bei entspannt auf dem Rücken liegenden Probanden im erwarteten Bereich. Die Glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und der renalen Plasmafluss (RPF) liegen normalerweise zwischen 80 – 140 ml/min pro 1,73 m² Körperoberfläche (KO) bzw. zwischen 480 – 800 ml/min pro 1,73 m² KO (Pummer, 1996). Bei normaler Ernährung pendelte die GFR um den Mittelwert von 86,85 ml/min pro 1,73 m² KO. Der RPF erreichte in der normalen Diätphase mit 428,07 ml/min pro 1,73 m² KO nicht ganz den angegebenen Normbereich, ist aber aufgrund der Probandenzahl von n = 12 als normal zu werten.

Im Rahmen der salzreichen Diätphase erreichte die Natriumkonzentration bei konstanter Salzeinnahme nach 7 Tagen ein Plateau. Im Vergleich zu den Werten in der Diätphase mit normaler Ernährung, stiegen wie erwartet die GFR auf 117 % und die RPF auf 123 % an. In Gegenüberstellung der Werte zu Beginn und zu Ende der salzreichen Diätphase sank dagegen die PRA bzw. das Angiotensin II auf 44 % bzw. 49 % ihrer Ausgangswerte ab.

Im Laufe der normalen Diätphase blieben die GFR, RPF, PRA und auch das Angiotensin II weitgehend unverändert.

Im Vergleich zur Diätphase mit normaler Ernährung sank die Natriumausscheidung im 24-Stunden-Sammelurin im Rahmen der salzarmen Diätphase erwartet deutlich auf 7,5 %. Im Gegensatz dazu stiegen im Verlauf der Diätphase die PRA auf 405 % und das Angiotensin II auf 311 % massiv an.

Die Studie zeigte, dass durch die unterschiedliche Salzkonzentration der Nahrung der EPO-Spiegel nicht signifikant verändert werden konnte.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass nur 10 % des gesamten EPO über die Niere ausgeschieden werden (Alexanian, 1969), erscheint es unwahrscheinlich, dass die Veränderungen der GFR zu einer signifikanten Erhöhung der EPO-Clearance führen können. Mit Untersuchungen und Studien, die am Menschen durchgeführt werden, kann man selbstverständlich nichts über die unterschiedlichen Variationen des intrarenalen Blutflusses aussagen. Über die Nieren hinaus lassen sich kaum Rückschlüsse über mögliche Reaktionen der EPO-Sekretion ziehen.

Schmid et al. untersuchten die Wirkung eines unterschiedlichen Salzgehaltes der Nahrung auf Angiotensin II-Typ1-Rezeptoren bei Ratten. Dazu führten sie den Tieren Nahrung mit drei verschiedenen Salzkonzentrationen (0,2 mg/g KG; 6 mg/g KG und 40 mg/g KG) zu. Diese Ernährung wurde über 5, 10 und 20 Tage durchgeführt. Im Laufe der Ernährungsphasen wurde regelmäßig die mRNA des AT₁-Rezeptors und der Subtypen AT_{1A}- und AT_{1B}-Rezeptor in der Leber, Lunge, Niere und Nebenniere bestimmt (Schmid et al., 1997). Dabei konnte gezeigt werden, dass salzreiche und normale Ernährung zu keiner Veränderung der Expression des AT₁-Rezeptors und der entsprechenden Subtypen führte. Jedoch führte die salzarme Ernährung in allen Organen zu einer Reduzierung AT_{1A}-Rezeptor mRNA mit einem Tiefpunkt zwischen Tag 5 und Tag 10 dieser Diätphase. Die Zahl an AT_{1B} mRNA blieb jedoch unverändert. Demzufolge scheint die salzarme Ernährung selektiv die Expression des AT_{1A}-Rezeptor Gens negativ zu beeinflussen. Allerdings ist wichtig zu erwähnen, dass im Rahmen dieser Studie nicht zwischen einzelnen anatomischen Strukturen der Organe unterschieden wurde,

sondern dass der absolute Effekt der Salzdiät auf die Zahl der verschiedenen AT-Rezeptor Subtypen im gesamten Parenchym gemessen wurde.

Sowohl die bereits in früheren klinischen Studien mit gesunden Probanden erzielten Ergebnisse, dass durch eine Angiotensin II-Infusion in Kombination mit dem selektiven AT_{1A}-Rezeptorblocker Losartan eine deutliche Veränderung in der EPO-Konzentration erreicht werden kann (Freudenthaler et al., 1999 b; Freudenthaler et al., 2000; Donnelly et al., 2001), als auch die Resultate von Schmid et al. könnten für die Interpretation der Ergebnisse unserer Studie mit Probanden von Bedeutung sein.

Möglicherweise führte unsere salzarme Diätphase über 7 Tage in den Nieren der Probanden zu einer Herunterregulierung der AT_{1A}-Rezeptor Subtypen. Dadurch wurde der erwartete Anstieg der Erythropoetinkonzentration, obwohl die Spiegel an endogenem Angiotensin II durch die salzarme Ernährung nahezu verdoppelt werden konnten, stark abgeschwächt oder sogar blockiert.

Naomi et al. unterzogen in ihrer Studie 14 Patienten mit essentieller Hypertonie für jeweils 7 Tage einer salzreichen Diätphase mit 342 mmol NaCl pro Tag und einer salzarmen Diätphase mit 34 mmol NaCl pro Tag. Nach Abschluss der Studie konnte gezeigt werden, dass unter salzreicher Ernährung (342 mmol NaCl/Tag für 7 Tage) die mittleren EPO-Konzentrationen nur schwach, um ca. 35 % anstiegen, während die

Hämoglobinkonzentrationen und der Hämatokrit sogar absanken (Naomi et al., 1993). Während der Diätphase mit salzreicher Ernährung wurden den Probanden in unserer Studie 100 mg NaCl/kg Körpergewicht verabreicht (dies entspricht 120 mmol NaCl pro Tag für eine 70 kg Person). Die Urinnatriumausscheidung über 24 Stunden lag bei den Probanden mit salzarmer Ernährung immer in derselben Größenordnung (13,3 mmol), während mit salzreicher Ernährung eine vergleichsweise deutlich erhöhte Ausscheidung erreicht wurde (382,42 mmol). Der geringere Anstieg der EPO-Konzentration während der salzreichen Ernährung wurde von Naomi et al. auf Hämodilution, die durch Wasser- und Salzretention entstanden ist, zurückgeführt. In Anbetracht unserer Ergebnisse sind deren Resultate schwer zu interpretieren. Insbesondere dadurch, dass diese Studie mit Patienten mit essentieller Hypertonie (aber normalem Serum-Kreatinin Werten) durchgeführt wurde, erscheint die Deutung umso schwieriger. Dadurch, dass den Patienten ihre antihypertensive Medikation im Verlauf dieser Studie nicht verabreicht wurde und der Einfluss eines unbehandelten arteriellen Hypertonus auf die Nierenhämodynamik bisher unklar ist, ist es besonders schwer die Resultate dieser Studie zu interpretieren und mit denen unserer Studie zu vergleichen.

Der Hämatokrit und das Hämoglobin wurden im Verlauf unserer Studie regelmäßig kontrolliert und es zeigten sich keine klinisch signifikanten Veränderungen. Diese Tatsache schließt die Möglichkeit des Einflusses großer Veränderungen der hämatologischen Parameter auf unser Studienresultat weitgehend aus.

Cole et al. zeigten, dass bei Mäusen, bei denen das Angiotensin-converting-enzyme (ACE) ausgeschaltet wurde und damit Angiotensin II in reduzierten Konzentrationen vorkommt, eine Anämie entsteht (Cole et al., 2000). Bei diesen Mäusen konnte nachgewiesen werden, dass die Plasma-EPO-Spiegel von $1,56 \pm 0,16 \text{ mU ml}^{-1}$ bis $2,71 \pm 0,29 \text{ mU ml}^{-1}$ insgesamt nur geringgradig erhöht sind. Die Streuung der Werte liegt aber noch im Rahmen des Normalbereiches.

Es könnte sogar die Möglichkeit bestehen, dass in dieser Studie der geringe Anstieg der EPO-Konzentrationen auf den nicht ausreichenden Anstieg des Angiotensin II-Spiegels zurückzuführen ist.

Die Ergebnisse von Cole widersprechen jedoch nicht der Annahme, dass das Angiotensin II die EPO-Sekretion beeinflusst. Vielmehr bestätigen sie die Erkenntnis, dass für die Bildung der Erythrozyten sowohl Erythropoetin, als auch Angiotensin II notwendig sind. So konnte 1997 anhand von Zellkulturen mit CD34+ hämatopoetischen Vorläuferzellen gezeigt werden, dass unter der Einwirkung von Erythropoetin in Kombination mit Angiotensin II eine Zunahme der Proliferation der Zellen zu beobachten war. Bei Zugabe von Losartan wurde dieser Effekt komplett antagonisiert (Mrug et al., 1997).

In einer späteren Studie wurde die Notwendigkeit von Angiotensin II bei der Bildung der Erythrozyten nochmals etwas genauer untersucht.

Dazu wurden aus der thorakalen Aorta 6-wochen alter Ratten durch enzymatische Spaltung glatte Muskelzellen der Gefäßwand gewonnen. Mit Hilfe der aus diesen Zellen gewonnen Kulturen konnte gezeigt

werden, dass Angiotensin II unter Normoxie in Zellkulturen den HIF1-Transkriptionsfaktor induziert. Die Konzentration des Faktors konnte so gesteigert werden, dass sie über der bei alleiniger Hypoxie lag (Richard et al., 2000).

Es kann nur darüber spekuliert werden, in wieweit die Ergebnisse dieser Studie auch auf den menschlichen Organismus übertragbar sind.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass unter dem gewählten Studiendesign mit gesunden Probanden endogen produziertes Angiotensin II nicht signifikant zur physiologischen Regulation der Produktion von Erythropoetin beiträgt. Allerdings besteht durchaus die Möglichkeit, dass unter bestimmten klinischen Bedingungen oder Umständen ein Zusammenspiel von verschiedenen Faktoren zu einem deutlicheren Effekt des Angiotensin II auf die EPO-Regulation führen könnte. Wahrscheinlich ließe sich dieser Effekt dann eher auf der lokalen, als auf der systemischen Ebene beobachten.

6 Zusammenfassung

Neuere Forschungsergebnisse zeigen, dass Angiotensin II eine wichtige Rolle in der physiologischen Regulation der Erythropoetinkonzentration spielt. Bisher wurde durch die Gabe von *exogenem* Angiotensin II die Wirkung dieser Substanz untersucht. Die Funktion und Wirkung von *endogen* produziertem Angiotensin II wurde aber bisher nicht geklärt.

Um die *endogene* Angiotensin II-Konzentration zu beeinflussen, nutzen wir in unserer Studie unterschiedliche Salzdiäten. In einem offenen cross-over Design erhielten 12 männliche Probanden jeweils über 7 Tage randomisiert salzreiche, salzarme oder normale Kost. Über die gesamte Dauer der Studie wurde die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) und die Angiotensin II-Konzentration gemessen. Jeweils am letzten Tag der Diätphase wurde eine Inulin- und PAH-Clearance zur Bestimmung der GFR und des RPF durchgeführt.

In der Diätphase mit salzarmer Ernährung konnte eine signifikante Steigerung des Angiotensin II auf 311 % und der PRA auf 405 % erreicht werden, während am Ende der salzreichen Diätphase sowohl Angiotensin II auf 49 %, als auch PRA auf 44 % der Ausgangswerte signifikant absanken. Demgegenüber stiegen die GFR und der RPF während der salzreichen Ernährung auf 117 % bzw. 123 % an. Bei den EPO-Konzentrationen konnte keine signifikante Änderung beobachtet werden. Abschließend lässt sich festhalten, dass, nach unseren Ergebnissen, erhöhte Angiotensin II-Konzentrationen bei gesunden Probanden keine

entscheidende Rolle bei der Regulation der Erythropoetinproduktion zu haben scheinen.

Die Resultate dieser Studie wurden bereits in *Kidney & Blood Pressure Research* veröffentlicht (Freudenthaler et al., 2001) und im *British Journal of Clinical Pharmacology* publiziert (Freudenthaler et al., 2003).

7 Literaturverzeichnis

Alexanian, R. (1969)

Correlations between erythropoietin production and excretion.

J.Lab.Clin.Med. 74, 614 – 622

Badzyska, B., Grzelec-Mojzesowicz, M., Dobrowolski, L., Sadowski, J. (2002)

Differential effect of angiotensin II on blood circulation in the renal medulla and cortex of anaesthetised rats

J.Physiol. 538, 159 – 166

Brown, JJ., Lever, AF., Morton, JJ., Fraser, R., Love, DR., Robertson, JI. (1972)

Raised plasma angiotensin II and aldosterone during dietary sodium restriction in man.

Lancet, 25, 1106 – 1107

Chong, ZZ., Kang, JQ., Maiese, K. (2002)

Angiogenesis and plasticity: Role of erythropoietin in vascular systems

J.Hematother.Stem.Cell.Res. 11, 863 – 871

Cole, J., Ertoy, D., Lin, H., Sutliff, RL., Ezan, E., Guyene, TT., Capecchi, M., Corvol, P., Bernstein, KE. (2000)

Lack of angiotensin II-facilitated erythropoiesis causes anemia in angiotensin-converting enzyme-deficient mice.

J.Clin.Invest. 106, 1391 – 1398

Donnelly, S., Shah, BR. (1999)

Erythropoietin deficiency in hyporeninemia

Am.J.Kidney Dis. 33, 947 – 953

Donnelly, SM., Miller, JA. (2001)

Losartan may modulate erythropoietin production

J.Renin Angiotensin Aldosterone Syst. 2, 255 – 260

Du Bois, Du Bois. (1916)
Arch.Int.Med. 17, 863

Eckardt, KU., Pugh, CW., Ratcliffe, PJ., Kurtz, A. (1993)
Oxygen-dependent expression of the erythropoietin gene in rat hepatocytes in vitro.
Pflugers Arch. 423, 356 – 364

Eckardt, KU., Boutellier, U., Kurtz, A., Schopen, M., Koller, EA., Bauer, C. (1989)
Rate of erythropoietin formation in humans in response to acute hypobaric hypoxia.
J.Appl.Physiol. 66, 1785 – 1788

Fink, GD., Fisher, JW. (1977 a)
Stimulation of erythropoiesis by beta adrenergic agonists.
II Mechanism of action
J.Pharmacol.Exp.Ther. 202, 199 – 208

Fink, GD., Fisher, JW (1977 b)
Stimulation of erythropoiesis by beta adrenergic agonists.
I Characterization of activity in polycythemic mice
J.Pharmacol.Exp.Ther. 202, 192 – 198

Fisher, JW. (2003)
Erythropoietin: Physiology and pharmacology update
Exp.Bio.Med. 228, 1 – 14

Fisher, JW., Samuels, Al., Langston, JW. (1967)
Effects of angiotensin and renal artery constriction on erythropoietin production
J.Pharmacol.Exp.Ther. 157, 618 – 625

Freudenthaler, S., Benöhr, P., Grenz, A., Selzer, T., Schmidt, T., Mörike, K., Osswald, H., Gleiter, CH. (2003)
Do alterations of endogenous angiotensin II levels regulate erythropoietin production in humans?
Br.J.Clin.Pharmacol. 56, 378 – 387

Freudenthaler, S., Benöhr, P., Grenz, A., Schmidt, T., Osswald, H., Gleiter, CH. (2001)

Influence of Sodium Diet on Human Erythropoietin Secretion
Kidney Blood Press.Res. 24, 356

Freudenthaler, SM., Schreeb, KH., Wiese, A., Pilz, J., Gleiter, CH (2002)

Influence of controlled hypoxia and radical scavenging agents on erythropoietin and malondialdehyde concentrations in humans
Acta Physiol.Scand. 174, 231 – 235

Freudenthaler, SM., Lucht, I., Schenk, T., Brink, M., Gleiter, CH. (2000)

Dose-dependent effect of angiotensin II on human erythropoietin production
Pflugers Arch. 439, 838 – 844

Freudenthaler, SM., Schenck, T., Lucht, I., Gleiter, CH. (1999 a)

Fenoterol stimulates human erythropoietin production via activation of the renin angiotensin system
Br.J.Clin.Pharmacol. 48, 631 – 634

Freudenthaler, SM., Schreeb, K., Korner, T., Gleiter, CH. (1999 b)

Angiotensin II increases erythropoietin production in healthy human volunteers.
Eur.J.Clin.Invest. 29, 816 – 823

Gleiter, CH., Schreeb, KH., Goldbach, S., Herzog, S., Cunze, T., Kuhn, W. (1998)

Fenoterol increases erythropoietin concentrations during tocolysis
Br.J.Clin.Pharmacol. 45, 157 – 159

Gleiter, CH., Becker, T., Wenzel, J. (1997 a)

Erythropoietin production in healthy volunteers subjected to controlled hypobaric hypoxia: Further evidence against a role for adenosine
Br.J.Clin.Pharmacol. 44, 203 – 205

Gleiter CH., Brause M., Delabar U., Zebski H., Eckardt KU. (1997 b)
Evidence against a major role of adenosine in oxygen-dependent
regulation of erythropoietin in rats.
Kidney Int. 52, 338 – 344

Gleiter, CH., Becker, T., Schreeb, KH., Freudenthaler, S., Gundert-
Remy, U. (1997 c)
Fenoterol but not dobutamine increases erythropoietin production in
humans
Clin.Pharmacol.Ther. 61, 669 – 676

Gleiter, CH., Freudenthaler, S., Delabar, U., Eckardt, KU.,
Muhlbauer, B., Gundert-Remy, U., Osswald, H. (1996 a)
Erythropoietin production in healthy volunteers subjected to controlled
haemorrhage: Evidence against a major role for adenosine
Br.J.Clin.Pharmacol. 42, 729 – 735

Gleiter, CH. (1996 b)
Posttransplant erythrocytosis: a model for the investigation of the
pharmacological control of renal erythropoietin production?
Int.J.Clin.Pharmacol.Ther. 34, 489 – 492

Goldberg, MA., Dunning, SP., Bunn, HF. (1988)
Regulation of the erythropoietin gene: Evidence that the oxygen sensor is
a heme protein.
Science, 242, 1412 – 1415

Goodfriend, TL., Elliot, ME., Catt, KJ. (1996)
Angiotensin receptors and their antagonists.
N.Engl.J.Med. 334, 1649 – 1654

Gossmann, J., Burkhardt, R., Harder, S., Lenz, T., Sedlmeyer, A.,
Klinkhardt, U., Geiger, H., Scheuermann, EH. (2001)
Angiotensin II infusion increases plasma erythropoietin levels via an
angiotensin II type 1 receptor-dependent pathway.
Kidney Int. 60, 83 – 86

Gould, AB., Goodman, S., DeWolf, R., Onesti, G., Swartz, C. (1980)
Interrelation of the renin system and erythropoietin in rats.

J.Lab.Clin.Med. 96, 523 – 534

Griffing, GT., Melby, JC. (1982)

Enalapril (Mk-421) and the white cell count and hematokrit.

Lancet, 12, 1361

Herkens, C., Wolff, M., Fandrey, J., Schuler, F., Jelkmann, W.
(1993)

Immunocytochemical demonstration of erythropoietin in hypoxic human
hepatoma cultures.

Histochemistry, 100, 303 – 309

Hofer, T., Wenger, RH., Gassmann, M. (2002)

Oxygen sensing, HIF-1alpha stabilization and potential therapeutic
strategies

Eur.J.Physiol. 443, 503 – 507

Jelkmann, W., Metzen, E. (1996)

Erythropoietin in the control of red cell production

Ann.Anat. 178, 391 – 403

Jelkmann, W. (1992)

Erythropoietin: Structure, control of production, and function.

Physiol.Rev. 72, 449 – 489

Jilma, B., Krejcy, K., Dirnberger, E., Eichler, HG., Kapiotis, S.,
Dorner, GT., Wagner, OF. (1997)

Effects of angiotensin II infusion at pressor and subpressor doses on
endothelin-1 plasma levels in healthy men.

Life Sci. 60, 1859 – 1866

Karlberg, BE., Tolagen, K. (1977)

Relationship between blood pressure, age, plasmarenin activity and
electrolyte excretion in normotensive rats

Scand.J.Clin.Lab.Invest. 37, 521 – 528

- Klaassen, R.J., van Gelder, T., Rischen-Vos, J., Deinum, J., Man in't Veld, A.J., Weima, W. (1997)
Losartan, an angiotensin-II receptor antagonist, reduces hematocrits in kidney transplant recipients with posttransplant erythrocytosis
Transplantation, 64, 780 – 782
- Matsumura, M., Nomura, H., Koni, I., Mabuchi, H. (1997)
Angiotensin-converting enzyme inhibitors are associated with the need for increased recombinant human erythropoietin maintenance in hemodialysis patients.
Nephron, 77, 164 – 168
- Maxwell, P.H., Ferguson, D.J.P., Nicholls, L.G., Iredale, J.P., Pugh, C.W., Johnson, M.H., Ratcliffe, P.J. (1997)
Sites of erythropoietin production
Kidney Int. 51, 393 – 401
- Mrug, M., Stopka, T., Julian, B.A., Prchal, J.F., Prchal, J.T. (1997)
Angiotensin II stimulates proliferation of normal early erythroid progenitors.
J.Clin.Invest. 100, 2310 – 2314
- Naomi, S., Umeda, T., Iwaoka, T., Yamauchi, J., Ideguchi, Y., Fujimoto, Y., Tokunaga, H., Sato, T. (1993)
Endogenous erythropoietin and salt sensitivity of blood press in patients with essential hypertension.
Am.J.Hypertens. 6, 15 – 20
- Perazella, M., McPhedran, P., Kliger, A., Lorber, M., Levy, E., Bia, M.J. (1995)
Enalapril treatment of posttransplant erythrocytosis: efficacy independent of circulating erythropoietin levels
Am.J.Kidney Dis. 26, 495 – 500
- Perazella, M.A., Bia, M.J. (1992)
Posttransplant erythrocytosis: Case report and review of newer treatment modalities.
J.Am.Soc.Nephrol. 3, 1653 – 1659
-

Plata, R., Cornejo, A., Arratia, C., Anabaya, A., Perna, A., Dimitrov, BD., Remuzzi, G., Ruggenenti, P., Commission on Global Advancement of Nephrology (COMGAN), Research Subcommittee of the International Society of Nephrology (2002)
Angiotensin-converting-enzyme inhibition therapy in altitude polycythaemia: a prospective randomised trial.
Lancet, 359, 663 – 666

Pratt, MC., Barned, L., Walker, RJ., Bailey, RR., Shand, Bl., Livesey, J. (1992)
Effect of angiotensin converting enzyme inhibitors on erythropoietin concentrations in healthy volunteers.
Br.J.Clin.Pharmacol. 34, 363 – 365

Pummer, S. (1996)
Normalwerte, 745 – 748
in: Klinke, R., Silbernagl, S.: Lehrbuch der Physiologie;
2.Aufl., Thieme, Stuttgart

Ratcliffe, PJ. (2002)
From erythropoietin to oxygen: Hypoxia-inducible factor hydroxylases and the hypoxia signal pathway
Blood Purif. 20, 445 – 450

Richard, DE., Berras, E., Pouysségur, J. (2000)
Nonhypoxic pathway mediates the induction of hypoxia-inducible factor 1 in vascular smooth muscle cells.
J.Biol.Chem. 275, 26765 – 26771

Sasaki, R. (2003)
Pleiotropic functions of erythropoietin
Intern.Med. 42, 142 – 149

Schmid, C., Castrop, H., Reitbauer, J., Della Bruna, R., Kurtz, A. (1997)
Dietary salt intake modulates angiotensin II type 1 receptor gene expression.
Hypertension, 29, 923 – 929

Smith, KJ., Bleyer, AJ., Little, WC., Sane, DC. (2003)

The cardiovascular effects of erythropoietin

Cardiovasc.Res. 59, 538 – 548

Torregrosa, JV., Campistol, JM., Montesinos, M., Rogada, AG., Oppenheimer, F., Andreu, J. (1994)

Efficacy of captopril on posttransplant erythrocytosis. Long-term follow-up.

Transplantation, 58, 311 – 314

Ueno, M., Brookins, J., Beckman, B., Fisher, JW. (1988)

A1 and A2 adenosine receptor regulation of erythropoietin production

Life Sci. 43, 229 – 237

Vlahakos, DV., Marathias, KP., Kosmas, EN. (2001)

Losartan reduces hematocrit in patients with chronic obstructive pulmonary disease and secondary erythrocytosis

Ann.Intern.Med. 134, 426 – 427

Vlahakos, DV., Balodimos, C., Papachristopoulos, V., Vassilakos, P., Hinari, E., Vlachjannis, JG. (1995)

Renin-angiotensin system stimulates erythropoietin secretion in chronic hemodialysis patients.

Clin.Nephrol. 43, 53 – 59

Vlahakos, DV., Kosmas, EN., Dimopoulou, I., Ikonomidou, E., Jullien, G., Vassilakos, P., Marathias, KP. (1999)

Association between activation of the renin-angiotensin system and the secondary erythrocytosis in patients with chronic obstructive pulmonary disease.

Am.J.Med. 106, 158 – 164

Wang, AY., Yu, AW., Lam, CW., Yu, LM., Li, PK., Goh, J., Lui, SF. (2002)

Effects of losartan or enalapril on hemoglobin, circulating erythropoietin, and insulin-like growth factor-1 in patients with and without posttransplant erythrocytosis.

Am.J.Kidney Dis. 39, 600 – 608

Wang, GL., Semenza, GL. (1995)
Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1
J.Biol.Chem. 270, 1230 – 1237

8 Anhang

8.1 Danksagung

Herrn **Professor Dr. C. H. Gleiter** danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Beratung, das rege Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Dr. S. Freudenthaler** für die Betreuung, Mithilfe und Unterstützung während der gesamten experimentellen Phase der Studie.

Desweiteren danke ich **Frau Dr. A. Grenz, Herrn Dr. P. Benöhr** und **Frau B. Proksch** für die Beratung und Mithilfe bei der Auswertung der Proben.

Ebenfalls danken möchte ich **Herrn PD Dr. K. Mörike** für die Einführung in die Handhabung der Software und die Unterstützung bei der Anfertigung der Grafiken.

Ein besonderer Dank geht an all' die Menschen, die durch ihre Bereitschaft sich als Proband zur Verfügung zu stellen, die Durchführung dieser Studie überhaupt erst ermöglichten.

Meinen Eltern und Geschwistern danke ich von ganzem Herzen für die Liebe und Geduld, mit der sie mich während meines Studiums begleitet haben.

Meiner Frau Ilona, die gute und schlechte Tage in Liebe und Verständnis mit mir geteilt hat.

8.2 Lebenslauf

Persönliche Daten :

Name : Schmidt
Vorname : Thomas Herbert
Geburtsdatum/-ort : 13.05.1975, Stuttgart
Familienstand : verheiratet
Eltern: Herbert und Monika Schmidt

Schulbildung :

08/1981 – 06/1986 Reisachschule Stuttgart Weilimdorf
08/1986 – 06/1993 Gymnasium Neckartenzlingen
08/1993 – 06/1995 Hölderlingymnasium Nürtingen

Hochschulbildung :

04/1997 – 05/2004 Medizinstudium an der Universität Tübingen
09/1999 Ärztliche Vorprüfung
09/2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
04/2003 – 03/2004 Praktisches Jahr
UniversitätsSpital Zürich (Chirurgie)
Städtisches Krankenhaus Sindelfingen
(Orthopädie, Innere Medizin)
05.05.2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung