

Medizinische Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin
aus der Medizinischen Klinik IV
Direktor/Abteilungsleiter: Univ. Prof. Dr. med. W. Zidek

**Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre
Konzentration von
Calcium und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in
Lymphozyten**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der
medizinischen Doktorwürde
der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

vorgelegt von
Diana Winzer
aus Berlin

Referent: Prof. Dr. med. M. Tepel

Koreferent: Prof. Dr. Dr. h.c. mult. E. Ritz

Gedruckt mit der Genehmigung der Charité – Universitätsmedizin Berlin
Campus Benjamin Franklin

Promoviert am: 15.12.2006

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	1
1.1 Oraler Glucose-Toleranztest	2
1.2 Calciumstoffwechsel und Thapsigargin	4
1.3 Hypertonie und Reaktive Sauerstoffspezies (ROS)	6
1.4 Gefäßreaktivität und Reflective Index	9
1.5 Fragestellung	11
2. Methoden.....	12
2.1 Reagenzien	12
2.2 Puffer- und Eichlösungen.....	13
2.3 Geräte	14
2.4 Probanden und Untersuchungsgut.....	15
2.5 Gewinnung und Präparation der Blutzellen	16
2.6 Oraler Glucose-Toleranztest	17
2.7 Digitale Photoplethysmographie	18
2.8 Fluoreszenzphotometrie	26
2.8.1 Messung der intrazellulären Konzentration von Calcium	26
2.8.2 Messung der Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale	29
2.9 Statistische Auswertung	30
3. Resultate.....	32
3.1 Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Reflective Index.....	32
3.2 Digitale Photoplethysmographie bei Bluthochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen - Auswirkung der Pulsreflexion.....	33
3.3 Veränderungen des Reflective Index vor und nach oralem Glucose-Toleranztest	34
3.4 Veränderungen des Reflective Index nach arterieller Stauung am Oberarm.....	38
3.5 Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre Calciumkonzentration .	40
(A) Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf den Calcium-Basalwert	42
(B) Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf den Thapsigargin – stimulierten Calciumwert	52
3.6 Auswirkungen des oralen Glucose-Toleranztests auf die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS).....	62

4. Diskussion	69
4.1 Veränderung des Reflective Index nach oraler Glucosebelastung.....	69
4.2 Veränderung des Reflective Index nach arterieller Stauung unter oraler Glucosebelastung	71
4.3 Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre basale Calciumkonzentration.....	73
4.4 Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre Thapsigargin-stimulierte Calciumkonzentration.....	76
4.5 Auswirkungen des OGTT auf die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)	79
5. Zusammenfassung.....	83
6. Literaturverzeichnis.....	85
7. Anhang	95
7.1 Abkürzungsverzeichnis	95
7.2 Abbildungsverzeichnis	97
7.3 Tabellenverzeichnis.....	99
7.4 Lebenslauf	100
7.4 Selbständigkeitserklärung	101
7.5 Danksagung.....	102

5. Zusammenfassung

Effekt des Oraln Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre Konzentration von Calcium $[Ca^{2+}]_i$ und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Lymphozyten

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Patienten mit essentieller Hypertonie (n=24) und altersgleichen gesunden Kontrollpersonen (n=24) ein oraler Glucose-Toleranztest (OGTT) im Sinne eines akuten Stressimpulses durchgeführt. Anschließend wurden die Veränderungen der Gefäßregulation sowie Veränderungen der intrazellulären Calcium-Konzentration und die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen in Lymphozyten gemessen.

Die Gefäßveränderungen in vivo wurden mittels digitaler Photoplethysmographie und durch die Bestimmung der Volumen-Pulswelle, die mit dem Reflective Index charakterisiert wurde, dargestellt. Dabei wurden sowohl die Basalwerte als auch die Werte während der reaktiven Gefäß – Weitstellung (reaktive Hyperämie) nach Lösen eines kurzzeitigen suprasystolischen Staus jeweils vor, eine Stunde und zwei Stunden nach OGTT ermittelt.

Die Fluoreszenz - spektrophotometrische Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Calcium in Lymphozyten erfolgte in vitro durch den Calcium-sensitiven Farbstoff Fura 2 Acetoxymethylester.

Die Konzentrationen reaktiver Sauerstoffradikale wurden in vitro mithilfe des sensitiven Farbstoffes Lucigenin bestimmt.

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie kam es zu einem signifikanten Abfall des Reflective Index von $37,6 \pm 2,9$ (Mittelwert \pm SEM) auf $31,0 \pm 3,0$ eine Stunde nach OGTT und auf $32,8 \pm 2,4$ zwei Stunden nach OGTT (n=24, $p < 0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Im Gegensatz dazu ergab sich bei gesunden Kontrollpersonen keine signifikante Veränderung des Reflective Index während des oralen Glucose-Toleranztests.

Nach kurzer suprasystolischer Stauung zeigte sich bei den normotensiven Kontrollpersonen ein signifikanter Abfall des Reflective Index von $27,1 \pm 2,8$ vor OGTT auf $24,5 \pm 3,1$ zwei Stunden nach OGTT (n=24, $p < 0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Bei Bluthochdruckpatienten dagegen gab es keine signifikanten Veränderungen des Reflective Index nach kurzer suprasystolischer Stauung.

Die fluoreszenzphotometrischen Bestimmungen der intrazellulären Calciumkonzentration ergaben signifikante Veränderungen bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie: es kam zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Calciums von $1,24 \pm 0,1$ auf $1,69 \pm 0,2$ eine Stunde nach OGTT und auf $1,60 \pm 0,1$ zwei Stunden nach OGTT ($n=24$, $p<0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Sowohl der Wert eine Stunde nach OGTT als auch zwei Stunden nach OGTT war signifikant unterschiedlich im Vergleich zu den Ausgangswerten ($p < 0,05$ und $p < 0,01$ mit Dunn's post hoc test).

In der Kontrollgruppe dagegen war der Zweistundenwert nach OGTT signifikant erhöht ($p < 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Die Vorgabe von Phorbol – 12 – myristate – 13 - acetate in vitro führte bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie zu einem signifikanten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration von $1,49 \pm 0,1$ auf $2,16 \pm 0,1$ eine Stunde nach OGTT und auf $2,14 \pm 0,2$ zwei Stunden nach OGTT ($n=24$, $p < 0,001$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Im Gegensatz dazu war bei gesunden Kontrollpersonen der Phorbol – 12 – myristate – 13 - acetate - induzierte Calcium-Einstrom nach OGTT nicht signifikant unterschiedlich.

Auch die in - vitro – Stimulation der Lymphozyten mit Insulin führte in der Patientengruppe zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Calciums von $1,63 \pm 0,1$ vor OGTT auf $1,91 \pm 1,2$ zwei Stunden nach OGTT ($n=24$, $p < 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), wogegen sich in der gesunden Kontrollgruppe keine signifikanten Veränderungen ergaben.

Sowohl Patienten mit essentieller Hypertonie als auch normotensive Kontrollpersonen reagierten auf die in - vitro - Gabe von Glucose mit einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Calciums zwei Stunden nach OGTT ($n = 48$, $p < 0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Die Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale unter OGTT war in keiner der Untersuchungsgruppen signifikant unterschiedlich im Vergleich zum Ausgangswert.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigen, dass orale Glucose - Belastung zu Veränderungen der Gefäßregulation und der intrazellulären Calcium - Homöostase sowohl bei Patienten mit essentieller Hypertonie als auch bei gesunden Kontrollpersonen führen.

7. Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

µl	Mikroliter
Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintriphosphat
[Ca²⁺]_i	freie intrazelluläre (zytosolische) Calciumkonzentration
[Ca²⁺]_{i basal}	basale intrazelluläre (zytosolische) Calciumkonzentration
ER	endoplasmatisches Retikulum
Fura 2 AM	Acetoxymethylester des Fluoreszenzfarbstoffes Fura 2
HAT	hypertensive Probanden
I.E.	Internationale Einheiten
KWT	Kruskal – Wallis - Test
ml	Milliliter
mmol/l	Millimol/Liter
mU/ml	Milli- Units/Milliliter
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
NT	normotensive Probanden
[O₂^{•-}]	Superoxidanion / freies Sauerstoffradikal
OGTT	oraler Glucose-Toleranztest
PMA	Phorbol – 12 – myristate - 13 - acetate
RI	Reflective Index
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
SEM	Standardabweichung des Mittelwertes
SERCA	sarcoendoplasmatische Retikulum-Calcium-ATPase

SR Sarcoplasmatisches Retikulum

Tab. Tabelle

7.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Strukturformel des Ca ²⁺ -ATPase-Inhibitors Thapsigargin.....	6
Abb. 2: Digitale Photoplethysmographie zur Analyse der Pulswelle.....	19
Abb. 3: Typisches Beispiel für kontinuierliches Monitoring der Pulswelle durch digitale Photoplethysmographie.....	19
Abb. 4: Schematische Darstellung der verschiedenen Komponenten der Pulswelle bestimmt durch digitale Photoplethysmographie.....	20
Abb. 5: Analyse des diastolischen Anteils der Pulswelle, die mittels digitaler Photoplethysmographie gewonnen wurde.	22
Abb. 6: Schematische Darstellung der reaktiven Hyperämie vor (schwarze Kreise), eine Stunde (weiße Vierecke) und zwei Stunden (schwarze Vierecke) nach oralem Glucose-Toleranztest....	23
Abb. 7: Beispielhafte Analyse des Reflective Index nach suprasystolischer Stauung.....	25
Abb. 8: Darstellung der Fluoreszenzintensität von Fura 2 AM bei einer Emissionswellenlänge $\lambda_E = 510$ nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und verschiedenen Calciumkonzentrationen.....	28
Abb. 9: Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Reflective Index aus der Pulswelle bei Patienten mit essentieller Hypertonie.....	32
Abb. 10: Auftragung der Daten nach Bland-Altman.	33
Abb. 11: Kontinuierliches Monitoring der Pulswelle durch digitale Photoplethysmographie.	34
Abb. 12: Veränderung des Reflective Index vor (0h) und nach (1h und 2h) oralem Glucose-Toleranztest bei 48 Probanden.	35
Abb. 13: Verlauf des Reflective Index bei gesunden Kontrollpersonen (NT, n=24) und Bluthochdruckpatienten (HT, n=24)..	36
Abb. 14: Verlauf des Reflective Index nach arterieller Stauung bei Bluthochdruckpatienten (HT, n=24) und gesunden Kontrollpersonen (NT, n=24)..	38
Abb. 15: Fluoreszenzphotometrische Darstellung der basalen intrazellulären Calciumkonzentration [Ca ²⁺] _i basal in Lymphozyten bei einer gesunden Kontrollperson vor und nach Stimulation mit Thapsigargin.	42
Abb. 16: Veränderung der Calcium-Basalwerte (Kontrolle)	43
Abb. 17: Veränderung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von 10 μ mol/l PMA.	45
Abb. 18: Veränderung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose	48

Abb. 19:	Veränderung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin	50
Abb. 20:	Darstellung der Thapsigargin - stimulierten Calciumwerte (Kontrolle).....	53
Abb. 21:	Darstellung der Delta-Calciumwerte nach Vorgabe von 10 µmol/l PMA.....	54
Abb. 22:	Darstellung der Delta - Calciumwerte nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose.....	56
Abb. 23:	Darstellung der Delta-Calciumwerte nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin.....	57
Abb. 24:	Fluoreszenzphotometrische Darstellung der Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ in Lymphozyten (Kontrolle).....	58
Abb. 25:	Fluoreszenzphotometrische Darstellung der Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ in Lymphozyten nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin.....	60
Abb. 26:	Fluoreszenzphotometrische Darstellung der Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ in Lymphozyten nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose.....	61
Abb. 27:	Darstellung der Konzentration freier Sauerstoffradikale (Kontrolle).....	63
Abb. 28:	Darstellung der Konzentration freier Sauerstoffradikale nach Vorgabe von 10 µmol/l PMA	64
Abb. 29:	Darstellung der Konzentration freier Sauerstoffradikale nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin	65
Abb. 30:	Darstellung der Konzentration freier Sauerstoffradikale nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose	67

7.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Klinische und biochemische Charakterisierung der gesunden Kontrollgruppe und der Patienten mit essentieller Hypertonie	15
Tab. 2: Verlauf des Reflective Index vor und nach oralem Glucose-Toleranztest	36
Tab. 3: Verlauf des Reflective Index nach arterieller Stauung bei Bluthochdruckpatienten (HT, n=24) und gesunden Kontrollpersonen (NT, n=24)	39
Tab. 4: Darstellung der Calcium-Basalwerte (Kontrolle) vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest.....	44
Tab. 5: Darstellung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ PMA vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest	46
Tab. 6: Darstellung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest	48
Tab. 7: Darstellung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest	51

7.4 Lebenslauf

Aus Datenschutzgründen entfällt die Online-Veröffentlichung des Verfasser-Lebenslaufs

7.4 Selbständigkeitserklärung

Ich, Diana Winzer, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: **Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre Konzentration von Calcium und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen in Lymphozyten** selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Berlin, den

.....

Diana Winzer

7.5 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt all denen, die diese Arbeit ermöglicht und unterstützt und damit entscheidend zu ihrem Gelingen beigetragen haben:

Vielen Dank Herrn Professor Tepel für die Überlassung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung und die stets zuverlässige und geduldige Begleitung im Labor bei der Durchführung der Experimente sowie bei der Verfassung der Dissertation.

Ein großes Dankeschön an Marcus Haucke, Anne- Katrin Zimmer, Nadine Zeunemann und Melanie Derer für ihr Vertrauen und ihre Freundschaft.

Meiner Studienkollegin und Mitstreiterin Jana Gutsche danke ich für die reibungslose Zusammenarbeit und so manche denkwürdige Stunde im Labor.

Ohne den Rückhalt meiner Familie wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen- danke ihr Lieben...!

Ganz besonders danke ich dir, mein Schatz: dein Interesse, dein Engagement und deine unerschütterliche Geduld haben mir sehr geholfen.