
1 Einleitung

Im folgenden (Kap. 1.1 bis 1.5) wird die Beziehung der in dieser Arbeit untersuchten Parameter zur essentiellen Hypertonie erläutert.

1.1 Adrenozeptoren

Ursprünglich stammt der Begriff "Adrenozeptoren" aus der Pharmakologie des sympathischen Nervensystems. Er wurde geprägt, um die quantitativen Wirkungsunterschiede der Katecholamine Noradrenalin und Adrenalin zu erklären. Zunächst sah man ihre physiologische Bedeutung darin die Wirkungen des adrenergen Transmitters Noradrenalin und des Nebennierenmarkhormons Adrenalin zu vermitteln.

Die Arbeiten von Dale aus den Jahren 1906 - 1913 enthalten erste Hinweise darauf, daß die Katecholamine ihre Wirkungen über unterschiedliche Rezeptoren vermitteln.

1948 postulierte Ahlquist die Existenz verschiedener Adrenozeptoren, gestützt auf den experimentellen Nachweis der Wirksamkeitsreihenfolge Adrenalin \geq Noradrenalin \gg Isoprenalin für die Erregung glatter Muskulatur. Für die Erschlaffung glatter Muskulatur fand er die Wirksamkeitsreihenfolge:

Isoprenalin $>$ Adrenalin \geq Noradrenalin.

Ahlquist nannte die Rezeptoren " α " (für die Erregung der glatten Muskulatur, Vasokonstriktion) und " β " (für die Erschlaffung der glatten Muskulatur, Vasodilatation oder Erregung am Herzen).

Die Synthese weitgehend selektiv wirkender α - und β -Sympatholytika bestätigte dieses Modell (Furchtgott 1972) und führte zu einer weiteren Unterteilung der β -Rezeptoren in " β_1 " und " β_2 " (Lands *et al.* 1967a). Hierbei vermitteln die β_1 -Adrenozeptoren am Herzen einen positiv inotropen sowie chronotropen Effekt (Carlson und Hedberg 1976, Lands 1967b). Am intestinalen glatten Muskel bewirken sie Relaxation (Lands 1967b). β_2 -Adrenozeptoren vermitteln am Herzen vorwiegend eine Zunahme der Herzfrequenz. Am glatten Gefäßmuskel rufen β_2 -Adrenozeptoren Vasodilatation hervor (Bohr 1967, Lands 1967a, Furchtgott 1967).

α -Agonisten unterschiedlicher Wirkung legten auch eine Unterteilung der α -Adrenozeptoren in postsynaptische exzitatorische α_1 - und in präsynaptische inhibitorische α_2 -Adrenozeptoren nahe (Langer 1974, Berthelsen und Pettinger 1977). Noradrenalin (durch Depolarisation aus Speichervesikeln synaptisch freigesetzt) und Adrenalin stimulieren die präsynaptischen α_2 -Adrenozeptoren, die daraufhin die weitere Freisetzung von Noradrenalin aus den neuronalen Speichern hemmen (negative Rückkopplung) (Langer 1976; Starke *et al.* 1975, 1977, 1981).

Der o.g. Nachweis bzw. die Subklassifizierung von Adrenozeptoren gelang nur indirekt, d.h. über physiologische Effekte und Dosis (Konzentrations)-Wirkungs-Beziehungen. Hingegen ermöglichen die aktuellen Radioligand-Bindungsstudien, die in der vorliegenden Studie Anwendung fanden, Adrenozeptoren direkt auf molekularer Ebene nachzuweisen. Voraussetzung dafür sind hochaffine Liganden

(meist Antagonisten) mit hoher spezifischer Radioaktivität, so daß die unspezifische Bindung gering gehalten wird (Lefkowitz 1978, Hoffmann und Lefkowitz 1980). Über den bloßen Nachweis der Adrenozeptoren hinaus lassen sich mit Radioligand-Bindungsstudien der Funktionszustand der Rezeptoren, die Rezeptordichte und die transmembranäre Signalumsetzung untersuchen.

Letztlich haben Untersuchungen, die auch postsynaptische α_2 -Adrenozeptoren nachwiesen (Drew und Whiting 1979, Docherty und McGrath 1980), die anatomische Einteilung in Frage gestellt. Diese postsynaptischen α_2 -Adrenozeptoren sind vornehmlich extrasynaptisch lokalisiert (Langer und Hicks 1984, Warnock und Docherty 1986, Jie *et al.* 1987), so daß vermutet werden kann, daß diese Rezeptoren vornehmlich durch im Blut zirkulierende Katecholamine stimuliert werden (Langer und Hicks 1984, Warnock und Docherty 1986, Jie *et al.* 1987). Obwohl die präsynaptischen α -Adrenozeptoren fast ausschließlich vom α_2 -adrenergen Rezeptortyp sind (van Zwieten und Timmermans 1987), wurden auch hier präsynaptische α_1 -Adrenozeptoren gefunden (Hicks und Langer 1985).

Der Vasokonstriktor-Tonus der menschlichen Extremitätengefäße wird also durch α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren vermittelt (Bühler *et al.* 1985, Bolli *et al.* 1985). Die postsynaptischen α_1 -Adrenozeptoren wirken auf den Kalziumeinstrom in die Zelle und die intrazelluläre Kalziummobilisation (van Zwieten und Timmermans 1987) sowie auf den Phosphatidylinositolstoffwechsel (Nishizuka 1984). Die α_2 -Adrenozeptoren sind dagegen über das Adenylylzyklasesystem an den intrazellulären Signalüberträgerstoff (second-messenger) cAMP gekoppelt (Robinson *et al.* 1969, Mills

1975, Jakobs *et al.* 1976). Beide α -adrenerge Rezeptorsubtypen vermitteln eine Kontraktion der Gefäßmuskelzelle: α_1 -Adrenozeptoren durch eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration und α_2 -Adrenozeptoren über eine Erniedrigung der intrazellulären cAMP-Konzentration.

Genetische Aspekte bieten die Clonierung des Gens und/oder der cDNS für den β_2 -Adrenozeptor (Dixon *et al.* 1986, Kobilka *et al.* 1987a,b), den β_1 -Adrenozeptor (Frielle *et al.* 1987) und den α_2 -Adrenozeptor (Kobilka *et al.* 1987c).

Beim Menschen wurden drei verschiedene Gene gefunden, die drei unterschiedliche α_2 -Adrenozeptoren kodieren (Kobilka *et al.* 1987c). Auch konnten humane atypische β -Adrenozeptoren (sog. β_3 -Adrenozeptoren) geklont werden (Michel und Insel 1989). Die molekular-genetischen Erkenntnisse verdeutlichen, daß die Ligandenbindungsassays nicht nur das Studium des Verhaltens von Liganden-Bindungsstellen, sondern darüberhinaus von definierten Rezeptormolekülen erlauben.

1.1.1 Adrenozeptor-Veränderungen bei essentieller Hypertonie

Die essentielle Hypertonie entsteht vermutlich durch eine Vielzahl genetischer Merkmale unter dem Einfluß begünstigender Umweltfaktoren (Williams RR *et al.* 1987, 1988a). Als eine der bedeutsamen Ursachen für die Entstehung der essentiellen Hypertonie wird eine erhöhte sympathische Aktivität angesehen (Folkow 1982, Weber MA und Drayer 1982, de Champlain 1978). Die gesteigerte Sympathikus-Aktivität kann sich einerseits in einer

gesteigerten Plasma-Noradrenalin (Adrenalin) -Konzentration darstellen, andererseits aber in einer erhöhten Anzahl (und damit Ansprechbarkeit) der Adrenozeptoren. Bisher ungeklärt bleibt, ob bei Patienten mit essentieller Hypertonie die Plasma-Noradrenalin-Konzentration erhöht ist, auch wenn in vielen Untersuchungen, insbesondere bei Patienten über 40 Jahren, leicht erhöhte Plasma-Katecholamin-Gehalte gefunden wurden (Goldstein 1983, Philipp 1987).

Eine erhöhte Sympathikus-Aktivität könnte sich auch in einer erhöhten Ansprechbarkeit der Adrenozeptoren äußern. So konnte man auf den zirkulierenden Lymphozyten von Grenzwert-Hypertonikern (Fitzgerald *et al.* 1983, Brodde *et al.* 1984) und Patienten mit manifester essentieller Hypertonie eine signifikant höhere β_2 -Adrenozeptor-Anzahl finden als bei einer altersgleichen normotonen Kontroll-Gruppe (Brodde *et al.* 1987). Weiterhin konnte man bei Patienten mit essentieller Hypertonie eine signifikant positive Korrelation zwischen der lymphozytären β_2 -Adrenozeptor-Dichte und dem mittleren arteriellen Blutdruck der Patienten (Brodde *et al.* 1984, Middeke *et al.* 1984) feststellen. Wird bei Patienten mit essentieller Hypertonie (mit erhöhter lymphozytärer β_2 -Adrenozeptor-Dichte) der Blutdruck durch Antihypertensiva, die nicht an β -Adrenozeptoren angreifen, normalisiert, verringert sich die lymphozytäre β_2 -Adrenozeptoren-Dichte auf Werte, die sich von denen normotensiver altersgleicher Kontrollgruppen nicht mehr signifikant unterscheiden (Middeke *et al.* 1985, Brodde *et al.* 1987). Diese Feststellung und der Befund, daß die lymphozytäre β_2 -Adrenozeptoren-Dichte bei den normotonen Kindern mit einem normoton essentiellen Elternteil von der normotoner

Kinder normotoner Eltern nicht unterschiedlich ist (Michel *et al.* 1987), läßt darauf schließen, daß in der Erhöhung der lymphozytären β -Adrenozeptoren-Dichte bei Patienten mit essentieller Hypertonie ein sekundäres (vielleicht kompensatorisches) Moment liegt.

Auf Fibroblasten von Patienten mit essentieller Hypertonie fanden Kotanko *et al.* (1992) nur halbsoviel β_2 -Adrenozeptoren als in der Kontrollgruppe normotoner Probanden.

Die Befunde über Veränderungen von thrombozytären α_2 -Adrenozeptoren bei Patienten mit essentieller Hypertonie sind widersprüchlich. Einige Arbeitsgruppen beobachteten bei Patienten mit essentieller Hypertonie höhere thrombozytäre α_2 -Adrenozeptordichten (Brodde *et al.* 1985a); Kafka *et al.* (1979) bestätigten dies nur bei weiblichen Hypertonikern; andere Arbeitsgruppen fanden keine Veränderungen (Fritschka und Philipp 1991, Fabris *et al.* 1992, Ashida *et al.* 1985, Boon *et al.* 1983, Motulsky *et al.* 1983); wieder andere maßen leicht erniedrigte thrombozytäre α_2 -Adrenozeptor-Dichten im Vergleich zu normotonen Kontrollgruppen (Jones *et al.* 1985). Kotanko *et al.* (1992) beobachteten auf Fibroblasten von Patienten mit essentieller Hypertonie keine veränderten α_2 -Adrenozeptor-Dichten. Übereinstimmend aber beschreiben mehrere Arbeitsgruppen bei Patienten mit essentieller Hypertonie verstärkte vaskuläre Reaktionen auf α_1 - und α_2 -Adrenozeptor-Stimulation (Amann *et al.* 1981, Bolli *et al.* 1984, Jie *et al.* 1986). Ob hierbei eine verstärkte vaskuläre α -Adrenozeptor-Ansprechbarkeit oder eine gesteigerte Vasokonstriktion aufgrund pathologischer Veränderungen der Zellwandstruktur (Folkow und Karlström 1987, van Zwieten *et al.* 1987) die maßgebliche Rolle

spielen, ist noch ungeklärt. Die Verkleinerung des Gefäßdurchmessers und insbesondere die Zunahme des Verhältnisses zwischen Gefäßwandstärke und Gefäßlumen führen aber zu einem exponentiellen Anstieg (4. Potenz des Gefäßlumenradius) des Durchflusswiderstandes (Hagen-Poiseuillesches Gesetz) und damit zu einem Blutdruckanstieg (Ohmsches Gesetz). Bei dem tierexperimentellen Modell der genetisch determinierten Hypertonie mit spontan hypertensiven Ratten wurde festgestellt, daß bei diesen die Dichte renaler α_1 - und α_2 -Adrenozeptoren signifikant höher ist als bei dem normotensiven WKY-Kontrollstamm (Sanchez *et al.* 1981, Pettinger *et al.* 1982a, Sanchez *et al.* 1986, Kanczik *et al.* 1987). Die gleiche Aussage gilt für α_2 -Adrenozeptoren bei zwei weiteren Modellen der genetisch determinierten Hypertonie: Dahl-Salz-empfindliche versus Dahl-Salz-resistente Ratten (Pettinger *et al.* 1982b) und SABRA-hypertensive Ratten (Diop 1984). Dagegen wurde in keinem tierexperimentellen Modell mit einer erworbenen Hypertonie eine Erhöhung von renalen α_1 - und/oder α_2 -Adrenozeptoren gefunden (DOCA-Salz-hypertensive Ratte [Pettinger *et al.* 1982a, Kanczik *et al.* 1987, Yamada *et al.* 1980, Fukuda *et al.* 1983, Saiz *et al.* 1986], renovaskulär-hypertensive Ratte [Pettinger *et al.* 1982a, Kanczik *et al.* 1987, Yamada *et al.* 1980, Fukuda *et al.* 1983] und spontan hypertensive Ratte mit verstärkter Hypertonie durch Behandlung mit dem Immunsuppressivum Cyclosporin A [Kanczik *et al.* 1987]).

Die renale α_1 - und α_2 -Adrenozeptor-Dichte ist bei spontan hypertensiven Ratten schon erhöht, wenn sie noch recht jung und normoton sind (Sanchez *et al.* 1986). Die Stimulation renaler α_1 -Adrenozeptoren bewirkt eine Natrium-Retention (Summers 1984).

Unklar bleibt die funktionelle Bedeutung der renalen α_2 -Adrenozeptoren. Ein kleiner Teil dieser α_2 -Adrenozeptoren ist inhibitorisch an der Regulation der intrarenalen Renin-Freisetzung beteiligt (Keeton et Campell 1980). Der größte Anteil renaler α_2 -Adrenozeptoren aber ist tubulär lokalisiert (Summers 1984). Offen bleibt, ob die Stimulation dieser α_2 -Adrenozeptoren eine Natrium-Retention bewirkt. Pettinger (1987) beschrieb, daß auch die Stimulation renaler α_2 -Adrenozeptoren bei spontan hypertonen Ratten zu einer verstärkten Natrium-Reabsorption führen kann. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß eine Erhöhung renaler α_1 - und/oder α_2 -Adrenozeptoren, welche zu einer verstärkten Natriumretention führt, ein früher Schritt in der Entwicklung der genetisch determinierten Hypertonie ist.

1.1.2 Adrenozeptoren und familiäre Bluthochdruckbelastung

Patienten mit essentieller Hypertonie und familiärer Bluthochdruckbelastung haben eine signifikant höhere thrombozytäre α_2 -Adrenozeptor-Dichte als Patienten ohne familiäre Bluthochdruckbelastung (Fritschka et al. 1985, 1986a-d, 1987a,b, 1991; Hoyer et al. 1986). Auch bei normotonen Probanden geht die familiäre Bluthochdruckbelastung mit einer erhöhten α_2 -Adrenozeptor-Dichte einher (Fritschka et al. 1987b, 1991). Desweiteren ist die α_2 -Adrenozeptor-Dichte in den Thrombozyten bei normotensiven Kindern mit einem essentiell hypertonen Elternteil signifikant höher als bei normotonen Kindern normotoner Eltern (Michel et al. 1987, 1989).

Es konnte durch Ligandenbindungsstudien nachgewiesen werden, daß die α_2 -Adrenozeptoren der Thrombozyten die α_2 -Adrenozeptoren anderer menschlicher Organe widerspiegeln (Dickinson *et al.* 1986). Vermutlich sind also Veränderungen thrombozytärer α_2 -Adrenozeptoren repräsentativ für Veränderungen renaler α_2 -Adrenozeptoren, die inhibitorisch an der Reninfreisetzung beteiligt sind. Dafür spricht, daß bei den normotonen Kindern normotoner Eltern eine signifikant negative Korrelation zwischen Plasma-Renin-Aktivität und thrombozytärer α_2 -Adrenozeptor-Dichte gefunden wurde (Michel *et al.* 1987). Bei Kindern mit einem essentiell hypertonen Elternteil wurde keine Beziehung zwischen Plasma-Renin-Aktivität und thrombozytärer α_2 -Adrenozeptor-Dichte beobachtet (Michel *et al.* 1987). Das weist darauf hin, daß bei Kindern mit familiärer Hochdruckbelastung frühzeitig eine Störung der physiologischen Regulation der Renin-Freisetzung (folglich auch der Natriumausscheidung) vorliegen könnte. Auch die Plasma-Renin-Aktivität dieser Kinder unterschied sich nicht von der normotoner Kinder normotoner Eltern, wenn auch die α_2 -Adrenozeptor-Dichte höher war. Eine ähnlich gestörte α_2 -adrenerge Regulation der Reninfreisetzung findet sich auch bei spontan hypertonen Ratten, bei denen trotz erhöhter renaler α_2 -Adrenozeptor-Dichte die Plasma-Renin-Aktivität nicht von der normotensiver WKY-Ratten abweicht (Yamori 1983).

Dieses nur eingeschränkte Vermögen des Organismus die Renin-Freisetzung zu unterdrücken, könnte zu einer verringerten Natrium-Ausscheidung führen und würde die positive Natriumbilanz im Stadium der sich entwickelnden essentiellen Hypertonie erklären.

Die erhöhte Natriumretention in der Niere führt über eine Expansion des Extrazellulärtraumes zu einer Blutdrucksteigerung, u.a. im Nierenmark mit einem erhöhten interstitiellen Druck und daraus folgender Drucknatriuresis.

Andererseits soll es, laut einer des längeren bekannten Hypothese, kompensatorisch zu einer Ausschüttung eines natriuretischen Hormons ("ouabain-like factor") kommen (de Wardener *et al.* 1980, Blaustein *et al.* 1987), welches durch Hemmung der renalen Na-K-ATPase zu einer erhöhten Natriumausscheidung, jedoch durch Hemmung der Natriumpumpe der glatten Gefäßmuskulatur zu einer Erhöhung der intrazellulären Konzentration von Natrium und freiem Kalzium führen soll (de Wardener *et al.* 1980, Blaustein *et al.* 1987, Haddy *et al.* 1976, Blaustein *et al.* 1977); dies bestätigen Befunde über erhöhte intrazelluläre freie Kalzium-Konzentrationen in glatten Gefäßmuskelzellen (Sugiyama *et al.* 1986) und Thrombozyten (Bruschi *et al.* 1985) von spontan hypertonen Ratten, sowie bei Patienten mit essentieller Hypertonie bei direkter Korrelation mit der Höhe des diastolischen Blutdrucks (Erne *et al.* 1984). Eine erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration bewirkt jedoch einen erhöhten Tonus der glatten Muskulatur sowie eine erhöhte Ansprechbarkeit der glatten Muskulatur auf endogene Vasokonstriktoren, wie z.B. Noradrenalin oder Angiotensin II, woraus schließlich ein erhöhter peripherer Widerstand und damit ein erhöhter Blutdruck entsteht.

1.1.3 Kochsalzempfindlichkeit

Vermehrte Kochsalzaufnahme ist als ein wichtiger Kofaktor bei der Entwicklung der essentiellen Hypertonie akzeptiert, besonders bei salzsensitiven Probanden, die auf vermehrte Kochsalzaufnahme mit einem steigenden Blutdruck reagieren (Freis 1976, Myers und Morgan 1983).

Bei salzsensitiven Probanden wurde im Vergleich zu salzresistenten Probanden eine höhere Natrium-Reabsorption im proximalen Tubulus festgestellt (Weder 1986, Kotanko *et al.* 1987). Diese erhöhte Natrium-Reabsorption scheint ein generelles Phänomen auch bei anderen Elektrolyte-transportierenden Geweben zu sein. So scheinen Individuen mit einer geringen Speichel-Natrium-Konzentration häufiger auf vermehrte Kochsalzaufnahme mit einem steigenden Blutdruck zu reagieren (Skrabal *et al.* 1989). Eine geringe Speichel-Natrium-Konzentration ist bei Individuen mit familiärer Bluthochdruckbelastung häufiger als bei Individuen ohne familiäre Bluthochdruckbelastung (Skrabal *et al.* 1989).

Es spricht vieles dafür, daß Salzsensitivität (bezüglich des arteriellen Blutdrucks) bei normotonen Probanden genetisch determiniert (Weinberger *et al.* 1981) ist und vielleicht, vermittelt durch eine veränderte Reaktivität der α -Rezeptoren, zu einer erhöhten pressorischen Wirkung des Noradrenalins führt (Bianchetti *et al.* 1984, Skrabal *et al.* 1984). Normotone Individuen mit familiärer Bluthochdruckbelastung neigen eher zur Salzsensitivität als diejenigen ohne familiäre Bluthochdruckbelastung (Grim *et al.* 1979). Auch hypertone Individuen

schlechthin neigen im Vergleich zu normotonen Individuen eher zur Salzsensitivität (Weinberger *et al.* 1986).

Es finden sich Hinweise darauf, daß bei normotensiven Probanden mit familiärer Bluthochdruckbelastung die α_2 -Adrenozeptor-Dichte erhöht ist (Fritschka *et al.* 1987b, 1991) und daß hohe Kochsalz-zufuhr den α_2/β_2 -Adrenozeptor-Quotienten bei normotonen Probanden steigert (Skrabal *et al.* 1986). Skrabal *et al.* (1989) beobachteten bei salzsensitiven Probanden einen erhöhten α_2/β_2 -Adrenozeptor-Quotienten.

Möglicherweise ist bei Salzsensitivität nicht die Regulation nur eines Adrenozeptortyps verstärkt, sondern das "cross talk" zwischen zwei einander entgegenwirkenden Adrenozeptortypen. Eine erhöhte Phospholipase A_2 -Aktivität könnte bei Salzsensitivität für stärkere reziproke Veränderungen der α_2 - und β_2 -Adrenozeptor-Dichten verantwortlich sein (Kunos *et al.* 1984).

Neuere Befunde (Höglinger *et al.* 1992) legen nahe, daß bei Salzsensitivität aufgrund von Punktmutationen unterschiedliche Aminosäuresequenzen der β_2 -Adrenozeptoren bei humanen Fibroblasten vorliegen. Höglinger *et al.* (1992) fanden auf Fibroblasten von normotonen salzsensitiven Probanden eine reduzierte β_2 -Adrenozeptor-Dichte im Vergleich zu normotonen salzresistenten Probanden.

Es konnte ein inverses Verhältnis zwischen Plasma-Noradrenalin und Reagibilität auf exogenes Noradrenalin bei normotensiven Probanden mit normaler Kochsalzaufnahme festgestellt werden (Philipp *et al.* 1978). Bemerkenswert ist, daß die Plasma-Noradrenalin-Konzentration bei hoher Kochsalzaufnahme fällt (Romoff

1979), während die pressorische Wirkung des Noradrenalins steigt (Distler *et al.* 1979).

1.1.4 Transmembranäre Signalumsetzung bei Katecholaminen

α - und β -Adrenozeptoren unterscheiden sich in ihrem Wirkmechanismus: β -Adrenozeptor-vermittelte Effekte führen zu einer Aktivierung der Adenylylzyklase und damit zu einem Anstieg des intrazellulären Gehaltes an zyklischem 3',5'-Adenosinmonophosphat (cAMP); Stimulation postsynaptischer α_1 -Adrenozeptoren bewirkt den Kalziumeinstrom in die Zelle und die intrazelluläre Kalziummobilisation (van Zwieten und Timmermans 1987); α_2 -Adrenozeptor-vermittelte Effekte führen zu einer Hemmung der Adenylylzyklase-Aktivität (Robinson *et al.* 1969, Mills 1975, Jakobs *et al.* 1976). Die Bindung von Agonisten an die Adenylylzyklase gekoppelten α_2 - und β -Adrenozeptoren ist durch Guanylnukleotide, wie z.B. Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) beeinflussbar. In Abwesenheit von Guanosin-5'-Triphosphat hemmen Agonisten die Radioligandbindung an α_2 - und β -Adrenozeptoren mit nur flachen, biphasischen Verdrängungskurven, während in Gegenwart von Guanosin-5'-Triphosphat die Kurven steil und monophasisch und nach rechts in den Bereich höherer Konzentrationen verschoben sind (Brodde 1987). Diese Befunde führten zu der Hypothese, daß an die Adenylylzyklase gekoppelte Rezeptoren in zwei Affinitätszuständen für Agonisten - nicht aber für Antagonisten - vorliegen: zum einen in einem hoch-affinen, GTP-abhängigen Zustand, zum anderen in einem nieder-affinen, GTP-unabhängigen

Zustand (Kent *et al.* 1980). Sowohl für die hormonale Stimulation (Rodbell *et al.* 1971) als auch für die α_2 -Adrenozeptor vermittelte Hemmung der Adenylylzyklase (Jakobs *et al.* 1976) ist die Gegenwart von Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) erforderlich.

Zwischen dem Rezeptor und der Adenylylzyklase (Effektor) ist eine Signalweiterleitungs-Komponente, das Guanyl-Nukleotid-bindende Protein (G_s -Protein) eingeschaltet (Pfeuffer und Helmreich 1975). Auch α_2 -Adrenozeptoren, die inhibitorisch an die Adenylylzyklase gekoppelt sind und deren Stimulation zu einer Verminderung des intrazellulären cAMP-Gehaltes führt, sind an ein solches G-Protein (G_i) gebunden (Schultz und Rosenthal 1985). Die G_s - oder G_i -Proteine sind von grundlegender Bedeutung für die Aktivierung bzw. Hemmung der Adenylylzyklase, da sie den Rezeptor an die Adenylylzyklase koppeln und so die Aktivierung bzw. Hemmung der katalytischen Einheit des Enzyms kontrollieren (Birnbaumer *et al.* 1985).

Anders als die β - und α_2 -Adrenozeptoren, die an die Adenylylzyklase gekoppelt sind, verlaufen die α_1 -Adrenozeptor-vermittelten Wirkungen der Katecholamine. Untersuchungen haben gezeigt, daß die Interaktion der Katecholamine mit α_1 -Adrenozeptoren Kalzium-unabhängig zur Stimulation einer Phospholipase C führt, die die Spaltung von Phosphatidylinositolen zu Inosit-1,4,5,-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerin katalysiert ("PI-Response") (Berridge 1984, Berridge und Irvine 1984). Beide Produkte stellen intrazelluläre Signale dar. IP_3 führt zur Freisetzung von Kalzium aus intrazellulären, nicht mitochondrialen Speichern und dadurch zu zellulären Reaktionen auf den hormonellen Stimulus; auf der anderen Seite stimuliert

Diacylglycerin die Proteinkinase C. Es gibt Anhalte dafür, daß zwischen α_1 -Adrenozeptoren, über die eine PI-Response ausgelöst werden kann, und der Stimulation von Phospholipase C ebenfalls ein G-Protein eingeschaltet ist. So wird die Hemmung der Bindung von α_1 -Adrenozeptor-Radioliganden durch α_1 -Adrenozeptor-Agonisten durch Guanosin-5'-Triphosphat (GTP) beeinflusst, zum anderen wirken Guanylnukleotide mit dem PI-Response synergistisch (Berridge 1984, Berridge und Irvine 1984, Schultz und Rosenthal 1985, Litosch und Fain 1986) (s. Abb.1).

Transmembranäre Signalumsetzung durch
 α - und β -Adrenozeptor-Subtypen

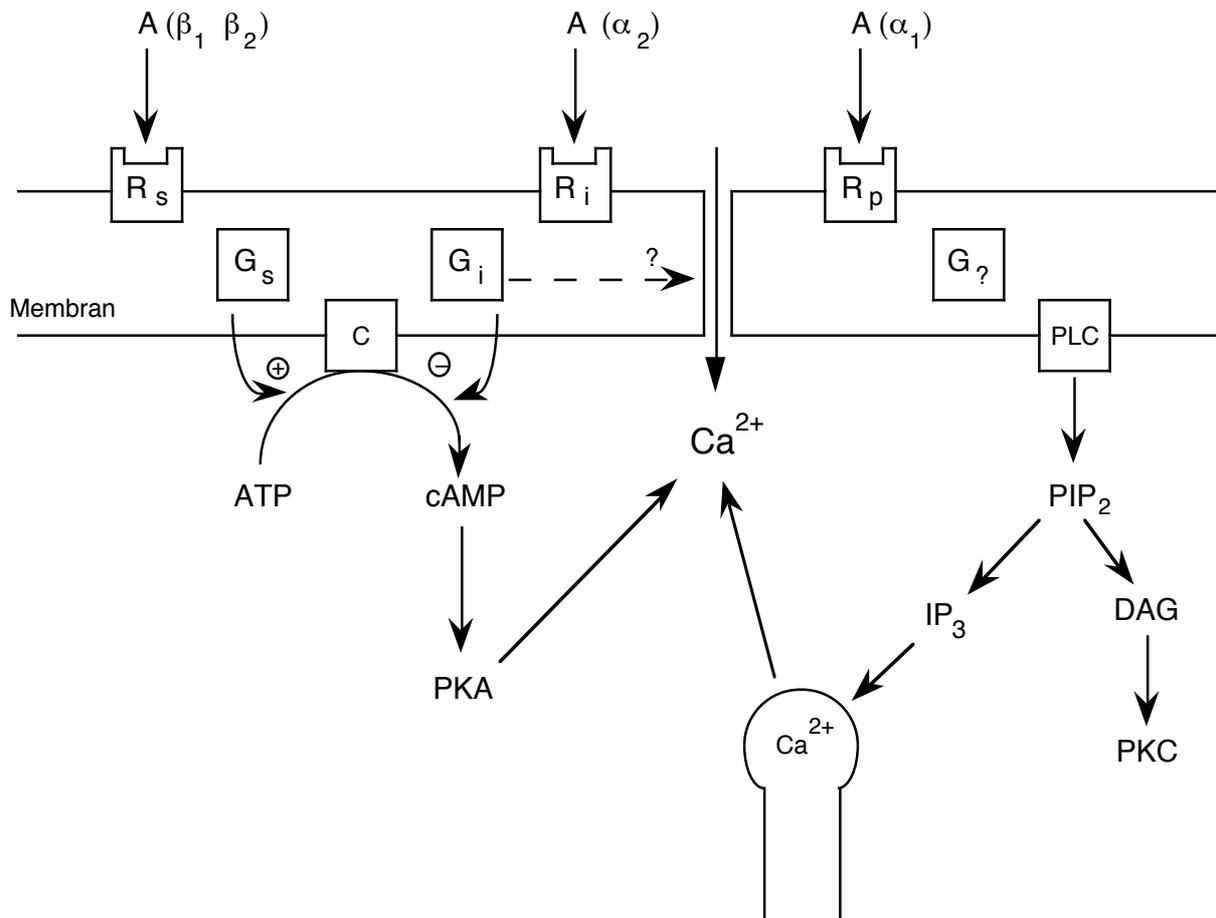


Abb. 1: Transmembranäre Signalumsetzung durch α - und β -Adrenozeptor-Subtypen. β_1 - und β_2 -Adrenozeptor-Stimulation aktiviert die Adenylylzyklase; α_2 -Adrenozeptor-Stimulation hemmt die Adenylylzyklase. α_1 -Adrenozeptor-Stimulation aktiviert die Phospholipase C. A = Agonist, R = Rezeptor, G = Guanylnukleotid bindendes Protein; C = Katalytische Einheit der Adenylylzyklase; PLC = Phospholipase C; PKA = Proteinkinase A; PKC = Proteinkinase C; PIP_2 = Phosphatidylinosit-4,5-diphosphat; IP_3 = Inosit-1,4,5-triphosphat; DAG = Diacylglycerin (Schultz und Rosenthal 1985).

1.1.5 Regulation der Adrenozeptoren

Die Gewebekonzentration von α - und β -Adrenozeptoren ist keine starre Größe, sondern kann sich erheblich ändern. Viele Hormone (z.B. Schilddrüsenhormone, Glukokortikoide), Pharmaka, pathologische (Herzinsuffizienz) oder auch physiologische Zustände (Lebensalter) können die Anzahl von α - und β -Adrenozeptoren im Gewebe (und damit die Ansprechbarkeit des Gewebes auf adrenerge Stimuli) beeinflussen.

Darüberhinaus können offensichtlich alle drei Komponenten des Rezeptor-G-Protein-Adenylylzyklase (β , α_2) - bzw. Phospholipase C (α_1) -Komplexes durch äußere Einflüsse in ihrer Ansprechbarkeit reguliert werden (Minneman *et al.* 1981, Stiles *et al.* 1984, Harden 1983, Lefkowitz und Caron 1985).

Die sog. "Down-Regulation" oder "Desensibilisierung" scheint ein generelles Phänomen der zellulären Gewöhnung an Stimulation durch Agonisten mit der Zeit zu sein, d.h. eine verringerte Ansprechbarkeit der Zelle auf adrenerge Stimulation nach einer Langzeiteinwirkung eines α - oder β -Adrenozeptor-Agonisten. Diese verminderte Ansprechbarkeit adrenerger Rezeptoren beruht auf einer Abnahme der Rezeptor-Anzahl und/oder einer beeinträchtigten Kopplung vom Rezeptor zum Effektorsystem (Adenylylzyklase oder Phospholipase). Untersuchungen an β -Adrenozeptoren zeigten, daß es hierbei innerhalb sehr kurzer Zeit zu einer Entkopplung des Rezeptors vom G_s -Protein/Adenylylzyklase-Komplex zu kommen scheint (durch eine Phosphorylierung des Rezeptors durch das Enzym β -Adrenozeptor-Kinase), so daß das System auf Stimulation durch einen β -Adrenozeptor-Agonisten nicht mehr mit einer ver-

mehrten Bildung von cAMP reagieren kann. Danach wird der Rezeptor internalisiert (d.h. er gelangt durch einen endozytischen Vorgang in das Zellinnere) und entweder abgebaut oder nach Ankopplung an das System wiederverwendet (Lefkowitz und Caron 1986).

Die Desensibilisierung von α_1 -Adrenozeptoren, die nicht an die Adenylylzyklase, sondern an das Phospholipase C-System gekoppelt sind, scheint einem ähnlichen Mechanismus zu unterliegen, wobei für die Phosphorylierung des Rezeptors wahrscheinlich die Proteinkinase C von Bedeutung ist (Leeb-Lundberg *et al.* 1987). Für die o.g. Studien fungierten vorerst nur Tiermodelle, da Adrenozeptor-tragende Gewebe beim Menschen, aus denen man leicht Proben hätte gewinnen können, unbekannt waren. Schließlich fand man heraus, daß zirkulierende Lymphozyten an die Adenylylzyklase gekoppelte β_2 -Adrenozeptoren (Williams LT *et al.* 1976, Brodde *et al.* 1981) und Thrombozyten inhibitorisch an die Adenylylzyklase gekoppelte α_2 -Adrenozeptoren (Jakobs *et al.* 1976, Newmann *et al.* 1978, Brodde *et al.* 1982) enthalten und Rezeptor-Veränderungen nun auch beim Menschen untersuchbar wurden.

Das Gegenteil zur Desensibilisierung ist die "Up-Regulation" oder "Supersensitivität", wie sie z.B. nach der Langzeitapplikation von β -Adrenozeptor-Antagonisten auftritt. So bewirkt der nicht-selektive β -Adrenozeptor-Antagonist Propranolol eine Zunahme der β -Adrenozeptor-Anzahl in Herz, Lunge und Lymphozyten von Ratten (Glaubiger und Lefkowitz 1977, Arons und Molinoff 1982) sowie in zirkulierenden Lymphozyten von gesunden Probanden (Arons *et al.* 1980, Fraser *et al.* 1981, Brodde *et al.* 1985b, Whyte *et al.* 1987). Die β -Adrenozeptor-Anzahl ist noch drei Tage

nach Absetzen von Propranolol erhöht, obschon nach ca. einem Tag kein Propranolol im Plasma mehr nachweisbar ist.

In der erhöhten β -Adrenozeptor-Dichte (ohne Schutz durch den β -Adrenozeptor-Antagonisten) vermutet man eine Erklärung für das "Rebound-Phänomen" nach plötzlichem Absetzen von Propranolol (Prichard *et al.* 1983, Frishman 1987).

Hingegen bewirkt der nicht-selektive β -Adrenozeptor-Antagonist mit einer hohen intrinsischen sympathomimetischen Aktivität bei gesunden Probanden eine signifikante Abnahme der β_2 -Adrenozeptor-Dichte in Lymphozyten (Molinoff und Aarons 1983, Brodde *et al.* 1986, Giudicelli *et al.* 1984, Hedberg *et al.* 1986). Hier beobachtet man nach plötzlichem Absetzen des Pindolols kein Rebound-Phänomen (Walden *et al.* 1982), da sich zuvor keine Supersensitivität von β_2 -Adrenozeptoren entwickeln konnte. Weil Propranolol die durch Pindolol hervorgerufene Abnahme der lymphozytären β_2 -Adrenozeptor-Dichte vollständig verhindert, kann man davon ausgehen, daß die β -Adrenozeptor-Anzahl-reduzierende Wirkung des Pindolols in seiner hohen intrinsischen sympathomimetischen Aktivität begründet liegt (Brodde *et al.* 1986).

1.2 Intrazelluläres freies Kalzium

1.2.1 Bedeutung des Kalziums für die Zellaktivierung

In der vorliegenden Studie wurden über einen Orthostasetest Adrenozeptoren an Thrombozyten und damit die zelluläre Kalziumhomöostase endogen stimuliert. Nun folgend wird die Bedeutung des Kalziums für die Zellaktivierung erläutert.

Wird eine Zelle aktiviert, so strömt einerseits Ca^{2+} in die Zelle ein, andererseits wird Ca^{2+} aus den zelleigenen Speichern freigesetzt. Dadurch ist die intrazelluläre freie Kalzium-Konzentration vorübergehend erhöht.

In Ruhe wird die Kalziumionen-Konzentration auf einem Niveau von etwa $0,1 \mu\text{mol}$ gehalten. Zwei spezifische Kalziumpumpen erhalten den transmembranären Kalziumgradienten aufrecht. Zum einen wird der $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austausch durch die Na/K -ATPase angetrieben und ermöglicht einen schnellen und hohen Kalziumumsatz. Hauptsächlich aber übernimmt die Ca^{2+} -ATPase die Feinregulation des physiologischen Ruhespiegels (Carafoli 1984). Sie pumpt ein Ca^{2+} -Ion gegen zwei H^+ -Ionen und verbraucht dabei ATP im Verhältnis 1:1 (Nigilli *et al.* 1982). Die Ca^{2+} -ATPase wird durch Calmodulin (Gopinath und Vincenzi 1977, Jarrett und Penniston 1977), sowie durch Phosphatidylinositdiphosphat (PIP_2) reguliert (Carafoli 1984).

Die Zelle verfügt über zwei Kompartimente zur Speicherung und Freisetzung des Kalziums (Kikkawa und Nishizuka 1986): Erstens über das hoch Ca^{2+} -affine endoplasmatische Retikulum, das als

kommunizierender Speicher bei der physiologischen Zellaktivierung dient; und zweitens über die weniger Ca^{2+} -affinen Mitochondrien, die als hochkapazitive Speicher den Untergang einer geschädigten Zelle verzögern. Thrombozyten besitzen kein endoplasmatisches Retikulum. Bei ihnen wird das "dense-tubular-system" als funktionelles Äquivalent angesehen (Brass 1984).

In eukaryoten Zellen wird das Kalzium-second-messenger-System ubiquitär angetroffen (Ebashi *et al.* 1978, Rasmussen 1986b). Aber seine Wirkungsweise in Nerven- oder Skelettmuskelzellen unterscheidet sich wesentlich von der in glatten Muskelzellen oder Thrombozyten. Bei Nerven- oder Skelettmuskelzellen sind Größe und Dauer der Zellantwort proportional zum Kalzium-Signal ("amplitude modulation").

Die Aktivierung der α_1 -Adrenozeptoren an glatten Muskelzellen führt durch Stimulation einer Phospholipase C zur Spaltung von Phosphatidylinositolen in zwei "second messenger":

in Inosit-1,4,5-triphosphat (IP_3) und in Diacylglycerin (DG) (Berridge 1984). Inosit-1,4,5-triphosphat (IP_3) mobilisiert im endoplasmatischen Retikulum gespeichertes Kalzium (Berridge 1984). Diacylglycerin (DG) bindet sich spezifisch an die Proteinkinase C und aktiviert dieses Enzym, indem es dessen Kalziumbedarf in den physiologischen Bereich verlagert (Kikkawa und Nishizuka 1986). Die Freisetzung von intrazellulärem freiem Kalzium führt über die Bildung des Kalzium-Calmodulin-Komplexes zur Aktivierung einer Calmodulin-abhängigen Proteinkinase, der Myosin-light-chain-Kinase (Kamm und Stull 1985). Die Phosphorylierung der leichten Myosin-Ketten führt zur Muskelkontraktion. Durch Calmodulin-kontrollierte Kalziumpumpen wird gleichzeitig

ein starker Ca^{2+} -Ausstrom in Gang gesetzt. Obgleich die Konzentration des intrazellulären freien Kalziums infolge dessen innerhalb weniger Minuten wieder auf Basalwerte zurückgeht, bleibt die Kontraktion noch für Stunden erhalten (Silver und Stull 1982). Diese Dauerkontraktion ist abhängig vom extrazellulären Kalzium, das also weiterhin als Botenstoff dient.

In dieser Phase wird die Zellantwort durch die Diacylglycerin-aktivierte Proteinkinase C unterhalten. Sie vergesellschaftet sich mit der Zellmembran und reguliert dort hormoninduzierte Zellantworten, beeinflusst durch den transmembranären Kalzium-einstrom bei weitgehend konstanter Kalziumionenkonzentration. Hier spricht man von der sogenannten "sensitivity modulation" (Rasmussen *et al.* 1984). In dieser Phase der Zellaktivierung beobachtet man an glatten Muskelzellen eine Dauerkontraktion, eine Aktivierung der transmembranären Kalziumpumpen sowie eine allenfalls gering erhöhte Kalziumkonzentration.

In der vorliegenden Arbeit wurden Thrombozyten *in vitro* mit Thrombin stimuliert. Thrombin bindet spezifisch an Thrombozyten (Tollefsen *et al.* 1974, Alexander *et al.* 1983) und isolierten Thrombozytenmembranen (Ganguly und Sonnichsen 1975). Dabei wurden drei Rezeptortypen entdeckt: Rezeptoren mit hoher, mittlerer und niedriger Affinität (Harmon und Jamieson 1986). Funktionell am wichtigsten ist der Rezeptor mit hoher Affinität (Okumura *et al.* 1978). Wird der Thrombinrezeptor am Thrombozyten stimuliert, so steigt die Konzentration des intrazellulären freien Kalziums (Rink *et al.* 1982). Es folgt die oben ausgeführte Aktivierung des Kalzium-Calmodulin- und Proteinkinase C-Weges (Rasmussen 1986a). Gleichfalls existiert ein konkurrieren-

der Weg der Thrombozytenaktivierung durch Thrombin: Diacylglycerin (DG) stellt die Verbindung zum Eicosanoidstoffwechsel her, indem es über die Phosphatidylsäure durch die Phospholipase A₂ zu Arachidonsäure hydrolysiert wird (Feinstein und Sha'afi 1983, Rink *et al.* 1985).

Durch die Indomethacin-hemmbar Cyclooxygenase wird die Arachidonsäure zu Thromboxan A₂, Prostaglandin E₂ und Prostaglandin I₂ metabolisiert. Thromboxan A₂ ist ein Rückkopplungsaktivator des Kalzium-second-messenger-Systems. Prostaglandin E₂ und Prostaglandin I₂ aktivieren die Adenylylzyklase und hemmen dadurch über einen Anstieg des cAMP indirekt das Kalzium-second-messenger-System sowohl in Thrombozyten wie auch in glatten Muskelzellen (Rasmussen 1986a).

1.2.2 Intrazelluläres Kalzium und Bluthochdruck

In dem o.g. Zusammenhang werden Störungen bei der Regulation des intrazellulären Kalziums als eine Theorie zur Pathogenese der essentiellen Hypertonie beschrieben. Der erhöhte Blutdruck liegt u.a. wahrscheinlich in der gesteigerten Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur kleiner Arterien begründet (Robinson *et al.* 1982, Doyle *et al.* 1959, Webb und Bohr 1981). Die Kontraktion der glatten Muskelzellen wird durch die Konzentration freier zytosolischer Kalziumionen bestimmt (Kuriyama *et al.* 1982). Demnach könnte eine Erhöhung des intrazellulären freien Kalziums die Regulation der Kontraktilität glatter Gefäßmuskelzellen verändern (Hermsmeyer 1984, Blaustein 1977). So geht z.B. die

Vasodilatation unter Kalziumantagonisten (Bradley und Morgan 1985) und Hydralazin (McLean *et al.* 1978) mit einer Abnahme des zytosolischen Kalziums und Veränderungen der transmembranären Kalziumfluxe einher. In Blutzellen, wie Thrombozyten (Erne *et al.* 1984, Bruschi *et al.* 1985, Haller *et al.* 1987) und Lymphozyten (Bruschi *et al.* 1984) bei Patienten mit essentieller Hypertonie, sowie Thrombozyten (Oshima *et al.* 1990) bei spontan hypertensiven Ratten, wurden erhöhte intrazelluläre freie Kalziumkonzentrationen gemessen. Auch wurde eine enge Korrelation zwischen der Höhe des arteriellen Blutdrucks und der Konzentration freier intrazellulärer Kalziumionen in Thrombozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie beschrieben (Erne *et al.* 1984). Allerdings ergaben Untersuchungen bei hypertonen Patienten ohne familiäre Bluthochdruckbelastung höhere Konzentrationen intrazellulärer freier Kalziumionen als bei hypertonen Patienten mit familiärer Bluthochdruckbelastung (Fritschka *et al.* 1987a). An Veränderungen der extrazellulären Kalziumregulation wurden eine erhöhte Kalziumausscheidung (McCarron *et al.* 1980, Kesteloot und Geboers 1983, Strazullo *et al.* 1983), erniedrigte Plasmaspiegel an Kalzium (McCarron 1982, Klaus *et al.* 1984) und eine erhöhte Plasmakonzentration an Parathormon (McCarron *et al.* 1980, Strazullo *et al.* 1983) bei Patienten mit essentieller Hypertonie festgestellt.

Aus den o.g. Erkenntnissen ergeben sich zwei Hypothesen zur Pathogenese der essentiellen Hypertonie: Einerseits, daß die erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration und die veränderte extrazelluläre Kalziumhomöostase Folge eines primären gene-

ralisierten Membrandefektes bei essentieller Hypertonie sind (Robinson 1984, Postnov 1981);

andererseits, daß die erhöhte intrazelluläre Kalzium-Konzentration Folge der primär erniedrigten Plasmakalziumspiegel und einer überkompensierenden Erhöhung der Membranpermeabilität für Kalziumionen ist (McCarron 1985, Wright und Rankin 1982).

1.3 Der Thrombozyt als Modell für die Gefäßmuskelzelle

Da isolierte menschliche Blutgefäße für Untersuchungen nur schwerlich zur Verfügung stehen, zieht man, wie auch in der vorliegenden Studie, aufgrund folgender Erkenntnisse zirkulierende Thrombozyten als Untersuchungsobjekte heran.

Der Thrombozyt weist α_2 -Adrenozeptoren (Alexander *et al.* 1978) sowie einen kalziumabhängigen kontraktilen Apparat auf (Bühler *et al.* 1987). Daher gilt er in gewissem Umfange als Modell für die Gefäßmuskelzelle. Beide Zelltypen verfügen darüberhinaus über eine Reihe weiterer gemeinsamer Rezeptoren für vasogene Substanzen, so z.B. für Vasopressin (Berettini *et al.* 1981), Angiotensin II (Moore und Williams GH 1982, Mann *et al.* 1985), Serotonin (de Clerck *et al.* 1984, Erne *et al.* 1985) sowie Prostaglandine (MacIntyre und Gordon 1977, Erne *et al.* 1985). Sowohl in der glatten Muskelzelle (Suematsu *et al.* 1983, Forder *et al.* 1985) als auch im Thrombozyt (Rink *et al.* 1985, Kaibuchi *et al.* 1983) aktiviert die Rezeptorstimulation das Kalzium-Calmodulin- und das Proteinkinase C-Regulationssystem. In beiden Zelltypen wirken Kalzium und cAMP gleichermaßen antagonistisch

(Rasmussen 1986a). Wie an glatten Gefäßmuskelzellen wird auch an Thrombozyten nach Stimulation der α_2 -Adrenozeptoren über eine Hemmung der Adenylylzyklaseaktivität die intrazelluläre cAMP-Konzentration erniedrigt (Robinson *et al.* 1969, Marquis *et al.* 1970, Mills 1975, Jakobs *et al.* 1976). Dies führt zur Kontraktion der glatten Gefäßmuskelzelle bzw. Aggregation der Thrombozyten (Grand und Scrutton 1979, Hsu *et al.* 1979). Hingegen bewirkt eine Inhibition der α_2 -Adrenozeptoren einerseits Vasodilatation, andererseits eine Hemmung der Thrombozytenaktivierung (Bolli *et al.* 1983). Ebenso wie an der glatten Gefäßmuskelzelle wird die cAMP-Produktion auch im Thrombozyten durch PgE₁ stimuliert (Robinson *et al.* 1969, Steer und Wood 1979). Bei Thrombozyten und glatten Muskelzellen sind physiologische Funktionen an kontraktile Filamente geknüpft (Hinssen *et al.* 1978, Niedermann und Pollard 1975), wobei auch in den Thrombozyten Myosin-light-chains nachgewiesen werden können (Feinstein und Walenga 1981), deren Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung die Interaktion von Aktin und Myosin reguliert (Hathaway und Adelstein 1979).

Wegen dieser strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten scheint eine vorsichtige Übertragung bestimmter an Thrombozyten gewonnener Erkenntnisse auf die Vorgänge in der glatten Gefäßmuskelzelle gerechtfertigt (Hamet *et al.* 1985, Erne *et al.* 1985).

1.4 Endothelin

Endothelin-1 ist ein Peptid, das aus 21 Aminosäuren besteht und von den Endothelzellen der Gefäße aus Pre-pro-Endothelin (200 Aminosäuren) und Pro-Endothelin (38 Aminosäuren, sog. "großes Endothelin") gebildet wird. Das Pro-Endothelin wird durch das "endothelin-converting-enzyme" in Endothelin-1 umgewandelt (Yanagisawa *et al.* 1988). Neben diesem Endothelin-1 wurden auch die Isoenzyme Endothelin-2 und Endothelin-3 entdeckt (Inoue *et al.* 1989), die nicht von den Endothelzellen gebildet werden. Sie unterscheiden sich durch nur wenige Aminosäuren voneinander, haben aber verschiedene Wirkungen. Endothelin-1 übt eine starke langanhaltende vasokonstriktive Wirkung auf glatte Gefäßmuskulzellen aus und beeinflusst wahrscheinlich sowohl die regionale Durchblutung als auch den Blutkreislauf (Yoshizumi *et al.* 1988, Miller *et al.* 1989). Zwei Drittel des Endothelin-1 wird während einer Passage durch den Lungenkreislauf abgebaut. Zirkulierendes Endothelin-1 verursacht die Ausschüttung starker Vasodilatoren wie dem Prostacyclin und dem "endothelial-derived relaxing factor" (EDRF) aus der Endothelzelle und schränkt dadurch seine eigene vasokonstriktive Wirkung ein (Vane *et al.* 1990). EDRF wurde als ein "nitric oxide" identifiziert (Palmer *et al.* 1987). Endothelin-1 hat auch proliferative Wirkungen, z.B. auf die Mesangiumzellen der Niere (Vane *et al.* 1990). Endothelin-2 hat eine noch stärker und länger anhaltende vasokonstriktive Wirkung als Endothelin-1. Endothelin-3 ist ein viel schwächerer Vasokonstriktor, bewirkt aber eine ähnlich starke Ausschüttung von

Prostacyclin und dem "endothelial-derived relaxing factor" (EDRF) aus der Endothelzelle wie Endothelin-1.

Der neutrale Protease-Hemmer (Phosphoramidon) bewirkt nicht nur eine Hemmung der Umwandlung von Pro-Endothelin in Endothelin-1, sondern auch eine Hemmung des Blutdruckanstieges, induziert durch Injektion von Pro-Endothelin bei Ratten.

Bemerkenswerterweise senkt dieser neutrale Hemmer des "endothelin-converting-enzyme" (ECE) den Blutdruck spontan hypertensiver Ratten (McMahon *et al.* 1991).

Für das Endothelin wurden zwei unterschiedliche Rezeptoren beschrieben (Arai *et al.* 1990, Sakurai *et al.* 1990). Sie gehören zu der Klasse der rhodopsin-ähnlichen Rezeptoren. Beide der Rezeptoren sind an ein G-Protein gekoppelt. Einer (Arai *et al.* 1990) der beiden zeigt eine hohe Spezifität für Endothelin-1; seine mRNA ist weitverteilt über das zentrale Nervensystem, das Herz und die Lunge. Wahrscheinlich befindet sich dieser Rezeptor an den glatten Gefäßmuskelzellen.

Der andere Rezeptor (Sakurai *et al.* 1990) bindet alle drei Endotheline gleichwertig und ist über ein G-Protein mit der Phospholipase C verbunden, wodurch ein vorübergehender Anstieg des intrazellulären freien Kalziums vermittelt werden kann. Seine mRNA wurde in glatten Gefäßmuskelzellen nicht gefunden.

Möglicherweise bewirkt er u.a. die Ausschüttung von Prostacyclin und dem "endothelial-derived relaxing factor" (EDRF).

Der für Endothelin-1 spezifische Rezeptor wird "ET_A", der nichtselektive Rezeptor wird "ET_B" genannt.

Folgende Hinweise versuchen einen Zusammenhang zwischen einer gestörten Blutdruckregulation und dem Endothelin herzustellen.

Aus Tierexperimenten kann geschlossen werden, daß intravenös appliziertes Endothelin-1 die Niere insofern beeinflusst (Yokokawa *et al.* 1989, Goetz *et al.* 1988, Miller *et al.* 1989), als daß es den renalen Blutfluß (Yokokawa *et al.* 1989) und die Natriumausscheidung einschränkt (Goetz *et al.* 1988).

Eine Erhöhung der Plasma-Endothelin-Konzentration induziert möglicherweise eine Proliferation der glatten Gefäßmuskelzelle, weil es in ihnen einen schnellen und flüchtigen Anstieg der c-fos und c-myc mRNA-Konzentrationen bewirkt. Dadurch könnte es zur Entwicklung einer Hypertonie beitragen (Komuro *et al.* 1988)

Eine andere Beobachtung ist, daß ein erhöhter transmuraler Druck die Endothelzellen stimuliert (Harder 1987) und die Synthese des Endothelins oder seine Ausschüttung aktiviert. Die erhöhte Wandspannung eines Gefäßes hätte einen erhöhten intramuralen Druck zur Folge, der die Expression von Endothelin-mRNA in den polygonalen Endothelzellen stimuliert und somit die Ausschüttung von Endothelin (Yoshizumi *et al.* 1989) steigert.

1.5 Endogene Opiode und Blutdruckregulation

Der Blutdruck wird zentral von bestimmten Neuronenverbänden bzw. Hirnstrukturen gesteuert. Das Vorkommen von endogenen Opioiden und Opiatrezeptoren in diesen Hirnstrukturen läßt vermuten, daß Opiode an der Kreislaufregulation beteiligt sind. So wurden β -endorphinerge Neurone im Ncl. arcuatus hypothalami, Ncl. commissuralis und Ncl. tractus solitarius gefunden. Enkephaline wurden in fast allen Hirnregionen entdeckt. Opiode aus der Familie der Dynorphine befinden sich im Hypothalamus, in der Adenohypophyse und in einigen anderen Kerngebieten des Hirnstamms (Khatchaturian *et al.* 1985). Hohe Dichten an Opiatrezeptoren, wie μ -, δ - oder κ -Rezeptoren, weisen der Ncl. tractus solitarius (NTS), der Ncl. commissuralis, der Ncl. dorsalis nervi vagi und der Ncl. ambiguus auf. Sie zeichnen sich durch eine hohe Affinität zu Morphinen (μ -Rezeptoren), zu Enkephalinen (δ -Rezeptoren) oder zu Dynorphinen (κ -Rezeptoren) aus (Atweh und Kuhar 1977, Kosterlitz *et al.* 1981).

Außer im Hirn sind β -Endorphine in der Adenohypophyse, Enkephaline in sympathischen Ganglien, im Nebennierenmark sowie im Herzen, und Dynorphine in Nebennieren- und Rückenmark vorhanden (Weihe *et al.* 1988). Periphere Opiatrezeptoren sind präsynaptisch an sympathischen Nervenendigungen von Blutgefäßen und sympathischen Ganglien lokalisiert (Illes und Pfeiffer 1985). Diese Befunde lassen eine Beteiligung der endogenen Opiode auf allen Ebenen der Blutdruckregulation vermuten. Laubie *et al.* (1977) zeigten, daß die Injektion von β -Endorphin in die Cisterna magna eines narkotisierten Hundes den Blutdruck und die

Herzfrequenz steigern, während Injektionen außerhalb der Hirnregion diese kardiovaskuläre Reaktion umkehren (Hassen *et al.* 1983). Die kardiovaskuläre Reaktion auf ein Opioid hängt also u.a. davon ab, ob es zentral oder peripher appliziert wird. Es gibt Anhalte dafür, daß zentrale Opiatrezeptoren auch von peripher applizierten Opioiden stimuliert werden und daß nicht nur lipophile Opioide die Blut-Hirn-Schranke durchqueren können (Banks und Kastin 1987). Daneben beeinflussen Rezeptortyp und wechselnde Rezeptordichte die Kreislaufregulation durch Opioide. Nach einem Blutdruckabfall, ausgelöst durch einen κ -Rezeptor-Agonisten, bewirkt z.B. die Mikroinjektion eines μ -Rezeptor-Agonisten eine Erhöhung des Blutdrucks (Hassen *et al.* 1984). Die chronische Behandlung mit dem Opiatrezeptor-Antagonist Naloxon steigert die Bindungskapazität der μ - und δ -Rezeptoren bei Ratten, folglich erniedrigt Morphin den Blutdruck hier stärker als in der unbehandelten Kontrollgruppe (Pfeiffer *et al.* 1984).

Erschwerend bei der Interpretation einiger Befunde kommen noch eine unterschiedliche "Up-" und "Down-Regulation" der Opiatbindungsstellen in den verschiedenen Hirnregionen nach chronischer Applikation von Opioiden hinzu (Steece *et al.* 1989). Dosis-Wirkungs-Kurven bei Opioiden können biphasisch sein: Eine niedrige β -Endorphin-Dosis, in den Hirnstamm narkotisierter Ratten injiziert, erniedrigt den Blutdruck, eine höhere β -Endorphin-Dosis steigert ihn (Petty und de Jong 1982). Dieses Phänomen könnte sich einerseits aus der Diffusionsstrecke, die dosisabhängig ist, begründen, andererseits aus der Anwendung derjenigen Opioide, die Rezeptoren verschiedener Affinität binden. Weiterhin hängt der Effekt der Opioide auf die Kreis-

laufregulation von der jeweiligen Spezies ab. Bei Katzen, Hunden und beim Menschen, aber nicht bei Nagern, konnte ein Blutdruckabfall nach systemischer Opioid-Applikation dargestellt werden (Hassen *et al.* 1983, Hassen *et al.* 1982). Auch der Funktionszustand des kardiovaskulären Systems, die Vigilanz und der Gebrauch von Anästhetika oder anderen Pharmaka beeinflussen die Wirkung endogener Opiode auf das kardiovaskuläre System. Enkephaline steigern den Blutdruck normotoner Wistar Kyoto Ratten (WKY), aber verursachen auch eine beträchtliche Tachykardie, ein Effekt, der bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) nicht beobachtet werden konnte (Feuerstein *et al.* 1983a). Die chronische Behandlung mit einem κ -Rezeptor-Agonisten verzögert bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) die altersabhängige Blutdrucksteigerung, nicht aber bei Wistar Kyoto Ratten (WKY) (Diehl *et al.* 1988). Die Konzentrationen endogener Opiode in einigen Kerngebieten des Hirns und auch im Nebennierenmark unterscheiden sich bei spontan hypertensiven Ratten (SHR) von denen bei normotonen Ratten (Feuerstein *et al.* 1983b, Kraft *et al.* 1984). Intravenöse Injektion von Enkephalinen bei narkotisierten Hunden oder Ratten vermindert den Blutdruck und die Herzfrequenz, hat aber bei diesen Tieren in wachem Zustand den entgegengesetzten Effekt (Sitsen *et al.* 1982).

Beim Menschen gibt es Anhalte dafür, daß Opiode die Funktion des Nebennierenmarks unterdrücken, besonders während es aktiviert ist. Die Adrenalin-Antwort unter Stimulation durch Hypoglykämie, akuter Anstrengung, isometrischer Handanspannung ("hand-grip") und "cold-pressure test" wird durch hohe Dosen Naloxons verstärkt (Bouloux *et al.* 1986). Diese Substanz

steigert also die Reaktion des Blutdrucks auf psychischen Stress bei Menschen mit niedrigen Ruhewerten (McCubbin *et al.* 1985). Eine akut verabreichte hohe Dosis Naloxons steigert den Anstieg der Plasma-Katecholamine, des Plasma-Renins und -Aldosterons nach Fahrradergometrie, eine niedrige Dosis hat keine Wirkung. Eine mögliche Erklärung wäre eine δ -Rezeptor-Blockade bei hoher Dosierung Naloxons (Brammert und Hökfelt 1985). Die Applikation Naloxons verhindert den physiologischen Blutdruckabfall während der Nacht (Rubin *et al.* 1981). Injektion des δ -Rezeptor-Agonisten Metkephamid erhöht beim gesunden Menschen die Herzfrequenz und unterdrückt die Aktivität des Baroreflexes unter körperlicher Anstrengung; dies resultiert in einer ausgeprägten Hypotonie, ohne daß gleichzeitig die Plasma-Katecholamine ansteigen (Pasanisi *et al.* 1985). Opioide des μ -Typs erniedrigen vermutlich den Blutdruck durch Verminderung der Sympathikusaktivität, während δ -Rezeptor-Stimulatoren die Neurotransmitterfreisetzung u.a. an den peripheren cholinergen Synapsen der sympathischen Ganglien vermindern.

Die Hypothese von der Beteiligung endogener Opioide an der Blutdruckregulation findet auch darin ihre Bestätigung, daß bei jungen Patienten mit milder Hypertonie erniedrigte Konzentrationen des Plasma- β -Endorphins und des Plasma-Leucin-Enkephaline sowie erhöhte Konzentrationen von Plasma-Noradrenalin festgestellt wurden (Kraft *et al.* 1986, 1987). Die erniedrigte Konzentration des Plasma- β -Endorphins, die erhöhte Konzentration von Plasma-Noradrenalin und der gesteigerte Blutdruck normalisieren sich in Ruhe bei jungen Patienten mit milder Hypertonie nach 14-tägiger Behandlung mit Clonidin (Kraft *et al.* 1988). Nach

14-tägiger Behandlung mit Clonidin steigt die Konzentration des Plasma- β -Endorphins bei normotonen Probanden unter körperlicher Belastung stärker an als bei jungen Patienten mit milder Hypertonie (Kraft *et al.* 1988). Für die genannten Befunde (Kraft *et al.* 1988) läßt sich folgende Erklärung finden: Die hauptsächliche Quelle des Plasma- β -Endorphins ist die Adenohypophyse. Seine Sekretion wird von endogenen Substanzen wie Kortikoliberin und Vasopressin, die beide direkt auf die Adenohypophyse wirken, geregelt (Vale *et al.* 1983). Auch Pharmaka, wie der zentral wirksame α_2 -Adrenozeptor-Agonist Clonidin, können eine Stimulation der β -Endorphin-Sekretion in Zellen der Adenohypophyse hervorrufen, wie es bei der Rattenhypophysenzelle gezeigt wurde (Pettibone und Mueller 1981).

Eine Aktivierung der α_2 -Adrenozeptoren im Ncl. tractus solitarius bei Ratten durch Noradrenalin oder das Antihypertonikum Clonidin führt zu Hypotonie, Bradykardie (Kunos *et al.* 1988) und zu einer Erniedrigung des Plasma-Noradrenalins (Martin *et al.* 1984). Diese kardiovaskuläre Reaktion auf die zentrale α_2 -Adrenozeptor-Stimulation kann durch akute Gabe des Opiatrezeptor-Antagonisten Naloxon ins Gegenteil verkehrt werden (Farsang und Kunos 1979), was wahrscheinlich durch die Ausschüttung des β -Endorphins aus Nervenendigungen in den Ncl. tractus solitarius mit verursacht wird (Kunos *et al.* 1981).

Die Normalisierung der erniedrigten Plasma- β -Endorphin-Konzentration, der erhöhten Plasma-Noradrenalin-Konzentration und die Normalisierung des gesteigerten Blutdrucks bei jungen Patienten mit milder Hypertonie unter Clonidin-Applikation (Kraft *et al.* 1988) lassen vermuten, daß die endogene α_2 -Adrenozeptor-Stimu-

lation bei diesen Patienten reduziert ist. Bei normotonen Probanden hingegen wurden nur leichte Veränderungen der Plasma- β -Endorphin-Konzentration, der Plasma-Noradrenalin-Konzentration und des Blutdrucks unter Clonidin-Applikation festgestellt (Kraft *et al.* 1988). Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß in dieser Gruppe eine zusätzliche α_2 -Adrenozeptor-Stimulation keinen Effekt hat (Kraft *et al.* 1988).

1.6 Fragestellung

Die familiäre Bluthochdruckbelastung kommt im Kollektiv der Patienten mit essentieller Hypertonie weitaus häufiger vor als in normotonen Vergleichskollektiven (Weitz 1923, Hamilton *et al.* 1954, Londe *et al.* 1971, Feinleib *et al.* 1974, Williams RR *et al.* 1988b).

In Anbetracht der Kochsalzempfindlichkeit als Modell für die frühe Manifestation genetisch determinierter Hypertonie sowie der Bedeutung der familiären Bluthochdruckbelastung ist es von besonderem Interesse, ob gegebenenfalls Marker für die genetische bzw. hereditäre Disposition der essentiellen Hypertonie gefunden werden können, die eng mit der Kochsalzempfindlichkeit bzw. der familiären Bluthochdruckbelastung korrelieren, in deren Kenntnis sich auf genetische Ursachen der essentiellen Hypertonie schließen läßt.

Für die vorliegenden Untersuchungen wurden Probanden ausgewählt, bei denen eine hereditäre bzw. genetische Disposition zur essentiellen Hypertonie vorlag. Diese Disposition wurde angenommen, wenn bei normotonen Probanden sowohl eine familiäre Bluthochdruckbelastung als auch eine Kochsalzsensitivität vorlag. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Parameter der Sympathikusaktivität, hormonelle Parameter und das intrazelluläre freie Kalzium schon zu diesem frühen Zeitpunkt einer sich potentiell entwickelnden, aber noch nicht manifesten Hypertonie Auffälligkeiten erkennen lassen.

Ziel der vorliegenden **Studie I** war es Parameter der Sympathikusaktivität, hormonelle Parameter und das intrazelluläre freie Kalzium bei normotonen Probanden mit bekannter Salzsensitivität und positiver familiärer Bluthochdruckbelastung oder Salzresistenz und negativer familiärer Bluthochdruckbelastung nach 9 h nächtlicher Bettruhe und nach dreistündiger Orthostase zu untersuchen.

Der Orthostasetest stellt eine endogene Stimulation und damit eine Erhöhung der Sympathikusaktivität dar.

In der vorliegenden Studie wurde in diesem Zusammenhang erstmalig untersucht, welchen Effekt die Orthostase auf das Endothelin und die funktionell bedeutsamen hochaffinen α_2 -Adrenozeptoren hat.

Der Orthostase-Effekt auf die u.g. Parameter wird sowohl als Gruppenvergleich zwischen normotonen Probanden mit und ohne hereditäre bzw. genetische Disposition zur essentiellen Hypertonie als auch für das gesamte Probandenkollektiv dargestellt.

Bei der Bestimmung der intrazellulären freien Kalzium-Konzentration wurde neben der endogenen (in vivo) Stimulation (über α_2 -Adrenozeptoren) der Thrombozyten durch die Orthostase zusätzlich eine in vitro Stimulation mit Thrombin (über Thrombinrezeptoren) durchgeführt.

Folgende Parameter wurden untersucht:

Studie I

Thrombozytäre α_2 -Adrenozeptoren

- (a) Hochaffine α_2 -Adrenozeptoren ($[^3\text{H}]$ -UK 14,304-Bindungsstellen)
- (b) gesamte α_2 -Adrenozeptoren ($[^3\text{H}]$ -Yohimbin-Bindungsstellen)

Thrombozytäres intrazelluläres freies Kalzium

- (c) Konzentration des intrazellulären freien Kalziums
- (d) Änderung der Konzentration des intrazellulären freien Kalziums unter Stimulation der Thrombozyten mit Thrombin

- (e) Plasma-Endothelin
- (f) Plasma-Renin
- (g) Plasma-Noradrenalin
- (h) Plasma-Adrenalin

- (i) Systolischer Blutdruck
- (j) Diastolischer Blutdruck
- (k) Mittlerer arterieller Blutdruck

- (l) Periphere Pulsfrequenz

Studie II

- (m) Plasma- β -Endorphin
- (n) Plasma-Noradrenalin
- (o) Plasma-Adrenalin

In der **Studie II** wurde die Suche nach Markern für die genetische bzw. hereditäre Disposition der essentiellen Hypertonie dahingehend ausgeweitet, als daß die Plasma- β -Endorphine und Plasma-Katecholamine in Ruhe (während 90 min Liegens) bei salzsensitiven normotonen Probanden mit familiärer Bluthochdruckbelastung und salzresistenten normotonen Probanden ohne familiäre Bluthochdruckbelastung bestimmt wurden.

2 Probanden, Studiendesign und Methoden

2.1 Probanden

Bei den männlichen, normotonen und freiwilligen Probanden wurden Vor- und Begleiterkrankungen anamnestisch und durch eine körperliche Untersuchung ausgeschlossen. Einschlusskriterien waren ein diastolischer Blutdruck von weniger als 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck von maximal 100 mmHg (siehe Blutdruckmeßverfahren). Die in Voruntersuchungen (s.u.) hinsichtlich ihrer Kochsalzempfindlichkeit getesteten Probanden wurden auf das kombinierte Auftreten zweier Merkmalsausprägungen hin ausgesucht. Die Probanden waren entweder salzsensitiv (s.u.) und hatten eine familiäre Bluthochdruckbelastung oder sie waren salzresistent und es lag keine familiäre Bluthochdruckbelastung bei ihnen vor.

Da die Genese der essentiellen Hypertonie zum Teil hereditären und wahrscheinlich polygenen Einflüssen unterliegt (Miall und Oldham 1963, Rose *et al.* 1979), wurde mit der o.g. Auswahl der Probanden versucht ein Kollektiv mit einer starken phänotypischen Expression dieser Einflüsse zu finden.

2.1.1 Definition der Familienanamnese

Eine Familienanamnese wurde als positiv angenommen, wenn dem Probanden bei mindestens einem Elternteil und/oder Geschwister eine behandlungsbedürftige Hypertonie bekannt war und dies durch den Hausarzt des betreffenden Angehörigen bestätigt wurde.

2.1.2 Testung der Kochsalzempfindlichkeit

Die Probanden unterzogen sich zwei Diät-Perioden von jeweils einer Woche: eine Woche mit hoher Natriumzufuhr und eine weitere mit nur niedriger Natriumzufuhr.

Die Niedrig-Natrium-Periode wurde in Form einer salzarmen Diät entsprechend 20 mmol Natriums/24h und Verabreichung von Placebo-Kapseln durchgeführt. Die Hoch-Natrium-Periode konnte durch Einnahme von Kochsalz-Kapseln zusätzlich zu der salzarmen Diät auf insgesamt 250 mmol Natrium/24h definiert werden. Die Abfolge der Hoch-Natrium-Periode bzw. Niedrig-Natrium-Periode aufeinander wurde damit randomisiert. Rauchen, Kaffeekonsum und Sport wurden während der Diät-Perioden vermieden.

Die Blutdruckwerte wurden am siebten Tag einer Woche anhand eines TONOPRINT^R-Blutdruck-Messgerätes (Speidel & Keller, Jungingen) ermittelt.

Die Messungen wurden 90 min lang am liegenden Probanden minütlich durchgeführt. Zur Bestimmung des mittleren arteriellen Druckes ($MAD = RR_{diast} + 1/3 [RR_{syst} - RR_{diast}]$) wurden die arithmetischen Mittel der letzten 60 Messungen herangezogen.

War der Abfall des mittleren arteriellen Druckes von einer Hoch-Natrium-Periode zu einer Niedrig-Natrium-Periode $> 3 \text{ mmHg}$, so galt der Proband als *salzsensitiv*, war er $\leq 3 \text{ mmHg}$, so galt der Proband als *salzresistent*.