

**Aus der Abteilung Pharmakologie
(Prof. Dr. med. J. Brockmöller)
im Zentrum Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

Einfluss des Renin-Angiotensin-Systems auf die menschliche
Erythropoetinproduktion unter normoxischen Bedingungen
und nach Stimulation durch Fenoterol

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von
Tim Philip Schenck

aus
Wuppertal

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. J. Brockmüller

II. Berichterstatter / in: Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

III. Berichterstatter / in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 09.11.2010

1. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	4
2. ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	6
3. TABELLENVERZEICHNIS	6
4. EINLEITUNG.....	7
5. MATERIAL UND METHODEN.....	12
5.1 Probandenkollektiv	12
5.1.1 Studieneinschlusskriterien.....	12
5.1.2 Studienausschlusskriterien	12
5.2 Durchführung der Studie.....	13
5.2.1 Studiendesign.....	13
5.2.2 Prüfmedikation und Studienmedikation	13
5.2.3 Bewertung der Studienmedikation.....	16
5.3 Studiendurchführung.....	17
5.3.1 Dosierung.....	17
5.3.2 Voruntersuchung	18
5.3.3 Studientag.....	18
5.3.4 Die Behandlung der Blutproben.....	21
5.4 Biochemische Analysen	22
5.4.1 Bestimmung der Erythropoetinkonzentration	22
5.4.2 Bestimmung der Angiotensin - II - Konzentration	23
5.4.3 Bestimmung der Plasmareninaktivität.....	23
5.4.4 Sammelurin.....	24
5.4.5 Parameter des Blutdruckes und Herzfrequenz.....	24
5.5 Statistik.....	25
5.5.1 Größe der einzelnen Gruppen.....	25
5.5.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse	25
5.5.3 Berechnungen	26
6. ERGEBNISSE	27
6.1 Erythropoetin	27

6.2 Parameter des Blutdruckes und Herzfrequenz	30
6.2.1 Herzfrequenz.....	30
6.2.2. Mittlerer arterieller Druck	31
6.2.3. Systolischer Blutdruck.....	32
6.2.4. Diastolischer Blutdruck.....	33
6.3 Natriumausscheidungsfraktion	34
6.4 Kreatininclearance	35
6.5 Serumkalium-Werte.....	36
6.6 Angiotensin - II - Konzentration	37
6.7 Plasmareninaktivität.....	38
7. DISKUSSION UND BETRACHTUNG DER ERHOBENEN PARAMETER	40
7.1 Herzfrequenz, mittlerer arterieller Druck und andere Parameter des Blutdruckes	40
7.2 Natriumausscheidungsfraktion (F_{Na}).....	41
7.3 Kreatininclearance	41
7.4 Serumkalium-Konzentration	42
7.5 Plasmareninaktivität.....	42
7.6 Angiotensin II.....	43
7.7 Erythropoetin	44
8. SCHLUSSBETRACHTUNG	45
9. ZUSAMMENFASSUNG	47
10. ANHANG	48
10.1 Demographische Daten der Probanden.....	48
10.2 Angiotensin - II - Konzentration %.....	49
10.3 Herzfrequenz [Minute].....	49
10.4 Blutdruck systolisch [mmHg]	50

10.5 Blutdruck diastolisch [mmHg]	50
10.6 Mittlerer Arterieller Druck [mmHg]	51
10.7 Serumkalium [Milligramm/Deziliter]	51
10.8 Plasmapreninaktivität % Verlauf	52
10.9 Erythropoetinkonzentration % Verlauf	52
ANLAGE 1	53
Ausführliche Darstellung der Historie und der bekannten Wirkungsmechanismen des Erythropoetins	53
Hypothesen zur Regulation der EPO-Produktion	55
ANLAGE 2	59
Beschreibung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und des Angiotensin - II ₁ - Rezeptors ...	59
9. LITERATUR	60

1. Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin converting enzyme
ANOVA	Analysis of variance
aPTT	partielle Thromboplastinzeit
AS	Aminosäure
AT	Angiotensin
AT II	Angiotensin II
AT-II ₁ -Rezeptor	Angiotensin-II-Rezeptor-Subtyp 1
AUC	Area under the curve
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate
CHO-Zellen	Ovarialzellen des chinesischen Hamsters
Cl _{Krea}	Kreatininclearance
COS-1- Zellen	Nierenzellen des „african green monkey“
EDTA	Ethylen- Diamin-Tetra-Acetat
EPO	Erythropoetin
F _{Na}	Natriumausscheidungsfraktion
γ-GT	γ-Glutamyltranspeptidase
GFR	Glomeruläre Filtrationsrate
HBs-Antigen	Hepatitis B surface Antigen
HCV	Hepatitis-C-Virus
HF	Herzfrequenz
HIF 1	Hypoxia inducible factor
HIV	human immuno deficiency virus
JAK 2	Januskinase 2
KDa	Kilodalton
KO	Körperoberfläche
LDHA	Lactatdehydrogenase A
L. / Losa.	Losartan
MAD	mittlerer arterieller Druck
mmol	Millimol
mRNA	messenger ribonucleic acid
mU	milliunits
NNR	Nebennierenrinde

O ₂	Sauerstoff
PCR	Polymerase chain reaction
PGA ₂	Prostaglandin A ₂
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
P _{Krea}	Kreatininkonzentration im Plasma
P _{Na}	Natriumkonzentration im Plasma
PRA	Plasma-Renin-Aktivität
RAS	Renin-Angiotensin-System
RBF	renaler Blutfluss
rhEPO	rekombinantes humanes Erythropoetin
RIA	Radioimmuno-Assay
RR	Blutdruck nach Riva-Rocci
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
S _{Krea}	Kreatininkonzentration im Serum
STAT 5	signal transducers and activators of transcription
t ½	Halbwertszeit
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Tetraiodthyronin
Tbc	Tuberkulose
TG	Triglyceride
TZ	Thrombinzeit
U _{Krea}	Kreatininkonzentration im Urin
U/min.	Umdrehungen pro Minute
U _{Na}	Natriumkonzentration im Urin
üNN	über Normal Null
VEGF	vasal endothelial growth factor
V _{Urin}	Urinvolumen
ZNS	Zentrales Nervensystem

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der „EPO-Produktion“	10
Abbildung 2: Studienablauf.....	20
Abbildung 3: Verlauf der EPO-Konzentration in Prozent des Ausgangswertes	27
Abbildung 4: Erythropoetin-AUC _(0-24, 0-48 und 0-72h)	28
Abbildung 5: Herzfrequenz	30
Abbildung 6: mittlerer arterieller Blutdruck.....	31
Abbildung 7: systolischer Blutdruck	32
Abbildung 8: diastolischer Blutdruck.....	33
Abbildung 9: Verlauf der Kalium-Konzentration im Serum.....	36
Abbildung 10: Verlauf der AT - II - Konzentration	37
Abbildung 11: Verlauf der Plasminogenaktivität in % des Ausgangswertes	38
Abbildung 12: Plasminogenaktivität-AUC _(0-12h)	39

3. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Blutentnahmezeitpunkte.....	21
Tabelle 2: Erythropoetin-AUC (0-24, 0-48 und 0-72h)	28
Tabelle 3: Natriumausscheidungsfraktion.....	34
Tabelle 4: Kreatininclearance vor und nach Medikation	35
Tabelle 5: Historie der Erythropoetinforschung.....	53

4. Einleitung

Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoprotein (165 AS) mit einem Molekulargewicht von 30,4kDa, welches im Organismus die Produktion und Differenzierung der Erythrozyten aus den Stammzellen im Knochenmark maßgeblich beeinflusst.

Die Produktionsrate von Erythropoetin korreliert umgekehrt zum Sauerstoffangebot des Organismus, so dass sie bei Hypoxie sogar bis auf das 1000-fache gesteigert werden kann (Halvorsen et al. 1968).

Für die Aufrechterhaltung eines konstanten Sauerstoffangebotes im Organismus ist diese Regulierung essenziell.

Zur Geschichte der Erforschung des Erythropoetin und dessen Wirkungsmechanismus sei auf Tabelle 4 (Anlage 1) verwiesen.

Seit 1985 ist die Sequenz des EPO-Gens bekannt: Jacobs et al. gelang es, EPO in COS-1-Zellen herzustellen. Lin et al. verwendeten hierzu CHO-Zellen. Heute sind CHO-Zellen Ausgangsort für die gentechnische Produktion von Erythropoetin, wobei die CHO-Zellen wie der menschliche Organismus die EPO-Proteine glykosilieren und obendrein die Produktion von EPO im CHO-Zellklon durch PCR amplifiziert werden kann (cloning) (Lin et al. 1985; Jacobs et al. 1985; Fisher 1997).

Der Produktionsort von EPO:

Zanjani et al. zeigten, dass die Leber im Fetus der Hauptproduktionsort für Erythropoetin ist. Das Umschalten der fetalen EPO-Produktion zur adulten Produktion in der Niere vollzieht sich etwa ab dem 120. Tag post gestationem und ist etwa am 40. Tag nach der Geburt beendet (Zanjani et al. 1981). An Hand des Nachweises von geringeren Mengen EPO-mRNA in der Leber und des vermehrtem Nachweises in der Niere wurde gezeigt, dass die Erythropoetinbildung beim Erwachsenen annähernd zu 99% von der Niere übernommen wird (La Combe et al. 1988; Koury und Bondurant 1988). Bachmann et al. identifizierten 1993 die EPO-produzierenden peritubulären Zellen im renalen Kortex als Fibroblasten (Bachmann et al. 1993).

Eine inadäquate EPO-Produktion führt zur Anämie (z.B. bei chronischer Niereninsuffizienz) oder zur Polyglobulie (z.B. bei Nierenzelltumoren oder Leberzellkarzinomen) (Fukushima et al. 1986; Chandra et al. 1988; Kazal und Erslev 1975; Kew und Fisher 1986).

Einen therapeutischen Nutzen hat demnach eine mögliche Stimulation der EPO-Produktion im Rahmen einer Anämie-Behandlung oder eine Blockade im Rahmen einer Polyglobulietherapie.

Fragestellung der Studie

Die Fragestellung der Untersuchung ist, auf welchem Wege die EPO-Produktion nach Stimulation des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) in der Niere erfolgt.

Das RAS ist ein sehr wirksames Instrument des Organismus, die Na^+ -Ausscheidung und den Blutdruck zu beeinflussen. Aus Angiotensinogen (Bildung in der Leber) wird unter dem Einfluss von Renin (Bildung in der Macula densa, Niere, v. a. abhängig von der Na^+ -Konzentration im Blutplasma und vom Blutdruck) Angiotensin I, aus welchem mit Hilfe des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) durch Abspaltung von zwei weiteren Aminosäuren (AS) Angiotensin II gebildet wird. Schließlich wird mittels Angiotensin II die Ausschüttung von Aldosteron aus der Neben-Nieren-Rinde (NNR) gesteuert.

Angiotensin II wirkt über eine direkte Stimulation seiner Rezeptoren an den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen. Hier wird über eine intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentrations-Erhöhung und Aktivierung der Proteinkinase C eine Vasokonstriktion ausgelöst (Fischer et al. 1994). Weitere Einzelheiten zum RAS finden sich in Anlage 2.

Viele Ergebnisse aus experimentellen und tierexperimentellen in-vitro-Versuchen sprechen dafür, dass das RAS mit seinen Komponenten einen wichtigen Einfluss auf die renale EPO-Produktion hat (Fisher et al. 1967; Gleiter et al. 1996).

In bisherigen Untersuchungen zur Erforschung der Mechanismen der EPO-Produktion wurde unter anderem auch ein kontrollierter Aderlass (mit nachfolgendem O_2 -Trägermangel) als Stimulus für die EPO-Produktion eingesetzt (Gleiter et al. 1997b). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass das sympathoadrenerge System mit seinen Komponenten in die EPO-Produktion involviert ist. Es zeigte sich, dass die Gabe von Theophyllin zu einer Steigerung der EPO-Produktion führte (Gleiter et al. 1996).

Andere Untersuchungen mit Gabe von Fenoterol in Tokolyse-Dosis zeigten ebenfalls einen Anstieg der EPO-Produktionsrate (Gleiter et al. 1998).

Dies führte zu der Hypothese, dass eine β_2 -adrenerge Stimulation, auch durch diese Medikamente, über eine Aktivierung des RAS zu einer vermehrten EPO-Produktion führt.

Auf welchem Wege erfolgt nun die EPO-Produktion nach Stimulation des RAS in der Niere ?

Eine β -adrenerge Stimulation führt allgemein zur Aktivierung des RAS.

In Folge der β -adrenergen Stimulation und einer Erhöhung des Sympathikotonus als Wirkung des Fenoterols kommt es durch Aktivierung des RAS dosisabhängig zu einem Blutdruckanstieg und einer vermehrten Vasokonstriktion. Hierdurch wird die renale Perfusion vermindert und somit die intrarenale O_2 -Spannung herabgesetzt, so dass dadurch die Erythropoetin-Produktion und der Serumanstieg erfolgen könnten.

Angiotensin II wirkt aber anscheinend auch direkt über den AT-1-Rezeptor der Fibroblasten in der renalen Kortex und könnte so direkt zu einer gesteigerten EPO-Produktion führen. Angiotensin wäre dann das Endglied im Renin-Angiotensin-System als „Schlüsseltransmitter“.

Bei zusätzlicher Gabe des selektiven AT-II₁-Rezeptorantagonisten Losartan dürfte dann durch die Blockade der Rezeptoren auf den Fibroblasten keine Steigerung des Serum-EPO's auftreten.

Folgende Möglichkeiten sind denkbar:

1. Angiotensin II reduziert die renale Perfusion und vermindert somit die intrarenale O_2 -Spannung mit nachfolgendem Anstieg der Epoproduktion.
2. Angiotensin II wirkt über direkte Stimulation der AT-II₁-Rezeptoren auf die EPO-produzierenden Fibroblasten peritubulär im Kortex der Niere.

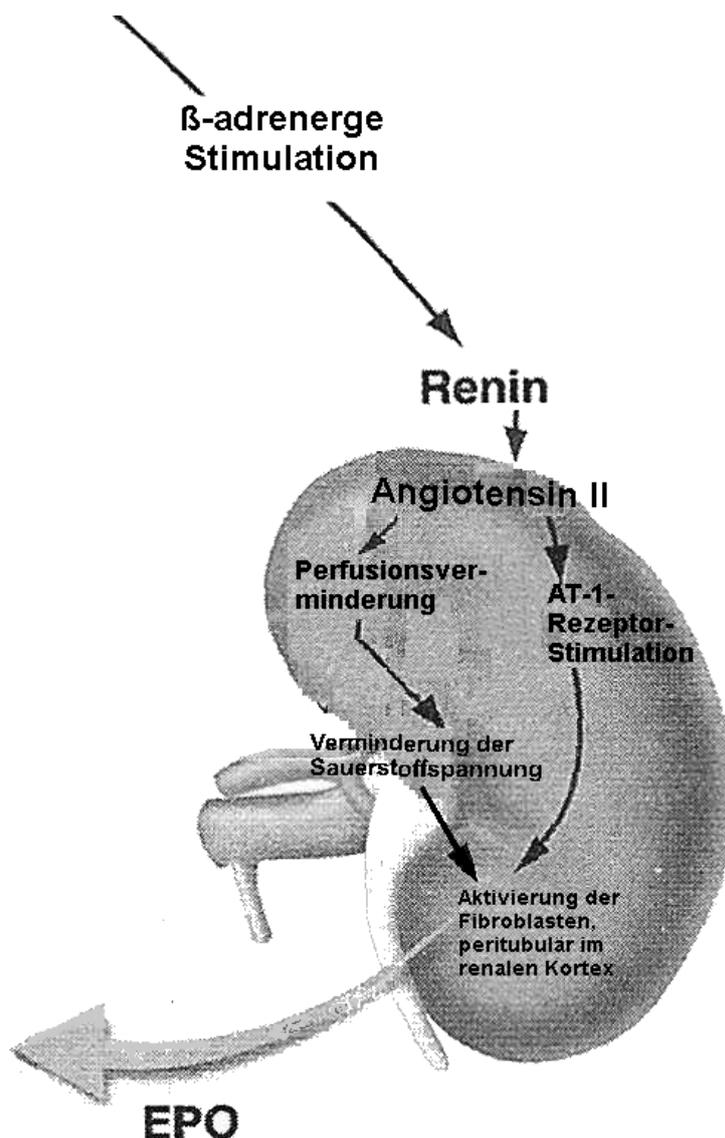


Abbildung 1: Schema der „EPO-Produktion“

Die Abbildung 1 soll die beiden denkbaren Verknüpfungen des RAS mit der EPO-Produktion verdeutlichen.

Im Rahmen dieser Studie wurde nun der Einfluss von Fenoterol als β_2 -Sympathomimetikum allein und in einer Kombination mit dem selektiven, kompetitiven AT-II₁-Rezeptor-Antagonist Losartan, ohne Aderlass und unter normoxischen Bedingungen (21% O₂), untersucht.

Diese systematische humanpharmakologische Studie sollte zeigen, dass Fenoterol als β -Sympathomimetikum das RAS stimuliert und Angiotensin II als Vermittler der EPO-Produktion fungiert, während eine gleichzeitige Blockade des AT-II₁-Rezeptors einen Anstieg der Produktion und damit der EPO-Konzentration im Serum verhindert.

Primärer Zielparameter war die Erythropetinkonzentration im Serum der Probanden.

Die sekundären Zielparameter waren Parameter des Herz-Kreislaufsystems (systolischer und diastolischer Blutdruck, MAD, Herzfrequenz) und laborchemisch bestimmte Parameter (Plasmareninaktivität, AT-II-Konzentration, Serumkalium-Werte, Kreatininclearance und Natriumausscheidungsfraktion). Die Auswertung dieser Parameter sollte bei gleichbleibendem Blutdruck eine Differenzierung zwischen einer RAS-Stimulation und Angiotensin-II-Bildung und einer AT-II₁-Rezeptorblockade (unter Vernachlässigung von Blutdruckschwankungen und o.g. Vasokonstriktion mit deren Folgen) ermöglichen.

5. Material und Methoden

Die Ethik-Kommission der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen hat das Studienprotokoll dieser Studie positiv beurteilt (Antragsnummer 9/11/97).

Alle Probanden wurden mündlich und schriftlich umfassend aufgeklärt und zeigten sich schriftlich mit den Studienbedingungen einverstanden.

5.1 Probandenkollektiv

Es wurden drei Gruppen von männlichen, nicht rauchenden Probanden gebildet.

Die Gruppengrößen variierten zwischen 11 und 12 Personen.

Das durchschnittliche Lebensalter der in die Studie eingeschlossenen Probanden betrug $24,54 \pm 0,74$ Jahre (Bandbreite: 18 - 30 Jahre), das durchschnittliche Körpergewicht $76,55$ Kilogramm $\pm 3,25$ Kilogramm (Bandbreite: 65 - 95 Kilogramm).

5.1.1 Studieneinschlusskriterien

- Alter zwischen 18 und 30 Jahren-männlich.
- Nichtraucher.
- Normalgewicht $\pm 25\%$ (nach Broca-Index).
- keine Erkrankungen wichtiger Organsysteme, insbesondere der renalen, kardiovaskulären, hämatopoetischen und zentralnervösen Systeme.

5.1.2 Studienausschlusskriterien

- Erkrankungen wichtiger Organsysteme, insbesondere der renalen, kardiovaskulären, hämatopoetischen und zentralnervösen Systeme.
- Hämoglobinkonzentrationen $< 14\text{g/dl}$.
- Blutspende innerhalb der letzten 3 Monate vor Beginn der Studie.
- Aufenthalt in Höhen über 1000m üNN, sowie Flugreisen im letzten Monat vor Studienbeginn.
- regelmäßige Einnahme bestimmter Medikamente.
- Allergien gegen die in der Studie eingesetzten Substanzen.
- Laborwerte außerhalb des Normbereiches.

- positives HBs-Antigen, HCV, HIV.
- Teilnahme an anderen Studien innerhalb der letzten 2 Monate vor Studienbeginn.
- begründeter Verdacht oder Nachweis einer Suchterkrankung.

5.2 Durchführung der Studie

Gemäß der zugrunde liegenden Hypothese bildeten wir drei Probandengruppen.

Die erste Gruppe erhielt Sterofundin[®] als Placebo intravenös (Placebogruppe).

Die zweite Gruppe erhielt Fenoterol als Studienmedikation intravenös (Fenoterolgruppe) und in der dritten Gruppe wurde Fenoterol in Verbindung mit Losartan verabreicht (Kombinationsgruppe).

5.2.1 Studiendesign

Es wurde eine offene, bezüglich der infundierten Medikation blinde, randomisierte und placebokontrollierte Studie durchgeführt.

5.2.2 Prüfmedikation und Studienmedikation

Es wurden folgende Substanzen verwendet:

1. Partusisten[®] Injektionslösungskonzentrat (Fenoterol, 1 Amp. à 10ml enthält 500µg Fenoterol-HBr; Firma Boehringer Ingelheim, Deutschland).
2. Lorzaar[®] (Losartan), 50mg Tabletten; Firma MSD Chibropharm GmbH, Deutschland).
3. NaCl[®] (Elektrolyt-Infusionslösung zu 0,5l – 1l, Firma Braun, Melsungen, Deutschland) als Trägermedium für die intravenöse Medikamentenapplikation.
4. Sterofundin[®] (Elektrolyt-Infusionslösung zu 0,5l – 1l; Firma Braun, Melsungen; Deutschland) als Flüssigkeits- und Substratausgleich bei Nahrungskarenz.

Fenoterol (Partusisten[®]):

Wirkmechanismus: Fenterol ist ein β -Sympathomimetikum. Als „entferntes Adrenalin-Derivat“ ist es durch eine Veränderung der Substituenten am Aminostickstoff in der Lage, überwiegend β_2 -Rezeptoren zu stimulieren. Hier kommt es, G-Protein-vermittelt,

zu einer Aktivierung der Adenylat-Cyclase und konsekutiv zur Erhöhung von intrazellulärem c-AMP. Dies ist ein second-messenger und induziert die Folgereaktionen. Es kommt durch Stimulation des β_2 -Rezeptors zu einer Steigerung des Calcium-Effluxes aus der Zelle und gleichzeitig zu vermehrtem Speichern des Calciums im sarkoplasmatischen Retikulum mit konsekutiver Verminderung des freien intrazellulären Calciums (Timmermans et al. 1992).

Wirkung: Fenoterol hat eine dilatierende Wirkung an den Gefäßen und führt zur Erschlaffung der Muskulatur des Bronchialsystems, der Blase und des Uterus. Auch in den Stoffwechsel greift es regulierend ein. Es kommt unter Wirkung von Fenoterol zu einer erhöhten Insulinsekretion aus dem Pankreas, zu einer gesteigerten Glykogenolyse und Glukoneogenese in der Leber, sowie zur Erhöhung der Lipolyse aus Fettzellen und einer gesteigerten Glykogenolyse im Skelettmuskel.

Bezüglich der β_2 -sympathomimetischen Wirkung sollte in Hinblick auf die durchgeführte Studie auch auf die stimulierende Wirkung auf das RAS hingewiesen werden.

Anwendungsgebiete: Die Zulassung für Fenoterol besteht gemäß der Fachinformation für die oben genannten Wirkungen. Fenoterol wird in erster Linie zur Behandlung des Asthma bronchiale und zur Tokolyse bei drohendem Abort und vorzeitiger Wehentätigkeit in der Gynäkologie eingesetzt.

Pharmakokinetik: Die orale Bioverfügbarkeit von Fenoterol liegt bei nur etwa 10-15%, so dass es in der Asthmathherapie v.a. als Dosieraerosol zur Anwendung kommt, da es in dieser Form die bronchodilatatorische Wirkung binnen Minuten entfaltet. Ein Wirkmaximum wird etwa nach 15-20 Minuten erreicht. Die Wirkung hält in Abhängigkeit von der Dosierung circa 6-8 Stunden an.

Zur Tokolyse wird Fenoterol gewichtsadaptiert verabreicht. Man orientiert sich mit der Dosierung am klinischen Beschwerdebild. Es werden Dosierungen zwischen 0,5 und 3 μ g/min i.v. eingesetzt. Diese Behandlung erfordert eine strenge Überwachung der Vitalparameter und ist bei obstruktiven Kardiomyopathien, Herzklappenstenosen, Tachykardien, Thyreotoxikose und pulmonaler Hypertonie kontraindiziert.

Unerwünschte Wirkungen: Es können sämtliche Wirkungen der Sympathomimetika als unerwünschte Wirkungen auftreten, da es sich bei den sog. selektiven β_2 -Sympathomimetika immer nur um eine relative „Selektivität“ handelt. Zum Beispiel: Herzrhythmusstörungen, Angina-pectoris-Anfälle, Übelkeit, Schwächegefühle, feinschlägiger Tremor, Hyperglykämien, Hypokaliämien, Hypomagnesiämien und übermäßige Schweißproduktion (Fachinfo Nr.: 7335-v877 – Partusisten – a (2003)).

Losartan (Lorzaar®):

Wirkmechanismus: Der in der Studie verwendete Wirkstoff Losartan ist ein nichtpeptidischer, selektiv kompetitiver AT-II₁-Rezeptor-Antagonist und hemmt zusammen mit seinem in der Leber gebildeten Metaboliten (E-3174), welcher eine noch höhere Affinität zum AT-II₁-Rezeptor hat, die physiologisch relevanten Wirkungen des endogenen Angiotensin II.

Wirkungen: Losartan vermindert als direkter kompetitiver Antagonist des starken Vasokonstriktors Angiotensin II am AT-II₁-Rezeptor den peripheren Gefäßwiderstand.

Anwendungsgebiete: Auch hier liegt die Zulassung gemäß der Fachinformation zur Therapie der arteriellen Hypertonie vor. Durch die Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes im Organismus erreicht man eine Blutdrucksenkung, die therapeutisch bei Hypertonikern genutzt wird. Eine Reflextachykardie tritt in der Regel nicht auf. Des Weiteren besteht die Zulassung bei der Therapie der chronischen Herzinsuffizienz und der diabetischen Nierenerkrankung mit Proteinurie ab 0,5g/d (hier bei gleichzeitiger Hypertoniebehandlung).

Pharmakokinetik: Maximale Plasmakonzentrationen von Losartan werden circa 1h nach oraler Aufnahme erreicht (bei E-3147 nach circa 3-4h). Die Halbwertszeit wird mit 2h beziehungsweise 3 bis 6h angegeben. Die therapeutische Dosierung beträgt 1 mal 50mg/Tag per os. Die blutdrucksenkende Wirkung hält etwa 24 Stunden an, jedoch wird der maximale Effekt erst nach circa 3-6 Wochen der Anwendung erreicht. Bei gesunden, "normo-natriämischen" Personen wird kein blutdrucksenkender Effekt erwartet.

Unerwünschte Wirkungen: Die häufigsten Nebenwirkungen von Losartan sind Kopfschmerzen und Schwindel. Bei Flüssigkeitsmangel und Hyponatriämie kann es zu starker Hypotonie kommen, außerdem ist die Anwendung bei gleichzeitiger Einnahme von Kalium-Salzen oder kaliumretinierenden Diuretika wegen der Gefahr der Hyperkaliämie zu vermeiden.

Kontraindikationen sind Schwangerschaft, Stillzeit und Nierenarterienstenosen (Fachinfo Nr.: 7121 – x789 – Lorzaar – n (2005)).

isotone Natriumchloridlösung 0,9%® :

Natriumchloridlösung wird zum Ausgleich extrazellulärer Flüssigkeitsverluste eingesetzt und eignet sich als Trägermedium für die intravenöse Medikamentenapplikation.

Unerwünschte Wirkungen: Die unerwünschten Wirkungen ergeben sich aus den bedingten Anwendungsbeschränkungen. Abhängig vom Wasser- und Säure-Base-Haushalt des jeweiligen Patienten sind die Anwendungsbeschränkungen sehr individuell.

Bei kardialen oder renalen Vorerkrankungen kann es durch nicht ausreichende Bilanzierung z.B. zur kardiopulmonalen Dekompensation bei Herzinsuffizienz oder Nierenfunktionsstörungen kommen. (Fachinfo Nr.: 005097-y768 – isotone Natriumchloridlösung 0,9% Braun – a (2008)).

Sterofundin®:

Sterofundin ist eine Elektrolytlösung, welche zum Ausgleich von extrazellulären Flüssigkeitsverlusten eingesetzt wird.

Unerwünschte Wirkungen: Ergeben sich aus den bedingten Anwendungsbeschränkungen. Abhängig vom Wasser- und Säure-Base-Haushalt des jeweiligen Patienten sind die Anwendungsbeschränkungen sehr individuell.

Bei kardialen oder renalen Vorerkrankungen kann es durch nicht ausreichende Bilanzierung z.B. zur kardiopulmonalen Dekompensation bei Herzinsuffizienz oder Nierenfunktionsstörungen kommen. (Fachinfo Nr.: 006108-z931 – Sterofundin HEG-5 – a (2001)).

5.2.3 Bewertung der Studienmedikation

1) Fenoterol, wirkt als β_2 -Sympathomimetikum v.a. durch eine Dilatation glatter Muskulatur. Die therapeutische Breite ist relativ groß, die Dosierungen liegen laut Fachinfo zwischen 0,5–3 μ g/kg Körpergewicht pro Minute. Dennoch wurde eine Überwachung der Vitalparameter, v.a. der Herzfrequenz und des Blutdrucks der Probanden auf der Station durchgeführt. Trotz relativer Selektivität ist bei Überdosierung v.a. mit kardialen Reaktionen, wie Tachykardie, ventrikulären Arrhythmien oder pectanginösen Beschwerden zu rechnen. Bei im Vorfeld der Studie gründlich untersuchten und gesunden Probanden war dies jedoch nicht zu erwarten.

2) Losartan, als bisher am besten untersuchter AT-II₁-Rezeptor-Antagonist, zeichnet sich v.a. durch niedrige Toxizität, relative Nebenwirkungsarmut und hohe therapeutische Breite, bei zuverlässiger spezifischer Blockade des AT-II₁-Rezeptors aus und wird in mehreren Ländern zur antihypertensiven Therapie eingesetzt (einmalige Gabe von 50mg/Tag).

3) als Placebo verwendeten wir Sterofundin[®], welches schon seit Jahren in täglichem klinischen Gebrauch ist und als ungefährlich eingestuft werden kann.

4) als Medikamententrägerlösung wurde isotone Kochsalzlösung verwendet. Hier entspricht das Risikoprofil dem des Sterofundins.

Da es sich bei den Probanden um junge gesunde Männer zwischen 18 und 30 Jahren handelte, konnte die Applikation von Fenoterol, Losartan, isotoner Natriumchloridlösung und Sterofundin[®] in therapeutischer Dosierung als ungefährlich eingestuft werden.

5.3 Studiendurchführung

5.3.1 Dosierung

Fenoterol wird in der klinischen Anwendung in Dosierungen zwischen 0,5 und 3µg/min intravenös eingesetzt. Für die Studie wählten wir die Dosis zwischen diesen Werten und verabreichten Fenoterol mit einer Infusionsrate von 1,5µg/min als Standarddosis für den Studientag. Als Trägermedium wurde NaCl-Lösung verwendet.

Losartan wurde einmalig 2 Stunden vor Beginn der Infusionen in einer therapeutischen Dosis von 50mg in Form einer handelsüblichen Tablette verabreicht.

Sterofundinlösung und Natriumchloridlösung wurden allen Probanden in Raten von 150ml/Stunde infundiert. Diese Rate wurde als physiologischer Flüssigkeits- und Elektrolytausgleich bei absoluter Nüchternheit gewählt.

5.3.2 Voruntersuchung

Im Rahmen der notwendigen Voruntersuchung wurde eine Anamnese erhoben, eine ausführliche körperliche Untersuchung, ein Urinstix (Multistix 10 SG®) durchgeführt sowie ein Elektro-Kardiogramm aufgezeichnet. Darüber hinaus wurden folgende klinisch-chemische und hämatologische Laborparameter bestimmt: Natrium, Kalium, Chlorid, Eisen, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, Glutamat-Pyruvat-Transferase, γ -GT, Kreatinin, Harnstoff/Stickstoff, Harnsäure, Bilirubin gesamt, Triglyceride (TG), Protein, Glucose, kleines Blutbild, Retikulozytenzahl, Quickwert, partielle Thromboplastinzeit (aPTT), Thrombinzeit (TZ). Des Weiteren wurden der Hepatitis-C-Antikörpertiter bestimmt und sowohl ein Hepatitis-B-Antigen- als auch ein HIV-Test durchgeführt.

5.3.3 Studientag

Ab 19:00 Uhr am Vorabend des Studientages war den Probanden lediglich das Trinken von Wasser gestattet, eine Nahrungsaufnahme war nicht erlaubt. Auch das Trinken koffein- und alkoholhaltiger Getränke und das Essen von Schokolade war über die gesamte Studiendauer untersagt.

Am Studientag trafen die Probanden morgens um 7:30 Uhr nüchtern auf der Probandenstation 1023 der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universität Göttingen ein. Nach der Befragung über möglicherweise zwischenzeitlich aufgetretene Ausschlusskriterien erfolgte der endgültige Studieneinschluss. Nun wurden jeweils 1 Venenverweilkanüle (Braunüle®) in Venen beider Unterarme der Probanden für die Dauer von 12 Stunden gelegt.

Nachdem ein, der Voruntersuchung entsprechender Ruheblutdruck und Ruhepuls nachgewiesen war, begannen wir mit den Blutabnahmen und der Infusion der Medikation. Im Falle der Placebo- und Fenoterolgruppe trafen die Probanden jeweils eine Stunde vor Beginn der Infusionen und Blutentnahmen zur „Beruhigung“ und Vorbereitung ein. Dies entsprach dem Zeitpunkt –1 Stunde.

Die Probanden der Kombinationsgruppe mit Fenoterol und Losartan trafen 2 Stunden vor Beginn des offiziellen Studientages ein, erhielten die Losartan-Tablette und legten

sich zur Ermittlung des Ruhedruckes und des Ruhepulses hin. Dies entsprach dem Zeitpunkt -2 Stunden, wobei der angenommene Wirkeintritt des oral zugeführten Losartans nach etwa 2h erfolgen sollte. Nach 1 Stunde begannen wir auch hier mit den Aufzeichnungen der „Vitalparameter“, dies entsprach wiederum dem Zeitpunkt -1 Stunde.

Die Gabe der jeweiligen Studienmedikation erfolgte wiederum 1 Stunde später. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch mit den Blutentnahmen für die Bestimmung der Laborparameter begonnen (Zeitpunkt 0 Stunden).

Die Dauer der Infusionen erfolgte bei allen 3 Gruppen über 8 Stunden.

Die Fenoterolgruppe erhielt das Fenoterol in einer Dosis von 1,5µg/Minute über 8 Stunden in einer Gesamtdosis von 720µg/8h. Als Medikamententräger wurde isotonische Kochsalzlösung gewählt, über 8 Stunden insgesamt 1200ml bei einer Infusionsrate von 150ml/ Stunde.

Während der Medikamentenapplikation wurden die Probanden mit Hilfe eines Elektrokardiogramm-Monitors (Pro-Paq® 140 EL) überwacht. Die Probanden durften keine Nahrung zu sich nehmen und nur für den Toilettengang aufstehen, ansonsten war das Herumlaufen untersagt.

Nach Ablauf des Infusionsprogramms wurde ein Mittagessen aus der Küche des Universitätsklinikums Göttingen serviert. Die Probanden durften sich nun auf der Station frei bewegen, diese jedoch nicht verlassen.

Die Entnahme der Blutproben erfolgte jeweils am kontralateralen Arm der Infusion, im Abstand von 2 Stunden. Zum Zeitpunkt 0h erfolgte die erste Blutentnahme, bis 2 Stunden nach Beendigung der Medikationsinfusion, dann 12, 24, 48 und 72 Stunden nach Beginn der Medikation (bezogen auf den Zeitpunkt 0 Stunden).

Die Urin-Sammelperioden erstreckten sich über 0 - 6, 6 - 12, 12 - 24, 24 - 48 und 48 - 72 Stunden (ebenfalls bezogen auf den Zeitpunkt 0 Stunden). Die Probanden fanden sich zu festen Zeiten ambulant zur Blutentnahme und Sammelurinabgabe nach 24, 48 Stunden und 72 Stunden wieder auf der Station 1023 ein.

Die Abbildung 2 zeigt den Studienablauf:

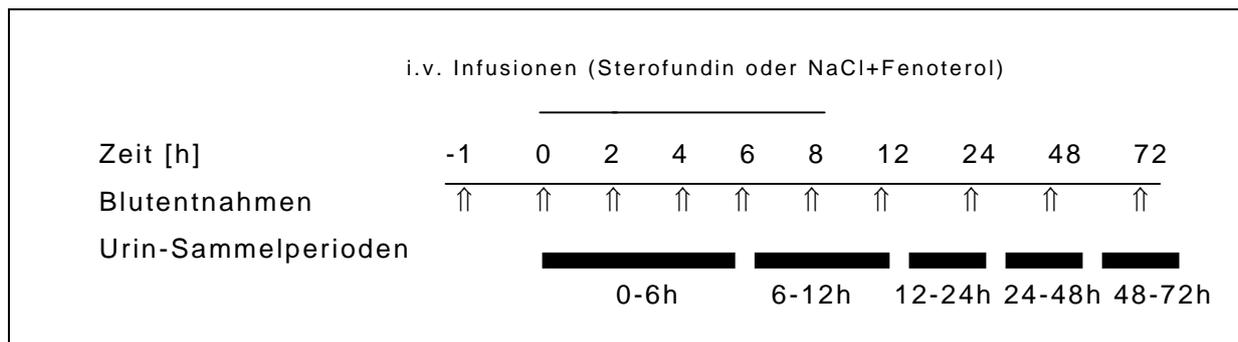


Abbildung 2: Studienablauf

Blutentnahme für die **Erythropoetin (EPO)**-Bestimmung:

- 4 Milliliter Serummonovetten.

Blutentnahmen zur **Angiotensin II (AT II)**-Bestimmung:

- 8 Milliliter EDTA-Monovetten.

Blutentnahmen zur Bestimmung der **Plasmareninaktivität (PRA)**:

- 8 Milliliter EDTA-Monovetten.

Blutentnahmen zur Bestimmung von **Na⁺**, **K⁺** und **Kreatinin**:

- 5,5 Milliliter NH₄-Heparinat-Monovetten.

Blutentnahmen für die Erstellung des **kleinen Blutbildes**:

- 2,7 Milliliter EDTA-Monovetten.

Blutentnahmen zur Erstellung des **Gerinnungsstatus**:

- 3 Milliliter Citrat-Monovetten.

Die Tabelle 1 zeigt die Blutabnahme-Zeitpunkte:

Tabelle 1: Blutentnahmezeitpunkte

-1h	0h	2h	4h	6h	8h	12h	24h	48h	72h
EPO	EPO	EPO	EPO	EPO	EPO	EPO	EPO	EPO	EPO
AT II	AT II	AT II	AT II	AT II	AT II	AT II	AT II	AT II	AT II
PRA	PRA	PRA	PRA	PRA	PRA	PRA			
	E´lyt	E´lyt	E´lyt	E´lyt	E´lyt	E´lyt	E´lyt	E´lyt	E´lyt
	kBB	kBB	kBB	kBB	kBB	kBB	kBB	kBB	kBB
									Ger.

Legende:

EPO: Erythropoetin

AT II: AngioTensin II

kBB: kleines Blutbild

E´lyt: Na, K, Kreatinin (bei der 72h-Abnahme wurde als Abschlusscreening eine klinisch-chemische Laboruntersuchung durchgeführt)

Ger.: Gerinnungsparameter

PRA: PlasmaReninAktivität

Alle 60 Minuten wurden die Parameter HF (Herzfrequenz) und RR (Blutdruck) beziehungsweise MAD (Mittlerer arterieller Druck (Algorithmus: systolischer RR + 2x diastolischer RR / 3 = MAD)) liegend, in Ruhe bestimmt und aufgezeichnet.

5.3.4 Die Behandlung der Blutproben

Die Monovetten für die Elektrolyt-Bestimmung, für das kleine Blutbild und zur Erfassung des Gerinnungsstatus wurden zur Auswertung umgehend an die Abteilung Klinische Chemie des Göttinger Universitätsklinikums gesandt.

Die mit Bestatin[®] vorbereiteten Monovetten für die AT-II-Bestimmung und die Monovetten für die Bestimmung der PRA wurden in Eiswasser vorgekühlt. Das Bestatin[®] wurde zur Hemmung der Angiotensinase im Probandenserum hinzugegeben. Nach erfolgter Blutentnahme wurden sie umgehend zusammen mit den Proben zur Bestimmung der EPO-Konzentration in einer auf +4 °C vorgekühlten Zentrifuge bei 4500U/min über 10 Minuten zentrifugiert. Danach wurde unter genauer Beachtung der Kühlkette der Überstand der EPO-Proben und der Proben zur Ermittlung der Plasma-Renin-Aktivität auf jeweils 3 Aliquots verteilt.

Der Überstand der Proben zur Bestimmung der AT-II-Konzentration wurde auf 2 Aliquots verteilt. Nun wurden die Proberöhrchen bis zur entgültigen Messung bei -80°C eingefroren.

Zur Behandlung der Angiotensin-Proben wurde Bestatin[®] (Firma Bühlmann Laboratories AG, Schönenbuch, Schweiz) verwendet.

5.4 Biochemische Analysen

5.4.1 Bestimmung der Erythropoetinkonzentration

Die Bestimmung der EPO-Konzentration erfolgte mit einem ELISA-Kit (Kat.-Nr. 500, Medac GmbH, Hamburg). Bei diesem Test-Kit war die Mikrotiterplatte mit monoklonalen Maus-Anti-Epo-Antikörpern gebrauchsfertig vorbeschichtet. Das Testverfahren erfolgte nach dem Sandwich-Prinzip.

Zur Durchführung des Tests wurde das 1:2 verdünnte Serum in die Vertiefungen der Platte pipettiert. Nach kurzer Einwirkzeit und folgendem 3maligem Auswaschen wurde Anti-EPO-Antikörper-ALP-Konjugat hinzupipettiert, dadurch wurde der Anti-EPO-Antikörper mit alkalischer Phosphatase konjugiert und das "Sandwich" vervollständigt. Nach nochmaligem Auswaschen wurde nun nach Zugabe von p-Nitrophenylphosphat die Konzentration durch Photometrie bei einer Wellenlänge von 405 Nanometer gemessen, was die Berechnung der EPO-Konzentration ermöglichte.

Die jeweiligen Ausgangswerte zu Beginn des Studientags wurden als Baseline festgelegt, dann wurde die Gabe der Medikation gestartet. Im Folgenden wurden die Blutentnahmen zur EPO-Konzentrationsberechnung zunächst jede Stunde bis zum Abschluß der Infusionsgabe durchgeführt. Hieraus errechneten wir die $\text{AUC}_{0-12\text{h}}$ (Area under the curve) mit Hilfe der linearen Trapezoidregel.

5.4.2 Bestimmung der Angiotensin - II - Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung des Angiotensin II erfolgte mit Hilfe eines Radio-Immuno-Assays (Nr. 40-6005, Nichols Institute Diagnostics, San Juan Capistrano, USA).

Bereits bei der Blutentnahme wurde das Blut mit Bestatin[®] versetzt, um den enzymatischen Abbau durch die physiologische Angiotensinase zu vermeiden und zu blockieren.

Der Angiotensin-II-Radioimmuno-assay misst immunreaktives Angiotensin II mit Hilfe eines doppelten Radioimmunoassays. Phasenextrahierte EDTA-Plasma-, Standard- und Kontrollproben wurden hierbei zunächst mit einem Anti-Angiotensin-II-Antikörper vorinkubiert. Nun konkurriert markiertes Angiotensin II mit dem Angiotensin II aus den Probandenproben um die gleichen Bindungsstellen. Nach weiterer Inkubation erfolgt die Zugabe eines zweiten Antikörpers auf einer festen Phase. Der gebundene Teil der Antikörperkomplexe ist nun auf der festen Phase fixiert und kann mittels Gamma-Zählkammer ausgezählt werden.

5.4.3 Bestimmung der Plasmareninaktivität

Die Plasmareninaktivität wurde mit Hilfe des Angiotensin-1-RIA (RENK P2510, Sorin Biomedica, Saluggia, Italien) bestimmt. Dies ist ein Test, der auf einer Konkurrenz zwischen markiertem Angiotensin I aus dem Standard und Angiotensin I aus der Probe um eine definierte standardisierte und begrenzte Zahl von Antikörperbindungsstellen basiert. Nach Zugabe der Proben und Inkubation bei 37 Grad Celsius ist die Menge des gebundenen, markierten Angiotensin I umgekehrt proportional zur Menge des freien Angiotensin I, welches Rückschlüsse auf die Plasma-Renin-Aktivität erlaubt. Es wird nicht das aktive Renin gemessen, sondern der Substratumsatz, bei dem Renin endogenes Angiotensinogen in Angiotensin überführt. Die Plasma-Renin-Aktivität wurde zu Beginn des Studientages als Ausgangswert ermittelt und dann im Folgenden alle 2 Stunden gemessen. Hieraus errechneten wir die AUC_{0-12h} .

Die Dimension wird in Milligramm/Milliliter/h angegeben.

5.4.4 Sammelurin

Die Urin-Sammelperioden wurden u.a. durchgeführt, um die Natriumausscheidung und die Kreatinin-Clearance festzustellen. Im Anschluss an die Urin-Sammelperioden wurde das Volumen der Ausscheidung bestimmt, des Weiteren die Kreatininkonzentration im Serum und im Harn des Probanden, wobei davon auszugehen ist, dass die Konzentration des Kreatinin im Urin gleich der Konzentration des Kreatinin im Serum ist, da weder eine Sezernierung, noch eine Resorption in der Niere erfolgt (bei Nierengesunden = Probanden).

Die Konzentration des Kreatinin wird mit Hilfe der Jaffe-Reaktion bestimmt. Kreatinin bildet in alkalischer Lösung mit Pikrin-Säure eine gelborange gefärbte Verbindung, deren Farbintensität der Konzentration des Kreatinins proportional ist und bei 546nm gemessen wird. Danach erfolgt eine Berechnung der Kreatinin-Clearance (siehe unten).

Beim Natrium erfolgt die Messung flammenemissionsspektrometrisch.

Nur in Kombination beider Werte ist eine Aussage über die PRA möglich. Es erhöht sich auch bei gesunden Probanden die Renin-Aktivität im Plasma, wenn eine Natrium-Retention erfolgt. Auf der anderen Seite sinkt die Plasma-Renin-Aktivität bei erhöhter Natrium-Ausscheidung.

5.4.5 Parameter des Blutdruckes und Herzfrequenz

Die Bestimmung der Parameter erfolgte jeweils zum Zeitpunkt der Blutentnahmen mittels Pro-Paq[®] 140 EL. Dieses Gerät führt nach manuellem Start selbstständig Blutdruckmessungen durch, kann die Herzfrequenz messen und berechnet den MAD nach unten genanntem Algorithmus.

5.5 Statistik

5.5.1 Größe der einzelnen Gruppen

Es wurden 2 Gruppen mit jeweils 12 und eine Gruppe mit 11 gesunden, männlichen Probanden im Alter zwischen 18 und 30 Jahren gebildet. Die Gruppenzuweisung erfolgte nach dem Zufallsprinzip. Die Gruppengrößen wurden ermittelt, unter der Annahme, dass die kleinste zu erwartende Differenz in der EPO-Konzentrations-Veränderung gegenüber der Placebogruppe je nach Medikation 50% beträgt, dies wurde als klinisch relevante Veränderung angesehen.

Die Standardabweichung wurde mit 33% angenommen.

5.5.2 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte in der Abteilung Klinische Pharmakologie der Universität Göttingen.

Ausgewertet wurden die Proben aller, in die Studie eingeschlossenen Probanden. Es gab einen Studienabbrecher, der ersetzt wurde. Die statistischen Berechnungen erfolgten durch eine Varianzanalyse mittels ANOVA (ANalysis Of VAriance) mit nachfolgendem t-Test und anschließender α -Korrektur nach Bonferroni-Holm. Die angegebenen Konfidenzintervalle mit $p < 0.05$ beziehen sich auf die Abweichungen der Wertunterschiede bezogen auf die Placebogruppe.

Des Weiteren wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen der AUC für EPO aus der Placebo- und den Behandlungsgruppen bestimmt und auch als SEM angegeben.

Im Einvernehmen mit der Arbeitshypothese, die besagt, dass im Vergleich zum Placebo Fenoterol die EPO-Produktion des menschlichen Körpers steigert und Losartan diese Steigerung unterbindet, wurden nun die Ergebnisse der Behandlungsgruppen in einem zweiseitigen, unverbundenen t-Test mit denen der Placebogruppe verglichen und statistisch ausgewertet.

5.5.3 Berechnungen

- **Berechnung des mittleren arteriellen Druckes (MAD):**

$$\text{MAD} = (\text{syst. RR.} + (2 \times \text{diast. RR})) / 3$$

- **Berechnung der Natriumausscheidungsfraktion (F_{Na}):**

$$F_{\text{Na}} = \left(\left(\frac{U_{\text{Na}}}{P_{\text{Na}}} \right) / \left(\frac{U_{\text{Krea}}}{P_{\text{Krea}}} \right) \right) \times 100$$

U_{Na} : Natriumkonzentration im Urin

P_{Na} : Natriumkonzentration im Plasma

U_{Krea} : Kreatininkonzentration im Urin

P_{Krea} : Kreatininkonzentration im Plasma

- **Berechnung der Kreatininclearance (CL_{Krea}):**

$$\text{CL}_{\text{Krea}} = (U_{\text{Krea}} \times V_{\text{Urin}}) / S_{\text{Krea}}$$

U_{Krea} : Kreatininkonzentration im Urin

V_{Urin} : Urinvolumen

S_{Krea} : Kreatininkonzentration im Serum

Normiert wurden die einzelnen Kreatininwerte auf eine Körperoberfläche (KO) von 1.73m^2 . Sie wurde errechnet nach der Dubois-Formel (Du Bois und Du Bois 1916). Hierbei ist das Produkt aus der $0,425_{\text{ten}}$ Potenz des Gewichtes (kg), der $0,725_{\text{ten}}$ Potenz der Größe (cm) und der Konstanten $0,007184 (\text{m}^2 / \text{kg} \times \text{cm})$ gleich der Körperoberfläche in m^2 : $\text{KO} = (\text{Größe}^{0,725} \times \text{Gewicht}^{0,425} \times 71,84 : 10000)$

Primäre Zielvariable war die Menge des während des Studientages gebildeten Erythropoetins. Ein äquivalentes Maß dafür ist die Fläche unter der EPO-Zeitkurve ($\text{AUC}_{0-72\text{h}}$, bestimmt mit der Trapeziodregel); Programm Topfit (Heinzel et al.1993).

6. Ergebnisse

Untersucht wurde als primäre Zielvariable die Entwicklung der Erythropoetin-Konzentration bei gesunden, nichtrauchenden Männern mit einem Durchschnittsalter von 24,54 Jahren, einem Durchschnittskörpergewicht von 76,55kg und einer durchschnittlichen Körpergröße von 182,1cm. Verteilt wurden die Probanden nach dem Zufallsprinzip auf die oben genannten 3 verschiedenen Gruppen.

Sekundäre Zielvariablen waren die Plasminogen-Aktivität und die Entwicklung in der Angiotensin-II-Serum-Konzentration. Des Weiteren wurden die Vitalparameter Herzfrequenz und Blutdruck aufgezeichnet.

6.1 Erythropoetin

Der Erythropoetin-Ausgangswert (als Baseline) war bei allen Untersuchungsgruppen etwa gleich und betrug zwischen 5.1 ± 1.0 mU/ml in der Placebogruppe und 4.1 ± 0.9 mU/ml in der Fenoterolgruppe beziehungsweise 4.2 ± 0.6 mU/ml Fenoterol + Losartan-Gruppe. Somit lagen die Werte im, für den ELISA-Test physiologischen Bereich von 4 – 25 mU/ml.

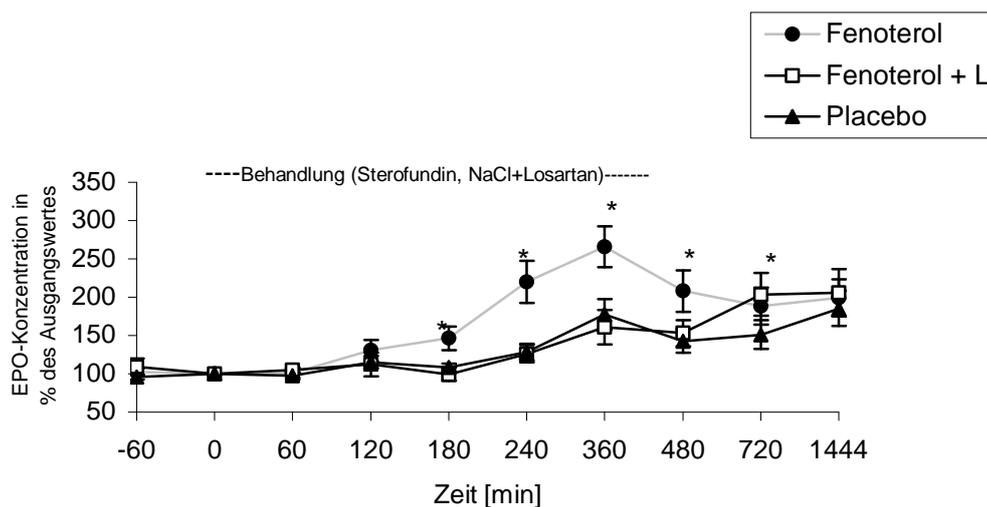


Abbildung 3: Verlauf der EPO-Konzentration in Prozent des Ausgangswertes

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

Betrachtet man die EPO-Konzentrationen der einzelnen Probandengruppen in prozentualer Relation zum Ausgangswert, so fällt die deutliche signifikante Steigerung der Serum-EPO-Konzentration etwa 120 Minuten nach Beginn der Infusion in der Fenoterol-Gruppe auf. Bereits zu diesem Zeitpunkt betrug die Steigerung 15%. Im weiteren Verlauf erhöhte sich die Steigerung mit einem Maximum von 156% zum Ausgangswert nach 6h. Die Steigerungen der EPO-Konzentrationen in der Fenoterol-Losartan-Gruppe war vergleichbar mit denen der Placebogruppe. Diese betrug bis zu 60% in der Kombinationsgruppe und bis zu 77% in der Placebo-Gruppe (nach 6 Stunden).

Tabelle 2: Erythropoetin-AUC (0-24, 0-48 und 0-72h)

EPO [mU/ml/h]		AUC 0-24h	AUC 0-48h	AUC 0-72h
Placebo	MEAN	3296.67	6783.83	11045.36
	SEM	288.47	596.72	1066.59
Fenoterol	MEAN	4891.42	9648.67	14319.17
	SEM	449.05	949.28	1325.33
Fenoterol+Losartan	MEAN	3315.08	7595.25	12082,17
	SEM	328.42	716.94	1378.19

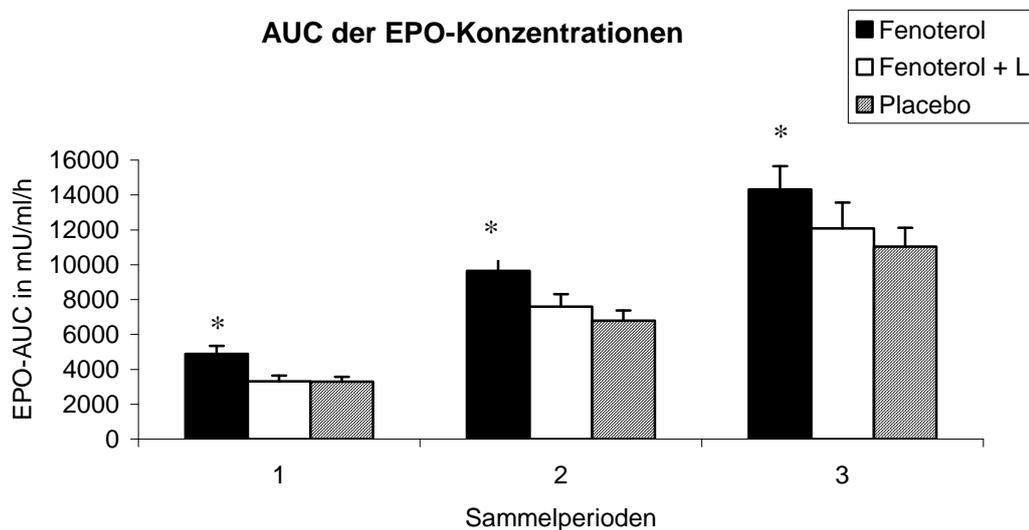


Abbildung 4: Erythropoetin-AUC (0-24, 0-48 und 0-72h)

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

Die Abbildung der AUC's über die Sammelperioden 0-24 Stunden, 0-48 Stunden und 0-72 Stunden macht diese Steigerung noch deutlicher. Statistisch signifikante Veränderung gab es sowohl in der ersten Sammelperiode von 0-24 Stunden als auch in den Sammelperioden 2 und 3. Hier zeigten sich Steigerungen von 48%, 42% beziehungsweise 29% in der letzten Sammelperiode von 0-72 Stunden in der Fenoterolgruppe gegenüber der Placebogruppe, wohingegen wir bei der Kombinationsgruppe keine signifikante Änderung verzeichnen konnten.

6.2 Parameter des Blutdruckes und Herzfrequenz

6.2.1 Herzfrequenz

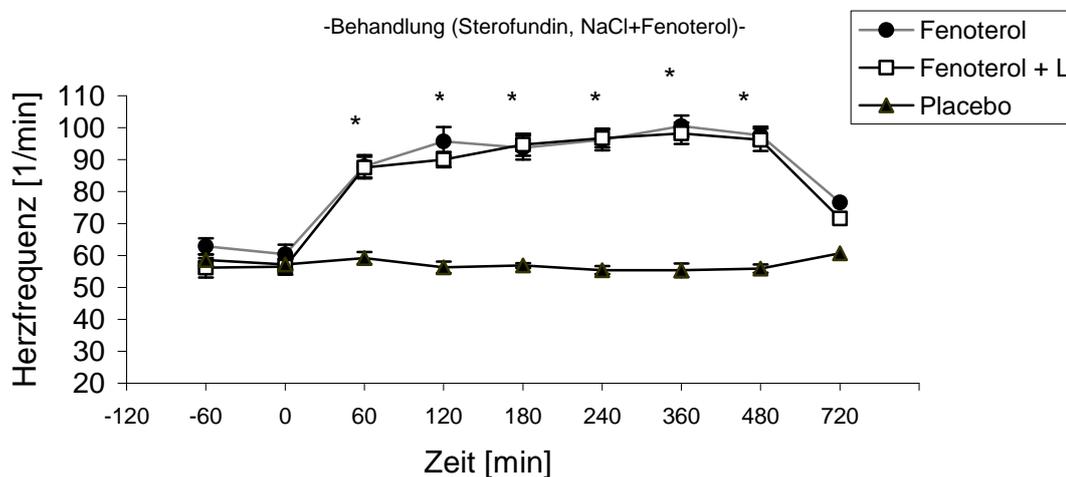


Abbildung 5: Herzfrequenz

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

Die Herzfrequenz zeigt eine signifikante Steigerung in den beiden Gruppen mit Medikamenteninfusion gegenüber der Placebogruppe. Diese Steigerung war statistisch signifikant. Der durchschnittliche Anstieg betrug durchschnittlich 38 Schläge/Minute und war während der Medikamentenapplikation konstant. Nach Beendigung der Behandlung näherten sich die Werte wieder einander an. Die Werte der Placebogruppe blieben über die gemessene Zeit stabil und nahezu unverändert.

6.2.2. Mittlerer arterieller Druck

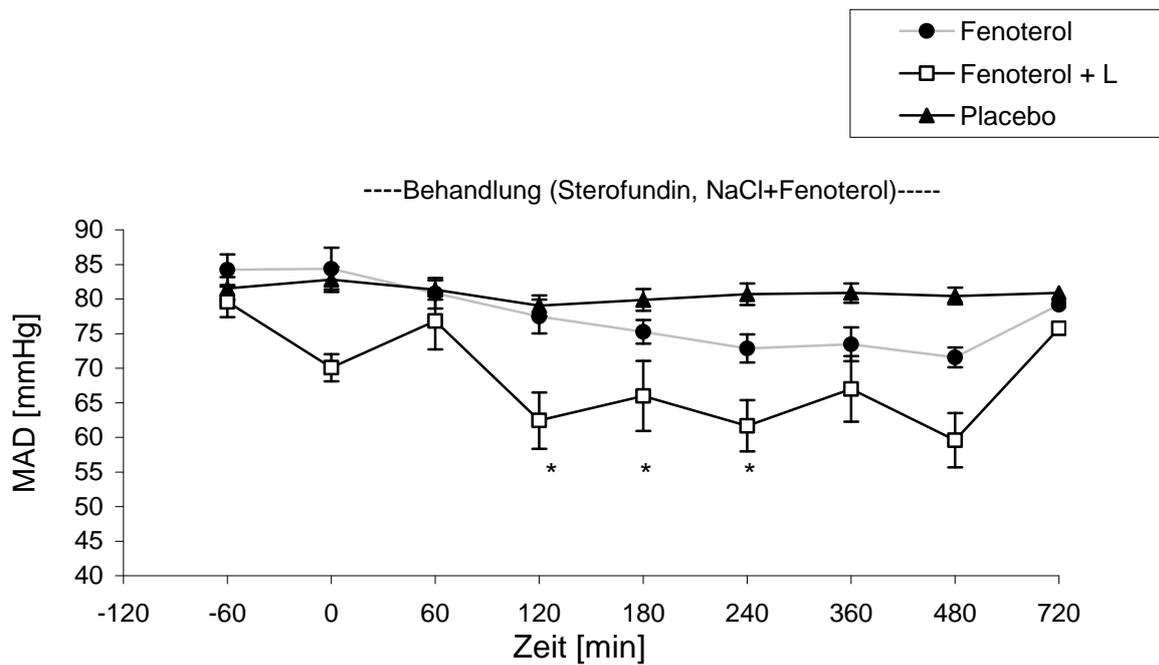


Abbildung 6: mittlerer arterieller Blutdruck

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

Der MAD zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen Placebo und Fenoterol. Einen statistisch signifikanten Abfall des mittleren arteriellen Druckes um etwa 10mmHg bemerkte man in der Kombinationsgruppe (Fenoterol+Losartan). Die Werte waren nach 2, 3, 4 und 6 Stunden (unter Gabe der Medikation) signifikant geringer als bei der Placebogruppe.

6.2.3. Systolischer Blutdruck

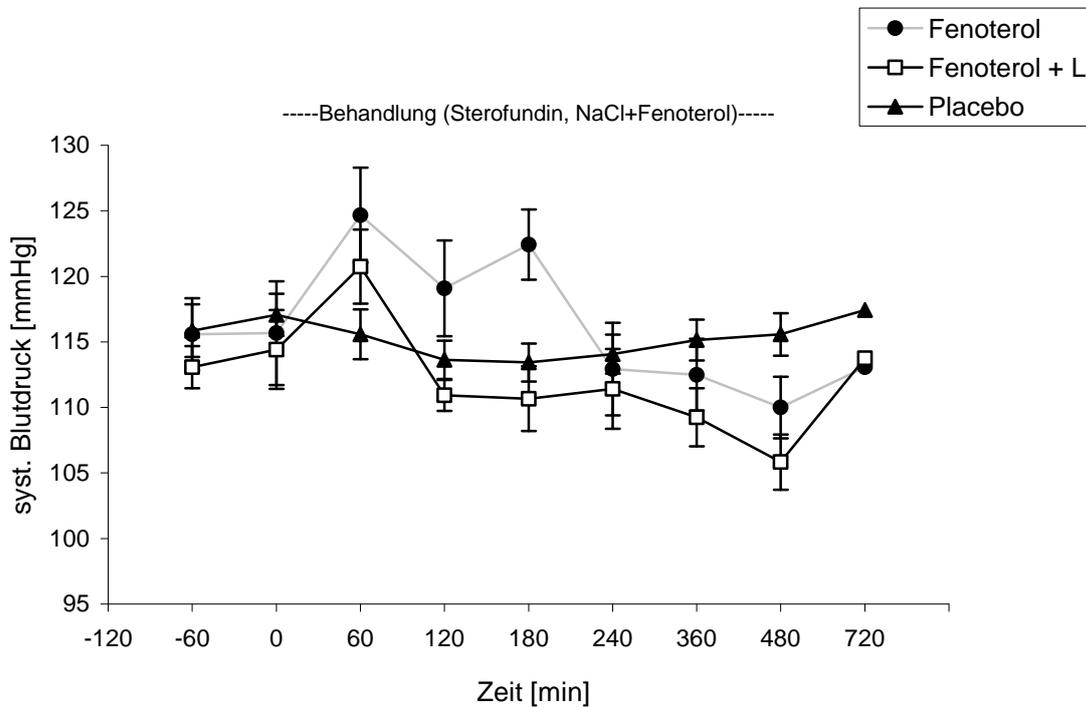


Abbildung 7: systolischer Blutdruck

Mittelwerte \pm SEM

Der systolische Blutdruck zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Einen leichten Anstieg um circa 10mmHg sahen wir in der Fenoterolgruppe, in der Kombinationsgruppe kam es nach 2 Stunden zu einem Abfall um etwa 10mmHg. Diese Unterschiede waren statistisch nicht signifikant.

6.2.4. Diastolischer Blutdruck

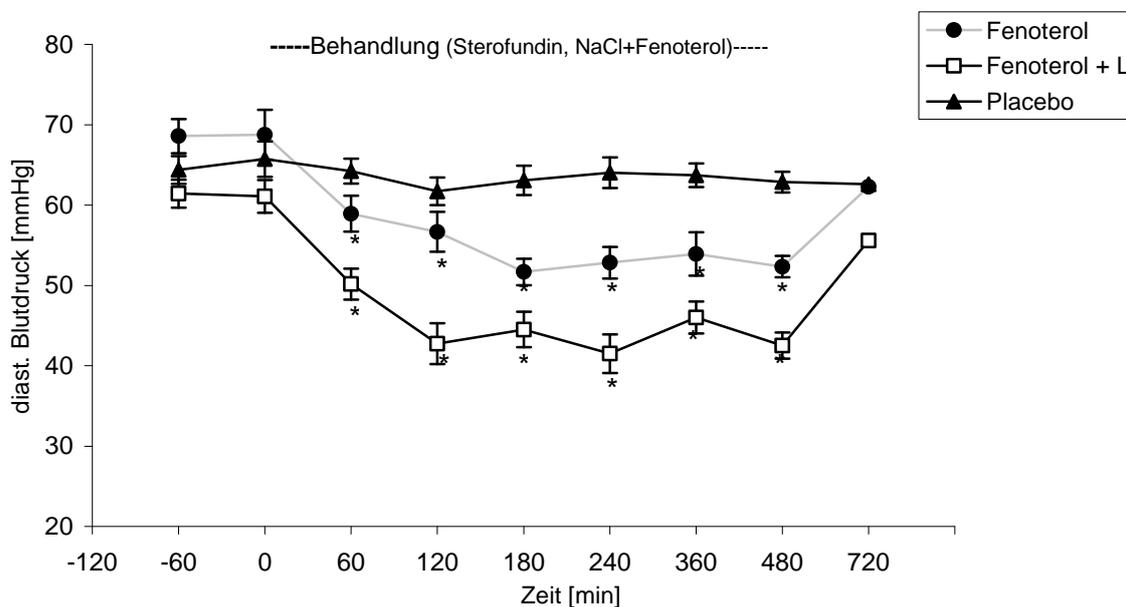


Abbildung 8: diastolischer Blutdruck

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

Bei der Betrachtung des diastolischen Blutdruckes fällt in den beiden Gruppen mit Medikation ein deutliches Abfallen der Werte auf. Statistisch signifikante Unterschiede ergaben sich 60 Minuten nach Beginn der Infusion. Hier fielen die Werte in der Fenoterol-Gruppe um etwa 10mmHg, in der Kombinationsgruppe sogar um bis zu 20mmHg. Etwa 2 Stunden nach Beendigung der Infusion normalisierten sich die Werte wieder und näherten sich den Ausgangswerten an. Ein signifikanter Unterschied bestand dann nicht mehr.

6.3 Natriumausscheidungsfraktion

Die Ausgangswerte waren statistisch nicht signifikant unterschiedlich und können als gleich angesehen werden. Es wird deutlich, dass bei den Probanden, die Fenoterol oder die Kombination Fenoterol + Losartan erhielten, die Werte, gegenüber der Placebogruppe, statistisch signifikant abfielen (SEM \pm , $p < 0,05$ Placebo).

Die Natriumausscheidungsfraktion bei der Placebogruppe erhöhte sich auf 104%, dies war allerdings nicht statistisch signifikant.

Tabelle 3: Natriumausscheidungsfraktion

<i>F_E Na in %</i>		t: 0 h	t: 6 h
PLACEBO	MEAN	69	104
	SEM	± 03	± 29
Fenoterol	MEAN	57	38
	SEM	± 06	$\pm 05^*$
Fenoterol+Losartan	MEAN	77	42
	SEM	± 13	$\pm 07^*$

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

6.4 Kreatininclearance

In allen Gruppen stieg die Kreatinin-Clearance an, bei nahezu identischen Ausgangswerten. Die Ausgangswerte lagen mit durchschnittlich $129,28 \text{ ml/min/1,73m}^2$ KO im Referenzbereich des Labors der Universität Göttingen (80–170ml/min).

Es zeigte der stärkste Anstieg der Kreatinin-Clearance in der Gruppe der Probanden, die Fenoterol + Losartan erhielten. Hier betrug der Anstieg etwa $80 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Der Anstieg der Kreatinin-Clearance in der Fenoterolgruppe Gruppe betrug fast $63 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Am geringsten war der Anstieg in der Placebo-Gruppe. Hier war der Anstieg circa $40 \text{ ml/min/1,73m}^2$. Die Anstiege waren im Vergleich zur Placebo-Gruppe signifikant (Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo).

Tabelle 4: Kreatininclearance vor und nach Medikation

CL_{Krea} (ml/min/1,73m²)	durchschnittlich vor Medikation	durchschnittlich während Medikation
Placebo	128.38	170.00 \pm 9,47
Fenoterol	130.88	193.29 \pm 6,71*
Fenoterol+Losartan	128.59	208.52 \pm 10,84*

6.5 Serumkalium-Werte

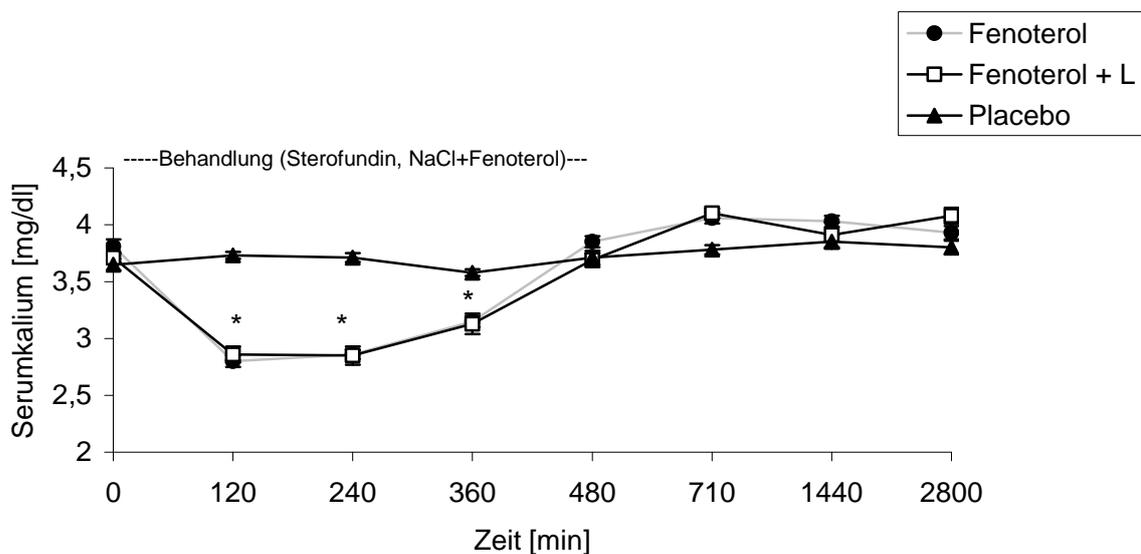


Abbildung 9: Verlauf der Kalium-Konzentration im Serum

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

Es fällt auf, dass die Serum-K⁺-Werte in beiden Gruppen, die Fenoterol bekamen, signifikant gegenüber der Placebo-Gruppe abfielen. Während die Messwerte der Placebo-Gruppe konstant bei Werten um 3,73 mmol/l (SEM \pm 0.12) lagen, war deutlich ein Abfall der beiden anderen Probandengruppen zu erkennen.

Zum Zeitpunkt der 120 Minuten-Messung fällt ein deutlicher Abfall um 0,86 mmol/l (SEM \pm 0,07) auf. Dieser Wert kehrte nach 8 Stunden, d.h. 2 Stunden nach Beendigung der Infusion, wieder auf das Ausgangsniveau zurück.

6.6 Angiotensin - II - Konzentration

Die Ergebnisse zeigen eine statistisch signifikante Steigerung der AT-II-Konzentrationen in der Fenoterol-Gruppe und noch ausgeprägter in der Kombinationsgruppe, die Fenoterol und Losartan erhielt

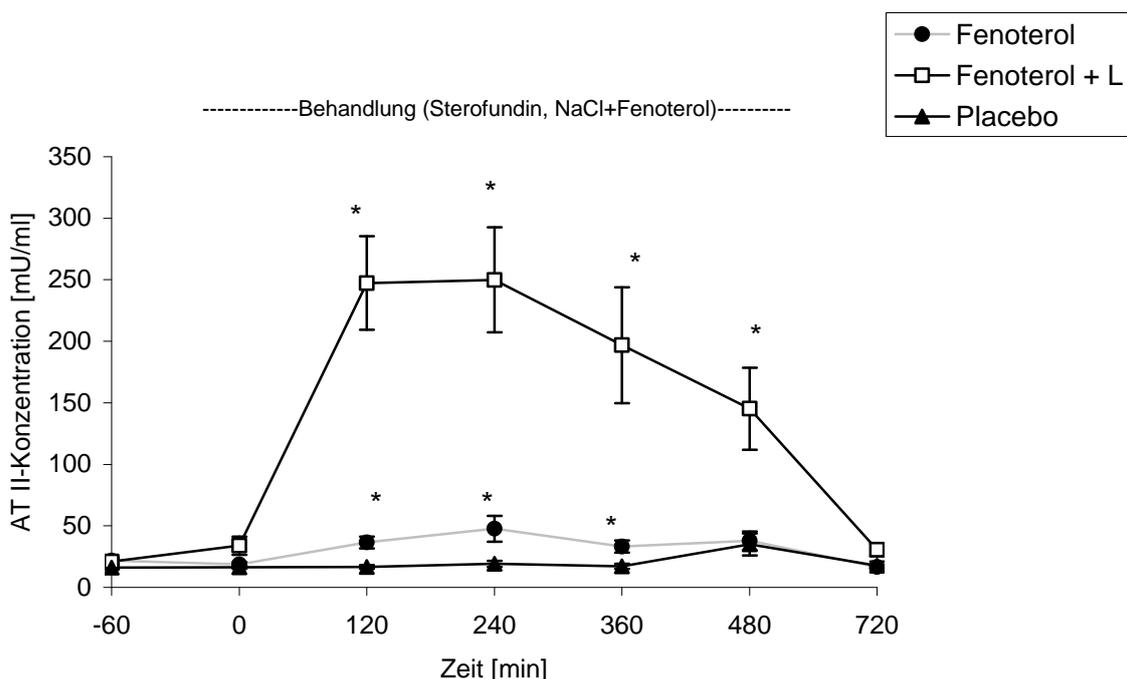


Abbildung 10: Verlauf der AT - II - Konzentration

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

In den ersten 2 Stunden stieg die Serumkonzentration des Angiotensins II in der Kombinationsgruppe auf über 247,38mU/ml (SEM \pm 38,08) an. Die Steigerung in der Fenoterolgruppe fiel mit 36,48mU/ml Placebo (SEM \pm 4,86) gegenüber 16,56mU/ml (SEM \pm 1,52) weniger stark, aber ebenfalls statistisch signifikant aus. Nach etwa 720 Minuten (12 Stunden), beziehungsweise 6 Stunden nach Beendigung der Infusionen, waren keine Unterschiede mehr, gemessen am Ausgangswert, erkennbar und die Ausgangswerte von etwa 16–17mU/ml beziehungsweise 30mU/ml in der Kombinationsgruppe wieder erreicht.

6.7 Plasmareninaktivität

Der Ausgangswert der Plasmareninaktivität lag bei allen Gruppen um 0,99ng/ml/Stunde (SEM \pm 0,08). In der Kombinations-Gruppe zeigte sich bereits 2 Stunden nach Einnahme der 50mg Tablette ein Anstieg der PRA auf 1,70ng/ml/Stunde, bei gleichbleibenden Werten in den beiden anderen Gruppen. Dies war statistisch signifikant.

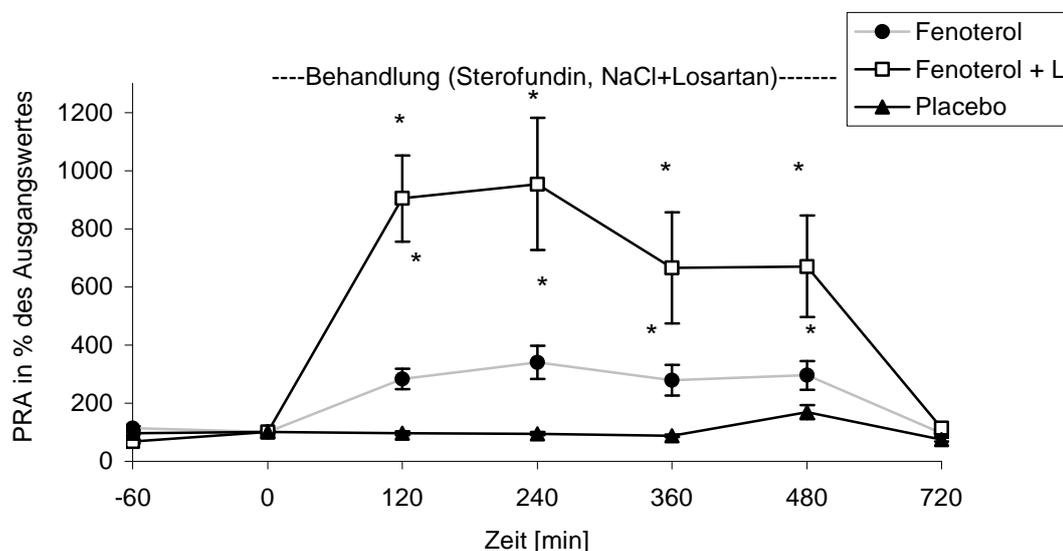


Abbildung 11: Verlauf der Plasmareninaktivität in % des Ausgangswertes

Mittelwerte \pm SEM; * = $p < 0,05$ vs. Placebo

Die AUC_{0-12h} zeigt den Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen in der PRA.

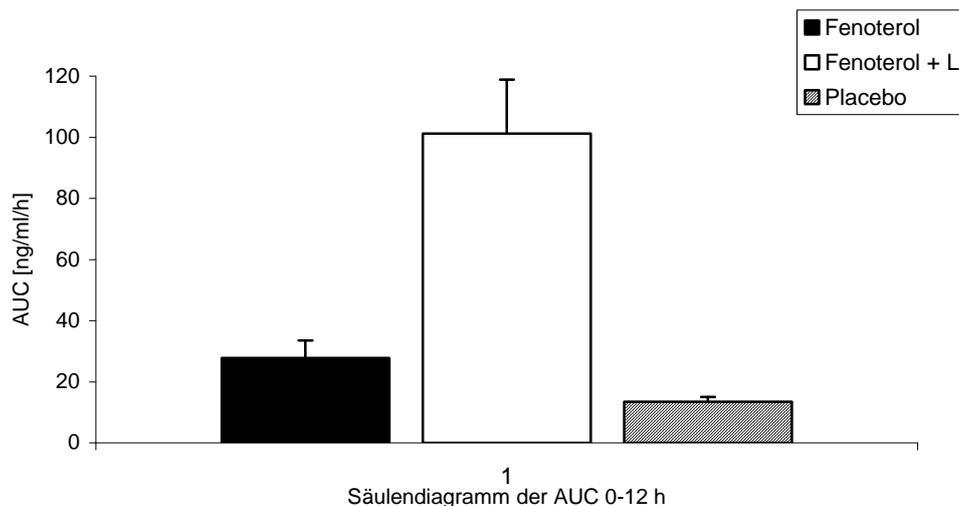


Abbildung 12: Plasmareninaktivität- $AUC_{(0-12h)}$

Die Steigerung der PRA in der durch Losartan „blockierten Gruppe“ ist sehr deutlich zu sehen. Auch hier liegt eine statistische Signifikanz vor, bei einem Konfidenzintervall (bezogen auf die Differenz zum Placebowert) von 1,7 bis 26,7ng/ml/Stunde (Mittelwerte \pm SEM; $p < 0,05$ Placebo).

Die Steigerungen lagen hierbei für die Fenoterolgruppe bei 106% (total 27,78ng/ml/Stunde) und für die „Losartan-Gruppe“ bei 659% (total 101,22ng/ml/Stunde), dies war etwa 4mal höher als in der Gruppe, welche mit Fenoterol alleine behandelt wurde.

7. Diskussion und Betrachtung der erhobenen Parameter

Die vorliegende Arbeit stellt eine klinisch-pharmakologische Studie bezüglich der Erythropoetin-Produktion unter normoxischen Bedingungen nach Gabe von Fenoterol, Fenoterol in Kombination mit Lorsatan und der Gabe einer Elektolytlösung als Placebo vor.

Unser Ziel war es, durch Fenoterol unter der Annahme einer konsekutiven Angiotensin-Produktion die β -adrenerge Stimulation der EPO-Produktion zu erreichen und somit die EPO-Bildung zu steigern. Des Weiteren sollte die EPO-Produktion durch den selektiven AT-II₁- Rezeptorantagonisten Losartan zu unterbinden sein.

7.1 Herzfrequenz, mittlerer arterieller Druck und andere Parameter des Blutdruckes

(siehe Punkt 6.2)

Betrachtet man die Ergebnisse dieser Parameter, so zeigen all diese Befunde die Wirkung der Fenoterolmedikation. Da die dilatierende Wirkung des Fenoterols vor allem die Kapazitätsgefäße erfasst, war in therapeutischer Dosierung ein Absinken des diastolischen Blutdruckes zu erwarten. Dies bestätigte sich. Der systolische Blutdruck verblieb dabei stabil, wobei hier ein, allerdings statistisch nicht signifikanter, Abfall nach 2h in der Kombinationsgruppe zu verzeichnen war. In der Kombinationsgruppe zeigte sich ein statistisch signifikanter Abfall des MAD. Die Herzfrequenz war durch die Aktivierung des Sympathikus durch eine direkt sympathomimetische Wirkung erhöht (eine sog. β_2 -Selektivität ist immer nur eine relative Selektivität). Dies kann aber auch reflektorisch durch eine verminderte Herzrate bei nachlassendem Pre-load zustande gekommen sein (Timmermans et al.1992).

Die im Studiendesign gewählte Dosierung der Medikamente führte nicht zu einer Veränderung des Blutdruckes im Sinne eines „pressorischen“ Effektes.

7.2 Natriumauscheidungsfraktion (F_{Na})

(siehe Punkt 6.3)

In unserem Probandengut zeigten sich nahezu identische Ausgangswerte zum Zeitpunkt $t=0h$. Nach Beenden der Medikationsgabe ($t=6h$) zeigten sich erhebliche, statistisch signifikante Unterschiede (Mittelwerte \pm SEM, $p < 0,05$ Placebo). Die Natriumauscheidungsfraktion verringerte sich in beiden Fenoterol-Gruppen. In der Placebo-Gruppe zeigte sich ein leichter Anstieg der F_{Na} .

Dies war ein durchaus zu erwartender Befund. Vermittelt wird dieser Effekt durch eine Stimulation von β_1 -Rezeptoren in der Niere, durch das nur relativ selektive β_2 -Sympathomimetikum Fenoterol. Hierdurch kommt es zu einer vermehrten Renin-Sekretion (Gleiter et al. 1996; Timmermans et al. 1992). Dies führt konsekutiv zu einer Angiotensin-Produktion mit nachfolgender Aldosteronproduktion, was eine erhöhte Rückresorption des Natriums aus dem Primärharn zur Folge hat und sich in der verminderten F_{Na} zeigt.

Darüber hinaus haben wir durch Gabe von Losartan die AT-II₁-Rezeptoren in einer Gruppe blockiert, so dass es zu einer Akkumulierung des Angiotensins kam.

7.3 Kreatininclearance

(siehe Punkt 6.4)

Als Maß für die glomeruläre Filtrationsrate zeigte die Kreatininclearance eine Erhöhung in allen 3 Gruppen, wobei die Veränderung zum Ausgangswert in der Kombinationsgruppe besonders ausgeprägt war.

Der Vergleich der einzelnen Gruppen mit der Placebogruppe zeigt statistisch signifikante Veränderungen (Mittelwerte \pm SEM, $p < 0,05$ Placebo).

Erklärbar wird dies durch einen Effekt der Fenoterolmedikation auf die Durchblutung der Niere durch Stimulation von β_1 -Rezeptoren mit konsekutiver Vasokonstriktion. Die glomeruläre Filtrationsrate ist direkt proportional zum renalen Blutfluss und steigt mit dem arteriellen Druck, vor allem im Bereich zwischen 50-100mmHg stark an (Schmidt 1992). Dies zeigt sich im der Anstieg der Kreatinin-Clearance. Die Blutdruckwerte während der Systole waren in unserer Untersuchung zwar kaum verändert und der MAD in der Kombinationsgruppe leicht vermindert. Die diastolischen Blutdruckwerte hingegen zeigten einen deutlicheren Abfall, was in Relation betrachtet einer Erhöhung des systolischen Druckes entspricht.

7.4 Serumkalium-Konzentration

(siehe Punkt 6.5)

Wie erwartet fielen die Serum-K⁺-Spiegel in beiden mit Fenoterol behandelten Gruppen, unabhängig von weiterer Losartanmedikation ab, während sich die Werte in der Placebo-Gruppe konstant zeigten. Diese Veränderung glich sich etwa 2 Stunden nach Beendigung der Infusionen wieder vollständig aus. Hieraus lässt sich erneut die Wirkung der Fenoterolmedikation, also die Aktivierung des Sympathikotonus erkennen, denn über eine Steigerung der Insulinsekretion aus dem Pankreas kommt es zu einer erhöhten Glykogenolyse in Leber und Muskulatur und zu einer gesteigerten Glukoneogenese, die eine Verschiebung des intravasalen und extrazellulären Kaliums nach intrazellulär zur Folge hat und das Absinken der K⁺-Ionen-Konzentration im Serum erklärt. Gleichzeitig sieht man die gelungene Flüssigkeitsbilanzierung und den wohl tarierten Elektrolytausgleich durch die Sterofundin[®]-Infusion von 150ml/Stunde in der Placebogruppe.

7.5 Plasmareninaktivität

(siehe Punkt 6.7)

Die Ergebnisse zeigen die deutliche, statistisch signifikante Steigerung der PRA in beiden Medikamenten-Gruppen (Mittelwerte \pm SEM, $p < 0,05$ Placebo). Auch Gleiter et al. beobachteten in einigen früheren Studien eine Steigerung der PRA nach Gabe von Fenoterol. Damals wurde jedoch unter anderem ein kontrollierter Aderlass als Stimulus für die EPO-Produktion eingesetzt. Es zeigte sich ebenfalls, dass das RAS mit seinen Komponenten in die Produktion von EPO involviert ist (Gleiter et al. 1996). Durch Fenoterol kam es auch dort zu einer Aktivierung des Sympathikus mit Aktivierung des RAS mit erhöhter PRA. Diese Befunde wurden in unserer Untersuchung eindrucksvoll bestätigt.

Diese Befunde lassen sich ebenfalls mit einer Akkumulierung des Renins bei Blockade der AT-II₁-Rezeptoren begründen, da der Effektor unterdrückt wurde.

Es bleibt jedoch zu bedenken, dass eine Steigerung der PRA auch, wie oben bereits erwähnt, durch eine Stimulierung von β_1 -Rezeptoren zu erreichen ist (Timmermans et al. 1992). Es ist bekannt, dass jede Selektivität immer nur eine dosisabhängige, relative Selektivität darstellt. Eine Differenzierung dieses Effektes (β_1 - beziehungsweise β_2 -mimetisch), etwa mit Isoprenalin als nicht selektivem

β -Rezeptor-Agonisten, und/oder einem β -Rezeptor-Antagonisten, gegebenenfalls in Kombination (z.B.: Propranolol als unspezifischem oder Metoprolol als spezifischem β_1 -Antagonisten) wäre sehr schwierig und war nicht Gegenstand dieser Studie.

Festzuhalten ist jedoch, dass Fenoterol eine Steigerung der PRA bewirkt hat und es offenbar dadurch zu einer Konzentrationserhöhung von Angiotensin II im Serum der Probanden kam.

7.6 Angiotensin II

(siehe Punkt 6.6)

Die Serumkonzentration von AT II stieg in beiden Fenoterol erhaltenden Gruppen statistisch signifikant gegenüber der Placebogruppe (Mittelwerte \pm SEM, $p < 0,05$ Placebo) an. Dies zeigt, dass Fenoterol zur Stimulierung einer AT-II-Produktion führt.

Angiotensin II hat eine Halbwertszeit von wenigen Minuten. Der hohe Anstieg in der Kombinationsgruppe ist wahrscheinlich Folge der Blockade der AT-II₂-Rezeptoren durch Losartan.

Allerdings könnte dieser Effekt sowohl durch direkte Stimulation der β_2 -Rezeptoren, als auch durch eine Stimulierung von β_1 -Rezeptoren zustande gekommen sein. Hierbei ließe sich der Anstieg der AT-II-Konzentration durch eine direkte Renin-Sekretionssteigerung erklären (Timmermans et al. 1992). Dazu passend wäre auch der Befund, dass die PRA im gleichen Zeitraum ebenfalls signifikant anstieg (siehe oben).

7.7 Erythropoetin

(siehe Punkt 6.1)

Die Erythropoetinkonzentration stieg deutlich an. Es gab eine bis zu 48%ige Steigerung (in der AUC) in der Fenoterolgruppe verglichen mit der Placebogruppe. Diese statistisch signifikante Steigerung wurde 2 Stunden nach Beginn der Infusionen erstmalig deutlich (Mittelwerte \pm SEM, $p < 0,05$ Placebo).

Die Kombinationsgruppe zeigte im gleichen Zeitraum keinen Anstieg gegenüber der Placebogruppe.

Durch die Gabe des Fenoterols kam es offenbar zu einer Aktivierung des RAS und konsekutiv zu einer vermehrten Bildung von AT II. Der Studienhypothese zufolge erreichten wir dadurch eine direkte Stimulation des AT-II₁-Rezeptors mit Aktivierung der EPO-produzierenden Fibroblasten.

Hingegen zeigte sich in der Kombinationsgruppe durch die gleichzeitige Blockade der AT-II₁-Rezeptoren mit Losartan ein Ausbleiben der EPO-Produktionssteigerung.

8. Schlussbetrachtung

Die Mechanismen, die zur Erythropoetinbildung in den Fibroblasten des renalen Kortex führen, waren bislang nicht detailliert geklärt. Bekannt war, dass nach Nierentransplantationen etwa 5-10% der Patienten eine Posttransplantationserythrozytose entwickeln. Des Weiteren zeigen Patienten mit chronischer Niereninsuffizienz häufig Zeichen der Anämie, die mit rekombinantem Erythropoetin behandelt werden kann (ebenso chronische Anämiker bei Tumorleiden).

Einige Ergebnisse deuteten auf eine wichtige Rolle des Adenosins bei der Vermittlung einer EPO-Produktion hin (Bakris et al. 1999; Gleiter et al. 1997a). Bakris et al. zeigten, dass eine Langzeittherapie der Erythrozytose mit Theophyllin eine Senkung des Hämatokrits und des Hb-Wertes erreichte. Dies basierte auf tierexperimentellen Versuchen von Ueno (Ueno et al. 1988). Insgesamt konnte jedoch ein klarer Zusammenhang der Theophyllintherapie der Posttransplantationserythrozytose nicht bestätigt werden (Ilan et al. 1994; Gleiter 1996).

Es zeigte sich, dass die Hb-Konzentration und der Hämatokrit durch eine Theophyllingabe auch bei Patienten mit unauffälligen Serum-Erythropoetinwerten gesenkt werden konnten.

Da Theophyllin indirekt den Sympatikotonus durch Blockade der präsynaptisch hemmenden Adenosinrezeptoren auf adrenerge Neurone erhöht, wurde postuliert, dass das RAS mit seinen Komponenten einen höheren Stellenwert in der Erythropoese hat als bislang vermutet (Ueno et al. 1988).

In unserer Studie konnten wir zeigen, dass durch Gabe von Fenoterol sowohl die EPO-Produktion, als auch die Plasmarenin-Aktivität und die AT-II-Konzentration deutlich gesteigert werden konnten.

Entsprechend der unserer Studie zugrunde liegenden Hypothese kam es offenbar zu einer sympathisch vermittelten Aktivierung des RAS durch Gabe von Fenoterol. Hierdurch wurde die Konzentration von Angiotensin II im Serum der Probanden deutlich gesteigert, was wiederum die EPO-Produktion aktivierte.

Des Weiteren zeigten wir durch Blockade des Angiotensin-II₁-Rezeptors den Zusammenhang der direkten Wirkung des Angiotensin II auf die EPO-Konzentration im Serum der Probanden, denn in der Kombinationsgruppe zeigte sich im gleichen Zeitraum

trotz enorm erhöhter AT-II-Konzentrationen im Serum keine statistisch signifikante Steigerungsrate der EPO-Konzentration. Vielmehr verlief die deutlich geringere Steigerung in der Kombinationsgruppe parallel zur Placebogruppe.

Nach Feststellung der außerordentlichen Bedeutung des RAS, mit wahrscheinlicher Vermittlung über Angiotensin II auf die EPO-Produktion und bei der Möglichkeit einer selektiven Blockade der AT-II₁-Rezeptoren, ergeben sich nun neue Therapieansätze zur Behandlung einer Erythrozytose (z.B. nach Nierentransplantationen). So ist es nun denkbar, den früher üblichen Aderlass mit bekannten Nebenwirkungen (z.B. Eisenverlust, erneuter Stimulation der Erythropoese oder Schwächegefühl der Patienten) durch Gabe eines AT-II₁-Rezeptorantagonisten (z.B. Losartan) zu ersetzen. Ob das in der Praxis auch gelingt, z.B. bei der Polyglobulie von Tumorpatienten (Nierenzellkarzinomen oder Leberzellkarzinomen), wird Gegenstand der Forschung bleiben. Umgekehrt ist durch Gabe von β_2 -Sympathomimetika (in dieser Untersuchung Fenoterol) eine Steigerung der EPO-Produktion erreichbar. Ob eine dauerhafte Gabe, z.B. inhalativ als Aerosol, vertretbar ist und die Gabe eines rekombinanten Erythropoetin ersetzt, ist bei dem zugrundeliegenden Wirkmechanismus der β_2 -Sympathomimetika und den daraus resultierenden unerwünschten Wirkungen beziehungsweise Kontraindikationen zu bezweifeln, so dass Fenoterol in der Therapie einer chronischen Anämie wohl eher eine geringe Rolle spielen wird. Denkbar wäre es aber, ein neues nebenwirkungsärmeres β_2 -Sympathomimetikum zu entwickeln.

9. Zusammenfassung

Erythropoetin ist ein Glykoprotein-hormon und entscheidend für die Ausbildung und die Differenzierung der Erythrozyten verantwortlich. Die Sequenz des EPO-Gens ist bekannt. Der Hauptproduktionsort des EPO befindet sich in den peritubulären Fibroblasten im renalen Kortex (Bachmann et al. 1993).

Der Produktionsmechanismus von Erythropoetin in der Niere sollte im Rahmen dieser Studie untersucht werden.

Primäre Zielvariable war die EPO-Konzentration im Serum der Probanden. Sie stieg statistisch signifikant bis zu 48% nach Gabe von Fenoterol an. Bei Zugabe von Losartan (Kombinationsgruppe) zeigte sich im gleichen Zeitraum keine Steigerung. Durch Gabe von Losartan haben wir die AT-II₁-Rezeptoren dieser Gruppe blockiert.

Die Plasma-Renin-Aktivität (PRA) stieg ebenfalls signifikant an. Gleiter et al. beobachteten in einigen Studien zuvor eine Steigerung der PRA nach Gabe von Fenoterol (Gleiter et al. 1996; Kazal et al. 1975). Diese Befunde konnten nun eindrucksvoll bestätigt werden.

Wir konnten unserer Hypothese entsprechend nachweisen, dass Fenoterol eine Aktivierung des RAS und eine Steigerung der PRA bewirkt hat. Dies hat offenbar zu einer Konzentrationserhöhung von Angiotensin II im Serum der Probanden geführt und eine gesteigerte EPO-Produktion verursacht, wobei Angiotensin II als „Schlüsseltransmitter“ fungierte. Die Blockade der AT-II₁-Rezeptoren mit Losartan bestätigt dies. Bei ausbleibendem „pressorischem“ Effekt der Medikation wurde auch die postulierte Minderdurchblutung der Niere als Auslöser einer EPO-Produktionssteigerung widerlegt. Dazu passend sind die Befunde von früheren Untersuchungen und klinischen Therapieformen, die einen Rückgang der EPO-Konzentration im Serum von Patienten mit Posttransplantationserythrozytose nach Gabe von ACE-Hemmstoffen beschrieben (Gleiter 1996). So zeigen sich dementsprechend neue Therapieansätze zur Behandlung einer Erythrozytose (z.B. nach Nierentransplantationen). Man könnte z.B. mit Losartan die bisher angewandten Aderlässe bei der Polyglobuliebehandlung ersetzen.

Des Weiteren ist durch Gabe von β_2 -Sympathomimetika (z.B. Fenoterol) eine Steigerung der EPO-Produktion erreichbar.

10. Anhang

Wertetabellen

10.1 Demographische Daten der Probanden

1. Gruppe Placebo

Proband Nr.	Alter [J]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	KO [m ²]
53	23	180	72	1,90
54	26	181	81	2,01
55	23	196	94	2,27
56	26	174	69	1,83
57	27	186	88	2,13
58	25	176	78	1,94
59	24	175	73	1,96
60	24	181	75	1,95
61	23	191	74	2,01
62	28	192	94	2,24
63	21	193	79	2,08
64	25	182	71	1,91

2. Gruppe Fenoterol

Proband Nr.	Alter [J]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	KO [m ²]
16	29	184	95	2,18
17	30	184	76	1,98
18	26	183	76	1,98
20	30	171	65	1,89
21	29	176	62	1,76
23	29	196	82	2,15
24	25	177	73	1,76
25	27	180	70	1,90
30	30	169	83	1,99
31	23	178	67	1,94
32	26	182	72	1,84

3. Gruppe Fenoterol - Losartan

Proband Nr.	Alter [J]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	KO [m ²]
26	30	190	73	2,00
27	22	178	73	1,90
28	24	181	75	1,95
29	22	174	69	1,83
33	26	179	71	1,89
34	23	181	65	1,84
35	23	181	78	1,98
36	26	175	71	1,86
37	27	183	73	1,94
38	29	174	63	1,76
39	23	172	77	1,90
41	23	183	74	1,95

	Alter [J]	Größe [cm]	Gewicht [kg]	KO [m ²]
Mittelwerte	24.54	182.1	76.55	1,97

(KO=Körperoberfläche)

10.2 Angiotensin - II - Konzentration %							
Zeit [Minute]	-60	0	120	240	360	480	720
Placebo	102,34	100,00	107,85	128,44	114,50	177,83	95,82
SEM	4,73	0,00	5,72	11,09	6,95	21,35	4,93
CI +	105,02	100,00	111,09	134,71	118,43	189,91	98,61
-	99,66	100,00	104,61	122,17	110,57	165,75	93,03
Fenoterol:	114,82	100,00	195,82	276,05	188,10	204,13	92,75
Fenoterol + L	78,28	100,00	879,14	879,37	666,76	522,17	101,91

10.3 Herzfrequenz [Minute]									
Zeit [Minute]	-60	0	60	120	180	240	360	480	720
Placebo	58,57	57,21	59,21	56,29	56,86	55,43	55,36	55,93	60,71
SEM	2,21	1,72	1,66	1,87	1,78	0,76	1,62	2,19	1,32
CI +	59,82	58,18	60,15	57,35	57,87	55,86	56,28	57,17	61,46
-	57,32	56,24	58,27	55,23	55,85	55,00	54,44	54,69	59,96
Fenoterol	62,92	60,42	87,92	95,75	93,75	96,17	100,50	97,58	76,58
Fenoterol+L	56,67	56,17	56,50	87,50	90,00	94,67	96,75	98,25	96,17

10.4 Blutdruck systolisch [mmHg]										
Zeit [Minute]	-60	0	60	120	180	240	360	480	720	1440
Placebo	115,86	117,07	115,57	113,64	113,43	114,07	115,14	115,57	117,43	117,71
SEM	1,95	2,00	1,60	1,90	1,46	1,45	1,49	1,55	1,61	1,48
CI +	116,96	118,20	116,48	114,72	114,26	114,89	115,98	116,45	118,34	118,55
-	114,76	115,94	114,66	112,56	112,60	113,25	114,30	114,69	116,52	116,87
Fenoterol	115,58	115,67	124,67	119,08	122,42	112,92	112,50	110,00	113,08	118,17
Fenoterol+L	115,50	113,08	114,42	120,75	110,92	110,67	111,42	109,25	105,83	113,75

10.5 Blutdruck diastolisch [mmHg]									
Zeit [Minute]	-60	0	60	120	180	240	360	480	720
Placebo	64,36	65,71	64,21	61,71	63,07	64,00	63,71	62,86	62,57
SEM	1,66	1,73	2,21	1,56	1,72	1,82	1,91	1,47	1,29
CI +	65,30	66,69	65,46	62,59	64,04	65,03	64,79	63,69	63,30
-	63,42	64,73	62,96	60,83	62,10	62,97	62,63	62,03	61,84
Fenoterol	68,58	68,75	58,92	56,67	51,67	52,83	53,92	52,33	62,25
Fenoterol+L	63,17	61,42	61,08	50,17	42,75	44,50	41,50	46,00	42,50

10.6 Mittlerer Arterieller Druck [mmHg]										
Zeit [Minute]	-60	0	60	120	180	240	360	480	720	1440
Placebo	81,52	82,83	81,33	79,02	79,86	80,69	80,86	80,43	80,86	81,67
SEM	1,49	1,65	1,83	1,40	1,49	1,56	1,58	1,40	1,21	1,44
CI +	82,36	83,76	82,37	79,81	80,70	81,57	81,75	81,22	81,54	82,48
-	80,68	81,90	80,29	78,23	79,02	79,81	79,97	79,64	80,18	80,86
Fenoterol	84,25	84,39	80,83	77,47	75,25	72,86	73,44	71,56	79,19	84,22
Fenoterol+L	80,92	79,58	79,08	76,83	62,42	66,00	61,67	67,00	59,58	75,75

10.7 Serumkalium [Milligramm/Deziliter]										
Zeit [Minute]	-60	0	120	240	360	480	720	1440	2800	
Placebo	3,51	3,65	3,73	3,71	3,58	3,52	3,71	3,78	3,85	
SEM	0,04	0,05	0,03	0,04	0,03	0,06	0,04	0,06	0,06	
CI +	3,53	3,68	3,75	3,73	3,60	3,55	3,73	3,81	3,88	
-	3,49	3,62	3,71	3,69	3,56	3,49	3,69	3,75	3,82	
Fenoterol	3,81	2,80	2,86	3,15		3,85	4,06	4,03	3,93	
Fenoterol+L	3,71	2,86	2,85	3,13	3,70	3,69	4,10	3,91	4,08	

10.8 Plasminogenaktivität % Verlauf							
Zeit [Minute]	-60	0	120	240	360	480	720
Placebo	96,85	100,00	97,13	95,22	88,19	169,26	74,92
SEM	3,64	0,00	6,31	5,10	4,76	23,32	6,92
CI +	<i>98,91</i>	<i>100,00</i>	<i>100,70</i>	<i>98,11</i>	<i>90,88</i>	<i>182,45</i>	<i>78,84</i>
-	<i>94,79</i>	<i>100,00</i>	<i>93,56</i>	<i>92,33</i>	<i>85,50</i>	<i>156,07</i>	<i>71,00</i>
Fenoterol	114,18	100,00	283,19	341,19	278,00	295,60	97,53
Fenoterol+L	69,08	100,00	903,98	953,97	665,42	670,81	114,26

10.9 Erythropoetinkonzentration % Verlauf										
Zeit [Minute]	-60	0	60	120	180	240	360	480	720	1440
Placebo	95,64	100,00	97,12	115,33	108,02	128,03	177,76	142,75	151,03	185,30
SEM	3,14	0,00	4,60	7,83	5,34	10,81	20,03	15,33	18,90	22,66
CI +	<i>97,42</i>	<i>100,00</i>	<i>99,72</i>	<i>119,76</i>	<i>111,04</i>	<i>134,15</i>	<i>189,09</i>	<i>151,42</i>	<i>161,72</i>	<i>198,12</i>
-	<i>93,86</i>	<i>100,00</i>	<i>94,52</i>	<i>110,90</i>	<i>105,00</i>	<i>121,91</i>	<i>166,43</i>	<i>134,08</i>	<i>140,34</i>	<i>172,48</i>
Fenoterol	102,59	100,00	101,14	130,62	146,26	220,20	265,82	208,02	188,43	199,35
Fenoterol+L	109,22	100,00	105,07	112,23	99,42	126,21	160,36	153,01	203,70	206,02

CI = Konfidenzintervall der Placebogruppe (\pm SEM)

Anlage 1

Ausführliche Darstellung der Historie und der bekannten Wirkungsmechanismen des Erythropoetins

Die Tabelle 5 gibt einen Überblick über die Eckdaten der Erythropoetinforschung.

Tabelle 5: Historie der Erythropoetinforschung

Um 1890	Claude Bernard beschreibt, dass die Effekte von Gasen physiologischerweise auf deren Partialdruck im Blut zurückzuführen sind, und dass die Gebirgskrankheit maßgeblich von einer Hypoxämie geprägt wird. Bert beschreibt eine Steigerung der O ₂ -Bindungskapazität während eines Höhengaufenthaltes (Jelkmann 1992).
1893	Miescher berichtet über den Einsatz der Höhentherapie bei Anämiepatienten (z.B. Patient mit Tbc). Als Konsequenz dessen wird die operative Verkleinerung der Alveolarfläche als Therapeutikum zur Behandlung chronisch anämischer Patienten diskutiert und durchgeführt (Miescher 1893).
1906	M. Carnot + Mme. de Flandre postulierten einen humoralen Einfluss auf die Erythropoese, nachdem sie Serum anämischer Hasen anderen Hasen injizierten und einen Anstieg der Erythropoese bei den behandelten Hasen um etwa 20-40% beobachteten (Carnot und de Flandre 1906).
1932	Sandor beschreibt eine Retikulozytose bei behandelten Hasen nach Injektion von Serum anämischer Hasen (Sandor 1932).
1943	Krumdieck berichtet von einer Häufung von Erythrozytenvorläuferzellen im Knochenmark nach einer solchen Seruminjektion bei gesunden Hasen (Injektion von Serum anämischer Hasen) (Krumdieck 1943).
1953	Erslev bringt den ersten Hinweis für ein Erythropoetin, indem er das Ausbleiben einer Retikulozytose bei mit Serum anämischer Hasen behandelten Hasen nachwies. Dennoch zeigte sich ein Anstieg des Hämatokrits durch regelmäßig wiederholte Gaben großer Mengen an

- infundiertem Plasma anämischer Hasen, ähnlich den Effekten bei rhEPO-Gabe heute bei Patienten mit chronischen Anämien (Erslev 1953).
- 1957 Jacobson postuliert die Niere als Hauptproduktionsort für das noch unbekannte Erythropoetin und berichtet über ein Ausbleiben eines Erythrozytenanstieges bei nephrektomierten Tieren nach Aderlass als Erythropoesestimulus (Jacobson et al. 1957).
- 1964 Nathan et al. unterstützen die These von Jacobson und zeigen einen Rückgang der Erythrozyten-Vorläuferzellen im Knochenmark eines nephrektomierten Menschen (Nathan et al. 1964).
- 1977 Miyake et al. führen den ersten Nachweis für EPO im Urin nach Purifikation (Miyake et al. 1977).

Erythropoetin (EPO):

Erythropoetin (EPO) ist ein Glykoproteinhormon (165 AS) mit einem Molekulargewicht von 34kDa, welches im Organismus die Produktion und Differenzierung der Erythrozyten aus den Stammzellen im Knochenmark maßgeblich beeinflusst. Der intrazelluläre Mechanismus beruht auf einer primären Bindung an einen EPO-Rezeptor, welcher membranständig auf der Oberfläche zahlreicher Zellen zu finden ist. Durch Bindung an den Rezeptor wird eine Autophosphorylierung der JAK 2 (Januskinase 2, eine Tyrosinkinase) induziert. Durch diese nunmehr phosphorylierte JAK 2 werden wiederum spezifische intrarezeptorische Tyrosine phosphoryliert, welche dann als Bindestelle für intrazelluläre Proteine fungieren, u.a. auch für einen STAT5 (signal transducers and activators of transcription). Dies ist gewissermaßen eine, durch Induktion einer Kaskadenreaktion vermittelte Proteinbiosynthese, mit dem Resultat der Transkription von Erythrozytenbestandteilen (Mulcahy 2001). Parallel dazu kommt es hierbei zu einer erhöhten Aufnahme von Ca^{2+} und Glukose innerhalb einer Stunde (Sawyer 1990; Sawyer et al. 1987), einer erhöhten Exprimierung von Transferinrezeptoren innerhalb von 6 Stunden und einer Hämoglobinsynthese nach etwa 12 Stunden (Krantz 1991).

Viele verschiedene Mechanismen, die die Produktion von Erythropoetin beeinflussen sind bekannt. Zu nennen sind v.a. physiologische Stimuli, wie Blutverlust (Miller et al. 1982), Hypoxämie mit Verminderung des O_2 -Partialdruckes im Blut, z.B. durch pulmonale Erkrankungen oder Höhengenaufenthalt (Abbrecht und Littell 1972; Eckardt et al.

1989), Anämie, etwa bei malignen Grunderkrankungen, Hypoxie des Gewebes mit Verschiebung des Blut-pH-Wertes (Miller et al. 1973) und Veränderung der O_2 -Affinität (Adamson und Finch 1975; Hebbe et al. 1978).

Der Produktionsort von EPO:

Zanjani et al. zeigten, dass die Leber der Hauptproduktionsort für Erythropoetin im Fetus ist. Das Umschalten der fetalen EPO-Produktion zur adulten Produktion in der Niere vollzieht sich etwa ab dem 120. Tag post gestationem und ist etwa am 40. Tag nach der Geburt beendet (Zanjani et al. 1981). An Hand des Nachweises von geringeren Mengen EPO-mRNA in der Leber und des vermehrten Nachweises in der Niere wurde gezeigt, dass die Erythropoetinbildung beim Erwachsenen annähernd zu 99% von der Niere übernommen wird (Jelkmann 1992). Bachmann et al. identifizierten 1993 die EPO-produzierenden peritubulären Zellen im renalen Kortex als Fibroblasten (Bachmann et al. 1993).

Hypothesen zur Regulation der EPO-Produktion

Die Produktionsrate von Erythropoetin korreliert umgekehrt zum Sauerstoffangebot des Organismus, so dass sie bei Hypoxie sogar bis auf das 1000-fache gesteigert werden kann (Halvorsen et al. 1968).

Für die Aufrechterhaltung eines konstanten Sauerstoffangebotes im Organismus ist eine Regulierung essenziell. Einige Studien konnten zeigen, dass eine negative Feedback-Regulierung durch EPO selbst nicht existiert (Eckardt et al. 1990). Vielmehr ist ein Zusammenspiel mehrerer Komponenten für die Regulation wahrscheinlich. Zum Beispiel könnte es durch vermehrte Ventilation bei O_2 -Mangel und durch eine nicht direkt kompensierte respiratorische Alkalose zu einer Verschiebung des Blut-pH-Wertes kommen. Dies könnte dann eine Änderung der O_2 -Affinität des Blutes bewirken und mit einer Verminderung der EPO-Produktion einhergehen (Miller et al. 1973; Adamson und Finch 1975; Hebbe et al. 1978).

Des Weiteren wird ein endogener Einfluss auf die EPO-Produktion z.B. durch den Hypothalamus über hormonelle und humorale Transmitter seit langem diskutiert. So gibt es nach Angaben einiger Autoren in der physiologischen EPO-Produktion eine ausgesprochene zirkadiane Rhythmik mit einem Serumspiegelminimum morgens und einem Maximum am Abend gegen 24 Uhr (Wide et al. 1988). Patienten mit Panhypopituitar-

rismus entwickeln Anämien (Halvorsen et al. 1968). Die Schilddrüsenhormone T_3 und T_4 steigern die EPO-Produktion, die Sexualhormone nehmen Einfluss auf die EPO-Produktion und auch Katecholamine steigern die Ausschüttung von EPO. Diese Erkenntnisse gerieten jedoch mit der Einführung von Zellklonen in die Forschung zunehmend in den Hintergrund, so dass man endogenen Einflüssen „nur“ permissive Effekte einräumte. Darüber hinaus sind die oben genannten Hormone (Schilddrüsenhormone und Katecholamine) sehr wichtig für den zellulären Metabolismus und wirken bei Überproduktion durch einen erhöhten Grundumsatz auch auf den O_2 -Verbrauch ein (Jelkmann 1992), vice versa z.B. bei Hypothyreose.

Der zelluläre Mechanismus, der zur Produktion von EPO führt, ist bislang noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist zum einen eine Regulierung auf Transkriptionsebene denkbar, denn spezifische Phosphatasen dephosphorylieren die Januskinase 2 und regeln den EPO-Rezeptor auf zellulärer Ebene herunter (Mulcahy 2001). Genauer gesagt wird dadurch die Transkription der Erythrozytengene vermindert.

Es wird ein bislang noch nicht identifiziertes Hämprotein vermutet, welches die EPO-Produktion als direktes "Sauerstoff-Sensorprotein" steuern soll (Goldberg et al. 1988). Experimente an isolierten Hepatozyten sprechen allerdings gegen diese Annahme (Eckardt et al. 1993).

Des Weiteren wurde ein HIF 1 (hypoxia inducible Factor 1) 1992 von Semanza als zellunspezifisches, intrinsisches O_2 -Sensorprotein beschrieben. Dieses führt durch Transkriptionsinduktion einiger Gene (VEGF – vascular Endothelium Growth Factor-, LDHA – Lactat Dehydrogenase A und auch EPO) zur Proteinsynthese. Setzt man Gewebe einer Hypoxie aus, so kommt es zu einer sauerstoffabhängigen Regulation der o.g. Proteinbiosynthese. Der HIF1 ist ein DNS-bindendes Protein, welches aus 2 Untereinheiten besteht, einer Alpha- und einer Beta-Untereinheit. Hierbei unterliegt die Beta-Untereinheit nicht sauerstoffabhängigen Mechanismen. Bei normoxischer Lage wird die HIF-1alpha-Untereinheit sehr schnell abgebaut, kann im Blut nicht nachgewiesen werden und kann nicht zur Induktion einer Transkriptionskaskade führen. Bei Hypoxie jedoch wird die HIF1-alpha-Untereinheit jedoch nicht so rasch abgebaut und greift dann aktiv in die Transkription der Erythropoetingene in den HEP3B-Zellen ein. HIF1 spielt demnach eine große Rolle in der Erhaltung der O_2 -Homöostase, jedoch ist anzunehmen, dass es ubiquitär im Körper vorhanden ist (Semanza und Wang 1992; Jelkmann 2004; Semanza et al. 1997; Semanza 2007).

Die EPO-Produktion wird jedoch, wie oben beschrieben, zu 99% von der Niere übernommen. Unklar bleibt, warum die EPO-Produktion hauptsächlich dort erfolgt. Warum findet sie nicht zum überwiegenden Teil in einem anderen Organ, wo ausgeprägtere O_2 -Gradienten vorhanden sind, statt? Denkbar wäre hier zum Beispiel die Alveolarzelle der Lunge.

Weiterhin ist bemerkenswert welchen Einfluss man der Nierenperfusion auf die Produktion von EPO eingeräumt hat, da Mujovic und Gross einen Anstieg des Serum-EPO's durch Konstriktion der Nierenarterien beim Hund zeigen konnten. Man setzte dies mit den ebenfalls erhöhten Werten von Prostaglandinen in Verbindung, welche über Stimulierung der Adenylatzyklase einen Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration verursachen und die EPO-Produktion auslösen sollten (Mujovic und Fisher 1974; Gross et al. 1976). Sowohl die Gabe von PGE_2 , PGA_2 oder Indometacin, als Prostaglandin-Synthese-Hemmstoff, führten zu einer Erhöhung des Plasma-Erythropoetins (Halvorsen et al. 1968). Mulcahy et al. beschreiben, dass exzessives Tumorwachstum mit einem immensen Anstieg verschiedener Zytokine im Serum einhergeht, was die Synthese von EPO blockiert (Mulcahy 2001). Dies könnte häufig beobachtete chronische Anämien bei Tumorleiden erklären.

Ein weiterer Ansatz wäre eine stoffwechselabhängige, energiebezogene Theorie. Da proximale Tubuluszellen nicht in der Lage sind, anaerobe Energiegewinnung zu betreiben, wurde Adenosin als energiebilanzabhängiger Transmitter diskutiert. Abhängig vom O_2 -Angebot und von der Stoffwechselleistung der Niere ist nämlich v.a. die Adenosinproduktion. So berichteten Schooley und Mahlmann über eine vermehrte EPO-Produktion unter Adenosin-Gabe (Schooley und Mahlmann 1975). Weitere Studien lassen allerdings erhebliche Zweifel an dieser Theorie aufkommen, denn Theophyllin als unspezifischer Adenosin-Rezeptor-Antagonist erhöhte wider Erwarten die EPO-Produktion (jedoch ohne statistische Signifikanz; Gleiter et al. 1996). Erklärbar wird dies jedoch, wenn man bedenkt, dass Theophyllin durch präsynaptische Hemmung der Adenosinrezeptoren eine stärkere Noradrenalinfreisetzung bewirkt (Hedqvist et al. 1978), welche wiederum zu einer Reninsekretion führen kann. Tatsächlich gibt es Hinweise darauf, dass die Injektion von Reninsubstrat einen Anstieg der EPO-Konzentration verursacht (Gould et al. 1980).

Fisher et al. zeigten einen Anstieg der EPO-Konzentration nach Angiotensin-Infusionen bei Hunden (Fisher et al. 1967). Angiotensin II ist ebenfalls in der Lage, die

Katecholaminausschüttung über präsynaptische sympathoadrenerge Neurone zu steigern (Mutschler und Schäfer-Korting 1996).

So ist es denkbar, dass die Niere selbst einen regulatorischen Einfluss auf die EPO-Produktion hat, nämlich über Perfusion beeinflussende Komponenten des Renin-Angiotensin-Systems (RAS). Dazu passt auch der Befund, dass sich durch Gabe von ACE-Hemmstoffen eine Reduktion der EPO-Serumkonzentration und eine Reduktion der Erythrozytose bei Nierentransplantierten mit Posttransplantationserythrozytose erreichen lässt (Gleiter 1996).

Anlage 2

Beschreibung des Renin-Angiotensin-Systems (RAS) und des Angiotensin - II₁ - Rezeptors

Das RAS ist ein sehr wirksames Instrument des Organismus, die Na⁺-Ausscheidung und den Blutdruck zu beeinflussen. Aus Angiotensinogen (Bildung in der Leber) wird unter dem Einfluss von Renin (Bildung in der Macula densa, Niere, v.a. abhängig von der Na⁺-Konzentration im Blutplasma und vom Blutdruck) Angiotensin I, aus welchem mit Hilfe des Angiotensin-Konversionsenzym (ACE) durch Abspaltung von zwei weiteren Aminosäuren (AS) Angiotensin II gebildet wird. Schließlich wird mittels Angiotensin II die Ausschüttung von Aldosteron aus der Neben-Nieren-Rinde (NNR) gesteuert.

Angiotensin II wirkt über eine direkte Stimulation seiner Rezeptoren an den glatten Muskelzellen von Blutgefäßen. Hier wird über eine intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrations-Erhöhung und Aktivierung der Proteinkinase C eine Vasokonstriktion ausgelöst (Fischer et al. 1994). Ferner wird auch eine Erleichterung der Noradrenalinfreisetzung an sympathischen Nervenendigungen, eine Steigerung des Durstgefühls und damit verbunden, die Ausschüttung von Hypophysenhormonen und ein direkter Einfluss auf die Osmokontrolle durch „zentralnervöses“ Angiotensin II diskutiert (Chung et al. 1999). Man unterscheidet zwei Subtypen von Angiotensin-II-Rezeptoren, über welche die Wirkung von Angiotensin vermittelt wird (Mutschler und Schäfer-Korting 1996).

Am besten kennen wir die Bedeutung des Angiotensin-II-Rezeptors, Subtyp1 (AT-II₁-Rezeptor). Dieser membranständige, zelluläre Angiotensinrezeptor ist G-Protein gekoppelt und befindet sich v.a. im Gefäßsystem, Gehirn, Herz, Nieren und Nebennieren, sowie in der Leber und im Darm. Wichtige Wirkungen von Angiotensin II kommen durch Stimulierung dieses AT-II₁-Rezeptors zustande, wie z.B. Vasokonstriktion, Aldosteron-Sekretion, ein Einfluss auf die kardiale Kontraktilität und auf die glomeruläre Filtration sowie die Stimulation des Zellwachstums (Chung et al. 1999).

Über den vor allem im ZNS lokalisierten Angiotensin-II-Rezeptor, Subtyp2, ist bisher wenig bekannt. So weiß man, dass er über einen noch nicht geklärten Mechanismus Einfluss auf das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung nimmt. Er ist vor allem auch in fetalem Gewebe zu finden (Timmermans et al. 1992).

9. Literatur

ABBRECHT PH and LITTELL JK (1972): *Plasma erythropoietin in men and mice during acclimatisation to different altitudes.*

J Appl Physiol 32: 54 – 58

ADAMSON JW and FINCH CA (1975): *Haemoglobin function, oxygen affinity and erythropoietin.*

Annu Rev Physiol 37: 351 – 369

BACHMANN S, Le HIR M, ECKARDT KU (1993): *Co-localization of erythropoietin mRNA and ecto-5'-nucleotidase immunoreactivity in peritubular cells of rat renal cortex indicates that fibroblasts produce erythropoietin.*

J Histochem Cytochem 41: 335 – 341

BAKRIS GL, SAUTER ER, HUSSEY JL et al. (1999): *Effects of theophylline on erythropoietin production in normal subjects and in patients with erythrocytosis after renal transplantation.*

N Engl J Med 323: 86-90

BERT P: *La Pression Barométrique. Recherches de Physiologie Expérimentale*, Paris: Masson, Paris 1878

BERT P (1882): *Sur la richesse en hémoglobine du sang des animaux vivant sur les hautes lieux*

C.R. Acad Sci Paris 94: 805 – 807

CARNOT C, de FLANDRE C (1906) : *Sur l'activité hémopoïétique du sérum au cours de la régénération du sang.*

CR Acad Sci Paris 143: 432 – 435

CHANDRA M, CLEMONS GK, M^oVICAR MI (1988) : *Relation of serum erythropoietin levels to renal excretory function: evidence for lowered set point for erythropoietin production in chronic renal failure.*

J Pediatr 113: 1015 – 1021

CHUNG O, STOLL M, UNGER T (1999): *Mögliche therapeutische Vorteile einer selektiven Blockade des Angiotensin II AT1-Rezeptors.*

DU BOIS, DU BOIS (1916): *A formula to estimate the approximate surface area if height and weight be known.* Arch Intern Med, Chicago 17 : 863 - 871

ECKARDT KU, BOUTELIER 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

ECKARDT KU, DITTMER J, NEUMANN R , BAUER C, KURTZ A (1990): *Decline of erythropoietin formation at continuous hypoxia is not due to feedback inhibition.*

Am J Physiol 258 (Renal Fluid Electrolyte Physiol 27): F1432 – F1437

ECKARDT KU, PUGH CW, RATCLIFFE PJ, KURTZ A (1993): *Oxygen dependent modulation of erythropoietin mRNA in rat hepatocytes in vitro.*

Pflügers Arch 423: 356 – 364

ERSLEV AJ (1953): *Humoral regulation of red cell production.*

Blood 8: 349 – 357

FACHINFO LORZAAR (2005): *Fachinfo Nr.: 7121 – x789 – Lorzaar – n,*
MSD CHIBROFARM GMBH, Lindenplatz 1, 85540 Haar

FACHINFO NACL 0,9% (2008): *Fachinfo Nr.: 005097-y768 – isotone Natriumchloridlösung 0,9% Braun-a*, B. BRAUN MELSUNGEN AG, Carl-Braun-Srasse 1, 34209 Melsungen

FACHINFO PARTUSISTEN (2003): *FachinfoNr.:7335-v877–Partusisten-a*, BOEHRINGER INGELHEIM PHARMA KG & Co. KG, Binger Strasse 173, 55216 Ingelheim

FACHINFO STEROFUNDIN (2001): *Fachinfo Nr.: 006108-z931 - Sterofundin HEG-5-a*, B. BRAUN MELSUNGEN AG, Carl-Braun-Srasse 1, 34209 Melsungen

FISCHER ND, ALLAN D, KIFOR I, GABOURY CL, WILIAMS GH, MOORE T J, HOLLENBERG N K (1994): *Responses to converting enzyme and renin inhibition. Role of angiotensin II in humans.* J Hum Hypertension 23: 44 – 51

FISHER JW (1997): *Erythropoietin: Physiologic and Pharmacologic Aspects*
Proc Soc exp biol med.
216: 3; 358 – 369

FISHER JW, SAMUELS AI (1967): *Relationship between renal blood flow and erythropoietin production in dogs.*
Proc Soc Exp Biol Med 125: 482 – 485

FISHER JW, SAMUELS AI, LENGSTON JW (1967): *Effects of angiotensin and renal artery constriction on erythropoietin production.*
J Pharmacol Exp Ther 157: 618 – 625

FUKUSHIMA Y, FUKUDA M, YOSHIDA K, YAMAGUCHI A, NAKAMOTO Y, MIURA AB., HARADA T, TSUCHIDA S (1986): *Serum erythropoietin levels and inhibitors of erythropoiesis in patients with chronic renal failure.*

Tohoku J Exp Med 150: 129 – 140

GLEITER C H (1996): *Posttransplant erythrocytosis: A model for the investigation of the pharmacological control of renal erythropoietin production ?*

Int J Clin Pharmacol Ther 34: 489 – 492

GLEITER CH, FREUDENTHALER S, DELABAR U, ECKARDT KU, MÜHLBAUER B, GUNDERT-REMY U, OSSWALD H (1996): *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, BECKER T, WENZEL J (1997a): *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, BECKER T, SCHREEB KH, FREUDENTHALER S, GUNDERT-REMY U (1997b): *Fenoterol but not dobutamine increases erythropoietin production in humans.*

Clin Pharmacol Ther 61: 669 – 676

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

GOLDBERG MA, DUNNING SP, BUNN HF (1988): *Regulation of the erythropoietin gene: evidence that the oxygen sensor is a heme proteine.*

Science Wash DC 242: 1412 – 1415

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

GROSS DM, MUJOVIC MV, JUBIZ W, FISHER JW (1976): *Enhanced erythropoietin and prostaglandin E production in the dog following renal artery constriction.*

Proc Soc Exp Biol Med 151: 498 – 501

HALVORSEN S, ROTH BL, FISHER JW (1968): *Erythropoietin production in Nephrectomized and hypophysectomized animals.*

Am J Physiol 215: 349 – 352

HEBBE RP, EATON JW, KRONENBERG RS, ZANJANI ED, MOORE LG, BERGER EM (1978): *Human llamas. Adaptation to altitude in subjects with high hemoglobin oxygen affinity.*

J Clin Invest 62: 593 – 600

HEDQVIST P, FREDHOLM BB, ÖLUNDH S (1978): *Antagonistic effects of theophylline and adenosine on adrenergic neuroeffector transmission in the rabbit kidney.*

Circ Res 43: 592 – 598

HEINZEL G, WOLOSZAK R, THOMANN P: Topfit Version 2.0; *Pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis system for the PC* Gustav Fischer Verlag, Stuttgart 1993

ILAN Y, DRANITZKI-ELHALLEL M, RUBINGER D, SILVER J, POPOV-TZER MM (1994): *Erythrocytosis after renal transplantation. The response to theophylline treatment.*

Transplantation 57(5); 661 – 664

JACOBS K, SHOEMAKER C, RUDERSDORF R, NEILL SD, KAUFMAN RJ, MUFSON A, SEEHRA J, JONES SS, HEWICK R, FRITSCH EF, KAWAKITA M, SHIMIZU T, MIYAKE T (1985): *Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin.*

Nature 313: 806 – 810

JACOBSON LO, GOLDWASSER E, FRIED W, PLAZAK L (1957): *Role of the kidney in erythropoiesis*

Nature Lond 179: 633 – 634

JELKMANN W (1992): *Erythropoietin: Structure, control of production and function*

Physiolog Rev 72: 449 – 470

JELKMANN W (2004): *Molecular biology of erythropoietin.*

Intern Med 43, 646 – 659

KAZAL L, ERSLEV AJ (1975): *Erythropoietin production in renal tumors.*

Ann Clin Lab Sci 5: 98 – 109

KEW MC, FISHER JW (1986): *Serum erythropoietin concentrations in patients with hepatocellular carcinoma.*

Cancer 58: 2485 – 2488

KOURY M J, BONDURANT MC (1988): *Maintenance by erythropoietin of viability and maturation of murine erythroid precursor cells.*

J Cell Physiol 137: 65 – 74

KRANTZ SB (1991): *Erythropoietin*
Blood 77: 419 – 434

KRUMDIECK N (1943): *Erythropoietic substance in a serum of anemic animals.*
Proc Soc Exp Biol Med 54: 14 – 17

LA COMBE C, DA SILVA JL, BRUNEVAL P, FOURNIER JG, WENDLING F, CASADEVALL N, CAMILLERI JP, BARIETY J, VARET B, TAMBOURIN P (1988): *Peritubular cells are the site of erythropoietin synthesis in the murine hypoxic kidney.*
J Clin Invest 81: 620 – 623

LIN FK, SUGGS S, LIN CH, BROWNE JK, SMALLING R, EGRIE JC, CHEN KK, FOX GM, MARTIN F, WASSER Z (1985): *Cloning and expression of the human erythropoietin gene.*
Proc Natl Acad Sci U S A 82: 7580 – 7584

MIESCHER F (1893): *Über die Beziehung zwischen Meereshöhe und Beschaffenheit des Blutes.*
Corresp Bl Schweiz Aerzte 23: 809 – 830

MILLER ME, RÖHRT M, PARVING HH, HOWARD D, REDDINGTONJ, VALERI CR, STOHLMAN F (1973): *pH effect on erythropoietin response to hypoxia.*
N Engl J Med 288: 706 – 710

MILLER ME, CRONKITE EP, GARCIA JF (1982): *Plasma levels of immunoreactive erythropoietin after acute blood loss in man.*
Br J Haematol 52: 545 – 549

MIYAKE T, KUNG CKH, GOLDWASSER E (1977): *Purifikation of human erythropoietin.*
J Biol Chem 252: 5558 – 5564

MUJOVIC VM, FISHER JW (1974): *The effects of indomethacin on erythropoietin production in dogs following renal artery constriction. I. The possible role of prostaglandines in the generation of erythropoietin by the kidney.*

J Pharmacol Exp Ther 191: 575 – 580

MULCAHY L (2001): *The erythropoietin receptor.*

Sem Oncol 28: 2 Suppl. 8: 19 – 23

MUTSCHLER E, SCHÄFER-KORTING M: *Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie.*

7. Auflage; Wissenschaftliche Verlag Gesellschaft mbH, Stuttgart 1996, 567

NATHAN DG, SCHUPAK E, STOHLMAN FJr., MERRIL JP (1964) *Erythropoiesis in anephric man.*

J Clin Invest 43: 2158 – 2165

SANDOR G (1932): *Über die blutbildende Wirkung des Serums von Tieren, die in verdünnter Luft gehalten wurden*

Z Gesamte Exp Med 82: 633 – 646

SAWYER ST (1990): *Receptors for erythropoietin. Distributionstructure, and role in receptor-mediated endocytosis in erythroid cells. In:*

Harris Jr Ed Blood Cell Biochemistry, Plenum New York, Vol. I: 365 – 402

SAWYER ST, KRANTZ SB, GOLDWASSER E (1987): *Binding and receptor-mediated endocytosis of erythropoietin in Friend virus-infected erythroid cells,*

J Biol Chem 262: 5554 – 5562

SCHMIDT RF: *Memorix spezial – Physiologie*

1. Auflage, VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim 1992, 261

SCHOOLEY JC, MAHLMANN LJ (1975): *Adenosine, AMP, cyclic AMP, theophylline and the action and production of erythropoietin.*

Proc Soc Exp Biol Med 150: 215 – 219

SEMANZA GL (2007): Regulation of Tissue Perfusion by Hypoxia-Inducible Factor 1

Exp Physiol 92.6: 988 - 991

SEMANZA G L, WANG GL (1992): *A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds the human erythropoietin gene enhancer at site required for transcriptional activation.*

Mol Cell Biol 12: 5447

SEMANZA GL, AGANI F, BOOTH G, FORSYTHE J, IYER N, JIANG BH, LEUNG S, ROE R, WIENER C, YU A (1997): *Structural and functional analysis of hypoxia-inducible factor 1.*

Kidney Int 51: 553 – 555

TIMMERMANS PB, CHIU AT, HERBLIN WF, WONG PC, SMITH RD (1992): *Angiotensin II receptor subtypes.*

Am J Hypertens (suppl 6, pt1): 406 – 410

UENO M, BROOKINS J, BECKMANN B, FISCHER JW (1988): *A1 and A2 adenosine receptor regulation of erythropoietin production.*

Life Sci 43: 229 – 237

WIDE L, BENGTSSON C, BIRGEGARD G (1988): *Circadian rhythm of erythropoietin in human serum.*

Br J Haematol 72: 85 – 90

ZANJANI ED, ASCENSAO JL, M^cGLAVE BP, BANISADRE M, ASH RC (1981): *Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production.*

J Clin Invest 67: 1183 – 1188