

Aus der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin A  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Günter Kraatz)  
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-  
Universität Greifswald

**Untersuchungen zur abnormen Stimulierbarkeit  
der intrazellulären Kalziumkonzentration  
bei essentiellen Hypertonikern**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2001

vorgelegt von:  
Sören Stolper  
geb. am: 05. Dezember 1968  
in: Hennigsdorf

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Krömer	Greifswald
1. Gutachter:	Prof. Dr. med. W. Zidek	Berlin
2. Gutachter:	Prof. Dr. med. G. Kraatz	Greifswald
(3. Gutachter:)		

Tag der Disputation: 15. März 2002

Ort, Raum: Institut für Pharmakologie  
Hörsaal

## Widmung

Diese Arbeit widme ich Frau MR Dr. med. R. Thonack.

Frau Dr. Thonack war nach Abschluß ihrer Ausbildung im Jahr 1967 hauptsächlich auf dem Gebiet der Gerontologie in Greifswald tätig. Bald nach ihrer Ernennung zur Chefärztin in einem Alten- und Pflegeheim widmete sie sich der Ausbildung von medizinischem Personal, insbesondere der praktischen Ausbildung von Studenten.

Auch nachdem sie sich 1991 in eigener Praxis niedergelassen hatte, schlug ihr Herz für die studentische Ausbildung.

So gründete sie das „Hausbesuchsprogramm“ im Rahmen des „Community Medicine“-Projektes der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald mit und wurde Senior-Tutor dieses Projektes.

Später war sie im International Medical Student Project Lund-Stettin-Greifswald mit der Thematik „Der Ältere Patient – eine Herausforderung an die Generation der künftigen Ärzte“ betraut.

Frau Dr. Thonack hat einen Großteil ihres beruflichen Lebens mit hohem Engagement der Ausbildung des studentischen Nachwuchses gewidmet. In zahlreichen Gesprächen und Hospitationen konnte ich viele praktische Dinge im Umgang mit Patienten von ihr lernen.

Durch ihre Hilfe und Unterstützung konnte ein Großteil der Probanden dieser Arbeit rekrutiert werden.

Frau Dr. Thonack wird zukünftigen Studentengenerationen und mir immer ein Vorbild bleiben.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Allgemeines zur Hypertonie</b>	<b>7</b>
1.1.1. Definition	7
1.1.2. Einteilung der Hypertonie	7
1.1.3. Sozialmedizinische Bedeutung der Hypertonie und „Community Medicine“	8
<b>1.2. Risikofaktoren der essentiellen Hypertonie</b>	<b>9</b>
<b>1.3. Pathogenese der Hypertonie</b>	<b>13</b>
1.3.1. Erbliche Hypertoniebelastung und genetische Faktoren	14
1.3.2. Volumenhochdruck	15
1.3.3. Peripherer Widerstand	16
1.3.4. Endotheliale Dysfunktion	18
1.3.5. Hypertonus als Stoffwechselerkrankung	18
1.3.6. Neurogene Hypertonie	18
1.3.7. Veränderungen auf zellulärer und subzellulärer Ebene	19
<b>2. Der zelluläre Kalziumstoffwechsel</b>	<b>20</b>
<b>2.1. Bedeutung des Kalziums</b>	<b>20</b>
<b>2.2. Kalziumeintritt in die Zelle</b>	<b>21</b>
<b>2.3. Kalziumaustritt aus der Zelle</b>	<b>22</b>
<b>2.4. Kalzium-Stoffwechsel an mitochondrialen Membranen</b>	<b>23</b>
<b>2.5. Kalzium-Stoffwechsel an sarkoplasmatischen Membranen</b>	<b>24</b>
2.5.1. Steuerung	25
2.5.2. Kalzium-Einstrom in das Sarkoplasmatische Retikulum	26
2.5.3. Kalzium-Ausstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum	26
<b>2.6. Weiteres</b>	<b>27</b>
<b>3. Der NHE in der Pathogenese der Hypertonie</b>	<b>28</b>
<b>3.1. Eigenschaften, Vorkommen und Einteilung des NHE</b>	<b>29</b>
<b>3.2. NHE und Pathophysiologie der Hypertonie</b>	<b>30</b>
<b>4. Intrazelluläre Signalweiterleitung und NHE-1</b>	<b>33</b>
<b>5. Zielstellung</b>	<b>37</b>
<b>6. Patientenauswahl und Methodik</b>	<b>39</b>
<b>6.1. Studiendesign</b>	<b>39</b>
<b>6.2. Versuchspersonen</b>	<b>41</b>
<b>6.3. Immortalisierung von B-Lymphozyten aus menschlichem Blut</b>	<b>43</b>
6.3.1. Materialien	43
6.3.2. Geräte	44
6.3.3. Gewinnung der Lymphozyten aus venösem Blut	44
6.3.4. Transformation der Lymphozyten	44
6.3.5. Anzucht und Kultivierung der transformierten Zellen	46

<b>6.4. Messung der basalen und durch PAF stimulierbaren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration</b>	<b>46</b>
6.4.1. Beladung der Zellen mit Fura-2	48
6.4.2. Fluoreszenzmessung	48
6.4.3. Auswertung	49
<b>6.5. Weitere laborchemische Untersuchungen</b>	<b>50</b>
<b>6.6. Statistik</b>	<b>50</b>
<b><u>7. Ergebnisse</u></b>	<b><u>51</u></b>
<b>7.1. Charakterisierung der Probanden</b>	<b>51</b>
<b>7.2. Basale Kalziumwerte</b>	<b>52</b>
<b>7.3. Kalziumwerte nach Stimulation</b>	<b>53</b>
<b>7.4. Normwertbildung und Anwendung</b>	<b>56</b>
7.4.1. Normwertbildung mit Standardabweichung	56
7.4.2. Verteilung der Kalziumwerte nach Stimulation	57
7.4.3. Normwertbildung mit Konfidenzintervall und Anwendung	58
<b>7.5. Korrelation der Ca<sup>2+</sup>-Daten zu weiteren Meßgrößen</b>	<b>58</b>
<b><u>8. Diskussion</u></b>	<b><u>60</u></b>
<b>8.1. Einführung</b>	<b>60</b>
<b>8.2. Bedeutung der Studie</b>	<b>60</b>
<b>8.3. Probandenkritik</b>	<b>62</b>
<b>8.4. Anzahl der Meßergebnisse</b>	<b>67</b>
<b>8.5. Immortalisierung und Stimulation der Lymphozyten mit PAF</b>	<b>69</b>
<b>8.6. Ergebnisse</b>	<b>74</b>
<b>8.7. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Basalwerte</b>	<b>75</b>
<b>8.8. Normwertbildung</b>	<b>76</b>
<b>8.9. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen nach Stimulation mit PAF</b>	<b>78</b>
<b>8.10. Erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen bei Hypertonikern</b>	<b>80</b>
<b>8.11. Abhängigkeit der Signalhöhe von antihypertensiver Therapie</b>	<b>82</b>
<b>8.12. Abhängigkeit der Signalhöhe von weiteren Parametern</b>	<b>83</b>
<b>8.13. Ausblick</b>	<b>85</b>
<b><u>9. Quellenverzeichnis</u></b>	<b><u>87</u></b>
<b><u>10. Anhang: Ergebnisse der laborchemischen Untersuchungen</u></b>	<b><u>102</u></b>
<b>10.1. Kalzium-Meßwerte der Hypertoniker</b>	<b>102</b>
<b>10.2. Kalzium-Meßwerte der Normotoniker</b>	<b>103</b>
<b>10.3. Weitere Laborparameter der Hypertoniker</b>	<b>104</b>
<b>10.4. Weitere Laborparameter der Normotoniker</b>	<b>106</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
ANF	Atrialer Natriuretischer Faktor
ATP	Adenosin-Tri-Phosphat
BMI	Body Mass Index
CSE-Hemmer	Cholesterinsyntheseenzym-Hemmer
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBV	Epstein-Barr-Virus
Fa.	Firma
FKS	Fetales Kälberserum
IE	Internationale Einheit
inkl.	inklusive
n. s.	nicht signifikant
NHE	Na <sup>+</sup> -H <sup>+</sup> -Exchanger (Natrium-Protonen-Austauscher)
NHE-1	Natrium-Protonen-Austauscher (Isoform 1)
PAF	Platelet-Activating-Factor
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RR <sub>dia</sub>	diastolischer Blutdruck
RR <sub>sys</sub>	systolischer Blutdruck
SD	Standard Deviation (Standardabweichung)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
Tab.	Tabelle
V <sub>max</sub>	Maximale Austauschergeschwindigkeit
vs.	versus

# 1. Einleitung

## 1.1. Allgemeines zur Hypertonie

### 1.1.1. Definition

Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat 1996 die Definition der Hypertonie präzisiert und folgendes festgelegt: *„Eine arterielle Hypertonie beim Erwachsenen liegt vor, wenn bei mehrmaliger Messung an verschiedenen Tagen in Ruhe unter Standardbedingungen Blutdruckwerte von systolisch 140 mm Hg oder darüber oder diastolisch von 90 mm Hg oder darüber gemessen werden.“* (1) Bei nur geringgradiger Überschreitung des Blutdruckes über o. g. Grenzwerte muß eine Bestätigung der Verdachtsdiagnose durch wiederholte Messungen während mehrerer Monate sowie ein Ausschluß des sogenannten „Weißkitteleffektes“ durchgeführt werden.

### 1.1.2. Einteilung der Hypertonie

Generell unterscheidet man zwischen einer arteriellen Hypertonie („Hypertonie des großen Kreislaufs“), einer pulmonalen Hypertonie („Hypertonus des kleinen Kreislaufs“) und einer portalen Hypertonie.

Die arterielle Hypertonie unterteilt sich in die essentielle Hypertonie (ca. 95 %), bei der laut Definition keine ursächliche Organerkrankung zu Grunde liegt, und in die sekundären Hypertonieformen (ca. 5 %). Die häufigste sekundäre Hypertonieform ist die renale Hypertonie, weitere sind die endokrine, die kardiovaskuläre, die neurogene Hypertonie sowie die Schwangerschaftshypertonie und Hypertonie durch Pharmaka oder Gifte (4, 35).

### **1.1.3. Sozialmedizinische Bedeutung der Hypertonie und „Community Medicine“**

In der 1984 in Lübeck durchgeführten Blutdruckstudie (2) zeigte sich unter 2359 zufällig ausgewählten Teilnehmern eine Prävalenz der Hypertonie von 16,4 %. Dabei betrug der Anteil der hypertonen Männer 19,9 % und der Anteil der hypertonen Frauen 13,5 %, insgesamt nahm die Prävalenz der Erkrankung mit steigendem Lebensalter zu. Im Vergleich zu einer Münchener Blutdruckstudie lag die Prävalenz der Hypertonie in der norddeutschen Stadt etwas höher (2).

In Deutschland verstarben im Jahr 1995 429.407 Menschen an Erkrankungen des Herz-Kreislauf-Systems, das sind 48,5 % aller Todesfälle (3). Dazu gehören neben der Hypertonie auch ischämische Herzkrankheiten inkl. des akuten Herzinfarktes, Störungen des Herzerregungsleitungssystems und Herzrhythmusstörungen, und die Herzinsuffizienz. Diese Erkrankungen können alle durch das Vorliegen einer Hypertonie verursacht oder verstärkt werden. Somit hat die Hypertonie auch einen erheblichen Stellenwert in der „Community Medicine“.

Nur wenn es gelingt, den Verlauf der Hypertonie und das Auftreten typischer Spätschäden hauptsächlich durch regelmäßige und fortwährende Betreuung der Hausärzte zu vermindern bzw. hinauszuzögern, kann die Zahl o. g. Todesfälle sinken. Ein weiterer Ansatzpunkt dazu ist die Gesundheitsförderung, mit Hilfe derer die Menschen bereits vor einem Auftreten von Symptomen zu einer gesunden Lebensweise animiert werden sollen.

Vor einem knappen halben Jahrhundert begann die Ära der „modernen“ antihypertensiven Therapie. So wurde seit 1957 mit Chlorothiazid (Diuretikum), seit 1968 mit Verapamil (Ca<sup>2+</sup>-Antagonist) und seit 1981 mit Captopril (ACE-Hemmer) versucht (34), den Verlauf und die Schwere der Hypertonie medikamentös zu beeinflussen. Vor ca. fünf Jahren wurden die



AT<sub>1</sub>-Blocker in die antihypertensive Therapie eingeführt, welche den Subtyp 1 des Angiotensin-II-Rezeptors blockieren. Trotz vielfältiger Therapieansätze mit verschiedenen pharmakologischen Stoffklassen hat sich die Prävalenz und die Mortalität an Herz-Kreislauf-Erkrankungen nicht verringert (3).

## **1.2. Risikofaktoren der essentiellen Hypertonie**

**1. Übergewicht:** In fast allen großen Blutdruckstudien stellte sich heraus, daß übergewichtige Personen ein höheres Risiko haben, eine Hypertonie zu entwickeln, als normalgewichtige Personen.

Wenn hingegen das Gewicht gesenkt wird, sinkt auch der erhöhte Blutdruck (5, 6). Eine Abnahme von einem kg Körpergewicht bewirkt durchschnittlich eine Erniedrigung des systolischen Blutdruckes um 1,6 und des diastolischen Blutdruckes um 1,3 mm Hg. Mit stärkerem Gewichtsverlust, wie z. B. durch Einhaltung einer genau definierten Diät, wurden auch größere Blutdruck-Abnahmen beobachtet (7). Auch Bewegungsmangel spielt in diesem Zusammenhang eine Rolle, so entwickeln z. B. physisch aktive Personen seltener einen Hypertonus als inaktive Personen (8) (Abb. 1).

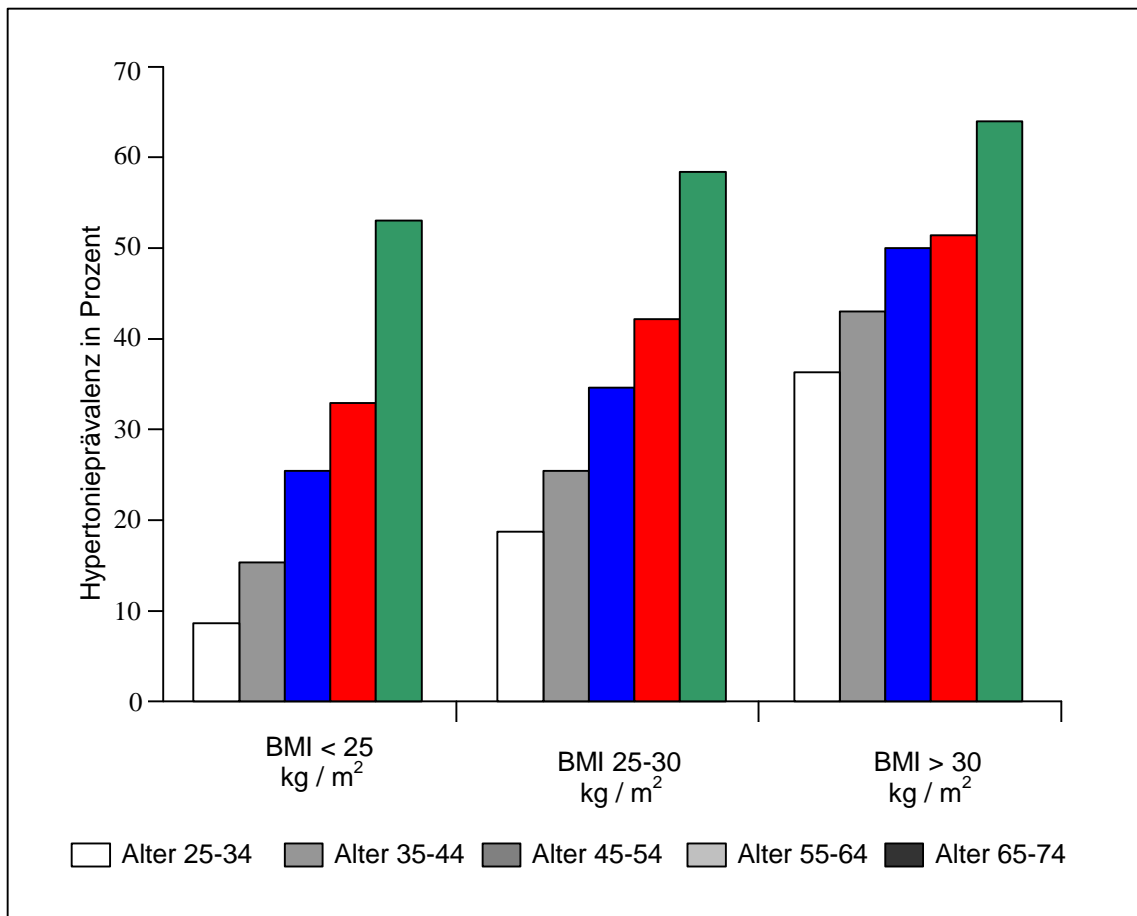


Abb.1: Prävalenz der arteriellen Hypertonie (WHO-Kriterien) in Abhängigkeit vom Body Mass Index; MONICA-Augsburg-Querschnittsuntersuchung 1990/1991 (n = 4.940, BMI in kg/m<sup>2</sup>). Nach: (6).

**2. Nikotin:** Zigarettenrauchen ist eine der bedeutendsten Ursachen für vermeidbare Erkrankungen sowie vorzeitige Invalidität und frühzeitigen Tod (106) und verdoppelt die Gesamtsterblichkeit bei Patienten mit geringer Hypertonie (107).

Der akute Anstieg des Nikotinspiegels im Blut verursacht eine Erhöhung sowohl des systolischen als auch des diastolischen Blutdruckes, die für etwa 15 - 30 Minuten anhält (108). Früher wurde dieser Umstand oft übersehen, da Krankenhäuser und Arztpraxen in der Regel „rauchfrei“ sind.

**3. Alkohol:** Bei regelmäßigem Konsum führen bereits 10 g Alkohol täglich zu einem Blutdruckanstieg von systolisch 2 und diastolisch 1 mm Hg (9). In einem Glas Bier oder Wein sind bis zu 15 g Alkohol enthalten. In großen Studien wurde eine Beziehung zwischen Alkohol und Hypertonie nachgewiesen. So konnte z. B. durch die Daten der Augsburger Studie des WHO-MONICA-Projektes die erhebliche Bedeutung des Alkoholkonsums für die Entstehung der Hypertonie nachgewiesen werden (10) (Abb. 2).

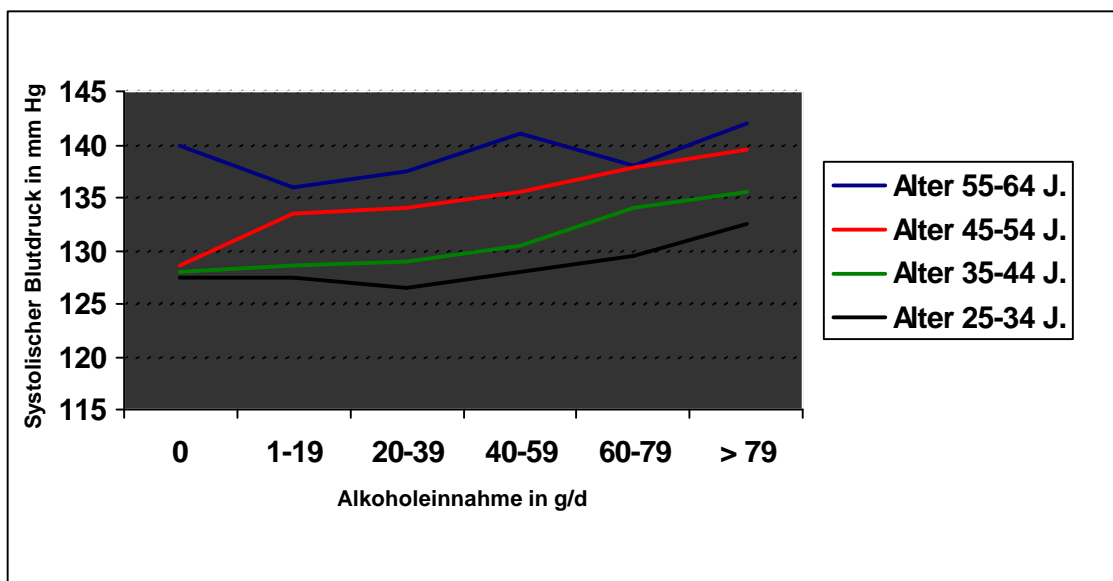


Abb. 2: Mittlere systolische Blutdruckwerte von Männern nach Alkoholeinnahme-Kategorien, unterteilt in Zehn-Jahres-Altersgruppen. Nach: (10).

Allerdings ergab eine neuere Analyse der FRAMINGHAM-Daten von 1995, daß die Gesamtmortalität bei einer Alkoholaufnahme von nur bis zu 25 g/d zurückgeht (11). Auch MCMAHON berichtete über einen niedrigeren Blutdruck bei Personen, die täglich 10 bis 20 g Alkohol konsumieren, als bei Abstinenz-Personen (19).

**4. Salzkonsum:** Die Rolle des Salzkonsums bei der Ausbildung der Hypertonie ist noch umstritten. Die INTERSALT-Studie ergab nur in einigen wenigen Zentren eine Korrelation zwischen der Blutdruckhöhe und der Na<sup>+</sup>-Exkretion. Aus verschiedenen

Gründen ist aber aus heutiger Sicht kein starker blutdrucksenkender Effekt infolge einer NaCl-Restriktion zu erwarten: Einerseits müßte die Salzrestriktion recht konsequent sein, weiterhin würden nicht alle Patienten davon gleichermaßen profitieren, sondern nur salzsensitive Personen. Außerdem ergab die INTERSALT-Studie auch, daß andere Risikofaktoren, wie Übergewicht und Alkoholkonsum, die Blutdruckhöhe stärker beeinflussen als der Salzkonsum (37). Da eine mäßige bzw. geringe Salzaufnahme jedoch die Wirkung einiger Antihypertensiva (z. B. Diuretika) unterstützt bzw. sich auch auf die Nierenfunktion positiv auswirkt, wird von der Hochdruckliga eine Salzreduktion (auf ca. 6 g/d) empfohlen (Abb. 3).

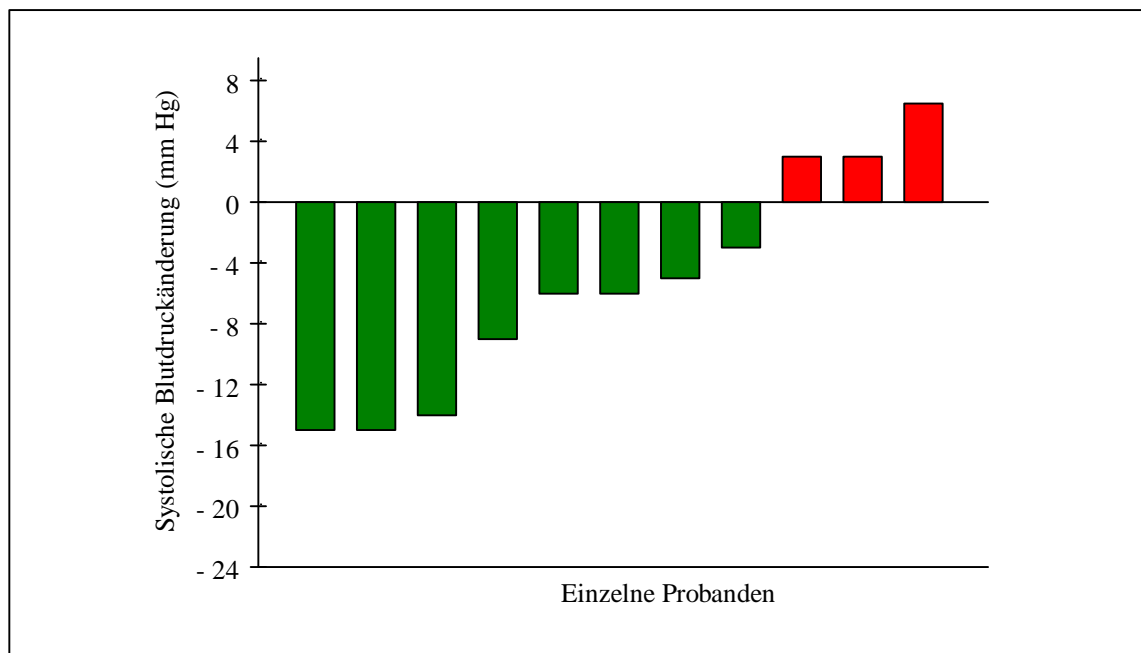


Abb. 3: Veränderungen des systolischen Blutdruckes beim Wechsel von Normalkost auf salzarme Diät. Nach: (16).

**5. Kontrazeptiva:** Weiterhin zeigte eine Münchener Blutdruckstudie eine reversible Blutdruckzunahme um durchschnittlich 3 mm Hg bei Frauen, die orale Kontrazeptiva einnehmen. Die Wirkungsweise ist noch unklar, aber der Hormonanteil der Kontrazeptiva, insbesondere der Östrogenanteil, scheint dabei von Bedeutung zu sein (12).

**6. Streß:** Psychosozialer Disstress wird ebenfalls als Risikofaktor der Hypertonie diskutiert. So fanden z. B. PICKERING et al. heraus, daß in sog. Low-Stress-Regionen eine niedrigere Hypertonieprävalenz besteht (48).

**7. Atemstörungen:** Derzeit findet die Untersuchung von Atemstörungen im Schlaf, insbesondere der sog. Schlafapnoe, besondere Beachtung. PEPPARD et al. haben 1999 erkannt, daß ein Zusammenhang zwischen Atemstörungen im Schlaf und einem erhöhten Blutdruck besteht. Dabei fand sich eine lineare Abhängigkeit zwischen der Anzahl der Atemstörungen und der Ausprägung einer arteriellen Hypertonie (105).

**8. Genetische Disposition:** Bei vielen Individuen liegt eine genetische Disposition zur Entstehung einer essentiellen Hypertonie vor. Oft führt erst die Wechselwirkung zwischen genetischer Disposition und exogenen Faktoren, wie z. B. Ernährung und Verhalten (13), zur Ausprägung der Hypertonie. Somit besteht hier die Möglichkeit einer Beeinflussung. Darauf zielen zahlreiche präventive Ansätze, wie z. B. die Reduktion von Übergewicht oder eine Minderung des Alkoholkonsums, ab.

### **1.3. Pathogenese der Hypertonie**

Nach wie vor ist die Pathogenese der Hypertonie letztendlich unklar. Jedoch ging PAGE bereits 1949 (109) in seiner Mosaiktheorie davon aus, daß die Ätiopathogenese der Hypertonie ein Zusammenspiel von Einzelfaktoren darstellt (Abb. 4).

GUYTON vertrat 1980 die Meinung, daß bei der Entstehung der essentiellen Hypertonie bekannte auslösende Faktoren als Regelkreis mit Stellgrößen und Störfaktoren darstellbar sind (113). Dieser komplexe Vorgang kann hier nur unvollständig dargestellt werden. Die relative Bedeutung der einzelnen Faktoren variiert zwischen den Individuen und hängt u. a.

auch vom Lebensalter und der Dauer des Hypertonus ab. Des weiteren haben Strukturveränderungen an Herz und Gefäßen, die sich in einem positiven Feedback-Mechanismus selbst verstärken, eine Bedeutung.

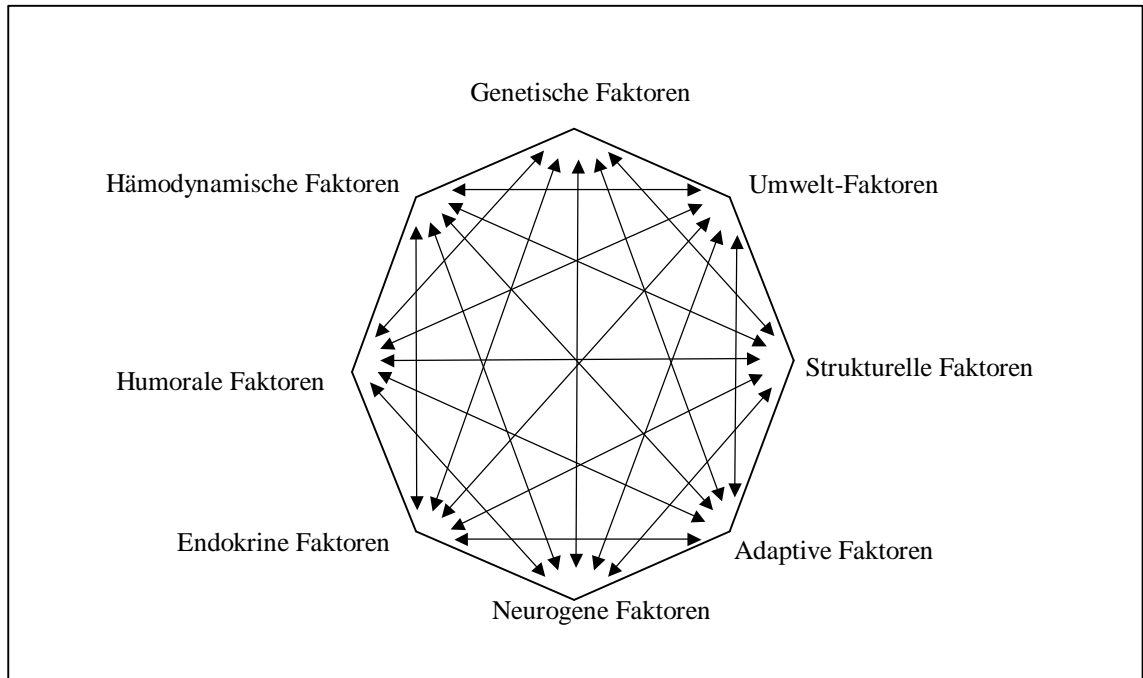


Abb. 4: Mosaiktheorie der essentiellen Hypertonie (15).

Im folgenden soll kurz auf einige wichtige pathogenetische Mechanismen eingegangen werden.

### 1.3.1. Erbliche Hypertoniebelastung und genetische Faktoren

Ergebnisse der Zwillingsforschung weisen darauf hin, daß 30 - 40 % der Blutdruckvariabilität auf erbliche Einflüsse zurückgeführt werden müssen (15). Weitere 15 % werden durch das familiäre Umfeld beeinflusst. 50 %, und damit der Hauptteil, sind im Einfluß individueller Umweltfaktoren begründet (38). Mit steigendem Alter nimmt der genetische Einfluß weiter ab und der der Umweltfaktoren (= „exogene Realisatoren“ wie z. B. Adipositas, Alkohol- und Salzkonsum, etc.) zu (39).

Gene, die nach ihrer Mutation in die Pathogenese der Hypertonie involviert sein könnten, werden Kandidatengene ge-

nannt. Nach LIFTON et al. (31) sollten diese molekular charakterisiert sein, und es muß ein plausibler Mechanismus der Hochdruckpathogenese erklärbar sein. Die durch Kandidatengene verursachte Wirkung darf sich nicht nur im prähypertensiven Stadium und beim unbehandelten Patienten nachweisen lassen, sondern muß auch beim etablierten und gut behandelten Hypertonus nachweisbar, also keine Hochdruckfolge sein.

Als Kandidatengene wurden bisher u. a. das Renin-, ACE- und Angiotensinogen-Gen, die Gene für die  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ , den  $\text{Na}^+\text{-H}^+\text{-Austauscher}$ , Kallikrein, epitheliale Natriumkanäle und adrenerge Rezeptoren untersucht. Die Beweisführung einer pathogenetischen Beteiligung ist jedoch schwierig, so ist z. B. für das ACE-Gen der Zusammenhang zur Linksherzhypertrophie (29) und zum Auftreten eines Myokardinfarktes (30) gefunden, aber nicht zur Blutdruckhöhe (31). Ebenso konnten gegenwärtig für das Renin-Gen und das  $\text{Na}^+\text{-H}^+\text{-Austauscher-Gen}$  noch keine Beziehungen zur essentiellen Hypertonie nachgewiesen werden (31).

Durch Anwendung moderner Technologien können heute Gene, wie auch Gen-Gen- und Umwelt-Gen-Interaktionen bei komplexen polygenen Erkrankungen, z. B. bei der essentiellen Hypertonie, bestimmt werden (17). Dies kann Möglichkeiten einer gezielten individuellen Behandlung und der Prävention kardiovaskulärer Komplikationen eröffnen.

### **1.3.2. Volumenhochdruck**

Ein Volumenhochdruck entsteht durch eine Vergrößerung des Herzzeitvolumens bei gleichbleibenden peripheren Widerständen. Auch diese Art des Bluthochdruckes könnte als primärer pathogenetischer Faktor von Bedeutung sein. Ursächlich hierfür könnte z. B. eine Störung der renalen Ausscheidungskapazität für Natrium sein. Dies hätte eine konsekutive Zunahme des Extrazellulärvolumens mit nachfolgender Blutdruckerhöhung zur Folge (15). Die Zunahme des Extrazellulärvolumens

wäre jedoch nur vorübergehend zu erwarten, da der Volumenhochdruck mit hoher Wahrscheinlichkeit in einen Widerstandshochdruck übergeht (41). Bei salzsensitiven Patienten könnte ein Volumenhochdruck durch eine verlangsamte Natrium-Ausscheidung, ein erniedrigtes Plasmarenin und -aldosteron, oder eine verminderte Ansprechbarkeit von Renin und Aldosteron auf Kochsalzbeschränkung und Kochsalzbelastung zustande kommen (15).

### 1.3.3. Peripherer Widerstand

Eine entscheidende Bedeutung kommt auch der Erhöhung des peripheren Widerstandes als primärer pathogenetischer Faktor zu, wobei jedoch noch unklar ist, ob die Widerstandserhöhung initial funktionell und/oder strukturell bedingt ist (15). Für die Höhe des peripheren Gesamtwiderstandes sind nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz Innendurchmesser, Zahl und Länge der Widerstandsgefäße, und zu geringem Teil auch die Plasmaviskosität verantwortlich (Formel 1).

$$R = \frac{8 \eta l}{\pi r^4}$$

Formel 1: Widerstandsberechnung nach dem Hagen-Poiseuille'schen Gesetz. R: Strömungswiderstand, l: Gefäßlänge,  $\eta$ : Viskosität der Flüssigkeit, r: Radius.

Eine Reihe von Untersuchern ist der Meinung, daß den strukturellen Gefäßveränderungen die *primär funktionelle* Erhöhung des peripheren Widerstandes vorausgeht (42, 43).

Dazu könnten z. B. eine erhöhte Sympathikusaktivierung, gefäßverengende Substanzen oder ein Überwiegen vasokonstriktorischer über vasodilatierende Faktoren führen. Auch systemisch einwirkende humorale Vasokonstriktoren oder eine verminderte Vasodilatation wären denkbar (Tab. 1).



<b>Vasokonstriktoren</b>	<b>Vasodilatoren</b>
<i>Systemisch wirksam:</i>	<i>Systemisch wirksam:</i>
Angiotensin II Katecholamine Arginin-Vasopressin Hypertensiver Faktor der Parathyreoidea Ouabain	ANF Medullipin Calcitonin Gen-related Peptid Endorphine
<i>Parakrin/autokrin wirksam:</i>	<i>Parakrin/autokrin wirksam:</i>
Endothelin-1 Angiotensin II Thromboxan A <sub>2</sub> Serotonin <sup>1</sup> Thrombin <sup>1</sup> Diadenosinpolyphosphat	Stickoxid (NO) Prostazyklin Hyperpolarisierender Faktor Bradykinin Serotonin <sup>1</sup> Adenosin Adrenomedullin

Tabelle 1: Humorale und para-/autokrin wirksame vasoaktive Faktoren (15).

<sup>1</sup>: Serotonin und Thrombin wirken über unterschiedliche Rezeptoren vasodilatatorisch und vasokonstriktorisch .

Für eine *primär strukturell* bedingte Erhöhung des peripheren Widerstandes spricht die Tatsache, daß bei unbehandelten Patienten mit essentieller Hypertonie sowohl die minimale vaskuläre Resistenz unter maximaler Dilatation als auch der Ruhewiderstand erhöht sind (44).

Letztendlich ist eine funktionell vermittelte Erhöhung des peripheren Widerstandes und damit eine Blutdruckerhöhung wahrscheinlich; erst durch wiederholte Blutdruckanstiege kommt es dann zu strukturellen Veränderungen.

#### **1.3.4. Endotheliale Dysfunktion**

Ein Mißverhältnis zwischen im Endothel gebildeten vaso-konstriktorischen und vasodilatierenden Faktoren (s. auch Tab. 1) und die vermehrte Expression von Wachstumsfaktoren für glatte Muskelzellen und für Matrixproteine könnten bei der Pathogenese der Hypertonie eine Rolle spielen. Die Mehrzahl der Untersucher sieht die sogenannte endotheliale Dysfunktion jedoch als sekundären Vorgang an (45, 46).

#### **1.3.5. Hypertonie als Stoffwechselerkrankung**

Wird die Hypertonie als Stoffwechselerkrankung gesehen, bewirken eine verminderte Insulinsensitivität der Skelettmuskulatur und die nachfolgende Hyperinsulinämie die sympathoadrenale Stimulation und fördern die Natrium-Reabsorption in der Niere (15).

Eine verminderte Insulinsensitivität tritt gehäuft im Zusammenhang mit Hypertonie, Adipositas, Diabetes mellitus Typ II, Hyperlipidämie und erhöhtem Harnsäurespiegel auf und wird dann u. a. als „Metabolisches Syndrom“ bezeichnet (47).

#### **1.3.6. Neurogene Hypertonie**

Für eine Mitwirkung neurogener Faktoren bei der Hypertonieentstehung spricht die niedrige Hypertonie-Prävalenz in Low-Stress-Regionen (48). Eine definierte „Hochdruckpersönlichkeit“ gibt es nicht, jedoch kommen gehäuft bestimmte Persönlichkeitszüge bei Hochdruckkranken vor, wie z. B. Beherrschtheit, Schuldbewußtsein, Unterdrückung von Ärger und Aggression sowie versteckte Feindseligkeit (49, 50). Schutzfaktoren vor Hypertonie stellen z. B. eine intakte Familie, Ehepartner oder gut funktionierende Gemeinschaften, das heißt also sozioemotionaler Rückhalt, dar (15).

### 1.3.7. Veränderungen auf zellulärer und subzellulärer Ebene

Auch zelluläre Veränderungen spielen bei der Pathogenese der Hypertonie eine Rolle. Diese können im Bereich der Membranen auftreten, es können rezeptorvermittelte intrazelluläre Veränderungen in Erscheinung treten und auch die intrazelluläre Signalweiterleitung könnte verändert sein. Alle genannten möglichen Abweichungen haben für den intrazellulären Elektrolythaushalt Konsequenzen. Weil dieser pathogenetische Mechanismus der These der Arbeit zugrunde liegt, wird er nachfolgend näher betrachtet.

Der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration kommt eine entscheidende Bedeutung bei der Kontraktilität der Gefäßmuskeln zu. Bereits 1977 vermutete BLAUSTEIN (51), daß infolge einer intrazellulären Natriumakkumulation der membranständige  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher aktiviert wird. Nachfolgend kommt es dann zu einem Anstieg der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und dadurch zu einer Erhöhung der Wandspannung der glatten Gefäßmuskulatur. Die intrazelluläre Natriumkonzentration könnte hierbei durch digitalisähnliche Substanzen, sog. Ouabain-like factors, gesteigert werden. Letztere konnten im Plasma von essentiellen Hypertonikern vermehrt nachgewiesen werden (32).

Weiterhin könnte auch ein unspezifisch wirkender hypothalamischer Faktor mit einer völlig anderen Struktur, der nicht nur die  $\text{Na}^+$ -Pumpe in den Nieren-Tubuli, sondern auch in anderen Zellen blockiert, z. B. glatten Gefäßmuskelzellen, einen Einfluß auf o. g. Vorgänge haben (54).

Auch eine veränderte intrazelluläre Signalweiterleitung ist als pathogenetischer Faktor bei der Hypertonie in Betracht zu ziehen. SIFFERT et al. berichteten über eine Aktivierung der Pertussistoxin-sensitiven G-Proteine bei einem Teil der Hypertoniker (52). Diese Veränderung resultiert letztlich in einer Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

## 2. Der zelluläre Kalziumstoffwechsel

### 2.1. Bedeutung des Kalziums

$\text{Ca}^{2+}$  spielt bei der Kontraktion von glatten, quergestreiften sowie auch den Herzmuskelzellen eine entscheidende Rolle. Weiterhin hat  $\text{Ca}^{2+}$  neben anderen intrazellulären Ionen wie Natrium, Kalium und Magnesium eine besondere Bedeutung als „second messenger“.

ZIDEK et al. (84) haben zusammenfassend festgestellt, daß in zahlreichen Untersuchungen in verschiedensten Blutzellen von Hypertonikern (Erythrozyten, Lymphozyten, Thrombozyten) erhöhte intrazelluläre freie  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nachgewiesen wurden. Die Ursachen dafür sind noch nicht abschließend geklärt, vermutlich besteht ein veränderter transmembranöser  $\text{Ca}^{2+}$ -Transport oder eine verminderte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung.

Im Blutplasma liegen 60 % des  $\text{Ca}^{2+}$  proteingebunden vor, der Rest in freier ionisierter Form. Nur die freien  $\text{Ca}^{2+}$  spielen bei den nachfolgend betrachteten Membrantransportern und intrazellulären Signalweiterleitungen eine Rolle. Viele intrazelluläre Funktionen werden jedoch nicht durch freie  $\text{Ca}^{2+}$  gesteuert, sondern vom Kalzium-Calmodulin-Komplex beeinflusst.

In einer großen Zahl von Veröffentlichungen wurde eine inverse Beziehung zwischen der Höhe der oralen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einnahme bei Probanden und ihrem Blutdruck festgestellt (81). Der Mechanismus, wie exogenes  $\text{Ca}^{2+}$  den Blutdruck senkt, ist jedoch nicht klar. Möglicherweise spielen Parathormon und Vitamin  $\text{D}_3$  (1,25-Dihydroxycholecalciferol) dabei eine Rolle. Von MCCARRON et al. (81) wurde geschlossen, daß täglich eine Einnahme von ca. 400 bis 500 mg  $\text{Ca}^{2+}$  notwendig sei; unterhalb dieser Schwellendosis ist der Blutdruck erhöht.

SOWERS et al. (86) zweifeln allerdings die Studienergebnisse von MCCARRON et al. an. Die Arbeitsgruppe um SOWERS ist der Meinung, daß der 24-Stunden-Untersuchungszeitraum der o. g. Studien inadäquat ist und der Ausschluß von Probanden mit Hypertonie in der Familienanamnese die Untersuchungsergebnisse verfälscht hat. Außerdem würde bei Berücksichtigung von Alter und Gewicht die statistische Signifikanz verloren gehen. SOWERS et al. schlußfolgern, daß bei bestimmten Personengruppen, wie z. B. Älteren und Schwarzen, eine tägliche  $\text{Ca}^{2+}$ -Einnahme von 800 bis 1000 mg ein chronisches Defizit ausgleichen und die Kochsalz-induzierten Veränderungen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase korrigieren kann.

Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase wird durch die Funktion aktiver und passiver Carriersysteme geregelt. Durch CARAFOLI et al. (40) und KHALIL et al. (26) wurden die  $\text{Ca}^{2+}$ -bezogenen transmembranösen Carriersysteme dargestellt (Abb. 5):

## 2.2. Kalziumeintritt in die Zelle

$\text{Ca}^{2+}$  gelangt über verschiedene Wege in die Zelle (Abb. 5). Es sind folgende  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintrittswege durch die sarcolemmale Membran gefunden worden:

?? **Spannungsabhängige Kanäle:** Diese werden durch Membran-Depolarisation aktiviert. Man kennt derzeit 3 verschiedene Typen, die sich in ihren elektrophysiologischen Eigenschaften unterscheiden: L, N und T. Der L-Typ kann durch die sog.  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten blockiert werden.

?? **Rezeptor-gesteuerte Kanäle:** Diese werden durch die Wirkung von Agonisten aktiviert.

??  **$\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt durch mechanische Belastung:** BEVAN et al. (27) belegten einen gesteigerten  $\text{Ca}^{2+}$ -Eintritt als Reaktion auf mechanische Belastung.

?? **„ $\text{Ca}^{2+}$ -Leck“:** Außerdem wurde auch ein „Leck-Weg“ (28) beschrieben, der von den vorgenannten Faktoren unabhängig

ist. Dieser Eintrittsweg ist als  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom entlang des Konzentrationsgradienten, unabhängig von Depolarisation, Agonisten oder mechanischen Einwirkungen, definiert.

??  **$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher**: Obwohl die Hauptfunktion im Ausschleusen von  $\text{Ca}^{2+}$  besteht, kann dieser Transporter unter bestimmten Bedingungen  $\text{Ca}^{2+}$  in die Zelle einschleusen. Dabei werden drei  $\text{Na}^+$  gegen ein  $\text{Ca}^{2+}$  getauscht, der Transport erfolgt also nicht elektroneutral.

### 2.3. Kalziumaustritt aus der Zelle

Die Entfernung des  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle erfolgt über den  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und über einen ATP-abhängigen Transportmechanismus ( $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase) (40).

?? Der  **$\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher** ist ein leistungsfähiges membranständiges Protein von ca. 33 bis 70 kDa. Er kann derzeit noch nicht einwandfrei identifiziert werden, da noch kein eindeutiger Inhibitor des Austauschers bekannt ist. Der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher schleust drei  $\text{Na}^+$  ein, dafür wird ein  $\text{Ca}^{2+}$  nach extrazellulär befördert. Somit findet nicht nur ein Stoffaustausch statt, sondern es wird auch ein elektrochemischer Gradient aufgebaut.

?? Die  **$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase** der Plasma-Membran hydrolysiert ein ATP, um ein  $\text{Ca}^{2+}$  auszuschleusen. Dieser Austauscher kommt wahrscheinlich in allen Eukaryoten-Zellen vor. Weiterhin ist bekannt, daß er durch Calmodulin stimuliert werden kann.

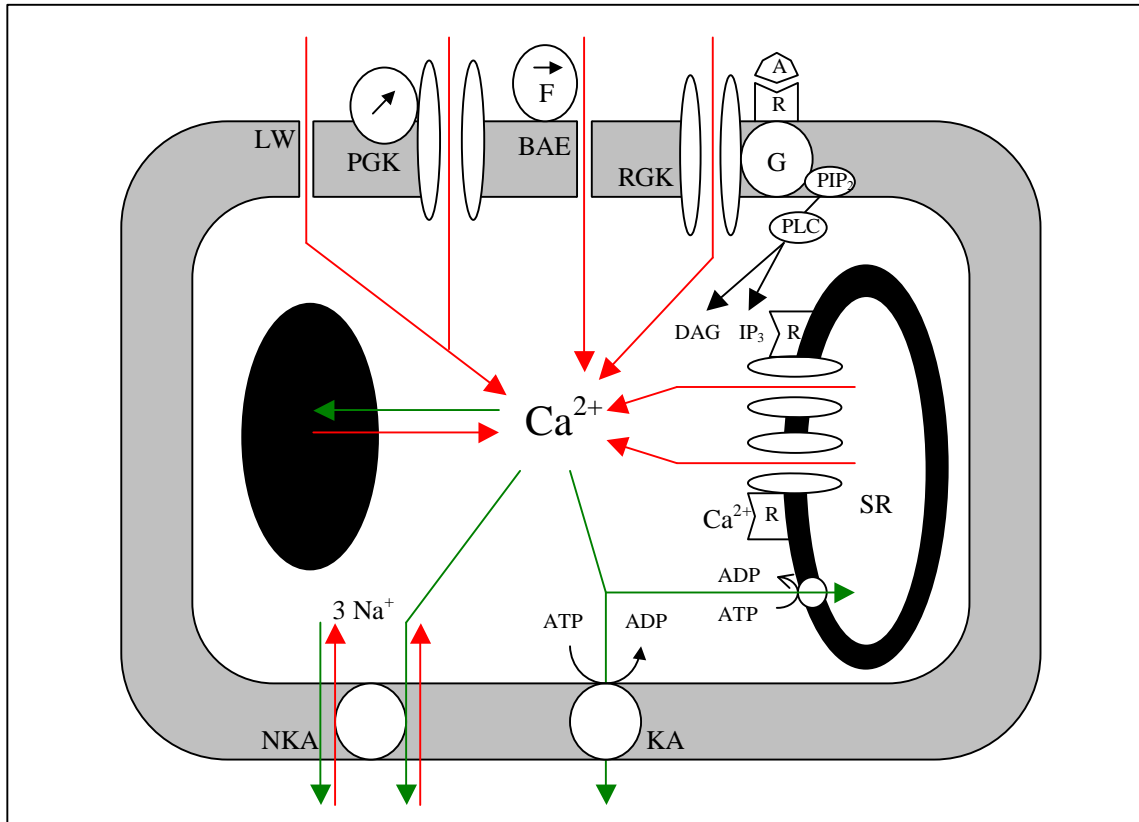


Abb. 5: Schematische Abb. der  $\text{Ca}^{2+}$ -Regulationsmechanismen in glatten Muskelzellen. Extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  gelangt durch passive Leckwege (LW), belastungsabhängige Eintrittswege (BAE), Potential-gesteuerte Kanäle (PGK) und rezeptorgesteuerte Kanäle (RGK) in die Zelle. Die intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Depots im sarkoplasmatischen Retikulum (SR) können durch Inositoltrisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) oder durch  $\text{Ca}^{2+}$  selbst entleert werden. Das erhöhte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  ist durch das SR gepuffert oder wird durch plasmalemmale  $\text{Ca}^{2+}$ -Pumpen und die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (KA) entfernt. Bei Auftreten hoher intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Level können der  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher (NKA) und die Mitochondrien (MIT) eine Rolle in der Aufrechterhaltung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase spielen. A: Agonist, R: Rezeptor, G: G-Protein,  $\text{PIP}_2$ : Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat, PLC: Phospholipase C, DAG: Diacylglycerol. Modifiziert nach: (97).

## 2.4. Kalzium-Stoffwechsel an mitochondrialen Membranen

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch an mitochondrialen und sarkoplasmatischen Membranen spielt eine wesentliche Rolle bei der Regulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase. Es findet eine aktive  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme aus dem Zytosol statt (26). In den Membranen der Mitochondrien existieren spezifische Transportmechanismen. Man kann verschiedene Ein- und Ausfuhrwege des  $\text{Ca}^{2+}$  unterscheiden:

?? Der  **$\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom** erfolgt mittels eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Uniporters, der durch das Membran-Potential angetrieben wird.

?? Der **Ca<sup>2+</sup>-Ausstrom** funktioniert als Ca<sup>2+</sup>-2H<sup>+</sup>- oder Ca<sup>2+</sup>-2Na<sup>+</sup>-Antiporter. Letzterer schleust in seiner mitochondrialen Form zwei Ca<sup>2+</sup> für ein hydrolysiertes ATP durch die Mitochondrienmembran (40). Da aber durch die niedrigere Kapazität des Ca<sup>2+</sup>-2Na<sup>+</sup>(2H<sup>+</sup>)-Antiporters der mitochondriale Ca<sup>2+</sup>-Spiegel immer mit dem zytosolischen Ca<sup>2+</sup>-Spiegel in Verbindung steht, ist es unwahrscheinlich, daß die Mitochondrien als physiologisches Ca<sup>2+</sup>-Reservoir dienen (26). Außerdem ist derzeit noch offen, ob das gebundene Matrix-Ca<sup>2+</sup> durch physiologische Effektoren der Ca<sup>2+</sup>-Freisetzung aus den Mitochondrien erhöht wird (40).

## **2.5. Kalzium-Stoffwechsel an sarkoplasmatischen Membranen**

Der Transport des Ca<sup>2+</sup> durch die Membranen des SR stellt einen Hauptregulator des zytosolischen freien Ca<sup>2+</sup>-Spiegels dar. Die sarkoplasmatischen Stoffwechselprozesse der Ca<sup>2+</sup> wurden durch KHALIL et al. (26) und CARAFOLI et al. (40) zusammenfassend dargestellt:



### 2.5.1. Steuerung

Für die Steuerung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausches durch die Membranen des SR sind zwei intrazelluläre second messenger,  $\text{IP}_3$  (1,4,5-Inositoltrisphosphat) und  $\text{Ca}^{2+}$ , verantwortlich.

??  $\text{IP}_3$  entsteht z. B. nach der Bindung von Norepinephrin an seinen Rezeptor durch Zerfall von Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat in  $\text{IP}_3$  und Diacylglycerol. Das entstehende Diacylglycerol aktiviert die Proteinkinase C,  $\text{IP}_3$  dagegen stimuliert die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung über Bindung an einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche des SR. Infolge dessen erhöht sich die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration.

?? Wenn die Konzentration des  $\text{Ca}^{2+}$  im Gebiet des SR einen bestimmten Wert übersteigt, beginnt die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung aus dem SR. Die Triggerschwelle kann durch  $\text{Mg}^{2+}$  erhöht werden.

Ein Einfluß von extrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  ist bei diesem Prozeß nicht notwendig, nur eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Gebiet des SR (26).

Es besteht die Vermutung, daß die  $\text{IP}_3$ -Freisetzung in Antwort auf die Aktivierung von Oberflächenrezeptoren auf dem SR eine Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  initiiert, dieses wird nachfolgend durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung verstärkt.

Zwei Mechanismen sind für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase des SR verantwortlich: die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, und  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom.

### 2.5.2. Kalzium-Einstrom in das Sarkoplasmatische Retikulum

In quergestreiften Muskeln und dem Herzen stammt der größte Teil des freigesetzten  $\text{Ca}^{2+}$  der Exzitationsphase aus dem SR.

?? Für den  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom ist die  **$\text{Ca}^{2+}$ -ATPase** verantwortlich.

Dieses ca. 105 kDa große Protein stellt einen Hauptbestandteil des SR dar. Für 1 Mol hydrolysiertes ATP werden 2 Mol  $\text{Ca}^{2+}$  aufgenommen. Das Transportprotein besteht aus katalytischen Bindungsplätzen und  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsplätzen im Verhältnis 1 : 2. Die Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  bewirkt über eine Zwischenform eine Konformationsänderung zur aktiven Proteinform. Alle Schritte sind vollständig reversibel, *in vitro* konnte eine ATP-Synthese induziert werden (40).

### 2.5.3. Kalzium-Ausstrom aus dem Sarkoplasmatischen Retikulum

Man hat festgestellt, daß der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom in quergestreiften Muskeln sehr viel schneller vonstatten geht als der Einstrom.

?? Deshalb ist das Vorliegen von  **$\text{Ca}^{2+}$ -Kanälen** wahrscheinlicher als ein carrier-verbundener enzymatischer Prozeß. Eine Öffnung der Kanäle verlangt als Voraussetzung eine geringe zytosolische  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration (dies erklärt somit die  $\text{Ca}^{2+}$ -induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung). Der Kanal wird durch mikromolare Konzentrationen an Nukleotiden, wie z. B. ATP, aktiviert und durch hohe Konzentrationen von  $\text{Mg}^{2+}$  und/oder  $\text{Ca}^{2+}$  inhibiert.

?? In glatten Muskeln ist wahrscheinlich ein  **$\text{IP}_3$ -regulierter  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal** in den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom eingebunden ( $\text{IP}_3$  ist für die Kontraktion von quergestreiften Muskeln zu langsam). Weiterhin enthalten glatte Muskelzellen ähnliche Kanäle wie der oben beschriebene  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal der quergestreiften Muskeln.

In den meisten glatten Muskeln können maximale Kontraktionen durch  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem SR unterstützt werden. Wenn das extrazel-

luläre  $\text{Ca}^{2+}$  jedoch entfernt wird, sind diese Kontraktionen nur von beschränkter Dauer. Somit kann man vermuten, daß die Erhaltung der Muskelspannung in weichen Muskeln vom langsamen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom, der über spannungsabhängige oder Rezeptor-gesteuerte  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle geregelt wird, abhängig ist (40).

## 2.6. Weiteres

Der  $\text{Ca}^{2+}$ -Austausch nach Stimulation findet nicht gleichmäßig statt. Es existiert ein kleiner, schnell austauschbarer Pool und ein großer, langsam austauschbarer Pool. Diese Theorie konnte in zahlreichen Untersuchungen bestätigt werden (74).

Es ist bemerkenswert, daß hinsichtlich des Kationen-Transportes Rassenunterschiede bestehen. In Plättchen der sog. afrikanischen Amerikaner wurden im Vergleich zu Weißen größere  $\text{Ca}^{2+}$ -Pools beobachtet. Dies könnte die größere Sensitivität dieser Gruppe auf vasoaktive Substanzen erklären (74).

KHALIL et al. (26) diskutieren die Existenz einer sog. oberflächlichen Puffer-Barriere. Diese soll bei langsamem Eintritt von  $\text{Ca}^{2+}$  ein sofortiges Ansteigen des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels verhindern.

### 3. Der NHE in der Pathogenese der Hypertonie

Der Gefäßtonus der peripheren Blutgefäße wird maßgeblich durch die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bestimmt. Die zelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase unterliegt einer Vielzahl von Regelmechanismen, sie kann dabei auf zellulärer Ebene durch die Größe des  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstromes, die Speicherung bzw. Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus den intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Speichern und den  $\text{Ca}^{2+}$ -Ausstrom beeinflusst werden. Auf die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase wurde in Kapitel 2 eingegangen.

Bei einem Vorliegen pathophysiologischer Bedingungen kann der intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt über das normale Level hinaus ansteigen und somit zu einer verstärkten Kontraktion der glatten Gefäßmuskulatur und zum Widerstandshochdruck führen (26).

Eine mögliche Regelgröße für die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE). Dieses Protein, dessen Isoform 1 in eukaryoten Zellen ubiquitär verbreitet ist, unterliegt einer umfangreichen intrazellulären und systemischen Regulation. Es tauscht ein extrazelluläres  $\text{Na}^+$  gegen ein intrazelluläres  $\text{H}^+$  aus (18).

In der Literatur wird seit längerer Zeit eine mögliche Übereinstimmung des NHE mit dem  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$ -Austauscher diskutiert. Derzeit ist aber noch nicht abschließend geklärt, ob der Austausch eines  $\text{Na}^+$  gegen ein  $\text{Li}^+$  nur ein spezieller Transportmodus des NHE ist, oder ein völlig anderes Transportsystem darstellt (53). Die beiden Austauscher-Varianten weisen eine hohe Ähnlichkeit auf, allerdings ist der  $\text{Na}^+$ - $\text{Li}^+$ -Austausch nicht Amilorid-sensibel.

Hypertoniker (bzw. eine Subgruppe dieser Patienten) weisen eine gesteigerte Aktivierbarkeit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  auf (52). Es gibt Hinweise, daß der NHE-1 maßgeblich daran beteiligt ist.

### 3.1. Eigenschaften, Vorkommen und Einteilung des NHE

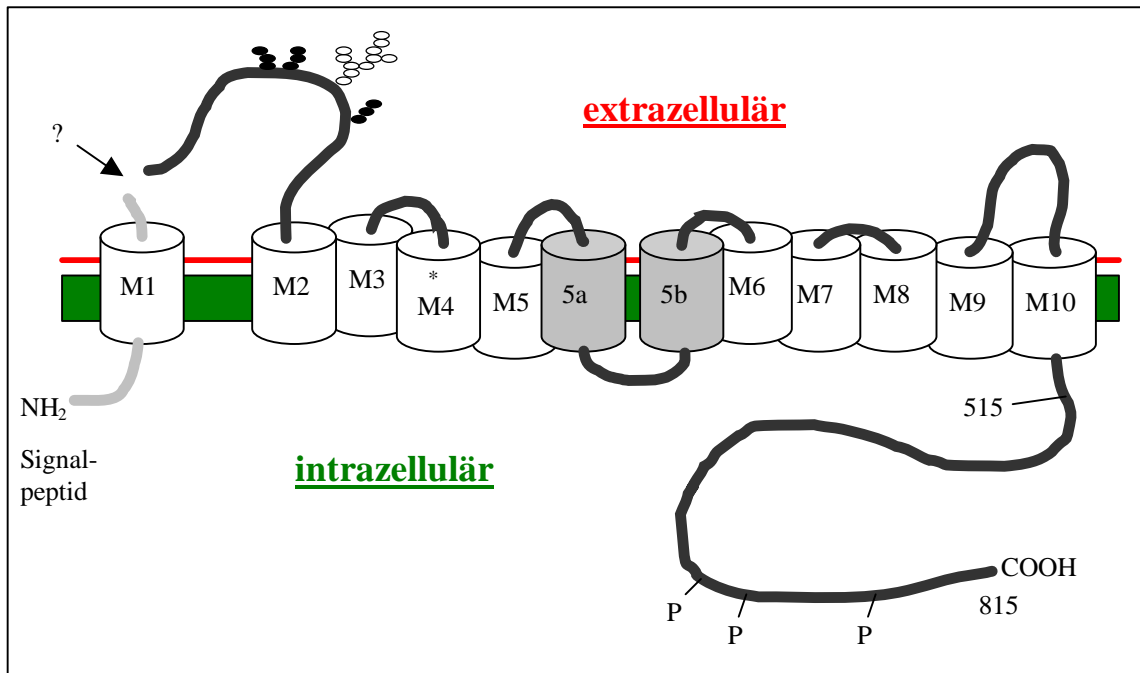


Abb. 6: Strukturelle Eigenschaften des NHE-1: Der NHE-1 ist ein Membranprotein, bestehend aus 815 Aminosäuren, die in zehn bis zwölf transmembranösen Domänen (ca. 500 Aminosäuren) und einer zyttoplasmatischen Domäne (ca. 315 Aminosäuren) angeordnet sind. Das Signalpeptid ist vermutlich M1. O-verbundene (☞) und N-verbundene (O) glykosylierte Reste sind in der ersten extrazellulären Schleife zwischen M1 und M2 angeordnet. Die Interaktion mit Amilorid erfolgt wahrscheinlich über M4 (\*). M5a und M5b sind vermutlich für den katalytischen Transport von  $H^+$  und  $Na^+$  verantwortlich. Modifiziert nach (18)

NHE sind transmembranöse Transportproteine, die aus ca. 800 Aminosäuren bestehen. Sie tauschen ein extrazelluläres  $Na^+$  ( $[Na^+]_{ec}$ ) gegen ein intrazelluläres Proton ( $[H^+]_{ic}$ ) elektro-neutral aus. Die Energie dafür stammt aus dem einwärts gerichteten  $Na^+$ -Gradienten, der durch die  $Na^+$ - $K^+$ -ATPase aufgebaut wird (Abb. 6).

Die Aktivität des NHE kann durch Hormone, Wachstumsfaktoren und viele andere extrazelluläre Stimuli reguliert werden. Alle Isoformen sind, wenn man sie in Austauscher-freien Fibroblasten exprimiert, durch intrazelluläre Wasserstoffionen aktivierbar, können den intrazellulären pH  $Na^+$ -abhängig regulieren und sind durch Amilorid und 5-Amino-Derivate inhibierbar (18).

Die Steuerung des NHE erfolgt aber auch über intrazelluläre und systemische Regulation. In der Zelle vermutet man das Vorliegen einer NHE-Kinase, die den NHE phosphoryliert. Weiterhin spielen  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin und G-Proteine (s. S. 33) eine Rolle. Systemisch kann der NHE durch Insulin und den pH-Wert reguliert werden, ebenfalls spielt die NaCl-Aufnahme eine Rolle (20).

Zur Zeit kennt man fünf Isoformen des NHE: NHE-1, NHE-2, NHE-3, NHE-4 und  $\beta$ -NHE (Tab. 2).

Geklonte Isoform	Spezies
NHE-1	Mensch, Kaninchen, Ratte, Hamster, Schwein
NHE-2	Ratte, Kaninchen
NHE-3	Ratte, Kaninchen
NHE-4	Ratte
$\beta$ -NHE	Forelle

Tabelle 2: Vorkommen der bisher bekannten Isoformen des NHE (18).

Die oben erwähnten Isoformen liegen in den einzelnen Organen unterschiedlich gehäuft vor. Die Isoform 1 der NHE-Familie ist jedoch ubiquitär verbreitet.

### 3.2. NHE und Pathophysiologie der Hypertonie

An dieser Stelle soll nur auf die mögliche Beteiligung des NHE-1 an der Pathogenese der Hypertonie eingegangen werden. Bei hypertensiven Patienten wurde in einer Anzahl von Untersuchungen eine Aktivitätssteigerung des NHE (insbesondere in Thrombozyten, Lymphozyten, Granulozyten, Erythrozyten, quergestreifter Muskulatur) gefunden (53). Durch die gesteigerte Aktivität des NHE-1 ist somit eine erhöhte intrazelluläre  $\text{Na}^+$ -Konzentration erklärbar.

Durch ROSSKOPF et al. wurden folgende wesentliche Mechanismen, in denen der NHE-1 in der Pathogenese der Hypertonie eine Rolle spielen könnte, zusammengefaßt (53):

- ?? Bei Aktivitätssteigerung des NHE-1 verschiebt sich der  $pH_i$  durch eine höhere intrazelluläre Natriumionenkonzentration und eine gesteigerte Ausschleusung von Wasserstoffionen in den alkalischen Bereich. So war in der Untersuchung durch IZZARD et al. (55) der  $pH_i$  in nichtkontrahierten glatten Muskelzellen von Hypertonikern und Normotonikern im Ruhezustand gleich, nach Stimulation mit Norepinephrin in den Zellen der Hypertoniker jedoch alkalischer.
- ?? Weiterhin wäre eine Verstärkung der Wirkung vasokonstriktorischer Hormone denkbar. Trotz quantitativ unverändertem Hormon-output könnten sich durch eine NHE-1-vermittelte Alkalisierung des Intrazellulärraumes bestimmte Rezeptoreigenschaften verändern.
- ?? Die ehemalige Hypothese, daß die NHE-Aktivitätssteigerung der vermutete Defekt in der renalen  $Na^+$ -Balance als Ursache der vermehrten  $Na^+$ -Absorption sein könnte (56), ist heute nicht mehr aktuell, da alle bisher gezeigten Veränderungen die Isoform 1 des NHE betreffen, welche jedoch nach bisherigem Erkenntnisstand nicht am epithelialen  $Na^+$ -Transport beteiligt ist.
- ?? Die hypertoniebedingten strukturellen Veränderungen (Media-Hypertrophie/-plasie, linksventrikuläre Hypertrophie) wurden ursprünglich als adaptiv angesehen. Es ergaben sich jedoch Hinweise für das Vorhandensein druckunabhängiger Faktoren, die zum Wachstum der glatten Gefäßmuskeln und der linksventrikulären Muskelmasse beitragen. BERK et al. (57) konnten bei Spontan Hypertensiven Ratten eine deutlich gesteigerte Replikation der glatten Muskelzellen im Gegensatz zu normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten nachweisen. Dies war von einer erhöhten Aktivität des NHE-1 in Spontan Hypertensiven Ratten begleitet.
- ?? Verschiedene Faktoren lassen einen Teil der Blutdruckvariabilität auf erbliche Einflüsse zurückführen. Man kennt

verschiedene sog. Kandidatengene, welche potentiell zur Veränderung des Merkmals Blutdruck führen können. Zu diesen gehört auch das Gen des NHE-1. Obwohl auch in anderen Untersuchungen (22, 111) eine Aktivitätssteigerung des NHE-1 an immortalisierten Zellen mit Kultivierung über mehrere Monate gezeigt wurde, ist die genetische Determinierung der NHE-1-Aktivitätssteigerung nach wie vor umstritten. So konnten LIFTON et al. 1991 eine primäre Alteration des Austauschergens weitgehend ausschließen (110). Deshalb muß eine Aktivitätssteigerung weiter proximal im intrazellulären Regulationssystem, z. B. im Bereich der G-Proteine, gelegen sein (112). Eine Bestätigung dieser These fanden SIFFERT et al. 1995, als sie an Pertussistoxin-sensitiven G-Proteinen eine erhöhte rezeptorvermittelte Aktivierbarkeit feststellten (52).



## 4. Intrazelluläre Signalweiterleitung und NHE-1

Die hormonelle Regulation von Stoffwechselprozessen erfolgt über einen hormonspezifischen Rezeptor. Die Bindung eines Hormons an seinen Rezeptor führt zu einer Konformationsänderung mit nachfolgender Modifikation der Signalweiterleitung. Dabei können die verschiedenen Rezeptortypen unterschiedliche Reaktionen bewirken:

- ?? Der aktivierte Rezeptor ist ein Enzym und katalysiert die Phosphorylierung von Tyrosinresten in Zielproteinen (z. B. Insulin).
- ?? Die Hormonbindung führt zur Veränderung von Ionenkanälen, so bewirken Neurotransmitter eine Veränderung der intrazellulären Ionenkonzentrationen.
- ?? G-Protein-gesteuerte Freisetzung von second messengern durch Bindung des Hormons an den Rezeptor.

Bei letzterem Rezeptortyp ändert der Rezeptor nach Kontakt mit dem Hormon seine Konformation und löst so eine intrazelluläre Signalkette aus, an deren Beginn oft ein sog. second messenger (z. B. cAMP, cGMP, IP<sub>3</sub>, Kalzium-Calmodulin, Diacylglycerol) steht. Hormone, die Enzyme durch cAMP oder cGMP aktivieren oder hemmen, wirken über Aktivierung einer membrangebundenen Adenyl- bzw. Guanylcyclase.

Der Signalweg beginnt mit der Bindung des Hormons an seinen spezifischen Rezeptor. Die Übertragung des Signals vom Hormonrezeptor zur Cyclase erfolgt wiederum über ein zwischengeschaltetes GTP-abhängiges G-Protein (= guanylnucleotidbindendes Protein), welches als Regulatorprotein wirkt. Man kennt stimulierende und inhibierende G-Proteine. G-Proteine bestehen aus drei verschiedenen Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ). Auf der Grundlage ihrer Aminosäuren unterteilt man die  $\alpha$ -Untereinheiten in vier Klassen: 1.)  $\alpha_s$ , 2.)  $\alpha_o$  und  $\alpha_1$ , 3.)

$\alpha$ ,  $\beta_{11}$  und  $\beta_{15/16}$  und 4.)  $\beta_{12}$  und  $\beta_{13}$ . Weiterhin kennt man fünf verschiedene Isoformen der  $\alpha$ - und elf Isoformen der  $\beta$ -Untereinheiten (21).

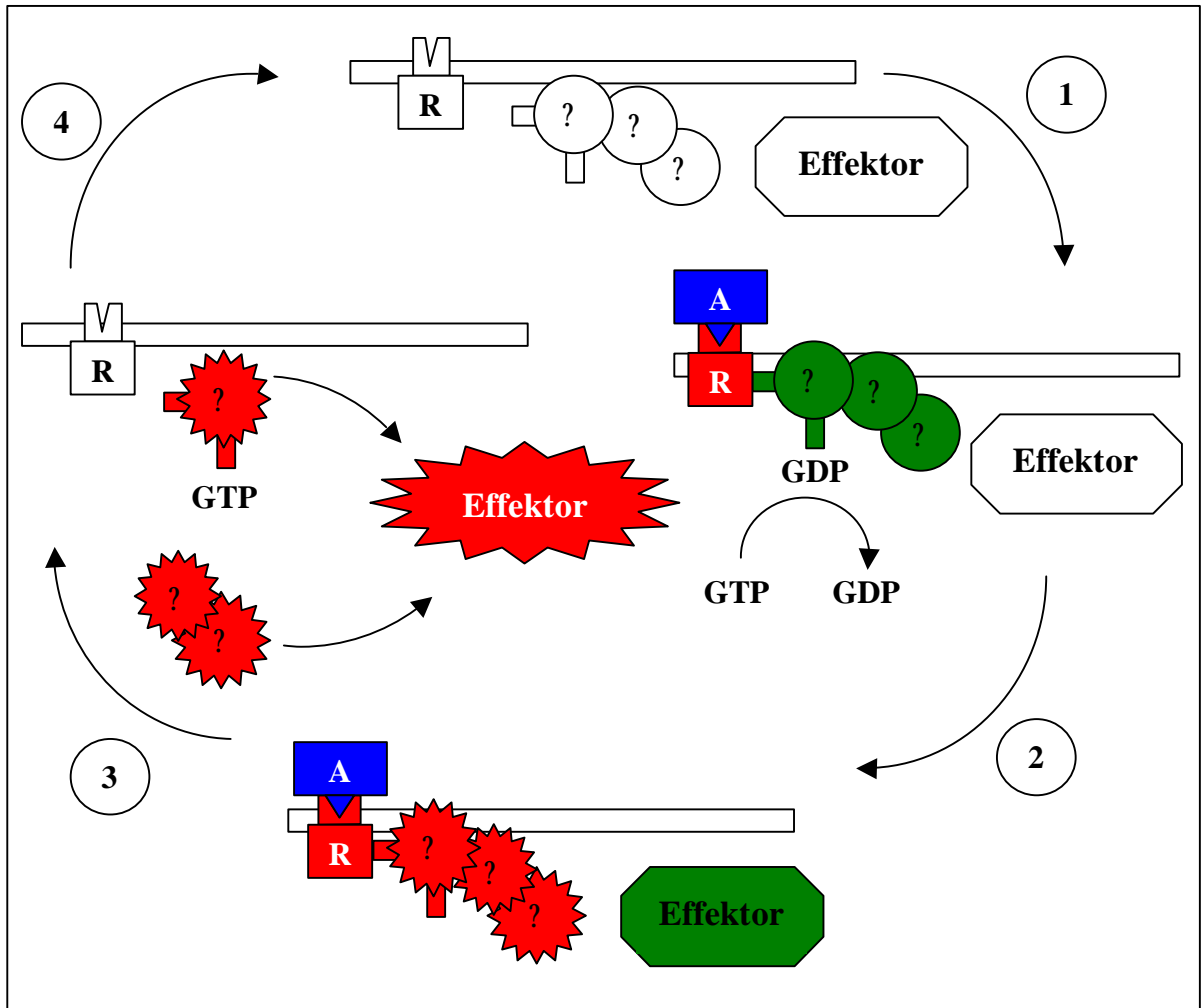


Abb. 7: Aktivierungs-/Deaktivierungs-Zyklus der G-Proteine. Nach Stimulation mit einem entsprechenden Agonisten (A) vollzieht der gekoppelte Rezeptor (R) eine Konformationsänderung und reagiert mit der  $\alpha$ -Untereinheit, welche GDP im Austausch mit GTP freisetzt (Schritt 1). Das G-Protein ist jetzt aktiviert (Schritt 2), die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit und die freigesetzte  $\beta\gamma$ -Untereinheit können mit intrazellulären Effektoren interagieren (Schritt 3). Durch ihre intrinsische GTPase-Aktivität wird an die  $\alpha$ -Untereinheit gebundenes GTP zu GDP hydrolysiert. Die  $\alpha$ - und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit verbinden sich wieder, damit ist der Aktivierungskreislauf der G-Proteine beendet (Schritt 4). Modifiziert nach: (21).

G-Proteine kommen in einer GDP- und einer GTP-Form vor. Die GTP-Form aktiviert die Adenylat-Cyclase, die GDP-Form nicht. Ohne Hormonwirkung liegt fast das gesamte G-Protein in der inaktiven GDP-Form vor. Die Hormonbindung an den Rezeptor

bewirkt den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP, gleichzeitig dissoziiert die  $\beta$ -Untereinheit mit dem GTP von der  $\gamma$ -Untereinheit ab. Die Beendigung der Aktivierung erfolgt über die GTPase-Aktivität des G-Proteins, welches das gebundene GTP langsam zu GDP hydrolysiert (Abb. 7).

Die Aktivierung der Adenylat-Cyclase durch Bindung eines Hormons an seinen spezifischen Rezeptor wird somit von  $G_s$ , dem stimulatorischen G-Protein, vermittelt. Ein einziger Hormon-Rezeptor-Komplex katalysiert die Bildung vieler  $G_s$ -Moleküle. Die Hydrolyse des an die  $\beta$ -Untereinheit von  $G_s$  gebundenen GTP beendet die Aktivierung der Adenylat-Cyclase.

Eine Modulation der Signalwege kann u. a. durch einen Anstieg der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration verursacht sein. An der Regulation letzterer sind zahlreiche Ionenkanäle (z. B.  $Ca^{2+}$ -Kanäle,  $K^+$ -Kanäle) und Austauscher (z. B. der NHE, die  $Na^+$ -ATPase,  $Ca^{2+}$ -ATPasen) beteiligt (s. o.).

BLAUSTEIN vermutete als Ursache einer erhöhten intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration eine erhöhte intrazelluläre  $Na^+$ -Konzentration (51).

Eine langfristige Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird vor allem durch eine veränderte Aktivität intrazellulärer Signalsysteme durch vermehrte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern verursacht. Diese signalvermittelte Beeinflussung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird durch Rezeptoren für vasokonstriktorische Substanzen und mechanosensitive Rezeptoren, die zum Teil an G-Proteine der Membran gekoppelt sind, ausgelöst. Gleichzeitig werden die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration und die Aktivität einzelner Transportsysteme durch intrazelluläre feed-back-Mechanismen reguliert. G-Proteine können dabei, wie oben erwähnt, auch eine inhibierende Wirkung ausüben.

Besondere Bedeutung für die Signalübermittlung hat die Protein-Kinase C, da ihre Aktivierung über die Phospholipase C und Diacylglycerol (DAG) eine langfristige Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkt und damit für die tonischen Phasen der Gefäßmuskelkontraktion verantwortlich ist. Die Proteinkinase C stimuliert auch den NHE, der für die Konstanthaltung von Zellvolumen und intrazellulärem pH verantwortlich ist. Die Aktivierung des NHE-1 führt zu einem erhöhten Protonenausstrom aus den Zellen, damit kommt es in der Zelle zu einem Anstieg von pH-Wert und  $\text{Na}^{+}$ -Konzentration. Dadurch kommt es wiederum zur  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung und zur Stimulation von Wachstumsfaktoren. Näheres s. Kapitel 3. Die Fülle der zellulären und subzellulären Veränderungen, meist nur für einzelne Zelltypen beschrieben, läßt eine Wirkung auf lokaler Ebene nur schwer abschätzen.

## 5. Zielstellung

Die essentielle Hypertonie ist eine multifaktorielle Erkrankung, die auf dem Boden einer polygenen Prädisposition unter dem Einfluß von exogenen Faktoren zu einem manifesten Blutdruckanstieg führt. Bei der Aufklärung möglicher Pathomechanismen bei der Entstehung der essentiellen Hypertonie stehen in dieser Arbeit Phänotypen mit einer veränderten intrazellulären Signalweiterleitung und intrazellulär erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen im Blickpunkt.

Es gibt Hinweise, daß essentielle Hypertoniker eine gesteigerte Aktivität des NHE (Isoform 1) aufweisen, wobei eine Mutation des Gens oder eine Überexpression des Austauscher-moleküls nicht nachgewiesen wurden (22). Vielmehr ist eine erhöhte Austauscheraktivität durch Veränderung der intrazellulären Signalweiterleitung denkbar. SIFFERT et al. bestätigten diese Hypothese durch die Messung erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale nach Stimulation mit vasoaktiven Substanzen an immortalen Zelllinien hypertensiver Patienten (52). Die gemessenen Effekte sind dabei G-Protein-vermittelt und möglicherweise genetisch determiniert. Auch andere Autoren/Untersucher wiesen eine erhöhte NHE-Aktivität bei Hypertonikern an Erythrozyten, anderen Blutzellen und Fibroblasten nach (53, 62, 63).

Die Meßdaten bei Hypertonikern lassen die Schlußfolgerung zu, daß die Veränderung der intrazellulären Signalweiterleitung bzw. der Aktivität des NHE nicht auf alle Hypertoniker gleichermaßen zutrifft, sondern Subgruppen existieren müssen, die u. a. durch eine gesteigerten Aktivierbarkeit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  charakterisiert sind. Die Aussagekraft der Daten ist jedoch begrenzt, weil die Studien entweder an

zahlenmäßig relativ kleinen Patientenkollektiven durchgeführt wurden, die definitiv schon nach dem Vorhandensein einer hohen oder niedrigen Austauschaktivität selektiert worden waren, oder es wurden für die Patienten andere Selektionskriterien angewendet, die den Informationsgehalt einschränkten.

Vor diesem Hintergrund bestand die wesentliche Aufgabe dieser Arbeit darin, die Prävalenz einer erhöhten Signalweiterleitung in einem Kollektiv essentieller Hypertoniker zu bestimmen. Als Äquivalent für die intrazelluläre Signalweiterleitung wurde die Aktivierbarkeit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  bei Stimulation mit vasoaktiven Substanzen angesehen. Einziges Einschlußkriterium für die Untersuchungen war das Vorliegen einer medikamentös behandelten essentiellen Hypertonie. Zum Vergleich sollten die Messungen auch in einer normotensiven Kontrollgruppe durchgeführt werden.

Wir führten eine Querschnittsstudie bei Patienten einer allgemeinärztlichen Praxis durch, die normotensiven Kontrollpersonen wurden überwiegend aus dem Klinikpersonal rekrutiert. Von allen Teilnehmern der Studie wurden nach einer einmaligen peripheren Blutabnahme Lymphozyten kultiviert und anschließend die Aktivierbarkeit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration gemessen.

Dazu war es erforderlich, zunächst Referenzwerte für eine „normale“ intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Signal-Erhöhung nach Stimulation zu ermitteln. Weiterhin wollten wir prüfen, ob eine gesteigerte Aktivierbarkeit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  mit Geschlecht, Alter oder Body Mass Index der Patienten oder anderen Faktoren, wie einer antihypertensiven Medikation oder paraklinischen Meßwerten, korreliert.

## 6. Patientenauswahl und Methodik

### 6.1. Studiendesign

Das Design unserer Querschnittsstudie ist in Abb. 8 dargestellt. Die Probanden rekrutierten wir aus dem Patientengut einer Greifswalder Gemeinschaftspraxis und aus Freiwilligen des Klinikpersonals sowie Studenten der Universität in Greifswald. Zuerst ermittelten wir aus den an der Studie interessierten Probanden die Hypertoniker. Die Probanden, die keine Hypertonie aufwiesen, bildeten die Kontrollgruppe. Aus dieser wurden später die Vergleichswerte ermittelt.

Die Diagnose „Hypertonie“ wurde durch die Voruntersuchungen der Praktischen Ärzte gestellt, denen die Patienten schon mindestens ein Jahr vor Eintritt in die Studie als hypertensiv bekannt waren und die bereits eine entsprechende antihypertensive Therapie erhielten. Weiterhin wurden Patienten ausgeschlossen, die eine sekundäre Hypertonie aufwiesen. Laut unserer Hypothese wollten wir nur essentielle Hypertoniker untersuchen.

Nach eingehender Information der verbleibenden Probanden über die Durchführung, die Ziele und die datenschutzrechtlichen Belange der Studie wurden die anamnestische Befragung der Probanden (Erhebung der Hypertonie-Anamnese, Familienanamnese), die Blutdruckmessungen und die Abnahme von 15 ml Blut durchgeführt.

Aus den Blutproben der Probanden wurden die Lymphozyten isoliert und angezüchtet (s. Kap. 6.3.), sowie andere Laborparameter wie  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , Osmolalität, Kreatinin, Glucose, Harnsäure, Gesamtcholesterin und Triglyceride erhoben. Die Lymphozyten einiger Probanden ließen sich nicht anzüchten, diese Probanden wurden von der Studie ausgeschlossen.

An den kultivierten Zellen wurden die erforderlichen Messungen (s. u.) durchgeführt.

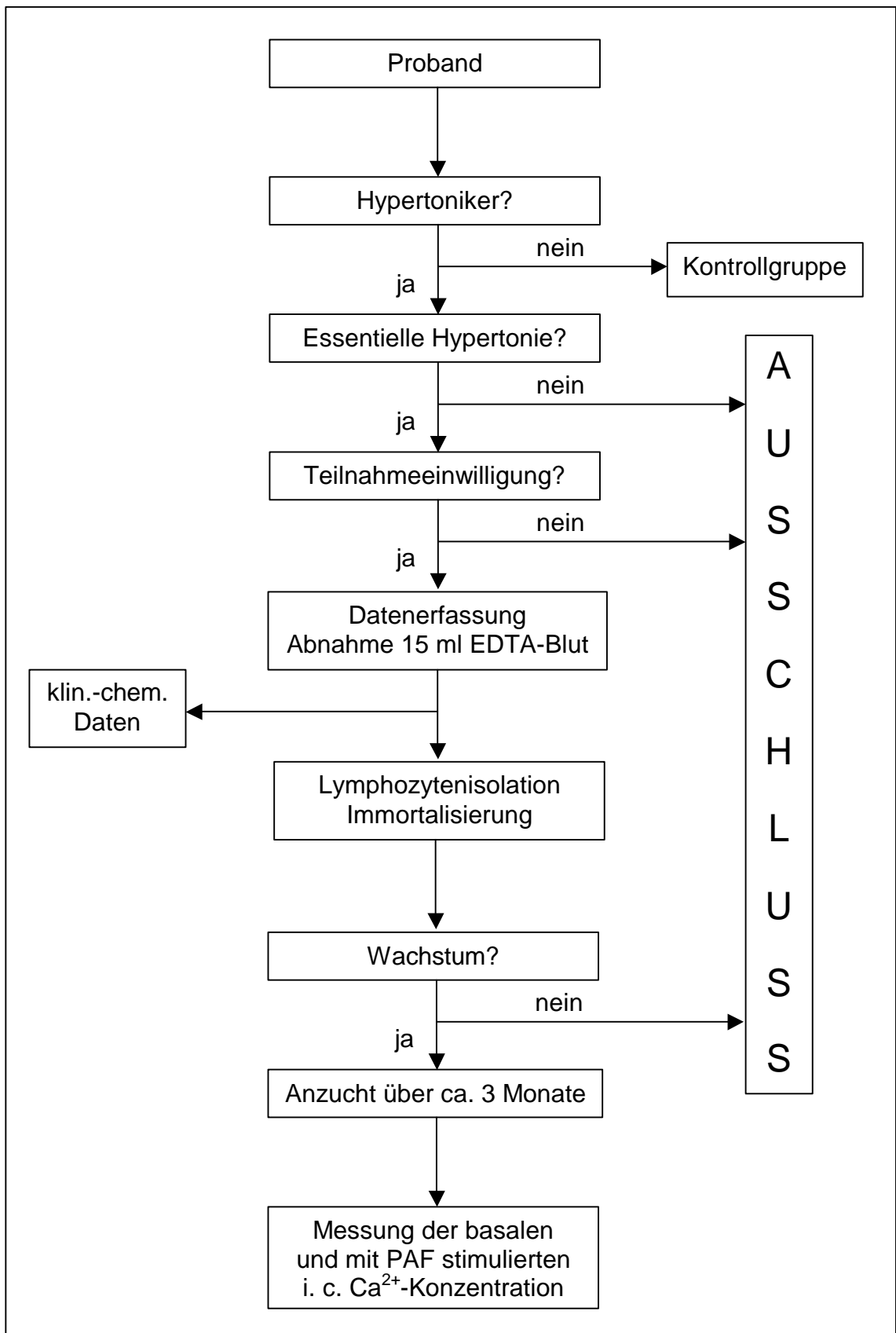


Abb. 8: Studiendesign.



## 6.2. Versuchspersonen

In einer Gemeinschaftspraxis von zwei Greifswalder Praktischen Ärzten bzw. der Inneren Klinik der Universität zu Greifswald wurden die Blutentnahmen, die Messungen der Körpermaße sowie die Blutdruckmessungen durchgeführt.

Letztere wurden nach einer Ruhephase von 15 Minuten in sitzender Position mit Hilfe des Blutdruckmeßgerätes 90207 Version 2.04.00 der Firma SpaceLabs Medical (Redmond, USA) ausgeführt. Im Mittel fanden zehn Messungen in Intervallen von zwei Minuten statt. Am Tag der Blutabnahme für die Zellkultivierung wurden auch alle anderen dargestellten Werte (klinisch-chemische Parameter und Blutdruckdaten) erhoben.

Nach der Blutdruckmessung erfolgte nach kurzer venöser Stauung (30 s) die Abnahme von 15 ml peripher-venösem Blut. Hierzu wurden Sarstedt-Monovetten verwendet, welche mit EDTA zur Gerinnungshemmung vorbereitet waren. Die Abtrennung der Lymphozyten aus dem Blut, die Immortalisierung und Kultivierung der Zellen und die sich anschließenden Messungen erfolgten im biochemischen Forschungslabor der Medizinischen Klinik der Universität zu Greifswald durch unsere Arbeitsgruppe.

Die Bestimmung der anderen Serumparameter ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , Osmolalität, Kreatinin, Glucose, Harnsäure, Gesamtcholesterin, Triglyceride) und der Urinparameter ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , Osmolalität, Kreatinin, Mikroalbumin) wurde im Zentrallabor der Greifswalder Universität mit den üblichen Standardmethoden durchgeführt. Die Blutproben der hypertensiven Probanden aus der Praxis der niedergelassenen Ärzte wurden innerhalb von zwei Stunden der Untersuchung im Labor zugeführt.

Die hypertensiven Probanden (initial 106) wurden dem Patientengut von zwei Praktischen Ärzten aus Greifswald, die an einer Querschnittsstudie über die Epidemiologie und den Verlauf der Hypertonie im Gebiet von Greifswald beteiligt wa-

ren, selektiert. Als Bedingung stellten wir eine ärztlich diagnostizierte essentielle Hypertonie, die medikamentös therapiert wurde und länger als ein Jahr bekannt war. Ausschlußkriterien wie ein bestimmtes Alter, Geschlecht, Body Mass Index oder anderen Einflußgrößen (z. B. Begleiterkrankungen) bestanden nicht.

Die normotensiven Versuchspersonen rekrutierten sich überwiegend aus dem Personal der Klinik für Innere Medizin und dem Labor der Universität zu Greifswald. Als Einschlußkriterium galt, daß zu keinem vorhergehenden Zeitpunkt eine Hypertonie diagnostiziert worden war und keine antihypertensiven Medikamente eingenommen wurden. Vor Einschluß in die Studie wurden unter standardisierten Bedingungen Blutdruckmessungen durchgeführt. Betreffs der Familienanamnese berichtete nur eine normotensive Versuchsperson über das Vorkommen der Hypertonie bei seinen Eltern. Die Probanden dieser Gruppe waren nach eigenen anamnestischen Angaben gesund, standen unter keiner besonderen Diät und waren normalgewichtig.

### 6.3. Immortalisierung von B-Lymphozyten aus menschlichem Blut

In Anlehnung an das von WALLS et al. (23) und ROSSKOPF et al. (22) bereits früher beschriebene Verfahren wurde die Immortalisierung der B-Lymphozyten durchgeführt.

#### 6.3.1. Materialien

Material	Hersteller
RPMI 1640 ohne Glutamin	Fa. Gibco, Kat.Nr. 31870-025
Lymphocyte Separation Medium, Dichte 1.077 g/ml	Boehringer Mannheim Kat.Nr. 295949
fetales Kälberserum (FKS)	Fa. Gibco, Kat.Nr.10500-064
Penicillin-Lösung 10 000U/ml	Fa. Gibco, Kat.Nr.15140-114
L-Glutaminlösung 200 mM	Fa. Gibco, Kat.Nr. 25030-024
	Fa. Molecular Probes Kat. Nr. F-1221
Platelet Activating Factor (PAF) (Molgew. 523.7)	Fa. Calbiochem, Kat. Nr. 511075
Gefrierschutzmedium mit DMSO	Fa. Gibco, Kat. No 11101-011
HBSS Hank's Balanced Salt Solution	
EDTA	Fa. Sigma, Kat. Nr. E 4378
Triton X-100	Fa. Ferak, Kat. Nr. 501104
	Deutsche Sammlung von Mikro- organismen und Zellkulturen GmbH

Tabelle 3: Verwendete Materialien.

### **6.3.2. Geräte**

?? Zentrifuge: Labofuge 400 Fa. Heraeus mit ausschwingendem Rotor, Radius 10 cm

?? Costar-Mikrozentrifuge mit Rotor für Eppendorfröhrchen, Radius 2.5 cm

?? Zellcounter Casy TT der Fa. Schaerfe

?? Brutschrank NU 4500 (water jacketed incubator), Fa. Nuair

?? Luminometer LS 50B der Fa. Perkin Elmer

### **6.3.3. Gewinnung der Lymphozyten aus venösem Blut**

Das gewonnene Blut wird nach Gerinnungshemmung mit EDTA im Verhältnis von 1:1 mit inkomplettem Medium (RPMI 1640 ohne Glutamin, Streptomycin, Penicillin oder FKS) verdünnt. Das verdünnte Blut wird anschließend über Lymphozytentrennmedium der Dichte 1.077 g/ml im Volumenverhältnis von 1:1 geschichtet. Nach 30minütiger Zentrifugation bei 250 g erfolgt die Isolation des Lymphozytenringes. Abschließend werden die Zellen dreimal mit inkomplettem Medium RPMI 1640 (die Volumenverhältnisse von Medium zu Zellsuspension betragen dabei etwa 10:1) gewaschen. Die Separation der Zellen erfolgte dabei nach jeweils zehnminütiger Zentrifugation bei 250 g.

### **6.3.4. Transformation der Lymphozyten**

#### **6.3.4.1. Herstellen der Virussuspension**

Die Virussuspension wird aus der Marmoset-Blutleukozyten-Zelllinie B95-8 hergestellt, welche hohe Titer transformierender EBV in den Überstand abgibt. EBV sind zellspezifisch für B-Lymphozyten, eine Infektion anderer Zellen kann ausgeschlossen werden. Die Anzucht der Zelllinie B95-8 erfolgt entsprechend der Vorschrift für die Lymphozytenkultivierung bis zu einer Zelldichte von ca.  $1 \times 10^6$ /ml. Danach belässt man

die Suspension 10 Tage ohne Passage im Brutschrank, in dieser Zeit sterben die Zellen ab und setzen Viren frei. Die Abtrennung des Überstandes von festen Zellfragmenten erfolgt durch 10minütige Zentrifugation bei 250 g. Danach wird der Überstand filtriert (0.45 µm-Filter bei 450 g über mindestens 10 min zentrifugieren). Anschließend wird das Filtrat erneut bei 450 g über 10 Minuten zentrifugiert. Hierbei erfolgt gegebenenfalls eine zweite Filtration. Nach Portionierung des Filtrates kann das Material zur Transformation verwendet werden. Es ist bei -80 °C ca. 3 Monate verwendbar.

#### 6.3.4.2. Transformation der B-Lymphozyten

Für die Anzucht und die Kultivierung verwendet man stets komplettes Medium (RPMI 1640 + 10 % (v/v) FKS + 100 U/ml Penicillin + 2 mmol/l Glutamin). Die Inkubation der Zellen erfolgt immer bei 37°C, 95 % Feuchte und 5 % CO<sub>2</sub>. Zur Transformation der B-Lymphozyten wird die Virussuspension zuerst im Verhältnis von 1 : 1 mit komplettem RPMI gemischt. Die Zellzahl der frisch präparierten B-Lymphozytensuspension soll bei der Transformation  $1 \times 10^6$ /ml betragen. Das erforderliche Volumen an Lymphozytensuspension wird zehn Minuten bei 250 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und mit der Virussuspension resuspendiert. Anschließend inkubiert man die Suspension 24 h im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Feuchte. Das Gesamtvolumen bei der Transformation soll zwischen 3 und 5 ml liegen, 2 ml werden für das weitere Prozedere benötigt. Nach der Inkubation zentrifugiert man 5 Minuten bei 700 g und saugt den Überstand vollständig ab. Danach wird das Material mit dem gleichen Volumen wie bei der Transformation mit komplettem Medium resuspendiert. Die erhaltene Suspension wird schließlich in einer 24-well-Platte in einer geometrischen Verdünnungsreihe mit komplettem Medium in Ein-Milliliter-Ansätzen eingesät

und verbleibt eine Woche im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % relativer Feuchte. Dann erfolgt der Mediumwechsel.

### **6.3.5. Anzucht und Kultivierung der transformierten Zellen**

Es ist folgende Reihenfolge einzuhalten: Nach Aussaat in der 24-well-Platte wird solange im wöchentlichen Abstand ein Mediumwechsel durchgeführt, bis ein deutlicher Wachstumsbeginn feststellbar ist (Gelbfärbung des Mediums und mehrere deutliche Zellhaufen). Danach erfolgt in drei- bis viertägigem Abstand solange das Passagieren der Zellen (zweimal auf der Platte, zweimal in der 25 cm<sup>3</sup>-Flasche und anschließend in der 75 cm<sup>3</sup>-Flasche), bis für die Messung und Konservierung ausreichend Zellen zur Verfügung stehen. Dazu wird jeweils eine Zellzahl von 0.4 x 10<sup>6</sup>/ml eingestellt, da diese Zellkonzentration für das Wachstum optimal ist. In der Regel sind 12 Passagen nötig.

### **6.4. Messung der basalen und durch PAF stimulierbaren Ca<sup>2+</sup>-Konzentration**

Immortalisierte B-Lymphozyten exprimieren keine Rezeptoren für Hormone oder vasoaktive Stoffe, wie z. B. Angiotensin II oder Katecholamine, die entscheidend in den zellulären Ca<sup>2+</sup>-Stoffwechsel und somit in die Blutdruckregulation eingreifen. Man findet auf ihrer Oberfläche jedoch PAF-Rezeptoren. Bei Stimulation dieser verändern sich die Aktivität des NHE-1 und die Konzentration des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> (Details siehe Kapitel 2 und 3). Dieser Effekt wurde in dieser Arbeit genutzt, um die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration zu stimulieren und somit indirekt Aussagen über die Aktivität des NHE-1 machen zu können.

Die Messung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Fura-2 durchgeführt. Fura-2 ist ein polyzyklischer Chelator, dessen Fluoreszenzintensität

tät sich bei komplexer Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  ändert (24). Fura-2 wird als Fura-2-acetoxymethylester (Fura-2-AM) in die Zelle geschleust, dort erfolgt durch zelleigene Esterasen die Abspaltung von Fura-2. Der entstehende Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplex entwickelt eine Fluoreszenzintensität, die sich proportional zur Konzentration der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  verhält. Ein Schema des Ablaufs der Messung an den kultivierten Lymphoblasten ist in Abb. 9 dargestellt.

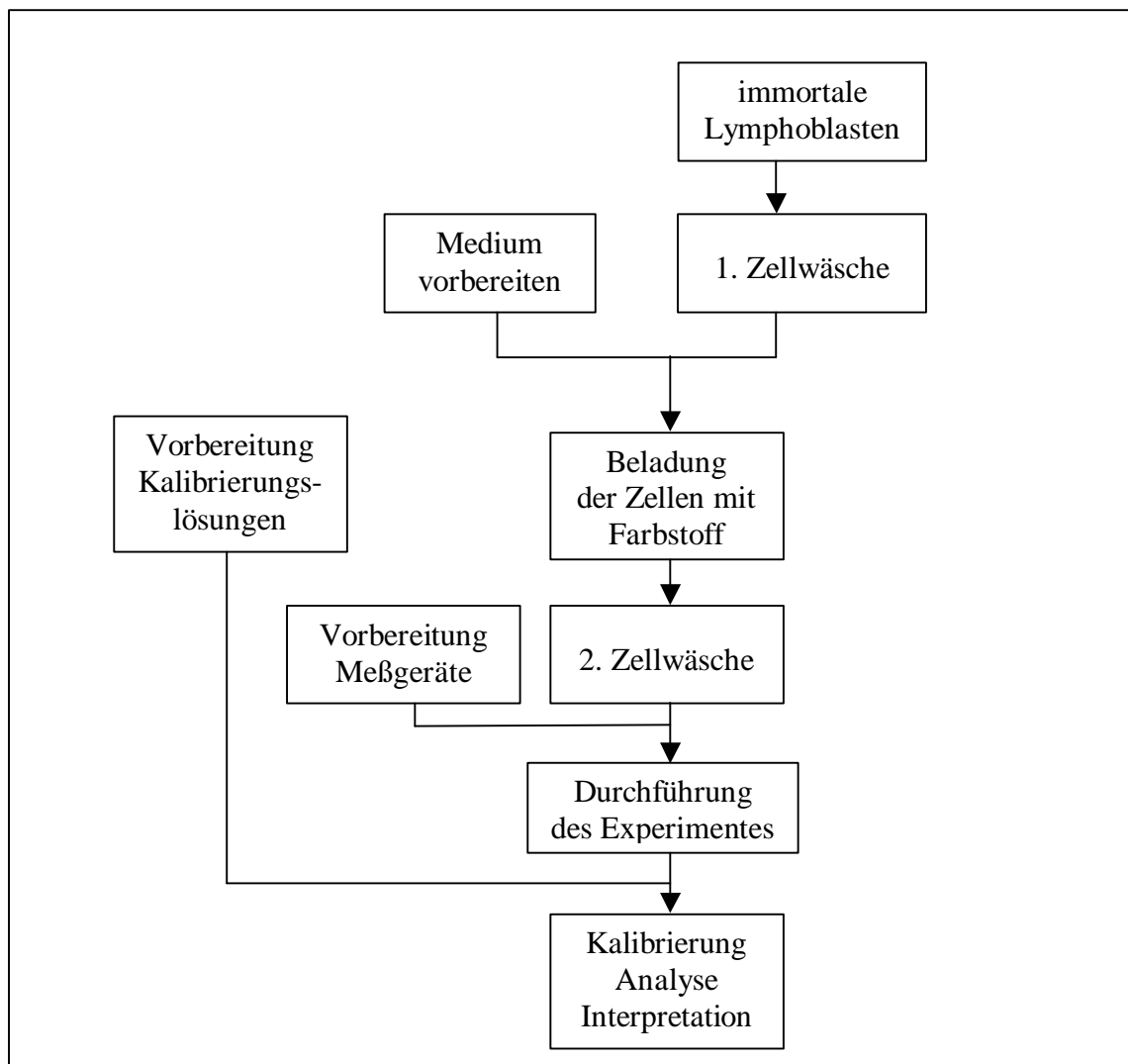


Abb. 9: Schematischer Ablauf der Messung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ . Nach: (33).

#### **6.4.1. Beladung der Zellen mit Fura-2**

Die Messung wird immer als Dreifachbestimmung durchgeführt. Es wird generell mit temperierten (37°C) Lösungen gearbeitet. Zuerst werden 3 ml einer Suspension von  $5 \times 10^6$ /ml bereitgestellt. Je 1 ml der Zellsuspension wird in Eppendorfröhrchen fünf Minuten bei 3500 g (10 000 rpm) zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wird abgehoben und verworfen, das Pellet in 500 µl Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) resuspendiert. Danach erfolgt die Zugabe von 500 µl Fura-2-AM Lösung (2.5 µmol Fura-2-AM Endkonzentration) und anschließend eine Inkubation über 30 min bei 37°C. Nach Zentrifugation bei 700 g (10 000 rpm) über fünf Minuten wird der Überstand abgehoben und das Zellpellet in 500 µl HBSS gelöst. Diese Suspension der mit Fura beladenen Zellen wird mit 1,5 ml HBSS in die Quarzküvette des Fluorimeters gegeben und zehn Minuten temperiert. Die Zellzahl zur Messung beträgt jetzt etwa  $1 \times 10^6$ /ml (Erfahrungswert nach vorangegangenen Meßreihen).

#### **6.4.2. Fluoreszenzmessung**

Die alternierende Anregung bei zwei Wellenlängen und die anschließende Quotientenbildung zur Berechnung ist durch den spezifischen Farbstoff Fura-2 möglich, dessen Exzitationsmaximum in  $\text{Ca}^{2+}$ -freiem Milieu bei 380 nm liegt und in  $\text{Ca}^{2+}$ -haltiger Lösung (40 µM) auf 340 nm verschoben ist. Die Quotientenbildung aus den bei 2 Wellenlängen unter exakt gleichen Bedingungen ermittelten Fluoreszenzintensitäten schaltet Artefakte wie inadäquate Farbstoffbeladung, „Ausbluten“ (sog. drop out des Farbstoffes aus den beladenen Zellen) und viele andere Fehlerquellen weitgehend aus. Die Fluoreszenzmessung im LS 50B erfolgt im Fast Filter Data Collection Modus. Dabei sind Filterräder in die Monochromatoren für die Exzitation und/oder für die Emission installiert. Diese Filterräder rotieren so schnell, daß sie mit den Lichtblitzen



der Lampe pro Datenpunkt (hier 5) in Übereinstimmung gebracht werden können.

Bei der  $\text{Ca}^{2+}$ -Messung mit Fura-2 kommt anstelle des Standardfilters für die Exzitation ein Filterrad mit einem Filterpaar bei 340 und 380 nm zum Einsatz. Die Emission wird mit dem Emissionsmonochromator bei 510 nm gemessen. Die Spaltbreiten betragen in beiden Fällen 5 nm. Die Messung wird in einer temperierbaren Küvette (37°C) unter Rühren für insgesamt 200 s aufgezeichnet. Dabei entspricht der erste Abschnitt (0 bis ca. 80 s) der basalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Nach ca. 80 s wird dann zur Stimulation PAF hinzugegeben.

Die Auswertung erfolgt nach der Maximum/Minimum-Kalibrierung. Dazu werden unmittelbar nach Ablauf der Messung für die basale und stimulierbare  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration 100  $\mu\text{l}$  Triton 1%ig in die Küvette gegeben (für den Max-Wert) und die vollständige Zellyse 15 min abgewartet. In einer erneuten Messung über insgesamt 100 s werden zunächst der Max-Wert und nach 50 s nach Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  EDTA-Lösung (250 mmol/l pH 8.7) der Min-Wert aufgezeichnet.

#### **6.4.3. Auswertung**

Die Auswertung erfolgte nach der Methode von GRYNKIEWICZ et al. (25). Diese Methode zur Berechnung der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist im Softwarepaket des LS 50B enthalten (Formel 2).

$$[\text{Ca}^{2+}] = \frac{(R_t - R_{\min})}{(R_{\max} - R_t)} \times K_d \times S_{fb}$$

Formel 2: Berechnung der freien intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration nach GRYNKIEWICZ et al.  $[\text{Ca}^{2+}]$ : freie intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration,  $R_t$ : Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm zum Zeitpunkt t,  $R_{\min}$ : Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm des ungebundenen Fura 2 (Abwesenheit von  $\text{Ca}^{2+}$  durch Komplexbildung mit EDTA),  $R_{\max}$ : Quotient der Fluoreszenzintensitäten bei 340 nm und 380 nm des gesättigten Fura-2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes nach Lyse der Zellen,  $K_d$ : Dissoziationskonstante des Fura 2- $\text{Ca}^{2+}$ -Komplexes bei 37°C ( $K_d = 224 \text{ nmol l}^{-1}$ ),  $S_{fb}$ : Quotient der Fluoreszenzintensitäten des freien und gebundenen Fura-2 bei 380 nm. Nach: (25).

## 6.5. Weitere laborchemische Untersuchungen

Neben den oben erwähnten  $\text{Ca}^{2+}$ -Messungen an Lymphozyten wurde noch eine Reihe weiterer laborchemischer Untersuchungen durchgeführt.

Wir bestimmten die Serum-Konzentrationen von Kreatinin, Glucose, Harnsäure, Gesamtcholesterin und Triglyceriden und den Ionen  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ; sowie die Osmolalität. Aus dem Urin wurden die Konzentrationen von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ , Kreatinin und Mikroalbumin bestimmt, sowie die Osmolalität gemessen.

## 6.6. Statistik

Alle hier aufgeführten Daten sind als arithmetische Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die Meßwerte der Kontrollgruppe wurden mit denen der Hypertoniker-Gruppe mit Hilfe des zweiseitigen unpaarigen Wilcoxon-Tests verglichen. Mit dem Kolmogoroff-Smirnoff-Test wurde die Normalverteilung der Daten in den jeweiligen Gruppen überprüft.

Die statistischen Berechnungen wurden mit Hilfe der Computerprogramme GraphPad Prism 2 (GraphPad Software Inc., San Diego, California, USA) und Lotus 1-2-3 V. 4 für Windows (Lotus Development GmbH, München, Deutschland) durchgeführt.

## 7. Ergebnisse

### 7.1. Charakterisierung der Probanden

Von den initial 106 rekrutierten Hypertonikern konnten letztendlich 37 Zelllinien mit zuverlässigen Meßwerten in die Auswertung gelangen. Merkmale zur Charakterisierung der normo- und hypertonen Versuchspersonen sind in Tabelle 4 enthalten.

	Normotoniker	Hypertoniker	Signifikanz
Männl./ Weibl.	17/9	15/22	
Alter (Jahre)	49,9 ± 9,3	67,8 ± 13,1	P < 0,0001

Tabelle 4: Charakteristika der Normotoniker und Hypertoniker; angegebene Werte stellen Mittelwerte ± Standardabweichung dar; ausführliche Darstellung s. Anhang.

Die hypertensiven Probanden waren 67,8 ± 13,1 Jahre, die normotensiven Probanden 49,9 ± 9,3 Jahre alt. Der Unterschied ist signifikant (p < 0,0001). Der BMI der Hypertoniker betrug 27,2 ± 4,7 kg/m<sup>2</sup> und der der Normotoniker 23,9 ± 2,1 kg/m<sup>2</sup>.

Alle Hypertoniker standen unter antihypertensiver Behandlung, eine Monotherapie erhielten 36 Probanden (Ca<sup>2+</sup>-Antagonisten 17, β-Blocker 9, ACE-Hemmer 10), eine Mehrfachkombination 1 Proband (Abb. 10).

Folgende laborchemische Daten wurden bei Normo- und Hypertonikern erhoben: Serumkonzentration von Kreatinin, Glucose, Harnsäure, Gesamtcholesterin und Triglyceriden und den Ionen Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>; sowie die Osmolalität; weiterhin die Urinkonzentrationen von Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup>, Kreatinin, Mikroalbumin; sowie die Osmolalität. Die ausführliche Darstellung der Laborwerte ist im Anhang wiedergegeben.

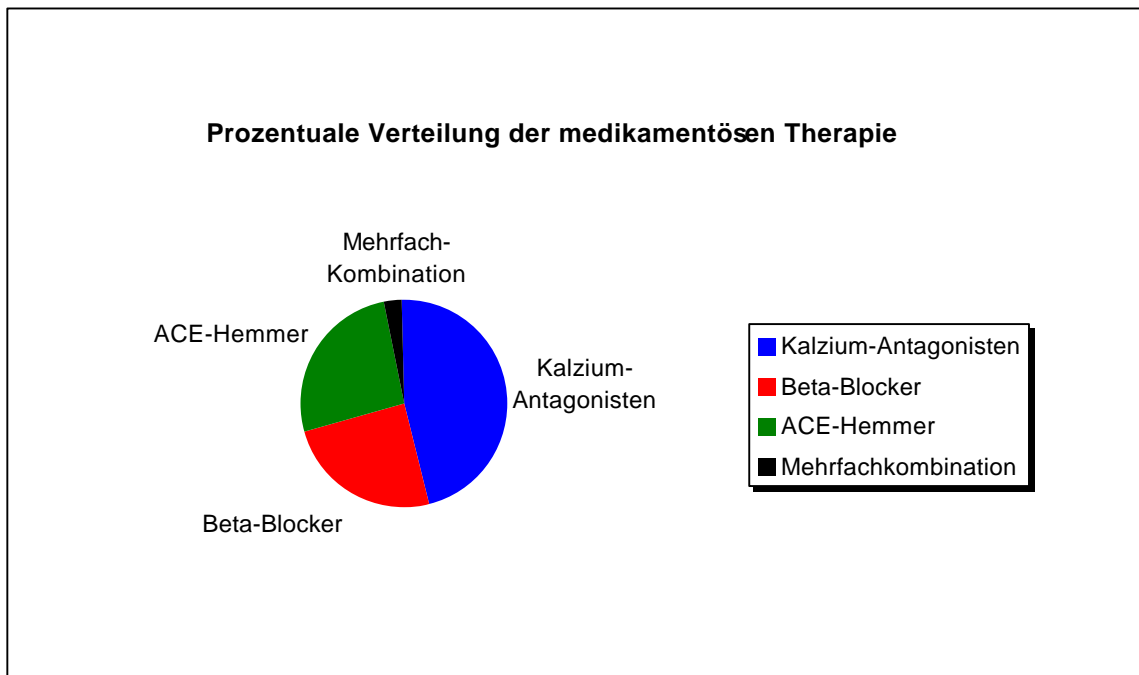


Abb. 10: Antihypertensive Therapie der hypertensiven Probanden - dargestellt sind prozentuale Anteile der verschiedenen Therapien.

Da, wie oben erwähnt, nur teilweise Informationen zur Familienanamnese und zum Risikoprofil vorlagen, konnte keine Verwertung der Daten für die gesamte Gruppe erfolgen.

Hypertoniker und Normotoniker unterschieden sich im Alter signifikant, hinsichtlich der erhobenen Laborparameter sind beide Gruppen jedoch vergleichbar.

Die genauen Zahlenangaben sind in den Tabellen 6 - 11 im Anhang enthalten.

## 7.2. Basale Kalziumwerte

Die Basalwerte des intrazellulären  $Ca^{2+}$  der B-Lymphozyten der normotensiven und hypertensiven Versuchspersonen bildeten einen Durchschnitt von  $95,1 \pm 12,4$  beziehungsweise  $97,4 \pm 17,8$  nmol/l (Abb. 11) und waren somit nicht signifikant unterschiedlich.

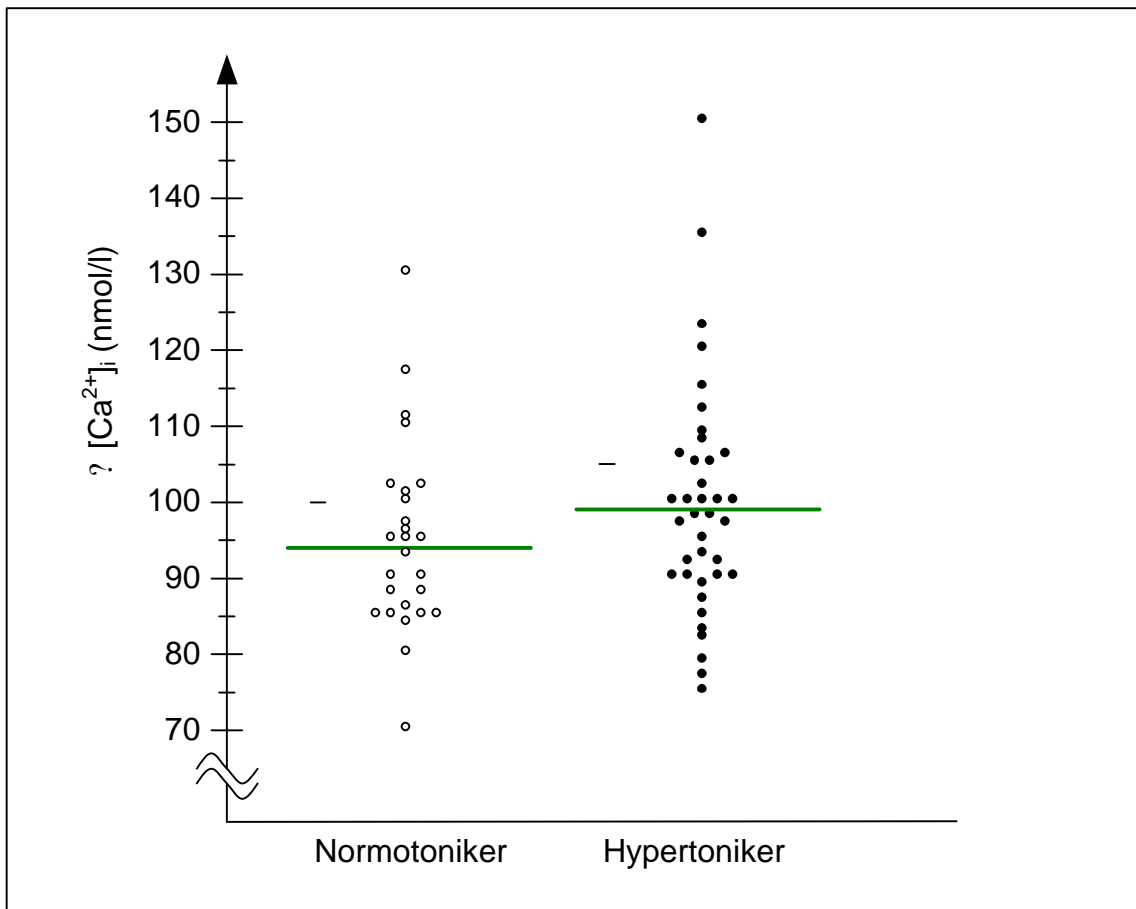


Abb. 11: Basale intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Werte der 26 Normo- und 37 Hypertoniker.

### 7.3. Kalziumwerte nach Stimulation

Nach Stimulation mit PAF erhöhte sich die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der Normotoniker um 20 - 120 nmol/l über den Basalwert. Im Durchschnitt betrug die Erhöhung nach Stimulation 58,1 nmol/l bei einer Standardabweichung von ± 27,6 nmol/l. Das untere 99%ige Vertrauensintervall betrug 43,0 nmol/l, das obere 73,2 nmol/l. Der Kolmogoroff-Smirnoff-Test ergab eine Gauß'sche Verteilung dieser Werte (Kolmogoroff-Smirnoff-Distanz 0,2274, p < 0,0436, Abb. 12).

Die Ca<sup>2+</sup>-Konzentration der Hypertoniker nach Stimulation bewegte sich im Bereich von 20 - 440 nmol/l mit einem Durchschnitt von 89,5 nmol/l und einer Standardabweichung von ± 91,6 nmol/l. Das untere 99%ige Vertrauensintervall betrug 48,5 nmol/l, das obere 130,5 nmol/l. Der Kolmogoroff-

Smirnof-Test konnte in dieser Gruppe keine Gauß'sche Verteilung bestätigen (Kolmogoroff-Smirnof-Distanz 0,1432,  $p > 0,1$ ).

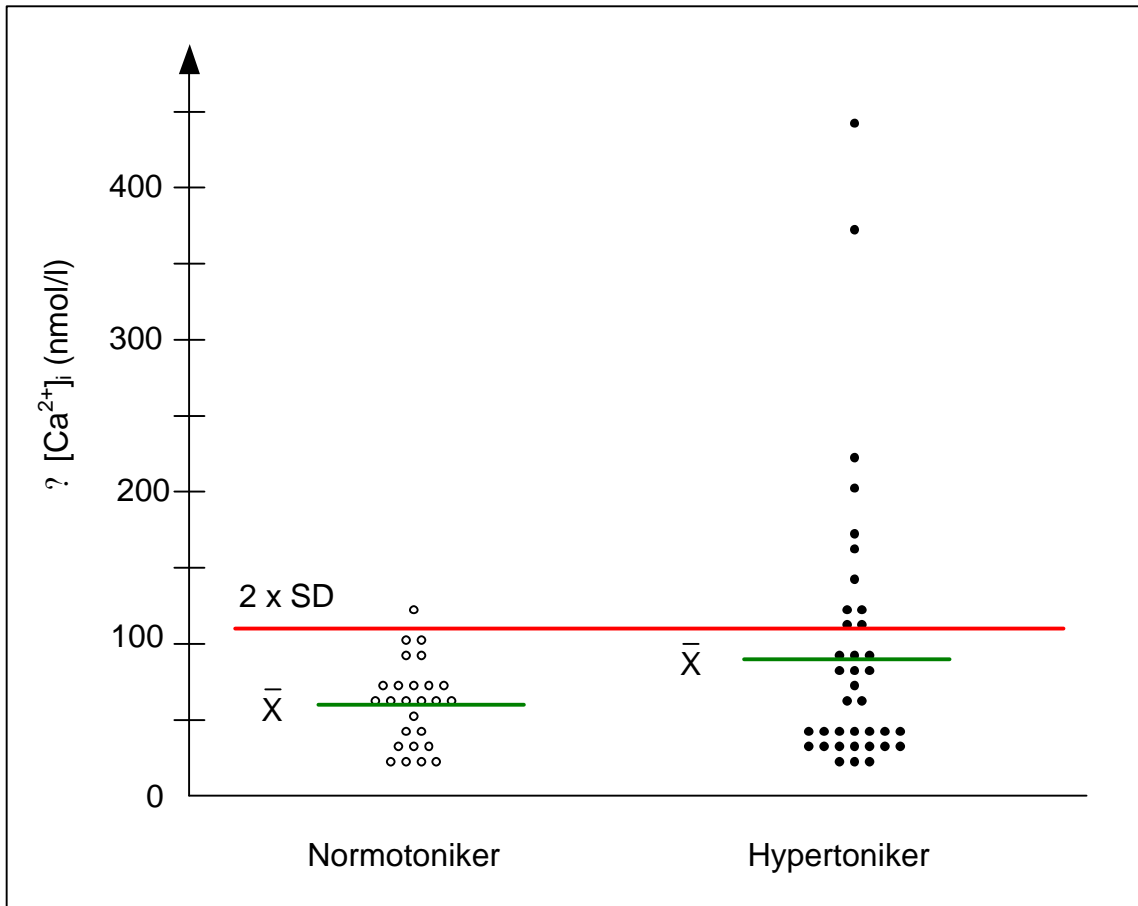


Abb. 12: Veränderung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration nach Stimulation mit PAF.

Nach Stimulation der B-Lymphozyten mit PAF in einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{mol/l}$  trat in beiden Gruppen erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung (jeweils  $p < 0,0001$ ) der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration ein.

Die mittleren Erhöhungen der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Werte der zwei Gruppen über den Basalwerten unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Angesichts der nicht normalverteilten Meßwerte in der Hypertoniker-Gruppe könnte sich entsprechend der Hypothese eine Subgruppe von Hypertonikern mit einer erhöhten  $Ca^{2+}$ -Stimulierbarkeit abzeichnen (Abb. 13).

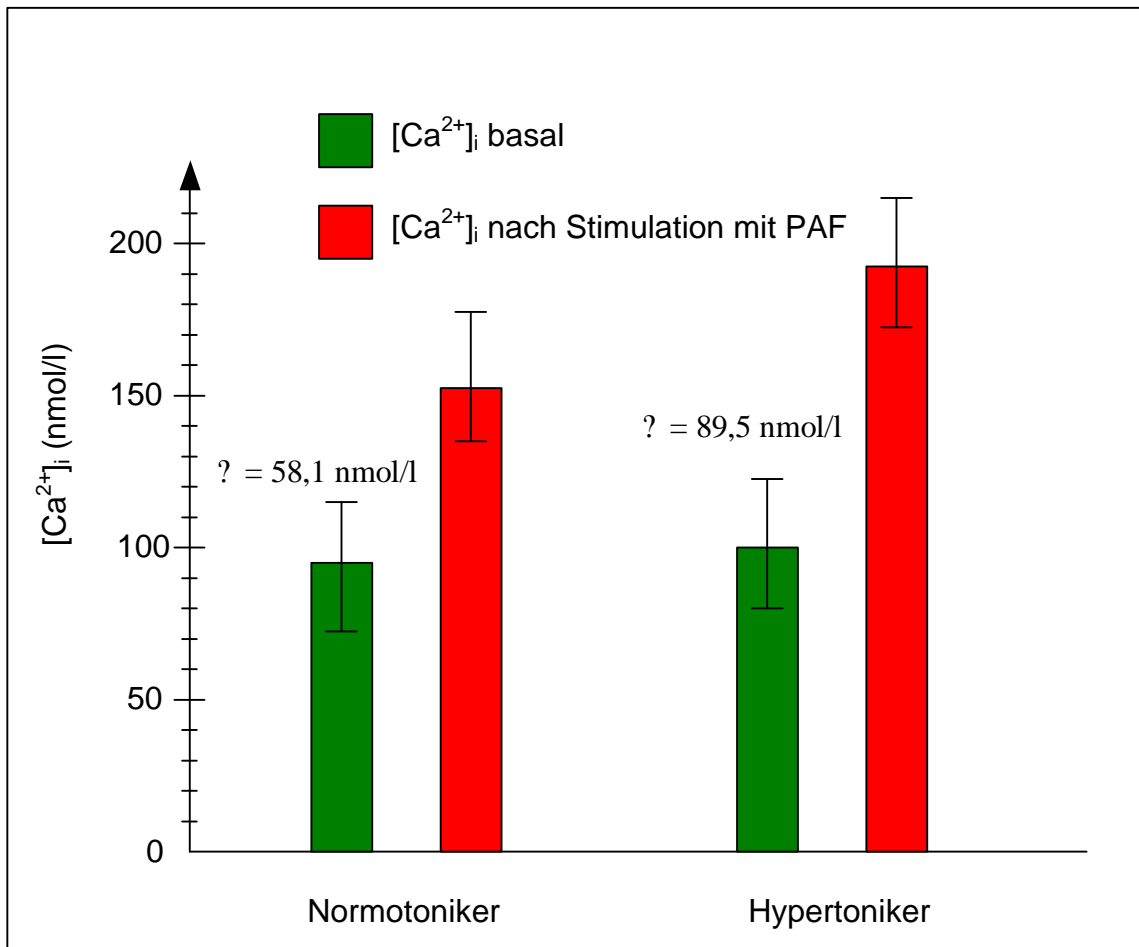


Abb. 13: Mittelwerte der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen vor und nach Stimulation der Zellen mit PAF.

Wir wollten nachfolgend ermitteln, wie viele Normotoniker und wie viele Hypertoniker normale bzw. stimulierbare intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen aufwiesen. Dazu mußte aber erst ein „Normalwert“ gebildet werden.

## 7.4. Normwertbildung und Anwendung

### 7.4.1. Normwertbildung mit Standardabweichung

Für viele laborchemische Parameter des Menschen gibt es definierte Bereiche, in denen die auftretenden Werte als „normal“ betrachtet werden. In einigen Studien (62, 63, 64) wurden bereits „Normalwerte“ für verschiedene Meßmethoden zur Bestimmung der NHE-1-Aktivität von Normo- und Hypertonikern definiert.

Für die PAF-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Erhöhung in B-Lymphozyten gibt es bislang jedoch noch keinen definierten „Normalbereich“. Im allgemeinen werden in der klinischen Chemie Normalbereiche durch den Mittelwert und der zweifachen Standardabweichung gebildet.

$$NW ? \bar{x} ? 2SD$$

Formel 3: Normwertbildung.

Zur Festlegung eines oberen Referenzwertes für PAF-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale wurden die Daten der normotensiven Gruppe herangezogen. Dabei wurde die obere Referenzgrenze bei 110 nmol/l definiert. Dieser Wert ergab sich entsprechend der Formel 3 durch Addition des Mittelwertes der stimulierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration und der zweifachen Standardabweichung in der normotensiven Gruppe (Abb. 14).

Die so ermittelten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen nach Zugabe von  $10^{-7}$  M PAF, die über der Grenze von 110 nmol/l lagen, galten in unserer Untersuchung somit als erhöht und nicht „normal“.



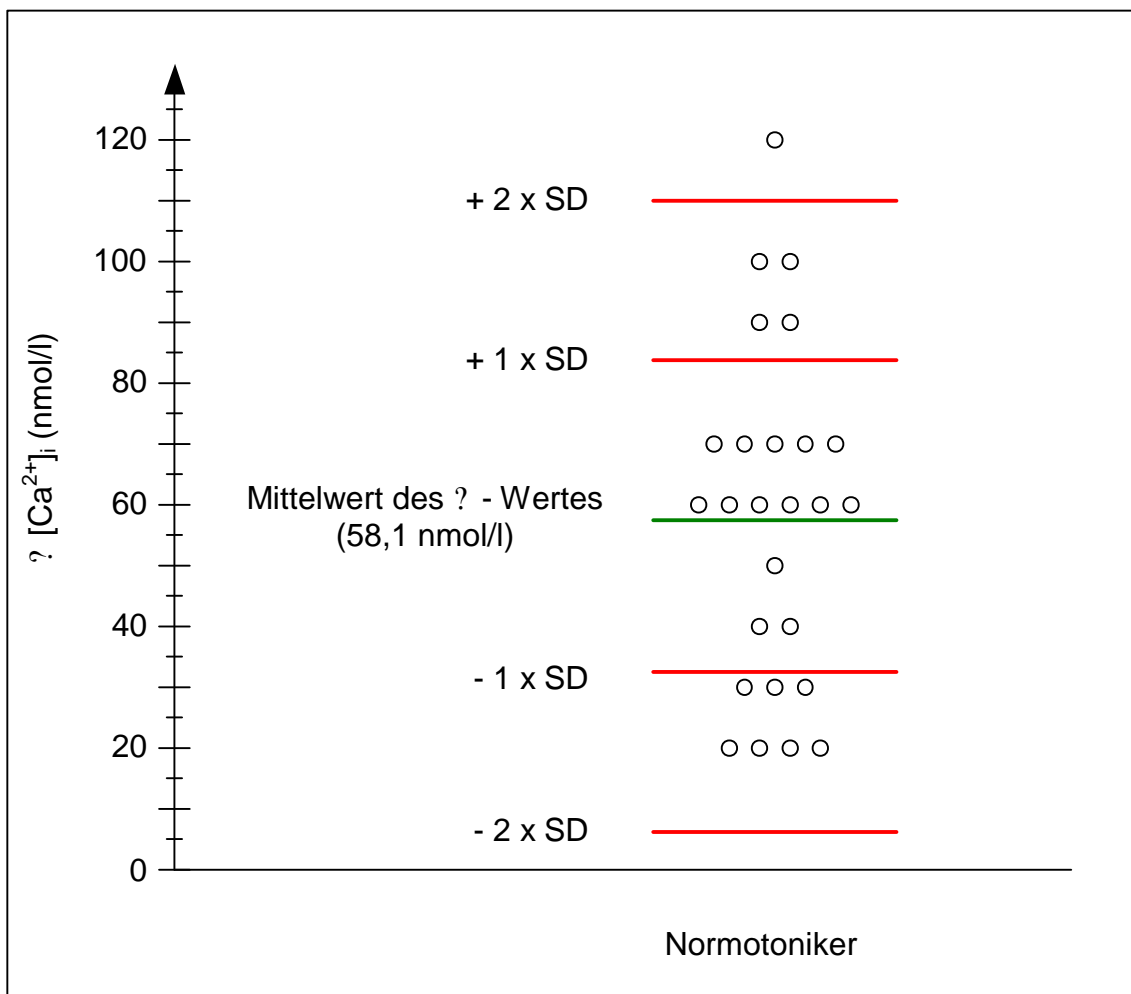


Abb. 14 Bildung des Normalwertes.

#### 7.4.2. Verteilung der Kalziumwerte nach Stimulation

Bei Anwendung des definierten Grenzwertes von 110 nmol/l wiesen 10 der 37 hypertensiven Versuchspersonen erhöhte stimulierte Ca<sup>2+</sup>-Werte auf, das sind ca. 27 %. Im einzelnen konnten bei 7 von 22 hypertensiven Frauen (ca. 32 %) und bei 4 von 15 hypertensiven Männern (ca. 26 %) erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Signale gemessen werden. In der Gruppe der 26 normotensiven Kontrollpersonen wurden nur bei einem Probanden (ca. 4 %) erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Werte > 110 nmol/l gemessen.

### **7.4.3. Normwertbildung mit Konfidenzintervall und Anwendung**

Eine andere Möglichkeit der Bildung eines „Normalbereiches“ besteht darin, die obere Grenze des 99%igen Vertrauensintervalls heranzuziehen. Für die normotensive Gruppe betrug diese ca. 75 nmol/l. Bei Anwendung dieses Grenzwertes wiesen 16 der 37 hypertensiven Versuchspersonen (ca. 43 %) stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale höher als 75 nmol/l auf, darunter 6 von 15 hypertensiven Männern (ca. 40 %) und 11 von 22 hypertensiven Frauen (= 50 %). Nach Anwendung der oberen 99%igen Konfidenzgrenze für normale und erhöhte PAF-induzierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale auf die normotensive Versuchsgruppe erhielten wir bei 5 von 26 normotensiven Versuchspersonen (ca. 19 %)  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale größer als 75 nmol/l.

### **7.5. Korrelation der $\text{Ca}^{2+}$ -Daten zu weiteren Meßgrößen**

In beiden Gruppen konnte kein Zusammenhang zwischen dem Alter der Personen und den ermittelten basalen und stimulierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen gefunden werden (s. Abb. 15 und 16).

Auch bei der Untersuchung des Zusammenhanges der stimulierbaren  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit anderen Parametern wie Geschlecht, Body Mass Index oder Plasmalipiden ließ sich keine Korrelation finden. Allerdings müssen diese Korrelationsanalysen kritisch betrachtet werden, da bei einigen Personen einzelne Laborwerte nicht erhoben wurden.

Weiterhin prüften wir eine mögliche Abhängigkeit der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von einer antihypertensiven Behandlung. Im Falle einer Therapie mit einem ACE-Hemmer ergaben sich stimulierte  $\text{Ca}^{2+}$ -Mittelwerte von  $118,0 \pm 154,4$  nmol/l ( $n = 10$ ), mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Antagonisten  $83,5 \pm 63,1$  nmol/l ( $n = 17$ ) und mit  $\beta$ -Blocker-Therapie  $83,5 \pm 47,4$  nmol/l ( $n = 9$ ). Eine Signifikanz lag nicht vor. Die geringe Zahl der Beobachtungen schränkt allerdings die Aussagekraft des Tests ein.

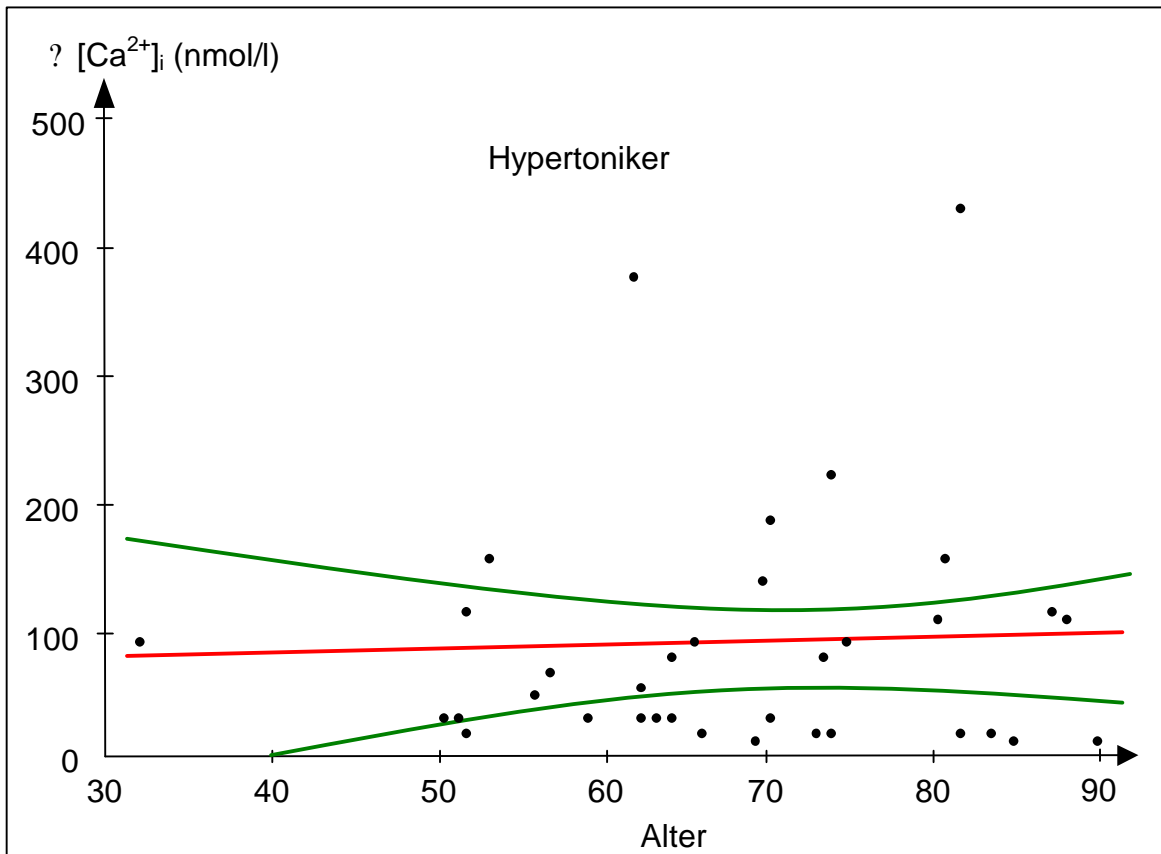


Abb. 15: Korrelation der stimulierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte der Hypertoniker mit dem Alter.

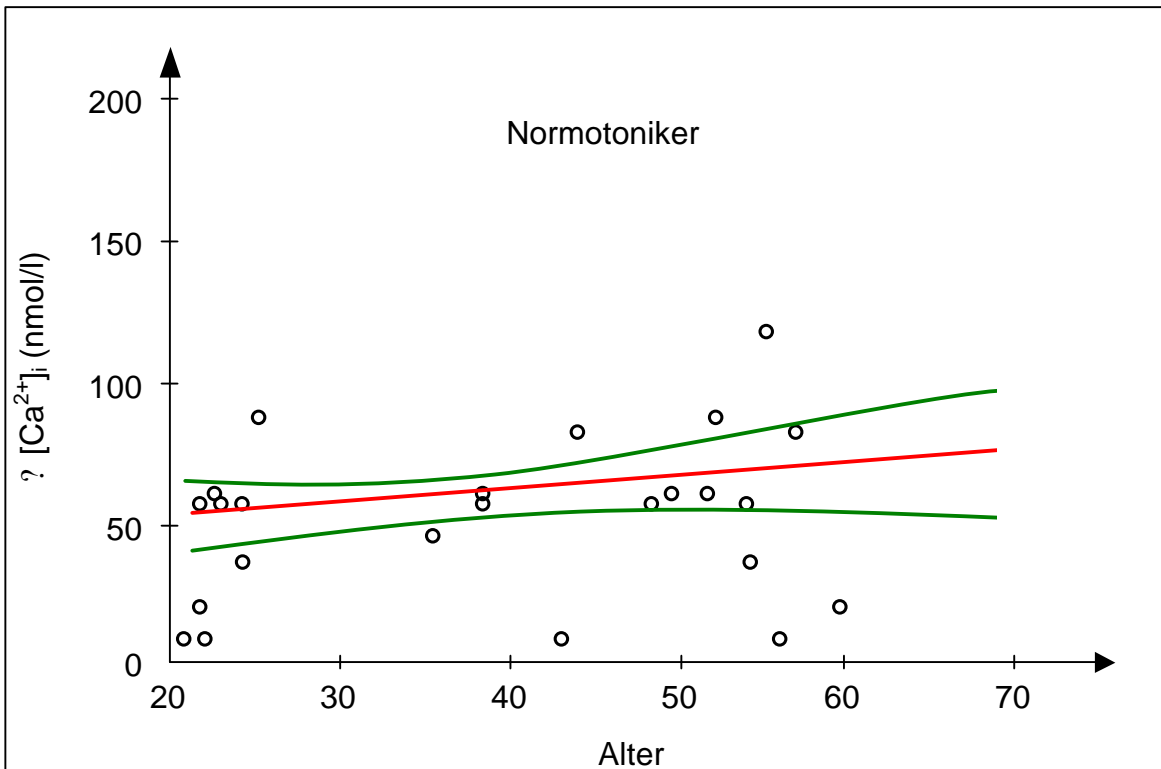


Abb. 16: Korrelation der stimulierten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte der Normotoniker mit dem Alter.

## **8. Diskussion**

### **8.1. Einführung**

Die Pathogenese der essentiellen Hypertonie ist im Detail nach wie vor nicht völlig aufgeklärt. Mit hoher Wahrscheinlichkeit spielen genetische Aspekte bei der Ausprägung dieser Erkrankung eine Rolle. So gibt es z. B. Hinweise, daß eine erhöhte Aktivität des NHE genetisch determiniert ist (52). Dies konnte 1994 indirekt durch die Messung der Stimulierbarkeit des intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$  ermittelt werden.

Das Ziel der vorliegenden Studie bestand darin, erstmalig an einer größeren Gruppe von Patienten mit essentieller Hypertonie den Anteil derjenigen zu ermitteln, die eine erhöhte Stimulierbarkeit des intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$  aufweisen. Dabei zeigte sich, daß ca. 30 - 50 % der essentiellen Hypertoniker eine gesteigerte Aktivierbarkeit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  aufweisen. Es konnte keine Korrelation mit anderen Parametern wie z. B. Body Mass Index oder bestimmten Laborparametern nachgewiesen werden.

### **8.2. Bedeutung der Studie**

Die Pathogenese der essentiellen Hypertonie ist ein komplexer Vorgang. Bei der Aufklärung der pathogenetischen Vorgänge spielen u. a. auch subzelluläre und genetische Faktoren eine wichtige Rolle (15). Seit ca. zehn Jahren findet in dieser Hinsicht der NHE zunehmende Beachtung. Dieses Transportprotein und seine Regulation sind heute gut charakterisiert und werden weiterhin untersucht (18, 20, 21, 53, 63, 75, 76, 77, 78, 79, 101).

Trotz eines hohen Erkenntnisstandes bezüglich seiner Struktur und Funktion sind die pathogenetische Funktion einerseits und die Prävalenz einer pathologischen Aktivität andererseits noch weitgehend unbekannt.

In letzter Zeit wurden einige Versuche unternommen, den Anteil der essentiellen Hypertoniker mit erhöhter NHE-1-Aktivität zu ermitteln (Tab. 5). ROSSKOPF et al. (64) und DIEZ et al. (62) untersuchten kleinere Gruppen von 26 bzw. 27 hypertensiven Probanden. CANESSA et al. ermittelten die Prävalenz unter 42 Probanden, selektierten die Hypertoniker jedoch vorher stark (63). So wurden z. B. Patienten, die älter als 70 Jahre waren, ausgeschlossen.

Studie	Jahr	Probandenzahl
CANESSA et al. (63)	1991	42
ROSSKOPF et al. (64)	1992	26
DIEZ et al. (62)	1995	27
<b>GRUSKA et al. (80)</b>	<b>1997</b>	<b>37</b>

Tabelle 5: bisherige Studien zur NHE-1-Aktivität bei Hypertonikern.

Unsere Arbeitsgruppe untersuchte deshalb die Prävalenz einer erhöhten Stimulierbarkeit des intrazellulären  $Ca^{2+}$  an einer weitestgehend unselektierten Gruppe von essentiellen Hypertonikern aus dem Patientengut einer allgemeinärztlichen Praxis in Greifswald (80). Initial wurden dabei 106 Hypertoniker in die Studie eingeschlossen. Von 37 Patienten lagen dann im Endeffekt auswertbare Meßergebnisse vor.

Grundsätzlich muß man erwähnen, daß die Ergebnisse anderer Autoren nicht uneingeschränkt übernommen und verallgemeinert werden können. Oftmals wurden in früher durchgeführten Studien z. B. andere Meßverfahren, andere Zellarten oder andere Auswahlkriterien der Probanden angewandt. Nachfolgende Zahlenvergleiche sind dementsprechend, wenn nicht anders erwähnt, mit Vorbehalt zu interpretieren.

### 8.3. Probandenkritik

Seit 1994 ist an der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald die „Community Medicine“ etabliert. Dazu gehört neben der Erhebung epidemiologischer Daten und der Forschungsarbeit auch eine praxisnahe Ausbildung der Medizinstudenten im Bereich der „Community Medicine“. Unter diesem Schwerpunkt sind auch praktische Ärzte außerhalb der Universität involviert. Auf diesem Wege war es möglich, insgesamt 106 hypertensive Probanden für die Mitarbeit an unserer Untersuchung zu gewinnen. Patienten mit sekundärer Hypertonie wurden vorher ausgeschlossen, da sich unsere Arbeit nur auf die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration bei essentiellen Hypertonikern konzentrierte.

Von allen Probanden wurde eine umfangreiche Anamnese erhoben. Es stellte sich jedoch heraus, daß einige Angaben der hypertensiven Patienten nicht in jedem Fall zuverlässig erschienen, was u. a. dem höheren Lebensalter der Patienten zugeschrieben werden kann ( $65,9 \pm 16,2$  Jahre). Deshalb wurden Angaben z. B. über die Dauer der Blutdruckanamnese oder der Familienanamnese in der Auswertung nicht berücksichtigt. Aus den detaillierten Aufzeichnungen der Hausärzte ging hervor, daß bei allen Patienten eine essentielle Hypertonie vorlag, die pharmakologisch therapiert wurde. Damit konnte das einzige Auswahlkriterium zuverlässig belegt werden.

Bei einem Teil der Probanden wurde die Diagnose „Hypertonie“ schon vor mehreren Jahren gestellt. Der Zeitpunkt der Manifestation der Erkrankung ist generell schwer zurückzuverfolgen, denn er hängt u. a. nicht nur von einer möglichen genetischen Belastung und von der Einwirkung zahlreicher Umweltfaktoren ab, sondern auch davon, wann die Hypertonie erstmals erkannt und therapiert wurde. So kann z. B. schon lange vor der Diagnosestellung ohne Wissen des Patienten ein Hochdruck vorgelegen haben.

Die essentielle Hypertonie tritt mit zunehmendem Alter häufiger auf. Diese alltägliche Erkenntnis belegen u. a. die Ergebnisse Lübecker und Münchener Blutdruckstudien (2, 82, 83). In beiden genannten Studien wurde insgesamt ein Anstieg der Prävalenz der „wirklichen“ Hypertonie mit zunehmendem Lebensalter registriert. So betrug z. B. die Prävalenz der Hypertonie bei 30 - 39jährigen Männern in einer Münchener Blutdruckstudie 1980/81 11,3 %, bei den 60 - 69jährigen jedoch 31,9 %. Somit ist auch das höhere Lebensalter der essentiellen Hypertoniker gegenüber den normotonen Vergleichspersonen unserer Studie erklärbar.

Gleichzeitig benötigten wir entsprechend dem Studiendesign als Kontrollgruppe Normotoniker. Gesunde Probanden im hohen Lebensalter, die keine essentielle Hypertonie aufwiesen, waren für uns im Prinzip nicht verfügbar, da diese Patienten seltener einen Arzt aufsuchen. Als Kompromißlösung rekrutierten wir deshalb aus dem Klinikpersonal die Probanden für die normotensive Kontrollgruppe. Damit lag das Durchschnittsalter allerdings zwangsläufig auch unter 65 Jahren. Da unsere These aber ein möglicherweise genetisch fixiertes Phänomen beinhaltet, erschien uns das unterschiedliche Alter der Normotoniker und Hypertoniker akzeptabel.

Auch bei anderen Untersuchern traten zwischen der normotensiven und der hypertensiven Gruppe erhebliche Altersunterschiede auf. So waren in der Studie von CANESSA et al. die behandelten Hypertoniker signifikant älter als die Normotoniker (63), auch in der Studie von ROSSKOPF et al. waren die Hypertoniker im Durchschnitt wesentlich älter als die Normotoniker (49,7 Jahre versus 36,9 Jahre) (64).

Das Verhältnis von Männern zu Frauen betrug in unserer Studie 15 zu 22, dies entspricht ungefähr der Verteilung in der

Alterspyramide der Bewohner Deutschlands im Altersbereich von ca. 60 bis 70 Jahren (3).

Die hypertensiven Probanden waren überwiegend Patienten mit sogenannten „kontrollierten“ Blutdruckwerten (23 von 37). Bei Personen mit „kontrollierten“ Blutdruckwerten ist die Hypertonie bekannt. Sie weisen bei Blutdruckmessungen keine Blutdruckwerte systolisch über 160 mm Hg oder diastolisch über 95 mm Hg auf und stehen unter einer antihypertensiven Therapie. Bei Hinzufügung der Personen mit hypertensiven Blutdruckwerten zur Gruppe der Patienten mit „kontrollierten“ Blutdruckwerten erhält man die Zahl der sogenannten „wirklichen“ Hypertoniker (2).

Bei den Probanden der vorliegenden Studie war die Hypertonie schon mindestens ein Jahr vorher bekannt. 14 der hypertensiven Probanden waren laut o. g. Kriterien als nicht „kontrolliert“ anzusehen. Die Ursachen dafür können sehr vielfältiger Natur sein, z. B. Non-Compliance des Patienten, eine ungenügende medikamentöse Einstellung, sogenannte „Non-responder“ oder das Auftreten des sogenannten „Weißkitteleffektes“.

Alle hypertensiven Probanden wurden medikamentös ( $\beta$ -Blocker,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker, ACE-Hemmer) behandelt. ROSSKOPF et al. (64) und DÍEZ et al. (62) untersuchten in ihren Studien nur unbehandelte Hypertoniker, CANESSA et al. ermittelten die Prävalenz unter 30 behandelten und 12 unbehandelten Probanden (63).

ROSSKOPF et al. untersuchten u. a. die Wirkung einer sechswöchigen Enalapril-Therapie mit 10 mg pro Tag an Patienten, die bereits vorher mit  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blockern oder Diuretika behandelt worden waren (64). Es wurde eine Blutentnahme vor und eine nach der Enalapril-Therapie durchgeführt. Nach der



Therapie war eine signifikante Senkung des Blutdruckes zu verzeichnen, eine Veränderung der maximalen NHE-1-Aktivität trat jedoch nicht ein. Dieser Umstand kann als weiterer Hinweis für eine mögliche genetische Fixierung der NHE-Aktivität gewertet werden.

Die essentielle Hypertonie ist eine multifaktorielle Erkrankung (15). Das Körpergewicht spielt bei der Entstehung und Ausbildung der Hypertonie eine entscheidende Rolle (5, 7, 15).

Es werden derzeit verschiedene Definitionen für das Vorliegen eines Übergewichts angewendet. Nach BROCA gelten Personen als übergewichtig, wenn sie ihr Normalgewicht um mehr als 20 % überschreiten ( $(\text{Körpergröße in cm} - 100) \times 1,2$  Körpergewicht in kg). Eine gebräuchlichere Definition ist die des National Institute of Health, die Männer mit einem Body Mass Index  $> 27,8 \text{ kg/m}^2$  und Frauen mit einem Body Mass Index von  $> 27,3 \text{ kg/m}^2$  als übergewichtig einteilt (6). BRAY stellte 1978 eine Kategorisierung des Übergewichtes nach dem Body Mass Index auf (85). Danach gelten Personen mit einem Body Mass Index von ca.  $25 \text{ kg/m}^2$  als normalgewichtig. Übergewicht liegt bei einem Body Mass Index zwischen 25 und  $30 \text{ kg/m}^2$  vor, stark übergewichtig sind Personen mit einem Body Mass Index von mehr als  $30 \text{ kg/m}^2$ . In letzterem Fall spricht man dann von Adipositas.

Das Übergewicht spielt höchstwahrscheinlich auch bei einem Teil der Patienten unserer Studie bei der Entwicklung der Hypertonie eine Rolle. Der Body Mass Index unserer hypertensiven Probandengruppe konnte mit  $27,2 \pm 4,7 \text{ kg/m}^2$  ermittelt werden und liegt somit nach BRAY im Bereich des Übergewichtes. 9 Probanden (24 %) wiesen einen Body Mass Index von mehr als  $30 \text{ kg/m}^2$  auf und waren somit sogar stark übergewichtig.

Im Vergleich dazu ergab sich in der Lübecker Blutdruckstudie eine Prävalenz des Übergewichtes von 67,6 % bei Männern und 64,9 % bei Frauen (nach BRAY, Frauen wurden bereits ab einem Body Mass Index von mehr als 24 kg/m<sup>2</sup> als übergewichtig gewertet). Bei Anwendung der gleichen Kriterien ergibt sich in unserer Studie eine Prävalenz des Übergewichtes von 71,4 % bei Männern und 52,1 % bei Frauen.

Es existiert eine Theorie, nach der sich die Zusammensetzung der Zellmembran in Abhängigkeit von den Plasmalipiden ändert und somit den NHE-1 beeinflusst (53). Bei Probanden mit einer abnormalen Plasmalipid-Zusammensetzung wurde eine erhöhte Aktivität des dem NHE sehr ähnlichen Natrium-Lithium-Austauschers gefunden (87, 88, 89). Die genauen pathogenetischen Mechanismen sind jedoch noch nicht geklärt.

POLI DE FIGUEIREDO et al. untersuchten die NHE-Aktivität an immortalisierten Lymphoblasten.

Dabei wurde eine signifikante Korrelation des Cholesteringehaltes der Zellmembranen mit der maximalen Austauscher-Geschwindigkeit in der Art festgestellt, daß eine Erhöhung des Cholesterol-Gehaltes ein Absinken der NHE-Aktivität und des intrazellulären pH zur Folge hat (90). Im Gegensatz dazu konnten DíEZ et al. in ihrer Studie keine Assoziation zwischen der Zusammensetzung der Plasmalipide und der Aktivität des NHE-1 finden (62). Andererseits fanden NG et al. heraus, daß es bei der Anwendung des HMG-CoA-Reduktase-Hemmers Pravastatin zu einer Absenkung der NHE-Aktivität und des intrazellulären pH kommt (91, 92).

In unserer Studie wiesen 34 % der Hypertoniker erhöhte Gesamtcholesterinwerte und 45 % der Hypertoniker erhöhte Triglycerid-Werte auf - eine Korrelation der Höhe der Plas-

malipide mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit konnten wir jedoch nicht ermitteln.

Dies ist durch verschiedene Umstände erklärbar: In die gemessenen Lipidwerte gehen sowohl unbehandelte Lipidstörungen, als auch medikamentös (CSE-Hemmer) und diätetisch therapierte Lipidstoffwechselstörungen ein. Aus diesen Gründen hatten wir auch keine Korrelation erwartet.

#### **8.4. Anzahl der Meßergebnisse**

Es wurden ursprünglich bei 106 hypertensiven Probanden peripher-venöse Blutentnahmen durchgeführt. Eine komplette Meßreihe mit allen zu erhebenden Daten konnte jedoch nur von 37 Probanden durchgeführt werden.

Die Gründe für diese hohe „Verlustrate“ sind vielfältig:

?? Die Bedingungen in den Organismen der Probanden zum Zeitpunkt der Blutentnahme sind sehr unterschiedlich. In variabler Höhe können „Faktoren“ vorhanden sein, die die Vitalität der Zellen und somit ihre Fähigkeit zu wachsen oder deren Transformationsfähigkeit behindern. Solche „Faktoren“ sind in unserer Studie vermutlich das höhere Alter der Patienten und nicht abschätzbare Einflüsse der Medikation. Auch andere Erkrankungen des Probanden können eine Rolle spielen.

?? Die Stimulation mit PAF zeigte bei manchen Zellen keine oder nur eine äußerst geringe Veränderung. Da wir dies als Hinweis auf nicht vitale Zellen ansahen, wurden Messungen mit einer Differenz zwischen basalem und stimuliertem  $\text{Ca}^{2+}$ -Gehalt von  $< 20 \text{ nmol/l}$  in der Auswertung der Meßergebnisse nicht berücksichtigt.

?? Die labortechnischen Randbedingungen wie z. B. die Medienzusammensetzung oder die Temperatur können bei der Kultivierung nicht immer exakt eingehalten werden und weichen dann von den Idealverhältnissen ab. Das kann ein

Ende des Zellwachstums bedeuten. Wir waren bemüht, alle Transformationen unter annähernd gleichen Bedingungen durchzuführen. Dazu gehört auch, daß nach der Blutentnahme das Material schnellstmöglich dem Labor zugeführt wird. Da wir, wie bereits erwähnt, mit niedergelassenen Ärzten zusammenarbeiteten, ließ sich auch wegen der örtlichen Entfernung die von uns gesetzte Frist von 2 Stunden zwischen Blutentnahme und -verarbeitung in einigen Fällen nicht exakt einhalten. Auch die Daten dieser Patienten wurden nicht in die Auswertung einbezogen.

?? Die Immortalisierung und Anzüchtung von Lymphozyten wurde im Rahmen dieser Studie zum ersten Mal in Greifswald durchgeführt. Somit läßt sich auch durch eine mangelnde Routine eine höhere „Versagerquote“ erklären. Allerdings kann auch mit zunehmender Erfahrung bei der praktischen Laborarbeit festgestellt werden, daß nur circa 75 % der angesetzten Transformationen erfolgreich wachsen.

Weiterhin sollte auch erwähnt werden, daß bei Studien dieser Art die Probandenzahl aus Kostengründen oftmals in kleinen Grenzen gehalten werden muß.

Die Ursachen der Kostenentstehung sind vielfältig. Einerseits ist die Durchführung des Meßansatzes äußerst arbeitszeit- und arbeitskräfteintensiv, andererseits sind für die Zellkultivierung generell große Mengen an Verbrauchsmaterial nötig. Nicht zuletzt ist für eine einzige Zelllinie eine lange Zeitdauer vom Beginn der Immortalisierung bis zum Erhalt von verwertbaren  $Ca^{2+}$ -Meßdaten nötig. Dadurch ist bei einem Mißerfolg der Immortalisierung kaum eine Rückkopplung und eine eventuelle nochmalige Rekrutierung von Patienten möglich. Dies würde die Studie zeitlich zu sehr ausdehnen.

## 8.5. Immortalisierung und Stimulation der Lymphozyten mit PAF

Das Erfolgsorgan zur Regelung des peripheren Widerstandes ist die glatte Gefäßmuskelzelle. Der Gefäßtonus ist bekanntlich stark von der Regulation der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration abhängig und diese wiederum u.a. auch durch den NHE beeinflusbar. Mit den meisten bisher bekannten Methoden zur Messung der NHE-1-Aktivität oder des intrazellulären pH oder  $\text{Ca}^{2+}$  lassen sich jedoch kaum Rückschlüsse auf die *in vivo* - Aktivitäten dieser Zellen ziehen. Nur DUDLEY et al. (71) konnten mittels eines Magnet-Resonanz-Spektrographie-Verfahrens bisher Ergebnisse bezüglich der Funktion des NHE-1 *in vivo* darstellen. Er verglich die durch Belastung hervorgerufenen pH-Veränderungen im Skelettmuskel *in vivo* und die leukozytäre NHE-1-Aktivität *in vitro* bei acht essentiellen Hypertonikern und einer Gruppe von normotensiven Kontrollpersonen. Dabei war der pH im ruhenden Skelettmuskel und in unstimulierten Leukozyten der essentiellen Hypertoniker ähnlich dem der Kontrollgruppe, nach Stimulierung (Ansäuerung) konnte jedoch eine höhere NHE-1-Aktivität in den Leukozyten der Hypertoniker gegenüber den Normotoniern ermittelt werden.

Da es kaum realisierbar ist, von einem Probanden zu Forschungszwecken glatte Gefäßmuskelzellen zu gewinnen, muß zur Untersuchung der Stimulierbarkeit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  eine andere Zellart benutzt werden. Zur Überprüfung einer möglichen genetischen Weitergabe pathophysiologischer Mechanismen konnten wir deshalb nur leicht gewinnbare Zellen verwenden. Da wir für die Messungen jedoch eine Zellzahl in Größenordnungen von  $10^7$  benötigten, ließ sich dies an nativen Zellen in größerem Umfang nur schwer realisieren. Es mußte also ein Weg gefunden werden, leicht zugängliche Zellen *in vitro* weiter zu vermehren. Eine weitere Bedingung bestand darin, daß die zur Untersuchung vorgesehenen Zellen

den NHE-1 exprimieren. Da die Isoform 1 des NHE ein in Eukaryoten-Zellen ubiquitär verbreitetes Transportprotein ist (53), bot sich für uns eine Entnahme peripher-venösen Blutes an.

ROSSKOPF et al. (64) benutzten zur Untersuchung der NHE-1-Aktivität Thrombozyten, DíEZ et al. (62) und CANESSA et al. (63) untersuchten die Na<sup>+</sup>-abhängige Aktivität des NHE-1 in Erythrozyten. Die Arbeitsgruppe um PIETRUCK experimentierte mit Hautfibroblasten von Probanden, deren Lymphozyten in einer vorgehenden Studie untersucht worden waren (99).

Obwohl Plättchen und glatte Muskelzellen eine gewisse Ähnlichkeit besitzen (59), haben jedoch Thrombozyten und Erythrozyten schon *in vivo* eine nur sehr begrenzte Lebensdauer (9-12 bzw. 110 - 130 Tage (95)). Im Gegensatz dazu können Lymphozyten *in vivo* eine erheblich längere Lebensdauer aufweisen, 90 % von ihnen werden wenigstens 18 Monate, ein Teil vermutlich viele Jahre alt. Die *in vivo* - Verhältnisse sind allerdings nur bedingt auf die *in vitro* - Verhältnisse zu übertragen. Das Hauptargument für die Verwendung von Lymphozyten in unserer Untersuchung war jedoch die weitgehende Vergleichbarkeit mit glatten Muskelzellen.

Viele bereits erwähnte Studien wurden an Blutzellen von Probanden mit bereits etablierter essentieller Hypertonie durchgeführt. Es besteht immer die Gefahr, daß die Ergebnisse durch die vorherrschenden Verhältnisse *in vivo* beeinflußt werden und man somit Ergebnisse erhält, die unter Einwirkung verschiedener endogener Faktoren zu Stande kommen. Als mögliche Einflußgrößen im Blutmilieu kommen letztendlich alle Faktoren mit direkter oder indirekter Wirkung auf die Zellen in Betracht. So muß man z. B. die erniedrigte Insulinsensitivität beim Diabetes mellitus oder die veränderten Membraneigenschaften bei Vorliegen eines pathologischen Lipidmetabolismus berücksichtigen. Daneben zählen außer den „natürli-

chen“ Molekülen auch „nichtnatürliche“, wie z. B. Medikamente und deren Abbauprodukte dazu. Deshalb ist es wichtig, die mögliche Wirkung dieser Faktoren auf das zu untersuchende Material möglichst klein zu halten oder günstigenfalls sogar auszuschalten oder bei allen Probanden konstant zu halten. Außerdem muß man bei der Untersuchung der Pathogenese der essentiellen Hypertonie auch genetische Aspekte in Betracht ziehen (15). Weiterhin sind noch Hypertonie-assoziierte Veränderungen zu berücksichtigen, die bei der Hypertonie zwar auftreten, aber mit deren Pathogenese nicht unmittelbar in Zusammenhang stehen.

Durch diese Vielzahl von Einflüssen lassen sich pathogenetische Kausalitäten deshalb nur erschwert feststellen bzw. ursächliche Veränderungen von Hypertonie-induzierten Veränderungen kaum klar unterscheiden.

Vor diesem Hintergrund wurde 1993 durch ROSSKOPF et al. erstmalig eine Studie an Lymphozyten durchgeführt, welche vorher mit Epstein-Barr-Viren immortalisiert worden waren (22).

Das Epstein-Barr-Virus ist ein humanpathogenes herpesähnliches DNS-Virus. Es wird für die Entstehung der infektiösen Mononukleose, des Burkitts-Lymphoms und des nasopharyngealen Karzinoms verantwortlich gemacht. EBV transformiert humane Lymphozyten, ohne daß diese dann bei Kultivierung infektiöse Viren produzieren bzw. in das Medium abgeben. Nach erfolgreicher Transformation ist eine Anzucht großer Lymphozytenzahlen möglich. Das Virus ist für B-Lymphozyten zellspezifisch, eine Infektion anderer Zellarten kann ausgeschlossen werden.

Diese Transformation stellt sich nicht nur als geeignetes Instrument zur Vermehrung der Lymphozyten dar, sondern ist auch sehr gut zur Untersuchung von genetisch determinierten Abnormalitäten bei dem jeweils betrachteten Krankheitsbild geeignet. Der Vorteil der von ROSSKOPF et al. beschriebenen

Vorgehensweise liegt insbesondere darin, daß mögliche patientenspezifische Effekte oder solche, die aus dem hypertensiven Milieu erwachsen, ausgeschlossen werden, denn alle transformierten Zellen wachsen lange genug vor der Messung unter identischen Bedingungen.

Außerdem wurde durch Einlagerung der immortalen Zellen in flüssigen Stickstoff eine umfangreiche Zellbank angelegt, aus der für künftige Studien ohne größeren Aufwand jederzeit Zellen reaktiviert werden können. Durch die immortale Zelllinie steht damit jederzeit eine beliebige Anzahl von Zellen zur Verfügung.

Die immortalisierten Lymphozyten erhalten im Laufe der Kultivierung den Status eines Lymphoblasten. Bei der Interpretation der Ergebnisse muß diese Tatsache dann berücksichtigt werden.

Außerdem konnten ROSSKOPF et al. nachweisen, daß die NHE-1-Aktivität von Lymphozyten durch die Transformation mit Epstein-Barr-Viren nicht beeinflusst wird (22). Dies könnte ein wichtiger Hinweis auf eine mögliche genetische Beeinflussung der Stoffwechselprozesse sein.

Die Übertragbarkeit unserer Ergebnisse von Lymphozyten auf glatte Muskelzellen ist noch nicht endgültig geklärt, es wurden jedoch Hinweise auf ein ähnliches Verhalten des NHE-1 in Lymphozyten und glatten Muskelzellen herausgefunden.

Die essentielle Hypertonie ist in der Regel mit bestimmten strukturellen Veränderungen der Gefäße assoziiert, die als Mediahypertrophie bzw. Mediahyperplasie bezeichnet werden. Auch die linksventrikuläre Hypertrophie ist in diesem Zusammenhang zu nennen. Während man die Veränderungen früher als adaptiv angesehen hat, wird derzeit diskutiert, ob nicht auch die Einwirkung anderer, blutdruckunabhängiger Faktoren, zu den beschriebenen Veränderungen führen kann (53).



So konnten z. B. BERK et al. (57) bei Spontan Hypertensiven Ratten eine deutlich gesteigerte Replikation der glatten Muskelzellen im Gegensatz zu normotensiven Wistar-Kyoto-Ratten nachweisen. Bei den Spontan Hypertensiven Ratten war dies von einer erhöhten Aktivität des NHE-1 begleitet.

Die Untersuchungen von IZZARD et al. (55) belegten, daß der pH in nichtkontrahierten glatten Muskelzellen von Hypertonikern und Normotonikern im Ruhezustand gleich, nach Stimulation mit Norepinephrin in den Zellen der Hypertoniker jedoch alkalischer war. DUDLEY et al. (71) erkannten mittels eines Magnet-Resonanz-Spektrographie-Verfahrens eine erhöhte NHE-1-Aktivität in den Leukozyten von Hypertonikern im Gegensatz zu Normotonikern nach durch Belastung hervorgerufenen pH-Veränderungen im Skelettmuskel *in vivo*. Diese Untersuchungen weisen ebenfalls auf eine ähnliche Wirkung des NHE-1 in Lymphozyten und in glatten Gefäßmuskelzellen hin.

Da die Lymphozyten relativ einfach durch peripher-venöse Blutentnahme von Probanden zu erhalten waren, und wir Fremdeinflüsse auf das Untersuchungsmaterial möglichst ausschalten wollten, um entsprechend der Hypothese genetisch determinierte Zusammenhänge zu untersuchen, griff unsere Arbeitsgruppe auf das von ROSSKOPF et al. (22) entwickelte Verfahren zurück. Die Immortalisierung erfolgte in unserer Untersuchung ebenfalls durch eine Transformation mit Epstein-Barr-Viren.

Die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration wird, wie bereits mehrfach diskutiert, durch eine Vielzahl von Stoffen beeinflusst, so z. B. durch Angiotensin II oder Katecholamine (s. Kapitel 4). Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß die Hypertonie durch eine vermehrte Produktion von para- und autokrin wirkenden Substanzen, das heißt also durch eine erhöhte Sympathikusaktivität, bedingt sein kann. Da wir gemäß der eingangs aufgestellten Hypothese die Stimulierbar-

keit der intrazellulären freien  $\text{Ca}^{2+}$  messen wollten, lag es nahe, im Meßansatz die Stimulierbarkeit der immortalen Zellen mit solchen oben erwähnten Substanzen zu testen.

In Fibroblasten konnte der Nachweis einer Aktivierung des NHE-1 durch Vasopressin und Bradykinin oder in glatten Muskelzellen durch Angiotensin bereits vor längerer Zeit geführt werden (77).

Angiotensin II oder Noradrenalin zur Stimulation zu verwenden ist jedoch nicht möglich, da nach dem derzeitigen Kenntnisstand bisher auf Blutzellen, insbesondere auf immortalisierten Lymphozyten, keinerlei Rezeptoren für o. g. Stoffe nachgewiesen wurden (21). SCHULAM et al. und MAZER et al. konnten jedoch nachweisen, daß Platelet Activating Factor (PAF) in B-Lymphozyten *in vitro* zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration führt (73, 96).

PAF bewirkt in B-Lymphozyten neben der Erhöhung des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  eine Reihe von weiteren Veränderungen, wie z.B. eine Stimulation des Einbaus von  $^{32}\text{P}$  in Phosphatidylcholin, Phosphatidylinositol und Phosphatsäure, Arachidonsäure-Freisetzung, die Bildung von 5-Hydroxyeicosatetraenoidsäure und die Induktion der Transskription von Proto-Onkogenen (c-fos, c-jun) (73).

## **8.6. Ergebnisse**

Wie oben beschrieben, wurden ursprünglich von 106 Probanden venöse Blutentnahmen durchgeführt. Vollständige Meßreihen konnten jedoch nur von einem Drittel der Probanden (37) erhoben werden. Eine Erhöhung der Probandenzahl wäre wünschenswert, mit der von uns angewendeten Methodik müßte man aber dann von einer dreifach höheren Eingangsprobandenzahl ausgehen. Dies war jedoch unter den Bedingungen einer drittmittelfinanzierten Studie (Community-Medicine-Projekt) aus zeitlichen und personellen Gründen nicht zu realisieren.

## 8.7. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Basalwerte

In dieser Arbeit wurden an immortalen Lymphoblasten intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen gemessen, die sich durch Stimulation der Zellen mit PAF erhöhen. SIFFERT et al. (58) untersuchten 1989 Plättchen von gesunden Probanden. Sie konnten herausfinden, daß eine Alkalisierung von Plättchen durch Stimulation mit Thrombin gleichzeitig mit einer Freisetzung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> verbunden ist. Dies kann als Zeichen einer Aktivierung des NHE-1 gewertet werden, da die Ca<sup>2+</sup>-Erhöhung durch Zugabe von Ethylisopropylamilorid (EIPA), einem Inhibitor des NHE-1, aufgehoben wurde.

ERNE et al. (59) ermittelten eine intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration von 108 nmol/l bei Normotensiven bzw. 168 nmol/l bei Hypertensiven. Diese Werte wurden an unstimulierten Plättchen mit Hilfe einer Fluoreszenztechnik ermittelt.

Die mittleren basalen Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen in unserer Studie lagen bei 95,1 nmol/l bei Normotensiven bzw. 97,4 nmol/l bei den hypertensiven Probanden. Das Ergebnis von ERNE et al. bezüglich der Konzentration des intrazellulären Ca<sup>2+</sup> von normotensiven Probanden bestätigt sich somit, die intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration bei Hypertensiven lag bei ERNE et al. jedoch wesentlich höher. Einschränkend ist allerdings anzumerken, daß ERNE et al. die Konzentrationen an Plättchen gemessen hatten sowie als Farbstoff Quin-2 verwendeten, so daß eine direkte Vergleichbarkeit nicht gegeben ist. Auch SIFFERT et al. (52) konnten ebenfalls keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich der basalen freien Ca<sup>2+</sup>-Konzentration in Lymphozyten von Normotonikern und Hypertonikern feststellen.

LECHI et al. (98) konnten ebenfalls in Thrombozyten von Hypertensiven höhere basale freie intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen als in den Thrombozyten einer normotensiven Kontrollgruppe nachweisen (167,4 ± 5,0 vs. 143,2 ± 3,1

nmol/l). Obwohl eine große Überlappung der Meßwerte in beiden Gruppen festgestellt wurde, unterschieden sie sich signifikant ( $p < 0,001$ ). Eine Korrelation der gemessenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen zum Blutdruck konnte nicht hergestellt werden.

## 8.8. Normwertbildung

Bisher wurden nur relativ wenige Studien durchgeführt, die eine Aussage zum Anteil der essentiellen Hypertoniker mit „erhöhter“ intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit an der Gesamtpopulation der essentiellen Hypertoniker machen konnten. Es gibt deshalb in der Literatur weder Angaben über einen „Normalwert“ des mit PAF stimulierbaren intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  noch eine Einigung über die Verfahrensweise zur Erlangung eines solchen „Normalwertes“. Außerdem können aus oben genannten Gründen die Meßwerte anderer Autoren nicht einfach übernommen werden.

ROSSKOPF et al. (64) ermittelten zur Unterteilung der essentiellen Hypertoniker in eine Gruppe mit „hoher“ und eine Gruppe mit „niedriger“ NHE-1-Aktivität die  $v_{\max}$  des Austauschers in Thrombozyten. Für die Bildung eines „Normalwertes“ diente dabei die errechnete  $v_{\max}$  der Normotoniker zuzüglich der zweifachen Standardabweichung.

DIEZ et al. (62) untersuchten die  $\text{Na}^+$ -abhängige Aktivität des NHE-1 als initiale Rate der Veränderung des intrazellulären pH von Erythrozyten nach Ansäuerung mit Azetazolamid. Als Grenzpunkt zur Unterteilung der Hypertoniker in solche mit „erhöhter“ und andere mit „normaler“ NHE-1-Aktivität benutzte diese Forschungsgruppe die obere Grenze der normalverteilten Hauptgruppe, welche 90 % der normotensiven Population einschloß.

In der Studie von CANESSA et al. (63) wurde, wie bereits früher beschrieben (93, 94), der Natrium-Protonen-Austausch in Erythrozyten als nach intrazellulär gerichteter  $\text{Na}^+$ -Einstrom, welcher von einem zellauswärts gerichteten Protonengradienten unterhalten wurde, gemessen. Die initiale Ansäuerung der Zellen erfolgte mittels Inkubation der Zellen bei unterschiedlichem extrazellulären pH-Wert, dieses Verfahren entspricht ebenfalls einer Berechnung der  $v_{\max}$ . Der Normalwert für die  $v_{\max}$  wurde auch in dieser Studie mit Hilfe des Mittelwertes der normotensiven Gruppe zuzüglich der zweifachen Standardabweichung gebildet.

In unserer Untersuchung bestand das primäre Ziel darin, den Anteil der essentiellen Hypertoniker mit einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit (als indirektes Maß der NHE-1-Aktivität) an der Gesamtgruppe der essentiellen Hypertoniker zu ermitteln. Für die Beurteilung, ob die Stimulierbarkeit des  $\text{Ca}^{2+}$  durch PAF im Normbereich liegt oder als erhöht gilt, bestand die Notwendigkeit, zunächst einen „Normwert“ zu definieren. Dazu wurden die Meßwerte der Normotoniker herangezogen.

Mittels des Kolmogoroff-Smirnoff-Testes konnten wir in der normotensiven Gruppe eine Gauß'sche Verteilung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Werte nach PAF-Stimulation belegen, während dieser Nachweis in der hypertensiven Gruppe nicht gelang. Danach konnten wir als oberen Grenzpunkt den Mittelwert (58,1 nmol/l) zuzüglich der zweifachen Standardabweichung (55 nmol/l) der PAF-induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale der normotensiven Probandengruppe nutzen. Dieser Grenzpunkt lag also bei 110 nmol/l.

Zur Absicherung unserer Ergebnisse wählten wir zusätzlich zum vorgehend beschriebenen Verfahren der Festlegung des oberen Grenzpunktes noch eine andere Herangehensweise: Wir definierten die Grenze für „normale“  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale bei PAF-

Stimulation als obere 99%ige Konfidenzgrenze der normotonen Gruppe und ermittelten so einen Grenzwert bei 75 nmol/l.

### **8.9. Intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen nach Stimulation mit PAF**

Wie bereits in Voruntersuchungen beschrieben, nimmt der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Gehalt von Lymphozyten hypertensiver Probanden nach Stimulation mittels PAF zu (52, 60). In unserer Untersuchung erhöhte sich der intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Gehalt um durchschnittlich 58,1 nmol/l bei den normotensiven bzw. um 89,5 nmol/l bei den hypertensiven Probanden. Diese Differenz zwischen den beiden Probandengruppen war auffallend, aber auf Grund der zahlenmäßig kleinen Probanden-Populationen lag keine statistische Signifikanz vor.

Wenn man den Schluß zuläßt, daß eine erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentration auf eine gesteigerte NHE-1-Aktivität hinweist, bestätigen unsere Ergebnisse vorhergehende Untersuchungen. LIVNE et al. (65) verglichen bereits 1987 die Aktivität des NHE-1 von 28 Normotonikern und 22 Hypertonikern. Die Forschungsgruppe ermittelte eine signifikant höhere NHE-1-Aktivität in Thrombozyten von hypertensiven Patienten als von Normotonikern. Diese Ergebnisse konnten durch SCHMOUDER et al. (66) 1989 und ROSSKOPF et al. (61) 1991 bestätigt werden.

SCHMOUDER et al. testeten den NHE-1 in Plättchen von männlichen Probanden, die Aktivität des Austauschers war bei 24 Hypertonikern signifikant höher als bei 20 Normotonikern ( $p < 0,006$ ). Interessanterweise konnte er eine positive Korrelation mit der Höhe des diastolischen Blutdruckes nachweisen (66). Die Gruppe um ROSSKOPF benutzte einen optischen Schwellungstest an Thrombozyten zur Bestimmung der NHE-1-Aktivität von 20 Hypertonikern und 32 gesunden Probanden. Auch mit diesem Verfahren konnte in der hypertensiven Gruppe eine signifikant höhere Austauscheraktivität nachgewiesen

werden ( $p < 0,0001$ ), allerdings war auch hier ein Überlappungsbereich erkennbar (61).

Nachfolgend wurden verschiedene andere Zelltypen von Patienten mit essentieller Hypertonie untersucht. Eine erhöhte NHE-1-Aktivität konnte dabei auch in anderen Blutzellen, wie Leukozyten (67, 68), Erythrozyten (63, 69) und Lymphozyten (70) gefunden werden. Auch in Skelettmuskelzellen von Hypertonikern wurde eine NHE-1-Aktivitätserhöhung gefunden (71). Beim Vergleich der verschiedenen Untersuchungsergebnisse sind jedoch folgende Faktoren zu beachten, die u. U. einen erheblichen Einfluß auf die Ergebnisse ausüben können:

?? Unterschiede zwischen verschiedenen Blutzellen,

?? Vorliegen verschiedener Patienten-Subpopulationen,

?? Inhomogenitäten in den untersuchten Gruppen von Blutzellen,

?? Unterschiede zwischen menschlichen und tierischen Blutzellen (72).

Eine Ursache für eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aktivierbarkeit könnte auch in einer Mutation oder einer Überexpression des NHE-1-Genes liegen. Dies könnte in der langen Zeit der Zellkultivierung begründet sein. Durch ROSSKOPF et al. konnte eine solche Annahme jedoch ausgeschlossen werden (22). Außerdem konnte keine Veränderung des Austauschermoleküls selbst bei Hypertonikern gefunden werden (21).

Wahrscheinlicher ist, daß nach der oben vorangestellten Theorie bei unserer hypertensiven Probandengruppe eine Teilgruppe mit wesentlich erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Werten existiert. Das Vorliegen einer solchen Subgruppe zeichnete sich bereits in Untersuchungen von DíEZ et al. (12 von 27 Probanden - 44 %) (62), ROSSKOPF et al. (14 von 26 Probanden - 54 %) (64) und CANESSA et al. (45 %) (63) ab.

Allerdings war auch in den Studien dieser Autoren das Problem aufgetreten, daß noch kein verlässlicher Grenzwert einer „normalen“ zu einer „erhöhten“ NHE-1-Aktivität existiert.

### **8.10. Erhöhte intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen bei Hypertonikern**

Wie bereits auf Seite 77 diskutiert, konnten die normalverteilten Werte der normotensiven Gruppe zur Bildung eines „Normalwertes“ herangezogen werden. Die Bildung eines solchen Normalwertes war zwingend notwendig, da nach derzeitigem Kenntnisstand ein „Normalwert“ für den intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Gehalt von Lymphozyten nach Stimulation mit PAF noch nicht existiert. Wir ermittelten schließlich einen Grenzwert von 110 nmol/l. Alle Werte, die unter unseren Bedingungen über dieser Grenze lagen, bezeichneten wir als „erhöht“. Unter Nutzung der 99%igen Konfidenzgrenze zur Normalwertbildung lag die Grenze bei 75 nmol/l.

Bei zehn von 37 hypertensiven Probanden (27 %) konnten intrazelluläre Ca<sup>2+</sup>-Werte gemessen werden, die über unserer definierten Grenze von 110 nmol/l lagen. Bei Heranziehung eines Grenzwertes von 75 nmol/l wiesen 17 hypertensive Probanden (46 %) erhöhte Werte auf. In der Gruppe der 26 normotensiven Kontrollpersonen wurden nur bei einem Probanden (ca. 4 %) erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Werte > 110 nmol/l gemessen.

Damit bestätigen unsere Ergebnisse die Voruntersuchungen von DíEZ et al. (62), CANESSA et al. (63) und ROSSKOPF et al. (64). In der Untersuchung von DíEZ et al. wiesen 12 von 27 hypertensiven Probanden eine erhöhte (44 %) NHE-1-Aktivität auf. Interessanterweise zeigte sich eine große Streuung der Meßwerte sowie eine bimodale Verteilung. 90 % der Mitglieder der normotensiven Kontrollgruppe wiesen Ca<sup>2+</sup>-Werte unterhalb der definierten oberen Grenze der „Normalwerte“ auf. Bei Be-



rechnung der NHE-1-Aktivität der Normotensiven ergab sich eine Normalverteilung (62).

Die Studie von ROSSKOPF et al. ergab in der normotensiven Gruppe eine Normalverteilung der  $v_{\max}$ -Werte des NHE-1. In der hypertensiven Gruppe kristallisierten sich jedoch zwei Gruppen heraus, eine mit einer „hohen“ (14 Probanden) und eine mit einer „niedrigen“ (12 Probanden) Austauschaktivität. Bei beiden schien eine Normalverteilung vorzuliegen, für eine klare Aussage war die Datenmenge jedoch zu gering. Der Anteil der Hypertensiven mit einer „hohen“ Austauschaktivität lag somit in dieser Studie bei 54 %.

Auch die Untersuchung von CANESSA et al. ergab in der hypertensiven Gruppe eine bimodale Verteilung. 45 % der hypertensiven Probanden wiesen eine über die definierte Grenze erhöhte Austauschaktivität auf (63).

Unter physiologischen Bedingungen kann eine durch Agonisten (z. B. Angiotensin II, Vasopressin, Noradrenalin) induzierte Beeinflussung der intrazellulären Signalweiterleitung und damit auch eine Beeinflussung des freien intrazellulären  $Ca^{2+}$  über drei Arten von Rezeptoren realisiert werden:

- ??Rezeptoren, die die Phosphorylierung von Tyrosinresten in Zielproteinen katalysieren,
- ??ligandengesteuerte Rezeptoren und
- ??Rezeptoren, die G-Protein-gesteuert die Freisetzung von second messengern bewirken.

Die mögliche Beteiligung des NHE-1 ist dabei über den zweiten, wahrscheinlicher aber über den dritten Rezeptortyp denkbar. So könnte langfristig eine Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch eine veränderte Aktivität intrazellulärer Signalsysteme durch vermehrte Freisetzung von  $Ca^{2+}$  aus den intrazellulären Speichern verursacht werden. Ein Auslöser dieser signalvermittelten Beeinflussung der zytosolischen  $Ca^{2+}$ -Konzentration könnten Rezeptoren für vaso-

konstriktorische Substanzen und mechanosensitive Rezeptoren, die zum Teil an G-Proteine der Membran gekoppelt sind, sein.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß in der von uns untersuchten Gruppe weitgehend unselektierter essentieller Hypertoniker die Prävalenz einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit bei ca. 30 bis 45 % liegt. Dieses Ergebnis läßt sich mit der von mehreren Arbeitsgruppen nachgewiesenen Aktivierung des NHE-1 bei ca. 40 % der essentiellen Hypertoniker in Einklang bringen.

### **8.11. Abhängigkeit der Signalhöhe von antihypertensiver Therapie**

Wir untersuchten in der Gruppe der hypertensiven Probanden die mögliche Abhängigkeit der Höhe der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Signale von einer vorangegangenen antihypertensiven Therapie. Eine Korrelation konnte jedoch nicht ermittelt werden. Es muß allerdings kritisch angemerkt werden, daß die untersuchten Hypertoniker verschiedene antihypertensiv wirksame Substanzen ( $\beta$ -Blocker,  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker, ACE-Hemmer) eingenommen hatten. Die Aussage ist deshalb mit Vorbehalt zu interpretieren.

Auch ROSSKOPF et al. (64) führten ihre Untersuchung an behandelten Hypertonikern durch. Acht Probanden, die durch ihre Hausärzte mit einem Diuretikum oder einem  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal-Blocker therapiert worden waren, erhielten sechs Wochen lang 10 mg Enalapril täglich. Auch hier konnte keine Korrelation zwischen den behandelten und den unbehandelten Hypertonikern hinsichtlich einer erhöhten NHE-1-Aktivität hergestellt werden.

## 8.12. Abhängigkeit der Signalhöhe von weiteren Parametern

Wir versuchten, eine Abhängigkeit der PAF-stimulierten Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration von verschiedenen Faktoren zu ermitteln. Wir konnten jedoch keine Abhängigkeit der Signalhöhe von Alter, Geschlecht, BMI oder Höhe der Plasmalipide nachweisen.

Auf einen Vergleich der gemessenen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration mit den ermittelten Blutdruckwerten verzichteten wir. Die Blutdruckwerte der Probanden stellten letztendlich nur einmalige Meßwerte mit ungenügender Aussagekraft dar, die einer Vielzahl von möglichen Einflüssen unterliegen, von denen nachfolgend nur einige angeführt sind:

?? Art der Therapie

?? Güte der Blutdruckeinstellung

?? Compliance der Patienten

?? Einfluß anderer Medikamente

?? Zirkadiane Rhythmik

?? Subjektive Meßfehler

Eine Langzeitblutdruckmessung wäre geeignet, einige der genannten Störfaktoren auszuschließen. Sie konnte aus organisatorischen Gründen jedoch nicht realisiert werden.

In der normotensiven Probandengruppe würde ein Großteil der aufgeführten Einflüsse wegfallen, eine Aussage bezüglich der Korrelation des Blutdruckes mit der gemessenen intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bei Normotonikern erscheint im Sinne unserer Hypothese allerdings nicht sinnvoll.

CANESSA et al. (63) untersuchten ebenfalls die Abhängigkeit von Alter, Gewicht, systolischem und diastolischem Blutdruck hinsichtlich einer erhöhten NHE-1-Aktivität. Sie konnten aber auch keine signifikanten Unterschiede feststellen.

DIEZ et al. (62) stellten höhere Blutdruckwerte bei Patienten mit gesteigerter NHE-1-Aktivität fest, allerdings unterhalb einer statistischen Signifikanz. Weiterhin konnten sie eine direkte Korrelation zwischen Alter und der NHE-1-Aktivität ermitteln, in einer nachfolgenden Multi-Regressions-Analyse mit anderen Parametern konnte jedoch keine unabhängige Korrelation bestätigt werden. Auch in seiner Gruppe waren die anderen von uns untersuchten Parameter (Hypertoniedauer, Blutdruckhöhe, Body Mass Index) nicht statistisch signifikant unterschiedlich.

Da auch ein Teil unserer hypertensiven Probanden erhöhte Blutzuckerwerte aufwies (Daten im Anhang), ist eine Beeinflussung denkbar. Eine Korrelation der gemessenen Blutzuckerwerte mit der Höhe der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Werte nach Stimulation mit PAF konnten wir jedoch nicht ermitteln.

Die Diskussion über eine Beeinflussung des NHE-1 durch eine Hyperinsulinämie wird in der Literatur uneinheitlich geführt.

CANESSA et al. hatten 1993 herausgefunden, daß eine erhöhte NHE-1-Aktivität in Erythrozyten von Schwarzen stark mit dem Vorliegen eines insulin-resistenten Glukosestoffwechsels assoziiert ist (97). PONTREMOLI et al. konnten ebenfalls nachweisen, daß die Aktivität des NHE-1 durch Insulin *in vitro* signifikant beeinflusst wird (36). CARR et al. konnten im Gegensatz dazu keine Korrelation der Austauschaktivität von Lymphozyten mit der Höhe des Insulinspiegels herstellen (14).

### 8.13. Ausblick

Unsere Arbeit stellt unseres Wissens nach die einzige Untersuchung dar, die ausschließlich die Bestimmung der Prävalenz einer erhöhten Stimulierbarkeit des intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  bei Hypertonikern zum Ziel hat.

Durch die äußerst geringe Zahl der bisher veröffentlichten Studien zu diesem Thema erwies sich die Vergleichbarkeit und Standardisierung der Methoden und Ergebnisse als ein Problem. Obwohl weitaus mehr Patienten als in bisherigen Studien für diese Untersuchung initial rekrutiert worden waren, liegen die verwertbaren Zahlen dennoch nur im Bereich anderer, vergleichbarer Studien. Die Ursache dafür liegt hauptsächlich in den zur Verfügung stehenden knappen zeitlichen und finanziellen Ressourcen.

Wir konnten in unserer Studie erstmals die Prävalenz einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit bei essentiellen Hypertonikern mit ca. 30 bis 45 % schätzen. Dieses Ergebnis stimmt letztlich mit der allgemeinen Annahme überein, daß die Hypertonie keine homogene Gruppe bezüglich der pathophysiologischen Kausalitäten darstellt.

Unsere Arbeit stellte eine Voruntersuchung zu einer gegenwärtig im Gebiet von Greifswald stattfindenden Studie statt, bei der bei essentiellen Hypertonikern die NHE-1-Aktivität direkt gemessen und mit der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit verglichen werden soll. Es stellte sich jetzt die Frage, ob mit einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit eine höhere Rate von Gefäßkomplikationen, wie die koronare Herzkrankheit oder die diabetische Nephropathie einhergehen.

Es gibt Hinweise, daß sich der von uns gemessene Effekt auch genetisch determinieren läßt. So hat die Arbeitsgruppe um SIFFERT vor kurzem einen C825T-Polymorphismus jenes Genes

entdeckt, welches die  $\beta_3$ -Untereinheiten von G-Proteinen kodiert (100). Man kann spekulieren, daß genetisch veränderte G-Proteine über eine gesteigerte Aktivität des NHE-1 eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Stimulierbarkeit zur Folge haben könnten. Nachfolgend fanden Untersuchungen statt, die unterschiedliche Ergebnisse erbrachten: In einer japanischen Studie fand sich keine Korrelation des Vorhandenseins des Polymorphismus zur Blutdruckhöhe (102), auch konnte keine Verbindung mit dem Auftreten der diabetischen Nephropathie aufgedeckt werden (103). Im Gegensatz dazu fanden jedoch NABER et al. eine gesteigerte Epinephrin-induzierte Plättchen-Aggregation heraus (104).

Zukünftige Studien müssen die Vererbbarkeit des von uns untersuchten Phänomens und die zugrundeliegenden molekularen Veränderungen weiter klären.

## 9. Quellenverzeichnis

- 1 World Health Organization Expert Committee: Hypertension control. World Health Organization, Technical Report Series No. 862, Geneva 1996, 3.
- 2 Keil U, Remmers A, Chambless L, Hense HW, Stieber J, Lauck A: Epidemiologie des Bluthochdrucks: Häufigkeit, Verteilung, Bekanntheits- und Behandlungsgrad der Hypertonie in der Hansestadt Lübeck. Ergebnisse der Lübecker Blutdruck-Studie und Vergleich mit Daten der Münchner Blutdruck-Studie. Münch Med Wochenschr 1986, 128: 424-429.
- 3 Statistisches Bundesamt: Statistisches Jahrbuch 1997. 1. Aufl, Metzler-Poeschel, Stuttgart 1997, 440.
- 4 Riede UN, Klein PJ: Generalisierte Kreislaufstörungen. In: Riede UN, Schaefer HE, Wehner H: Allgemeine und spezielle Pathologie. 2. Aufl, Thieme, Stuttgart [u. a.] 1989, 342-349.
- 5 Keil U, Allhoff P, Laaser U: Epidemiologie der Hypertonie. In: Ganten D, Ritz E: Lehrbuch der Hypertonie. Schattauer, Stuttgart 1985, 6-20.
- 6 Kuch B, Hense H-W: Risikofaktoren des Hochdrucks: Übergewicht. In: Klaus D [Hrsg]: Manuale hypertonicum. Du-stri-Verl., Deisenhofen 1997, II-2.1-GW, 1-9.
- 7 Kaplan NM: Clinical hypertension. 6. Aufl, Williams & Wilkins, Baltimore [u. a.] 1990, 1-25.

- 8 Arroll B, Beaglehole R: Does physical activity lower blood pressure: A critical review of the clinical trials. *J Clin Epidemiol* 1992, 45: 439-447.
- 9 Deutsche Liga zur Bekämpfung des hohen Blutdruckes: Alkohol läßt den Blutdruck steigen. *Herz Gefäße* 1991, 11: 395.
- 10 Keil U, Chamless L, Filipiak B, Härtel U: Alcohol and blood pressure and its interaction with smoking and other behavioral variables: Results from the MONICA Augsburg survey 1984/85. *J Hypertens* 1991, 9: 491-498.
- 11 Keil U, Spelsberg A: Epidemiologie der Atherosklerose-risiken. In: Schwandt P, Richter OW: *Handbuch der Fettstoffwechselstörungen*. Schattauer, Stuttgart [u. a.] 1995, 65-83.
- 12 Cairns V, Keil U, Döring A, Koenig W, Stieber J, Kleinbaum DG: Oral contraceptive use and blood pressure in a German metropolitan population. *Int J Epidemiol* 1985, 14: 389-395.
- 13 Keil U: Epidemiologie der Hypertonie. In: Klaus D [Hrsg]: *Manuale hypertonicum*. Dustri-Verl, Deisenhofen 1997, II-1-GW, 1-22.
- 14 Carr P, Taub NA, Watts GF, Poston L: Human lymphocyte sodium-hydrogen exchange: The influences of lipids, membrane fluidity, and insulin. *Hypertension* 1993, 21: 344-352.
- 15 Klaus D: Ätiopathogenese der essentiellen Hypertonie. In: Klaus D [Hrsg]: *Manuale hypertonicum*. Dustri-Verl, Deisenhofen 1997, III-11-GW, 1-53.



- 16 Kotchen JM, Taylor P, McFadden M, Ngai B, Guthrie GP, Kotchen TA: Blood pressure responses to acute sodium chloride depletion in healthy young adults: The Bourbon county study. In: Rettig R, Ganten D, Luft F [Hrsg]: Salt and hypertension - dietary minerals, volume homeostasis and cardiovascular regulation. Springer, Berlin [u. a.] 1989, 275-282.
- 17 Hamet P, Zdenka P, Adarichev V, Adaricheva K, Tremblay J: Hypertension: Genes and environment. J Hypertens 1998, 16: 397-418.
- 18 Noël J, Pouysségur J: Hormonal regulation, pharmacology, and membrane sorting of vertebrate Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms. Am J Physiol 1995, 268: C283-C296.
- 19 MacMahon S: Alcohol consumption and hypertension. Hypertension 1987, 9: 111-121.
- 20 Siffert W, Düsing R: Sodium-proton exchange and primary hypertension - an update. Hypertension 1995, 26: 649-655.
- 21 Siffert W: G proteins, hypertension, and coronary heart disease - novel findings and hypotheses. Kidney Blood Press Res 1996, 19: 71-80.
- 22 Roskopf D, Frömter E, Siffert W: Hypertensive sodium-proton exchanger phenotype persists in immortalized lymphoblasts from essential hypertensive patients. A cell culture model for human hypertension. J Clin Invest 1993, 92: 2553-2559.

- 23 Walls EV, Crawford DH: Generation of human B lymphoblastoid cell lines using Epstein-Barr virus. In: Klaus GGB [Hrsg]: Lymphocytes - a practical approach. IRL Press, Oxford 1987, 149-162.
- 24 Stryer L: Biochemie. 4. Aufl, Spektrum Akad Verl, Heidelberg [u. a.] 1991, 1027.
- 25 Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY: A new generation of  $Ca^{2+}$ -indicators with improved fluorescence properties. J Biol Chem 1985, 260: 3440-3450.
- 26 Khalil RA, Lodge NJ, Saida K, Gelband CH, van Breemen C: Calcium mobilization in vascular smooth muscle and its relevance to the etiology of hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM: Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, and management. Raven Press, New York 1990, 547-563.
- 27 Bevan JA, Bevan RD, Hwa JJ, Owen MP, Tayo FM, Winkquist RJ: Calcium, extrinsic and intrinsic (myogenic) vascular tone. In: Godfraind T, Albertini A, Paoletti R [Hrsg]: Calcium modulators. Elsevier, Amsterdam 1982, 125-132.
- 28 Cauvin C, Loutzenhiser R, van Breemen C: Mechanisms of calcium antagonist-induced vasodilation. Annu Rev Pharmacol Toxicol 1983, 23: 373-396.
- 29 Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR, Steuder M, Perz S, Keil U et al.: Association between a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. N Engl J Med 1994, 330: 1634-1638.

- 30 Cambien F, Costerousse O, Tiret L, Poirier O, Lecerf L, Gonzales MF et al.: Plasma level and gene polymorphism of angiotensin-converting enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 1994, 90: 669-676.
- 31 Lifton RP, Jeunemaitre X: Finding genes that cause human hypertension. *J Hypertens* 1993, 11: 231-236.
- 32 Hamlyn JM, Manunta P: Ouabain, digitalis-like factors and hypertension. *J Hypertens* 1992, 10(Suppl7): S99-S111.
- 33 Scheenen WJMJ, Hofer AM, Pozzan T: Intracellular measurement of calcium using fluorescent probes. In: Celis JE [Hrsg]: *Cell biology: A laboratory handbook*. 2. Aufl, Acad Press, San Diego 1994, Bd 3, 367.
- 34 Wink K: *Differenzierte Hochdrucktherapie*. Systemed-Verl, Lünen 1992, 75-96.
- 35 Klaus D: Definition, Einteilung und Klassifikation der Hypertonie - Normalwerte des Blutdrucks. In: Klaus D [Hrsg]: *Manuale hypertonicologicum*. Dusterl-Verl, Deisenhofen 1997, I-GW, 1-14.
- 36 Pontremoli R, Zerbini G, Rivera A, Canessa M: Insulin activation of red blood cell Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange decreases the affinity of sodium sites. *Kidney Int* 1994, 46: 365-375.
- 37 Watt GC: Does salt sensitivity exist? *Klin Wochenschr* 1991, 69(Suppl25): S30-S35.
- 38 Schwartz GL, Turner ST, Sing CF: Association of genetic variation with interindividual variation in ambulatory blood pressure. *J Hypertens* 1996, 14: 251-258.

- 39 Carmelli D, Robinette D, Fabsitz R: Concordance, discordance and prevalence of hypertension in World War II male veteran twins. *J Hypertens* 1994, 12: 323-328.
- 40 Carafoli E, Chiesi M, Gazzotti P: The membrane carriers related to intracellular calcium regulation. In: Laragh JH, Brenner BM: *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis, and management*. Raven Press, New York 1990, 965-976.
- 41 Guyton AC, Coleman TG, Cowley AW, Scheel KW, Manning RD, Norman RA: Arterial pressure regulation. *Am J Med* 1972, 52: 584-594.
- 42 Heagerty AM, Izzard AS: Small artery changes in hypertension. *J Hypertens* 1995, 13: 1560-1565.
- 43 Mulvany MJ: Resistance vessel structure and the pathogenesis of hypertension. *J Hypertens* 1993, 11(Suppl5): S7-S12.
- 44 Folkow B: Hypertensive structural changes in systemic precapillary resistance vessels: How important are they for in vivo haemodynamics? *J Hypertens* 1995, 13: 1546-1559.
- 45 Dzau VJ, Gibbins GH: Endothelium and growth factors in vascular remodeling of hypertension. *Hypertension* 1991, 18(SupplIII): 115-121.
- 46 Lüscher TF: The endothelium in hypertension: Bystander, target or mediator? *J Hypertens* 1994, 12(Suppl10): S105-S116.
- 47 Morris AD, Petrie JR, Connell JMC: Insulin and hypertension. *J Hypertens* 1994, 12: 633-642.

- 48 Pickering GT, Devereux RB, Gerin W, James GD, Pieper C, Schnall PL: The role of behavioral factors in white coat and sustained hypertension. *J Hypertens* 1990; 8(Suppl7): S141-S147.
- 49 Birkenhäger WH: A critical interpretation of juvenile borderline hypertension. *J Hypertens* 1991, 9(Suppl6): S2-S9.
- 50 Henry JP, Grim CE: Psychosocial mechanism of primary hypertension. *J Hypertens* 1990, 8: 783-793.
- 51 Blaustein MP: Sodium ions, calcium ions, blood pressure regulation and hypertension: A reassessment and a hypotheses. *Am J Physiol* 1977, 232: C165-C173.
- 52 Siffert W, Roszkopf D, Moritz A, Wieland T, Kaldenberg-Stasch S, Kettler N, et al.: Enhanced G protein activation in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension. *J Clin Invest* 1995, 96: 759-766.
- 53 Roszkopf D, Düsing R, Siffert W: Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension. *Hypertension* 1993, 21: 607-617.
- 54 Aviv A: The link between cytosolic  $Ca^{2+}$  and the  $Na^+-H^+$ -antiport: A unifying factor for essential hypertension. *J Hypertens* 1988, 6: 685-691.
- 55 Izzard AS, Cragoe EJ, Heagerty AM: Intracellular pH in human resistance arteries in essential hypertension. *Hypertension* 1991, 17: 780-786.
- 56 Mahnensmith RL, Aronson PS: The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circ Res* 1985, 56: 773-788.

- 57 Berk BC, Vallega GA, Muslin AJ, Gordon HM, Canessa M, Alexander RW: Spontaneously hypertensive rat vascular smooth muscle cells in culture exhibit increased growth and  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange. *J Clin Invest* 1989, 83: 822-829.
- 58 Siffert W, Siffert G, Scheid P, Akkerman JWN: Activation of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange and  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization start simultaneously in thrombin-stimulated platelets. *Biochem J* 1989, 258: 521-527.
- 59 Erne P, Bolli P, Bürgisser E, Bühler FR: Correlation of platelet calcium with blood pressure: Effect of antihypertensive therapy. *N Engl J Med* 1984, 310: 1084-1088.
- 60 Ihrke R, Gruska S, Kraatz G: Induced cytosolic  $\text{Ca}^{2+}$  rise in lymphocytes from hypertensive patients. *Pflugers Arch* 1995, 429: R63 [Abstract].
- 61 Roskopf D, Morgenstern E, Scholz W, Osswald U, Siffert W: Rapid determination of the elevated  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange in platelets of patients with essential hypertension using an optical swelling assay. *J Hypertens* 1991, 9: 231-238.
- 62 Díez J, Alonso A, Garcíandía A, López R, Gómez-Alamillo C, Arrázola A, Fortuño A: Association of increased erythrocyte  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger with renal  $\text{Na}^+$  retention in patients with essential hypertension. *Am J Hypertens* 1995, 8: 124-132.
- 63 Canessa M, Morgan K, Goldszer R, Moore TJ, Spalvins A: Kinetic abnormalities of the red blood cell sodium-proton exchange in hypertensive patients. *Hypertension* 1991, 17: 340-348.

- 64 Rosskopf D, Siffert G, Osswald U, Witte K, Düsing R, Akkerman JWN, Siffert W: Platelet  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchanger activity in normotensive and hypertensive subjects: Effect of enalapril therapy upon antiport activity. *J Hypertens* 1992, 10: 839-847.
- 65 Livne A, Balfe JW, Veitch R, Marquez-Julio A, Grinstein S, Rothstein A: Increased platelet  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange rates in essential hypertension: Application of a novel test. *Lancet* 1987, 1: 533-536.
- 66 Schmouder RL, Weder AB: Platelet sodium-proton exchange is increased in essential hypertension. *J Hypertens* 1989, 7: 325-330.
- 67 Ng LL, Fennell DA, Dudley C: Kinetics of the human leucocyte  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  antiport in essential hypertension. *J Hypertens* 1990, 8: 533-537.
- 68 Ng LL, Dudley C, Bomford J, Hawley D: Leucocyte intracellular pH and  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  antiport activity in human hypertension. *J Hypertens* 1989, 7: 471-475.
- 69 Orlov SN, Postnov IY, Pokudin NI, Kukhareno VY, Postnov YV:  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  exchange and other ion-transport systems in erythrocytes of essential hypertensives and spontaneously hypertensive rats: A comparative analysis. *J Hypertens* 1989, 7: 781-788.
- 70 Düsing R, Göbel BO, Hoffmann G, Siffert W, Vetter H: Lymphocyte  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  exchanger kinetics in essential hypertension. *J Am Soc Nephrol* 1990, 1: 488 [abstract].

- 71 Dudley CR, Taylor DJ, Ng LL, Kemp GJ, Ratcliffe PJ, Radda GK, Ledingham JG: Evidence for abnormal  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiport activity detected by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy in exercising skeletal muscle of patients with essential hypertension. Clin Sci 1990, 79: 491-497.
- 72 Hermsmeyer K, Erne P: Vascular muscle electrophysiology and platelet calcium in hypertension. In: Laragh JH, Brenner BM: Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis, and Management. Raven Press, New York 1990, 661-666.
- 73 Schulam PG, Kuruvilla A, Putcha G, Mangus L, Franklin-Johnson J, Shearer WT: Platelet-activating factor induces phospholipid turnover, calcium flux, arachidonic acid liberation, eicosanoid generation, and oncogene expression in a human B cell line. J Immunol 1991, 146: 1642-1648.
- 74 Cho JH, Nash F, Fekete Z, Kimura M, Reeves JP, Aviv A: Increased calcium stores in platelets from African Americans. Hypertension 1995, 25: 377-383.
- 75 Ng LL, Sweeney FP, Siczkowski M, Davies JE, Quinn PA, Krolewski B, Krolewski AS:  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter phenotype, abundance, and phosphorylation of immortalized lymphoblasts from humans with hypertension. Hypertension 1995, 25: 971-977.
- 76 Seifter JL, Aronson PS: Properties and physiologic roles of the plasma membrane sodium-hydrogen exchanger. J Clin Invest 1986, 78: 859-864.
- 77 Grinstein S, Rothstein A: Mechanisms of regulation of the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger. J Membr Biol 1986, 90: 1-12.



- 78 Paris S, Pouysségur J: Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiport in chinese hamster lung fibroblasts. J Biol Chem 1983, 258: 3503-3508.
- 79 Busch S, Wieland T, Esche H, Jakobs KH, Siffert W: G protein regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in *Xenopus laevis* oocytes. J Biol Chem 1995, 270: 17898-17901.
- 80 Gruska G, Ihrke R, Stolper S, Kraatz G, Siffert W: Prevalence of increased intracellular signal transduction in immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects. J Hypertens 1997, 15: 29-33.
- 81 McCarron DA, Young WE, Bukoski RD, Morris CD: Calcium metabolism and arterial pressure regulation in humans. In: Rettig R, Ganten D, Luft F [Hrsg]: Salt and hypertension - dietary minerals, volume homeostasis and cardiovascular regulation. Springer, Berlin [u. a.] 1989, 177-189.
- 82 Keil U, Hense H-W, Stieber J: Screening for hypertension: Results of the Munich blood pressure program. Prev Med 1985, 14: 519-531.
- 83 Stieber J, Döring A, Keil U: Häufigkeit, Bekanntheits- und Behandlungsgrad der Hypertonie in einer Großstadtbevölkerung. Ergebnisse der Münchner Blutdruckstudie I. Münch Med Wochenschr 1982, 35: 747-752.
- 84 Zidek W, Tepel M: Ionenfluxe als intrazelluläre Signale bei Hypertonie. In: Klaus D [Hrsg]: Manuale hypertoniologie. Düstri-Verl, Deisenhofen 1997, III-4.4-GW, 1-6.
- 85 Bray GA: Definition, measurement and classification of the syndromes of obesity. Int J Obesity 1978, 2: 99-122.

- 86 Sowers JR, Zemel MB, Standley PR, Zemel PC: Calcium and hypertension. *J Lab Clin Med* 1989, 114: 338-348.
- 87 Duhm J, Behr J: Sodium transport across the red cell membrane and pathogenesis of essential hypertension: Perspectives. *Klin Wochenschr* 1987, 65(SupplVIII), 69-75.
- 88 Corrocher R, Steinmayr M, Ruzzenente O, Brugnara C, Bertinato M, Mazzi M, Furri C, Bonfanti F, De Sandre G: Elevation of red cell sodium-lithium countertransport in hyperlipidemias. *Life Sci* 1985, 36: 649-655.
- 89 Hunt SC, Williams RR, Smith JB, Ash KO: Associations of three erythrocyte cation transport systems with plasma lipids in Utah subjects. *Hypertension* 1986, 8: 30-36.
- 90 Poli De Figueiredo CE, Ng LL, Davies JE, Cazana FJL, Hendry BM, Ellory JC: Effect of cell cholesterol on  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  antiporter activity in human lymphoblasts. *J Physiol* 1991, 432: 26P [abstract].
- 91 Ng LL, Davies JE: Lipids and cellular  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  antiport activity in diabetic nephropathy. *Kidney Int* 1992, 41: 872-876.
- 92 Ng LL, Davies JE: HMG CoA reductase inhibitors affect  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  antiport activity in human lymphoblasts. *Am J Physiol* 1991, 261: C780-C786.
- 93 Semplicini A, Spalvins A, Canessa M: Kinetics, stoichiometry and transport modes of the human red cell  $\text{Na}^+\text{/H}^+$  exchanger. *J Membr Biol* 1989, 107: 219-228.

- 94 Canessa M: Kinetic properties of the human red cells  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  and  $\text{Li}^+/\text{Na}^+$  exchanges. *Methods Enzymol* 1989, 173: 176-191.
- 95 Bucher O, Wartenberg H: *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. 11., vollst überarb Aufl, Verl Hans Huber, Bern [u. a.] 1989, 261-281.
- 96 Mazer B, Domenico J, Sawami H, Gelfand EW: Platelet-activating factor induces an increase in intracellular calcium and expression of regulatory genes in human B lymphoblastoid cells. *J Immunol* 1991, 146: 1914-1920.
- 97 Canessa M, Falkner B, Hulman S: Red blood cell sodium-proton exchange in hypertensive blacks with insulin-resistant glucose disposal. *Hypertension* 1993, 17: 340-348.
- 98 Lechi A, Lechi C, Bonadonna G, Sinigaglia D, Corradini P, Polignano R, Arosio E, Covi G, Togni P: Increased basal and thrombin-induced free calcium in platelets of essential hypertensive patients. *Hypertension* 1987, 9: 230-235.
- 99 Pietruck F, Moritz A, Montemurro M, Sell A, Busch S, Roskopf D, Virchow S, Esche H, Brockmeyer N, Jakobs KH, Siffert W: Selectively enhanced cellular signalling by  $G_i$  proteins in essential hypertension.  $G_{i2}$ ,  $G_{i3}$ ,  $G_{\beta 1}$  and  $G_{\beta 2}$  are not mutated. *Circ Res* 1996, 79: 974-983.
- 100 Siffert W: G proteins and hypertension. *Kidney Blood Press Res* 1998, 21: 262-263.
- 101 Sartori M, Ceolotto G, Semplicini A: MAP kinase and regulation of the sodium-proton exchanger in human red blood cell. *Biochim Biophys Acta* 1999, 1421: 140-148.

- 102 Ishikawa K, Imai Y, Katsuya T, Ohkubo T, Tsuji I, Nagai K, Takami S, Nakata Y, Satoh H, Hisamichi S, Higaki J, Ogi-hara T: Human G protein beta3 subunit variant is associated with serum potassium and total cholesterol levels but not with blood pressure. *Am J Hypertens* 2000, 13: 140-145.
- 103 Beige J, Ringel J, Distler A, Sharma AM: G protein beta(3)-subunit C825T genotype and nephropathy in diabetes mellitus. *Nephrol Dial Transplant* 2000, 15: 1384-1387.
- 104 Naber C, Hermann BL, Vietzke D, Altmann C, Haude M, Mann K, Roszkopf D, Siffert W: Enhanced epinephrine-induced platelet aggregation in individuals carrying the G protein beta3 subunit 825T allele. *FEBS Lett* 2000 Nov, 484: 199-201.
- 105 Peppard PE, Young T, Palta M, Skatrud J: Prospective study of the association between sleep-disordered breathing and hypertension. *N Eng J Med* 1999, 342: 1378-1384.
- 106 Bartecchi CE, MacKenzie TD, Schier RW: The human costs of tobacco use (first of two parts). *N Engl J Med* 1994, 330: 975-980.
- 107 Wikstrand J, Warnold I, Olsson G, Tuomilehto J, Elm-feldt D, Berglund G: On behalf of the advisory committee: Primary prevention with metoprolol in patients with hypertension. Mortality results from the MAPHY study. *JAMA* 1988, 259: 1976-1982.
- 108 Groppelli A, Giorgi DMA, Omboni S, Parati G, Mancia G: Persistent blood pressure increase induced by heavy smoking. *J Hypertens* 1992, 10: 495-499.
- 109 Page IH: Pathogenesis of arterial hypertension. *JAMA* 1949, 140: 451-458.

110 Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Pouysségur J, Lalouel J-M: Exclusion of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter as a candidate gene in human essential hypertension. Hypertension 1991, 17: 8-14.

111 Rosskopf D, Schröder K-J, Siffert W: Role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange in the proliferation of immortalized lymphoblasts from patients with essential hypertension and normotensive subjects. Cardiovasc Res 1995, 29: 254-259.

112 Düsing R: Transmembranöse Transportsysteme. In: Klaus D [Hrsg]: Manuale hypertonologicum. Dustri-Verl, Deisenhofen 1997, III-4.3-GW, 1-6.

113 Guyton AC, Coleman TG, Young DB, Lohmeier TE, DeClue JW: Salt balance and long-term blood pressure control. Annu Rev Med 1980, 31: 15-27.

## 10. Anhang: Ergebnisse der laborchemischen Untersuchungen

### 10.1. Kalzium-Meßwerte der Hypertoniker

Proband	i.c.Ca <sup>2+</sup> basal nmol/l	? Ca <sup>2+</sup> nmol/l
T 02	87	30
T 03	106	40
T 07	98	370
T 08	83	40
T 13	98	90
T 14	90	30
T 15	89	90
T 18	93	40
T 20	95	110
T 23	105	220
T 24		40
T 25	97	40
T 27	102	80
T 29	77	60
T 32	100	20
T 36	85	40
T 37	79	120
T 48	90	110
T 51	92	30
T 57	100	200
T 59	100	60
T 61	123	30
T 63	92	140
T 66	90	90
T 69	115	30
T 70	120	440
T 72	135	30
T 73	106	40
T 74	109	20
T 76	82	20
T 78	90	120
T 79	100	170
T 81	100	160
T 85		30
T 87	75	70
T 88	108	80
VG 23	150	80

Tabelle 6: Intrazelluläre basale Ca<sup>2+</sup>-Werte der Hypertoniker und Differenz nach Stimulation mit PAF.

## 10.2. Kalzium-Meßwerte der Normotoniker

Proband	i.c.Ca <sup>2+</sup> basal nmol/l	? Ca <sup>2+</sup> nmol/l
VG 02	95	20
VG 03	96	100
VG 05	95	30
VG 07	101	30
VG 08	88	70
VG 09	102	60
VG 11	93	60
VG 14	85	40
VG 15	102	20
VG 17	111	60
VG 18	88	70
VG 19	85	20
VG 21	86	120
VG 22	70	100
VG 24	90	20
VG 26	84	70
VG 27	90	50
VG 28	100	60
VG 29	110	60
VG 31	85	60
VG 32	95	70
VG 33	85	90
VG 35	80	90
VG 36	97	70
VG 38	130	30
VG 39	117	40

Tabelle 7: Intrazelluläre basale Ca<sup>2+</sup>-Werte der Normotoniker und Differenz nach Stimulation mit PAF.

### 10.3. Weitere Laborparameter der Hypertoniker

Prob.	Serum								
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Osmol	Crea	Gluc	HRS	Chol	TG
	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mosmol/l	μmol/l	mmol/l	μmol/l	mmol/l	mmol/l
T 02	145,4	4,5	100,9	309,0	110,0	10,5	452,0	5,7	2,2
T 03	142,1	4,7	102,0	292,0	74,0	4,4	226,0	6,0	1,2
T 07	143,3	4,3	101,1	293,0	88,0	5,5	446,0	5,4	1,9
T 08	143,4	4,0	101,0	290,0	89,0	4,3	418,0	6,4	1,9
T 13	140,8	4,2	98,6	297,0	62,0	10,2	300,0	5,3	4,0
T 14	141,6	4,2	100,8	305,0	79,0	9,4	435,0	9,4	9,5
T 15	146,6	4,8	102,8	311,0	90,0	5,9	418,0	4,3	3,3
						6,3		5,1	
						4,2		7,9	
T 23	144,0	4,3	101,6	291,0	110,0	6,6	381,0	6,6	6,5
T 24	140,9	4,5	102,8	286,0	121,0	5,2	370,0	6,9	6,5
T 25	143,2	4,4	110,5	292,0	71,0	7,4	259,0	5,2	1,2
T 27	140,1	4,1	98,3	291,0	71,0	14,3	328,0	4,2	1,5
T 29	143,5	4,6	100,3	300,0	75,0	13,8	374,0	3,9	2,8
T 32	142,8	3,9	102,6	289,0	72,0	5,5	344,0	5,2	2,1
T 36	143,0	4,1	102,6	298,0	111,0	5,6	477,0	5,8	3,0
T 37	144,4	3,5	102,4	302,0	72,0	5,7	263,0	6,7	1,5
T 48	140,9	3,6	103,0	288,0	84,0	4,9	243,0	5,8	1,8
T 51	145,1	4,7	104,5	304,0	157,0	3,0	613,0	7,8	4,5
						6,2		7,3	
						6,4		5,4	
T 61	142,4	4,2	102,6	280,0	104,0	5,1	349,0	5,8	1,0
T 63	142,9	4,1	101,3	286,0	91,0	10,1	345,0	5,9	2,5
T 66	143,8	3,0	99,2	285,0	79,0	4,6	252,0	3,8	1,4
T 69	144,2	4,7	102,4	287,0	71,0	5,5	311,0	6,0	2,1
T 70	142,7	5,1	108,0	293,0	153,0	7,0	526,0	4,2	2,0
T 72	146,6	3,8	102,4	292,0	78,0	5,5	297,0	5,0	3,6
T 73	144,3	3,8	102,6	287,0	104,0	5,0	585,0	5,9	2,8
T 74	142,7	3,8	100,0	288,0	87,0	6,0	346,0	5,0	0,7
T 76	140,2	4,9	101,7	285,0	81,0	5,4	401,0	3,8	1,5
T 78	142,1	3,9	101,2	291,0	78,0	10,2	363,0	4,2	2,1
						5,5		6,5	
						8,0		6,3	
T 85	144,2	4,5	102,6	296,0	65,0	9,5	322,0	5,7	2,1
T 87	144,8	4,1	106,0	288,0	73,0	5,1	411,0	7,4	2,4
T 88	143,6	4,1	103,2	291,0	103,0	6,7	473,0	4,4	1,9
VG 23	144,5	4,2	102,3	293,0	96,0	8,3	422,0	5,3	2,1

Tabelle 8: Serum-Werte der Hypertoniker. Prob.: Proband, Osmol: Osmolalität, Crea: Kreatinin, Gluc: Glucose, HRS: Harnsäure, Chol: Gesamtcholesterin, TG: Triglyceride.



	Urin					
Prob.	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Osmol	Crea	Mikroalb
	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mosmol/l	mmol/l	µg/ml
T 02	145,3	41,8	135,9	654,0	8,4	437,0
T 03	64,5	81,8	122,9	776,0	16,5	14,7
T 07	70,7	92,3	111,8	648,0	10,7	5,9
T 08	87,2	108,9	123,9	1008,0	24,7	36,7
T 13	51,1	61,0	45,5	752,0	2,1	29,9
T 14	209,4	44,1	183,0	762,0	5,9	7,0
T 15	73,0	29,8	73,2	434,0	5,3	13,8
T 18	125,9	79,7	141,5	816,0	12,6	4,3
T 23	152,3	60,8	151,4	683,0	9,1	12,9
T 24	83,0	37,8	78,2	426,0	6,5	50,4
T 27	131,5	74,1	162,2	529,0	7,0	28,6
T 29	106,5	50,7	96,9	654,0	7,2	48,3
T 32	149,7	69,3	140,8	686,0	9,1	5,1
T 36	175,2	83,2	154,1	828,0	12,5	23,3
T 37	230,1	56,2	208,7	788,0	4,7	2,8
T 48	68,3	54,7	59,6	686,0	8,3	3,9
T 51	93,4	38,9	86,3	558,0	6,7	26,3
T 57	44,2	18,3	37,2	281,0	3,5	1,8
T 59	108,0	115,0	142,9	692,0	14,6	9,3
T 61	134,6	57,8	150,1	522,0	5,4	2,3
T 63	92,7	58,1	110,1	558,0	8,5	7,0
T 66	31,3	107,1	110,1	743,0	36,8	253,0
T 69	118,8	23,1	103,1	377,0	3,4	10,4
T 70	122,4	29,4	98,3	472,0	7,0	164,0
T 72	33,3	22,7	34,0	180,0	2,0	5,4
T 73	66,0	65,2	65,7	616,0	12,7	33,4
T 74	87,7	44,4	74,3	388,0	7,7	66,2
T 76	34,8	23,8	13,0	234,0	3,2	12,3
T 78	48,4	53,9	18,3	698,0	12,2	10,4
T 79	62,3	64,2	30,3	858,0	17,1	12,5
T 81	157,7	36,2	140,9	639,0	5,5	30,4
T 85	78,3	17,5	54,5	480,0	4,6	3,0
T 87	65,6	28,5	56,1	316,0	3,5	260,0
VG23	117,5	54,2	102,6	426,0	8,3	24,9

Tabelle 9: Urin-Werte der Hypertoniker. Prob.: Proband, Osmol: Osmolalität, Crea: Kreatinin.

## 10.4. Weitere Laborparameter der Normotoniker

Prob.	Serum							
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Osmol	Crea	HRS	Chol	TG
	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mosmol/ka	umol/l	umol/l	mmol/l	mmol/l
VG 02	143,4	3,7	101,7	289,0	93,0	271,0	5,1	2,4
VG 03	145,0	4,6	104,0	295,0	102,0	398,0	8,2	0,8
VG 05	142,2	4,4	101,7	290,0	81,0	264,0	5,0	1,5
VG 07	143,9	4,0	101,8	289,0	82,0	311,0	7,1	5,0
VG 08	145,1	4,7	102,2	293,0	91,0	128,0	5,4	1,7
VG 09	143,3	4,3	102,5	286,0	75,0	384,0	5,7	0,9
VG 11	139,6	3,8	101,7	277,0	81,0	231,0	5,1	0,8
VG 14	143,6	4,1	103,2	289,0	99,0	389,0		
VG 15	144,0	3,5	103,8	286,0	99,0	361,0	4,1	3,8
VG 17	143,7	4,3	105,3	279,0	74,0	299,0	5,4	0,9
VG 18	143,5	3,7	106,4	285,0	67,0	164,0	4,8	1,2
VG 19	142,6	4,1	104,6	285,0	98,0	321,0	4,3	1,0
VG 21	144,3	3,5	107,5	285,0	78,0	172,0	5,2	0,6
VG 22	144,0	4,3	103,6	288,0	67,0	362,0	6,4	2,1
VG 24	141,8	4,5	102,2	283,0	75,0	222,0	5,4	2,2
VG 26	148,5	4,5	103,1	334,0	81,0	494,0	7,0	3,0
VG 27	142,0	4,4	101,4	283,0	86,0	184,0	7,0	1,6
VG 28	146,0	3,8	103,7	294,0	92,0	297,0	4,9	1,9
VG 29	141,6	4,2	101,4	284,0	93,0	253,0	4,4	1,2
VG 31	144,3	4,5	102,6	286,0	73,0	233,0	5,4	0,9
VG 32	142,2	4,4	102,7	281,0	83,0	249,0	3,9	1,1
VG 33	141,5	4,3	101,8	278,0	80,0	204,0	4,0	0,3
VG 35	142,2	4,1	102,8	284,0	101,0	226,0	6,0	1,1
VG 36	142,8	4,6	104,3	281,0	77,0	241,0	5,5	0,5
VG 38	144,1	3,5	104,1	283,0	68,0	313,0	3,7	3,8
VG 39	143,7	3,9	103,4	285,0	90,0	320,0	6,6	2,1
VG 42	144,6	3,8	105,0	292,0	95,0	348,0	5,0	1,0
VG 44	143,2	3,9	100,5	289,0	94,0	408,0	4,8	4,3
VG 45	144,9	4,0	104,0	292,0	99,0	440,0	5,5	1,8
VG 46	142,8	3,7	103,4	289,0	68,0	232,0	7,7	1,5
VG 47	144,5	4,5	105,1	290,0	109,0	290,0	6,0	2,0
VG 48	144,9	4,5	105,1	287,0	96,0	313,0	4,7	1,3
VG 50	142,8	4,1	104,6	283,0	100,0	354,0	6,6	3,1
VG 52		4,0	98,3		66,0	195,0	5,3	0,6
VG 53	142,8	4,1	103,1	282,0	91,0	309,0	5,8	1,1
VG 54	143,5	4,2	103,2	282,0	74,0	462,0	5,0	1,5
VG 55	145,5	4,3	105,9	290,0	78,0	348,0	5,2	1,6
VG 57	142,2	4,7	103,0	284,0	84,0	314,0	5,4	1,1
VG 58	143,2	4,1	102,7					

Tabelle 10: Serum-Werte der Normotoniker. Prob.: Proband, Osmol: Osmolalität, Crea: Kreatinin, HRS: Harnsäure, Chol: Gesamtcholesterin, TG: Triglyceride.

Prob.	Urin					
	Na <sup>+</sup>	K <sup>+</sup>	Cl <sup>-</sup>	Osmol	Crea	Mikroalbumin
	mmol/l	Mmol/l	mmol/l	mosmol/kg	mmol/l	µg/ml
VG 2	34,2	26,2	35,9	278,0	4,3	3,5
VG 3	192,9	120,3	198,9	856,0	12,	3,0
VG 5	40,8	43,7	49,9	272,0	3,2	1,2
VG 7	117,7	140,4	134,7	774,0	7,9	3,9
VG 8	123,3	108,0	151,4	688,0	8,3	4,5
VG 9	102,5	73,1	118,1	538,0	8,2	6,1
VG 11	67,8	60,9	92,9	478,0	4,7	3,0
VG 14	154,0	65,3	171,8	774,0	11,4	2,5
VG 15	135,7	26,9	116,1	416,0	4,2	14,3
VG 17	140,0	70,4	151,5	722,0	11,7	6,7
VG 18	94,9	97,8	160,9	714,0	8,9	21,1
VG 19	196,6	115,8	267,2	936,0	11,6	9,8
VG 21	89,0	37,0	114,0	400,0	5,0	9,1
VG 22	168,0	62,0	163,8	759,0	6,6	4,3
VG 24	154,2	82,7	194,2	894,0	13,8	7,0
VG 26	84,2	120,7	131,2	830,0	17,5	48,0
VG 27	109,4	41,7	82,4	408,0	4,9	2,3
VG 28	162,2	47,1	168,2	689,0	10,3	4,6
VG 29	126,2	173,0	187,4	824,0	11,8	8,5
VG 31	195,5	74,2	208,9	789,0	8,7	13,8
VG 32	84,2	67,3	117,5	684,0	22,2	11,5
VG 33	135,2	108,3	191,6	802,0	10,4	3,5
VG 35	122,3	138,5	182,6	932,0	12,9	4,5
VG 36	112,6	69,9	129,5	533,0	8,5	4,8
VG 38	137,7	73,8	167,6	948,0	18,5	16,8
VG 39	160,1	99,4	185,5	778,0	15,1	4,3
VG 42	156,8	78,8	158,6	781,0	15,1	31,6
VG 44	99,4	139,6	127,8	898,0	16,9	53,7
VG 45	154,8	55,0	149,5	840,0	12,1	7,1
VG 46	94,8	72,8	115,7	448,0	4,9	4,2
VG 47	191,3	85,5	208,8	930,0	16,4	8,3
VG 48	213,8	108,4	245,1	1084,0	19,6	15,2
VG 50	52,1	112,0	108,1	480,0	6,8	9,9
VG 52	74,2	52,0	81,0	499,0	3,8	3,9
VG 53	62,6	17,8	62,2	281,0	2,7	2,5
VG 54	143,6	155,6	262,4	789,0	7,5	8,3
VG 55	231,0	114,8	240,6	918,0	11,4	
VG 57	135,1	133,9	208,9	808,0	8,6	
VG 58	70,1	150,2	151,4			

Tabelle 11: Urin-Werte der Normotoniker. Prob.: Proband, Osmol: Osmolalität, Crea: Kreatinin.

## Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. med. G. Kraatz für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung sehr herzlich bedanken.

Weiterhin bin ich insbesondere Frau Dr. rer. med. S. Gruska für ihre stete Hilfsbereitschaft und die unzähligen Tips bei der Anfertigung dieser Arbeit sehr dankbar.

Ganz besonderer Dank gebührt Dres. med. R. und B. Thonack, die durch ihre unkomplizierte Hilfe bei der Rekrutierung der Patienten einen entscheidenden Anteil am Entstehen dieser Arbeit haben.

Ebenso sei den ehemaligen Mitarbeitern des Biochemischen Forschungslabors Herrn Dr. rer. nat. E. Wolf und Herrn Dipl. Chem. R. Ihrke sowie Frau Heidrun Durak und Frau Cornelia Höftmann für die exzellente Durchführung der Laborarbeiten gedankt.

Mein Dank gilt auch Frau C. Fieber und Frau M. Wenzke, die mich bei der Beschaffung der Literatur und der Erstellung des Literaturverzeichnisses unterstützten.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meiner Frau Claudia und meinen Töchtern Selina und Melika bedanken, die viele Stunden unseres berufsbedingt schon knappen Familienlebens für die Erstellung dieser Arbeit opferten.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Sören Stolper  
Geburtsdatum: 05. Dezember 1968  
Geburtsort: Hennigsdorf bei Berlin  
Wohnort: 14612 Falkensee, Sonnenstr. 45  
Eltern: Günther Stolper, Elektroingenieur  
Marlies Stolper, Technische Zeichnerin  
Staatsangehörigkeit: Deutschland  
Familienstand: verheiratet, 2 Kinder

## Schulbildung

1975 - 1982 Allgemeinbildende Schule Falkensee  
1982 - 1985 Sportschule Potsdam, „Mittlere Reife“  
1985 - 1987 Gymnasium Nauen, Prädikat „Mit Auszeichnung“

## Beruflicher Werdegang

1990 - 1996 Medizinstudium in Greifswald, Prädikat „Gut“  
1996 - 1998 Arzt im Praktikum am Klinikum „Ernst von Bergmann“ Potsdam  
seit 1998 Assistenzarzt in Weiterbildung an der „Havellandklinik Nauen“  
im Fachgebiet Anästhesie und Intensivmedizin