

**Der vasodilatatorische Effekt der Aminosäure
L-Arginin - Stereospezifität und Insulinabhängigkeit**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
Bonn

Ingo Ochlast
Köln

2005

Angefertigt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. med. K. von Bergmann
2. Gutachter: Prof. Dr. med. L. Schmetterer

Tag der Mündlichen Prüfung: 07.10.2005

Abteilung für Klinische Pharmakologie, Universität Bonn
Prof. Dr. med. K. von Bergmann

Ich widme die Dissertation meiner Oma Gertrud Ochlast

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	7
I.1	HISTORISCHES	7
I.2	ANATOMIE DER OKULÄREN HÄMODYNAMIK	8
I.2.1	<i>Das retinale Gefäßbett</i>	9
I.2.2	<i>Das uveale Gefäßbett</i>	10
I.3	OKULÄRE HÄMODYNAMIK UND MECHANISMEN DER REGULATION	11
I.3.1	<i>Strömungsphysiologische Grundlagen</i>	12
I.3.2	<i>Systemische Faktoren – Innervation</i>	13
I.3.3	<i>Insulin – systemische versus lokale Modelle der Einflussnahme auf die okuläre Hämodynamik</i>	14
I.3.4	<i>Einfluss von Sauerstoff und CO₂ auf die retinale und choroideale Autoregulation</i>	15
I.3.5	<i>Humoral-hormonelle Faktoren und Mediatoren benachbarter Zellen</i>	15
I.3.6	<i>Autoregulation und Reaktionen auf metabolische Veränderungen</i>	16
I.3.7	<i>Basale Freisetzung von Stickoxiden</i>	17
I.4	VOM L-ARGININ ZUM NO	17
I.4.1	<i>L-Arginin als Precursor der NO-Synthese</i>	17
I.4.2	<i>Unterformen und Vorkommen der NO-Synthetase</i>	20
I.4.3	<i>Aufbau und Funktion</i>	22
I.4.4	<i>Aktivatoren, Inhibitoren, Halbwertszeit und Abbau</i>	23
I.4.5	<i>Analoga</i>	24
I.4.6	<i>Biologische Effekte der NOS</i>	25
I.4.7	<i>Nebenwirkungen</i>	26
I.5	ZIEL DER STUDIE	27
II	MATERIAL UND METHODEN	29
II.1	DESIGN	29
II.2	PROBANDEN	30
II.2.1	<i>Randomisierung</i>	30
II.2.2	<i>Auswahl der Probanden</i>	30
II.2.3	<i>Anzahl der Probanden</i>	30
II.2.4	<i>Voruntersuchungen</i>	31
II.2.5	<i>Einschlusskriterien</i>	31
II.2.6	<i>Ausschlusskriterien</i>	32
II.3	STUDIENMEDIKATION	33
II.3.1	<i>Dosis und Art der Verabreichung</i>	33

II.3.2	<i>Hintergrund der Dosierungen</i>	35
II.3.3	<i>Probandenaufgaben</i>	36
II.3.4	<i>Beschreibung der Studientage</i>	36
II.4	EVALUIERUNGSMETHODEN	40
II.4.1	<i>Definition der Variablen</i>	40
II.4.2	<i>Euglykämischer Clamp</i>	40
II.4.3	<i>Laserinterferometrische Messung der Funduspulsationen</i>	41
II.4.4	<i>Doppler-Sonographie der Arteria ophthalmica</i>	42
II.4.5	<i>Nicht-invasive Messung der systemischen Hämodynamik</i>	43
II.4.6	<i>Renaler Plasma- und Blutfluss (PAH-Messung)</i>	43
II.4.7	<i>Glomeruläre Filtrationsrate (Inulinmethode)</i>	44
II.4.8	<i>L-Arginin Messung im Plasma</i>	44
II.4.9	<i>Messung der Plasmawerte</i>	44
II.5	RISIKO-NUTZEN-ABWÄGUNG	45
II.6	UNERWÜNSCHTE EREIGNISSE.....	45
II.6.1	<i>Definition der «ernsten» und «nicht-ernsten» unerwünschten Ereignisse</i>	46
II.6.2	<i>Dokumentation der unerwünschten Ereignisse</i>	46
II.6.3	<i>Einschätzung des Schweregrades und Beziehung zur Studienmedikation</i>	47
II.7	STATISTISCHE DATENANALYSE.....	48
II.8	ETHISCHE UND LEGALE ASPEKTE.....	48
II.8.1	<i>Aufklärung der Probanden</i>	48
II.8.2	<i>Genehmigung</i>	48
II.8.3	<i>Versicherung</i>	49
III	ERGEBNISSE	50
III.1	STUDIE I.....	50
III.2	STUDIE II.....	51
IV	DISKUSSION	60
V	ZUSAMMENFASSUNG	69
VI	ABKÜRZUNGEN	70
VII	LITERATURVERZEICHNIS	72
VIII	DANKSAGUNG	91

I Einleitung

I.1 Historisches

Anfang der achtziger Jahre bemerkte die Forschergruppe Furchgott u. Zawadski, dass trotz der stark ausgeprägten vasodilatatorischen Eigenschaften von Acetylcholin *in vivo*, an isolierten Blutgefäßpräparationen es nicht immer zu einer Relaxation kam. Sie bemerkten, dass während der Herstellung der Blutgefäßpräparate unabsichtlich hierbei die Intimaoberfläche verletzt wurde. Jedoch bei vorsichtiger Präparation, ohne die Intima zu berühren, reagierten alle Gefäße mit einer Vasodilatation bei ACh-Gabe. Furchgott & Zawadski folgerten, dass daher ein intaktes Endothel für die Acetylcholin-induzierte Dilatation glatter Muskelzellen nötig sei. Weiter postulierten sie, dass es einen Überträgerstoff gäbe, der diesen Effekt auszulöse und nannten ihn «EDRF - Endothelium Derived Relaxing Factor» (Furchgott et al 1980).

Sieben Jahre später entdeckte die selbe Forschergruppe zeitgleich mit anderen Forschergruppen, dass es sich bei diesem Überträgerstoff um nichts anderes handelte, als um NO - Stickstoffmonoxid, ein farbloses, anorganisches Gas, hochreaktiv und toxisch, das an Gewebe starke Schäden verursacht und ursächlich für die Luftverschmutzung unserer Atmosphäre mitverantwortlich gemacht wird. Dennoch spielt NO eine essentielle Rolle in biologischen Prozessen. Diese Entdeckung im Jahre 1987 erklärt, warum Nitroglycerin und andere organische Nitrate so wirksam sind bei der Behandlung von Angina pectoris und Herzinfarkt – durch Metabolisierung zu NO. Damit war ein fast hundert Jahre altes Rätsel gelöst (Voet D. et al., 2003).

Frühere Studien kamen zum Schluss, dass in normalen Gefäßen anscheinend genügend endogenes L-Arginin vorhanden sei für die Sättigung der NO-Synthetase, da die Zufuhr zusätzlichen L-Arginins keine Vasorelaxation *in vitro* an präparierten Gefäßen und *in vivo* an Widerstandgefäßen verursachte (Amezcuca et al., 1989; Rees et al., 1989). Spätere Studien konnten ebenfalls diese Vasodilatation nachweisen: intra-arterielle Infusionen L-Arginins erhöhten dosisabhängig den Blutfluss und erniedrigten den Gefäßwiderstand im ipsilateralen Unterarm, ohne den Blutdruck zu beeinflussen.

D-Arginin hingegen hatte keinen Einfluss auf Blutdruck oder Gefäßwiderstand. Acetylcholin steigerte ebenfalls den Blutfluss und erniedrigte den Gefäßwiderstand im ipsilateralen Oberarm. Zusätzliche Infusionen L-Arginins mit Acetylcholin hatten einen potenzierenden Effekt. Imaizumi et al., postulierten, dass Acetylcholin Blutgefäße durch Umwandlung von L-Arginin in NO dilatiere (Imaizumi, 1992). Eine basale Sekretion von NO wurde zuerst an den Widerstandsgefäßen am Unterarm beschrieben, ist aber keineswegs einzigartig im Körper. Sie kommt in jedem arteriellen Gefäßbett vor, an dem bisher Studien durchgeführt wurden (inklusive renale, cerebrale, mesenteriale und kardiovaskuläre). Des weiteren verursacht die systemische Blockade (z.B. durch L-NMMA) auf der Stelle Hypertension (Haynes et al., 1993; Stamler et al., 1994). Es zeigte sich, dass NO für die Aufrechterhaltung eines normalen Blutdrucks in physiologischen Grenzen wichtig ist.

I.2 Anatomie der okulären Hämodynamik

Die Durchblutung im Auge wird über die A. ophthalmica, ein Ast der A. carotis interna gewährleistet. Nach Durchtritt durch den Canalis opticus und Eintritt in die Orbita, gibt sie mehrere Äste ab, wovon des weiteren nur die wichtigen Gefäßversorgungen für die posteriore arterielle Augendurchblutung näher erläutert werden. Nur diese waren für unsere Studie von Bedeutung.

Die arterielle Versorgung des Auges wird durch zwei eigenständige Gefäßsysteme, den retinalen und uvealen Schenkel, gewährleistet.

I.2.1 Das retinale Gefäßbett

Die A. centralis retinae tritt als Ast der A. ophthalmica, nach etwa 1.2 cm langem Verlauf im retrobulbären Raum, in den N. opticus ein. Sie wandert im optischen Nerven zu dessen Kopf, wo dessen Faszikel die Lamina cribrosa durchqueren. Hier im Discus nervi optici teilt sie sich in zwei gleiche Rami, zuerst in einen superioren und einen inferioren, bald danach wiederum in die superioren und inferioren nasalen und die superioren und inferioren temporalen Rami. Jeder der 4 Zweige versorgt seinen eigenen 'Quadranten' der Retina. Die Rami der Arterien teilen sich normalerweise dichotom auf, jeder in einen Winkel von 45-60°, dennoch zweigen gelegentlich kleinere Rami im rechten Winkel ab. Die Arteriolen dringen tiefer in die Retina ein, von wo aus Venulen zu größeren oberflächlicheren Venen zurückkehren. Zwischen diesen Gefäßen liegt ein dichtes Kapillarbett, diffus organisiert ohne ersichtliches Muster. Besonders zahlreiche retinale Kapillaren sind in der Macula zu finden, ausgespart von Gefäßen ist jedoch bekannter Weise die Fovea centralis. Die Gefäßdichte nimmt zunehmend in Richtung Peripherie ab, um in einem Abstand von 1.5 mm zur Ora serrata vollständig zu verschwinden. Verglichen mit der Choroidea ist das retinale Gefäßbett eher spärlich – ein offensichtlicher Vorteil für die Optik.

Die Struktur der Blutgefäße gleicht denen anderer Gefäße im Körper, bis auf das Fehlen der Lamina elastica interna und dass Muskelzellen in der Adventitia auftreten können. Die Kapillaren sind nicht gefenstert und zahlreiche murale Perizyten sind außerhalb des Endothels entlang der Gefäßachse verteilt.

Mikrozirkulationsstudien haben gezeigt, dass sich die 'Quadranten' nicht überlappen und auch die Rami untereinander nicht anastomisieren. Folglich führt der Verschluss eines Ramus zum Verlust der Sehkraft in dem korrespondierenden Quadranten. Die einzige Ausnahme bildet die Region um den optischen Nerven. Die hinteren Ziliararterien dringen hier, nahe dem Discus nervi optici, ins Auge ein und bilden in der Sklera den anastomisierenden Zinn'schen Kranz um den N. opticus. Von jeder Arterie in dieser Region kann eine kleine *cilioretinale Arterie* ins Auge eintreten und eine Anastomose mit einer retinalen Arterie bilden.

I.2.2 Das uveale Gefäßbett

Mit Tunica vascularis (Uvea) bezeichnet man die Choroidea, Corpus ciliaris und Iris – eine sie bildende kontinuierliche Struktur. Die Choroidea bedeckt die innere Oberfläche der Sklera und reicht nach ventral bis zur Ora serrata.

Die Choroidea ist ein dünnes, hochvaskuliertes Gewebe, das mit der äußeren Oberfläche locker der Sklera durch die Lamina suprachoroidealis (Lamina fusca) anhaftet und mit dem retinalen Pigmentepithel fest verbunden ist.

Die Choroidea besteht weitestgehend aus einem dichten Kapillarplexus kleiner Arterien und Venen und besteht aus 4 Schichten (von außen nach innen)

1. Die *Lamina suprachoroidea*, die äußere, lockere Verschiebeschicht zur Sklera
2. *Lamina vasculosa*, sie enthält die terminalen Enden der kurzen hinteren Ziliararterien
3. intermediäre *Lamina capillaris (choroideocapillaris)*, bestehend aus einem Maschenwerk großer, einschichtiger und gefensterter Haargefäße von jeweils 8-15 µm Durchmesser, deren Maschen sich gegen den Ziliarkörper zunehmend weiten. Sie sind durchlässig für Plasmaproteine bis zu einer Größe von γ -Globulinen (150.000 – 385.000 Dalton), was vermutlich notwendig ist, um den hohen Bedarf der Retina an Vitamin A (Retinol) zu decken. Dieses kann nur mit Hilfe des großen Retinol-bindenden Proteins die Retina erreichen (Foulds et al., 1990).
4. eine dünne *Lamina basalis (Bruch'sche Membran)*, bestehend aus elastischen und kollagenen Fasern, grenzt die äußere choroideocapillaris von der Basalmembran der innen liegenden retinalen Pigmentzellschicht ab.

Das uveale Gefäßsystem versorgt Iris, Corpus ciliare und Choroidea und wird gespeist aus den Ziliararterien. Die Aa. ciliares posteriores breves et longae durchbohren gemeinsam um den N. opticus herum die Sklera. Die zwei Aa. ciliares posteriores longae ziehen entlang des Augenäquators von medial und lateral jeweils nach anterior und bilden zusammen mit den Aa. ciliares anteriores, aus den Rr. musculares der Mm. recti laterales et mediales, den Circulus arteriosus iridis major. Die Aa. ciliares posteriores versorgen folglich die Iris, den Corpus ciliare und mit ihren Ästen an der Ora serrata, zusammen mit rekurrenten Zweigen aus den anterioren Ziliararterien, den anterioren Teil der Lamina choroideocapillaris. Die Aa. ciliares posteriores breves teilen

sich nach dem Skleradurchtritt rasch in ein dichtes System feinsten Gefäße auf und bilden den posterioren Anteil der Lamina choroideocapillaris. Zweige der kurzen posterioren Ziliararterien formen den Zinn'schen Gefäßkranz um die optische Sehnervenplatte, ein arterielles Netzwerk auf dem N. opticus.

I.3 Okuläre Hämodynamik und Mechanismen der Regulation

Im Gegensatz zu den avaskulären Strukturen des Auges – Kornea, Linse und Glaskörper, die durch Diffusion ernährt werden, sind die anderen Strukturen auf eine Nährstoffversorgung durch Gefäße angewiesen.

Wie schon erwähnt, wird die Retina durch zwei getrennte Gefäßbetten versorgt, das innere retinale und äußere choroideale. Dennoch unterscheiden sie sich sowohl anatomisch als auch physiologisch substantiell voneinander: im choroidealen Gefäßsystem herrscht ein hoher Blutfluss, er umfasst 85% des totalen okulären Blutflusses und dient wahrscheinlich der Thermoregulation des Auges. Dennoch liegt die Sauerstoffextraktion nur bei 3-4%. Der hohe Blutfluss in der Choroidea wird ermöglicht durch den niedrigen Gefäßwiderstand in den choroidealen Kapillaren. Verglichen dazu ist die retinale Blutzirkulation charakterisiert durch einen niedrigen Blutfluss bei hoher Sauerstoffextraktionsrate – die arteriovenöse Differenz der Sauerstoffsättigung liegt hier bei ungefähr 40%.

Um den hohen Nährstoffbedarf der metabolischen Prozesse zu decken, bedürfen die Gefäße einer guten Regulation. Systemische Faktoren wie zirkulierende Hormone und die neural-autonome Innervation sind verantwortlich für die allgemeine Verteilung des Herzzeitvolumens auf die verschiedenen Gefäßbetten der Körpers, während lokale Faktoren wie pO₂, pCO₂ und pH den lokalen Blutfluss an die aktuellen lokalen Anforderungen adaptieren. Das retinale Gefäßbett, das über keine autonome Innervation verfügt, wird von lokalen Faktoren beeinflusst, wohingegen die Choroidea, die ein innerviertes Gewebe ist, im besonderem Maße durch das autonome Nervensystem moduliert wird (Steinle et al., 2000; Steinle et al., 2000A; Zagvazdin et al., 1996).

I.3.1 Strömungsphysiologische Grundlagen

Das *Ohmsche Gesetz*, gültig für den Gesamtkreislauf und Teilkreisläufe, besagt, dass der Blutfluss (F) durch ein Gefäßbett abhängig ist von der Druckdifferenz (ΔP) über dem Gefäßbett und dem Strömungswiderstand (R), der in diesem Gefäßsystem herrscht. Des weiteren beschreibt das *Hagen-Poiseuillsche Gesetz*, dass der Strömungswiderstand in Röhren abhängig ist von der Viskosität (η) der Flüssigkeit, der Länge (L) der Röhre und der vierten Potenz des Röhrenradius r^4 ($R = 8\eta L/\pi r^4$).

Kombiniert man beide, erhält man folgende Beschreibung des Blutflusses (F):

$$F = \Delta P / R \quad F = \frac{\Delta P \cdot \pi \cdot r^4}{8 \cdot \eta \cdot L}$$

Im folgenden möchte ich nur kurz auf die einzelnen Komponenten eingehen.

Der *Perfusions-Druckgradient* (ΔP) im okulären Kreislauf lässt sich näherungsweise angeben als 2/3 des mittleren arteriellen Blutdrucks minus intraokulärem Druck (Strauss et al., 1987).

Die *Blutviskosität* bei niedrigem Blutfluss ist auf Grund des »Rouleauxschen Effektes« der Erythrozyten hoch, kann aber teilweise durch den »Fåhräus-Lindqvist-Effekt« kompensiert werden (Erythrozyten schwimmen zentral im Blutstrom). Steigt die Viskosität zu sehr an, kann es zur Blutstase kommen. Luxenberg und Knaben haben nachgewiesen, dass die retinale Perfusion tatsächlich erniedrigt ist bei Patienten mit Hyperviskositätssyndromen und sich normalisieren ließ durch Korrektur der Hyperviskosität. Änderungen der *totalen Länge* des vaskulären Bettes, z.B. durch Kontraktion präkapillärer Sphinkter, hat sich als unwichtig erwiesen bei der Regulation der okulären Zirkulation (Knabben et al., 1995; Luxenberg et al., 1970).

Die Änderung des Gefäßdurchmessers hat einen entscheidenden Einfluss auf den Blutfluss durch die okulären Gefäße. Die lokalen und systemischen Faktoren, die in diese Regulation mit reinspielen, werden im folgenden im Detail erläutert.

I.3.2 Systemische Faktoren – Innervation

Das Auge verfügt über eine reichhaltige autonome Innervation. Sympathische Nerven erreichen das Auge via Ganglion cervicale superior, Plexus carotideus internus und schließlich Nn. ciliares longi et breves. Parasympathische Afferenzen gelangen zum Auge über den N. trigeminus via Ganglion ciliare, über den N. Fazialis, N. ophthalmicus und N. maxillaris des N. trigeminus. Dennoch enden die Nerven an den Gefäßen der Uvea und den extraokulären Teilen der retinalen Blutgefäße – das retinale Gefäßbett ist weder adrenerg (Latties et al., 1967), cholinerg (Ferrari-Dileo et al., 1989) noch peptiderg (Ye et al., 1990) innerviert (Pernkopf et al., 1987).

Verschiedene Studien haben gezeigt, dass die uveale Vasodilatation durch Stimulation des N. oculomotoricus (Stjernerchantz et al., 1979), N. Fazialis und der maxillären und ophthalmicalen Äste des N. trigeminus (Stjernerchantz et al., 1979) hervorgerufen werden kann. Es wurden VIP-(vasoaktives intestinales Polypeptid)-immunreaktive Nerven in der Choroidea gefunden (Flugel et al., 1994), die auf eine mögliche Beteiligung von VIP an der Vasodilatation schließen lassen (Delaey et al., 2000), zumal der vasodilatatorische Effekt durch nervale Stimulation des N. Fazialis zumindest teilweise resistent ist auf muskarinerge Blockade (Stjernerchantz et al., 1980). Des Weiteren fanden Butler und Ruskel am Tiermodell heraus, dass nach pterygopalatinum Schaden der VIP-Spiegel in der Choroidea dramatisch abfällt und vermuteten, dass nach Fazialisstimulation VIP als Mediator der uveale Vasodilatation fungiert (Butler et al., 1984). Zusätzlich sind die postganglionären Neurone immunreaktiv auf PACAP (hypophysäres Adenylatzyklase-aktivierendes Polypeptid) (Elsas et al., 1996), PHI (Peptidisches Histidin-Isoleucin) (Stone et al., 1987) und Stickstoffmonoxid-Synthetase (Roufail et al., 1995).

I.3.3 Insulin – systemische versus lokale Modelle der Einflussnahme auf die okuläre Hämodynamik

Der Mechanismus, über den Insulin zu einer Vasodilatation führt, ist immer noch nicht komplett geklärt. Es konnte ein direkter vasodilatatorischer Effekt, unabhängig vom Gewebemetabolismus *in vitro* (Yagi et al., 1988) und an isolierten Gefäßsegmenten *in vivo* (Feldman et al., 1993) nachgewiesen werden. Es wurde ein Anstieg des Blutflusses im Oberarm und Bein nach Infusion von Insulin beschrieben, ferner der Abfall des Gefäßwiderstandes im Bein (der größer ist als der Abfall des systemischen Gefäßwiderstandes), der Anstieg des Herzindex, aber keine Änderung des Blutdruckes (einzige Ausnahme beschrieben durch Rowe et al., 1981) während der akuten Phase der Hyperinsulinämie (Baron et al., 1993; Creager et al., 1985; Fisher et al., 1987; Gelfand et al., 1987; Kahn et al., 1993; Liang et al., 1982; Natali et al., 1990; Rowe et al., 1981; Vollenweider et al., 1993;). Ob die Insulin-vermittelte Vasodilatation 1.) durch den direkten Effekt des Insulins auf die glatte Muskulatur, 2.) auf indirektem Wege via Freisetzung endothelialer oder Gefäßwandmediatoren (NO, Adenosine), 3.) durch indirekte Effekte, gekoppelt an metabolische Aktivitäten oder 4.) durch Kombination all dieser vonstatten geht, ist letztendlich nicht geklärt. Steinberg et al. (Steinberg et al., 1999) wiesen auf eine starke Beteiligung von NO als lokal-vasodilatative Komponente hin, deren Freisetzung durch Insulin moduliert wird. Schmetterer et al. lieferten weitere Beweise dafür, dass die Insulin-induzierte Vasodilatation abhängig ist von Endothel-abhängigem NO. Sie beschrieben, dass Insulin zu einem Dosis-unabhängigen Anstieg des choroidealen Blutflusses und der mittleren Flussgeschwindigkeit (MFV) in der A. ophthalmica führte, während der retinale Blutfluss sich aber nicht signifikant änderte (Polak et al., 2000).

Applikation systemischer NO-Synthetase-Inhibitoren führten zu einem signifikanten Abfall des choroidealen Blutflusses, was die These der NO-Beteiligung stützt (Schmetterer et al., 1997).

In vitro Daten weisen darauf hin, dass der vasodilatatorische Effekt von Insulin in der Retina gleichfalls Stickstoffmonoxid-abhängig ist (Mann et al., 1995).

I.3.4 Einfluss von Sauerstoff und CO₂ auf die retinale und choroideale Autoregulation

Gelöste Gase im Blut nehmen eine Schlüsselrolle in der Autoregulation vieler Gefäßbetten ein – so auch im Auge. Dennoch divergieren die Reaktionen der einzelnen Gefäßbetten.

Die Inhalation 100%igen Sauerstoffes bewirkt eine Vasokonstriktion der retinalen Blutgefäße (Riva et al., 1983), wahrscheinlich Endothelin-vermittelt (Takagi et al., 1996), wohingegen fast kein Einfluss auf den choroidealen Blutfluss besteht (Kergoat et al., 1999). Obwohl weniger Sauerstoff die Retina während Inhalation 100%igen Sauerstoffes erreicht, bedingt durch die erniedrigte retinale Blutzirkulation bei Vasokonstriktion, wird dies ausgeglichen durch zusätzlichen Sauerstoff aus dem choroidealen Blutkreislauf.

Bei Hyperkapnie reagieren dagegen beide Gefäßbetten, retinale als auch choroideale, mit einer starken Vasodilatation (Friedmann et al., 1972 ; Harris et al., 1995). Man kann dies als lokale Adaption an lokal-metabolische Änderungen ansehen, ähnlich den cerebralen Blutgefäßen.

I.3.5 Humoral-hormonelle Faktoren und Mediatoren benachbarter Zellen

Neben diesen physikalisch-chemischen Veränderungen spielen auch andere Arten von Botenstoffe eine Transmitterrolle. An erster Stelle ist dabei das NO-System zu erwähnen, das hier an späterer Stelle ausführlicher erörtert wird.

Prostaglandine werden vom Endothel gebildet. Je nachdem können diese eine Vasokonstriktion aber auch Vasodilatation hervorrufen. Thromboxan A₂ und Prostaglandin H₂ z.B. verursachen Vasokonstriktion und Plättchenaggregation. Prostaglandine scheinen komplexe vasoregulatorische Einflüsse auf die Gefäße der Retina und Choroidea zu haben, ob dabei lokal gebildete Prostaglandine eine Rolle spielen, ist bisher unklar.

Die stärksten Vasokonstriktoren, produziert und freigesetzt von Endothelzellen, sind *Endotheline* – vasoaktive Polypeptide, die aber auch über vasodilatatorische Wirkungen verfügen. Man unterscheidet 3 Isoformen – Endothelin-1. Endothelin-2 und

Endothelin-3. Hiervon ist Endothelin-1 als Einziges vom Endothel produziert; es wird aus Präproendothelin und Proendothelin erzeugt, die Produktion wird stimuliert via Thrombin, transforming growth factor β , Interleukin-1, Vasopressin, Epinephrin und Angiotensin II. Inhibiert wird es durch Stickoxide und Prostazykline. Biochemisch agiert Endothelin über einen Phospholipase-C-abhängigen ET_B -Rezeptor und die sich daraus ergebende Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration. Endotheline werden in direkter Nachbarschaft von Gefäßmuskelzellen sezerniert. Endothelin-I reduziert, in Konzentrationen die keine systemischen Nebenwirkungen verursachen, den pulsatilen Blutfluss in der Choroidea und im Discus nervi optici gesunder Probanden (Luescher et al., 1990; Luescher et al., 1992).

Seit einigen Jahren ist die Existenz eines weiteren Faktors bekannt, der ebenfalls mit NO an der Vasodilatation beteiligt ist – EDHF »Endothelium-Derived Hyperpolarizing Factor« (Cohen et al., 1995). Dieser Faktor ist wahrscheinlich ein Epoxid der Arachidonsäure und wird durch eine Cytochrom P450-abhängige Monooxygenase erzeugt (Campbell et al., 1996). EDHF aktiviert insbesondere Kalzium-abhängige K^+ -Kanäle, die im Endeffekt über ein hyperpolarisiertes Membranpotential der glatten Gefäßmuskelzellen zu deren Relaxation führen (Cohen et al., 1995). Endotheliale Dysfunktion könnte daher ebenfalls mit Defekten des EDHF erklärt werden.

I.3.6 Autoregulation und Reaktionen auf metabolische Veränderungen

Wie erwähnt reagieren die Gefäße des retinalen Kreislaufes bei einem Anstieg des pCO_2 mit Vasodilatation, ferner erhöht sich die retinale Durchblutung bei gesteigertem Metabolismus (im Stroboskop-Test) (Kondo et al., 1997; Wang et al., 1997). Beides sind Adaptionen im Sinne von Autoregulationen an lokal-metabolische Bedürfnisse. Im Gegensatz dazu wird die choroideale Durchblutung nicht durch den retinalen Metabolismus beeinflusst, was durch ihren enorm hohen Blutfluss erklärbar ist. Selbst bei substantiellen Erniedrigungen des Blutflusses, hat dies keinerlei Effekt auf die Zusammensetzung der interstitiellen Flüssigkeit. Zu vermuten ist, dass die Bruch'sche Membran außerdem eine Art Barriere bildet, die verhindert, dass Metaboliten der Retina die Widerstandsgefäße der Choroidea erreichen (Delaey et al., 2000).

Allgemein wird Autoregulation definiert als »die Fähigkeit eines Gefäßbettes, dessen Blutfluss bei Änderungen des Perfusionsdrucks konstant zu halten oder als die Fähigkeit eines Gewebes, dessen Blutfluss den metabolischen Bedürfnissen anzupassen« (Johnson et al., 1986). Ausgehend davon müsste sich der retinale Gefäßwiderstand bei Änderung des retinalen Perfusionsdrucks dahin gehend verändern, dass ein dennoch konstanter Blutfluss gewährleistet bleibt – genau dies konnte beschrieben werden (Robinson et al., 1986).

Diverse andere Studien konnten jedoch keine autoregulatorischen Vorgänge in der Choroidea nachweisen, deuten aber darauf hin, dass sie über Mechanismen zur Aufrechterhaltung des Blutflusses bei Änderungen des Perfusionsdrucks verfügt (Alm et al., 1992; Friedman et al., 1970; Riva et al., 1997; Riva et al., 1997A).

I.3.7 Basale Freisetzung von Stickoxiden

Die Gefäßbetten der ophthalmologischen Zirkulation befinden sich in ständiger Vasodilatation, auf Grund basaler NO-Sekretion. Inhibitoren der Stickoxide induzieren an isolierten Retinaarterien, sowohl beim Schwein als auch beim Menschen, eine endothelabhängige Kontraktion. An perfundierten Schweineaugen reduziert L-NAME den Blutfluss um 40%. Eine basale NO-Sekretion und die damit verbundene Vasodilatation ist essentiell für die Aufrechterhaltung des lokalen Blutflusses und schützt vor krankhaften Veränderungen wie Plättchenaggregation oder Thrombenbildung (Meyer et al., 1993).

I.4 Vom L-Arginin zum NO

I.4.1 L-Arginin als Precursor der NO-Synthese

Die semi-essentielle Aminosäure Arginin (Arg, $C_6H_{14}N_4O_2$) ist eine basische Aminosäuren, die in zwei stereoisomeren Formen vorkommt, der L- und D- Form. Das L-Enantiomer spricht L-Arginin (Abk. für L-(+)-alpha-amino-delta-guanidinovalerinsäure, IUPAC) dient dem Körper als Substrat für verschiedene Stoffwechselwege; für uns vornehmlich von Interesse ist hierbei die NO-Synthese. Im »L-Arginin Nitric Oxide

Pathway« wird L-Arginin durch eine enzymkatalysierte Oxidationsreaktion in mehreren Zwischenschritten zu L-Citrullin und NO umgewandelt (Voet et al., 2004).

Diese Sauerstoff- und NADPH-abhängige Reaktion wird durch ein Enzym katalysiert, das wir »Stickstoffmonoxid-Synthetase« (NOS) nennen (Schmidt et al., 1994).

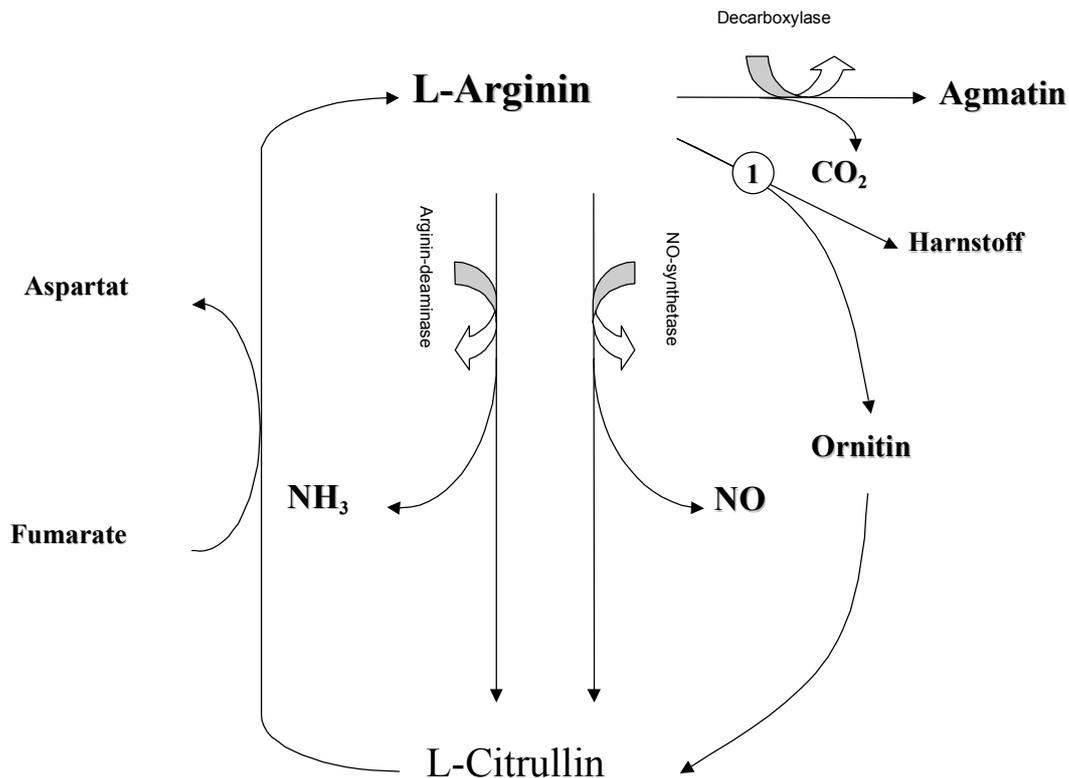


Abbildung 1 - Biosynthese von NO und schematische Metabolisierung von L-Arginin (1) L-Arginin wird durch die L-Arginase in L-Ornithin und Harnstoff konvertiert. Der Harnstoffzyklus und die Wiedergewinnung von L-Arginin aus Harnstoff sind nicht aufgezeichnet– (Böger et al., 2001)

L-Arginin ist überdies das Hauptsubstrat für die Entgiftung toxischen Ammoniaks (NH_3) im Körper. Der Harnstoffzyklus ist hierbei der einzige Weg – L-Arginin wird durch enzymatische Katalyse mit L-Arginase, unter Verbrauch von Ammoniak, zu L-Ornithin und Harnstoff konvertiert. Im weiteren Verlauf des Harnstoffzyklus wird es wieder zurückgewonnen (Voet et al., 2004). Das Nebenprodukt L-Ornithin wird dabei weiter umgewandelt in L-Citrullin, dient aber auch als Edukt zur Gewinnung wichtiger Polyamine, die für die Zellproliferation und –differenzierung von Nöten sind (Pegg et al.,

1986). Über einen anderen Stoffwechselzweig kann L-Arginin überdies durch Arginin-Decarboxylase zu CO_2 und Agmatin abgebaut werden (Ketteler et al., 1998). Die Funktion dieses Moleküls wurde bis heute nicht gänzlich geklärt. Agmatin ist selbst ein schwacher Inhibitor der NO-Synthetase; es könnte eine Art negativer Rückkopplungsmechanismus sein, über den bei ausreichend hohen NO-Spiegeln die weitere NO-Produktion durch Substratkompetition gedrosselt wird.

Die Homöostase des Plasmaspiegels an L-Arginin wird aufrechterhalten über exogene Zufuhr, endogene Produktion und Reutilisation sowie den Abbau und die enzymatische Verstoffwechslung. Exogenes L-Arginin wird mit der täglichen Nährstoffaufnahme zugeführt, es wird im Darm zügig und zum überwiegenden Teil resorbiert, über den γ^+ -Transporter für kationische Aminosäuren aktiv durch die Zellmembran transportiert und von den Enterozyten aktiv metabolisiert. Selbiger Transporter findet sich auch in der Niere, im dünnen Teil der aufsteigenden Henleschen Schleife sowie im proximalen Tubulus. L-Arginin wird hier nach renaler Filtration, folgend einer Sättigungskinetik, zu 99% reabsorbiert (Silbernagl et al., 1988; Young et al., 1971).

Bei der oralen Gabe von L-Arginin stellen 1 g zugeführten Proteins 54 mg (31.5 mmol) L-Arginin zur Verfügung. Bei einer durchschnittlichen Proteinaufnahme von 1.0 – 1.5 g/ Körpergewicht würde demnach ein 70 kg schwerer Mann etwa 3.8 – 5.7 g (21.7 – 32.6 mmol) pro Tag mit der Nahrung aufnehmen. Nur unter Ausnahmesituation wie z.B. in der Wachstumsperiode kann die nicht-essentielle Aminosäure L-Arginin hierbei den Status einer essentiellen Aminosäure erlangen (Rose et al., 1954).

Endogenes L-Arginin wird vornehmlich in der Niere aus L-Citrullin synthetisiert und stellt die Hauptquelle des systemischen Pools an L-Arginin dar. Zweiter Produktionsort von L-Arginin ist die Leber: hier wird L-Arginin vollständig im Harnstoffzyklus reutilisiert. Da dieser hepatische Anteil endogen synthetisierten L-Arginins aber fast vollständig zur Ammoniakdetoxikation heran gezogen wird, besteht eine fast vollständige Separation beider Pools (Watford et al., 1991). Eine zweite Möglichkeit der Reutilisation verbrauchten L-Arginins ist der »Arginin-Citrullin-Zyklus«. Hierbei wird L-Citrullin unter Beteiligung verschiedener Enzyme, die teilweise auch im Harnstoffzyklus vorkommen, zu L-Arginin remetabolisiert.

L-Arginin kommt im Blut in Konzentrationen von 40-90 μM vor und in Zellen im Bereich von 1 mM (MacAllister et al., 1995). Die Aminosäure hat die Aufmerksamkeit der Wissenschaft auf sich gezogen durch die Entdeckung, dass eines ihrer Stoffwechselprodukte – NO - ein wichtiges Messengermolekül ist für Prozesse der Neurotransmission, Vasodilatation, Entzündungsvorgänge und die Regulation der Genexpression. Dennoch stellt dieser Stoffwechselzweig nur einen kleinen Teil dar in der Gesamtheit der Metabolisierungswege von L-Arginin *in vivo*.

Derzeitige Studien und die vorliegende kommen zu der Annahme, das L-Arginin wahrscheinlich nicht Dosis-limitierend für die NO-Produktion ist, worauf ich zu einem späteren Zeitpunkt noch einmal näher eingehen möchte. L-Arginin führt in Bereichen von 10 mM zu vaskulären Reaktionen und zur Ausschüttung zahlreicher Hormone: Insulin, Glucagon, Wachstumshormone und Prolaktin. Diese Effekte sind nicht stereospezifisch, D-Arginin konnte derartige Veränderungen ebenfalls erwirken (Calver et al., 1991). Auf der anderen Seite stellt L-Arginin die vasodilatatorische Antwort auf Acetylcholin bei Patienten mit Hypercholesterinämie wieder her, diese Reaktion ist stereospezifisch.

1.4.2 Unterformen und Vorkommen der NO-Synthetase

Die Reaktion bei der NO und Citrullin als Reaktionsprodukte anfallen wird durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthetase katalysiert, wovon bisher 6 Formen entdeckt wurden, die genetisch unabhängig voneinander kodiert sind (Forstermann et al., 1991). Es wird unterschieden zwischen konstitutiven, Ca^{2+} -/ Calmodulin-abhängigen (cNOS) und induzierbaren NOS (iNOS, synonym NOS-II), die funktionell Ca^{2+} -/ Calmodulin-abhängig sind. Die konstitutiven NOS werden weiter unterteilt in neuronale (bNOS, synonym nNOS, NOS-I genannt) und endotheliale NOS (ecNOS, synonym NOS-III, eNOS genannt) (Lowenstein et al., 1994; Moncada et al., 1988; Moncada et al., 1989; Moncada et al., 1989A; Thomsen et al., 1994).

Die konstitutiven cNOS sind zu finden in den Zellen des Endokards und Myokards, Thrombozyten sowie Zellen des peripheren und zentralen Nervensystems.

Die wichtigste Hauptwirkung der ecNOS, hauptsächlich lokalisiert in endothelialen Zellen, ist die Kontrolle des vaskulären Tonus. Daneben beeinflusst sie aber auch die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten an den Blutgefäßwänden.

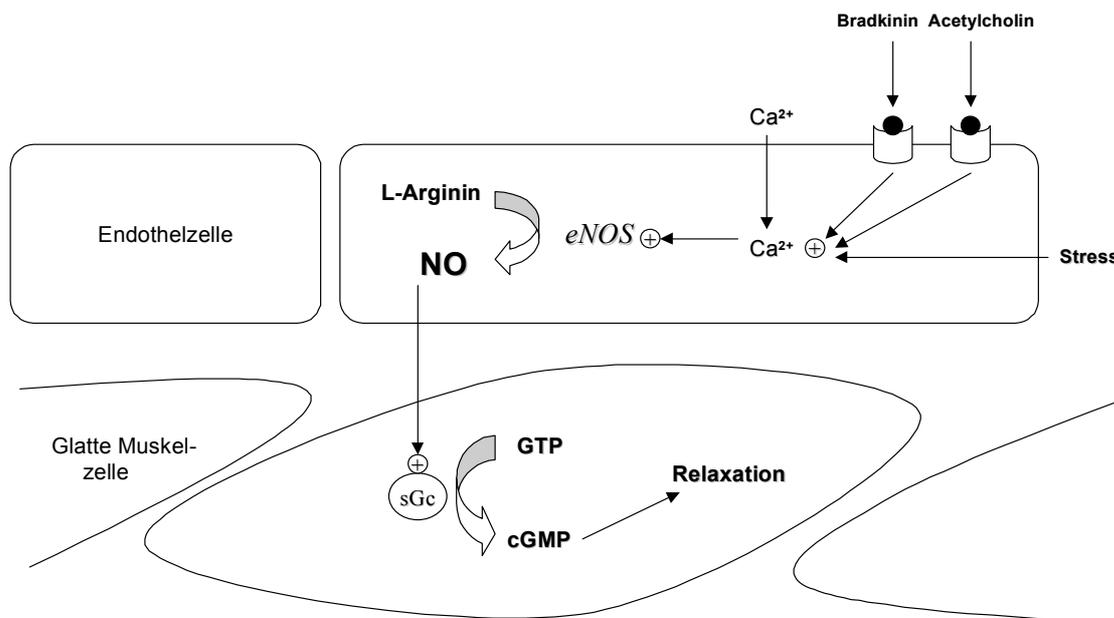


Abbildung 2 - Rezeptorstimulation via Bradykinin, Acetylcholin oder Stress führt zum Kalziuminflux mit konsekutiver Aktivierung der konstitutiven ecNOS bei steigendem Ca^{2+} -Spiegel. ecNOS formt NO aus dem Edukt L-Arginin. NO diffundiert in die benachbarte glatte Gefäßmuskelzelle und aktiviert eine gelöste Guanylatcyclase, die cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosin-5'-triphosphat (GTP) formt. Erhöhte Spiegel an cGMP in der Muskelzelle führen schließlich zu deren Relaxation.

Die NO-Ausschüttung durch die eNOS ist an der Neurotransmission im zentralen und peripheren Nervensystem beteiligt wie z.B. der Hormonausschüttung. Es sei zu erwähnen, dass die Aktivierung der eNOS wesentlichen Einfluss auf die penile Erektion (Knowles et al., 1994) nimmt. Die induzierbaren NOS kommen in den Zellen der Immunabwehr (Makrophagen, neutrophile Granulozyten) (Kubes et al., 1991), Thrombozyten (Radomski et al., 1991), Endothelzellen, glatten Gefäßmuskelzellen (Garg et al., 1989), Myokardzellen (de Belder et al., 1993), Endokardzellen und Astrozyten des ZNS vor; prinzipiell werden sie aber ubiquitär von nahezu allen

Körperzellen exprimiert (Hibbs et al., 1987; Hibbs et al., 1987A; Nathan et al., 1992). Je nach Gewebeart ist die NO-Synthetase an unterschiedlich Stellen lokalisiert. Während bNOS und iNOS als zytosolische Form vorkommen, ist die endotheliale NOS sowohl membrangebunden als auch zytosolisch zu finden (Ketteler et al., 1998). Das Substrat für die NO-Synthese ist die semi-essentielle Aminosäure L-Arginin.

I.4.3 Aufbau und Funktion

NO existiert in 3 chemischen Grundformen, wobei nicht bekannt ist, in welcher Form NO von den Zellen sezerniert wird. Das freie Radikal Stickstoffmonoxid (NO^\cdot) kann 1.) durch Entfernung eines Elektrons via Oxidation in NO^+ (Nitrosoniumkation) überführt werden oder 2.) durch Hinzufügen eines weiteren Elektrons zum antibindenden Orbital via Reduktion zu NO^- (Nitroxylanion) (Stamler et al., 1992). NO reagiert überdies mit körpereigenen Proteinen (z.B. Hämoglobin, Myoglobin) (Calver et al., 1993) und anderen Enzymen die Eisen-Schwefelzentren besitzen (Ignarro et al., 1991. Moncada et al., 1989; Moncada et al., 1989A).

Beide Enzymunterklassen der NO-Synthetasen sind von multiplen Co-Faktoren abhängig und besitzen daher Bindungsstellen für Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD) und Flavin-Adenin-Mononukleotid (FMD), (6R)-5,6,7,8-tetrahydro-L-Biopterin (H_4Bip) und Eisen-Protoporphyrin IX (Häm), die als prosthetische Gruppen der Oxidasen fungieren. Zusätzlich existieren Bindungsstellen für Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotidphosphat (NADPH) und Phosphorylierungsstellen.

Als wichtigste Co-Faktor-Bindungsstelle enthalten alle NOS H_4Bip , das essentiell ist für die enzymatische Aktivität, weil es diese und die NO-Produktion aus L-Arginin maximal aktiviert durch Stabilisierung der sterischen Konfirmation und Förderung der Dimerbildung. Nur homodimerische NOS sind in der Lage, L-Arginin zu metabolisieren. Zusätzlich scheinen einzelne ZnS_4 -Untereinheiten wichtig zu sein, sowohl für die Stabilität des Dimers als auch der H_4Bip -Bindungsstelle (Bommel et al., 1998; Fischmann et al., 1999; Klatt et al., 1994; Klatt et al., 1995; Moncada et al., 1993; Poulos et al., 1998; Raman et al., 1998; Tayeh et al., 1989). Kotsonis et al.,

entwickelten dafür bereits passende 4-oxo-Pteridin-basierende NOS-Inhibitoren, die als therapeutische Agenzien in der Lage sein sollen, NOS-medierte pathophysiologische Abläufe bei Sepsis, Entzündung und neurodegenerative Erkrankungen positiv zu beeinflussen. Sie konstruierten diese Derivate in Anlehnung an das natürlich vorkommende H₄Bip durch Einführung bestimmter chemischer Gruppen. Als besonders effektiv erwiesen sich Änderungen an der Position 6 des reduzierten 4-oxo-Pteridin (z.B. durch Einführung hydrophober Substituenten) (Kotsonis et al., 2001).

Von den ecNOS synthetisiertes NO induziert eine zytosolisch gelöste Guanylatzyklase durch Bindung am Eisen-Schwefelzentrum der hemi-prothetischen Gruppe. Die Guanylatzyklase synthetisiert daraufhin vermehrt zyklisches Guanosinmonophosphat (3',5'-cyclo-GMP) aus Guanosintriphosphat:



Das cyclo-GMP hat Second-Messenger-Funktion in Analogie zum cyclo-AMP. Die eigentliche Wirkung (z.B. Relaxation der glatten Muskelzellen) wird durch die stark ansteigende intrazelluläre Konzentration des cyclo-GMP vermittelt (Waldman et al., 1988). Das in den Makrophagen (Ignarro et al., 1991) und den Zellen des Nervensystems hingegen synthetisierte NO benötigt keinen Second-Messenger, es wirkt direkt auf die Zielzelle.

I.4.4 Aktivatoren, Inhibitoren, Halbwertszeit und Abbau

Die NOS werden durch verschiedene Substanzen aktiviert. Während die ecNOS über Acetylcholin, Bradykinin, Thrombin und «Scherkräfte» (Rubanyi et al., 1986) aktiviert werden, stimulieren L-Glutamat und Lithium die bNOS. Die iNOS-Expression wird vorwiegend durch proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1-β, Interferon-γ, Tumornekrosefaktor-α und γ-Strahlen induziert (Bogle et al., 1991; Geller et al., 1993; Moncada et al., 1992; Moncada et al., 1993; Poljakovic et al., 2002; Zhang et al., 1997;).

Die NO-Synthetasen lassen sich hauptsächlich mittels analoger Substanzen des L-Arginins hemmen. NG-monomethyl-L-Arginin (L-NMMA), NG-nitro-L-arginin-Methylester

(L-NAME), NG-nitro-iminoethyl-L-Ornithin (L-NIO) und NG-nitro-iminoethyl-L-Lysin (L-NIL) führen zu einer nicht-selektiven, kompetitiven Hemmung aller NOS (Nathan et al., 1994). Verschiedene Forschergruppen konnten bisher *in vivo* und *in vitro* (z.T. an total isolierten okulären Arterien) Experimenten, an unterschiedlichen Spezies, diese NOS an verschiedenen anatomischen Stellen im Auge nachweisen. Ein zusätzlicher, oft breit genutzter NO-Synthetaseinhibitor ist 7-Nitroindazol (7-NI), anscheinend selektiv für die Hemmung der nNOS gegenüber den eNOS *in vivo* und der noch stärker selektiv wirkende nNOS-Inhibitor TRIM (Handy et al., 1996), der sich an die Oxygenase-Domäne der hemi-prothetischen Gruppe bindet. Wie schon erwähnt, synthetisierten Kotsanis et al. eine neu Art von NOS-Inhibitoren, die besonders die NOS-I-Aktivität hemmen (Kotsonis et al., 2001).

Dennoch stellt der Mangel an hoch-selektiven NO-Synthetasehemmern weiterhin ein ungelöstes Problem für neue Therapieansätze dar. Pathologien wie Leberzirrhose und Sepsis stellen mögliche Einsatzgebiete solcher Inhibitoren dar.

Der wichtigste biologische Unterschied zwischen beiden NOS-Formen besteht in deren enzymatischer Aktivitätsdauer. Indes die induktiven NOS über Stunden hinweg enzymatisch aktiv bleiben, sind die konstitutiven NOS nur für kurze Zeit aktiv. Hierdurch erreichen die iNOS erheblich höhere Gewebekonzentrationen als die konstitutiven Formen. Hinzu kommt, dass NO seine Wirkung nur für kurze Zeit entfalten kann, da sich seine Halbwertszeit im Bereich von 3-5 Sekunden bewegt. NO wird schließlich zu Nitraten und Nitriten im Verhältnis 1:5 oxidiert (Kelm et al., 1999; Xie et al., 1994).

1.4.5 Analoga

Bestimmte Chemikalien wurden entdeckt, die als exogene NO-Donatoren fungieren. Sie beinhalten die klinisch verwertbaren Nitrovasodilatoren (Nitroprussid-Na, Glycerylnitrat und verschiedene andere Nitrite) und mehr für wissenschaftliche Zwecke verwendbare Substanzen (Sidonimine z.B. SIN-1, S-nitrosothiole). Generell sind die NO-Donatoren mehrheitlich organische Stoffverbindungen. Sie werden in 6 Klassen eingeteilt, je nachdem, an welches Atom das NO gebunden ist: C-NO-Donatoren (z.B. FK409), N-NO-Donatoren (z.B. N-Nitrosoharnstoff, Streptozotocin), O-

NO-Donatoren (z.B. Alfred Nobels Glyceroltrinitrat), S-NO-Donatoren, heterozyklische NO-Donatoren (z.B. Molsidomin) und transiente Metallionen-NO-Komplexe (z.B. Natriumnitroprussid) (Hou et al., 1999).

I.4.6 Biologische Effekte der NOS

Das L-Arginin/NO-System ist in den verschiedensten Zellen des Körpers entdeckt worden, wo es modulierend in biochemische und physiologische Abläufe eingreift. Die ecNOS wirken vasodilatatorisch auf die Gefäße und hemmen die intravaskuläre Aggregation der Thrombozyten.

Vorgänge der Neurotransmission im peripheren und zentralen Nervensystem wie penile Erektion (Ignarro et al., 1990), Gedächtnisfunktion im Hippokampus (Collingridge et al., 1991) und gastrointestinale Motilität (Rand et al., 1992) werden durch die neuronalen NOS moduliert. Die iNOS spielen eine große Rolle in der unspezifischen Abwehr von intra- und extrazellulären Mikroorganismen (Nathan et al., 1991) wie Fungi, Helminthen, Mykobakterien und Protozoen. Sie werden in einer großen Vielfalt von Zellen exprimiert, die bakteriellen Endotoxinen und/ oder inflammatorischen Zytokinen wie LPS, $TNF\alpha$ und IL-1. ausgesetzt sind. Das produzierte NO entwickelt hierbei außerordentlich zytotoxische Eigenschaften. In hohen Konzentrationen reagiert es als zytotoxisches Radikal, das direkte DNS-Schäden hervorrufen kann und durch Nitrosylierung von Eisengruppen in Enzymen deren Funktion blockiert. Ferner kann es mit Superoxid zu Superoxid-Radikalen reagieren, die ebenso zytotoxische Eigenschaften besitzen (Moncada et al., 1992; Nathan et al., 1992). Des Weiteren wirkt NO antiproliferativ (Garg et al., 1989), hemmt die Leukozytenmigration (Kubes et al., 1991), induziert Apoptose, steigert die Prostaglandinsynthese und ist an der Destruktion von Tumorzellen beteiligt (Moncada et al., 1992). Bei autoimmunologischen Prozessen wie dem Typ I Diabetes mellitus und Glomerulonephritiden (Ketteler et al., 1994) scheint NO ebenfalls eine wichtige Rolle einzunehmen. Es konnte gezeigt werden, dass der Untergang von Inselzellen durch Inhibition der NO-Produktion verhindert werden kann und damit im weiteren Verlauf auch die Entwicklung eines Autoimmundiabetes (Lukic et al., 1991). Bei Patienten mit Fieber, im septischen Schock und unter Immuntherapie mit inflammatorischen Zytokinen erhöhen sich die

Konzentrationen an zirkulierendem NO und Nitraten im 24h Sammelurin. Folglich scheinen diese Zustände ebenfalls mit einer erhöhten Produktion an NOs einherzugehen (Moncada et al., 1993; Vallance et al., 1992). Einmal aktiviert, produzieren sie große Mengen an NO, was im Zusammenhang mit dem septischen Schock von großem pathogenetischen Interesse ist. Dennoch konnte die iNOS nicht direkt als Quelle dieser NO-Produktion identifiziert werden, da NO-Inhibitoren nicht-selektiv alle NO-Synthetasen blockieren. Ein Dilemma, das hinreichend auch aus anderen Bereiche bekannt ist – eine selektive Forschung und/ oder Behandlung mit einzelnen NOS ist nur möglich, wenn man in der Lage wäre, selektive NO-Inhibitor für die einzelnen Unterklassen der NOS zu entwickeln.

Es wird ersichtlich, wie vielfältig und komplex das L-Arginin/NO-System aufgebaut ist. Es bedarf noch weiterergender Forschung, die einzelnen biochemischen Abläufe hinreichend zu verstehen und sich diese pharmako-therapeutisch zu nutze zu machen. Die folgende Tabelle fasst noch einmal kurz die wichtigsten Eckpunkte der verschiedenen NO-Synthetasen zusammen.

I.4.7 Nebenwirkungen

In höheren Dosierungen kann L-Arginin bei intravenöser Gabe zu lokalen Irritationen und Phlebitis führen auf Grund der hohen Osmolarität der Lösung. Versehentliche Extravasation kann zu lokalem Gewebeschaden und Nekrose führen (Baker et al., 1991). Ein einerseits therapeutisch wünschenswerter vasodilatatorischer Effekt, kann auf der anderen Seite zu Hypotension führen (Nakaki et al., 1990; Paton et al., 1990). Auf Grund möglicher anaphylaktischer Reaktionen sollte L-Arginin nicht bei Personen mit Neigung zur Atopie verabreicht werden (Tiwary et al., 1973). Ebenfalls beschrieben sind in der Literatur Änderungen im Säure-Base- und Elektrolythaushalt wie Hyperkaliämie (Bushinsky et al., 1978), Hyperphosphatämie (Massara et al., 1981), metabolische Azidose (Orchard et al., 1994) und die damit verbundenen Änderungen der Natrium-Clearance (Alberta et al., 1967).

	<i>ecNOS (Typ III)</i>	<i>iNOS (Typ II)</i>	<i>bNOS (Typ I)</i>
Vorkommen	Endothelzellen	Makrophagen, viele andere Gewebe	Cerebrum, Cerebellum, PNS
Ca ²⁺ / Calmodulin-Abhängigkeit	Ja	Nein	Ja
Stimulatoren	„Scherkräfte“, Bradykinin, Thrombin, Acetylcholin	IL-1 β , IF- γ , γ -Strahlen, TNF α	L-Glutamat, Lithium
Inhibitoren	L-NMMA, L-NAME	L-NMMA, L-NAME, L-NIL	L-NMMA, L-NAME, 7-Nitroindazol
Enzymlokalisation	Membrangebunden/ Zytosolisch	Zytosolisch	Zytosolisch
NO-Produktionsgeschwindigkeit	pmol (Sekunden)	nmol (h bis d)	pmol (Sekunden)
Funktionen:	Vasodilatation Thrombozyten-Aggregationshemmung	Zytotoxizität: - Mikroorganismen (Fungi, Helminthen, Mykobakterien, Parasiten u.a.) - Auto-Immunprozesse - Tumorzellen Inhibition: Leukopedese Induktion: Apoptose Antiproliferativ Prostaglandinsynthese \uparrow Autoimmunprozesse	Neurotransmission PNS & ZNS: - Hippokampus - Gastrointestinaltrakt - Penile Erektion

Abbildung 3 - Die Charakteristika der verschiedenen konstitutiven und induzierbaren NOS (*PNS = peripheres Nervensystem)

1.5 Ziel der Studie

In der Diskussion um L-Arginin stehen im Mittelpunkt Fragen zur direkten oder indirekten Aktivierung des Stickstoffmonoxid-Systems, Freisetzung vasoaktiven Insulins und unspezifischen Effekten. Unklar bleibt bislang wie L-Arginin an Gefäßen vasodilatatorisch wirkt. Möglicherweise ist die L-Arginin-vermittelte Vasodilatation teils abhängig von der Aktivierung des NO-Systems und gesteigerter Insulinsekretion. Ziel dieser Studie war es, diese weitergehend zu erforschen. Bei der Eruierung des Mechanismus der L-Arginin-induzierten Vasodilatation und dessen Effekte auf NO-abhängige und NO-unabhängige Abläufe, wurden folgende Möglichkeiten der Interaktion gewählt und untersucht: direkte Stimulation der NO-Synthese und Insulin-vermittelte Vasodilatation.

Um die Beteiligung des Insulins am vasodilatatorischen Effekt des L-Arginins zu beleuchten, wurde die Vasodilatation des L-Arginins mit und ohne euglykämische Hyperinsulinämie studiert. Wir induzierten eine Hyperinsulinämie, um eine mögliche Vasodilatation via Insulinstimulation auszuschließen.

In Studie II wurde geklärt, ob Insulin dosisabhängig die L-Arginin-verursachte Vasodilatation triggert.

Ein zusätzlicher vasodilatatorischer Effekt wird unter Umständen durch Stimulation des L-Arginin/ NO-Wegs oder anderer Mechanismen induziert.

Um die unspezifisch induzierte Vasodilatation zu analysieren, applizierten wir D-Arginin in der Abwesenheit einer Hyperinsulinämie. Abhängig von den Ergebnissen am Studientag IC führten wir einen zusätzlichen Studientag durch. Wir applizierten hierbei D-Arginin unter hyperinsulinämischen Bedingungen.

Wir führten die Untersuchungen an den Gefäßbetten des Auges und der Niere durch, weil diese besonders sensibel sind für die Effekte des L-Arginins und direkten Untersuchungen frei zugänglich sind.

II Material und Methoden

II.1 Design

Studie I:

Durchgeführt wurde Studie I als randomisiertes, Placebo-kontrolliertes, balanciertes, 3fach Cross-over Design, n=15. Das Design ist doppelt-blind in Bezug auf L-Arginin oder D-Arginin und offen in Bezug auf Insulin.

Jeder Proband erhielt die folgenden drei Medikationen in einer randomisierten, balancierten Sequenz an 3 verschiedenen Untersuchungstagen. Der zeitliche Abstand zwischen den Studientagen betrug 5 Tage.

Studientag IA: Insulin (euglykämischer Clamp) + L-Arginin

Studientag IB: Kochsalzlösung (Placebo) + L-Arginin

Studientag IC: Kochsalzlösung (Placebo) + D-Arginin

Ein vierter Untersuchungstag wurde in Abhängigkeit von den Ergebnissen des Studientages IC durchgeführt.

Studientag ID: Insulin (euglykämischer Clamp) + D-Arginin
(durchgeführt an den 15 Probanden aus Studientag IC)

Studie II:

Als Studiendesign wurde ein randomisiertes, Placebo-kontrolliertes, doppel-blindes, 2fach Cross-over Design, n=8 gewählt. Das Design war doppelt-blind in Bezug auf Insulin.

Jeder Proband erhielt die 2 folgenden Medikationen in randomisierter, balancierter Abfolge an zwei unterschiedlichen Tagen. Der zeitliche Abstand zwischen den Studientagen betrug 5 Tage.

Studientag IIA: L-Arginin in ansteigender Dosis + Placebo

Studientag IIB: L-Arginin in ansteigender Dosis + Insulin

II.2 Probanden

II.2.1 Randomisierung

Die Randomisierung wurde von Mitarbeitern der Universitätsklinik für Klinische Pharmakologie Wien durchgeführt. Diese waren selber nicht in die Studie eingebunden.

II.2.2 Auswahl der Probanden

Die Studienteilnehmer wurden von Mitarbeitern der Universitätsklinik für Klinische Pharmakologie ausgewählt.

II.2.3 Anzahl der Probanden

Studie I: 15 gesunde Probanden

Studie II: 8 gesunde Probanden

In Bezug auf die rasche Variabilität der Fundus-Pulsationsrate (Schmetterer et al., 1997) können Änderungen im Blutfluss >8% gegenüber der Baseline detektiert werden. Hinsichtlich der Variabilität der glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und des renalen Plasmaflusses (RPF) sollten mit Hilfe von PAH (p-amino-Hippursäure) und der Inulin-Clearance-Methode (Wolzt et al., 1997) Änderungen dieser Parameter > 10% im Rahmen der Studie, bei zusätzlicher Anwesenheit von L-Arginin, messbar sein. Aus vorherigen Studien geht hervor, dass L-Arginin einen Abfall des RPF von 15% bewirkt (Wolzt et al., 1998), hingegen verursacht Insulin einen Anstieg des RPF um 10% vom Ausgangswert (Schmetterer et al., 1997). In dieser Studie wurden daher Änderungen im Blutfluss von weniger als 10% als irrelevant bewertet.

II.2.4 Voruntersuchungen

Folgende Parameter wurden vier Wochen vor Studienbeginn an allen Probanden erhoben:

- allgemeine klinische Anamnese und medizinische Vorgeschichte
- standardisierter oraler Glucosetoleranztest (oGTT)
- Gewicht und Größe
- Blutdruck und Herzfrequenz (in liegender und stehender Position)
- hämatologischer Status (Hämoglobin, Hämatokrit, Erythrozyten, MCH, Leukozyten, Thrombozyten, aPTT, Thrombinzeit)
- klinische Chemie (Natrium, Kalium, Kreatinin, ALAT, γ -GT, Gesamt-Bilirubin, Gesamt-Eiweiss)
- Hepatitis B, C und HIV-Serologie (nicht älter als 6 Monate)
- Urinanalyse (Leukozyten, Nitrit, Protein, Glucose, Keton, Urobilinogen, Bilirubin, Blut/ Hämoglobin)
- 12-Kanal-Elektrokardiogramm
- 24h Kreatinin-Clearance
- 24h Natrium und Kalium-Ausscheidung
- Urin-Drogentest (Stichproben)
- Augenstatus

II.2.5 Einschlusskriterien

- männliche Probanden zwischen 19 und 35 Jahren
- Body Mass Index (BMI) zwischen der 15. und 85. Percentile (Must et al., 1991)
- unauffällige Befunde in der medizinischen Vorgeschichte und klinischen Anamnese, oder pathologische Befunde, die vom Untersucher als klinisch irrelevant angesehen wurden
- unauffällige Laborwerte oder pathologische Befunde, die vom Untersucher als klinisch irrelevant angesehen wurden

II.2.6 Ausschlusskriterien

- regelmäßige Einnahme von Medikamenten, Alkohol- und Drogenabusus, Teilnahme an einer klinischen Studie während den letzten 3 Wochen
- Hinweise auf Hypertonie, pathologische Hyperglykämien, Hyperlipidämien
- Einnahme eines Medikamentes in den letzten 3 Wochen
- Symptome einer klinisch relevanten Krankheit in den letzten 3 Wochen vor Studienbeginn
- frühere oder gegenwärtig bestehende gastrointestinale, Leber- und Nierenerkrankungen oder das Vorhandensein von Interaktionen bezüglich Verteilung, Metabolismus oder Ausscheidung der Wirkstoffe
- Blut-, Plasma- oder Thrombozytenspende während den letzten 3 Wochen, bekannte Überempfindlichkeit gegen die Studienmedikation oder gegen Medikamente mit ähnlicher chemischer Struktur.
- Ametropie ≤ 3 Dpt.
- Hyperthyreose
- M. Addison
- Epilepsie

II.3 Studienmedikation

Alle Medikamente wurden regelrecht nach den Anweisungen des Herstellers aufbewahrt. Details über die exakte Verabreichung der Studienmedikation (Tag, Stunde, Minute) wurden im Studienprotokoll dokumentiert.

II.3.1 Dosis und Art der Verabreichung

Insulin, Insulin „Lilly“ Humaninsulin

Hersteller: Lilly, Fegersheim, France

Dosierungsform: intravenöse Infusion, Infusionsdauer 120 Minuten

Startdosierung: Bolusinjektion von 12 mU/kg/min über 2 min, danach kontinuierliche

Dosisreduktion von 0.5 mU/kg/min über 10 min.

Erhaltungsdosis (Applikation mittels Pumpe zur intravenösen Infusion):

Studie I: 6 mU/kg/min intravenös infundiert über 120 min

Studie II 1.5mU/kg/min intravenös infundiert über 155 min

Quellenangabe der Dosis: Baron et al., 1994

Glucose, Glucose 20%, Leopold Infusionsflaschen

Hersteller: Leopold Pharma, Linz, Austria

Darreichungsform: intravenöse Infusion,

Infusionsdauer: 20 Minuten (Studie I), 190 min (Studie II)

Dosierung: individuell zur Aufrechterhaltung eines adäquaten Blutzuckerspiegels von 100 mg/dl \pm 20 mg/dl

Quellenangabe der Dosis: DeFronzo et al., 1979

KCl, Kaliumchlorid Leopold 20% Infusionszusatz

Hersteller: Leopold Pharma, Linz, Österreich

Darreichungsform: intravenöse Infusion

Infusionsdauer: 120 Minuten (Studie I), bei Bedarf (Studie II)

Dosierung: 10 mmol/h

Quellenangabe der Dosis: DeFronzo et al., 1979

L-Arginin

Hersteller: Clinalfa AG, Läfelfingen, Schweiz

Darreichungsform (intravenöse Infusion):

Studie I: Infusionsdauer 30 min,

Dosierung: 1 g/min, verdünnt in 500 ml Ringer

Studie II: intravenöse Infusion, kontinuierliche Infusion über 120 Minuten

Dosierung: 10. 30. 100. 300 (und 1000 mg/min), jede Stufe infundiert über 15 min

Quellenangabe der Dosis: Schmetterer et al., 1997

D-Arginin

Hersteller: Clinalfa AG, Läfelfingen, Schweiz

Darreichungsform: intravenöse Infusion, Infusionsdauer 30 min

Dosierung: 1 g/min, verdünnt in 500 ml Ringer (Studie I)

Quellenangabe der Dosis: Giugliano et al., 1997

Physiologische Kochsalzlösung

Darreichungsform: intravenöse Infusion

Infusionsdauer 120 Minuten (Studie I) bzw. 155 min (Studie II) (Ersatz für Insulin)

Para-amino-Hippursäure, Aminohippurate Natrium

Hersteller: Clinalfa AG, Läfelfingen, Schweiz

Darreichungsform: intravenöse Infusion, Infusionsdauer 180 Minuten (Studie I) bzw. 235 min (Studie II)

Dosierung: 8 mg/kg Bolus, 15 mg/min/1.73 m² kontinuierlich infundiert

Quellenangabe der Dosis: Schnurr et al., 1980

Inulin

Hersteller: Laevosan, Linz, Österreich

Darreichungsform: intravenöse Infusion, Infusionsdauer 180 Minuten (Studie I) bzw. 235 min (Studie II)

Dosierung: 37,5 mg/kg Bolus, 35 mg/min/1.73 m² kontinuierliche Infusion

Quellenangabe der Dosis: Schnurr et al., 1980

Lithium Karbonat 300mg Tabletten

Hersteller: Kwizda GesmbH, Wien, Österreich

Darreichungsform: per os

Dosierung: 300 mg einmal vor jedem Studientag (Studie I)

Quellenangabe der Dosis: Carstens et al., 1997

II.3.2 Hintergrund der Dosierungen

Die verwendeten Dosierungen von L-Arginin wurden bereits in einigen vorausgegangenen Diabetes-Studien sowie an gesunden Probanden als intravenöse Infusion komplikationslos appliziert. L-Arginin führte bei 11% der gesunden Probanden zu einem signifikanten Anstieg der Funduspulsationsrate (FPA) (Schmetterer et al., 1997) und zu einem Anstieg des renalen Plasmaflusses um 10% gegenüber Baseline (Wolzt et al., 1998). Hingegen fand man, dass bei gesunden Probanden der totale periphere Widerstand um 66% während 30minütiger Verabreichung von jeweils 1g L-Arginin/min sank (Hishikawa et al., 1993).

6 mU/kg/min Insulin verursachte in vorhergehenden Studien einen Abfall des mittleren arteriellen Druckes (MAP) um 10% und des Herzindex um 25%. Hierbei löste es keine Unverträglichkeitsreaktionen aus (Baron et al., 1993). Insulin erhöhte die FPA um 14% und den renalen Plasmafluss um 10% (Schmetterer et al., 1997). In dieser Studie wurden daher Veränderungen im Blutfluss von weniger als 10% als irrelevant angesehen.

Nach der ersten Studie wurde jedoch ersichtlich, dass die Dosis zur Erzielung eines okulären hämodynamischen Effekts von Insulin bei 1.5 mU/kg/min oder sogar niedriger liegt. Bei dieser Dosierung beobachteten wir einen signifikanten Anstieg der Funduspulsationsrate (FPA) um 8.7% ($\pm 1.1\%$ vs. Baseline, $p < 0.001$). Es wurden ausreichend hohe Plasmawirkspiegel von ca. 100 $\mu\text{U/ml}$ erreicht (Polak et al., 2000), die vergleichbar waren mit einer Studie über den Effekt von Insulin auf den Blutfluss im Bein; hier wurde eine maximale Insulin-vermittelte Vasodilatation bei Plasmaspiegeln von ca. 80 $\mu\text{U/ml}$ ($\text{EC}_{50} = \sim 40 \mu\text{U/ml}$) erreicht (Baron et al., 1994).

II.3.3 Probandenaufgaben

Den Probanden wurde die Einnahme von Xanthinhaltigen Getränken (Tee, Kaffee, Coca Cola-artige Getränke) 12 Stunden vor dem Studientag verboten. Die Voruntersuchung sowie die Durchführung der einzelnen Studientage erfolgte nüchtern. Eine mindestens 8-stündige Nachtruhe war obligatorisch.

II.3.4 Beschreibung der Studientage

Zwei Tage vor jedem Studientag nahmen die Probanden 1g Natriumchlorid jeweils zwei mal täglich ein, um einem möglichen Salzverlust während der Infusionsperiode vorzubeugen.

Nach ausreichendem Schlaf wurden die Studientage in einem ruhigen Raum, bei einer Raumtemperatur von 22°C mit vollständiger notfallmedizinischer Ausrüstung durchgeführt. Während der ganzen Studiendauer wurde der Blutdruck in 10minütigen Intervallen bestimmt, die Messungen der Pulsrate sowie EKG-Ableitung erfolgten kontinuierlich. Für die nachfolgende Bestimmung der Nierenfunktion, wurden die Probanden angehalten, mindestens 1000 ml/h Wasser zu sich zu nehmen.

Die Studie wurde an der Universitätsklinik für Klinische Pharmakologie, Allgemeines Krankenhaus Wien durchgeführt.

Studie I:

Den Patienten wurden Insulin oder Placebo, sowie L-Arginin oder D-Arginin in einer randomisierten Sequenz gegeben. Drei Plastikkanülen (Venflon®) wurden in die Unterarmvenen gelegt: für das simultane Monitoring der Glucose-Plasmakonzentrationen und die Blutabnahmen (1. Venflon); zu Verabreichung von Insulin, Glucose, Kalium (Clamp) oder NaCl-Lösung (2. Venflon) und für PAH, Inulin sowie L-Arginin oder D-Arginin über die letzten 30 Minuten. Nach einer kurzen Erholungspause von 20 Minuten in sitzender Position, Urin wurde bei spontanem Harndrang gesammelt, erfolgte eine Blutabnahme zur Messung der Serum-Lithium-Konzentration und die Bestimmung der Baseline-Werte. An allen 3 Studientagen wurden zur Bestimmung des renalen Plasmaflusses und der glomerulären

Filtrationsrate konstante Infusion von para-amino-Hippursäure und Inulin verabreicht. Für die folgenden Infusionen errechneten wird die Infusionsraten aus den genäherten Clearances von PAH und Inulin (750 ml/min und 140 ml/min). Wir applizierten den Probanden zuerst eine intravenöse Bolusinjektion von para-amino-Hippursäure und Inulin, gefolgt von intravenösen Dauerinfusionen zur Aufrechterhaltung einer konstanten Plasmakonzentration von 0.02 mg/ml (PAH) bzw. 0.25 mg/ml (Inulin). Es wurde nach 45 min wiederum Urin gesammelt und Blut zur Bestimmung der Serum-Lithium-Konzentration abgenommen. Danach starteten wir die iv-Infusionen von Insulin (Eli Lilly, Wien, Österreich; Dosis: 6 mU/kg/min) unter euglykämischen Bedingungen (siehe Methoden: euglykämischer Clamp) oder Placebo für 120 min. Hierbei musste mit der Glucoseinfusion einige Minuten vor Gabe des Insulins (Placebo) begonnen werden, um einen starken Abfall des Blutzuckerspiegels bzw. einen hypoglykämische Schock zu verhindern. Der Blutzuckerspiegel wurde in 5-minütigen Intervallen bestimmt. Alle 30 Minuten erfolgten Blutabnahmen zur Bestimmung der Nierenparameter. Die okuläre Hämodynamik wurde mittels Laserinterferometrie und Doppler-Sonographie zu den selben Zeitpunkten gemessen. 90 Minuten nach Studienbeginn wurde erneut Urin gesammelt und es erfolgte eine weitere Blutabnahme zur Bestimmung der Serum-Lithium-Konzentration, Nierenparameter sowie Insulin- und L-Arginin-Plasmaspiegel. 135 Minuten nach Studienbeginn starteten wir für 30 min die L-Arginin- bzw. D-Arginin-Infusion. Alle 15 Minuten wurden daraufhin die Blutabnahmen (L-Arginin-Plasmaspiegel, Nierenparameter) und hämodynamischen Untersuchungen durchgeführt. Am Ende der Infusionsperiode wurde abschließend noch einmal Urin gesammelt und zum letzten Mal Blutproben abgenommen (L-Arginin-, Insulin-Plasmaspiegel, Nierenparameter). Die Probanden erhielten nach Studienende weiterhin Glucose per infusionem und blieben monitiert, bis ihre Parameter wieder zu den Ausgangswerten zurückgekehrt waren.

Studie II:

Den Patienten wurden Insulin oder Placebo sowie L-Arginin in einer randomisierten Sequenz gegeben. Drei Plastikkanülen (Venflon®) wurden in die Unterarmvenen gelegt für das simultane Monitoring der Glucose-Plasmakonzentrationen und die Blutabnahmen (1. Venflon); zu Verabreichung von Insulin, Glucose oder Placebo, Kalium (Clamp) oder NaCl-Lösung (2. Venflon) und für PAH, Inulin sowie L-Arginin. Nach einer kurzen Erholungspause von 20 Minuten in sitzender Position, Urin wurde bei spontanem Harndrang gesammelt, erfolgte eine Blutabnahme zur Bestimmung der Baseline-Werte (Nierenparameter). An beiden Studientagen wurden zur Bestimmung des renalen Plasmaflusses und der glomerulären Filtrationsrate konstante Infusionen von para-amino-Hippursäure und Inulin verabreicht. Für die folgenden Infusionen errechneten wird die Infusionsraten jeweils aus den genäherten Clearances von PAH und Inulin (750 ml/min und 140 ml/min). Wir applizierten den Probanden zuerst eine intravenöse Bolusinjektion von para-amino-Hippursäure und Inulin, gefolgt von intravenösen Dauerinfusionen zur Aufrechterhaltung einer konstanten Plasmakonzentration von 0.02 mg/ml (PAH) bzw. 0.25 mg/ml (Inulin). Es wurde nach 45 Minuten wiederum Urin gesammelt und Blut für die Nierenparameter abgenommen. Danach starteten wird die iv-Infusionen Insulins (Eli Lilly, Wien, Österreich; Dosis: 6 mU/kg/min) unter euglykämischen Bedingungen (siehe Methoden: euglykämischer Clamp) oder Placebo. Hierbei musste mit der Glucoseinfusion einige Minuten vor Gabe des Insulins (Placebo) begonnen werden, um einen starken Abfall des Blutzuckerspiegels bzw. einen hypoglykämische Schock zu verhindern. Der Blutzuckerspiegel wurde jede 5 Minuten bestimmt. Alle 30 Minuten erfolgten Blutabnahmen zur Bestimmung der Nierenparameter, die okuläre Hämodynamik wurde mittels Laserinterferometrie und Doppler-Sonographie zu den selben Zeitpunkten gemessen. Nach 120 Minuten erfolgte eine große Blutabnahme (Nierenparameter, Insulin-, L-Arginin-Plasmaspiegel). Die L-Arginin-Infusion wurde nach 135 Minuten gestartet und die Infusionsmenge pro Minuten, beginnend mit 10 mg/min, alle 15 Minuten auf 30, 100, 300 und 1000 mg/min erhöht. Es wurden zeitgleich alle 15 Minuten die Blutabnahmen und hämodynamischen Untersuchungen durchgeführt. Am Ende der Infusionsperiode wurde abschließend noch einmal Urin gesammelt und zum

letzten Mal eine große Blutprobe abgenommen (Nierenparameter, Insulin-, L-Arginin-Plasmaspiegel). Die Probanden erhielten nach Studienende weiterhin Glucose per infusionem und blieben monitiert, bis ihre Parameter wieder zu den Ausgangswerten zurückgekehrt waren.

Studienzeit (min)	-20	0	45	60	90	120	135	150	165
Erholungszeit	X								
Inulin und PAH-Infusion (165 min)		→							
Insulin oder Placebo-Infusion (120 min)		→							
L-Arginin oder D-Arginin (30 min)						→			
Blutabnahme für PAH- & Inulin-Clearance		X	X	X	X	X	X	X	X
Blutabnahme für Insulin-Plasmaspiegel					X				X
Blutabnahme für L-Arginin-Plasmaspiegel					X			X	X
Hämodynamische Messung		X	X	X	X	X	X	X	X

Abbildung 4 - Zeitplan der Studie I

Studienzeit (min)	-20	0	45	60	90	120	135	150	165	180	195	210
Erholungszeit	X											
Inulin und PAH-Infusion (210 min)		→										
Insulin oder Placebo-Infusion (165 min)		→										
L-Arginin (65 min)							10 mg	30 mg	100 mg	300 mg	1000 mg	→
Blutabnahme für PAH- & Inulin-Clearance		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Blutabnahme für Insulin-Plasmaspiegel						X						X
Blutabnahme für L-Arginin-Plasmaspiegel						X						X
Hämodynamische Messung		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Abbildung 5 - Zeitplan der Studie II

II.4 Evaluierungsmethoden

II.4.1 Definition der Variablen

Hauptvariablen

Renaler Plasmafluss (RPF, PAH-Clearance-Methode)

Choroidaler Blutfluss (Laserinterferometrie, Doppler-Sonographie)

Nebenvariablen

Automatische Oszillometrie: mittlerer arterieller, systolischer und diastolischer Blutdruck (MAP, SBP, DBP)

Finger-Pulsoximetrie: Pulsfrequenz (PR)

Doppler-Sonographie: Mittlere Flussgeschwindigkeit der A. ophthalmica (MFV), Widerstandsindex (RI)

Laserinterferometrie: Funduspulsationsrate (FPA)

Inulin-Clearance-Methode: glomeruläre Filtrationsrate (GFR)

Labor: Insulin, Glucose, C-Peptid,

II.4.2 Euglykämischer Clamp

Der euglykämische Clamp nach De Fronzo et al. ist eine Methode zur Quantifizierung der Gewebesensitivität gegenüber Insulin (DeFronzo et al., 1979). Die Plasma-Insulin-Konzentration wird rasch durch eine Bolusgabe angehoben und danach mittels kontinuierlicher Infusion bei ca. 10 mU/ml gehalten. Die Plasma-Insulinkonzentration bleibt durch gleichzeitiges variables Infundieren von Glucose auf einem basalen Wert.

In der vorliegenden Studie wurde die Plasma-Insulinkonzentration durch eine Startinfusion von 12 mU/kg/min über 2 Minuten kontinuierlich angehoben. Danach wurde die Infusionsrate um 0.5 mU/kg/min alle 2 min gesenkt und schließlich bei einer konstanten Rate von 6 mU/kg/min für 150 min beibehalten. Glucose wurde je nach Bedarf, zur Aufrechterhaltung eines Blut-Glucosespiegels von 100 mg/dl \pm 20 mg/dl, infundiert. Die Blutproben wurden am kontralateralen Arm alle 5 min abgenommen und mit dem Beckschen Glucose Analyser bestimmt. Zusätzlich wurde eine Kaliumchlorid-Lösung (max. 10 mmol/h) nach Kalium-Spiegel infundiert.

II.4.3 Laserinterferometrische Messung der Funduspulsationen

Das für die vorliegende Studie verwandte laserinterferometrische Verfahren misst die pulssynchrone Pulsation des Augenfundus. Dies geschieht mit Hilfe eines Kohärenzlasers bei einer Wellenlänge von 780 nm, der mit einer hochauflösenden Echtzeit-Funduskamera (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) verbunden ist. Der Laser dient hierbei sowohl der Messung in der Fovea centralis der Macula optici, als auch der Fixation. Standardmäßig wurde das rechte Auge als Untersuchungsauge definiert. Die Leistung des Lasers liegt hierbei unterhalb der Grenze, die festgelegt wurde durch das American National Standards Institute (American National Standards Institute, 1986). Die Darstellung der Messdaten erfolgt durch mathematische Kurven und graphisch konvertierte Bilddateien (im Bitmap-Format *.BMP).

Am Menschen wurde die laserinterferometrische Funduspulsationsmessung erstmals durch Fercher beschrieben (Fercher A.F. 1984). Er konnte nachweisen, dass nach Beleuchtung des Auges mit einem Laser Interferenzringe entstehen, die einer zeitabhängigen Distanzveränderung zwischen der Kornea und dem Augenhintergrund während des Herzzyklus entsprechen. Schmetterer et al. machten diese Methode erstmals klinischen Reihenuntersuchungen zugänglich (Schmetterer et al., 1995). Die laserinterferometrische Messung ist folglich eine weitgehend automatisierte Methode, die auf nicht-invasivem Weg Aussagen über die Hämodynamik und Perfusion des Fundus treffen kann. Das Licht wird von der anterioren Fläche der Kornea und dem Fundus reflektiert. Hierbei dient das Licht, welches von der Korneavorderseite reflektiert wird, als Referenzwelle, um die relative Distanzänderungen zwischen Kornea und Augenhintergrund aus den Interferenzen zu ermitteln. Die Distanzänderungen beider Wellen entstehen während des Herzzyklus (Schmetterer et al., 1998). Sie entstehen durch die rhythmische Füllung und Entleerung der Augengefäße bei der Systole und Diastole. Der Abstand zwischen Kornea und Fundus verringert sich während der Systole und vergrößert sich in der darauf folgenden Diastole. Der FPA stellt hierbei die maximale Distanzänderung innerhalb des Herzzyklus dar. Diese korrespondierenden Variationen der Interferenzzusammensetzung ($\Delta N(t)$) während des Herzzyklusses können mit einer Funduskamera aufgenommen werden. Diese ermöglicht eine

Echtzeitinspektion des Fundus mit Hilfe von Laserpunkten. Es kann eine hohe topographische Auflösung erzielt werden, da die Messpunkte auf der Retina nur 20-50 µm betragen. Zusammen mit der MFV und EDV, Doppler-sonographisch ermittelt, lässt sich der relative Wert des choroidealen Blutflusses errechnen.

$$\text{ChBF} = \frac{\text{FPA} \cdot \text{PR} \cdot \text{MFV}}{\text{EDV}}$$

FPA = Funduspulsationsrate, PR = Pulsrate, MFV = mittlere Flussgeschwindigkeit, EDV = enddiastolische Flussgeschwindigkeit

II.4.4 Doppler-Sonographie der Arteria ophthalmica

Diese nicht-invasive Methode ermöglicht die Messung von Strömungsgeschwindigkeiten in Gefäßen aufgrund des Dopplereffektes. Dieser beschreibt die Frequenzänderung, die ein reflektierter Schallstrahl an einer Grenzfläche (einem Körper) erfährt, wenn dieser eine Relativbewegung zur Schallquelle ausführt. In den Gefäßen dienen die Erythrozyten als Grenzfläche (Kauffmann G. 1996). Die Messungen an der Arteria ophthalmica wurden mit einem gepulsten Doppler (pulsed doppler) (CFM 750; Vingmed Sound, Horten, Norway) bei einer Frequenz von 7.5 MHz durchgeführt und gleichzeitiger Echtzeit-EKG-Aufzeichnung (Guthoff et al., 1991; Lieb et al., 1991). Es ließen sich hierbei die systolische Spitzenflussgeschwindigkeit (PSV), enddiastolische Flussgeschwindigkeit (EDV) sowie die Zeit zwischen der ventrikulären Depolarisation und dem Auftreten der peripheren Pulswelle (pulse wave propagation time) messen. Aus diesen Parametern ließen sich der Widerstandsindex (RI) und die mittlere Flussgeschwindigkeit (MFV) errechnen (Schmetterer et al., 1998).

$$\text{RI} = (\text{PSV} - \text{EDV}) / \text{PSVMFV} = \frac{\text{Integral der Doppler-Kurve}}{\text{Dauer des Herzzyklus}}$$

EDV = enddiastolische Flussgeschwindigkeit, MFV = mittlere Flussgeschwindigkeit, PSV = systolische Spitzenflussgeschwindigkeit, RI = Widerstandsindex

Rückschlüsse vom RI auf den distalen Gefäßwiderstand sollten dennoch mit Vorsicht betrachtet werden, zumal durch den Doppler-Ultraschall nur ein kleiner Teil der totalen Augendurchblutung gemessen werden kann.

II.4.5 Nicht-invasive Messung der systemischen Hämodynamik

Der systolische, diastolische und mittlere arterielle Blutdruck (SBP, DBP, MAP) wurden am linken Oberarm mit Hilfe eines automatischen oszillometrischen Gerätes gemessen (HP-CMS patient monitor, Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA).

Die Pulsrate (PR) wurde über ein automatisches Finger-Pulsoximeter gemessen.

Die Reproduzierbarkeit und Sensitivität dieser Methode ist beschrieben worden (Wolzt et al., 1995). Das Echtzeit-EKG wurde über ein Standardmodul abgeleitet (HP-CMS patient monitor)

II.4.6 Renaler Plasma- und Blutfluss (PAH-Messung)

Die PAH-Clearance wurde durch photometrische Analysen bestimmt (Schnurr et al., 1980; Waugh et al., 1974). Der renale Plasmafluss (RPF) wurde gleichgesetzt mit der PAH-Clearance, die sich aus der 750fachen Plasma-Zielkonzentration (0.02 mg ml^{-1} /PAH Plasmakonzentration) errechnet. Der totale renale Gefäßwiderstand (RVR) errechnet sich aus dem Quotienten des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und des renalen Plasmaflusses (RPF). Der renale Blutfluss (RBF) ergibt sich mittels Division des renalen Blutflusses durch (1-Hämatokrit).

$\text{PVR} = \frac{\text{MAP}}{\text{RPF}}$	$\text{RBF} = \frac{\text{RPF}}{1 - \text{Hämatokrit}}$
--	---

II.4.7 Glomeruläre Filtrationsrate (Inulinmethode)

Für die Messung der Inulin-Konzentration wurden Glasröhrchen á 3 ml verwendet, die nach jeder venösen Blutabnahmen sofort auf Eis gelegt wurden. Nach Studienende wurden die Proben zentrifugiert (3000 G, 4°C für 10 Minuten), der Plasmaüberstand abdekantiert und dieser bis zur Analyse bei -20° aufbewahrt. Die Messung der Inulin-Plasma-Konzentration wurde mit einem kommerziell erhältlichen Test (INUTEC, Laevosan, Linz) durchgeführt. Die glomeruläre Filtrationsrate wurde gleichgesetzt mit der Inulin-Clearance, die sich aus der Plasma-Zielkonzentration (0.25mg ml^{-1} /Inulin-Plasma-Konzentration) errechnet.

II.4.8 L-Arginin Messung im Plasma

Die Messung der L-Arginin-Konzentration wurde nach der spektrophotometrischen Methode von Bacchus und London, basierend auf der Sakaguchi Methode, durchgeführt (Bacchus et al., 1971).

II.4.9 Messung der Plasmawerte

Insulin und C-Peptide wurden durch Routineanalysen bestimmt (Klinisches Institut für Medizinische und Chemische Labordiagnostik). Die Glukosekonzentration während des Insulin-Clamps wurde sofort Vorort mit Hilfe eines Beckmanschen Glucose Analyser (Beckmann, Fullerton, CA) nach der Glucoseoxidase-Methode bestimmt.

II.5 Risiko-Nutzen-Abwägung

L-Arginin ist in der Diskussion als therapeutische Substanz bei einer Vielzahl von Krankheiten. Für ein besseres Verständnis des zu Grunde liegenden Wirkmechanismus, über den L-Arginin vasodilatatorisch wirkt, sind trotz der bekannten möglichen Unverträglichkeitsreaktionen größere klinische Studien gerechtfertigt. Die Medikamentenwirkung wurde über die Clearance-Methode, durch Laserinterferometrie und Doppler-Ultraschall gemessen. Der totale Blutverlust wurde mit <172 ml eingeschätzt, über einen Zeitraum von höchstens 4 Wochen. Daher erschien in Studie I die Risiko-Nutzen-Ratio akzeptabel. In der zweiten Studie war die Risiko-Nutzen-Ratio noch günstiger, da in Studie I keine Unverträglichkeitsreaktionen auftraten und für die zweite Studie noch niedrigere Dosierung an Insulin und L-Arginin als in Studie I verwendet wurden.

II.6 Unerwünschte Ereignisse

Ein unerwünschtes Ereignis (adverse event, AE) ist jedes Ereignis während des Verlaufes der klinischen Studie, einschließlich Erkrankung oder Unfall, welches das Wohlbefinden des Probanden einschränkt; es kann sich auch in Form abnormaler Laborwerte ausdrücken.

Bei allen Probanden, die ein unerwünschtes Ereignis erfahren – gleichgültig ob es im Zusammenhang mit der Studienmedikation steht oder nicht – wird jegliche Medikation sofort gestoppt. Sie verbleiben monitiert bis Symptombefreiheit besteht, der betreffende Laborwert zum Ausgangswert zurückgekehrt ist, bis eine hinreichende Erklärung für die Veränderung gefunden wurde oder der Tod eintritt; in diesem Fall wird ein vollständiger pathologischer Bericht vorgelegt. Alle Befunde müssen im Studienprotokoll in der Sektion „unerwünschte Wirkungen“ dokumentiert werden. Unterteilt werden die unerwünschten Wirkungen in «ernst» oder «nicht-ernst». Das weitere Prozedere richtet sich nach dieser Einteilung.

II.6.1 Definition der «ernsten» und «nicht-ernsten» unerwünschten Ereignisse

Ein unerwünschtes Ereignis ist «ernst» (serious), wenn es:

- lebensbedrohlich ist
- permanente Schäden verursacht
- eine Hospitalisation erfordert
- Krebs oder kongenitale Anomalien verursacht oder in Folge einer Überdosierung auftritt (Verabreichung von mehr als der festgesetzten Dosis)

Unerwünschte Ereignisse, die nicht in diese Kategorien fallen, werden als «nicht-ernst» (non-serious) definiert.

II.6.2 Dokumentation der unerwünschten Ereignisse

«Ernst» unerwünschte Ereignisse (serious adverse event, SAE)

Alle unerwünschten Ereignisse, die während der Studie auftreten – gleichgültig ob sie in Zusammenhang mit der Studienmedikation stehen oder nicht, müssen im Studienprotokoll in der Sektion «unerwünschte Ereignisse» dokumentiert werden.

Alle nachfolgenden neuen Befunde über die aufgetretenen «unerwünschten Ereignisse» werden gesammelt.

Der Untersucher übermittelt auf Verlangen der Ethikkommission einen vollständigen Bericht aller erhobenen Befunde. Wenn erforderlich setzt der Untersucher die entsprechenden Behörden in Kenntnis.

«Nicht-ernste» unerwünschte Ereignisse (non-serious adverse event)

Sie werden im Studienprotokoll unter der Sektion «unerwünschte Ereignisse» dokumentiert.

II.6.3 Einschätzung des Schweregrades und Beziehung zur Studienmedikation

Unabhängig von der Einteilung der unerwünschten Ereignisse in «ernst» und «nicht-ernst», wird deren Schweregrad in leicht, mittelschwer, schwer und lebensbedrohlich eingeteilt, abhängig alleine von den medizinisch-toxikologischen Kriterien (WHO grading system, common toxicity criteria CTC)

Leicht	=	beeinflusst nicht alltägliche Handlungen, akzeptierbar
Mittelschwer	=	beeinflusst alltägliche Handlungen
Schwer	=	unmöglich alltägliche Handlungen durchzuführen oder signifikante Änderungen des klinischen Status, die sofortige Intervention erfordern
Lebensbedrohend	=	sofortiges Todesrisiko

Es sei angemerkt, dass ein schweres unerwünschtes Ereignis von Natur aus nicht «ernst» sein muss und dass ein «ernstes» unerwünschtes Ereignis, per Definition, nicht schwer sein muss. Unabhängig vom Schweregrad, muss jedes unerwünschte Ereignis im Studienprotokoll und im «case report form» (CRF) aufgezeichnet werden. Das erstmalige Auftreten und Dauer, sowie Schweregrad und Beziehung zur Studienmedikation werden für jedes unerwünschte Ereignis separat aufgezeichnet.

Der Studienarzt muss ebenfalls den Zusammenhang zwischen dem aufgetretenen unerwünschten Ereignis und der verwendeten Studienmedikation, basierend auf allen verfügbaren Informationen, einschätzen. Dabei richtet er sich nach folgenden Richtlinien:

0	=	unwahrscheinliche/keine zeitliche Assoziation oder der Grund des unerwünschten Ereignis wurde gefunden
1	=	mögliche zeitliche Assoziation, aber eine andere Ethologie scheint zu Grunde zu liegen; der Einfluss der Studienmedikation kann nicht ausgeschlossen werden
2	=	wahrscheinliche zeitliche Assoziation; andere Ethologien sind möglich, aber unwahrscheinlich

II.7 Statistische Datenanalyse

Die statistischen Analysen wurden mit dem Statistica® Softwarepaket (Version 4.5, StatSoft Inc., Tulsa, OK, USA) durchgeführt. Die Daten sind dargestellt als Mittelwerte \pm Standardabweichung. Die hämodynamischen Parameter, gemessen nach der 45minütigen Äquilibrationsperiode, wurden als Baseline-Werte definiert. Medikamentenwirkungen auf die zu messenden Hauptzielvariablen wurden gewichtet durch wiederholte Messungen mit ANOVA. Post hoc Analysen wurden als gepaarter T-Test durchgeführt. Effekte von L-Arginin und D-Arginin wurden als Prozentabweichung der vorbehandelten Werte dargestellt. Das Signifikanzniveau von $p < 0.05$ wurde als signifikant definiert.

II.8 Ethische und legale Aspekte

Die vorliegende Studie wurde in Übereinstimmung mit den Richtlinien der EU-GCP und dem Österreichischen Arzneimittelgesetz 1993 durchgeführt. Sie wurde ferner an der Deklaration von Helsinki (1964) und deren Abänderungen ausgerichtet.

II.8.1 Aufklärung der Probanden

Die Probanden wurden, bevor sie an der Studie teilnahmen, sowohl mündlich als auch schriftlich umfassend, für sie leicht nachvollziehbar über Hintergrund, Anwendungsbereich und die möglichen Nebenwirkungen, die im Rahmen der Studie entstehen können, aufgeklärt. Danach unterschrieben die Probanden die Einverständniserklärung (inform consent). Die Einwilligungen der Probanden wurden durch den Untersucher und einen Zeugen bestätigt.

II.8.2 Genehmigung

Vor dem Beginn der Studie wurde das Studienprotokoll durch die Ethikkommission der Universität Wien/ Medizinische Fakultät genehmigt.

II.8.3 Versicherung

Alle teilnehmenden Probanden an klinischen Studien waren versichert über die Universitätsklinik für klinische Pharmakologie gemäß § 32 der Österreichischen Medizinischen Gesetzgebung von 1993.

III Ergebnisse

III.1 Studie I

Die Basiswerte der gemessenen Parameter sind in Tabelle 1 abgelegt. Es ließen sich keine signifikanten Abweichungen unter den Baselinewerten an den drei Studientagen nachweisen.

Effekt des D-Arginins

D-Arginin konnte keinen signifikanten hämodynamischen Effekt hervorrufen, aber zeigte tendenziell einen Anstieg der MFV in der A. ophthalmica. Gleichzeitig kam es zu einem kleinen, jedoch signifikanten Anstieg des Insulinspiegels ($p=0.006$) Tabelle 2.

Effekt des D-Arginins vs. L-Arginin

L-Arginin nahm wie erwartet Einfluss auf den MAP und verursachte einen signifikanten Blutdruckabfall ($-8\% \pm 3\%$, $p=0.005$ vs. Baseline), hatte aber kaum Einfluss auf die Pulsrate ($+3\% \pm 1\%$, $p=0.239$ vs. Baseline). Dennoch ließ L-Arginin die regionalen hämodynamischen Parameter (PR, MAP) ansteigen. L-Arginin steigerte während der Verabreichung den RPF ($+11\% \pm 7\%$; $p=0.002$ vs. D-Arginin), die GFR ($+7\% \pm 6\%$; $p=0.016$ vs. D-Arginin) und die FPA ($+12\% \pm 4\%$; $p<0.001$ vs. D-Arginin). D-Arginin hatte einen deutlich untergeordneten Effekt. Weiter zeigte sich tendenziell ein Anstieg der MFV der A. ophthalmica ($+6\% \pm 2\%$, $p=0.351$ vs. Baseline), ohne signifikanten Unterschied im Vergleich zum D-Arginin ($p = 0.534$ vs. D-Arginin). L-Arginin erhöhte signifikant die Insulin-Plasmaspiegel (ungefähr 5-fach), wohingegen D-Arginin keinen Effekt hatte (Tabelle 2; $p<0.001$).

Effekt von Insulin und L-Arginin

Insulin beeinflusste nicht den MAP und PR, führte aber zu einem Anstieg des RPF ($+14\% \pm 4\%$; $p<0.001$ vs. Placebo), GFR ($+8\% \pm 5\%$; $p<0.001$ vs. Placebo) und der FPA ($+9\% \pm 5\%$; $p<0.001$ vs. Placebo). Insulin zeigte ebenfalls einen Anstieg der MFV der A. ophthalmica, dennoch war der Effekt nicht signifikant ($+8\% \pm 13\%$; $p=0.29$). L-Arginin zeigte gleichfalls keinen Effekt auf die systemischen hämodynamischen

Parameter (PR, MAP) während der Co-Infusion von Insulin. Dennoch waren die regionalen hämodynamischen Veränderungen (MFV der A. ophthalmica) signifikanter verglichen mit L-Arginin alleine. L-Arginin erhöhte stark den RPF um $21\% \pm 11\%$ ($p=0.010$ vs. L-Arginin alleine) und führte ebenso zum Anstieg der GFR ($+12\% \pm 4\%$; $p=0.031$ vs. Baseline), des FPA ($+19\% \pm 6\%$; $p \leq 0.001$ vs. Baseline) und der MFV ($+23\% \pm 10\%$; $p=0.002$ vs. Baseline).

Die renalen und hämodynamischen Effekte von L-Arginin waren im Vergleich signifikant deutlicher während zusätzlicher Infusion von Insulin.

Wie vorhergesehen ergaben die Bestimmungen des exogenen Insulins (6 mU/kg/min) stark erhöhte Insulin-Plasmaspiegel, wobei die Glucose-Plasmaspiegel durch individuelle Glucoseinfusionen innerhalb des festgelegten Rahmens blieben.

III.2 Studie II

Weder L-Arginin noch Insulin beeinflussten den MAP oder die PR (Abbildung 7-9). Insulin konnte den RPF ($+8\% \pm 3\%$; $p < 0.001$ vs. Baseline) und die GFR ($+7\% \pm 5\%$; $p=0.012$ Baseline) erhöhen. Ebenso kam es zum Anstieg der FPA ($+8\% \pm 5\%$; $p=0.018$ vs. Baseline) und des MFVs in der A. ophthalmica ($+10\% \pm 6\%$; $p=0.018$ vs. Baseline). Die hämodynamischen Effekte des L-Arginins \pm Insulin waren vergleichbar mit den erhobenen Werten in Studie I. L-Arginin allein infundiert rief einen dosisabhängigen Anstieg des RPF, der GFR, FPA und MFV (Abbildung 10,12,14,16) hervor. Diese Effekte ließen sich weiter steigern bei zusätzlicher Infusion mit Insulin: RPF ($p < 0.001$), GFR ($p=0.006$), FPA ($p < 0.001$) und MFV ($p=0.034$) (Abbildung 11,13,15,17). Wiederum konnte eine Erhöhung des Insulin-Plasmaspiegels ($p < 0.001$) durch L-Arginin beobachtet werden. Dem gegenüber steigerte exogen zugeführtes Insulin (1.5 mU/kg/min) die Insulin-Plasmaspiegel auf Werte, die auch im Rahmen von postprandialen Insulinerhöhungen beobachtet werden können (Tabelle 4). Die Glucose-Plasmaspiegel wurden während des gesamten Studienablaufes euglykämisch gehalten.

	<i>Tag 1</i>	<i>Tag 2</i>	<i>Tag 3</i>
MAP (mmHg)	80 ± 6	80 ± 5	83 ± 10
PR (Schläge/min)	68 ± 6	71 ± 9	69 ± 8
RPF (ml/min)	813 ± 81	796 ± 91	833 ± 119
GFR (ml/min)	131 ± 15	129 ± 10	132 ± 9
FPR (µm)	4.2 ± 1.5	4.2 ± 1.5	4.2 ± 1.5
MFV (cm/s)	17.7 ± 3.0	16.7 ± 4.1	16.2 ± 2.0
Insulin (µU/ ml)	4.4 ± 1.7	3.8 ± 1.3	4.0 ± 1.4
Glucose (mg/dl)	93 ± 10	87 ± 8	89 ± 9

Tabelle 1 Baselineparameter an den Studientagen I-III (Studie I; n=15)

	Placebo + L-Arginin	Placebo + D-Arginin	Insulin + L-Arginin
Insulin (µU/ml)	33.9 ± 12.0	5.4 ± 1.7	683.3 ± 110.4
Glucose (mg/dl)	91 ± 9	97 ± 12	99 ± 11

Tabelle 2 Effekte von Insulin, L-Arginin und D-Arginin auf den Insulin- und Glucose-Plasmaspiegel (Studie I; n=15)

	<i>Baseline</i>	<i>Start</i>	<i>Insulin (1.5 mU/kg/min)</i>			
L-Arginin-Dosis (mg/min)			10	30	100	300
Placebotag						
MAP (mmHg)	83 ± 9	82 ± 8	83 ±	81 ± 5	79 ±	76 ± 7
PR (Schläge/min)	68 ± 6	70 ± 5	73 ± 6	71 ± 6	72 ± 7	72 ± 5
RPF (ml/min)	772 ± 83	774 ± 73	782 ± 6	782 ± 70	808 ± 5	831 ± 74
GFR (ml/min)	128 ± 10	129 ± 7	127 ± 7	127 ± 7	133 ± 7	136 ± 6
FPA (µm)	3.6 ± 1.3	3.7 ± 1.2	3.7 ± 1.1	3.7 ± 1.2	3.8 ± 1.3	4.0 ± 1.4
MFV (cm/s)	17.7 ± 2.9	18.0 ± 3.4	18.1 ± 3.2	18.4 ± 3.3	19.1 ± 3.4	19.2 ± 3.8
Insulintag						
MAP (mmHg)	84 ± 8	80 ± 5	78 ± 7	78 ± 5	76 ± 7	73 ± 5
PR (Schläge/min)	69 ± 6	72 ± 5	69 ± 5	70 ± 5	71 ± 6	72 ± 5
RPF (ml/min)	782 ± 91	844 ± 98	868 ± 82	873 ± 81	934 ± 112	1009 ± 130
GFR (ml/min)	124 ± 9	132 ± 8	134 ± 7	135 ± 7	141 ± 9	151 ± 11
FPR (µm)	3.7 ± 1.2	4.0 ± 1.3	4.2 ± 1.4	4.2 ± 1.4	4.4 ± 1.6	4.8 ± 1.8
MFV (cm/s)	17.7 ± 2.9	19.4 ± 2.9	20.3 ± 3.1	20.4 ± 20.3	20.4 ± 2.8	21.6 ± 2.8

Tabelle 3 Einflüsse von L-Arginin und Co-Infusion mit Insulin auf die hämodynamischen Ergebnisvariablen (Studie II; n=8)

	Placebo + L-Arginin	Insulin + L-Arginin
Insulin (µU/ ml)	39.6 ± 14.3	132.3 ± 36.4
Glucose (mg/ dl)	86 ± 8	101 ± 9

Tabelle 4 Einflüsse von Insulin und L-Arginin auf den Insulin- und Glucose-Plasmaspiegel (Studie II; n=8)

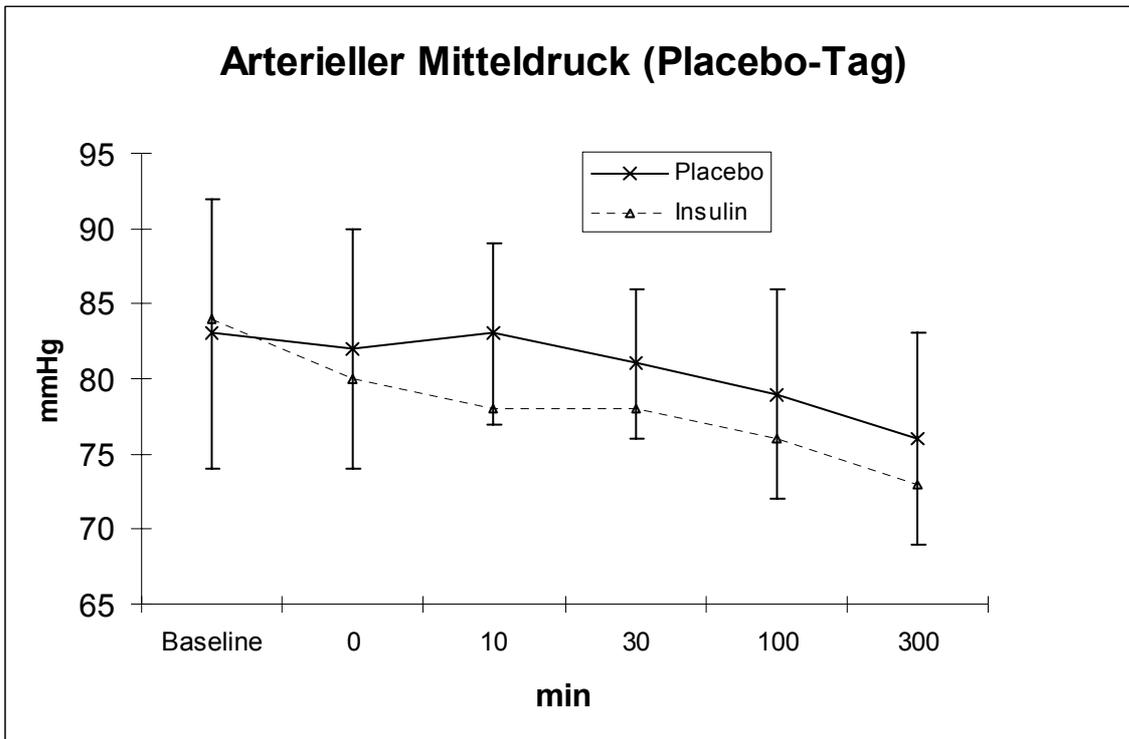


Abbildung 6 Auswirkungen auf den arteriellen Mitteldruck während Co-Infusion von L-Arginin und Placebo; (Studie II; n=8)

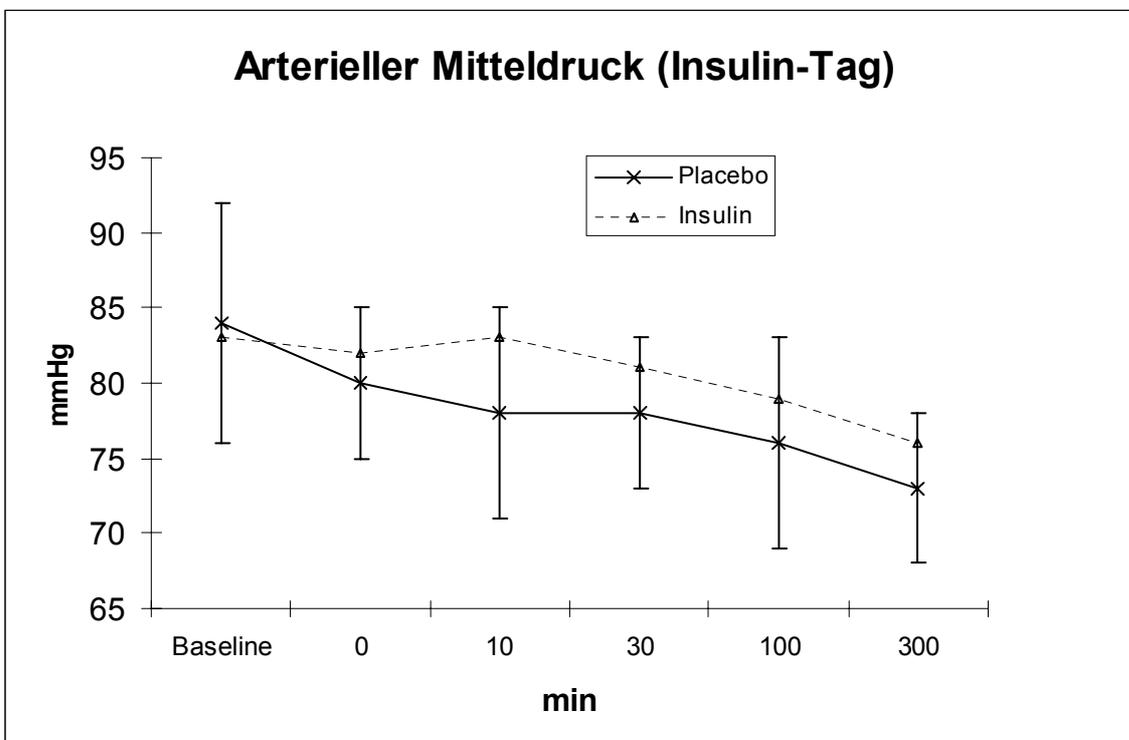


Abbildung 7 Auswirkungen auf den arteriellen Mitteldruck während Co-Infusion von L-Arginin und Insulin; (Studie II; n=8)

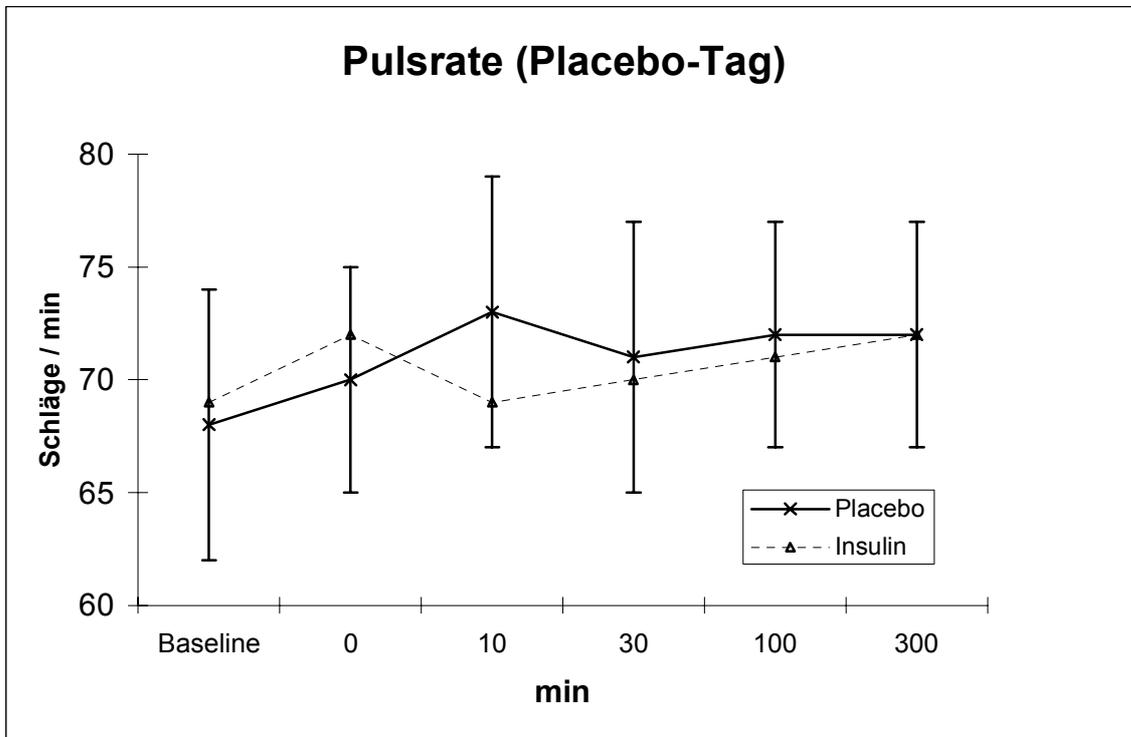


Abbildung 8 Auswirkungen auf die Pulsrate während Co-Infusion von L-Arginin und Placebo; (Studie II; n=8)

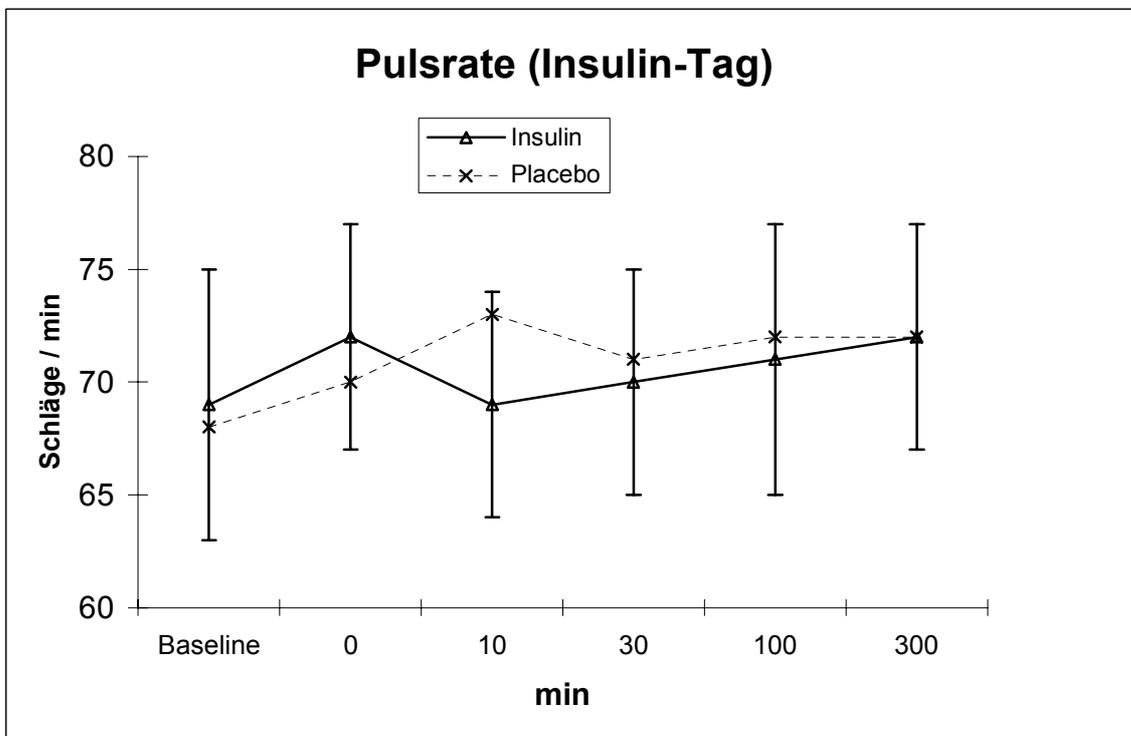


Abbildung 9 Auswirkungen auf die Pulsrate während Co-Infusion von L-Arginin und Insulin; (Studie II; n=8)

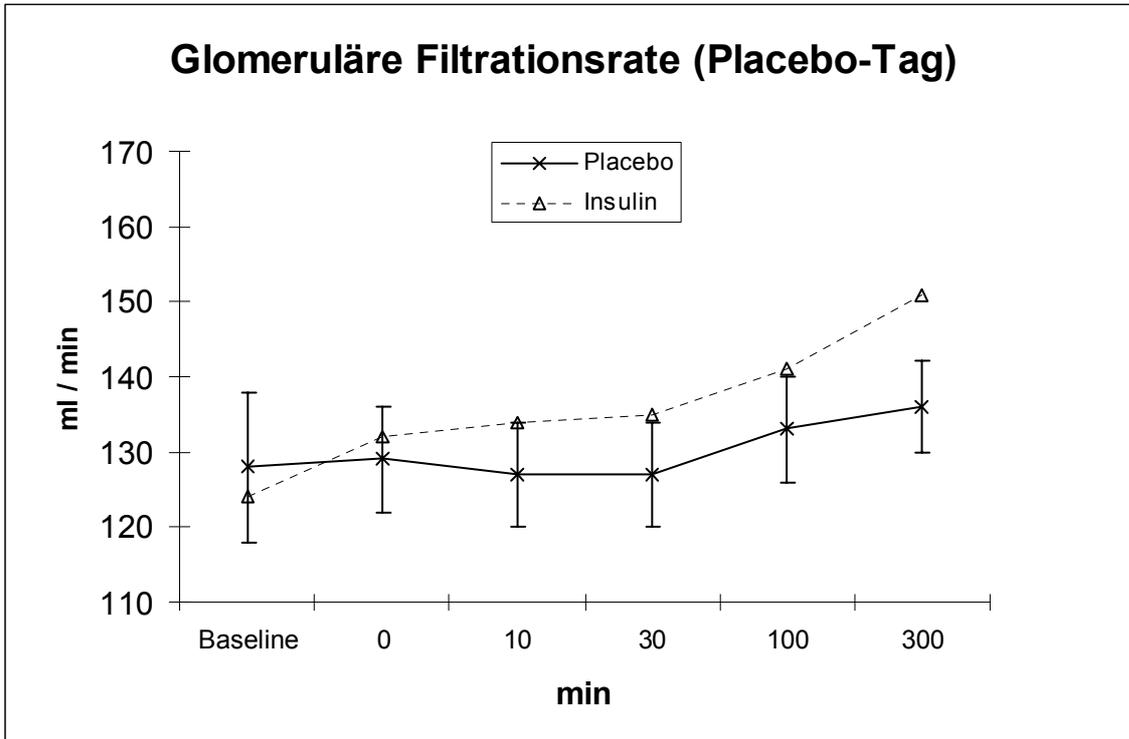


Abbildung 10 Auswirkungen auf die glomeruläre Filtrationsrate während Co-Infusion von L-Arginin und Placebo; (Studie II; n=8)

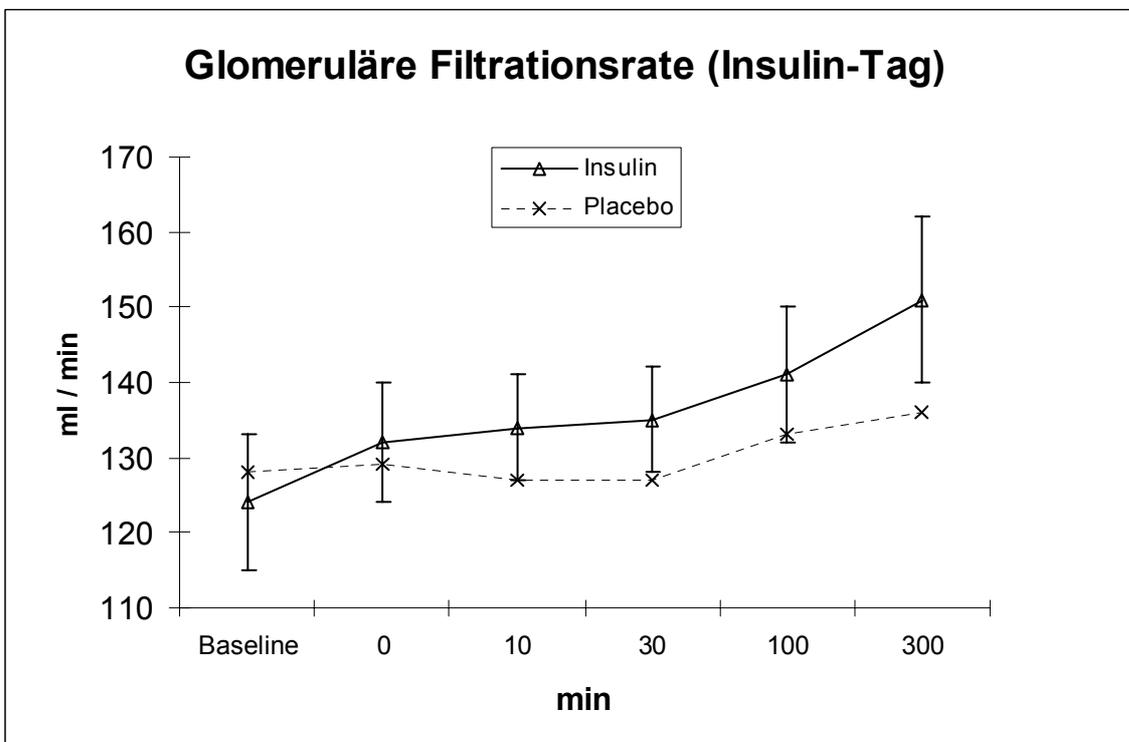


Abbildung 11 Auswirkungen auf die glomeruläre Filtrationsrate während Co-Infusion von L-Arginin und Insulin; (Studie II; n=8)

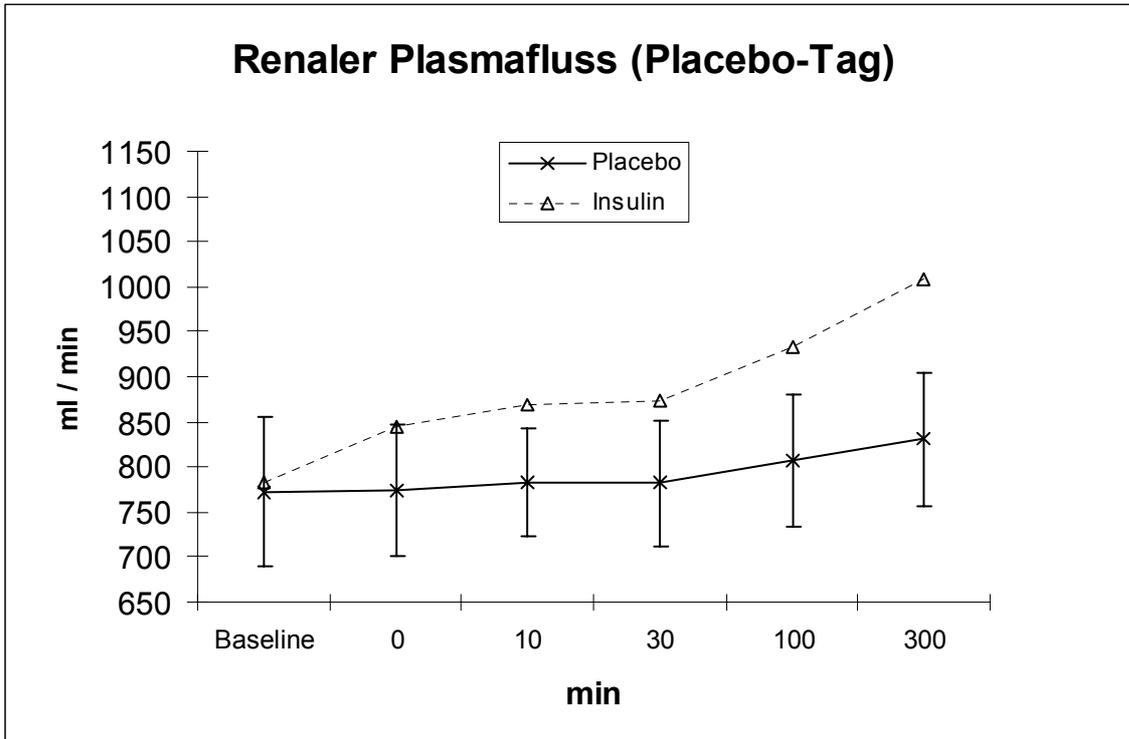


Abbildung 12 Auswirkungen auf den renalen Plasmafluss während Co-Infusion von L-Arginin und Placebo; (Studie II; n=8)

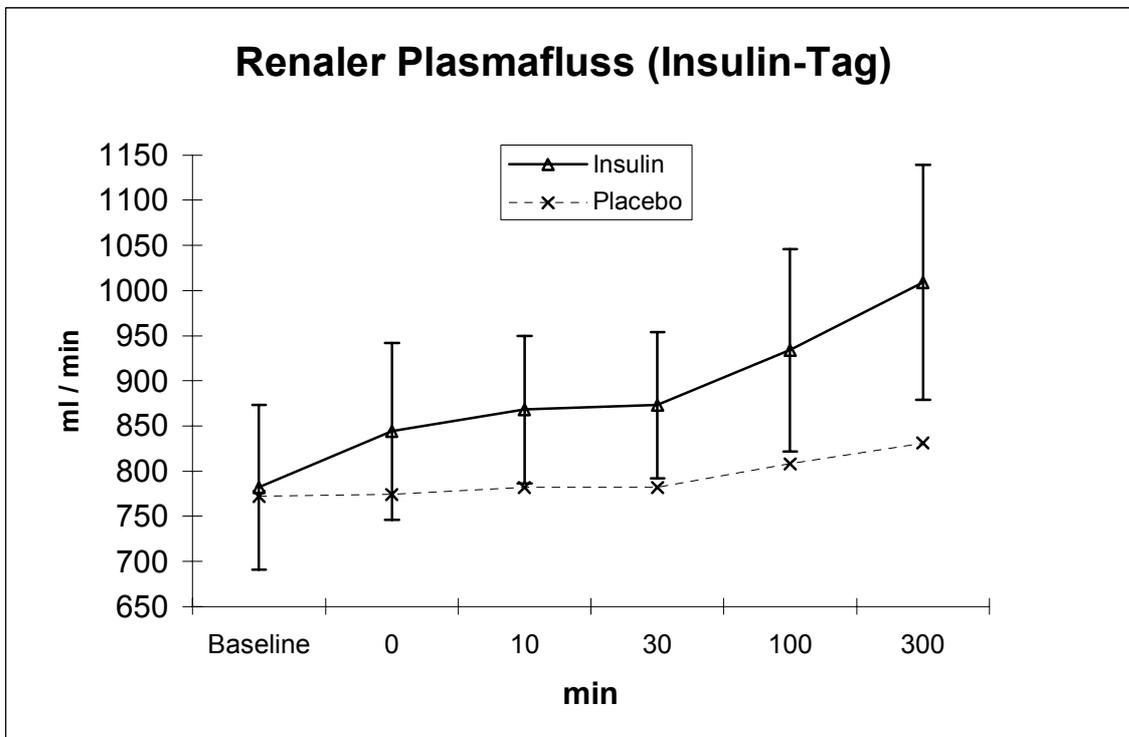


Abbildung 13 Auswirkungen auf die renalen Plasmafluss während Co-Infusion von L-Arginin und Insulin; (Studie II; n=8)

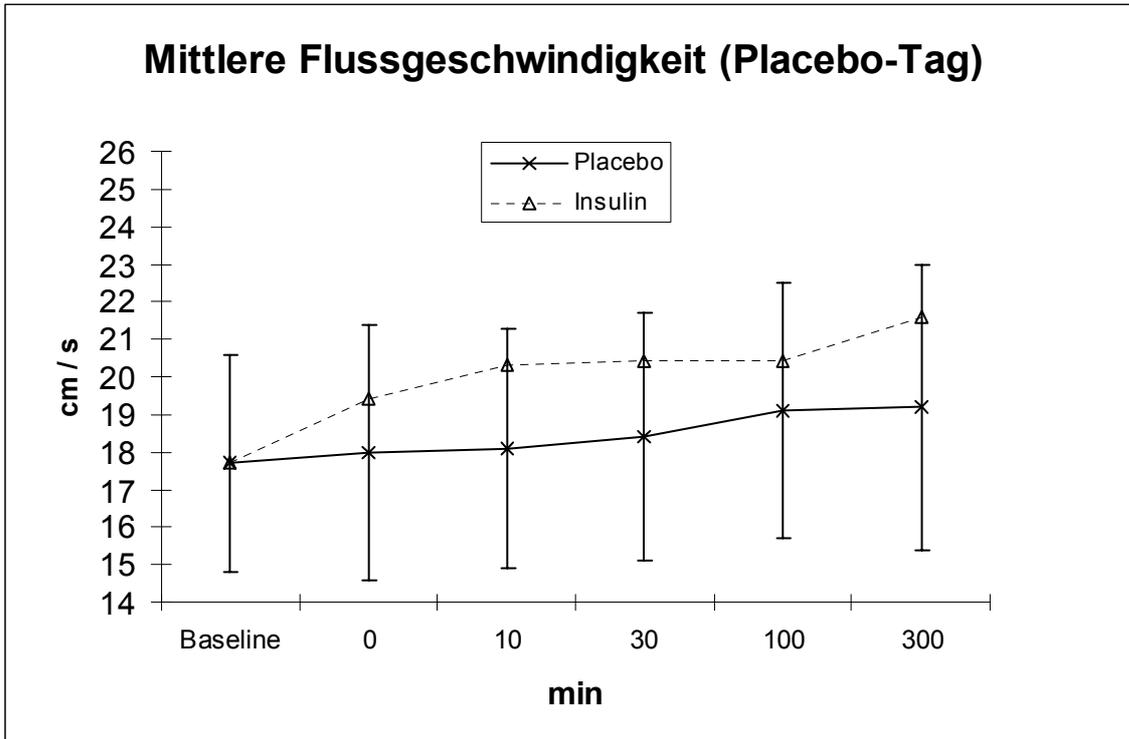


Abbildung 14 Auswirkungen auf die mittlere Flussgeschwindigkeit während Co-Infusion von L-Arginin und Placebo; (Studie II; n=8)

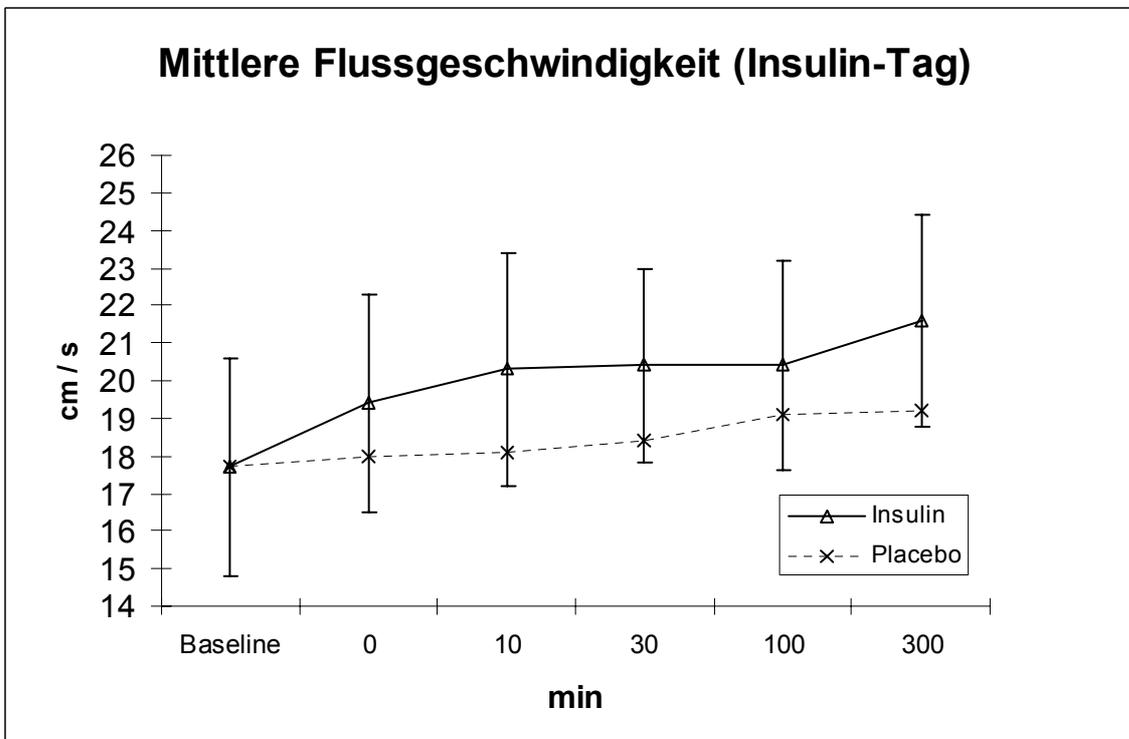


Abbildung 15 Auswirkungen auf die mittlere Flussgeschwindigkeit während Co-Infusion von L-Arginin und Insulin; (Studie II; n=8)

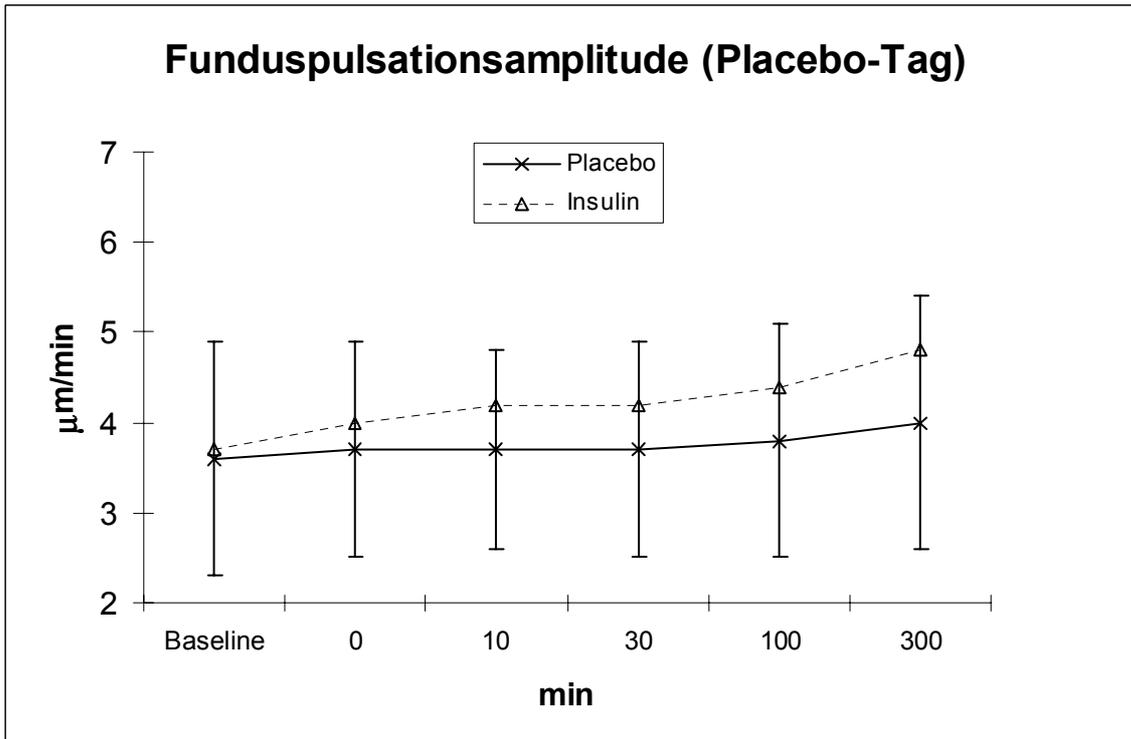


Abbildung 16 Auswirkungen auf die Funduspulsationsrate während Co-Infusion von L-Arginin und Placebo; (Studie II; n=8)

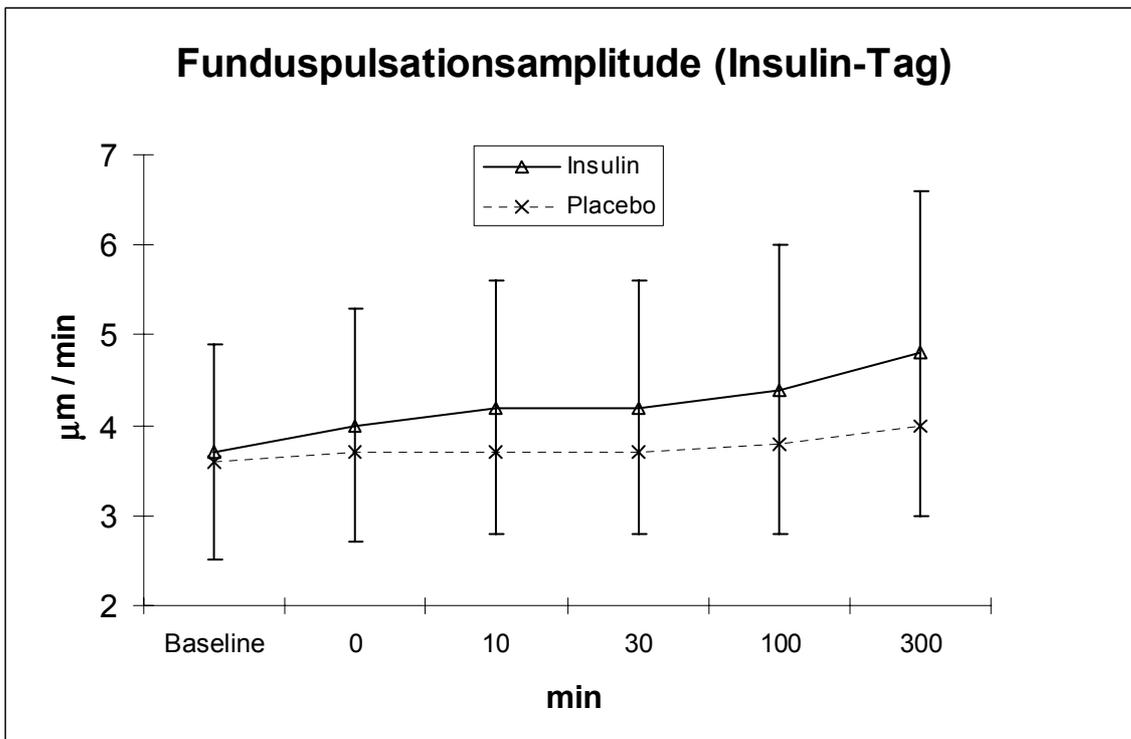


Abbildung 17 Auswirkungen auf die Funduspulsationsrate während Co-Infusion von L-Arginin und Insulin; (Studie II; n=8)

IV Diskussion

Zentrales Ergebnis der vorliegenden Studie ist, dass der vasodilatatorische Effekt der Aminosäure L-Arginin durch Insulin verstärkt wird. Insulin verursachte eine signifikante Linksverschiebung in der regionalen hämodynamischen Dosis-Wirkkurve von L-Arginin (Studie 2, dieser vasodilatatorische Effekt ist stereospezifisch).

Es sind eine Zahl verschiedener Instrumente verfügbar, um die endotheliale Funktion im Zusammenhang mit NO zu untersuchen: muskarinerge Agonisten wie Acetylcholin und Metacholinchlorid bewirken eine Endothel-abhängige Vasodilatation, die primär auf die gesteigerte NO-Freisetzung zurückzuführen ist; NO-Donatoren wie Nitroprussid-Natrium können direkt auf die Gefäßmuskelzellen unter Umgehung des Endothels wirken, während Arginin-Analoga wie L-NMMA benutzt werden können, um zu testen, ob eine Vasodilatation NO-abhängig ist. Darüber hinaus beobachtet man, dass systemische L-Arginin-Verabreichungen bei normalen Probanden zur Erhöhung der Urinausscheidung von cGMP und NO_3^- führen (welches das stabile metabolische Endprodukt des NO-Metabolismus darstellt) (Bode-Boger et al., 1994), sowie zu einer Erhöhung des plasmatischen cGMP-Spiegels (Smulders et al., 1994) und des abgeatmeten NO (Kharitonov et al., 1995). Es liegt die Vermutung nahe, dass die Menge an L-Arginin für die NOS Dosis-limitierend sein muss und stereospezifisches Edukt ist für die endogene NO-Produktion. Mehta et al. zeigten, dass eine direkte Korrelation zwischen der hämodynamischen Antwort auf infundiertes L-Arginin und dem Anstieg der abgeatmeten NO-Konzentration besteht. Des weiteren beschrieben sie einen Anstieg des L-Citrullins im Plasma, das ein direktes Abbauprodukt von L-Arginin darstellt. Sie folgerten, dass zumindest ein Teil des NO-Anstiegs in der Atemluft durch den NO-Metabolismus mediiert sein müsse (Mehta et al., 1996). Die Produktion von L-Citrullin aus exogen zugeführtem L-Arginin, CO-Produkt im NOS Metabolismus von L-Arginin zu NO, wird als Hilfsmarker der NOS-Aktivität angesehen und dient als indirekter Beweis für eine Beteiligung des NO-Systems und L-Arginins an Veränderungen der Hämodynamik (Mehta et al., 1995; Palmer et al., 1989). Darüber hinaus legt es nahe, dass die hypotensiven Blutdruckregulationen, assoziiert mit L-

Arginin-Infusionen, verursacht werden durch die steigende Produktion von NO im Gefäßbett. Dennoch ist die Quelle des NO's in der Ausatemluft wahrscheinlich nicht-vaskulären Ursprungs. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass Gaben von NO-Donoren nicht die Konzentration im Exhalat beeinflussen (Dirnberger et al., 1998). Vielmehr scheint ein signifikanter Anteil von den oberen Luftwegen herzurühren (Lundberg et al., 1994). Folglich beweisen ansteigende Konzentrationen NOs in der Ausatemluft nicht direkt, dass der vasodilatatorische Effekt bei Verabreichung von L-Arginin durch Endothel-abgeleitetes NO induziert wird, sondern führen eher zur Annahme, dass es auf eine gesteigerte NO-Produktion in den oberen Luftwegen zurückzuführen ist.

Einige Forscher kamen zur Hypothese, dass die eNOS substratlimitierend sei. MacAllister et al. (MacAllister, 1995) konnten in ihren Versuchen keine derartige Limitierung nachweisen, da biochemische Überlegungen die Hypothese widerlegen: die halbe Sättigungskonzentration von L-Arginin (K_m) für isolierte NO-Synthetase-Isoenzyme beträgt 1-3 $\mu\text{mol/l}$, die intrazelluläre Konzentration L-Arginins erreicht 1 mmol/l und die normale Plasmakonzentration etwa 100 $\mu\text{mol/l}$ (Forstermann et al., 1994). Obwohl MacAllister et al. in ihrer Studie die Blutkonzentration von $77 \pm 13 \mu\text{mol/l}$ auf ca. 2 mmol/L anhoben, was etwas mehr als das 100fache der supraphysiologischen Konzentration ist, verzeichneten sie keine Änderungen der Hämodynamik (MacAllister et al., 1995). Wäre die L-Arginin-Dosis limitierend für die NO-Synthese, hätte es zu Änderungen der hämodynamischen Parameter kommen müssen, besonders da eine solch hohe Plasmakonzentration hätte ausreichen müssen, alle L-Arginin-bindenden Rezeptoren aufzusättigen. Die gefasste Hypothese konnte daher nicht bestätigt werden. Wie kommen nun diese Diskrepanzen zwischen einzelnen Forschergruppen und Studien zustande? Während in manchen Studien schon bei niedrigen L-Arginin Konzentrationen sich hämodynamische Effekte im Sinne einer Hypotension nachweisen ließen, bewirkten in anderen selbst hohe Konzentration nichts. In der vorliegenden Studie überprüften wir daher die Hypothese, dass die vasodilatatorischen Effekte des L-Arginins an die Ausschüttung andere Hormone – besonders Insulin (Visek et al., 1986) gekoppelt sein müsse. L-Arginin führt zur Ausschüttung von Insulin, das auf das Endothels vasodilatatorisch wirkt (Steinberg et al., 1994). In wieweit diese

Vasodilatation NO-vermittelt ist, ist noch unklar. Bekanntlich existieren starke interindividuelle Unterschiede in der Insulin-Ausschüttung als hormonelle Antwort auf eine L-Arginin Infusion (Baron et al., 1994; Fajans et al., 1967; Floyd et al., 1966). Es lässt sich die Beteiligung des Insulins an der Vasodilatation erkennen und erklärt, warum einmal niedrige Konzentrationen einer L-Arginin-Infusion vasodilatatorisch wirken und einmal nicht.

D-Arginin führte weder zu einer Erhöhung des Insulin-Plasmaspiegels, noch hatte es signifikante Einflüsse auf die Hämodynamik. Ähnliche Dosen des Enantiomers D-Arginin, das nicht zur endogenen NO-Synthese herangezogen wird (Moncada et al., 1993) und L-Lysin, welches das gleiche kationische Aminosäure-Transportsystem wie L-Arginin benutzt (White et al., 1985), haben keinen Effekt auf Hyperglykämie-induzierte vaskuläre Veränderungen. Die vorliegende Studie liefert folglich mehrere Hinweise dafür, dass exogen zugeführtes L-Arginin *in vivo* die NO-Produktion erhöht.

Frühere Studien verglichen die vasoaktive Wirkung von D-Arginin und L-Arginin am menschlichen Unterarm. Während direkte intraarterielle Infusionen von L-Arginin in aufsteigender Dosis den Blutfluss im ipsilateralen Unterarm steigerten und den Gefäßwiderstand erniedrigten, hatte im Gegensatz dazu das Stereoisomer D-Arginin keinen Einfluss auf Blutfluss und vaskulären Widerstand (Imaizumi et al., 1992).

Ueda et al. konnten zeigen, dass in Anwesenheit von Insulin der vasodilatatorische Effekt von L-Arginin deutlich ausgeprägter zu sein scheint als der des D-Arginins (Ueda et al., 1998). Calver et al. infundierten ebenfalls L-Arginin in aufsteigender Dosis (2.1, 8.3, 33.6 mg/min) und kamen dabei zu einem anderen Ergebnis: die höchste Dosis von L-Arginin und D-Arginin wirkte in beiden Fällen vasodilatatorisch am Unterarm gesunder Probanden. Sie postulierten deshalb, dass die Auswirkung der Argininverabreichung nicht begründet seien in der Aktivierung des L-Arginin/NO-Stoffwechselwegs (Imaizumi et al., 1992). Auch McAllister et al. (MacAllister et al., 1995) fanden heraus, dass hohe Dosen von L-Arginin wie auch D-Arginin, lokal in eine Vene am Handrücken oder die V. brachialis infundiert, den venösen Blutfluss erhöhten. Diese Entdeckungen unterscheiden sich von unseren und den Ergebnissen Imaizumi's et al. Die Ergebnisse McAllisters et al. könnten auch in Richtung eines noch nicht

beschriebenen vasodilatatorischen Mechanismus des venösen Gefäßsystems hinweisen. Eine wichtige Erkenntnis war, dass L-Arginin, aber nicht D-Arginin, in der vorliegenden Studie den Insulin-Plasmaspiegel signifikant zu erhöhen vermochte. Wir stimmen hier mit früheren Studien überein, die zeigten, dass die Insulin-mediierte Glukoseaufnahme bei gesunden Probanden während L-Arginin-Infusion stereospezifisch ist (Paolisso et al., 1997), während das Enantiomer D-Arginin keinen Effekt auf die systemischen, renalen oder okulären Hämodynamik ausübte. Dennoch ist beschrieben, dass D-Arginin die basale Insulinausschüttung des Insulins *in vitro* zu erhöhen vermag (Panagiotidis et al., 1995). Im direkten Vergleich ist jedoch *in vivo* L-Arginin viel stärker an der Anhebung des endogenen Insulinspiegels beteiligt. Für D-Arginin lässt sich kein signifikanter Anstieg verzeichnen. Die Untersuchungsergebnisse bleiben in diesem Punkt dennoch kontrovers – Akesson et al., 1996 fanden in ihrer Tierstudie heraus, dass zum einen L-Arginin *in vivo* ein negativer Modulator der Insulinausschüttung ist und zum anderen die Glukagonsekretion aus den Inselzellen des Pankreas steigert. Bei Vorbehandlung mit dem NOS-Inhibitor L-NAME und anschließender L-Arginin-Infusion verzeichneten sie daher auch eine gesteigerte Insulinantwort in Kombination mit einer markanten Glukagon-Suppression und lang dauerndem Abfall des Plasmaglukosespiegels bei den vorbehandelten Tieren. Hierbei kamen sie zu dem Ergebnis, dass dieser potenzierende Effekt von L-NAME auf die L-Arginin-vermittelte Insulinausschüttung hauptsächlich als Ergebnis der NOS-Blockade zustande kommt. Trotzdem kamen sie bei *in vitro* Versuchen an isolierten Inselzellen zu widersprüchlichen Resultaten: die Verabreichung L-Arginins führte zu einer gesteigerten basalen Insulin- und Glukagonsekretion, wobei zusätzlich verabreichtes L-NAME die L-Arginin-stimulierte Insulinfreisetzung potenzierte, aber die L-Arginin-induzierte Glukagonsekretion (Akesson et al., 1996) unterdrückte.

Es gibt Hinweise dafür, dass ein Teil des vasodilatatorischen Effektes von L-Arginin durch die Erhöhung des Insulin Plasmaspiegels vermittelt wird. Es scheint so, dass ein Teil der Insulin-vermittelten Vasodilatation NO-abhängig ist. Steinberg et al. erkannten, dass die Insulin-induzierte Vasodilatation von der Ausschüttung endothel-abhängigen NO's (EDNO) abhängt (Steinberg et al., 1993). Zu diesem Zweck infundierten sie an der A. femoralis den NOS-inhibitor L-NMMA (N^G-monomethyl-L-Arginin). Unter basalen

Ruhebedingungen waren ~20% (~60 ml/min) der Beindurchblutung EDNO abhängig. Im Gegensatz dazu waren bei euglykämischer Hyperinsulinämie ~40% (~ 213 ml / min) des Blutflusses im Bein EDNO abhängig. Entscheidend war die Beobachtung, dass bei Gabe von L-NMMA, diese Insulin-vermittelte Vasodilatation vollständig aufgehoben wurde – ein starker Hinweis dafür, dass EDNO bei der Insulin-mediierten Vasodilatation eine große Rolle spielt (Baron et al., 1994). EDNO diffundiert in die glatten Gefäßmuskelzellen und reduzierte den Ca^{2+} -Influx (Ca_i) durch Stimulation der Guanylat-Cyclase, die zyklisches Guanosin 3',5'-monophosphat produziert (Kahn et al., 1993). EDNO scheint der prinzipielle vasodilatatorische Mechanismus in der Regulation der glatten Muskulatur zu sein. Ob sich der Mechanismus synergistisch oder additiv verhält, ist dahingestellt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass es weitere Substanzen oder Mechanismen gibt, die in der Lage sind, den Calcium-Influx in die glatten Gefäßmuskelzelle zu vermindern.

Um den Mechanismus weiter zu charakterisieren, der hinter den beschriebenen Effekten von L-Arginin steckt, steigerten wir Insulin auf eine Dosis von $6 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$. Unter dieser Dosierung konnten wir das Maximum der Insulin-vermittelten hämodynamischen Aktion bewirken. Wir induzierten Hyperinsulinämie mit der euglykämischen Clamptechnik, um die vasodilatatorischen Effekte seitens der Hyperglykämie aus zu schalten. Forscher stellten basierend auf ihren früheren Studien fest, dass die Insulin-induzierten Effekte bei einer Insulin-Infusionsrate von $1 \text{ mU} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ oder $40 \text{ mU} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{min}^{-1}$ auf den renalen und okuläre Blutfluss gesunder Probanden suboptimal waren. Sie stellten überdies fest, dass der Zeitverlauf für die Insulin-vermittelten Wirkungen, Glukose-Aufnahme und hämodynamischen Änderungen, wahrscheinlich ausgeprägter wäre bei höheren Insulin-Infusionsraten (Baron et al., 1994; Prager et al., 1986). Im Vergleich damit erreichten wir in der vorliegenden Studie das Höchstmaß Insulin-induzierter Vasodilatation. Der maximale Wirkeffekt bei dieser etwa 6fach höheren Plasma-Insulinkonzentration auf den renalen Plasmafluss und die glomeruläre Filtrationsrate war jedoch vergleichbar mit denen niedriger Plasma-Insulinspiegel. Es kam zu einem betonteren Anstieg des regionalen Blutflusses bei gleichzeitiger Gabe von Insulin und L-Arginin. Betrachtet man die

Effekte der Stoffe Insulin und L-Arginin einzeln und vergleicht sie mit den Effekten bei gleichzeitiger Verabreichung, erkennt man, dass bei Co-Infusion die Einflüsse auf den Blutfluss signifikant höher liegen. Ausgehend von dieser Beobachtung, kann man von einem synergistischen Effekt zwischen L-Arginin und Insulin sprechen. Besonders signifikante Unterschiede sind zu verzeichnen bei Verabreichung von L-Arginin unter euglykämischen und hyperglykämischen Bedingungen (~130fache Insulinkonzentration). Obwohl wir unsere Ergebnisse nicht auf andere isolierte Gefäßbetten bzw. den Gesamtorganismus verallgemeinern können und im Grunde genommen nur spekulieren können, was der Mechanismus bzw. der Grund für eine derart ausgeprägte Vasodilatation bei gleichzeitiger Verabreichung L-Arginins und Insulins ist, werden unsere Beobachtungen trotz allem durch *in vitro* Experimente gestützt. Diese zeigen, dass Insulin nicht nur den L-Arginin-Transport in endothelialen Zellen (Sobrevia et al., 1996) und isolierten Magendrüsen (Contreras et al., 1997) unterstützt, sondern auch die NO-Synthese in Blutplättchen *in vivo* stimuliert (Trovati et al., 1997). Die Aggregationshemmung der Thrombozyten, verbunden mit einem Abfall der Blutviskosität, ist hierbei nur partiell abhängig von der Sekretion endogenen Insulins, welches durch die Aminosäure L-Arginin gesteigert wird. Umgekehrt ist die Insulin-induzierte Vasodilatation abhängig von der NO-Synthese (Scherrer et al., 1994; Steinberg et al., 1994), zumal sich zeigte, dass sowohl der vasodilatatorische Effekt von Insulin als auch der des L-Arginins herabgesetzt ist bei Patienten mit endothelialer Dysfunktion (Giugliano et al., 1997). Baron et al. publizierten kürzlich ein hypothetisches Model der Insulin-medierten, L-Arginin-abhängigen NO-Sekretion (Baron et al., 2002). Sie gehen dabei davon aus, dass Insulin einen dosis-abhängigen Anstieg der NO-Produktion an Endothelzellen menschlicher Umbilikalvenen (HUVECs) bewirkt. Dieser Effekt wird durch Vorinkubation mit Genestein (einem Tyrosinase-Inhibitor) vollständig aufgehoben, was die Folgerung zulässt, dass der Insulin-Signalmechanismus, mit dem Effekt einer NO-Ausschüttung, durch eine Tyrosinase mediiert wird - höchst wahrscheinlich der Insulinrezeptor selbst (Zeng et al., 2000; Zeng et al., 1996). Der Insulinrezeptor ist eine Tyrosinkinase, die nach Insulin-Bindung zelluläre Substrate wie IRS-1 und IRS-2 (Insulin-Rezeptor Substrat-1 bzw. 2) phosphoryliert, die wiederum die Phosphotidyl-3-Kinase (PI3K) aktivieren. PI3K scheint

für die Insulin-medierte NO-Produktion in Endothelzellen verantwortlich zu sein. In den weiteren Ausführungen von Baron et al. wird Akt/PKB (Phosphokinase-B, eine Serin-Threonin-Proteinkinase) als Substrat der PI3K betitelt. Durch Phosphorylierung seitens PI3K aktiviert Akt die eNOS, die schließlich zur gesteigerten NO-Produktion führt (siehe Abbildung 18) (Baron et al., 2002).

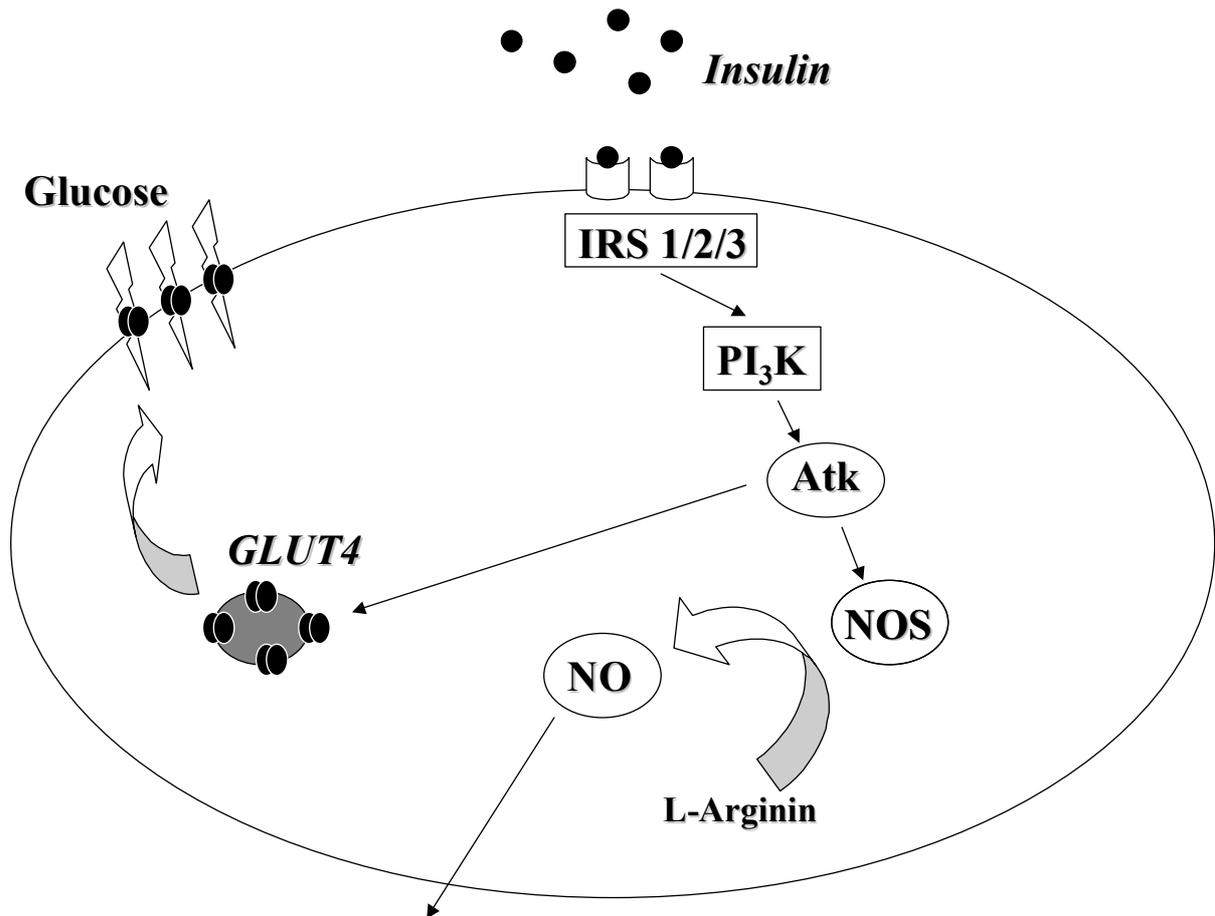


Abbildung 18 – Hypothetischer Signalaktivierungsweg der Rezeptoraktivierung mit Translokation von Glu 4 and NO-Ausschüttung, Baron et al., 2002

Dieses Modell könnte helfen, die physiologischen und pathophysiologischen Abläufe des Endothels tiefgreifender zu erfassen sowie scheinbare Paradoxien und Steuerungskreise zu verstehen – wie kann z.B. die vasodilatatorische Wirkung der Aminosäure L-Arginin partiell durch Insulin mediiert werden, dessen Ausschüttung aber aus den Inselzellen des Pankreas gleichzeitig stark unterdrückt wird.

Die Ergebnisse unserer Studie sind gut vergleichbar mit den Forschungsergebnissen von Alain D. Baron et al. (Baron et al., 1999). Sie untersuchten die Insulinwirkungen an a) schlanken Insulin-sensitiven Probanden, b) fettleibigen Probanden mit normaler Glukosetoleranz und c) Probanden mit Typ II-Diabetes, gewichtsgematched mit den Probanden der Gruppe b. Sie benutzten ebenfalls die euglykämische Hyperinsulinämie-Clamptechnik und bestimmten den Blutfluss und die Glukoseaufnahme im Bein sowohl unter euglykämischer Hyperinsulinämie als auch bei einer zusätzlichen arteriellen Infusion von L-NMMA. Der Blutfluss stieg hierbei nach 4 Stunden Hyperinsulinämie um das 2fache, fiel aber während anschließender L-NMMA-Infusion sogar auf Werte unter Baselinebedingungen ab – der vasodilatatorische Effekt während Hyperinsulinämie konnte darauf voll aufgehoben werden. Ebenfalls sank die Glukoseaufnahme dadurch um 30%. Baron et al. folgerten, dass die Insulin-abhängige Vasodilatation komplett NO-abhängig sein müsse, was sich nicht direkt aus den Untersuchungsergebnissen ableiten lässt, da mögliche Zweitmechanismen wie die Freisetzung anderer Hormone in dieser Studie nicht berücksichtigt bleiben. Um auszuschließen, dass diese Insulin-vermittelte Vasodilatation nur auf bloße Stressreaktionen des Endothels zurück zu führen ist, die bei D-Arginin beobachtet werden können, infundierten sie Insulin in einem weiteren Versuch in physiologischer Konzentration und verabreichten vorher L-NMMA. Sie konnten bei diesem Versuch keinerlei Vasodilatation während Insulininfusion nachweisen. Sie folgerten daher, dass Insulin eine große Rolle bei der NO Freisetzung spielt.

Die basale NO-Produktion nimmt großen Einfluss auf das Verhalten einzelner Gefäßsysteme. Zusammen mit anderen chemischen Mediatoren wie Prostacyclin (PGI₂), Endothelin u.a., produziert von den vaskulären Endothelzellen, reguliert es den lokalen Durchmesser, die Perfusionsverhältnisse und den vaskulären Tonus. Änderungen ihres Produktionsgleichgewichtes durch Schädigung der Endothelzellen und der demzufolge eingeschränkten NO-Produktion führen zu pathologischen Zuständen. Es kann zu unverhältnismäßiger Vasokonstriktion und Plättchenaggregation führen, die frühe Zeichen von Gefäßkrankheiten wie essentielle Hypertonie, Atherosklerose, koronaren und zerebralen Vasospasmen und Gefäßverschluss,

diabetische Nephropathie und Retinopathie sind (Vanhoutte et al., 1987). Gepaart mit freien Radikalen aus Neutrophilen und oxidiertem LDL, führt dies auf raschem Wege zur progressiven Atherosklerose. L-Arginin als Precursor und NO als eigentliche Wirksubstanz erweisen sich hier als potente antiatherogene Substanzen: sie setzen drei der Hauptfaktoren ausser Kraft, zum einen durch Adhäsions- und Aggregationshemmung der Plättchen und Senkung der Blutviskosität, zum anderen blockiert sie die Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen. Schließlich ist die lipidsenkende Eigenschaft des L-Arginins bekannt. Die Hypercholesterinämie als Risikofaktor der Atherosklerose und potentiell schädigendes Moment des Endothels an sich wird korrigiert (Chin et al., 1992; Ward et al., 1991). Alle diese Faktoren spielen eine Schlüsselrolle in der Entstehung von atherosklerotischen Plaques.

V Zusammenfassung

Durchgeführt wurde Studie I als randomisiertes, placebo-kontrolliertes, balanciertes, 3fach Crossover Design. Das Design war doppelt-blind in bezug auf L-Arginin oder D-Arginin und offen in bezug auf Insulin. 15 männlichen Probanden erhielten eine Insulininfusion ($6 \text{ mU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ über 120 min unter Euglykämie) oder Placebo und während der letzten 30 Minuten L-Arginin oder D-Arginin ($1 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$ über 30 min). L-Arginin, aber nicht D-Arginin erhöhte hierbei den RPF ($+11 \pm 7 \%$, $p < 0.002$ vs. D-Arginin) und die FPA ($+12 \pm 4 \%$, $p < 0.001$). Unter Hyperinsulinämie war der vasodilatatorische Effekt von L-Arginin mit $21 \pm 11\%$ Anstieg des RPF ($p = 0.01$ vs. L-Arginin alleine) und $+19 \pm 6 \%$ Anstieg der FPA ($p = 0.001$) ausgeprägter.

Studie II hatte ein randomisiertes, placebo-kontrolliertes Studiendesign, doppelt-blind in bezug auf Insulin. Wir infundierten 8 Probanden Insulin ($6 \text{ mU}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$ über 120 min) unter euglykämischen Bedingungen oder Placebo. Nach 60 Minuten wurde L-Arginin co-infundiert und die Konzentration schrittweise erhöht. Weder L-Arginin noch Insulin beeinflussten Blutdruck und Pulsrate. Die hämodynamischen Effekte von L-Arginin alleine und in Kombination mit Insulin waren vergleichbar mit den ermittelten Werten der ersten Studie. L-Arginin erzeugte einen dosisabhängigen Anstieg des RPF, GFR, FPA und MFV. Diese Effekte waren bei Hyperinsulinämie ausgeprägter für RPF ($p < 0.018$), GFR ($p = 0.006$), FPA ($p < 0.001$) und MFV ($p = 0.034$).

Unsere Daten aus Studie I und II zeigen, dass L-Arginin einen regionalen, vasodilatatorischen Effekt hat. Die potenzierte Wirkung bei Hyperinsulinämie deutet darauf hin, dass der Metabolismus von L-Arginin durch Insulin verstärkt wird. Insulin verursachte eine signifikante Linksverschiebung der regionalen, hämodynamischen Dosis-Wirkungs-Kurve von L-Arginin. Dieses stereospezifische renale und okuläre vasodilatatorische Potential von L-Arginin wird durch Insulin gesteigert, was aus einem erleichterten L-Arginin-Membrantransport, intrazellulär erhöhter NO-Bildung oder einer verbesserten NO-Bioverfügbarkeit resultieren kann.

VI Abkürzungen

Akt/PKB	Proteinkinase B	Proteinkinase B
DBP	Diastolic blood pressure	Diastolischer Blutdruck
EDNO	Endothelium derived NO	Endothel-abhängiges NO
EDRF	Endothelium derived relaxing factor	Endothel-abhängiger relaxierender Faktor
EDV	End diastolic flow velocity	Enddiastolische Flussgeschwindigkeit
FPA	Fundus pulsation rate	Funduspulsationsrate
GFR	Glomerulare filtration rate	Glomeruläre Filtrationsrate
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells	Endothelzellen menschlicher Umbilikalvenen
IRS	Insulin receptor subtype	Insulin-Rezeptorsubtyp
L-NAME	Nitro-L-arginine methyl ester	Nitro-L-Argininmethylester
L-NMMA	N ^G -monomethyl-L-arginine	N ^G -monomethyl-L-arginin
MAP	Mean arterial pressure	Mittlerer arterieller Druck
MFV	Mean flow velocity	Mittlere Flussgeschwindigkeit
NO	Nitric oxide	Stickstoffmonoxid, Stickoxid, Stickstoff-(II)-oxid
NOS	Nitric oxide synthetase	Stickstoffmonoxid-Synthetase
PFV	Peak flow velocity	Spitzenflussgeschwindigkeit
PACAP	Pituitary adenylat cyclase-activating polypeptid	Hypophysäres Adenylatzyklase-aktivierendes Polypeptid
PHI	Peptide histidine isoleucine	Peptidisches Histidin-Isoleucin
PI3K	Phosphatidyl 3-kinase	Phosphatidyl-3-kinase
PR	Pulse rate	Pulsfrequenz
PSV	Peak systolic flow velocity	Systolische Spitzenflussgeschwindigkeit
RI	Resistance index	Widerstandsindex

RPF	Renal plasma flow	Renaler Plasmafluss
RVR	Renal vascular resistance	Renaler Gefäßwiderstand
SBP	Systolic blood pressre	Systolischer Blutdruck
VSMC	Vascular smooth muscle cell	Glatte Gefäßmuskelzellen
PACAP	pituitary adenylat cyclase-activating polypeptid	hypophysäres Adenylatzyklase-aktivierendes Polypeptid
PHI	Peptide histidine isoleucine	Peptidisches Histidin-Isoleucin

VII Literaturverzeichnis

Akesson,B., Mosen,H., Panagiotidis,G. & Lundquist,I. Interaction of the islet nitric oxide system with L-arginine-induced secretion of insulin and glucagon in mice. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 758-764 (1996).

Alm A. Adler's Physiology of the eye: Clinical application St. Louis Mosby year book. *Ocular Circulation* **9th**, 198-227 (1992).

Alm,A. & Bill,A. Ocular and optic nerve blood flow at normal and increased intraocular pressures in monkeys (*Macaca irus*): a study with radioactively labelled microspheres including flow determinations in brain and some other tissues. *Exp. Eye Res.* **15**, 15-29 (1973).

American National Standarts Institute. Safe use of lasers. (1986).

Amezcuca,J.L., Palmer,R.M., de Souza,B.M. & Moncada,S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br. J. Pharmacol.* **97**, 1119-1124 (1989).

Bacchus,R.A. & London,D.R. The measurement of arginine in plasma. *Clin. Chim. Acta* **33**, 479-482 (1971).

Baron,A.D. & Brechtel,G. Insulin differentially regulates systemic and skeletal muscle vascular resistance. *Am. J. Physiol* **265**, E61-E67 (1993).

Baron,A.D., Brechtel,G., Wallace,P. & Edelman,S.V. Rates and tissue sites of non-insulin- and insulin-mediated glucose uptake in humans. *Am. J. Physiol* **255**, E769-E774 (1988).

Baron,A.D. Hemodynamic actions of insulin. *Am. J. Physiol* **267**, E187-E202 (1994).

Baron,A.D., Brechtel-Hook,G., Johnson,A. & Hardin,D. Skeletal muscle blood flow. A possible link between insulin resistance and blood pressure. *Hypertension* **21**. 129-135 (1993).

Baron,A.D. Insulin resistance and vascular function. *J. Diabetes Complications* **16**, 92-102 (2002).

Baron,A.D. Vascular reactivity. *Am. J. Cardiol.* **84**, 25J-27J (1999).

Baudouin,S.V., Bath,P., Martin,J.F., Du,B.R. & Evans,T.W. L-arginine infusion has no effect on systemic haemodynamics in normal volunteers, or systemic and pulmonary haemodynamics in patients with elevated pulmonary vascular resistance. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **36** , 45-49 (1993).

Baylis,C., Harton,P. & Engels,K. Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. *J. Am. Soc. Nephrol.* **1**. 875-881 (1990).

Bode-Boger,S.M. *et al.*, L-arginine infusion decreases peripheral arterial resistance and inhibits platelet aggregation in healthy subjects. *Clin. Sci. (Lond)* **87**, 303-310 (1994).

Bogle,R.G., Coade,S.B., Moncada,S., Pearson,J.D. & Mann,G.E. Bradykinin and ATP stimulate L-arginine uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 926-932 (1991).

Bommel,H.M. *et al.*, Anti-pterins as tools to characterize the function of tetrahydrobiopterin in NO synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, 33142-33149 (1998).

Bredt,D.S. *et al.*, Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase. *Nature* **351**. 714-718 (1991).

Butler,J.M. *et al.*, Effects of VIIth (facial) nerve degeneration on vasoactive intestinal polypeptide and substance P levels in ocular and orbital tissues of the rabbit. *Exp. Eye Res.* **39**, 523-532 (1984).

Calver,A., Collier,J. & Vallance,P. Dilator actions of arginine in human peripheral vasculature. *Clin. Sci. (Lond)* **81**. 695-700 (1991).

Calver,A., Collier,J. & Vallance,P. Nitric oxide and cardiovascular control. *Exp. Physiol* **78**, 303-326 (1993).

Campbell,W.B., Gebremedhin,D., Pratt,P.F. & Harder,D.R. Identification of epoxyeicosatrienoic acids as endothelium-derived hyperpolarizing factors. *Circ. Res.* **78**, 415-423 (1996).

Chen,P.Y. & Sanders,P.W. L-arginine abrogates salt-sensitive hypertension in Dahl/Rapp rats. *J. Clin. Invest* **88**, 1559-1567 (1991).

Chin,J.H., Azhar,S. & Hoffman,B.B. Inactivation of endothelial derived relaxing factor by oxidized lipoproteins. *J. Clin. Invest* **89**, 10-18 (1992).

Cho,H.J. *et al.*, Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages. *J. Exp. Med.* **176**, 599-604 (1992).

Cohen,R.A. & Vanhoutte,P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization. Beyond nitric oxide and cyclic GMP. *Circulation* **92**, 3337-3349 (1995).

Collingridge,G.L., Blake,J.F., Brown,M.W., Bashir,Z.I. & Ryan,E. Involvement of excitatory amino acid receptors in long-term potentiation in the Schaffer collateral-commissural pathway of rat hippocampal slices. *Can. J. Physiol Pharmacol.* **69**, 1084-1090 (1991).

Contreras,R., Fuentes,O., Mann,G.E. & Sobrevia,L. Diabetes and insulin-induced stimulation of L-arginine transport and nitric oxide synthesis in rabbit isolated gastric glands. *J. Physiol* **498 (Pt 3)**, 787-796 (1997).

Creager,M.A., Liang,C.S. & Coffman,J.D. Beta adrenergic-mediated vasodilator response to insulin in the human forearm. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **235**, 709-714 (1985).

de Belder,A.J. *et al.*, Nitric oxide synthase activities in human myocardium. *Lancet* **341**. 84-85 (1993).

DeFronzo,R.A., Tobin,J.D. & Andres,R. Glucose clamp technique: a method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am. J. Physiol* **237**, E214-E223 (1979).

Delaey,C. & Van,D., V. Regulatory mechanisms in the retinal and choroidal circulation. *Ophthalmic Res.* **32**, 249-256 (2000).

Dirnberger,E. *et al.*, Effects of nitroglycerin and sodium nitroprusside on endexpiratory concentrations of nitric oxide in healthy humans. *Life Sci.* **62**, L103-L108 (1998).

Durante,W., Liao,L. & Schafer,A.I. Differential regulation of L-arginine transport and inducible NOS in cultured vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol* **268**, H1158-H1164 (1995).

Elsas,T., Uddman,R. & Sundler,F. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide-immunoreactive nerve fibers in the cat eye. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **234**, 573-580 (1996).

Fajans,S.S., Floyd,J.C., Jr., Knopf,R.F. & Conn,F.W. Effect of amino acids and proteins on insulin secretion in man. *Recent Prog. Horm. Res.* **23**, 617-662 (1967).

Feldman,R.D. & Bierbrier,G.S. Insulin-mediated vasodilation: impairment with increased blood pressure and body mass. *Lancet* **342**, 707-709 (1993).

Feletou,M. & Vanhoutte,P.M. Endothelium-dependent hyperpolarization of canine coronary smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* **93**, 515-524 (1988).

Fercher A.F. In vivo measurement of fundus pulsations by laser interferometry. *IEEE J Quantum Electronics* **20**, 1469-1471. (1984).

Ferrari-Dileo,G., Davis,E.B. & Anderson,D.R. Biochemical evidence for cholinergic activity in retinal blood vessels. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **30**. 473-477 (1989).

- Fischmann, T.O. *et al.*, Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 233-242 (1999).
- Fisher, B.M., Gillen, G., Dargie, H.J., Inglis, G.C. & Frier, B.M. The effects of insulin-induced hypoglycaemia on cardiovascular function in normal man: studies using radionuclide ventriculography. *Diabetologia* **30**, 841-845 (1987).
- Floyd, J.C., Jr., Fajans, S.S., Conn, J.W., Knopf, R.F. & Rull, J. Stimulation of insulin secretion by amino acids. *J. Clin. Invest* **45**, 1487-1502 (1966).
- Flugel, C., Tamm, E.R., Mayer, B. & Lutjen-Drecoll, E. Species differences in choroidal vasodilative innervation: evidence for specific intrinsic nitrenergic and VIP-positive neurons in the human eye. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **35**, 592-599 (1994).
- Forstermann, U. *et al.*, Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol.* **42**, 1849-1857 (1991).
- Forstermann, U. *et al.*, Nitric oxide synthase isozymes. Characterization, purification, molecular cloning, and functions. *Hypertension* **23**, 1121-1131 (1994).
- Foulds, W.S. The choroidal circulation and retinal metabolism--an overview. *Eye* **4 (Pt 2)**, 243-248 (1990).
- Friedman, E. & Chandra, S.R. Choroidal blood flow. 3. Effects of oxygen and carbon dioxide. *Arch. Ophthalmol.* **87**, 70-71 (1972).
- Friedman, E. Choroidal blood flow. Pressure-flow relationships. *Arch. Ophthalmol.* **83**, 95-99 (1970).
- Friedmann E. & Chandra S.R. Choroidal blood flow: Effects of oxygen and carbon dioxide. *Arch Ophthalmol* **87**, 70-71 (1972)
- Furchgott, R.F. & Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* **288**, 373-376 (1980).

Garg,U.C. & Hassid,A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest* **83**, 1774-1777 (1989).

Garg,U.C. & Hassid,A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J. Clin. Invest* **83**, 1774-1777 (1989).

Gelfand,R.A. & Barrett,E.J. Effect of physiologic hyperinsulinemia on skeletal muscle protein synthesis and breakdown in man. *J. Clin. Invest* **80**. 1-6 (1987).

Geller,D.A. *et al.*, Cytokines, endotoxin, and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **90**. 522-526 (1993).

Giugliano,D. *et al.*, The vascular effects of L-Arginine in humans. The role of endogenous insulin. *J. Clin. Invest* **99**, 433-438 (1997).

Giugliano,D. *et al.*, Vascular effects of acute hyperglycemia in humans are reversed by L-arginine. Evidence for reduced availability of nitric oxide during hyperglycemia. *Circulation* **95**, 1783-1790 (1997).

Giugliano,D. *et al.*, L-arginine for testing endothelium-dependent vascular functions in health and disease. *Am. J. Physiol* **273**, E606-E612 (1997).

Gray H., Warwick R., Williams P.L. & Dyson M. *Grays Anatomy*. (1989).

Guigliano,D. *et al.*, Glucose metabolism in patients receiving chronic calcitonin treatment. *Diabete Metab* **8**, 213-216 (1982).

Guthoff,R.F., Berger,R.W., Winkler,P., Helmke,K. & Chumbley,L.C. Doppler ultrasonography of the ophthalmic and central retinal vessels. *Arch. Ophthalmol.* **109**, 532-536 (1991).

- Handy, R.L. *et al.*, Inhibition of nitric oxide synthase by 1-(2-trifluoromethylphenyl) imidazole (TRIM) in vitro: antinociceptive and cardiovascular effects. *Br. J. Pharmacol.* **119**, 423-431 (1996).
- Harris, A., Arend, O., Wolf, S., Cantor, L.B. & Martin, B.J. CO₂ dependence of retinal arterial and capillary blood velocity. *Acta Ophthalmol. Scand.* **73**, 421-424 (1995).
- Haynes, W.G., Ferro, C.E. & Webb, D.J. Physiologic role of endothelin in maintenance of vascular tone in humans. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **26 Suppl 3**, S183-S185 (1995).
- Haynes, W.G., Noon, J.P., Walker, B.R. & Webb, D.J. Inhibition of nitric oxide synthesis increases blood pressure in healthy humans. *J. Hypertens.* **11**, 1375-1380 (1993).
- Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R. & Vavrin, Z. Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**, 473-476 (1987).
- Hibbs, J.B., Jr., Vavrin, Z. & Taintor, R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.* **138**, 550-565 (1987).
- Higashi, Y. *et al.*, Effects of L-arginine infusion on renal hemodynamics in patients with mild essential hypertension. *Hypertension* **25**, 898-902 (1995).
- Hishikawa, K., Nakaki, T., Suzuki, H., Kato, R. & Saruta, T. Role of L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *J. Hypertens.* **11**, 639-645 (1993).
- Hishikawa, K. *et al.*, Effect of systemic L-arginine administration on hemodynamics and nitric oxide release in man. *Jpn. Heart J.* **33**, 41-48 (1992).
- Hou, Y.C., Janczuk, A. & Wang, P.G. Current trends in the development of nitric oxide donors. *Curr. Pharm. Des* **5**, 417-441 (1999).
- Ignarro, L.J. Heme-dependent activation of guanylate cyclase by nitric oxide: a novel signal transduction mechanism. *Blood Vessels* **28**, 67-73 (1991).

Ignarro,L.J. *et al.*, Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **170**. 843-850 (1990).

Imaizumi,T. *et al.*, Effects of L-arginine on forearm vessels and responses to acetylcholine. *Hypertension* **20**. 511-517 (1992).

Johnson,P.C. Autoregulation of blood flow. *Circ. Res.* **59**, 483-495 (1986).

Kahn,A.M. *et al.*, Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension* **22**, 735-742 (1993).

Kahn,A.M. *et al.*, Insulin reduces contraction and intracellular calcium concentration in vascular smooth muscle. *Hypertension* **22**, 735-742 (1993).

Kauffmann G., Moser E & Wunsch C. *Radiologie.* (1996).

Kelm,M. Nitric oxide metabolism and breakdown. *Biochim. Biophys. Acta* **1411**. 273-289 (1999).

Kergoat,H. & Faucher,C. Effects of oxygen and carbogen breathing on choroidal hemodynamics in humans. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **40**. 2906-2911 (1999).

Ketteler,M. *et al.*, [Nitric oxide, L-arginine and the kidney. Experimental studies of new therapy approaches]. *Med. Klin.* **93**, 15-21 (1998).

Ketteler,M. *et al.*, [Nitric oxide, L-arginine and the kidney. Experimental studies of new therapy approaches]. *Med. Klin.* **93**, 15-21 (1998).

Ketteler,M., Border,W.A. & Noble,N.A. Cytokines and L-arginine in renal injury and repair. *Am. J. Physiol* **267**, F197-F207 (1994).

Kharitonov,S.A., Lubec,G., Lubec,B., Hjelm,M. & Barnes,P.J. L-arginine increases exhaled nitric oxide in normal human subjects. *Clin. Sci. (Lond)* **88**, 135-139 (1995).

- Klatt,P. *et al.*, The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase. Tetrahydrobiopterin binding kinetics, specificity, and allosteric interaction with the substrate domain. *J. Biol. Chem.* **269**, 13861-13866 (1994).
- Klatt,P. *et al.*, Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer. *EMBO J.* **14**, 3687-3695 (1995).
- Knabben,H. *et al.*, [Retinal hemodynamics in patients with hyperviscosity syndrome]. *Klin. Monatsbl. Augenheilkd.* **206**, 152-156 (1995).
- Knowles,R.G. & Moncada,S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem. J.* **298 (Pt 2)**, 249-258 (1994).
- Kondo,M., Wang,L. & Bill,A. The role of nitric oxide in hyperaemic response to flicker in the retina and optic nerve in cats. *Acta Ophthalmol. Scand.* **75**, 232-235 (1997).
- Kotsonis,P. *et al.*, Structural basis for pterin antagonism in nitric-oxide synthase. Development of novel 4-oxo-pteridine antagonists of (6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin. *J. Biol. Chem.* **276**, 49133-49141 (2001).
- Kubes,P., Suzuki,M. & Granger,D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 4651-4655 (1991).
- Lamas,S., Marsden,P.A., Li,G.K., Tempst,P. & Michel,T. Endothelial nitric oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme isoform. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **89**, 6348-6352 (1992).
- Laties,A.M. Central retinal artery innervation. Absence of adrenergic innervation to the intraocular branches. *Arch. Ophthalmol.* **77**, 405-409 (1967).
- Liang,C. *et al.*, Insulin infusion in conscious dogs. Effects on systemic and coronary hemodynamics, regional blood flows, and plasma catecholamines. *J. Clin. Invest* **69**, 1321-1336 (1982).

Lieb,W.E. *et al.*, Color Doppler imaging of the eye and orbit. Technique and normal vascular anatomy. *Arch. Ophthalmol.* **109**, 527-531 (1991).

Lowenstein,C.J., Dinerman,J.L. & Snyder,S.H. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann. Intern. Med.* **120**. 227-237 (1994).

Luescher,T.F., Boulanger,C.M., Dohi,Y. & Yang,Z.H. Endothelium-derived contracting factors (Brief review). *Hypertension* **19**. 117-130 (1992).

Luescher,T.F., Yang,Z.H. & Tschudi,M. Interaction between endothelin-1 and endothelium-derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ.Res.* **66**, 1088-1094 (1990).

Lukic,M.L., Stosic-Grujicic,S., Ostojic,N., Chan,W.L. & Liew,F.Y. Inhibition of nitric oxide generation affects the induction of diabetes by streptozocin in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 913-920 (1991).

Lundberg,J.O., Rinder,J., Weitzberg,E., Lundberg,J.M. & Alving,K. Nasally exhaled nitric oxide in humans originates mainly in the paranasal sinuses. *Acta Physiol Scand.* **152**, 431-432 (1994).

Luxenberg,M.N. & Mausolf,F.A. Retinal circulation in the hyperviscosity syndrome. *Am. J. Ophthalmol.* **70** , 588-598 (1970).

MacAllister,R.J. *et al.*, Vascular and hormonal responses to arginine: provision of substrate for nitric oxide or non-specific effect? *Clin. Sci. (Lond)* **89**, 183-190 (1995).

Malvezzi,C.K., Moreira,E.G., Vassilieff,I., Vassilieff,V.S. & Cordellini,S. Effect of L-arginine, dimercaptosuccinic acid (DMSA) and the association of L-arginine and DMSA on tissue lead mobilization and blood pressure level in plumbism. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **34**, 1341-1346 (2001).

Mann,R.M., Riva,C.E., Stone,R.A., Barnes,G.E. & Cranstoun,S.D. Nitric oxide and choroidal blood flow regulation. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **36**, 925-930 (1995).

Marletta, M.A., Tayeh, M.A. & Hevel, J.M. Unraveling the biological significance of nitric oxide. *Biofactors* **2**, 219-225 (1990).

Masaki, T. The discovery, the present state, and the future prospects of endothelin. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **13 Suppl 5**, S1-S4 (1989).

McCall, T.B., Boughton-Smith, N.K., Palmer, R.M., Whittle, B.J. & Moncada, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion. *Biochem. J.* **261**, 293-296 (1989).

Mehta, S., Stewart, D.J. & Levy, R.D. The hypotensive effect of L-arginine is associated with increased expired nitric oxide in humans. *Chest* **109**, 1550-1555 (1996).

Mehta, S., Stewart, D.J., Langleben, D. & Levy, R.D. Short-term pulmonary vasodilation with L-arginine in pulmonary hypertension. *Circulation* **92**, 1539-1545 (1995).

Meyer, P., Flammer, J. & Luscher, T.F. Endothelium-dependent regulation of the ophthalmic microcirculation in the perfused porcine eye: role of nitric oxide and endothelins. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **34**, 3614-3621 (1993).

Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 642-644 (1989).

Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine. A pathway for the regulation of cell function and communication. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1709-1715 (1989).

Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator. *Hypertension* **12**, 365-372 (1988).

Moncada, S. The 1991 Ulf von Euler Lecture. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand.* **145**, 201-227 (1992).

Moncada, S., Palmer, R.M. & Higgs, E.A. The biological significance of nitric oxide formation from L-arginine. *Biochem. Soc. Trans.* **17**, 642-644 (1989).

Moncada,S. & Higgs,A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* **329**, 2002-2012 (1993).

Natali,A. *et al.*, Effects of insulin on hemodynamics and metabolism in human forearm. *Diabetes* **39**, 490-500 (1990).

Nathan,C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J.* **6**, 3051-3064 (1992).

Nathan,C. & Xie,Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 13725-13728 (1994).

Nathan,C. & Xie,Q.W. Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.* **269**, 13725-13728 (1994).

Nathan,C.F. & Hibbs,J.B., Jr. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. *Curr. Opin. Immunol.* **3**, 65-70 (1991).

Palmer,R.M. & Moncada,S. A novel citrulline-forming enzyme implicated in the formation of nitric oxide by vascular endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **158**, 348-352 (1989).

Panagiotidis,G., Akesson,B., Rydell,E.L. & Lundquist,I. Influence of nitric oxide synthase inhibition, nitric oxide and hydroperoxide on insulin release induced by various secretagogues. *Br. J. Pharmacol.* **114**, 289-296 (1995).

Paolisso,G. *et al.*, L-arginine but not D-arginine stimulates insulin-mediated glucose uptake. *Metabolism* **46**, 1068-1073 (1997).

Pegg,A.E. Recent advances in the biochemistry of polyamines in eukaryotes. *Biochem. J.* **234**, 249-262 (1986).

Pernkopf E.,P.W. Anatomie, in 2 Bnd. (1987).

Polak,K. *et al.*, Effects of insulin on retinal and pulsatile choroidal blood flow in humans. *Arch. Ophthalmol.* **118**, 55-59 (2000).

Polak,K. *et al.*, Effects of insulin on retinal and pulsatile choroidal blood flow in humans. *Arch. Ophthalmol.* **118**, 55-59 (2000).

Polak,K. *et al.*, Effects of insulin on retinal and pulsatile choroidal blood flow in humans. *Arch. Ophthalmol.* **118**, 55-59 (2000).

Poljakovic,M., Karpman,D., Svanborg,C. & Persson,K. Human renal epithelial cells express iNOS in response to cytokines but not bacteria. *Kidney Int.* **61**. 444-455 (2002).

Poulos,T.L., Raman,C.S. & Li,H. NO news is good news. *Structure.* **6**, 255-258 (1998).

Prager,R., Wallace,P. & Olefsky,J.M. In vivo kinetics of insulin action on peripheral glucose disposal and hepatic glucose output in normal and obese subjects. *J. Clin. Invest* **78**, 472-481 (1986).

Radomski,M.W., Palmer,R.M. & Moncada,S. Modulation of platelet aggregation by an L-arginine-nitric oxide pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* **12**, 87-88 (1991).

Raman,C.S. *et al.*, Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: a paradigm for pterin function involving a novel metal center. *Cell* **95**, 939-950 (1998).

Rand,M.J. Nitrenergic transmission: nitric oxide as a mediator of non-adrenergic, non-cholinergic neuro-effector transmission. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol* **19**, 147-169 (1992).

Rees,D.D., Palmer,R.M. & Moncada,S. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **86**, 3375-3378 (1989).

Riva,C.E., Grunwald,J.E. & Sinclair,S.H. Laser Doppler Velocimetry study of the effect of pure oxygen breathing on retinal blood flow. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **24**, 47-51 (1983).

- Riva,C.E., Titze,P., Hero,M., Movaffaghy,A. & Petrig,B.L. Choroidal blood flow during isometric exercises. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 2338-2343 (1997).
- Riva,C.E., Titze,P., Hero,M. & Petrig,B.L. Effect of acute decreases of perfusion pressure on choroidal blood flow in humans. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 1752-1760 (1997).
- Robinson,F., Riva,C.E., Grunwald,J.E., Petrig,B.L. & Sinclair,S.H. Retinal blood flow autoregulation in response to an acute increase in blood pressure. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **27**, 722-726 (1986).
- Rose WC, Haines WJ & Warner DT. The amino acid requirements of man: the role of lysine, arginine, and tryptophan. *J. Biol. Chem.* 421-430 (1954).
- Roufail,E., Stringer,M. & Rees,S. Nitric oxide synthase immunoreactivity and NADPH diaphorase staining are co-localised in neurons closely associated with the vasculature in rat and human retina. *Brain Res.* **684**, 36-46 (1995).
- Rowe,J.W. *et al.*, Effect of insulin and glucose infusions on sympathetic nervous system activity in normal man. *Diabetes* **30**. 219-225 (1981).
- Rubanyi,G.M., Romero,J.C. & Vanhoutte,P.M. Flow-induced release of endothelium-derived relaxing factor. *Am. J. Physiol* **250**. H1145-H1149 (1986).
- Scherrer,U., Randin,D., Vollenweider,P., Vollenweider,L. & Nicod,P. Nitric oxide release accounts for insulin's vascular effects in humans. *J. Clin. Invest* **94**, 2511-2515 (1994).
- Schmetterer,L. *et al.*, Noninvasive investigations of the normal ocular circulation in humans. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **39**, 1210-1220 (1998).
- Schmetterer,L. *et al.*, Nitric oxide and ocular blood flow in patients with IDDM. *Diabetes* **46**, 653-658 (1997).
- Schmetterer,L. *et al.*, Topical fundus pulsation measurements in age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* **236**, 160-163 (1998).

Schmetterer,L. *et al.*, The effect of systemic nitric oxide-synthase inhibition on ocular fundus pulsations in man. *Exp. Eye Res.* **64**, 305-312 (1997).

Schmetterer,L. *et al.*, Effects of endothelin-1 (ET-1) on ocular hemodynamics. *Curr. Eye Res.* **16**, 687-692 (1997).

Schmetterer,L. *et al.*, Renal and ocular hemodynamic effects of insulin. *Diabetes* **46**, 1868-1874 (1997).

Schmetterer,L., Lexer,F., Unfried,C., Sattmann H. & Fercher A. A Topical measurement of fundus pulsations. *Opt.Eng.* **34**, 711-716. (1995)

Schmidt,H.H. & Walter,U. NO at work. *Cell* **78**, 919-925 (1994).

Schnurr,E., Lahme,W. & Koppers,H. Measurement of renal clearance of inulin and PAH in the steady state without urine collection. *Clin. Nephrol.* **13**, 26-29 (1980).

Sigmon,D.H., Carretero,O.A. & Beierwaltes,W.H. Angiotensin dependence of endothelium-mediated renal hemodynamics. *Hypertension* **20**. 643-650 (1992).

Silbernagl,S. The renal handling of amino acids and oligopeptides. *Physiol Rev.* **68**, 911-1007 (1988).

Smulders,R.A. *et al.*, Plasma endothelin levels and vascular effects of intravenous L-arginine infusion in subjects with uncomplicated insulin-dependent diabetes mellitus. *Clin. Sci. (Lond)* **87**, 37-43 (1994).

Sobrevia,L., Nadal,A., Yudilevich,D.L. & Mann,G.E. Activation of L-arginine transport (system y+) and nitric oxide synthase by elevated glucose and insulin in human endothelial cells. *J. Physiol* **490 (Pt 3)**, 775-781 (1996).

Stamler,J.S., Loh,E., Roddy,M.A., Currie,K.E. & Creager,M.A. Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* **89**, 2035-2040 (1994).

Stamler, J.S., Singel, D.J. & Loscalzo, J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* **258**, 1898-1902 (1992).

Steinberg, H.O., Brechtel, G., Johnson, A., Fineberg, N. & Baron, A.D. Insulin-mediated skeletal muscle vasodilation is nitric oxide dependent. A novel action of insulin to increase nitric oxide release. *J. Clin. Invest* **94**, 1172-1179 (1994).

Steinberg, H.O. & Baron, A.D. Insulin-mediated vasodilation: why one's physiology could be the other's pharmacology. *Diabetologia* **42**, 493-495 (1999).

Steinberg, H.O., Brechtel, G., Johnson, A. & Baron, A.D. Insulin modulates endothelium derived relaxing factor/nitric oxide dependent vasodilation in skeletal muscle. *Hypertension Dallas* **22**, 74-436 (1993).

Stjernschantz, J. & Bill, A. Vasomotor effects of facial nerve stimulation: noncholinergic vasodilation in the eye. *Acta Physiol Scand.* **109**, 45-50 (1980).

Stjernschantz, J., Geijer, C. & Bill, A. Electrical stimulation of the fifth cranial nerve in rabbits: effects on ocular blood flow, extravascular albumin content and intraocular pressure. *Exp. Eye Res.* **28**, 229-238 (1979).

Stjernschantz, J. & Bill, A. Effect of intracranial stimulation of the oculomotor nerve on ocular blood flow in the monkey, cat, and rabbit. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **18**, 99-103 (1979).

Stone, R.A., Kuwayama, Y. & Laties, A.M. Regulatory peptides in the eye. *Experientia* **43**, 791-800 (1987).

Strauss, A.L. & Kedra, A.W. Experiences with a new procedure for the measurement of the ophthalmic artery pressure: ophthalmomanometry-Doppler. *Med. Instrum.* **21**. 255-261 (1987).

Takagi, C. *et al.*, Endothelin-1 action via endothelin receptors is a primary mechanism modulating retinal circulatory response to hyperoxia. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **37**, 2099-2109 (1996).

Tayeh, M.A. & Marletta, M.A. Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *J. Biol. Chem.* **264**, 19654-19658 (1989).

Thomsen, L.L. *et al.*, Nitric oxide synthase activity in human gynecological cancer. *Cancer Res.* **54**, 1352-1354 (1994).

Trovati, M. *et al.*, Insulin stimulates nitric oxide synthesis in human platelets and, through nitric oxide, increases platelet concentrations of both guanosine-3', 5'-cyclic monophosphate and adenosine-3', 5'-cyclic monophosphate. *Diabetes* **46**, 742-749 (1997).

Ueda, S., Petrie, J.R., Cleland, S.J., Elliott, H.L. & Connell, J.M. Insulin vasodilatation and the „arginine paradox“. *Lancet* **351**. 959-960 (1998).

Vallance, P., Palmer, R.M. & Moncada, S. The role of induction of nitric oxide synthesis in the altered responses of jugular veins from endotoxaemic rabbits. *Br. J. Pharmacol.* **106**, 459-463 (1992).

Vallance, P. & Moncada, S. Hyperdynamic circulation in cirrhosis: a role for nitric oxide? *Lancet* **337**, 776-778 (1991).

Vanhoutte, P.M. Vascular physiology: the end of the quest? *Nature* **327**, 459-460 (1987).

Vissek, W.J. Arginine needs, physiological state and usual diets. A reevaluation. *J. Nutr.* **116**, 36-46 (1986).

Voet D., C.W.Pratt & C.W.Pratt. Lehrbuch der Biochemie. (4 A.D.).

Vollenweider, P. *et al.*, Differential effects of hyperinsulinemia and carbohydrate metabolism on sympathetic nerve activity and muscle blood flow in humans. *J. Clin. Invest* **92**, 147-154 (1993).

Waldman,S.A. & Murad,F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **12 Suppl 5**, S115-S118 (1988).

Wang,C.H. *et al.*, Upregulation of inducible nitric oxide synthase and cytokine secretion in peripheral blood monocytes from pulmonary tuberculosis patients. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* **5**, 283-291 (2001).

Wang,L., Kondo,M. & Bill,A. Glucose metabolism in cat outer retina. Effects of light and hyperoxia. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **38**, 48-55 (1997).

Ward,P.A. Mechanisms of endothelial cell injury. *J. Lab Clin. Med.* **118**, 421-426 (1991).

Watford,M. The urea cycle: a two-compartment system. *Essays Biochem.* **26**, 49-58 (1991).

Waugh,W.H. & Beall,P.T. Simplified measurement of p-aminohippurate and other arylamines in plasma and urine. *Kidney Int.* **5**, 429-436 (1974).

Weigelin E,L.A. OphthalmodynamometrieBasel. Karger, (1962).

White,M.F. The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **822**, 355-374 (1985).

Wolzt,M. *et al.*, Exogenous L-arginine does not affect angiotensin II-induced renal vasoconstriction in man. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **45**, 71-75 (1998).

Wolzt,M. *et al.*, Comparison of non-invasive methods for the assessment of haemodynamic drug effects in healthy male and female volunteers: sex differences in cardiovascular responsiveness. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **39**, 347-359 (1995).

Wolzt,M. *et al.*, Effect of nitric oxide synthase inhibition on renal hemodynamics in humans: reversal by L-arginine. *Am. J. Physiol* **272**, F178-F182 (1997).

Xie,Q. & Nathan,C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J. Leukoc. Biol.* **56**, 576-582 (1994).

Xie,Q.W. *et al.*, Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* **256**, 225-228 (1992).

Yagi,S. *et al.*, Effects of insulin on vasoconstrictive responses to norepinephrine and angiotensin II in rabbit femoral artery and vein. *Diabetes* **37**, 1064-1067 (1988).

Ye,X.D., Laties,A.M. & Stone,R.A. Peptidergic innervation of the retinal vasculature and optic nerve head. *Invest Ophthalmol. Vis. Sci.* **31**. 1731-1737 (1990).

Young,J.A. & Freedman,B.S. Renal tubular transport of amino acids. *Clin. Chem.* **17**, 245-266 (1971).

Zeng,G. *et al.*, Roles for insulin receptor, PI3-kinase, and Akt in insulin-signaling pathways related to production of nitric oxide in human vascular endothelial cells. *Circulation* **101**. 1539-1545 (2000).

Zeng,G. & Quon,M.J. Insulin-stimulated production of nitric oxide is inhibited by wortmannin. Direct measurement in vascular endothelial cells. *J. Clin. Invest* **98**, 894-898 (1996).

Zhang,J., Patel,J.M., Li,Y.D. & Block,E.R. Proinflammatory cytokines downregulate gene expression and activity of constitutive nitric oxide synthase in porcine pulmonary artery endothelial cells. *Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.* **96**, 71-87 (1997).