

4. Diskussion

Um den Einfluss des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre Konzentration von Calcium und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen bei Patienten mit essentieller Hypertonie und gesunden Kontrollpersonen zu zeigen, wurde aus dem Blut der Probanden Lymphozyten isoliert und untersucht. Als zusätzliche Stimulantien wurden in vitro PMA, Human-Insulin, 5%ige Glucose und das Lacton Thapsigargin eingesetzt.

Im Rahmen der Fragestellung eines möglichen Zusammenhangs zwischen akuter Zuckerbelastung, kurzzeitiger arterieller Stauung und veränderter peripherer Gefäßelastizität wurde zusätzlich der Reflective Index (RI) bestimmt und die Unterschiede in den Untersuchungsgruppen miteinander verglichen und diskutiert.

4.1 Veränderung des Reflective Index nach oraler Glucosebelastung

Die eingeschränkte Dehnungsfähigkeit (Compliance) der Gefäße bei atherosklerotischer Veränderung geht mit erhöhter „Stiffness“ der Arterienwand und letztlich erhöhtem peripheren Widerstand einher (Tsuchiya et al., 2005, Ohta et al., 2005).

In Abhängigkeit von peripherem Widerstand und Gefäßdurchmesser ändert sich die Amplitude der Pulswelle, die umso höher ist, je kleiner das Gefäßlumen ist.

Wie in der Literatur beschrieben besteht die digitale Pulswelle aus einer systolischen und einer diastolischen Komponente, wobei der diastolische Anteil die Pulswellenreflexion in der Peripherie widerspiegelt. Als sogenannter „Marker“ der Pulswellenreflexion und des peripheren Widerstandes dient der Reflective Index (Manabe et al., 2005, Tsuchiya et al., 2005), der mittels digitaler Photoplethysmographie ermittelt wird (Millassau et al., 2003). Der Reflective Index ist assoziiert mit der Schwere der Atherosklerose (Ohta et al., 2005, Leoncini et al., 2002) und umso höher, je enger der Gefäßdurchmesser ist.

Zunächst wurde mithilfe des oralen Glucose-Toleranztests der Effekt kurzfristigen Zuckerstress auf die Gefäßelastizität betrachtet.

Um die Veränderung der Gefäßelastizität nach akuter oraler Glucosebelastung im Sinne einer kurzfristigen Stress-Situation bei Bluthochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen feststellen zu können, wurde bei jedem Studienteilnehmer die nicht invasive Methodik der

digitalen Photoplethysmographie angewendet und so das Ausmaß der Pulswellenreflexion in der Peripherie, ausgedrückt durch den Reflective Index, ermittelt.

Im Rahmen unserer Untersuchungen bei Patienten mit essentieller Hypertonie kam es zu einem signifikanten Abfall des Reflective Index nach oraler Glucosebelastung ($n=24$, $p<0,01$ und $p<0,05$ mit KRUSKAL – WALLIS – TEST).

Scheinbar führte akuter Zuckerstress zu einer paradoxen Gefäßreaktion, charakterisiert durch einen Abfall des peripheren Widerstandes mit resultierender Vasodilatation und vermindertem Reflective Index bei Patienten mit essentieller Hypertonie. Nachvollziehbar wäre allerdings auch eine verminderte Gefäßelastizität durch vaskuläre Schädigung oder „hyperglykämischen Stress“, ausgedrückt durch einen erhöhten Reflective Index in der Patientengruppe, wie beispielsweise in einer Studie von Ohta et al., 2005, in der erwartungsgemäß signifikant erhöhte Reflective Indices bei Patienten mit diabetischer Nephropathie ermittelt wurden. Auch Valensise & Romanini 1993 beschrieben in einer Veröffentlichung gesteigerte arterielle Gefäßwiderstände nach oralem Glucose-Toleranztest ausgedrückt durch hohe Reflective Indices.

Die durchschnittlich verminderte Gefäßelastizität charakterisiert durch einen vergleichsweise hohen Reflective Index – Wert noch vor oraler Glucosebelastung bei Patienten mit essentieller Hypertonie ($37,6 \pm 2,9$ Mittelwerte \pm SEM) im Gegensatz zu den gesunden Kontrollen ($32,0 \pm 3,4$ Mittelwerte \pm SEM) ist offenbar Ausdruck der eingeschränkten Gefäßfunktion im Rahmen der essentieller Hypertonie.

Der darauf folgende markante Abfall des Reflective Index bei Patienten mit primärer Hypertonie zeigt, dass die Gefäße aufgrund reduzierter Elastizität und Dehnbarkeit nicht mehr adäquat auf die gegebene (Zucker-) Stress – Situation reagieren können: anstelle einer Vasokonstriktion kann es scheinbar „nur noch“ zu einer Weitstellung der Gefäße kommen.

In einer Veröffentlichung von Pardo et al., 1999 kam es ebenfalls nach oralem Glucose-Toleranztest im Mittel zu einem signifikanten Abfall des Reflective Index in den Zerebralarterien ungeborener Feten als Reaktion auf die gegebene (Zucker-) Stress – Situation.

Im Unterschied zur Patientengruppe ergaben die Messungen bei den gesunden Kontrollpersonen in der vorliegenden Arbeit keine signifikanten Veränderungen des Reflective Index während oraler Glucose - Belastung ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Dies zeigt die Variabilität der Wirkung oraler Glucosebelastung auf die Gefäßreaktion.

In der Gruppe der normotensiven Kontrollpersonen zeigte sich im Durchschnitt ein diskreter Anstieg des Reflective Index eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest, wahrscheinlich als Ausdruck einer leichten Erhöhung des peripheren Widerstandes durch die kurzfristige

Hyperglykämie. Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest zeigte sich ein im Mittel niedrigerer Reflective Index im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Dieser Abfall deutet womöglich auf die Normalisierung der Gefäßelastizität bei wieder einsetzender Normoglykämie in der Kontrollgruppe hin.

Unter akuter Zuckerbelastung reagierten Patienten mit essentieller Hypertonie primär mit einer Vasodilatation im Sinne einer paradoxen bzw. inversen Gefäßreaktion, charakterisiert durch eine signifikant verminderte Pulswellenreflexion in der Peripherie, die wahrscheinlich Ausdruck der gestörten Gefäßfunktion bzw. -elastizität ist.

Normotensive Probanden zeigten währenddessen keine Auffälligkeiten in der Veränderung der Pulswellenreflexion unter hyperglykämischen Bedingungen.

4.2 Veränderung des Reflective Index nach arterieller Stauung unter oraler Glucosebelastung

Um probandenspezifische Unterschiede der Gefäßelastizität herausstellen zu können, simulierten wir neben oraler Zuckerbelastung eine weitere vaskuläre Stress-Situation durch Anlage einer Blutdruckmanschette am Oberarm jedes Probanden. Nach Lösen der kurzzeitigen suprasystolischen Stauung von über 200 mmHg wurde während der reaktiven Weitstellung der Gefäße (reaktive Hyperämie) erneut der Reflective Index gemessen.

Einige Autoren berichten über einen messbaren Stress vermittelten Einfluss auf Gefäßreaktivität und Hämodynamik (Lind et al., 2002): Mithilfe zweier verschiedener Stress-Tests (MAT = Mental Arithmetic Task und COP = Cold Pressure Test) an gesunden Probanden konnte ein Anstieg des Blutdrucks sowie eine signifikante Verminderung der endothelabhängigen Vasodilatation (FMD = flow-mediated vasodilation) festgestellt werden. Eine reduzierte FMD bedeutet einen erhöhten Gefäßwiderstand, dieser ist wiederum mit einem erhöhten Reflective Index assoziiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun – vergleichbar mit dem Einsatz des Cold Pressure Tests – mittels OGTT und suprasystolischen Staus der Effekt kurzfristigen Zuckerstresses und kurzfristiger Ischämie auf die Gefäßelastizität betrachtet.

Die Untersuchungen ergaben bei Patienten mit essentieller Hypertonie einen kontinuierlichen, jedoch nicht signifikanten Abfall des Reflective Index nach arterieller Stauung und oraler Glucosebelastung, wobei der Zweistundenwert von $33,6 \pm 3,2$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $31,8 \pm 3,0$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest sank der Reflective Index auf $29,6 \pm 2,7$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Verglichen mit den Resultaten unter alleiniger Zuckerbelastung bestätigte sich auch nach suprasystolischer Stauung die Tendenz einer paradoxen Gefäßreaktion im Sinne forcierter Weitstellung der Gefäße. Diese ausgeprägte reaktive Hyperämie kann wiederum als Ausdruck gestörter Gefäßelastizität gedeutet werden, was die kontinuierliche Verminderung des Reflective Index unterstreicht.

Zusammenfassend konnte ein überwiegender Abfall des peripheren Widerstandes ausgedrückt durch abfallende Reflective Indices bei Patienten mit essentieller Hypertonie nach Stress-Induktion mittels kurzzeitiger arterieller Stauung unter OGTT festgestellt werden.

Gesunde Studienteilnehmer dagegen reagierten ähnlich wie unter alleiniger Glucosebelastung initial mit einem Anstieg des Reflective Index ($n=24$, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), vergleichbar mit den Ergebnissen der Studie von Lind et al., 2002. Dem entgegen steht der signifikante Abfall des Reflective Index bei normotensiven Kontrollpersonen zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest und arteriellem Stau im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p < 0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Offensichtlich führte der abnehmende Glucosespiegel verbunden mit der maximalen Weitstellung der Gefäße im Rahmen der reaktiven Hyperämie zu einer überschießenden Vasodilatation, charakterisiert durch die signifikante Verminderung der Pulswellenreflexion in der Peripherie.

4.3 Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre basale Calciumkonzentration

Wie in unterschiedlichen Studien beschrieben wird ein Zusammenhang zwischen veränderter intrazellulärer Calciumkonzentration und der Entstehung primärer (essentieller) Hypertonie vermutet, insbesondere bei vorliegender Insulinresistenz verbunden mit erhöhten Plasma - Glucosewerten sowie erhöhtem Plasma – Insulin - Spiegel (Byyny et al., 1992, Fu et al., 1997, Ohno et al., 2000, Tang et al. 2004, Horio et al., 2005).

So konnte beispielsweise bei Patienten mit manifester essentieller Hypertonie und Insulinresistenz eine gestörte Funktion der Ca^{2+} - ATPase im Sinne einer Suppression der ATPase (Fu et al., 1997) beobachtet werden. Die verminderte Aktivität des Calcium - Transportsystems führte bei diesen Patienten zu signifikant gesteigerten $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentrationen, nicht jedoch bei normotensiven Kontrollpersonen.

Den Einfluss von Insulin auf die intrazelluläre Calciumhomöostase im Sinne eines Insulin - abhängigen Calciumanstiegs zeigten auch Untersuchungen von Zhu et al., 1993 und Touyz & Schiffrin, 1994 an primär hypertensiven (SHR) und normotensiven (WKY) Ratten.

Signifikant höhere $[\text{Ca}^{2+}]_i$ - Konzentrationen ließen sich bei Tieren mit essentieller Hypertonie (SHR) feststellen, nicht aber bei der normotensiven Kontrollgruppe (WKY) (Touyz & Schiffrin, 1994).

Die fluoreszenzphotometrischen Messungen der intrazellulären Calciumkonzentration ergaben in der vorliegenden Arbeit ebenfalls signifikante Veränderungen bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie. Unter oraler Glucosebelastung konnte ein signifikanter Anstieg des intrazellulären Calciums sowohl eine Stunde ($n=24$, $p<0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) als auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p<0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) nachgewiesen werden.

In der Kontrollgruppe dagegen war der Zweistundenwert nach OGTT signifikant erhöht ($n=24$, $p<0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Allerdings war der Anstieg des Calciums mit $1,34 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,53 \pm 0,1$ zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest deutlich geringer ausgeprägt als bei Patienten mit essentieller Hypertonie.

Der Einstundenwert der intrazellulären Calciumkonzentration war in der Kontrollgruppe mit $1,52 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM) zwar höher als der Ausgangswert, jedoch nicht signifikant

unterschiedlich ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass unter kurzfristiger oraler Zuckerbelastung ein markanter Anstieg des basalen Calciums bei hypertensiven Patienten und normotensiven Kontrollen zu verzeichnen war, der Calciumanstieg bei den gesunden Testpersonen jedoch eine geringere Ausprägung aufwies als bei Patienten mit primärer Hypertonie.

Insulin ist das wichtigste Hormon des Intermediärstoffwechsels und für die Regulation des intrazellulären Bedarfs an Aminosäuren, Fettsäuren und Glucose verantwortlich, insbesondere in Muskulatur und Fettgewebe. Physiologischerweise findet man Insulin-Konzentrationen von 150-250 I.E. gespeichert in den B-Zellen der Langerhansschen Inseln. Pro Tag werden zwischen 20 und 40 I.E. Insulin ins Blut abgegeben.

Bei vorhandener genetischer Disposition kann es im Rahmen eines metabolischen Syndroms durch erhöhte Insulinsekretion zur Downregulation der Insulinrezeptoren kommen, daraus resultiert eine verminderte oder fehlende Insulinwirkung. Dieser pathologische Zustand wird als Insulinresistenz bezeichnet. Das Überangebot an Insulin fördert direkt über Lipideinlagerung in die Gefäßwand und Muskelzellproliferation einerseits und indirekt durch Dyslipoproteinämie und Hyperglykämie andererseits die Entstehung von Hypertonie und Artherosklerose.

Die Fragestellung eines kausalen Zusammenhangs zwischen Insulinresistenz und der Entstehung essentieller Hypertonie war und ist Gegenstand zahlreicher Studien (Ohno et al., 2000, Tang et al. 2004, Horio et al., 2005), wobei einige Autoren insbesondere den Faktor der veränderten intrazellulären Calciumkonzentration bei Patienten mit essentieller Hypertonie in ihre Untersuchungen einschlossen (Byyny et al. 1992 und Fu et al., 1997).

Dieses Kriterium galt auch in Bezug auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit.

Nach Insulin - Stimulation konnte bei Lymphozyten von Patienten mit primärer Hypertonie ein signifikanter Anstieg des intrazellulären Calciums nachgewiesen werden ($n=24$, $p<0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den Zellen normotensiver Probanden ein initialer Abfall der basalen intrazellulären Calciumkonzentration nach Insulin - Gabe ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), gefolgt von einem Anstieg nach der Zweistundenmessung ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Diese Resultate bestätigen die in der Literatur beschriebene Hypothese eines Insulin sensitiven intrazellulären Calciumanstiegs bei Patienten mit essentieller Hypertonie und unterstreichen

einen möglichen kausalen Zusammenhang zwischen primärerem Bluthochdruck, Insulinresistenz und veränderter Calciumhomöostase.

Neben Insulin vermittelten Veränderungen in Bezug auf die intrazelluläre Calciumkonzentration beeinflussen außerdem hohe Glucosekonzentrationen und Proteinkinase C vermittelte Mechanismen das intrazelluläre Calcium - Gleichgewicht (Kindmark et al., 1994, Christopher et al., 2001, Nutt & O'Neil 2000, Dang et al., 2005, Frecker et al., 2005).

Beispielsweise zeigten Untersuchungen von Dang et al., 2005 an glatter Gefäßendothel, dass die Stimulation mit Glucose und PMA zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität verbunden mit einer verminderten intrazellulären Calciumkonzentration führt. Auch Manicassamy et al., 2006 beschrieben eine PMA - vermittelte Reduktion der intrazellulären Calciumkonzentration in humanen T-Zellen.

Phorbol - 12 - myristate - 13 - acetate ist eine Substanz, die sowohl das zelluläre Calciumgleichgewicht als auch die Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies beeinflusst (Lucas & Días, 2001). Als Tumorpromoter hemmt PMA beispielsweise das Zellwachstum und die Zellproliferation (Trubiani et al., 1993) sowie die Synthese von Immunglobulinen in humanen Lymphozyten (Weetman et al., 1982). Des Weiteren wurde in verschiedenen Studien der Einfluss von PMA auf den zellulären Calciumfluss durch Interaktion zwischen Proteinkinase C und Phorbol-12-myristate-13-acetate gezeigt (Racke & Nemeth, 1993, Shivnan & Alexander, 1995, Luo et al., 1995, Balasubramanyam & Gardner, 1995, Mork et al., 1999). Demnach fungiert PMA als Aktivator der Proteinkinase C, verbunden mit reduzierter intrazellulärer Calciumfreisetzung und gehemmtem Calcium - Influx. Durch Inhibition der Proteinkinase C mittels z.B. Staurosporin oder Calphostin C wird die PMA - induzierte Wirkung auf den zellulären Calciumfluss aufgehoben (Racke & Nemeth, 1993, Balasubramanyam & Gardner, 1995).

Die Stimulation von peripheren Lymphozyten mit Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) führte in der vorliegenden Arbeit bei Patienten mit essentieller Hypertonie unter oraler Glucosebelastung zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration. Sowohl eine Stunde (n=24, p<0,01 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) als auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, p<0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) konnten markant gesteigerte Calciumkonzentrationen gemessen werden.

Im Gegensatz dazu war der PMA - induzierte Calcium-Einstrom bei gesunden Kontrollpersonen unter oraler Glucosebelastung nicht signifikant unterschiedlich ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Die vorliegenden Ergebnisse unterscheiden sich maßgeblich von den in der Literatur dargestellten Erkenntnissen bezüglich des Effektes von PMA auf die intrazelluläre Calciumkonzentration, was womöglich auf eine gestörte PMA - Proteinkinase C-Interaktion unter akutem Zuckerstress bei hypertensiven Patienten zurückzuführen ist.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte weiterhin gezeigt werden, dass die in – vitro - Stimulation von Lymphozyten mit Glucose sowohl bei Patienten mit essentieller Hypertonie als auch bei normotensiven Kontrollpersonen zu einem deutlichen Anstieg des intrazellulären Calciums führte.

In beiden Untersuchungsgruppen war im Durchschnitt ein signifikant erhöhter Zweistundenwert des intrazellulären Calciums zu beobachten ($n=48$, $p<0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

In einer im Jahr 2000 veröffentlichte Studie dagegen berichten die Autoren Nutt & O'Neil über eine Glucose - induzierte Verminderung des Calcium - Influx in Mesangiumzellen der Niere. Anhand der vorliegenden signifikanten Veränderungen des intrazellulären Calciums nach Glucose- Stimulation von humanen Lymphozyten in – vitro und unter oraler Glucosebelastung in beiden Untersuchungsgruppen konnte jedoch der Einfluss sowohl oraler als auch direkter Glucose – Gabe auf die basale intrazelluläre Calciumkonzentration gezeigt werden.

4.4 Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre Thapsigargin-stimulierte Calciumkonzentration

Der Transport von Stoffen; Energie und Information bildet die elementare Voraussetzung für die Regulation, Koordination und Aufrechterhaltung komplexer Stoffwechsel – und Lebensvorgänge wie beispielsweise die Regulation des Gefäßtonus, die zelluläre Volumenregulation oder die Sekretion von Hormonen im menschlichen Körper. Der Transport durch zelluläre Membranen erfolgt durch integrale Proteine: Ionenkanäle, Carrier oder ATPasen sorgen unter physiologischen Bedingungen für die Aufrechterhaltung des Zell – Gleichgewichts. Ein gestörter Ablauf der Transportvorgänge stellt die Ursache unterschiedlichster Krankheitsbilder dar.

Die SERCA (sarcoendoplasmatische Retikulum- Ca^{2+} - ATPase) ist ein Vertreter der sogenannten P_2 – Typ ATPasen, die ubiquitär vorkommen und maßgeblich das zelluläre Gleichgewicht regulieren (McIntosh, 2000). Durch aktiven Transport wird unter Verbrauch eines Moleküls ATP (Hydrolyse von ATP zu ADP und Phosphat unter Energiefreisetzung) Calcium vom Zytoplasma ins sarcoplasmatische Retikulum gepumpt.

Mehrere Studien haben sich unter verschiedenen Gesichtspunkten mit dem Einfluss Ca^{2+} -ATPase hemmender Substanzen auf die intrazelluläre Calciumkonzentration beschäftigt. Zu den selektiven Inhibitoren der SERCA zählen Thapsigargin, Cyclopiazonsäure (CPA) oder 2,5-Di-(tert-butyl)-1,4-benzohydroquinon (TBQ).

Ziel unserer Untersuchungen war die Klärung der Fragestellung, ob und inwieweit akute orale Glucosebelastung einen unterschiedlichen Einfluss auf die Thapsigargin – induzierte Calciumkonzentration bei Patienten mit primärer Hypertonie im Vergleich zu normotensiven Kontrollen aufweist.

In einer Veröffentlichung von Wang et al., 1995 zeigten sich signifikant verminderte zytosolische Calciumkonzentrationen in Endothelzellen nach Thapsigargingabe bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) im Vergleich zu gesunden Kontrolltieren (WKY). Wang et al. bewerten das Ergebnis als eine Folge der endothelialen Dysfunktion, die in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie eine Rolle spielt. Die reduzierte intrazelluläre Calciumkonzentration führte zu einer verminderten Fähigkeit zur Weitstellung der Gefäße bei Tieren mit essentieller Hypertonie.

In der vorliegenden Arbeit wurden niedrigere Thapsigargin - induzierte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentrationen bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie vor oralem Glucose-Toleranztest gemessen, allerdings waren die Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration im Vergleich zur gesunden Kontrollgruppe nicht signifikant unterschiedlich: Bei den Bluthochdruckpatienten zeigte sich vor oralem Glucose-Toleranztest nach Gabe des Ca^{2+} -ATPase - Inhibitors Thapsigargin eine intrazelluläre Calciumkonzentration von $1,14 \pm 0,1$ (Mittelwert \pm SEM), in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen dagegen war die intrazelluläre Calciumkonzentration $1,23 \pm 0,2$ ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Im Gegensatz dazu berichten Nomura et al., 1997 von einem signifikanten Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration bei hypertensiven Ratten nach Thapsigargin - Gabe verbunden mit gesteigerter Fähigkeit zur Vasokonstriktion.

Im Rahmen unserer Untersuchungen ließ sich eine gesteigerte $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -Konzentration von $1,51 \pm 0,2$ bei Lymphozyten von primär hypertensiven Patienten zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest nachweisen. Diese war jedoch zur gesunden Kontrollgruppe nicht signifikant

unterschiedlich, hier zeigte sich zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest eine intrazelluläre Calciumkonzentration von $1,16 \pm 0,2$ ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Die Vorgabe von $10 \mu\text{mol/l}$ PMA oder 40 mU/ml Insulin führte bei Patienten mit essentieller Hypertonie zwar zu einem Anstieg der zytosolischen Calciumkonzentration sowohl eine als auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest, dieser war jedoch nicht signifikant unterschiedlich zum Ausgangswert ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL – WALLIS – TEST).

Die Ergebnisse zeigen lediglich die Tendenz einer gesteigerten intrazellulären Calciumkonzentration nach oralem Glucose-Toleranztest und Thapsigargin - Gabe bei Patienten mit essentieller Hypertonie; gesunde Kontrollpersonen dagegen reagierten tendenziell mit einem Abfall der zytosolischen Calciumkonzentration.

Ein Zusammenhang zwischen oralem Glucose-Toleranztest, Thapsigargin - induziertem intrazellulärem Calciumanstieg durch Hemmung der Ca^{2+} -ATPase und essentieller Hypertonie konnte in der vorliegenden Arbeit nicht festgestellt werden, da die Veränderungen weder innerhalb der beiden Untersuchungsgruppen noch beim Vergleich derselben signifikant unterschiedlich waren.

Eine Studie von Neusser et al., 1994 beschäftigte sich mit der Fragestellung, ob und inwiefern die Verteilung des freien intrazellulären Calciums Einfluss auf die Entstehung der essentiellen Hypertonie hat. Der Vergleich des Thapsigargin - induzierten Calciumanstiegs in glatten Gefäßmuskelzellen bei hypertensiven (SHR) und normotensiven (WKY) Ratten zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Versuchsgruppen.

In einer ähnlich aufgebaute Studie von Neusser et al., 1999 wurde die Veränderung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Hemmung der SERCA durch Thapsigargin bei Ratten mit essentieller Hypertonie (SHR) und bei normotensiven Kontrolltieren (WKY) untersucht. Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei SHR oder WKY bezüglich des intrazellulären Calciumanstiegs nachgewiesen werden.

Diese Ergebnisse unterstreichen die in dieser Arbeit gewonnene Erkenntnis, dass der Thapsigargin - induzierte Calciumanstieg nach oralem Glucose-Toleranztest bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen nicht signifikant verschieden ist.

Dem entgegen steht eine Veröffentlichung von Kwan et al., 1994, in der ebenfalls bei hypertensiven (SHR) und normotensiven (WKY) Versuchstieren der Thapsigargin - induzierte Calciumanstieg an glatten Gefäßmuskelzellen untersucht wurde. Anhand der Ergebnisse konnte unter anderem gezeigt werden, dass bei SHR eine deutlich höhere Sensitivität für den SERCA-Inhibitor Thapsigargin vorliegt als bei WKY.

Nach Kwan et al. unterstreichen diese Resultate die funktionelle Bedeutung der intrazellulären Calciumregulation in der Pathogenese der essentiellen Hypertonie.

Ein wegweisender Einfluss des oralen Glucose-Toleranztests auf die Thapsigargin - stimulierte Calciumkonzentration bei Patienten mit essentieller Hypertonie ließ sich nicht nachweisen, auch die Stimulation der Lymphozyten mit Insulin, PMA oder Glucose zeigte in keiner der zu untersuchenden Probandengruppen Konsequenzen im Sinne einer prägnanten Änderung des Thapsigargin - stimulierten intrazellulären Calciumflusses.

4.5 Auswirkungen des OGTT auf die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)

Reaktive Sauerstoffspezies (ROS) sind in eine Vielzahl von physiologischen und pathophysiologischen Prozessen involviert. In niedrigen Konzentrationen treten sie als Nebenprodukte physiologischer zellulärer Stoffwechselprozesse auf (Siems et al., 1998, Orié et al., 1999, Tepel, 2003), forcierte ROS – Freisetzung führt zur Zellzerstörung im Sinne oxidativen Stresses (Gajewski et al., 1990). In verschiedenen Studien wurden ROS – insbesondere Superoxidanionen (freie Sauerstoffradikale) mit der Genese chronischer Erkrankungen wie Hypertonie, Diabetes mellitus, Hypercholesterinämie oder Ischämie in Verbindung gebracht (Heinecke, 1998, Orié et al., 1999, Griendling et al., 2000, Zalba et al., 2000, Schulze et al., 2004).

Da der Superoxidanionen - Bildung in Lymphozyten im Rahmen der Pathogenese der Hypertonie eine bedeutende Rolle zugeschrieben wird (Schultz & Harrison, 2000), wurde in der vorliegenden Arbeit die Bildung freier Sauerstoffradikale in Lymphozyten nach oralem Glucose-Toleranztest bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen untersucht.

Wie in der Literatur beschrieben besteht ein Zusammenhang zwischen akuter postprandialer Hyperglykämie und erhöhtem Atherosklerose-Risiko (Da Ros et al., 2005), was durch den Einsatz des OGTT als „Modell“ des postprandialen hyperglykämischen Status gezeigt werden konnte. Die in diesem Zusammenhang gesteigerte ROS – Produktion (oxidativer Stress) wird als eine Ursache der endothelialen Dysfunktion diskutiert (Ceriello et al., 2002). Demnach kann postprandialer „Zuckerstress“ verbunden mit der Produktion reaktiver Sauerstoffspezies als Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen gedeutet werden (Da Ros et al., 2005, Ceriello et al., 2002).

Im Rahmen unserer Untersuchungen wurde bei Patienten mit essentieller Hypertonie unter oraler Glucosebelastung mittels OGTT die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) registriert. Die Ergebnisse wurden mit den Resultaten einer gesunden Kontrollgruppe verglichen.

Bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie zeigte sich ein Anstieg freier Sauerstoffradikale auf $4,39 \pm 0,9$ eine Stunde nach oraler Glucosebelastung, der im Vergleich zum Ausgangswert allerdings nicht signifikant verschieden war ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

In der normotensiven Kontrollgruppe dagegen sank die Konzentration freier Sauerstoffradikale sowohl eine Stunde als auch zwei Stunden nach oraler Glucosebelastung, ohne Signifikanzen aufzuweisen ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Der Anstieg des Einstundenwertes freier Sauerstoffradikale im Vergleich zum Ausgangswert bei Patienten mit primärer Hypertonie zeigt womöglich die Tendenz einer vermehrten Radikalbildung im hyperglykämischen Status an, auch wenn - Bezug nehmend auf die Resultate von Da Ros et al., 2005 und Ceriello et al., 2002 - anhand unserer Untersuchungen keine signifikant gesteigerte Radikal - Freisetzung nach oraler Zuckerbelastung bei Lymphozyten hypertensiver Patienten festgestellt werden konnte. Auch der kontinuierliche Abfall reaktiver Sauerstoffradikale bei gesunden Kontrollpersonen in der vorliegenden Arbeit stützt die Hypothese einer vermehrten ROS - Bildung in Individuen mit vorgeschädigtem Status, wie z.B. Diabetiker oder Patienten mit PCOS, im Unterschied zu gesunden Kontrollen (Ceriello et al., 2002, Schulze et al., 2004, Gonzales et al., 2005).

Der Vergleich beider Untersuchungsgruppen brachte keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Radikal - Freisetzung unter oraler Glucosebelastung ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

In einer von Orie et al., 1999 durchgeführten Untersuchung an Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie oder Diabetes mellitus Typ 2 zeigte sich eine signifikant erhöhte ROS - Bildung bei Diabetespatienten gegenüber einer gesunden Kontrollgruppe, nicht aber bei Patienten mit essentieller Hypertonie, was mit unseren Beobachtungen bei primär hypertensiven Patienten vergleichbar ist.

Im Tierexperiment einer Studie von Swee et al., 1997 dagegen konnte gezeigt werden, dass hypertensive Dahl-Ratten signifikant höhere Plasma - Konzentrationen freier Sauerstoffradikale [$O^{2\cdot-}$] und Hydrogenperoxide aufwiesen als ihre normotensiven Pendanten. In einer Veröffentlichung von Zalba et al., 2000 konnte überdies gezeigt werden, dass NADPH - Oxidase - Überaktivität in den Aortas von SHR assoziiert ist mit der Überexpression des Gens p22phox.

Die resultierende forcierte Superoxidanion - Produktion verbunden mit vaskulärer Schädigung gilt als eine mögliche Ursache für die Entstehung der essentiellen Hypertonie.

Zusammenfassend konnte – vergleichbar mit den beschriebenen Resultaten der Studie von Orié et al., 1999 – keine signifikant gesteigerte ROS-Bildung in Lymphozyten bei Patienten mit essentieller Hypertonie festgestellt werden.

Analog zu den Untersuchungen der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte auch hier eine in vitro - Stimulation der Lymphozyten mit Phorbol – 12 – myristate – 13 - acetate, Insulin oder Glucose, um einen möglichen Effekt dieser Substanzen auf die ROS - Bildung zu zeigen.

Laut Whitacre & Cathcart, 1992 hängt die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies von der Art des mitogenen Stimulus ab. Eine solche mitogene Substanz ist Phorbol – 12 – myristate – 13 - acetate (PMA).

Wie in der Literatur beschrieben induziert PMA die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies in humanen Zellen (Orié et al., 1999, Traore et al., 2005, Schleicher et al., 2005,), wobei die PMA – vermittelte ROS - Produktion bei krankhaften Prozessen wie z.B. der Multiplen Sklerose signifikant gesteigert ist im Vergleich zu jener in gesunden Zellen (Ferretti et al., 2005).

In einer weiteren Studie von Orié et al., 1999 wurde eine signifikant verstärkte Radikalproduktion in Lymphozyten nach PMA - Stimulation bei Personen mit Diabetes mellitus Typ 2, nicht jedoch bei Patienten mit essentieller Hypertonie ermittelt. Dies unterstreicht das Ergebnis unserer Untersuchungen, da sich bei primär hypertensiven Patienten unserer Studie ebenfalls keine signifikante Steigerung reaktiver Sauerstoffspezies feststellen ließ.

Die Stimulation mit Phorbol – 12 – myristate – 13 - acetate führte sowohl bei den Patienten mit essentieller Hypertonie als auch bei den normotensiven Kontrollen zu einem Abfall der Sauerstoffradikalproduktion; signifikante Veränderungen konnten dabei weder innerhalb der einzelnen Gruppen (n=24, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) noch beim Vergleich derselben festgestellt werden (n=48, $p>0,05$, t-Test).

Die Vorgabe von 40 mU/ml Insulin führte in der Gruppe der Bluthochdruckpatienten im Mittel zu einem kontinuierlichem Abfall der Konzentration freier Sauerstoffradikale sowohl eine Stunde als auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest, der jedoch zum Ausgangswert nicht signifikant verschieden war (n=24, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Auch bei den gesunden Kontrollpersonen sank die Konzentration freier Sauerstoffradikale nach oraler Glucosebelastung über den Messungszeitraum von zwei Stunden ohne feststellbare Signifikanz ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Diese Ergebnisse zeigen, dass Insulin keinen markanten Einfluss auf die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale bei Lymphozyten von Patienten mit primärer Hypertonie oder gesunden Kontrollpersonen hat.

Dies gilt letztlich auch für die in – vitro - Stimulation der Zellen mit Glucose, nach welcher ebenfalls keine entscheidenden Unterschiede in der Radikal – Produktion bei Hypertonikern und gesunden Kontrollen festgestellt werden konnten.

Die Zugabe von 250 mg/dl Glucose führte in beiden Untersuchungsgruppen ähnlich wie nach PMA – und Insulin – Zugabe zuvor zu einem durchschnittlichen Abfall freier Sauerstoffradikale eine und zwei Stunden nach oraler Glucosebelastung, wobei die Veränderungen weder innerhalb der Gruppen noch beim Vergleich derselben signifikante Unterschiede aufwiesen. ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST, $n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Ein wesentlicher Einfluss des oralen Glucose-Toleranztests auf die Entstehung freier Sauerstoffradikale bei Patienten mit essentieller Hypertonie ließ sich in dieser Arbeit nicht nachweisen. Ebenso wenig war die ROS - Bildung nach Stimulation lymphozytärer Zellen mit PMA, Insulin oder Glucose bei primär hypertensiven Probanden und normotensiven Kontrollen signifikant unterschiedlich.