

J. Clin. Chem. Clin. Biochem.
Vol. 21, 1983, pp. 805–811

Bestimmung von β -Rezeptoren an polymorphkernigen intakten Leukocyten im autologen Plasma¹⁾

Von M. Lehmann, P. Schmid, E. Bergdolt

Medizinische Universitätsklinik, Abt. Sport- und Leistungsmedizin (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. J. Keul)
Freiburg/Breisgau

H. Porzig

Pharmakologisches Institut der Universität Bern und

J. Keul

Medizinische Universitätsklinik, Abt. Sport- und Leistungsmedizin (Ärztlicher Direktor: Prof. Dr. J. Keul)
Freiburg/Breisgau

(Eingegangen am 18. März/22. Juli 1983)

Zusammenfassung: Zur Bestimmung der β -Rezeptoren-Dichte wurde die spezifische Bindung von [³H]Dihydroalprenolol an intakten polymorphkernigen Leukocyten bei 6 ausdauertrainierten (VO_2 max. $65,7 \pm 2,0$ ml/kg · min) und 9 nicht ausdauertrainierten männlichen Probanden (VO_2 max. $52,0 \pm 4,0$ ml/kg · min) untersucht. Die spezifische Bindung ist definiert als Differenz zwischen Gesamtbindung und nicht verdrängbarer unspezifischer Bindung. Für die Bindungsstudien wurden die Leukocyten im autologen Plasma reinkubiert. Die spezifische Bindung zeigt bei trainierten und untrainierten Probanden ein Sättigungsverhalten bei ungefähr 2 nmol/l Dihydroalprenolol. Sie beträgt 85% (0,1 nmol/l Dihydroalprenolol) bis 51% (2,0 nmol/l Dihydroalprenolol) der Gesamtbindung. B_{max} beträgt, basierend auf der *Scatchard*-Analyse, 41,2 fmol/ 10^7 Zellen (Trainierte) und 21,6 fmol/ 10^7 Zellen (Untrainierte). Die Dissozianzkonstante (K_D) wurde zu 0,44 nmol/l Dihydroalprenolol (Untrainierte) und 0,49 nmol/l Dihydroalprenolol (Trainierte) berechnet, die Zahl der β -adrenergen Bindungsstellen beträgt ungefähr 1300 (Untrainierte) und 2500 pro Zelle (Trainierte). Die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol an intakte polymorphkernige Leukocyten von ausdauertrainierten ist signifikant höher als bei untrainierten Probanden. Die trainings-abhängige Änderung der β -Rezeptoren-Dichte kann ein Indikator einer gesteigerten Empfindlichkeit gegenüber Katecholaminen sein.

Determination of β -receptors on live human polymorphonuclear leukocytes in autologous plasma

Summary: The binding of tritium labelled radioligand dihydroalprenolol was investigated on live polymorphonuclear leukocytes of 6 endurance trained (VO_2 max. 65.7 ± 2.0 ml/kg · min), and 9 non-endurance trained subjects (VO_2 max. 52.0 ± 4.0 ml/kg · min). The specific binding of dihydroalprenolol is seen as an indicator of the β -receptor density. The specific binding of dihydroalprenolol is defined as the difference between the total binding and that amount of dihydroalprenolol that could not be displaced. The leukocytes were reincubated for the binding studies in their autologous plasma. The specific binding of dihydroalprenolol on live polymorphonuclear leukocytes shows a levelling off behaviour at a concentration of approximately 2 nmol/l dihydroalprenolol in trained as well as in untrained subjects. The specific binding amounts to about 85% (0.1 nmol/l dihydroalprenolol) to 51% (2.0 nmol/l dihydroalprenolol) of the total binding. Based on *Scatchard* analysis, B_{max} was determined as 41.2 fmol/ 10^7 cells (trained subjects), and 21.6 fmol/ 10^7 cells

¹⁾ Mit Unterstützung des Bundesinstitutes für Sportwissenschaft, Köln-Lövenich.

(untrained subjects). K_D is 0.44 nmol/l dihydroalprenolol (untrained subjects), and 0.49 nmol/l dihydroalprenolol (trained subjects). The β -adrenergic binding sites are approximately 1300 (untrained subjects), and 2500 binding sites/cell (trained subjects). The specific binding of dihydroalprenolol on live polymorphonuclear leukocytes is significantly higher in trained than in untrained subjects. This training dependent change in β -receptor density may be an indicator of an increased sensitivity to catecholamines.

Einführung

Das Verhalten β -adrenerger Bindungsstellen kann durch Untersuchungen mit Radioliganden an Membranpräparaten und intakten Zellen beobachtet werden (1). Diese Studien beruhen auf der hohen Affinität von β -Sympatholytica zu β -Rezeptoren. Schwierigkeiten bereitet das Ausmaß der unspezifischen Bindung oder lysosomalen Aufnahme des Radioliganden durch intakte Zellen. Fortschritte wurden durch Hemmung der lysosomalen Aufnahme β -adrenerger Liganden durch Chloroquin (2) oder Phentolamin (3) erzielt. In Vorversuchen bemerkten wir eine deutliche Aggregationsneigung der Zellen nach Inkubation in der von *Dulis & Wilson* angegebenen Pufferlösung (2). Mit der vorliegenden Arbeit wird deshalb das Verhalten der β -Rezeptoren an intakten polymorphkernigen Leukocyten im autologen Plasma bei ausdauer- und nicht ausdauertrainierten Probanden untersucht.

Methodik

Probanden

Untersucht wurden 15 gesunde, männliche Probanden, von denen 6 ein regelmäßiges körperliches, dynamisches Ausdauertraining von mehr als 4–6 Stunden pro Woche betreiben (Tab. 1).

Tab. 1. Anthropometrische Daten und maximale Sauerstoffaufnahme-fähigkeit der untersuchten Probanden.

	n		Alter (Jahre)	Größe (cm)	Ge- wicht (kg)	VO ₂ max.* (ml/kg · min)
Ausdauer- trainierte	6	\bar{x}	32	179	68	65,7
		s	5	9	5	2,0
Nicht- Ausdauer- trainierte	9	\bar{x}	28	181	71	52,0
		s	3	5	9	4,0

* maximale Sauerstoffaufnahme-fähigkeit als Bruttokriterium der maximalen aeroben Kapazität und dynamischen Leistungsfähigkeit, bestimmt während stufenweiser Laufbandergometrie.

Substanzen

Isolierung der polymorphkernigen Leukocyten: Ficoll-Paque wird von Deutsche Pharmacia, Freiburg, FRG, bezogen, Heparin (Liquemin) in der Konzentration von 5000 E/ml von Hoffmann-La Roche, Grenzach, FRG, Plasmasteril® von Fresenius, Bad Homburg, FRG. Die 1 mol/l Heparin-Pufferlösung wird von Gibco Europe, Karlsruhe, FRG, physiologische Kochsalzlösung von Boehringer Mannheim, Mannheim, FRG, Dextran T 500 von Roth, Karlsruhe, FRG, geliefert.

Bindungsstudie: Hierzu werden benötigt: MgCl₂ · 6H₂O (Merck, Darmstadt, FRG), EDTA (Fluka, Buchs, CH), Chloroquine-diphosphat (Sigma, St. Louis, U.S.A.), HCl, NaOH und Eisessig; ferner 1 mol/l Heparin-Pufferlösung (s.o.), Hanks-buffered-salt-solution, phenolrot-, calcium- und magnesiumfrei (Gibco Europe, Karlsruhe, FRG), [³H]-(-)-Dihydroalprenolol-hydrochlorid, spezifische Aktivität ungefähr 3330 TBq/mol (90 Ci/mmol) (NEN, Dreieich, FRG), (-)-Timolol-maleat (MSD Sharp und Dohme, München, FRG), Whatmann Filter GF/F, 25 mm Ø (Bender und Hobein, Freiburg, FRG), Toluol (Merck, Darmstadt, FRG) und Butyl-PBD (Packard, Zürich, CH). Protokoll wurde von NEN, Dreieich, FRG, bezogen.

Versuchsablauf

Die Bindungsstudien wurden an polymorphkernigen Leukocyten durchgeführt. Der Versuchsablauf gliedert sich in *Isolierung der Leukocyten* (Dichte-Gradienten-Zentrifugation und Sedimentation) und *Bindungsstudie* (Inkubation, Filtervorgang und Ermitteln der gebundenen Aktivität an [³H]-Dihydroalprenolol). 50 ml Blut (Heparin: 10 E/ml) wurden zwischen 8 und 8.30 Uhr abgenommen und sofort weiterbearbeitet. Die *Dichte-Gradienten-Zentrifugation* wurde nach *Böyum* (4) mit Ficoll-Paque (400 g, 40 min, 20 °C) durchgeführt. Das Vollblut wurde hierzu im Verhältnis 1:4 mit physiol. NaCl-Lösung gemischt und 16 ml auf 6 ml Ficoll-Paque überschichtet. Die Bodenphase, bestehend aus polymorphkernigen Leukocyten und Erythrocyten wurde anschließend mit Plasmasteril im Verhältnis 1 + 1 gemischt und etwa 75 min bei 1 g einer *Sedimentation* unterzogen. Das Plasmasteril war hierfür mit Heparin-Pufferlösung (12,5 ml 1 mol/l Heparin-Lösung + 487,5 ml Plasmasteril®, entsprechend einer 25 mmol/l Heparin-Lösung) und Heparin (5 E/ml) auf pH 7,4 eingestellt worden. (1 mol/l Heparin-Puffer: 23,83 g 2-[4-(2-Hydroxyäthyl)-piperazinyl-(1)-ethansulfonsäure ad 100 ml bidest. Wasser nach Einstellen und Kontrolle des pH-Wertes mit NaOH). Die *Sedimentation* wurde nach *Böyum* (4) durch Zugabe von Dextran verbessert. Nach der *Dichte-Gradienten-Zentrifugation* war die obere Fraktion, bestehend aus einem Plasma-NaCl-Gemisch (1:4) zur weiteren Verwendung separiert worden. Die isolierten polymorphkernigen Leukocyten wurden dreimal im autologen Plasma-NaCl-Gemisch gewaschen und auf ein Volumen von 2,4 ml Zellsuspension eingestellt. Die Konzentration an Leukocyten dieser Suspension betrug $16,7 \pm 7,7 \times 10^9/l$ ($\bar{x} \pm s$). Die *Bestimmung der β -Rezeptoren* an den intakten polymorphkernigen Leukocyten erfolgte nach *Dulis & Wilson* (2), *Baer & Porzig* (5) bzw. *Porzig et al.* (6). In Abänderung dieser Methoden erfolgte die Inkubation der Zellen im autologen Plasma, 1:4 mit physiol. NaCl-Lösung verdünnt. Entgegen dem Vorschlag von *Dulis & Wilson* (2) wurde die Verdrängung des [³H]-Dihydroalprenolols aus seiner spezifischen Bindung nicht durch Propranolol, sondern wie von *Porzig et al.* (6) empfohlen, mittels (-)-Timolol vorgenommen; 200 μ l der Zellsus-

pension wurden inkubiert in 2000 μ l der 1:4 autologen Plasma-NaCl-Verdünnung, und zwar einmal mit 10^{-6} mol/l (-)Timolol und ein zweites Mal ohne Timolol-Zusatz. Ad 50 ml Plasma waren zuvor 5 mg $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 1,29 mg Chloroquin (= 50 μ mol/l) und 18,5 mg EDTA gegeben und der pH-Wert mit 1 mol/l NaOH auf 7,4 eingestellt worden. Die Bindungsstudie begann durch Zugabe von 40 μ l Dihydroalprenolol der Konzentration 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 und 5,0 nmol/l. Inkubationslösung und Dihydroalprenolol enthaltende Zählgefäße wurden im Abstand von 2,5 min ins Schüttelwasserbad (37 °C) gegeben, nach 5 min Äquilibrium erfolgte die Zugabe von 200 μ l Zellsuspension und nach weiteren 25 min Inkubation wurden die Proben im Abstand von je 2,5 min filtriert. Hierzu wurden im Duplikat 1000 μ l Inkubationsmischung auf je 1 Filter gegeben, (die Filterkammer enthielt dabei bereits 7 ml eiskalte Waschlösung), sofort filtriert und noch zweimal mit wiederum 7 ml Waschlösung nachgespült. Diese drei Arbeitsschritte nahmen jeweils ungefähr 4 s in Anspruch. Als Waschlösung diente eine calcium- und magnesiumfreie HEPES-Hanks-Salt-Solution, zu der $MgCl_2$, EDTA und HEPES-Puffer in gleicher Konzentration wie zur Inkubationslösung hinzugefügt wurden. (HEPES-Hanks-Salt-Solution: 136,8 mmol/l NaCl, 5,3 mmol/l KCl, 0,26 mmol/l Na_2HPO_4 , 4,1 mmol/l $NaHCO_3$, 0,31 mmol/l KH_2PO_4 , 5,5 mmol/l Glucose). Die Konzentration der Zellen pro Filter betrug $1490 \pm 680 \times 10^3$ ($\bar{x} \pm s$). Die Filter wurden sofort in ein 20 ml Zählgefäß gegeben und jeweils mit 0,6 ml Protosol-Ethanol-Gemisch (1 + 1) überschichtet. Am folgenden Morgen wurden 10 μ l Eisessig und 10 ml Toluol hinzugegeben, das 4 g/l Butyl-PBD ((2-(4-tert-Butylphenyl)-5-(4-biphenyl)-1,3,4-oxadiazol)) enthielt. Anschließen wurde die Aktivität an Tritium gemessen (Packard Liquid-Scintillation-System TRICARB 300).

Auswertung der Untersuchungsergebnisse

In den Tabellen wurden Median, 50% Vertrauensbereich und Gesamtbereich angegeben, ausgenommen Tabelle 1, und in den Abbildungen 1 und 2 der Medianwert graphisch dargestellt. Die statistische Untersuchung beruht auf dem Wilcoxon-Test für un-

verbundene Stichproben (Rangordnungstest), die Scatchard-Funktion wurde nach dem Prinzip der kleinsten Summe der Abweichungsquadrate berechnet (Signifikanzniveau $p < 0,05$).

Ergebnisse

Als spezifisch gebundene Menge an Dihydroalprenolol wird die Differenz zwischen Gesamtbindung und unspezifischer Bindung gewertet. Die unspezifische Bindung wurde mittels der lysosomotropen Substanz Chloroquin in Übereinstimmung mit *Dulis & Wilson* (2) deutlich reduziert. Sie betrug zwischen 15% (bei 0,1 nmol/l Dihydroalprenolol), 18% (0,5 nmol/l Dihydroalprenolol), 31% (1,0 nmol/l Dihydroalprenolol) und 49% (2 nmol/l Dihydroalprenolol) (Tab. 2) der Gesamtbindung oder -aufnahme. Entsprechend lag die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol im Mittel (Median) bei 85 (0,1 nmol/l Dihydroalprenolol) bis 51% (2 nmol/l Dihydroalprenolol). In Abwesenheit von Chloroquin betrug die spezifische Bindung für Dihydroalprenolol bei 8 Vorversuchen, in Übereinstimmung mit *Dulis & Wilson* (2), zwischen 0–20% der Gesamtbindung, bzw. -aufnahme. Die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol zeigt um 2 nmol/l Dihydroalprenolol ein Sättigungsverhalten (Tab. 2, Abb. 1). Die Erhöhung der Konzentration auf 5 nmol/l Dihydroalprenolol erbringt keine weitere wesentliche Zunahme der spezifischen Bindung.

Tab. 2. Spezifische und unspezifische Bindung von [3H]Dihydroalprenolol an polymorphkernige Leukocyten zur Charakterisierung der β -Rezeptoren bei ausdauertrainierten (T; n = 6) und nicht ausdauertrainierten Probanden (U; n = 9).

Inkubation an [3H]Dihydroalprenolol (nmol/l)	Spezifische Bindung		Spezifische Bindung in % der Gesamtbindung		Unspezifische Bindung		
	(fmol/10 ⁷ Zellen)		(%)		(fmol/10 ⁷ Zellen)		
	U	T	U	T	U	T	
0,1	\bar{x}	2,5	4,0	82	84	0,4	0,7
	50%	1,0–2,7	2,1–4,6	68–87	63–88	0,2–0,8	0,4–1,0
	R	0,6–5,3	1,3–5,9	58–96	47–95	0,1–1,0	0,2–6,6
0,5	\bar{x}	8,1	15,3	76	82	2,0	2,6
	50%	3,1–9,7	14,2–19,0	63–85	67–88	1,0–3,4	1,0–7,7
	R	1,9–13,5	12,5–22,9	58–96	61–93	0,5–3,9	1,0–12,9
1,0	\bar{x}	11,3	22,7	63	78	6,5	8,7
	50%	10,4–19,4	21,2–28,3	54–69	63–80	5,9–8,7	5,5–12,5
	R	7,9–20,9	20,6–32,0	22–78	61–82	3,5–10,7	4,1–16,5
2,0	\bar{x}	16,9	30,6	51	54	18,5	25,0
	50%	13,2–22,0	25,0–35,1	44–57	50–61	14,1–22,6	15,4–36,7
	R	10,0–22,7	23,6–35,7	25–59	38–64	5,3–30,9	12,5–39,3
5,0	\bar{x}	17,9	30,9	27	35	54,4	60,6
	50%	14,6–21,7	28,2–36,3	19–37	30–37	42,7–76,5	50,7–81,7
	R	12,1–30,2	27,1–38,7	13–59	19–38	7,3–91,9	19,6–114,5

\bar{x} = Median, 50% – Vertrauensbereich, R = Gesamtbereich

Die Unterteilung des Gesamtkollektivs in 6 ausdauertrainierte und 9 nicht-ausdauertrainierte Probanden zeigt, daß die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol und somit die Rezeptorzahl trainingsabhängig ist (Tab. 2). Die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol liegt bei den trainierten für die Konzentration 0,5 bis 5 nmol/l Dihydroalprenolol signifikant höher als bei den nicht trainierten Probanden (Abb. 1). Dies trifft nicht zu für die unspezifische Aufnahme von Dihydroalprenolol durch die Zellen. Wenngleich unspezifische Bindung (Aufnahme) von Dihydroalprenolol durch die polymorphkernigen Leukocyten der Trainierten, wie auch die spezifische Bindung in % der Gesamtbindung im Mittel (Median) etwas höher sind als bei den Untrainierten (Tab. 2).

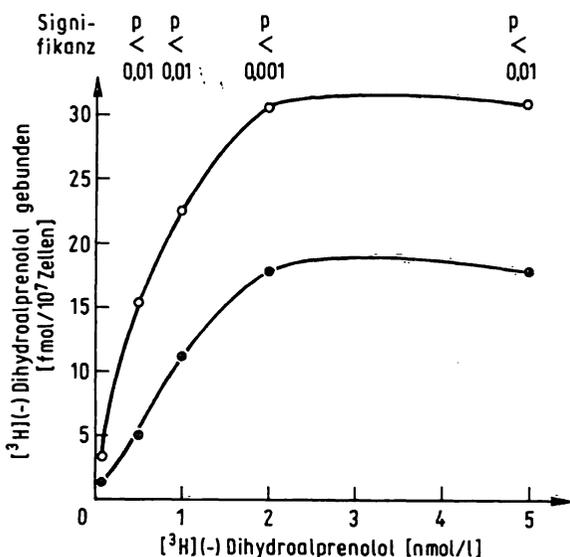


Abb. 1. Polymorphkernige Leukocyten ausdauertrainierter Probanden (n = 6, O—O) zeigen eine signifikant höhere Bindung an Dihydroalprenolol als Zellen von nicht ausdauertrainierten Personen (n = 9, ●—●).

Mittels Gleichgewichtsdialyse (7) von physiologischer NaCl-Lösung gegen das 1:4 autologe Plasma-NaCl-Inkubations-Medium – bei Zugabe von EDTA, MgCl₂ und Chloroquin zu beiden Lösungen – ergab sich für den Konzentrationsbereich von 0,1 nmol/l–10 nmol/l Dihydroalprenolol eine freie, nicht eiweißgebundene Dihydroalprenolol-Fraktion von 0,53–0,57, im Mittel 0,55. Die Scatchard-Analyse (8) ergibt bei Berücksichtigung der Eiweißbindung, welche die K_D, jedoch nicht B_{max}, beeinflusst:

1. Ausdauertrainierte: B_{max} = 41,2 fmol/10⁷ Zellen (50% Vertrauensbereich 37–49,4 fmol/10⁷ Zellen), ungefähr 2500 Rezeptoren pro Zelle und K_D = 0,49 nmol/l Dihydroalprenolol;

2. nicht Ausdauertrainierte: B_{max} = 21,6 fmol/10⁷ Zellen (50% Vertrauensbereich 17,5–26,1 fmol/10⁷ Zellen), ungefähr 1300 Rezeptoren pro Zelle und K_D = 0,44 nmol/l Dihydroalprenolol (Abb. 2).

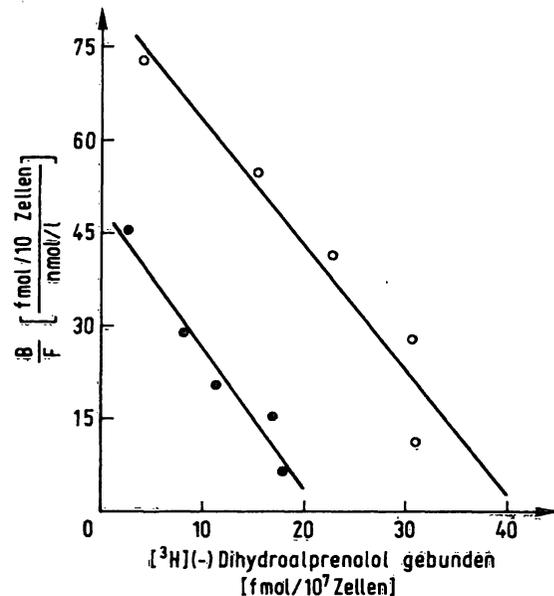


Abb. 2. Die Scatchard-Regression für die Trainierten (O—O, r = 0,96) und Untrainierten (●—●, r = -0,97) verlaufen annähernd linear, was als Indikator einer homogenen Rezeptorpopulation gedeutet werden darf. B_{max} beträgt 41,5 fmol/10⁷ Zellen (Trainierte) und 22,9 fmol/10⁷ Zellen (Untrainierte), K_D 0,90 nmol/l (Trainierte) und 0,84 nmol/l (Untrainierte) Dihydroalprenolol.

Die Zahl der Rezeptoren pro Zelle wurde nach der Gleichung

$$\frac{\text{Rezeptoren}}{\text{Zelle}} = \frac{\text{Dihydroalprenolol gebunden}}{\text{Zellzahl}} = \frac{6,02 \cdot 10^{23} \text{ Moleküle}}{\text{mol}}$$

berechnet. Die unspezifische Aufnahme von Dihydroalprenolol durch die Zellen verhält sich sowohl bei Trainierten (r = 0,997, Medianwerte der Doppelbestimmungen von 6 Probanden) wie Untrainierten (r = 0,997, Medianwerte der Doppelbestimmungen von 9 Probanden) linear zur Konzentration von Dihydroalprenolol. Die spezifische Bindung nimmt für den beobachteten Bereich von ungefähr 5000–35000 Zellen pro Liter, entsprechend ungefähr 450000–3 125 000 Zellen pro Filter bei Trainierten (r = 0,92, p < 0,01, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von 6 Probanden) und Untrainierten (r = 0,82, p < 0,01, Mittelwerte aus Doppelbestimmungen von 9 Probanden) linear mit der Zellzahl zu.

Diskussion

Anlaß zur Modifikation der Methode zur Isolierung von polymorphkernigen Leukocyten und der Bindungsstudie zur Charakterisierung β -adrenerger Rezeptoren an intakten Zellen, wie sie von Böyum (4) bzw. Dulis & Wilson (2) beschrieben wurden, war die Beobachtung, daß die gewonnenen Zellen sowohl in der Zellsuspension nach der Isolierung als auch im Inkubationsmedium (Hepes-Hank'sche Lösungen unterschiedlicher Modifikationen) erheblich zur Aggregation neigen. Diese Aggregation beeinflusst die Bindungsstudie in nicht voraussehbarer Weise und verfälscht die Ergebnisse. Die Isolierung der polymorphkernigen Leukocyten folgt weitgehend der von Böyum (4) beschriebenen Technik. Nach der Dichte-Gradienten-Zentrifugation wird die Sedimentation zur Trennung von Erythrocyten und polymorphkernigen Leukocyten jedoch in Plasmasteril® (1 Teil Zellsuspension, 1 Teil Plasmasteril®), durchgeführt, da sonst aus quantitativen Gründen eine weitere Blutentnahme zur Gewinnung von autologem, unverdünntem Plasma erforderlich geworden wäre. Nach der Sedimentation werden die separierten Leukocyten nicht in einer Pufferlösung, sondern dreimal im autologen Plasma (1:4 verdünnt mit physiol. NaCl-Lösung) gewaschen („Top“-Fraktion nach der Dichte-Gradienten-Zentrifugation). Nach diesem Vorgehen konnte weder makroskopisch noch lichtmikroskopisch eine Aggregatbildung von polymorphkernigen Leukocyten vor Beginn der Bindungsstudie mit Dihydroalprenolol festgestellt werden.

In Abänderung des von Dulis & Wilson (2) vorgeschlagenen Mediums („Hanks' balanced salt solution was prepared according to Grand Island Biological Co“) zur Inkubation der polymorphkernigen Leukocyten für die Bindungsstudie, wurden 200 μ l Zellsuspension in 2000 μ l autologem Plasma (1:4 mit physiol. NaCl verdünnt) inkubiert. Einerseits konnte dadurch die Bildung von Zellaggregationen verhindert werden, andererseits vermögen individuelle Bestandteile des Plasmas, welche die Bindungsstudie beeinflussen können, wirksam zu werden, d. h., das Inkubationsmilieu ist weitgehend individuellen physiologischen Bedingungen angenähert. Auf das lysosomotrophe Chloroquin zur Reduktion der unspezifischen Bindung von Dihydroalprenolol konnte in Übereinstimmung mit Dulis & Wilson (2) wie auch Bieger et al. (9) nicht verzichtet werden, da sonst die spezifische Bindung nur 0–20% der Gesamtbindung beträgt. Ein weiterer Unterschied gegenüber Dulis & Wilson (2) beruht darauf, daß zur Verdrängung von Dihydroalprenolol aus seiner spezifischen Bindung nicht Propranolol oder Katechola-

mine wie (–)Adrenalin, sondern (–)Timolol in Übereinstimmung mit Baer & Porzig (5) bzw. Porzig et al. (6) verwendet wurde. In der Konzentration von 10^{-6} mol/l an (–)Timolol darf eine stereospezifische, komplette Verdrängung von Dihydroalprenolol aus seiner spezifischen Rezeptorbindung an der intakten Zelle angenommen werden (6). Insgesamt ist die Güte der Studien mit davon abhängig, daß Äquilibrieren der Inkubationslösung, Inkubation und Filtriervorgang zeitlich exakt standardisiert werden.

Die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol an intakten polymorphkernigen Leukocyten zeigt in Übereinstimmung mit Dulis & Wilson (2), wie auch Bieger et al. (9) bei einer Dosis von ungefähr 2 nmol/l Dihydroalprenolol Sättigungsverhalten. Dies wird auch von Porzig et al. (6) für Ratten-Reticulo-cyten und Meurs et al. (3) für intakte menschliche Lymphocyten berichtet. Die Analyse nach Scatchard (8) ergibt für die untersuchte spezifische Bindung von Dihydroalprenolol an intakten polymorphkernigen Leukocyten einen linearen Verlauf (Abb. 2), der als Indikator einer homogenen Rezeptorpopulation gedeutet werden darf. Entsprechend dieser Analyse kann die maximale spezifische Bindung an Dihydroalprenolol für die Ausdauertrainierten mit 41,2 fmol/ 10^7 Zellen und für die nicht Ausdauertrainierten auf 21,6 fmol/ 10^7 Zellen berechnet werden. Hieraus ergibt sich eine β -Rezeptorenzahl von ungefähr 1300 pro Zelle (nicht Ausdauertrainierte) und 2500 pro Zelle (Ausdauertrainierte). Diese Resultate sprechen dafür, daß dynamisches körperliches Ausdauertraining ein mittelbarer Faktor zur Steigerung der β -Rezeptorenzahl an polymorphkernigen Leukocyten sein kann. Damit übereinstimmende Befunde wurden von Bieger et al. (9) berichtet. Eine unmittelbare Ursache zur Erhöhung der β -Rezeptordichte kann die trainingsabhängige Reduktion freier, zirkulierender Katecholamine sein (10–13), die vom Organismus auf zellulärer Ebene mit einer Gegenregulation beantwortet wird. An Membranpräparationen von Lymphocyten wurden entgegengesetzte, trainingsabhängige Befunde von Butler et al. (14) berichtet. Die Ursache dieser widersprüchlichen Resultate ist unklar; möglicherweise waren Trainingsdauer und Intensität ineffektiv oder die Lymphocytenfraktion oder aber Subpopulationen dieser Fraktion zeigen ein anderes Verhalten als polymorphkernige Leukocyten. Der Unterschied kann auch darauf beruhen, daß Butler et al. (14) im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, die Bindungsstudien an Membranpräparationen durchführten, die an sich über weniger spezifische Bindungsstellen verfügen als intakte Zellen (3).

An Hand der *Scatchard*-Analyse (Abb. 2) wurde die K_D zur 0,44 (Untrainierte) und 0,49 nmol/l Dihydroalprenolol (Trainierte) berechnet. Sie ist etwas höher als an Ratten-Retikulocyten für Dihydroalprenolol ermittelt (8, 14) und liegt in der gleichen Größenordnung wie von *Dulis & Wilson* (6) an polymorphkernigen Leukocyten bestimmt. *Dulis & Wilson* (2) fanden an menschlichen polymorphkernigen Leukocyten, allerdings nur bei 3–4 Probanden, eine β -Rezeptorendichte von ungefähr 1700 pro Zelle; an intakten menschlichen Lymphocyten werden von *Meurs et al.* (3) ungefähr 1500–1700 β -Rezeptoren pro Zelle beschrieben. In beiden Untersuchungen findet sich jedoch keine Definition der untersuchten Probanden, so daß direkte Vergleiche schwierig sind. Das mit der vorliegenden Untersuchung beobachtete Gesamtkollektiv weist ungefähr 1800 Rezeptoren pro Zelle, die Untrainierten ungefähr 1300 pro Zelle, die Trainierten 2500 pro Zelle auf. Diese Unterschiede weisen auf die Notwendigkeit einer genauen Definition der zu untersuchenden Probanden hin.

Dulis & Wilson (2) schlagen zur Hemmung der unspezifischen lysosomalen Aufnahme von Dihydroalprenolol durch intakte Zellen das lysosomotrope Chloroquin vor. In Anwesenheit von 50 μ mol/l Chloroquin beträgt die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol 70% bei einer Dosis von 0,36 nmol/l Dihydroalprenolol der Gesamtbindung und 29% bei 5,1 nmol/l Dihydroalprenolol. Eine statistische Untersuchung wird allerdings nicht vorgelegt. Dies trifft auch zu für die Studien von *Meurs et al.* (3), welche durch das ebenfalls lysosomotrope Phentolamin in Anwesenheit von Propranolol die unspezifische Bindung (oder Aufnahme) von Dihydroalprenolol durch intakte Lymphocyten von 75% auf 45% bei einer Konzentration von 1,6 nmol/l Dihydroalprenolol und 10^{-4} mol/l Phentolamin reduzieren können. Mit der vorliegenden Untersuchung

kann gezeigt werden, daß die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol in Anwesenheit von 50 μ mol/l Chloroquin im autologen Plasma als Inkubationsmedium bei einer Konzentration von 0,1 bis 0,5 nmol/l Dihydroalprenolol im Mittel (Median) über 80% und im Dosisbereich von 1,0 bis 2,0 nmol/l Dihydroalprenolol von 70% auf 50% abnimmt. Eine Ursache für die beobachtete, etwas höhere spezifische Bindung von Dihydroalprenolol gegenüber der in einer Pufferlösung (2, 3) beobachteten kann die Reinkubation der Leukocyten im autologen Plasma zur Durchführung der Bindungsstudie sein.

Die Frage der Übertragbarkeit der vorliegenden Resultate an peripheren Blutzellen auf Organe wie z. B. das Herz muß derzeit offen bleiben. Hierzu sind simultane Bestimmungen zu fordern. Immerhin scheint aber die Reduktion β -adrenerger Bindungsstellen an Myokardzellen von Patienten mit Ruherhertinsuffizienz um den Faktor 3–4 (15) in der gleichen Größenordnung zu liegen, wie an polymorphkernigen Leukocyten (16), was für die Vergleichbarkeit spricht.

Zusammenfassend darf gefolgert werden, daß Waschen und Reinkubieren der polymorphkernigen Leukocyten mit autologem Plasma die beobachtete Neigung zur Zell-Aggregation verhindert. In Anwesenheit von 50 μ mol/l Chloroquin kann die spezifische Bindung von Dihydroalprenolol an intakten polymorphkernigen Leukocyten dosisabhängig auf 50% bis 80% erhöht werden. Die Dichte an β -adrenergen Bindungsstellen kann durch dynamisches körperliches Ausdauertraining gesteigert werden. Ausdauertraining stellt einen physiologischen Faktor zur „up regulation“ der β -Rezeptorendichte an polymorphkernigen Leukocyten, somit der Empfindlichkeit gegenüber Katecholaminen auf zellulärer Ebene dar. Kenntnisse der Regulation der β -Rezeptoren können das Verständnis der Modulation der Aktivität des Sympathicus erweitern.

Literatur

- Motulsky, H. J. & Insel, P. A. (1982) *N. Engl. J. Med.* 307, 18–29.
- Dulis, B. H. & Wilson, I. B. (1980) *J. Biol. Chem.* 255, 1043–1048.
- Meurs, H., Van den Bogaard, W., Kauffman, H. F. & Bruynzeel, P. L. B. (1982) *Eur. J. Pharmacol.* 85, 185–194.
- Böyum, A. (1967) *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 97 (Suppl), 77–89.
- Baer, M. & Porzig, H. (1980) *FEBS Lett.* 111, 205–208.
- Porzig, H., Baer, M. & Chanton, C. (1981) *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 317, 286–293.
- Weder, J. H. & Bickel, M. H. (1970) *Z. Anal. Chem.* 252, 253–255.
- Scatchard, G. (1949) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 51, 660–672.
- Bieger, W., Zittel, R., Zappe, H. & Weicker, H. (1982) *Dtsch. Z. Sportmed.* 33, 249.
- Hartley, L. H., Mason, J. W., Hogan, R. P., Jones, L. G., Kotchen, T. A., Mougey, E. H., Wherry, F. E., Pennington, L. L. & Ricketts, X. Y. (1972) *J. Appl. Physiol.* 33, 602–606.
- Lehmann, M., Keul, J., Huber, G. & Da Prada, M. (1981) *Int. J. Sports Med.* 2, 143–147.
- Péronnet, F., Cléroux, J., Perrault, H., Cousineau, D., Champain, J. & Nadeau, R. (1981) *J. Appl. Physiol.* 51, 812–815.

13. Winder, W. W., Hickson, R. C., Hagberg, J. M., Ehsani, A. A. & McLane, J. A. (1979) *J. Appl. Physiol.* **46**, 766–771.
14. Butler, J., O'Brien, M., O'Malley, K. & Kelle, J. G. (1982) *Nature* **298**, 60–61.
15. Bristow, M. R., Ginsburg, R., Minobe, W., Cubicciotti, R. S., Sagemann, W. S., Lurie, K., Billingham, M., Harrison, D. C. & Stinton, E. B. (1982) *N. Engl. J. Med.* **307**, 205–211.
16. Lehmann, M., Rühle, K., Schmid, P., Klein, H., Matthys, K. & Keul, J. (1983) *Z. Kardiol.* **72**, 529–536.

Priv.-Doz. Dr. M. Lehmann
Med. Univ.-Klinik
Abt. Sport- u. Leistungsmedizin
Hugstetter Str. 55
D-7800 Freiburg

