
2 Probanden, Studiendesign und Methoden

2.1 Probanden

Bei den männlichen, normotonen und freiwilligen Probanden wurden Vor- und Begleiterkrankungen anamnestisch und durch eine körperliche Untersuchung ausgeschlossen. Einschlusskriterien waren ein diastolischer Blutdruck von weniger als 90 mmHg bzw. ein mittlerer arterieller Blutdruck von maximal 100 mmHg (siehe Blutdruckmeßverfahren). Die in Voruntersuchungen (s.u.) hinsichtlich ihrer Kochsalzempfindlichkeit getesteten Probanden wurden auf das kombinierte Auftreten zweier Merkmalsausprägungen hin ausgesucht. Die Probanden waren entweder salzsensitiv (s.u.) und hatten eine familiäre Bluthochdruckbelastung oder sie waren salzresistent und es lag keine familiäre Bluthochdruckbelastung bei ihnen vor.

Da die Genese der essentiellen Hypertonie zum Teil hereditären und wahrscheinlich polygenen Einflüssen unterliegt (Miall und Oldham 1963, Rose *et al.* 1979), wurde mit der o.g. Auswahl der Probanden versucht ein Kollektiv mit einer starken phänotypischen Expression dieser Einflüsse zu finden.

2.1.1 Definition der Familienanamnese

Eine Familienanamnese wurde als positiv angenommen, wenn dem Probanden bei mindestens einem Elternteil und/oder Geschwister eine behandlungsbedürftige Hypertonie bekannt war und dies durch den Hausarzt des betreffenden Angehörigen bestätigt wurde.

2.1.2 Testung der Kochsalzempfindlichkeit

Die Probanden unterzogen sich zwei Diät-Perioden von jeweils einer Woche: eine Woche mit hoher Natriumzufuhr und eine weitere mit nur niedriger Natriumzufuhr.

Die Niedrig-Natrium-Periode wurde in Form einer salzarmen Diät entsprechend 20 mmol Natriums/24h und Verabreichung von Placebo-Kapseln durchgeführt. Die Hoch-Natrium-Periode konnte durch Einnahme von Kochsalz-Kapseln zusätzlich zu der salzarmen Diät auf insgesamt 250 mmol Natrium/24h definiert werden. Die Abfolge der Hoch-Natrium-Periode bzw. Niedrig-Natrium-Periode aufeinander wurde damit randomisiert. Rauchen, Kaffeekonsum und Sport wurden während der Diät-Perioden vermieden.

Die Blutdruckwerte wurden am siebten Tag einer Woche anhand eines TONOPRINT^R-Blutdruck-Messgerätes (Speidel & Keller, Jungingen) ermittelt.

Die Messungen wurden 90 min lang am liegenden Probanden minütlich durchgeführt. Zur Bestimmung des mittleren arteriellen Druckes ($MAD = RR_{diast} + 1/3 [RR_{syst} - RR_{diast}]$) wurden die arithmetischen Mittel der letzten 60 Messungen herangezogen.

War der Abfall des mittleren arteriellen Druckes von einer Hoch-Natrium-Periode zu einer Niedrig-Natrium-Periode $> 3 \text{ mmHg}$, so galt der Proband als *salzsensitiv*, war er $\leq 3 \text{ mmHg}$, so galt der Proband als *salzresistent*.

2.2 Studiendurchführung

2.2.1 Studie I

Blutentnahme zur Bestimmung der thrombozytären α_2 -Adrenozeptor-Dichten, des thrombozytären intrazellulären freien Kalziums, des Plasma-Renins, -Noradrenalins, -Adrenalins und -Endothelins; Bestimmung des Blutdruckes und der peripheren Pulsfrequenz:

Zeitlicher Versuchsablauf der Studie I

- *Vortag*

21³⁰ Dem Probanden wird eine Venenverweilkanüle gelegt.

21³⁰ – 22⁰⁰ Blutdruck- und Pulsmessung im Liegen

23⁰⁰ – 8⁰⁰ nächtliche Bettruhe

- *1. Untersuchungstag:*

7¹⁵ – 7⁴⁵ Blutdruck- und Pulsmessung im Liegen

7⁵⁰ Blutentnahme im Liegen

- *2. Untersuchungstag:*

8⁰⁰ – 11⁰⁰ Der Proband befindet sich in Orthostase.

11⁰⁰ Blutdruck- und Pulsmessung in Orthostase

Blutentnahme in Orthostase

2.2.2 Studie II

Blutentnahme zur Bestimmung des β -Endorphins, des Plasma-Noradrenalins und -Adrenalins;

Bestimmung des Blutdruckes und der peripheren Pulsfrequenz:

Zeitlicher Versuchsablauf der Studie II

21³⁰ – 23⁰⁰ Der Proband hält Bettruhe.

21³⁰ Dem Probanden wird eine Venenverweilkanüle gelegt.

21³⁰ – 22⁰⁰ Blutdruck- und Pulsmessung im Liegen

22⁰⁰ 1. Blutentnahme

22¹⁵ 2. Blutentnahme

22³⁰ 3. Blutentnahme

23⁰⁰ 4. Blutentnahme

2.2.3 Blutdruck- und Pulsmeßverfahren

Es wurde ein TONOPRINT[®]-Gerät (Speidel & Keller, Jungingen) eingesetzt, das ermöglichte, den Blutdruck und den peripheren Puls in Serie automatisch zu messen (Weber und Anlauf 1982).

Die Blutdruckmanschette des Gerätes wurde so am rechten Oberarm des Probanden angelegt, daß das Mikrophon zur Erfassung der Korotkoff-Geräusche (Korotkoff 1905) über der Arteria brachialis in der medialen Ellenbeuge lag. Der Aufblasdruck wurde auf 180 mmHg, das Luftablaßventil auf 3 mmHg/Sekunde und das Meßintervall auf eine bzw. zwei Minuten eingestellt. Die Blutdruck-

werte (und die Pulsfrequenz) werden als arithmetisches Mittel, aus fünf standardisierten Messungen errechnet, angegeben.

Diese sind auch Berechnungsgrundlage für den mittleren arteriellen Druck:

$$MAD = RR_{diast} + 1/3 (RR_{syst} - RR_{diast})$$

Die unter den physiologischen Parametern der Probanden angegebenen Blutdruckwerte wurden am liegenden Probanden gemessen.

2.2.4 Blutentnahmen

Für die Blutentnahmen wurde eine periphere Venenverweilkanüle (Abbocath-T 16 gauge; Fa. Abboth Ireland Ltd., Sligo, Irland) unter Lokalanästhesie mit 1%-iger Lidocainlösung in die Vena cubitalis des linken Armes eingeführt.

Die Blutproben wurden ohne wesentliche Stauung des Oberarmes und ohne Sog mit Plastikspritzen entnommen, um eine Thrombozytenaktivierung zu vermeiden.

2.3 Laborchemische Methoden

Studie I

2.3.1 Bestimmung der α_2 - adrenergen Rezeptorbindungsstellen an Thrombozytenmembranen

Reagenzien:

EDTA: Titriplex III, Ethylendinitrilotetraessigsäure Dinatrium-
salz, Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz, Kupfer(II)-sulfat-5-
hydrat, Magnesiumchlorid-Hexahydrat, NaOH (Titrisol), Natrium-
hydrogenkarbonat, Natriumchlorid und Tris(hydroxymethyl)amino-
methan: Fa. Merck, Darmstadt.

Ethylenglycol-bis-(β -Aminoethyl Äther)

N,N'-Tetraessigsäure (EGTA): Fa. Serva, Heidelberg.

Heparin-Natrium und Natriumcitratlösung 3,13 % :

Fa. B. Braun Melsungen, Melsungen.

Insta-Gel Universal-Szintillations-Cocktail:

Fa. Packard Instrument Company, Dowers Grove, USA.

Phentolamin-HCl: Fa. Ciba Geigy, Wehr, Schweiz.

Lidocainhydrochlorid 1 % :

Fa. Astra Chemicals GmbH, Wedel/ -Holstein.

(Methyl-[^3H])-Yohimbin: Fa. New England Nuclear, Boston, USA.

(Imidazolyl-4,5-[^3H])-UK 14,304:

Fa. New England Nuclear, Dreieich.

Bestimmung der α_2 -adrenergen Rezeptorbindungsstellen

Die α_2 -Adrenozeptor-Dichte wurden an Thrombozytenmembranen durch Analyse von Sättigungskurven des Antagonisten [^3H]-Yohimbin (Fritschka *et al.* 1984,1986e; Brodde *et al.* 1982,1988) und des Agonisten [^3H]-UK 14,304 (Schloos *et al.* 1987) bestimmt.

Thrombozytenmembranpräparation:

Durch die Verwendung von Materialien aus Kunststoff wurde bei der Präparation eine Thrombozytenaktivierung vermieden.

Um thrombozytenreiches Plasma zu gewinnen, wurden in einer ersten Abtrennungszentrifugation 20 ml Citratblut (1:10; 3,13% -iges Na-Citrat) bei 160 g (15 Minuten, Raumtemperatur) zentrifugiert. Hierbei wurde eine Zentrifuge mit Ausschwingrotor (MSE Mistral 6 L mit Universal-Ausschwingrotor) eingesetzt, damit der Überstand beim Abbremsen des Rotors vom Unterstand sauber getrennt blieb.

Die Thrombozyten wurden vom Plasma getrennt, indem der thrombozytenreiche Überstand in einer zweiten Abtrennungszentrifugation mit 23 400 g für 10 Minuten bei 4 °C in einer Ultrazentrifuge mit vorgekühltem Festwinkelrotor (Centricon H-401 mit Rotor A. 12.24, B. Hermle KG, Gosheim) zentrifugiert wurde.

Das so gewonnene, aus Thrombozyten bestehende Pellet wurde zum Auswaschen von evtl. noch vorhandenen Plasmabestandteilen in einem hyperosmolaren Puffer (Puffer I) gelöst und anschließend mit 23 400 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Puffer I mit einem pH von 7,35 enthielt 50 mmol/l Tris (= 50 mosmol/kg) zur Pufferung saurer Valenzen, 20 mmol/l EDTA (= 60 mosmol/kg) zum

Abfangen von Kalzium und 150 mmol/l NaCl (= 300 mosmol/kg) als osmotisch wirksame Teilchen. Diese Zentrifugation zum Waschen der Thrombozyten wurde zweimal wiederholt.

Danach wurde das Pellet in einem hypotonen Lyse-Puffer (Puffer II) gelöst und nach einer Minute mittels eines Ultra-Turrax-"Stabmixers" (Firma Jahnke und Kunkel, IKA-Werk, Staufen) unter Verwendung des kleinsten Schaftes für 15 Sekunden homogenisiert. Dann wurde das Homogenisat mit 55 000 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der Puffer II mit einem pH von 7,5 enthielt 5 mmol/l Tris (= 5 mosmol/kg) 5 mmol/l EDTA (= 15 mosmol/kg).

In einem letzten Zentrifugationsschritt wurde das aus Thrombozytenmembranen bestehende Pellet zum Auswaschen des Lyse-Puffers in einem Inkubationspuffer (Puffer IIIa) gelöst und anschließend mit 55 000 g für 15 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Der hypotone Inkubationspuffer (Puffer IIIa) mit einem pH von 7,4 enthielt 50 mmol/l Tris (= 50 mosmol/kg) und 0,5 mmol/l EDTA (= 1,5 mosmol/kg). Das so erhaltene Thrombozytenmembranpellet wurde in 6 ml Inkubationspuffer gelöst, homogenisiert und in Eiswasser gekühlt.

Bindungsassay

Die hochaffinen α_2 -Adrenozeptor-Bindungsstellen wurden mittels des mit Tritium markierten α_2 -Adrenozeptor-Agonisten [^3H]-UK 14,304, die Dichte der gesamten α_2 -Adrenozeptoren wurde mittels des α_2 -Adrenozeptor-Antagonisten [^3H]-Yohimbin bestimmt. Hierzu wurde eine Standardreihe hergestellt und die [^3H]-Yohimbin-Lösungen (bzw. [^3H]-UK 14,304-Lösungen) in Konzentrationen

von 10,00; 7,50; 5,00; 3,75; 2,50; 1,88; 1,00; 0,50; und 0,25 nmol [³H]-Yohimbin/l (bzw. [³H]-UK 14,304/l) Ansatz eingesetzt.

Zur Erfassung der unspezifischen Bindung von [³H]-Yohimbin (bzw. [³H]-UK 14,304) durch Nicht-Rezeptor-Strukturen im Assay wurde parallel in einer zweiten Inkubationsreihe der unspezifische α_1/α_2 -Adrenozeptor-Antagonist Phentolamin eingesetzt.

Das in Puffer IIIa gelöste Phentolamin erreichte im Inkubationsansatz eine Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ mol/l. (Die so bestimmte unspezifische Bindung von [³H]-Yohimbin [bzw. [³H]-UK 14,304] wurde später von der gesamten gemessenen [³H]-Yohimbin-Bindung [bzw. [³H]-UK 14,304-Bindung] subtrahiert.)

Zuletzt wurde zum Starten der Inkubation die Thrombozytenmembransuspension in den Inkubationsansatz pipettiert, so daß sich ein Assayvolumen von 250 μ l/Ansatz ergab, bestehend aus:

- 50 μ l [³H]-Yohimbin-Lösung (bzw. [³H]-UK 14,304-Lösung)
- 50 μ l $1 \cdot 10^{-5}$ molarer Phentolaminlösung bzw. Puffer IIIa
- 150 μ l Thrombozytenmembransuspension

Der Ansatz wurde 30 Minuten in einem abgedeckten, 25 °C warmen Wasserschüttelbad (Köttermann 3047, Hänigsen) inkubiert. Die Inkubation wurde durch Zugabe von 10 ml eisgekühltem Puffer IIIa gestoppt.

Die insgesamt im Assay eingesetzte Aktivität wurde von dem an den Thrombozytenmembranen gebundenen [³H]-Yohimbin (bzw. [³H]-UK 14,304) unmittelbar anschließend durch Vakuumfiltration über Glasmikrofaserfiltern mit einer Porengröße von 0,7 μ m

(Whatman-Glasmikrofaserfilter GF / C [2,5 cm], Whatman Ltd., Springfield Mill, England) separiert. Zur Reduktion der unspezifischen Bindung wurden die Filter vor der Filtration in Inkubationspuffer eingelegt.

Es wurde ein an eine Vakuumpumpe (-900 mbar) angeschlossenes Vielfachfiltriergerät (Millipore-Saugtopf, Millipore Corp., Bedford, USA) eingesetzt. Die getrockneten Filter mit den inkubierten Thrombozytenmembranen wurden in die mit 7 ml Szintillationszählflüssigkeit gefüllten Zählgläser hinzugegeben und der Szintillationsmessung in einem β -Szintillations-Meßgerät zugeführt.

Szintillationsmessung

Die Szintillationszählflüssigkeit wurde nach den Bedingungen und Eigenschaften des Assays ausgesucht: Durch Micellenbildung in der Flüssigkeit wurde ein enger Kontakt zwischen Probenmaterial und Szintillationszählflüssigkeit gewährleistet, der nötig ist, da die freiwerdenden β -Teilchen des Tritiumzerfalls eine nur geringe Energie von 0,018 MeV haben. Der Zähler arbeitete mit einer Zählkammertemperatur von 10 °C und lag damit für eine effiziente Zählung im Temperaturoptimum dieser Flüssigkeit.

Die Zählkammer des Flüssigszintillationszählers (Tri-Carb 300 C, Packard Instrument Comp., Downers Grove, USA) war mit zwei Photomultipliern bestückt, welche die Photonen registrierten, die aus dem Zusammentreffen von β -Teilchen des Tritiummarkierten Yohimbins (bzw. UK14,304) mit der Szintillationszählflüssigkeit in den Zählgläsern entstanden. Die Impulse

beider Photomultipliern gingen durch einen Summations- und einen Koinzidenzkreis und wurden an einem analogen Ausgang registriert.

Die Messung in dem β -Szintillations-Meßgerät erfolgte mit einer Effizienz von 56%. Ein Programm zur Umrechnung der cpm (counts per minute) auf dpm (desintegrations per minute) wurde mittels einer quenchkorrigierten Effizienz-Korrelationskurve bekannter, gequenchter Standards (n=10) im Zähler gespeichert und in mehrwöchigen Abständen auf seine Genauigkeit hin überprüft. Die Sättigungskurven umfaßten neun Meßpunkte der totalen und neun Meßpunkte der unspezifischen Bindung des Liganden. Die spezifische Bindung des Liganden wurde aus der Differenz zwischen der totalen und der unspezifischen Bindung errechnet.

Bestimmung des Proteingehaltes der Thrombozytenmembransuspension

Als Bezugsgröße für die eingesetzte Menge an Membranen wurde der Proteingehalt der Thrombozytenmembransuspension bestimmt. Hier wurde die Proteinbestimmungsmethode nach Lowry *et al.* (1951) mit dem Folin-Ciocalteus-Phenolreagenz hinzugezogen, bei der Molybdän-Kupfer-Protein-Komplexe photometrisch bei 578 nm bestimmt werden.

2.3.2 Bestimmung der Plasma-Katecholamine

Plasma-Noradrenalin und -Adrenalin wurden aus 10 ml heparinisiertem Vollblut bestimmt, das mit 40 μ l 5%-ige Ethylenglykol-Tetraessigsäure (EGTA) versetzt wurde. EGTA wurde eingesetzt, da

es ein stärkerer Kalzium-Komplex-Bildner als Ethylendiamin-Tetraessigsäure (EDTA) ist. Die Proben wurden unmittelbar nach der Entnahme in Eiswasser gekühlt und anschließend bei 4 °C mit 2000 g zentrifugiert. Das so gewonnene Plasma wurde bei -70 °C bis zur Analyse eingefroren.

Die Bestimmung der Plasma-Katecholamine erfolgte radioenzymatisch nach der von Thiede und Kehr (1981) modifizierten Methode von da Prada und Zürcher (1976). Dieser Assay basiert auf Methylierung der Katecholstruktur in meta-Stellung mit Hilfe einer gereinigten Enzympräparation (COMT) in Gegenwart des Methyl donors S-([³H]-Methyl)-Adenosyl-L-Methionin zu den jeweiligen ortho-([³H]-Methyl)-Katecholderivaten. Die aufgetrennten ortho-methylierten Produkte wurden entweder zu Vanilin oxidiert (Normetanephrin und Metanephrin) oder durch erneute Extraktion und Reextraktion (3-Metoxythyramin) und anschließender Dünnschichtchromatographie isoliert. Nach erfolgter Isolierung wurde die Radioaktivität der Probe im Flüssigszintillationszähler bestimmt, mit der die Konzentration der Katecholamine im Blut über einen internen Standard berechnet wurde.

2.3.3 Bestimmung des intrazellulären freien Kalziums

Das intrazelluläre freie ionisierte Kalzium wurde an Thrombozyten mit der Quin II-Methode bestimmt (Tsien *et al.* 1982, Rink *et al.* 1982).

Quin II -Methode

20 ml Citratblut wurden 20 Minuten lang bei 140 g zentrifugiert. Danach wurde das thrombozytenreiche Plasma im Wasserbad bei 37 °C für 10 Minuten vorinkubiert. Der Probe wurden 10 µmol Quin II (Amersham, Buckinghamshire, England) zugefügt. Quin II ist ein Tetracarboxylatfarbstoff. Es bildet mit Kalziumionen einen Komplex im stöchiometrischen Verhältnis von 1:1.

Der nicht polare, in DMSO gelöste Quin II-tetraazetoxymethylester dringt als lipophile Substanz durch die Lipidmembran der Thrombozyten hindurch. Intrazellulär wird er sofort durch unspezifische Esterasen gespalten, wodurch der Farbstoff als polare, lipophobe Substanz die Zelle nicht mehr verlassen kann. Die Inkubationszeit betrug nach Hinzufügen von Quin II 20 Minuten bei 37 °C im Wasserbad. Um den extrazellulären Farbstoff abzutrennen, wurde bei Raumtemperatur eine Gelfiltration auf einer Sepharose-Säule (Sephadex CL-2B, 50 ml) durchgeführt. Als flüssige Phase wurde ein HEPES-Puffer verwendet, mit: HEPES 10 µmol, NaCl 145 µmol, KCl 5 µmol, MgCl₂ 1 µmol, Na₂PO₄ 0,5 µmol, Glukose 6 µmol, pH 7,4.

Hiernach wurde die Zellsuspension auf eine Konzentration von 3,5 bis $7,0 \cdot 10^7$ Zellen pro ml verdünnt. Die Fluoreszenz der mit Quin II beladenen Thrombozyten wurde mit einem Spektralfluorometer (Aminco-Bowmann) in auf 37 °C temperierten 2 ml Quartzküvetten gemessen.

Die Exzitationswellenlänge lag bei 340 nm, bei 4 nm Bandbreite. Die Emissionswellenlänge lag bei 492 nm, bei 10 nm Bandbreite.

Sie entsprechen den Exzitations- und Emissionsspektren des Kalzium-Quin II-Komplexes.

Nach Lysieren mit Triton X-100, einem Detergens mit geringer Eigenfluoreszenz, wurde zunächst die Fluoreszenz (F) des Kalzium-Quin II-Komplexes gemessen. Durch Zugabe von EGTA, einem Komplexbildner mit weitaus höherer Affinität zu ionisiertem Kalzium als Quin II, wurde die Konzentration von ionisiertem Kalzium auf unter 2 nmol gesenkt und das Kalzium aus dem Quin II-Komplex kompetitiv gelöst. Dafür wurde durch Zugabe von NaOH der pH der Lösung auf pH 8,4, dem Wert der höchsten Affinität von EGTA zu Kalzium eingestellt. Es wurde die minimale Fluoreszenz (F_{\min}) abgelesen, die der des kalziumfreien Quin II entspricht. Nach Absättigung der Bindungsstellen des Quin II durch Zugabe von Kalziumchlorid auf eine Endkonzentration von ca. 10 nmol wurde die maximale Fluoreszenz (F_{\max}) bestimmt. Die Konzentration des freien intrazellulären Kalziums ließ sich nach folgender Gleichung ermitteln:

$$[Ca^{2+}]_i = K_D \cdot (F - F_{\min}) / (F_{\max} - F)$$

" K_D " entspricht der Dissoziationskonstanten des Kalzium-Quin II-Komplexes von 115 nmol.

Überprüfung des Funktionszustandes der Thrombozyten

Um sicherzustellen, daß die Thrombozyten unter der Präparation nicht gelitten haben, wurde ein Adhäsionstest (Breidin *et al.* 1980) und eine Zellzählung mit Registrierung der Größen-

verteilung jeweils vor Inkubation und nach Gelfiltration durchgeführt.

Adhäsionstest

Die Fähigkeit der Thrombozyten sich auf blutfremden Oberflächen auszubreiten, ist vom intakten Stoffwechsel der Thrombozyten abhängig. An Fremdoberflächen bleiben diese Zellen rasch haften. Dabei weisen sie in der Regel schon mehr oder weniger lange, fadenförmige Fortsätze auf. Entlang dieser Fortsätze breitet sich das Hyaloplasma auf der Kontaktfläche aus.

Verdünntes thrombozytenreiches Plasma wurde für eine Zeitdauer von 30 Minuten gleichmäßig auf einen Kunststoffobjektträger verteilt. Danach wurden die Objektträger in einer NaCl/Citratlösung gewaschen, für 5 Minuten in Formalin fixiert, 5 Minuten in 10 n Kaliumpermanganatlösung zur besseren Farbaufnahme oxidiert, und 60 Minuten lang in einer 1:5 verdünnten Giemsalösung gefärbt. Die Auswertung erfolgte bei einer 240- bis 320-fachen Vergrößerung unter dem Lichtmikroskop.

Zellzählung und Größenbestimmung

Die Zählung und Größenbestimmung der Thrombozyten wurde mit einem elektronischen Zellzähler (Baker 810-Thrombocounter) durchgeführt. Da eine traumatische Präparation zu einer spontanen Aggregation einzelner Thrombozyten führt, wird die Größenverteilungskurve zu höheren Größenangaben und zu kleineren Zellzahlen hin verschoben.

Die Größenverteilungskurve der Zelle ist daher ein Maß für ihre Belastung durch die Präparation. Die Thrombozytenzahl sollte nach der Gelfiltration mehr als 75 % des Ausgangswertes betragen.

Bestimmung der in-vitro Stimulierbarkeit

Hierbei wurde zu der Zellsuspension Kalziumchlorid (0,5 µmol bis 1 µmol) hinzugefügt, um die Aufnahme von Kalzium aus dem Extrazellulärraum zu erleichtern. Die Zellen wurden in den Meßküvetten mit 0,1 U Thrombin/ml und 0,25 U Thrombin/ml als Stimulans inkubiert.

2.3.4 Bestimmung des Plasma-Renins

Das Plasma-Renin wurde radioimmunologisch mittels monoklonaler Antikörper bestimmt (Laboserv GmbH, Frankfurt/Main). Die Plasma-Renin-Konzentration wird in pg/ml angegeben.

2.3.5 Bestimmung des Plasma-Endothelins

Das Plasma-Endothelin wurde nach Extraktion über Sep-Pak C₁₈-Säulen radioimmunologisch gemessen, wobei der verwendete Antikörper (ITS) zu 100 % mit Endothelin-1, zu 96 % mit Endothelin-3 und zu 52 % mit Endothelin-2 reagiert. Die Interassayvarianz des verwendeten Testkits (Laboserv GmbH, Frankfurt/Main) beträgt 4,2 %. Die Meßwerte werden in pg/ml angegeben.

Studie II

2.3.6 Bestimmung des β -Endorphins

Radioimmunoassay für β -Endorphin

Die Plasma-Proben wurden mit einem Volumen von 100 μ l im Assay eingesetzt. Die 100 μ l der Proben und 100 μ l β -Endorphin-Antikörper (Kaninchen, hergestellt im pharmakologischen Institut Heidelberg, Endverdünnung 1:180 000) wurden in 200 μ l Tris-Puffer (0,1m; pH 7,4) gelöst und für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Die Blank-, Null-, Standard- und Plasma-Pool-Standardwerte wurden in ähnlicher Weise angesetzt (s. Tab.1).

Tab.1: Ansatzschema für die radioimmunologische Bestimmung von Plasma- β -Endorphin (Angaben in μ l)

	Blank	0-Werte	Standard	Probe	Pool-Standard
Tris-Puffer	300	200	100	200	200
Standard	-	-	100	-	-
Pool-Plasma	100	100	100	-	-
Pool-Standard	-	-	-	-	100
Probe	-	-	-	100	-
Antikörper	-	100	-	100	100

Nach Zugabe von 100 μ l des radioaktiv markierten Antigens (J^{125} - β -Endorphin, Fa. Amersham Buchler, Braunschweig) mit einer Totalaktivität von 2500 cpm je Meßprobe wurde der Ansatz erneut für 24 Stunden bei 4 °C inkubiert. Danach wurde der ungebundene Anteil des markierten β -Endorphins durch 200 μ l Holzkohle (Fa. Serva, Norit A, Nr. 30890) und anschließender Zentrifugation bei 2000 g für 20 Minuten abgetrennt.

Die flüssige Phase wurde abgesaugt und die Radioaktivität des Niederschlages im Gamma-Strahlen-Zähler (Modell 1185, Fa. Zinsser Analytic, Frankfurt) gemessen.

Die Standardkurve umfaßte 10 Meßwerte (1,95 pg - 1000 pg/100 μ l).

Die spezifische Bindung wird definiert durch:

$$(\text{Blank} - 0\text{-Wert}) \cdot 100 / \text{Totalaktivität}$$

Die β -Endorphin-Konzentration und die Standardkurven wurden mit Hilfe eines programmierbaren Rechners (HP-97, Fa. Hewlett-Packard, Frankfurt) ermittelt.

2.4 Berechnung und statistische Auswertung

Alle Werte werden als arithmetische Mittel \pm Standardfehler (SEM [standard error of mean]) angegeben.

Ein Student-t-Test wurde für verbundene und unverbundene Stichproben, sowie ein Wilcoxon-Test bei nicht normalverteilten Daten durchgeführt.

Das Signifikanzniveau wurde wie folgt gekennzeichnet:

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Korrelationen wurden nach Spearman geprüft.

Die Berechnung der Sättigungskurven erfolgte durch nicht-lineare Regression, sowie durch Konstruktion eines Scatchard-Plots (Scatchard 1949). Die Auswertung der Sättigungskurven der [³H]-Yohimbin-Bindung sowie der [³H]-UK 14,403-Bindung wurde durch eine computergestützte (Hewlett Packard HP 9826), iterative Parameterberechnung, modifiziert nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate (Gauss 1809) mit Hilfe des Giessen Iteration Procedure Rechenprogrammes (Wiemer *et al.* 1982) durchgeführt. Die Dissoziationskonstante (K_D) der [³H]-Yohimbin-Bindung sowie der [³H]-UK 14,403-Bindung sind log-normal verteilt. Daher wurden diese Werte als Antilogarithmus des Mittelwertes der logarithmisch transformierten Werte angegeben. Statistische Vergleiche wurden zwischen den arithmetischen Mitteln \pm Standardfehler (SEM) der logarithmisch transformierten Werte durchgeführt.