

Aus der Medizinischen Klinik I

der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. H.L. Fehm

**Der Einfluss kurz- und langfristiger Sympathoexzitation auf das
fibrinolytische System bei primären Hypertonikern
– Modifikation durch Amlodipin oder Valsartan –**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

vorgelegt von

Jan Struck

aus Bückeburg

Lübeck 2004

1. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Christoph Dodt
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: Prof. Dr. med. Michael Seyfarth

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2005

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 17.02.2005

gez. Prof. Dr. med. Peter Dominiak

- Dekan der Medizinischen Fakultät -

Inhaltsverzeichnis	IV-VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 Sympathoexzitation und Fibrinolyse in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen	1
1.2 Das fibrinolytische System	2
1.2.1 Aufbau	2
1.2.1 Fibrinolyseaktivatoren	3
1.2.2 Fibrinolyseinhibitoren	5
1.2.3 Weitere Faktoren des Hämostasesystems	7
1.2.4 Regulation der Fibrinolyse	8
1.3 Einfluss sympathischer Aktivierung auf das fibrinolytische System	10
1.3.1 Charakteristika der muskulären sympathischen Aktivität	11
1.3.2 Regulationsmechanismen der sympathischen Aktivität	13
1.3.3 MSNA-Regulation durch Barorezeptoren	14
1.3.4 MSNA-Regulation durch Chemorezeptoren	15
1.4 Fragestellung	17
2 MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Probanden	18
2.2 Studienprotokoll	20

2.3 Versuchsablauf	21
2.3.1 Vorbereitung der Probanden	21
2.3.2 Monitoring von EKG, Atmungskurve und Blutdruck	22
2.3.3 Lokalisation des N. peroneus superficialis	22
1.2.4 Ableitung von MSNA über Mikroelektroden	22
2.4 Zeitlicher Ablauf eines Untersuchungstages	24
2.5 Exzitatorische Stimuli der MSNA	25
2.5.1 Lower body negative pressure (LBNP)	25
2.5.2 Eiswassertest (cold pressor)	26
2.5.3 Hyperinsulämischer euglykämischer Clamp	26
2.6 Bestimmung der Blutparameter	28
2.6.1 Blutentnahmen	28
1.5.2 Messung der Plasma- bzw. Serumkonzentrationen von Angiotensin II, Katecholaminen, Renin, t-PA, D-Dimer, PAP, TAT, t-PA/PAI-1, F1+2, Fibrinogen	29
2.1.5 Wirkung der antihypertensiven Therapie auf die Gerinnungsparameter während der Ruhephase	36

Abkürzungsverzeichnis

α_2 AP	α_2 -Antiplasmin
α_2 M	α_2 Makroglobulin
Abb.	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Aml	Amlodipin
CP	Cold pressor

d	Tag
d.h.	das heißt
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EGF	epidermal growth factor
EKG	Elektrokardiogramm
F1+2	Prothrombinfragment 1+2
Fib	Fibrinogen
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
LBNP	Lower body negative pressure
MSNA	Muskuläre sympathische Nervenaktivität
N.	Nervus

Nn.	Nervi
NTS	Nucleus tractus solitarii
PAI-1	Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ 1
PAP	Plasmin- α_2 -Antiplasmin-Komplex
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SSA	Kutane sympathische Nervenaktivität
TAT	Thrombin-Antithrombin III-Komplex
t-PA	Gewebsplasminogenaktivator
u-PA	Urokinase
Val	Valsartan
z.B.	zum Beispiel

1 EINLEITUNG

1.1 Sympathoexzitation und Fibrinolyse in der Pathogenese kardiovaskulärer Erkrankungen

Patienten mit arteriellem Hypertonus weisen ein erhöhtes Risiko für thrombotische Gefäßverschlüsse, die zu Hirn- und Myokardinfarkten führen können, auf. Für die Entstehung dieser Komplikationen spielen Störungen des fibrinolytischen Systems eine wichtige Rolle. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass wichtige Elemente des fibrinolytischen Systems bei Patienten mit arteriellem Hypertonus so verändert sind, dass die fibrinolytische Aktivität im Vergleich zur Normalbevölkerung reduziert ist.

Verschiedene Faktoren können die fibrinolytische Aktivität beeinträchtigen, unter anderem ist eine Aktivierung von Ästen des sympathischen Nervensystems von pathophysiologischer Relevanz. *In vitro* und *in vivo* Arbeiten konnten zeigen, dass die Expression wichtiger Faktoren der Fibrinolyse, wie z.B. Gewebplasminogenaktivator (t-PA) oder Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ1 (PAI-1), durch sympathische Neurotransmitter beziehungsweise auch durch Adrenozeptor blockierende Substanzen beeinflusst wird. Meist wurden in diesen Arbeiten Katecholamine bzw. Adrenozeptorantagonisten verabreicht und deren Wirkung auf das fibrinolytische System untersucht. Ob diese pharmakologischen Studien für die Regulation der Fibrinolyse unter physiologischen Bedingungen relevant sind, ist bisher ungeklärt. Hinweise auf eine mögliche Bedeutung der sympathischen Aktivierung für eine Regulation der Fibrinolyse sind Untersuchungen unter mentalem Stress körperlicher Anstrengung oder Hypoxie. Diese Manöver bewirken unter anderem eine Steigerung der sympathischen Nervenaktivität und beeinflussen die Fibrinolyse. Problematisch war bei diesen Studien, dass das sympathische Nervensystem nicht spezifisch angeregt wurde, also z.B. auch das endokrine System durch die Manöver in seiner Aktivität verändert wurde. Auch wurde die Aktivierung des sympathischen Nervensystems nicht quantifiziert.

Unsere Arbeit versucht auf diesem Hintergrund, die Bedeutung der Aktivierung von Ästen des sympathischen Nervensystems für das fibrinolytische System beim Menschen *in vivo* näher zu untersuchen. Neben Parametern der Hämostase wurde die

Sympathoexzitation spezifisch durch eine mikroneurographische Messung der sympathischen Nervenaktivität zum muskulären Gefäßbett erfasst, um Korrelationen zwischen Änderungen der sympathischen Aktivität und der Änderungen der Gerinnungsparameter untersuchen zu können. Es wurden verschiedene, gut evaluierte sympathoexzitatorische Manöver verwandt, die sich in dem Modus der Exzitation ebenso wie in der Dauer unterschieden. So wurde z.B. neben dem Kurzdauernden, stark exzitatorisch wirkenden Cold pressor-Test auch eine prolongierte metabolische Aktivierung des sympathischen Systems durch eine Hyperinsulinämie über eine Stunde untersucht.

Diese Untersuchungen wurden bei Menschen, die unter einem moderaten Bluthochdruck, der medikamentöser Behandlung bedurfte, litten durchgeführt. Das sympathische Nervensystem nimmt entscheidende Funktionen in der Blutdrucksteuerung wahr und eine Aktivierung sympathischer Nerven spielt auch in der Pathogenese der arteriellen Hypertonie eine wichtige Rolle. Möglicherweise ist die Neigung hypertoner Patienten zu Entwicklung thrombotischer Komplikationen auch durch deren Störung in der Regulation sympathischer Aktivität bedingt. In diesem Zusammenhang ist von besonderem Interesse, dass einige antihypertensive Medikamente per se sympathoexzitatorisch wirken, so dass diese möglicherweise einen negativen Einfluss auf die Blutgerinnung ausüben, während andere antihypertensive Substanzen solche Effekte nicht haben. In unserer Studie untersuchten wir deswegen auch den Einfluss zweier häufig eingesetzter Antihypertensiva (Amlodipin, Valsartan) auf die Aktivität des sympathischen und fibrinolytischen Systems.

1.2 Das fibrinolytische System

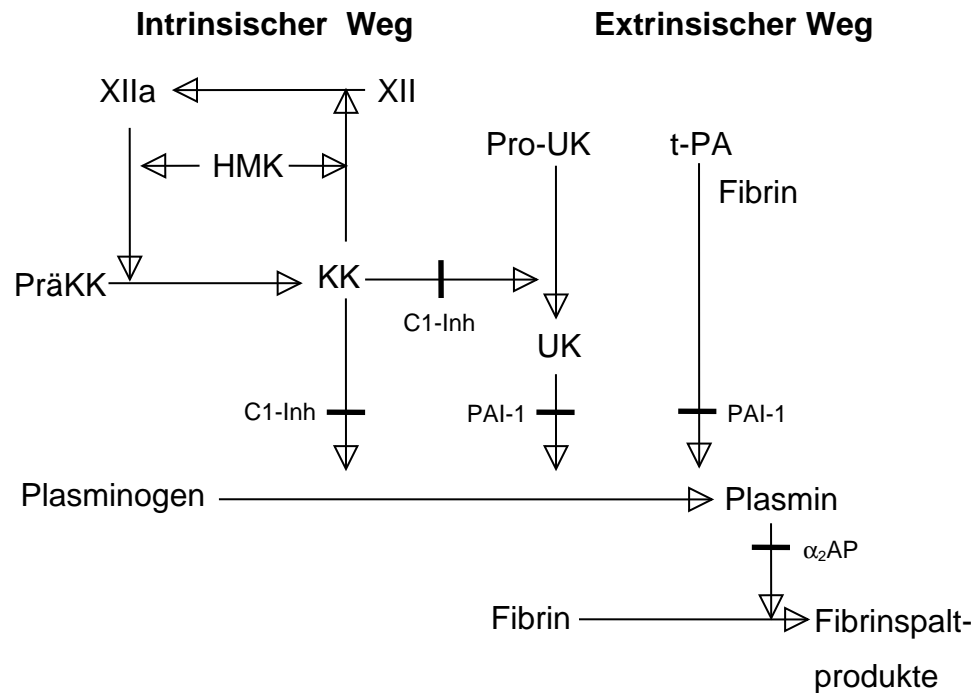
1.2.1 Aufbau

Die Fibrinolyse stellt einen lebensnotwendigen Mechanismus unseres Organismus dar und hat im Hämostasesystem zwei wesentliche Funktionen:

- sie limitiert eine Gerinnselbildung
- sie baut ein Fibringerinnsel, nachdem dieses seine Funktion in der Blutstillung erfüllt hat, wieder ab.

Die Fibrinolyse steht in einem fließenden Gleichgewicht mit prokoagulatorischen Faktoren der Hämostase. Wie auch die prokoagulatorischen Systeme ist das Fibrinolyse-System über einen intrinsischen Weg über die Kontaktaktivierung und einen extrinsischen Weg über Plasminogenaktivatoren zu stimulieren:

Abbildung 1: Kaskade der Fibrinolyseaktivierung



KK= Kallikrein, HMK= hochmolekulares Kininogen, C1-Inh= C1-Inhibitor, UK= Urokinase, t-PA= Tissue-type plasminogen activator, PAI-1= Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ1, α_2 AP= α_2 -Antiplasmin
(nach)

1.2.1 Fibrinolyseaktivatoren

Plasminogen

Plasminogen (Molekulargewicht 92 kD) wird von den Hepatozyten synthetisiert und ist die inaktive Vorstufe des Fibrinolyseenzym Plasmin. Die Aktivierung erfolgt durch Enzyme wie Gewebs-Plasminogen-Aktivator (t-PA) und Urokinase (uPA) oder durch die Kontaktphase des Gerinnungssystems (FXIIa-HighMolecularWeight-

Kininogen-Komplex). Plasminogen kommt im Plasma in zwei Modifikationen vor, die sich hinsichtlich ihrer Glykosilierung unterscheiden und eine unterschiedlich hohe Affinität für Fibrin aufweisen. Die Bindung von Plasminogen an Fibrin erfolgt über eine als Kringle-Struktur bezeichnete Region und wird durch Histidin-reiches Glykoprotein gestört. Zirkulierendes Plasmin hingegen wird durch seinen Inhibitor α_2 -Antiplasmin inaktiviert .

Gewebsplasminogenaktivator (Tissue-type Plasminogen Activator, t-PA)

t-PA (Molekulargewicht 68 kD) wird primär von Endothelzellen als aktive Protease synthetisiert und seine Hauptbedeutung liegt in der Initiierung der intravaskulären Fibrinolyse. Das Ausmaß seiner Synthese ist abhängig von der Körperregion . Im Zusammenhang mit unserer Studie besonders interessant ist, dass neben Mesothelzellen, Megakaryozyten und Monozyten auch periphere sympathischen Neuronen t-PA synthetisieren . Aus dem Gefäßendothel erfolgt eine kontinuierliche Freisetzung von t-PA, die einer zirkadianen Rhythmik unterworfen ist .

Aufgrund einer schnellen Komplexbildung mit dem Plasminogenaktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) finden sich nur etwa 20% der Gesamtkonzentration des t-PA im Plasma. Begründet durch einen sehr raschen hepatischen Metabolismus beträgt die biologische Halbwertszeit ca. 4 Minuten. Durch Stimulation, wie z.B. venöse Okklusion, physische Anstrengung oder vasoaktive Substanzen wie Katecholamine oder Bradykinin läßt sich ein sehr rascher Anstieg des t-PA innerhalb weniger Minuten erreichen .

t-PA ist vornehmlich für die Auflösung von Blutgerinnseln in der Zirkulation verantwortlich und bindet mit relativ hoher Affinität an Fibrin.

Urokinase (Urinary-type Plasminogen activator, u-PA)

Urokinase (Molekulargewicht 54 kD) wird in den epithelialen Zellen des Nierentubulus synthetisiert und findet sich in hohen Konzentrationen im Urin. Von Endothelzellen hingegen, ebenso wie von Monozyten, wird das Zymogen Pro-Urokinase, das auch als "Single-chain u-PA" (scu-PA) bezeichnet wird, synthetisiert. Das Ein-Ketten-Molekül wird dann in Anwesenheit bereits geringer Mengen von

Plasmin in das Zwei-Ketten-Molekül (“two-chain u-PA”, tcu-PA), die eigentliche Urokinase überführt. Urokinase hat eine Halbwertszeit von 5-10 Minuten und wird ebenfalls hepatisch eliminiert.

Die Hauptbedeutung der Urokinase liegt in der extravaskulären Proteolyse. Die katalytische Aktivität der Urokinase wird nicht wie die des t-PA über Fibrin reguliert sondern über eine durch die EGF (epidermal growth factor)-Domäne vermittelte Bindung an den zellulären u-PA-Rezeptor. Dieser Rezeptor wird auf vielen Zellen, so z.B. auf Endothelzellen und auf Monozyten nachgewiesen .

1.2.2 Fibrinolyseinhibitoren

α_2 -Antiplasmin (α_2 AP) und Plasmin- α_2 AP-Komplex (PAP)

α_2 AP (Molekulargewicht 70 kD) wird in der Leber synthetisiert und ist der wichtigste Inhibitor der Fibrinolyse. Es kann in Bruchteilen einer Sekunde freies Plasmin binden (halbmaximale Inaktivierung in ungefähr 0,1 Sekunden) und einen stabilen stöchiometrischen 1:1 Komplex bilden, den Plasmin- α_2 AP-Komplex (PAP). Der PAP ist somit ein sensibler Indikator der aktuellen *in vivo* Fibrinolyse . Die Halbwertszeit des α_2 AP beträgt 2,6 Tage, der PAP-Komplex hingegen wird in ca. 12 Stunden aus der Zirkulation eliminiert. Die PAP-Konzentration zeigt einen zirkadianen Verlauf, der dem des PAI-1 entgegengesetzt ist, mit einem Minimum am Morgen .

α_2 AP hat drei wesentliche Funktionen:

- Es hemmt Plasmin über die schnelle irreversible Komplexbildung
- Es vermindert die Adsorption von Plasminogen an Fibrin indem es um die Bindungsstelle konkurriert
- Es kann durch FXIIIa an Fibrin quervernetzt werden und senkt so die Bindungsaffinität für t-PA zu Plasminogen

α_2 Makroglobulin (α_2 M)

α_2M gilt als so genannter Reserveinhibitor, der bedeutsam wird, wenn α_2AP nicht mehr in der Lage ist, Plasmin zu inaktivieren. Es inaktiviert verschiedenste Variablen des Fibrinolyse systems, wie Plasmin, Kallikrein, Urokinase und t-PA, allerdings sehr viel langsamer als α_2AP .

Plasminogenaktivator-Inhibitor Typ1 (PAI-1)

Plasminogenaktivator-Inhibitoren binden t-PA und Urokinase und führen so zu einer Hemmung der Fibrinolyse. Es sind bisher vier verschiedene Plasminogenaktivator-Inhibitoren (PAI-1, PAI-2, PAI-3, PCI) nachgewiesen worden, von denen der Typ 1 der wichtigste ist und ansonsten nur noch der Typ 2 in nennenswerten Konzentrationen während der Schwangerschaft vorkommt.

PAI-1 (Molekulargewicht 52 kD) wird insbesondere von Gefäßendothelzellen als aktives Molekül synthetisiert und in die Zirkulation freigesetzt. Es wird durch eine Konformationsänderung (Bindung an S-Protein oder Vitronectin) in eine aktive Form mit einer Halbwertszeit von ca. 30 Minuten umgewandelt. Ca. 90% des im Blut zirkulierenden PAI-1 liegen in den α -Granula der Thrombozyten in einer inaktiven bzw. latenten Form vor. Die PAI-1-Synthese wird durch verschiedene Hormone, Zytokine und Wachstumsfaktoren stimuliert. Ähnlich der Konzentration von t-PA ist auch PAI-1 einer zirkadianen Rhythmik unterworfen. Unter physiologischen Bedingungen liegt PAI-1 in seiner aktiven Form im Plasma in der Regel in einem molaren Überschuss im Vergleich zu t-PA und Urokinase vor, so dass keine freie fibrinolytische Aktivität zu erwarten ist. Trotzdem lässt sich ein geringer Anteil (etwa 5% der gesamten t-PA Konzentration) als freie Aktivität im Plasma bestimmen.

Der Großteil des im Plasma vorhandenen t-PA zirkuliert als t-PA/PAI-Komplex und je höher der PAI-Spiegel, desto höher ist auch der Anteil an komplexgebundenem t-PA.

Weitere die Fibrinolyse hemmenden Substanzen, wie den C1-Inhibitor (c1-Inh) oder das Histidin reiche Glykoprotein haben wir in dieser Studie nicht bestimmt.

1.2.3 Weitere Faktoren des Hämostasesystems

Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT)

Thrombin ist das zentrale Enzym des Gerinnungssystems: es spaltet Fibrinogen in Fibrin, aktiviert Plättchen, Faktor XIII, V und VIII:C sowie Protein C. Thrombin wird unter Einwirkung von Faktor Xa aus Prothrombin freigesetzt, kommt jedoch in der Blutbahn frei zirkulierend praktisch nicht vor, sondern nur in inaktivierter Form komplexiert mit Antithrombin III im Thrombin-Antithrombin III-Komplex (TAT). TAT hat eine Halbwertszeit von 10-15 Minuten und wird überwiegend hepatisch eliminiert (.

Prothrombinfragment 1+2 (F1+2)

Bei der Freisetzung von Thrombin aus Prothrombin wird das Fragment (F1+2) abgespalten. Es besitzt ein Molekulargewicht von 41kD und eine biologische Halbwertszeit von ca. 90 Minuten. F1+2 ist wie TAT ein Parameter, der indirekt das Ausmaß der Thrombinbildung, das heisst der Gerinnungsaktivierung *in vivo* reflektiert. Deswegen werden TAT und F 1+2 auch als Aktivierungsmarker der Gerinnung bezeichnet . Für F1+2 wurde eine Korrelation mit den wichtigsten koronaren Risikofaktoren nachgewiesen .

Fibrinogen

Fibrinogen ist ein Akute-Phase-Protein und wird in der Leber gebildet. Die Halbwertszeit beträgt 2,1- 3,8 Tage. Im Rahmen der Hämostase ist Fibrinogen das Substrat der plasmatischen Gerinnung. Nach Aktivierung der Gerinnungskaskade und der Thrombin-katalysierten Abspaltung der Fibrinopeptide A und B vom Fibrinogen erfolgt dessen Polymerisation zu Fibrin. Die anschliessende Faktor XIII-katalysierte Quervernetzung des Fibrinpolymerisats bewirkt die Ausbildung eines quervernetzten Fibringerinnsels .

D-Dimer

Der Begriff D-Dimere ist ein Sammelbegriff für verschiedene quervernetzte Fibrinspaltprodukte, die bei der Auflösung eines quervernetzten Fibringerinnsels durch Plasmin entstehen. Neben hochmolekularen Molekülen mit verschiedenen Anteilen von D-Dimeren liefert ein weiterer Abbau schließlich D-Dimer (Molekulargewicht 180 kD), an das häufig noch über Wasserstoffbrücken Fragment E assoziiert ist (DD/E-Komplex; Molekulargewicht 230 kD). D-Dimer selbst kann noch weiter gespalten werden. Die physiologische Halbwertszeit beträgt ca. 8 Stunden. Eine erhöhte D-Dimer Konzentration ist immer Zeichen einer sekundären oder reaktiven Hyperfibrinolyse .

1.2.4 Regulation der Fibrinolyse

Das Fibrinolysesystem ist in seiner Aktivität reguliert und befindet sich unter physiologischen Bedingungen in einem dynamischen Gleichgewicht mit prokoagulatorischen Faktoren des Gerinnungssystems . Unter Bildung von freier Plasminaktivität findet eine kontinuierliche Aktivierung der Fibrinolyse statt, deswegen lassen sich auch unter physiologischen Bedingungen fibrinolytische Spaltprodukte als Ergebnis einer Fibrinolyseaktivierung nachweisen. Wie diese kontinuierliche Aktivierung aufrechterhalten wird, ist nicht genau bekannt, sicherlich spielt die konstante Fibrinbildung ebenso eine Rolle wie hormonelle und vegetative Einflüsse .

An der Regulation der Fibrinolyse sind mehrere Mechanismen bzw. Systeme beteiligt:

1. Viele Faktoren regulieren die Synthese von t-PA ad hoc, zusätzlich weist sie eine endogene zirkadiane Rhythmik auf . Viele Stimuli und Agenzien führen zur Modulation der Synthese von t-PA: Acetylcholin, intravenös injiziert, führt zu einer deutlichen Erhöhung der fibrinolytischen Aktivität . In gleicher Weise setzt Adrenalin t-PA aus den Endothelzellen frei . Bradykinin, das bei Spaltung von hochmolekularem Kininogen während der Aktivierung der Kontaktphase

entsteht und einen starken Vasodilatator darstellt, setzt ebenfalls t-PA aus Endothelzellen frei . Auch Hypoxie, körperliche Belastung oder venöse Stauung führen zur t-PA-Freisetzung , ohne dass die mediiierenden Mechanismen im Detail aufgeklärt sind.

Im Gegensatz zu den erwähnten Stimulatoren wird die t-PA-Synthese in den Endothelzellen durch cAMP herunterreguliert . Unter physiologischen Bedingungen ist t-PA ein schwacher Aktivator des Plasminogens, solange beide Komponenten nicht an Fibrin gebunden sind. Selbst eine t-PA Erhöhung um das 20-100fache, wie z.B. nach starker körperlicher Belastung, führt zu keiner systemischen Aktivierung der Fibrinolyse. Erst eine Erhöhung um das 1000-5000fache, wie z.B. unter therapeutischen Bedingungen, kann diese Aktivierung erzeugen .

2. Im Plasma zirkulierenden Inhibitoren induzieren eine Hemmung der Fibrinolyse. So steht das im Plasma zirkulierende Plasminogen akut nur zu etwa 50% zur Verfügung, da der Rest an histidin-reiches Glykoprotein gebunden ist. Zusätzlich wird die Plasminogenaktivierung durch den im zirkulierenden Blut vorhandenen molaren Überschuß von PAI-1 im Vergleich zu den Plasminogenaktivatoren verhindert .
3. Die Beschränkung der Fibrinolyse auf den Ort der Gerinnungsbildung beengt die systemische Aktivierung des fibrinolytischen Systems. Z.B wird das freie Plasmin, das während der Degradation eines Fibringerinnsels freigesetzt wird, in der Zirkulation rasch durch α_2 AP gehemmt. Auch Thrombozyten unterstützen diese Lokalisierung, da sie während des Gerinnungsprozesses PAI-1 freisetzen .
4. Durch das Zusammenspiel von Fibrinolyse-System, plasmatischer Gerinnung und Thrombozytenaggregation wird die Fibrinolyse moduliert. So konnte z.B. *in vitro* nachgewiesen werden, dass Thrombin die Freisetzung von t-PA aus Endothelzellen steigert . Noch deutlicher kann die Konzentration von t-PA in der Zirkulation durch Injektion von Faktor Xa erhöht werden .
5. Auch das mononukleäre phagozytäre System von Leber und Milz spielt in der Begrenzung der fibrinolytischen Aktivität eine Rolle: Es entfernt im Blutstrom transportierte Aktivatoren der Fibrinolyse .

1.3 Einfluss sympathischer Aktivierung auf das fibrinolytische System

Bereits 1947 konnte gezeigt werden, dass Adrenalin die fibrinolytische Aktivität beim Menschen steigert. In einem Übersichtsartikel von von Känel und Dimsdale wurde der Einfluss α - und β -sympathomimetischer Substanzen auf die Fibrinolyse beim Menschen untersucht. Bei insgesamt 46 *in vivo* Studien mit Epinephrin, Isoproterenol, Phenylephrin, Salbutamol und Norepinephrin konnte in fast allen Untersuchungen eine Stimulation der Fibrinolyse durch die getesteten Substanzen nachgewiesen werden. Als Erklärung für die Steigerung der fibrinolytischen Aktivität dient zum einen die t-PA-Freisetzung als sofort aktive Serinprotease (andere Serinproteasen müssen erst proteolytisch aktiviert werden) und zum anderen die Veränderung der hepatischen Clearance von t-PA und verschiedenen Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren wie PAI-1.

In allen diesen Studien wurden adrenerge Substanzen intravenös appliziert. Deswegen sind sie mit den *in vivo* Verhältnissen bei einer Stimulation des sympathischen Systems möglicherweise nicht zu vergleichen. Bisher hat noch keine Studie den Einfluss einer physiologischen Sympathoexzitation auf die Hämostase beim Menschen untersucht.

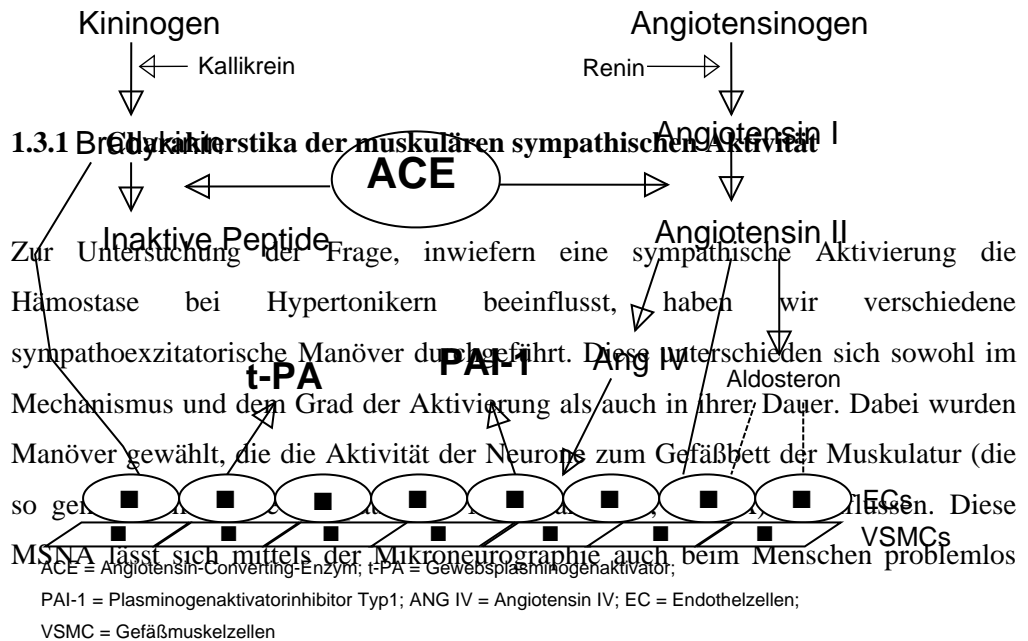
Eine antihypertensive Medikation führt je nach Medikament entweder zu einer Aktivierung oder aber Reduzierung der sympathischen Nervenaktivität. Der Calcium-Kanal-Blocker Amlodipin bewirkt eine Steigerung der sympathischen Aktivität bei kurz- und mittelfristiger Gabe, die bei langfristiger Gabe wieder nachzulassen scheint. Zur Wirkung der Calcium-Kanal-Blocker auf das fibrinolytische System existieren nur wenige, in ihren Aussagen differierende Studien. Ob der Einfluss auf die Fibrinolyse mit der Sympathikusaktivierung zusammenhängt ist nicht bekannt.

Auch zwischen dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System und dem sympathischen Nervensystem bei Hypertonikern besteht eine Interaktion. Desweiteren existieren eine Vielzahl von Studien, die belegen, dass das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System an der Regulation der Fibrinolyse beteiligt ist, und zwar unabhängig vom Blutdruck. Die Hauptmechanismen sind zum einen die Freisetzung von t-PA durch Bradykinin und zum anderen die Freisetzung von PAI-1 durch Angiotensin (siehe Abb.2). Aufgrund dieser zwei Wirkmechanismen kommt es zu unterschiedlichen

Wirkungen von Angiotensin-Converting-Enzym-Hemmern und von Angiotensin II-Typ 1-Rezeptorantagonisten auf die Fibrinolyse, wobei die genauen Mechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Ob der Angiotensin I Rezeptorantagonist Valsartan oder das Antihypertensivum Amlodipin, bei dem wir kürzlich eine sympathoexzitatorische Wirkung nachweisen konnten, einen spezifische Einfluss auf die Fibrinolyse ausübt, ist bisher *in vivo* beim Menschen nur unzureichend untersucht worden.

Abbildung 2: Zusammenhänge zwischen dem Renin-Angiotensin-, Kallikrein-Kininogen- und dem fibrinolytischen-System (modifiziert nach)

SHAPE



bestimmen und gilt als hochspezifisches Maß für die Erfassung sympathischer Nervenaktivität .

Hagbart und Vallbo waren die ersten, die postganglionäre sympathische Nervenaktivität mittels Mikroneurographie beim Menschen ableiten konnten . Durch die Mikroneurographie ist es möglich, Potentialänderungen einzelner, üblicherweise aber mehrerer sympathischer Neurone zu erfassen. Hierzu wird eine spezielle Elektrode in einen oberflächlich gelegenen peripheren Nerven (N.peroneus superficialis, N.medianus, N.radialis) eingeführt und in die Nähe einer Gruppe sympathischer Neurone gebracht. Die Entladung der Neuronen erfolgt synchronisiert in sogenannten bursts, deren Amplitude von der Anzahl der aktivierten Neuronen abhängt.

Zwei unterschiedliche Arten sympathischer Nervenaktivität können in einem peripheren Nerven abgeleitet werden: Zum einen die muskuläre sympathische Nervenaktivität (MSNA) und zum anderen die sympathische Hautnervenaktivität (SSA= skin sympathetic activity). Die MSNA reguliert den Tonus der Muskulatur von Blutgefäßen und damit den peripheren Gefäßwiderstand durch Vasokonstriktion. Bei der SSA handelt es sich um eine Mischung aus sudomotorischen und vasokonstriktorischen Impulsen, wahrscheinlich zusätzlich aber auch pilomotorischen und vasodilatatorischen neuronalen Aktivitäten . Während die SSA unabhängig vom Herzzyklus ist, wird die MSNA stark durch Einflüsse des Barorezeptors, aber auch durch andere im folgenden näher beschriebene Mechanismen beeinflusst . Diese Ableittechnik findet ihre Anwendung in physiologischen und pathophysiologischen Studien, bisher jedoch nicht in der klinischen Routinediagnostik . In unserem Experiment wurde die MSNA aus dem N. peroneus superficialis abgeleitet.

Die muskulär sympathische Nervenaktivität ist genetisch determiniert und variiert zwischen einzelnen Individuen relativ stark und reicht von 10 bis 90 bursts/100 Herzschläge . Sie bleibt aber innerhalb einer Person relativ konstant , wobei die MSNA im Alter ansteigt . Auch das Geschlecht spielt eine Rolle. Es zeigt sich, daß junge Frauen eine niedrigere Aktivität besitzen als junge Männer . Dieser geschlechtsspezifische Unterschied bleibt auch bei älteren Frauen erhalten, nimmt aber im Vergleich zu gleichalten Männern ab . Östrogene unterdrücken die muskuläre sympathische Nervenaktivität bei postmenopausalen Frauen . Das Körpergewicht

korreliert ebenfalls mit der MSNA, wobei diese bei Übergewicht erhöht ist . Schließlich wird die Ruheaktivität des sympathischen Nervensystems durch das hormonelle System beeinflusst, z.B. durch ACTH, Glukokortikoide und Insulin .

1.3.2 Regulationsmechanismen der sympathischen Aktivität

Die Aktivität der peripheren prä- und postganglionären sympathischen Neurone wird zentralnervös über autonome Zentren, insbesondere des Hirnstamms gesteuert (Medulla oblongata, Pons, Mesencephalon). Diese integrieren auch die Einflüsse höherer zentralnervöser Zentren. Für die Regulation des Kreislaufs sind Areale innerhalb der Medulla oblongata von besonderer Bedeutung. Im Tierversuch bewirkt eine Reizung von Neuronen der rostroventerolateralen Medulla eine Steigerung von Blutdruck, Herzfrequenz, sowie eine Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark . Die Axone ziehen dann von der rostroventerolateralen Medulla direkt über den spinalen Hinterseitenstrang in die intermediäre Zone des Rückenmarks und bilden Synapsen mit den präganglionären Neuronen für Vasokonstriktion. Die rostroventerolaterale Medulla reguliert so die tonische Aktivität der Vasokonstriktorneurone und ist gleichzeitig Bestandteil des Barorezeptorreflexes, der die Anpassung des kardiovaskulären Systems an wechselnde Erfordernisse steuert. Informationen über den Funktionszustand des kardiovaskulären Systems gelangen über neuronale Afferenzen von den arteriellen Barorezeptoren, den Volumen- und Chemorezeptoren über die Nn. vagi und glossopharyngei zum Nucleus tractus solitarii (NTS). Die Sekundärneurone des NTS ziehen von hier zu den verschiedenen Kerngebieten des Hypothalamus sowie des Hirnstamms und hier insbesondere zu der rostroventerolateralen Medulla.

Auch höhere zentralnervöse Zentren wie das limbische System (insbesondere die Amygdala) und der Hypothalamus üben Einflüsse auf die autonomen Zentren der Medulla aus. Eine große Bedeutung hat hier der Hypothalamus. Über die neuronale Verknüpfung zwischen Hypothalamus und medialem Kreislaufzentrum kontrolliert der Hypothalamus die Medulla oblongata und damit das kardiovaskuläre System. Darüberhinaus besteht eine direkte neuronale Verbindung zwischen Hypothalamus und den präganglionären Neuronen . Hypothalamische Kerne beeinflussen

schließlich die Aktivität der Endorgane über verschiedene Hormone und koordinieren die Funktion des endokrinen Systems und des autonomen Systems. Prinzipiell erfolgt die Anpassung der Aktivität von Teilen des sympathischen Systems insbesondere über Blutdruckänderungen, die durch Barorezeptoren erfasst und den zentralnervösen autonomen Zentren mitgeteilt werden, oder über Volumenrezeptoren, die im Herzen nachzuweisen sind. Weiterhin bewirkt die Stimulation von Chemorezeptoren, wie z.B bei einer Hypoxie, eine ausgeprägte Aktivierung von Anteilen des sympathischen Systems. Auch die Stimulation von Kälteafferenzen z. B. durch einen sogenannten cold pressor Test, erlaubt es, das sympathische System zum Muskelgefäßbett stark zu aktivieren. Schließlich spielen auch hormonelle Einflüsse für die Aktivität sympathischer Neurone eine wichtige Rolle.

1.3.3 MSNA-Regulation durch Barorezeptoren

Die funktionell wichtigsten Barorezeptorareale finden sich im Aortenbogen und Carotissinus. Die Erregung erfolgt durch Dehnung der Gefäßwände in Abhängigkeit von der Größe des transmuralen Drucks. Ein Druckanstieg bewirkt eine Erhöhung der Impulsrate der Barorezeptorafferenzen und führt zu einer Erregung der medial liegenden Neurone im NTS. Diese Neurone wirken auf einen Teil der Neurone in der rostroventerolateralen Medulla hemmend. Dies hat zur Folge, daß die Reizung des Barorezeptors die Aktivität in den sympathischen Neuronen zu den Widerstandsgefäßen und zum Herzen hemmt. Dieses ist mikroneurographisch in einer Unterdrückung der MSNA zu erkennen .

Umgekehrt führt eine Denervierung des Barorezeptors infolge der Blockade des N. glossopharyngeus und N. vagus zu einer Erhöhung der MSNA . Desweiteren sind die bursts dann nicht mehr an den kardialen Rhythmus gekoppelt. Dies zeigt, daß die Anzahl der MSNA-bursts durch den Barorezeptor beeinflußt wird. Veränderungen der MSNA werden insbesondere durch den diastolischen Blutdruck bestimmt, der systolische und mittlere Blutdruck spielt nur eine untergeordnete Rolle .

In unserem Experiment haben die Antihypertensiva Amlodipin und Valsartan über ihren blutdrucksenkenden Effekt einen baroreflexiven Einfluss auf die MSNA. Dabei ist dieser Einfluss allerdings bei den beiden Substanzen trotz einer Senkung des Blutdrucks auf ein vergleichbares Niveau unterschiedlich. Während Amlodipin eine

Aktivierung der MSNA im Vergleich zu Placebo bewirkt, ist dieser Effekt bei Valsartan nicht zu beobachten. Dies wurde durch einen unterschiedlichen Einfluss auf den Setpoint des Baroreflex erklärt und kann als Hinweis dafür dienen, dass zumindest Medikamente mit Einfluss auf das Renin-Angiotensin-System auch einen direkt zentralnervösen Effekt aufweisen. Auch das Insulin im euglykämischen hyperinsulinämischen Clamp hat über eine Vasodilatation und eine Blutdrucksenkung einen sympathoexzitatorischen Effekt, der durch den Baroreflex zu erklären ist.

1.3.4 MSNA-Regulation durch Chemorezeptoren

Eine Abnahme des O₂-Partialdruckes und die Zunahme des CO₂-Partialdruckes (bzw. der H⁺-Konzentration) führt zu einer Erregung der Chemorezeptoren im Glomus caroticum und aorticum. Die afferenten Impulse der Chemorezeptoren stimulieren das Kreislaufzentrum und das Atemzentrum in der Medulla oblongata. Sowohl Hypoxie (Apnoe) als auch Hyperkapnie erhöhen die MSNA, trotz unveränderten bzw. ansteigenden Blutdruckwerten. Eine Apnoe wurde in unserem Experiment zur Verifikation einer adäquaten Ableitqualität durchgeführt. Dieses Manöver lässt sich nicht lang genug durchführen, um als definiertes und reproduzierbares sympathoexzitatorisches Manöver zur Aktivierung der Fibrinolyse zu dienen.

1.3.5 MSNA-Regulation durch Volumenrezeptoren

Volumenrezeptoren befinden sich primär im Herzen und in den großen Gefäßen. Eine Reduktion des intrathorakalen Blutvolumens bewirkt über die Erregung der Volumenrezeptoren einen Anstieg der MSNA. Der in unserem Experiment durchgeführte lower body negative pressure bei -15 mmHg führt zu einer Aktivierung der Volumenrezeptoren des Herzens ohne Barorezeptoren wesentlich zu beeinflussen, da der Blutdruck sich nicht ändert.

1.3.6 MSNA-Regulation durch Kälteafferenzen

Die Reizung von Kälteafferenzen führt zu einer starken Sympathikusaktivierung. Die Steigerung der MSNA korreliert dabei gut mit der Höhe des Blutdruckanstieges. Auch die gefühlte Schmerzintensität zeigt eine Korrelation zur MSNA, wobei jedoch die alleinige elektrische Stimulation von Schmerzfasern, mit der gleichen Intensität wie beim Kältereiz, keinerlei Steigerung der MSNA bewirkt. Es handelt sich daher beim cold pressor test möglicherweise um eine kombinierte Stimulation von Schmerz- und Kälterezeptoren. Der genaue Mechanismus der Sympathikusaktivierung ist jedoch zur Zeit immer noch unklar .

1.4 Fragestellung

1. Ist die Funktion des hämostatischen/fibrinolytischen Systems durch kontrollierte Sympathoexzitation zu verändern?
2. Spielt der Modus der Sympathoexzitation für die beobachteten Änderungen des fibrinolytischen Systems eine Rolle?
3. Ist die Dauer einer Sympathoexzitation für die Effekte auf das hämostatische bzw. fibrinolytische System von Bedeutung?
4. Welche Anteile des fibrinolytischen Systems sind durch eine Sympathoexzitation besonders zu beeinflussen?
5. Haben die antihypertensiven Substanzen Amlodipin oder Valsartan einen Einfluss auf die Fibrinolyseparameter und läßt sich dieser möglicherweise durch ihre Effekte auf das sympathische System erklären?
6. Modifizieren Valsartan oder Amlodipin die Veränderungen der Fibrinolyseparameter auf unterschiedliche sympathoexzitatorische Manöver?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Probanden

An der Studie nahmen 18 Probanden (siehe Tabelle 1) erfolgreich an allen 3 Ableitungstagen teil. Neun weitere Probanden konnten die Studie aufgrund qualitativ nicht verwertbarer MSNA-Ableitung (n=8) bzw. aufgrund einer Studienprotokollverletzung (n=1) nicht abschließen.

Tabelle 1: Probandencharakteristika (MW \pm SEM)

Geschlecht (M/F)	12/6
Alter (Jahre)	56 \pm 1.74
Serumkreatinin ($\mu\text{mol/l}$)	81 \pm 3.5
Gewicht (kg)	82.6 \pm 2.9
Waist-to-hip ratio	0,9 \pm 0,01
Körpermasseindex (kg/m^2)	27.2 \pm 0.8

Die Probanden wurden durch Anzeigen in einer lokalen Tageszeitung (Lübecker Nachrichten) geworben. Eine erste Vorauswahl fand telefonisch anhand der Ein- und Ausschlusskriterien statt. Der danach noch in Frage kommende Personenkreis wurde zu einer Aufnahmeuntersuchung inklusive Blut- und Urinentnahme eingeladen. Die Voraussetzungen, die die Probanden für eine Teilnahme an der Studie erfüllen mussten, sind in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt:

Tabelle 2: Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
<ul style="list-style-type: none"> • Alter von 45 bis 70 Jahren • Bestehen eines milden bis moderaten Hypertonus (systolisch 140-180 mmHg, diastolisch 90-100 mmHg, oszillometrisch als Mittelwert von drei Messungen im Abstand von jeweils 2 Minuten gemessen, in sitzender Position) • Einnahme von höchstens zwei Antihypertensiva • Unterschrift der Einverständniserklärung vor Studienbeginn • Ansonsten im wesentlichen gesund 	<ul style="list-style-type: none"> • Schwangere, stillende Mütter oder Frauen im gebärfähigen Alter, die keine der folgenden Verhütungsmethoden verwenden: hormonelle Kontrazeptiva, chirurgische Sterilisation oder ein Diaphragma • bestehender oder innerhalb der letzten 6 Monate operierter Herzfehler • AV-Block II. oder III. Grades • Zeichen eines Myokardinfarktes oder eines zerebrovaskulären Insultes innerhalb der letzten 3 Monate • Angina pectoris Beschwerden • klinisch relevante Arrhythmien • klinisch relevante Herzklappenfehler • Zeichen eines malignen Hypertonus (diastolischer Blutdruck >130mmHg, rasch progrediente Beeinträchtigung der Nierenfunktion) • Zeichen einer hypertensiven Enzephalopathie • Hinweis auf eine hypertensive Retinopathie (Keith Wegener Grad III oder IV) • sekundärer Hypertonus (z.B. Hyperaldosteronismus, Phäochromozytom, einseitige Nierenarterienstenose) • Lebererkrankungen, definiert durch: GOT- und GPT-Werte höher als das 2fache des oberen Normwertes, Zeichen einer hepatischen Enzephalopathie, Ösophagusvarizen oder portocavaler Shunt • Nierenerkrankungen, gekennzeichnet durch: Dialyse, Erhöhung des Serumkreatinins um mehr als das 1,8fache des oberen Normwertes, nephrotisches Syndrom oder Hypokalämie (unter 3,5 mmol/l) • unzureichend eingestellter Diabetes mellitus (persistierende Nüchternblutzuckerwerte über 200 mg/dl oder diabetische Neuropathie) • Gastrointestinale Erkrankungen wie Gastro- und Duodenalulzera innerhalb der letzten 3 Monate, Operationen am Gastrointestinaltrakt oder Erkrankungen desselben, die eine Medikamentenaufnahme beeinflussen können

	<ul style="list-style-type: none"> • Klinisch relevante Allergien (inklusive Asthma, Medikamentenallergien) • Autoimmunkrankheiten (z.B. Lupus erythematoses, rheumatoide Arthritis, Glomerulonephritis) • Unverträglichkeit der in der Studie verabreichten Stoffe • maligne neoplastische Erkrankungen innerhalb der letzten 5 Jahre, wie Leukämie, Lymphom (Ausnahme: Basaliom) • Bestehen einer schweren oder lebensbedrohenden Erkrankung • Alkohol- oder Drogenmissbrauch innerhalb der letzten 2 Jahre • Schwere oder möglicherweise die Versuchsergebnisse beeinflussende Krankheiten, sowie Lebensumstände • Vorab als unkooperativ anzusehende Probanden, was die Befolgung des Versuchsprotokolls angeht • An der Durchführung der Studie beteiligte Personen • Unmöglichkeit die bisher eingenommenen antihypertensiven Medikamente ohne Eigengefährdung für den Zeitraum der Studie abzusetzen
--	---

Die Studie war zuvor von der Ethikkommission der Medizinischen Universität zu Lübeck als ethisch unbedenklich beurteilt worden.

Die Aufklärung der Probanden erfolgte sowohl in mündlicher als auch in schriftlicher Form. Die Zustimmung zur Teilnahme an der Studie wurde schriftlich niedergelegt.

2.2 Studienprotokoll

2.2.1 Medikamentöse Vorbereitung

In einer doppel-blind randomisiert durchgeführten Studie wurden in einem balancierten cross-over Design entweder Placebo oder Amlodipin (Norvasc® 5 mg, Pfizer Inc.) oder Valsartan (Diovan® 80mg, Novartis Pharma GmbH) für jeweils 7-10 Tage verabreicht. Die Tabletten sollten immer nach dem Frühstück eingenommen werden. Zwischen diesen Therapiephasen lagen 2-3 wöchige Auswaschphasen ohne Medikamenteneinnahme. Patienten, die vor Einschluss in die Studie bereits mit Antihypertensiva behandelt wurden, beendeten diese Therapie 2-3

Wochen vor Studienbeginn. Vor Beginn der Einnahme der Studiensubstanzen wurde eine 24-h Blutdruckmessung durchgeführt (siehe Abb. 3).

Am letzten Tag der Studienmedikation wurden die Patienten zur Bestimmung der MSNA und der anderen Parameter in das neurophysiologische Labor einbestellt. An diesem Tag blieben die Probanden nüchtern, sollten aber die Studienmedikation zwischen 9:00 und 10:00 Uhr einnehmen, sodass die Medikation ca. 120 Minuten vor Versuchsbeginn appliziert war.

Die Randomisierung der Medikamente und die Aufrechterhaltung des Doppelblindstatus unterlag hierbei der Novartis Pharma GmbH.

Abbildung 3: Zeittafel der Medikamenteneinnahme

	Ausw aschph. I	Medikation I	Ausw aschph. II	Medikation II	Ausw aschph. III	Medikation III	
	14 Tage	7 Tage	14 Tage	7 Tage	14 Tage	7 Tage	
	↑	↑	↑	↑	↑	↑	
klinische	24h Blutdruck-	Versuch		Versuch		Versuch	
Untersuchung	messung						
& Studieneinschluss							

2.3 Versuchsablauf

2.3.1 Vorbereitung der Probanden

Nachdem die Probanden ihre Blase entleert und eine Urinprobe abgegeben hatten, wurden sie gebeten, sich bis auf die Unterwäsche zu entkleiden und eine entspannte horizontale Position auf dem Untersuchungsbett einzunehmen, wobei die Beine bis über die Hüfte in der LBNP-Box (siehe 2.5.1) lagen. Der Oberkörper wurde auf Wunsch in eine erhöhte Position gebracht. Das Bein, an welchem die MSNA-Ableitung erfolgen sollte, wurde auf eine für diese Zwecke zurechtgeschnittene Schaumstoffschiene gelagert, das andere mit einer Knierolle und einem Abstützkissen versorgt und bequem daneben abgelegt.

In einer Ellenbeuge wurde eine Venenverweilkanüle (Venflon[®]2, 18G, 80 ml/min) in eine Cubitalvene eingebracht. Bei dieser Gelegenheit fand über einen Drei-Wege-Hahn (Discofix[®], B.Braun) die erste Blutentnahme statt.

2.3.2 Monitoring von EKG, Atmungskurve und Blutdruck

Das EKG wurde über zwei selbstklebende Einmalelektroden abgeleitet, welche thorakal in Herzachse angebracht wurden. Die Atemexkursionen wurden auf Höhe der unteren Thoraxapertur mittels elastischen Gurts und eigenem Druckwandler (Pneumobelt[®], Nihon Kohden, Tokyo, Japan) kontinuierlich registriert. Der arterielle Blutdruck wurde über eine pneumatische Fingermanschette, die um das Mittelglied des linken Mittelfingers (Hand auf Herzniveau) gelegt wurde, photoplethysmographisch erfasst und durchgehend aufgezeichnet (Finapres[®], Ohmeda 2300, BOC Health care, Colorado, USA). Zusätzlich wurden nach Lagerung und Verkabelung des Patienten drei oszillometrische Blutdruckmessungen am Oberarm (Lebenszeichenmonitor 5200 Series, Welch Allyn, Inc., New York, USA) durchgeführt.

2.3.3 Lokalisation des N. peroneus superficialis

Um den Verlauf des N. peroneus superficialis unterhalb des Fibulaköpfchens aufzufinden, wurde dieser durch transkutane, elektrische Stimulation gereizt (Model S48 Stimulator, Grass Instrument Company, Quincy, USA und Model SIU 8 T Stimulus Isolation Unit, Grass Instrument Company, W. Warwick, USA). Hierfür wurde eine Spannung von 40 bis 70 Volt, eine Frequenz von 1 Hz und eine Dauer von 0,01 ms pro Reiz verwendet. Die Punkte auf der Haut, die bei transkutaner Stimulation die stärksten unwillkürlichen Muskelkontraktionen zur Folge hatten, wurden mit einem Stift markiert und als ungefähre Verlauf des Nerven unter der Haut angesehen.

1.2.4 Ableitung von MSNA über Mikroelektroden

Nachdem der ungefähre Verlauf des Nerven festgestellt war, wurde eine Referenzelektrode ungefähr 2 cm oberhalb des markierten Nervenverlaufes in das subkutane Fettgewebe inseriert. Anschließend wurde die Ableitelektrode unter gleichzeitiger Stimulation mit einer Spannung von 3 bis 4,5 Volt, einer Frequenz von

1 Hz und einer Reizdauer von 0,01 ms in Richtung des markierten Nerven vorgeschoben. Wenn eine unwillkürliche Muskelkontraktion der Zehenstrecker, des M. tibialis anterior oder der Peronealmuskulatur erfolgte, oder der Proband Parästhesien angab, hatte die Elektrode den Nerven erreicht. Bei der genaueren Positionierung der Elektrode wurde darauf geachtet, dass die unwillkürlichen Muskelkontraktionen bereits bei einer Spannung von 1,5 Volt auftraten und die Probanden keine Parästhesien mehr angaben. Sobald auf diese Weise eine gute, intraneurale Position der Elektrode erreicht war, wurde mittels minimaler Lageänderungen versucht, die Elektrode in der Nähe sympathischer Nervenfasern zu positionieren. Dabei wurde die Lage der Elektrode im Nervenfaszikel durch Reizung der intramuskulären Dehnungsrezeptoren (Klopfen auf die Muskelbäuche) kontinuierlich überprüft.

Die MSNA unterscheidet sich deutlich von der SSA (skin sympathetic activity). Die MSNA ist im Gegensatz zur SSA rhythmisch an den Herzzyklus gekoppelt, durch eine inspiratorische Apnoe stimulierbar und gegen Erschrecken unempfindlich .

Eine Ableitung wurde daher aufgrund folgender Kriterien als qualitativ geeignet angesehen:

1. sichere Lage im Nervenfaszikel, durch Reizung der Dehnungsrezeptoren bestätigt
2. kein Nachweis sensorischer Afferenzen bei sorgfältiger Testung durch Streichbewegungen auf der Haut
3. Sympathoexzitation durch inspiratorische Apnoe
4. ein Verhältnis der Burstamplitude zum Hintergrundrauschen von mindestens 3:1
5. keine Sympathoexzitation durch Erschrecken

Bei der Suche nach einer adäquaten Ableitungsqualität ist darauf geachtet worden, die Elektrode nicht länger als 45 Minuten intraneural zu bewegen, um das Risiko einer dauerhaften Irritation zu vermeiden. Aus demselben Grund wurde bei jedem Versuchstag das jeweils andere Bein untersucht. Die Erholungsphase des Nerven betrug also mindestens 6 Wochen.

Bei den Elektroden, die zur Ableitung der sympathischen Nervenaktivität benutzt wurden, handelte es sich um isolierte Wolframmikroelektroden von 0,2 mm Dicke

und einer geätzten Spitze von wenigen Mikrometern Durchmesser. Die Elektroden waren mit einem Epoxydharz beschichtet. Durch das Eindringen in die Haut wurde der Isolationslack zurückgeschoben und gab die Elektrodenspitze frei. Nach Gebrauch einer Elektrode beträgt die Impedanz 20-100 k Ω . Elektroden mit einer geringeren Impedanz wurden als Referenzelektroden verwendet.

1.2.5 Signalaufbereitung und simultane Aufzeichnung von MSNA, EKG, Blutdruck und Atmung

Die über die Elektroden abgeleiteten Entladungen postganglionärer sympathischer Nervenfasern wurde zunächst 50 000 -fach verstärkt. Durch Bandpassfilterung (700-2000 Hz) wurde das Signal aus dem Hintergrundrauschen extrahiert. Nach Aufbereitung durch eine resistance-capacity Einheit (RC-network) mit einer Zeitkonstante von 0,1 s erfolgte die Darstellung des sympathischen Summenpotentials als mittlere Spannungsschwankung.

Diese Signale wurden simultan mit EKG, Blutdruck- und Atmungskurve mit einer Abtastgeschwindigkeit von 200 Hz digitalisiert (CED, Electronic Design 1401 plus, Science Park, Cambridge, England) und auf einem Computer gespeichert.

Die analoge Aufzeichnung von MSNA, EKG, Blutdruck- und Atmungskurve erfolgte über einen EEG Schreiber (EEG-4418G, Nihon Kohden, Tokyo, Japan). Dies ermöglichte eine direkte Beurteilung der Ableitungsqualität, so dass innerhalb der Versuche eine bestmögliche Vergleichbarkeit erreicht werden konnte. Außerdem erleichterte die analoge Mitschrift die spätere Auswertung am Computer wesentlich.

2.4 Zeitlicher Ablauf eines Untersuchungstages

Nach der Positionierung des Probanden erfolgte die erste Blutentnahme und kurz darauf die Suche nach einer guten Ableitposition für die MSNA - Elektrode. War diese erreicht, wurde die analoge und die digitale Aufzeichnung von MSNA, EKG, Blutdruck- und Atmungskurve gestartet.

In den darauf folgenden 5 Minuten wurde der arterielle Blutdruck dreimal am rechten Arm oszillometrisch gemessen, um ihn später mit dem photoplethysmographisch gemessenen abzugleichen. Als nächstes folgte die prä-Apnoe Messung und die Apnoe Phase, der sich nach einer Pause von 5 Minuten die ersten 5 Minuten einer definierten Ruhephase anschlossen. Nun schlossen sich der LBNP, eine weitere

Nachdem der Proband sich in die Box gelegt hatte wurde die ovale (ca. 30 x 42 cm) Einstiegsöffnung in Höhe des Abdomens mittels einer Plastikfolie abgedichtet. Dadurch konnte nach Einschalten eines Staubsaugers ein Unterdruck von -15 mmHg über die Dauer von 10 Minuten geschaffen werden.

Dieser Unterdruck senkt den zentralen Venendruck und stimuliert kardiopulmonale Niedrigdruckrezeptoren und geringfügig die arteriellen Barorezeptoren während der Blutdruck unverändert bleibt. Für die Auswertung des LBNP-Tests bezüglich der Kreislaufparameter und der MSNA wurden die letzten 5 Minuten mit einer direkt vorhergehenden 5-minütigen Ruhephase verglichen, Blutabnahmen fanden direkt vor und nach der LBNP-Phase statt.

2.5.2 Eiswassertest (cold pressor)

Der dritte Test bestand darin, eine Hand vollständig für 90 Sekunden in ca. 4° C kaltes Eiswasser zu halten. Dieser Reiz steigert die muskuläre sympathische Aktivität erheblich .

Zur Auswertung kamen die letzten 30 Sekunden der direkt vorangegangenen Ruhephase und die letzten 30 Sekunden des Eiswassertestes. Blut wurde direkt vor und nach dem cold pressor Test abgenommen.

2.5.3 Hyperinsulämischer euglykämischer Clamp

Zum Ende eines jeden Untersuchungstages wurden die Probanden einem hyperinsulämischen euglykämischen Clamp unterzogen. Zur Aufrechterhaltung eines physiologischen Blutzuckerspiegels wurde Altinsulin nach festgelegten Infusionsraten bei simultaner Plasmaglukosebestimmung intravenös injiziert und mittels Glukose nach variablen Infusionsraten intravenös gegenreguliert.

Für beide Infusionen wurde ein Venenverweilkatheter (Venflon®2, 18G, 80 ml/min) mit Dreiwegehahn (Discofix®, B.Braun) in einer Ellenbeuge platziert, am Handrücken des jeweils anderen Armes wurde ein venöser Katheter (Venflon®2, 20G, 54 ml/min) zur Blutentnahme für die Plasmaglukosebestimmung gelegt.

Das Infusat wurde mit einer Spritzenpumpe (Model 711-1G, IVAC Cooperation, San Diego, California, USA) und den dazugehörigen Infusionssystemen verabreicht. Insgesamt wurden 25 ml Infusat mit einer Konzentration von 13,5 mE Insulin/kg*ml

aus Normal-Alt-Insulin (H-Insulin Hoechst[®], Frankfurt am Main, 1 ml enthält 40 IE) und NaCl 0,9% bereitet. Hieraus folgt zur Berechnung der individuell benötigten Insulinmenge die Formel:

$$Insulin(E) = \frac{Insulinkonz. \left(13,5 \frac{mE}{kg \times ml}\right) \times Infusatmenge(ml) \times Probandengewicht(kg)}{1000 \frac{mE}{E}}$$

Zur akuten Anhebung der Plasmainsulinkonzentration wurde der Extrazellulärraum mittels eines Initialbolus mit fallenden Infusionsraten aufgefüllt. Es folgte die Insulingabe mit konstanten Infusionsraten, wie in Tabelle 3 ersichtlich.

Tabelle 3: Infusionsschema Insulin während des Clamps modifiziert nach

Zeit (min)	mE/kg x min (Insulin)	ml/h (Infusat)
0-2	3,75	16,66
2-4	3,375	15,0
4-6	3,0	13,33
6-8	2,25	10,0
8-60	1,5	6,66

Für die Bestimmung der Insulininfusionsraten sind die Pasmaglukosewerte des arteriellen Blutes maßgebend. Deswegen wurde das Blut aus einer Vene des Handrückens entnommen, nachdem es zuvor durch Erwärmung der Hand arterialisiert worden war. Dazu wurde die Hand des Probanden in eine Heizdecke (Temperatur ca. 60°C, Typ P5, BC) eingeschlagen. Die Blutentnahmen, ca. 0,5 ml pro Probe, erfolgten einmal vor und dann alle 5 Minuten während des Clamps. Sie wurden umgehend zentrifugiert (Microfuge, Beckman Instruments, Brea, California, USA), ihr Blutzuckerspiegel mit Hilfe eines Glukoseanalyseautomaten (Glucose Analyzer 2, Beckman Instruments, Brea, California, USA) gemessen und diese Ergebnisse protokolliert.

Zur Regulierung des Blutzuckerspiegels wurden 500 ml Glukose 20% mit 40 mval Kalium versetzt, um einer insulininduzierten Hypokalämie vorzubeugen. Zur Titrierung wurde eine volumetrische Infusionspumpe (Model 561-MGG, IVAC

Cooperation, San Diego, California, USA) mit originalen Infusionssystemen benutzt, die 4 Minuten nach Beginn der Insulingabe gestartet wurde.

Am jeweils ersten Versuchstag eines Probanden legten wir eine anfängliche basale Glukoserate von 3,75 mg Glukose / kg x min zu Grunde. Dies entspricht im Einzelfall:

$$\text{Glukoserate} = \frac{3.75 \frac{\text{mg}}{\text{kg} \times \text{min}} \times 60 \frac{\text{min}}{\text{h}} \times \text{Probandengewicht}}{200 \frac{\text{mg}}{\text{ml}}}$$

Die Infusionsrate wurde im weiteren Verlauf den Absolutwerten und den Tendenzen der vorherigen Plasmaglukosemessungen mit dem Ziel, den Blutzuckerspiegel bei 100 g/dl \pm 10% zu halten, angepasst. Am jeweils 2. bzw. 3. Untersuchungstag eines Probanden diente das Protokoll des vorherigen Clamps als wichtigster Anhaltspunkt für den Glukosebedarf.

Die Hyperinsulinämie stellt einen starken primären Stimulus der muskulären sympathischen Nervenaktivität dar.

Die MSNA wurde in zwei Phasen, von Minute 25-30 und 55-60, des 60 minütigen Clamps ausgewertet.

2.6 Bestimmung der Blutparameter

2.6.1 Blutentnahmen

Insgesamt wurde während des Experimentes 8-mal Blut entnommen, das Gesamtvolumen der Blutentnahme lag bei ca. 330 ml. Die ersten 6 Blutentnahmen wurden über eine Venenverweilkanüle (Venflon[®]2, 18G, 80 ml/min) aus einer der Ellenbeugen in unterschiedlichen Sarstedt Monovetten[®] entnommen. Die letzten beiden Blutentnahmen wurden während des hyperinsulinämischen euglykämischen Clamps aus einem Venenkatheter im Handrücken entnommen, da über den anderen Zugang die Glukose- und Insulinlösung infundiert wurden.

Eine EDTA - Sarstedt Monovette[®] wurde kurz vor der Blutentnahme mit 100 μ l einer Bestatinlösung versetzt. Bestatin ist ein Angiotensinogeninhibitor, und sollte auf diese Weise die Umwandlung des Angiotensinogen zu Angiotensin hemmen.

Das EDTA - Blut, mit und ohne Bestatin, wurde nach der Entnahme möglichst rasch bei 4000 Umdrehungen und einer Temperatur von 5°C viereinhalb Minuten lang zentrifugiert (Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Hanau). Zehn ml Vollblut wurden zu je 5ml in einen Vacutainer (Blood collection tube, Amersham International plc, Amersham, UK) und in eine Sarstedt Monovette® (weiß, 9ml, Serum) umgefüllt. Diese Behältnisse wurden anschließend auf gleiche Weise zentrifugiert und wie auch die anderen in einem Kühlschrank bei 5° C bis zum Ende der Untersuchung gelagert. Der Überstand des EDTA - Blutes mit Bestatin und der des Vacutainers wurden am Ende der Untersuchung in je eine 5 ml fassende Röhrentube abpipettiert und bis zur Bestimmung der Angiotensin II- und Katecholaminkonzentrationen bei -80° C eingefroren. Der Überstand des EDTA - Blutes ohne Bestatin und der des Serums wurden am Ende der Untersuchung zu je gleichen Teilen in fünf 1,5 ml fassende Reaktionsgefäße (Eppendorf) abpipettiert und zur späteren Bestimmung der Endothelin, Renin und Insulin Werte bei -80° C eingefroren.

Die grüne Monovette zur Bestimmung der Fibrinolyseparameter wurde nach der Entnahme nicht verändert, sondern möglichst rasch in das Gerinnungslabor gebracht. Während des hyperinsulämischen euglykämischen Clamps wurden zudem zahlreiche Blutentnahmen aus einer Venenverweilkanüle im Handrücken entnommen, um den Blut-Glukose-Spiegel genau beobachten zu können.

1.5.2 Messung der Plasma- bzw. Serumkonzentrationen von Angiotensin II, Katecholaminen, Renin, t-PA, D-Dimer, PAP, TAT, t-PA/PAI-1, F1+2, Fibrinogen

Die einzelnen Parameter wurden, z.T. nach Vorbehandlung, mit unterschiedlichen Assays quantifiziert. Zur Vereinfachung sind alle verwendeten Assays mit Ihren Intra- und Interassaykoeffizienten in der folgenden Tabelle dargestellt:

Parameter	Name/Hersteller	Intraassay-koeffizient	Interassay-koeffizient
Angiotensin II	rabbit polyclonal anti-Ang II, Peninsula, Belmont, CA, USA	9%	11%

Adrenalin	HPLC-System, Waters		5,6%
Noradrenalin	HPLC-System, Waters		6,1%
Renin	Renin III Generation, Sanofi Diagnostics Pasteur, Marnes-La-Coquette, Frankreich	4,6%	14,6%
t-PA	Coaliza [®] t-PA, ELISA, Chromogenix, Mölndal, Schweden	7%	7%
PAP	Enzygnost [®] PAP micro, Dade Behring, Marburg, Deutschland	2,1-6,3%	3,5-11%
F1+2	Enzygnost [®] F1+2 micro, Dade Behring, Marburg, Deutschland	5-7,5%	6-13%
TAT	Enzygnost [®] TAT micro, Dade Behring, Marburg, Deutschland	4-6%	6-9%
t-PA/PAI	TintElize [®] tPA/PAI-1, Biopool, Schweden	2,1-5,7%	3,2-6,8%
D-Dimer	Turbiquant [®] D-Dimer, Dade Behring, Marburg, Deutschland	1,6-4,7%	1,3-4,7%

Die Fibrinogen- Konzentration wurde mit Hilfe des auch für die Routinediagnostik benutzen Gerinnungsanalysators (Behring Coagulation System[®], Dade Behring, Marburg, Deutschland) ermittelt.

2.7 Datenzusammenfassung und Statistik

Die Auswertung der Daten wurde von mir selbst durchgeführt.

Die Analyse der Ableitung erfolgte mit der Unterstützung eines Auswertprogrammes (TAP, Göteborg, Schweden). Die MSNA-bursts wurden im Computer per Hand markiert und die Software berechnete die burst-Anzahl pro Minute (burst-Frequenz), die Herzfrequenz, die burst-Anzahl pro 100 Herzschläge (burst Inzidenz) sowie die Blutdruckwerte der ausgewerteten Perioden. Ein burst wurde als solcher akzeptiert, wenn seine Amplitude mindestens das Dreifache des Grundrauschens der Ableitung betrug. Artefakte wurden aufgrund der Anstiegssteilheit des Signals identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen.

Für die MSNA wurden folgende Perioden ausgewertet: 1. Eine 5-minütige Ruhephase vor Beginn des LBNP; 2. die letzten 5 Minuten des LBNP; 3. die letzten 30 Sekunden des cold pressor tests; 4. die letzten 5 Minuten des hyperinsulinämen euglykämischen Clamps. Die Ruhephase vor Beginn des LBNP unterschied sich durch die antihypertensive Vorbehandlung signifikant, unter Amlodipin wurde im Vergleich zu Placebo und Valsartan eine Erhöhung der MSNA Frequenz beobachtet. Deswegen wurde die jeweilige Ruhe-MSNA der unterschiedlichen Versuchstage als 100 % angesehen und im Weiteren die prozentuale Abweichung der MSNA von diesem 100% Wert für die Berechnungen verwendet.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer ANOVA (SPSS für Windows 11.0.1, SPSS Inc., Chicago, USA) mit den Faktoren Behandlung (Placebo versus Valsartan versus Amlodipin) sowie mit dem Messwiederholungsfaktor Zeit und dem Faktor Manöver (Ruhe versus LBNP versus cold pressor Test versus hyperinsulinämer Clamp) getrennt für die jeweiligen Gerinnungsparameter. Zeigte die overall Analyse signifikante Ergebnisse erfolgte eine post hoc Analyse. Ein nach Greenhouse-Geisser korrigierter p-Wert $<0,05$ wurde als signifikant angesehen. Die Daten werden wiedergegeben als Mittelwert \pm SEM.

3 ERGEBNISSE¹

3.1 Einfluss der medikamentösen Vorbehandlung auf hämodynamische Parameter, Katecholamine und MSNA während der Ruhephase

Alle Probanden waren entsprechend der Einschlusskriterien vor Medikamenteneinnahme hypertensiv. Sowohl Valsartan als auch Amlodipin konnten den systolischen und den diastolischen Blutdruck signifikant um durchschnittlich 16 bzw. 6 mmHg senken, beide Substanzen unterschieden sich in ihrer blutdrucksenkenden Wirkung nicht.

Unter Amlodipin zeigte sich sowohl im Vergleich zu Placebo als auch zu Valsartan ein signifikanter Anstieg der Herzfrequenz, unter Valsartan änderte sich die Herzfrequenz nicht.

Noradrenalin wurde durch Amlodipin signifikant erhöht, der geringere Noradrenalinanstieg unter Valsartan war weder zu der Placebobedingung noch zu der Amlodipinbedingung signifikant unterschiedlich. Die AdrenalinKonzentration wurde weder durch Amlodipin noch durch Valsartan signifikant erhöht.

Amlodipin bewirkte einen signifikanten Anstieg der Anzahl der MSNA-Frequenz im Vergleich zu Placebo und Valsartan. Valsartan änderte die MSNA im Vergleich zu Placebo nicht signifikant.

Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 4 aufgeführt.

¹ Die Effekte der antihypertensiven Vorbehandlung auf Parameter sympathischer Aktivität und hämodynamischer Parameter werden nur insoweit berichtet, als sie für die Untersuchung des Einflusses einer Sympathoexzitation auf das Gerinnungssystem relevant sind. Eine weitergehende Analyse der Therapieeffekte auf die sympathisch vermittelte Blutdruckregulation in Ruhe und unter sympathoexzitorischen Manövern ist Gegenstand weiterer Doktorarbeiten und wird an dieser Stelle nicht vertieft.

Tabelle 4: Einzelwerte unter den verschiedenen Behandlungsbedingungen in Ruhe

	Placebo	Amlodipin	Valsartan
Baseline Bedingung			
Noradrenalin (ng/l)	47,53 ± 3,60	63,44 ± 5,21**	54,56 ± 4,81
Adrenalin (ng/l)	25,5 ± 3,37	42,2 ± 9,9	32,6 ± 5,3
Plasma Renin (ng/l)	4,18 ± 0,52	5,49 ± 0,79 ^{°°}	9,13 ± 1,42 ⁺⁺
Angiotensin II (ng/l)	1,96 ± 0,45	2,02 ± 0,30 [°]	2,96 ± 0,33 ⁺⁺
Systolischer Blutdruck (mmHg)	164,5 ± 3,8	150,3 ± 3,5**	146,2 ± 3,2 ⁺
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	95,4 ± 2,1	89,8 ± 2,1**	88,7 ± 1,6 ⁺
Herzfrequenz (Schläge/min)	66,7 ± 3,3	71,1 ± 3,6 ^{**°}	67,1 ± 2,5
MSNA (bursts/min)	27,9 ± 2,4	37,0 ± 2,5 ^{**°}	32,1 ± 3,0

Amlodipin vs Placebo: * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005

Amlodipin vs Valsartan: [°]p<0,05, ^{°°}p<0,005; Valsartan vs Placebo: +p<0,05, ++p<0,005

3.2 Hämodynamische Parameter, Katecholamine und MSNA unter Sympathoexzitation

3.2.1 LBNP

Weder Herzfrequenz noch Blutdruck wurden durch Anlegen eines Unterdrucks an die unteren Extremitäten signifikant verändert. Die MSNA hingegen erhöhte sich signifikant in allen Behandlungsbedingungen.

Die Noradrenalinfreisetzung war unter Amlodipin und Valsartan im Vergleich zu Placebo signifikant erhöht, die Adrenalinwerte wurden durch das LBNP Manöver nicht verändert.

Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

3.2.2 Cold pressor

Die MSNA erhöhte sich durch das Manöver signifikant in allen Behandlungsbedingungen, die erreichten Maximalwerte waren für Valsartan und Amlodipin jeweils signifikant höher als in der Placebobedingung. Noradrenalin wurde durch den Cold pressor-Versuch signifikant gesteigert, während Adrenalin im Wesentlichen unverändert blieben.

Sowohl der systolische als auch der diastolische Blutdruck stiegen an, ohne dass es aber signifikante Unterschiede zwischen den drei Behandlungsbedingungen gab, die Herzfrequenz wurde nicht signifikant beeinflusst.

Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

3.2.3 Hyperinsulinämer euglykämischer Clamp

Der hyperinsulinäme euglykämische Clamp stimulierte die MSNA unter allen 3 Vorbehandlungen. Noradrenalin und Adrenalin wurden durch den Clamp-Versuch signifikant erhöht.

Der systolische und diastolische Blutdruck veränderte sich unter keiner der unterschiedlichen Behandlungen durch die Insulin-/Glukoseinfusion. Die Herzfrequenz stieg durch den Clamp signifikant an, dieser Anstieg war besonders deutlich unter Amlodipin und führte am Ende des Clamps zu einer signifikant höheren Herzfrequenz im Vergleich zu Placebo und Valsartan. Zwischen Valsartan und Placebo bestanden keine signifikanten Unterschiede.

Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

3.2.4 Renin und Angiotensin in Ruhe während der sympathoexzitorischen Manöver

Die Angiotensin II-Rezeptorblockade steigerte in Ruhe die Renin- und Angiotensin II-Werte signifikant im Vergleich zu Amlodipin und Placebo. Amlodipin zeigte hier keinen Effekt.

Dieses Ergebnis zeigte sich auch nach den sympathoexzitorischen Manövern (LBNP, Cold pressor, hyperinsulinämer Clamp) unverändert.

Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 5 aufgeführt.

Tabelle 5: Einzelwerte der verschiedenen sympathoexzitorischen Manöver im Vergleich zur Baseline

	Placebo	Amlodipin	Valsartan
Baseline Bedingung			
Noradrenalin (ng/l)	47,53 ± 3,60	63,44 ± 5,21**	54,56 ± 4,81
Adrenalin (ng/l)	25,5 ± 3,37	42,2 ± 9,9	32,6 ± 5,3
Plasma Renin (ng/l)	4,18 ± 0,52	5,49 ± 0,79 ^{oo}	9,13 ± 1,42 ⁺⁺
Angiotensin II (ng/l)	1,96 ± 0,45	2,02 ± 0,30 ^o	2,96 ± 0,33 ⁺⁺
Systolischer Blutdruck (mmHg)	164,5 ± 3,8	150,3 ± 3,5**	146,2 ± 3,2 ⁺
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	95,4 ± 2,1	89,8 ± 2,1**	88,7 ± 1,6 ⁺
Herzfrequenz (Schläge/min)	66,7 ± 3,3	71,1 ± 3,6 ^{**o}	67,1 ± 2,5
MSNA (bursts/min)	27,9 ± 2,4	37,0 ± 2,5 ^{**o}	32,1 ± 3,0
LBNP			
Noradrenalin (ng/l)	52,49 ± 3,88	68,54 ± 5,42***	63,83 ± 5,59 ⁺
Adrenalin (ng/l)	26,3 ± 3,0	39,9 ± 9,1	30,4 ± 5,1
Plasma Renin (ng/l)	4,27 ± 0,51	5,52 ± 0,78 ^{oo}	9,68 ± 1,51 ⁺⁺
Angiotensin II (ng/l)	2,21 ± 0,43	2,41 ± 0,29 ^{oo}	3,53 ± 0,43 ⁺⁺
Systolischer Blutdruck (mmHg)	171,3 ± 4,5	164,0 ± 4,4 ^o	155,2 ± 3,7 ⁺⁺
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	94,9 ± 2,4	88,8 ± 3,2	89,0 ± 3,5
Herzfrequenz (Schläge/min)	67,5 ± 3,4	70,8 ± 3,9 ^{*o}	68,1 ± 2,7
MSNA (bursts/min)	39,1 ± 2,9	45,2 ± 2,8	42,7 ± 2,9
Cold pressor test			
Noradrenalin (ng/l)	55,66 ± 4,20	70,80 ± 5,06***	65,78 ± 5,47 ⁺
Adrenalin (ng/l)	26,4 ± 3,2	35,3 ± 7,6	27,8 ± 4,2
Plasma Renin (ng/l)	4,08 ± 0,49	5,44 ± 0,70 ^{oo}	9,18 ± 1,52 ⁺⁺
Angiotensin II (ng/l)	2,02 ± 0,43	2,21 ± 0,28 ^o	3,31 ± 0,51 ⁺⁺
Systolischer Blutdruck (mmHg)	191,0 ± 7,0	189,4 ± 7,0	187,3 ± 5,5
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	108,2 ± 4,0	105,8 ± 5,0	106,7 ± 4,6
Herzfrequenz (Schläge/min)	72,3 ± 4,0	74,4 ± 4,1 [*]	72,2 ± 3,9
MSNA (bursts/min)	44,5 ± 4,3	53,1 ± 3,2**	51,9 ± 3,9 ⁺
Hyperinsulinämer Clamp			
Noradrenalin (ng/l)	54,32 ± 4,21	67,50 ± 5,19***	62,42 ± 5,46 ⁺
Adrenalin (ng/l)	69,0 ± 10,1	66,7 ± 9,3	50,5 ± 4,9 ^{o+}
Plasma Renin (ng/l)	5,09 ± 0,62	6,15 ± 0,75 ^{oo}	11,14 ± 1,86 ⁺⁺
Angiotensin II (ng/l)	3,28 ± 0,97	3,52 ± 0,42 ^o	5,16 ± 1,22 ⁺
Systolischer Blutdruck (mmHg)	171,0 ± 6,0	155,1 ± 3,5 [*]	149,3 ± 4,6 ⁺
Diastolischer Blutdruck (mmHg)	95,5 ± 3,2	93,2 ± 3,6	88,6 ± 3,5
Herzfrequenz (Schläge/min)	71,4 ± 3,4	77,2 ± 3,7 ^{***oo}	70,8 ± 3,0
MSNA (bursts/min)	43,7 ± 2,6	50,4 ± 2,2 [*]	46,1 ± 3,0

Amlodipin vs Placebo: * p<0,05, **p<0,01, ***p<0,005;

Amlodipin vs Valsartan: ^op<0,05, ^{oo}p<0,005; Valsartan vs Placebo: +p<0,05, ++p<0,005

2.1.5 Wirkung der antihypertensiven Therapie auf die Gerinnungsparameter während der Ruhephase

Die 7-10-tägige Vorbehandlung mit Amlodipin hatte keinen signifikanten Effekt auf die bestimmten Blutgerinnungsparameter während der Ruhephase. Valsartan führte zu einer signifikanten Erhöhung der D-Dimer Konzentrationen im Vergleich zu Placebo ($p < 0,05$) (siehe Abb. 7). Alle weiteren Parameter der Fibrinolyse wurden durch Valsartan nicht signifikant beeinflusst. Zwischen den beiden antihypertensiven Therapien zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Beeinflussung der Gerinnungsparameter während der Ruhephase. Die Zusammenfassung des Einflusses der antihypertensiven Therapie findet sich in Tabelle 6.

Abbildung 7: Änderungen der D-Dimer-Werte der einzelnen Probanden unter Medikation mit Amlodipin und Valsartan

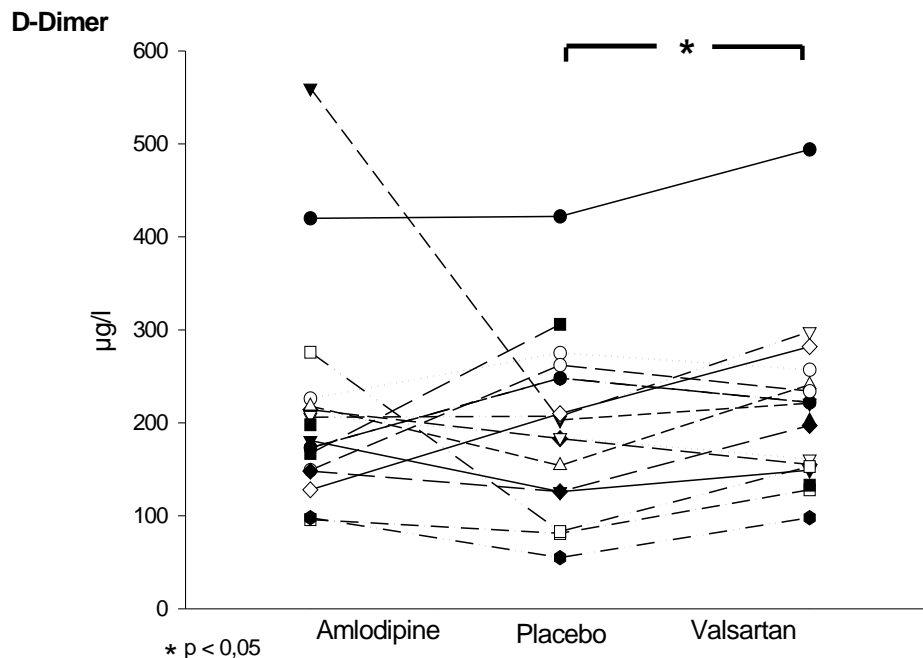


Tabelle 6: Änderungen der Gerinnungsparameter unter Medikation mit Amlodipin oder Valsartan

	Baseline	Amlodipin	Valsartan
Fibrinogen (g/l)	2,38 ± 0,14	2,41 ± 0,14	2,26 ± 0,14
TAT (µg/l)	3,96 ± 1,15	4,89 ± 1,45	8,54 ± 2,59
D-Dimere (µg/l)	199,9 ± 24,8	216,8 ± 29,9	219,3 ± 24,7 *
F1+2 (nmol/l)	0,73 ± 0,07	0,84 ± 0,13	0,87 ± 0,11
t-PA (ng/ml)	4,70 ± 0,32	4,38 ± 0,41	4,32 ± 0,37
PAP (µg/l)	405,0 ± 51,5	381,6 ± 41,2	329,7 ± 27,7
t-PA/PAI (ng/ml)	3,73 ± 0,37	4,09 ± 0,39	3,38 ± 0,33

2.2 Effekt der sympathoexzitatorischen Manöver auf Parameter der Hämostase

3.3.1 LBNP

Der LBNP-Versuch führte in der Placebobedingung bei keinem Gerinnungsparameter zu signifikanten Änderungen. Es ließen sich zwar anhand der Mittelwerte Anstiege von D-Dimeren und TAT erkennen, diese erreichten jedoch aufgrund der starken Streuung der Einzelwerte nicht das Signifikanzniveau (siehe Abb.16).

Nach einwöchiger Vorbehandlung mit Amlodipin führte das LBNP Manöver zu einer signifikanten Steigerung der TAT-Werten in Prozent des Ausgangswertes ($p < 0,05$) (siehe Abb.8). Für die F1+2 Spiegel ließ sich ein Trend zu einer Erhöhung feststellen ($p < 0,07$) (siehe Abb.9). In der Valsartan-Bedingung waren lediglich die TAT-Spiegel in Prozent des Ausgangswerts leicht erhöht (Trend: $p < 0,07$) (siehe Abb.10), ansonsten waren die Gerinnungsparameter unter LBNP nicht signifikant verändert (siehe Abb.16).

Zwischen den einzelnen Behandlungsregimes ergab sich kein signifikanter Unterschied in dem Effekt des LBNP-Manövers auf die unterschiedlichen Gerinnungsparameter (siehe Abb.17).

Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 7, 8 und 9 aufgeführt.

Abbildung 8: Prozentuale Änderung der TAT-Werte unter Amlodipinbehandlung im Vergleich zur Baseline

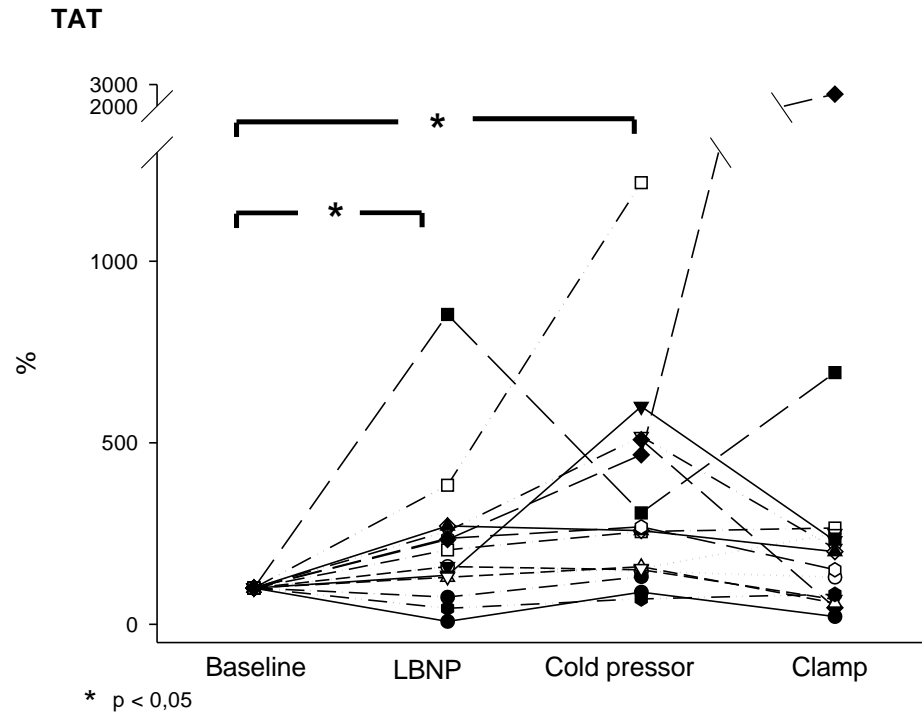


Abbildung 9: Prozentuale Änderung der F1+2-Werte unter Amlodipinbehandlung im Vergleich zur Baseline

F1+2

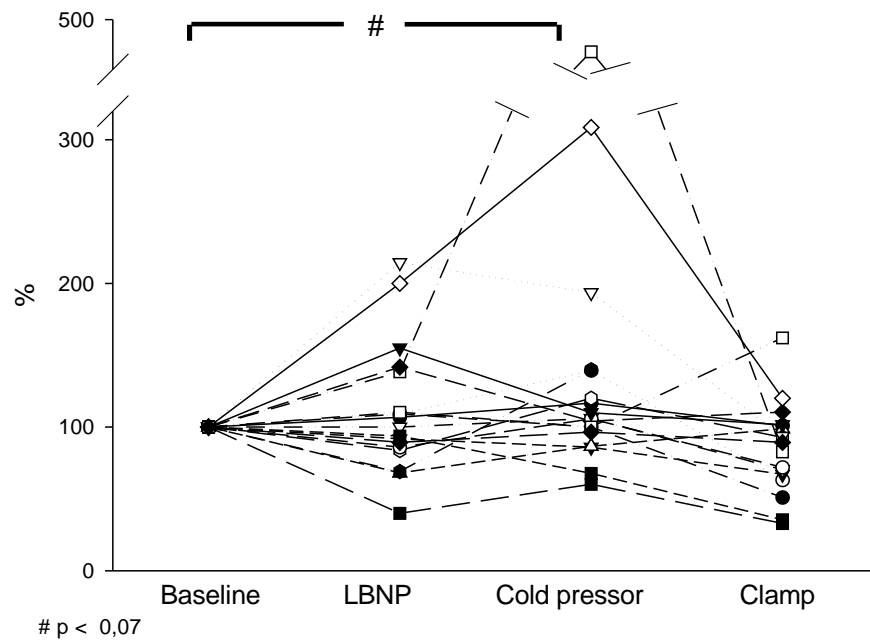
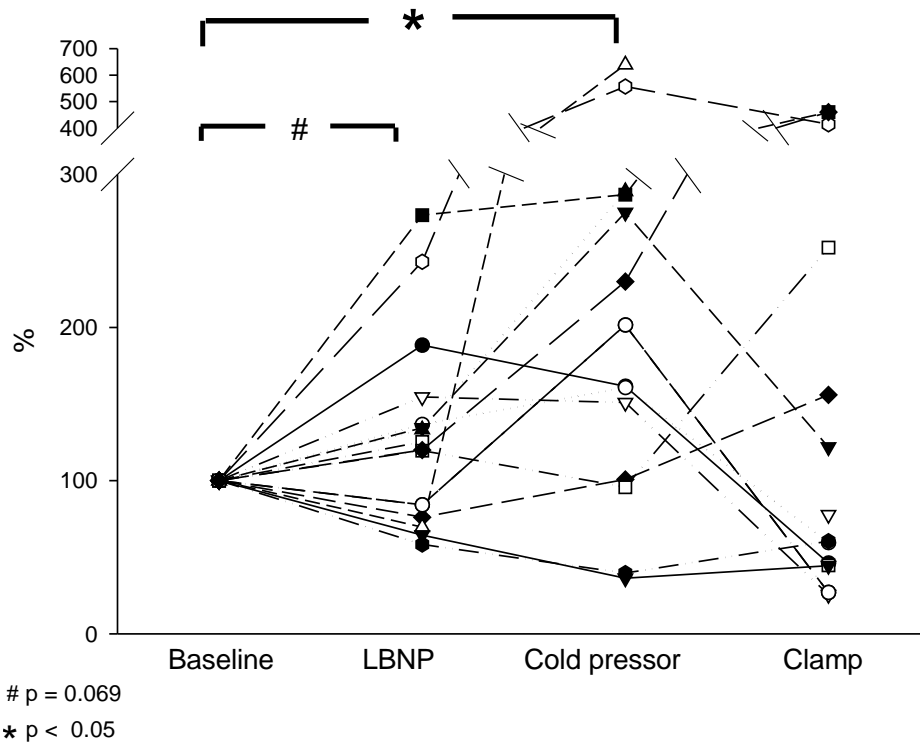


Abbildung 10: Prozentuale Änderung der TAT-Werte unter Valsartanbehandlung im Vergleich zur Baseline

TAT



3.3.2 Cold Pressor

Der cold pressor Test zeigte die deutlichsten Auswirkungen auf die Hämostase/ Fibrinolyse. In der Placebobedingung war die Konzentration der TAT-Werte signifikant erhöht ($p < 0,05$) (siehe Abb.11). Die Spiegel des t-PA waren erniedrigt ($p < 0,05$) (siehe Abb.12) Die anderen Gerinnungsparameter wurden nicht signifikant verändert (siehe Abb.16).

Abbildung 11: Änderungen der TAT-Werte der einzelnen Probanden unter verschiedenen sympathoexzitatorischen Mänovern

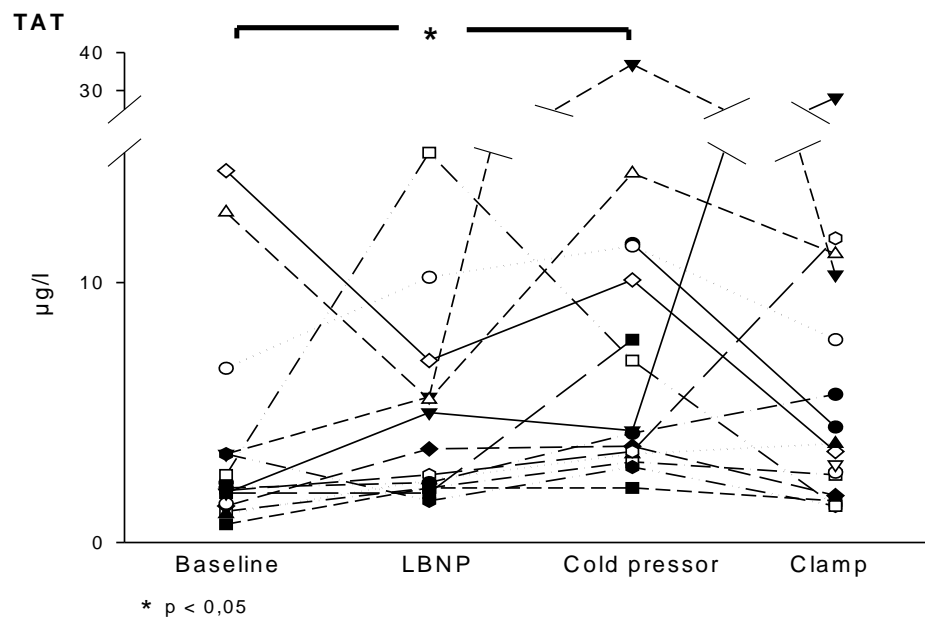
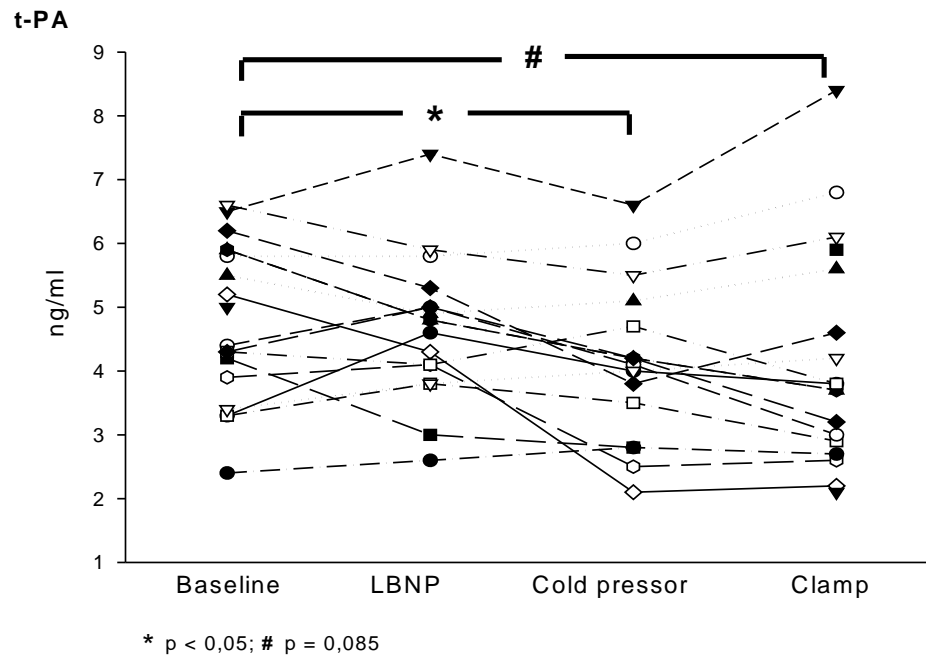


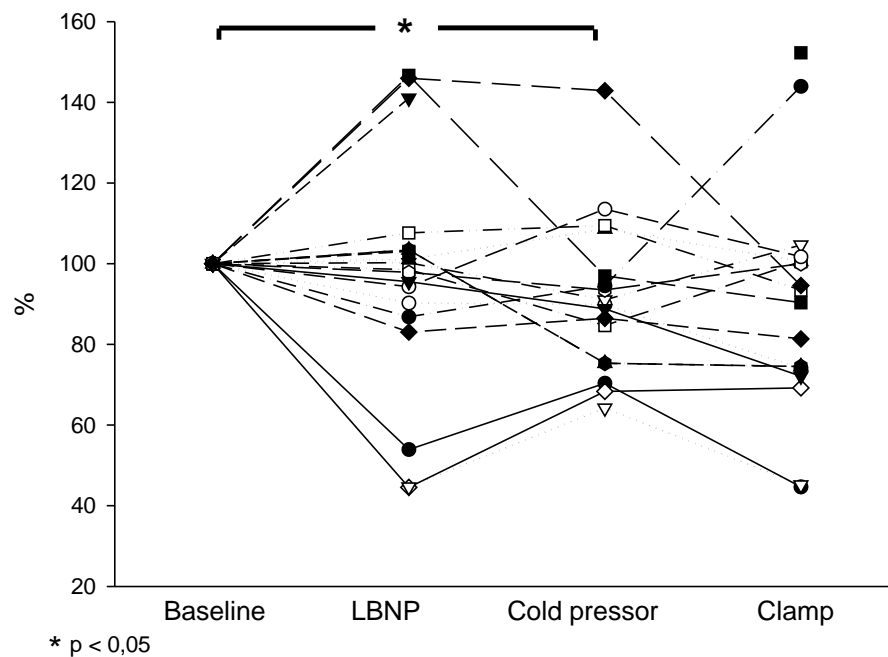
Abbildung 12: Änderungen der t-PA-Werte der einzelnen Probanden unter verschiedenen sympathoexzitatorischen Mänovern



Nach Vorbehandlung mit Amlodipin führte der cold pressor Test ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der auf den Ruhewert normalisierten TAT-Werte ($p < 0,01$) (siehe Abb.8). Der t-PA/PAI-Quotient zeigte einen signifikanten Abfall ($p < 0,05$) (siehe Abb.13). Die t-PA-Werte veränderten sich durch das cold pressor Manöver nicht. Nach Vorbehandlung mit Valsartan zeigte sich wiederum eine signifikante Steigerung der auf den Ruhewert normalisierten TAT-Werte ($p < 0,05$) (siehe Abb.10). Die t-PA- Werte waren wie alle weiteren Gerinnungswerte durch Valsartan im Vergleich zu der Ruhephase nicht signifikant verändert.

Abbildung 13: Prozentuale Änderung der t-PA/PAI-Werte unter Amlodipinbehandlung im Vergleich zur Baseline

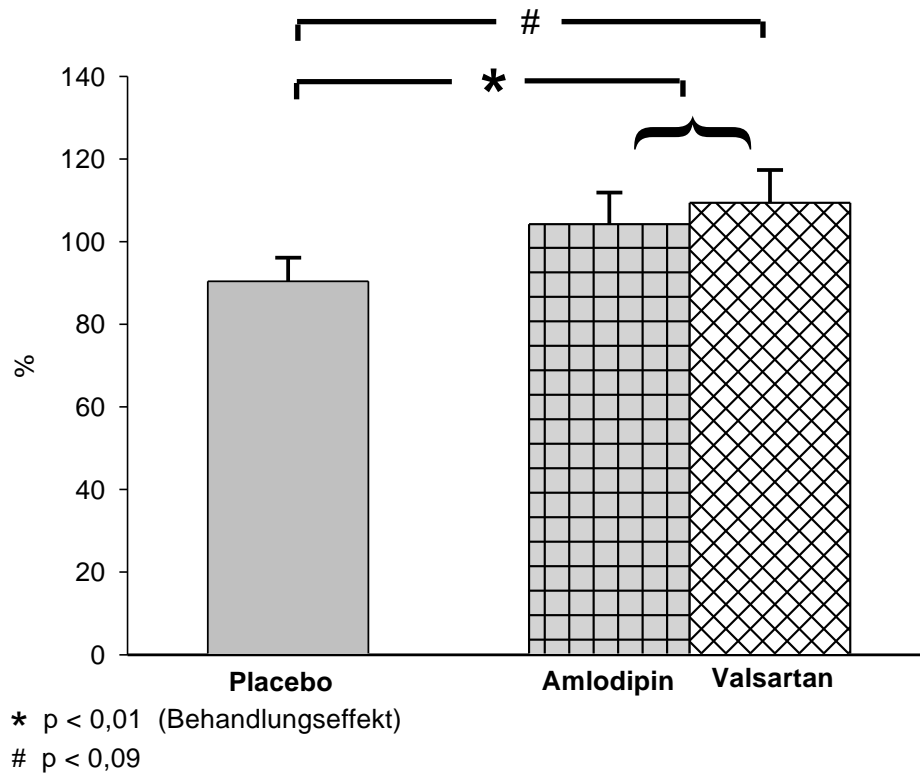
t-PA/PAI



Die einzelnen Vorbehandlungsregimes unterschieden sich signifikant in der Änderung der t-PA-Werte durch den cold pressor Test. Während in der Placebobedingung die t-PA-Werte signifikant abfielen, zeigte sich nach Behandlung mit den Antihypertensiva Amlodipin oder Valsartan keine signifikante Änderung der t-PA Spiegel. Dies führte zu einem signifikanten Behandlungseffekt ($p < 0,05$). Nach Vorbehandlung mit Valsartan lagen die t-PA Spiegel tendenziell höher ($p < 0,09$) als in der Placebobedingung (siehe Abb.14).

Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 7, 8 und 9 aufgeführt.

Abbildung 14: Prozentuale Änderung der t-PA-Werte im Bezug zur baseline Phase während des Cold pressor-Versuchs innerhalb der verschiedenen Behandlungsgruppen



2.2.3 Hyperinsulinärer euglykämischer Clamp

Die Sympathoexzitation durch einen hyperinsulinären euglykämischen Clamp hatte in der Placebobedingung keinen signifikanten Einfluss auf die Gerinnungsparameter (siehe Abb.16). Allerdings zeigte sich ein Trend zu einer Erniedrigung der t-PA-Werte ($p < 0,09$) (siehe Abb.12). Auch unter der Vorbehandlung mit Amlodipin oder Valsartan ergaben sich keine wesentlichen Änderungen der Hämostaseparameter (siehe Abb.17). Einzige Ausnahme sind die D-Dimere, deren auf den Ausgangswert normalisierten Prozentwerte nach der Hyperglykämie unter Valsartan signifikant niedriger lagen als unter der Placebobedingung ($p < 0,05$) (siehe Abb.15). Sämtliche Einzelwerte sind in Tabelle 7, 8 und 9 aufgeführt.

Abbildung 15: Prozentuale Änderung der D-Dimer-Werte im Bezug zur baseline Phase während des Clamp-Versuchs innerhalb der verschiedenen

Behandlungsgruppen	Baseline	LBNP	Cold pressor	Clamp
Fibrinogen (g/l)	2,38 ± 0,14	2,35 ± 0,14	2,33 ± 0,15	2,32 ± 0,15
TAT (µg/l)	3,96 ± 1,15	4,78 ± 1,02	8,41 ± 2,26 *	6,53 ± 1,80
D-Dimere (µg/l)	199,9 ± 24,8	241,1 ± 39,9	223,1 ± 28,5	256,9 ± 49,4
F1+2 (nmol/l)	0,73 ± 0,07	0,75 ± 0,07	0,83 ± 0,06	0,69 ± 0,10
t-PA (ng/ml)	4,70 ± 0,32	4,65 ± 0,29	4,12 ± 0,31 *	4,11 ± 0,45
PAP (µg/l)	405,0 ± 51,5	396,4 ± 52,2	390,4 ± 49,5	419,9 ± 52,2
t-PA/PAI (ng/ml)	3,73 ± 0,37	3,45 ± 0,32	3,45 ± 0,39	3,64 ± 0,40

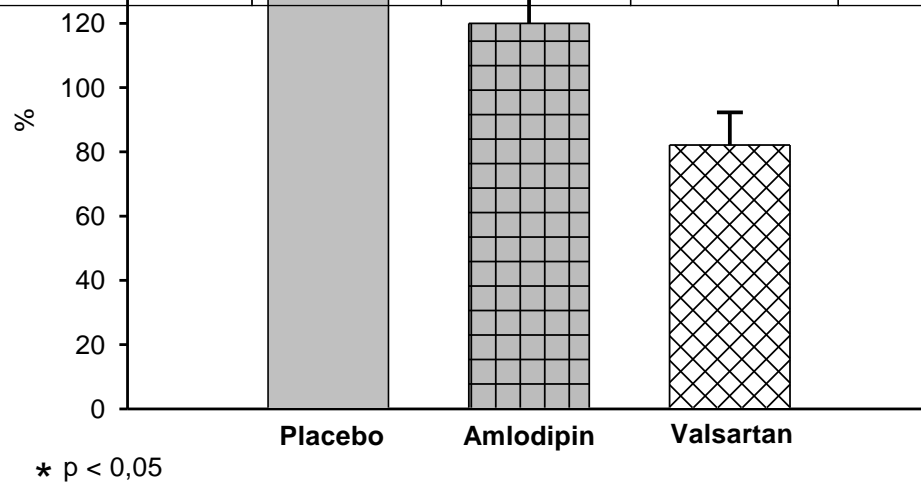


Abbildung 16: Vergleich der Baseline mit den verschiedenen sympathoexzitorischen Manövern in der Placebobedingung

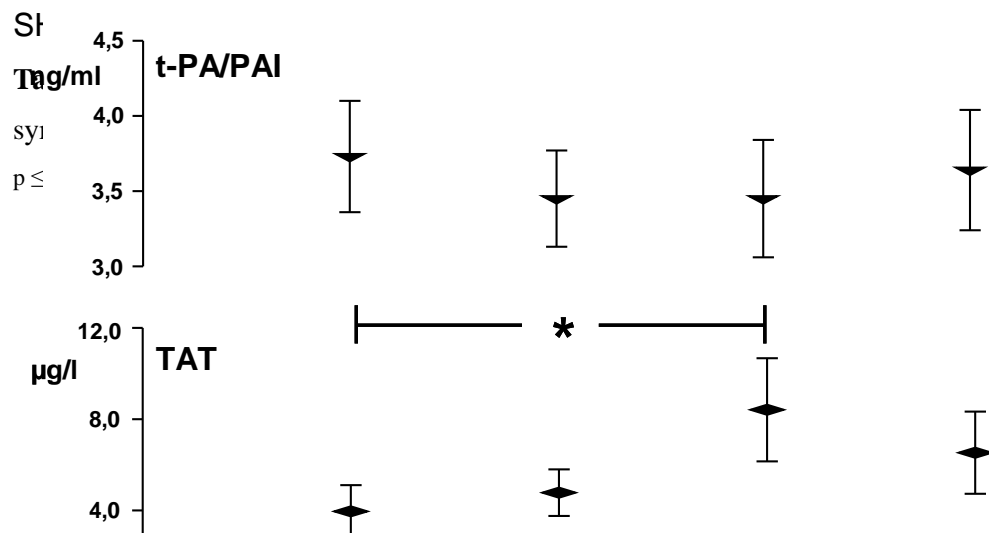


Tabelle 8: Prozentuale Veränderungen im Vergleich zur Baseline (100%) unter Amlodipin-Behandlung

* p < 0,05; # p = 0,071

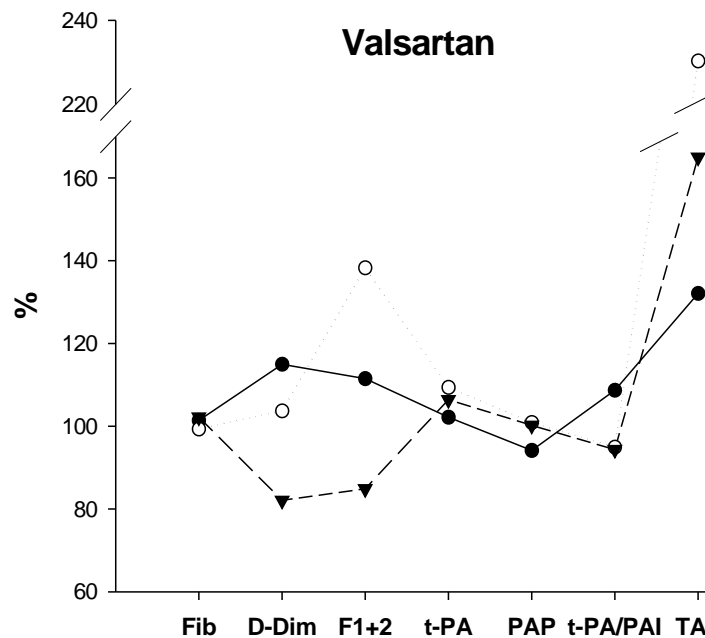
Tabelle 9: Prozentuale Veränderungen im Vergleich zur Baseline unter Valsartan-Behandlung

	LBNP	Cold pressor	Clamp
Fibrinogen	101,4 ± 3,02	99,36 ± 2,64	102,2 ± 4,19
TAT	132,1 ± 15,7 °	230,3 ± 45,6	165,0 ± 40,0
D-Dimere	115,0 ± 11,5	103,7 ± 11,6	82,10 ± 10,2 *
F1+2	111,5 ± 10,2	138,3 ± 21,8 #	84,90 ± 7,49
t-PA	102,2 ± 7,36	109,4 ± 7,94 Δ	106,4 ± 8,19
PAP	94,16 ± 4,70	100,9 ± 6,07	100,2 ± 4,95
t-PA/PAI	108,7 ± 4,79	94,93 ± 5,48	94,36 ± 4,98

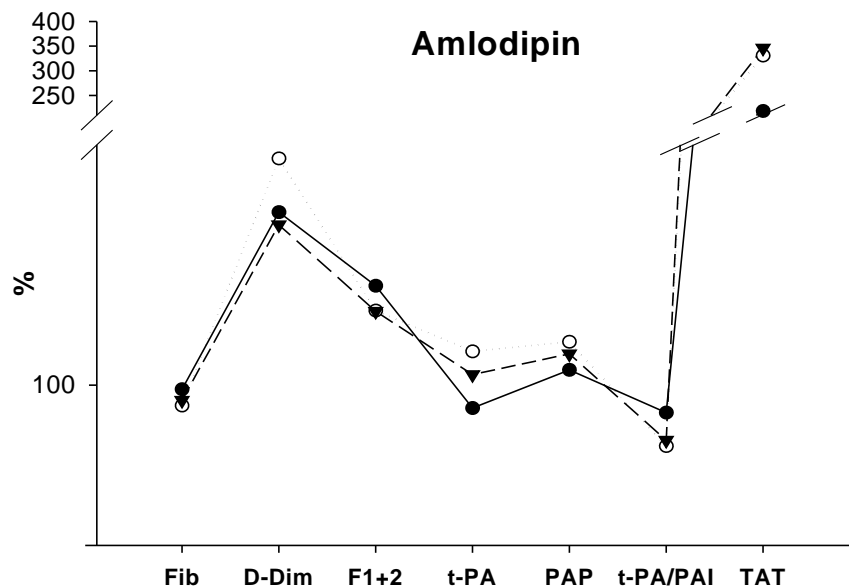
* p < 0,05; # p = 0,1; ° p = 0,069; Δ p = 0,087

	LBNP	Cold pressor	Clamp
Fibrinogen	99,49 ± 2,87	97,46 ± 3,10	98,10 ± 2,81
TAT	218,6 ± 49,9 *	330,9 ± 69,9	345,9 ± 152,3
D-Dimere	121,6 ± 17,3	128,3 ± 17,0	120,0 ± 14,7
F1+2	112,4 ± 8,24	109,3 ± 8,42	109,2 ± 14,7
t-PA	97,14 ± 7,20	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
PAP	101,9 ± 2,43	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
t-PA/PAI	96,57 ± 6,74	96,57 ± 6,74	96,57 ± 6,74

Abbildung 17: Überblick über die prozentualen Änderungen der Gerinnungswerte im Bezug zur baselins Phase während der verschiedenen sympathoexzitorischen Manöver unter der jeweiligen Behandlung



Manöver unter der jeweiligen Behandlung



Fib = Fibrinogen; D-Dim = D-Dimere

4. DISKUSSION

Unsere Studie hatte zum Ziel, die Folgen der Aktivierung des sympathischen Nervensystems auf die Hämostase zu untersuchen. Dabei wurden verschiedene sympathoexzitatorische Manöver angewandt, die sich weniger in ihrer Stärke als vielmehr in dem Modus der Exzitation und der Dauer des Stimulus unterschieden. Alle Manöver sind gut etabliert und weitestgehend in Ihren Mechanismen aufgeklärt. Damit war es uns erstmals möglich, die Effekte einer Sympathoexzitation auf die Blutgerinnung *in vivo* bei hypertensiven Menschen zu untersuchen. Gleichzeitig konnten wir die quantitative Veränderung der sympathischen neuronalen Aktivität mit Veränderungen unterschiedlicher Blutgerinnungsparameter korrelieren. Zusätzlich konnten wir den Effekt zweier Antihypertensiva mit ebenfalls unterschiedlicher Wirkung auf das sympathische System und das Renin-Angiotensin-Aldosteronsystem auf die Hämostase untersuchen. In diesem Zusammenhang war nicht nur interessant, wie ein schwach sympathoexzitatorisches Antihypertensivum (Amlodipin) die Blutgerinnung beeinflusst, sondern auch wie die beiden Antihypertensiva möglicherweise die sympathoexzitatorisch bedingten

Veränderungen der Hämostase beeinflussen. Von besonderem Interesse war, ob eine Hyperinsulinämie im Vergleich zu anderen sympathoexzitorischen Manövern einen unterschiedlichen Einfluss auf die Blutgerinnung ausübt.

4.1 Differentielle Effekte auf MSNA, Katecholamine und hämodynamische Parameter bei unterschiedlichen sympathoexzitorischen Manövern

Alle 3 sympathoexzitorischen Manöver (LBNP, Cold pressor, hyperinsulinämer Clamp) führten wie erwartet zu einer signifikanten Steigerung von MSNA und Noradrenalin.

Unterschiede zeigten sich in der Beeinflussung von Herzfrequenz und Blutdruck. So kam es nur unter cold pressor zu einem signifikanten systolischen und diastolischen Blutdruckanstieg und zwar ohne Veränderung der Herzfrequenz. Im Gegensatz dazu bewirkte der hyperinsulinäme Clamp eine Steigerung der Herzfrequenz ohne Blutdruckänderungen und beim LBNP kam es zu keinerlei Änderung hämodynamischer Parameter.

Diese unterschiedlichen Auswirkungen auf die hämodynamischen Parameter bei gleicher Steigerung der MSNA sind bedingt durch die Stimulation unterschiedlicher Rezeptoren und entsprechen den vorbeschriebenen Effekten der jeweiligen Stimulationsmanöver .

Lediglich zur Katecholaminantwort auf einen hyperinsulinämen euglykämischen Clamp (wir konnten sowohl einen Noradrenalin als auch einen Adrenalinanstieg feststellen) gibt es verschiedenste, in ihren Ergebnissen stark differierende Ergebnisse .

4.2 Differentielle Effekte auf verschiedene Parameter der Hämostase bei unterschiedlichen sympathoexzitorischen Manövern

4.2.1 LBNP

Der, wenn man die Wirkung auf MSNA, Blutdruck, Herzfrequenz und Katecholamine zusammen betrachtet, schwächste exzitorische Stimulus ist der LBNP-Versuch. Hier zeigen sich unter Placebobedingung keinerlei Änderungen der

Gerinnungsparameter. Unter Amlodipin-Behandlung jedoch kommt es beim LBNP-Versuch zu einem signifikanten Anstieg von TAT und einem als Trend zu wertenden Anstieg des F1+2 als Hinweis auf eine Aktivierung der Gerinnung im Sinne eines prokoagulatorischen Effektes.

Eine mögliche Erklärung ist, dass sich hier die sympathoexzitatorischen Effekte des LBNP-Versuches und der Amlodipin-Medikation summieren und so zu einer Gerinnungsaktivierung führen, denn auch die Vorbehandlung mit Amlodipin bewirkt alleinig keine Veränderung der Gerinnungsparameter.

Zur Wirkung von Calciumantagonisten auf das fibrinolytische System existieren wenige Untersuchungen, die Ihrerseits widersprüchliche Ergebnisse aufzeigen. In einer Untersuchung von Glerup et al. zeigte sich unter Ruhebedingungen bei 12 Hypertonikern eine deutlich geringere t-PA-Aktivität als in der normotensiven Kontrollgruppe. Nach einer Behandlung mit 2,5 mg Isradipine über 12 Monate kam es zu einem signifikanten Blutdruckabfall und einem Anstieg der t-PA-Werte in der Hypertonikergruppe bis fast auf das Niveau der Kontrollgruppe bereits nach zwei Wochen. Bei der PAI-Aktivität fanden sich sowohl vor als auch nach Behandlung keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen. In einer zweiten Studie derselben Arbeitsgruppe wurde der Effekt von Isradipine auf die fibrinolytische Aktivität in Ruhe und während Fahrradfahren an Normotensiven untersucht. Es zeigt sich, dass das Fahrradfahren einen deutlichen Anstieg der t-PA-Aktivität bewirkte. Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei den Hypertonikern der ersten Studie führte eine 2wöchige Behandlung mit Isradipine jedoch zu keinerlei Änderung der t-PA-Aktivität. Sakata et al. fanden nach 3monatiger Behandlung mit Nitrendipin einen signifikanten Anstieg der PAI-1-Aktivität und Pahor et al. konnten nach 4wöchiger Behandlung mit 5 und 10mg Amlodipin bei Patienten mit Hypertonus und Diabetes keine signifikanten Änderungen feststellen, allerdings zeigte sich eine dosisabhängige Steigerung der PAI-1-Konzentration. Ein Grund für die starken Unterschiede ist möglicherweise, dass es sich bei den Calciumantagonisten in den beschriebenen Studien und unserer Untersuchung zwar bei allen Medikamenten um Dihydropyridine der 2.Generation handelt, jedoch mit sehr unterschiedlichen Halbwertszeiten.

4.2.2 Cold pressor

Der nur sehr kurz aber stark exzitatorisch wirkende Cold-pressor Versuch bewirkt eine Hyperkoagulabilität, angezeigt durch einen Anstieg des prokoagulatorischen Markers TAT und einen Abfall der t-PA-Werte im Sinne einer Hypofibrinolyse.

Bei allen anderen Gerinnungsparametern sind hier keinerlei signifikante Änderungen oder Trends auszumachen.

Unter Vorbehandlung mit Amlodipin zeigt sich ebenso wie unter Valsartanmedikation eine signifikante Steigerung der auf den Ruhewert normalisierten TAT-Werte, wie auch schon unter Ruhebedingung gesehen. Im Gegensatz zu diesem prokoagulatorischen Effekt zeigt sich jedoch bei den t-PA-Werten ein signifikanter Behandlungseffekt im Sinne einer Hyperfibrinolyse durch beide Antihypertensiva, denn unter Placebo kommt es zu einem t-PA-Abfall und unter Amlodipin und Valsartan zu einem geringfügigen Anstieg. Dieser Effekt ist unter Valsartan ausgeprägter als unter Amlodipin.

Neben dem t-PA haben wir auch einen erst seit jüngerer Zeit bestimmbar Parameter der Fibrinolyse, den t-PA/PAI-Komplex untersucht. Dieser Parameter scheint eine wichtige Rolle zu spielen, wie eine Studie von Johansson et al. zeigt, wo ein hoch signifikanter Zusammenhang zwischen erhöhten t-PA/PAI-Spiegeln und der Entwicklung eines Schlaganfalls bei 324 Patienten beobachtet werden konnte. Eine Subgruppenanalyse für den hämorrhagischen Schlaganfall zeigte eine starke Assoziation mit t-PA/PAI, während sich hingegen für t-PA und PAI kein Zusammenhang herstellen ließ. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Messung des t-PA/PAI-Komplexes nicht nur ein anderer Weg ist um t-PA und PAI zu messen, sondern als eigenständiger Parameter angesehen werden muss. Da das gemessene t-PA die Gesamtheit von freiem t-PA (t-PA-Aktivität) und komplexgebundenem t-PA (t-PA/PAI-Komplex) widerspiegelt, lassen sich in unserem Fall durch die Messung von t-PA und t-PA/PAI auch Rückschlüsse auf die t-PA-Aktivität ziehen, wobei je nach verwendetem Assay auch hier leichte Fehlermöglichkeiten existieren. In unserem Fall zeigt sich bei fallendem t-PA und gleich bleibendem t-PA/PAI demnach auch eine gesunkene t-PA-Aktivität. Rückschlüsse auf die PAI-Aktivität bzw. -Antigenkonzentration lassen sich jedoch nicht ziehen.

Unter Amlodipin kommt es zusätzlich zu einem signifikanten Abfall der auf den Ruhewert normalisierten t-PA/PAI-Werte, was ebenfalls als Hinweis auf eine

Hyperfibrinolyse zu werten ist. Die antihypertensive Medikation scheint hier also einen „positiven Effekt“ (Hyperfibrinolyse) auf die Gerinnung zu haben, denn der cold pressor führt ja eigentlich zu einer Hyperkoagulabilität. Die antihypertensive Wirkung der Medikamente erklärt diesen Effekt jedoch nicht, denn der Blutdruckanstieg ist unter Medikation nicht unterschiedlich zu dem Anstieg unter Placebo. Es scheint hier also noch andere Effekte dieser beiden unterschiedlichen Antihypertensiva auf die Sympathikusaktivierung während des Cold pressor Versuches zu geben, deren Genese hier jedoch letztlich unklar bleiben und auch in der Literatur nicht vorbeschrieben sind.

Während es zur Auswirkung der Medikation mit Calcium-Antagonisten auf die Hämostase wie oben beschrieben nur wenige Studien gibt, sind die Effekt einer Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems auf die Blutgerinnung deutlich besser untersucht.

Eine Steigerung der Fibrinolyse durch Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems konnte in vielen *in vitro* und *in vivo* Studien nachgewiesen werden.

So zeigen *in-vitro*-Studien an glatten Gefäßmuskelnzellen, Endothelzellen, proximalen Tubuluszellen und glomerulären Mesangiumzellen eine signifikante Stimulation von PAI-1 durch Angiotensin II. Welcher Rezeptor jedoch welche Wirkung vermittelt ist bisher ungeklärt.

An isolierten Aortenendothelzellen in Kultur kam es auch nach Zugabe des Angiotensin-II-Metaboliten Angiotensin IV zu einer Stimulation von PAI-1, die durch spezifische Blockade des Angiotensin-II-Typ-4-Rezeptors hemmbar war. In einer Studie von Vaughan et al. konnte eine Angiotensin Typ1- und Typ2-Blockade eine PAI-Expression aus Endothelzellen nicht vermindern. Hingegen führte in einer anderen Untersuchung eine Infusion von Angiotensin II bei Ratten zu einem PAI-1-Anstieg, der durch Angiotensin Typ1-Rezeptoren-Blockade hemmbar war.

Auch die *in vivo*-Versuche weisen widersprüchliche Ergebnisse auf. Eine Infusion von Angiotensin II bei normotensiven und hypertensiven Patienten führte in beiden Gruppen zu einem signifikanten PAI-Anstieg, die t-PA-Konzentrationen blieben jedoch unverändert. In einer ähnlichen Studie an normotensiven Patienten führte eine zeitlich kürzere, sonst aber gleich dosierte Angiotensin II-Infusion zu einer Steigerung von Plasmakonzentration und Aktivität von t-PA, die PAI-Aktivität blieb jedoch gleich. Eine Studie von Labinjoh et al. hingegen konnte nach Angiotensin-II-

Infusion bei normotensiven Probanden weder eine Änderung der t-PA- noch der PAI-1-Parameter feststellen .

Ebenso existiert eine Vielzahl von klinischen Studien (nachfolgend eine Übersicht aus Lottermoser et al. 2000; siehe Tabelle 10), die ebenfalls zum Teil widersprüchliche Ergebnisse liefern. Man muss bei dieser Übersicht allerdings anmerken, dass eine Vergleichbarkeit aufgrund unterschiedlicher Medikamentendosierungen und Dosierungsintervalle, sowie aufgrund unterschiedlichster Komorbiditäten, die ihrerseits die Fibrinolyse beeinflussen können, schwierig ist. In der Mehrheit zeigt sich jedoch, dass eine medikamentöse Hemmung des Renin-Angiotensin-Systems mit einer gesteigerten Fibrinolyse durch Hemmung des PAI-1 einhergeht. Dies passt zu den Ergebnissen unserer Studie, bei der die Gabe von Valsartan zu einer Erhöhung der D-Dimer-Konzentration führt. Dies ist als Ausdruck der aktivierten Fibrinolyse zu deuten. Andere Parameter der Fibrinolyse, wie das t-PA oder der t-PA/PAI-Komplex, wurden allerdings nicht beeinflusst.

Tabelle 10: Wirkung einer ACE-Hemmung bzw. AT-1-Rezeptorblockade auf t-PA und PAI in klinischen Studien bei Patienten mit arterieller Hypertonie (HTN), koronarer Herzkrankheit (KHK), post Myokardinfarkt (MI) oder mit chronischer Herzinsuffizienz (HI) (↑=erhöht, ↓= erniedrigt, → = kein Effekt, Ø = nicht bestimmt) modifiziert nach

Studie	Medikament	N	PAI-1	t-PA	Anmerkung
	Enalapril	66	↓	→	Patienten mit HTN
	Losartan	20	→	→	Patienten mit HTN
	Perindopril	25	↓	→	Patienten mit HTN
	Losartan		↓	→	
	Trandolapril	64	↓	Ø	Patienten mit HTN
	Losartan		→	Ø	
	Lisinopril	12	→	Ø	Patienten mit KHK
	Quinapril	20	→	→	Patienten mit KHK
	Captopril	15	↓	↓	Patienten post MI
	Enalapril	81	→	↓	Patienten post MI
	Ramipril	12	↓	→	Patienten post MI
		0			
	Imidapril	30	↓	→	Patienten post MI
	Imidapril	40	↓	→	Patienten post MI

	Captopril	75	→	↑	Patienten post MI
	Captopril	29	↓	↓	Patienten post MI
	Enalapril	23	↓	∅	Patienten post MI
	Captopril	33	→	→	Patienten mit HI
	Enalapril		→	→	
	Enalapril	20	↓	→	Patienten mit HI
	Losartan		→	↓	

4.2.3 Hyperinsulinärer euglykämischer Clamp

Die länger andauernde metabolische Aktivierung des sympathischen Nervensystems zeigt lediglich einen Trend in Richtung Hypofibrinolyse, angezeigt durch einen t-PA-Abfall. Auch unter Vorbehandlung mit Amlodipin oder Valsartan zeigen sich keine wesentlichen Veränderungen der Hämostaseparameter. Lediglich unter Valsartan kommt es zu einem signifikanten Abfall der auf den Ruhewert normalisierten D-Dimere, also ebenfalls eine Veränderung in Richtung einer Hypofibrinolyse.

Der bei unserem hyperinsulinämen Clamp beobachtete Effekt in Richtung Hypofibrinolyse deckt sich nicht mit den hierzu existierenden Untersuchungen. Bei *in vitro* Versuchen auf der Basis von Zellkulturexperimenten (Schneider et al. 1992) und in klinischen Studien ließ sich ein Zusammenhang zwischen Insulin und den Plasmaspiegeln von PAI herstellen. So fanden Landin et al bei zwei Untersuchungen mit einem 2stündigen hyperinsulinämen Clamp an gesunden Probanden einen Anstieg der t-PA-Aktivität und einen Abfall des PAI-1- und t-PA-Antigen sowie der PAI-1-Aktivität als Kennzeichen einer Hyperfibrinolyse . Auch Seljeflot et al. konnten während eines 3stündigen Clamps bei Hypertonikern eine Hyperfibrinolyse feststellen, gekennzeichnet durch einen Abfall von PAI-1-Antigen und –Aktivität und einen Anstieg der t-PA-Aktivität bei allerdings unverändertem t-PA-Antigen und Grant et al. fanden ebenfalls einen Abfall der PAI-1-Konzentration während eine 2stündigen Clamps .

Eine möglich Erklärung für unsere differierenden Ergebnisse ist sicherlich, dass unser Clamp lediglich über 1 Stunde hinweg durchgeführt wurde. Zusätzlich wurde

nur das t-PA-Antigen bestimmt, das bei Landin et al. in beiden Versuchen sinkt und bei Seljeflot unverändert bleibt. Die t-PA-Aktivität haben wir nur indirekt bestimmt und die Inhibitor-Seite gar nicht gemessen, was eine direkte Vergleichbarkeit und natürlich auch eine schlüssige Aussage in Richtung Hyper- oder Hypofibrinolyse schwierig macht. Dennoch konnten wir durch den Clamp eine deutliche und lang anhaltende Sympathoexzitation erreichen, die schließlich auf einem hohen Niveau konstant blieb. Das macht es unwahrscheinlich, dass die in anderen Studien beobachteten Veränderungen der Fibrinolyse auf die Aktivierung des sympathischen Nervensystems zurückzuführen sind.

In unserem hyperinsulinämen Clamp zeigt sich ein signifikanter D-Dimer-Abfall unter Valsartan im Vergleich zu Placebo im Sinne einer Hypofibrinolyse. Da Valsartan unter Ruhebedingungen eine signifikante Steigerung der D-Dimere bewirkt und auch die beiden anderen sympathoexzitorischen Manöver zu einer Aktivierung der Fibrinolyse führen, muss es sich hier um eine spezielle Interaktion zwischen dem Renin-Angiotensin-System, der Hämostase und dem Insulin handeln. Dieses Ergebnis wird allerdings wiederum nur durch einen einzelnen Parameter gestützt und steht im Kontrast zu der eigentlich durch den Clamp erwarteten Hyperfibrinolyse (siehe oben). Auch Seljeflot et al. konnten in einer Studie bei 20 Hypertoniker bei einem hyperinsulinämen euglykämischen Clamp nach Behandlung mit einem AT-1-Antagonisten keine Unterschiede zur Placebobehandlung feststellen. Hier sind weitere Studien notwendig um die genauen Mechanismen zu klären.

4.2.4 Mögliche Ursachen für die differentiellen Effekte der Sympathoexzitation auf die Blutgerinnung

Die Stärke des Stimulus scheint einen entscheidenden Einfluss auf die Veränderung der Hämostaseparameter zu haben. Wallen et al konnten bei einem Vergleich verschiedener Stimuli (körperliche Anstrengung, mentaler Stress und Adrenalingabe) zeigen, dass der Stimulus mit den stärksten Auswirkungen auf das sympathische System (gemessen an Herzfrequenz, Blutdruck und Katecholaminen) auch die größten Veränderungen der Gerinnungsparameter bewirkte. Bei den Katecholaminen scheint Noradrenalin einen entscheidenderen Einfluss zu haben, denn die Adrenalininfusion, mit einem wesentlich niedrigeren Noradrenalin Spiegel als bei der

körperlichen Anstrengung, hatte auch deutlich geringere Auswirkungen auf die Gerinnungsparameter .

Diese Beobachtungen lassen sich indirekt auch auf unsere Ergebnisse übertragen, denn der Stimulus mit dem nominell stärksten Noradrenalin- und Blutdruckanstieg, der Cold-pressor, führt als einziger zu signifikanten Veränderungen der Gerinnungsparameter, während hingegen beim Clamp trotz des starken Adrenalinanstieges fast keine Veränderungen zu beobachten sind. Wir konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede in der Stärke der Sympathikusaktivierung zwischen dem Cold pressor Versuch und dem hyperinsulinämen Clamp finden. Möglicherweise spielen hier auch noch andere durch den Cold pressor Test vermittelte Effekte, wie z.B. Stimulation von Schmerzafferenzen oder humorale Effekte eine Rolle.

Auch die Dauer des Stimulus scheint einen Einfluss zu haben. Das bedeutet jedoch nicht, dass ein längerer Stimulus auch zu einer stärkeren Beeinflussung der Hämostase führt. So bewirkte z.B. in einer Arbeit von van der Poll et al. eine 24stündige konstante Adrenalininfusion einen maximalen Peak von t-PA und PAP nach einer Stunde, der maximale PAI-1 Peak hingegen zeigte sich erst nach 23 Stunden . Eine ähnliche Beobachtung machten Larsson et al. bei einer 3stündigen Adrenalininfusion, wo es bereits nach 15 Minuten zu einem maximalen Peak des t-PA kam . Ein möglicher Grund hierfür könnte das Erreichen eines Steady-State-Zustandes für die Freisetzung, Komplexbildung und Clearance von t-PA und Adrenalin sein, denn bei kürzeren Stimulationsmanövern lässt sich ein linearer Zusammenhang zwischen Plasmaadrenalinkonzentration und t-PA-Spiegeln feststellen .

Diese Studien zeigen, dass die Dauer der von uns gewählten Stimuli ausreichend war um Veränderungen in der Fibrinolyse hervorzurufen.

Die oben genannten Studien wurden allerdings an gesunden Probanden durchgeführt. In einer Übersichtsarbeit von von Känel und Dimsdale kommt es in 31 von 32 Studien mit Adrenalingabe und allerdings nur 3 von 6 Studien mit Noradrenalingabe zu einer Aktivierung der Fibrinolyse .

Wir konnten weder beim Cold pressor-Test mit dem stärksten Noradrenalinanstieg noch beim Clamp mit dem stärksten Adrenalinanstieg eine Aktivierung der Fibrinolyse beobachten. Im Gegenteil, es kam beim Cold pressor sogar zu einem

signifikanten t-PA-Abfall und auch beim Clamp ist ein Trend in Richtung Hypofibrinolyse zu erkennen.

Ein möglicherweise entscheidender Grund für unsere Beobachtung ist, dass es sich bei unseren Probanden um Personen mit einem Bluthochdruck handelt. Hypertensive Patienten zeigen per se eine Störung der Hämostase. So konnten z.B. auch Palermo et al in einer Studie mit Hypertonikern eine verringerte fibrinolytische Antwort auf eine adrenerge Stimulation (Stress) feststellen. Dies könnte die geringen Effekte der Sympathoexzitation erklären.

Neben der arteriellen Hypertonie könnte auch das erhöhte Körpergewicht unserer Probanden, die eine Tendenz zum Übergewicht und einer erhöhten waist-to-hip Ratio aufwiesen, für die geringen Effekte der Sympathoexzitation und der antihypertensiven Therapie verantwortlich sein. Verschiedene Untersuchungen konnten zeigen, dass Personen mit Übergewicht und erhöhter W-H-Ratio eine gestörte Hämostase aufweisen.

Des Weiteren hat auch die Art der Probenabnahme einen Einfluss auf die Werte der Gerinnungsparameter. So konnten Hafner et al. beim Vergleich der Werte von F1+2 und TAT von Blutabnahmen aus Braunülen und direkter Venenpunktion signifikante Unterschiede feststellen. Ebenso verändert das Anlegen einer Stauung zur Blutabnahme die Gerinnungswerte. Unsere Blutabnahmen erfolgten immer aus Braunülen, so dass es sich wenn überhaupt um einen fortlaufenden Fehler handelt. Bei einigen Blutabnahmen musste jedoch eine venöse Stauung angelegt werden, so dass hier eine mögliche Ursache für eine erhöhte Streuung der bestimmten Gerinnungsparameter liegt.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Auf dem Hintergrund der Hypothese, dass eine sympathoexzitorisch bedingte Hyperkoagulabilität bei Patienten mit entsprechender Disposition eine Ursache von thrombembolischen und atherosklerotischen Gefäßverschlüssen ist, haben wir den Einfluss verschiedener sympathoexzitorischer Manöver auf Parameter der Hämostase und Fibrinolyse *in vivo* bei Menschen mit einer primären Hypertonie untersucht. Wir untersuchten 18 ansonsten gesunde Patienten mit arteriellem Hypertonus gemäß einem doppelblinden, placebokontrollierten, randomisierten, cross-over, single center Protokoll. Die Patienten erhielten entweder Valsartan, Amlodipin oder Placebo, unterbrochen jeweils von einer Auswaschphase von 2 Wochen. Am siebten Tag der Behandlung wurden Blutdruck, Herzfrequenz, MSNA, Noradrenalin, Renin, Angiotensin II, t-PA, t-PA/PAI, F1+2, TAT, D-Dimere, PAP und Fibrinogen gemessen. Die Messungen erfolgten unter Ruhebedingungen und nach Sympathoexzitation mit einem LBNP-Versuch, einem Cold pressor Test und einem euglykämischen hyperinsulinämen Clamp.

Die eindeutigsten Ergebnisse fanden sich bei dem kurzdauernden cold pressor Test. Hier entwickelte sich eine Hyperkoagulabilität, angezeigt durch einen Anstieg des prokoagulatorischen Marker TAT und eine Hypofibrinolyse, gekennzeichnet durch einen t-PA-Abfall. Die anderen sympathoexzitorischen Manöver führten zu keiner signifikanten Beeinflussungen der Gerinnungsparameter.

Die Medikation mit Amlodipin hatte keinen Einfluss auf die Fibrinolyseparameter und unter Valsartan zeigte sich nur bei den D-Dimeren ein signifikanter Anstieg im

Sinne einer Aktivierten Fibrinolyse, alle anderen Gerinnungsparameter blieben unbeeinflusst.

Jedoch ließ sich durch eine antihypertensive Medikation der t-PA-Abfall unter Sympathoexzitation verhindern, es zeigte sich somit eine positive Beeinflussung der Fibrinolyse im Sinne einer Hyperfibrinolyse. Dieser Effekt konnte sowohl unter Amlodipin als auch unter Valsartan gesehen werden und war unabhängig von der blutdrucksenkenden Wirkung der Substanzen.

Somit zeigt sich schon ein Zusammenhang zwischen dem sympathischen System und dem Hämostasesystem bei Hypertonikern. Worauf der gleichermaßen positive Einfluss der beiden unterschiedlichen Antihypertensiva beruht konnte mit unserer Untersuchung leider nicht geklärt werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

7. ANHANG

Hauptprotokoll

Datum :

Patienteninitialen / -nummer :

Versuchstag (A-C) :

Zeit	Ereignis	Ergebnis / Bemerkung
nach Versuchsuhr		
	1. BE	
	RR Messung & Fina-Press kalibrieren.	RR:..... P:.....

		RR:..... P:.....
		RR:..... P:.....
	Fina-Press	RR:.....
	Start Computeraufzeichnung	
	Inspiratorische Apnoe	Dauer :..... (Min.:Sek.)
	Beginn Ruhephase (5 Min.)	
	Beginn baseline Messung (5 Min.)	
	Ende	
	2. BE (I)	
	Beginn LBNP (insgesamt 10 Min.)	
	Beginn Messung (letzten 5 Min.)	
	Ende	
	3. BE (II)	
	Beginn Ruhephase (10 Min.)	
	Ende	
	4. BE (III)	
	Beginn Ruhephase (2 Min.)	
	Ende	

Patient :

Zeit	Ereignis	Ergebnis / Bemerkung
	Beginn cold pressure (insg. 1,5 Min./ Messung letzte 30 Sek.)	
	Ende	
	5. BE (IV)	
	Ruhephase (10 Min.)	

	Ende	
	Beginn baseline Messung (5 Min.)	
	Ende	
	6. BE (V)	
	Beginn Clamp (60 Min.)	
	7. BE (VI) (nach 30 Min.)	
	Beginn 1. Messung (nach 25 Min./ 5 Min. lang)	
	Ende	
	Beginn 2. Messung (nach 55 Min./ 5 Min. lang)	
	Ende - Clamp	
	8. BE (VII)	
	RR Messung & Fina Press kalibrieren	RR:..... P:.....
		RR:..... P:.....
		RR:..... P:.....
	Fina-Press	RR:.....

8. DANKSAGUNG

Zum Abschluss meiner Arbeit möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Professor Dr. med. C. Dodt recht herzlich für das Thema meiner Doktorarbeit und für das Ermöglichen dieser wissenschaftlichen Arbeit bedanken. Er hat diese Arbeit mit seinen Ideen, seiner Geduld und Erfahrung und vielen

fruchtbaren Diskussionen immer wieder vorangetrieben hat und stets ein offenes Ohr für alle anfallenden Probleme hatte.

An dieser Stelle möchte ich mich auch nochmals bei meiner Frau Kathleen und meiner Tochter Emily für Ihre unermüdliche Geduld während meiner wissenschaftlichen Arbeit und bei meinen Eltern für Ihre Unterstützung während meines Studiums bedanken.

Außerdem bedanke ich mich bei Philip Muck und Daniel Trübger für Ihre tatkräftige Hilfe bei dieser Studie.

Zum Schluss sind noch alle freiwilligen Probanden zu erwähnen, ohne die keine Forschungsarbeit möglich gewesen wäre.

9. LEBENSLAUF

Persönliche Daten

Name:	Struck
Vorname:	Jan
Geburtsdatum/-ort:	12.08.1969 Bückeberg

Nationalität:	Deutsch
Konfession:	Evangelisch
Familienstand:	Verheiratet

Schulbildung

1975-1980	Klosterhof-Schule, Lübeck
1979-1989	Thomas-Mann-Schule, Lübeck
	Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung

1989-1997	Medizinische Universität zu Lübeck
1993	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1996	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
1997	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Arzt im Praktikum

0.11.1997	Medizinische Universität zu Lübeck
bis 31.05.1999	Medizinische Klinik I

Assistenzarzt

seit 01.06.1999	Medizinische Universität zu Lübeck
	Medizinische Klinik I