

**Aus dem Institut für Pharmakologie und Toxikologie  
der Universität Würzburg  
Leitung: Prof. Dr. Kristina Lorenz**

**Untersuchung von Markern für oxidativen Stress und  
DNA-Schäden bei arterieller Hypertonie**

**Inaugural - Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von  
Moritz Paul Kreutzmann  
aus Erfurt**

**Würzburg, November 2020**

**Referentin:** Prof. Dr. Helga Stopper

**Korreferent:** Prof. Dr. Christoph Wanner

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 11.06.2021

**Der Promovend ist Arzt**

Für Pete, der mich für die Medizin begeisterte

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Arterielle Hypertonie.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Sekundäre Hypertonieformen.....	4
1.1.1.1 Primärer Hyperaldosteronismus (PHA).....	5
1.1.1.2 Renale Hypertonie.....	5
1.1.1.3 Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom.....	6
1.1.2 Therapieresistente Hypertonie (TRH).....	7
<b>1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) .....</b>	<b>8</b>
1.2.1 Wirkungen von Angiotensin II.....	10
1.2.2 Wirkungen von Aldosteron.....	10
<b>1.3 Oxidativer Stress.....</b>	<b>11</b>
1.3.1 Bildung von ROS .....	11
1.3.2 Antioxidantien .....	13
1.3.3 Wirkungen von ROS .....	13
1.3.3.1 Physiologische Wirkung .....	14
1.3.3.2 Pathophysiologische Wirkung .....	14
1.3.4 Oxidativer Stress und arterielle Hypertonie .....	16
<b>1.4 DNA-Schäden und Krebs bei arterieller Hypertonie .....</b>	<b>17</b>
1.4.1 Oxidative Schäden der DNA.....	17
1.4.2 Rolle des RAAS bei der Krebsentstehung .....	19
1.4.3 Andere Mechanismen der Krebsentstehung bei arterieller Hypertonie.....	19
<b>1.5 Zielsetzung.....</b>	<b>21</b>
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>22</b>
<b>2.1 Material.....</b>	<b>22</b>
<b>2.2 Patientenrekrutierung .....</b>	<b>22</b>
<b>2.3 Datenerhebung.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4 Blutentnahme und -aufbereitung .....</b>	<b>24</b>
<b>2.5 Urinaufbereitung.....</b>	<b>25</b>
<b>2.6 <math>\gamma</math>-H2AX-Bestimmung .....</b>	<b>25</b>
2.6.1 Probenaufbereitung.....	26
2.6.2 Färbung.....	26
2.6.3 Auswertung.....	27

<b>2.7</b>	<b>Mikrokernfrequenztest</b> .....	<b>29</b>
2.7.1	Probenaufbereitung.....	31
2.7.2	Färbung und Auswertung.....	31
<b>2.8</b>	<b>Marker für oxidativen/ nitrosativen Stress im Plasma</b> .....	<b>33</b>
2.8.1	D-ROM.....	34
2.8.2	SHp.....	34
2.8.3	3-Nitrotyrosin.....	35
<b>2.9</b>	<b>Marker für oxidativen Stress im Urin</b> .....	<b>36</b>
2.9.1	15-F <sub>2t</sub> -Isoprostan.....	36
2.9.2	Malondialdehyd.....	37
2.9.3	8-oxodG.....	38
2.9.4	Kreatinin.....	39
<b>2.10</b>	<b>Statistische Auswertung</b> .....	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>42</b>
<b>3.1</b>	<b>Studienpopulation</b> .....	<b>42</b>
3.1.1	Gruppendefinition.....	42
3.1.2	Merkmale der Studienteilnehmer.....	43
<b>3.2</b>	<b>Marker für oxidativen Stress</b> .....	<b>49</b>
<b>3.3</b>	<b>Marker für DNA-Schäden</b> .....	<b>53</b>
<b>3.4</b>	<b>Korrelationsanalyse</b> .....	<b>55</b>
3.4.1	Korrelation mit Blutdruckwerten.....	55
3.4.2	Korrelation unter den Markern.....	55
3.4.3	Korrelation mit anderen klinischen Parametern.....	55
<b>3.5</b>	<b>Einflussfaktoren auf die Marker für oxidativen Stress und DNA-Schäden</b>	<b>58</b>
3.5.1	Alter.....	60
3.5.2	Nierenfunktion.....	60
3.5.3	Geschlecht.....	60
3.5.4	Stoffwechselfparameter.....	61
3.5.5	Begleiterkrankungen.....	61
3.5.6	Entzündung.....	62
3.5.7	Rauchen.....	63
3.5.8	Dipping.....	63
3.5.9	Statine.....	63
3.5.10	Sekundäre Hypertonie.....	63

3.5.11	Antihypertensiva.....	64
<b>3.6</b>	<b>Regressionsanalysen .....</b>	<b>65</b>
3.6.1	Regressionsanalysen der Marker für oxidativen Stress im Plasma .....	66
3.6.2	Regressionsanalysen der Marker für oxidativen Stress im Urin .....	67
3.6.3	Regressionsanalysen der Marker für DNA-Schäden .....	68
<b>3.7</b>	<b>Längsschnittanalyse .....</b>	<b>69</b>
3.7.1	Entwicklung der Marker im zeitlichen Verlauf .....	70
3.7.2	Entwicklung klinischer Parameter im zeitlichen Verlauf .....	71
3.7.3	Korrelationsanalyse der Veränderungen im zeitlichen Verlauf .....	72
<b>3.8</b>	<b>Ergebnissynopsis .....</b>	<b>73</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>75</b>
<b>4.1</b>	<b>Diskussion der Methodik .....</b>	<b>75</b>
4.1.1	Studiendesign.....	75
4.1.2	Statistische Verfahren .....	76
4.1.3	Wahl der Biomarker.....	77
<b>4.2</b>	<b>Oxidativer Stress und arterielle Hypertonie .....</b>	<b>78</b>
4.2.1	SHp.....	78
4.2.2	D-ROM .....	82
4.2.3	3-Nitrotyrosin.....	84
4.2.4	8-oxodG.....	87
4.2.5	Malondialdehyd .....	90
4.2.6	15-F <sub>2t</sub> -Isoprostan.....	92
4.2.7	Erhöhter oxidativer Stress bei arterieller Hypertonie.....	95
<b>4.3</b>	<b>DNA-Schäden und arterielle Hypertonie .....</b>	<b>100</b>
4.3.1	γ-H2AX.....	100
4.3.2	Mikrokernfrequenztest.....	104
4.3.3	Keine erhöhten DNA-Schäden bei arterieller Hypertonie.....	107
<b>4.4</b>	<b>Ausblick.....</b>	<b>109</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>111</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>113</b>
<b>7</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>131</b>

**Danksagung**

**Lebenslauf**

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
8-oxodG	8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosin
ABDM	Ambulantes Blutdruck-Monitoring
ACE	Angiotensin-konvertierendes Enzym
ANCOVA	Kovarianzanalyse
AT <sub>1</sub> R	Angiotensin II-Typ-1-Rezeptor
AT <sub>2</sub> R	Angiotensin II-Typ-2-Rezeptor
CBMN	cytokinesis-block micronucleus
Cl <sup>-</sup>	Chlor-Ion
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COX	Cyclooxygenase
CPAP	Continuous Positive Airway Pressure
D-ROM	derivative of reactive oxygen metabolite
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octan
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSB	Doppelstrangbruch
e <sup>-</sup>	Elektron
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFR	abgeschätzte (estimated) glomeruläre Filtrationsrate
EK	einkernige Zelle
FBS	Fetal Bovine Serum
Fe <sup>2+</sup>	zweiwertiges Eisen-Ion
FUP1	1. Follow-up
FUP2	2. Follow-up
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
GPx	Gluthationperoxidase

## Abkürzungsverzeichnis

---

GSH	Gluthation
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HypAll	Gruppe aller Hypertoniker
HypGut	Gruppe der gut eingestellten Hypertoniker
HypSch	Gruppe der schlecht eingestellten Hypertoniker
IsoP	Isoprostan
lg	dekadischer Logarithmus
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MDA	Malondialdehyd
mg	Milligramm
min	Minute
Mio.	Million
MK	Mikrokern
ml	Milliliter
MMS	Methylmethanesulfonate
MR	Mineralkortikoid-Rezeptor
MRT	Magnetresonanztomographie
MyStIC-Studie	Myocardial Sodium Content In Cardiac disease study
n	Fallzahl
NA	Nukleäre Anomalien
Na <sup>+</sup>	Natrium
NBLEB	nuclear bleb
NBUD	nuclear bud
NEAA	Non- Essential AminoAcid- Lösung
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
NO•	Stickstoffmonoxid



## Abkürzungsverzeichnis

---

NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
Nox	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat (NADPH)- Oxidase
O <sub>2</sub>	Sauerstoff
O <sub>2</sub> <sup>•-</sup>	Hyperoxid-Anionen
OCl <sup>-</sup>	Hypochlorid-Anion
•OH	Hydroxyl-Radikal
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit-Anionen
OSAS	obstruktives Schlafapnoe-Syndrom
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	phosphate buffered saline
PBST	phosphate buffered saline mit Tween
pg	Pikogramm
PHA	primärer Hyperaldosteronismus
r	Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNS	Reaktive Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehungen pro Minute
SH	Thiolgruppe
SOD	Superoxid-Dismutase
SSB	Einzelstrangbruch
TBA	Thiobarbitursäure
TBARS	Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen
TRH	Therapieresistente Hypertonie
Trx	Thioredoxin
U	Enzymeinheit
UKW	Universitätsklinikum Würzburg
V1	Erste Visite
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

## Abkürzungsverzeichnis

---

$\mu\text{M}$	Mikromolar
$\mu\text{mol}$	Mikromol

## 1 Einleitung

In epidemiologischen Studien konnte eine erhöhte Inzidenz an Tumorerkrankungen unter Patienten mit arterieller Hypertonie gefunden werden [1]. Insbesondere das Risiko ein Nierenzellkarzinom zu entwickeln ist um ca. das Doppelte erhöht [1-4]. Auch bei anderen Krebsentitäten wie dem Endometriumkarzinom [5], Prostatakarzinom [6] oder Mammakarzinom [7, 8] konnte die arterielle Hypertonie als Risikofaktor benannt werden. Die Aufklärung der biologischen Mechanismen des Zusammenhanges zwischen arterieller Hypertonie und Tumorerkrankungen ist Gegenstand aktueller Untersuchungen. Hierbei wird dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS), welches als hormoneller Mechanismus den Blutdruck reguliert, eine wichtige Rolle zugeschrieben. Daten aus molekularen, tierexperimentellen und klinischen Studien legen nahe, dass ein hochreguliertes RAAS unter anderem über die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) die Krebsentstehung und das Krebswachstum beeinflusst [9].

### 1.1 Arterielle Hypertonie

2008 waren etwa 40% der weltweiten Bevölkerung über 25 Jahren von arterieller Hypertonie betroffen [10], wobei die Prävalenz mit dem Lebensalter ansteigt. Sie ist der wichtigste kardiovaskuläre Risikofaktor und ursächlich für jährlich etwa 9,4 Mio. Tote [11]. In Tabelle 1.1 ist die Definition der arteriellen Hypertonie dargestellt.

**Tabelle 1.1: Definitionen der arteriellen Hypertonie. Modifiziert nach [12].**

Art der Blutdruck-Messung	Systolischer Blutdruck [mmHg]		Diastolischer Blutdruck [mmHg]
Praxis	≥140	und/oder	≥90
24-h	≥130	und/oder	≥80

Die beiden den Blutdruck bestimmenden Größen sind das Herzzeitvolumen und der Gefäßwiderstand. Eine arterielle Hypertonie ist Folge einer Erhöhung eines

der oder beider Faktoren. Zahlreiche Systeme im Körper nehmen Einfluss auf die Blutdruckregulation [13]. Für die kurzfristige Regulation sind vor allem vaskuläre und kardiale Pressorezeptoren zuständig, welche Blutdruckschwankungen detektieren und diesen über das autonome Nervensystem als efferentem Schenkel entgegenwirken. Die langfristige Blutdruckeinstellung erfolgt vor allem über die Kontrolle des Flüssigkeitshaushaltes und ist somit Aufgabe der Niere und endokriner Systeme wie des RAAS oder des antidiuretischen Hormons (ADH).

Bei nur ca. 10% aller Bluthochdruckpatienten lässt sich eine organische Ursache für die Blutdruckerhöhung finden (siehe 1.1.1). Bei 90% der Hypertoniker liegt demnach eine primäre/essentielle Hypertonie vor, bei der eine sekundäre Ursache nicht eruierbar ist. Sie ist eine multifaktorielle Erkrankung, welche aus einem Zusammenspiel von genetischen, pathophysiologischen und Umweltfaktoren entsteht [14]. Viele Hypertonie-begünstigende Faktoren sind dem modernen Lebensstil geschuldet. Ernährungsgewohnheiten mit hoher Kochsalz- und Kalorienzufuhr führen zu Insulinresistenz und Übergewicht. Stress, geringe körperliche Aktivität sowie hoher Alkohol- und Nikotinkonsum wirken sich ebenfalls negativ auf den Blutdruck aus [15].

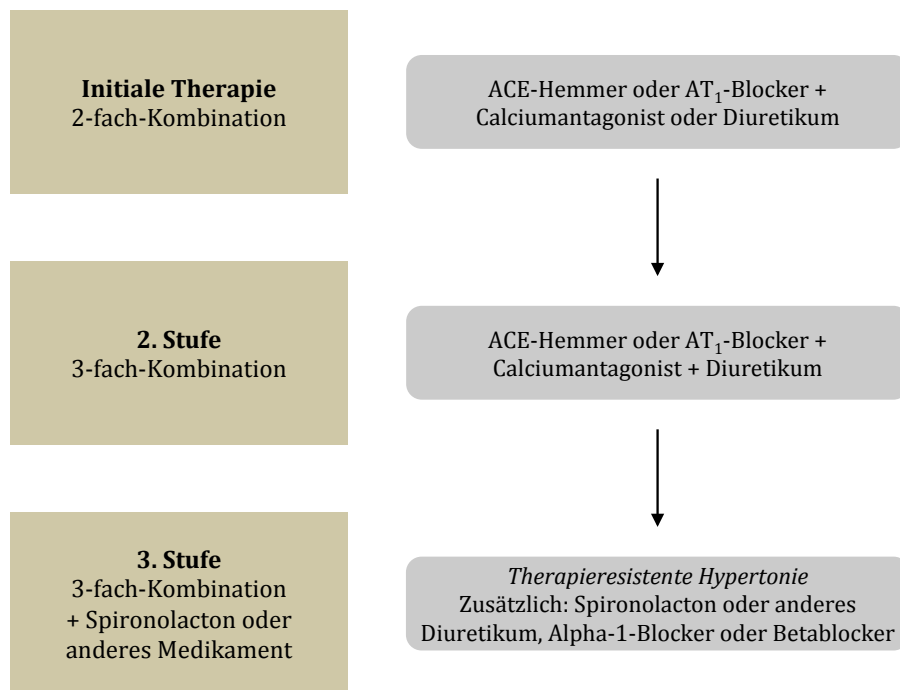
In der komplexen Pathophysiologie der Hypertonie spielen neben einem hochregulierten RAAS [16], einem erhöhten Sympathikotonus [17], renaler Dysfunktion [18], Inflammation und Aktivierung der Immunabwehr [19], auch Veränderungen in der Gefäßstruktur und -funktion eine Rolle. Zu diesen auch in anderen kardiovaskulären Erkrankungen ablaufenden Mechanismen gehören ein strukturelles Remodelling der Gefäßwand mit endothelialer Dysfunktion und Proliferation/Apoptose der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC), was zu Fibrose, erhöhter Steifigkeit und herabgesetzter Dehnbarkeit der Gefäße führt [20]. All diesen Prozessen liegt ein erhöhtes Vorkommen an ROS zugrunde [21] (siehe auch 1.3.4).

Die Erkrankung bleibt häufig zunächst asymptomatisch, von Patienten genannte Beschwerden können unter anderem sein: Schwindel, Kopfschmerzen, Palpitationen, Burstschmerzen, Belastungsdyspnoe [12]. Häufig wird eine arterielle Hypertonie erst durch Komplikationen klinisch auffällig. Hypertoniebedingte Endorganschäden sind am Herzen eine linksventrikuläre

Hypertrophie, eine koronare Herzkrankheit (KHK), ein Vorhofflimmern und eine Herzinsuffizienz, am Gehirn ein Schlaganfall und eine intrazerebrale Blutung, am Auge eine Retinopathie, an der Niere eine Proteinurie und Niereninsuffizienz, an den Gefäßen schließlich atherosklerotische Veränderungen mit Stenosen und Aneurysmata [22].

Die diagnostische Evaluation eines Hypertonie-Patienten sollte neben der Bestimmung des Schweregrades der Hypertonie eine mögliche sekundäre Hypertonieform sowie weitere kardiovaskuläre Risikofaktoren und Endorganschäden aufdecken. Zur Messung des Blutdrucks kommt die Messung in der Praxis, die ambulante 24-h-Blutdruckmessung (ABDM) und die häusliche Messung in Frage [12]. Dabei ist das ABDM in seiner Aussagekraft der Praxismessung überlegen [23].

Allgemeinmaßnahmen der Hypertonietherapie, die allesamt mit höchstem Evidenzgrad empfohlen werden, umfassen Veränderungen des Lebensstils [12, 24]. Dazu gehören eine Gewichtsnormalisierung, eine salz- und fettarme sowie obst- und gemüsereiche Diät, reduzierter Alkohol- und Nikotinkonsum sowie dynamisches Ausdauertraining. In der medikamentösen Therapie der Hypertonie gehören die folgenden fünf Medikamentenklassen zur ersten Wahl: Thiazid-Diuretika, Hemmer des Angiotensin-konvertierenden Enzyms (ACE), Angiotensin II-Typ-1-Rezeptor(AT<sub>1</sub>R)-Blocker, langwirksame Calciumantagonisten und Betablocker [25]. Als Initiierungstherapie kommt eine fixe 2-fach-Kombination mit jeweils der Möglichkeit zur stufenweisen Eskalation in Frage (siehe Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1: Allgemeines Schema der medikamentösen Behandlung der arteriellen Hypertonie.**

Eine Monotherapie sollte nur bei Patienten mit Grad-1-Hypertonie und niedrigem kardiovaskulären Risiko sowie bei Patienten  $\geq 80$  Jahren erwogen werden. Betablocker können bei bestimmten kardiologischen Indikationen (z.B. bei Zustand nach Myokardinfarkt) auf jeder Stufe hinzugenommen werden. Modifiziert nach [12].

### 1.1.1 Sekundäre Hypertonieformen

Wenn eine Hypertonie als Folge einer anderen Grunderkrankung entsteht, wird diese zu den sekundären Hypertonieformen gezählt. Sie machen etwa 10 % aller Hypertonien aus, unter den resistenten Hypertonien ist der Anteil noch höher [26]. Eine Evaluation auf sekundäre Hypertonieursachen sollte erfolgen bei klinischen oder anamnestischen Hinweisen, jungen Patienten, resistenter Hypertonie, plötzlichen Blutdruckveränderungen und unverhältnismäßig hohen Endorganschäden [27].

Die häufigsten Ursachen sind ein primärer Hyperaldosteronismus (PHA), eine renoparenchymatöse Erkrankung, eine Nierenarterienstenose und ein obstruktives Schlafapnoe-Syndrom (OSAS). Seltener tritt eine Hypertonie im Rahmen eines Phäochromozytoms oder eines Morbus Cushings auf [12].

#### **1.1.1.1 Primärer Hyperaldosteronismus (PHA)**

Beim PHA kommt es zu einer von Regelmechanismen entkoppelten, autonomen Aldosteron-Sekretion aufgrund eines Aldosteron-produzierenden Adenoms der Nebennierenrinde oder einer uni- oder bilateralen Hyperplasie der Zona glomerulosa. Entgegen früherer Annahmen ist ein PHA mit etwa 5-10 % die häufigste Ursache einer sekundären Hypertonie.

Nicht nur aufgrund der hohen Prävalenz und der guten Therapiemöglichkeiten, sondern auch wegen der im Vergleich zur essentiellen Hypertonie erhöhten kardiovaskulären Morbidität und Mortalität kommt der Erkennung eines PHA eine besondere Bedeutung zu [28] (siehe 1.2.2).

Neben der Hypertonie tritt bei etwa 30 % der Patienten eine Hypokaliämie auf. Patienten mit einem dreifach gemessenen Wert  $>150/100$  mmHg, mit einer resistenten Hypertonie, mit Hypertonie und spontaner Hypokaliämie, mit Hypertonie und Schlafapnoe, oder mit positiver Familienanamnese sollten mit Hilfe des Plasma-Aldosteron-Renin-Quotienten auf einen PHA gescreent werden. Einer positiven Screening-Untersuchung sollte ein Bestätigungstest in Form eines Kochsalzbelastungstests oder eines Fludrocortison-Hemmtests folgen. Die Bestimmung des zugrunde liegenden Subtyps erfolgt durch eine CT-Abdomen- und/oder Nebennierenvenenkatheter-Untersuchung.

Eine unilaterale Erkrankung kann mittels laparoskopischer Adrenaektomie, eine bilaterale Hyperplasie durch Mineralkortikoid-Rezeptor(MR)-Blocker behandelt werden [29].

#### **1.1.1.2 Renale Hypertonie**

Renale Ursachen einer Hypertonie sind zum einen renoparenchymatöse und zum anderen renovaskuläre Erkrankungen.

Zahlreiche Krankheiten führen zu einer Schädigung des Nierenparenchyms. Darunter fallen Glomerulonephritiden, polyzystische Nierenerkrankungen, tubulointerstitielle Erkrankungen, und vor allem auch die hypertensive und diabetische Nephropathie. Hinweise auf eine solche Erkrankung können renale Plasma- und Urin-Laborparameter geben. Bei Verdacht sollte eine renale

Ultraschalluntersuchung durchgeführt werden und eine detaillierte Abklärung der Nierenerkrankung erfolgen [12, 27].

Eine Nierenarterienstenose ist zumeist Folge arteriosklerotischer Veränderungen, bei etwa 10 % ist aber eine fibromuskuläre Dysplasie ursächlich. Klinische Hinweise können ein abrupter Beginn oder eine Verschlechterung einer Hypertonie, ein plötzlich auftretendes Lungenödem, abdominelle Strömungsgeräusche oder eine Verschlechterung der Nierenfunktion unter ACE-Hemmer- oder AT<sub>1</sub>R-Blocker sein. Als Screening-Verfahren eignet sich die Farbdopplersonographie. Die Diagnose kann mittels Spiral-CT, MRT-Angiographie und/oder intraarterieller digitaler Subtraktionsangiographie (i.a.-DSA) gesichert werden. Zur Behandlung wird vor allem Patienten mit fibromuskulärer Stenose eine perkutane transmurale Angioplastie (PTA) empfohlen, ansonsten erfolgt eine medikamentöse Einstellung [12, 30].

### **1.1.1.3 Obstruktives Schlafapnoe-Syndrom**

Das OSAS stellt eine schlafbezogene Atmungsstörung dar, bei der es im Schlaf zu einer Obstruktion der oberen Atemwege kommt, welche zu mindestens fünf länger als 10 s andauernden Atempausen pro h führt. Das OSAS führt zu Tagesmüdigkeit sowie kognitiven und affektiven Störungen und wird mit einem erhöhten kardiovaskulären Risiko in Verbindung gebracht. So wird dem OSAS eine unabhängige Rolle in der Hypertonie-Pathogenese zugeschrieben. Etwa 40 % der Hypertoniker haben ein OSAS und über 60 % der Patienten mit schwerem OSAS haben eine Hypertonie.

Die chronische Sympathikus-Aktivierung und reduzierte Barorezeptor-Sensitivität gelten als Mechanismen, die zur Entstehung einer Hypertonie bei OSAS beitragen. Zudem wird in gegenwärtigen Studien die Rolle des RAAS, von Inflammation, endothelialer Dysfunktion und oxidativem Stress untersucht.

Als Goldstandard der OSAS-Diagnostik zählt die Polysomnographie. Im ABDM zeigen sich vor allem erhöhte nächtliche systolische Blutdruckwerte [31].

Neben der Reduktion von Risikofaktoren wie Gewichtsnormalisierung und Verzicht auf Alkohol, Schlafmittel sowie andere apnoeverstärkende Medikamente hat sich die Anwendung einer Continuous Positive Airway Pressure (CPAP)-



Beatmung bei der Behandlung des OSAS als hilfreich erwiesen [32]. Inwiefern eine CPAP-Behandlung Einfluss auf die Reduzierung des Blutdrucks hat, ist abhängig von der Subgruppe und bedarf noch weiterer Studien. Bisher konnte gezeigt werden, dass eine CPAP-Behandlung bei Patienten mit resistenter Hypertonie oder unkontrollierten Blutdruckwerten eine moderate Blutdrucksenkung von 2-5 mmHg bewirkt. Ob das Risiko für die Entwicklung einer Hypertonie bei normo- oder prähypertensiven Patienten mit OSAS durch eine CPAP-Beatmung gesenkt werden kann, ist unklar [33].

### 1.1.2 Therapieresistente Hypertonie (TRH)

Eine Hypertonie wird als therapieresistent definiert, wenn ein Therapieregime aus Lebensstil-verändernden Maßnahmen und drei oder mehr adäquat dosierten Antihypertensiva verschiedener Klassen, darunter ein Diuretikum, ACE-Hemmer- oder AT<sub>1</sub>R-Blocker und Calciumantagonisten, den Blutdruck nicht unter 140/90 mmHg senkt [12]. Die TRH macht etwa 3-30 % der Hypertonien aus und ist mit einem hohen kardiovaskulären Risiko assoziiert [34].

Um eine TRH diagnostizieren zu können, müssen zum einen sogenannte Pseudoresistenzen ausgeschlossen und zum anderen potenziell reversible Lebensstil-assoziierte Ursachen identifiziert werden [35, 36].

**Tabelle 1.2: Aufführung von Pseudoresistenz-Ursachen sowie Lebensstil-assoziierten Hypertonie-Faktoren.**

Pseudoresistenzen	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nicht-Adhärenz bei der medikamentösen Therapie</li> <li>• Falsche Blutdruck-Messmodalitäten</li> <li>• Weißkittel-Hypertonie</li> <li>• Inadäquate antihypertensive Medikation</li> <li>• Begleitmedikation mit blutdrucksteigernder Wirkung (z.B. NSAR, orale Kontrazeptiva)</li> <li>• Pseudo-Hypertension bei Mediasklerose der Gefäße</li> </ul>
Lebensstil-assoziierte Faktoren	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Übergewicht</li> <li>• Alkohol- und Nikotinkonsum</li> <li>• Erhöhte diätische Salzzufuhr</li> </ul>

Da bei Patienten mit TRH die Prävalenz einer sekundären Hypertonie im Vergleich zur allgemeinen Hypertoniegruppe deutlich erhöht ist [34], muss zudem die Abklärung organischer Ursachen erfolgen (siehe 1.1.1). Z.B. lag in zwei Studien die

Prävalenz eines OSAS bei Patienten mit TRH mit etwa 80 % [36] doppelt so hoch wie bei kontrollierten Hypertonikern (siehe 1.1.1.3).

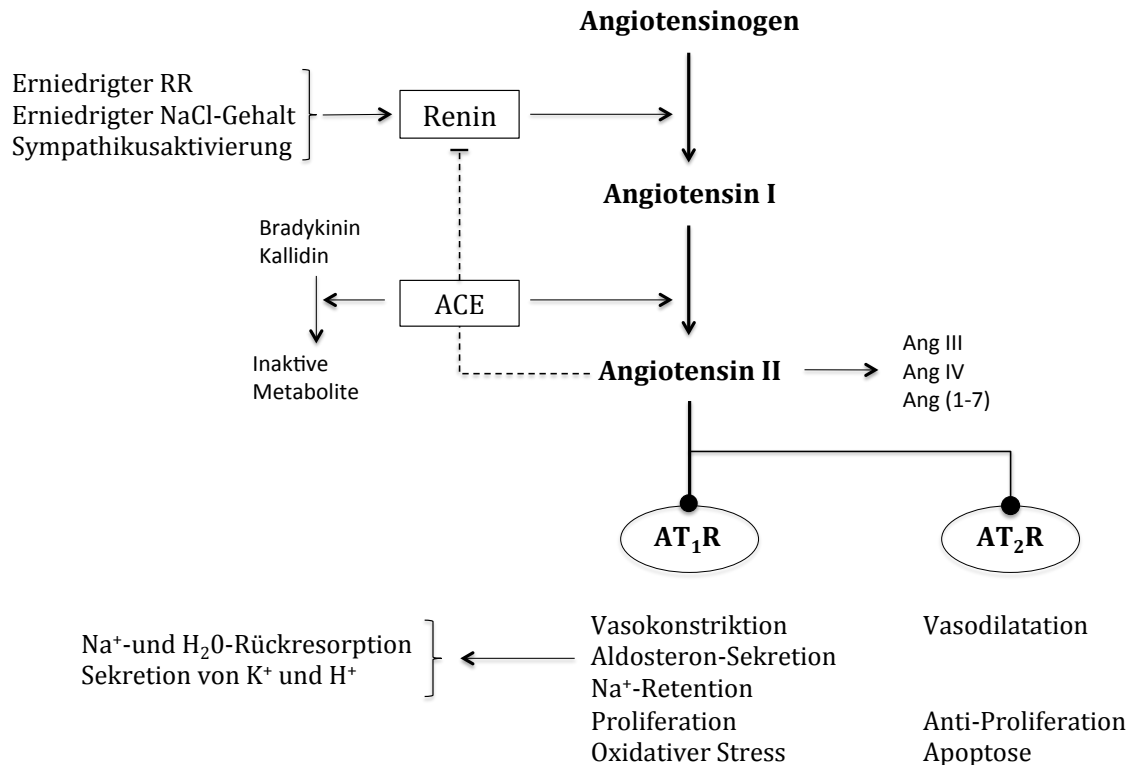
Lebensstil-verändernde Maßnahmen spielen auch in der Therapie der TRH eine wichtige Rolle (siehe 1.1.). Medikamentös kann eine Eskalation auf MR-Antagonisten, Alpha-1-Blocker, Schleifendiuretika sowie eine Dosissteigerung des Diuretikums erwogen werden [12]. Bereits geringe Dosen des MR-Antagonisten Spironolacton (25-50 mg/Tag) haben sich als wirksam erwiesen [37]. Alternative Behandlungsmethoden für ausgewählte Patienten mit TRH stellen die Barorezeptorstimulation und die minimal-invasive renale Denervation dar. Bei der renalen Denervation werden durch einen über die Arteria femoralis in die Arteria renalis eingebrachten Katheter die dortigen sympathischen Nervenfasern verödet. Die Barorezeptorstimulation, bei der durch einen chirurgischen Eingriff Elektroden an den Karotissinus angebracht werden, führt zu einer Senkung der sympathischen Aktivität und dadurch zu einer signifikanten Blutdrucksenkung. Beide Methoden werden bislang nicht als routinemäßige Therapien empfohlen, da es noch weiterer klinischer, insbesondere randomisierter kontrollierter Studien bedarf, um deren Sicherheit und Effizienz beurteilen zu können [12, 38].

### **1.2 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)**

Das RAAS nimmt im menschlichen Organismus eine zentrale Rolle bei der Regulation von arteriellem Blutdruck, Elektrolyt- und Flüssigkeitshaushalt ein (siehe Abbildung 1.2).

Zu Beginn der hormonellen Kaskade steht die Produktion von Renin aus Prorenin. Renin wird in den juxtaglomerulären Nierenzellen gespeichert und bei Abfall des Blutdrucks, Salz- oder  $\beta_1$ -Adrenorezeptoren-vermittelter Sympathikusaktivität in den systemischen Kreislauf abgegeben [39]. Renin spaltet Angiotensinogen, welches hauptsächlich von der Leber konstitutiv sekretiert wird und somit mit stabilem Plasmaspiegel vorliegt, zu Angiotensin I [40]. Das biologisch inaktive Angiotensin I wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) zu Angiotensin II gespalten. Das ACE kommt vor allem in den endothelialen Zellen der Lunge vor und ist neben der Umwandlung von Angiotensin I zu Angiotensin II auch in der Lage die vasodilatatorisch wirksamen

Peptide Bradykinin und Kallidin in inaktive Metabolite zu spalten [41]. Aus Angiotensin II können weitere Peptide wie Angiotensin III, Angiotensin IV oder Angiotensin (1-7) abgespalten werden, deren Effekte Bestandteil gegenwärtiger Untersuchungen sind [42].



**Abbildung 1.2: Vereinfachte Darstellung des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems.**

Angiotensinogen wird durch Renin zu Angiotensin I gespalten. Angiotensin I wird durch das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) zu Angiotensin II umgewandelt. Angiotensin II entfaltet seine Wirkung v.a. über die Bindung an den Angiotensin II-Typ-1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R). Es kann auch mit anderen teils antagonistisch wirkenden Angiotensin II-Rezeptoren interagieren und zu weiteren Angiotensin-Metaboliten umgesetzt werden. Modifiziert nach [39].

Als Haupteffektor des RAAS wirkt Angiotensin II vor allem über den Angiotensin II-Typ-1-Rezeptor (AT<sub>1</sub>R). Vasokonstriktion, Stimulation der Aldosteron-Sekretion, Erhöhung der Natriumreabsorption sowie negative Rückkopplung bezüglich der Renin-Sekretion sind physiologische AT<sub>1</sub>R-vermittelte Effekte von Angiotensin II [39]. Pathologische, ebenfalls über diesen Rezeptor vermittelte Prozesse sind

Zellwachstum, Inflammation und oxidativer Stress [43]. Über den Angiotensin II-Typ-2-Rezeptor (AT<sub>2</sub>R) werden gegenregulierende Prozesse herbeigeführt [41].

Aldosteron ist ebenfalls an der Regulation des Blutdrucks beteiligt, indem es im distalen Tubulus und Sammelrohr die Rückresorption von Natriumionen und Wasser sowie die Ausscheidung von Kaliumionen und Protonen steigert [44].

Neben dem klassischen RAAS existieren auch lokale RAAS in z.B. der Niere, dem Gehirn und dem Herzen [41, 45], sodass in diesen Organen Angiotensin II in deutlich erhöhter Konzentration vorliegen kann [46].

Ein im Übermaß aktiviertes RAAS wird mit zahlreichen kardiovaskulären und renalen Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dies wird durch die protektive Wirkung einer medikamentösen RAAS-Blockade deutlich [47-49].

### **1.2.1 Wirkungen von Angiotensin II**

Der AT<sub>1</sub>R gehört zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Die Bindung von Angiotensin II aktiviert zahlreiche intrazelluläre Signalwege [50], welche die in Abbildung 1.2 dargestellten Effekte zur Folge haben.

Unter anderem wird die Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat-Oxidase (Nox) durch Angiotensin II aktiviert, welche durch Bildung von ROS zur Entstehung von oxidativem Stress beiträgt. Die Nox wird zum einen auf einem direkten Weg durch Vereinfachung der Komplexbildung der Untereinheiten, z.B. durch Proteinkinase-C-vermittelte Phosphorylierung von p47<sup>pbox</sup>, zum anderen über die Expressionssteigerung von Untereinheiten wie p67<sup>pbox</sup> oder Nox1 aktiviert [51, 52].

In erhöhten Konzentrationen trägt Angiotensin II zur Entstehung und Aufrechterhaltung zahlreicher Erkrankungen wie arterieller Hypertonie, linksventrikulärer Hypertrophie, Arteriosklerose oder Diabetes mellitus bei [42].

### **1.2.2 Wirkungen von Aldosteron**

Das Steroidhormon Aldosteron wird in der Nebennierenrinde produziert und bei Stimulation durch Angiotensin II, Kaliumionen oder Adrenocorticotropin (ACTH) ausgeschüttet [53]. Neben Angiotensin II ist es der Haupteffektor des RAAS (siehe 1.2).

Aldosteron bindet im Zytoplasma an den Mineralkortikoid-Rezeptor (MR) und bildet den Aldosteron-Rezeptor-Komplex. Zum einen entfaltet dieser seine Wirkung, indem er in den Zellkern transloziert und dort die Expression von Proteinen wie dem epithelialen Natriumkanal (ENaC) oder der Natrium-Kalium-ATPase initiiert. Zum anderen führt der Aldosteron-Rezeptor-Komplex zu schnellen, nicht-genomischen, über sekundäre Messenger vermittelten Reaktionen [54]. Dazu gehören Signalkaskaden, die oxidativen Stress, Inflammation, Fibrose und Proliferation zur Folge haben [55]. Aldosteron-induzierter oxidativer Stress wird u.a. wie bei Angiotensin II durch die Aktivierung der Nox verursacht [56]. Zudem sorgt Aldosteron für erhöhten oxidativen Stress, indem es die NO-Synthase aktiviert und eine verminderte Expression von Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PD), welche  $\text{NADP}^+$  zu NADPH reduziert, einleitet [44].

Die Folgen erhöhter Aldosteron-Konzentrationen lassen sich an Patienten mit PHA beobachten. Beim PHA lassen sich schwerwiegendere kardiovaskuläre, renale und metabolische Komplikationen feststellen als in Geschlechts-, Alter- und Blutdruckangepassten Vergleichsgruppen [57, 58]. Zum Beispiel ließen sich eine deutlich stärker ausgeprägte linksventrikuläre Hypertrophie [59] und myokardiale Fibrose [60] bei PHA-Patienten als bei Patienten mit essentieller Hypertonie mit vergleichbar erhöhten Blutdruckwerten finden. Aus klinischen Studien, in denen MR-Antagonisten zum Einsatz kamen, lassen sich weitere Hinweise für die direkte Aldosteron-Wirkung ableiten. So konnte in der RALES-Studie eine Morbiditäts- und Mortalitätssenkung bei Patienten mit schwerer Herzinsuffizienz durch die Einnahme von MR-Antagonisten beobachtet werden [61].

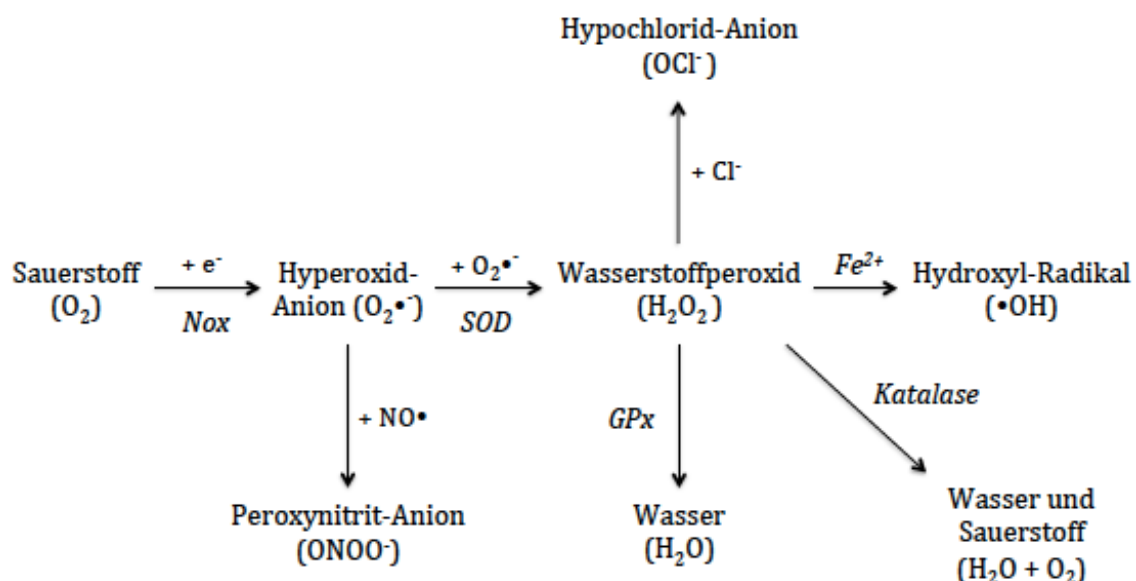
### **1.3 Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress beschreibt den Zustand eines Systems, in dem Oxidantien im Vergleich zu Antioxidantien im Überschuss vorliegen. Dieses Ungleichgewicht ist Folge von vermehrter Bildung von ROS und/oder reduzierten antioxidativen Abwehrmechanismen [62].

#### **1.3.1 Bildung von ROS**

ROS bilden eine Einheit chemisch hochreaktiver Moleküle und lassen sich in zwei Gruppen einteilen: freie Radikale, stark reaktiv und kurzlebig, wie das Hydroperoxid-

Anion ( $O_2^{\bullet-}$ ) oder das Hydroxyl-Radikal ( $\bullet OH$ ), und nicht-radikale Sauerstoff ( $O_2$ )-Derivate, weniger reaktiv und stabiler, wie Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) oder Peroxynitrit-Anionen ( $ONOO^-$ ). Sie entstehen als Redox-Zwischenprodukte auf dem Weg von  $O_2$  zu Wasser ( $H_2O$ ) [63] (siehe Abbildung 1.3). Neben  $O_2^{\bullet-}$  ist Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ ) das wichtigste Radikal in biologischen Prozessen.  $NO^{\bullet}$  gehört zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS) und wird vor allem durch die Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) hergestellt [64].



**Abbildung 1.3: Vereinfachte Darstellung der ROS-Bildung.**

Ausgehend von Sauerstoff ( $O_2$ ) entstehen vermittelt durch Enzyme wie die NADPH-Oxidase (*Nox*) durch Aufnahme von Elektronen ( $e^-$ ) Hyperoxid-Anionen, welche durch die Superoxid-Dismutase (*SOD*) zu Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) abgebaut werden oder mit Stickstoffmonoxid ( $NO^{\bullet}$ ) zum Peroxynitrit-Anion weiterreagieren.  $H_2O_2$  kann mit einem Chlor-Ion ( $Cl^-$ ) das Hypochlorid-Anion ( $OCl^-$ ) und in der Fenton-Reaktion mit einem zweiwertigen Eisen-Ion ( $Fe^{2+}$ ) das Hydroxyl-Radikal ( $\bullet OH$ ) bilden. Zudem können die Enzyme Gluthationperoxidase (*GPx*) und Katalase  $H_2O_2$  zu Wasser ( $H_2O$ ) und  $O_2$  konvertieren. Modifiziert nach [65].

Die ROS-Produktion wird durch endogene und exogene Prozesse verursacht. Zu den exogenen Quellen gehören u.a. ionisierende Strahlungen, UV-A-Strahlung und Zytostatika. Endogene Quellen umfassen z.B. die mitochondriale Atmungskette und diverse inter- und intrazelluläre Signalwege wie über die *Nox* [66].

### 1.3.2 Antioxidantien

Zu den Abwehrmechanismen gegenüber freien Radikalen gehören zum einen antioxidativ-wirkende Enzyme wie die Superoxid-Dismutase (SOD), die Gluthation-Peroxidase (GPx), das Thioredoxin (Trx) und die Katalase, und zum anderen nicht-enzymatische Antioxidantien wie Gluthation (GSH), Karotinoide und Vitamin A und E [67].

GSH ist dabei der bedeutendste Regulator der intrazellulären Redox-Homöostase. Es ist ein Tripeptid und bildet mit der Thiolgruppe des Cysteins den größten Thiol-Pool im menschlichen Organismus. An dieser Thiolgruppe kann es reversibel oxidiert werden, sodass es im reduzierten Zustand (GSH) als Monomer und im oxidierten Zustand (GSSG) als Dimer vorliegt. Unter normalen Redox-Bedingungen liegt GSH in deutlich höheren Konzentrationen als GSSG vor, bei oxidativem Stress kann sich dieses Verhältnis schnell umkehren. GSH entfaltet seine protektive Wirkung als 1. direkter Radikalfänger von  $\bullet\text{OH}$  und  $\text{O}_2\bullet$ ; 2. Substrat der GPx bei der Entgiftung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder Lipid-Hydroperoxiden; 3. Regenerator der aktiven Formen von Vitamin C und E [68].

Trx ist ein ubiquitär vorkommendes antioxidativ-wirksames Enzym, welches als Oxidoreduktase oxidierte Proteine reduziert. Trx verwendet sein u.a. aus Cystein bestehendes aktives Zentrum, um die Disulfidbrücke im oxidierten Substrat zu brechen. Das oxidierte Trx wird dann durch die Trx-Reduktase in die reduzierte Form zurückgeführt [69].

Die freien Thiolgruppen in Proteinen (SHp) können als Maß des antioxidativen Potenzials mit Hilfe des SHp-Tests im Plasma bestimmt werden (siehe 2.8.2).

### 1.3.3 Wirkungen von ROS

ROS haben aufgrund ihres ungepaarten Valenzelektrons die Eigenschaft mit umliegenden Molekülen rege zu reagieren. ROS spielen eine entscheidende Rolle in sowohl physiologischen als auch pathophysiologischen Prozessen. Langanhaltende hohe ROS-Konzentrationen können zu Schäden an Lipiden, Membranen, Proteinen, RNA und DNA führen, niedrige oder intermediäre Konzentrationen entfalten ihre Wirkung v.a. bei der Signaltransduktion [65].

### **1.3.3.1 Physiologische Wirkung**

ROS beteiligen sich bei der Redox-Regulation zahlreicher physiologischer Prozesse. Sie übernehmen eine wichtige Funktion in diversen Signaltransduktionskaskaden im Sinne eines sekundären Botenstoffs. Z.B. aktivieren ROS verschiedene Transkriptionsfaktoren wie den nukleären Transkriptionsfaktor Nrf2 (nuclear factor erythroid 2-related factor), welcher die Expression von zellulären antioxidativen Proteinen fördert [70], oder NF- $\kappa$ B, welcher Chemokine, Immunrezeptoren, Adhäsionsmoleküle, Regulatoren der Apoptose und des Zellzyklus als Zielgene aktiviert [71].

ROS sind auch an der Immunabwehr beteiligt. Beim oxidativen Burst der neutrophilen Granulozyten und Makrophagen werden durch die Nox große Mengen ROS produziert um phagozytierte Fremdkörper zu zerstören. Weiterhin sind ROS bei der Regulierung der NO-Produktion und des Vasotonus sowie bei der intrazellulären O<sub>2</sub>-Messung beteiligt [67, 72].

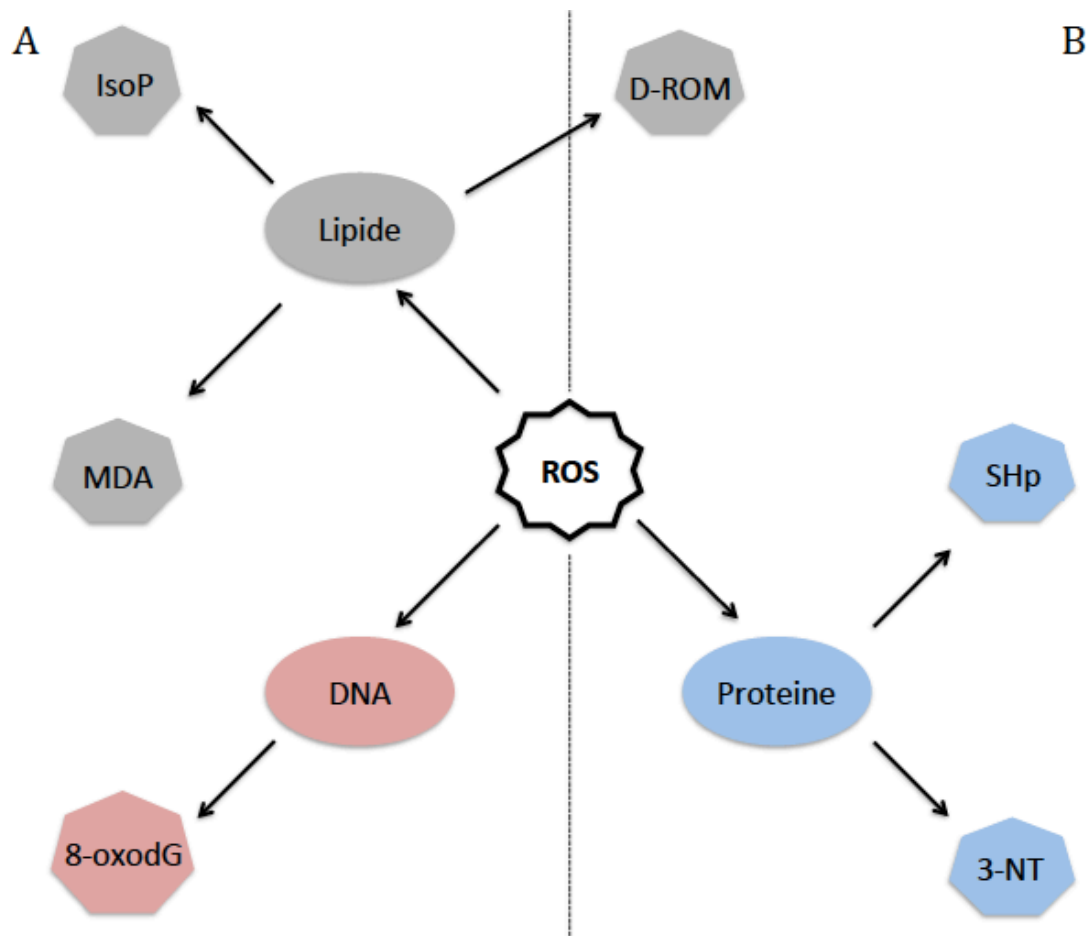
### **1.3.3.2 Pathophysiologische Wirkung**

In erhöhter Konzentration schädigen ROS zahlreiche Biomoleküle (siehe Abbildung 1.4) und tragen so zur Entstehung von vor allem altersbedingten Krankheiten wie Arteriosklerose, Tumoren und Neurodegeneration bei [73].

Protein-Schäden entstehen entweder direkt durch ROS oder indirekt durch oxidativ veränderte Moleküle wie Kohlenhydrate oder Aldehyde. Wenn ROS das Protein-Rückgrat angreifen, kann es über die Bildung von Hydroperoxiden zur Protein-Fragmentierung kommen. Zudem können ROS mit den Aminosäuren-Seitenketten reagieren. Die Aminosäuren Histidin, Leucin, Methionin, Cystein, Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan sind am empfänglichsten für oxidativen Stress. Dabei sind nur die oxidativen Veränderungen der schwefelhaltigen Aminosäuren reversibel. Wenn der aromatische Ring freier oder Protein-gebundener Tyrosine von RNS angegriffen wird, bildet sich 3-Nitrotyrosin, welches im Plasma gemessen werden kann (siehe 2.8.3).

Die Proteinschäden führen zu Funktionsverlust, veränderter Proteinexpression und Aggregatbildung [74].





**Abbildung 1.4: Übersicht über die Entstehung ausgewählter Biomarker oxidativen Stresses.**

A: Nachweis im Urin. B: Nachweis im Plasma. Durch Nitrierung von Tyrosin entsteht 3-Nitrotyrosin (3-NT). Als Antioxidantien-Marker werden die freien Thiolgruppen in Proteinen (SHp) gemessen. Marker der Lipidperoxidation sind Malondialdehyd (MDA) und Isoprostan (IsoP). „Derivatives of reactive oxygen metabolites“ (D-ROM) werden als Nachweis von Hydroperoxiden in v.a. Lipiden herangezogen. Biomarker für oxidative DNA-Modifikationen ist 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosin (8-oxodG). Modifiziert nach [75] und [76].

ROS mit der höchsten Lipid-schädigenden Wirkung sind  $\bullet\text{OH}$  und  $\text{O}_2\text{-}\bullet$ . Sie greifen Lipide mit Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen, vor allem also mehrfach ungesättigte Fettsäuren, an, indem sie diesen ein Proton entziehen und im Verlauf Fettsäure-Radikale und -Hydroperoxide entstehen lassen. Dieser als Lipidperoxidation bezeichnete Prozess verläuft in drei Schritten: 1. Initiation: Oxidantien entziehen einer Fettsäure ein Proton, sodass ein Fettsäure-Radikal entsteht. 2. Prolongation: das Fettsäure-Radikal reagiert mit  $\text{O}_2$  zum Fettsäure-Peroxyradikal, welches ein Proton eines weiteren Fettsäuremoleküls aufnimmt.

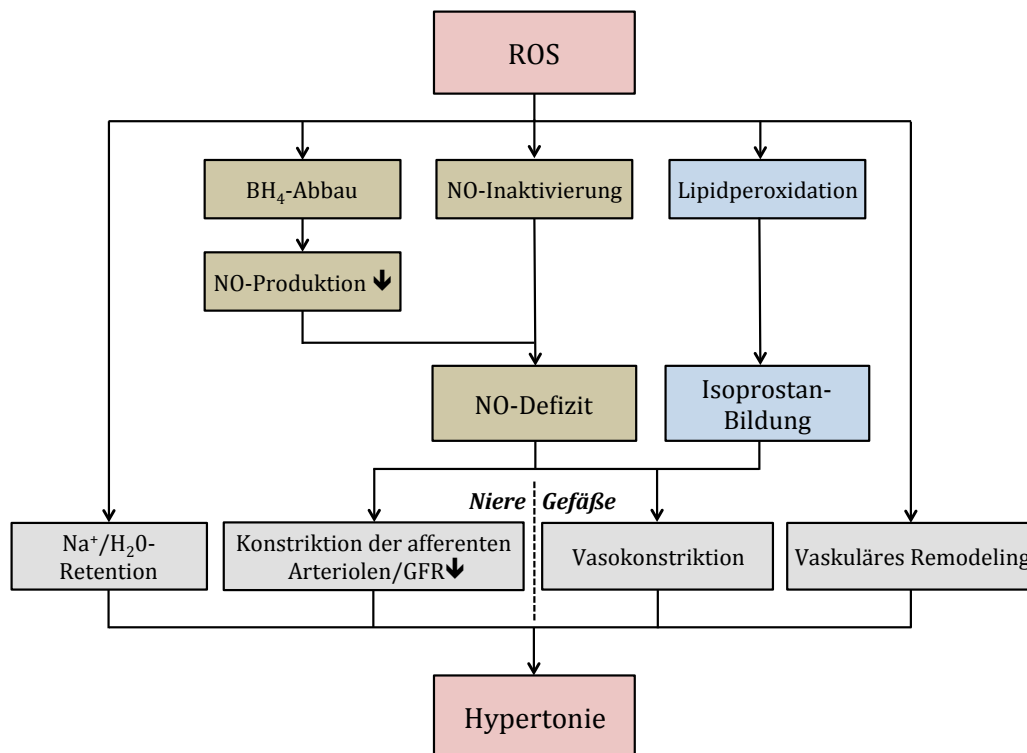
Dadurch entsteht zum einen ein Fettsäure-Hydroperoxid und zum anderen ein neues Fettsäure-Radikal. Eine Kettenreaktion wird in Gang gesetzt. 3. Termination: Wenn die Radikale durch Antioxidantien abgefangen werden, endet die Reaktion. Das häufigste Endprodukt sind Fettsäure-Hydroperoxide. Diese induzieren weitere oxidative Schäden und machen einen Großteil der im Plasma nachweisbaren „derivatives of reactive oxygen metabolites“ (D-ROM) aus (siehe 2.8.1) [77]. Weitere Endprodukte der Lipidperoxidation sind die Isoprostane, welche im Urin detektierbar sind (siehe 2.9.1).

Als sekundäre Produkte der Lipidperoxidation entstehen hochreaktive Aldehyde wie das im Urin nachweisbare MDA (siehe 2.9.2) oder 4-Hydroxynonenal. Die kontinuierliche oxidative Schädigung von Fettsäuren mit ihrer Fragmentierung und Aldehyd-Bildung führt zu Verlust der Membranintegrität und begünstigt so zahlreiche pathophysiologische Prozesse [78].

Besonders weitreichende Folgen können durch oxidativen Stress verursachte DNA-Schäden haben (siehe 1.4.1). Sie werden mit Altern, Karzinogenese und kardiovaskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht [79, 80].

### **1.3.4 Oxidativer Stress und arterielle Hypertonie**

Oxidativer Stress ist die Basis zahlreicher pathophysiologischer Abläufe, welche die Entwicklung einer arteriellen Hypertonie begünstigen. Umgekehrt führt die arterielle Hypertonie u.a. durch die direkte mechanische Beanspruchung der Gefäße und Organe zu mehr oxidativem Stress. Diese wechselseitige Beeinflussung wird durch inflammatorische Prozesse moduliert, indem ROS z.B. über die Aktivierung von NF- $\kappa$ B die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine induzieren, welche die Einwanderung von Leukozyten hervorruft. Diese können den oxidativen Stress wiederum durch eigene ROS-Produktion und Aktivierung des lokalen RAAS mit Freisetzung von Angiotensin II verstärken [81]. Die durch oxidativen Stress zu Hypertonie führenden Prozesse finden im Gehirn, den Nieren und den Gefäßen statt und sind in Abbildung 1.5 dargestellt.



**Abbildung 1.5: Einfluss oxidativen Stresses auf die Entstehung von arterieller Hypertonie.**

ROS provozieren über eine direkte Inaktivierung von NO ( $\text{NO} + \text{O}_2 \cdot \rightarrow \text{ONOO}^-$ ) und einer verminderten NO-Produktion durch Abbau des NOS-Kofaktors Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) ein NO-Defizit. Dieses hat einen erhöhten Gefäßtonus zur Folge, welcher am Vas afferens der Niere zur Reduktion der glomerulären Filtrationsrate (GFR) führt. Auch die durch Lipidperoxidation entstandenen Isoprostane tragen zur Vasokonstriktion bei. An der Niere führen ROS über verschiedene Mechanismen wie z.B. der durch ROS veränderten Aktivität von  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPasen und  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher im proximalen Tubulus zur Retention von Natrium und Wasser. In den Gefäßen begünstigen ROS das Remodeling durch Induktion von Hypertrophie der glatten Gefäßmuskelzellen (VSMC) und Fibrose. Modifiziert nach [81] und [82].

## 1.4 DNA-Schäden und Krebs bei arterieller Hypertonie

DNA-Schäden können die Folge erhöhten oxidativen Stresses sein und bei Akkumulation Krebs hervorrufen. Einem hochaktiven RAAS wird dabei neben anderen Mechanismen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung von DNA-Schäden bei arterieller Hypertonie zugeschrieben.

### 1.4.1 Oxidative Schäden der DNA

Es sind über 100 oxidative DNA-Modifikationen bekannt. Dazu zählen Einzel- und Doppelstrangbrüche, DNA-Quervernetzungen sowie Veränderungen von Purin-

und Pyrimidin-Basen und der Desoxyribose [83]. Chronisch erhöhte ROS-Level führen, wenn die Kapazität der DNA-Reparaturmechanismen überschritten wird, zur Akkumulation von DNA-Schäden. Bleiben diese unrepariert, ist eine genomische Instabilität mit der möglichen Entwicklung von u.a. Karzinomen die Folge [84].

Die häufigsten oxidativen DNA-Modifikationen betreffen die Nukleinbasen. Es sind über 20 verschiedene Basenmodifikationen bekannt, wobei das 8-Oxo-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosin (8-oxodG) auch aufgrund seiner vergleichbar einfachen Nachweisbarkeit am besten untersucht ist (siehe 2.9.3). Es entsteht durch Addition eines •OH an der C8-Position des Guaninrings. Unter physiologischen Bedingungen liegt die entstandene Sauerstoff-Kohlenstoff-Bindung überwiegend in ihrer Keto-Form als 8-oxodG statt in ihrer Enol-Form als 8-Hydroxy-7,8-Dihydro-2'-Deoxyguanosin (8-OHdG) vor. 8-oxodG ist hoch mutagen, da es mit Adenin statt mit Cytosin eine Basenpaarung eingeht [85]. Wenn A:8-oxodG-Fehlpaarungen nicht repariert werden, folgen G:C->T:A-Transversionen, welche auch häufig in veränderten Genen von Tumoren gefunden werden [86].

Die Bildung von Einzelstrangbrüchen (SSB) durch ROS erfolgt deutlich häufiger als die von Doppelstrangbrüchen (DSB). Ausgangspunkt ist zumeist der •OH-vermittelte Protonenentzug an C3-, C4- oder C5-Position der 2'-Deoxyribose. Ein SSB entsteht dann entweder direkt durch den Zerfall des oxidierten Zuckers oder indirekt während der Basenexzisionsreparatur (BER) von oxidierten oder anderweitig geschädigten Basen [87, 88].

DSB sind die schwerwiegendste Form oxidativ induzierter DNA-Schäden, da sie bereits in geringer Anzahl zu schweren Mutationen und Chromosomenaberrationen oder auch zum Zelltod führen können. Ein DSB kann z.B. entstehen, wenn sich zwei SSB nahe beieinander an gegenüberliegenden Strängen bilden, eine Topoisomerase an die gegenüberliegende Seite eines SSB bindet oder ein ROS-induzierter DNA-Schaden mit der DNA-Replikation oder -Transkription interferiert. DSB lassen sich durch den immunzytochemischen Nachweis von phosphoryliertem Histon H2AX ( $\gamma$ -H2AX) quantifizieren (siehe 2.6) [84]. Nicht reparierte DSB können zur Bildung von Chromosomenfragmenten

führen, welche als Mikrokerne (MK) in der Fluoreszenzmikroskopie sichtbar sind (siehe 2.7) [89].

Weitere komplexe oxidative DNA-Läsionen wie Tandem-Basen-Modifikationen, DNA-Protein- und Intra- und Interstrang-Verknüpfungen werden von Cadet [90] ausführlich beschrieben.

### **1.4.2 Rolle des RAAS bei der Krebsentstehung**

Es ist bekannt, dass die arterielle Hypertonie mit einem hochregulierten RAAS mit dem Vorkommen von Tumorerkrankungen assoziiert ist. Neueste Erkenntnisse legen nahe, dass das RAAS einen zugrundeliegenden Signalweg für die mechanistische Verknüpfung von arterieller Hypertonie und Nierenzellkarzinomen darstellt [91]. So ergab die Analyse von Polymorphismen von in die Blutdruckregulation involvierten Genen eine Assoziation von Varianten des Angiotensinogen-Gens und des AT<sub>1</sub>R-Gens mit einem erhöhten Nierenzellkarzinom-Risiko. Dieses war bei Patienten mit arterieller Hypertonie nochmals höher [91, 92].

In den Zusammenfassungen von George et al. [9] und Ager et al. [93] werden zudem tumorbegünstigende Mechanismen des lokalen RAAS beschrieben, welche vor allem auf die AT<sub>1</sub>R-vermittelte Wirkung von Angiotensin II beruhen. Dazu zählen die Förderung (1) der Angiogenese z.B. durch eine erhöhte Expression vom Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), (2) der Zellproliferation u.a. über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B und (3) inflammatorischer Prozesse über die Bildung von ROS. Tierstudien an Mäusen konnten eine von der applizierten Angiotensin II-Dosis abhängige DNA-Schädigung in Herz und Niere nachweisen [94], wobei auch dem Aldosteron eine synergistische Wirkung zugeschrieben werden konnte [95].

### **1.4.3 Andere Mechanismen der Krebsentstehung bei arterieller Hypertonie**

Neben einem hochregulierten RAAS wurden auch andere biologische Mechanismen beschrieben, um den Zusammenhang zwischen arterieller Hypertonie und der Entstehung von Tumorerkrankungen zu erklären. Hamet [96] gibt an, dass Veränderungen im Apoptoseprozess, welche bei arterieller Hypertonie beobachtet werden, zur Tumorentstehung beitragen könnten, da eine

reduzierte Apoptose zu einem übermäßigen Zellwachstum führen kann. Eine antiapoptotische Wirkung kann zum Beispiel durch die Aktivierung vom AT<sub>1</sub>R entfaltet werden [97].

Eine erhöhte Zufuhr von Kochsalz mit der Nahrung führt zu arterieller Hypertonie [98] und könnte laut einer Kohortenstudie von Deckers et al. [99] eine Rolle bei der Entstehung von Nierenzellkarzinomen spielen. Djamgoz [100] behauptet, dass die erhöhte extrazelluläre Natriumkonzentration nicht nur Einfluss auf die Entwicklung von Nierenzellkarzinomen hat, sondern generell in Tumorzellen das Metastasierungspotenzial fördert. Dies sei die Folge der in Tumorzellen hochregulierten Expression von spannungsgesteuerten Natriumkanälen (VGSC), welche einen erhöhten Natriumeinstrom begünstigen und damit die intrazelluläre Ionenhomöostase verändern und die Zellmotilität beeinflussen [101].

Der Lipidperoxidation (siehe auch 1.3.3.2) und ihrer DNA-schädigenden Endprodukte wird eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von Tumorerkrankungen zugesprochen [102]. Sowohl in hypertensiven Patienten als auch in Nierenzellkarzinomen bzw. geschädigten renalen Tubuli konnte eine erhöhte Lipidperoxidation nachgewiesen werden, sodass darin ein möglicher Signalweg gesehen wird [103].

Risikofaktoren, welche konfundierend auf den Zusammenhang von arterieller Hypertonie und Tumorerkrankungen einwirken könnten, da sie beide Erkrankungen begünstigen, sind Rauchen, Alter, Übergewicht, Diabetes mellitus und Alkoholkonsum [1]. Auch wurde diskutiert, ob Antihypertensiva, insbesondere Diuretika, selbst die Entwicklung von Nierenzellkarzinomen hervorrufen. Jüngste Studien legen jedoch nahe, dass eher der erhöhte Blutdruck als die Medikation verantwortlich ist [104-106].

### 1.5 Zielsetzung

In dieser Studie wurde die Verbindung zwischen arterieller Hypertonie, oxidativem Stress und DNA-Schäden als Risikofaktor für Tumorerkrankungen untersucht. Hierfür wurden aus Blut- und Urinproben von Hypertonikern und gesunden Kontrollpersonen folgende Biomarker quantifiziert:

*Marker für systemischen oxidativen Stress:*

- im Plasma: SHp, D-ROM und 3-Nitrotyrosin
- im Urin: 8-oxodG, 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan und Malondialdehyd

*Marker für DNA-Schäden in Lymphozyten:*

- $\gamma$ -H2AX
- Mikrokernfrequenztest

Es erfolgte der Vergleich beider Gruppen mit der Frage, ob Hypertoniker mehr systemischen oxidativen Stress und DNA-Schäden als die Kontrollpersonen aufweisen. Auch wurde untersucht, ob sich gut und schlecht eingestellte Hypertoniker hinsichtlich der Ausprägung der Biomarker unterscheiden.

Im Weiteren wurden mögliche klinische Einflussfaktoren auf die untersuchten Biomarker und deren Entwicklung im zeitlichen Verlauf analysiert.

Die Ergebnisse der Studie dienen der Abschätzung von systemischem oxidativen Stress und DNA-Schäden, unter Berücksichtigung deren Beeinflussung durch eine antihypertensive Therapie, in dieser speziellen Hypertoniker-Gruppe. Zudem soll ein Beitrag zur weiteren Etablierung der verwendeten Biomarker geleistet werden.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Material**

Soweit nicht anders im Text erwähnt, wurden alle Chemikalien von Sigma Aldrich (Taufkirchen, Deutschland) bezogen.

### **2.2 Patientenrekrutierung**

Die Patienten wurden zum einen über die Ambulanz-Sprechstunde für therapieresistente Hypertonie des Universitätsklinikums Würzburg (UKW) und zum anderen über die Myocardial Sodium Content In Cardiac Disease (MyStIC)-Studie rekrutiert.

In der Sprechstunde für therapieresistente Hypertonie werden Patienten behandelt, die trotz der Einnahme von (ursprünglich) mindestens drei blutdrucksenkenden Medikamenten einen spontanen systolischen Blutdruck  $>160$  mmHg oder im ABDM einen durchschnittlichen Blutdruck  $>135/85$  mmHg vorweisen. Als Baseline-Evaluation erfolgt dort der Ausschluss sekundärer Hypertonieformen. Die in der Sprechstunde gewonnenen Daten wurden, bei entsprechend vorliegender Einwilligungserklärung des Patienten, in das Würzburger Register für therapieresistente Hypertonie eingetragen. Die Blut- und Urinentnahme für die weitere Untersuchung auf Marker oxidativen Stresses und auf Genomschäden erfolgte im Rahmen der Sprechstunde; die zum Patienten gewonnenen klinischen Daten wurden aus dem Register bezogen. Eine entsprechende Bewilligung durch die zuständige Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Universität Würzburg lag vor (Nr. 311/12).

Die MyStIC-Studie ist eine klinische Studie des Deutschen Zentrums für Herzinsuffizienz (DZHI) des UKW zur Messung des Natriumgehaltes im Herz- und Skelettmuskel. Es handelt sich um eine Beobachtungsstudie, die mittels Natrium-MRT Unterschiede in der Natriumspeicherung bei drei verschiedenen Gruppen feststellen will: (1) Patienten mit primärem Hyperaldosteronismus, (2) Patienten mit essentieller Hypertonie, (3) gesunden Probanden. Es galten die folgenden Ein- und Ausschlusskriterien.



### Allgemeine Einschlusskriterien:

- Alter  $\geq$  18 Jahre
- Unterschriebene Einverständniserklärung

### Allgemeine Ausschlusskriterien:

- Kontraindikationen für die Durchführung eines MRT
- Kardiale Vorerkrankungen (z.B. Vorhofflimmern, Myokardinfarkt oder koronare Herzkrankheit)
- Eingeschränkte Nierenfunktion (GFR<30 ml/min)
- Manifeste Lebererkrankung
- Systemische Erkrankungen mit kardialer oder pulmonaler Beteiligung (z.B. Amyloidose, Lungenfibrose)
- Schwangerschaft/ Stillzeit

### Spezifische Ausschlusskriterien für gesunde Probanden:

- Bekannte arterielle Hypertonie
- Einnahme eines blutdruckwirksamen Medikaments (z.B. ACE-Hemmer/AT<sub>1</sub>R-Blocker, Calciumantagonisten, Betablocker, Diuretikum, Antisymphotonika, Alpha-1-Blocker)
- Behandlung mit einem Mineralkortikoid-Rezeptor(MR)-Antagonisten innerhalb der letzten drei Wochen

Aus der MyStIC-Studie wurden also zum einen Patienten mit arterieller Hypertonie und zum anderen die gesunden Probanden als Kontrollgruppe rekrutiert. Die Blutentnahme für die weitere Untersuchung auf Marker oxidativen Stresses und Genomschäden erfolgte im Rahmen der Baseline-Untersuchung der Patienten bzw. Probanden, die dazu gewonnenen klinischen Daten wurden aus der Studiendatenbank bezogen. Der entsprechende Ethikantrag (Nr. 220/13) lag bewilligt vor.

### **2.3 Datenerhebung**

Die Datenerhebung erfolgte für die Patienten bzw. Probanden der Sprechstunde für therapieresistenten Bluthochdruck und der MyStIC-Studie gleichermaßen. Die üblichen Blut- und Urinparameter wurden vom Zentrallabor des UKW bestimmt (siehe Tabelle 7.1 und

Tabelle 7.2). Die ärztlich durchgeführte körperliche Untersuchung beinhaltete neben der Bestimmung von Körpergröße und -gewicht die Messung des Blutdrucks am Oberarm mittels eines Standard-Sphygmomanometers. Nachdem der Patient sich setzte, wurde die Blutdruckmanschette angelegt und 5 min Ruhe eingehalten. Es erfolgten drei Messungen im Abstand von jeweils 2 min am gleichen Arm nach folgendem Schema: 1. Messung im Sitzen, 2. Messung im Liegen, 3. Messung im Stehen.

Das Ambulante Blutdruck-Monitoring (ABDM) wurde entweder im DZHI oder extern durchgeführt.

Informationen über Vorerkrankungen, kardiovaskuläre Risikofaktoren und aktuelle Medikation wurden anamnestisch und über vorherige Arztbriefe ermittelt.

### **2.4 Blutentnahme und -aufbereitung**

Die Entnahme peripheren venösen Blutes erfolgte mit einer Einmalkanüle oder -butterfly und einer 9 ml EDTA-Monovette. Mit der Aufbereitung des Blutes wurde innerhalb von zwei Stunden nach Entnahme begonnen. Zunächst wurden 7 ml des Mediums zur Auftrennung der Zellen nach Dichtegradient Histopaque-1077 in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) gegeben und auf Raumtemperatur erwärmt. Histopaque-1077 wurde vorsichtig im Verhältnis von 1:1 mit 7 ml Vollblut überschichtet. Die anschließende Zentrifugation (Universal K25, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) erfolgte bei Raumtemperatur für 30 min mit 400 x g. Dies führte zu einer Aufteilung des Gemisches in vier Schichten. Die oberste Schicht, dem Plasma entsprechend, wurde mit einer Pasteurpipette bis etwa 0,5 cm oberhalb der undurchsichtigen Interphase abgenommen, in Eppendorfcups (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die undurchsichtige Schicht mit Lymphozyten und anderen mononukleären Zellen wurde ebenfalls mit einer Pasteurpipette aufgenommen und in ein neues konisches 15 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Es wurden 10 ml des Lymphozytenmediums (RPMI-1640 Medium, 15 % FBS (Biochrom, Berlin, Deutschland), 1 % L-Glutamin, 0,4 % Penicillin/Streptomycin, 0,1 % Tylosin, 1 % Natrium-Pyruvat, 1 % NEAA) hinzugefügt und vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde bei Raumtemperatur für 10 min mit  $250 \times g$  zentrifugiert (Rotanta RP, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde aspiriert und verworfen. Das Zellpellet wurde mit 10 ml Lymphozytenmedium resuspendiert und erneut bei oben genannten Einstellungen zentrifugiert. Der Überstand wurde aspiriert und verworfen. Das Pellet wurde mit 3 ml Lymphozytenmedium resuspendiert. Nach Bestimmung der Zellzahl mittels Zählkammer (Neubauer improved, Hecht Assistent, Sondheim, Deutschland) wurden die Lymphozyten für unterschiedliche Versuche weiterverwendet und dementsprechend aufgeteilt.

### **2.5 Urinaufbereitung**

Die von den Probanden abgegebene Urinprobe erreichte in 10 ml Monovetten innerhalb von zwei Stunden das Labor und wurde dann stets auf Eis gelagert. Es erfolgte zunächst eine Zentrifugation (Universal 16R, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  für 10 min mit  $4100 \times g$ . Das am Monovettenboden verbleibende Sediment wurde verworfen, der Urin wurde in Eppendorfcups aliquotiert und bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **2.6 $\gamma$ -H2AX-Bestimmung**

Das H2A-Histon lagert sich mit Proteinen dreier anderer Histonklassen zusammen um den Nukleosomenkern zu bilden. H2AX ist eine von vier Varianten des H2A-Histons und besitzt ein verlängertes COOH-Ende mit der Aminosäure Serin an Position 139. Als Reaktion auf DNA-Doppelstrangbrüche kann es dort phosphoryliert werden und wird dann als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet. Die Phosphorylierung dient u.a. der Rekrutierung von Reparaturproteinen, sodass es innerhalb weniger Sekunden nach Doppelstrangbruch (DSB) zu einer

Akkumulation von  $\gamma$ -H2AX-Molekülen und Reparaturenzymen um den Bruch herum kommt [107]. Diese Anhäufungen werden als Foci bezeichnet und können mit phosphospezifischen Antikörpern fluoreszenzmikroskopisch sichtbar gemacht werden [108] (siehe Abbildung 2.1). Da die Anzahl der  $\gamma$ -H2AX-Foci mit der Anzahl der DSB korreliert [109], ist der  $\gamma$ -H2AX-Assay eine sehr sensitive Methode zur Detektion von DSB [110].

DSB entstehen zum einen im Rahmen von physiologischen Vorgängen wie der V(D)J-Rekombination des Immunsystems, der Meiose oder ROS-assoziiert, und zum anderen durch äußere Einflüsse wie z.B. UV-Strahlung oder Chemotherapeutika [111]. Sie stellen eine schwerwiegende Form von DNA-Schäden dar, da ein Fehler in der Reparatur den Zelltod oder genomische Veränderungen wie Deletionen, Translokationen oder Chromosomenverluste zur Folge haben kann [112]. Diese chromosomalen Veränderungen können zur Tumorentstehung beitragen [113].

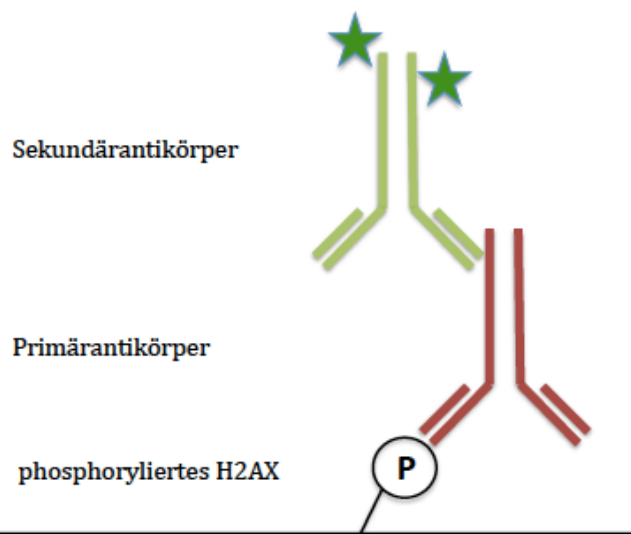
### **2.6.1 Probenaufbereitung**

Direkt im Anschluss an die Isolierung der PBMC (siehe 2.4) wurden etwa je 20.000 Zellen mittels Zytocentrifugation (Cytospin 3, Thermo Scientific, Braunschweig, Deutschland) auf vorgereinigte Objektträger aufgebracht. Die Zentrifugation wurde für 5 min mit  $112,9 \times g$  und hoher Beschleunigung durchgeführt. Die Objektträger wurden dann bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  in Methanol (Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelagert und die Zellen dadurch fixiert.

### **2.6.2 Färbung**

Zunächst wurden die in Methanol fixierten Cytospinpräparate für 5 min mit PBS gewaschen. Das Zellenfeld wurde mit einem Fettstift (ImmEdge™ Pen, Vector Laboratories, Burlingame, USA) umrandet. Bei den folgenden Färbeschritten waren je  $60 \text{ }\mu\text{l}$  Lösung pro Objektträger nötig. Um die Zellen zu permeabilisieren und unspezifische Protein-Protein-Interaktionen zu unterbinden, wurden diese nun bei Raumtemperatur für 30 min mit der Blockierlösung (PBS, 5 % donkey serum (Biochrom, Berlin, Deutschland), 1 % BSA, 0,3 % Triton X-100) inkubiert. Die Blockierlösung wurde mit einer Pipette abgenommen und es folgte unmittelbar die Inkubation mit dem Primärantikörper (Rabbit monoclonal

(EP854(2)Y) to Histone H2A.X (phospho S139) antibody, ab81299, Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:100 in Blockierlösung für 1 h bei 37 °C im Dunkeln. Die ungebundenen Antikörper wurden daraufhin durch 3-mal 8-minütiges Waschen mit PBS und 0,2 % Tween (PBST) entfernt. Die nächsten Färbeschritte erfolgten im Dunkeln. Die Präparate wurden mit dem korrespondierenden Sekundärantikörper (CF488A Donkey Anti-Rabbit IgG (H+L), #20015, Biotium, Hayward, USA) in einer Verdünnung von 1:200 in Blockierlösung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Ein Waschen mit PBST für 3-mal 8 min folgte. Nun wurden zur Zellkernfärbung die Zellen für 10 min mit DAPI (Stammlösung 10 mg/ml) in einer Verdünnung von 1:1000 in PBS inkubiert und daraufhin 2-mal für 5 min mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die gefärbten Zellen mit Confocal Matrix (Micro Tech Lab, Graz, Österreich) eingedeckt, mit einem Deckglas versehen, am Rand mit Nagellack abgedichtet und bis zur Visualisierung am Mikroskop am nächsten Tag bei 4 °C gelagert.



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung der indirekten Immunfluoreszenz zur Detektion von  $\gamma$ -H2AX-Foci.

### 2.6.3 Auswertung

Die gefärbten Cytospinpräparate wurden am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) mit der Kamera MP5000 Fluoro-Pro (Intas, Göttingen,

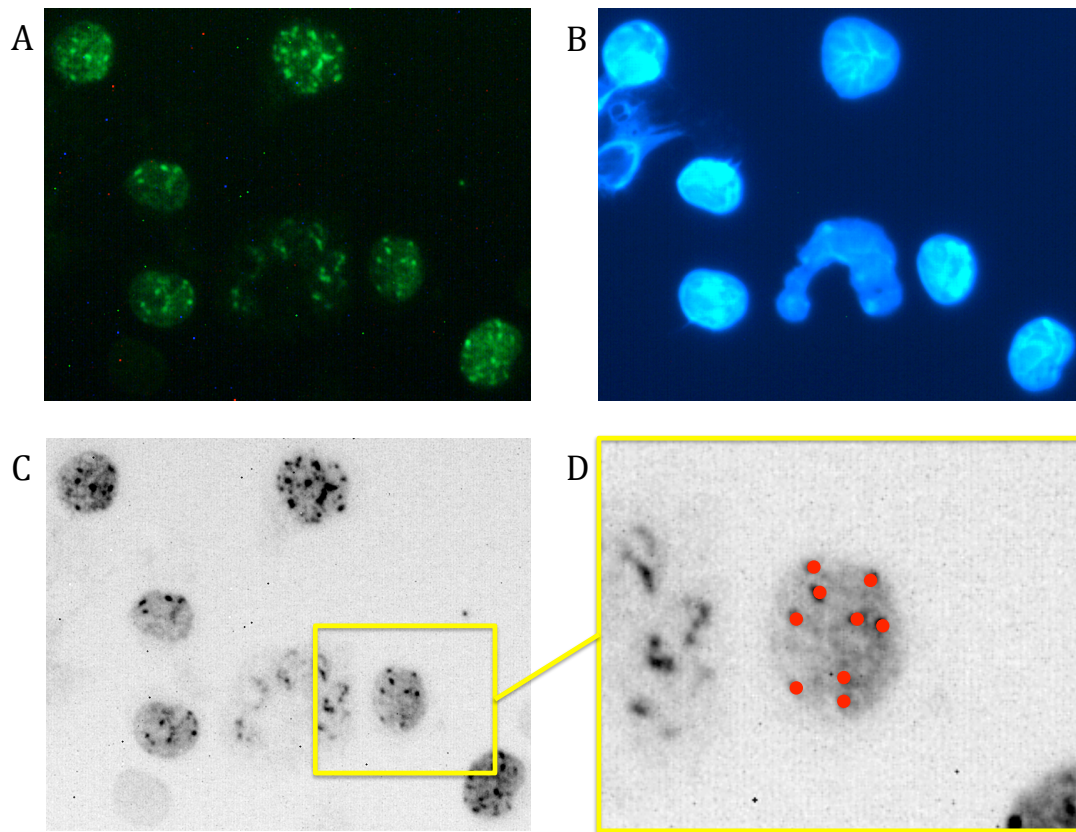
Deutschland) bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen und über das Programm Qcapture Pro (Version 5.0.1.26, Media Cybernetics, Rockville, USA) als TIFF-Dateien gespeichert. Für jedes Bild mit FITC-Filter wurde ein korrespondierendes Bild mit UV-2A-Filter aufgenommen.

Zur Quantifizierung des DNA-Schadens wurde die Anzahl der Foci pro Zelle bestimmt. Um die Visualisierung der Foci zu verbessern wurden die FITC-Bilder mit ImageJ (Version 1.47v, RSB Home, Bethesda, USA) bearbeitet. Zunächst wurde das Bild in seine Kanäle aufgetrennt und das neu erzeugte grüne 8-bit Graustufenbild invertiert. Die Kontrasteinstellungen wurden dann anhand der Positivkontrolle des entsprechenden Versuchs gewählt und für alle Bilder des Versuchs übernommen. Unterschiedliche Belichtungszeiten beim Fotografieren am Mikroskop an verschiedenen Bearbeitungstagen konnten so ausgeglichen werden (siehe Abbildung 2.2).

Die Positivkontrollen wurden an einem Versuchstag aus der Blutprobe einer Person hergestellt. Nach der Probenaufbereitung (siehe 2.4) wurden die isolierten Lymphozyten für 2 h mit 100  $\mu$ M Genistein in Lymphozytenmedium bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht. Bei jeder  $\gamma$ -H2AX-Färbung wurden zwei dieser Objektträger als Positivkontrolle mitgefärbt.

Alle Bilder wurden vom selben Untersucher auf die gleiche Weise manuell ausgewertet. Die Probenherkunft war während des Zählens für den Untersucher verblindet. Für jede Probe wurden zwei Objektträger gefärbt und jeweils in 50 Zellen die Anzahl der Foci bestimmt. Der daraus gebildete Mittelwert ergab den Endpunkt Foci/Zelle. Unterschiedliche Proben des gleichen Patienten wurden an einem Tag gefärbt.

Es wurden nur die Foci eines mit DAPI gefärbten Nucleus gezählt. Der Nucleus musste rund, unbeschädigt, scharf abfotografiert und komplett im Bild einsehbar sein. Zellkerne mit Nuclear Buds (NBUD), Nuclear Blebs (NBLEB) oder Mikrokern wurden inkludiert, andere deformierte oder fragmentierte Nuclei wurden nicht gezählt. Der  $\gamma$ -H2AX-Focus musste zudem klar begrenzt sein, ineinander verschmolzene Foci wurden als ein Focus gezählt.



**Abbildung 2.2: Repräsentative Bilder der  $\gamma$ -H2AX-Fluoreszenzfärbung, die zur manuellen Zählung der Foci verwendet wurden.**

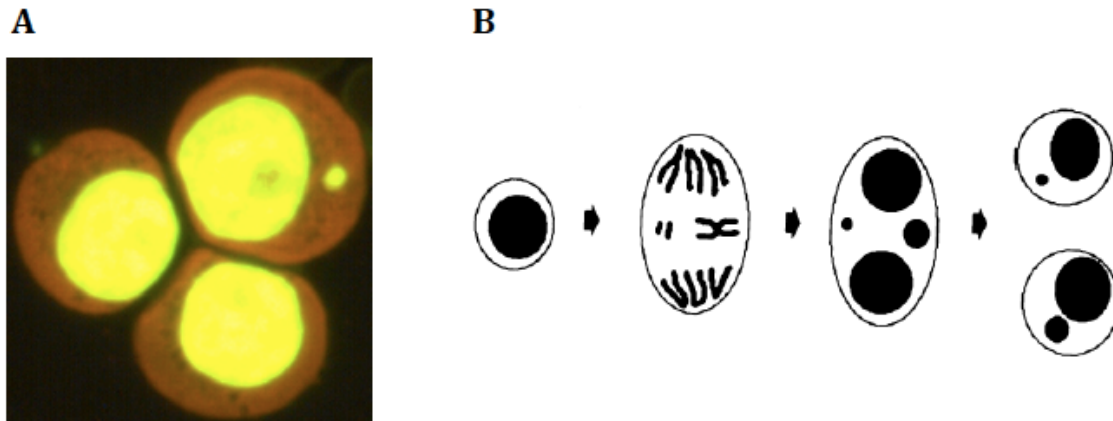
Die verschiedenen für die Auswertung notwendigen Schritte sind dargestellt. Der deformierte U-förmige Nucleus in der Bildmitte wurde nicht mitgezählt. A: Bild von mit Genistein behandelten Lymphozyten, aufgenommen bei FITC-Filter am Mikroskop. B: Ausschnitt wie A, aufgenommen bei UV-2A-Filter. C: Durch Bearbeitung von Bild A in ImageJ entstandenes Bild. Hierzu wurde das Originalbild in seine Graustufen-Kanäle geteilt, das Grünkanal-Bild invertiert und entsprechende Kontrasteinstellungen gewählt. D: Zeigt ein aus Bild C vergrößerten Bildausschnitt. Die gezählten Foci wurden zur Veranschaulichung mit roten Punkten besetzt.

## 2.7 Mikrokernfrequenztest

Der Mikrokernfrequenztest dient dem Nachweis verschiedener Arten chromosomaler Schäden [89]. Die dabei beobachteten Chromatin-haltigen Strukturen, welche von einer Membran umgeben im Zytoplasma ohne Verbindung zum Zellkern vorliegen, werden als Mikrokerne bezeichnet. Sie beinhalten entweder gebrochene Chromosomenfragmente oder komplette Chromosomen (siehe Abbildung 2.3). Zur Entstehung tragen also sowohl unreparierte DNA-Doppelstrangbrüche als auch Schäden des Spindelapparates bei. Diese

schwerwiegenden Schäden können während der Mitose auf Tochterzellen übertragen werden.

Die Korrelation zwischen Mikrokernfrequenz in peripheren Lymphozyten und Tumorrisiko wurde mehrfach aufgezeigt [114, 115], sodass die Bildung von Mikrokernen ein durchaus relevantes Ereignis darstellt.

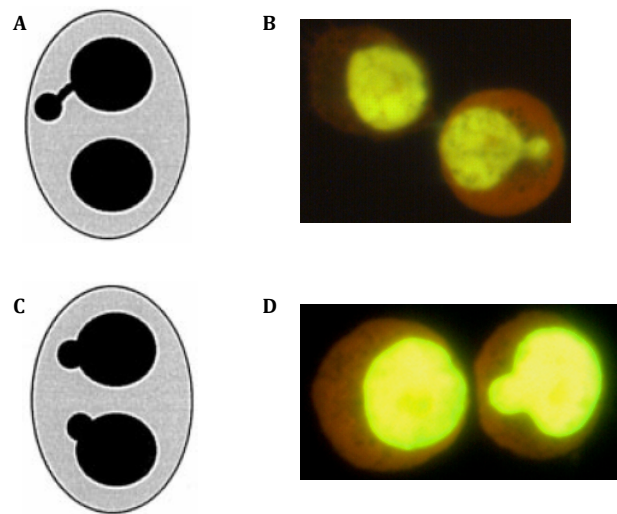


**Abbildung 2.3: Mikrokerne in einkernigen Zellen.**

A: Bild von drei einkernigen Zellen. Im Zytoplasma der oberen rechten Zelle befindet sich ein Mikrokern. B: Schematische Darstellung der Mikrokernentstehung in einer sich teilenden Zelle. Mikrokerne enthalten gebrochene Chromosomenfragmente oder komplette Chromosomen. Modifiziert nach [116].

Mit dem Mikrokernfrequenztest können auch andere nukleäre Anomalien, die auf eine chromosomale Instabilität hinweisen, detektiert werden [117] (siehe Abbildung 2.4). NBUDs besitzen die gleichen morphologischen Eigenschaften wie Mikrokerne, sind aber über eine Brücke mit dem Zellkern verbunden. Sie entstehen, wenn während der S-Phase des Zellzyklus überschüssige oder im Zytoplasma verbliebene DNA von Zellkernmembran ummantelt wird [118]. Anders als Mikrokerne beinhalten NBUDs vor allem azentrische Chromosomenfragmente [119]. Als NBLEBs werden Vorwölbungen des Zellkerns beschrieben, welche sich nicht durch eine klare Einschnürung vom Zellkern abgrenzen. Ihre Entstehung und Rolle sind weitestgehend unbekannt [120].





**Abbildung 2.4: Schematische Darstellung und Bilder von weiteren im Mikrokernfrequenztest detektierbaren chromosomalen Schäden nach GelGreen-Färbung.**

A: Schematische Darstellung eines NBUD in einer zweikernigen Zelle. B: Bild von zwei einkernigen Zellen; der Zellkern der rechten Zelle zeigt einen NBUD, eine MK-ähnliche Struktur, die mit dem Zellkern über eine Brücke verbunden ist. C: Schematische Darstellung von NBLEBs in einer zweikernigen Zelle. D: Bild von zwei einkernigen Zellen; der Zellkern der rechten Zelle zeigt einen NBLEB, eine Ausstülpung Chromatin-haltigen Materials aus dem Zellkern. Modifiziert nach [121].

### 2.7.1 Probenaufbereitung

Direkt im Anschluss an die Isolierung der PBMC (siehe 2.4) wurden 5 ml der Lymphozytensuspension mit etwa 1 Mio. Zellen/ml in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche für Suspensionszellen (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) gegeben. Zur Stimulation der Mitose wurden 10 µg/ml Phytohämagglutinin hinzugeben. Die Zellkulturflaschen wurden dann stehend bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> für 24 h im Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland) inkubiert [121]. Die Zellen wurden anschließend durch Zytozentrifugation (siehe 2.6.1) auf vorgereinigte Objektträger aufgebracht und diese bei -20 °C in Methanol gelagert und fixiert.

### 2.7.2 Färbung und Auswertung

Die Cytospinpräparate wurden nach Verdunstung des Methanols für 7 min mit 10 µl des Nukleinsäure-Farbstoffs GelGreen (Biotium, Hayward, USA) inkubiert und

nach Abspülen mit PBS mit DABCO und einem Deckglas eingedeckt. Die GelGreen-Gebrauchslösung bestand aus 1 % Stammlösung in destilliertem Wasser.

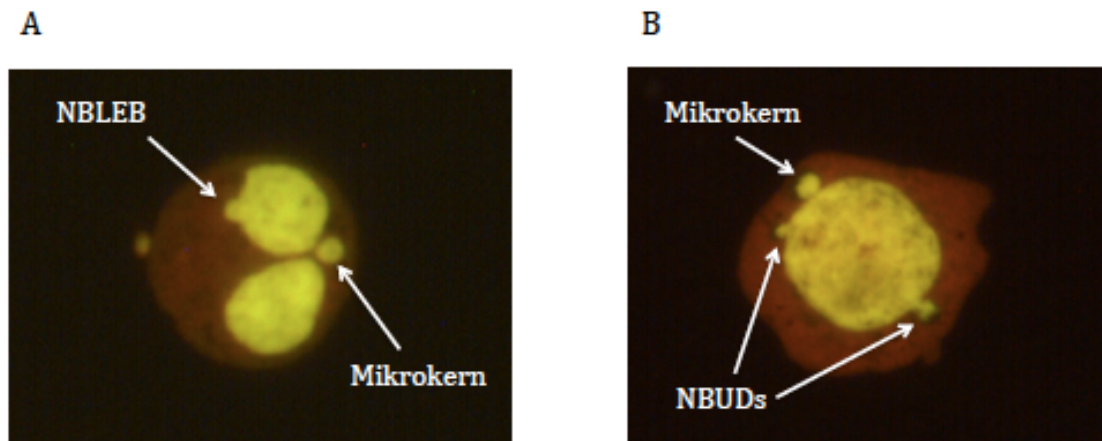
Die Präparate wurden am Tag der Färbung, nachdem sie codiert wurden, bei 400-facher Vergrößerung am Mikroskop Eclipse 55i (Nikon, Düsseldorf, Deutschland) ausgewertet.

Alle Auswertungen wurden vom selben Untersucher durchgeführt. Pro Probe wurden zwei Objektträger gefärbt und jeweils mindestens 1000 Zellen ausgewertet, sodass insgesamt mindestens 2000 Zellen pro Probe erfasst wurden. Zum einen wurde der Anteil doppelkerniger und mehrkerniger ( $\geq 3$  Nuclei) Zellen sowie Apoptosen und Mitosen in 1000 einkernigen Zellen (EK) gezählt und zum anderen nukleäre Anomalien wie MK, NBUDs, NBLEBs und NPBs erfasst. Die Auswertungskriterien orientierten sich an denen von Fenech [120] (siehe Tabelle 2.1). Da die Zellteilung nicht durch Cytochalasin B in der Anaphase arretiert wurde, wurden die Anomalien in einkernigen Lymphozyten gezählt.

**Tabelle 2.1: Auswertungskriterien des Mikrokernfrequenztests.**

Einkernige Zelle		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Zellmembran intakt und deutlich abgrenzbar von Nachbarzellen</li> <li>• Zellkernmembran intakt und innerhalb der Zellmembran befindlich</li> <li>• Zellkern rund bis oval</li> </ul>
Mikrokern		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morphologie und Färbung wie Hauptkern</li> <li>• Lokalisation innerhalb des Zytoplasmas aber außerhalb des Hauptkerns</li> <li>• Keine Verbindung oder Überlappung mit dem Hauptkern</li> <li>• Größe (Fläche) <math>1/256</math> bis <math>1/9</math> des Hauptkerns</li> </ul>
Nuclear Bud	klassisch	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morphologische und Färbeigenschaften wie MK</li> <li>• verbunden mit dem Zellkern über eine Brücke, die entweder wenig oder deutlich schmaler ist als der Bud</li> </ul>
	spezial	<ul style="list-style-type: none"> <li>• wie klassisch, aber Bud ist größer als ein MK</li> </ul>
Nuclear Bleb		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Keine Einschnürung zwischen Zellkern und überständigem Zellkernmaterial erkennbar</li> </ul>

Die Chromosomenschäden NBUD, NBLEB und andere wie zum Beispiel doppelkernige Zellen mit MK oder einkernige Zellen mit NBUD und MK (siehe Abbildung 2.5) wurden als Summe zum Endpunkt „Nukleäre Anomalien“ (NA) zusammengefasst.



**Abbildung 2.5: Nukleäre Anomalien in Lymphozyten nach GelGreen-Färbung.**

A: Bild von zweikerniger Zelle mit Mikrokernel und NBLEB. B: Bild von einkerniger Zelle mit Mikrokernel und 2 NBUDs.

Wenn in einer Probe andere Leukozytenarten wie segmentkernige neutrophile Granulozyten gehäuft vorkamen, wurde dies ebenfalls erfasst.

In regelmäßigen Abständen wurden Positiv- und Negativkontrollen gefärbt und ausgewertet. Hierfür dienten V79-Zellen, die in Zellkultur gehalten wurden. Diese wurden zum einen mit 15 µg/ml MMS als Alkylanz und zum anderen mit DMSO für 4 h inkubiert. Nach Austausch des Mediums wurden sie entsprechend ihrer Verdopplungszeit nach 20 h geerntet und durch Zytozentrifugation auf Objektträger aufgebracht.

## **2.8 Marker für oxidativen/ nitrosativen Stress im Plasma**

Die Plasmaproben wurden für den Nachweis drei verschiedener Marker für oxidativen bzw. nitrosativen Stress verwendet (siehe B in Abbildung 1.4).

### 2.8.1 D-ROM

Als Biomarker für oxidativen Stress wurde der D-ROM-Test herangezogen. Da ROS eine sehr kurze Halbwertszeit haben [122], werden die stabileren D-ROM im Plasma nachgewiesen. Dabei handelt es sich um den Nachweis von v.a. Hydroperoxiden (chemische Struktur R—O—OH mit R als kohlenstoffhaltigen Rest), welche u.a. in Lipiden, Glykosiden und Proteinen vorkommen. Sie entstehen zum Beispiel bei der Reaktion zwischen Lipiden und Hydroxyl-Radikalen und werden von den Zellen in die Blutgefäße transportiert [77]. In zahlreichen Studien wurde der D-ROM-Test bereits eingesetzt und es konnte eine Korrelation zu kardiovaskulären Erkrankungen [123, 124], Inflammation [125], Tumorerkrankungen [126] sowie Mortalität und Alter [127, 128] gezeigt werden.

Die photometrische Methode zur Messung von Hydroperoxid-Leveln im Serum wurde erstmals von Trotti und Carratelli beschrieben [129] und basiert auf einfachen chemischen Reaktionen. Im sauren Milieu (pH=4,8) lösen sich die zuvor an Serumproteinen gebundenen Eisen-Ionen und katalysieren die Umwandlung von Hydroperoxiden zu Alkoxy- und Peroxyl-Radikalen. Diese wiederum oxidieren das Chromogen N,N-Diethyl-p-phenylendiamin, sodass ein rot gefärbtes Kation entsteht, welches bei Wellenlänge 505 nm gemessen wird [130]. Das Testergebnis wird in CARR U (Carratelli Units) angegeben, wobei 1 CARR U 0,08 mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/100 ml Plasma entspricht [131].

Die Messungen wurden von Herrn Eugène Jansen des Centre for Health Protection, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Niederlande, mit einem D-ROM-Assay-Kit (Diacron, Grosseto, Italien) und dem Autoanalyser LX20-Pro (Beckman-Coulter, Woerden, Niederlande) durchgeführt.

### 2.8.2 SHp

Der SHp-Assay ist ein photometrisches Verfahren zur Bestimmung der Thiol-Konzentration im Plasma. Thiole sind organische Verbindungen, die an einem Kohlenstoff-Atom eine Thiolgruppe (-SH) gebunden haben. Sie kommen im menschlichen Organismus v.a. in Proteinen als Aminosäure Cystein oder in Liponsäure vor. Thiolgruppen, z.B. von Glutathion oder Thioredoxin, können reversibel oxidiert werden und spielen daher als Antioxidantien eine wichtige

Rolle bei der Regulierung des Redox-Status [132]. Thiol-Level im Serum oder Plasma wurden daher bereits als Biomarker eingesetzt [133], erniedrigte Werte zeigten ein ungünstiges Profil und korrelierten negativ mit Mortalität und Alter [127, 128].

Die Messung der Thiol-Konzentration beruht auf ein Verfahren nach Ellman [134], welches von Hu modifiziert wurde [135] und heutzutage automatisiert erfolgen kann. Die Methode basiert auf die Reaktion zwischen Thiolgruppen mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB), bei der es durch Gelbfärbung zu einer erhöhten Absorption bei Wellenlänge 412 nm kommt [136, 137]. Die Messungen wurden von Herrn Eugène Jansen des Centre for Health Protection, National Institute for Public Health and the Environment, Bilthoven, Niederlande, mit einem SHp-Assay-Kit (Diacron, Grosseto, Italien) und dem Autoanalyser LX20-Pro (Beckman-Coulter, Woerden, Niederlande) durchgeführt. Die Ergebnisse des Assays wurden als  $\mu\text{mol/l}$  ausgegeben.

Zur Kontrolle der Plasmaproben-Qualität wurde das Ausmaß von Hämolyse und hohen Gehalten an Bilirubin und Lipiden als H(ämolytischer)-, I(kterischer)- und L(ipämischer)-Index angegeben [138]. Für L-Index-Werte  $\geq 4$  wurde das SHp-Ergebnis der entsprechenden Probe nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

### **2.8.3 3-Nitrotyrosin**

Als Marker für nitrosativen Stress wurde 3-Nitrotyrosin im Plasma bestimmt. Tyrosin ist eine nicht-essentielle Aminosäure, welche in Proteinen häufig oberflächennah liegt und daher leicht modifiziert werden kann. Für die Nitrierung von freiem und proteingebundenem Tyrosin zu 3-Nitrotyrosin ist als Vertreter der RNS vor allem Peroxynitrit verantwortlich [139]. 3-Nitrotyrosin stellt, vor allem wenn es proteingebunden vorliegt, eine stabilere Verbindung dar als beispielsweise Stickstoffmonoxid und eignet sich daher besser zum Nachweis von nitrosativem Stress. Zahlreiche Studien zeigten erhöhte 3-Nitrotyrosin-Level in verschiedenen Erkrankungen u.a. des vaskulären, rheumatoiden und neurologischen Formenkreises [140].

Es wurde ein kompetitiver ELISA zur quantitativen Bestimmung der 3-Nitrotyrosin-Level im Plasma verwendet. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450 \text{ nm}$  [141].

Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Nicole Schupp, Institut für Toxikologie der Universitätsklinik Düsseldorf, mit dem „Nitrotyrosine ELISA Kit (#SKT-126)“ (StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Kanada) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in nM angegeben.

## **2.9 Marker für oxidativen Stress im Urin**

Im Spontanurin wurden drei verschiedene Marker für oxidativen Stress nachgewiesen und jeweils auf die Kreatinin-Konzentration bezogen (siehe A in Abbildung 1.4).

### **2.9.1 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan**

Zur Bestimmung eines weiteren Biomarkers oxidativen Stresses wurde die Isoprostan-Konzentration im Urin gemessen. F<sub>2</sub>-Isoprostane sind Prostaglandin-F<sub>2</sub>-ähnliche Verbindungen, welche *in vivo* durch ROS-induzierte Peroxidation von Lipiden, v.a. von Arachidonsäure, ohne die enzymatische Wirkung der Cyclooxygenasen (COX) entstehen [142, 143]. In reduzierter Form, dann F<sub>2 $\alpha$</sub> -Isoprostan genannt, gibt es zahlreiche Isomere, unter denen das 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan (15-F<sub>2t</sub>-IsoP) die meiste Beachtung findet [144]. Dies beruht darauf, dass 15-F<sub>2t</sub>-IsoP zum einen biologische Aktivität, z.B. als Vasokonstriktor der renalen glomerulären Arteriolen, besitzt, und zum anderen als stabiler Biomarker für Lipidperoxidation und oxidativen Stress in Plasma und Urin bereits etabliert ist. Erhöhte F<sub>2</sub>-IsoP-Level sind in zahlreichen Krankheiten wie Diabetes mellitus, alkoholtoxischer Lebererkrankung oder Arteriosklerose zu finden [145].

15-F<sub>2t</sub>-IsoP-Level im Urin können mittels Gaschromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (GC/MS) oder Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) bestimmt werden. In dieser Arbeit kam letzteres in Form eines kompetitiven Immunassays zum Einsatz. Das 15-F<sub>2t</sub>-IsoP der Probe und der Standardreihe konkurriert mit an Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertem 15-F<sub>2t</sub>-IsoP um die Bindung an den auf die Mikrotiterplatte angebrachten spezifischen 15-F<sub>2t</sub>-IsoP-Antikörpern. Wenn HRP mit dem hinzugegebenen Substrat reagiert,

kommt es zu einem Farbumschlag. Dabei ist die Farbintensität proportional zum am Antikörper gebundenen 15-F<sub>2t</sub>-IsoP-HRP und invers korreliert mit der Anzahl an unkonjugiertem 15-F<sub>2t</sub>-IsoP der Probe oder Standardreihe. Vor Verdünnung des Urins für den ELISA wurde dieser mit  $\beta$ -Glucuronidase behandelt. Dadurch wurde an Glucuronsäure gebundenes 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan freigesetzt, sodass letztlich nicht das freie sondern das totale 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan gemessen werden konnte [146].

Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Nicole Schupp, Institut für Toxikologie der Universitätsklinik Düsseldorf, mit dem „Urinary Isoprostane EIA Kit (EA-85)“ (Oxford Biomedical Research, Rochester Hills, USA) durchgeführt. Die Ergebnisse wurden nach Normierung mit den Kreatininwerten in ng 15-F<sub>2t</sub>-IsoP/mg Kreatinin angegeben.

### 2.9.2 Malondialdehyd

Ein weiterer im Urin gemessener Biomarker für oxidativen Stress und Lipidperoxidation ist MDA. MDA entsteht *in vivo* zum einen durch nicht-enzymatische Prozesse als sekundäres Endprodukt der Lipidperoxidation, v.a. aus Arachidonsäure, und zum anderen durch enzymatische Prozesse als Nebenprodukt der Thromboxan-A<sub>2</sub>-Herstellung. MDA kann die schädigende Wirkung oxidativen Stresses verstärken, indem es selbst mit multiplen Biomolekülen reagiert und mit diesen Addukte bildet. Durch Bindung an Proteine und freie Aminosäuren können deren Funktion herabgesetzt oder verändert werden. Bei der Adduktbildung mit Nukleosiden entsteht u.a. Pyrimido[1,2- $\alpha$ ]purin-10(3H)-ein (M<sub>1</sub>G), welches Frameshift- und Punktmutationen verursachen kann. Diese durch MDA induzierten Schäden spielen eine Rolle bei der Entstehung zahlreicher Krankheiten wie Karzinomen, Diabetes mellitus oder des kardiovaskulären Formenkreises [78, 147].

Zur Detektion des MDA-Gehalts im Urin wurde der auf der Methode von Yagi [148] basierende Thiobarbitursäure (TBA)-Assay verwendet. Unter Hitze- und Säureeinwirkung verbindet sich TBA mit den sogenannten TBA-reaktiven Substanzen (TBARS), darunter v.a. MDA, und bildet ein rosafarbenes Produkt, dessen Intensität bei Wellenlänge  $\lambda_{\text{ex/em}} = 560 \text{ nm}/585 \text{ nm}$  fluorimetrisch

bestimmt wird. Die Fluoreszenzintensität ist direkt proportional zur TBARS-Konzentration der Probe [149, 150].

Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Nicole Schupp, Institut für Toxikologie der Universitätsklinik Düsseldorf, mit dem „QuantiChrom™ TBARS Assay Kit (DTBA-100)“ (BioAssay Systems LLC, Hayward, USA) durchgeführt. Bei TBARS-Werten > 1,5  $\mu\text{M}$  wurde die Probe verdünnt, der Assay erneut durchgeführt und das Ergebnis mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert. Die Ergebnisse wurden im Verhältnis zum Kreatinin als  $\mu\text{mol MDA/mol Kreatinin}$  angegeben.

### **2.9.3 8-oxodG**

Die Messung von 8-oxodG im Urin als Biomarker für oxidative DNA-Schäden und oxidativen Stress ist eine weit verbreitete Methode. Die Oxidation von Guanin findet zum einen direkt in der DNA und zum anderen am Vorläufermolekül dGTP im Nukleotidpool, welches anschließend in die DNA eingebaut wird, statt. Durch diverse Reparaturenzyme, z.B. die Oxoguanin-DNA-Glycosylase 1 (OGG1), wird 8-oxodG freigesetzt und gelangt über den Blutkreislauf zur Niere und in den Urin. Unter der Annahme, dass sich die Guanin-Oxidationsrate ebenso wie die Reparatur- und Exkretionsrate dieser oxidierten Basen im Menschen über Tage/Wochen im Gleichgewicht befinden, repräsentiert die exkretierte Menge oxidiertes Nucleoside im Urin die Produktion oxidiertes DNA im Körper und damit den oxidativen Stress. Erhöhte Exkretionsraten wurden in verschiedenen kardiovaskulären und Tumorerkrankungen festgestellt [151-153].

Zur quantitativen Bestimmung der 8-oxodG-Level im Urin kam ein kompetitiver ELISA zur Anwendung. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 450 \text{ nm}$  [154].

Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Nicole Schupp, Institut für Toxikologie der Universitätsklinik Düsseldorf, mit dem „DNA Damage (8-OHdG) ELISA Kit (#SKT-120)“ (StressMarq Biosciences Inc., Victoria, Kanada) durchgeführt. Bei den untersuchten Urinproben handelte es sich um Spontanurin. Die Ergebnisse wurden auf das Urin-Kreatinin bezogen und in  $\text{ng 8-oxodG / mg Kreatinin}$  angegeben.



#### **2.9.4 Kreatinin**

Um die Ergebnisse der oben genannten Marker für oxidativen Stress aus dem Spontanurin vergleichbar zu machen, wurden sie ins Verhältnis zur Kreatinin-Konzentration der jeweiligen Probe gesetzt. Kreatinin entsteht kontinuierlich als Abbauprodukt des Kreatin-Stoffwechsels im Muskel und wird unverändert über die Niere ausgeschieden.

Der zur Bestimmung der Kreatinin-Konzentration verwendete Assay beruht auf einer erstmals von Jaffé beschriebene Reaktion, bei der in einem alkalischen Milieu Pikrinsäure einer Urinprobe zugeführt wird und eine orangerote Verbindung mit unter anderem Kreatinin entsteht [155]. Die Farbintensität wurde kolorimetrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 500$  nm gemessen. Eine erneute Messung erfolgte nach 20-minütiger Inkubation mit einer sauren Lösung. Die Differenz der Farbintensitäten vor und nach dem Ansäuern ist proportional zur Kreatinin-Konzentration [156].

Die Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Nicole Schupp, Institut für Toxikologie der Universitätsklinik Düsseldorf, mit dem „Creatinine (urinary) Colorimetric Assay Kit (Item No. 500701)“ (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, USA) durchgeführt.

#### **2.10 Statistische Auswertung**

Metrische Variablen wurden als Median mit dazugehörigen mit Tukey-Angelpunkten berechneten 1. und 3. Quartil (Q1-Q3), kategoriale Variablen als Prozent angegeben. Die Daten wurden mittels Shapiro-Wilk-Test auf ihre Normalverteilung hin überprüft. Da größtenteils keine normalverteilten Daten vorlagen, erfolgte die weitere Überprüfung von Unterschieden und Zusammenhängen mittels nicht-parametrischer Testverfahren.

Bei unabhängigen Stichproben erfolgte die Überprüfung auf signifikante Unterschiede zwischen mehreren ( $\geq 3$ ) Gruppen mittels Kruskal-Wallis-Test und zwischen zwei Gruppen mittels Mann-Whitney-U-Test. Bei abhängigen Stichproben wurde hingegen bei mehreren ( $\geq 3$ ) Gruppen der Friedman-Test und bei zwei Gruppen der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test angewandt. Nach

Anwendung des Kruskal-Wallis- bzw. Friedman-Test erfolgten Post-Hoc-Tests mittels Bonferroni-Korrektur.

Korrelationen zwischen metrischen Variablen wurden mit dem Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman ( $r$ ) angegeben. Orientierend an der Einteilung von Cohen [157] wurde dieses Maß der Effektstärke folgendermaßen interpretiert:  $r = .10$  entspricht einem schwachen,  $r = .30$  einem mittleren und  $r = .50$  einem starken Effekt. Bei nominalen Variablen wurden zur Überprüfung des Zusammenhangs der Chi-Quadrat bzw. Fisher-Exakt-Test angewandt. Wenn bei einer nominalen Variable mehr als zwei Ausprägungen möglich waren, kam als exakter Test die Monte-Carlo-Methode zur Anwendung.

Zur weiterführenden Betrachtung von Gruppenunterschieden und Zusammenhängen wurden zudem Kovarianz (ANCOVA)- und Regressionsanalysen durchgeführt. Um die Voraussetzungen für diese parametrischen Verfahren erfüllen zu können, war es notwendig die nicht-normalverteilten Variablen im Sinne einer Datentransformation zu logarithmieren. Die mit dem dekadischen Logarithmus transformierten Variablen erhielten das Präfix „lg“.

Um Zusammenhänge zwischen mehreren erklärenden (unabhängigen) Variablen und einer abhängigen Variable festzustellen, wurden Regressionsanalysen durchgeführt. Die Modellgleichung des multiplen linearen Regressionsmodells lautet:

$$y = \beta_0 + \beta_1 \cdot x_1 + \dots + \beta_k \cdot x_k + \varepsilon$$

Jeder abhängigen Variable  $y$  (z.B. SHp oder  $\gamma$ -H2AX) wurden die unabhängigen Variablen  $x$  (z.B. Geschlecht oder Alter), welche in den zuvor durchgeführten einfachen Zusammenhangsanalysen Signifikanz gezeigt hatten, zugeordnet. Der Einfluss der unabhängigen Variablen wird durch den standardisierten Koeffizienten  $\beta$  ausgedrückt. Der nicht standardisierte Regressionskoeffizient  $B$  lässt eine Aussage zur quantitativen Veränderung von  $y$  zu, wenn  $x$  sich um eine Einheit ändert.  $\varepsilon$  entspricht dem Residuum. Der Determinationskoeffizient  $R^2$  gibt an, wie viel Prozent der abhängigen Variable durch die Regressionskoeffizienten

der Modellschätzung erklärt werden können. Beim korrigierten  $R^2$  ist das  $R^2$  in Hinblick auf Fallzahl ( $n$ ) und Anzahl der unabhängigen Variablen adjustiert.

In dieser Arbeit wurden die Regressionsanalysen in einem explorativen Ansatz mit der Methode der Rückwärtsselektion durchgeführt. Dabei schloss das Statistik-Programm nacheinander jeweils die unabhängige Variable, welche die größte Insignifikanz (mit  $p > 0,1$ ) aufwies, aus dem Modell aus, bis nur noch Variablen verblieben, welche einen signifikanten Beitrag zur Varianzaufklärung leisteten. Die Ergebnisse sind für jede abhängige Variable als Tabelle dargestellt. Die Voraussetzungen für die Anwendung eines multiplen linearen Regressionsmodells wurden jeweils geprüft.

Um Gruppenunterschiede einer abhängigen Variable genauer zu untersuchen, wurde im Rahmen einer ANCOVA das Modell um eine Kovariate ergänzt. Die Güte des Modells wurde ebenfalls mit dem korrigierten  $R^2$  angegeben.

Bei allen statistischen Verfahren wurde ein  $p \leq 0,05$  als signifikant anerkannt.

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS Statistics (Version 25, IBM, Armonk, USA) verwendet.

## **3 Ergebnisse**

### **3.1 Studienpopulation**

#### **3.1.1 Gruppendefinition**

Die Studienteilnehmer wurde entsprechend ihrer Einnahme von Antihypertensiva und ihrer durchschnittlichen systolischen Blutdruckwerte im ABDM bzw. ihrer Praxis-Blutdruckwerte in 3 Gruppen eingeteilt (siehe Tabelle 3.1). Hierzu wurden jeweils die Daten ihrer ersten Visite herangezogen.

Als gesunde Kontrolle wurden solche Personen definiert, welche keine Antihypertensiva einnahmen und einen durchschnittlichen systolischen Blutdruck im ABDM kleiner als 140 mmHg aufwiesen. Hierbei wurde sich an der entsprechenden Einteilung der MyStIC-Studie orientiert. Als gut eingestellte Hypertoniker (HypGut) galten Personen mit einem durchschnittlichen systolischen Blutdruck im ABDM oder, wenn dieser nicht vorhanden war, einem systolischen Praxis-Blutdruck im Sitzen kleiner als 140 mmHg unter laufender Therapie mit mindestens einem Antihypertensivum. Zu den schlecht eingestellten Hypertonikern (HypSch) wurden dementsprechend Patienten gezählt, welche unter laufender antihypertensiver Therapie einen durchschnittlichen systolischen Blutdruck im ABDM oder, wenn dieser nicht vorhanden war, einen systolischen Praxis-Blutdruck im Sitzen größer/ gleich 140 mmHg zeigten. Ebenfalls in diese Gruppen fielen Patienten, die keine Antihypertensiva einnahmen und einen durchschnittlichen systolischen Blutdruck im ABDM größer/ gleich 140 mmHg aufwiesen. Zudem wurden die Gruppen der gut und schlecht eingestellten Hypertoniker zu einer gemeinsamen Hypertoniker-Gruppe (HypAll) zusammengefasst betrachtet.

**Tabelle 3.1: Definitionen zur Einteilung der Studienteilnehmer.**

Diese erfolgte in 2 Haupt- und 3 Untergruppen anhand der Einnahme von Antihypertensiva und gemessener Blutdruckwerte.

Gruppe	Untergruppe	Antihypertensiva	Durchschnittlicher systolischer Blutdruck im ABDM bzw. systolischer Praxis-Blutdruck
Kontrolle		0 und	< 140 mmHg
Hypertoniker (HypAll)	Gut eingestellte Hypertoniker (HypGut)	≥ 1 und	< 140 mmHg
	Schlecht eingestellte Hypertoniker (HypSch)	≥ 1 und	≥ 140 mmHg
		0 und	≥ 140 mmHg

### 3.1.2 Merkmale der Studienteilnehmer

Von den insgesamt 72 rekrutierten Studienteilnehmern konnten 8 der Kontroll-Gruppe und 64 der Hypertoniker-Gruppe zugeordnet werden, wobei 36 Patienten einen gut eingestellten und 28 Patienten einen schlecht eingestellten Blutdruck zeigten. Die folgenden Tabellen zeigen die klinischen Merkmale der Studienteilnehmer.

**Tabelle 3.2: Basischarakteristika der Studienteilnehmer.**

Neben Alter, Geschlecht und Body Mass Index (BMI) sind Vorerkrankungen und Lebensstilfaktoren nach Gruppe geordnet dargestellt. Gezeigt ist jeweils der Median (Q1-Q3) oder die Anzahl mit prozentuaem Anteil. \* $p \leq 0,05$  verglichen zur Kontrolle. ° $p \leq 0,05$  verglichen zu HypGut.

	Kontrolle	HypGut	HypSch	HypAll
Anzahl	8	36	28	64
Alter [Jahre]	56 (47,5-63,5)	69,5 (62-76)*	65 (59-73)	66,5 (60,5-73,5)*
Männliches Geschlecht	6 von 8 (75%)	16 von 36 (44,4%)	18 von 28 (64,3%)	34 von 64 (53,1%)
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	27,8 (25,2-28,9)	29,0 (26,4-33,1)	30,4 (28,0-34,0)	29,6 (26,8-33,8)* $p=0,07$
Raucher	0 von 8 (0%)	3 von 33 (9,1%)	4 von 26 (15,4%)	7 von 59 (11,9%)
Diabetes	0 von 8 (0%)	12 von 36 (33,3%)* $p=0,08$	13 von 28 (46,4%)*	25 von 64 (39,1%)*
Chronisch-entzündliche Erkrankung	0 von 8 (0%)	3 von 36 (8,3%)	4 von 28 (14,3%)	7 von 64 (10,9%)
Tumor-erkrankung	0 von 8 (0%)	6 von 34 (17,6%)	0 von 24 (0%)°	6 von 58 (10,3%)

In Tabelle 3.2 ist festzustellen, dass das mediane Alter der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt der Untersuchung signifikant niedriger war als das mediane Alter der Hypertoniker und der HypGut. Die Gruppen zeigten keine signifikanten Unterschiede in ihrer Zusammensetzung bezüglich Geschlecht, Body Mass Index (BMI), Rauchgewohnheiten und dem vorliegen chronisch-inflammatorischer Erkrankungen wie z.B. einer chronischen Virushepatitis oder Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises. Sowohl bei der Kontrolle als auch bei den Hypertonikern lag der mediane BMI zwischen 25 und 30 kg/m<sup>2</sup>, sodass beide Patientengruppen nach WHO-Definition übergewichtig waren. 17,6 % der HypGut-Gruppe und damit signifikant mehr als in der HypSch-Gruppe hatten in einem Zeitraum von 16 Jahren bis 11 Monaten vor dem Untersuchungszeitpunkt die Erstdiagnose einer malignen Tumorerkrankung und wurden bereits operativ, chemotherapeutisch und/ oder strahlentherapeutisch behandelt. Gutartige Tumoren wurden nicht berücksichtigt. In der HypAll-Gruppe waren signifikant mehr Patienten an Diabetes mellitus erkrankt als in der Kontrollgruppe. Trotz der

hohen Diabetes mellitus-Prävalenz von 39,1 % unter den Hypertonikern betrug der mediane HbA<sub>1c</sub> 5,9 % (siehe Tabelle 3.3).

**Tabelle 3.3: Laborparameter der Studienteilnehmer.**

Diese sind nach funktionellen Systemen unterteilt dargestellt. Die Werte sind alle mit Ausnahme von den zwei Werten des Sammelurins aus dem Blut bestimmt worden. Die fett gedruckten Werte liegen über den Labor-Referenzwerten für den jeweiligen Wert (siehe Anhang). eGFR = abgeschätzte glomeruläre Filtrationsrate nach CKD-EPI-Formel. HbA<sub>1c</sub> = Glykohämoglobin, NT-proBNP = N-terminales Propeptid des Brain Natriuretic Peptide. Gezeigt ist jeweils der Median (Q1-Q3) und die Fallzahl (n) oder die Anzahl mit prozentualem Anteil. \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001 verglichen zur Kontrolle. °°°p ≤ 0,001 verglichen zu HypGut.

	Kontrolle	HypGut	HypSch	HypAll
<u>Nierenfunktion:</u>				
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	82 (77-88) n = 8	75 (56-86) n = 35	77 (57-89) n = 28	75 (57-87) n = 63
Harnstoff [mg/dl]	23 (23-25) n = 8	38 (28-48)** n = 36	35 (28-41)** n = 28	36 (28-46)*** n = 64
Kreatinin [mg/dl]	1,01 (0,78-1,06) n = 8	0,89 (0,8-1,15) n = 36	0,99 (0,77-1,20) n = 28	0,96 (0,79-1,17) n = 64
Cystatin C [mg/l]		<b>1,06</b> (0,93-1,27) n = 22	<b>0,99</b> (0,86-1,29) n = 22	<b>1,00</b> (0,88-1,28) n = 44
<u>Sammelurin:</u>				
Proteinurie	0 von 8 (0%)	4 von 21 (19%)	10 von 19 (52,6%) *,°	14 von 40 (35%)*p=0,09
Albuminurie	0 von 8 (0%)	2 von 21 (9,5%)	12 von 18 (66,7%)**°,°°	14 von 39 (35,9%)*p=0,08
<u>RAAS:</u>				
ACE [U/l]		8 (7-27) n = 15	27 (8-37) n = 20	18 (7-33) n = 35
Renin [ng/l]	7,8 (6,9-10,1) n = 8	11,6 (6,5-39,8) n = 31	6,2 (2,5-15,4) n = 25	9,2 (4,2-28,4) n = 56
Aldosteron [ng/l]	45 (38-66) n = 8	66 (39-119) n = 31	52 (36-101) n = 25	58 (37-117) n = 56
Aldosteron- Renin-Quotient	5,6 (4,9-8,5) n = 8	4,2 (1,2-12,9) n = 31	12,0 (2,3-16,4) n = 25	7,4 (1,5-16,4) n = 56

## Ergebnisse

	Kontrolle	HypGut	HypSch	HypAll
<u>Stoffwechsel:</u>				
HbA <sub>1c</sub> [%]	5,6 (5,5-5,7) n = 5	5,9 (5,6-6,4) n = 34	6,0 (5,5-6,6) n = 28	5,9 (5,5-6,5) n = 62
Cholesterin [mg/dl]	<b>236</b> (210-256) n = 8	194 (160-221)* n = 34	182 (146-224)* n = 28	187 (158-221)** n = 62
Triglyceride [mg/dl]	142 (114-193) n = 8	126 (104-217) n = 35	122 (94-205) n = 28	124 (98-214) n = 63
Harnsäure [mg/dl]		5,9 (5,1-7,8) n = 25	5,8 (5,1-7,5) n = 24	5,8 (5,1-7,8) n = 49
Protein [g/dl]	7,2 (6,9-7,5) n = 8	7,1 (6,8-7,3) n = 36	7,0 (6,8-7,3) n = 27	7,0 (6,8-7,3) n = 63
<u>Weitere:</u>				
NT-proBNP [pg/ml]	41 (30-62) n = 8	<b>103</b> (48-434)* <sub>p=0,08</sub> n = 32	<b>154</b> (75-413)* n = 27	<b>109</b> (59-433)** n = 59
CRP [mg/dl]	0,08 (0,06-0,23) n = 8	0,27 (0,07-0,50) n = 9	0,22 (0,16-0,71) n = 5	0,25 (0,10-0,50) n = 14

Die Harnstoffwerte betrachtend zeigten die Hypertoniker-Gruppen eine signifikant schlechtere Nierenfunktion. Im Sammelurin über 24 Stunden wiesen Patienten der HypSch-Gruppe signifikant häufiger eine Protein- und Albuminurie auf als die der Kontroll- und HypGut-Gruppe. Im RAAS ergaben sich keine signifikanten Gruppenunterschiede. Die Kontrollen hatten einen signifikant erhöhten Cholesterinwert im Vergleich zu den Hypertonikern bei jedoch seltenerer Einnahme von Statinen (siehe Tabelle 3.6). Andere Stoffwechsel-Parameter waren über die Gruppen ähnlich ausgeprägt. Als Marker der Herzinsuffizienz war das NT-proBNP bei den HypSch und HypAll im Vergleich zu den Kontrollen signifikant erhöht messbar. Der Entzündungsmarker C-reaktives Protein (CRP) lag in den Hypertoniker-Gruppen tendenziell erhöht vor, wurde jedoch nur bei insgesamt 22 Studienteilnehmern bestimmt.



**Tabelle 3.4: Systolische Blutdruckwerte der Studienteilnehmer.**

Zum einen sind die Messungen während der körperlichen Untersuchung im Sitzen und zum anderen während des ABDM dargestellt. Als Dipping wird ein nächtlicher Blutdruckabfall > 10 % des Tagesmittelwertes bezeichnet. Gezeigt ist jeweils der Median (Q1-Q3) oder die Anzahl mit prozentualem Anteil. \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01, \*\*\*p ≤ 0,001 verglichen zur Kontrolle. °p ≤ 0,05, °°p ≤ 0,01, °°°p ≤ 0,001 verglichen zu HypGut.

	Kontrolle	HypGut	HypSch	HypAll
<u>Praxis-Messung:</u>				
Anzahl	8	34	27	61
Systole im Sitzen [mmHg]	138 (129-140)	143 (127-152)	154 (148-172)*,°°	149 (136-162)*p=0,09
<u>ABDM:</u>				
Anzahl	8	32	22	54
Systole Gesamt [mmHg]	126 (123-132)	129 (121-134)	154 (146-160)***,°°°	136 (128-151)*
Systole Tag [mmHg]	133 (125-137)	132 (124-137)	158 (151-166)***,°°°	140 (129-154)*p=0,07
Systole Nacht [mmHg]	118 (114-124)	120 (115-127)	142 (134-157)***,°°°	131 (119-138)*
Dipper	5 von 8 (62,5%)	11 von 32 (34,4%)	10 von 22 (45,5%)	21 von 54 (38,9%)

Tabelle 3.4 zeigt die während der körperlichen Untersuchung am sitzenden Patienten und die während des ABDM gemessenen systolischen Blutdruckwerte. Der Gruppeneinteilung entsprechend fanden sich bei den HypSch signifikant höhere systolische Blutdruckwerte als bei der Kontrolle und den HypGut. Unter den HypAll waren erwartungsgemäß, wenn auch nicht signifikant, weniger Dipper.

**Tabelle 3.5: Sekundäre Hypertonieformen bei den Studienteilnehmern.**

Gezeigt ist jeweils die Anzahl mit prozentualem Anteil. \* $p \leq 0,05$  verglichen zur Kontrolle.

	Kontrolle	HypGut	HypSch	HypAll
Primärer Hyperaldosteronismus	0 von 8 (0%)	2 von 33 (6,1%)	3 von 26 (11,5%)	5 von 59 (8,5%)
OSAS	0 von 8 (0%)	11 von 26 (42,3%)*	9 von 20 (45%)*	20 von 46 (43,5%)*
Phäochromozytom	0 von 8 (0%)	0 von 33 (0%)	0 von 25 (0%)	0 von 58 (0%)
Nierenarterienstenose	0 von 8 (0%)	0 von 31 (0%)	0 von 24 (0%)	0 von 55 (0%)

Es gab keine signifikanten Unterschiede unter den Hypertoniker-Gruppen bezüglich der Prävalenz sekundärer Hypertonieformen. Die mit Abstand häufigste Ursache einer sekundären Hypertonie war das OSAS. Insgesamt 5 Studienteilnehmer hatten einen nachgewiesenen primären Hyperaldosteronismus. Ein Phäochromozytom oder eine Nierenarterienstenose lag bei keinem der Studienteilnehmer vor.

**Tabelle 3.6: Medikation der Studienteilnehmer.**

Neben der detaillierten Auflistung der eingenommenen Antihypertensiva ist die Einnahme von Statinen dargestellt. Gezeigt ist jeweils die Anzahl mit prozentualem Anteil oder der Median (Q1-Q3). \* $p \leq 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$  verglichen zur Kontrolle. ° $p \leq 0,05$  verglichen zu HypGut.

	Kontrolle	HypGut	HypSch	HypAll
Anzahl	8	36	28	64
ACE-Hemmer	0 (0%)	18 (50%)*	11 (39,3%)* $p=0,08$	29 (45,3%)*
AT <sub>1</sub> R-Blocker	0 (0%)	15 (41,7%)*	12 (42,9%)*	27 (42,2%)*
Aldosteronantagonist	0 (0%)	9 (25%)	7 (25%)	16 (25%)
Renininhibitor	0 (0%)	1 (2,8%)	1 (3,6%)	2 (3,1%)
Diuretikum	0 (0%)	28 (77,8%)*	21 (75%)*	49 (76,6%)*
Calciumantagonist	0 (0%)	32 (88,9%)*	19 (67,9%)* $p=0,06$	51 (79,7%)*
Betablocker	0 (0%)	29 (80,6%)*	20 (71,4%)*	49 (76,6%)*
Alpha-1-Blocker	0 (0%)	11 (30,6%)	14 (50%)*	25 (39,1%)*
Antisymphotonikum	0 (0%)	14 (38,9%)*	9 (32,1%)	23 (35,9%)*
Direkter Vasodilatator	0 (0%)	2 (5,6%)	4 (14,3%)	6 (9,4%)

	Kontrolle	HypGut	HypSch	HypAll
Anzahl Antihypertensiva	0	5 (3,5-6)***	5 (2,5-6)***	5 (3-6)***
Statine	1 (12,5%)	16 (44,4%)	10 (35,7%)	26 (40,6%)

Gemäß der Gruppeneinteilung zeigten sich signifikante Unterschiede bei der Einnahme von Antihypertensiva zwischen der Kontroll- und den Hypertonikergruppen. Patienten sowohl der HypGut- als auch der HypSch-Gruppe nahmen im Median 5 Antihypertensiva ein. Die 3 in beiden Gruppen am häufigsten eingenommene Substanzklassen waren Calciumantagonisten, Diuretika und Betablocker. Auch wurden ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>R-Blocker in beiden Gruppen in ähnlicher Häufigkeit eingenommen. Aldosteronantagonisten wurden sowohl in der HypGut- als auch in der HypSch-Gruppe von 25 % eingenommen. Renininhibitoren waren mit Abstand die am seltensten angewandten RAAS-wirksamen Antihypertensiva. Antihypertensiva der zweiten Wahl wie Alpha-1-Blocker wurden tendenziell häufiger von den HypSch eingenommen.

### 3.2 Marker für oxidativen Stress

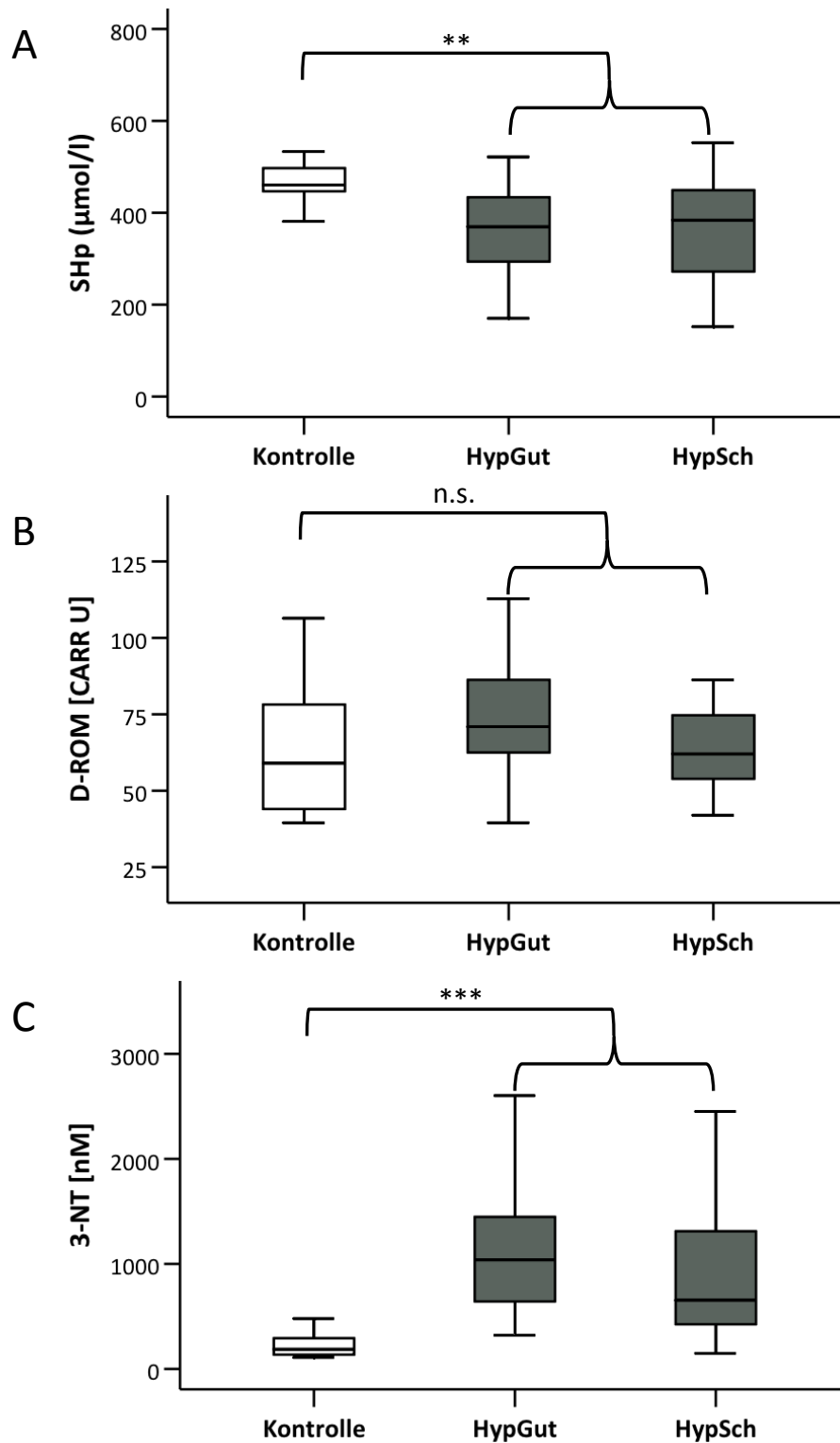
Zur Ermittlung der Level oxidativen Stresses in den Studienteilnehmern wurden mehrere Biomarker sowohl in ihrem Urin als auch in ihrem Blutplasma bestimmt. Hierbei ist in Abbildung 3.1 und Abbildung 3.2 zu sehen, dass die HypAll-Gruppe verglichen zur Kontroll-Gruppe für alle Marker mit Ausnahme von MDA höhere Stresslevel aufwies. Für SHp ( $p \leq 0,01$ ), 3-Nitrotyrosin ( $p \leq 0,001$ ) und 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan ( $p \leq 0,05$ ) waren diese Unterschiede signifikant, wohingegen 8-oxodG und D-ROM lediglich nicht-signifikante Unterschiede zeigten. Nach Korrektur der Gruppenunterschiede für das Alter, verblieb dieser signifikante Unterschied für SHp und 3-Nitrotyrosin, wobei das Alter bei SHp auch einen signifikanten Einfluss zeigte. Für 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan wurde der Gruppenunterschied durch den Einfluss des Alters nicht-signifikant (siehe Tabelle 3.7).

**Tabelle 3.7: ANCOVA einzelner Marker für oxidativen Stress.**

Für die 3 Marker, welche einen signifikanten Gruppenunterschied zwischen Kontrolle und HypAll zeigten, wurde eine ANCOVA durchgeführt. Angegeben sind der korrigierte Determinationskoeffizient ( $R^2$ ), die Fallzahl (n) und Signifikanz (p) des Modells sowie die Signifikanz des Faktors Gruppe (Kontrolle vs. HypAll) und der Kovariate Alter.

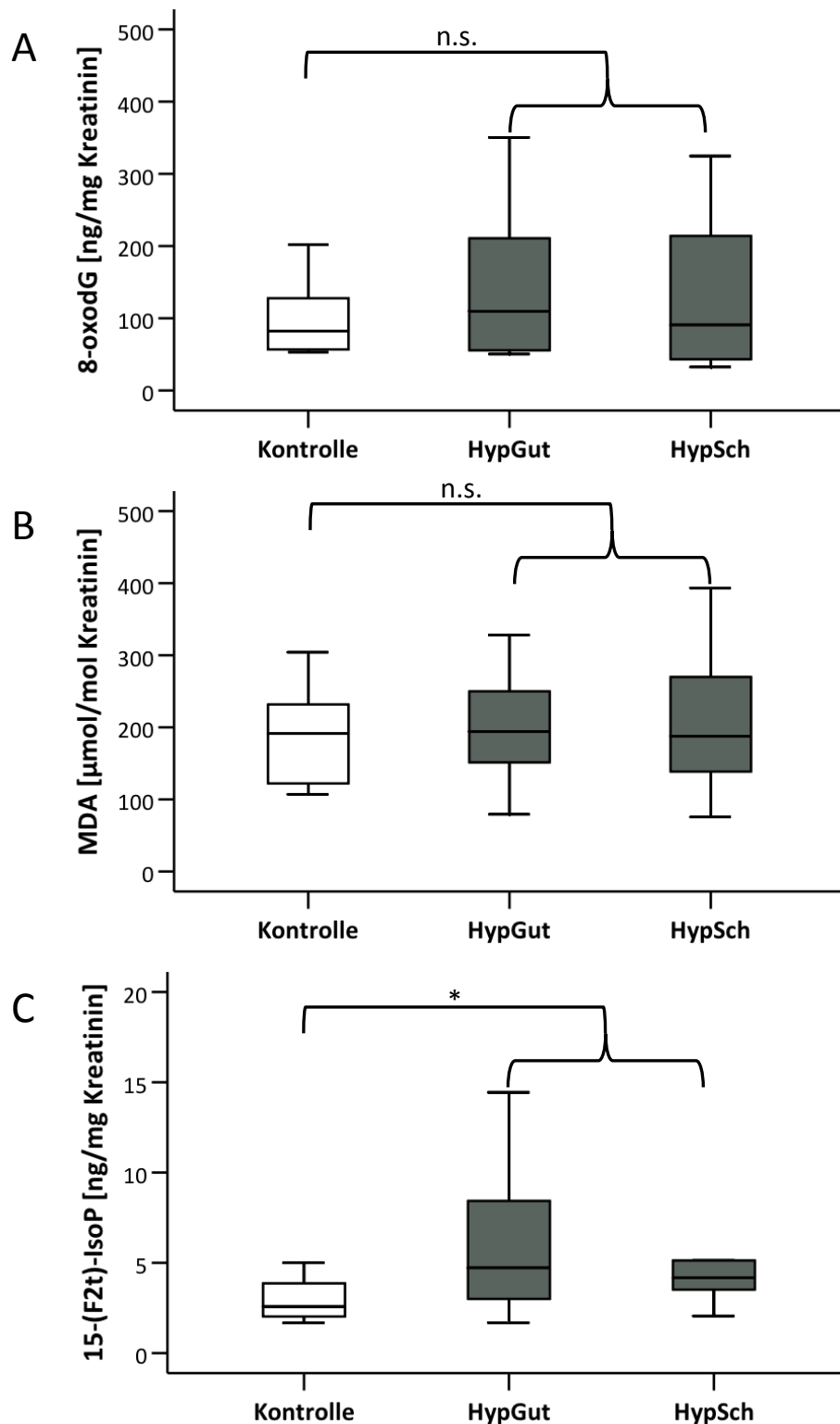
	Kor. $R^2$	n	p (Modell)	p (Gruppe)	p (Alter)
SHp	.31	57	$\leq 0,001$	0,043	$\leq 0,001$
3-NT	.35	65	$\leq 0,001$	$\leq 0,001$	0,148
15-F <sub>2t</sub> -IsoP	.26	34	0,003	0,087	0,008

Beim Vergleich der Hypertoniker-Untergruppen mit der Kontrollgruppe waren weniger signifikante Unterschiede auszumachen. SHp lag bei den HypSch signifikant ( $p \leq 0,05$ ) und bei den HypGut knapp nicht-signifikant ( $p = 0,06$ ) niedriger vor als bei den Kontrollen. Dabei sprechen hohe SHp-Level für weniger oxidativen Stress und ein höheres antioxidatives Potenzial. 3-Nitrotyrosin war sowohl bei HypGut ( $p \leq 0,001$ ) als auch HypSch ( $p \leq 0,01$ ) signifikant erhöht. Es fällt zudem auf, dass die HypGut-Gruppe für alle Marker tendenziell höhere Level an oxidativem Stress als die HypSch-Gruppe zeigte.



**Abbildung 3.1: Marker für oxidativen Stress gemessen im Plasma.**

A: Boxplot der freien Thiolgruppen in Proteinen (SHp) als Marker des antioxidativen Potenzials (n = 57). B: Boxplot der D-ROM (n = 69). C: Boxplot des 3-Nitrotyrosin (n = 65). Gezeigt wird jeweils der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe, HypGut und HypSch. Die Klammern geben den Vergleich HypAll zur Kontrolle an mit n.s. = nicht-signifikant, \*\*p ≤ 0,01 und \*\*\*p ≤ 0,001.



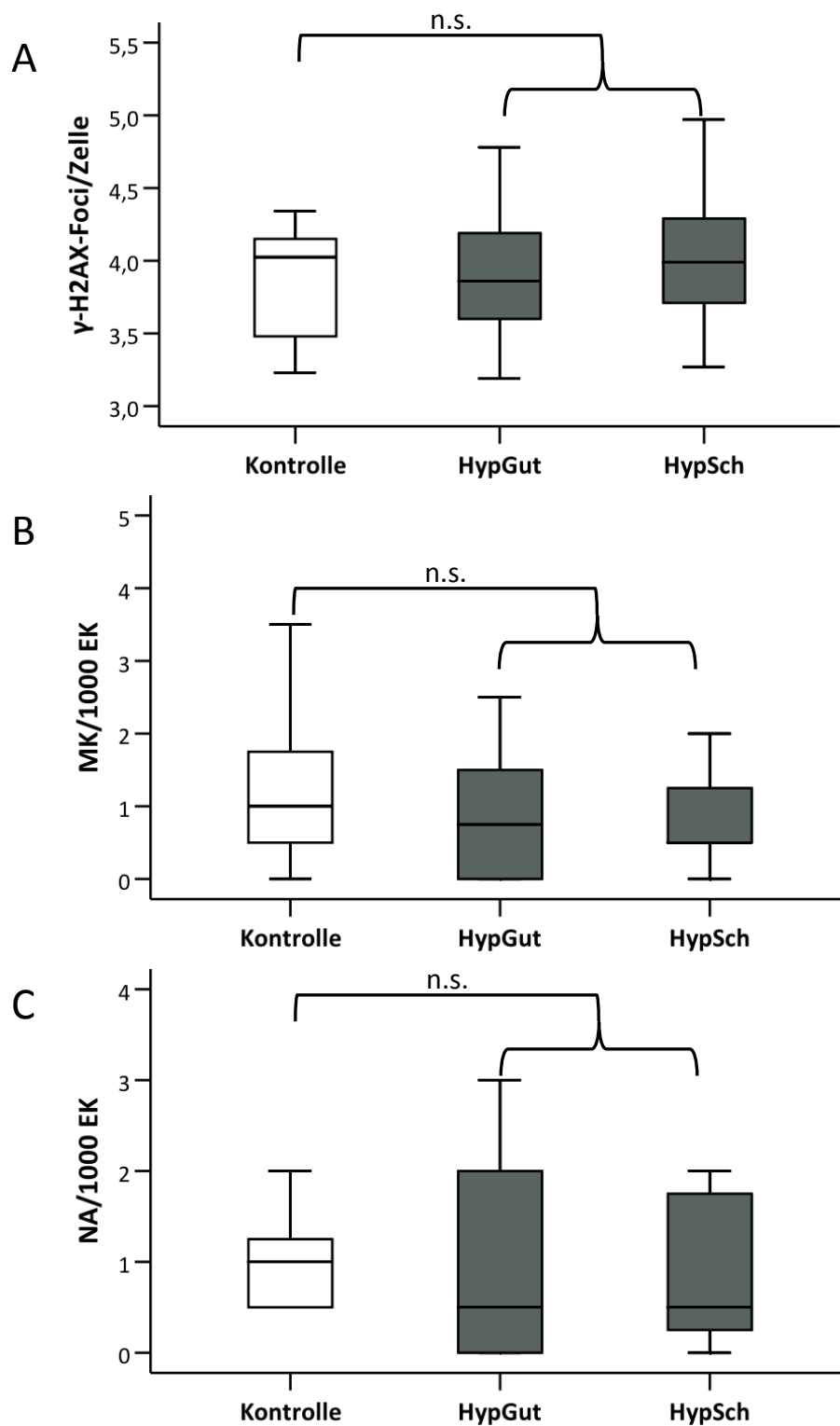
**Abbildung 3.2: Marker für oxidativen Stress gemessen im Urin.**

A: Boxplot des 8-oxodG (n = 34). B: Boxplot des Malondialdehyd (n = 34). C: Boxplot des 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan (n = 34). Gezeigt wird jeweils der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe, HypGut und HypSch. Die Klammern geben den Vergleich HypAll zur Kontrolle an mit n.s. = nicht-signifikant und \*p ≤ 0,05.

### **3.3 Marker für DNA-Schäden**

Zur Detektion von DNA-Schäden wurden in Lymphozyten des peripheren Blutes der Studienteilnehmer  $\gamma$ -H2AX als Marker für DNA-Doppelstrangbrüche und Mikrokerne als Marker für chromosomale Aberrationen bestimmt.

Aufgrund der sehr geringen Ausprägung der im Mikrokernfrequenztest neben den Mikrokernen detektierbaren Anomalien wie NBUDs und NBLEBs wurden diese hier nicht einzeln graphisch dargestellt, sondern als nukleäre Anomalien zusammengefasst. Mittels der Marker konnten keine signifikanten Unterschiede an DNA-Schäden zwischen den Gruppen festgestellt werden (siehe Abbildung 3.3). Tendenziell waren die DNA-Schäden bei den Hypertonikern sogar erniedrigt.



**Abbildung 3.3: Marker für DNA-Schäden in Lymphozyten.**

A: Boxplot der  $\gamma$ -H2AX-Foci/Zelle (n = 51). B: Boxplot der Mikrokerne/1000 einkernige Zellen (n = 32). C: Boxplot der Nukleären Anomalien/1000 einkernige Zellen (n = 32). Gezeigt wird jeweils der Vergleich zwischen der Kontrollgruppe, HypGut und HypSch. Die Klammern geben den Vergleich HypAll zur Kontrolle an mit n.s. = nicht-signifikant.



### **3.4 Korrelationsanalyse**

Es erfolgte eine Korrelationsanalyse mit den Markern für oxidativen Stress und DNA-Schäden anhand der zur ersten Visite erhobenen klinischen Parameter. Da keine normalverteilten Daten vorlagen, wurde der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman angewandt.

#### **3.4.1 Korrelation mit Blutdruckwerten**

Ausgenommen einer negativen Korrelation zwischen D-ROM und dem systolischen Gesamt-Blutdruck im ABDM ( $r = -.27, p \leq 0,05$ ) konnten keine Korrelationen mit ausreichender Effektstärke und Signifikanz zwischen den Markern für oxidativen Stress bzw. DNA-Schäden mit den systolischen Blutdruckwerten festgestellt werden.

#### **3.4.2 Korrelation unter den Markern**

Unter den Markern für oxidativen Stress korrelierte lediglich SHp mit 3-Nitrotyrosin signifikant ( $r = -.63, p \leq 0,01$ ). Die Marker für DNA-Schäden wiesen untereinander keine Korrelationen auf. Die einzige Korrelation zwischen Markern für oxidativen Stress und DNA-Schäden war zwischen 3-Nitrotyrosin und nukleären Anomalien zu sehen, welche überraschenderweise negativ war ( $r = -.49, p \leq 0,01$ ).

#### **3.4.3 Korrelation mit anderen klinischen Parametern**

Bei der Korrelationsanalyse zwischen den Markern für oxidativen Stress bzw. DNA-Schäden mit den anderen metrisch skalierten klinischen Parametern aus Abschnitt 3.1.2 wiesen vor allem SHp, 3-Nitrotyrosin und 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan effektstarke und signifikante Korrelationen auf. Alle 3 korrelierten signifikant mit dem Alter (für SHp siehe Abbildung 3.4), dem Herzinsuffizienzmarker NT-proBNP und dem Serumprotein (siehe Tabelle 3.8). SHp und 3-Nitrotyrosin korrelierten darüber hinaus mit Nierenfunktionsparametern (für 3-Nitrotyrosin siehe Abbildung 3.5), Cholesterin und Renin. Bei 8-oxodG fielen Korrelationen mit metabolischen Parametern wie BMI oder Harnsäure auf. D-ROM und MDA wiesen keine relevanten Korrelationen auf.

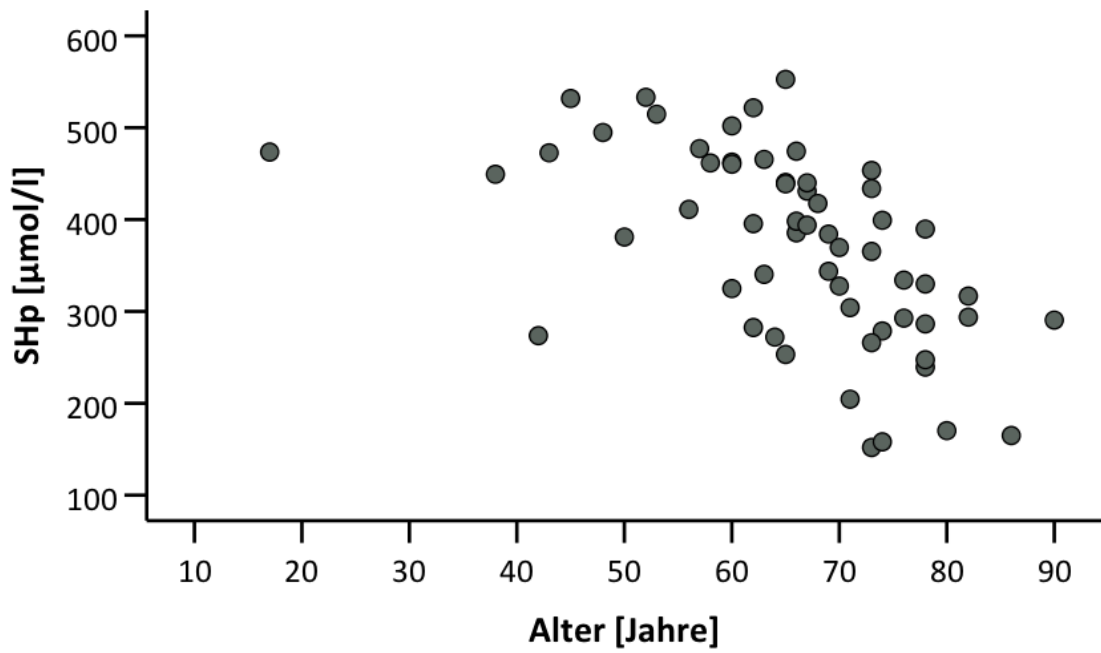


Abbildung 3.4: Korrelationsanalyse von SHp bezogen auf das Alter.

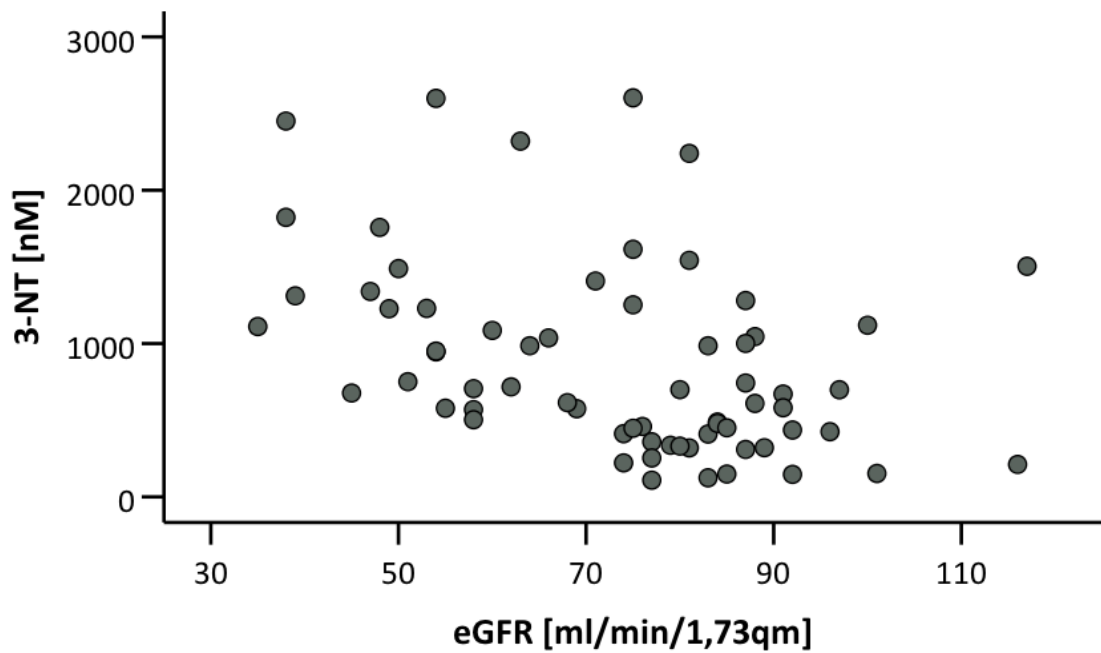


Abbildung 3.5: Korrelationsanalyse von 3-Nitrotyrosin bezogen auf den Nierenfunktionsparameter eGFR.

**Tabelle 3.8: Korrelationsanalyse der Marker für oxidativen Stress und klinische Parameter.**

Dargestellt sind alle Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman  $\geq .20$  mit jeweiliger Fallzahl (n) und Signifikanzniveau: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ . Stellvertretend für die Nierenfunktion wurde die eGFR gezeigt, wobei die anderen hier nicht gezeigten Parameter der Nierenfunktion aus Blut und Sammelurin ebenfalls signifikant korrelierten.

	Alter	eGFR	NT-proBNP	Serumprotein	BMI	Harnsäure	Cholesterin	CRP	Renin
SHp	-.64** n = 59	.49** n = 58	-.52** n = 55	.39** n = 57		-.29 n = 37	.30* n = 56		-.28* n = 55
D-ROM								.31 n = 22	
3-NT	.37** n = 67	-.45** n = 66	.39** n = 61	-.28* n = 64		.36* n = 44	-.40** n = 64	.22 n = 18	.31* n = 59
8-oxodG					-.52** n = 34	-.61** n = 20			-.21 n = 33
15-F <sub>2t</sub> -IsoP	.44** n = 34		.35* n = 34	-.39* n = 34		-.27 n = 20		.39 n = 18	
MDA	.26 n = 34		.33 n = 34		-.26 n = 34	-.20 n = 20	.24 n = 3		

Bei der Korrelationsanalyse der Marker für DNA-Schäden hob sich der Marker  $\gamma$ -H2AX durch eine starke positive Korrelation mit CRP (siehe Abbildung 3.6) und negative Korrelationen mit dem Gesamteiweiß und Cholesterin hervor. Die Mikrokerne korrelierten negativ mit Renin (siehe Tabelle 3.9).

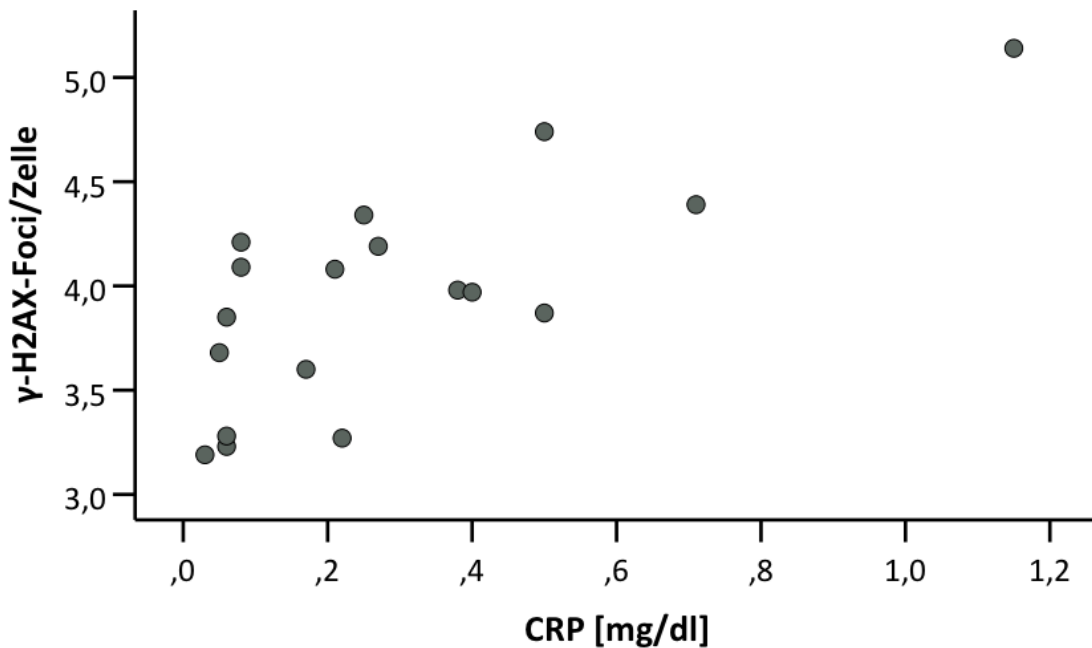


Abbildung 3.6: Korrelationsanalyse von  $\gamma$ -H2AX bezogen auf das Akute-Phase-Protein CRP.

Tabelle 3.9: Korrelationsanalyse der Marker für DNA-Schäden und klinische Parameter.

Dargestellt sind alle Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman  $\geq .20$  mit jeweiliger Fallzahl (n) und Signifikanzniveau: \*\*p  $\leq 0,01$ .

	Alter	eGFR	NT-proBNP	Serumprotein	BMI	Harnsäure	Cholesterin	CRP	Renin
$\gamma$ -H2AX	.21 n = 51			-.40** n = 51			-.32* n = 50	.70** n = 18	
MK						-.22 n = 21			-.47** n = 32
NA				-.27 n = 32	-.24 n = 32	-.31 n = 21	.25 n = 32		

### 3.5 Einflussfaktoren auf die Marker für oxidativen Stress und DNA-Schäden

Bekannte klassische Einflussfaktoren auf Zielgrößen in medizinischen Studien sind das Alter, das Geschlecht und der BMI. Hinweise für deren Einfluss auf die hier untersuchten Studiengruppen hinsichtlich der Ausprägung von oxidativem Stress und DNA-Schäden ergaben sich bereits in der Korrelationsanalyse. Im Folgenden

wurden neben den klassischen demographischen Einflussfaktoren weitere wie das Rauchverhalten oder Begleiterkrankungen untersucht. Metrische Variablen, für welche bereits in Abschnitt 3.4.3 signifikante und teils starke Korrelationen mit den Markern für oxidativen Stress und DNA-Schäden festgestellt wurden, wurden im Folgenden auf ihre Korrelationen untereinander untersucht (siehe Tabelle 3.10). Für kategoriale Variablen erfolgte eine Einteilung in entsprechende Gruppen mit anschließender Prüfung auf signifikante Unterschiede mittels Mann-Whitney-U-Test.

**Tabelle 3.10: Interkorrelationsanalyse verschiedener klinischer Parameter.**

Dargestellt ist der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman mit jeweiliger Fallzahl (n) und Signifikanzniveau: \*p ≤ 0,05, \*\*p ≤ 0,01.

	Alter	eGFR	NT-proBNP	Serumprotein	BMI	Harnsäure	CRP	Cholesterin
Alter								
eGFR	-.46** n = 73							
NT-proBNP	.48** n = 68	-.46** n = 67						
Serumprotein	-.24* n = 71	.19 n = 70	-.28* n = 66					
BMI	-.11 n = 73	-.08 n = 72	.04 n = 67	-.04 n = 71				
Harnsäure	.11 n = 49	-.42** n = 48	.06 n = 45	.15 n = 48	.30* n = 49			
CRP	.20 n = 22	-.13 n = 22	.21 n = 22	-.17 n = 21	.43* n = 22	.33 n = 8		
Cholesterin	-.05 n = 71	.21 n = 61	-.21 n = 66	.25* n = 69	-.48** n = 71	-.16 n = 48	-.30 n = 22	
Renin	.12 n = 64	-.25* n = 63	-.14 n = 62	.04 n = 64	.20 n = 64	.40** n = 43	-.38 n = 21	-.22 n = 63

### 3.5.1 Alter

Die Altersstruktur der Hypertoniker- bzw. Kontroll-Gruppen konnte als signifikant unterschiedlich beschrieben werden (siehe Tabelle 3.2). Es war zudem festzustellen, dass das Alter ähnlich wie die Stressmarker für oxidativen Stress (siehe Tabelle 3.8) mit der eGFR, dem NT-proBNP und dem Serumprotein korrelierte (siehe Tabelle 3.10).

### 3.5.2 Nierenfunktion

Für die weiteren Auswertungen wurde stellvertretend für die Nierenfunktion die eGFR verwendet. Diese zeigte adäquate Korrelationen mit den anderen Parametern der Nierenfunktion (siehe Tabelle 3.11).

**Tabelle 3.11: Korrelationsanalyse der eGFR und anderen Parametern der Nierenfunktion.**

Dargestellt ist der Rangkorrelationskoeffizient nach Spearman mit jeweiliger Fallzahl (n) und Signifikanzniveau: \*\* $p \leq 0,01$ .

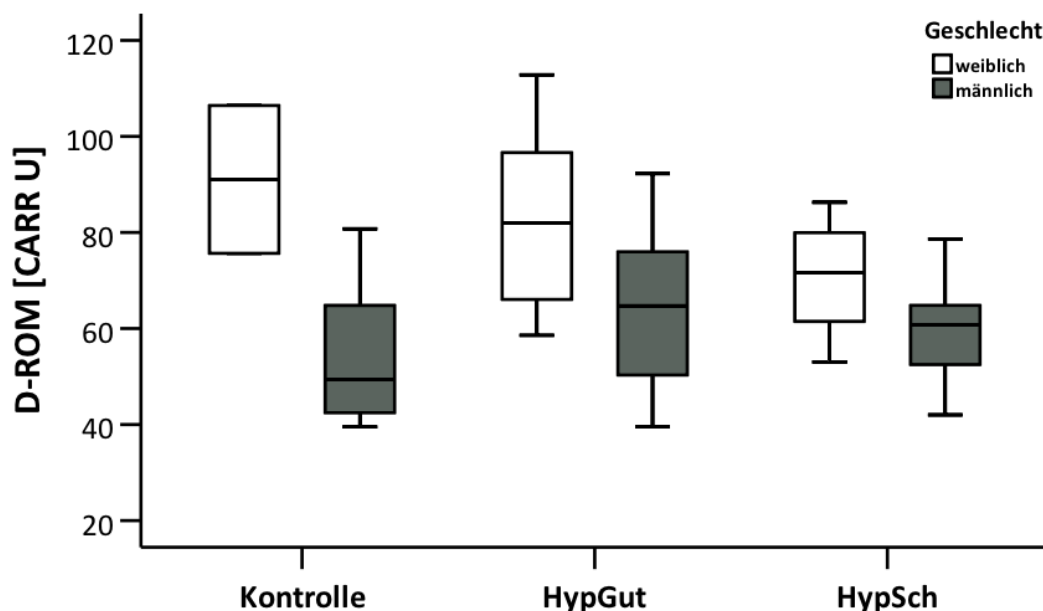
	Kreatinin	Harnstoff	Cystatin C
eGFR	-.83** n = 73	-.67** n = 72	-.79** n = 43

In Tabelle 3.10 ist zu sehen, dass sich die Korrelationen der Nierenfunktion ähnlich zu denen des Alters und damit auch zu denen der Marker für oxidativen Stress (siehe Tabelle 3.8) verhielten. Zusätzlich korrelierte sie negativ mit der Harnsäure. Patienten mit einer Albuminurie waren über alle Studienteilnehmer gesehen tendenziell älter und hatten signifikant weniger SHp ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 39$ ). Innerhalb der HypSch-Gruppe war  $\gamma$ -H2AX bei Albuminurie-Patienten signifikant erhöht ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 13$ ).

### 3.5.3 Geschlecht

Nach zusätzlicher Unterteilung der Studienteilnehmer nach Geschlecht zeigten sich bei den Markern für DNA-Schäden keine und bei den Markern für oxidativen Stress deutliche Veränderungen. D-ROM lag über alle Studienteilnehmer hinweg bei Frauen signifikant erhöht vor ( $p \leq 0,001$ ,  $n = 69$ ) (siehe Abbildung 3.7). Für 3-Nitrotyrosin konnte nur bei Frauen der HypGut-Gruppe gesteigerte Werte

festgestellt werden ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 31$ ). Hingegen hatten Frauen in der HypSch-Gruppe in Bezug auf 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan niedrigere Werte ( $p \leq 0,01$ ,  $n = 10$ ).



**Abbildung 3.7: Marker für oxidativen Stress D-ROM getrennt nach Blutdruck-Gruppen und Geschlecht.**

Gezeigt wird ein Boxplot mit dem Vergleich zwischen der Kontrollgruppe ( $n = 8$ ), HypGut ( $n = 34$ ) und HypSch ( $n = 27$ ) mit zusätzlicher Unterteilung nach dem Geschlecht.

### 3.5.4 Stoffwechselfparameter

Der BMI zeigte bei der Korrelationsanalyse mit den Markern für oxidativen Stress und DNA-Schäden eine negative Korrelation mit 8-oxodG ( $r = -.52$ ,  $p \leq 0,01$ ). Positiv korrelierte er mit der Harnsäure und dem CRP, überraschenderweise negativ hingegen mit dem Cholesterin (siehe Tabelle 3.10).

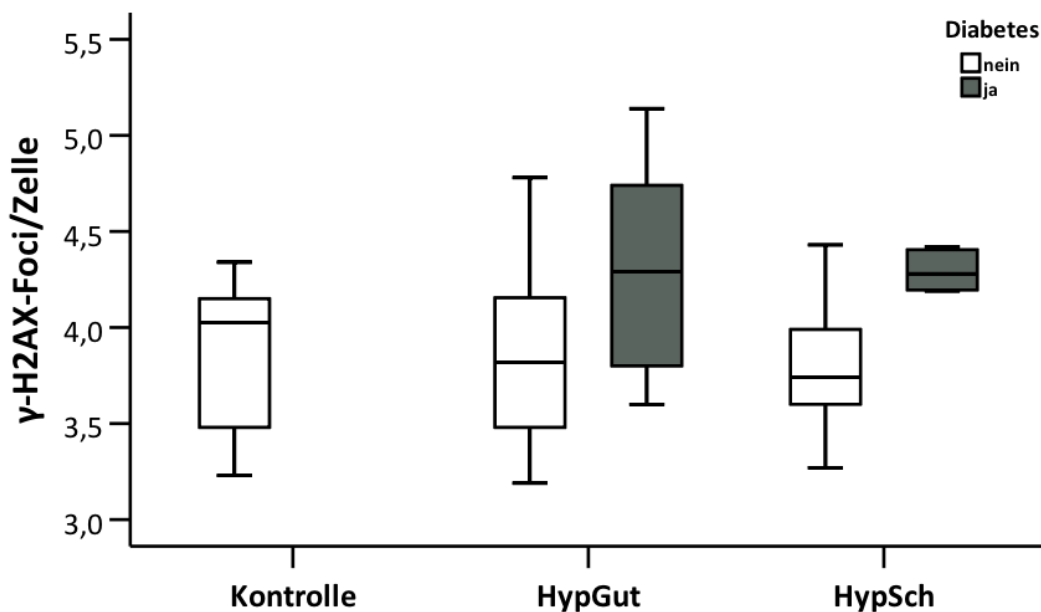
Das Serumprotein und das Cholesterin zeigten Korrelationen mit Markern für sowohl oxidativen Stress als auch Genomschäden. Niedrige Level an Serumprotein und Cholesterin waren demnach mit höheren Leveln an oxidativem Stress und  $\gamma$ -H2AX assoziiert (siehe Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9).

### 3.5.5 Begleiterkrankungen

Bei Tumorkranken lag über alle Studienteilnehmer gesehen ein signifikant erhöhtes 3-Nitrotyrosin vor ( $p \leq 0,05$ ). Die niedrige Fallzahl der Tumorkranken ( $n = 6$ ) ist zu berücksichtigen.

Diabetiker wiesen keine erhöhten Marker für oxidativen Stress auf. Jedoch war der Marker für DNA-Doppelstrangbrüche,  $\gamma$ -H2AX, über alle Studienteilnehmer gesehen bei Diabetikern signifikant erhöht ( $p \leq 0,001$ ,  $n = 51$ ) (siehe Abbildung 3.8).

Der Herzinsuffizienzmarker NT-proBNP zeigte Korrelationen zu erhöhtem oxidativen Stress in Form einer negativen Korrelation mit SHp und positiven Korrelation mit 3-Nitrotyrosin (siehe Tabelle 3.8).



**Abbildung 3.8: Marker für DNA-Doppelstrangbrüche  $\gamma$ -H2AX getrennt nach Blutdruck-Gruppen und Diabetes mellitus.**

Gezeigt wird ein Boxplot mit dem Vergleich zwischen der Kontrollgruppe ( $n = 8$ ), HypGut ( $n = 22$ ) und HypSch ( $n = 21$ ) mit zusätzlicher Unterteilung nach der Begleiterkrankung Diabetes mellitus.

### 3.5.6 Entzündung

Patienten mit chronisch-entzündlicher Erkrankung wiesen, bei allerdings auch geringer Fallzahl ( $n = 7$ ), keine erhöhten Marker für oxidativen Stress oder DNA-Schäden auf.

3-Nitrotyrosin und 8-oxodG zeigten entgegengesetzte Korrelationen mit der potenziell entzündliche Krankheitsverläufe verursachenden Harnsäure.

Das Akute-Phase-Protein CRP korrelierte positiv mit  $\gamma$ -H2AX (siehe Tabelle 3.9).



### **3.5.7 Rauchen**

Raucher zeigten weder erhöhte Marker für oxidativen Stress noch für DNA-Schäden auf. Auch hier war die Fallzahl der untersuchten Untergruppe sehr gering (n = 7).

### **3.5.8 Dipping**

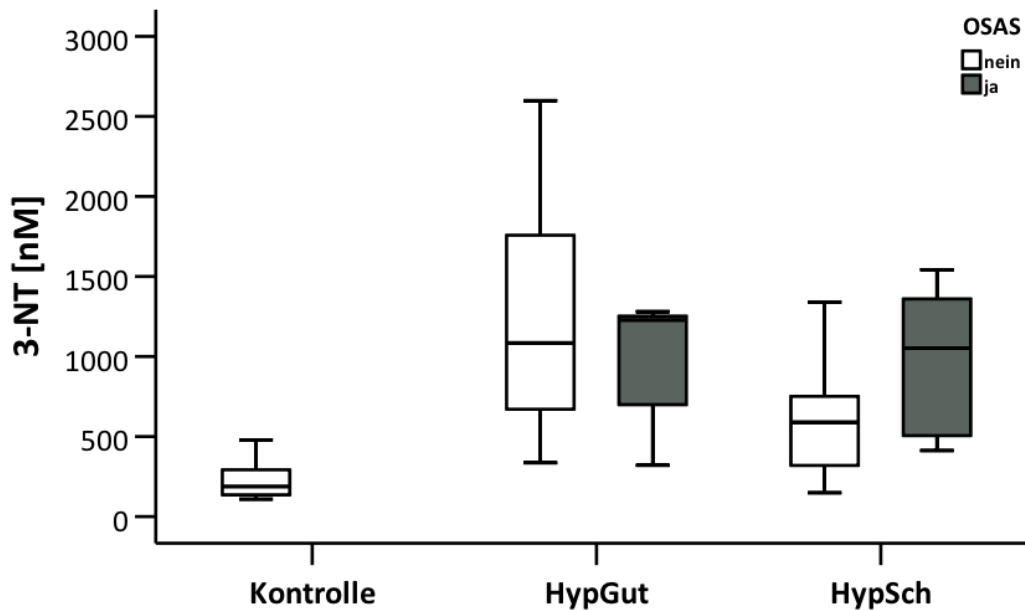
Dipper wiesen über alle Studienteilnehmer gesehen ein jüngeres Alter auf ( $p \leq 0,05$ , n = 62), sodass bei der weiteren Betrachtung ein Alterseffekt anzunehmen war. Sie zeigten über alle Studienteilnehmer gesehen tendenziell weniger oxidativen Stress mit höheren SHp- und niedrigeren 3-Nitrotyrosin-Werten.

### **3.5.9 Statine**

Studienteilnehmer, die keine Statine einnahmen, hatten ein signifikant höheres SHp ( $p \leq 0,05$ , n = 57), wobei diese Patientengruppe auch signifikant jünger war ( $p \leq 0,001$ , n = 72).

### **3.5.10 Sekundäre Hypertonie**

Patienten mit einem OSAS hatten über alle Studienteilnehmer gesehen signifikant erhöhtes 3-Nitrotyrosin ( $p \leq 0,05$ , n = 48) (siehe Abbildung 3.9) und tendenziell erhöhtes 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan.



**Abbildung 3.9: Marker für oxidativen Stress 3-Nitrotyrosin getrennt nach Blutdruck-Gruppen und OSAS.**

Gezeigt wird ein Boxplot mit dem Vergleich zwischen der Kontrollgruppe (n = 8), HypGut (n = 22) und HypSch (n = 18) mit zusätzlicher Unterteilung nach der sekundären Hypertonieursache OSAS.

Bei der Betrachtung der Patienten mit nachgewiesenem primären Hyperaldosteronismus konnten keine signifikant veränderten Marker festgestellt werden, wobei jedoch die Fallzahl (n = 5) sehr gering war.

Renin zeigte Korrelationen mit Markern für sowohl oxidativen Stress als auch DNA-Schäden. Hohe Level an Renin waren demnach mit mehr oxidativem Stress und weniger Mikrokernen assoziiert (siehe Tabelle 3.8 und Tabelle 3.9). In Tabelle 3.10 fiel zudem eine positive Korrelation mit der Harnsäure auf.

### 3.5.11 Antihypertensiva

Patienten, welche RAAS-wirksame Medikamente einnahmen, waren signifikant älter ( $p \leq 0,05$ , n = 72) und wiesen über alle Studienteilnehmer gesehen signifikant höhere Level oxidativen Stresses, gemessen an SHp ( $p \leq 0,05$ , n = 57) und 3-Nitrotyrosin ( $p \leq 0,001$ , n = 65), auf. 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan war unter RAAS-wirksame Medikamente einnehmenden Patienten der HypSch-Gruppe erhöht ( $p \leq 0,05$ , n = 10). Ähnlich verhielt es sich für Patienten, welche Alpha-Rezeptor-wirksame Medikamente (Alpha-1-Blocker und/oder Antisymphotonika) einnahmen. Diese

waren signifikant älter ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 72$ ) und hatten über alle Studienteilnehmer gesehen weniger SHp ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 57$ ), mehr 3-Nitrotyrosin ( $p \leq 0,01$ ,  $n = 65$ ) und 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 34$ ), wiesen aber weniger D-ROM ( $p \leq 0,05$ ,  $n = 69$ ) und Nukleäre Anomalien ( $p \leq 0,01$ ,  $n = 32$ ) auf. Für Calciumantagonisten ließen sich ähnliche, aber weniger signifikante Ergebnisse erzielen.

Die Ergebnisse dieser Antihypertensiva-Betrachtung ließen auf eine relevante Beeinflussung durch das Alter schließen. Die Ursache der tendenziell unterschiedlichen Ausprägung der Marker für oxidativen Stress zwischen HypGut und HypSch (siehe Abschnitt 3.2) ließ sich daher, zumal keine signifikanten Gruppenunterschiede bei der Einnahme dieser Medikamente vorlag (siehe Tabelle 3.6), weniger in den Antihypertensiva selbst als im Alter sehen. Hierfür sprach ebenso das höhere Alter der HypGut-Gruppe.

### **3.6 Regressionsanalysen**

Im Folgenden wurden die in Abschnitt 3.5 beschriebenen Einflussfaktoren und die einzelnen Marker für oxidativen Stress/ DNA-Schäden anhand von multiplen linearen Regressionsanalysen auf ihre Beziehungen hin untersucht. Hierfür wurden alle in Spalte 1 in Tabelle 3.12 aufgeführten Einflussvariablen, teilweise nach Transformation, eingeschlossen. Für jeden Marker erfolgte eine multiple lineare Regressionsanalyse mit der Methode der Rückwärtsselektion. Die durch dieses Verfahren ermittelten Regressionsmodelle mit ihren darin aufgenommenen Einflussvariablen sind Tabelle 3.13 bis Tabelle 3.15 zu entnehmen.

Harnsäure wurde, obwohl zuvor signifikante Korrelationen mit verschiedenen Markern gezeigt worden waren, von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, da für die Kontroll-Gruppe keine Werte vorlagen. CRP und Tumorerkrankungen wurden aufgrund ihrer niedrigen Fallzahlen ebenfalls nicht in die Regressionsanalyse aufgenommen.

**Tabelle 3.12: Übersicht über signifikante Interaktionen zwischen Marker für oxidativen Stress/ DNA-Schäden und klinischen Parametern.**

	SHp	D-ROM	3-NT	8-oxodG	15-F <sub>2t</sub> - IsoP	MDA	γ- H2AX	MK	NA
Alter	x		x		x				
Systole Gesamt		x							
BMI				x					
eGFR	x		x						
Serumprotein	x		x		x		x		
NT-proBNP	x		x		x				
Cholesterin	x		x				x		
Renin	x		x					x	
Geschlecht		x	x		x				
Diabetes							x		
OSAS			x						

### 3.6.1 Regressionsanalysen der Marker für oxidativen Stress im Plasma

Bei der multiplen linearen Regressionsanalyse von SHp verblieben nach Rückwärtsselektion das Alter, die eGFR, das Serumprotein und das OSAS als signifikante Einflussvariablen im Modell (siehe Tabelle 3.13). Dieses wies eine hohe Modellgüte auf (kor.  $R^2 = .60$ ). Patienten mit einem OSAS hatten weniger SHp. Wie bereits in den vorherigen Untersuchungen, zeigte sich bei der Regressionsanalyse von D-ROM das Geschlecht als der dominanteste Einflussfaktor. Frauen hatten dabei mehr D-ROM als Männer.

In der Rückwärtsregressionsanalyse von 3-Nitrotyrosin wurden das Alter, die eGFR und das OSAS als signifikante Einflussfaktoren in das Modell aufgenommen, wobei Patienten mit einem OSAS mehr 3-Nitrotyrosin hatten.

**Tabelle 3.13: Multiple lineare Regressionsanalysen der Marker für oxidativen Stress im Plasma.**

Eigenschaften des jeweiligen Modells mit korrigiertem Determinationskoeffizienten ( $R^2$ ), Fallzahl (n) und Signifikanz (p) sind jeweils der ersten Zeile zu entnehmen. Weiterhin sind pro im Modell aufgenommenen Einflussfaktor der ermittelte Regressionskoeffizient (B), Standardfehler von B (SE), standardisierter Koeffizient ( $\beta$ ), T-Statistik (T) und Signifikanz (p) angegeben.

<b>SHp</b> Kor. $R^2 = .60$ , n = 36, p $\leq$ 0,001					
	B	SE	$\beta$	T	p
Alter	-4,32	1,26	-0,45	-3,44	0,002
eGFR	1,73	0,76	0,29	-2,57	0,029
IgSerumprotein	903,42	309,91	0,34	2,92	0,007
OSAS	-57,94	22,58	-0,29	-2,57	0,015

<b>D-ROM</b> Kor. $R^2 = .32$ , n = 41, p $\leq$ 0,001					
	B	SE	$\beta$	T	p
Geschlecht	-20,81	4,69	-0,58	-4,43	$\leq$ 0,001

<b>Ig3-NT</b> Kor. $R^2 = .57$ , n = 38, p $\leq$ 0,001					
	B	SE	$\beta$	T	p
Alter	0,013	0,01	0,40	3,40	0,002
eGFR	-0,01	0,003	-0,33	-2,87	0,007
IgRenin	0,14	0,07	0,22	1,95	0,06
OSAS	0,37	0,09	0,49	4,39	$\leq$ 0,001

### 3.6.2 Regressionsanalysen der Marker für oxidativen Stress im Urin

Bei der Regressionsanalyse mittels Rückwärtsselektion ging für 8-oxodG der BMI und für 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan das Alter als der einzige signifikante Einflussfaktor hervor (siehe Tabelle 3.14).

In der Regressionsanalyse von Malondialdehyd zeigten sich das Serumprotein und Diabetes als signifikante Einflussfaktoren, wobei Diabetiker mehr MDA aufwiesen als Nicht-Diabetiker.

**Tabelle 3.14: Multiple lineare Regressionsanalysen der Marker für oxidativen Stress im Urin.**

Eigenschaften des jeweiligen Modells mit korrigiertem Determinationskoeffizienten ( $R^2$ ), Fallzahl (n) und Signifikanz (p) sind jeweils der ersten Zeile zu entnehmen. Weiterhin sind pro im Modell aufgenommenen Einflussfaktor der ermittelte Regressionskoeffizient (B), Standardfehler von B (SE), standardisierter Koeffizient ( $\beta$ ), T-Statistik (T) und Signifikanz (p) angegeben.

<b>lg8-oxodG</b> Kor. $R^2 = .32$ , n = 26, p = 0,002					
	B	SE	$\beta$	T	p
BMI	-0,04	0,01	-0,59	-3,54	0,002

<b>lgIsoP</b> Kor. $R^2 = .22$ , n = 26, p = 0,023					
	B	SE	$\beta$	T	p
Alter	0,01	0,01	0,46	2,57	0,017
OSAS	0,20	0,11	0,33	1,86	0,075

<b>lgMDA</b> Kor. $R^2 = .21$ , n = 26, p = 0,041					
	B	SE	$\beta$	T	p
BMI	-0,02	0,10	-0,37	-2,00	0,058
lgSerumprotein	3,92	1,71	0,47	2,3	0,032
Diabetes	0,27	0,10	0,54	2,64	0,015

### 3.6.3 Regressionsanalysen der Marker für DNA-Schäden

In der Regressionsanalyse im Rückwärtsselektion-Verfahren von  $\gamma$ -H2AX konnte Diabetes als signifikanter Einflussfaktor identifiziert werden. Diabetes führte demnach zur Ausbildung von mehr  $\gamma$ -H2AX-Foci (siehe Tabelle 3.15).

Bei der Regressionsanalyse der Mikrokerne konnte der systolische Blutdruck im ABDM, das NT-proBNP und das Renin als signifikante Einflussfaktor ausgemacht werden. Für den systolischen Blutdruck und das Renin zeigte sich dabei ein negativer Zusammenhang.

Mittels Rückwärtsregression konnte für Nukleäre Anomalien kein signifikantes Modell generiert werden.

**Tabelle 3.15: Multiple lineare Regressionsanalysen der Marker für DNA-Schäden.**

Eigenschaften des Modells mit korrigiertem Determinationskoeffizienten ( $R^2$ ), Fallzahl (n) und Signifikanz (p) sind der ersten Zeile zu entnehmen. Weiterhin sind pro im Modell aufgenommenen Einflussfaktor der ermittelte Regressionskoeffizient (B), Standardfehler von B (SE), standardisierter Koeffizient ( $\beta$ ), T-Statistik (T) und Signifikanz (p) angegeben.

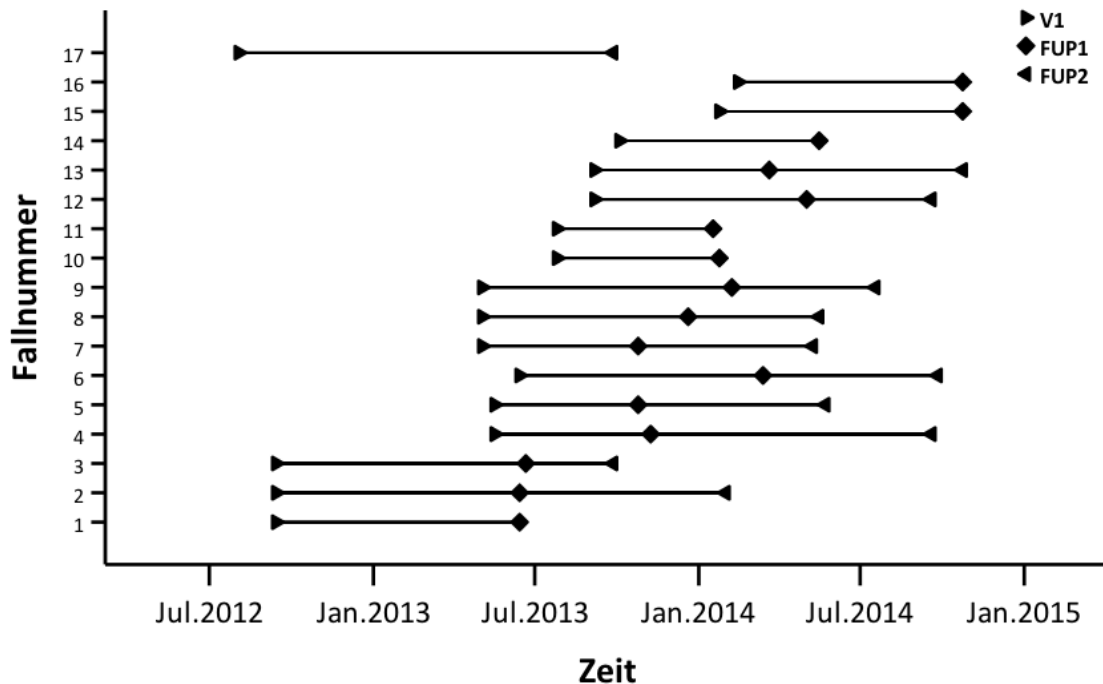
<b><math>\gamma</math>-H2AX</b> Kor. $R^2 = .34$ , n = 34, p $\leq$ 0,001					
	B	SE	$\beta$	T	p
eGFR	-0,01	0,01	-0,26	-1,79	0,083
Diabetes	0,55	0,16	0,50	3,48	0,002

<b>Mikrokerne</b> Kor. $R^2 = .36$ , n = 26, p = 0,014					
	B	SE	$\beta$	T	p
Systole Gesamt	-0,03	0,01	-0,52	-2,78	0,012
eGFR	0,02	0,01	0,33	1,79	0,089
IgNT-proBNP	0,81	0,38	0,41	2,11	0,048
IgRenin	-0,95	0,30	-0,51	-3,12	0,006
Geschlecht	0,62	0,31	0,35	2,01	0,058

<b>Nukleäre Anomalien</b> Kor. $R^2 = .17$ , n = 26, p = 0,069					
	B	SE	$\beta$	T	p
Alter	-0,03	0,02	-0,42	-2,23	0,036
BMI	-0,06	0,03	-0,34	-1,81	0,085
IgRenin	0,59	0,32	0,35	1,82	0,083

### 3.7 Längsschnittanalyse

Bisher wurden die Daten im Querschnitt zum Zeitpunkt der ersten Visite betrachtet. Bei 17 Studienteilnehmern, allesamt der Gruppe HypAll angehörig, erfolgte die Datenerhebung und -auswertung zusätzlich im zeitlichen Verlauf. Die Zeitspanne zwischen der ersten Visite (V1) und dem 1. Follow-up (FUP1) betrug  $7 \pm 2$  Monate und zwischen V1 und dem 2. Follow-up (FUP2)  $14 \pm 2$  Monate (siehe Abbildung 3.10). Dabei zählte die FUP1 nur 16 Patienten, da ein Patient (Fallnummer 17) diese nicht wahrgenommen hatte. Zur FUP2 waren 11 Patienten erschienen.



**Abbildung 3.10: Übersicht über die Längsschnittstudie.**

Gezeigt sind die Daten von V1, FUP1 und FUP2 für jeden einzelnen Fall. Der Abstand zwischen V1 und FUP1 betrug  $7 \pm 2$  Monate und zwischen V1 und FUP2  $14 \pm 2$  Monate.

Der Umfang der erhobenen klinischen Parameter zu FUP1 und FUP2 entsprach dem zu V1 (siehe 3.1.2). Die Unterschiede der metrisch skalierten Merkmale zu den 3 verschiedenen Zeitpunkten wurden mittels Friedman-Test auf ihre Signifikanz überprüft. Der Post-hoc-Test erfolgte mittels Bonferroni-Korrektur. Für nominale Variablen wurde ein konstantes Verhalten postuliert, sodass diese nicht im zeitlichen Verlauf betrachtet wurden.

### 3.7.1 Entwicklung der Marker im zeitlichen Verlauf

Das antioxidative Potenzial, gemessen an SHp, stieg im Verlauf signifikant an. Dieser Anstieg erfolgte von V1 zu FUP1. Von FUP1 zu FUP2 blieb SHp konstant. Im Gegensatz dazu steht der Anstieg der beiden Marker für oxidativen Stress. D-ROM sank zunächst von V1 zu FUP1 ab und stieg dann von FUP1 zu FUP2 über den Ausgangswert von V1 hinaus an. 3-Nitrotyrosin zeigte einen signifikanten Anstieg sowohl von V1 zu FUP1 als auch von V1 zu FUP2, wobei der größere Anstieg von V1 zu FUP1 erfolgte (siehe Tabelle 3.16). Zu beachten sind die niedrigen Fallzahlen zu FUP2 und von 3-Nitrotyrosin.



Die Marker für oxidativen Stress im Urin wurden nur zu einem Zeitpunkt bestimmt, sodass diese bei der Auswertung im Längsschnitt keine Berücksichtigung fanden.

**Tabelle 3.16: Veränderungen der Marker für oxidativen Stress im Blut im zeitlichen Verlauf.**

FUP1 nach  $7 \pm 2$  Monaten, FUP2 nach  $14 \pm 2$  Monaten. Gezeigt ist jeweils der Median (Q1-Q3) und die Fallzahl (n). \* $p \leq 0,05$  verglichen mit V1, ° $p \leq 0,01$  verglichen zu FUP1.

	V1	FUP1	FUP2
SHp [ $\mu\text{mol/l}$ ]	294 (260-370) n = 11	379 (295-478) n = 16	379 (347-457)* n = 9
D-ROM [CARR U]	64 (55-70) n = 16	59 (46-69) n = 16	70 (61-80)* $p=0,07, \circ\circ$ n = 9
3-NT [nM]	966 (671-1311) n = 14	1032 (699-2061)* n = 5	1072 (685-1452)* n = 9

Für  $\gamma$ -H2AX ergaben sich im zeitlichen Verlauf keine signifikanten Veränderungen (siehe Tabelle 3.17). Nukleäre Anomalien stiegen von FUP1 zu FUP2 signifikant an. Hier war die niedrige Fallzahl bei den Parametern des Mikrokernfrequenztests zu V1 zu beachten, welche einen Vergleich mit diesem Zeitpunkt nicht zuließ.

**Tabelle 3.17: Veränderungen der Marker für DNA-Schäden im zeitlichen Verlauf.**

FUP1 nach  $7 \pm 2$  Monaten, FUP2 nach  $14 \pm 2$  Monaten. Gezeigt ist jeweils der Median (Q1-Q3) und die Fallzahl (n). ° $p \leq 0,05$  verglichen zu FUP1.

	V1	FUP1	FUP2
$\gamma$ -H2AX-Foci/Zelle	3,81 (3,69-4,20) n = 11	3,90 (3,73-4,13) n = 15	4,23 (3,90-4,38) n = 10
MK/1000 EK	0,75 (0,00-1,50) n = 2	1,00 (0,50-1,75) n = 12	1,00 (0,50-1,50) n = 9
NA/1000 EK	1,00 (0,00-2,00) n = 2	0,50 (0,00-1,75) n = 12	1,50 (0,50-2,00)° n = 9

### 3.7.2 Entwicklung klinischer Parameter im zeitlichen Verlauf

Unter allen erhobenen klinischen Parametern konnte lediglich für den systolischen Praxis-Blutdruck im Sitzen eine signifikante Veränderung im zeitlichen Verlauf

festgestellt werden (Friedman-Test mit  $p \leq 0,05$ ), wobei auch die systolischen Blutdruckwerte im ABDM tendenziell rückläufig waren (siehe Tabelle 3.18). Die Werte der anderen Parameter sind in Tabelle 7.3 des Anhangs aufgeführt.

**Tabelle 3.18: Veränderungen des systolischen Blutdrucks im zeitlichen Verlauf.**

FUP1 nach  $7 \pm 2$  Monaten, FUP2 nach  $14 \pm 2$  Monaten. Gezeigt ist der Median (Q1-Q3) und die Fallzahl (n). \* $p \leq 0,05$  verglichen mit V1.

	V1	FUP1	FUP2
<b>Praxis-Messung:</b>			
Anzahl	16	15	11
Systole im Sitzen [mmHg]	152 (144-161)	133 (131-150)	135 (122-148)*
<b>ABDM:</b>			
Anzahl	15	12	9
Systole Gesamt [mmHg]	137 (130-157)	136 (128-142)	130 (128-149)
Systole Tag [mmHg]	146 (134-162)	140 (131-147)	135 (133-154)
Systole Nacht [mmHg]	129 (120-146)	125 (120-129)	119 (115-128)

### 3.7.3 Korrelationsanalyse der Veränderungen im zeitlichen Verlauf

Um die Messwiederholungsdaten einer Korrelationsanalyse unterziehen zu können, war es notwendig die Differenzwerte zwischen den verschiedenen Messzeitpunkten zu ermitteln. In Tabelle 3.19 sind die im Folgenden verwendeten Definitionen beschrieben.

**Tabelle 3.19: Berechnung der Variablen  $\Delta 1$  bis  $\Delta 3$  als Differenz der Werte der verschiedenen Messzeitpunkte.**

Bezeichnung	Berechnung
$\Delta 1$	FUP1 - V1
$\Delta 2$	FUP2 - V1
$\Delta 3$	FUP2 - FUP1

Für die Parameter des Mikrokernfrequenztests konnten aufgrund niedriger Fallzahlen mit  $n \leq 2$  keine Analysen zu  $\Delta 1$  und  $\Delta 2$  durchgeführt werden.

Zu  $\Delta 1$  zeigte lediglich  $\Delta 1$ (D-ROM) signifikante Korrelationen bei ausreichend hohen Fallzahlen  $\geq 10$ .  $\Delta 1$ (D-ROM) korrelierte mit hoher Effektstärke positiv mit dem Anstieg vom systolischen Blutdruck (siehe Tabelle 3.20).

**Tabelle 3.20: Korrelationsanalysen der Differenzwerte von FUP1 zu V1 ( $\Delta 1$ ) von Markern für oxidativen Stress/ DNA-Schäden und Blutdruckwerten.**

Dargestellt sind alle Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman  $\geq .20$  mit jeweiliger Fallzahl (n) und Signifikanzniveau: \* $p \leq 0,05$ , \*\* $p \leq 0,01$ .

jeweils $\Delta 1$	Systole Sitzen	Systole Gesamt	Systole Tag	Systole Nacht
SHp	.28 n = 9			
D-ROM	.74** n = 13	.38 n = 10	.68* n = 10	.33 n = 10
3-NT	.80 n = 4			.50 n = 3
$\gamma$ -H2AX				

Bei den Korrelationsanalysen der Differenzwerte zu  $\Delta 2$  und  $\Delta 3$  lagen die Fallzahlen unter 10, sodass diese aufgrund mangelnder Aussagekraft hier nicht aufgeführt werden. Weiterführende Untersuchungen wie eine Regressionsanalyse waren aufgrund der niedrigen Fallzahlen ebenfalls nicht sinnvoll.

### 3.8 Ergebnissynopsis

Hypertoniker wiesen im Vergleich zur Kontrollgruppe mehr oxidativen Stress auf. Dies konnte anhand unterschiedlicher Ausprägungen der Biomarker in den zwei Gruppen festgestellt werden, wobei dieser Gruppenunterschied für die Marker SHp, 3-Nitrotyrosin und 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan signifikant und für die Marker D-ROM und 8-oxodG nicht-signifikant war. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Altersstruktur der beiden Gruppen konnte letztlich nur für die beiden Proteinstressmarker SHp und 3-Nitrotyrosin ein signifikanter Gruppenunterschied gezeigt werden.

Bei Betrachtung der Marker für DNA-Schäden,  $\gamma$ -H2AX und Mikrokerne/Nukleäre Anomalien, konnte kein Unterschied zwischen Hypertonikern und Kontrollen gefunden werden.

Im Weiteren konnten mittels Korrelations- und Untergruppenanalysen Faktoren ausgemacht werden, welche möglicherweise die Biomarker beeinflussen. Diese wurden dann im Rahmen von Regressionsanalysen untersucht. In Tabelle 3.21 ist die Zusammenfassung dieser Untersuchungen in Anlehnung an Tabelle 3.12 zu sehen.

**Tabelle 3.21: Zusammenfassung der Ergebnisse der Einflussfaktoren auf die Marker von oxidativen Stress und DNA-Schäden.**

Für jeden Marker ist an erster Stelle das Ergebnis der Korrelations- bzw. Untergruppenanalyse und an zweiter Stelle das Ergebnis der Regressionsanalyse angegeben. „x“ beschreibt einen signifikanten und „0“ keinen bzw. nicht-signifikanten Zusammenhang. In Klammern ist die Richtung des Zusammenhangs gezeigt.

	SHp	D-ROM	3-NT	8-oxodG	15-F <sub>2t</sub> -IsoP	MDA	γ-H2AX	MK	NA
Alter	x/x (-)		x/x (+)		x/x (+)				0/x (-)
Systole Gesamt		x/0 (-)						0/x (-)	
BMI				x/x (-)					
eGFR	x/x (+)		x/x (-)						
Serumprotein	x/x (+)		x/0 (-)		x/0 (-)	0/x (+)	x/0 (-)		
NT-proBNP	x/0 (-)		x/0 (+)		x/0 (+)			0/x (+)	
Cholesterin	x/0 (+)		x/0 (-)				x/0 (-)		
Renin	x/0 (-)		x/0 (+)					x/x (-)	
Geschlecht		x/x	x/0		x/0				
Diabetes						0/x (+)	x/x (+)		
OSAS	0/x (-)		x/x (+)						

Zuletzt konnte im Rahmen der Längsschnittstudie ein Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Blutdrucks und einzelner Marker für oxidativen Stress beobachtet werden. Zum einen sank der systolische Blutdruck während SHp anstieg und zum anderen korrelierte die Veränderung des systolischen Blutdrucks mit der Veränderung von D-ROM.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion der Methodik

#### 4.1.1 Studiendesign

Die Rekrutierung der Studienteilnehmer für die durchgeführte Beobachtungsstudie erfolgte über die Sprechstunde für TRH des UKW und die MyStIC-Studie. Die dabei gewonnenen umfangreichen klinischen Daten ließen eine detaillierte Beschreibung der untersuchten Kohorte zu. Die Gewinnung der Patienten aus der Sprechstunde für TRH für diese Studie war sinnvoll, da zum einen bei den Patienten eine bereits gut untersuchte, gesicherte und länger andauernde arterielle Hypertonie vorlag und zum anderen Patienten mit sowohl gut als auch schlecht eingestelltem Bluthochdruck untersucht werden konnten.

Aus der MyStIC-Studie sollten initial nur gesunde Kontrollen rekrutiert werden. Vier vermeintliche Kontrollen mussten allerdings nach der Baseline-Evaluation in die Hypertoniker-Gruppe überführt werden, da zwei bereits blutdruckwirksame Medikamente einnahmen und zwei einen bislang unbekanntem und im ABDM detektierten arteriellen Hypertonus hatten. Dadurch und durch zeitliche Limitationen konnte eine im Vergleich zur Hypertoniker-Gruppe ( $n = 64$ ) nur sehr kleine Kontroll-Gruppe ( $n = 8$ ) generiert werden, obwohl mindestens ein 1:1-Matching von Erkrankten zu Kontrollen anzustreben wäre [158]. In anderen vergleichbaren Studien, welche in der Pubmed-Literaturrecherche am 14.11.2019 die Begriffe „oxidative stress“, „DNA damage“ und „hypertension“ oder „hypertensive“ im Titel oder Abstract führten, war dieses Verhältnis, mit Ausnahme der Studie von Fandos et al. [159], zumindest annähernd gegeben. Die Anzahl der untersuchten Hypertoniker war ähnlich zu denen der anderen Studien. Die Vorteile dieser Arbeit sind jedoch zu sehen in: (1) dem gut umschriebenen Patientengut mit sowohl gut als auch schlecht eingestellten TRH-Patienten, (2) der breiten Auswahl der Marker für oxidativen Stress und DNA-Schäden (siehe 4.1.3) und (3) dem zusätzlich zum Quer- auch im Längsschnitt angelegten Studiendesign,

mit der Möglichkeit auch unabhängig von der kleinen Kontrollgruppe, intraindividuelle Veränderungen bei den Hypertonikern festzustellen.

Die in der Studie angewandten Messverfahren sind als reproduzierbar und nachvollziehbar anzusehen, da die Untersuchungen standardisiert nach einem Protokoll durchgeführt wurden. Gegebenenfalls zu kritisieren wären die an unterschiedlichen Geräten durchgeführten ABDMs. Der Unterschied zwischen den aus dem UKW-Pool stammenden und den von einweisenden Ärzten verwendeten Geräten sollte aber vernachlässigbar gering sein. Hervorzuheben ist, dass in allen vergleichbaren Studien mit Ausnahme derer, die das Dipping-Verhalten oder die Weißkittelhypertonie untersuchten, Praxis-Blutdruckwerte verwendet wurden, ABDM-Werte jedoch aufgrund ihrer stärkeren prognostischen Aussagekraft und realitätsnäheren Messbedingungen vorzuziehen sind, insofern die ökonomischen Möglichkeiten bestehen [12].

Eine Besonderheit dieser Studie lag auch in der Unterteilung der Hypertoniker in gut und schlecht eingestellte, da in der Literaturrecherche keine ähnliche Studie zu finden war bezüglich des Vergleichs von Markern für DNA-Schäden in diesen Patientengruppen. Auch bei der Betrachtung von Markern für oxidativen Stress war dies zuvor nur von de Faria et al. [160] für Isoprostane erfolgt.

### **4.1.2 Statistische Verfahren**

Bei der Auswertung dieser Arbeit kamen übliche statistische Methoden zur Anwendung. Auf die in Abschnitt 3.6 durchgeführten Regressionsanalysen muss an dieser Stelle ein besonderes Augenmerk gerichtet werden. Um die theoretischen Voraussetzungen zu erfüllen, war zum Teil eine Datentransformation notwendig. Um ein stabiles und reproduzierbares Regressionsmodell zu erhalten, sollte die Stichprobengröße mindestens 5-mal und optimalerweise 20-mal höher sein als die Anzahl der unabhängigen Variablen. Auch Faustregeln wie  $n > 50 + 8k$  oder  $n > 104 + k$  mit  $k$  als Anzahl der unabhängigen Variablen finden Anwendung [161, 162]. Das minimal empfohlene Stichprobengrößen-unabhängige Variablen-Verhältnis wird in dieser Studie für kein Modell erreicht (siehe Tabelle 3.13 bis Tabelle 3.15).

Zusätzlich könnten die in Tabelle 3.10 gezeigten Korrelationen unter den unabhängigen Variablen zu instabilen Ergebnissen der Regressionsanalyse führen. Hierfür spricht auch die Beobachtung, dass sich durch Hinzunahme bzw. Entfernen einzelner unabhängiger Variablen die Signifikanzwerte der anderen unabhängigen Variablen stark veränderten. Der Varianzinflationsfaktor (VIF) als Maß der Multikollinearität war jedoch für jedes Modell normwertig.

Eine weitere Möglichkeit das Regressionsmodell auf seine Robustheit zu überprüfen, ist sowohl eine Vorwärts- als auch eine Rückwärtsselektion durchzuführen. Dabei sollten beide Verfahren die gleiche Variablenkombination hervorbringen [163]. In der hier durchgeführten Analyse war das für SHp, D-ROM, 3-Nitrotyrosin, 8-oxodG und  $\gamma$ -H2AX der Fall. Für 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan und Mikrokerne wurden durch die Vorwärtsselektion andere unabhängige Variablen ins Modell aufgenommen, für MDA und Nukleäre Anomalien konnte erst gar kein signifikantes Modell generiert werden.

Insgesamt sollten daher die Ergebnisse der Regressionsanalysen, insbesondere von 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan, MDA, Mikrokernen und Nukleären Anomalien, kritisch betrachtet und den in Abschnitt 3.5 beschriebenen Einflussfaktoren mehr Bedeutung zugemessen werden.

### **4.1.3 Wahl der Biomarker**

In dieser Studie zur Detektion von oxidativem Stress und DNA-Schäden bei hypertensiven Patienten kamen eine Reihe verschiedener, bereits etablierter Biomarker zur Anwendung. Marker des Redox-Status umfassten vor allem solche, die durch unmittelbare ROS-Einwirkung und damit als direkte Folge des oxidativen Stresses entstehen (siehe Abbildung 1.4). Nur der Marker SHp steht für das antioxidative Potenzial. Mit den anderen fünf Markern konnte ein breites Spektrum an ROS-vermittelten Molekülschäden abgedeckt werden. In vergleichbaren Studien wurde das Augenmerk vor allem auf die Bestimmung von Antioxidantien wie SOD oder GSH gelegt.

Auch für die Betrachtung von DNA-Schäden kamen zwei verschiedene Marker zum Einsatz. Sowohl  $\gamma$ -H2AX als auch die im Mikrokernfrequenztest detektierbaren Mikrokerne stehen für schwerwiegendste DNA-Schäden. 8-oxodG nimmt als

Marker für oxidative Basenmodifikation eine Zwischenrolle zwischen den Markern für oxidativen Stress und Markern für DNA-Schäden ein. Der Unterschied der verwendeten Biomarker zu anderen Humanstudien, welche den Zusammenhang von oxidativem Stress, DNA-Schäden und arterieller Hypertonie untersuchten, lag vor allem in den Markern für DNA-Schäden. Dort fand bisher der Comet Assay, welcher in seiner alkalischen Form SSB, DSB, alkalilabile Stellen und Crosslinks erfasst [164], eine breite Anwendung. Der Mikrokernfrequenztest wurde bislang nur von Toljic et al. [165] in einer speziellen Hypertonie-Subgruppe, der Gestationshypertonie, verwendet. Neben der Studie von Schurman et al. [166], in der 37 Patienten der Baltimore Longitudinal Study of Aging auf  $\gamma$ -H2AX in Verbindung mit altersassoziierten Erkrankungen untersucht wurden, konnte keine weitere Studie gefunden werden, welche  $\gamma$ -H2AX in diesem Zusammenhang bestimmte.

Insgesamt lässt sich feststellen, dass sich die verwendeten Biomarker zum einen aufgrund ihres weiten Spektrums an abgebildeten oxidativen Schäden und zum anderen aufgrund der teilweise erstmaligen Anwendung im Gebiet der Hypertonie gut eigneten.

### **4.2 Oxidativer Stress und arterielle Hypertonie**

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der einzelnen verwendeten Marker für oxidativen Stress, auch vor dem Hintergrund ihrer Nachweisverfahren, besprochen und dann im letzten Unterpunkt in ihrer Gesamtheit als Redox-Status mit der arteriellen Hypertonie zusammengeführt.

#### **4.2.1 SHp**

Als Maß des Redox-Status wurden in Plasmaproben die freien Thiolgruppen in Proteinen mittels SHp-Assay photometrisch bestimmt. HypAll wies signifikant weniger SHp auf als die Kontrollen. Nach Korrektur für das Alter blieb dieser Unterschied als signifikant bestehen, obwohl das Alter ebenfalls einen signifikanten Einfluss zeigte. Ähnlich wie für die Marker für oxidativen Stress zeigte die HypGut-Gruppe mit weniger SHp als die HypSch-Gruppe (370 vs. 384  $\mu\text{mol/l}$ ) einen tendenziell schlechteren Redox-Status. In der Regressionsanalyse konnten neben dem Alter auch die GFR, das Serumprotein und das OSAS als



Einflussfaktoren gefunden werden. Auch wenn in der Längsschnittstudie keine Korrelation zwischen der Veränderung von SHp und der Veränderung des systolischen Blutdrucks zu finden war, so konnte ein SHp-Anstieg bei gleichzeitigem Blutdruck-Absinken beobachtet werden.

Thiole stellen als funktionelle Gruppen von Peptiden eine wichtige antioxidative Kraft im Redox-Haushalt dar [132]. Als Biomarker für den Redox-Status findet die Thiol-Messung im Serum oder Plasma daher bereits breite Anwendung [136]. In dieser Studie erfolgte der Nachweis mittels der verbreiteten und auch in anderen Hypertoniestudien verwendeten DTNB-Methode und mit Hilfe eines Autoanalyzers. Hervorzuheben gegenüber anderen Studien ist, dass neben der Bestimmung der Thiole auch eine Kontrolle der Plasmaqualität erfolgte. Hierfür wurde unter anderem der Gehalt an Lipiden bestimmt. Insgesamt wurden 12 SHp-Proben mit einem hohen Lipidanteil (L-Index  $\geq 4$ ) von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen, um falsch niedrige Werte zu vermeiden. Dass der SHp-Assay generell weniger anfällig gegenüber hohem Lipidgehalt ist als andere ähnliche Assays, konnte in einer Untersuchung von Jansen et al. [167] gezeigt werden. Dabei wurden Proben dieser Studie verwendet, um den SHp-Assay mit dem TTL-Assay (RelAssay, Gaziantep, Türkei) zu vergleichen. Da die Ergebnisse der beiden Assays mit einem  $r^2$  von .942 korrelierten, lässt sich zudem feststellen, dass die hier verwendete Methode durchaus valide Ergebnisse hervorbringt. Die ermittelten Thiol-Konzentrationen lassen sich zudem gut mit denen der Literatur vergleichen. Sie lag bei den Kontrollen mit 460  $\mu\text{mol/l}$  innerhalb des Normbereichs von 450 bis 650  $\mu\text{mol/l}$  [136]. Die HypAll lagen mit 377  $\mu\text{mol/l}$  darunter.

Auch andere Studien kamen zu dem Schluss, dass Hypertoniker niedrigere Thiol-Level aufweisen als vergleichbare gesunde Kontrollen [168-173]. Diese Untersuchungen wurden jedoch stets mit therapienaiven Hypertonikern durchgeführt. In der Studie von Bandeira et al. [174] konnten hingegen zwischen Hypertonikern, deren Mehrheit bereits Antihypertensiva einnahm, und Nicht-Hypertonikern keine signifikant unterschiedlichen Thiol-Level festgestellt werden. Allerdings handelte es sich dabei um eine Studie, die ihren Fokus auf Diabetes

mellitus richtete. Es bleibt unklar, nach welchen Kriterien eine arterielle Hypertonie festgelegt wurde und wie hoch die Blutdruckwerte der Hypertoniker und der Nicht-Hypertoniker waren, sodass die Ergebnisse der Studie die Hypertonie betreffend nur unzureichend nachvollzogen werden konnten.

Entgegen der Erwartung wiesen die HypSch, wenn auch nicht signifikant, höhere Thiolkonzentrationen auf als die HypGut. Die gleichen Ergebnisse erzielte eine vom Aufbau her ähnliche Studie von Tse et al. [175]. Da dort die schlecht eingestellten Hypertoniker sogar signifikant älter als die gut eingestellten Hypertoniker waren, führte man ebenfalls eine Altersadjustierung durch. Allerdings nahmen die schlecht eingestellten Hypertoniker deutlich mehr Antihypertensiva ein als die gut eingestellten, sodass womöglich der antioxidative Effekt der Antihypertensiva für die unterschiedlichen Thiol-Level verantwortlich war. In der vorliegenden Studie ist jedoch weniger von einem Medikamenten- als von einem Alterseffekt auszugehen, da zum einen die HypGut und die HypSch gleich viele Antihypertensiva einnahmen und zum anderen die HypGut im Median 4,5 Jahre älter waren als die HypSch. Untermuert wird der Einfluss des Alters durch das Ergebnis der ANCOVA, in welcher das Alter mit einem  $p$  von  $< 0,001$  ein deutlich höheres Signifikanzniveau und damit stärkeren Einfluss als die Gruppenzugehörigkeit mit einem  $p$  von 0,043 aufwies. Eine gesonderte ANCOVA mit dem Gruppenvergleich von HypGut und HypSch wurde aufgrund mangelnder signifikanter Unterschiede hinsichtlich der Ausprägung von SHp jedoch nicht unternommen.

In den Korrelations- und Regressionsanalysen sowie den Gruppenvergleichen konnten zahlreiche Einflussfaktoren auf die SHp-Level ausgemacht werden. Der positive Zusammenhang mit dem Serumprotein ergibt sich bereits aus der Methodik heraus, da der SHp-Assay die Thiolgruppen insbesondere in Proteinen misst. In wenigen Veröffentlichungen wird daher die Thiol-Konzentration auf den Protein- bzw. Albuminspiegel genormt.

Der gefundene negative Zusammenhang von Alter und freien Thiolen im Plasma reiht sich ein in die Ergebnisse der Kohortenstudien von Yavuzer et al. [172] und von Schöttker et al. [128]. Letztere umfasste eine Kohorte von 2932 Teilnehmern

und zeigte sogar eine vom initialen Gesundheitszustand unabhängige Assoziation von Thiolen mit der Mortalität im Alter.

Weiterhin zeigte SHp eine positive Korrelation ( $r = .49$ ) mit der GFR. In der Regressionsanalyse blieb die GFR mit einem geringen  $\beta$  von 0,29 weiterhin als Einflussfaktor bestehen, obwohl sich zuvor eine mäßig starke Korrelation ( $r = -.46$ ) auch mit dem Alter gezeigt hatte. Somit ist eine verfälschende Multikollinearität der Regressionsanalyse anzunehmen, auch wenn entsprechende Parameter wie Toleranz und Varianzinflationsfaktor (VIF) normwertig waren. Dennoch deckt sich das Ergebnis mit dem anderer Studien. Diese betrachteten zwar Patienten mit deutlich eingeschränkterer Nierenfunktion, konnten aber auch für freie Thiole im Plasma eine positive Korrelation mit der GFR [176] oder deutlich reduzierte Thiol-Level bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung im Vergleich zu Nierengesunden [177] finden.

Erhöhte Level an oxidativem Stress bzw. ein verringertes antioxidatives Potenzial beim OSAS konnten ebenfalls bereits gezeigt werden [178]. Hinsichtlich der Bestimmung von Thiolen im Zusammenhang mit dem OSAS gibt es weniger Daten. Mit Ausnahme von Passali et al. [179] konnten in Übereinstimmung mit dieser Studie erniedrigte Thiol-Konzentrationen beim OSAS gefunden werden [180-182].

SHp nimmt, da er als einziger Marker nicht als Maß für den oxidativen Stress, sondern für das antioxidative Potenzial herangezogen wird, eine besondere Rolle in dieser Studie ein. Für die hier untersuchten Hypertoniker konnte ein signifikant niedrigeres SHp und damit auch niedrigeres antioxidatives Potenzial im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Beobachtungen der Längsschnittstudie unterstützen dieses Ergebnis, da es im zeitlichen Verlauf unter gebesserten Blutdruckwerten zu einem Anstieg der Thiol-Level kam. Der SHp-Assay bietet sich, unter Berücksichtigung der verschiedenen Einflussfaktoren, auch für zukünftige Studien als geeigneter Marker zur Einschätzung des Redox-Status an.

#### 4.2.2 D-ROM

Der Nachweis von Hydroperoxiden erfolgte durch spektrophotometrische Bestimmung von D-ROM im Plasma. D-ROM zeigte sich in der HypAll-Gruppe im Vergleich zur Kontroll-Gruppe nicht-signifikant erhöht. Dabei waren die Werte für HypGut tendenziell höher als für HypSch. In der Regressionsanalyse fiel der systolische Blutdruck, welcher in der Korrelationsanalyse einen negativen Zusammenhang gezeigt hatte, aus dem Modell heraus und das Geschlecht war als wichtigster Einflussfaktor auf D-ROM zu identifizieren. In der Längsschnittstudie zeigte die Veränderung von D-ROM eine positive Korrelation mit der Veränderung des systolischen Blutdrucks.

Der D-ROM-Test, insbesondere wenn er durch einen Autoanalyser durchgeführt wird, ist eine etablierte Methode, um oxidativen Stress *in vivo* zu messen [183, 184]. Obwohl üblicherweise Serum oder Heparin-Plasma zur D-ROM-Bestimmung verwendet wird, erfolgte diese in dieser Studie aus EDTA-Plasma. Die dadurch resultierenden deutlich niedrigeren D-ROM-Werte lassen sich daher nicht mit denen anderer Studien vergleichen. Normale Serumlevel liegen bei 250 bis 300 CARR U [131], hier lagen sie bei 50 bis 80 CARR U. Bei korrekter Füllhöhe der EDTA-Monovetten ist von gleichen EDTA-Konzentrationen in den verschiedenen Proben auszugehen, sodass die D-ROM-Ergebnisse unter den Studienteilnehmern dennoch vergleichbar sind.

Es gibt bisher nur wenige Studien, welche D-ROM in Zusammenhang mit arterieller Hypertonie bestimmt haben. Dabei konnten anders als in dieser Studie erhöhte D-ROM-Level in Hypertonikern verglichen zu Nicht-Hypertonikern bzw. eine positive Korrelation zwischen D-ROM und systolischem Blutdruck festgestellt werden. Die Betrachtung von TRH-Patienten und der Vergleich zwischen gut und schlecht eingestellten Hypertonikern spielte in diesen Studien keine Rolle. Vielmehr wurden bei Shiraishi et al. [185] eine zu 97 % männliche Gruppe von Katastrophenhelfern ohne Berücksichtigung vom Raucherstatus und Alter oder bei Digiesi et al. [186] Hypertoniker zum Zeitpunkt der Erstdiagnose, d.h. ohne vorherige Therapie mit Antihypertensiva, untersucht.

Der mangelnde Unterschied in den D-ROM-Leveln zwischen HypAll und Kontrollen könnte durch die Medikation der HypAll-Gruppe begründet sein. So könnten die Antihypertensiva bereits zu einem Absinken der D-ROM-Level der HypAll-Gruppe geführt haben. Taguchi et al. [187] beschreiben einen solchen antioxidativen Effekt unabhängig vom Blutdruck für den AT<sub>1</sub>R-Blocker Irbesartan. Zudem könnte das erhöhte Cholesterin die D-ROM-Level der Kontroll-Gruppe erhöht haben. Eine entsprechende positive Korrelation zwischen D-ROM und Cholesterin, insbesondere dem „low density“ Lipoprotein (LDL), konnte in einer anderen Studie festgestellt werden [124].

Die tendenziell höheren D-ROM-Werte in der HypGut-Gruppe verglichen zur HypSch-Gruppe könnten wiederum dem tendenziell höheren Alter dieser Gruppe zugeschrieben werden. Auch zwischen D-ROM und dem Alter konnte in anderen Studien eine positive Korrelation gesehen werden [188, 189].

Bei den im Rahmen der Längsschnittstudie betrachteten Hypertonikern ließ sich eine positive Korrelation von  $\Delta 1(\text{D-ROM})$  und  $\Delta 1(\text{Systole Sitzen})$  bzw.  $\Delta 1(\text{Systole Tag})$  feststellen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit der gefundenen positiven Korrelation von D-ROM und systolischem Blutdruck [124, 190]. Anders als Taguchi et al. [187], welche unter einem Wechsel verschiedener AT<sub>1</sub>R-Blocker auf Irbesartan bei gleichbleibendem Blutdruck eine Absenkung der D-ROM-Level beobachteten, konnte hier unter nicht-signifikanter Steigerung der Anzahl der Antihypertensiva (siehe Tabelle 7.4 im Anhang) sowohl eine Senkung des Blutdrucks als auch der D-ROM-Werte erreicht werden.

Das weibliche Geschlecht zeigte sich in dieser Studie mit höheren D-ROM-Leveln assoziiert. Dieser Zusammenhang konnte bereits in anderen Studien beobachtet werden [123, 124, 190, 191]. Eigentlich wären niedrigere Level oxidativen Stresses bei Frauen zu erwarten. Da es sich jedoch mit einem medianen Alter von 67 Jahren um größtenteils postmenopausale Studienteilnehmerinnen handelte, entfällt womöglich der antioxidative Effekt des Östrogens [192]. Der mediane Altersunterschied von einem Jahr zwischen männlichen und weiblichen Studienteilnehmern war nicht-signifikant, sodass der Alterseffekt hier keine Rolle spielt.

Mittels D-ROM-Test als etabliertes Verfahren zur Messung oxidativen Stresses konnten keine erhöhten Level für Hypertoniker festgestellt werden. In dieser Studie kommt den D-ROMs eine besondere Bedeutung bei der Längsschnittuntersuchung zu, da sie dort zum einen aufgrund der höchsten Fallzahlen die größte Aussagekraft unter den Markern für oxidativen Stress haben und zum anderen ihre Veränderung positiv mit der Veränderung des systolischen Blutdrucks korreliert. Zur besseren Vergleichbarkeit mit anderen Studien sollte zukünftig der D-ROM-Test aus Serum statt aus Plasma durchgeführt werden.

### **4.2.3 3-Nitrotyrosin**

3-Nitrotyrosin wurde als Marker für nitrosativen Stress mittels kompetitivem ELISA im Plasma der Studienteilnehmer bestimmt. Dabei zeigten HypAll und jeweils die beiden Subgruppen HypGut und HypSch signifikant höhere 3-Nitrotyrosin-Level als die Kontrollen. Dieser Unterschied blieb auch nach Adjustierung für das Alter erhalten. Auffällig war, wie auch bei den anderen Markern, dass HypGut nicht-signifikant höhere Werte hatten als HypSch (1037 vs. 654 nM). In der Regressionsanalyse verblieben von den zahlreichen zuvor ermittelten Einflussfaktoren lediglich das Alter, die GFR und das OSAS. In der Längsschnittstudie war ein steigendes 3-Nitrotyrosin bei gleichzeitig sinkendem Blutdruck zu beobachten.

3-Nitrotyrosin gilt als der etablierteste Biomarker um nitrosativen Stress zu detektieren. Der Nachweis ist dabei sowohl aus Gewebe als auch verschiedensten Körperflüssigkeiten möglich. Aufgrund der höchsten Sensitivität und Spezifität sind massenspektrometrische Verfahren gekoppelt mit Gas- oder Flüssigkeitschromatographie als Goldstandard der 3-Nitrotyrosin-Bestimmung im Plasma anzusehen. Da diese aber sehr teuer und schwer durchführbar sind, stehen verschiedene immunchemische Methoden zur Verfügung [75, 140]. ELISA zur 3-Nitrotyrosin-Bestimmung sollten aufgrund teilweise mangelnder Spezifität kritisch beurteilt werden [193]. So verglichen Safinowski et al. [194] verschiedene Immunassays und kamen zu dem Schluss, dass keiner verlässliche Ergebnisse

generieren würde. Dabei schnitten Sandwich-basierte ELISA am schlechtesten ab und es wurden kompetitive Verfahren als Mittel der Wahl empfohlen. Letztlich ist der in dieser Studie verwendete ELISA, auch wenn er an sich eher semiquantitative Ergebnisse liefert [195], ausreichend um festzustellen, dass HypAll deutlich mehr 3-Nitrotyrosin aufweisen als die Kontrollen (946 vs. 188 nM). Die Wertebereiche sind dabei mit denen anderer ELISA-Ergebnisse vergleichbar [140].

Obwohl bereits eine Assoziation zwischen zahlreichen kardiovaskulären Erkrankungen, insbesondere der Arteriosklerose und der koronaren Herzkrankheit [196], und erhöhtem 3-Nitrotyrosin festgestellt wurde, liegen nur wenige Humanstudien in Bezug auf arterielle Hypertonie vor. Bruno et al. [197] und Zhou et al. [198] wiesen erhöhte 3-Nitrotyrosin-Level bei Hypertonikern nach, wobei beide ein adäquates Verhältnis von Hypertonikern zu Kontrollen sowie eine immunchemische Nachweismethode verwendeten und erstere therapienaive Hypertoniker untersuchten.

In dieser Studie konnte somit erstmalig für therapieresistente Hypertoniker ein erhöhter systemischer nitrosativer Stress nachgewiesen werden. Dieser war sowohl in den HypSch als auch in den HypGut im Vergleich zu den Kontrollen signifikant höher (654 bzw. 1037 vs. 188 nM). 3-Nitrotyrosin scheint also zunächst unabhängig von der Einstellung des Blutdrucks bei TRH-Patienten erhöht zu sein. Der erstaunliche, aber wohl aufgrund der breiten Streuung nicht-signifikante Unterschied zwischen HypGut und HypSch kann nicht allein auf das tendenziell höhere Alter der HypGut zurückgeführt werden, da die ANCOVA dem Alter zumindest für den Gruppenunterschied von HypAll und Kontrollen keinen signifikanten Einfluss einräumt. Möglicherweise hängen die hohen 3-Nitrotyrosin-Werte bei den HypGut mit einer Akkumulation von 3-Nitrotyrosin im Plasma zusammen. Für einen solchen Effekt würden auch die Ergebnisse der Längsschnittstudie sprechen, in welcher trotz sinkenden Blutdrucks das 3-Nitrotyrosin anstieg. Über den genauen Abbau und die Elimination von 3-Nitrotyrosin ist bislang wenig bekannt [199]. Tsikas et al. [200] beschreiben eine nur zögerliche Veränderung der 3-Nitrotyrosin-Konzentrationen im Plasma. So kann angenommen werden, dass die HypGut in ihrer Vergangenheit Phasen hohen

Blutdrucks durchgemacht haben und sich in dieser Zeit vermehrt 3-Nitrotyrosin gebildet hatte. In der Studie von Zimnol et al. [201] zur Wirkung von Angiotensin II auf AT<sub>1a</sub>R-Knockout-Mäuse konnte nach 28 Tagen zwar lokaler oxidativer Stress im Gewebe von Herz und Nieren aber kein systemischer oxidativer Stress in Form von erhöhtem 3-Nitrotyrosin im Plasma nachgewiesen werden. In einer Folgestudie [202] zeigten sich jedoch nach 20-wöchiger Behandlung mit Angiotensin II bereits tendenziell erhöhte 3-Nitrotyrosin-Werte im Plasma, was für einen zeitverzögerten Anstieg des Markers spricht. Zur besseren Beurteilung der 3-Nitrotyrosin-Dynamik wären daher noch weitere Verlaufskontrollen der untersuchten Patienten in dieser Studie interessant.

Der Marker 3-Nitrotyrosin zeigte mit dem Alter, der GFR und dem OSAS ein ähnliches Profil an Einflussfaktoren wie zuvor SHp. Einige Einflussfaktoren, vor allem solche die auch mit anderen korrelierten, wurden in der Regressionsanalyse eliminiert.

RNS verändern oder schränken durch Nitrierung die Funktion von Proteinen ein. Wenn im Rahmen des Alterungsprozesses die Proteolyse zunehmend ineffizient wird, kommt es zur Akkumulation solch veränderter Proteine und die Entstehung altersassoziierter Erkrankungen wird begünstigt [203]. Die Akkumulation von 3-Nitrotyrosin im Alter wird in einer Übersichtsarbeit von Peluffo et al. [204] beschrieben. Der Einfluss des Alters auf die Ausprägung von 3-Nitrotyrosin in dieser Arbeit ist demnach nicht verwunderlich.

Der negative Zusammenhang von Nierenfunktion und 3-Nitrotyrosin ist bereits bekannt, wenn auch nicht ausführlich untersucht. Es konnten zum einen im Plasma von Patienten mit präterminaler und terminaler Nierenerkrankung [205] und zum anderen im Plasma von 5/6-nephrektomierten Ratten [206] erhöhte 3-Nitrotyrosin-Werte festgestellt werden. Bei letztgenannten war interessanterweise nach Gabe des Antioxidans Tempol das 3-Nitrotyrosin wieder rückläufig.

Für das OSAS konnte in Abschnitt 4.2.1 bereits ein reduziertes antioxidatives Potenzial beschrieben werden. Zudem zeigten die Patienten in dieser Studie erhöhten nitrosativen Stress im Sinne von erhöhten 3-Nitrotyrosin-Werten im Plasma. Bisweilen war 3-Nitrotyrosin nicht im Blut jedoch in venösen



Endothelzellen von OSAS-Patienten erhöht nachgewiesen worden [207]. Nach einmonatiger CPAP-Behandlung zeigten sich die 3-Nitrotyrosin-Werte bereits fallend. Von Interesse wäre, inwiefern die OSAS-Patienten dieser Studie bereits ausreichend mit CPAP behandelt waren, da sich in Abbildung 3.9 zeigt, dass es vor allem die OSAS-Patienten der HypSch-Gruppe waren, die mit ihren 3-Nitrotyrosin-Leveln für die signifikant höheren 3-Nitrotyrosin-Werte der OSAS-Patienten über alle Gruppen hinweg sorgten. Trotz ihrer engen Verzahnung ist das OSAS eine häufig unterschätzter Einflussfaktor der TRH [208].

In dieser Studie ist 3-Nitrotyrosin insbesondere von Belang, da es als einziger Marker den nitrosativen Stress widerspiegelt und zudem den eindeutigsten Unterschied zwischen Kontrollen und Hypertonikern aufweist. Wünschenswert für zukünftige Studien ist sicherlich die als Goldstandard geltende massenspektrometrische Nachweismethode zu verwenden, um präzisere Werte zu erhalten.

#### **4.2.4 8-oxodG**

Im Spontanurin der Studienteilnehmer wurde mit einem kompetitiven ELISA 8-oxodG als Marker oxidativer Nukleinbasenmodifikationen bestimmt. Dabei fanden sich in der HypAll-Gruppe tendenziell höhere Werte als in der Kontroll-Gruppe (109 vs. 83 ng/mg Kreatinin). Innerhalb der HypAll-Gruppe wiesen die HypGut nicht-signifikant höhere 8-oxodG-Level auf als die HypSch (110 vs. 91 ng/mg Kreatinin). Als Einflussfaktor konnte lediglich der BMI ausgemacht werden, mit welchem sich eine negative Assoziation zeigte.

Die arterielle Hypertonie bietet sich als eine den ganzen Körper betreffende Systemerkrankung an, um mit dem Marker 8-oxodG im Urin untersucht zu werden, da es den globalen oxidativen Stress des Organismus widerspiegelt und als wichtigster Marker oxidativer Nukleinbasenmodifikationen bereits etabliert ist. Das Nachweismedium der Wahl ist der Urin, welcher neben dem Vorteil der nicht-invasiven Gewinnung auch verlässlichere Ergebnis liefert als zum Beispiel das Plasma. Bei der Messung von 8-oxodG im Spontanurin ist eine Korrektur für das

Kreatinin notwendig. Dies beinhaltet jedoch die Annahme, dass die Kreatinin-Exkretion konstant ist. Zudem unterliegt die Messung im Spontanurin stärker akuten Einflüssen auf das Fließgleichgewicht der Guanin-Exkretion und tageszeitlichen Schwankungen, sodass das Ergebnis eher verzerrt werden kann. Als Goldstandard gilt daher die Messung im 24-Stunden-Sammelurin [153]. Zur Bestimmung von 8-oxodG im Urin kommen immunochemische und chromatographische Verfahren zur Anwendung. Das European Standards Committee on Urinary (DNA) Lesion Analysis (ESCUA) sieht die Verwendung von ELISAs kritisch [209]. ELISA-Messungen zeigen große Schwankungen und neigen durch Unspezifität und Kreuzreaktivität zu überschätzten Werten [210]. Die Nachteile sind auch in dieser Studie zu beobachten, da die erzielten 8-oxodG-Werte selbst den vom Hersteller des verwendeten ELISA Kits angegebenen Bereich um ein Vielfaches übersteigen.

Der mangelnde signifikante Unterschied in der Ausprägung von 8-oxodG zwischen HypAll und Kontrollen ist somit womöglich rein methodisch bedingt. Hierfür spricht auch das erstaunliche Ergebnis der Korrelations- und Regressionsanalyse, in welcher sich lediglich ein relativ starker negativer Zusammenhang mit dem BMI zeigte. Bisherige Studien an größeren Patientenzahlen, auch unter Verwendung chromatographischer Verfahren, weisen jedoch auf einen positiven Zusammenhang zwischen Adipositas und 8-oxodG [211, 212] bzw. dem Marker für RNA-Oxidation 8-oxoGuo [213] hin.

Von Tierstudien geht die Annahme aus, dass arterielle Hypertonie zu erhöhten 8-oxodG-Werten in verschiedenen Geweben [94, 214] und im Urin führt [215]. Allerdings lassen sich in Humanstudien, welche zumeist mit dem Nachweis mittels ELISA im Spontanurin eine zu dieser Studie ähnliche Methodik anwandten, keine einheitlichen Ergebnisse finden. Eine vergleichbare Studie von Subash et al. [216] fand signifikant erhöhte 8-oxodG-Level in Hypertonikern, wobei zudem unbehandelte Patienten bei Diagnosestellung signifikant höhere Level aufwiesen als Patienten, die bereits seit 1 Jahr eine antihypertensive Medikation einnahmen. Dieses Ergebnis zusammen mit denen zahlreicher klinischer Studien, welche eine Reduktion von unter anderem 8-oxodG unter vor allem AT<sub>1</sub>R-Blocker-Therapie

beobachteten [217, 218], verdeutlicht den antioxidativen Effekt von Antihypertensiva. Dieser antioxidative Effekt ist, wie in Abschnitt 4.2.7 näher erläutert, zum einen direkt durch die Blutdrucksenkung an sich und zum anderen indirekt durch blutdruckunabhängige Mechanismen, wie zum Beispiel der Reduktion der in Abschnitt 1.2 aufgeführten oxidativen Wirkung von Angiotensin II und Aldosteron, begründet. Demensprechend könnten sich die 8-oxodG-Werte der HypAll bereits unter antihypertensiver Therapie abgesenkt und denen der Kontrollen angenähert haben. Andere Studien, die auch therapierte Patienten, wenn auch keine TRH-Patienten, untersuchten, konnten ebenfalls keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zu gesunden Kontrollen finden [219, 220].

Neben der Wirkung der Antihypertensiva könnte möglicherweise der Harnstoffgehalt im Urin die 8-oxodG-Werte beeinflusst haben. Laut Song et al. [221] kommt es bei der Anwendung des Antikörpers N45.1 im Rahmen des 8-oxodG-ELISAs zu einer ausgeprägten Kreuzreaktion mit Harnstoff im Urin, wodurch falsch zu hohe Werte gemessen werden. Unter der Annahme, dass unter erhöhter Retention von Harnstoff im Blut die Harnstoffkonzentration im Urin sinkt, könnten die Kontrollen, die signifikant weniger Harnstoff im Blut hatten als die HypAll, mehr Harnstoff im Urin und damit auch mehr falsch hohe 8-oxodG-Werte haben. Die 8-oxodG-Werte der Kontrollen und der HypAll würden sich so zusätzlich annähern. Da allerdings weder bekannt ist, welcher Antikörper genau von Stressmarq Biosciences zum Einsatz kam, noch der Harnstoffgehalt im Spontanurin gemessen wurde, bleibt diese These vage.

Die tendenziell höheren 8-oxodG-Werte der HypGut im Vergleich zu den HypSch könnten, wie auch bei den anderen Markern, durch das nicht-signifikant höhere Alter dieser Gruppe verursacht sein. Eine Assoziation zwischen oxidativen DNA-Schäden und Alter wurde bereits beobachtet [222], konnte in der vorliegenden Studie aber nicht statistisch nachgewiesen werden.

Die Bestimmung der oxidativ veränderten Nukleinbase 8-oxodG, welche als Bindeglied der Marker für oxidativen Stress und DNA-Schäden fungiert, ergab nicht-signifikant erhöhte Level für Hypertoniker. Die genaue Beurteilung des Markers wird jedoch durch methodische Defizite erschwert. Zur besseren

Einordnung des Markers wäre zum einen die Bestimmung aus Sammelurin und zum anderen die Anwendung chromatographischer Verfahren wünschenswert.

### 4.2.5 Malondialdehyd

MDA wurde als Marker der Lipidperoxidation mittels Fluorimetrie im Urin der Studienteilnehmer bestimmt. Dabei konnten keine unterschiedlichen Level zwischen Hypertonikern und Kontrollen festgestellt werden. Einflussfaktoren konnten zunächst keine eruiert werden. Die Regressionsanalyse brachte dann aber Diabetes mellitus und das Serumprotein als Einflussfaktoren hervor, wobei diese Ergebnisse unter den in 4.1.2 aufgeführten Gesichtspunkten äußerst kritisch beurteilt werden müssen.

In dieser Studie wurde der TBARS-Assay im fluorimetrischen Verfahren durchgeführt, welches deutlich sensitiver und spezifischer ist als das kolorimetrische. Obwohl der TBARS-Assay insgesamt aufgrund seiner Unspezifität gegenüber MDA stark kritisiert wurde, ist er weiterhin die am weitesten verbreitete Nachweismethode. Spezifischere Nachweise gelingen mit entsprechenden ELISA Kits oder in der Kombination mit der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) [223]. Der Nachweis erfolgt am häufigsten aus dem Plasma, ist aber auch aus anderen Körperflüssigkeiten möglich. Die Untersuchung von MDA im Urin war in der Vergangenheit aufgrund von möglichen überschätzten Leveln durch diätetische Aufnahme von Peroxiden [224] und vermuteten Wechselwirkung mit Harnstoff [147] weniger empfohlen. Dabei bietet der Nachweis im Urin den Vorteil weniger durch präanalytische Vorgänge, z.B. durch die Wahl des Antikoagulans, beeinflusst zu werden [225]. Zudem zeigt eine 2018 von Cui et al. veröffentlichten Studie [226], dass das im Urin nachgewiesene MDA durchaus das *in vivo* gebildete MDA widerspiegelt. Ob für die Untersuchung im Urin Spontanurin oder 24-Stunden-Sammelurin besser geeignet ist, konnte anders als für die anderen hier im Urin untersuchten Stressmarker noch nicht gezeigt werden. Es ist jedoch anzunehmen, dass die Bestimmung von MDA im 24-Stunden-Sammelurin verlässlichere Ergebnisse

bringt, da zirkadiane Schwankungen oder akute Ereignisse keinen Einfluss haben und zudem keine Normierung auf Kreatinin erfolgen muss.

Erhöhte MDA-Level bei Hypertonikern konnten bereits in zahlreichen Studien nachgewiesen werden [227-229]. Dabei erfolgte der Nachweis unter Anwendung verschiedener Methoden stets im Blut. Eine Ausnahme stellt die Gestationshypertonie-Studie von Babu et al. [230] dar, in welcher MDA im Urin bestimmt wurde. Ein Vergleich mit der Studie ist allerdings nicht möglich, da keine Normierung der MDA-Werte auf Kreatinin erfolgte. Der Nachweis von MDA im Urin bei TRH stellt daher eine Neuigkeit dar. Der gemessene Wertebereich ist dabei vergleichbar mit anderen Studien, die MDA im Urin bestimmt haben [231].

Neben dem gewählten Untersuchungsmedium könnte die kleine Kontroll-Gruppe den mangelnden MDA-Unterschied zwischen den Hypertonikern und den Kontrollen erklären. Ein Unterschied wäre bei einer größeren Kontrollgruppe eventuell sichtbar geworden.

Auch könnten körpereigene Substanzen, welche in dieser Studie nicht bestimmt wurden und möglicherweise in den beiden Gruppen in unterschiedlicher Ausprägung vorliegen, einen Einfluss auf den Metabolismus von MDA haben. So machen Vasconcelos et al. [232] ein in der Hypertoniker-Gruppe signifikant höheres Ceruloplasmin, welches sein antioxidatives Potenzial z.B. im Eisenstoffwechsel entfaltet, mitverantwortlich für sogar signifikant niedrigere MDA-Werte in dieser Gruppe.

Ein entscheidender Einfluss auf die MDA-Level in den verschiedenen Gruppen ist wohl in der Selektion der Hypertoniker zu sehen. Als Patienten mit TRH nahmen diese zum Untersuchungszeitpunkt bereits zahlreiche Antihypertensiva ein. Die antioxidative Wirkung von Antihypertensiva im Zusammenhang mit den hier verwendeten Markern für oxidativen Stress wird in Abschnitt 4.2.7 näher beleuchtet.

Der in der Regressionsanalyse gefundene Zusammenhang zwischen MDA und Diabetes mellitus steht im Einklang mit anderen Studienergebnissen. So konnten in den Reviews von Piconi et al. [233] und Marjani [234] erhöhte MDA-Level bei Typ 1 und Typ 2 Diabetes mellitus gezeigt werden. Jedoch konnte in der

vorliegenden Arbeit beim Vergleich von Diabetikern und Nicht-Diabetikern kein signifikanter Unterschied der MDA-Level festgestellt werden, eventuell da die Diabetiker, mit einem medianen HbA1c von 6,65 %, gut eingestellt im therapeutischen Zielkorridor zwischen 6,5 und 7,0 % lagen.

Zudem brachte die Regressionsanalyse einen positiven Zusammenhang zwischen dem im Urin gemessenen MDA und dem Serumprotein hervor. Eine negative Korrelation, wie sie bereits zwischen dem im Plasma gemessenen MDA und Albumin beschrieben wurde [230, 235], wäre hingegen besser nachvollziehbar. So ist davon auszugehen, dass durch eine erhöhte Protein-Clearance und damit verbundenem Entzug von Serumproteinen das im Urin gemessene MDA steigt. Der Grund hierfür ist darin zu sehen, dass im Urin v.a. konjugiertes, d.h. an Proteinen gebundenes MDA vorliegt [226] und zudem der TBARS-Assay das totale, d.h. die Summe aus konjugiertem und freien MDA misst [147]. Um jedoch valide Aussagen bezüglich dieses Zusammenhangs in dieser Studie treffen zu können, wäre ein größerer Stichprobenumfang nötig und eine parallele Bestimmung des MDA im Plasma sinnvoll.

MDA zeigte als einziger Marker in dieser Studie keine unterschiedlichen Level an oxidativem Stress an. Hierbei ist jedoch zu beachten, dass die MDA-Bestimmung zum einen im Urin und zum anderen bei TRH-Patienten erfolgte. Für zukünftige Studien an TRH-Patienten wäre die Verwendung spezifischerer Methoden und auch die parallele Bestimmung im Plasma wünschenswert.

#### **4.2.6 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan**

Als weiteres Endprodukt der Lipidperoxidation wurde 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan im Urin der Studienteilnehmer untersucht. Dafür wurde ein kompetitiver ELISA verwendet. Die Hypertoniker wiesen im Vergleich zu den Kontrollen signifikant mehr 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan auf. Nach Adjustierung für das Alter war dieser Unterschied allerdings nicht mehr signifikant. Auch die Korrelationen mit dem NT-proBNP und Serumprotein sowie der Einfluss des Geschlechts wurden in der Regressionsanalyse durch das Alter als größten Einflussfaktor relativiert.

15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan gilt als verlässlicher Biomarker oxidativen Stresses *in vivo* [236]. In den meisten Studien wird es im Urin nachgewiesen, da es dort anders als im Plasma nicht *ex vivo* durch Autooxidation entstehen kann und zudem mit einer nicht-invasiven Probengewinnung einhergeht [237]. Auch die Verwendung von Spontanurin anstelle von Sammelurin ist für eine adäquate Messung von 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan geeignet [144]. Die Bestimmung von 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan mittels GC/MS gilt als die genauere Methode, da beim ELISA durch Kreuzreaktivität womöglich auch andere Isoprostan-Isoformen mitgemessen werden [238]. Das hier verwendete ELISA Kit wurde jedoch laut Herstellerangaben validiert, indem für die gleichen Proben sowohl ein ELISA als auch eine GC/MS durchgeführt wurden. Es ergab sich eine Korrelation der beiden Nachweisverfahren mit einem  $r^2$  von  $> .80$  [146]. Zudem wurde in einer zuletzt veröffentlichten Metaanalyse von van 't Erve et al. [239], in welcher 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Daten aus 242 Publikationen in Bezug auf verschiedene Erkrankungen untersucht wurden, festgestellt, dass unterschiedliche Nachweismethoden nicht zu signifikant unterschiedlichen 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Werten führen. In den meisten Studien wurde das freie 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan bestimmt, sodass die in dieser Studie ermittelten Werte für das totale 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan erwartungsgemäß höher lagen. Da 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan möglicherweise doch nicht nur durch oxidativen Stress sondern auch über einen COX-abhängigen Weg entsteht und die veresterte Arachidonsäure kein Substrat für die COX darstellt [239], ist die Bestimmung des totalen 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan im Vergleich zum freien 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan mit weniger falsch positiven Werten verbunden.

Vergleichbare Studien zeigten kein einheitliches Bild bezüglich der 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Level von Hypertonikern im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Die Metaanalyse von van 't Erve et al. [239], bei der insgesamt 335 Hypertoniker gegen 455 Kontrollen betrachtet wurden, konnte nur einen, verglichen zu anderen Erkrankungen, milden Effekt der arteriellen Hypertonie auf 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Level ausmachen. Andere nicht in die Metaanalyse inkludierte Studien mit größerem Stichprobenumfang konnten nach Altersadjustierung keine Assoziation von 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Leveln und Hypertonie herausfinden [240, 241]. Von besonderem Interesse ist die Studie von de Faria et al. [160], da diese ebenso

Patienten mit TRH untersuchte. Der Vergleich der 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Werte erfolgte dabei zwischen gleichaltrigen schlecht eingestellten TRH-Patienten und gut eingestellten gewöhnlichen Hypertonikern ohne gesunde Kontrollgruppe. Die TRH-Patienten wiesen, gemessen mittels ELISA im Plasma, signifikant erhöhte 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Level auf, obwohl sie mehr Antihypertensiva einnahmen (Mittelwerte: 4,3 vs. 2,3). Beim Vergleich von HypGut und HypSch, welche beide die gleiche Menge an Antihypertensiva einnahmen (Mediane: 5 vs. 5), könnte allerdings der angenommene antioxidative Effekt von Antihypertensiva zu gleich hohen 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Leveln geführt haben. Dies wird vom Ergebnis der Studie von Horbal et al. [242] untermauert, welche zwischen gut und schlecht eingestellten Hypertonikern ebenfalls keinen 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Unterschied feststellen konnten. Anders als in der vorliegenden Studie zeigten sich bei Horbal et al., jedoch nach Adjustierung für verschiedene Einflussfaktoren, höhere 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Werte mit einer arteriellen Hypertonie assoziiert, wenn auch keine positive Korrelation zwischen 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan und den Blutdruckwerten vorlag. Möglicherweise wird zudem die Exkretion von 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan und damit dessen Nachweis im Urin durch die Nierenfunktion beeinflusst, auch wenn sich hierfür in dieser Studie keine signifikanten Ergebnisse zeigten. So wäre denkbar, dass es bei einer hypertensiven Nephropathie zu einer geringeren Ausscheidung von 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan mit dem Urin kommt. Hierfür sprechen die Ergebnisse verschiedener Studien, in welchen mit sinkender GFR bzw. steigender Albuminurie die 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Werte im Plasma steigen und im Urin sinken [243, 244]. So könnten sich auch in der vorliegenden Studie die 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Werte von HypAll und Kontrollen angenähert haben, da unter den HypAll tendenziell mehr Studienteilnehmer Zeichen eines initialen Nierenschadens mit normaler GFR und Albuminurie aufwiesen.

Sowohl beim Gruppenvergleich als auch bei der Korrelations- und Regressionsanalyse zeigte sich das Alter als wichtiger Einflussfaktor auf die 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Level. In Studien in Verbindung mit arterieller Hypertonie lässt sich kein einheitliches Bild beim Zusammenhang von Alter und 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan finden. Korrelationen werden als nicht vorhanden [245], positiv [246] oder sogar



negativ [241] beschrieben. Losgelöst vom Kontext der arteriellen Hypertonie konnten einige Studien, zusammengefasst von Voss et al. [247], erhöhte Isoprostane im Alter feststellen. Den Einfluss des Alters bei der Untersuchung von Isoprostanen gilt es daher auch weiter zu berücksichtigen.

15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan stellt im Vergleich zum MDA den besser validierten Marker für Lipidperoxidation dar. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass unter Berücksichtigung des Alters keine erhöhte Lipidperoxidation bei TRH-Patienten vorliegt. Zur Einschätzung des Einflusses COX-abhängiger Wege bei der 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Entstehung wäre eine zeitgleiche Bestimmung der freien und totalen 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan-Level interessant.

#### **4.2.7 Erhöhter oxidativer Stress bei arterieller Hypertonie**

Zusammenfassend lässt sich anhand der untersuchten Marker ein erhöhter oxidativer Stress in der HypAll-Gruppe feststellen. Der einzige Marker, welcher keinen Gruppenunterschied vorweist, ist das MDA. Dieses ist, zumal mit dem TBARS-Assay gemessen, als Marker der Lipidperoxidation ohnehin schwächer einzuschätzen als das 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan [248].

Alle verwendeten Marker wurden mittels etablierter immunologischer oder photometrischer Verfahren bestimmt, welche, wenn auch in ihrer Sensitivität und Spezifität nicht an die chromatographischer heranreichend, für die Menge an Proben gut umsetzbar waren. Anders als in vergleichbaren Studien kamen mehrere Marker für oxidativen Stress aus sowohl Blut als auch Urin gleichzeitig zur Anwendung, sodass eine Vielfalt verschiedener ROS-induzierter Molekülschäden abgebildet werden konnte.

Für einen Teil der Marker, 8-oxodG und 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan, zeigte sich bislang in der Literatur ein uneinheitliches Bild bezüglich ihrer Ausprägung bei arterieller Hypertonie. Für die anderen Marker konnten bereits Werte im Sinne eines erhöhten oxidativen Stresses bei arterieller Hypertonie nachgewiesen werden. Patienten mit TRH haben dabei bisher kaum Berücksichtigung gefunden und stehen in dieser Studie im Vordergrund. Dieses besondere Patientengut zeichnet sich durch eine lange Hypertonie-Historie sowie die Einnahme zahlreicher

Antihypertensiva aus und unterscheidet sich darin wesentlich von den sonst untersuchten therapienaiven Hypertonikern. Bei der Behandlung der Frage, weshalb nur 2 der 6 Marker für oxidativen Stress einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und HypAll hervorbrachten, sind diese Besonderheiten mit einzubeziehen. So berichten Rodrigo et al. [249], dass oxidativer Stress und damit auch seine Messung mittels Marker vor allem in der Frühphase der arteriellen Hypertonie, wenn das vaskuläre Remodeling induziert wird, erhöht bzw. relevant ist und nicht im Krankheitsverlauf, wenn die endotheliale Dysfunktion bereits irreversibel ist und sich die ROS-Produktion im Rahmen von Rückkopplungsmechanismen selbst aufrechterhält.

Die entscheidendere Rolle spielen jedoch die antihypertensiven Medikamente der Studienteilnehmer, welche womöglich nicht nur für den teils nicht-signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und HypAll, sondern auch für den mangelnden Unterschied zwischen HypGut und HypSch verantwortlich sind. Zahlreiche Antihypertensiva-Klassen entfalten eine über die bloße Blutdrucksenkung hinausgehende, antioxidative Wirkung, indem sie unter anderem in den NO-Stoffwechsel eingreifen [250]. Unter den Betablockern konnte für Nebivolol ein antioxidativer Effekt nachgewiesen werden. Durch Aktivierung der endothelialen NOS erhöht es die NO-Bioverfügbarkeit [251]. Der Calciumantagonist Nifedipin führt ebenso zu einer Erhöhung der NO-Konzentration in Endothelzellen [252]. In der HypAll-Gruppe dieser Studie nahmen 79,7 % einen Calciumantagonisten und 76,6 % einen Betablocker ein, wobei keine weitere Wirkstoff-Differenzierung innerhalb der Substanzklassen erfolgte und somit unklar bleibt, inwiefern sie Einfluss auf den oxidativen Stress ausgeübt haben könnten. Wesentlich wichtiger sind die ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>R-Blocker, da sie von 87,5 % der HypAll-Gruppe eingenommen wurden. Diese Substanzklassen unterbinden die in Abschnitt 1.2 und 1.4.2 aufgeführten Effekte des RAAS und besitzen eine stärkere über die Blutdruck-Senkung hinausgehende Wirkung als andere Antihypertensiva-Klassen, indem sie Entzündung, oxidativen Stress und vaskuläres Remodeling reduzieren und einen nachgewiesenen kardiovaskulären Schutz bieten [42]. Auch in anderen vergleichbaren Studien konnte der antioxidative Einfluss von Antihypertensiva beobachtet werden. So

wiesen Hypertoniker unter antihypertensiver Therapie zum einen gleiche [220, 242, 253] und zum anderen sogar niedrigere [232] Level oxidativen Stresses auf als ihre gesunden Kontrollen.

In diesem Zusammenhang gilt es auch den mangelnden Unterschied von oxidativem Stress zwischen HypGut und HypSch zu betrachten. In zahlreichen Studien konnte eine blutdruckunabhängige Senkung des oxidativen Stresses durch Antihypertensiva, insbesondere AT<sub>1</sub>R-Blocker, nachgewiesen werden [187, 217, 254]. Daher könnten sich die Level oxidativen Stresses beider Gruppen, auch wenn ihre Blutdruckwerte per definitionem unterschiedlich sind, bereits angeglichen haben, zumal sowohl HypGut als auch HypSch im Median 5 Antihypertensiva mit gleichen Anteilen an RAAS-wirksamen Medikamenten einnahmen (siehe Tabelle 3.6). Einen zusätzlichen Einfluss könnte die Dauer der Medikamenteneinnahme spielen. Saez et al. [255] beschreiben diesbezüglich eine steigende antioxidative Wirkung von Antihypertensiva mit der Länge der Anwendung. Da es sich bei den Studienteilnehmern der HypAll-Gruppe um TRH-Patienten handelt, ist von einer langen Einnahmedauer auszugehen.

Auch für Statine konnte in zahlreichen experimentellen und klinischen Studien eine über die reine Fettsenkung hinausgehende antioxidative Wirkung nachgewiesen werden [256]. Dies könnte ebenfalls für diese Studie von Relevanz sein und zu den nicht-signifikant unterschiedlichen bzw. ähnlichen Leveln der Marker für oxidativen Stress zwischen Kontrollen und HypAll bzw. HypGut und HypSch beigetragen haben, da Statine sowohl von den HypGut als auch von den HypSch häufiger als von den Kontrollen eingenommen wurden (44,4 % vs. 35,7 % vs. 12,5 %).

Weiterhin muss beim Vergleich der Marker für oxidativen Stress zwischen HypGut und HypSch das Alter als Einflussfaktor berücksichtigt werden, da die HypGut im Median 4,5 Jahre älter waren als die HypSch und damit die ältesten Studienteilnehmer stellten. Dabei stehen die Ergebnisse aus Abschnitt 3.5.11 in scheinbarem Widerspruch mit dem bislang in diesem Abschnitt bezüglich der antioxidativen Wirkung von Antihypertensiva Beschriebenen. Dort konnte für Studienteilnehmer, welche RAAS- oder Alpha-Rezeptor-wirksame Medikamente einnahmen, ein erhöhter oxidativer Stress festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist

jedoch dem verzerrenden Effekt des Alters zuzuschreiben, da zum einen die Studienteilnehmer, die diese Medikamente einnahmen, auch signifikant älter waren und zum anderen die auffälligen Marker SHp, 3-Nitrotyrosin und 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan in der Korrelations- und Regressionsanalyse eine signifikante und bereits in der Literatur vorbeschriebene Beeinflussung durch das Alter zeigten. Die tendenziell höheren Level an oxidativem Stress in der HypGut-Gruppe lassen sich daher am ehesten durch deren höheres Alter erklären.

Unterschiede in den Gruppencharakteristika zwischen HypGut und HypSch ergaben sich zudem beim Auftreten von Tumorerkrankungen und Albuminurie. Unter den HypGut befanden sich signifikant mehr Studienteilnehmer mit einer malignen Tumorerkrankung in ihrer Vorgeschichte (17,6 % vs. 0 %) und für diese konnten erhöhte 3-Nitrotyrosin-Level gefunden werden (siehe Abschnitt 3.5.5). Erhöhte Level an oxidativem Stress sind bei diesen Studienteilnehmern vielmehr als Folge der Tumorbehandlung durch Chemo- oder Radiotherapie und nicht als Ursache der Erkrankung, wie in Abschnitt 1.4.1 erläutert, anzusehen. Die Induktion von ROS durch diese therapeutischen Verfahren ist bekannt [257, 258]. Da zum einen der Zeitraum von Erstdiagnose zum Untersuchungszeitpunkt um bis zu 15 Jahre differiert und zum anderen nur 6 der insgesamt 72 Studienteilnehmer betroffen waren, handelt es sich bei den Tumorerkrankten der HypGut um eine ausgesprochen heterogene und kleine Gruppe. Deren Einfluss auf die tendenziell höheren Level an oxidativem Stress der HypGut ist daher als gering einzuschätzen. Des Weiteren weisen unter den HypGut signifikant weniger Studienteilnehmer eine Albuminurie auf als unter den HypSch (9,5 % vs. 66,7%). Denkbar wäre, dass es durch einen glomerulären Schaden zu einem renalen Verlust von Markern für oxidativen Stress kommt und die HypGut entsprechend ihres besser funktionierenden glomerulären Filters weniger über den Urin ausscheiden. Unter der Annahme, dass eine Albuminurie Ausdruck einer eingeschränkten Nierenfunktion ist, sprechen die Ergebnisse der Korrelationsanalyse gegen einen solchen Zusammenhang. Dort korrelierte oxidativer Stress in Form von SHp und 3-Nitrotyrosin invers mit der Nierenfunktion (siehe Tabelle 3.8). Zudem wäre bei obiger Hypothese zu erwarten, dass sich die Stressmarker im Blut und im Urin entgegengesetzt verhielten und die HypGut zwar erhöhte Marker für oxidativen

Stress im Blut, jedoch nicht im Urin hätten. Ein genereller Einfluss der Nierenfunktion auf die Ausscheidungseigenschaften der unterschiedlichen Marker für oxidativen Stress lässt sich aus den Daten dieser Arbeit nicht ableiten. Vielmehr gilt es, wie in den obigen Abschnitten ansatzweise erfolgt, jeden Marker individuell auf seinen Stoffwechsel bezogen zu betrachten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die antioxidative Wirkung der Antihypertensiva und die unterschiedliche Altersstruktur maßgeblich zum mangelnden Unterschied an oxidativen Stress zwischen HypGut und HypSch beigetragen haben. Ein Einfluss von Tumorerkrankung oder Proteinurie ist hingegen nicht zu erkennen.

Bei Betrachtung der Ergebnisse der Stressmarker von Kontrollen und HypAll fällt weiterhin auf, dass nur die Marker, die einen Proteinschaden anzeigen, signifikante Unterschiede liefern. Werden Marker für oxidativen Stress bei chronischen Erkrankungen untersucht, wird ein Fließgleichgewicht aus deren Entstehung und Elimination postuliert. Für bestimmte Marker, wie dem aus der Lipidperoxidation hervorgehende MDA oder 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan, ist bekannt, dass sie kurzlebig sind, weiterreagieren oder schnell abgebaut werden [236, 248]. Möglicherweise spielt aber bei oxidativ veränderten Proteinen ein Akkumulationseffekt eine Rolle. Hierfür sprechen Erkenntnisse, die bei Untersuchungen von oxidativ geschädigten Proteinen im Zusammenhang mit Alterungsprozessen erlangt wurden. Demnach erfolgt der Abbau im Proteasom in der Regel erst, wenn das Protein an mehreren Stellen oxidiert wurde. Zudem wird eine Akkumulation von oxidierten Proteinen dadurch begünstigt, dass geschädigte Proteine Aggregate bilden, welche wiederum den proteasomalen Abbau dieser und anderer Proteine behindern [74]. Dies könnte auch auf die TRH-Patienten dieser Studie übertragen werden, bei welchen eine lang anhaltende arterielle Hypertonie bereits zu zahlreichen oxidativen Proteinschäden geführt hat, sodass die zellulären Abbaukapazitäten überschritten wurden. Weiterhin könnte die Lebensdauer von Proteinen zur Akkumulation beitragen. Einige Publikationen weisen darauf hin, dass die durchschnittliche Halbwertszeit von Proteinen zwar unter 2 Tagen liegt, es jedoch auch lösliche Proteine gibt, welche teils über Jahre stabil bleiben [259].

Eine Akkumulation ist insbesondere auch für 3-Nitrotyrosin anzunehmen, da die Aminosäure Tyrosin als sehr empfänglich für oxidative Modifikationen gilt und diese irreversibel sind. Die oxidativen Veränderungen an schwefelhaltigen Aminosäuren sind hingegen reversibel, sodass die Mechanismen für SHp weniger ersichtlich sind. Denkbar wäre, dass die SHp-Level nicht nur durch die Oxidation der Thiolgruppen erniedrigt sind, sondern auch durch irreversible oxidative Modifikationen an anderen Stellen des Proteins. Zum Beispiel könnte dadurch die dreidimensionale Struktur des Proteins so verändert werden, dass es sekundär zu einer Beeinträchtigung der Funktion des thiolhaltigen aktiven Zentrums, wie es sie bei verschiedenen antioxidativ-wirkenden Enzymen gibt, kommt.

Zur besseren Einordnung von möglichen Akkumulationseffekten wäre es interessant zum einen die Erkrankungsdauer der Studienteilnehmer und zum anderen die Längsschnittstudie über einen noch längeren Zeitraum zu erheben.

### **4.3 DNA-Schäden und arterielle Hypertonie**

Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der einzelnen verwendeten Marker für DNA-Schäden, auch vor dem Hintergrund ihrer Nachweisverfahren, besprochen und dann im letzten Unterpunkt in ihrer Gesamtheit als DNA-Schäden mit der arteriellen Hypertonie zusammengeführt.

#### **4.3.1 $\gamma$ -H2AX**

Als Marker für DSB wurden  $\gamma$ -H2AX-Foci in PBMC mittels Immunfluoreszenzmikroskopie bestimmt. HypAll wiesen keine höheren  $\gamma$ -H2AX-Werte auf als die Kontrollen. In der Korrelations- und Regressionsanalyse stellte sich der Diabetes mellitus als Einflussfaktor dar. In der Längsschnittstudie zeigten sich die  $\gamma$ -H2AX-Werte bei gleichzeitig sinkenden Blutdruckwerten tendenziell steigend, die Veränderungen korrelierten jedoch nicht.

Zum Nachweis *in vivo* entstandener DSB steht neben dem Comet Assay oder der Pulsed-Field-Gelelektrophorese die  $\gamma$ -H2AX-Bestimmung zur Verfügung, wobei letztere als sensitivstes Verfahren gilt [260]. Die in dieser Studie angewandte mikroskopische  $\gamma$ -H2AX-Nachweismethode mit Zählung der Foci wird wiederum als sensitiver angesehen als die Durchflusszytometrie oder das Immunoblotting.

PBMC stellen dabei das Nachweismedium der Wahl dar, da diese zum einen eine geringe  $\gamma$ -H2AX-Hintergrundaktivität aufweisen und zum anderen aufgrund ihrer Arretierung in der G0-Phase keiner Beeinflussung der  $\gamma$ -H2AX-Level durch den Zellzyklus unterliegen [261]. Manuelles Auszählen der  $\gamma$ -H2AX-Foci bietet sich, im Gegensatz zum (semi-)automatischen, vor allem bei geringer Foci-Dichte wie in dieser Studie an [262]. In dieser Studie kritisch zu bewerten ist, dass die Aufnahmen am Mikroskop, da die Färbungen über mehrere Wochen durchgeführt wurden, mit unterschiedlichen Belichtungszeiten angefertigt werden mussten. Die daraus möglicherweise resultierenden Schwankungen der  $\gamma$ -H2AX-Detektion wurden jedoch durch die Anpassung der Kontrasteinstellung anhand der Positivkontrollen während der Bearbeitung mit ImageJ minimiert.

Die Level an  $\gamma$ -H2AX-Foci/Zelle in PBMC lagen in dieser Studie und der von Schurman et al. [166] um etwa ein 10-Faches höher als in anderen Studien, welche vor allem Tumorpatienten unter Chemo- oder Radiotherapie untersuchten [110]. Schurman et al. beschreiben steigende  $\gamma$ -H2AX-Foci/Zelle mit steigender relativer Zentrifugalbeschleunigung (RZB) während des Aufbringens der PBMC auf die Objektträger durch Zytozentrifugation. In anderen Studien sind die methodischen Beschreibungen hierzu mangelhaft, da entweder nur die Drehzahl genannt wird oder keine weiteren Angaben hierzu gemacht werden. Die höheren  $\gamma$ -H2AX-Werte in dieser Studie könnten also durch eine höhere RZB bedingt sein. Gegen einen solchen Einfluss spricht jedoch, dass Schurman et al. unter Verwendung des gleichen Zytozentrifugationsgeräts mit 200 rpm den gleichen  $\gamma$ -H2AX-Wertebereich wie diese Studie mit 1000 rpm erzielte. Vielmehr scheint die Auszählmethodik die Ursache für den höheren  $\gamma$ -H2AX-Wertebereich zu sein [166]. Da die zum einen mit FITC- und zum anderen mit UV-2A-Filter angefertigten Bilder bei der Foci-Auszählung nicht übereinandergelegt wurden, verbesserte sich die Auflösung der  $\gamma$ -H2AX-Foci, sodass mehr gezählt werden konnten.

Ein weiterer möglicher verfälschender Faktor auf die  $\gamma$ -H2AX-Foci-Anzahl könnte die unterschiedliche Neigung zur Ausbildung dieser unter den durch Zentrifugation gewonnenen Zellarten der PBMC-Schicht, darunter Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten, sein [263]. Da in dieser Studie durch das manuelle Auszählen Zellen mit nicht-rundem Zellkern, also Granulozyten, nicht

berücksichtigt wurden, ist dieser Effekt jedoch als nicht ausschlaggebend anzusehen.

Versuchstiere, bei denen durch Aldosteron- [264] oder Angiotensin II-Infusion [94] eine arterielle Hypertonie induziert wurde, wiesen in ihren Herz- und Nierengeweben vermehrt DSB, gemessen u.a. anhand von  $\gamma$ -H2AX, auf. Diese Ergebnisse ließen auch erhöhte  $\gamma$ -H2AX-Werte bei hypertensiven Menschen vermuten. Neben der Studie von Schurman et al. [166] ist diese Studie bislang die einzige, die diesen Marker in einem solchen Zusammenhang in einer Humanstudie untersucht. Schurman et al. konnten bei Betrachtung ihres kompletten Studienkollektivs nach Alters- und Geschlechtsadjustierung ebenfalls keine erhöhten  $\gamma$ -H2AX-Werte bei Hypertonikern finden. Allerdings wiesen in der Subgruppe der über 57-Jährigen hypertone Studienteilnehmer signifikant mehr  $\gamma$ -H2AX-Foci/Zelle auf als normotone. In der vorliegenden Studie scheint ein solcher Vergleich nur schwer möglich, da die Kontrollgruppe mit einem medianen Alter von 56 Jahren etwa 10 Jahre jünger ist als die HypAll-Gruppe. Sowohl Schurman et al. [166] als auch Sedelnikova et al. [265] beobachteten jedoch eine Stagnation der  $\gamma$ -H2AX-Werte ab einem bestimmten Alter (57 bzw. 50 Jahre). Auch unter Berücksichtigung dieser Feststellung lassen sich in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede finden, sodass doch abzuleiten ist, dass die Ergebnisse der beiden Studien erheblich differieren. Trotz des besseren Verhältnisses zwischen Kontrollen und Hypertonikern bei Schurman et al. im Vergleich zu dieser Studie (25 zu 15 vs. 8 zu 64), bleiben wichtige Charakteristika der Studienteilnehmer wie die Definition der Hypertoniker-Gruppe und deren medikamentöse Therapie unklar. Möglicherweise waren die Hypertoniker der Schurman-Studie, wie bei den meisten Studien in diesem Bereich, im Gegensatz zu den HypAll dieser Studie therapienaiv. Die gleichen Level an DSB in dieser Studie könnten daher, wie bereits für die Marker für oxidativen Stress in Abschnitt 4.2.7 diskutiert, durch den antioxidativen Effekt der eingenommenen Antihypertensiva erklärt werden. So konnte in einer Tierstudie gezeigt werden, dass bei mit DOCA (Deoxycorticosteron-Acetat) und Salz behandelten Ratten zum einen DNA-Schäden in Form von DSB induziert und zum anderen diese Schäden durch einen



Aldosteronantagonisten auch unabhängig vom Blutdruck reduziert werden können [214]. Ähnliches zeigte sich in einer anderen Studie mit Angiotensin II, wobei ein antigenotoxischer Effekt des AT<sub>1</sub>R-Blockers zu sehen war [201]. Interessant für diese Studie wäre sicherlich die Bestimmung von Angiotensin II, um, neben den erhobenen Parametern (siehe Tabelle 3.3), das RAAS komplett abzubilden.

Als Ursache für die ansteigenden  $\gamma$ -H2AX-Werte über die Zeitspanne von V1 bis FUP2 ist eine Akkumulation der DNA-Schäden denkbar, da Lymphozyten, die den Großteil der PBMC ausmachen, eine Lebensdauer von Tagen bis mehreren Jahren aufweisen. Dagegen spricht die kurze Halbwertszeit der  $\gamma$ -H2AX-Foci von etwa 2 bis 7 Stunden. Es ist daher bei der Bestimmung der  $\gamma$ -H2AX-Level im Rahmen einer chronischen Erkrankung, wie der arteriellen Hypertonie, von einem Fließgleichgewicht aus DSB-Entstehung und -Reparatur auszugehen [110]. In diesem Zusammenhang wäre es für diese Studie zum Beispiel interessant gewesen, das ABDM unmittelbar bis zur Blutentnahme durchzuführen, um den Einfluss hypertensiver Krisen abbilden zu können. Dies war aus organisatorischen Gründen nicht zu realisieren. Letztlich ist die Wertigkeit der Längsschnittstudie aufgrund der niedrigen Fallzahl nur eingeschränkt.

Als Einflussfaktor auf die  $\gamma$ -H2AX-Werte konnte in dieser Studie lediglich die Begleiterkrankung Diabetes mellitus gefunden werden. Sowohl für Diabetes mellitus Typ 1 [266] als auch Typ 2 [267] konnten bereits erhöhte  $\gamma$ -H2AX-Level beobachtet werden. Weitere Untersuchungen des Diabetes mellitus in Bezug auf DNA-Schäden sind für die Zukunft sicherlich interessant, zumal Diabetes mellitus und arterielle Hypertonie im Rahmen des metabolischen Syndroms häufig zusammen auftreten.

Als einer von zwei Markern für DNA-Schäden in dieser Studie, neben den Mikrokernen, nimmt  $\gamma$ -H2AX eine zentrale Rolle ein. Es kam dabei die derzeit sensitivste Methode zum Nachweis von DSB zur Anwendung. Es konnten bei den hier untersuchten Hypertonikern keine erhöhten  $\gamma$ -H2AX-Werte nachgewiesen werden, wodurch das Ergebnis nicht in Übereinstimmung mit der bislang einzigen vergleichbaren Studie von Schurman et al. [166] steht. Die gleichzeitige

Untersuchung von Kontrollen, therapienaiven und vorbehandelten Hypertonikern ist für zukünftige Studien interessant, um einen möglichen DNA-protectiven Effekt der Antihypertensiva herausarbeiten zu können.

### 4.3.2 Mikrokernfrequenztest

Mittels Mikrokernfrequenztest wurden verschiedene chromosomale Schäden in Form von Mikrokernen und anderen nukleären Anomalien in PBMC nachgewiesen. Hierzu kam die Immunfluoreszenzmikroskopie zum Einsatz. Zwischen HypAll und Kontrollen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Frequenz an Mikrokernen oder nukleären Anomalien. Als Einflussfaktoren für Mikrokerne wurde das Renin, der systolische Blutdruck und das NT-proBNP ausfindig gemacht. Für nukleäre Anomalien konnte kein Einflussfaktor gefunden bzw. kein signifikantes Modell erstellt werden. In der Längsschnittstudie zeigte sich ein signifikanter Anstieg nukleärer Anomalien von FUP1 zu FUP2.

Der Nachweis von Mikrokernen ist eine etablierte Methode, um den genotoxischen Effekt verschiedener Stoffe im Rahmen von *in vitro* Genotoxizitätstests [268] oder Biomonitoring [269] zu messen. Dazu findet der „cytokinesis-block micronucleus“ (CBMN) Assay, beschrieben von Fenech [120], bei welchem durch Gabe von Cytochalasin B die Zytokinese verhindert und damit Mikrokerne in zweikernigen Zellen gezählt werden, die meiste Anwendung. In dieser Studie wich die Probenaufbereitung insofern vom CBMN Assay ab, dass 24 Stunden nach Beginn der Phytohämagglutinin-Stimulation die Zellen fixiert wurden und keine Inkubation mit Cytochalasin B erfolgte. Die Mikrokerne wurden demnach, anders als beim CBMN Assay, in einkernigen Zellen bestimmt. Die dabei nachgewiesenen Mikrokerne sind, da sie zu einem frühen Zeitpunkt der Lymphozytenkultur und damit vor ihrer ersten *in vitro* Zellteilung gemessen wurden, mit hoher Sicherheit *in vivo* entstanden. Dahingegen sind viele der in zweikernigen Zellen nach ihrer ersten *in vitro* Zellteilung nachgewiesenen Mikrokerne höchstwahrscheinlich erst *in vitro* entstanden [270]. Ohne die Behandlung von Cytochalasin B besteht das Risiko falsch negative Ergebnisse zu erzielen, da erst durch die Zellteilung vorhandene DNA-Schäden in Form von Mikrokernen demaskiert werden können

[121]. Die Verwendung von Cytochalasin B hingegen birgt das Risiko falsch positive Ergebnisse zu generieren, da unklar ist inwiefern Lymphozyten *in vitro* in der Lage sind *in vivo* entstandene DNA-Schäden zu reparieren [271]. Welches der beiden Risiken letztlich überwiegt, ist Bestandteil aktueller Diskussionen [270, 272]. In diesem Zusammenhang wurde die Sensitivität des Tests infrage gestellt, da durch die lange Inkubation von 44 Stunden bis zur Cytochalasin B-Gabe womöglich Zellen mit *in vivo* entstandenen Mikrokernen bereits durch Apoptose während der *in vitro* Kultivierung zugrunde gehen und DNA-Schäden bereits vor der Ausbildung von Mikrokernen *in vitro* repariert werden [270]. Es bleibt daher offen, ob relativ gering genotoxische Prozesse, verglichen zu zum Beispiel strahlen- oder chemotherapeutischen Maßnahmen, überhaupt mit diesem Test detektiert werden können. Um die genauen Mechanismen der *in vitro* Reparatur von DNA-Schäden und Mikrokern-Bildung zu verstehen, benötigt es daher weiterer Untersuchungen.

Derweil gibt es bereits zahlreiche Studien, in welchen der Mikrokernfrequenztest auch für endogene Erkrankungen angewandt wurde. Neben Tumor- [114] und chronischer Nierenerkrankung [273] zeigten auch kardiovaskuläre Krankheiten [274] eine Assoziation mit erhöhten Leveln an Mikrokernen. Neben dieser Studie liegen keine Humanstudien vor, welche explizit den Zusammenhang von arterieller Hypertonie und Mikrokernen untersuchen. Zwar fanden Toljic et al. [165] eine höhere Mikrokernfrequenz bei Patientinnen mit Gestationshypertonie verglichen zu gesunden Schwangeren, jedoch ist ein Vergleich mit dieser speziellen Patientengruppe nicht geeignet. Möglicherweise ist für den mangelnden Unterschied an Mikrokernen zwischen den Kontrollen und HypAll, wie auch schon für  $\gamma$ -H2AX angeführt, die antihypertensive Medikation der HypAll-Gruppe verantwortlich. In einer Zellkultur-Studie konnten die durch Aldosteron induzierten Mikrokerne durch einen Aldosteronantagonisten verhindert werden [275]. ACE-Hemmer und AT<sub>1</sub>R-Blocker sind für diese Studie jedoch relevanter, da 87,5 % der HypAll-Gruppe ein Medikament dieser Substanzklassen einnahmen. So stellten Schupp et al. [276] bei Hämodialyse-Patienten einen blutdruckunabhängigen antigenotoxischen Effekt von Candesartan, gemessen

anhand von Mikrokernen, fest. Die Mikrokern-Level von HypGut und HypSch einerseits und von Kontrollen und HypAll andererseits könnten sich daher bereits angeglichen haben.

Bei der Interpretation der Ergebnisse der Längsschnittstudie stehen statistische Überlegungen im Vordergrund, auch wenn denkbar wäre, dass eine Akkumulation von DNA-Schäden bei Lymphozyten während ihrer Zirkulation im Blut zu einer Erhöhung der nukleären Anomalien von FUP1 zu FUP2 geführt hat. Bei der Auswertung sind zum einen die niedrigen Fallzahlen mit einem  $n = 9$  zu FUP2 und zum anderen die Streuungsmaße zu berücksichtigen. Obwohl sich die Interquartilbereiche der Messungen der nukleären Anomalien zu FUP1 und FUP2 nahezu überlappen, sind die Mediane signifikant unterschiedlich, da zudem eine ausgeprägte entgegengesetzte schiefe Verteilung vorliegt.

Sowohl in der Korrelations- als auch in der Regressionsanalyse konnte ein negativer Zusammenhang zwischen der Reninkonzentration und der Mikrokernfrequenz gesehen werden. Diese Beobachtung zeigt, dass die von der Mehrzahl der Studienteilnehmer eingenommenen ACE-Hemmer bzw. AT<sub>1</sub>R-Blocker ihre Wirkung entfalten, da zum einen durch die Hemmung des negativen Rückkopplungsmechanismus erhöhte Reninkonzentrationen zu erwarten sind und zum anderen gleichzeitig die Mikrokernfrequenz durch die oben erwähnte antigenotoxische Wirkung reduziert wird. Ohne die Einnahme von ACE-Hemmern oder AT<sub>1</sub>R-Blockern wäre jedoch ein positiver Zusammenhang zwischen Reninkonzentration und Mikrokernen zu erwarten, da eine hohe Reninkonzentration Ausdruck eines hochregulierten RAAS ist und dieses wiederum Mikrokerne induziert [277]. Korrelationen zwischen Mikrokernen und anderen Bestandteilen des RAAS hätten geholfen den gefundenen Zusammenhang zwischen Mikrokernen und Renin besser einordnen zu können.

Nicht in der Korrelations- jedoch in der Regressionsanalyse zeigte sich zudem ein Zusammenhang zwischen Mikrokernen und NT-proBNP bzw. dem systolischen Blutdruck. Bislang liegen keine Studien vor, welche Mikrokerne und NT-pro BNP, ein Marker der Herzinsuffizienz, zusammen untersuchten. Indes konnte für andere Marker für DNA-Schäden eine Assoziation mit der Herzinsuffizienz festgestellt werden [80]. Für weitere Untersuchungen der Marker für oxidativen Stress und

DNA-Schäden im Zusammenhang mit der Herzinsuffizienz müssten Daten der Echokardiographie oder NYHA-Klassifikation, welche bei den Studienteilnehmern diese Studie erhoben, aber nicht verwertet wurden, herangezogen werden.

Ein negativer Zusammenhang von Mikrokernen und Systole Gesamt war nicht zu erwarten. Jedoch sollten, unter Berücksichtigung der statistischen Bedenken aus 4.1.2, die Ergebnisse der Regressionsanalyse für die Werte des Mikrokernfrequenztests keiner weiteren Interpretation zugeführt werden.

In dieser Studie wurde erstmalig bei Patienten mit arterieller Hypertonie die Mikrokernfrequenz bestimmt. Dabei konnten, anders als Tier- und Zellkultur-Versuche es erwarten ließen, keine erhöhten Mikrokern-Level bei Hypertonikern festgestellt werden. Um methodische Gründe hierfür auszuschließen, sollten die Mikrokerne in Folgestudien zum einen sowohl in einkernigen als auch in zweikernigen Zellen und zum anderen zusätzlich in therapienaiven Hypertonikern bestimmt werden.

### **4.3.3 Keine erhöhten DNA-Schäden bei arterieller Hypertonie**

In dieser Studie ließen sich anhand der Marker  $\gamma$ -H2AX und Mikrokerne/Nukleäre Anomalien keine erhöhten Level an DNA-Schäden bei Hypertonikern nachweisen. Ebenso ergaben sich keine Unterschiede bezüglich der untersuchten Marker für DNA-Schäden unter den Hypertoniker-Subgruppen.

Ergebnisse aus Zellkultur- und Tierversuchen (siehe 4.3.1 und 4.3.2) sowie aus anderen Humanstudien ließen erhöhte Level an DNA-Schäden bei Hypertonikern erwarten. In anderen Humanstudien kamen, die Studie von Schurman et al. [166] ausgenommen, stets andere Methoden zum Nachweis von DNA-Schäden, insbesondere der Comet-Assay [278-280], zum Einsatz. Die Ursache der unterschiedlichen Ergebnisse ist zum einen in der Methode und zum anderen im Patientenkollektiv zu suchen.

Beim Vergleich verschiedener Methoden zur Detektion oxidativer DNA-Schäden fand sich eine breite Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen dem Comet Assay und anderen Tests, wie dem Mikrokernfrequenztest [281]. Dabei werden mit dem Comet Assay neben DSB auch weniger schwerwiegende und häufiger auftretende

DNA-Schäden wie SSB und alkalilabile Stellen nachgewiesen [164]. Womöglich hätte der Comet Assay daher in dieser Studie einen signifikanten Unterschied zwischen den Kontrollen und HypAll hervorgebracht und wäre eine sinnvolle ergänzende Methode gewesen. Der Vorteil dieser Studie liegt jedoch gerade in der Tatsache, dass bereits, anders als in vergleichbaren Studien, zwei verschiedene etablierte Methoden zum Nachweis von DNA-Schäden zur Anwendung kamen. Mit dem Mikrokernfrequenztest wurde zudem der einzige etablierte Marker, für den bislang eine prognostische Relevanz bezüglich des Tumorrisikos nachgewiesen werden konnte [114, 115], verwendet. In *in vitro* Genotoxizitätstests zeigten der  $\gamma$ -H2AX-Assay und der Mikrokernfrequenztest eine gute Korrelation [282]. Unter den Humanstudien fand sich nur eine, welche beide Tests anwandte, wobei erhöhte Level an  $\gamma$ -H2AX-Foci mit erhöhten Leveln an Mikrokernen einhergingen [283]. Da in dieser Studie beide Tests keine erhöhten Level an DNA-Schäden bei Hypertonikern hervorbrachten, erscheint das Ergebnis umso valider. Um die hier erlangten Resultate zu bestätigen, sind weitere Untersuchungen, zum Beispiel anhand eines besseren Verhältnisses an Kontrollen zu Erkrankten, sinnvoll. Diese Studie bietet als die erste, welche die beiden Marker im Rahmen der arteriellen Hypertonie bestimmt, eine gute Grundlage.

Zudem unterscheidet sich das in dieser Studie untersuchte Patientengut deutlich von dem anderer Studien. Da es sich bei den Patienten der HypAll-Gruppe um Patienten mit TRH handelt, ging dieser Studie eine langjährige Einnahme verschiedener Antihypertensiva voraus. So ist zusätzlich zu der in Abschnitt 4.2.7 beschriebenen antioxidativen Wirkung der Antihypertensiva auch eine antigenotoxische Wirkung anzunehmen, welche zu einem Absinken der Marker für DNA-Schäden in der HypAll-Gruppe geführt haben könnte. Unterstützt wird diese Vermutung durch eine Beobachtung in einer Studie von Subash [279], in welcher es nach einjähriger antihypertensiver Therapie – ein genaues therapeutisches Regime wurde nicht angegeben – zu einer Reduktion von DNA-Schäden, gemessen mit dem Comet Assay, kam. Dabei spielen die AT<sub>1</sub>R-Blocker und Aldosteronantagonisten eine besondere Rolle. In einigen Studien unserer Arbeitsgruppe (siehe 4.3.1 und 4.3.2) konnte gezeigt werden, dass diese Stoffe,

über die Reduktion des oxidativen Stresses, auch zu einer Reduktion des oxidativ induzierten DNA-Schadens führen.

In diesem Zusammenhang kommt die Frage auf, weshalb in dieser Studie zwar ein erhöhter oxidativer Stress, jedoch keine erhöhten DNA-Schäden bei Hypertonikern nachgewiesen werden konnten. Möglicherweise besitzen Antihypertensiva, insbesondere die RAAS-wirksamen, eine direkte DNA-protektive Wirkung, welche unabhängig vom Redox-Status ist. Bisherige Untersuchungen des AT<sub>1</sub>R und MR zeigten pleiotrope, auch nicht ROS-abhängige Effekte [50, 55], zum Beispiel über den MAP-Kinase- oder JAK-STAT-Signalweg. Die weitere Erforschung der mannigfaltigen Signaltransduktion von u.a. AT<sub>1</sub>R und MR sowie deren Blockierung ist im Gange.

Weiterhin könnte der oxidative Stress durch die Antihypertensiva bereits so reduziert worden sein, dass dieser zwar noch erhöht messbar ist, aber keine relevante Menge an komplexen DNA-Schäden wie DSB oder Chromosomenschäden mehr generieren kann. Weniger komplexe DNA-Schäden könnten nach wie vor erhöht vorliegen, was sich auch an den tendenziell und nicht-signifikant erhöhten 8-oxodG-Werten zeigt.

Letztlich lässt sich postulieren, dass die Einnahme von insbesondere RAAS-wirksamen Antihypertensiva essenziell ist, um langfristig DNA-Schäden bei Hypertonikern zu vermeiden. Dieser antigenotoxische Effekt scheint, wenn man den Vergleich zwischen HypGut und HypSch betrachtet, auch unabhängig von der eigentlichen Blutdruckeinstellung zu sein.

#### **4.4 Ausblick**

In dieser Studie konnten mittels einer breiten Auswahl an Biomarkern sowohl im Quer- als auch im Längsschnitt eine gut umschriebene, besondere Hypertoniker-Gruppe bezüglich oxidativem Stress und DNA-Schäden untersucht werden. Für eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse wäre zum einen ein verbessertes Studiendesign mit adäquaterem Matching und zum anderen eine Optimierung der Nachweismethoden wie in den Abschnitten 4.2 und 4.3 angegeben notwendig.

Um den Circulus vitiosus aus oxidativem Stress und arterieller Hypertonie zu beeinflussen, wurden bereits zahlreiche Versuche unternommen, Antioxidantien als Antihypertensiva einzusetzen. Die in Studien am Menschen gewonnenen Ergebnisse zeigten kein einheitliches Bild bezüglich deren Wirksamkeit [249]. Aus dieser Studie sowie zahlreichen vorherigen geht hervor, dass Antihypertensiva auch über die Blutdrucksenkung hinaus eine antioxidative Wirkung besitzen. Es erscheint daher sinnvoll bei der Prüfung neuer antihypertensiver Substanzen auch deren antioxidativen und antigenotoxischen Effekt mittels Biomarker zu evaluieren, um für den Patienten den optimalen Nutzen aus der antihypertensiven Therapie zu erzielen.

Ebenso ist vorstellbar, dass Biomarker im klinischen Alltag Verwendung finden, um das individuelle Risiko eines Patienten für Folgeerkrankungen zu kalkulieren oder eine individuelle Therapie mit einer entsprechenden Auswahl der Antihypertensiva und individuellem Blutdruck-Zielbereich festzulegen. Hierfür müssten jedoch die in dieser Studie angewandten Verfahren an großen Patientenzahlen validiert und zur massentauglichen Anwendung automatisiert werden.

Zuletzt gilt es, das Augenmerk auf die in dieser Studie nur einen geringen Umfang einnehmende Längsschnittanalyse zu richten. Die Nachteile dieses Studienabschnitts mit geringen Fallzahlen und unbekannter Krankheitsdauer der Patienten sind offensichtlich. Dennoch geben die Ergebnisse, insbesondere die Korrelation von  $\Delta 1(\text{D-ROM})$  mit  $\Delta 1(\text{Systole Sitzen})$  und  $\Delta 1(\text{Systole Tag})$ , Anlass zur Planung weiterführender Untersuchungen, um den Einfluss einer antihypertensiven Therapie auf den Redox- und DNA-Status näher zu verstehen. Dabei wäre interessant zum einen die Patienten über einen deutlich längeren Zeitraum von Jahren zu beobachten und zum anderen auch therapienaive Patienten von Diagnosestellung an zu begleiten und mit den TRH-Patienten zu vergleichen.



## 5 Zusammenfassung

Patienten mit arterieller Hypertonie haben ein erhöhtes Risiko eine Tumorerkrankung, insbesondere Nierenzellkarzinome, zu entwickeln. Die arterielle Hypertonie ist über die Entstehung von oxidativem Stress mit der Entwicklung von DNA-Schäden verknüpft, wobei ein hochreguliertes Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) eine entscheidende Rolle einnimmt. Das Ziel dieser Arbeit war es zum einen Hypertoniker (HypAll) und gesunde Kontrollen und zum anderen gut (HypGut) und schlecht (HypSch) eingestellte Hypertoniker unter Berücksichtigung der eingenommenen Antihypertensiva bezüglich ihrer Level an oxidativem Stress und DNA-Schäden zu vergleichen. Zusätzlich erfolgte im Rahmen einer Längsschnittanalyse der intraindividuelle Vergleich unter den Hypertonikern. Hierfür erfolgte die Bestimmung von SHp, D-ROM und 3-Nitrotyrosin als Marker für oxidativen Stress im Plasma, von 8-oxodG, 15-F<sub>2t</sub>-Isoprostan und Malondialdehyd als Marker für oxidativen Stress im Urin und von  $\gamma$ -H2AX und Mikrokernen als Marker für DNA-Schäden in Lymphozyten. Dabei konnte ein erhöhter oxidativer Stress in der HypAll-Gruppe verglichen zu den Kontrollen anhand aller Marker für oxidativen Stress mit Ausnahme von Malondialdehyd festgestellt werden. Nach Altersadjustierung zeigte sich dieser Gruppenunterschied nur noch für die Proteinstressmarker SHp und 3-Nitrotyrosin signifikant. Bezüglich der Marker für DNA-Schäden ergab sich kein Unterschied zwischen HypAll und Kontrollen. Ebenso zeigte sich kein signifikanter Unterschied in den Leveln für oxidativen Stress und DNA-Schäden zwischen der HypGut- und HypSch-Gruppe. Zuletzt konnte im Rahmen der Längsschnittstudie ein positiver Zusammenhang zwischen der Entwicklung des Blutdrucks und des oxidativen Stresses anhand der Veränderung von D-ROM und des systolischen Blutdrucks beobachtet werden.

Die teils nicht-signifikanten und teils mangelnden Unterschiede zwischen HypAll und Kontrollen sowie zwischen HypGut und HypSch sind am ehesten durch das besondere Patientengut, welches sich auch grundlegend von dem anderer vergleichbarer Studien unterscheidet, erklärbar. Die Patienten mit

therapieresistenter Hypertonie (TRH) zeichnen sich durch eine langjährige Einnahme zahlreicher Antihypertensiva aus. Diese, insbesondere die RAAS-wirksamen, besitzen eine über die reine Blutdrucksenkung hinausgehende antioxidative und antigenotoxische Wirkung, welche vermutlich zu einer Angleichung der Level für oxidativen Stress und DNA-Schäden geführt hat.

Um die Dynamik der Biomarker und den Einfluss der Antihypertensiva auf oxidativen Stress und DNA-Schäden besser zu verstehen, sind weitere Studien über einen längeren Beobachtungszeitraum sowie mit zusätzlich therapienaiven Hypertonikern sinnvoll. Die weitere Erforschung von Biomarkern, um sie im klinischen Alltag zur Verbesserung der Patientenbehandlung einsetzen zu können, ist notwendig.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Grossman E, Messerli FH, Boyko V, et al. Is there an association between hypertension and cancer mortality? *Am J Med.* 2002;112(6):479-86.
2. Weikert S, Boeing H, Pischon T, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol.* 2008;167(4):438-46.
3. Colt JS, Schwartz K, Graubard BI, et al. Hypertension and risk of renal cell carcinoma among white and black Americans. *Epidemiology.* 2011;22(6):797-804.
4. Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2011;60(4):615-21.
5. Rosato V, Zucchetto A, Bosetti C, et al. Metabolic syndrome and endometrial cancer risk. *Ann Oncol.* 2011;22(4):884-9.
6. Martin RM, Vatten L, Gunnell D, et al. Blood pressure and risk of prostate cancer: Cohort Norway (CONOR). *Cancer Causes Control.* 2010;21(3):463-72.
7. Han H, Guo W, Shi W, et al. Hypertension and breast cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Sci Rep.* 2017;7:44877.
8. Kabat GC, Kim M, Chlebowski RT, et al. A longitudinal study of the metabolic syndrome and risk of postmenopausal breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009;18(7):2046-53.
9. George AJ, Thomas WG, Hannan RD. The renin-angiotensin system and cancer: old dog, new tricks. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:745.
10. World Health Organization. Global Status report on noncommunicable diseases 2010 2011 [26.05.2016]. April 2011:[22-176]. Available from: [http://www.who.int/nmh/publications/ncd\\_report2010/en/](http://www.who.int/nmh/publications/ncd_report2010/en/).
11. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, et al. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990–2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet.* 2012;380(9859):2224-60.
12. Williams B, Mancia G, Spiering W, et al. 2018 ESC/ESH Guidelines for the management of arterial hypertension. *Eur Heart J.* 2018;39(33):3021-104.
13. Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS. Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell.* 2001;104(4):545-56.
14. Hamza SM, Dyck JR. Systemic and renal oxidative stress in the pathogenesis of hypertension: modulation of long-term control of arterial blood pressure by resveratrol. *Front Physiol.* 2014;5:292.
15. Kaplan NM. Hypertension curriculum review: lifestyle modifications for prevention and treatment of hypertension. *J Clin Hypertens (Greenwich).* 2004;6(12):716-9.
16. Savoia C, Burger D, Nishigaki N, et al. Angiotensin II and the vascular phenotype in hypertension. *Expert Rev Mol Med.* 2011;13:e11.

17. Zubcevic J, Waki H, Raizada MK, et al. Autonomic-Immune-Vascular Interaction: An Emerging Concept for Neurogenic Hypertension. *Hypertension*. 2011;57(6):1026-33.
18. Singh M, Mensah GA, Bakris G. Pathogenesis and clinical physiology of hypertension. *Cardiol Clin*. 2010;28(4):545-59.
19. Muller DN, Kvakan H, Luft FC. Immune-related effects in hypertension and target-organ damage. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2011;20(2):113-7.
20. Touyz RM. New insights into mechanisms of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens*. 2012;21(2):119-21.
21. Montezano AC, Touyz RM. Molecular mechanisms of hypertension--reactive oxygen species and antioxidants: a basic science update for the clinician. *Can J Cardiol*. 2012;28(3):288-95.
22. Schmieder RE. Hypertoniebedingte Endorganschäden. *Dtsch Arztebl International*. 2010;107(49):866-73.
23. Dolan E, Stanton A, Thijs L, et al. Superiority of ambulatory over clinic blood pressure measurement in predicting mortality: the Dublin outcome study. *Hypertension*. 2005;46(1):156-61.
24. Eckel RH, Jakicic JM, Ard JD, et al. 2013 AHA/ACC guideline on lifestyle management to reduce cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *Circulation*. 2014;129(25 Suppl 2):S76-99.
25. Law MR, Morris JK, Wald NJ. Use of blood pressure lowering drugs in the prevention of cardiovascular disease: meta-analysis of 147 randomised trials in the context of expectations from prospective epidemiological studies. *BMJ*. 2009;338.
26. Puar TH, Mok Y, Debajyoti R, et al. Secondary hypertension in adults. *Singapore Med J*. 2016;57(5):228-32.
27. Sukor N. Secondary hypertension: a condition not to be missed. *Postgrad Med J*. 2011;87(1032):706-13.
28. Milliez P, Girerd X, Plouin PF, et al. Evidence for an increased rate of cardiovascular events in patients with primary aldosteronism. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(8):1243-8.
29. Funder JW, Carey RM, Mantero F, et al. The Management of Primary Aldosteronism: Case Detection, Diagnosis, and Treatment: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016;101(5):1889-916.
30. Kallistratos MS, Giannakopoulos A, German V, et al. Diagnostic modalities of the most common forms of secondary hypertension. *Hellenic J Cardiol*. 2010;51(6):518-29.
31. Parati G, Lombardi C, Hedner J, et al. Position paper on the management of patients with obstructive sleep apnea and hypertension: joint recommendations by the European Society of Hypertension, by the European Respiratory Society and by the members of European COST (COoperation in Scientific and Technological research) ACTION B26 on obstructive sleep apnea. *J Hypertens*. 2012;30(4):633-46.
32. Adult Obstructive Sleep Apnea Task Force of the American Academy of Sleep. Clinical Guideline for the Evaluation, Management and Long-term

- Care of Obstructive Sleep Apnea in Adults. *J Clin Sleep Med.* 2009;5(3):263-76.
33. Fatureto-Borges F, Lorenzi-Filho G, Drager LF. Effectiveness of continuous positive airway pressure in lowering blood pressure in patients with obstructive sleep apnea: a critical review of the literature. *Integr Blood Press Control.* 2016;9:43-7.
  34. Rimoldi SF, Messerli FH, Bangalore S, et al. Resistant hypertension: what the cardiologist needs to know. *Eur Heart J.* 2015;36(40):2686-95.
  35. Calhoun DA, Jones D, Textor S, et al. Resistant hypertension: diagnosis, evaluation, and treatment: a scientific statement from the American Heart Association Professional Education Committee of the Council for High Blood Pressure Research. *Circulation.* 2008;117(25):510-26.
  36. Mahfoud F, Himmel F, Ukena C, et al. Behandlungsstrategien bei therapierefraktärer arterieller Hypertonie. *Dtsch Arztebl International.* 2011;108(43):725-31.
  37. Judd EK, Calhoun DA, Warnock DG. Pathophysiology and Treatment of Resistant Hypertension: The Role of Aldosterone and Amiloride-Sensitive Sodium Channels. *Semin Nephrol.* 2014;34(5):532-9.
  38. Oparil S, Schmieder RE. New approaches in the treatment of hypertension. *Circ Res.* 2015;116(6):1074-95.
  39. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm.* 2007;13(8 Suppl B):9-20.
  40. Castrop H. Angiotensin receptor-associated proteins: local modulators of the renin-angiotensin system. *Pflugers Arch.* 2013;465(1):111-9.
  41. Carey RM, Siragy HM. Newly recognized components of the renin-angiotensin system: potential roles in cardiovascular and renal regulation. *Endocr Rev.* 2003;24(3):261-71.
  42. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, et al. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. *Lancet.* 2007;369(9568):1208-19.
  43. Ferrario CM. Role of angiotensin II in cardiovascular disease therapeutic implications of more than a century of research. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2006;7(1):3-14.
  44. Marney AM, Brown NJ. Aldosterone and end-organ damage. *Clin Sci (Lond).* 2007;113(6):267-78.
  45. MacKenzie SM, Fraser R, Connell JM, et al. Local renin-angiotensin systems and their interactions with extra-adrenal corticosteroid production. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2002;3(4):214-21.
  46. Agarwal R, Campbell RC, Warnock DG. Oxidative stress in hypertension and chronic kidney disease: role of angiotensin II. *Semin Nephrol.* 2004;24(2):101-14.
  47. Jacoby DS, Rader DJ. Renin-angiotensin system and atherothrombotic disease: From genes to treatment. *Arch Intern Med.* 2003;163(10):1155-64.
  48. Karalliedde J, Viberti G. Evidence for renoprotection by blockade of the renin-angiotensin-aldosterone system in hypertension and diabetes. *J Hum Hypertens.* 2006;20(4):239-53.

49. Pfeffer MA, Swedberg K, Granger CB, et al. Effects of candesartan on mortality and morbidity in patients with chronic heart failure: the CHARM-Overall programme. *Lancet*. 2003;362(9386):759-66.
50. Mehta PK, Griendling KK. Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2007;292(1):C82-97.
51. Garrido AM, Griendling KK. NADPH Oxidases and Angiotensin II Receptor Signaling. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;302(2):148-58.
52. Sachse A, Wolf G. Angiotensin II-induced reactive oxygen species and the kidney. *J Am Soc Nephrol*. 2007;18(9):2439-46.
53. Connell JM, Davies E. The new biology of aldosterone. *J Endocrinol*. 2005;186(1):1-20.
54. Williams JS. Evolving research in nongenomic actions of aldosterone. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2013;20(3):198-203.
55. Briet M, Schiffrin EL. Vascular actions of aldosterone. *J Vasc Res*. 2013;50(2):89-99.
56. Queisser N. Oxidative and nitrosative stress induced by the mineralocorticoid aldosterone - Mechanism of induction and role of signal transduction pathways and transcription factors [Dissertation]. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2010.
57. Rossi GP, Sechi LA, Giacchetti G, et al. Primary aldosteronism: cardiovascular, renal and metabolic implications. *Trends Endocrinol Metab*. 2008;19(3):88-90.
58. Guichard JL, Clark D, 3rd, Calhoun DA, et al. Aldosterone receptor antagonists: current perspectives and therapies. *Vasc Health Risk Manag*. 2013;9:321-31.
59. Muiesan ML, Salvetti M, Paini A, et al. Inappropriate left ventricular mass in patients with primary aldosteronism. *Hypertension*. 2008;52(3):529-34.
60. Lee HH, Hung CS, Wu XM, et al. Myocardial ultrasound tissue characterization of patients with primary aldosteronism. *Ultrasound Med Biol*. 2013;39(1):54-61.
61. Pitt B, Zannad F, Remme WJ, et al. The effect of spironolactone on morbidity and mortality in patients with severe heart failure. Randomized Aldactone Evaluation Study Investigators. *N Engl J Med*. 1999;341(10):709-17.
62. Sies H. Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine. *Redox Biol*. 2015;4:180-3.
63. Paravicini TM, Touyz RM. NADPH oxidases, reactive oxygen species, and hypertension: clinical implications and therapeutic possibilities. *Diabetes Care*. 2008;31 Suppl 2:S170-80.
64. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002;82(1):47-95.
65. Brieger K, Schiavone S, Miller FJ, Jr., et al. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012;142:13659.
66. Kryston TB, Georgiev AB, Pissis P, et al. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutat Res*. 2011;711(1-2):193-201.

67. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84.
68. Masella R, Di Benedetto R, Vari R, et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem.* 2005;16(10):577-86.
69. Collet JF, Messens J. Structure, function, and mechanism of thioredoxin proteins. *Antioxid Redox Signal.* 2010;13(8):1205-16.
70. Li W, Khor TO, Xu C, et al. Activation of Nrf2-antioxidant signaling attenuates NFkappaB-inflammatory response and elicits apoptosis. *Biochem Pharmacol.* 2008;76(11):1485-9.
71. Tergaonkar V. NFkappaB pathway: a good signaling paradigm and therapeutic target. *Int J Biochem Cell Biol.* 2006;38(10):1647-53.
72. Alfadda AA, Sallam RM. Reactive oxygen species in health and disease. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:936486.
73. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40.
74. Hohn A, Konig J, Grune T. Protein oxidation in aging and the removal of oxidized proteins. *J Proteomics.* 2013;92:132-59.
75. Ho E, Karimi Galougahi K, Liu CC, et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice. *Redox Biol.* 2013;1:483-91.
76. Shah D, Mahajan N, Sah S, et al. Oxidative stress and its biomarkers in systemic lupus erythematosus. *J Biomed Sci.* 2014;21:23.
77. Schöttker B, Zhang Y, Heiss JA, et al. Discovery of a novel epigenetic cancer marker related to the oxidative status of human blood. *Genes Chromosomes Cancer.* 2015;54(9):583-94.
78. Ayala A, Munoz MF, Arguelles S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxid Med Cell Longev.* 2014;2014:360438.
79. Maynard S, Schurman SH, Harboe C, et al. Base excision repair of oxidative DNA damage and association with cancer and aging. *Carcinogenesis.* 2009;30(1):2-10.
80. Kroese LJ, Scheffer PG. 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and cardiovascular disease: a systematic review. *Curr Atheroscler Rep.* 2014;16(11):452.
81. Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B. Mechanisms of disease: oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of hypertension. *Nat Clin Pract Nephrol.* 2006;2(10):582-93.
82. Loperena R, Harrison DG. Oxidative Stress and Hypertensive Diseases. *Med Clin North Am.* 2017;101(1):169-93.
83. Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:239-67.
84. Sedelnikova OA, Redon CE, Dickey JS, et al. Role of oxidatively induced DNA lesions in human pathogenesis. *Mutat Res.* 2010;704(1-3):152-9.
85. Valko M, Izakovic M, Mazur M, et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem.* 2004;266(1-2):37-56.

86. Nakabeppu Y, Sakumi K, Sakamoto K, et al. Mutagenesis and carcinogenesis caused by the oxidation of nucleic acids. *Biol Chem.* 2006;387(4):373-9.
87. Caldecott KW. DNA single-strand break repair. *Exp Cell Res.* 2014;329(1):2-8.
88. Cadet J, Loft S, Olinski R, et al. Biologically relevant oxidants and terminology, classification and nomenclature of oxidatively generated damage to nucleobases and 2-deoxyribose in nucleic acids. *Free Radic Res.* 2012;46(4):367-81.
89. Stopper H, Müller SO. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: A minireview. *Toxicol In Vitro.* 1997;11(5):661-7.
90. Cadet J, Ravanat JL, TavernaPorro M, et al. Oxidatively generated complex DNA damage: tandem and clustered lesions. *Cancer Lett.* 2012;327(1-2):5-15.
91. Deckers IA, van den Brandt PA, van Engeland M, et al. Polymorphisms in genes of the renin-angiotensin-aldosterone system and renal cell cancer risk: interplay with hypertension and intakes of sodium, potassium and fluid. *Int J Cancer.* 2015;136(5):1104-16.
92. Andreotti G, Boffetta P, Rosenberg PS, et al. Variants in blood pressure genes and the risk of renal cell carcinoma. *Carcinogenesis.* 2010;31(4):614-20.
93. Ager EI, Neo J, Christophi C. The renin-angiotensin system and malignancy. *Carcinogenesis.* 2008;29(9):1675-84.
94. Brand S, Amann K, Schupp N. Angiotensin II-induced hypertension dose-dependently leads to oxidative stress and DNA damage in mouse kidneys and hearts. *J Hypertens.* 2013;31(2):333-44.
95. Brand S, Amann K, Mandel P, et al. Oxidative DNA damage in kidneys and heart of hypertensive mice is prevented by blocking angiotensin II and aldosterone receptors. *PLoS One.* 2014;9(12):e115715.
96. Hamet P. Cancer and hypertension. An unresolved issue. *Hypertension.* 1996;28(3):321-4.
97. Zhao Y, Chen X, Cai L, et al. Angiotensin II suppresses adriamycin-induced apoptosis through activation of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling in human breast cancer cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* 2008;40(4):304-10.
98. Meneton P, Jeunemaitre X, de Wardener HE, et al. Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev.* 2005;85(2):679-715.
99. Deckers IA, van den Brandt PA, van Engeland M, et al. Long-term dietary sodium, potassium and fluid intake; exploring potential novel risk factors for renal cell cancer in the Netherlands Cohort Study on diet and cancer. *Br J Cancer.* 2014;110(3):797-801.
100. Djamgoz MB. Blood pressure and risk of cancer progression - A possible connection with salt and voltage-gated sodium channel. *Med Hypotheses.* 2015;85(5):591-3.
101. Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. *Trends Mol Med.* 2010;16(3):107-21.



102. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg.* 2006;391(5):499-510.
103. Gago-Dominguez M, Castela JE, Yuan JM, et al. Lipid peroxidation: a novel and unifying concept of the etiology of renal cell carcinoma (United States). *Cancer Causes Control.* 2002;13(3):287-93.
104. Flaherty KT, Fuchs CS, Colditz GA, et al. A Prospective Study of Body Mass Index, Hypertension, and Smoking and the Risk of Renal Cell Carcinoma (United States). *Cancer Causes Control.* 2005;16(9):1099-106.
105. Fryzek JP, Poulsen AH, Johnsen SP, et al. A cohort study of antihypertensive treatments and risk of renal cell cancer. *Br J Cancer.* 2005;92(7):1302-6.
106. Milan A, Puglisi E, Ferrari L, et al. Arterial hypertension and cancer. *Int J Cancer.* 2014;134(10):2269-77.
107. Bennett EJ, Harper JW. DNA damage: ubiquitin marks the spot. *Nat Struct Mol Biol.* 2008;15(1):20-2.
108. Petrini JH, Stracker TH. The cellular response to DNA double-strand breaks: defining the sensors and mediators. *Trends Cell Biol.* 2003;13(9):458-62.
109. Sedelnikova OA, Rogakou EP, Panyutin IG, et al. Quantitative detection of (125)IdU-induced DNA double-strand breaks with gamma-H2AX antibody. *Radiat Res.* 2002;158(4):486-92.
110. Valdiguiesias V, Giunta S, Fenech M, et al.  $\gamma$ H2AX as a marker of DNA double strand breaks and genomic instability in human population studies. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research.* 2013;753(1):24-40.
111. Ismail IH, Hendzel MJ. The gamma-H2A.X: is it just a surrogate marker of double-strand breaks or much more? *Environ Mol Mutagen.* 2008;49(1):73-82.
112. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* 2008;18(1):134-47.
113. Bonner WM, Redon CE, Dickey JS, et al.  $\gamma$ H2AX and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008;8(12):957-67.
114. Bonassi S, Znaor A, Ceppi M, et al. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis.* 2007;28(3):625-31.
115. Murgia E, Ballardini M, Bonassi S, et al. Validation of micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes as early cancer risk biomarker in a nested case-control study. *Mutat Res.* 2008;639(1-2):27-34.
116. Fenech M. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. *Environ Health Perspect.* 1993;101 Suppl 3:101-7.
117. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutat Res.* 2006;600(1-2):58-66.
118. Fenech M, Kirsch-Volders M, Natarajan AT, et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis.* 2011;26(1):125-32.

119. Lindberg HK, Wang X, Jarventaus H, et al. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutat Res.* 2007;617(1-2):33-45.
120. Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nat Protoc.* 2007;2(5):1084-104.
121. Fenech M. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* 2000;455(1-2):81-95.
122. Stephens JW, Khanolkar MP, Bain SC. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. *Atherosclerosis.* 2009;202(2):321-9.
123. Fukui T, Yamauchi K, Maruyama M, et al. Significance of measuring oxidative stress in lifestyle-related diseases from the viewpoint of correlation between d-ROMs and BAP in Japanese subjects. *Hypertens Res.* 2011;34(9):1041-5.
124. Sugiura T, Dohi Y, Takase H, et al. Increased reactive oxygen metabolites is associated with cardiovascular risk factors and vascular endothelial damage in middle-aged Japanese subjects. *Vasc Health Risk Manag.* 2011;7:475-82.
125. Kotani K, Sakane N. C-reactive protein and reactive oxygen metabolites in subjects with metabolic syndrome. *J Int Med Res.* 2012;40(3):1074-81.
126. Aleksandrova K, Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, et al. Biomarker patterns of inflammatory and metabolic pathways are associated with risk of colorectal cancer: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC). *Eur J Epidemiol.* 2014;29(4):261-75.
127. Saum KU, Dieffenbach AK, Jansen EH, et al. Association between Oxidative Stress and Frailty in an Elderly German Population: Results from the ESTHER Cohort Study. *Gerontology.* 2015;61(5):407-15.
128. Schöttker B, Saum KU, Jansen EH, et al. Oxidative stress markers and all-cause mortality at older age: a population-based cohort study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2015;70(4):518-24.
129. Trotti R, Carratelli M, Barbieri M. Performance and clinical application of a new, fast method for the detection of hydroperoxides in serum. *Panminerva Med.* 2002;44(1):37-40.
130. Jansen EH, Ruskovska T. Comparative Analysis of Serum (Anti)oxidative Status Parameters, Cytometric Parameters in Healthy Persons. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):6106-15.
131. Palmieri B, Sblendorio V. Oxidative stress tests: overview on reliability and use. Part II. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2007;11(6):383-99.
132. Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008;295(4):C849-68.
133. Boffetta P, Bobak M, Borsch-Supan A, et al. The Consortium on Health and Ageing: Network of Cohorts in Europe and the United States (CHANCES) project design, population and data harmonization of a large-scale, international study. *Eur J Epidemiol.* 2014;29(12):929-36.
134. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959;82(1):70-7.
135. Hu ML. Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994;233:380-5.

136. Jansen EH, Ruskovska T. Serum Biomarkers of (Anti)Oxidant Status for Epidemiological Studies. *Int J Mol Sci.* 2015;16(11):27378-90.
137. Costa CMD, Santos RCCd, Lima ES. A simple automated procedure for thiol measurement in human serum samples. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42:345-50.
138. Jansen EH, Beekhof P, Cremers J, et al. Quality control data of physiological and immunological biomarkers measured in serum and plasma. *Mech Ageing Dev.* 2015;151:54-9.
139. Ahsan H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Hum Immunol.* 2013;74(10):1392-9.
140. Teixeira D, Fernandes R, Prudencio C, et al. 3-Nitrotyrosine quantification methods: Current concepts and future challenges. *Biochimie.* 2016;125:1-11.
141. StressMarq Biosciences Inc. Nitrotyrosine ELISA kit 2017 [01.06.2017]. Available from: <http://www.stressmarq.com/products/assay-kits/nitrotyrosine-elisa-kit-skt-126/?v=3a52f3c22ed6>.
142. Morrow JD, Awad JA, Boss HJ, et al. Non-cyclooxygenase-derived prostanoids (F2-isoprostanes) are formed in situ on phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(22):10721-5.
143. Morrow JD, Hill KE, Burk RF, et al. A series of prostaglandin F2-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(23):9383-7.
144. Cracowski JL, Durand T, Bessard G. Isoprostanes as a biomarker of lipid peroxidation in humans: physiology, pharmacology and clinical implications. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23(8):360-6.
145. Comporti M, Signorini C, Arezzini B, et al. F2-isoprostanes are not just markers of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 2008;44(3):247-56.
146. Oxford Biomedical Science. Urinary Isoprostane ELISA Kit - EA85 2013 [11.06.2016]. Available from: <http://www.oxfordbiomed.com/urinary-isoprostane-eia-kit>.
147. Del Rio D, Stewart AJ, Pellegrini N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005;15(4):316-28.
148. Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 1976;15(2):212-6.
149. BioAssay Systems. QuantiChrom™ TBARS Assay Kit (DTBA-100) 2009 [11.06.2016]. Available from: <https://www.biotrend-usa.com/us/shop/search-query?itemid=DTBA-100>.
150. Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking. *Clin Chim Acta.* 2007;380(1-2):50-8.
151. Espinosa O, Jiménez-Almazán J, Chaves FJ, et al. Urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG), a reliable oxidative stress marker in hypertension. *Free Radic Res.* 2007;41(5):546-54.

152. Loft S, Danielsen P, Lohr M, et al. Urinary excretion of 8-oxo-7,8-dihydroguanine as biomarker of oxidative damage to DNA. *Arch Biochem Biophys.* 2012;518(2):142-50.
153. Poulsen HE, Nadal LL, Broedbaek K, et al. Detection and interpretation of 8-oxodG and 8-oxoGua in urine, plasma and cerebrospinal fluid. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1840(2):801-8.
154. StressMarq Biosciences Inc. DNA Damage (8-OHdG) ELISA kit 2016 [15.06.2016]. Available from: <http://www.stressmarq.com/products/assay-kits/dna-damage-8-ohdg-elisa-kit-skt-120/#citations-section>.
155. Jaffé M. Über den Niederschlag welchen Pikrinsäure in normalen Harn erzeugt und über eine neue Reaction des Kreatinins. *Zeitschrift für Physiologische Chemie.* 1886;10:391-400.
156. Cayman Chemical Company. Creatinine (urinary) Colorimetric Assay Kit 2017 [01.06.2017]. Available from: <https://www.caymanchem.com/product/500701>.
157. Cohen J. *Statistical power analysis for the behavioral sciences.* 2 ed. Hillsdale: Lawrence Erlbaum Associates; 1988.
158. Kreienbrock L, Pigeot I, Ahrens W. *Epidemiologische Methoden.* 5 ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag; 2012.
159. Fandos M, Corella D, Guillen M, et al. Impact of cardiovascular risk factors on oxidative stress and DNA damage in a high risk Mediterranean population. *Free Radic Res.* 2009;43(12):1179-86.
160. de Faria AP, Fontana V, Modolo R, et al. Plasma 8-isoprostane levels are associated with endothelial dysfunction in resistant hypertension. *Clin Chim Acta.* 2014;433:179-83.
161. Tabachnick BG, Fidell LS. *Using multivariate statistics.* 5 ed. Boston, MA: Allyn & Bacon/Pearson Education; 2007.
162. Green SB. How many subjects does it take to do a regression analysis. *Multivariate behavioral research.* 1991;26(3):499-510.
163. Schneider A, Hommel G, Blettner M. *Lineare Regressionsanalyse.* *Dtsch Arztebl International.* 2010;107(44):776-82.
164. Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen.* 2000;35(3):206-21.
165. Toljic M, Egic A, Munjas J, et al. Increased oxidative stress and cytokinesis-block micronucleus cytome assay parameters in pregnant women with gestational diabetes mellitus and gestational arterial hypertension. *Reprod Toxicol.* 2017;71:55-62.
166. Schurman SH, Dunn CA, Greaves R, et al. Age-related disease association of endogenous gamma-H2AX foci in mononuclear cells derived from leukapheresis. *PLoS One.* 2012;7(9):e45728.
167. Jansen EH, Beekhof P, Schupp N, et al. A Comparison Between Two Assays for the Redox Status in Plasma. *J Anal Bioanal Tech.* 2017;8(1).
168. Ates I, Ozkayar N, Altay M, et al. Is disulphide/thiol ratio related to blood pressure in masked hypertension? *Clin Exp Hypertens.* 2016;38(2):150-4.

169. Caner M, Karter Y, Uzun H, et al. Oxidative stress in human in sustained and white coat hypertension. *Int J Clin Pract.* 2006;60(12):1565-71.
170. Erkus ME, Altiparmak IH, Akyuz AR, et al. The association between plasma thiol levels and left ventricular diastolic dysfunction in patient with hypertension. *Scand J Clin Lab Invest.* 2015;75(8):667-73.
171. Kashyap MK, Yadav V, Sherawat BS, et al. Different antioxidants status, total antioxidant power and free radicals in essential hypertension. *Mol Cell Biochem.* 2005;277(1-2):89-99.
172. Yavuzer S, Yavuzer H, Cengiz M, et al. The role of protein oxidation and DNA damage in elderly hypertension. *Aging Clin Exp Res.* 2016;28(4):625-32.
173. Yildirim E, Ipek E, Bavunoglu I, et al. The impact of protein oxidation on sustained and white coat hypertension. *Anatol J Cardiol.* 2017;17(3):210-6.
174. Bandeira Sde M, Guedes Gda S, da Fonseca LJ, et al. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid Med Cell Longev.* 2012;2012:819310.
175. Tse WY, Maxwell SR, Thomason H, et al. Antioxidant status in controlled and uncontrolled hypertension and its relationship to endothelial damage. *J Hum Hypertens.* 1994;8(11):843-9.
176. Aveles PR, Criminacio CR, Goncalves S, et al. Association between biomarkers of carbonyl stress with increased systemic inflammatory response in different stages of chronic kidney disease and after renal transplantation. *Nephron Clin Pract.* 2010;116(4):c294-9.
177. Himmelfarb J, McMonagle E, McMenamin E. Plasma protein thiol oxidation and carbonyl formation in chronic renal failure. *Kidney Int.* 2000;58(6):2571-8.
178. Eisele HJ, Markart P, Schulz R. Obstructive Sleep Apnea, Oxidative Stress, and Cardiovascular Disease: Evidence from Human Studies. *Oxid Med Cell Longev.* 2015;2015:608438.
179. Passali D, Corallo G, Yaremchuk S, et al. Oxidative stress in patients with obstructive sleep apnoea syndrome. *Acta Otorhinolaryngol Ital.* 2015;35(6):420-5.
180. Dinc ME, Ozdemir C, Ayan NN, et al. Thiol/disulfide homeostasis as a novel indicator of oxidative stress in obstructive sleep apnea patients. *Laryngoscope.* 2017;127(7):E244-e50.
181. Gul F, Muderris T, Yalciner G, et al. A novel method for evaluation of oxidative stress in children with OSA. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2016;89:76-80.
182. Ustundag Y, Demirci H, Balik R, et al. Thiol/disulfide homeostasis in pregnant women with obstructive sleep apnea syndrome. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2017:1-6.
183. Vassalle C. An easy and reliable automated method to estimate oxidative stress in the clinical setting. *Methods Mol Biol.* 2008;477:31-9.
184. Iamele L, Fiocchi R, Vernocchi A. Evaluation of an automated spectrophotometric assay for reactive oxygen metabolites in serum. *Clin Chem Lab Med.* 2002;40(7):673-6.
185. Shiraishi Y, Kujiraoka T, Hakuno D, et al. Elevation of Derivatives of Reactive Oxygen Metabolites Elevated in Young "Disaster Responders" in

- Hypertension due to Great East Japan Earthquake. *Int Heart J*. 2016;57(1):61-6.
186. Digiesi V, Oliviero C, Gianni V, et al. Reactive metabolites of oxygen, lipid peroxidation, total antioxidant capacity and vitamin E in essential arterial hypertension. *Clin Ter*. 1997;148(11):515-9.
187. Taguchi I, Toyoda S, Takano K, et al. Irbesartan, an angiotensin receptor blocker, exhibits metabolic, anti-inflammatory and antioxidative effects in patients with high-risk hypertension. *Hypertens Res*. 2013;36(7):608-13.
188. Sugiura T, Dohi Y, Takase H, et al. Oxidative Stress is Closely Associated with Increased Arterial Stiffness, Especially in Aged Male Smokers without Previous Cardiovascular Events: A Cross-Sectional Study. *J Atheroscler Thromb*. 2017;24(11):1186-98.
189. Vassalle C, Boni C, Di Cecco P, et al. Automation and validation of a fast method for the assessment of in vivo oxidative stress levels. *Clin Chem Lab Med*. 2006;44(11):1372-5.
190. Kotani K, Tsuzaki K, Taniguchi N, et al. Correlation between reactive oxygen metabolites & atherosclerotic risk factors in patients with type 2 diabetes mellitus. *Indian J Med Res*. 2013;137(4):742-8.
191. Vassalle C, Vigna L, Bianchi S, et al. A biomarker of oxidative stress as a nontraditional risk factor in obese subjects. *Biomark Med*. 2013;7(4):633-9.
192. Kander MC, Cui Y, Liu Z. Gender difference in oxidative stress: a new look at the mechanisms for cardiovascular diseases. *J Cell Mol Med*. 2017;21(5):1024-32.
193. Egea J, Fabregat I, Frapart YM, et al. European contribution to the study of ROS: A summary of the findings and prospects for the future from the COST action BM1203 (EU-ROS). *Redox Biol*. 2017;13:94-162.
194. Safinowski M, Wilhelm B, Reimer T, et al. Determination of nitrotyrosine concentrations in plasma samples of diabetes mellitus patients by four different immunoassays leads to contradictive results and disqualifies the majority of the tests. *Clin Chem Lab Med*. 2009;47(4):483-8.
195. Karimi Galoughi K, Antoniadis C, Nicholls SJ, et al. Redox biomarkers in cardiovascular medicine. *Eur Heart J*. 2015;36(25):1576-82, 82a-b.
196. Stoner L, Lucero AA, Palmer BR, et al. Inflammatory biomarkers for predicting cardiovascular disease. *Clin Biochem*. 2013;46(15):1353-71.
197. Bruno RM, Daghini E, Landini L, et al. Dynamic evaluation of renal resistive index in normoalbuminuric patients with newly diagnosed hypertension or type 2 diabetes. *Diabetologia*. 2011;54(9):2430-9.
198. Zhou L, Xiang W, Potts J, et al. Reduction in extracellular superoxide dismutase activity in African-American patients with hypertension. *Free Radic Biol Med*. 2006;41(9):1384-91.
199. Tsikas D. Analytical methods for 3-nitrotyrosine quantification in biological samples: the unique role of tandem mass spectrometry. *Amino Acids*. 2012;42(1):45-63.
200. Tsikas D, Mitschke A, Suchy MT, et al. Determination of 3-nitrotyrosine in human urine at the basal state by gas chromatography-tandem mass spectrometry and evaluation of the excretion after oral intake. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2005;827(1):146-56.

201. Zimnol A, Amann K, Mandel P, et al. Angiotensin II type 1a receptor-deficient mice develop angiotensin II-induced oxidative stress and DNA damage without blood pressure increase. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2017;313(6):F1264-f73.
202. Hartmann C, Schulz I, Epe B, et al. Angiotensin II-induced hypertension increases the mutant frequency in rat kidney. *Arch Toxicol.* 2019;93(7):2045-55.
203. Drew B, Leeuwenburgh C. Aging and the Role of Reactive Nitrogen Species. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;959(1):66-81.
204. Peluffo G, Radi R. Biochemistry of protein tyrosine nitration in cardiovascular pathology. *Cardiovasc Res.* 2007;75(2):291-302.
205. Tsikas D, Caidahl K. Recent methodological advances in the mass spectrometric analysis of free and protein-associated 3-nitrotyrosine in human plasma. *Journal of Chromatography B.* 2005;814(1):1-9.
206. Vaziri ND, Dicus M, Ho ND, et al. Oxidative stress and dysregulation of superoxide dismutase and NADPH oxidase in renal insufficiency. *Kidney Int.* 2003;63(1):179-85.
207. Jelic S, Lederer DJ, Adams T, et al. Vascular inflammation in obesity and sleep apnea. *Circulation.* 2010;121(8):1014-21.
208. Parati G, Ochoa JE, Bilo G, et al. Obstructive sleep apnea syndrome as a cause of resistant hypertension. *Hypertens Res.* 2014;37(7):601-13.
209. Evans MD, Olinski R, Loft S, et al. Toward consensus in the analysis of urinary 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxyguanosine as a noninvasive biomarker of oxidative stress. *The FASEB Journal.* 2010;24(4):1249-60.
210. Barregard L, Moller P, Henriksen T, et al. Human and methodological sources of variability in the measurement of urinary 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine. *Antioxid Redox Signal.* 2013;18(18):2377-91.
211. Al-Aubaidy HA, Jelinek HF. Oxidative DNA damage and obesity in type 2 diabetes mellitus. *Eur J Endocrinol.* 2011;164(6):899-904.
212. Monzo-Beltran L, Vazquez-Tarragon A, Cerda C, et al. One-year follow-up of clinical, metabolic and oxidative stress profile of morbid obese patients after laparoscopic sleeve gastrectomy. 8-oxo-dG as a clinical marker. *Redox Biol.* 2017;12:389-402.
213. Cejvanovic V, Asferg C, Kjaer LK, et al. Markers of oxidative stress in obese men with and without hypertension. *Scand J Clin Lab Invest.* 2016;76(8):620-5.
214. Schupp N, Kolkhof P, Queisser N, et al. Mineralocorticoid receptor-mediated DNA damage in kidneys of DOCA-salt hypertensive rats. *FASEB J.* 2011;25(3):968-78.
215. Mandel P. Entstehung von oxidativen Stressmarkern in DNA und RNA nach der Behandlung mit den Hormonen Angiotensin II und Aldosteron in vitro und in vivo: Vergleich von drei Analysemethoden zum Nachweis von 8-Oxo-2'-desoxyguanosin in LLC-PK1-Zellen [Dissertation]. Würzburg: Julius-Maximilians-Universität Würzburg; 2014.
216. Subash P, Gurumurthy P, Sarasabharathi A, et al. Urinary 8-OHdG: A marker of oxidative stress to DNA and total antioxidant status in essential

- hypertension with South Indian population. *Indian J Clin Biochem.* 2010;25(2):127-32.
217. Ogawa S, Kobori H, Ohashi N, et al. Angiotensin II Type 1 Receptor Blockers Reduce Urinary Angiotensinogen Excretion and the Levels of Urinary Markers of Oxidative Stress and Inflammation in Patients with Type 2 Diabetic Nephropathy. *Biomark Insights.* 2009;4:97-102.
218. Pan Y, Qiao QY, Pan LH, et al. Losartan reduces insulin resistance by inhibiting oxidative stress and enhancing insulin signaling transduction. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2015;123(3):170-7.
219. Dincer Y, Sekercioglu N, Pekpak M, et al. Assessment of DNA oxidation and antioxidant activity in hypertensive patients with chronic kidney disease. *Ren Fail.* 2008;30(10):1006-11.
220. Kotani K, Yamada T. Association between urinary 8-OHdG and pulse wave velocity in hypertensive patients with type 2 diabetes mellitus. *Singapore Med J.* 2014;55(4):202-8.
221. Song M-F, Li Y-S, Ootsuyama Y, et al. Urea, the most abundant component in urine, cross-reacts with a commercial 8-OH-dG ELISA kit and contributes to overestimation of urinary 8-OH-dG. *Free Radic Biol Med.* 2009;47(1):41-6.
222. Jacob KD, Noren Hooten N, Trzeciak AR, et al. Markers of oxidant stress that are clinically relevant in aging and age-related disease. *Mech Ageing Dev.* 2013;134(3-4):139-57.
223. Lee R, Margaritis M, Channon KM, et al. Evaluating oxidative stress in human cardiovascular disease: methodological aspects and considerations. *Curr Med Chem.* 2012;19(16):2504-20.
224. Draper HH, Csallany AS, Hadley M. Urinary aldehydes as indicators of lipid peroxidation in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000;29(11):1071-7.
225. Ligor M, Olszowy P, Buszewski B. Application of medical and analytical methods in Lyme borreliosis monitoring. *Anal Bioanal Chem.* 2012;402(7):2233-48.
226. Cui X, Gong J, Han H, et al. Relationship between free and total malondialdehyde, a well-established marker of oxidative stress, in various types of human biospecimens. *J Thorac Dis.* 2018;10(5):3088-97.
227. Hendre AS, Shariff AK, Patil SR, et al. Evaluation of oxidative stress and antioxidant status in essential hypertension. *J Indian Med Assoc.* 2013;111(6):377-8, 80-1.
228. Parslow RA, Sachdev P, Salonikas C, et al. Associations between plasma antioxidants and hypertension in a community-based sample of 415 Australians aged 60-64. *J Hum Hypertens.* 2005;19(3):219-26.
229. Russo C, Olivieri O, Girelli D, et al. Anti-oxidant status and lipid peroxidation in patients with essential hypertension. *J Hypertens.* 1998;16(9):1267-71.
230. Babu MS, Bobby Z, Habeebullah S. Increased inflammatory response and imbalance in blood and urinary oxidant-antioxidant status in South Indian women with gestational hypertension and preeclampsia. *Clin Biochem.* 2012;45(10-11):835-8.
231. Korchazhkina O, Exley C, Andrew Spencer S. Measurement by reversed-phase high-performance liquid chromatography of malondialdehyde in normal human urine following derivatisation with 2,4-



- dinitrophenylhydrazine. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2003;794(2):353-62.
232. Vasconcelos SM, Goulart MO, Silva MA, et al. Markers of redox imbalance in the blood of hypertensive patients of a community in Northeastern Brazil. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(2):141-7.
233. Piconi L, Quagliario L, Ceriello A. Oxidative stress in diabetes. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(9):1144-9.
234. Marjani A. Lipid peroxidation alterations in type 2 diabetic patients. *Pak J Biol Sci.* 2010;13(15):723-30.
235. De Vecchi AF, Bamonti F, Novembrino C, et al. Free and total plasma malondialdehyde in chronic renal insufficiency and in dialysis patients. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2009;24(8):2524-9.
236. Roberts LJ, Morrow JD. Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(4):505-13.
237. Cracowski JL, Durand T. Cardiovascular pharmacology and physiology of the isoprostanes. *Fundam Clin Pharmacol.* 2006;20(5):417-27.
238. Berdeaux O, Scruel O, Cracowski JL, et al. F2-Isoprostanes: review of analytical methods. *Current Pharmaceutical Analysis.* 2006;2(1):69-78.
239. van 't Erve TJ, Kadiiska MB, London SJ, et al. Classifying oxidative stress by F2-isoprostane levels across human diseases: A meta-analysis. *Redox Biol.* 2017;12:582-99.
240. Annor FB, Goodman M, Okosun IS, et al. Oxidative stress, oxidative balance score, and hypertension among a racially diverse population. *J Am Soc Hypertens.* 2015;9(8):592-9.
241. Melton CD, Luo R, Wong BJ, et al. Urinary F2-isoprostanes and the risk of hypertension. *Ann Epidemiol.* 2017;27(6):391-6.
242. Horbal SR, Seffens W, Davis AR, et al. Associations of Apelin, Visfatin, and Urinary 8-Isoprostane With Severe Hypertension in African Americans: The MH-GRID Study. *Am J Hypertens.* 2016;29(7):814-20.
243. Nerpin E, Helmersson-Karlqvist J, Risérus U, et al. Inflammation, oxidative stress, glomerular filtration rate, and albuminuria in elderly men: a cross-sectional study. *BMC Res Notes.* 2012;5:537-.
244. Upadhyay A, Larson MG, Guo C-Y, et al. Inflammation, kidney function and albuminuria in the Framingham Offspring cohort. *Nephrology Dialysis Transplantation.* 2010;26(3):920-6.
245. Cracowski J-L, Baguet J-P, Ormezzano O, et al. Lipid peroxidation is not increased in patients with untreated mild-to-moderate hypertension. *Hypertension.* 2003;41(2):286-8.
246. Vassalle C, Botto N, Andreassi MG, et al. Evidence for enhanced 8-isoprostane plasma levels, as index of oxidative stress in vivo, in patients with coronary artery disease. *Coron Artery Dis.* 2003;14(3):213-8.
247. Voss P, Siems W. Clinical oxidation parameters of aging. *Free Radic Res.* 2006;40(12):1339-49.
248. Ito F, Sono Y, Ito T. Measurement and Clinical Significance of Lipid Peroxidation as a Biomarker of Oxidative Stress: Oxidative Stress in Diabetes, Atherosclerosis, and Chronic Inflammation. *Antioxidants (Basel).* 2019;8(3).

249. Rodrigo R, Libuy M, Feliu F, et al. Oxidative stress-related biomarkers in essential hypertension and ischemia-reperfusion myocardial damage. *Dis Markers*. 2013;35(6):773-90.
250. Portaluppi F, Boari B, Manfredini R. Oxidative stress in essential hypertension. *Curr Pharm Des*. 2004;10(14):1695-8.
251. Coats A, Jain S. Protective effects of nebivolol from oxidative stress to prevent hypertension-related target organ damage. *J Hum Hypertens*. 2017;31(6):376-81.
252. Berkels R, Egink G, Marsen TA, et al. Nifedipine increases endothelial nitric oxide bioavailability by antioxidative mechanisms. *Hypertension*. 2001;37(2):240-5.
253. Ward NC, Hodgson JM, Puddey IB, et al. Oxidative stress in human hypertension: association with antihypertensive treatment, gender, nutrition, and lifestyle. *Free Radic Biol Med*. 2004;36(2):226-32.
254. Ono H, Minatoguchi S, Watanabe K, et al. Candesartan decreases carotid intima-media thickness by enhancing nitric oxide and decreasing oxidative stress in patients with hypertension. *Hypertens Res*. 2008;31(2):271-9.
255. Saez GT, Tormos C, Giner V, et al. Factors related to the impact of antihypertensive treatment in antioxidant activities and oxidative stress by-products in human hypertension. *Am J Hypertens*. 2004;17(9):809-16.
256. Profumo E, Buttari B, Saso L, et al. Pleiotropic effects of statins in atherosclerotic disease: focus on the antioxidant activity of atorvastatin. *Curr Top Med Chem*. 2014;14(22):2542-51.
257. Conklin KA. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. *Integr Cancer Ther*. 2004;3(4):294-300.
258. La Torre F, Orlando A, Silipigni A, et al. [Increase of oxygen free radicals and their derivatives in chemo- and radiation treated neoplasm patients]. *Minerva Med*. 1997;88(4):121-6.
259. Toyama BH, Savas JN, Park SK, et al. Identification of long-lived proteins reveals exceptional stability of essential cellular structures. *Cell*. 2013;154(5):971-82.
260. Sedelnikova OA, Bonner WM. GammaH2AX in cancer cells: a potential biomarker for cancer diagnostics, prediction and recurrence. *Cell Cycle*. 2006;5(24):2909-13.
261. Redon CE, Weyemi U, Parekh PR, et al.  $\gamma$ -H2AX and other histone post-translational modifications in the clinic. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1819(7):743-56.
262. Anderson D, Andrais B, Mirzayans R, et al. Comparison of two methods for measuring  $\gamma$ -H2AX nuclear fluorescence as a marker of DNA damage in cultured human cells: applications for microbeam radiation therapy. *Journal of Instrumentation*. 2013;8(06):C06008-C.
263. Muslimovic A, Hammarsten O, Johansson P. Measurement of H2AX Phosphorylation as a Marker of Ionizing Radiation Induced Cell Damage: INTECH Open Access Publisher; 2012.
264. Queisser N, Oteiza PI, Link S, et al. Aldosterone activates transcription factor Nrf2 in kidney cells both in vitro and in vivo. *Antioxid Redox Signal*. 2014;21(15):2126-42.

265. Sedelnikova OA, Horikawa I, Redon C, et al. Delayed kinetics of DNA double - strand break processing in normal and pathological aging. *Aging cell*. 2008;7(1):89-100.
266. Giovannini C, Piaggi S, Federico G, et al. High levels of gamma-H2AX foci and cell membrane oxidation in adolescents with type 1 diabetes. *Mutat Res*. 2014;770:128-35.
267. Khan S, Raghuram GV, Bhargava A, et al. Role and clinical significance of lymphocyte mitochondrial dysfunction in type 2 diabetes mellitus. *Transl Res*. 2011;158(6):344-59.
268. OECD. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4: OECD Publishing; 2010.
269. Bonassi S, Ugolini D, Kirsch - Volders M, et al. Human population studies with cytogenetic biomarkers: review of the literature and future prospectives. *Environ Mol Mutagen*. 2005;45(2 - 3):258-70.
270. Speit G. Does the recommended lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for human biomonitoring actually detect DNA damage induced by occupational and environmental exposure to genotoxic chemicals? *Mutagenesis*. 2013;28(4):375-80.
271. Speit G, Zeller J, Neuss S. The in vivo or ex vivo origin of micronuclei measured in human biomonitoring studies. *Mutagenesis*. 2011;26(1):107-10.
272. Kirsch-Volders M, Bonassi S, Knasmueller S, et al. Commentary: critical questions, misconceptions and a road map for improving the use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay for in vivo biomonitoring of human exposure to genotoxic chemicals-a HUMN project perspective. *Mutat Res Rev Mutat Res*. 2014;759:49-58.
273. Schupp N, Stopper H, Heidland A. DNA Damage in Chronic Kidney Disease: Evaluation of Clinical Biomarkers. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:3592042.
274. Andreassi MG, Barale R, Iozzo P, et al. The association of micronucleus frequency with obesity, diabetes and cardiovascular disease. *Mutagenesis*. 2011;26(1):77-83.
275. Schupp N, Queisser N, Wolf M, et al. Aldosterone causes DNA strand breaks and chromosomal damage in renal cells, which are prevented by mineralocorticoid receptor antagonists. *Horm Metab Res*. 2010;42(6):458-65.
276. Schupp N, Rutkowski P, Sebekova K, et al. AT1 receptor antagonist candesartan attenuates genomic damage in peripheral blood lymphocytes of patients on maintenance hemodialysis treatment. *Kidney Blood Press Res*. 2011;34(3):167-72.
277. Fazeli G, Stopper H, Schinzel R, et al. Angiotensin II induces DNA damage via AT1 receptor and NADPH oxidase isoform Nox4. *Mutagenesis*. 2012;27(6):673-81.
278. Gür M, Elbasan Z, Yildiray Sahin D, et al. DNA damage and oxidative status in newly diagnosed, untreated, dipper and non-dipper hypertensive patients. *Hypertens Res*. 2013;36(2):166-71.

279. Subash P. Assessment of Oxidative DNA Damage by Alkaline Comet Assay in Human Essential Hypertension. *Indian J Clin Biochem.* 2016;31(2):185-93.
280. Yildiz A, Gur M, Yilmaz R, et al. Lymphocyte DNA damage and total antioxidant status in patients with white-coat hypertension and sustained hypertension. *Turk Kardiyol Dern Ars.* 2008;36(4):231-8.
281. Faust F, Kassie F, Knasmuller S, et al. The use of the alkaline comet assay with lymphocytes in human biomonitoring studies. *Mutat Res.* 2004;566(3):209-29.
282. Kopp B, Khoury L, Audebert M. Validation of the gammaH2AX biomarker for genotoxicity assessment: a review. *Arch Toxicol.* 2019;93(8):2103-14.
283. Scarpato R, Verola C, Fabiani B, et al. Nuclear damage in peripheral lymphocytes of obese and overweight Italian children as evaluated by the gamma-H2AX focus assay and micronucleus test. *FASEB J.* 2011;25(2):685-93.

## 7 Anhang

**Tabelle 7.1: Referenzbereiche und Einheiten der im Zentrallabor des UKW gemessenen Blutwerte.**

	Referenzbereich	Einheit
eGFR (CKD-EPI)		ml/min/1,73m <sup>2</sup>
Kreatinin	0-1,17 (weiblich: 0-0,95)	mg/dl
Harnstoff	10-50	mg/dl
Harnsäure	3,4-7 (weiblich: 2,4 - 5,7)	mg/dl
Cholesterin	130-220	mg/dl
Triglyceride	74-172	mg/dl
Gesamt-Eiweiß	6,6-8,7	g/dl
Cystatin C	0,61-0,95	mg/l
ACE	20-70	U/l
HbA1c	4,3-6,1	%
NT-proBNP	< 50J. : 0-88 > 50J. : Bedarf noch Studien	pg/ml
Renin	2,7-27,8 (vor dem 14.10.14: 3-57)	ng/l
Aldosteron	30-353 (vor dem 14.10.14: 38-313)	ng/l
Aldosteron/Renin-Quotient	0-25	

**Tabelle 7.2: Referenzbereiche und Einheiten der im Zentrallabor des UKW gemessenen Werte des Sammelurins.**

	Referenzbereich	Einheit
Protein	<150	mg/d
Albumin	<30	mg/d

**Tabelle 7.3: Labor- und klinische Parameter der Studienteilnehmer im zeitlichen Verlauf.**

V1 = 1. Visite, FUP1 = 1. Follow-up nach 7±2 Monaten, FUP2 = 2. Follow-up nach 14±2 Monaten. Gezeigt ist jeweils der Median (Q1-Q3) oder die Anzahl mit prozentualem Anteil.

	V1	FUP1	FUP2
Anzahl	17	16	11
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	31,7 (28,4-33,9)	30,9 (28,2-34,9)	30,5 (29,4-33,2)
<u>Nierenfunktion:</u>			
eGFR [ml/min/1,73m <sup>2</sup> ]	75 (48-87)	68 (51-75)	67 (53-72)
Harnstoff [mg/dl]	37 (29-49)	40 (38-44)	41 (39-52)
Cystatin C [mg/l]	1,07 (0,94-1,42)	1,13 (0,97-1,21)	1,12 (0,98-1,23)
<u>Sammelurin:</u>			
Proteinurie (%)	7 von 13 (53,8)	3 von 9 (33,3)	1 von 5 (20)
Albuminurie (%)	7 von 12 (58,3)	5 von 9 (55,6)	1 von 5 (20)
<u>RAAS:</u>			
ACE [U/l]	23,7 (7,0-32,5)	26,8 (7,0-43,8)	8,4 (7,0-26,4)
Renin [ng/l]	9,2 (6,8-30,1)	20,3 (8,5-46,5)	23,4 (13,6-113,4)
Aldosteron [ng/l]	73 (48-130)	84 (70-125)	66 (40-111)
Aldosteron-Renin-Quotient	7,4 (1,7-14,2)	4,6 (2,3-8,8)	1,9 (0,8-5,1)
<u>Stoffwechsel:</u>			
HbA <sub>1c</sub> [%]	5,9 (5,5-6,6)	6,2 (5,6-6,4)	6,3 (5,7-7,5)
Cholesterin [mg/dl]	189 (169-209)	190 (154-223)	173 (153-204)
Triglyceride [mg/dl]	133 (88-282)	161 (93-215)	213 (115-298)
Protein [g/dl]	7,2 (6,8-7,3)	7,1 (6,8-7,3)	7,0 (6,7-7,3)
<u>Weitere:</u>			
NT-proBNP [pg/ml]	106 (59-266)	133 (79-223)	100 (72-288)
CRP [mg/dl]	0,07		

**Tabelle 7.4: Anzahl der Antihypertensiva der Studienteilnehmer im zeitlichen Verlauf.**

V1 = 1. Visite, FUP1 = 1. Follow-up nach 7±2 Monaten, FUP2 = 2. Follow-up nach 14±2 Monaten. Gezeigt ist der Median (Q1-Q3).

	V1	FUP1	FUP2
Anzahl	17	16	11
Anzahl Antihypertensiva	5 (5-6)	6 (5-6)	6 (6-6,5)

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. Nicole Schupp für die langjährige, geduldige, zuverlässige und insgesamt vortreffliche Betreuung.

Ich danke aufrichtig Frau Prof. Dr. Helga Stopper für die Begutachtung meiner Dissertation und die Möglichkeit einen Großteil meiner Laborarbeit im Austausch mit ihrer Arbeitsgruppe durchgeführt haben zu können.

Bei Frau Dr. Bettina Kraus bedanke ich mich für die Datenerhebung und Gewinnung der Patientenproben im Rahmen der Sprechstunde für therapieresistente Hypertonie. Ihre klinische Expertise und Hilfestellung bei statistischen Fragen waren unabdingbar für die Fertigstellung meiner Dissertation.

Weiterhin danke ich den Mitarbeitern der MyStIC-Studie für die gute Zusammenarbeit, insbesondere Frau Bettina Geier, Frau Caroline Wörmann und Herrn Dr. Martin Christa.

Außerdem richte ich ein Dankeschön an alle Kolleginnen und Kollegen der AG Schupp und AG Stopper des toxikologischen Instituts. Hier hervorzuheben sind die technischen Assistentinnen Elisabeth Stein, Silvana Wunram und Laura Vogel, die mich bei den Labortätigkeiten unterstützt haben.

Abschließend gilt mein großer Dank meiner Freundin Esther, meiner Familie und meinen Freunden. Vielen Dank für Eure fortwährende Unterstützung und Hilfsbereitschaft!

## Lebenslauf

--- in Onlineversion nicht komplett aufgeführt ---

### Publikation

Jansen EH, Beekhof P, Schupp N, **Kreutzmann M**, Kraus BJ. A Comparison Between Two Assays for the Redox Status in Plasma. J Anal Bioanal Tech. 2017;8(1).