

3. Resultate

3.1 Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Reflective Index

Zunächst wurde die Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Reflective Index untersucht. Wie in **Abbildung 9** dargestellt, zeigten die Reflective Indices von zwei aufeinander folgenden Episoden bei 30 Messungen eine gute Korrelation (Pearson correlation $r^2=0,92$; $p<0,001$). Die Auftragung der Daten nach Bland - Altman ergab ebenfalls eine gute Reproduzierbarkeit für die Bestimmung des Reflective Index aus der Pulswelle (**Abbildung 10**).

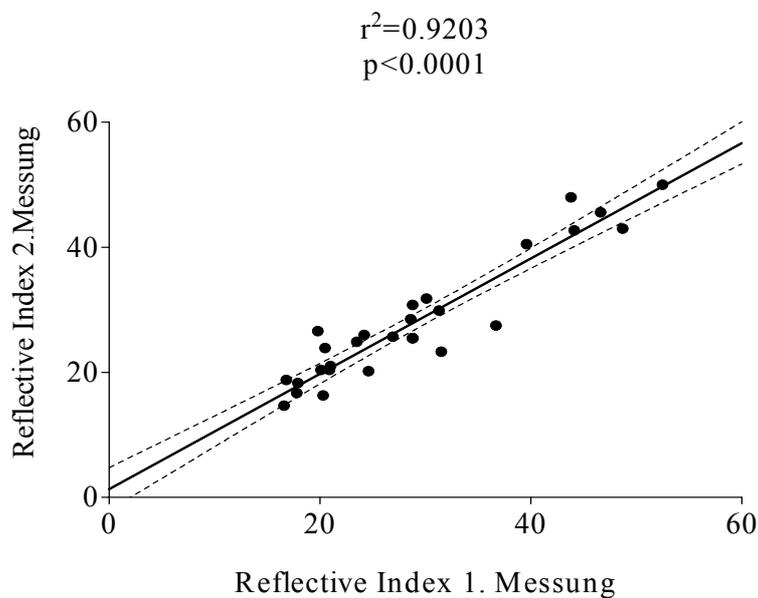


Abb. 9: Reproduzierbarkeit der Bestimmung des Reflective Index aus der Pulswelle bei Patienten mit essentieller Hypertonie. Aufgetragen sind die Reflective Indices aus zwei aufeinander folgenden Episoden (1. Messung und 2. Messung). Die Regressionsgerade, das 95% Konfidenzintervall und die Pearson correlation ist angegeben.

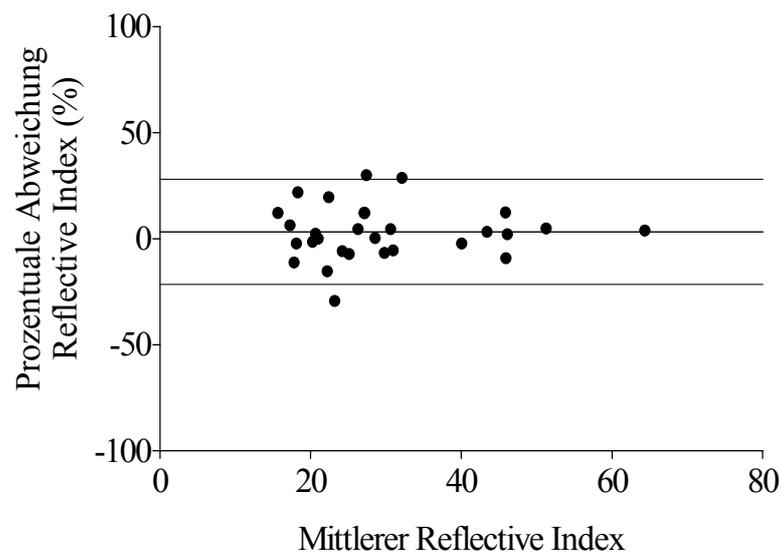


Abb. 10: Auftragung der Daten nach Bland-Altman. Die gepunkteten Linien geben das 1,96fache der Standardabweichung der prozentualen Abweichungen aus 2 Messungen wieder.

3.2 Digitale Photoplethysmographie bei Bluthochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen - Auswirkung der Pulsreflexion

Mittels nicht invasiver digitaler Photoplethysmographie wurde die Pulswelle bei gesunden und hypertensiven Personen registriert. Durch dieses Verfahren konnte die Pulswelle bei jedem Herzschlag mit einem Pulsoximeter kontinuierlich aufgezeichnet werden, ohne dass die Probanden beeinträchtigt wurden. Betrachtet wurde der diastolische Anteil der Pulswelle, der so genannte Reflective Index. Dieser wurde stets als Mittelwert aus allen Pulswellen, die innerhalb einer Episode von 150 Sekunden aufgezeichnet wurden, angegeben.

Abbildung 11 zeigt den Reflective Index für alle Pulswellen ($n=519$) bei einer gesunden Kontrollperson, die über einen Zeitraum von 7,5 Minuten aufgezeichnet worden war. Der Mittelwert des Reflective Index war $47,2 \pm 0,3$. Der Median des Reflective Index lag bei 47,3, die 25% Perzentile bei 42,1 und die 75% Perzentile bei 52,0. Der Variationskoeffizient für die Bestimmung des Reflective Index lag bei 16,1%. Im weiteren Verlauf wurde der Reflective Index immer als Mittelwert aus allen Pulswellen, die innerhalb einer Episode von 2,5 Minuten aufgezeichnet wurden, angegeben.

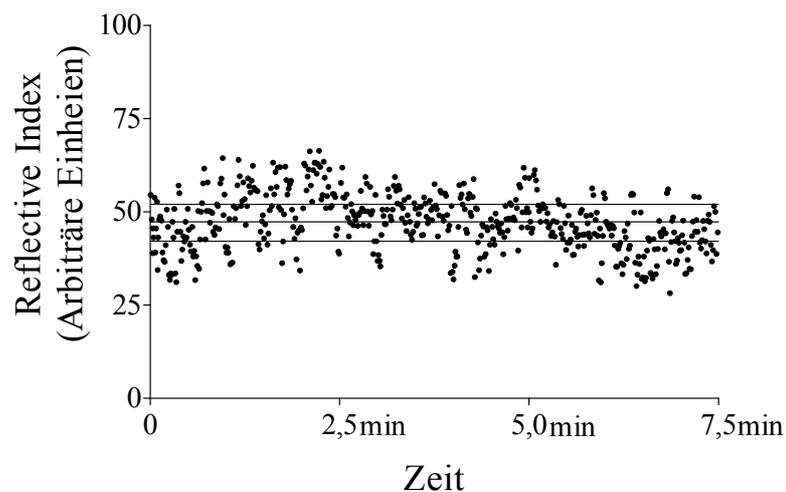


Abb. 11: Kontinuierliches Monitoring der Pulsweite durch digitale Photoplethysmographie. Dargestellt sind die Reflective Indices für alle Pulsweiten, die über einen Zeitraum von 7,5 Minuten bei einem gesunden Probanden aufgezeichnet wurden. Der Median (durchgezogene Linie), die 25% Perzentile und die 75% Perzentile (gepunktete Linien) sind angegeben.

Um den Einfluss der Pulsreflexion auf die digitale Photoplethysmographie und die Veränderungen des Reflective Index aufzuzeigen, wurden an gesunden Kontrollpersonen und Bluthochdruckpatienten ein oraler Glucose-Toleranztest und eine kurzzeitige arterielle suprasystolische Stauung mit darauf folgender reaktiver Hyperämie durchgeführt.

3.3 Veränderungen des Reflective Index vor und nach oralem Glucose-Toleranztest

Zunächst wurde bei jedem der $n=48$ Probanden ein oraler Glucose-Belastungstest (eine Flasche Dextro® O.G.-T. enthielt 300 ml Saft, entsprechend 75 g Glucose) durchgeführt. Danach erfolgte durch digitale Photoplethysmographie die Aufzeichnung der Pulswellenreflexion in der Peripherie. Anschließend wurde der Reflective Index durch ein spezielles Auswertungsprogramm bestimmt.

Abbildung 12 verdeutlicht die individuellen Veränderungen des Reflective Index bei 48 Probanden (gesunde Kontrollpersonen und Bluthochdruckpatienten, $n=48$) vor und nach oralem Glucose-Toleranztest. Im Mittel zeigte sich eine signifikante Abnahme der Pulsreflexion zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest.

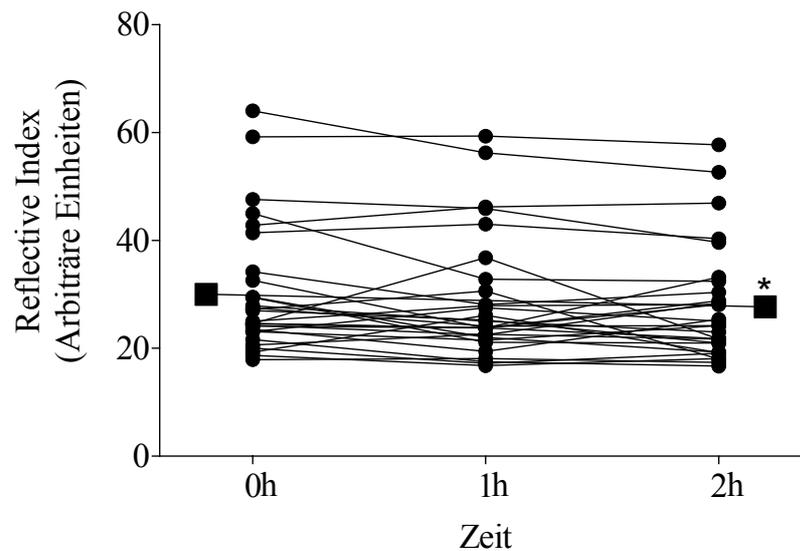


Abb. 12: Veränderung des Reflective Index vor (0h) und nach (1h und 2h) oralem Glucose-Toleranztest bei 48 Probanden. Die Mittelwerte sind durch die Vierecke dargestellt.

In **Abbildung 13** ist der Verlauf des Reflective Index vor und nach oralem Glucose-Toleranztest bzw. vor arterieller Stauung dargestellt. Im rechten Teil der Graphik sind die Patientendaten ($n=24$, Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes SEM) aufgetragen, im linken Teil die der gesunden Kontrollgruppe ($n=24$, Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes SEM). Im Folgenden werden zuerst die Messergebnisse der Patienten besprochen, danach die der normotensiven Kontrollen. Abschließend erfolgt der Vergleich beider Gruppen. Signifikante Unterschiede sind mit $*(p<0,05)$ bzw. $** (p<0,01)$ gekennzeichnet.

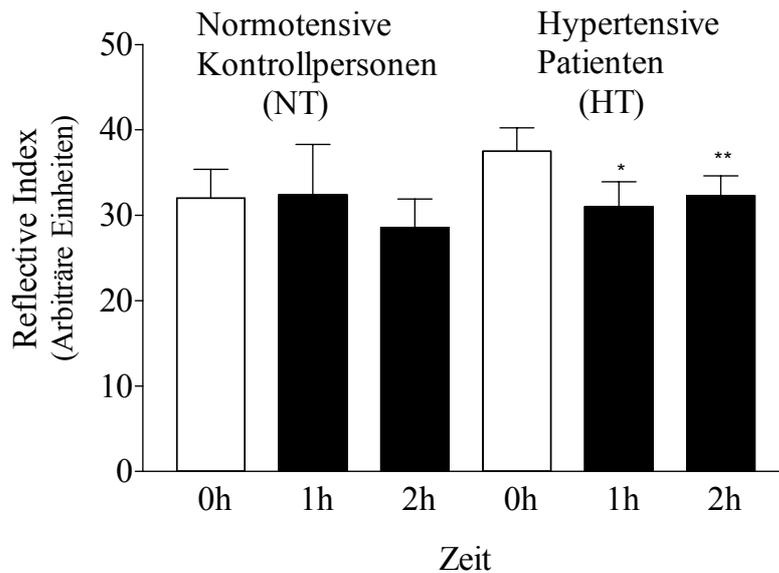


Abb. 13: Verlauf des Reflective Index bei gesunden Kontrollpersonen (NT, n=24) und Bluthochdruckpatienten (HT, n=24). Gemessen wurde der Reflective Index über einen Zeitraum von zwei Stunden dreimal: Vor (weiße Balken), eine Stunde (schwarze Balken) und zwei Stunden (schwarze Balken) nach oralem Glucose-Toleranztest.

Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

*p<0,05: Vergleich zwischen 1h und 0h (HT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

**p<0,01: Vergleich zwischen 2h und 0h (HT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

Tab. 2: Verlauf des Reflective Index vor und nach oralem Glucose-Toleranztest bei Bluthochdruckpatienten (HT, n=24) und gesunden Kontrollpersonen (NT, n=24). Gemessen wurde der Reflective Index über einen Zeitraum von zwei Stunden dreimal: Vor (0h), eine Stunde (1h), und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest.

<i>Reflective Index vor&nach OGTT</i>	<i>NT Mittelwerte ± SEM</i>	<i>HT Mittelwerte ± SEM</i>	<i>t-Test Vergleich NT&HT</i>
0h	32,0 ± 3,4	37,6 ± 2,9	p > 0,05
1h	32,4 ± 5,9	31,0 ± 3,0	p > 0,05
2h	29,4 ± 3,5	32,8 ± 2,4	p > 0,05
gesamt	31,3 ± 4,3	33,8 ± 2,8	p > 0,05
Vergleich 1h zu 0h	p > 0,05	p < 0,05	
Vergleich 2h zu 0h	p > 0,05	p < 0,01	

In **Abbildung 13** und **Tabelle 2** ist in der Patientengruppe ein signifikanter Abfall des Reflective Index von $37,6 \pm 2,9$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $31,0 \pm 3,0$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p<0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) zu erkennen. Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest sank der Reflective Index signifikant auf $32,8 \pm 2,4$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p<0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Auffällig ist der hohe 0-Stundenwert (Ausgangswert) $37,6 \pm 2,9$ (Mittelwerte \pm SEM) bei Patienten mit essentieller Hypertonie.

Dagegen kam es bei den normotensiven Probanden zu einem diskreten Anstieg des Reflective Index von $32,0 \pm 3,4$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $32,4 \pm 5,9$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest fiel der Reflective Index auf $29,4 \pm 3,5$ ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) im Vergleich zum Ausgangswert, allerdings ebenfalls nicht signifikant.

Auch wenn der Vergleich beider Gruppen keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Veränderung des Reflective Index über den Messungszeitraum von zwei Stunden ($n=48$, $p>0,05$, t-Test) erbrachte, zeigten die Patienten mit essentieller Hypertonie insgesamt höhere Reflective Indices (RI gesamt: $33,8 \pm 2,8$ Mittelwerte \pm SEM) als die gesunden Kontrollpersonen (RI gesamt: $31,3 \pm 4,3$ Mittelwerte \pm SEM) über den Messungszeitraum von zwei Stunden ($p>0,05$, t-Test).

Auffällig ist bei den Patienten mit essentieller Hypertonie der hohe Ausgangswert (Nüchternwert) mit $37,6 \pm 2,9$ (Mittelwerte \pm SEM) sowie der ebenfalls erhöhte Zweistundenwert mit $32,8 \pm 2,4$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zu den gesunden Kontrollen.

3.4 Veränderungen des Reflective Index nach arterieller Stauung am Oberarm

Mithilfe einer Blutdruckmanschette, die am Oberarm angelegt und auf einen Druck von 200 mmHg aufgepumpt wurde, untersuchten wir nun den Einfluss einer kurzen, suprasystolischen Stauung mit darauf folgender maximaler Weitstellung der Gefäße (reaktive Hyperämie) auf die Pulsreflexion im Rahmen oraler Zuckerbelastung (OGTT).

Abbildung 14 und **Tabelle 3** geben den Verlauf des Reflective Index nach kurzem arteriellem Stau und reaktiver Hyperämie unter oraler Glucosebelastung bei hypertensiven und normotensiven Probanden wider.

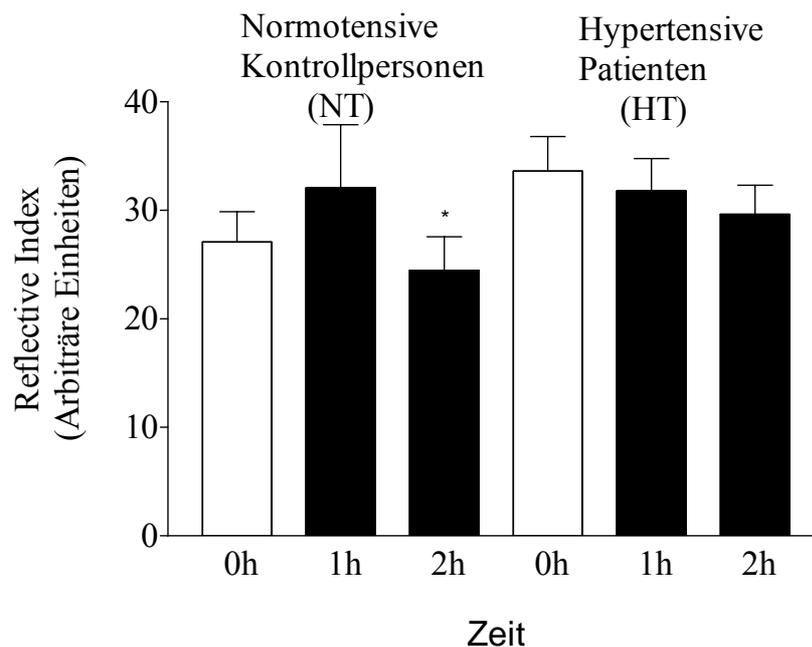


Abb. 14: Verlauf des Reflective Index nach arterieller Stauung bei Bluthochdruckpatienten (HT, n=24) und gesunden Kontrollpersonen (NT, n=24). Gemessen wurde der Reflective Index über einen Zeitraum von zwei Stunden dreimal: Vor (weiße Balken), eine Stunde (schwarze Balken) und zwei Stunden (schwarze Balken) nach oralem Glucose-Toleranztest.

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

* $p < 0,05$: Vergleich zwischen 2h und 0h (NT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

Tab. 3: Verlauf des Reflective Index nach arterieller Stauung bei Bluthochdruckpatienten (HT, n=24) und gesunden Kontrollpersonen (NT, n=24). Gemessen wurde der Reflective Index über einen Zeitraum von zwei Stunden dreimal: Vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest.

<i>Reflective Index nach Stau</i>	NT Mittelwerte ± SEM	HT Mittelwerte ± SEM	t-Test Vergleich NT&HT
0h	27,1 ± 2,8	33,6 ± 3,2	p > 0,05
1h	32,0 ± 5,8	31,8 ± 3,0	p > 0,05
2h	24,5 ± 3,1	29,6 ± 2,7	p > 0,05
gesamt	27,9 ± 3,9	31,7 ± 3,0	p > 0,05
Vergleich 1h zu 0h	p > 0,05	p > 0,05	
Vergleich 2h zu 0h	p < 0,05	p > 0,05	

Ähnlich wie im Versuch zuvor fiel der Reflective Index in der Patientengruppe von $33,6 \pm 3,2$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $31,8 \pm 3,0$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest, allerdings war der Abfall hier nicht signifikant (n=24, p>0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest sank der Reflective Index auf $29,6 \pm 2,7$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, p>0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), ohne Signifikanzen aufzuweisen.

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den gesunden Kontrollpersonen ein Anstieg des Reflective Index von $27,1 \pm 2,8$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $32,0 \pm 5,8$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, p>0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest kam es zu einem signifikanten Abfall des Reflective Index auf $24,5 \pm 3,1$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, p<0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Beim Vergleich beider Gruppen ließen sich keine signifikanten Unterschiede in der Veränderung des Reflective Index über den Messungszeitraum von zwei Stunden feststellen (n=48, p>0,05, t-Test).

Interessant aber ist auch hier die Tatsache, dass ähnlich wie im vorangegangenen Versuch unter alleiniger Glucosebelastung bei den Patienten mit essentieller Hypertonie erneut ein insgesamt höherer Reflective Index (RI gesamt: $31,7 \pm 3,0$ Mittelwerte \pm SEM) als bei der gesunden Kontrollgruppe (RI gesamt: $27,9 \pm 3,9$) über den Messungszeitraum von zwei Stunden zu verzeichnen war (n=48, p>0,05, t-Test).

Im Unterschied zur Kontrollgruppe reagierten die Patienten wiederholt mit einer deutlich erhöhten Pulswellenreflexion noch vor oralem Glucose-Toleranztest ($33,6 \pm 3,2$ Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Nullstundenwert der Kontrollgruppe mit $27,1 \pm 2,8$ (Mittelwerte \pm SEM).

Der auffallend verzögerte Abfall des Reflective Index eine Stunde ($31,8 \pm 3,0$ Mittelwerte \pm SEM) und zwei Stunden ($29,6 \pm 2,7$ Mittelwerte \pm SEM) nach oralem Glucose-Toleranztest in der Patientengruppe steht dem raschen Anstieg der Pulsreflexion in der Kontrollgruppe nach einer Stunde ($32,0 \pm 5,8$ Mittelwerte \pm SEM) und dem folgenden signifikanten Abfall nach zwei Stunden ($24,5 \pm 3,1$ Mittelwerte \pm SEM, $p < 0,05$) entgegen.

3.5 Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf die intrazelluläre Calciumkonzentration

Einen weiteren Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildete die Untersuchung der Calciumhomöostase in humanen Blutzellen nach Stimulation mit verschiedenen Reagenzien (PMA, Insulin, Glucose und Thapsigargin) im Rahmen des oralen Glucose-Toleranztests.

Untersucht wurden Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie, zum Vergleich wurden Zellen von gesunden Kontrollpersonen herangezogen.

Wie in der Literatur beschrieben (Karow & Lang, 2003) existiert ein direkter Zusammenhang zwischen essentieller Hypertonie, Dyslipoproteinämie, stammbetonter Adipositas, Insulinresistenz und Glucosetoleranzstörung; das gemeinsame Auftreten dieser Krankheitsbilder wird als Metabolisches Syndrom (Synonym: „Wohlstandssyndrom“) beschrieben. Um einen möglichen Zusammenhang zwischen Glucoseintoleranz, Insulinresistenz, essentieller Hypertonie und veränderter intrazellulärer Calciumkonzentration aufzuzeigen, wurden unter oraler Glucosebelastung in vitro 250 mg/dl Glucose, 40 mU/ml Insulin und 10 μ mol/l PMA verabreicht.

Parallel wurde der Effekt von Glucose, Insulin und PMA unter oraler Zuckerbelastung (OGTT) auf den Thapsigargin - induzierten intrazellulären Calciumanstieg untersucht.

Die fluoreszenzphotometrische Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Calcium in Lymphozyten erfolgte mit Hilfe eines Calcium - sensitiven Fluoreszenzfarbstoffes. Bei dem membrangängigen Farbstoff handelte es sich um FURA 2 AM, Pentasodium Salt, dessen Exzitationsspektrum von der Bindung freier Calciumionen abhängig ist. Für die calciumgebundene Form von Fura 2 lag das Maximum des Exzitationsspektrums bei $\lambda_1=340$ nm,

für die calciumfreie Form lag es bei $\lambda_2=385$ nm. Die maximale Emission erfolgte in beiden Fällen bei $\lambda_E=510$ nm. Als eigentliche Messgrößen dienten die Fluoreszenzintensitäten F_1 und F_2 , die bei Anregung mit den Wellenlängen λ_1 und λ_2 emittiert wurden. Für ein gegebenes optisches System verhielt sich der Quotient $R=F_1/F_2$ proportional zur Konzentration freier Calciumionen. 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. Der Farbstoff diffundierte durch die Zellmembran in das Zytosol der Lymphozyten. Der durch intrazelluläre Spaltung von Esterbindungen polarisierte Farbstoff war in dieser Form membranimpermeabel und fluoreszent. 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 resuspendiert. Die Suspension wurde in vier Quarzküvetten aufgeteilt und 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 $\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin.

(A) Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf den Calcium-Basalwert

Zunächst wurden die basalen Calciumkonzentrationen $[Ca^{2+}]_i$ basal in Lymphozyten bei Bluthochdruckpatienten und gesunden Kontrollpersonen bestimmt.

Bei der basalen Calciumkonzentration handelte es sich um jene Anzahl von intrazellulären Calciumionen, die **vor** Zugabe von Thapsigargin floureszenzphotometrisch ermittelt wurde (**Abbildung 15**).

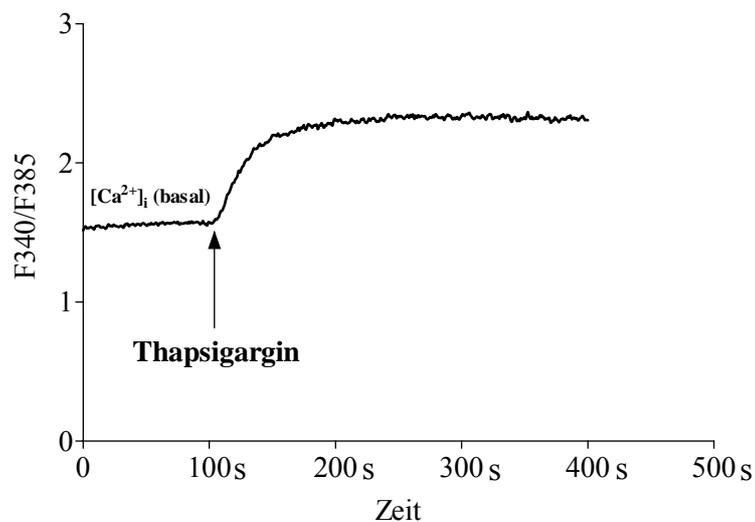


Abb. 15: Fluoreszenzphotometrische Darstellung der basalen intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ basal in Lymphozyten bei einer gesunden Kontrollperson vor und nach Stimulation mit Thapsigargin.

In **Abbildung 16** und **Tabelle 4** sind die basalen Calciumkonzentrationen vor und nach oraler Glucosebelastung (Kontrolle) bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie (HT) und normotensiven Kontrollpersonen (NT) dargestellt.

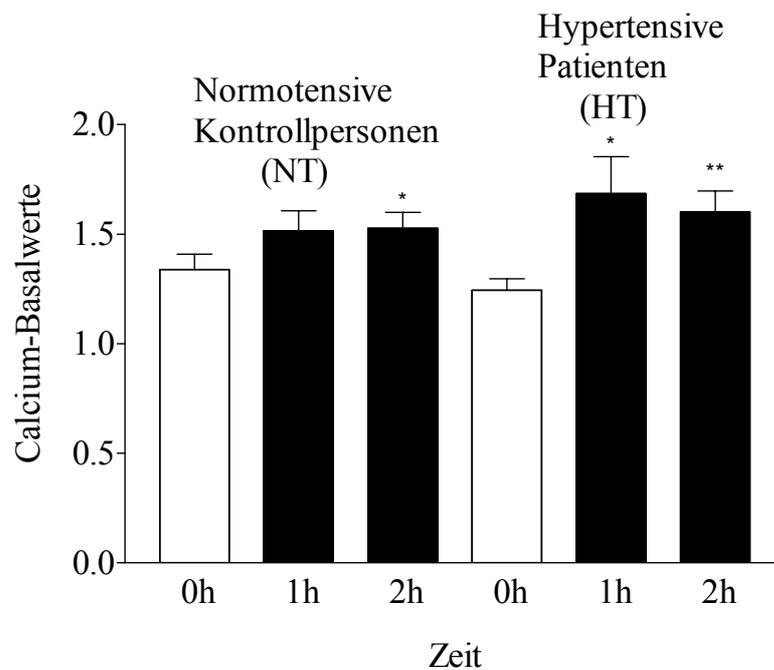


Abb. 16: Veränderung der Calcium-Basalwerte (Kontrolle) vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

* $p < 0,05$: Vergleich zwischen 2h und 0h (NT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

* $p < 0,05$: Vergleich zwischen 1h und 0h (HT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

** $p < 0,01$: Vergleich zwischen 2h und 0h (HT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

Tab. 4: Darstellung der Calcium-Basalwerte (Kontrolle) vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24).

Calcium-Basalwerte (Kontrolle)	NT Mittelwerte ± SEM	HT Mittelwerte ± SEM	t-Test Vergleich NT&HT
0h	1,34 ± 0,1	1,24 ± 0,1	> 0,05
1h	1,52 ± 0,1	1,69 ± 0,2	> 0,05
2h	1,53 ± 0,1	1,60 ± 0,1	> 0,05
gesamt	1,46 ± 0,1	1,51 ± 0,1	> 0,05
Vergleich 1h zu 0h	> 0,05	< 0,05	
Vergleich 2h zu 0h	< 0,05	< 0,01	

Aus **Abbildung 16** und **Tabelle 4** kann man erkennen, dass es in der Gruppe der Bluthochdruckpatienten zu einem signifikanten Anstieg der basalen Calciumkonzentration von $1,24 \pm 0,1$ (Mittelwerte ± SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,69 \pm 0,2$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p < 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) kam.

Auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest zeigte sich ein signifikanter Anstieg von $[Ca^{2+}]_{i\text{ basal}}$ auf $1,60 \pm 0,1$ (Mittelwerte ± SEM) im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, $p < 0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Im Vergleich dazu konnte in der gesunden Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg der basalen Calciumkonzentration von $1,34 \pm 0,1$ (Mittelwerte ± SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,53 \pm 0,1$ (Mittelwerte ± SEM) zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest gemessen werden (n=24, $p < 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Der Einstundenwert war mit $1,52 \pm 0,1$ (Mittelwerte ± SEM) ebenfalls deutlich höher als der Ausgangswert $1,34 \pm 0,1$ (Mittelwerte ± SEM) der intrazellulären Calciumkonzentration, jedoch nicht signifikant unterschiedlich (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Der Vergleich der Patientengruppe mit der gesunden Kontrollgruppe mittels t-Test allerdings ergab keine signifikanten Unterschiede in der Veränderung der basalen Calciumkonzentration ($p > 0,05$, t-Test).

Auffallend ist aber der vergleichsweise starke Calciumanstieg in der Patientengruppe eine Stunde nach OGTT ($1,69 \pm 0,2$ Mittelwerte ± SEM, n=24, $p < 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), wogegen der Anstieg in der

Kontrollgruppe deutlich geringer ausgeprägt war ($1,52 \pm 0,1$ Mittelwerte \pm SEM, $n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Dagegen wiesen die Kontrollen durchschnittlich höhere basale Calciumkonzentrationen vor oralem Glucose-Toleranztest mit $1,34 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM) als die Gruppe der Bluthochdruckpatienten mit $1,24 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM, $p>0,05$, t-Test).

Über den Messungszeitraum von zwei Stunden zeigte sich bei den Patienten mit essentieller Hypertonie interessanterweise eine insgesamt höhere basale Calciumkonzentration von $1,51 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM) als bei der gesunden Kontrollgruppe mit $1,46 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM), die jedoch nicht signifikant unterschiedlich war ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Als nächstes erfolgte die in – vitro - Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ PMA.

Abbildung 17 und **Tabelle 5** zeigen die Veränderung der intrazellulären basalen Calciumkonzentration unter PMA - Stimulation und oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie und gesunden Kontrollen.

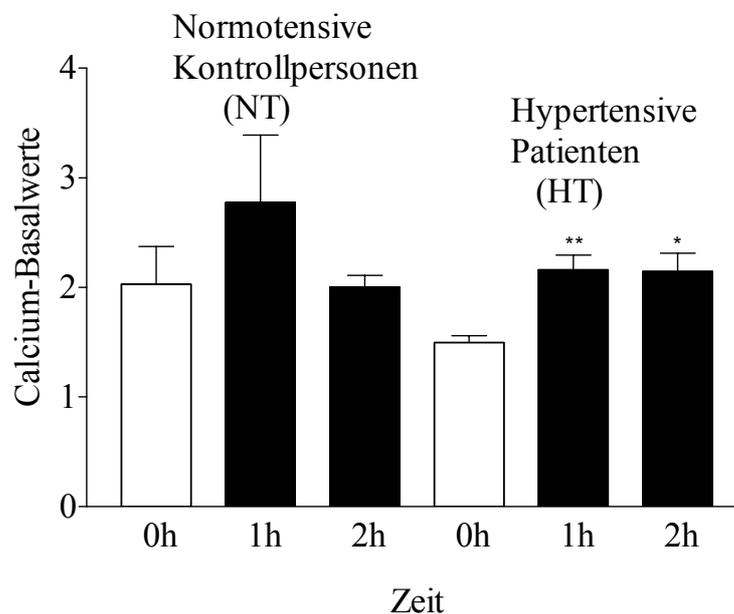


Abb. 17: Veränderung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von $10 \mu\text{mol/l}$ PMA vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, $n=24$) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, $n=24$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

* $p < 0,05$: Vergleich zwischen 2h und 0h (HT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

** $p < 0,01$: Vergleich zwischen 1h und 1h (HT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

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 bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, $n=24$) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, $n=24$).

Calcium-Basalwerte (PMA)	NT Mittelwerte \pm SEM	HT Mittelwerte \pm SEM	t-Test Vergleich NT&HT
0h	2,03 \pm 0,3	1,49 \pm 0,1	$p > 0,05$
1h	2,77 \pm 0,6	2,16 \pm 0,1	$p > 0,05$
2h	2,0 \pm 0,1	2,14 \pm 0,2	$p > 0,05$
gesamt	2,27 \pm 0,3	1,93 \pm 0,1	$p > 0,05$
Vergleich 1h zu 0h	$p > 0,05$	$p < 0,01$	
Vergleich 2h zu 0h	$p > 0,05$	$p < 0,05$	

In der Patientengruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der basalen Calciumkonzentration von 1,49 \pm 0,1 (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf 2,16 \pm 0,1 (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p < 0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest stieg $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$ ebenfalls signifikant auf 2,14 \pm 0,2 (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p < 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Auch in der Gruppe der gesunden Kontrollpersonen zeigte sich ein PMA - induzierter Anstieg der basalen Calciumkonzentration von 2,03 \pm 0,3 (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf 2,77 \pm 0,6 (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest jedoch ohne Signifikanz ($n=24$, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest sank $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{basal}}$ auf 2,0 \pm 0,1 (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Der Vergleich der Patientengruppe mit der gesunden Kontrollgruppe ergab keine signifikanten Unterschiede in der Veränderung der basalen Calciumkonzentration über den Messungszeitraum von zwei Stunden ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Im Unterschied zu der vorausgegangenen Messung ohne PMA zeigte sich bei den Patienten mit essentieller Hypertonie eine insgesamt niedrigere basale Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_{i\text{ basal}}$ -gesamt: $19,3 \pm 0,1$, Mittelwerte \pm SEM) als bei den normotensiven Studienteilnehmern ($[Ca^{2+}]_{i\text{ basal}}$ -gesamt: $2,27 \pm 0,3$) über den Messungszeitraum von zwei Stunden ($n=48$, $p>0,05$, t-Test)

Markant waren in beiden Gruppen die deutlichen Anstiege des Calciums eine Stunde nach oraler Glucosebelastung.

Während in der Patientengruppe die basale Calciumkonzentration auch zwei Stunden nach OGTT nur geringfügig sank, kam es in der Kontrollgruppe zu einem deutlichen Abfall des basalen Calciums, der allerdings zur Patientengruppe nicht signifikant verschieden war ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Als Nächstes erfolgte die in – vitro – Zugabe von 250 mg/dl Glucose bei Patienten mit essentieller Hypertonie und gesunden Kontrollen.

Abbildung 18 und zeigt die Veränderung der basalen Calciumkonzentration nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose und unter oraler Glucosebelastung bei Lymphozyten von Bluthochdruckpatienten und normotensiven Kontrollpersonen.

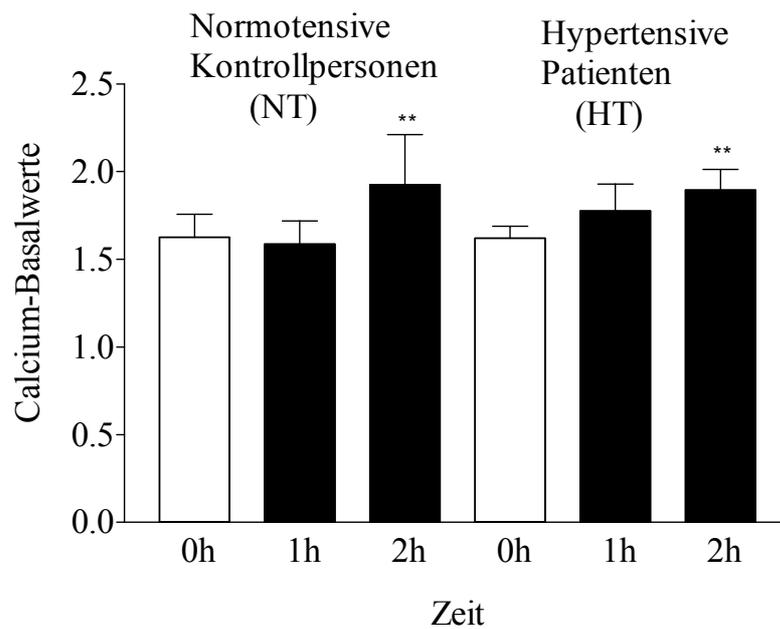


Abb. 18: Veränderung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24) Dargestellt sind die Mittelwerte ± Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).
 p**<0,01: Vergleich zwischen 2h und 0h (NT und HT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

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 bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24).

Calcium-Basalwerte (Glucose)	NT Mittelwerte ± SEM	HT Mittelwerte ± SEM	t-Test Vergleich NT&HT
0h	1,63 ± 0,1	1,62 ± 0,1	p > 0,05
1h	1,59 ± 0,1	1,78 ± 0,2	p > 0,05
2h	1,93 ± 0,3	1,92 ± 0,1	p > 0,05
gesamt	1,72 ± 0,2	1,77 ± 0,1	p > 0,05
Vergleich 1h zu 0h	p > 0,05	p > 0,05	
Vergleich 2h zu 0h	p < 0,01	p < 0,01	

Die Stimulation der Lymphozyten mit 250 mg/dl Glucose führte bei den Probanden mit essentieller Hypertonie zu einem Anstieg des basalen Calciums von 1,62 ± 0,1 (Mittelwerte ±

SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,78 \pm 0,2$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest schließlich kam es zu einem signifikanten Anstieg der basalen Calciumkonzentration auf $1,92 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p<0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

In der Kontrollgruppe dagegen führte die Vorgabe von 250 mg/dl Glucose zu einem Abfall der basalen Calciumkonzentration von $1,63 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,59 \pm 0,1$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest aber kam es ähnlich wie in der Patientengruppe zu einem signifikanten Anstieg der basalen Calciumkonzentration von $1,63 \pm 0,1$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,93 \pm 0,3$ ($n=24$, $p<0,01$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Der Vergleich beider Probandengruppen miteinander ergab allerdings keine signifikanten Unterschiede in der Veränderung der basalen Calciumkonzentration über den Messungszeitraum von zwei Stunden ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Unter Stimulation mit 250 mg/dl Glucose war bei Patienten mit essentieller Hypertonie eine insgesamt höhere basale Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$ basal-gesamt: $1,77 \pm 0,1$ Mittelwerte \pm SEM) als bei den gesunden Kontrollen ($[Ca^{2+}]_i$ basal-gesamt: $1,72 \pm 0,2$, Mittelwerte \pm SEM) über den Messungszeitraum von zwei Stunden zu beobachten ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Zuletzt wurden Proben der extrahierten Blutzellen mit 40 mU/ml Insulin versetzt. In **Abbildung 19** und **Tabelle 7** sind die Veränderungen der basalen Calciumkonzentration nach in – vitro - Stimulation mit Insulin und unter oraler Glucosebelastung bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten und normotensiven Kontrollen dargestellt.

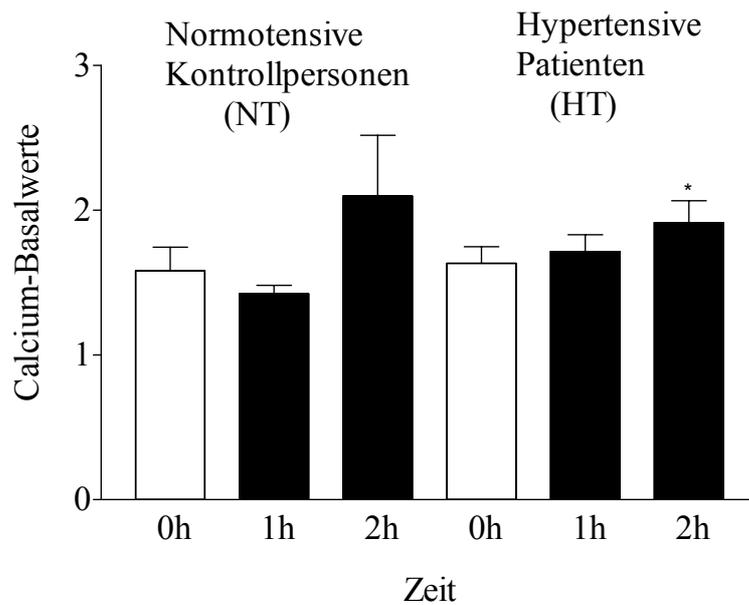


Abb. 19: Veränderung der Calcium-Basalwerte nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

p* < 0,05: Vergleich zwischen 2h und 0h (HT) mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST

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 bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24).

Calcium-Basalwerte (Insulin)	NT Mittelwerte ± SEM	HT Mittelwerte ± SEM	t-Test Vergleich NT&HT
0h	1,58 ± 0,2	1,63 ± 0,1	p > 0,05
1h	1,42 ± 0,1	1,71 ± 0,1	p > 0,05
2h	2,10 ± 0,4	1,91 ± 1,2	p > 0,05
gesamt	1,7 ± 0,2	1,8 ± 0,5	p > 0,05
Vergleich 1h zu 0h	p > 0,05	p > 0,05	
Vergleich 2h zu 0h	p > 0,05	p < 0,05	

In der Patientengruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg des intrazellulären Calciums auf $1,91 \pm 1,2$ (Mittelwerte ± SEM) zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest im Vergleich zum Ausgangswert von $1,63 \pm 0,1$ vor oralem Glucose-Toleranztest (n=24, p<0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest und Insulinstimulation konnte ebenfalls ein Anstieg der basalen Calciumkonzentration auf $1,71 \pm 0,1$ (Mittelwerte ± SEM) gemessen werden, dieser unterschied sich jedoch nicht signifikant vom Ausgangswert (n=24, p>0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den gesunden Teilnehmern ein Abfall der basalen Calciumkonzentration von $1,58 \pm 0,2$ oralem Glucose-Toleranztest (Mittelwerte ± SEM) auf $1,42 \pm 0,1$ (Mittelwerte ± SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest und Insulin – Stimulation (n=24, p>0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest und Insulin – Zugabe wiederum stieg $[Ca^{2+}]_i$ basal auf $2,10 \pm 0,4$, allerdings nicht signifikant (n=24, p>0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Beim Vergleich beider Gruppen jedoch konnten keine signifikanten Unterschiede in der Veränderung der basalen Calciumkonzentration festgestellt werden (n=48, p>0,05, t-Test).

Auffallend aber ist auch hier die insgesamt höhere basale Calciumkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$ basal-gesamt: $1,8 \pm 0,5$ Mittelwerte ± SEM) bei Patienten mit essentieller Hypertonie im Unterschied zu den normotonen Probanden ($[Ca^{2+}]_i$ basal-gesamt: $1,7 \pm 0,2$) über den Messungszeitraum von zwei Stunden (p>0,05, t-Test).

(B) Effekt des oralen Glucose-Toleranztests auf den Thapsigargin – stimulierten Calciumwert

Nach der Messung der basalen intrazellulären Calciumkonzentration wurde nun durch Stimulation von Lymphozyten bei primär hypertensiven und normotensiven Probanden mit 10 $\mu\text{mol/l}$ Thapsigargin die so genannte Delta-Calciumkonzentration ($\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$) bestimmt. Dieser Wert setzt sich zusammen aus der intrazellulären Calciumkonzentration **nach** Zugabe von Thapsigargin (Endwert) minus der intrazellulären Calciumkonzentration **vor** Zugabe von Thapsigargin (Basalwert) \pm der Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

Wie in der Literatur beschrieben erhöht die Substanz Thapsigargin durch spezifische Hemmung der Ca^{2+} -ATPase (SERCA) die intrazelluläre Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$, was zu erhöhter Kontraktilität an glatter Gefäßmuskulatur führt (Tepel et al., 1994).

Im Folgenden wurde der Thapsigargin – induzierte intrazelluläre Calciumanstieg in Lymphozyten unter oraler Glucosebelastung sowie nach Stimulation mit PMA, Insulin oder Glucose bei hypertensiven und normotensiven Studienteilnehmern untersucht.

Abbildung 20 zeigt die Veränderungen der Thapsigargin - stimulierten intrazellulären Calciumkonzentration unter oraler Glucosebelastung bei Lymphozyten von Bluthochdruckpatienten und gesunden Kontrollen.

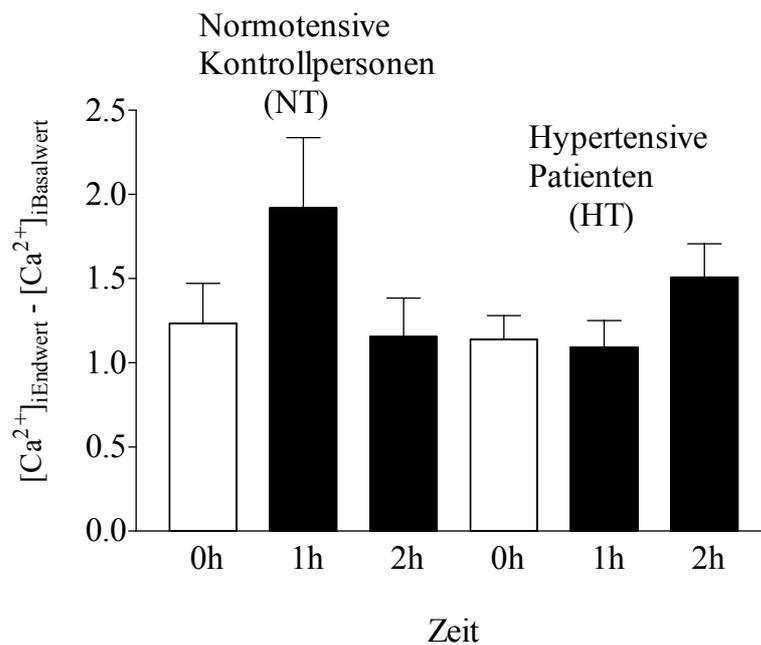


Abb. 20: Darstellung der Thapsigargin - stimulierten Calciumwerte (Kontrolle) vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie zeigte sich ein durchschnittlicher Abfall der Delta-Calciumkonzentration von $1,14 \pm 0,1$ (Mittelwert \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,09 \pm 0,2$ (Mittelwert \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest stieg $\Delta[Ca^{2+}]_i$ auf $1,51 \pm 0,2$ (Mittelwert \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Im Gegensatz dazu kam es in der normotensiven Kontrollgruppe zu einem Anstieg der Delta-Calciumkonzentration von durchschnittlich $1,23 \pm 0,2$ (Mittelwert \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,92 \pm 0,4$ (Mittelwert \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest fiel $\Delta[Ca^{2+}]_i$ auf $1,16 \pm 0,2$ (Mittelwert \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Der Vergleich der Calciumwerte beider Untersuchungsgruppen zu den vorgegebenen Zeitpunkten (0h, 1h, 2h) mithilfe des t-Tests zeigte keinerlei signifikante Unterschiede zwischen hypertensiven und normotensiven Probanden ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Aus **Abbildung 21** lassen sich die Thapsigargin - stimulierten Calciumkonzentrationen nach Zugabe des Proteinkinase C - Aktivators Phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie und gesunden Kontrollpersonen unter oraler Glucosebelastung entnehmen.

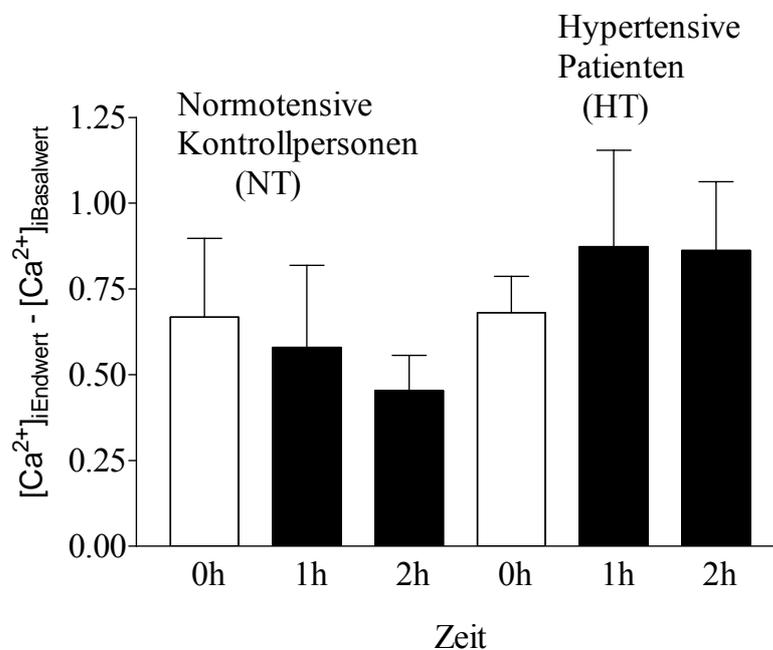


Abb. 21: Darstellung der Delta-Calciumwerte nach Vorgabe von 10 $\mu\text{mol/l}$ PMA vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, $n=24$) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, $n=24$). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

In der Gruppe der Bluthochdruckpatienten kam es zu einem leichten Anstieg der Thapsigargin - stimulierten Calciumkonzentration von $0,68 \pm 0,1$ (Mittelwert \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $0,87 \pm 0,1$ (Mittelwert \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest

(n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest stieg $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ auf $0,86 \pm 0,2$ (Mittelwert \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Im Unterschied dazu kam es bei den gesunden Kontrollpersonen zu einem Abfall der Thapsigargin - stimulierten Calciumkonzentration von $0,67 \pm 0,2$ (Mittelwert \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $0,58 \pm 0,2$ (Mittelwert \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest. Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest sank $\Delta[\text{Ca}^{2+}]_i$ erneut auf $0,45 \pm 0,1$ (Mittelwert \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Auch wenn der Vergleich beider Teilnehmergruppen nicht signifikant verschieden war (n=48, $p > 0,05$, t-Test), so fällt doch ein kontinuierlicher Abfall der Calciumkonzentration in der gesunden Teilnehmergruppe über den Messungszeitraum von zwei Stunden auf. Dagegen stieg das intrazelluläre Calcium in der Patientengruppe unter Thapsigargin und PMA nach einer Stunde deutlich an und blieb auch nach zwei Stunden auf diesem Niveau.

Bei Patienten mit essentieller Hypertonie zeigte sich somit eine vermehrte intrazelluläre Calciumfreisetzung unter PMA und Thapsigargin, wogegen die Calciumfreisetzung in der Kontrollgruppe vermindert war.

Abbildung 22 stellt die Thapsigargin - stimulierten Calciumkonzentrationen nach Zugabe von 250 mg/dl Glucose bei Lymphozyten von hypertensiven und normotensiven Personen unter oraler Glucosebelastung dar.

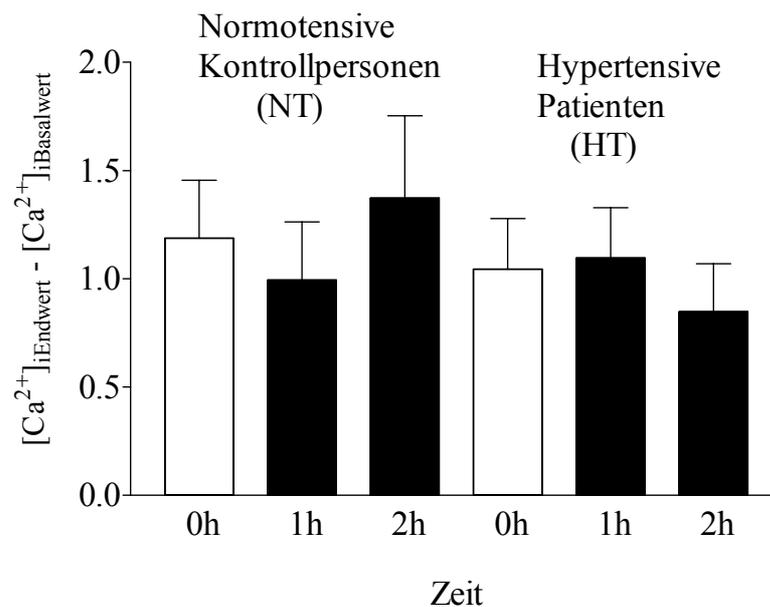


Abb. 22: Darstellung der Delta - Calciumwerte nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

Aus der in – vitro - Gabe von 250 mg/dl Glucose resultierte bei den Patienten mit essentieller Hypertonie ein Anstieg der Thapsigargin - stimulierten Calciumkonzentrationen von $1,04 \pm 0,2$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,10 \pm 0,2$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest fiel $\Delta[Ca^{2+}]_i$ auf $0,85 \pm 0,2$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Im Gegensatz dazu sank die Delta-Calciumkonzentration in der gesunden Kontrollgruppe von $1,19 \pm 0,3$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $0,99 \pm 0,3$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zwei Stunden nach oralem Glucosebelastungstest stieg die Thapsigargin - stimulierte Calciumkonzentrationen auf $1,37 \pm 0,4$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert

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

Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den zu untersuchenden Gruppen festgestellt werden (n=48, p>0,05, t-Test).

Abbildung 23 zeigt die Thapsigargin - stimulierten Calciumkonzentrationen nach in – vitro - Gabe von 40 mU/ml Insulin bei Lymphozyten von normotensiven und hypertensiven Studienteilnehmern unter oraler Glucosebelastung.

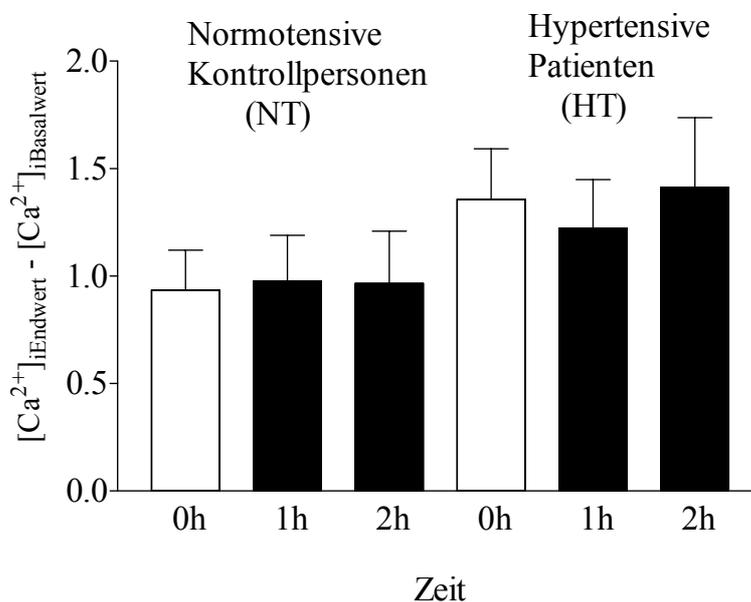


Abb. 23: Darstellung der Delta-Calciumwerte nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24). Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

In der Gruppe der Patienten mit essentieller Hypertonie führte die in – vitro - Gabe von 40 mU/ml Insulin zu einem durchschnittlichen Abfall der Delta-Calciumkonzentration von $1,36 \pm 0,2$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,22 \pm 0,2$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, p>0,05 mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Zwei Stunden nach oralem Glucose-

Toleranztest stieg $\Delta[Ca^{2+}]_i$ auf $1,41 \pm 0,3$ im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

In der Kontrollgruppe dagegen zeigte sich ein diskreter Anstieg der Delta-Calciumkonzentration von $0,93 \pm 0,2$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $0,98 \pm 0,2$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest und Insulin – Stimulation ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest stieg $\Delta[Ca^{2+}]_i$ auf $0,97 \pm 0,2$ (Mittelwerte \pm SEM) im Vergleich zum Ausgangswert ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Der Vergleich beider Gruppen war nicht signifikant verschieden ($p>0,05$, t-Test).

Trotz fehlender signifikanter Unterschiede konnte man bei Patienten mit essentieller Hypertonie unter 40 mU/ml Insulin und 10 μ mol/l Thapsigargin erhöhte intrazelluläre Calciumspiegel feststellen, wogegen bei gesunden Personen kaum Veränderungen im vorgegebenen Zeitraum ersichtlich waren.

In den folgenden Abbildungen sind die individuellen Veränderungen der intrazellulären Calciumkonzentration ($\Delta[Ca^{2+}]_i$) nach Stimulation mit Thapsigargin jeweils eines Patienten mit essentieller Hypertonie und einer Kontrollperson gegenübergestellt.

Abbildung 24 zeigt die Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ bei Lymphozyten von hypertensiven und normotensiven Probanden (Kontrolle).

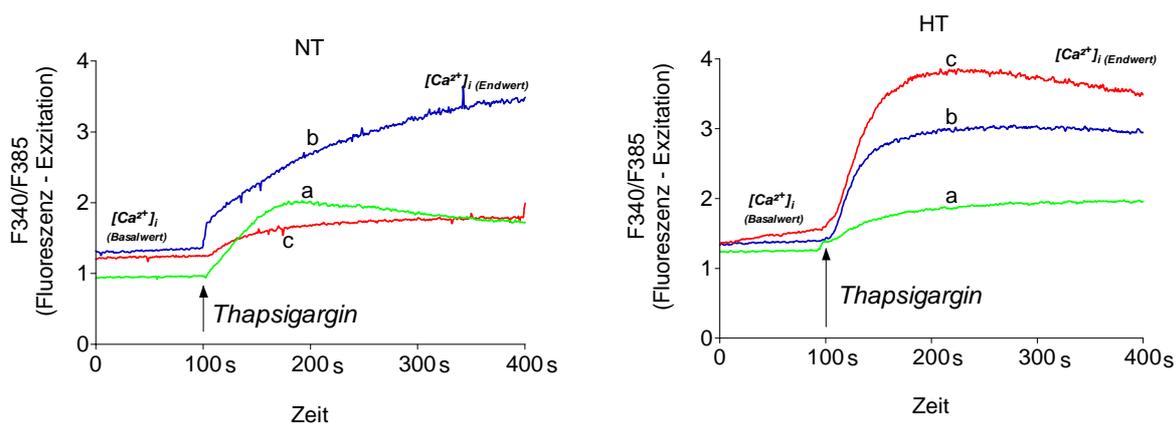


Abb. 24: Fluoreszenzphotometrische Darstellung der Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ in Lymphozyten (Kontrolle) bei einem Bluthochdruckpatienten (HT, rechte Abbildung) und einer gesunden Kontrollperson (NT, linke Abbildung).

Der Pfeil markiert die Zugabe von Thapsigargin vor (a), eine Stunde (b) und zwei Stunden (c) nach oralem Glucose-Toleranztest. Dargestellt ist die Ratio der Fluoreszenz - Intensitäten bei $F_1=340$ nm (Fura-2-Calcium-Komplex) und $F_2=385$ nm (freies Fura-2)

$[Ca^{2+}]_i$ Endwert minus $[Ca^{2+}]_i$ Basalwert = Delta-Calciumkonzentration \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM)

Bei dem Patient mit primärer Hypertonie kam zu einem Anstieg des Delta-Calciumwertes von $0,71 \pm 0,5$ vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,54 \pm 0,9$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Nach zwei Stunden war $\Delta[Ca^{2+}]_i$ mit $1,72 \pm 0,8$ am höchsten, jedoch ohne Signifikanz aufzuweisen.

Im Vergleich dazu zeigte sich bei der gesunden Kontrollperson ebenfalls ein Anstieg der Delta-Calciumkonzentration von $0,76 \pm 0,7$ vor oralem Glucose-Toleranztest auf $2,13 \pm 1,2$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest, der jedoch nicht signifikant war ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest fiel $\Delta[Ca^{2+}]_i$ auf $0,56 \pm 0,7$ ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Die Vorgabe von 40 mU/ml Insulin führte in den Zellen beider Probanden zu einem verminderten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration nach Zugabe von Thapsigargin. **(Abbildung 25).**

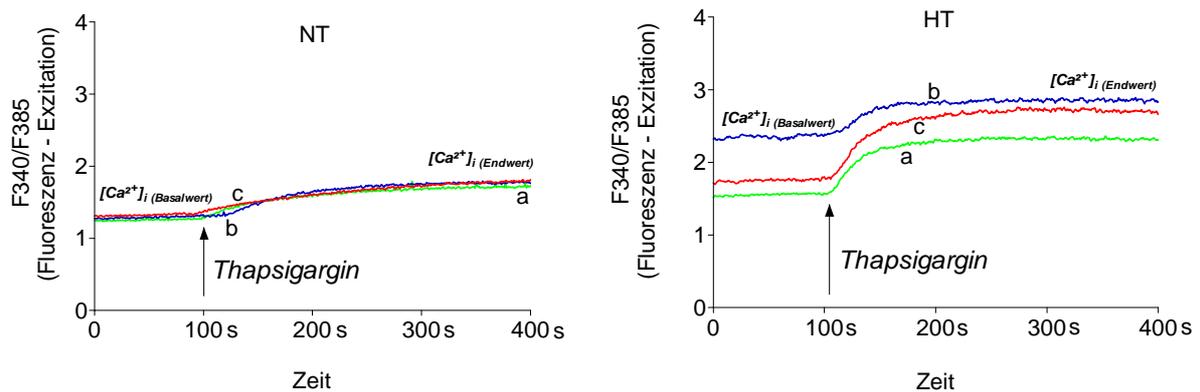


Abb. 25: Fluoreszenzphotometrische Darstellung der Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ in Lymphozyten nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin bei einem Bluthochdruckpatienten (HT, rechte Abbildung) und einer gesunden Kontrollperson (NT, linke Abbildung).

Der Pfeil markiert die Zugabe von Thapsigargin vor (a), eine Stunde (b) und zwei Stunden (c) nach oralem Glucose-Toleranztest. Dargestellt ist die Ratio der Fluoreszenz - Intensitäten bei $F_1=340$ nm (Fura-2-Calcium-Komplex) und $F_2=385$ nm (freies Fura-2)

$$[Ca^{2+}]_i \text{ Endwert} \text{ minus } [Ca^{2+}]_i \text{ Basalwert} = \Delta\text{-Calciumkonzentration} \pm \text{Standardabweichung des Mittelwertes (SEM)}$$

Im Falle des Patienten mit essentieller Hypertonie zeigte sich ein Abfall der Delta-Calciumkonzentration von $0,76 \pm 0,8$ vor oralem Glucose-Toleranztest auf $0,51 \pm 0,8$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Nach zwei Stunden stieg $\Delta[Ca^{2+}]_i$ auf $0,95 \pm 1,2$ ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), allerdings auch hier nicht signifikant.

Bei der gesunden Kontrollperson konnten lediglich minimale Veränderungen des Delta-Calciumwertes mit $0,48 \pm 0,8$ vor oralem Glucose-Toleranztest, $0,49 \pm 0,5$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest und $0,40 \pm 0,7$ zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest festgestellt werden ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Auch die Vorgabe von 250 mg/dl Glucose führte sowohl bei Lymphozyten des Patienten mit essentieller Hypertonie als auch bei denen der gesunden Kontrollperson zu einer Blockierung des Thapsigargin- Effekts und somit zu einem verminderten Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration (**Abbildung 26**).

Im Falle des Bluthochdruckpatienten kam es zu einem Anstieg der Delta-Calciumkonzentration von $0,50 \pm 0,8$ vor oralem Glucose-Toleranztest auf $1,08 \pm 1,5$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Nach zwei Stunden sank $\Delta[Ca^{2+}]_i$ auf Werte von $0,14 \pm 0,9$ ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Bei der gesunden Kontrollperson waren die Veränderungen von $[Ca^{2+}]_i$ mit $0,49 \pm 0,9$ vor oralem Glucose-Toleranztest, $0,51 \pm 0,8$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest und $0,52 \pm 1,0$ zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest ähnlich gering wie nach Vorgabe von Insulin und wiesen keinerlei Signifikanzen auf ($n=1$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

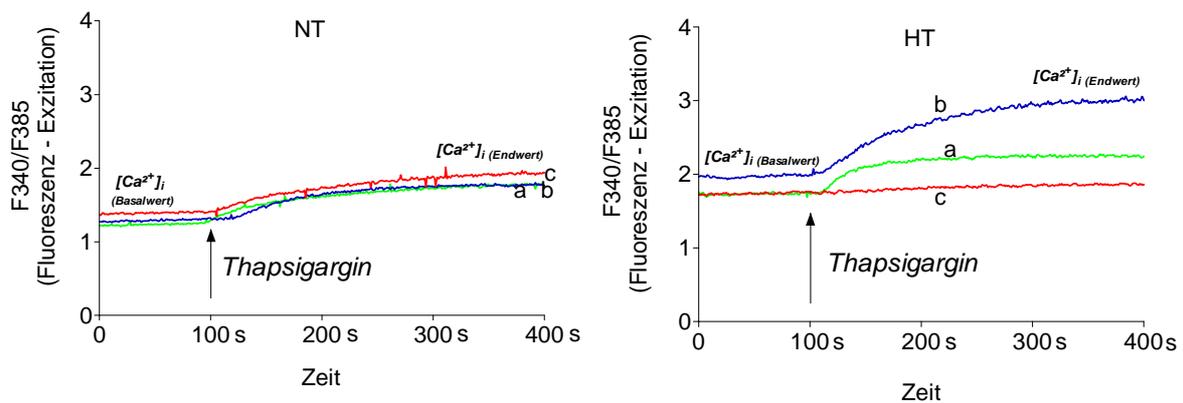


Abb. 26: Fluoreszenzphotometrische Darstellung der Veränderung von $[Ca^{2+}]_i$ in Lymphozyten nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose bei einem Bluthochdruckpatienten (HT, rechte Abbildung) und einer gesunden Kontrollperson (NT, linke Abbildung).

Der Pfeil markiert die Zugabe von Thapsigargin vor (a), eine Stunde (b) und zwei Stunden (c) nach oralem Glucose-Toleranztest. Dargestellt ist die Ratio der Fluoreszenz - Intensitäten bei $F_1=340$ nm (Fura-2-Calcium-Komplex) und $F_2=385$ nm (freies Fura-2)

$[Ca^{2+}]_i \text{ Endwert} \text{ minus } [Ca^{2+}]_i \text{ Basalwert} = \text{Delta-Calciumkonzentration} \pm \text{Standardabweichung des Mittelwertes (SEM)}$

3.6 Auswirkungen des oralen Glucose-Toleranztests auf die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS)

Abschließend wurde die Konzentration freier Sauerstoffradikale gemessen. Zur Bestimmung der Konzentration freier Sauerstoffradikale wurde der extrahierte Lymphozytenring fünf Minuten zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und die sich am Boden sammelnden Lymphozyten mit 2000 μ l PBS (PBS – Dulbecco w/o Ca^{++} , Mg^{++} , von Biochrom AG®, L 1835) resuspendiert. Die Suspension kam zu je 500 μ l in vier Eppendorfgefäße (E1-E4): E1 war die Kontrolle, E2 erhielt 10 μ mol/l PMA, E3 erhielt 40 mU/ml Insulin und E4 erhielt 250 mg/dl Glucose. E1-E4 inkubierten für eine Stunde im Wasserbad bei 37°C. Danach erfolgte die Aufteilung zu je 100 μ l in eine Lochpalette, wobei jedes Loch mit 110 μ M Farbstoff Lucigenin versetzt wurde. Im Fluoroskan® (Ascent FL, Labsystems) wurde die Konzentration freier Sauerstoffradikale gemessen.

In **Abbildung 27** ist die Entstehung freier Sauerstoffradikale bei Lymphozyten von hypertensiven und normotensiven Probanden unter oraler Glucosebelastung dargestellt.

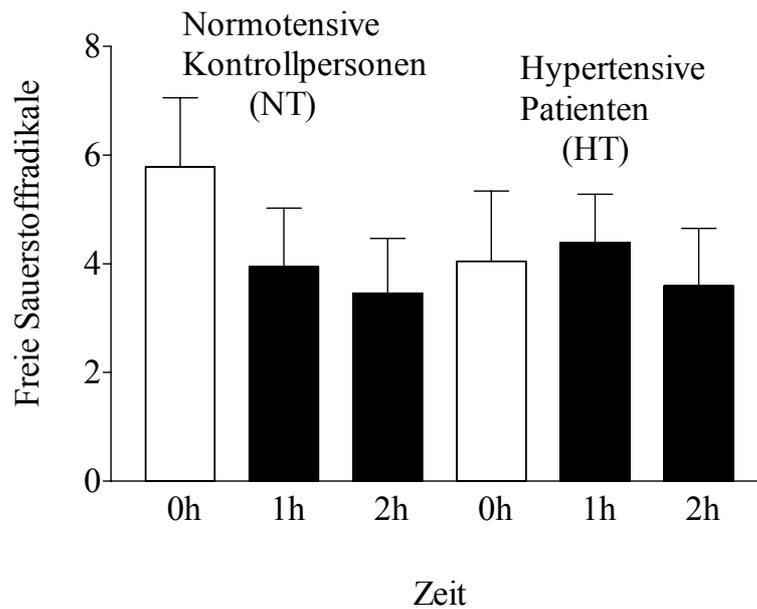


Abb. 27: Darstellung der Konzentration freier Sauerstoffradikale (Kontrolle) vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24) Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

Bei den Patienten mit essentieller Hypertonie zeigte sich ein Anstieg freier Sauerstoffradikale (Kontrolle) von $4,05 \pm 1,3$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $4,39 \pm 0,9$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest, der jedoch nicht signifikant war (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest kam es zu einem Abfall auf $3,59 \pm 1,1$ im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

In der normotensiven Kontrollgruppe dagegen sank die Konzentration freier Sauerstoffradikale durchschnittlich von $5,78 \pm 1,3$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $3,95 \pm 1,3$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST). Auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest kam es zu einem Abfall der (O_2^-)- Konzentration auf $3,46 \pm 1,0$ (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), der ebenso wie der Einstundenwert nicht signifikant unterschiedlich

zum Ausgangswert war. Beim Vergleich beider Untersuchungsgruppen konnten ebenfalls keine markanten Unterschiede bezüglich der Produktion freier Sauerstoffradikale festgestellt werden ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Abbildung 28 verdeutlicht die Entstehung freier Sauerstoffradikale bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie und gesunden Kontrollen nach in – vitro - Zugabe von $10 \mu\text{mol/l}$ PMA und unter oraler Glucosebelastung.

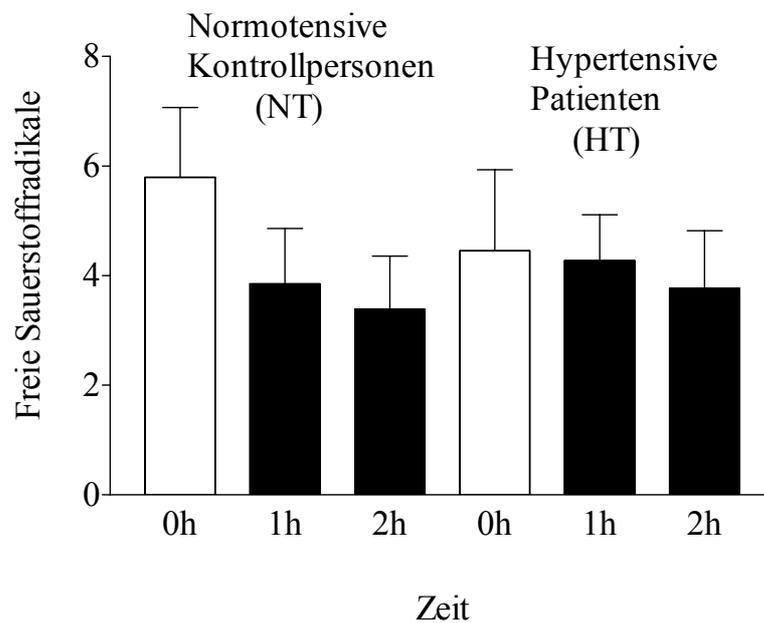


Abb. 28: Darstellung der Konzentration freier Sauerstoffradikale nach Vorgabe von $10 \mu\text{mol/l}$ PMA vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, $n=24$) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, $n=24$).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

Nach Stimulation der Zellen mit $10 \mu\text{mol/l}$ PMA zeigte sich bei den Bluthochdruckpatienten ein Abfall freier Sauerstoffradikale von $4,45 \pm 1,5$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $4,27 \pm 0,8$ eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), jedoch nicht signifikant. Zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest war die Konzentration freier

Radikale mit $3,77 \pm 1,1$ (Mittelwerte \pm SEM) am niedrigsten, ohne sich signifikant vom Ausgangswert zu unterscheiden ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Auch die normotensiven Studienteilnehmer reagierten im Durchschnitt mit einem Abfall der Konzentration reaktiver Sauerstoffradikale von $5,79 \pm 1,3$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $3,85 \pm 1,0$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) und auf $3,38 \pm 1,0$ (Mittelwerte \pm SEM) zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest ($n=24$, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), jedoch ohne signifikante Veränderungen aufzuweisen.

Der Vergleich beider Untersuchungsgruppen hinsichtlich der Radikalproduktion zeigte ebenfalls keinerlei Signifikanz ($n=48$, $p>0,05$, t-Test).

Abbildung 29 zeigt die Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale bei Lymphozyten von Patienten mit primärer Hypertonie und gesunden Kontrollen nach in – vitro – Stimulation mit 40 mU/ml Insulin und unter oraler Glucosebelastung.

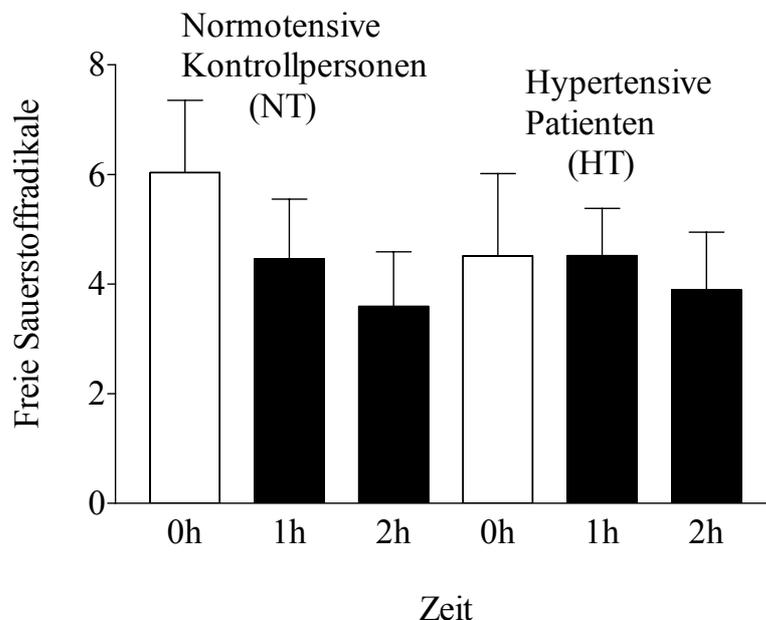


Abb. 29: Darstellung der Konzentration freier Sauerstoffradikale nach Vorgabe von 40 mU/ml Insulin vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei

Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

Die Vorgabe von 40 mU/ml Insulin führte in der Gruppe der Bluthochdruckpatienten im Mittel zu einem Abfall der Konzentration freier Sauerstoffradikale von $4,52 \pm 1,5$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $4,50 \pm 0,9$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) sowie auf $3,90 \pm 1,1$ (Mittelwerte \pm SEM) zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), allerdings ohne signifikante Veränderungen aufzuweisen.

Bei den gesunden Kontrollpersonen sank die Konzentration freier Sauerstoffradikale im Mittel ebenfalls von $6,03 \pm 1,3$ (Mittelwerte \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $4,46 \pm 1,1$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) und auf $3,59 \pm 1,0$ (Mittelwerte \pm SEM) zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p>0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), jedoch auch hier nicht signifikant.

Der Vergleich normotensiver und hypertensiver Probanden miteinander zeigte keinerlei signifikante Unterschiede (n=48, $p>0,05$, t-Test).

In **Abbildung 30** ist die Produktion freier Sauerstoffradikale bei Lymphozyten von Patienten mit essentieller Hypertonie und normotensiven Kontrollen nach in – vitro – Gabe von 250 mg/dl Glucose und unter oraler Glucosebelastung dargestellt.

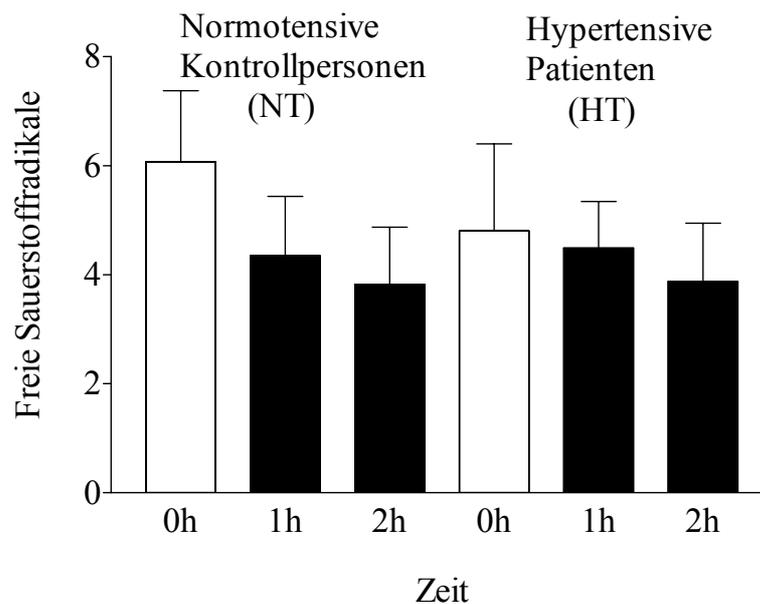


Abb. 30: Darstellung der Konzentration freier Sauerstoffradikale nach Vorgabe von 250 mg/dl Glucose vor (0h), eine Stunde (1h) und zwei Stunden (2h) nach oralem Glucose-Toleranztest bei Lymphozyten von hypertensiven Patienten (HT, n=24) und normotensiven Kontrollpersonen (NT, n=24).

Dargestellt sind die Mittelwerte \pm Standardabweichung des Mittelwertes (SEM).

Nach Stimulation der Zellen mit 250 mg/dl Glucose zeigte sich bei den Patienten mit essentieller Hypertonie ein durchschnittlicher Abfall freier Sauerstoffradikale von $4,81 \pm 1,6$ (Mittelwert \pm SEM) vor oralem Glucose-Toleranztest auf $4,49 \pm 0,9$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), allerdings ohne Signifikanz. Auch zwei Stunden nach oralem Glucose-Toleranztest fiel die (O_2^-) -Konzentration auf $3,88 \pm 1,1$ im Vergleich zum Ausgangswert (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST).

Bei den gesunden Testpersonen sank die Produktion freier Sauerstoffradikale von $6,07 \pm 1,3$ vor oralem Glucose-Toleranztest auf $4,35 \pm 1,1$ (Mittelwerte \pm SEM) eine Stunde nach oralem Glucose-Toleranztest (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST) und auf $3,82 \pm 1,1$ (Mittelwerte \pm SEM) zwei Stunden nach oralem

Glucose-Toleranztest (n=24, $p > 0,05$ mit KRUSKAL-WALLIS-TEST und DUNN'S MULTIPLE COMPARISON TEST), jedoch ohne signifikante Unterscheidung vom Ausgangswert.

Der Vergleich beider Gruppen in Bezug auf die Radikalfreisetzung nach in – vitro – und oraler Glucose – Stimulation zeigte keine signifikanten Unterschiede (n=48, $p > 0,05$, t-Test).