

## 2. Methoden

### 2.1 Reagenzien

Destilliertes Wasser

Formaldehydlösung 35%, DAB 10 200-001-8 (EINECS), AUG Hedinger, Stuttgart

FURA 2 AM; Pentasodium Salt 1-[2 – (5 – Carboxyoxazol – 2 – yl) – 6 – aminobenzofuran – 5 – oxy] – 2 – (2' - amino – 5' - methylphenoxy) – ethane – N,N,N',N' - tetraacetic Acid, 5Na; in solution von Calbiochem®, 344906

Glucosteril® 5%, Glucose-Monohydrat, Reg.-Nr. G 755-1, von Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg

Histopaque®, von SIGMA Diagnostics, Inc. St-Louis MD 63178, USA

Alt-Insulin

Lucigenin, von CALBIOCHEM®

PBS – Dulbecco w/o Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>, von Biochrom AG®, L 1835,

PMA (Phorbol - 12 - Myrestate - 13 - Acetate)

Thapsigargin, Calcium- ATPase- Inhibitor, von CALBIOCHEM®

## 2.2 Puffer- und Eichlösungen

HBSS (Hank's balanced salt solution)

136 mmol/l	NaCl	7,94 g
5,40 mmol/l	KCl	0,40 g
0,44 mmol/l	KH <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,06 g
0,34 mmol/l	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,06 g
5,60 mmol/l	D-Glucose	1,00 g
1,00 mmol/l	CaCl <sub>2</sub> * 2H <sub>2</sub> O	0,147 g
10 mmol/l	Hepes	43,83 g

---

ad 1000ml Aqua dest.

Die Einstellung erfolgte mit 1M Natronlauge auf ph 7,4.

---

### 2.3 Geräte

CASY®1, Cellcounter und Analysesystem, Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland

Eppendorf Research, Präzisions-Küvetten aus Quarzglas, SUPRASIC®, 101-QS 10 mm

Floureszenz Spektrophotometer Modell F-2000, Hitachi LTD., Tokyo, Japan

Fluoroskan Ascent FL, Labsystems

Guardian 3000 Gefäß-Plethysmograph

Hamilton-Spritzen Micriliter®, Hamilton, Bonaduz, Schweiz

Pumpe 4010, CLINICON GmbH, Mannheim, Deutschland

Vacutainer, Reagenzgläser

Wasserbad, Julabo

Zentrifugen:

Eppendorf-Zentrifuge

Heraeus-Zentrifuge (1000-6000 U/min)

## 2.4 Probanden und Untersuchungsgut

Die Untersuchungen wurden bei gesunden Personen (n=24) und Patienten mit essentieller Hypertonie (n=24) durchgeführt. Als Kontrollgruppe wurden gesunde Personen ausgewählt, die zum Zeitpunkt der Untersuchung weder Bluthochdruck noch andere Begleiterkrankungen aufwiesen.

In beiden Gruppen befanden sich Probanden im Alter zwischen 22 und 93 Jahren.

Bei der Auswahl der Personen wurde auf eine Gleichverteilung der Geschlechter Wert gelegt. Jeder Studienteilnehmer wurde vor Untersuchungsbeginn ausführlich über Inhalt und Durchführung der Studie aufgeklärt; die Zustimmung der Teilnehmer erfolgte sowohl in mündlicher als auch in schriftlicher Form. Personen mit manifestem Diabetes mellitus kamen als Probanden nicht in Frage.

**Tab. 1:** Klinische und biochemische Charakterisierung der gesunden Kontrollgruppe und der Patienten mit essentieller Hypertonie. Die kontinuierlichen Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  SEM angegeben.

Charakteristikum	Normotensive Kontrollgruppe	Hypertensive Patienten
Alter (Jahre)	44,1 $\pm$ 5,3	61,3 $\pm$ 3,5
Mann / Frau	8/16	13/11
Körpergewicht (kg)	66,1 $\pm$ 2,8	83,9 $\pm$ 4,8
Blutzucker (mg/dl)	81,1 $\pm$ 4,9	81,2 $\pm$ 3,8
Systolischer Blutdruck (mmHg)	122,6 $\pm$ 3,1	142,9 $\pm$ 4,4
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	66,5 $\pm$ 1,9	79,1 $\pm$ 3,0
Pulsrate (1/min)	68,7 $\pm$ 2,5	64,9 $\pm$ 2,2
Natrium (mmol/l)	135,4 $\pm$ 0,8	136 $\pm$ 1,5
Kalium (mmol/l)	3,8 $\pm$ 0,1	3,2 $\pm$ 0,1

Einzelne Voruntersuchungen zur Etablierung der digitalen Photoplethysmographie wurden bei gesunden Kontrollpersonen durchgeführt.

Eine essentielle Hypertonie wurde nach mehrfacher Bestimmung des Blutdruckes (systolischer Blutdruck größer als 140 mmHg, diastolischer Blutdruck größer als 90 mmHg) und nach

Ausschluss sekundärer Ursachen für eine Hypertonie (renale Hypertonie, endokrine Hypertonie, Aortenisthmusstenose) diagnostiziert.

## 2.5 Gewinnung und Präparation der Blutzellen

Auf vier Reagenzgläser wurden 20 ml heparinisieretes Blut aufgeteilt. Sie enthielten jeweils 3 ml Histopaque® (SIGMA Diagnostics, Inc. St-Louis MD 63178, USA).

Die Gewinnung der Lymphozyten erfolgte nach etablierter Methodik durch Dichtegradienten - Zentrifugation (Peper et al. 1968, Pritchard et al. 1989) mit 2100 rounds per minute (rpm) für 30 Minuten. Der dabei entstandene Leukozytenring wurde mit einer Pipette vorsichtig aspiriert und auf drei Eppendorfgefäße (E1, E2, E3) aufgeteilt. Das Cellcounter- und Analysesystem CASY®1 (Schärfe System GmbH, Reutlingen, Deutschland) ermittelte durchschnittliche Lymphozytenkonzentrationen von  $3209,4 \pm 06$  counts/ml vor oralem Glucose-Toleranztest,  $2661,67 \pm 06$  counts / ml 60 Minuten nach oralem Glucose-Toleranztest und  $3758,8 \pm 06$  counts/ml (120 Minuten nach oralem Glucose-Toleranztest).

E1 wurde mit  $10 \mu\text{mol/l}$  Fluoreszenzfarbstoff FURA 2 AM, Pentasodium Salt versetzt, fünfzehn Minuten unter Lichtschutz inkubiert, danach fünf Minuten zentrifugiert und mit  $4000 \mu\text{l}$  PBS (PBS – Dulbeco w/o  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ , von Biochrom AG®, L 1835) resuspendiert.

Dann erfolgte die Verteilung der Suspension auf vier Quarzküvetten (Eppendorf Research, Präzisions - Küvetten aus Quarzglas, SUPRASIC®, 101-QS 10 mm ) zu jeweils  $1000 \mu\text{l}$ : Küvette 1 war die Kontrolle, Küvette 2 erhielt  $10 \mu\text{mol/l}$  PMA, Küvette 3 erhielt  $40 \text{ mU/ml}$  Insulin und Küvette 4 erhielt  $250 \text{ mg/dl}$  Glucose.

Küvette 3 und Küvette 4 wurden lichtgeschützt eine Stunde inkubiert. Die Bestimmung der intrazellulären Calciumkonzentration erfolgte für alle Proben im Fluoreszenzphotometer (Modell F-2000, Hitachi LTD, Tokyo, Japan).

Zur Bestimmung der Konzentration freier Sauerstoffradikale wurde das zweite Eppendorfgefäß (E2) ebenfalls fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und die sich am Boden sammelnden Lymphozyten mit  $2000 \mu\text{l}$  PBS resuspendiert. Die Suspension kam zu je  $500 \mu\text{l}$  in vier Eppendorfgefäße (E1-E4), die analog der Proben für die Calciummessung bestückt wurden: E1 war die Kontrolle, E2 erhielt  $10 \mu\text{mol/l}$  PMA, E3 erhielt  $40 \text{ mU/ml}$  Insulin und E4  $250 \text{ mg/dl}$  Glucose.

E1-E4 inkubierten für eine Stunde im Wasserbad bei 37°C. Danach erfolgte die Aufteilung zu je 100 µl in eine Lochpalette. Jedes Loch erhielt 100 µmol/l Farbstoff Lucigenin (Lucigenin-Lösung: 5 mg/ml DMSO, Endkonzentration 100 µmol). Im Fluoroskan® (Ascent FL, Labsystems) wurde die Konzentration freier Sauerstoffradikale gemessen.

## 2.6 Oraler Glucose-Toleranztest

### **Dextro® OGTT**

Wirkstoff: Mono- und Oligosaccharid-Gemisch (Stärkehydrolysat)

#### **Zusammensetzung:**

Eine Flasche Dextro® O.G-T. mit 300 ml Saft enthält:

#### *- arzneilich wirksame Bestandteile*

Mono- und Oligosaccharid-Gemisch (Stärkehydrolysat), das nach enzymatischer Spaltung einer Menge von 75 g wasserfreier Glucose entspricht

#### *- sonstige Bestandteile*

Schwarzer Johannisbeer-Muttersaft, Kaliumsorbat (Konservierungsmittel), gereinigtes Wasser. Dextro® O.G-T. enthält 0,01 - 0,06 Vol.-% Alkohol, da der aus Geschmacksgründen zugesetzte Johannisbeer-Muttersaft Spuren von Alkohol aufweist.

#### **Darreichungsform und Inhalt:**

Dextro® O.G-T. ist als Flasche mit 300 ml Saft erhältlich.

#### **Anwendungsgebiet:**

Dextro® O.G-T. ist ein Belastungstrunk für den oralen Glucose-Toleranztest

(Zuckerbelastungstest zum Ausschluss bzw. zur Diagnose eines Diabetes mellitus).

Der orale Glucose-Toleranztest wurde bei 24 gesunden Personen und 24 Personen mit essentieller Hypertonie als „vasogener Belastungstest“ durchgeführt. Nüchtern, 60 und 120 Minuten nach der Einnahme wurde die Gefäßelastizität gemessen und bei normotensiven und hypertensiven Probanden verglichen. Anschließend erfolgte nach oben beschriebener Methodik die Isolierung von Lymphozyten aus peripherem Blut zur Bestimmung der intrazellulären

Calciumkonzentration sowie der Konzentration freier Sauerstoffradikale nach oraler Zuckerbelastung.

Pharmazeutischer Unternehmer:

Hoffmann-La Roche AG

Emil-Barell-Straße 1

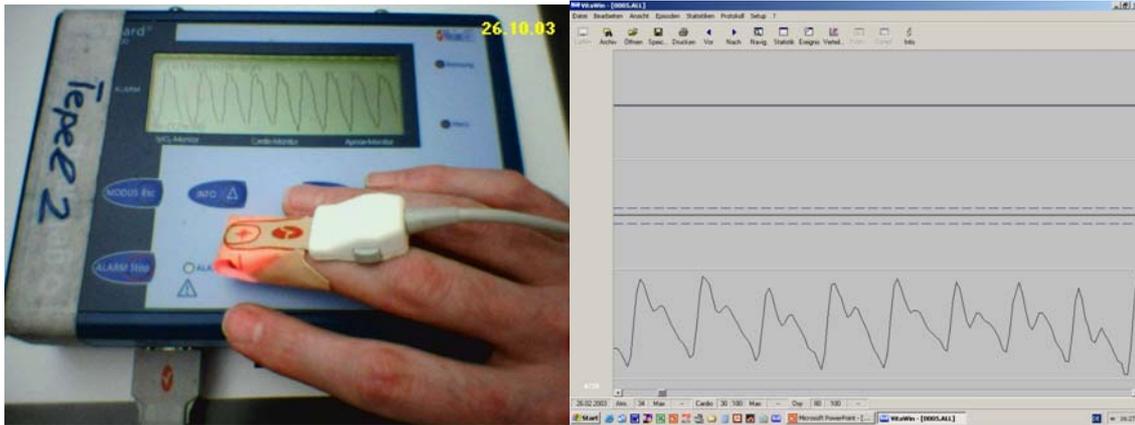
79639 Grenzach-Wyhle

(Stand der Information: November 2001)

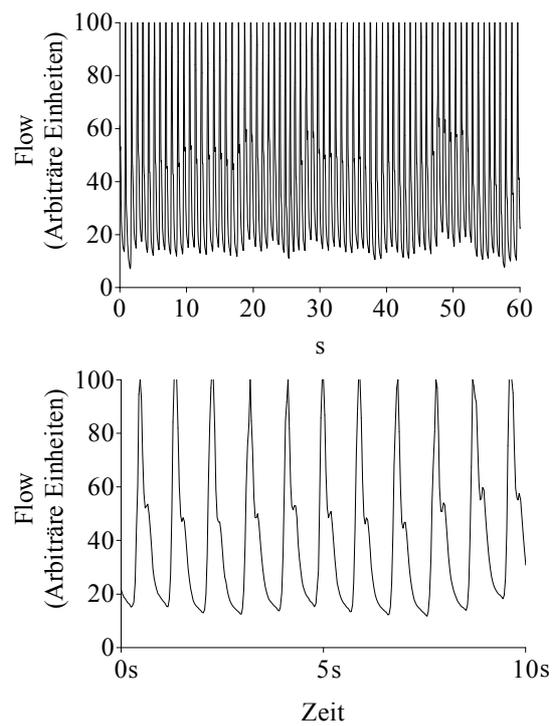
## 2.7 Digitale Photoplethysmographie

### Digitale Photoplethysmographie vor und nach oralem Glucose-Toleranztest

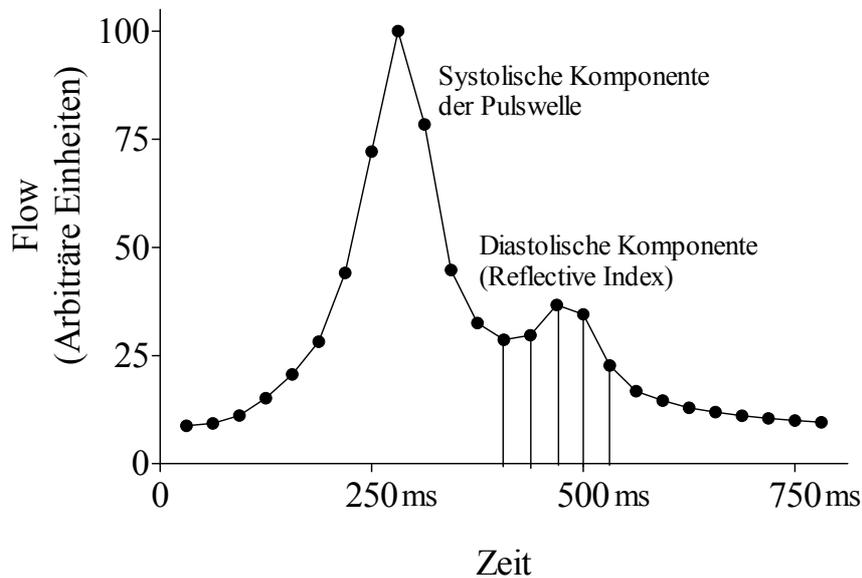
Die digitale Photoplethysmographie wurde mit einem Pulsoximeter (Vitaguard VG3000; getemed, Teltow) durchgeführt mit einem Sensor (LNOP-Adult SpO<sub>2</sub> sensor; Masimo Corp. CA), der auf die Fingerkuppe des Mittelfingers aufgeklebt wird. **Abbildung 2** zeigt die Mess-Apparatur in situ. Mit der digitalen Photoplethysmographie wird der digitale Volumenpuls gemessen. Mittels digitaler Photoplethysmographie mit einem Pulsoximeter kann die Pulswelle bei jedem Herzschlag kontinuierlich aufgezeichnet werden, ohne dass der Patient oder die Behandlung beeinträchtigt werden (**Abbildung 3**). Wie in der Literatur beschrieben (Millasseau et al., 2003) besteht die digitale Volumenpulswelle aus zwei Anteilen (**Abbildung 4**). Der initiale, systolische Anteil der digitalen Volumenpulswelle wird durch die voranschreitende Pulswelle bestimmt. Der spätere, diastolische Anteil der digitalen Volumenpulswelle kommt durch die Reflexion der Pulswelle in der Peripherie, wahrscheinlich vorwiegend an kleinen Arterien insbesondere der unteren Körperabschnitte, zustande.



**Abb. 2:** Digitale Photoplethysmographie zur Analyse der Pulswelle.



**Abb. 3:** Typisches Beispiel für kontinuierliches Monitoring der Pulswelle durch digitale Photoplethysmographie. Dargestellt sind die Pulswellen, die über einen Zeitraum von 60 Sekunden (obere Abbildung) bzw 10 Sekunden (untere Abbildung) aufgezeichnet wurden.

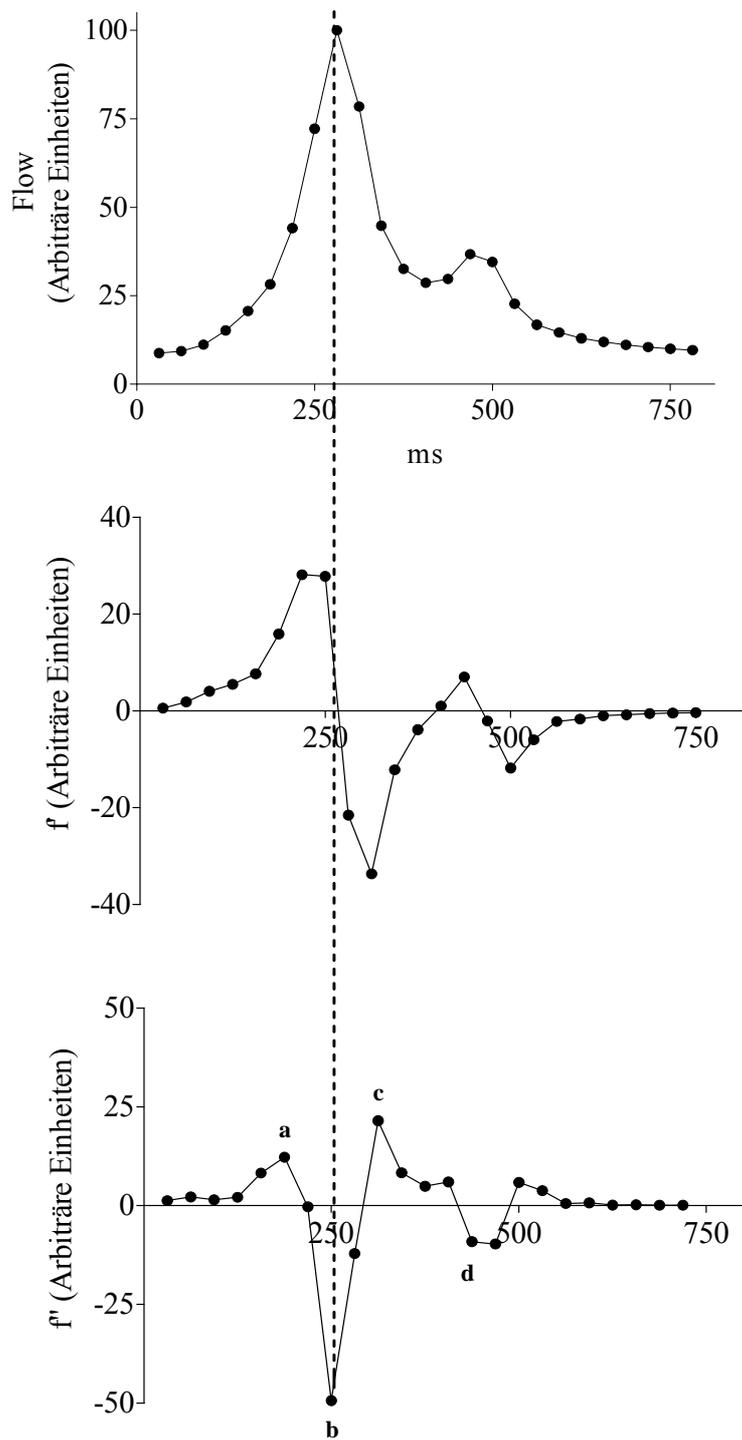


**Abb. 4:** Schematische Darstellung der verschiedenen Komponenten der Pulswelle bestimmt durch digitale Photoplethysmographie.

Die Photoplethysmographie - Daten wurden mit 32 pro Sekunde gewonnen, aufgezeichnet und auf einen PC übertragen. Die Rohdaten wurden mit einem speziellen, selbst entwickelten Auswertungsprogramm analysiert. Die Messdaten wurden in Episoden von 150 Sekunden zusammengefasst. Die Pulswellen wurden durch den so genannten Reflective Index charakterisiert; dieser zeigte den diastolischen Anteil der Pulswelle, also die Reflexion der Pulswelle in der Peripherie. Der Reflective Index wurde immer als Mittelwert aus allen Pulswellen, die innerhalb einer Episode von 150 Sekunden aufgezeichnet wurden, also typischerweise mehr als 150 Pulswellen, angegeben.

Zur Berechnung des Reflective Index zur Charakterisierung des diastolischen Anteils der Pulscurve wurde für jede Pulswelle die erste und zweite Ableitung berechnet (GraphPad Prism 3.0, GraphPad Software, San Diego, CA). Das lokale Minimum dieser Funktion wurde automatisch berechnet. Das lokale Minimum der ersten Ableitung entspricht dem Wendepunkt der Pulswelle. Die Mittelwerte der Daten des dritten bis siebten Punktes, die dem Wendepunkt der Pulswelle folgen, wurden analysiert. Der Mittelwert in Prozent der maximalen Amplitude der Pulswelle wurde dann als Reflective Index bezeichnet. Die **Abbildung 5** zeigt eine beispielhafte Auswertung der Pulswelle. Die oben genannten Punkte liegen in einem Intervall zwischen 93

Millisekunden bis 218 Millisekunden nach dem Wendepunkt der Pulswelle und beschreiben die charakteristische "Schulterregion" im diastolischen Verlauf der Pulswelle, welche überwiegend durch die Reflexion der Pulswelle in der Peripherie bedingt ist. Durch den neuen Auswertelgorithmus konnte der Reflective Index als Charakteristikum des diastolischen Anteils der Pulswelle kontinuierlich vor und nach oralem Glucose-Toleranztest gemessen werden.

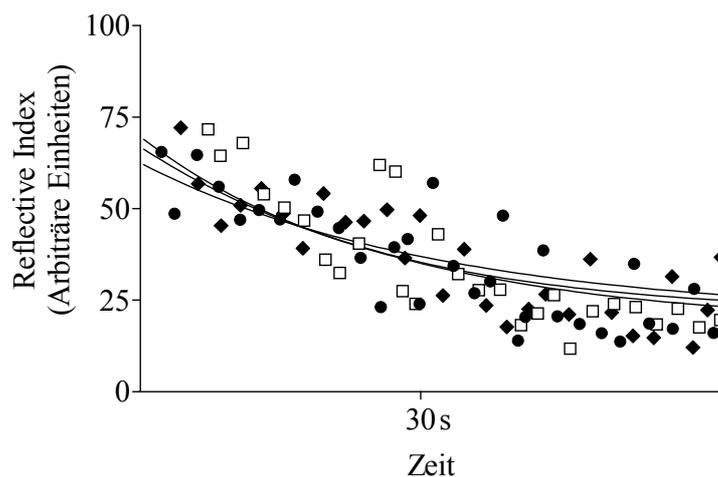


**Abb. 5:** Analyse des diastolischen Anteils der Pulswelle, die mittels digitaler Photoplethysmographie gewonnen wurde. Die Pulswelle (Flow, obere Abbildung) wurde durch digitale Photoplethysmographie mit einem Pulsoximeter gemessen mit einem Sensor, der auf die Fingerkuppe aufgeklebt wurde. Die Plethysmographie-Daten wurden mit 32 pro Sekunde

gewonnen. Für jede Pulswelle wurde die erste Ableitung berechnet ( $f'$ , mittlere Abbildung) und das lokale Minimum dieser Funktion wurde automatisch analysiert. Das lokale Minimum der ersten Ableitung entspricht dem Wendepunkt der Pulswelle. Die Mittelwerte der Daten des dritten bis siebten Punktes, die dem Wendepunkt der Pulswelle folgen, wurden bestimmt und als Reflective Index bezeichnet. In diesem Beispiel ist der Reflective Index = 34,2.

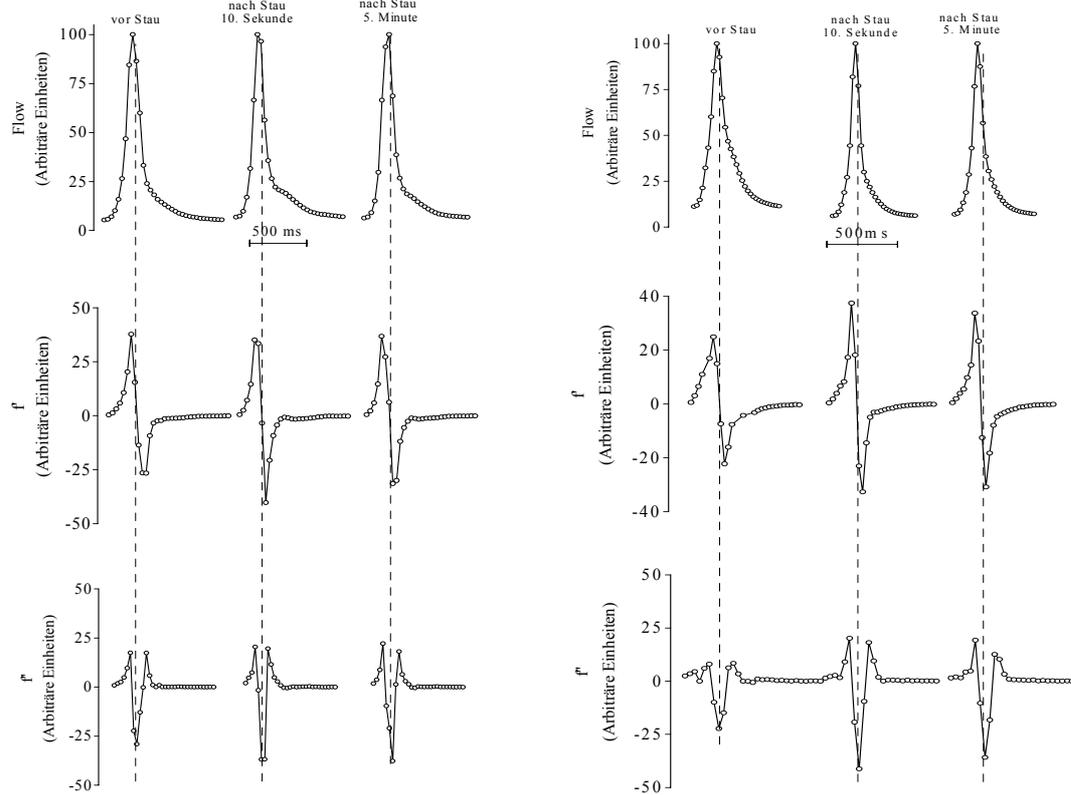
Anhand der zweiten Ableitung ( $f''$ , untere Abbildung) lässt sich die Pulscurve durch die Parameter **a**, **b**, **c** und **d** charakterisieren: **a** und **c** stellen erstes und zweites Maximum, **b** und **d** erstes und zweites Minimum der Pulscurve dar. In diesem Beispiel ist  $a = 12,6$ ,  $b = -49,2$ ,  $c = 21,4$  und  $d = -8,8$ . Die Messungen erfolgten pro Proband jeweils dreimal: vor oralem Glucose-Toleranztest und eine bzw. zwei Stunden danach.

Außerdem wurde bei jedem Probanden die reaktive Hyperämie gemessen. Darunter versteht man die reaktive Weitstellung der Gefäße nach längerer Kompression. Die Stauung der Gefäße wurde durch eine am Oberarm befestigte und auf ca. 200 mmHg aufgepumpte Blutdruckmanschette erreicht. Die Messung der reaktiven Hyperämie erfolgte pro Proband ebenfalls dreimal: nüchtern, d.h. vor Einnahme der Glucoselösung und jeweils eine und zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest. (**Abbildung 6**)



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der reaktiven Hyperämie vor (schwarze Kreise), eine Stunde (weiße Vierecke) und zwei Stunden (schwarze Vierecke) nach oralem Glucose-Toleranztest.

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf des Reflective Index nach arterieller Stauung bei einem hypertensiven Probanden und einer gesunden Kontrollperson (**Abbildung 7**).



**Abb. 7:** Beispielhafte Analyse des Reflective Index nach suprasystolischer Stauung am Oberarm bei einem Patienten mit essentieller Hypertonie (linke Abbildung) und einer gesunden Kontrollperson (rechte Abbildung). Die gestrichelte Linie markiert den Wendepunkt der Pulscurve (Flow) und das lokale Minimum in der 1. Ableitung ( $f'$ ). Das Minimum bei  $f'$  entspricht dem Wendepunkt in  $f$ .

Der Reflective Index entspricht dem Mittelwert des 3. bis 7. Punktes, die dem Wendepunkt der Pulswelle folgen. Er wurde vor Stau sowie 10 Sekunden und 5 Minuten nach Stau ermittelt.

## 2.8 Fluoreszenzphotometrie

Bei der Fluoreszenzphotometrie handelt es sich um ein optisches Messverfahren zur Konzentrationsbestimmung fluoreszierender Substanzen. Wird ein im Grundzustand befindliches Teilchen von Licht getroffen, absorbiert es Strahlung einer bestimmten Wellenlänge, um in einen „angeregten Zustand“ zu gelangen.

Bei der Rückkehr aus diesem Zustand in den Grundzustand wird die Differenzenergie in Form von Licht freigesetzt. Geht ein Molekül ca.  $10^{-9}$  bis  $10^{-8}$  Sekunden nach der Bestrahlung wieder in seinen Grundzustand über, emittiert es Energie; diese Energie bezeichnet man als Fluoreszenz (Greiling, 1989). Bei der Fluoreszenzmessung nutzt man also die Eigenschaft von angeregten Teilchen, Licht auszusenden.

Die Intensität der im Emissionsspektrum gemessenen Fluoreszenz lässt auf die Anzahl der in der Probe befindlichen Moleküle schließen. Die Exzitationswellenlänge lag während des Versuches bei 340 nm und 385 nm, die Emissionswellenlänge war 510 nm. Die zu untersuchenden Lymphozyten wurden durch eine Xenon - Lampe angeregt, wobei die von der Xenon - Lampe ausgehende Primärstrahlung durch einen Filter (der Exzitationsfilter ließ ausschließlich Licht mit einer Wellenlänge von 340 nm und 385 nm hindurch) verändert wurde und als so genannte Exzitationsstrahlung auf die Lymphozytenprobe traf. Die angeregten Zellen wurden kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau gehoben, kehrten jedoch aufgrund der Instabilität wieder in ihren Grundzustand zurück und setzten dabei Strahlung (Fluoreszenz) frei. Diese Strahlung passierte einen Emissionsfilter (ausschließlich für Wellenlängen von 510 nm), traf danach auf einen Detektor und wurde in eine Messzahl transformiert. Die resultierenden analogen Signale wurden mittels spezieller PC-Software weiterverarbeitet.

### 2.8.1 Messung der intrazellulären Konzentration von Calcium

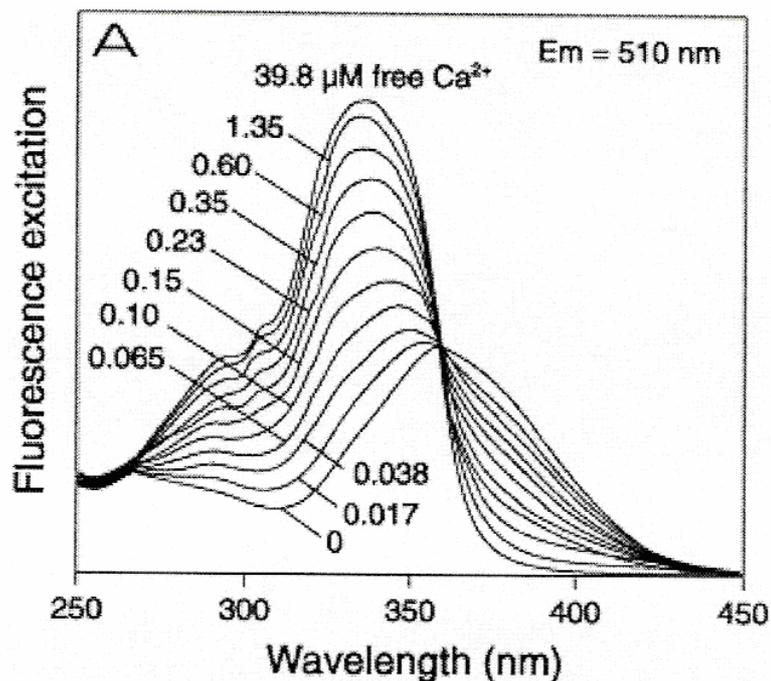
Die fluoreszenzphotometrische Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Calcium in Lymphozyten erfolgte mit Hilfe eines Calcium sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes (Gryniewicz et al., 1985). Bei dem membrangängigen Farbstoff handelte es sich um FURA 2 AM, Pentasodium Salt (1-[2-(5-Carboxyoxazol-2-yl)-6-aminobenzofuran-5-oxy]-2-(2'-amino-5'-

methylphenoxy)-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic Acid, 5Na, Calbiochem®), welcher in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst war. Die Stammlösung des Calcium sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes FURA 2 AM wurde in einer Konzentration von 1 mmol/l in DMSO angesetzt, dessen Exzitationsspektrum von der Bindung freier Calciumionen abhängig ist: Für die calciumgebundene Form von Fura 2 AM lag das Maximum des Exzitationsspektrums bei Anregung mit Licht der Wellenlänge  $\lambda_1=340$  nm, für die calciumfreie Form lag es bei  $\lambda_2=385$  nm. Mit steigender Calciumbindung nahm dieses Maximum ab, während es bei Anregung mit 340 nm zunahm. Es kam somit zu einer zunehmenden Verschiebung des Fluoreszenzmaximums zur Anregungswellenlänge 340 nm. Die maximale Emission erfolgte in beiden Fällen bei  $\lambda_E=510$  nm (**Abbildung 8**).

Die intrazelluläre Fura 2 Konzentration blieb während der Versuchsdurchführung durch Auswaschung, aktiven Transport in den Extrazellularraum und photochemischen Verfall nicht stabil. Darum wurde bei der Auswertung der Versuche die Ratio R ( $F_{340nm}/F_{385nm}$ ) der Fluoreszenzintensitäten  $F_{340nm}$  und  $F_{385nm}$  als eigentliche Messgröße betrachtet, die unabhängig von der Farbstoffkonzentration für eine bestimmte Calciumkonzentration konstant blieb. Für ein gegebenes optisches System verhielt sich der Quotient R ( $F_{340nm}/F_{385nm}$ ) proportional zur Konzentration freier Calciumionen.

Nach Ermittlung der Ratio R (Verhältnis der gemessenen Fluoreszenz - Intensitäten bei  $F_1=340$  nm (Fura 2 Calcium-Komplex) und  $F_2=385$  nm (freies Fura 2)) konnte der Maximal und Minimalwert (Absolutwerte) von  $[Ca^{2+}]_i$  abgelesen werden. Durch die Bildung des Quotienten R wurden Störungen des Fluoreszenzsignals – hervorgerufen durch Konzentrationsänderungen des Farbstoffes – durch Division der konzentrationsabhängigen Terme vermieden (Grynkiewicz et al., 1985).

Da keine Eichung an Calciumlösungen erfolgte, konnte bei der Auswertung auf die Angabe einer Einheit verzichtet werden.



**Abb. 8:** Darstellung der Fluoreszenzintensität von Fura 2 AM bei einer Emissionswellenlänge  $\lambda_E = 510$  nm in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge und verschiedenen Calciumkonzentrationen (<http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/mk-2000>).

Um die intrazelluläre Konzentration freier Calciumionen  $[Ca^{2+}]_i$  messen zu können, musste FURA 2 AM in das Innere der zu untersuchenden Zellen gebracht werden.

4 ml der Lymphozytensuspension wurden mit 10  $\mu\text{mol/l}$  FURA 2 AM versetzt und fünfzehn Minuten bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz inkubiert. Der zunächst hydrophobe, membrangängige Fura 2 Acetoxymethylester diffundierte durch die Zellmembran in das Zytosol der Lymphozyten. Nach erfolgter Diffusion des Fura 2 AM in die Zellen kam es zur hydrolytischen Spaltung der Esterbindungen durch intrazelluläre Esterasen. Der nun polarisierte Farbstoff war in dieser Form membranimpermeabel und fluoreszent. Diese Methode wird als „bulk loading“ bezeichnet (Kirischuk. & Verkhratsky, 1996). Danach erfolgte die Zentrifugation der Zellen für fünf Minuten, um den nicht in die Lymphozyten gelangten Farbstoff zu eliminieren. Die sich am Boden sammelnden Lymphozyten wurden in PBS (PBS – Dulbecco w/o  $Ca^{++}$ ,  $Mg^{++}$ , Biochrom AG®, L 1835) resuspendiert.

Die Suspension wurde in vier Quarzküvetten (Eppendorf Research, Präzisions-Küvetten aus Quarzglas, SUPRASIC®, 101-QS 10 mm) aufgeteilt und jeweils mit 10  $\mu\text{mol/l}$  PMA, 40 mU/ml

Insulin oder 250 mg/dl Glucose versetzt. Die vierte Küvette fungierte als Kontrolle. Im Fluoreszenzphotometer wurde die Fluoreszenzintensität von jeweils 1000 µl Zellsuspension gemessen. Zuerst wurde der basale Calciumwert bestimmt, gefolgt von der Messung der intrazellulären Calciumkonzentration nach Zugabe von 10 µmol/l Thapsigargin.

### **2.8.2 Messung der Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale**

Die Bestimmung freier Sauerstoffradikale wurde nach etablierter Methodik mithilfe des sensitiven Farbstoffes Lucigenin durchgeführt. Zur Superoxidanionen - Messung ( $O_2^{\cdot-}$ ) in lymphozytären Zellen war die Verwendung der Lucigenin - Chemielumineszenz- Methode etabliert. Unter Lumineszenz versteht man die optische Strahlung eines physikalischen Systems, die beim Übergang von einem angeregten Zustand in den Grundzustand entsteht. Im Falle der Chemielumineszenz erfolgt die Anregung durch eine chemische Reaktion.

Dazu stellte man eine Zellsuspension bestehend aus 2000 µl PBS und durch Zentrifugation gewonnenen Lymphozyten her. Diese wurde auf vier Eppendorfgefäße aufgeteilt und mit 10 µmol/l PMA, 40 mU/ml Insulin oder 250 mg/dl Glucose versetzt, die vierte Probe diente als Kontrolle. Nach einstündiger Inkubation im Wasserbad bei 37°C wurde die Suspension in eine Lochpalette aufgeteilt und pro Loch mit 100 µmol des Farbstoffes Lucigenin versetzt (Lucigenin-Lösung: 5mg/ml DMSO, Endkonzentration 100 µM). Lucigenin ist ein Indikator, der nach Reaktion mit ROS in einen elektronisch angeregten Zustand übergeht. Nach Rückfall der Elektronen in den Grundzustand emittiert diese Verbindung Energie in Form eines Lichtsignals (Photonen) im Bereich von 519 nm. Während Lucigenin spezifisch Superoxidradikale detektiert, reagiert der Indikator Luminol im Vergleich dazu nur unspezifisch mit Radikalen unter Emission von Licht mit 460 nm Wellenlänge. (Lee et al. 2003).

Die erzeugten Lichtsignale wurden in einem Photonenzähler (Fluoroskan, Ascent FL, Labsystems) gemessen und quantifiziert. Die Radikalmessung erfolgte für jeweils 20 Minuten vor und nach oralem Glucose-Toleranztest. Als Messwert diente das Integral der Lichtsignale innerhalb des Messungszeitraums von 20 Minuten.

## 2.9 Statistische Auswertung

Bei der Prüfung der Testergebnisse werden theoretischen Erwartungen mit Beobachtungen verglichen, um allgemeine Aussagen verfassen zu können. Da die Stichprobe nur einen kleinen Teil der Grundgesamtheit umfasst, besteht bei der Auswertung die Gefahr des Irrtums. Um diesen so wahrscheinlich wie möglich unter Kontrolle zu halten, müssen formale Richtlinien eingehalten werden.

Diese angestrebten Aussagen werden Hypothesen genannt, da man nicht sicher sagen kann, ob sie falsch oder richtig sind. Dabei werden die Annahmen so formuliert, dass sie widerlegt werden können. Man unterscheidet eine Nullhypothese von der Alternativhypothese.

Die Nullhypothese  $H_0$  geht von der Annahme aus, dass es keinen Unterschied zwischen den Stichproben gibt:

$$H_0 : x_1 = x_2$$

Dagegen geht die Alternativhypothese von einem Unterschied in den Aussagen aus:

$$H_0 : x_1 \neq x_2$$

Als Grenzwerte wurden  $\alpha < 0,05$  für den kritischen Bereich und  $\alpha < 0,001$  für den Ablehnungsbereich festgelegt. Werden diese unterschritten, wird die Nullhypothese abgelehnt. Da die Verteilungskurve des geprüften Merkmals nicht bekannt ist, wurde für den Vergleich der Werte der Stichproben ein nicht-parametrisches Prüfverfahren für unverbundene Stichproben angewandt. Dabei handelte es sich um den U – Rangtest nach Wilcoxon- Mann- Whitney.

Mit Hilfe des U-Tests von Wilcoxon- Mann- Whitney wird geprüft, ob sich die Mittelwerte von zwei unabhängigen Stichproben signifikant oder nur zufällig voneinander unterscheiden.

Die Nullhypothese  $H_0$  lautet:

$$H_0: x_1 = x_2 = x$$

Dieser Test für unabhängige Stichproben ist verteilungsunabhängig. Der Umfang der einen Stichprobe sei  $n_1$  und der anderen Stichprobe sei  $n_2$ . Man bringt die Stichprobenwerte ( $n_1+n_2$ ) in eine gemeinsame aufsteigende Rangfolge, d.h. die Daten der beiden Stichproben werden zusammengefasst ( $\Sigma = n_1 + n_2$ ) und der Größe nach geordnet. So erhält man eine gemeinsame

aufsteigende Rangordnung. Jedem Wert der Rangordnung wird anschließend eine Rangzahl zugeordnet.

Die Summe der Rangzahlen von Stichprobe 1 sei  $R_1$ , die von Stichprobe 2 sei  $R_2$ . Als Prüfgrößen wurden folgende beiden Größen verwendet:

$$U_1 = n_1 * n_2 + \frac{1}{2} * n_1 * (n_1 + 1) - R_1$$

$$U_2 = n_1 * n_2 + \frac{1}{2} * n_2 * (n_2 + 1) - R_2$$

Der kleinere Wert der beiden Prüfgrößen wird als kritischer Wert  $U$  betrachtet. Die Kontrolle der Rechnungen erfolgte mit folgender Prüfgleichung:

$$U_1 + U_2 = n_1 * n_2$$

Die Nullhypothese wurde mit der Irrtumswahrscheinlichkeit  $\alpha$  verworfen, wenn  $U$  als der niedrigere Wert von  $U_1$  und  $U_2$  kleiner oder gleich dem tabellierten kritischen Wert  $U_0(n_1, n_2, \alpha)$  war (Ramm/Hoffmann, 1990, Sachs, 1984)

Als Irrtumswahrscheinlichkeit für den Fehler 1. Art wurde  $\alpha \leq 0,05$  festgelegt.

Kontinuierliche Daten wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM aufgeführt. Die Daten wurden mit dem nicht - parametrischen Wilcoxon – Mann - Whitney-Test, dem nicht - parametrischen KRUSKAL-WALLIS-TEST, DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST oder dem parametrischen Student t -test verglichen. Ein  $p < 0,05$  im zweiseitigen Test wurde als signifikanter Unterschied gewertet.

Die Reproduzierbarkeit der Bestimmung der Reflective Indices aus der Pulswelle wurde nach der Methode von Bland - Altman geprüft. Dazu wird die prozentuale Abweichung aus zwei Messungen im Verhältnis zum Mittelwert gegen den Mittelwert aufgetragen.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels GraphPad Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA) oder SPSS für Windows (version 11.5; SPSS, Chicago, IL).