

2. Probanden und Methodik

2.1. Allgemeine Bemerkungen zur Studienplanung

2.1.1. Probandenauswahl

Initial wurde ein Kollektiv von 220 Probanden im Alter von 19 bis 32 Jahren (davon 113 weibliche und 107 männliche Probanden) auf einen Gly389 bzw. Arg389 Polymorphismus des β_1 -Adrenozeptors untersucht.

An der nachfolgend vorgestellten klinischen Studie nahmen 24 gesunde Probanden teil (12 homozygot für den Gly389 Polymorphismus, 6 männliche und 6 weibliche, mittleres Alter 24 ± 1 Jahre, von 22-30 Jahre, mittleres Gewicht 67 ± 3 kg; 12 homozygot für den Arg389 Polymorphismus, 6 männliche und 6 weibliche, mittleres Alter 24 ± 1 Jahre, von 22-30 Jahre, mittleres Gewicht 70 ± 4 kg). Bei allen Testpersonen wurde eine Anamneseerhebung, klinische Untersuchung, Kontrolle von Blutbild und Serumelektrolyte, EKG-Ableitung sowie Blutdruckmessung durchgeführt, um Asthma bronchiale, chronische Lungenerkrankungen, Diabetes mellitus, arteriellen Bluthochdruck und weitere kardiovaskuläre Erkrankungen auszuschließen. Keiner der männlichen Probanden nahm zum Zeitpunkt der Studie Medikamente ein. Jeweils 3 Probandinnen der Gruppe A und B gaben an, Hormonpräparate zur Empfängnisverhütung einzunehmen. Alle Probanden erklärten, nur unregelmäßig sportlich aktiv zu sein. In Vorbereitung der Studie wurden sie über deren Inhalt und Verlauf von einem approbierten Arzt aufgeklärt und erteilten schriftlich ihr Einverständnis. Die Zustimmung der Ethikkommission der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg lag zu Beginn der klinischen Studie vor.

2.1.2. Studienmodell

Das Studienmodell war einfach blind, randomisiert und cross-over. Am Untersuchungstag erfolgte die dynamische Belastung am Fahrradergometer in liegender Position und steigenden Belastungsstufen. Gleichzeitig erfolgte die Ableitung der systolischen Zeitintervalle sowie die Bestimmung hämodynamischer und biochemischer Parameter.

2.1.3. Studienausgangsbedingungen und Studienprotokoll

Die Probanden erschienen am Untersuchungstag um 13 Uhr nüchtern im klimatisierten (22°C) Kreislauflabor des Pharmakologischen Institutes der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg. Das Rauchen war den Probanden am Untersuchungstag nicht gestattet, ebenso das Erscheinen im Institut mit dem Fahrrad.

In einer linken unteren Armvene wurde eine Verweilkanüle fixiert, durch welche die Blutabnahme erfolgte und im Bedarfsfall schnell kreislaufwirksame Medikamente appliziert werden konnten.

Die Blutdruckmanschette wurde am rechten Arm befestigt, die EKG-Elektroden als Extremitätenableitungen angebracht, das Herzscharlmikrophon am Erbschen Punkt (3. Intercostalraum links) plaziert sowie der Pulswandler jeweils an der Karotisbifurkation submandibulär aufgelegt und die Stelle mit der optimalen Anstiegssteilheit markiert.

Nach einer mindestens 60-minütigen Ruhephase im Liegen wurden die Ausgangswerte für die zu untersuchenden hämodynamischen Werte (Blutdruck, Herzfrequenz, systolische Zeitintervalle) aufgezeichnet und die biochemischen Parameter (Plasmakatecholamine, Plasminreninaktivität, Plasmakalium und Plasmalaktat Spiegel) abgenommen. Anschließend erfolgte die Belastung am Fahrradergometer in steigenden Belastungsstufen von 25, 50, 75, und 100 Watt. Die Dauer eines jeweiligen Belastungsschrittes betrug 5 min. Jeweils in der 2., 3., und 4. Minute wurden der systolische und diastolische Blutdruck manuell nach Riva-Rocci gemessen, sowie die Herzfrequenz notiert. In der 5. Minute einer jeweiligen Belastungsstufe wurden die systolischen Zeitintervalle, ein noninvasives Verfahren zur Bestimmung der Steigerung der Kontraktionskraft des Herzens gemessen (Belz, 1995), sowie 10 ml Blut zur Bestimmung der Plasmaspiegel für Adrenalin, Noradrenalin und Renin entnommen. Die Glukose, Kalium und Laktatbestimmung erfolgte erst wieder am Ende der letzten Belastungsstufe mit 100 Watt (20. Minute).

Der letzten Belastungsstufe folgte eine 15-minütige Beobachtungszeit mit nochmaliger Erfassung sämtlicher vorher genannter hämodynamischer und biochemischer Parameter sowie einer letztmaligen Bestimmung des Glukose-, Kalium- und Laktatwertes.

Der Proband wurde nach Erreichen von Blutdruck- und Herzfrequenzausgangswerten sowie subjektiven Wohlbefinden entlassen. Bei allen Untersuchungen war stets ein approbierter Arzt zugegen und es erfolgte eine ständige elektrokardiographische Kontrolle des Probanden.

2.1.4. Abbruchkriterien

Im Vorfeld waren folgende klinische Abbruchkriterien festgelegt worden:

- Wunsch des Probanden,
- Anstieg des systolischen Blutdruckes um mehr als 80 mmHg,
- Anstieg des diastolischen Blutdruckes um mehr als 40 mmHg,
- Anstieg der Herzfrequenz um mehr als 80 Schläge/Minute,
- Abfall der Herzfrequenz unter 40 Schläge/Minute,
- pathologische Veränderungen im Elektrokardiogramm,
- ventrikuläre Rhythmusstörungen (Neuaufreten von isolierten, ventrikulären, Extrasystolen mit einer Frequenz von mehr als 5 pro Minute und alle höhergradigen ventrikulären Rhythmusstörungen),
- Dyspnoe,
- jede weitere in der Beurteilung des Untersuchers potentiell bedrohliche Störung.

Von den Probanden wurden keinerlei Nebenwirkungen angegeben. In dieser Studie wurde kein Versuch vorzeitig abgebrochen, weder aus persönlichen noch aus klinischen Gründen.

2.2. Untersuchungsparameter und -methoden

2.2.1. Systolischer und diastolischer Blutdruck

Der Blutdruck wurde nach festgelegtem Zeitschema in allen Versuchen unblutig nach Riva-Rocci mit einem Quecksilbermanometer (Erkometer; Richard Kallmayer, Bad

Tölz, Deutschland) gemessen (I. und V. Korotkoff'sches Geräusch). Um die individuellen Fehlerquellen so gering wie möglich zu halten, wurde er während des gesamten Versuches durch ein und denselben Untersucher ermittelt. Der Mittelwert aus jeweils 3 gemessenen Werten diente zur weiteren statistischen Auswertung.

2.2.2. Herzfrequenz

Per Computer (Programm: LabVIEW 4.0) wurden 20 aufeinanderfolgende RR-Zacken im EKG automatisch ausgemessen, welches vom Elektrokardiographen (Bioset 8000, Hörmann Medizintechnik Zwönitz) aufgenommen wurde.

Zur exakten Ermittlung der Herzfrequenz wurden immer 20 RR-Intervalle vermessen. So konnte der Einfluss der physiologischen respiratorischen Arrhythmie, die sich auf das Schlagintervall, jedoch nicht wesentlich auf die systolischen Zeitintervalle auswirkt, minimiert werden (Erbel & Belz, 1977).

2.2.3. Systolische Zeitintervalle

Die Ermittlung der systolischen Zeitintervalle LVET, QS₂ und PEP ist eine anerkannte nicht-invasive Methode zur Charakterisierung der linksventrikulären Kontraktilität (Lewis et al., 1977; Gibson, 1978; Johnson et al., 1981). Durch zeitgleiche Registrierung von Elektrokardiogramm [EKG] (ein Kanal einer Extremitätenableitung nach Goldberger), Phonokardiogramm [PKG] (Mikrofon am 3. Intercostalraum links, parasternal aufgesetzt) und der Karotispulskurve (Ableitung immer am vorher ermittelten und festgelegten Punkt über der rechten Karotisbifurkation) ist es möglich, die zeitlichen Beziehungen zwischen elektrischer und mechanischer Herzaktion darzustellen, eben jene oben erwähnten systolischen Zeitintervalle (Li & Belz, 1993; Venitz und Lucker, 1984; World, 1990). Die Aufzeichnung der STI's erfolgte bei hoher Papiervorlaufgeschwindigkeit (100 mm/sek) mit Hilfe des Bioset 8000 jeweils unmittelbar vor Belastung und am Ende (5. Minute) eines jeweiligen Belastungsschrittes. Die dynamische Belastung erfolgte in liegender Position am Fahrradergometer (Ergo-fit 877, Pirmasens, Germany).

Zur näheren Erläuterung:

- 1.) LVET: Linksventrikuläre Austreibungszeit (left ventricle ejection time) in ms markiert den Beginn des Steilanstieges in der Carotispulskurve bis zur Inzisierung im PKG
- 2.) QS₂: Zeitraum der elektromechanischen Systole (Anspannungs- und Austreibungszeit) in ms, gemessen vom Beginn der Q-Zacke im EKG (entspricht der ventrikulären Depolarisation) bis zur ersten hochfrequenten Schwingung im PKG (entspricht dem Anfang des 2. Herztones, Aortenklappenschlusston)
- 3.) PEP: Präejektionsperiode (pre-ejection-period) entspricht der Anspannungszeit der isovolumetrischen Phase in ms ($PEP = QS_2 - LVET$)
- 4.) RR-Intervall: Zeitintervall zwischen 2 R-Zacken der QRS-Komplexe im EKG
- 5.) Herzfrequenz: $Herzfrequenz = 60000 : RR\text{-Intervall}$

Es wurden stets 10 Herzzyklen aufgezeichnet (Papiergeschwindigkeit 100 mm/sek) und meist der dritte bis siebente Schlag ausgemessen und daraus der Mittelwert von QS₂, LVET und PEP errechnet. Zur Auswertung kamen dabei jeweils 5 Herzaktionen pro Messung. Eine weitere Erhöhung der Zahl der Messwerte erbringt keine wesentliche Steigerung der Messgenauigkeit (Erbel & Belz, 1977).

Mittels einer von Schäfers et al. (1994) ermittelten Korrekturgleichung lässt sich die in hohem Maße herzfrequenzabhängige QS₂ frequenzkorrigieren. Diese herzfrequenzkorrigierte QS₂-Zeit wird nachfolgend als QS_{2c} bezeichnet und stellt den sensitivsten Parameter der systolischen Zeitintervalle dar (Belz, 1995). Sie berechnet sich nach folgender Gleichung: $QS_{2c} = QS_2 + (1,22 \times \text{Herzfrequenz})$.

2.2.4. Blutproben

Unmittelbar vor Versuchsbeginn und jeweils am Ende eines jeden Versuchsschrittes (5. Minute) wurden in speziell vorbereiteten 4,9 ml EDTA-Monovetten (50 µl Gluthationzusatz zu den EDTA-Monovetten für die Katecholaminbestimmung) Blut zur Bestimmung der Plasmakatecholamine und der Plasmareninaktivität entnommen und

sofort eisgekühlt. Die Proben wurden am Versuchsende bei 4°C und 2000 U/min für mindestens 10 Minuten zentrifugiert, anschließend das Plasma abpipettiert und bei –80°C tiefgefroren. Die Bestimmung der Plasmakatecholaminspiegel erfolgte fluorometrisch mit Hilfe der HPLC wie bei Schäfers et al., (1997) beschrieben; die Bestimmung der Plasmareninaktivität mit einem Radioimmunassay (Sorin, Turin, Italy). Zusätzlich erfolgte vor Versuchsbeginn und am Versuchsende die Bestimmung der Plasmakalium- und Laktatwerte mit Hilfe des ABL-System 650 Radiometer, Kopenhagen, Dänemark

2.2.5. Datenanalyse

Die experimentellen Daten im Text und in den Abbildungen sind dargestellt als Mittelwert (\bar{x}) \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM) von n Versuchen. Die Signifikanz von Unterschieden zwischen zwei Gruppen wurde mit dem ungepaarten t-Test bestimmt. Ein p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen. Alle statistischen Berechnungen wurden mit dem InStat-Programm (GraphPAD Software, San Diego, CA, USA) durchgeführt.