

1. Medizinische Klinik und Poliklinik  
der Technischen Universität München  
Klinikum Rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. A. Schömig)

## Einfluß des intrazellulären pH auf den Präkonditionierungseffekt in sympathoadrenergen Zellen

Lorenz Bott-Flügel

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation: 1. Privatdozent Dr. M. Seyfarth  
2. Univ.-Prof. A. Kastrati  
3. Univ. Prof. Dr. J. Dudel, em. (Ludwigs-Maximilians-  
Universität, München)

Die Dissertation wurde am 09.01.2001 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 13.06.2001 angenommen.

<b>1. Einleitung</b> .....	4
<b>2. Material und Methoden</b> .....	7
2.1 Zelllinie und Versuchsvorbereitung.....	7
2.2 Inkubation.....	7
2.3 Versuchsaufbau.....	8
2.3.1 pH-Regulation.....	8
2.3.2 Anoxieversuche.....	9
2.4 Ermittlung des $pH_i$ .....	10
2.5 Bestimmung der intrazellulären Pufferkapazität und des Netto- Protonenflusses.....	10
2.6 Verwendete Lösungen und Pharmaka.....	14
<b>3. Ergebnisse</b> .....	17
3.1 Regulation des $pH_i$ in PC12-Zellen.....	17
3.1.1 Verlauf des intrazellulären $pH_i$ nach Prepulse.....	17
3.1.2 Protonenfluß nach intrazellulärer Azidose.....	25
3.2 Anoxieexperimente in PC12-Zellen.....	28
3.2.1 pH-Verlauf während Anoxie.....	28
3.2.2 Einfluß der Präkonditionierung auf den $pH_i$ -Verlauf während Anoxie.....	31
3.2.3 Einfluß von intrazellulärer und extrazellulärer Azidose.....	33

<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	36
4.1	Pathophysiologische Veränderungen während einer Myokardischämie ..	36
4.2	Bedeutung der ischämische Präkonditionierung im Myokard.....	39
4.3	Präkonditionierung neuronaler Zellen.....	40
4.4	Einfluß der anoxischen Präkonditionierung auf den intrazellulären pH <sub>i</sub> ...	43
4.5	Präkonditionierung in neuronalen Zellen.....	45
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	50
<b>6.</b>	<b>Verwendete Abkürzungen</b> .....	52
<b>7.</b>	<b>Literatur</b> .....	53
<b>8.</b>	<b>Eigene Veröffentlichungen</b> .....	62

## 1. Einleitung

Während eines Myokardinfarkts kommt es nach ungefähr 15 Minuten zu einer exzessiven Freisetzung von Noradrenalin aus den synaptischen Endigungen der sympathoadrenergen Neurone im Myokard. Diese Freisetzung erfolgt nicht exozytotisch, sondern über den Ausstrom von Noradrenalin und Natrium über ein Carriermolekül, den sogenannten „uptake1“-Carrier. (Schömig et al. 1984).

Die hohen interstitiellen Konzentrationen von Noradrenalin werden für eine Reihe deletärer Effekte am infarzierten Myokard verantwortlich gemacht. So glaubt man, daß die erhöhte Neigung infarzierten Myokards zu kardialen Arrhythmien auf die starke Stimulation durch die freigesetzten Katecholamine zurückzuführen ist. Durch die Aktivierung von  $Ca^{2+}$ -Kanälen an Myozyten wird der ischämische Schaden zusätzlich verstärkt (Schömig et al. 1991).

1986 wurde von Murry und Mitarbeitern der Effekt der ischämischen Präkonditionierung beschrieben (Murry et al. 1986). Mehrere kurze ischämische Episoden vor einer langen Zielischämie wirkten sich protektiv auf das Myokard aus. Dieser Effekt konnte seitdem an einer Vielzahl von Geweben und Zelltypen gezeigt werden, z. B. an Hund, Kaninchen, Ratte und zum Teil auch beim Menschen (Murry et al. 1986, Liu H et al. 1998, Yellon et al. 1992, Yellon et al. 1993). So führt der repetitive Energiemangel zur Aktivierung zahlreicher zellulärer „second-messenger“-Systeme, nukleärer Transkriptionsfaktoren und Proteinkinasen. Weiterhin kommt es zu einer Verbesserung der funktionellen Parameter in der Reperfusionsphase. Die während einer Myokardischämie auftretenden Elektrolyt- und Säure-Base-Verschiebungen fallen in präkonditionierten Herzen deutlich milder aus als in Herzen

ohne diese Vorbehandlung. Es konnte an isoliert perfundierten Rattenherzen gezeigt werden, daß der intrazelluläre pH ( $\text{pH}_i$ ) während der Ischämie langsamer abfällt, sich aber auch deutlich langsamer wieder erholt, wenn diese Herzen zuvor präkonditioniert worden waren (Asimakis et al. 1992). Eine schnelle Erholung des  $\text{pH}_i$  nach Ischämie wird für einige der Reperfusionsschäden verantwortlich gemacht, wie zum Beispiel die Überladung der Zellen mit Calcium (Steenbergen et al. 1990).

Aufgrund der veränderten Kinetik des intrazellulären pH in präkonditionierten Herzen vermutet man eine Beteiligung der protonenregulierenden Systeme am Präkonditionierungseffekt. Unter diesen Systemen nehmen der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) sowie der Natrium-Bikarbonat-Symport eine herausragende Stellung ein. Zahlreiche Studien, die den Einfluß dieser pH-Regulatoren auf den Präkonditionierungseffekt untersuchten, ergaben widersprüchliche Resultate. Der Zusammenhang zwischen Präkonditionierung und NHE-Aktivierung konnte von einigen Gruppen gezeigt werden, von anderen wurde er verworfen (Ramasamy et al. 1995, Shipolini et al. 1997). Die Rolle des Natrium-Bikarbonat-Symports ist ebenfalls noch nicht geklärt.

Während einer Ischämie kommt es durch das Sistieren der ATP-Produktion zum Umschalten auf die anaerobe Glykolyse, wodurch der  $\text{pH}_i$  innerhalb der ersten Minuten stark abfällt. Dies wiederum aktiviert die pH-regulierenden Systeme, vor allem den NHE, der Protonen im Austausch mit Natriumionen aus der Zelle befördert. Nach wenigen Minuten kommt aber auch dieser Transporter wegen der nun einsetzenden extrazellulären Protonen-Akkumulation und der damit zusammenhängenden Verminderung des treibenden Gradienten zum Erliegen. Es folgt eine Phase, in der der  $\text{pH}_i$  ein Äquilibrium erreicht, das bis zum Wiedereinsetzen der Perfusion keine große Veränderung mehr erfährt.

Nach Beginn der Reperfusion und damit der Wiederentstehung des pH-Gradienten über die Zellmembran nehmen die Protonenregulatoren ihre Tätigkeit auf, was auf Kosten der Akkumulation von Natrium zu einer schnellen Erholung des  $pH_i$  führt. Dieses wiederum wird über den Natrium-Calcium-Austauscher aus der Zelle entfernt, was neben den ischämisch entstandenen Membranschäden zu einer Überladung der Zelle mit Calcium führt.

In neuronalen Zellen des Herzens führen diese pathophysiologischen Veränderungen zu einem Zusammenbrechen der Speicherkapazität der Vesikel und einem nachfolgenden Freisetzen von Katecholaminen in das Zytoplasma. Zusammen mit der erhöhten intrazellulären Natriumkonzentration kommt es zum Efflux von Noradrenalin und Natrium im Kotransport über den "uptake-1"-Carrier. Auch für diese Endgröße konnte gezeigt werden, daß ischämische Präkonditionierung einen protektiven Einfluß hat (Seyfarth et al. 1996).

Allerdings ist wenig bekannt über den Mechanismus der Präkonditionierung an sympathoadrenergen Terminalen, den an der Noradrenalinausschüttung verantwortlichen Strukturen. Während der Einfluß der pH-Regulation und des transmembranären pH-Gradienten während einer Ischämie in Myozyten belegt ist, fehlen vergleichbare Daten über die neuronale Population des Herzens.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war deshalb:

- 1.) die Charakterisierung der pH-Regulationsmechanismen an sympathoadrenergen Zellen
- 2.) Charakterisierung des  $pH_i$ -Verlaufs in sympathoadrenergen Neuronen während Ischämie, Präkonditionierung oder intrazellulärer Azidose

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Zelllinie und Versuchsvorbereitung

Es wurden immortalisierte Phäochromozytomzellen der Ratte verwendet (PC12-Zellen), die für die Versuche mittels Trypsin-EDTA aus ihren Kulturflaschen gelöst, in neuem Medium gewaschen und anschließend in Kulturschälchen mit einem 4 cm-großen Glasslip gegeben wurden. Die Glasslips waren zur besseren Adhäsion der Zellen mit 10 µl CellTak (Collaborative Biomedical Products, Bedford, USA) beschichtet. Die Zellen wurden nun weitere 3 Tage bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub>/90% O<sub>2</sub> bebrütet.

### 2.2 Inkubation

Am Versuchstag wurden die Zellen dreimal mit Versuchspuffer gewaschen (Zusammensetzung Abschnitt 2.6). Anschließend wurden sie mit 4 ml des Versuchspuffers und 20 µl 2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein acetoxymethylester (BCECF-AM, Molecular Probes, USA) für 5 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen weitere dreimal mit Versuchspuffer gewaschen und anschließend lichtgeschützt bis zum Beginn des Experiments aufbewahrt.

## 2.3 Versuchsaufbau

Die Zellen wurden mit dem Glasslip in eine Perfusionskammer eingespannt, auf 36°C erwärmt und mit 1 ml/min superfundiert. Die Perfusionskammer ihrerseits befand sich auf einem Axiovert 500-Mikroskop (Zeiss, Jena). Mittels einer Quecksilberdampflampe und entsprechender Exzitationsfilter wurde monochromatisches Licht der Wellenlängen 434 nm und 488 nm erzeugt und auf die Zellen gelenkt. Ein Neutraldichtefilter reduzierte dabei die auftreffende Strahlungsleistung um 97%. Das von den Zellen emittierte Licht wurde bei 529 nm von einer Kamera eingefangen und digital auf einem Windows-PC mittels des Programms Attofluor (AttoSystems, USA) dargestellt. Zur Optimierung des Signals wurde der Quotient aus den Werten der pH-sensitiven und pH-unabhängigen Wellenlängen errechnet:  $\text{Ratio} = I_{488\text{nm}} / I_{434\text{nm}}$ .

Nach dem Einspannen der Zellen wurden visuell geeignet erscheinende Zellkluster herausgesucht und als Regions of Interest (ROIs) festgelegt. Es folgte eine Äquilibrierungszeit von 15-20 Minuten.

### 2.3.1 Versuche zur Ermittlung der pH-Regulation in PC12-Zellen

Die Zellen wurden nach der Äquilibrierung für 5 Minuten mit 10 mM NH<sub>4</sub>Cl perfundiert, anschließend mit dem entsprechenden NH<sub>4</sub>Cl-freien Versuchspuffer reperfundiert. Die Reperfusionspuffer bestanden entweder aus normalem Versuchspuffer mit oder ohne HOE 694 ((3-methylsulphonyl-4-piperidinobenzoyl)guanidine methanesulphonate), 10<sup>-5</sup> M), Na<sup>+</sup>-freiem Puffer, HEPES-Puffer oder HEPES-Puffer mit HOE 694 (10<sup>-5</sup> M).



### 2.3.2 Anoxieversuche

Zur Induktion eines Energiemangels in den Zellen und Simulation einer Ischämie im Myokard wurden die Zellen glucosefrei perfundiert und zusätzlich die Glykolyse mittels 0,1 mmol/l Iodoacetat geblockt. Durch Zugabe von 1 mmol/l Natrium-Dithionit wurde der Sauerstoff aus dem Perfusionsmedium vollständig entfernt und in der Perfusionskammer die Sauerstoffatmosphäre gegen Stickstoff ausgetauscht. Messungen des  $\text{pH}_i$  erfolgten in Intervallen von 20 Sekunden.

a) Anoxiegruppe: Die Zellen wurden nach der Äquilibrierung weitere 10 Minuten mit Kontrollpuffer perfundiert. Anschließend erfolgte der schnelle Austausch gegen den Anoxiepuffer (s.o.). Nach 20 Minuten Anoxie wurde mit Kontrollpuffer reperfundiert und der pH-Verlauf eine weitere halbe Stunde beobachtet.

b) Präkonditionierungsgruppe: In dieser Gruppe wurden die Zellen vor dem eigentlichen Energiemangel jeweils dreimal 5 Minuten mit anoxischem Medium perfundiert und anschließend mit normalem Puffer reperfundiert.

c) Präkonditionierung mit Azidosezwischenperfusion: Wie in der Präkonditionierungsgruppe wurden die Zellen mit dreimal 5-minütigen Anoxieintervallen präkonditioniert. In den Erholungsphasen wurde zur Reperfusion ein azidotischer Puffer verwendet. Nach dem letzten Präkonditionierungsintervall wurde weitere 5 Minuten mit dem Azidosepuffer

perfundiert und anschließend 5 Minuten vor Einleiten der Zielischämie ein Kontrollpuffer benutzt.

d) Prepulsegruppe: Im Anschluß an die Äquilibration wurden die Zellen je dreimal 5 Minuten mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  perfundiert und 5 Minuten mit normalem Puffer reperfundiert. Nach dem letzten Prepulse wurden die Zellen 10 Minuten bis zum Beginn der simulierten Ischämie mit Kontrollpuffer weiterperfundiert.

#### 2.4 Ermittlung des $\text{pH}_i$

In regelmäßigen Abständen wurden Kalibrationsexperimente zur Bestimmung einer Eichgeraden durchgeführt, mit deren Hilfe die Emissionsdaten in  $\text{pH}$ -Werte übertragen werden konnten. Hierzu wurden die Zellen zunächst wie oben beschrieben inkubiert. Anschließend wurde der Kontrollpuffer gegen einen Kalibrationspuffer ausgetauscht und  $I_{488\text{nm}}/I_{434\text{nm}}$  nach einer Äquilibrationszeit von 5 Minuten über weitere 10 Minuten gemessen. Hierauf wurde der Kalibrationspuffer zur jeweils nächsten  $\text{pH}$ -Stufe gewechselt.  $I_{488\text{nm}}/I_{434\text{nm}}$  wurde bei  $\text{pH}_o$ -Werten von 6.5, 7.0 und 7.5 bestimmt.

#### 2.5 Bestimmung der intrazellulären Pufferkapazität und des Netto-Protonenflusses

Zur Bestimmung der sogenannten intrinsischen, nicht- $\text{CO}_2$ -abhängigen Pufferkapazität wurden PC12-Zellen einem  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Prepulse ausgesetzt, unter gleichzeitiger Blockade aller  $\text{pH}$ -regulierender Systeme. Hierzu wurde der Natrium-

Protonen-Exchanger mit  $10^{-5}$  M HOE694 und die  $\text{HCO}_3^-$ -abhängigen Prozesse durch  $1,5 \cdot 10^{-4}$  M DIDS inhibiert. Schrittweise wurde nun die  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentration von 30 mM auf 20, 10, 5, 2, 1 und 0 mM reduziert. Die hieraus resultierenden pH-Abfälle wurden nach Stabilisierung aufgezeichnet (Abbildung 1).

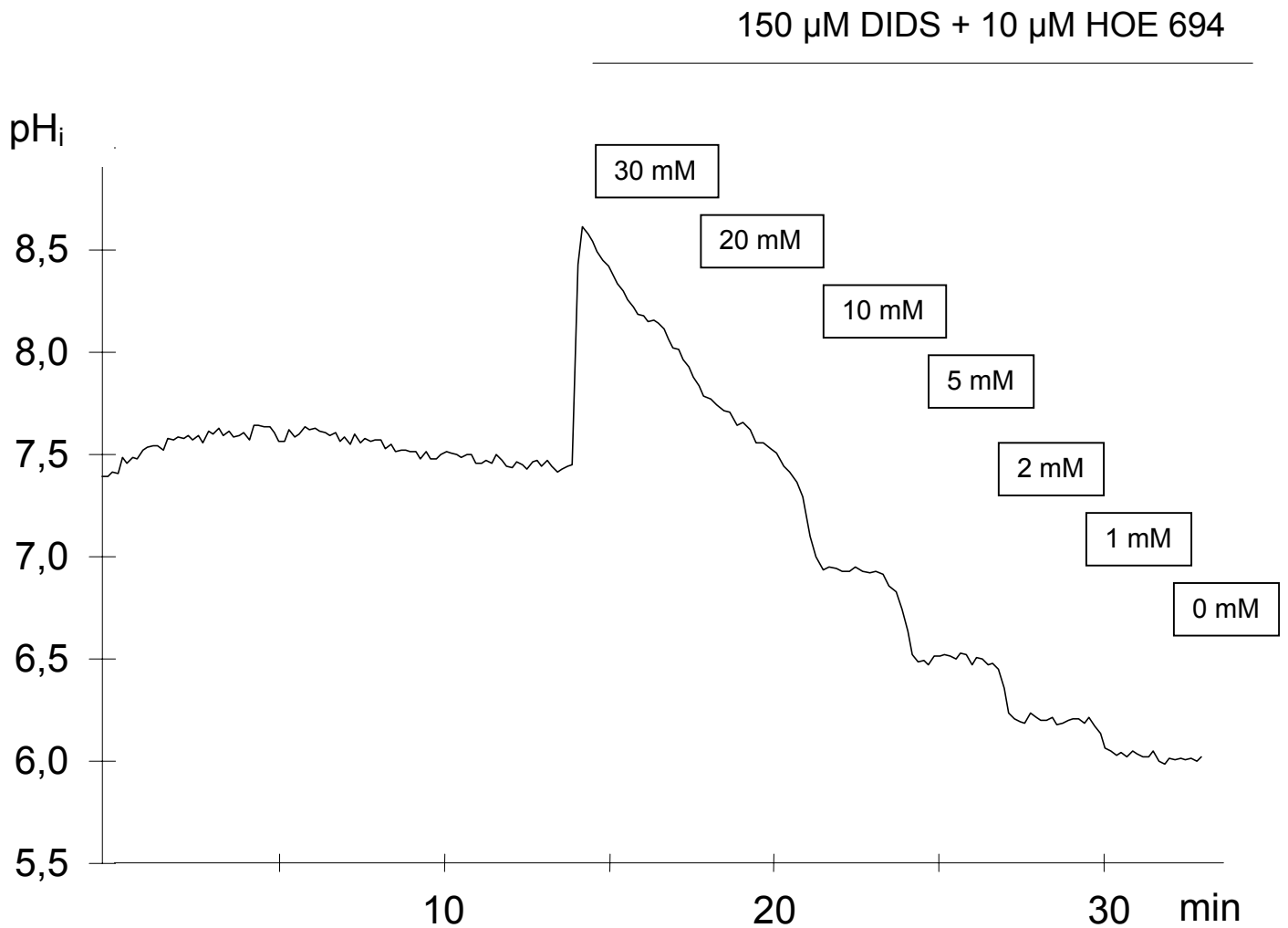


Abbildung 1:

Intrazellulärer pH-Verlauf während  $\text{NH}_4^+$ -Prepulse mit abnehmenden  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentrationen zur Bestimmung der intrazellulären Pufferkapazität.

Originalmeßdaten.

Der Protonenfluss über die Membran wurde nach folgender Gleichung ermittelt:

$$(1) \quad J_{H^+} = \beta_{\text{tot}} \cdot dpH/dt \quad (\text{Lagadic-Gossmann et al. 1992})$$

wobei  $\beta_{\text{tot}}$  die totale Pufferkapazität und  $dpH/dt$  die Erholungsrate bei den gegebenen pH-Werten ist.

Die totale Pufferkapazität einer Zelle setzt sich aus der intrinsischen und der durch andere Puffersysteme vermittelten Pufferkapazität zusammen – vornehmlich  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ .

$$(2) \quad \beta_{\text{tot}} = \beta_i + \beta_{\text{CO}_2}, \text{ wobei } \beta_{\text{CO}_2} \text{ sich folgendermaßen berechnet}$$

$$(3) \quad \beta_{\text{CO}_2} = 2,3 \cdot [\text{HCO}_3^-]_i \quad (\text{Dart et al. 1992})$$

Die intrazelluläre Bikarbonat-Konzentration kann nach einer Umformung der Henderson-Hasselbalch-Gleichung aus den experimentell gewonnenen pH-Werten und der bekannten Bikarbonat-Konzentration nach Äquilibrierung errechnet werden,

$$(4) \quad [\text{HCO}_3^-]_i = [\text{HCO}_3^-]_o / 10^{\text{pH}_o - \text{pH}_i} \quad (\text{Lagadic-Gossmann et al. 1992})$$

vorausgesetzt, daß für  $\text{CO}_2$  ein offenes System vorliegt und sowohl die Löslichkeitsprodukte als auch der pK auf beiden Seiten der Zellmembran identisch sind.

Nach jedem Wechsel der  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Konzentration dissoziiert ein Teil des intrazellulär akkumulierten  $\text{NH}_4^+$  in  $\text{NH}_3$  und ein Proton. Aus der Kenntnis der intrazellulären  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration kann nun die Menge an freigesetzten Protonen ermittelt werden, die zu dem beobachteten  $\text{pH}_i$ -Abfall führten.

Die intrinsische Pufferkapazität wird nun experimentell aus folgender Beziehung ermittelt:

$$(5) \quad \beta_i = H^+\text{-Fluss} / \Delta\text{pH} \quad (\text{Wu et al. 1994})$$

Da wie oben erwähnt für jedes dissoziierte  $\text{NH}_4^+$ -Molekül äquimolar ein Proton entsteht, kann man also vereinfachend sagen:

$$(6) \quad \beta_i = \Delta[\text{NH}_4^+]_i / \Delta\text{pH} \quad (\text{Wu et al. 1994})$$

Wie von anderen bereits gezeigt, ist  $\beta_i$  stark abhängig vom aktuellen  $\text{pH}_i$ . Daher wurden die  $\beta_i$ -Werte für jede pH-Stufe grafisch aufgetragen und folgende Gleichung ermittelt (Abbildung 2):

$$(7) \quad \beta_i = -29,0 \cdot \text{pH}_i + 226,7 \quad (\text{Korrelationskoeffizient } R^2=0,97)$$

Vergleichbare Werte in der Literatur existieren nur für myozytäres Gewebe, nicht für Neuronen.

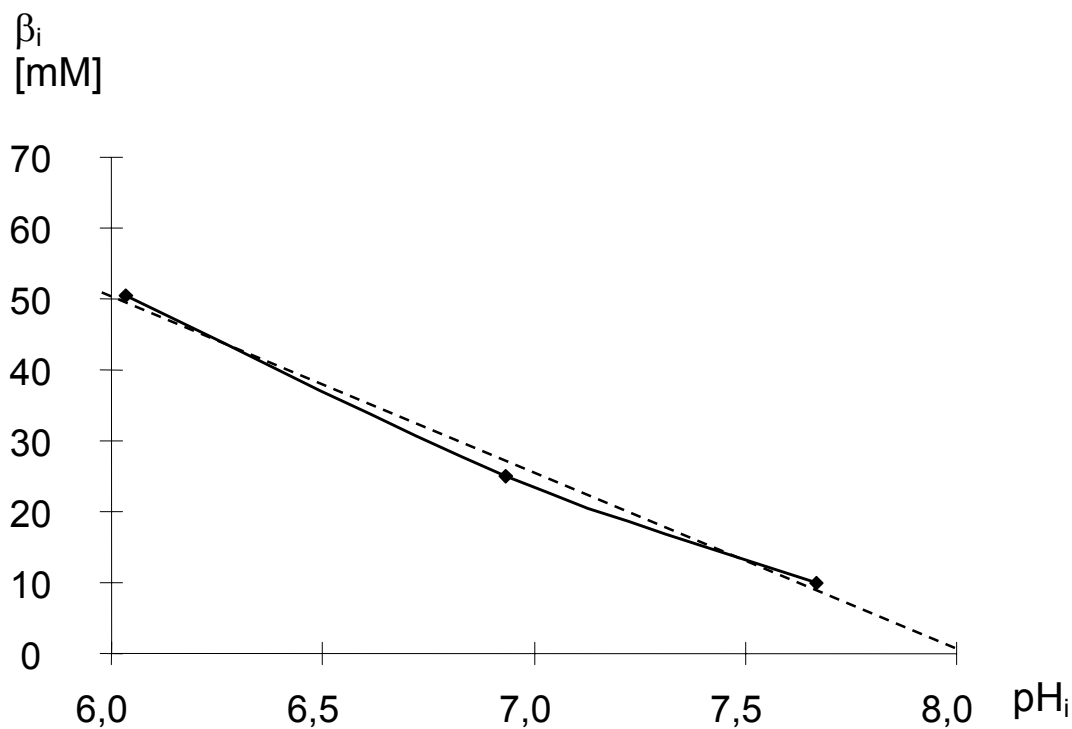


Abbildung 2:

Einfluß des intrazellulären pH auf die intrinsische Pufferkapazität.

Dargestellt sind 3 Werte (ermittelt aus dem Experiment in Abbildung 2) mit eingezeichneter Ausgleichsgeraden.

## 2.6 Statistische Auswertung

Zur Analyse der Daten wurde das Programm Excel97 (Microsoft) verwendet, für die statistische Auswertung die Programme Statview und Origin. Alle dargestellten Werte sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwerts angegeben. Zum statistischen Vergleich wurde der ANOVA-Test verwendet mit Fischer- und Bonferroni-Test als post-hoc-Analyse. Testergebnisse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  wurden als statistisch signifikant betrachtet.

## 2.7 Verwendete Lösungen und Pharmaka

Kontrollpuffer (in mmol/l):	NaCl	120
	NaHCO <sub>3</sub>	16
	KCl	5.4
	CaCl <sub>2</sub>	1.8
	MgCl <sub>2</sub>	0.5
	Glucose	10
	pH auf 7.4 kalibriert mit NaOH	

Anoxiepuffer (in mmol/l):	wie Kontrollpuffer	
	außer Glucose	0

HEPES-Puffer (in mmol/l):	NaCl	137
	KCl	5,4
	CaCl <sub>2</sub>	1.8
	MgCl <sub>2</sub>	0.5
	HEPES	10
	Glucose	10
	zur Elimination von CO <sub>2</sub> mit	

100% O<sub>2</sub> begast

Natriumfreier Kontrollpuffer (in mmol/l):

Cholinchlorid	137
KCl	5.4
CaCl <sub>2</sub>	1.8
MgCl <sub>2</sub>	0.5
Glucose	10

mit CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Gemisch begast (95%/5%)  
pH justiert auf 7.4 mit KOH

Kalibrationspuffer (in mmol/l):

KCl	120
CaCl <sub>2</sub>	1.8
MgCl <sub>2</sub>	1
HEPES	10
Cholinchlorid	40
Nigericin	10 µmol/l

mit KOH auf pH 7.5, 7.0 und 6.5  
justiert

Verwendete Pharmaka: BCECF-AM und Nigericin (Molecular Probes, USA), Natrium-Dithionit, Iodoacetat, DIDS, SITS (Sigma, München), HOE 694 (Hoechst AG, Frankfurt).

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Regulation des $pH_i$ in PC12-Zellen

##### 3.1.1 Verlauf des intrazellulären pH nach Prepulse

Zur Erzeugung einer intrazellulären Azidose wurden die Zellen 5 Minuten lang mit  $NH_4Cl$ -Lösung superfundiert. Dabei stieg der intrazelluläre pH von einem Ruhewert von  $7.50 \pm 0.01$  auf alkalische Werte (Kontrolle  $8.02 \pm 0.04$ , HOE  $7.82 \pm 0.02$ , Natriumfrei  $7.87 \pm 0.03$ , HEPES  $8.13 \pm 0.02$ , HEPES + HOE  $7.82 \pm 0.02$ ; Abbildung 3). Um den Einfluß der verschiedenen pH-regulierenden Systeme zu untersuchen, wurden einzelne Transporter inhibiert und hierunter die Geschwindigkeit der Erholung nach intrazellulärer Azidose beobachtet.

Unmittelbar nach Entfernen des  $NH_4Cl$  aus der Superfusionslösung kam es in der Kontrollgruppe zu einem schnellen und anhaltenden Abfall des  $pH_i$  um 1,69 pH-Einheiten, die minimalen Werte betragen  $6,61 \pm 0,04$ .

Der niedrigste pH-Wert war nach 4 Minuten erreicht. Im Anschluß an dieses Minimum erholten sich die pH-Werte vollständig. 10 Minuten nach Beginn der Azidose betrug der  $pH_i$   $7,2 \pm 0,04$ , nach 15 Minuten  $7,32 \pm 0,07$ . Nach 20 Minuten wurden wieder präazidotischen Werte erreicht (Abbildung 3). Die maximale Erholung nach 20 Minuten Reperfusion betrug  $1,04 \pm 0,05$  pH-Einheiten (Abbildung 5).



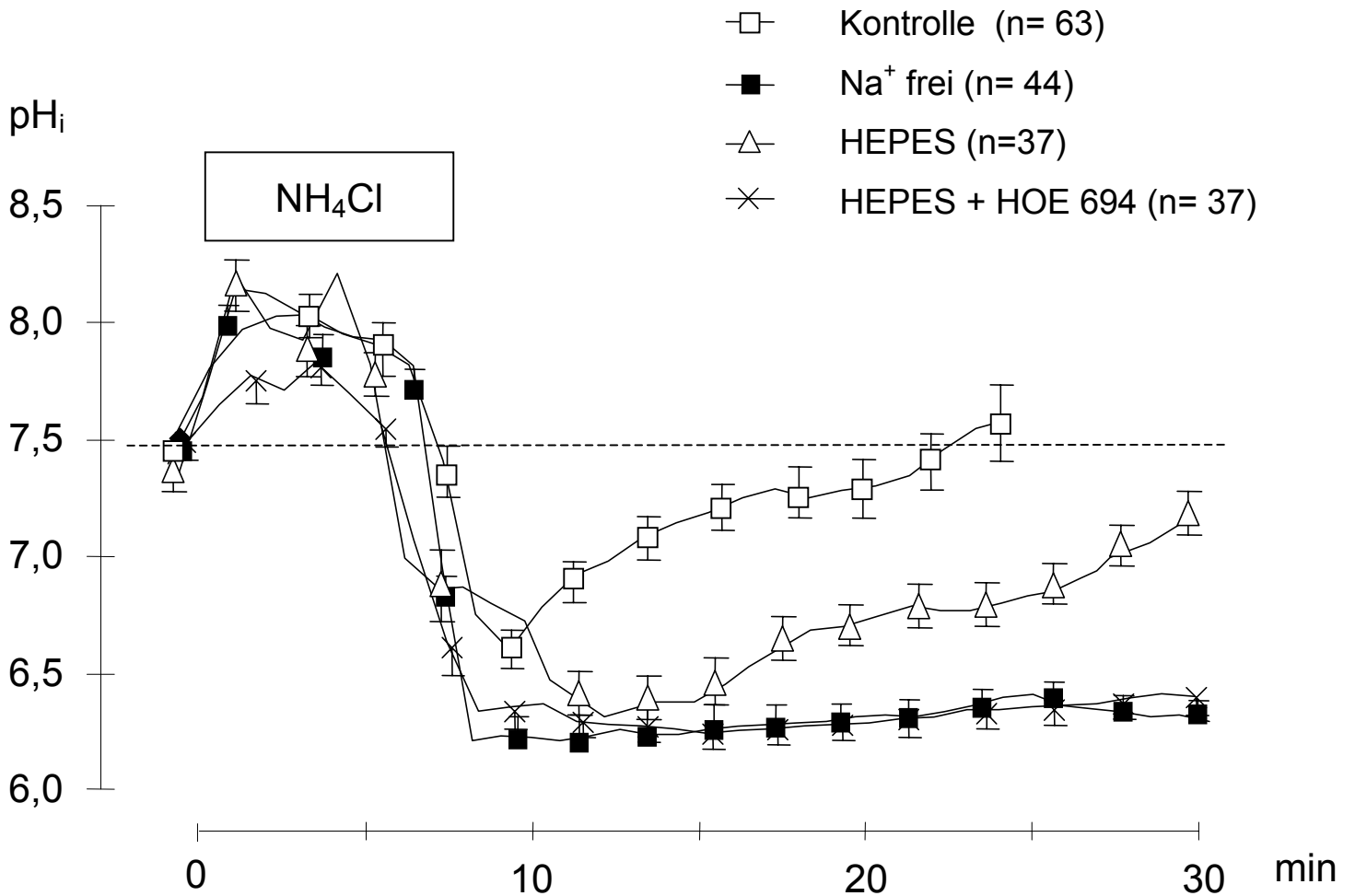


Abbildung 3:

Erholung des intrazellulären pH nach einem Prepulse mit 10 mM NH<sub>4</sub>Cl über 5 Minuten gefolgt von Reperfusion mit Kontrollpuffer, HEPES-Puffer, HEPES-Puffer + HOE 694 10<sup>-5</sup> M oder natriumfreiem Puffer.

Mittelwerte ± SEM.

Die Geschwindigkeit der pH-Erholung in der Kontrollgruppe betrug unmittelbar nach Erreichen des Minimums  $0,15 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$  und sank im weiteren Verlauf der Erholung auf  $0,04 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$  (Abbildung 4).

Wurde der Natrium-Protonen-Exchanger mit HOE 694 geblockt, so erholten sich die Zellen signifikant langsamer von einer intrazellulären Azidose. Zudem fiel der  $\text{pH}_i$  auf deutlich niedrigere Werte,  $5,69 \pm 0,08$ . Nach 10 Minuten betrug der pH in dieser Gruppe  $6,13 \pm 0,07$ , nach 20 Minuten  $6,74 \pm 0,06$  und nach weiteren 5 Minuten  $6,77 \pm 0,05$ . Auch nach 30 Minuten waren die Ausgangswerte noch nicht wieder erreicht, sondern nur eine Erholung auf ca. 60% der Kontrollgruppe erfolgt.

Die Geschwindigkeit der Erholung in dieser Gruppe war gegenüber der Kontrollgruppe um die Hälfte vermindert,  $0,08 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\Delta\text{min}$  (Abbildung 4).

Die Erholung war insgesamt aber nur verzögert, die absolute pH-Differenz zwischen Minimum und maximaler Erholung erreichte Kontrollwerte, nämlich  $1,08 \pm 0,05$  pH-Einheiten (Abbildung 5).

In nominell Bikarbonat-freiem Puffer wird vor allem die Funktion des  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Cotransports beeinträchtigt. Durch Ersetzen des Bikarbonats durch HEPES und Begasung mit reinem Sauerstoff wird der Anteil gelösten Kohlendioxids auf unter 0,001% gedrückt. Die endogene  $\text{HCO}_3^-$ -Produktion der Zelle wird hierdurch allerdings nicht beeinflusst.

In der HEPES-Gruppe fiel der  $\text{pH}_i$  ähnlich wie in den anderen Gruppen schnell auf azide Werte ab. Der kleinste Wert betrug  $6,45 \pm 0,02$  und wurde, wie in der Kontrollgruppe, nach durchschnittlich 4 Minuten erreicht. Die danach einsetzende Erholung verlief langsamer als in der Kontrollgruppe.

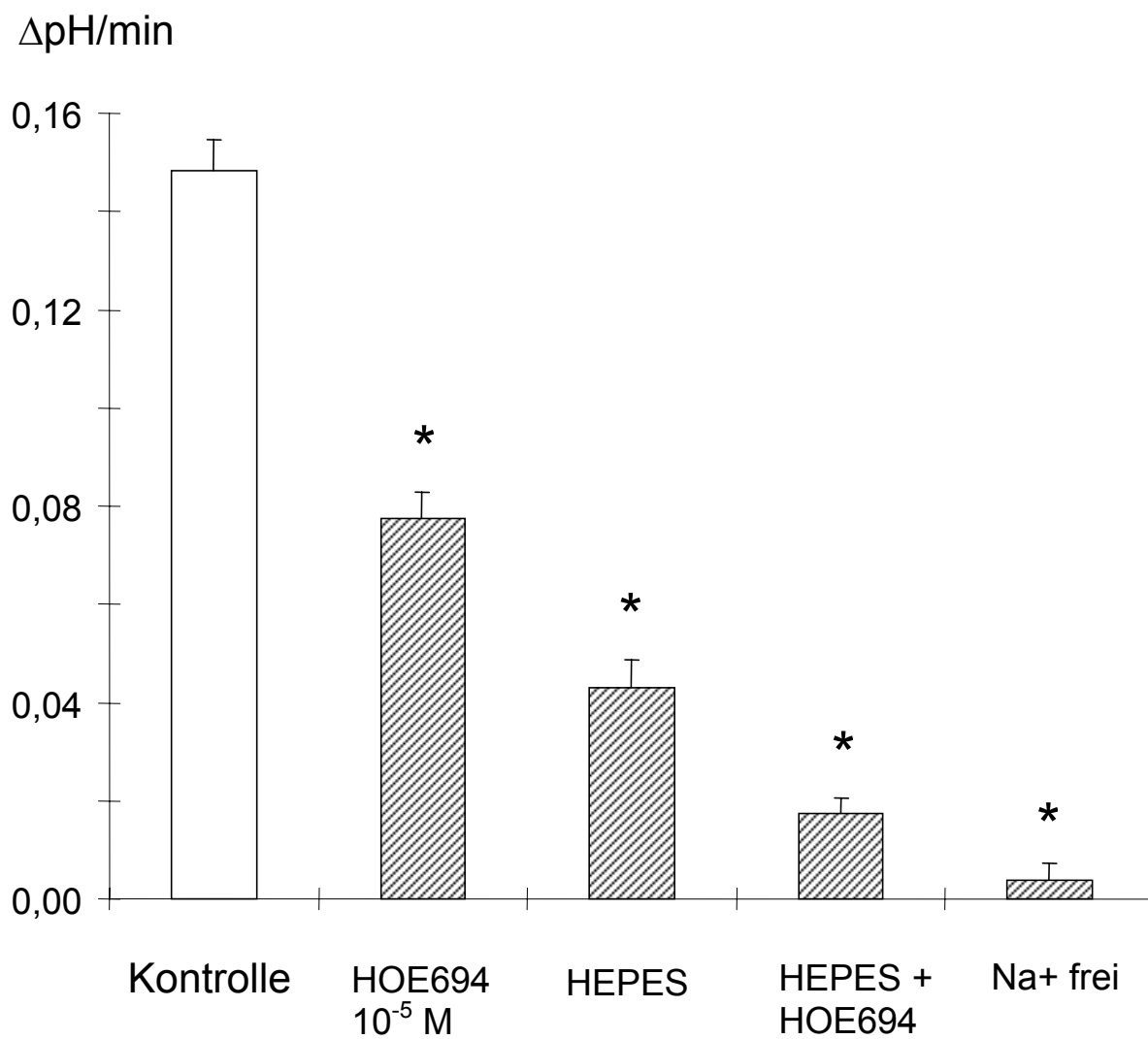


Abbildung 4:

Maximale Geschwindigkeit der pH-Erholung nach intrazellulärer Azidose induziert durch 5 Minuten  $\text{NH}_4\text{Cl}$  10 mM.

\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

10 Minuten nach Einleitung der intrazellulären Azidose betrug der pH  $6,85 \pm 0,04$ , nach 15 Minuten  $7,01 \pm 0,05$  und nach 20 Minuten  $7,10 \pm 0,05$ . Auch in dieser Gruppe wurde im Rahmen des Experiments keine vollständige Erholung des  $\text{pH}_i$  beobachtet. Die Erholung betrug nur 60% des Ausgangswertes (Abbildung 3).

Die Geschwindigkeit der Erholung erreichte in den ersten 5 Minuten nach Erreichen des Minimums  $0,04 \pm 0,006 \Delta\text{pH}/\text{min}$ , in den darauffolgenden 5 Minuten  $0,05 \pm 0,003 \Delta\text{pH}/\text{min}$  (Abbildung 4).

Auch die maximale Erholung nach 20 Minuten fiel niedriger aus als in der Kontrollgruppe,  $0,63 \pm 0,03$  (Abbildung 5).

Bei Perfusion mit natriumfreier Lösung werden die beiden wichtigsten pH-regulierenden Systeme, der  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Exchanger und der  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3\text{-Cotransport}$ , inhibiert.

In dieser Gruppe erreichten die Zellen einen ähnlichen minimalen  $\text{pH}_i$  wie in der Kontrollgruppe,  $6,32 \pm 0,04$ . Im Gegensatz zu den anderen Gruppen erholte sich der  $\text{pH}_i$  aber nur noch marginal von dieser aziden Beladung. 10 Minuten nach Beginn der Azidose betrug der  $\text{pH}_i$   $6,34 \pm 0,04$ , nach weiteren 10 Minuten  $6,46 \pm 0,03$  und nach insgesamt 25 Minuten  $6,37 \pm 0,03$  (Abbildung 3).

Die Erholungsgeschwindigkeit der natriumfrei perfundierten Gruppe betrug 5 Minuten nach Erreichen des minimalen  $\text{pH}_i$  nur  $0,004 \pm 0,003 \Delta\text{pH}/\text{min}$ , und somit nur 3% der Kontrollgruppe. Nach 10 Minuten war die Rate leicht angestiegen, auf  $0,01 \pm 0,003$  bzw. 7% (Abbildung 4).

Der  $\text{pH}_i$  erreichte in dieser Phase nur 5% seines Ausgangswertes bzw. stieg nur um  $0,05 \pm 0,03$  vom wieder an (Abbildung 5).

Nach Umstellen der Perfusionslösung auf einen Puffer mit Natrium, setzte eine schnelle und nachhaltige Erholung des intrazellulären pH ein.

Bereits 5 Minuten nach Reperfusion mit natriumhaltigem Puffer betrug der  $\text{pH}_i$   $7,03 \pm 0,03$ , nach 10 Minuten  $7,17 \pm 0,03$  (Abbildung 6).

Analog reagierte die Erholungsgeschwindigkeit, die nach der Reperfusion mit natriumhaltigem Puffer Kontrollwerte erreichte,  $0,10 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$ .

Der  $\text{pH}_i$  erreichte nach Reperfusion innerhalb von 10 Minuten 75% des Ausgangswertes bzw. stieg um  $0,38 \pm 0,03$  pH-Einheiten während der ersten 10 Minuten Reperfusion an.

Sehr ähnlich verhielt sich die Gruppe der mit HEPES und HOE 694 behandelten Zellen. In diesen kam es durch die nominell bikarbonatfreie Perfusion und Blockade des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Exchanger zu einer kompletten Inhibition der pH-regulierenden Systeme. Nach Einleitung der Azidose fiel der  $\text{pH}_i$  in dieser Gruppe auf  $6,20 \pm 0,04$  und erholte sich in den nächsten 20 Minuten nur minimal auf  $6,44 \pm 0,04$  (Abbildung 3).

Die Erholungsrate betrug während der ganzen Dauer des Versuchs  $0,02 \pm 0,001 \Delta\text{pH}/\text{min}$  bzw. 13% der Kontrollgruppe (Abbildung 4).

Der  $\text{pH}_i$  erreichte im Rahmen des Versuchs nur 19% des Ausgangswertes bzw. erholte sich nur um  $0,43 \pm 0,04$  pH-Einheiten (Abbildung 5).

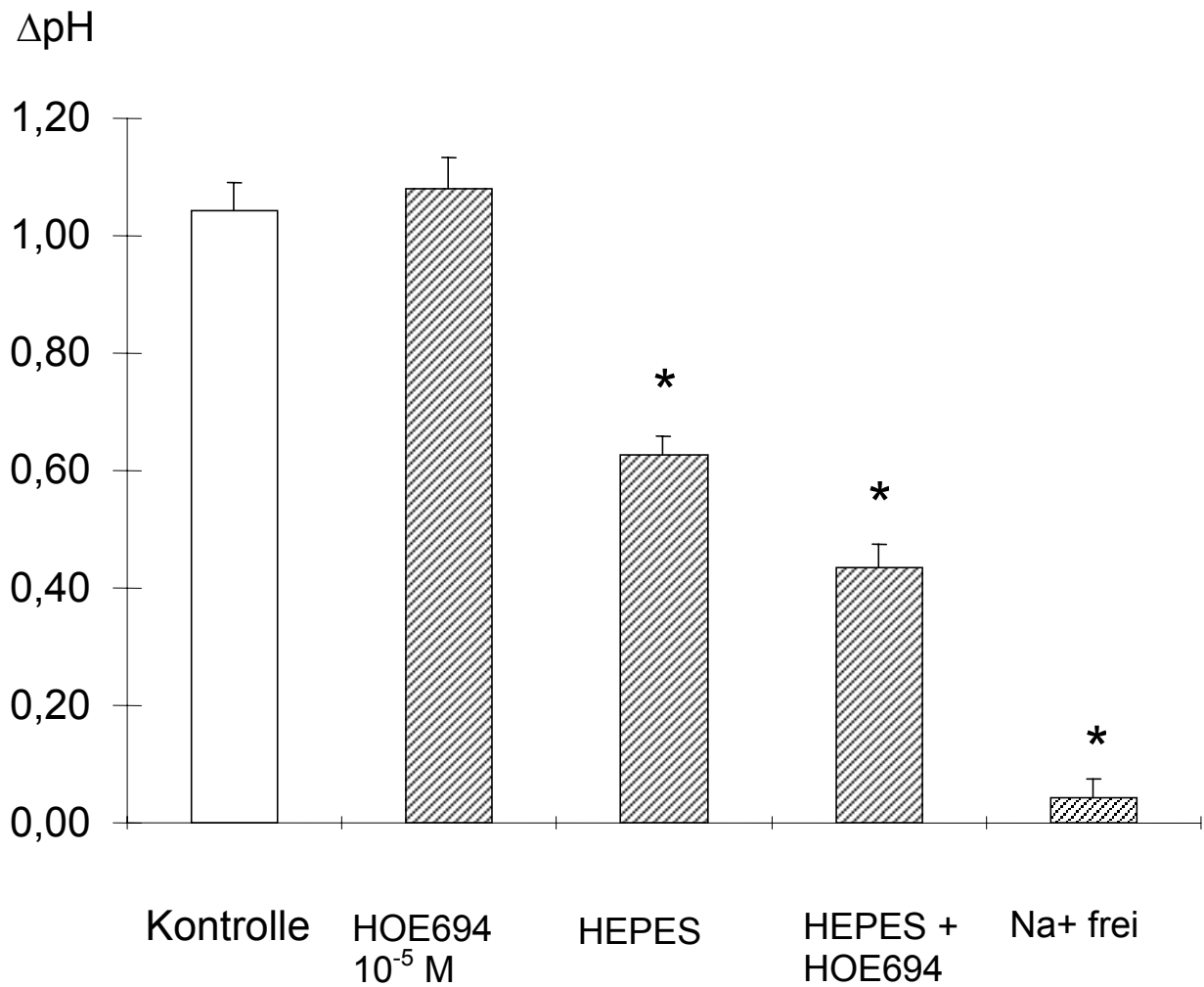


Abbildung 5:

Maximale Erholung des  $pH_i$  im Vergleich zum niedrigsten erreichten  $pH_i$  nach Prepulse mit 10 mM  $NH_4Cl$  bei Blockade des NHE, Natrium-Bikarbonat-Cotransport bzw. beider Systeme.

Mittelwerte  $\pm$  SEM.

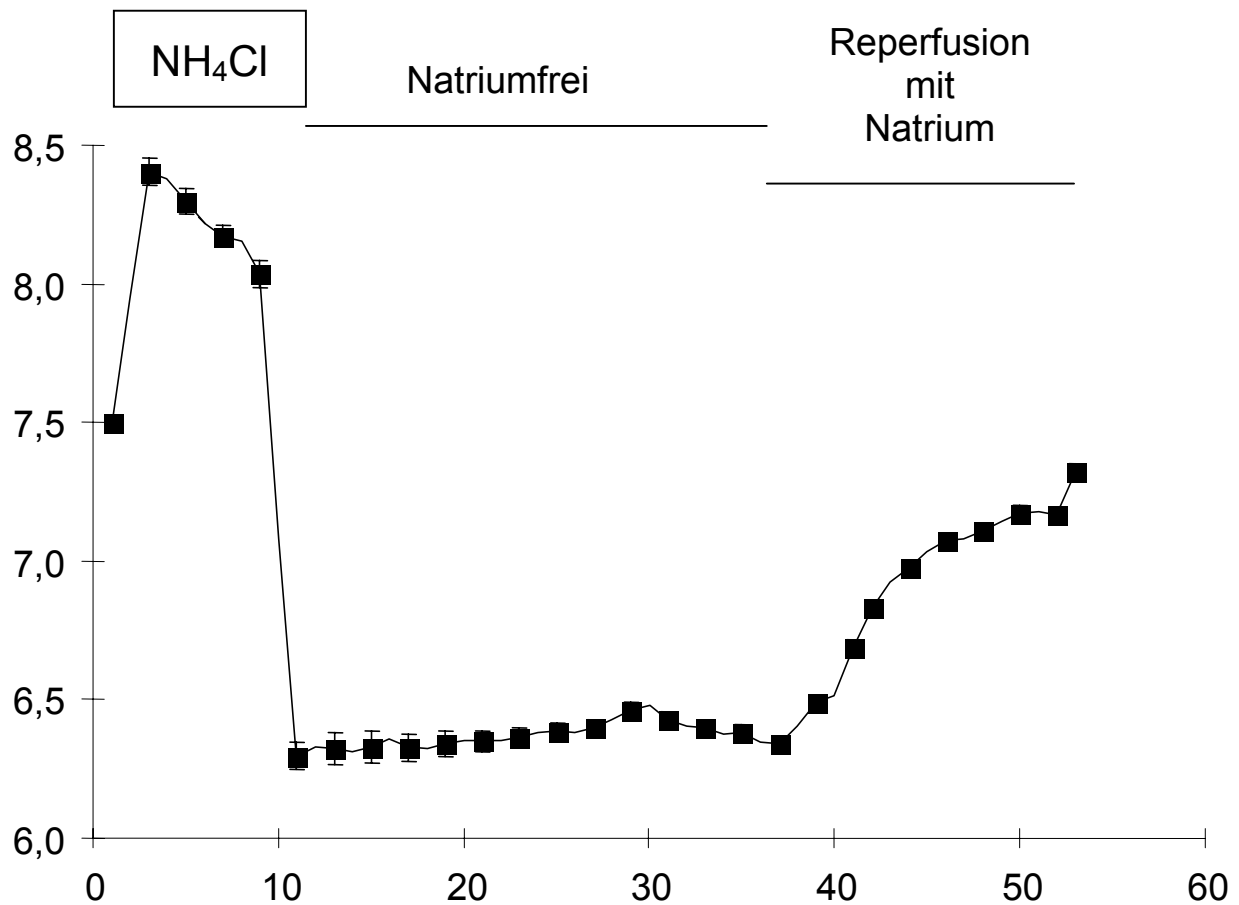


Abbildung 6:

pH-Verlauf nach NH<sub>4</sub>Cl-Prepulse und Perfusion mit natriumfreier Lösung bzw.

Reperfusion mit natriumhaltigem Kontrollpuffer.

Mittelwerte ± SEM.

### 3.1.2 Protonenfluß nach intrazellulärer Azidose

Sehr ähnlich wie die pH-Verläufe stellten sich auch die Protonenflüsse über die Membran der Zellen dar. Durch Blockade der einzelnen Protonencarrier konnte jeweils eine Reduktion des Protonenefflux erzielt werden.

In der Kontrollgruppe wurden nach einer initialen Beladung mit durchschnittlich  $23,05 \pm 5,9$  meqv/min (Abbildung 7) in den ersten 5 Minuten der Reperfusion  $5,66 \pm 1,3$  meqv/min Protonen über die Plasmamembran transportiert (Abbildung 8).

Um den potentiellen Störfaktor ungleicher Beladungsmengen zu eliminieren, wurde der Quotient aus Protonenefflux und Beladung gebildet (Effluxindex, EI), der in der Kontrollgruppe initial, d.h. während der ersten 5 Minuten, 0,25 betrug.

Nach Blockade des Natrium-Protonen-Exchanger verminderte sich die initiale eliminierte Protonenmenge nur wenig,  $4,48 \pm 0,6$  meqv/min. Da aber diese Gruppe auch stärker mit Protonen beladen wurde –  $34,94 \pm 23,8$  meqv/min, – ist hier der Efflux-Beladungsindex aussagekräftiger, er betrug 0,13 bzw. 52% der Kontrollgruppe.

Eine deutlich stärkere Reduktion des Protonenefflux konnte durch Blockade des  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -Cotransport erreicht werden. Nach einer anfänglichen Beladung von  $26,22 \pm 9,9$  meqv/min wurden nur noch  $1,58 \pm 0,5$  meqv/min aus der Zelle eliminiert, entsprechend einem EI von 0,06 bzw. 24% der Kontrollgruppe.



Blockade beider Carrier entweder durch Kombination der beiden letztgenannten Interventionen oder durch Elimination allen Natriums aus der Perfusionslösung führte zu einer ebenfalls sehr ausgeprägten Reduktion der Protonenflüsse.

Nach gleichstark ausgefallener Beladung,  $29,84 \pm 12,2$  bzw.  $30,89 \pm 6,0$  meqv/min, wurden noch  $0,55$  bzw.  $0,04$  meqv/min über die Membran transportiert.

Der prozentuale Anteil im Vergleich zur Kontrolle betrug  $7,8\%$  bzw.  $0,53\%$ .

$J_{H^+}$  [meqv/min]

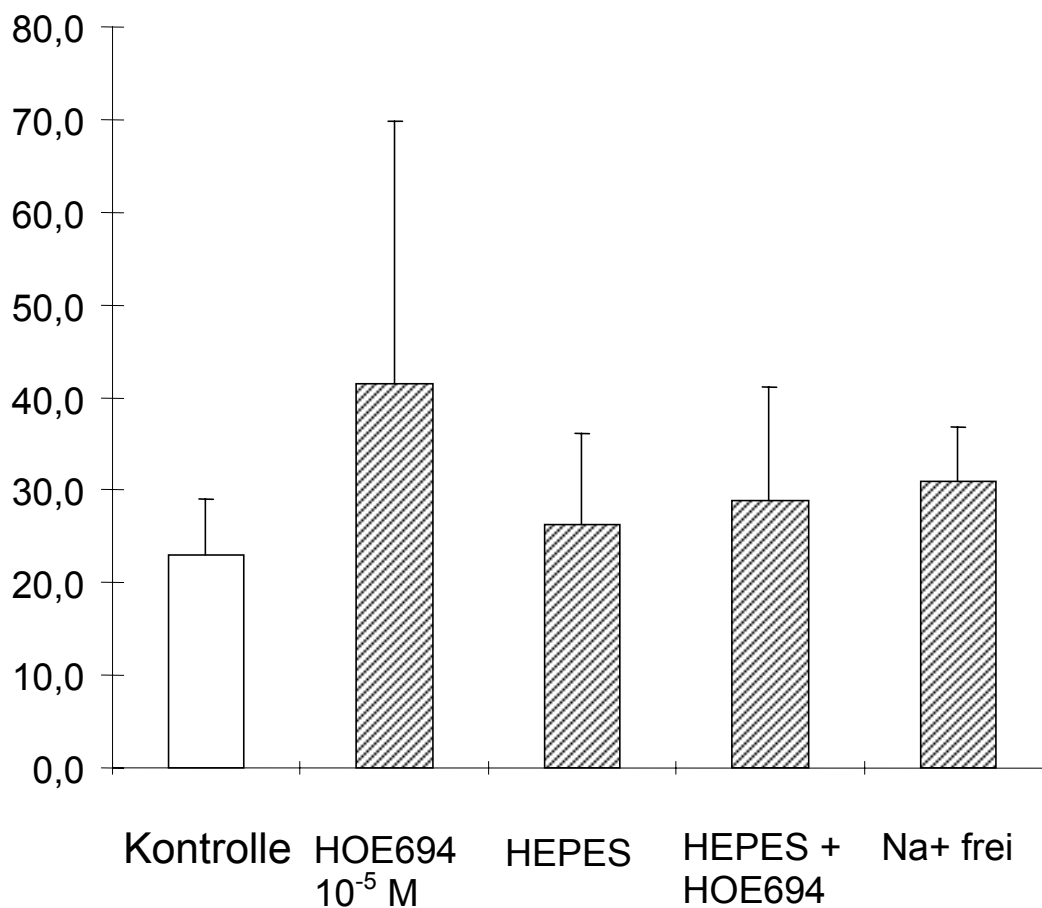


Abbildung 7:

Initiale Beladung der Zellen mit Säureäquivalenten nach Perfusion mit  $10\text{ mM NH}_4\text{Cl}$ . Mittelwerte  $\pm$  SEM.

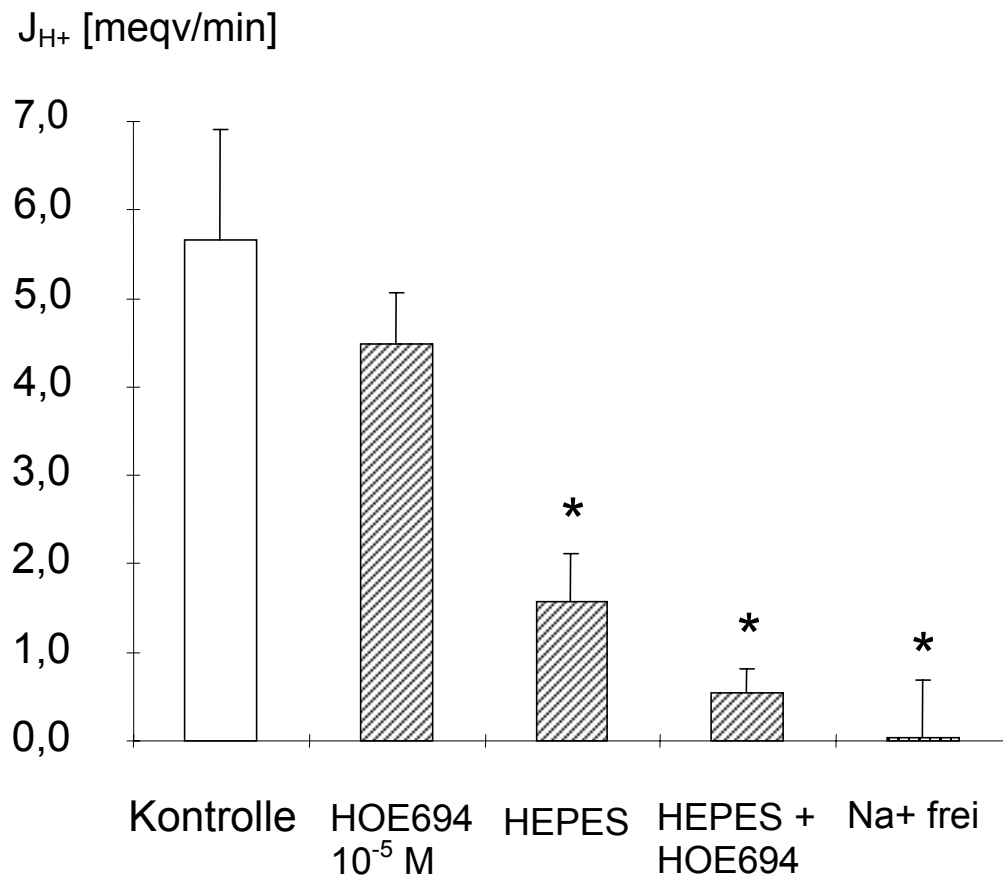


Abbildung 8:

Protonenefflux aus PC12-Zellen nach Prepulse mit 10 mM  $NH_4Cl$  und Blockade des NHE mit HOE694, Blockade des  $Na^+-HCO_3^-$ -Cotransport durch Elimination des Bikarbonats bzw. Blockade aller natriumabhängigen Prozesse durch Entfernung des Natriums aus der Lösung.

\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Kontrolle sowie  $p < 0,05$  im Vergleich zur HOE694-Gruppe. Mittelwerte  $\pm$  SEM.

## 3.2 Anoxieexperimente an PC12-Zellen

### 3.2.1 pH-Verlauf während Anoxie

Die Erzeugung eines Energiemangels wurde mittels Blockade der Glykolyse und Schaffung eines anoxischen Mediums erreicht. Hierunter fiel in der Anoxiegruppe der  $\text{pH}_i$  von einem Ruhe-pH von  $7.55 \pm 0,01$  schnell ab. Nach 5 Minuten betrug der  $\text{pH}_i$   $6,55 \pm 0,03$ , nach 10 Minuten  $6,18 \pm 0,05$ , um sich nach 15 Minuten bei einem intrazellulären pH von  $6,05 \pm 0,09$  einzupendeln (Abbildung 9).

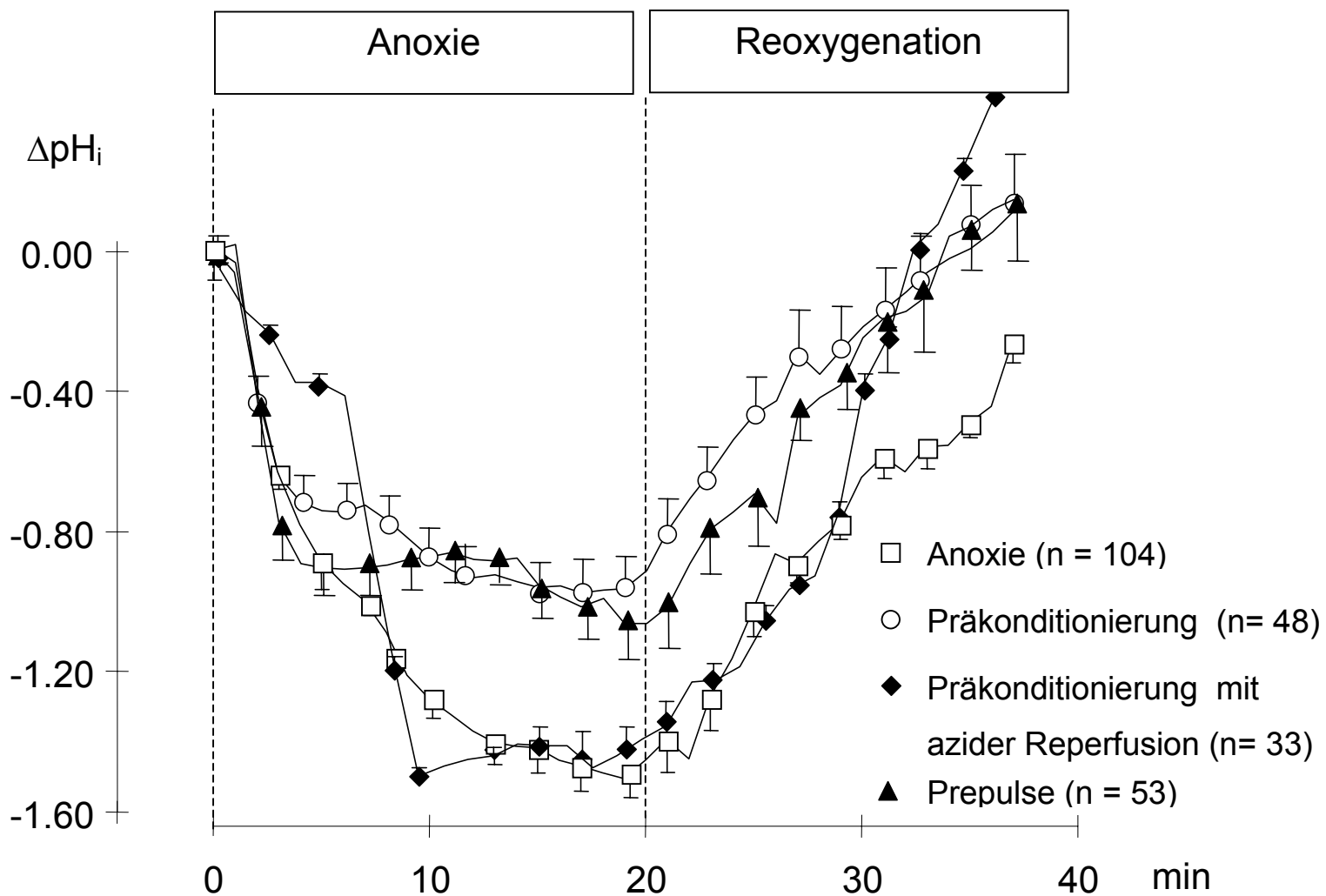
Die Geschwindigkeit des Abfalls betrug im Mittel  $0,19 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$ . Der maximale Abfall des  $\text{pH}_i$  betrug  $1,44 \pm 0,07$  pH-Einheiten (Abbildung 10).

Nach 20-minütiger Anoxie wurden die Zellen wieder mit glucose- und sauerstoffhaltigem Kontrollpuffer superfundiert.

Daraufhin kam es zu einer zügigen Erholung des  $\text{pH}_i$ . 5 Minuten nach Reperfusionbeginn betrug der  $\text{pH}_i$   $6,64 \pm 0,06$ , nach 15 Minuten  $7,06 \pm 0,04$  und nach 20 Minuten  $7,21 \pm 0,06$ .

In einigen Zellen kam es nach Erreichen des Ruhe-pH zu einem Überschießen des  $\text{pH}_i$  in alkalische Werte.

Die Geschwindigkeit der Erholung betrug innerhalb der ersten 5 Minuten  $0,17 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$  und nahm in den nächsten 5 Minuten ab auf  $0,08 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$  (Abbildung 13).



**Abb 9:**

Wirkung eines 20-minütigen Energiemangels auf den intrazellulären pH in PC12-Zellen. Darstellung des Abfall des  $pH_i$  ( $\Delta pH_i$ ) während des Energiemangels und nachfolgender Reperfusion.

Mittelwerte  $\pm$  SEM

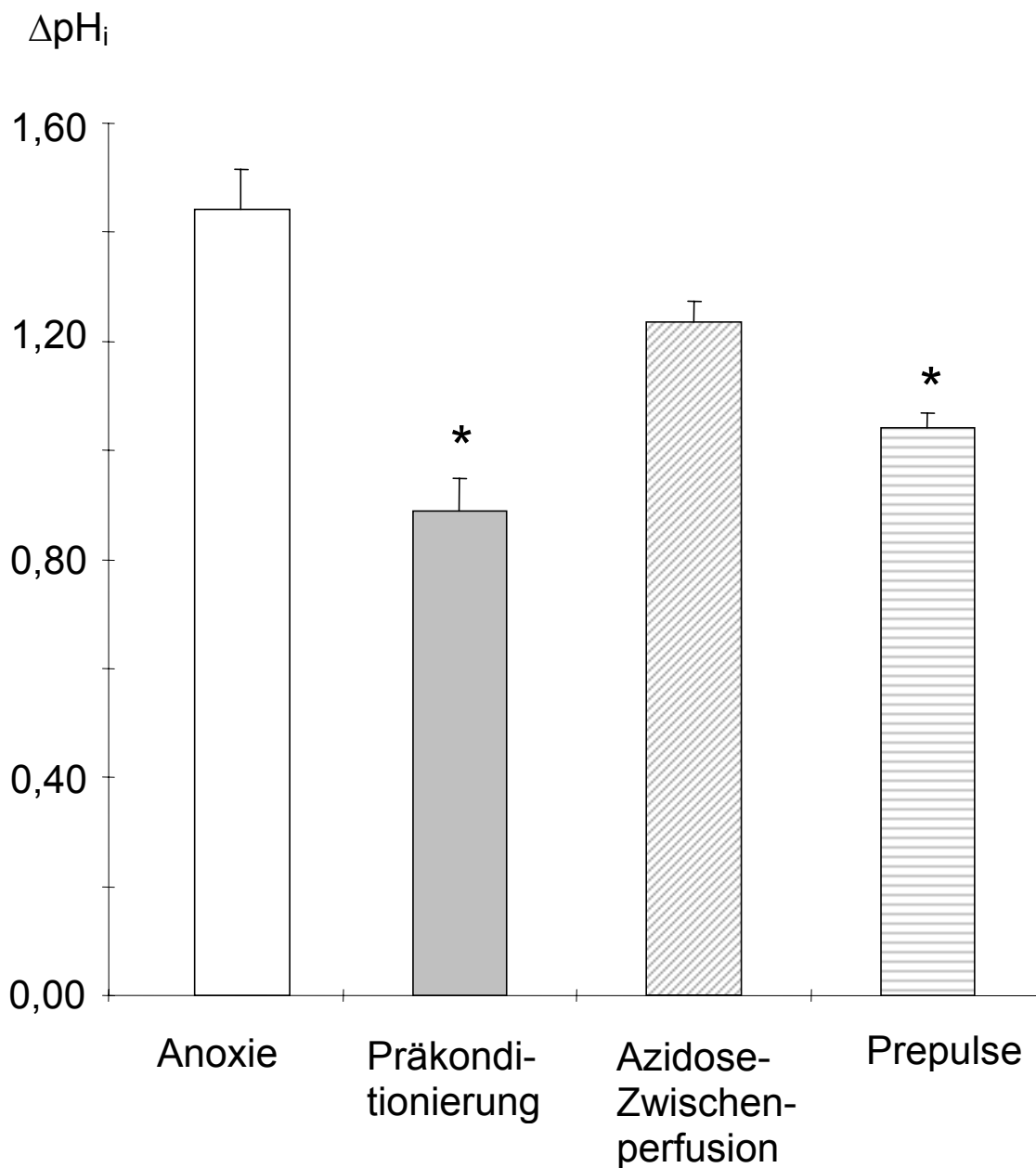


Abbildung 10:

Maximaler Abfall des intrazellulären pH<sub>i</sub> nach Einleitung der simulierten Ischämie mit und ohne vorangegangene Präkonditionierung bzw. intermittierende Azidose.

\* p < 0,001 im Vergleich zur Kontrolle. Mittelwerte ± SEM

### 3.2.2 Einfluß der Präkonditionierung auf den $pH_i$ -Verlauf während Anoxie

Mit Beginn der anoxischen Präkonditionierungsintervalle fiel der  $pH_i$  in der Präkonditionierungsgruppe von einem Ruhe- $pH$  von 7,54 (Anoxiegruppe 7,55) nach dem ersten Intervall auf  $6,89 \pm 0,04$ , nach dem zweiten auf  $6,61 \pm 0,04$  und nach dem dritten und letzten auf  $6,60 \pm 0,04$ . In den 5-minütigen Reperfusionperioden zwischen den anoxischen Stimuli erholte sich der  $pH_i$  jeweils unvollständig,  $7,11 \pm 0,03$  bzw.  $6,98 \pm 0,03$  bzw.  $7,00 \pm 0,04$  unmittelbar vor der Zielischämie (Abbildung 11).

Von diesem Wert aus fiel der  $pH_i$  wie in der Anoxiegruppe rasch ab. Nach 5 Minuten Anoxie betrug der  $pH_i$   $6,29 \pm 0,05$  und pendelte sich ebenfalls nach 15 Minuten bei einem  $pH_i$  von  $6,07 \pm 0,06$  ein (Anoxie  $6,05 \pm 0,05$ ;  $p = 0,18$ ; Abbildung 9).

Der maximal erreichte  $pH$ -Abfall war in dieser Gruppe allerdings signifikant geringer. So fiel der  $pH_i$  nur um  $0,89 \pm 0,06$  Einheiten ab (Anoxie  $1,44 \pm 0,07$ ;  $p < 0,001$ ; Abbildung 10).

Nach Beginn der Reperfusion erholte sich der  $pH_i$  schnell, in den ersten 5 Minuten auf  $6,59 \pm 0,2$ , nach 15 Minuten  $7,15 \pm 0,08$  und erreichte nach 25 Minuten mit  $7,39 \pm 0,16$  wieder den präischämischen Bereich (Präkonditionierung vs. Anoxie  $p = 0,2$ ).

Die Geschwindigkeit der Erholung betrug wie in der Anoxiegruppe in den ersten 5 Minuten der Reperfusion  $0,15 \pm 0,01 \Delta pH/min$  und fiel in den nächsten 10 Minuten auf  $0,08 \pm 0,007 \Delta pH/min$  ab (Präkonditionierung vs. Anoxie  $p=0,32$  bzw.  $p=1,0$ ; Abbildung 13).

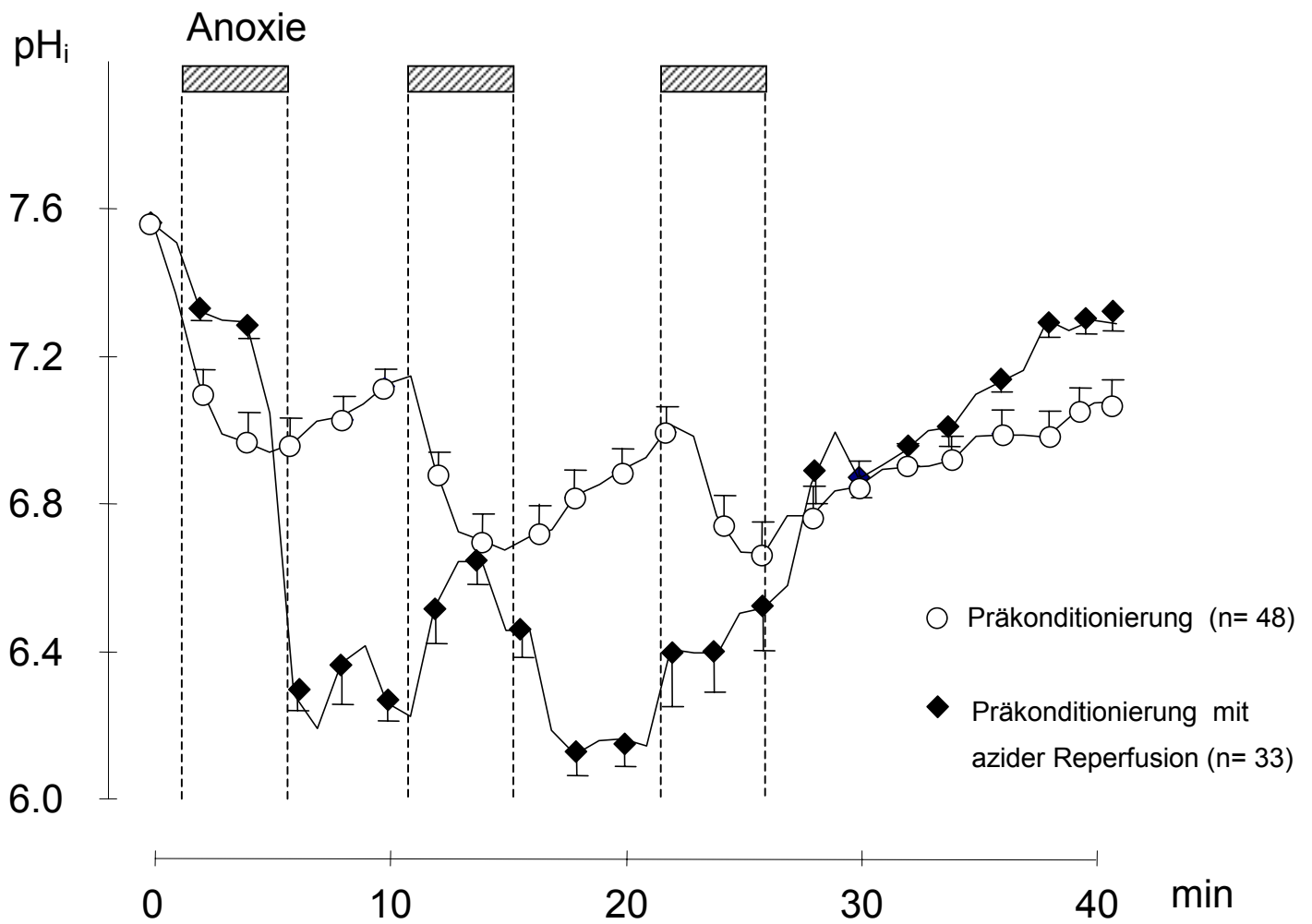


Abbildung 11:

Darstellung des intrazellulären pH während 3 x 5 min anoxischer

Präkonditionierung bzw. Präkonditionierung mit azider Zwischenperfusion.

Mittelwerte ± SEM.

### 3.2.3 Einfluß von intra- und extrazellulärer Azidose

Wie oben gezeigt wurde, verändert die ischämische Präkonditionierung den pH-Verlauf während einer prolongierten Ischämiephase.

Um den Effekt eines veränderten Protonengradienten über die Membran während der Präkonditionierung zu untersuchen, wurden die Zellen in einem weiteren Versuch nach den anoxischen Phasen der Präkonditionierung statt mit Kontrollpuffer mit einem azidotischen Puffer reperfundiert.

Der Ruhe-pH lag analog zu den anderen Gruppen bei  $7,52 \pm 0,01$ .

Nach dem ersten Präkonditionierungsintervall fiel der  $\text{pH}_i$  auf  $7,00 \pm 0,02$ . Während der nun folgenden Superfusion mit dem Azidosepuffer erholte sich der  $\text{pH}_i$  nicht mehr, sondern fiel noch weiter auf  $6,17 \pm 0,04$ .

Während der nächsten Präkonditionierung trat eine leichte Erholung des  $\text{pH}_i$  auf  $6,62 \pm 0,05$  ein, der aber in der nächsten Azidose-Zwischenperfusion wieder auf  $6,10 \pm 0,07$  abfiel.

Auch im dritten Präkonditionierungsintervall stieg der  $\text{pH}_i$  leicht an, um sich nach Reperfusion mit Kontrollpuffer rasch wieder dem Ruhe-pH anzunähern.

Der  $\text{pH}_i$  unmittelbar vor Einleitung der Zielischämie betrug  $7,10 \pm 0,02$  (Abbildung 11).

In der Anoxie erfolgte ein rapider und ausgeprägter Abfall des  $\text{pH}_i$ , der nach 5 Minuten  $6,97 \pm 0,02$  und nach 15 Minuten  $5,92 \pm 0,05$  betrug (Abbildung 9). Der maximale pH-Abfall betrug  $1,23 \pm 0,04$  (Azidose-Preconditioning vs. Preconditioning  $p < 0,001$ ; vs. Anoxie  $p = 0,09$ ; Abbildung 10).

Nach Reperfusion mit Kontrollpuffer stieg der  $\text{pH}_i$  in dieser Gruppe sehr schnell wieder an, nach 5 Minuten erreichten die Zellen einen  $\text{pH}_i$  von  $6,34 \pm 0,03$ , nach 10 Minuten  $7,27 \pm 0,05$ .



Die Erholungsgeschwindigkeit stieg demnach anders als in den anderen Gruppen während der Reperfusion sogar noch an, von initial  $0,09 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$  auf  $0,20 \pm 0,01 \Delta\text{pH}/\text{min}$  ( vs. Anoxie  $p < 0,001$ ; vs. Präkonditionierung  $p < 0,001$ ; Abbildung 13).

Anstelle der Vorbehandlung mit intermittierender Anoxie wurden die Zellen in der Prepulse-Gruppe vor der 20-minütigen Anoxie mittels Perfusion mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  einer 3-maligen intrazellulären Azidose von je 5 Minuten unterworfen.

Von einem Ruhe-pH von  $7,55 \pm 0,02$  stieg der  $\text{pH}_i$  während der Perfusion mit  $\text{NH}_4\text{Cl}$  auf alkalische Werte von  $7,88 \pm 0,03$  während der ersten Perfusion bzw.  $7,76 \pm 0,04$  und  $7,70 \pm 0,05$  im zweiten und dritten Intervall.

Im Anschluß an die Perfusion mit Ammoniumchlorid fiel der  $\text{pH}_i$  in den Zellen rasch auf Werte von  $6,86 \pm 0,05$ ,  $6,54 \pm 0,08$  bzw.  $6,64 \pm 0,08$  nach den jeweiligen „Prepulses“ ab.

Nach der letzten Azidose erholte sich der  $\text{pH}_i$  allmählich, um unmittelbar vor Einleiten der 20-minütigen Anoxie wieder einen Wert von  $7,33 \pm 0,06$  erreicht zu haben (Abbildung 12).

Von diesem Wert fiel der  $\text{pH}_i$  nach Einleitung der Anoxie analog zu den anderen Gruppen schnell ab und näherte sich bis deren Ende einem tiefsten Wert von  $6,27 \pm 0,07$  an (Abbildung 9).

Der maximale Abfall betrug  $1,04 \pm 0,03$  pH-Einheiten (vs. Anoxie  $p < 0,001$ ; vs. Präkonditionierung  $p < 0,05$ ; vs. Azidose-Zwischenperfusion  $p < 0,001$ ; Abbildung 10) und lag somit zwischen den Werten für Anoxiegruppe und Präkonditionierungsgruppe.

Von der Anoxie erholten sich diese Zellen gleich gut wie die vorher beschriebenen Gruppen. Nach 5 Minuten betrug der  $pH_i$   $6,54 \pm 0,08$ , nach 10 Minuten  $7,12 \pm 0,09$  und erreichte nach 15 Minuten den Kontrollbereich mit  $7,43 \pm 0,09$ .

Die Geschwindigkeit der Erholung betrug während der ersten 5 Minuten  $0,12 \pm 0,01$   $\Delta pH/min$  und im Anschluß daran  $0,07 \pm 0,01$   $\Delta pH/min$  (vs. Anoxie  $p < 0,01$ ; Abbildung 13).

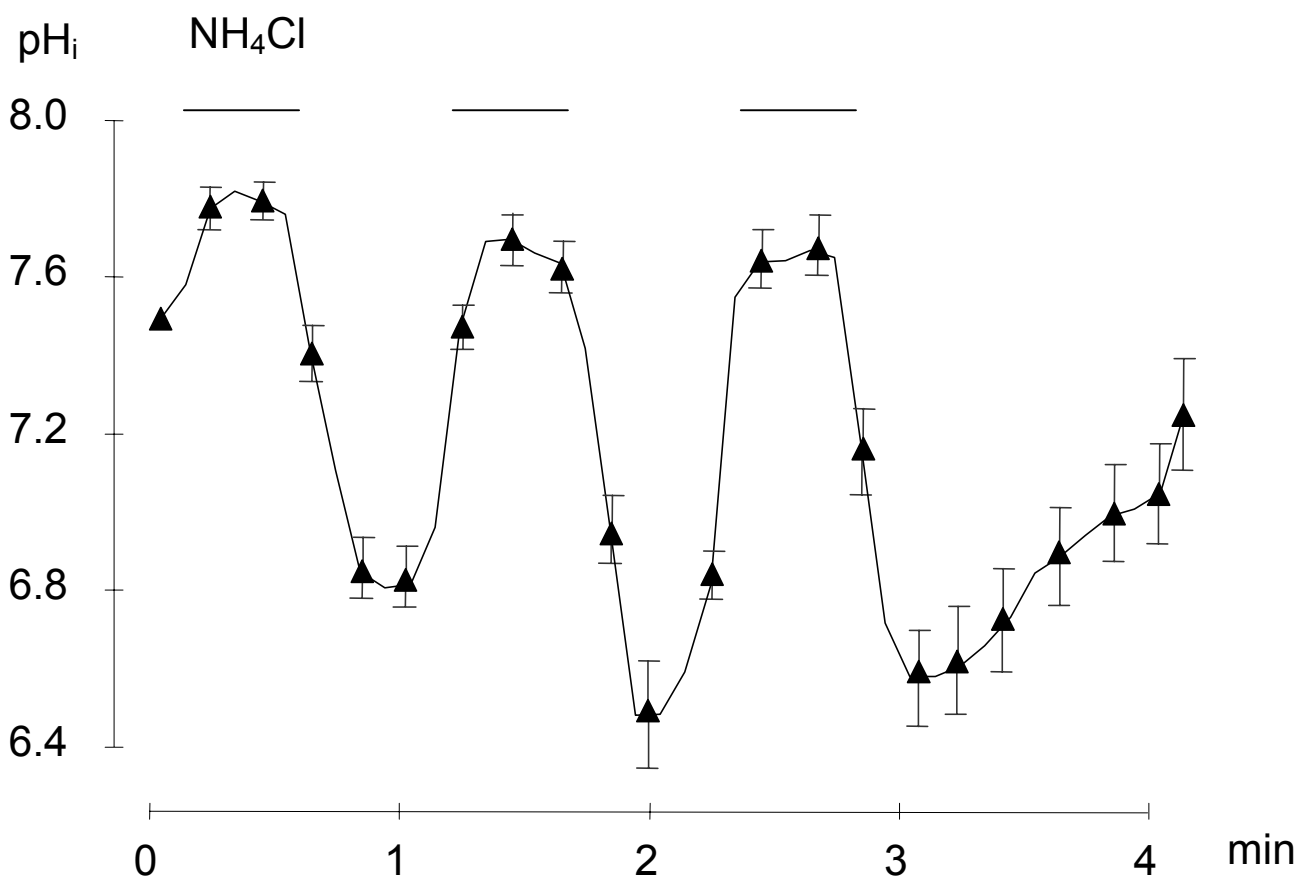


Abbildung 12:

$pH$ -Verlauf in Zellen ( $n = 53$ ) nach Induktion einer intermittierenden intrazellulären Azidose durch Perfusion mit 3 x 5 min  $NH_4Cl$  20 mM.

Mittelwert  $\pm$  SEM.

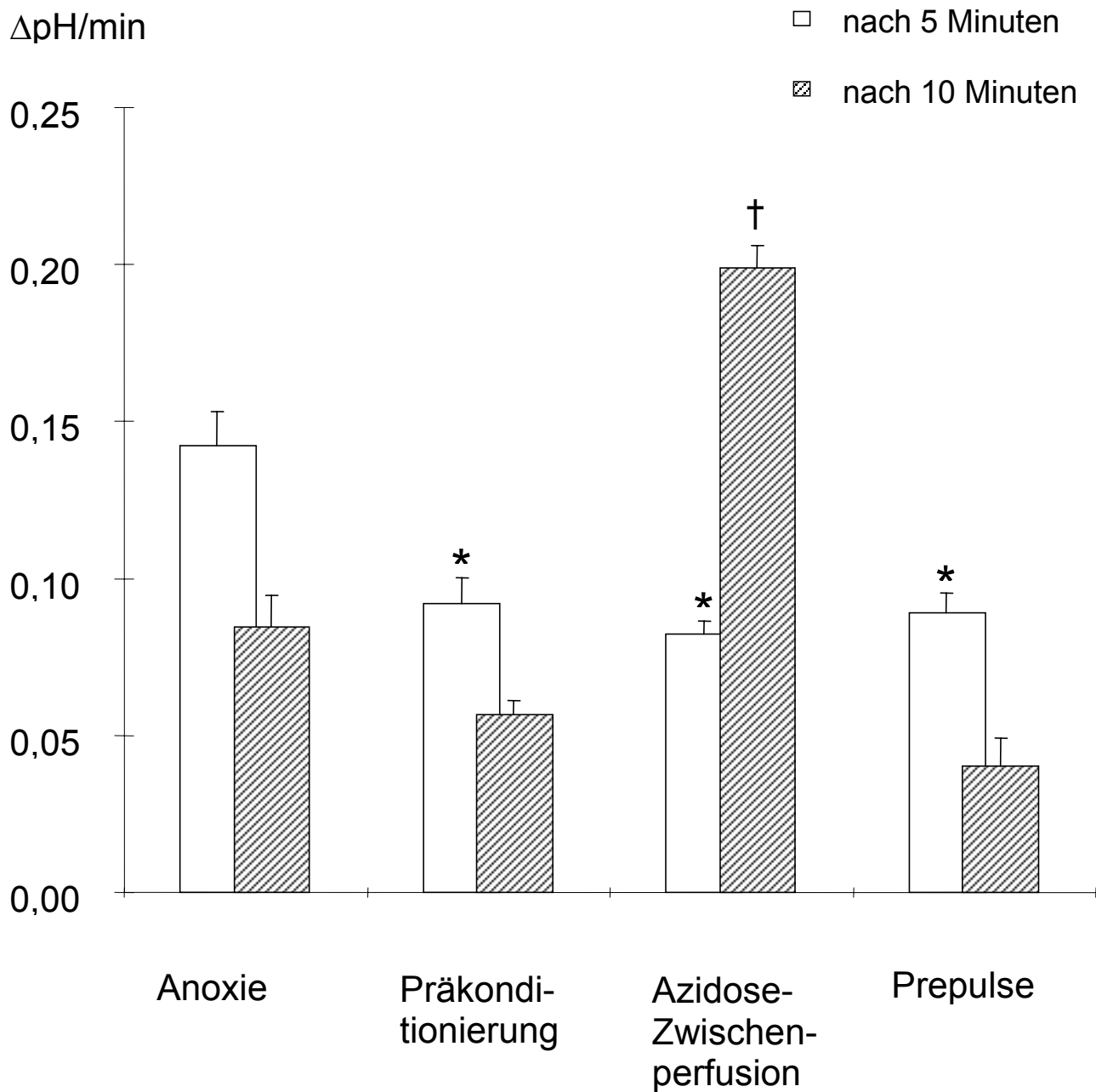


Abbildung 13:

Geschwindigkeit der pH-Erholung nach 20 min simulierter Ischämie in den ersten 5 bzw. 10 Minuten der Reperfusion.

\*  $p < 0,01$  im Vergleich zur Anoxie, †  $p < 0,01$  im Vergleich zur Anoxie.

Mittelwert  $\pm$  SEM.

## 4. Diskussion

### 4.1 Pathophysiologische Vorgänge während einer Myokardischämie

Der unmittelbar nach Eintreten des Energiemangels beginnende Abbau des ATP sowie das Umschalten auf anaeroben Stoffwechsel führt zu einem raschen Abfall des  $pH_i$  in den Zellen (Dennis et al. 1991). Solange der elektrochemische Gradient für Protonen nicht erloschen ist, werden diese im Austausch mit Natrium aus der Zelle befördert. Dies geschieht in den meisten Zelltypen hauptsächlich über den Natrium-Protonen-Exchanger (NHE), aber auch über den Natrium-Bikarbonat-Cotransport.

Durch die starke Aktivierung der natriumabhängigen Protonenregulatoren steigt der Natriumgehalt der Zelle in den ersten Minuten der Ischämie stark an (Abbildung 14). Die für die Erhaltung der Natriumhomöostase zuständige Natrium-Kalium-ATPase ist wegen des Energiemangels nicht mehr aktiv, so daß einströmendes Natrium nicht mehr aus der Zelle transportiert werden kann (Scholz et al. 1993). Durch den hohen intrazellulären Natriumgehalt kommt es zum Erliegen der Funktion des  $Na^+$ - $Ca^{2+}$ -Austauschers, der unter normoxischen Bedingungen Calcium aus der Zelle transportiert. Es kann sogar zu einer Umkehr der Transportrichtung kommen (Steenbergen et al. 1990). Indirekt steigt hierdurch die intrazelluläre Calciumkonzentration, welche für eine Vielzahl deletärer Effekte verantwortlich gemacht wird. Durch die hohe Calciumkonzentration werden lysosomale Enzyme aktiviert, Schäden an der Membran verursacht und die Zellen übererregbar gemacht (Tani et al. 1990).

Die extrazelluläre Metabolit- und Protonenakkumulation führt schließlich zum Zusammenbruch des Gradienten für Protonen über die Zellmembran.



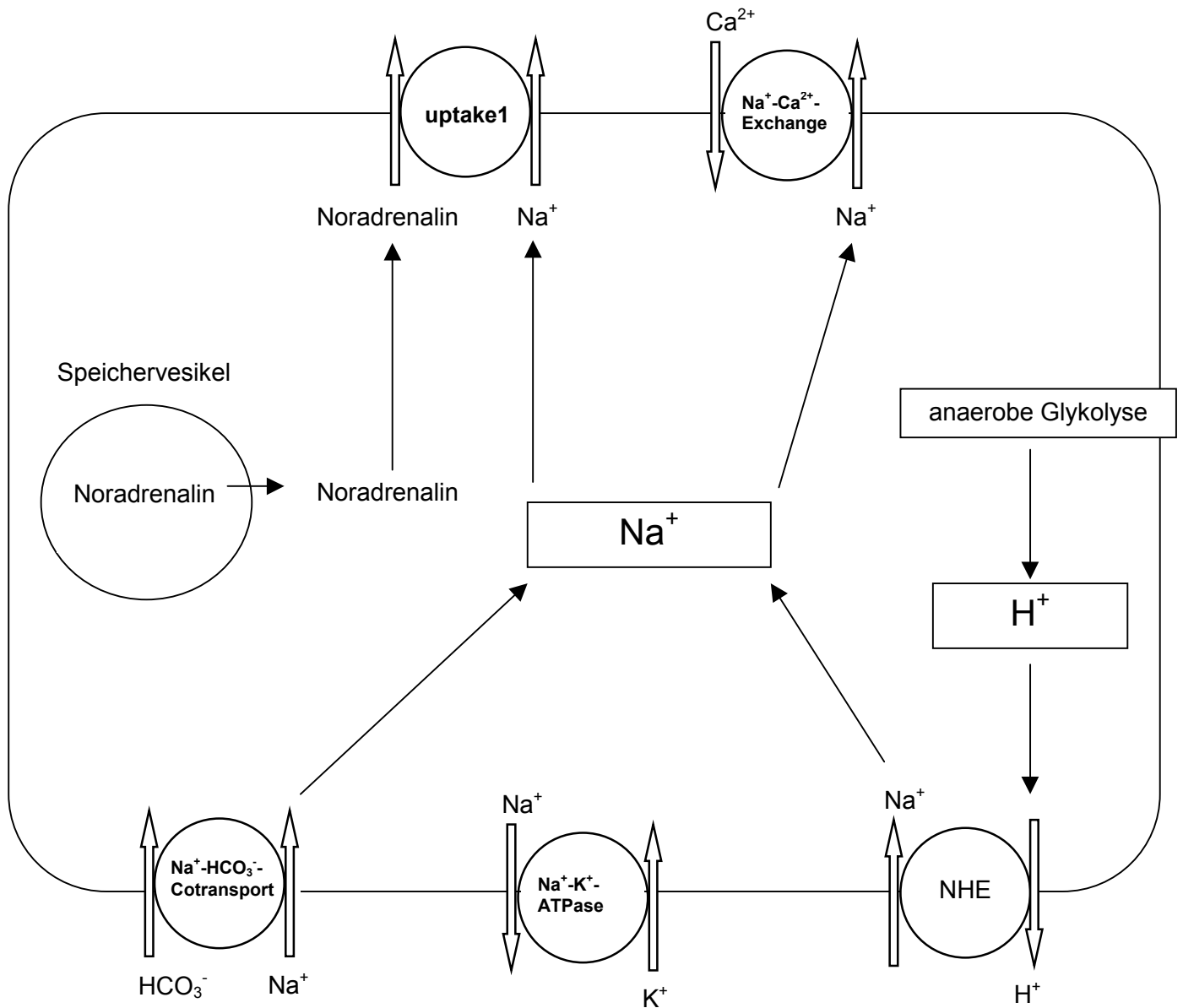


Abbildung 14:

Pathophysiologische Vorgänge während einer Ischämie und nachfolgender Reperfusion in sympathoadrenen Nervenenden des Herzens.

Nach Einsetzen der Ischämie fällt der ATP-Gehalt der Zelle, es setzt die anaerobe Glykolyse ein, wodurch der pH sinkt und NHE und  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Cotransport aktiviert werden – Natrium akkumuliert. Noradrenalin wird aus den Speichervesikeln freigesetzt und verläßt im Cotransport mit Natrium – und abhängig vom Natriumgradienten – die Zelle. Zusätzlich kommt es bedingt durch Dysfunktion des  $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Exchangers zu einer starken Zunahme des Calciums in der Zelle und entsprechenden Folgeveränderungen.

Extrazelluläre und intrazellulärer pH nähern sich einander an, die pH-Regulation steht still. Dieser Zustand tritt nach ungefähr 10 Minuten Ischämiedauer ein. Ab diesem Zeitpunkt sind Myozyten nicht mehr erregbar, da alle Ionengradienten über die Membran erloschen sind, es entsteht eine funktionelle Entkoppelung der Myozyten (Owens et al. 1996).

Dieser Zustand dauert bis zum Einsetzen einer Reperfusion, die innerhalb kürzester Zeit zu einer Wiederaufnahme der Aktivität der verschiedenen pH-regulierenden Systeme führt. Innerhalb weniger Sekunden entsteht ein enormer pH-Gradient zwischen Extrazellularraum und Zellinnerem, der vor allem über den Natrium-Protonen-Exchanger ausgeglichen wird. Wie bereits in der Ischämie kommt es hierdurch zu einer erneuten starken Zunahme des Natriums und Calciums, welche die schädlichen Effekte der Ischämie anfänglich noch verstärken (Scholz et al. 1993). Insbesondere die Übererregbarkeit der Zellmembranen führt in den ersten Minuten der Reperfusion zu häufigen Arrhythmien (Aye et al. 1999, Avkiran et al. 1992, Opie et al. 1988), eine Beobachtung, die auch klinisch große Relevanz besitzt, da ein Großteil der Todesfälle durch Myokardinfarkt auf maligne Rhythmusstörungen zurückzuführen ist.

Ein weiterer Faktor in der Arrhythmogenese ist die ischämisch bedingte nicht-exozytotische Noradrenalinfreisetzung aus den sympathoadrenergen Nervenenden des Herzens (Schömig et al. 1984). Weitere Folgen des postischämisch erhöhten Calciums sind die reperfusionsbedingte Kontraktur, „Stunning“ der Myozyten sowie Nekrose (Steenbergen et al. 1990).

## 4.2 Bedeutung der ischämische Präkonditionierung im Myokard

Die intermittierende ischämische Vorbehandlung myokardialen Gewebes führt zu einer deutlichen Protektion vor einer nachfolgenden längeren Ischämie (Murry et al., 1986).

Am isoliert-perfundierten Rattenherzen bewirkt die Präkonditionierung einen geringeren Abfall des  $\text{pH}_i$  während der Ischämie sowie eine langsamere Erholung des  $\text{pH}_i$  in der Reperfusionsphase. Letzteres wird auf eine verminderte Aktivität des Natrium-Protonen-Exchanger nach Präkonditionierung zurückgeführt.

Aufgrund der langsameren postischämischen Erholung des  $\text{pH}$  kommt es auch zu einer erheblich geringer ausgeprägten Beladung der Zelle mit Natrium und konsekutiv zu einer verminderten postischämischen Calcium-Überladung (Steenbergen et 1993, Liu et al. 1998).

Ischämische Präkonditionierung verringert das Ausmaß und die Dauer der postischämischen Kontraktur und verbessert die Erholung der Pumpfunktion (Cohen et al. 1996). Der ATP-, Glykogen- und Phosphokreatingehalt zu Beginn der Reperfusion ist in präkonditionierten Herzen höher als in Kontrollherzen und ermöglicht damit den präkonditionierten Herzen eine bessere Erholung (Liu et al. 1998). Auch die Größe des infarzierten Areals wird durch ischämische Präkonditionierung deutlich verringert (Mitchell et al. 1995, Bugge et al. 1995). Dies ist unter anderem auf eine verminderte Aktivierung der Apoptose-Kaskade zurückzuführen (Piot et al. 1999).



### 4.3 Präkonditionierung neuronaler Zellen

Ähnlich wie in Myozyten konnte auch an Neuronen gezeigt werden, daß ischämische Präkonditionierung die Zellen vor einer nachfolgenden Ischämie schützt, und zwar sowohl in Zellkultur als auch an Gewebeschnitten (Liu Y et al. 1992, Bruer et al. 1997, Barone et al. 1998). Wie in Myozyten konnte die Wirkung der ischämischen Präkonditionierung durch Adenosin oder Adenosin-Rezeptor-Agonisten (z.B. R-PIA) imitiert werden (Reshef et al. 1996).

Auch im Tiermodell konnten die protektiven Effekte ischämischer Präkonditionierung gezeigt werden. In präkonditionierten, neugeborenen Ratten war die Rate an Hirninfarkten nach einseitiger Okklusion der A. carotis deutlich niedriger als in der Kontrollgruppe, und die Speicher an energiereichen Phosphaten füllten sich schneller wieder auf (Vannucci et al. 1998).

Anders aber als in Myozyten herrscht über die Rolle der intrazellulären Signaltransduktion noch weitgehend Unklarheit. Während die Proteinkinase C im Myozyten eine herausragende Rolle spielt, scheint sie in Neuronen keinen Anteil am Präkonditionierungseffekt zu haben.

Blockade der PKC mit Chelerythrin, Staurosporin oder Calphostin C führte zu keinem Verlust der Protektion durch Präkonditionierung (Tauskela et al. 1999, Perez-Pinzon et al. 1999). Ebenso scheint die Protektion, die durch Wachstumsfaktoren vermittelt wird, unabhängig von einer Aktivierung der Proteinkinase C zu erfolgen (Boniece et al. 1993). Auch die Aktivierung der MAP-Kinasen hatte keinen Einfluß auf die

Präkonditionierung in Neuronen (Tauskela et al. 1999). Ebenso besteht Unklarheit über die Rolle des Natrium-Protonen-Exchanger im Zusammenhang mit Präkonditionierung von Neuronen.

Analog zu den Befunden an kortikalen Neuronen und Neuroglia konnte auch in sympathoadrenergen Nervenenden des Herzens ein protektiver Effekt durch ischämische Präkonditionierung nachgewiesen werden (Seyfarth et al. 1996, Feng et al. 1997).

Während einer myokardialen Ischämie kommt es bereits nach 15 Minuten zu einem signifikanten Konzentrationsanstieg des Noradrenalins im synaptischen Spalt (Schömig et al. 1984). Zunächst wird die Speicherung des Noradrenalins in den Speichervesikeln durch die zunehmende ATP-Verarmung eingestellt, Noradrenalin wird aus den Vesikeln in das Zytoplasma abgegeben (Schömig et al. 1984).

Als zweiter Schritt wird die Transportrichtung des „uptake-1“-Carriers auswärts gerichtet (Abbildung 14). Normalerweise dient dieser Transporter zur Aufnahme des extrazellulär lokalisierten Noradrenalins in die Zelle. Mit dem Noradrenalin wird ein Natrium im Cotransport aufgenommen. Durch die ischämisch bedingte intrazelluläre Azidose und die hierdurch erhöhte Aktivität des Natrium-Protonen-Exchanger kommt es zu einer starken Akkumulation von intrazellulärem Natrium, welches nun zusammen mit der hohen NoradrenalinKonzentration zu einer Umkehr des „uptake-1“-Carriers führt (Schömig et al. 1988). Dieser Prozeß ist kalziumunabhängig und durch präsynaptische Modulation nicht beeinflussbar (Seyfarth et al. 1996).

Die ischämische Noradrenalinfreisetzung führt letzten Endes zu einem massiven Anstieg der NoradrenalinKonzentration im Extrazellularraum (Shindo et al. 1996).

Die erhöhte NoradrenalinKonzentration wird für eine Reihe schädlicher Effekte am infarzierten Herzen verantwortlich gemacht, vor allem für die Induktion maligner

Arrhythmien (Schömig et al. 1991), aber auch direkte zytotoxische Effekte an Myozyten sind beschrieben (Rona 1985).

Ischämische Präkonditionierung führte zu einer signifikant erniedrigten Ausschwemmung von Noradrenalin in das koronarvenöse Effluat nach einer 20-minütigen Ischämie (Seyfarth et al. 1996). Dabei kam der protektive Effekt bereits nach einem einzigen Präkonditionierungsintervall von 5 Minuten zustande, ein Maximum an Protektion wurde nach drei 5-minütigen Intervallen erreicht. Eine Verlängerung der Phase zwischen Ende der Präkonditionierung und Beginn der Zielischämie führte zu einem Nachlassen der Wirkung der Protektion (Seyfarth et al. 1996). Durch Induktion repetitiver intrazellulärer Azidosen mittels  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Prepulse konnte eine ähnliche Reduktion der Noradrenalinausschüttung erzielt werden (Seyfarth et al. 1997).

Außerdem konnte gezeigt werden, daß eine azide Zwischenperfusion zwischen den einzelnen Präkonditionierungsintervallen zu einem Verlust des Effekts der Präkonditionierung führt, während eine Zwischenperfusion mit alkalischem Medium eine geringe Verstärkung dieses Effekts bewirkt. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten diese Beobachtungen bestätigt werden. Durch azide Zwischenperfusion wird das zyklische Abfallen und Wiederansteigen des  $\text{pH}_i$  unterbunden, was in einem sehr niedrigen  $\text{pH}_i$  während der ganzen Präkonditionierungsphase resultiert. Somit scheint der transmembranäre pH-Gradient während der Präkonditionierung ein entscheidender Prädiktor des Erfolges einer Präkonditionierung zu sein.

#### 4.4 pH-Regulation in Myozyten und Neuronen

In PC12-Zellen spielt der Natrium-Protonen-Exchanger wie in den meisten anderen Zellen eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung eines physiologischen pH in der Zelle. Es sind derzeit fünf Isoformen bekannt, NHE-1 bis NHE-5, wobei nur ersterer in allen Zellen exprimiert wird und für myokardiales Gewebe die einzige Isoform ist. NHE-5 wurde erst kürzlich charakterisiert, kommt in hohem Maße in Neuronen vor und ist relativ gering durch Amilorid zu beeinflussen. Welche Rolle dieser Subtyp in Neuronen spielt ist noch unklar (Attaphitaya et al. 1999). Die anderen Isoformen werden bevorzugt in epithelialen Geweben exprimiert, wie zum Beispiel in intestinaler Mucosa oder der Bürstensaummembran von Nierentubuli (Counillon et al. 1995). Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Inhibitoren des NHE-1 (HOE 694) verwendet.

Eine Blockade des NHE-1 führte zu einer starken Abnahme der Fähigkeit der Zelle, sich von einer intrazellulären Azidose zu erholen. Die Zellen konnten die während der Azidose freiwerdenden Protonen nur noch mit etwa der Hälfte der normalen Eliminationsgeschwindigkeit herausbefördern.

Der NHE transportiert ein Natrium-Ion in die Zelle im Austausch gegen ein Proton, arbeitet also energetisch neutral. Bei physiologischem pH ist der Transporter teilweise inaktiv, erreicht aber innerhalb einer pH-Einheit sein Maximum. Die halbmaximale Aktivität liegt bei  $\text{pH}_i = 7,35$ . Bei einem  $\text{pH}_i$  von 7 ist der Transporter also maximal aktiviert, was bedeutet, daß er den intrazellulären Protonengehalt sehr eng regulieren kann (Lazdunski et al. 1985).

Das zweite wichtige pH-Regulationssystem, der  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Cotransport, schleust gleichzeitig ein Natrium- und ein oder mehrere Bikarbonat-Ionen in die Zelle. Die

Stöchiometrie des Transporters scheint hierbei gewebeabhängig zu sein (Camilion de Hurtado et al. 1996). Blockade des NHE und gleichzeitige Aktivierung des  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -Cotransports führt zu einer Hyperpolarisation der Zelle, was auf einen elektrogenen Netto-Transport von negativen Ladungen deutet. Hyperpolarisation durch Kalium bewirkt analog dazu eine Alkalinisierung der Zelle durch Erhöhung des elektrochemischen Gradienten für Bikarbonat (Camilion de Hurtado et al. 1995). Eine andere Gruppe berichtet zusätzlich von einem elektroneutralen natriumabhängigen Bikarbonat-Transport. Vermutlich existieren mehrere Isoformen desselben Carriers mit unterschiedlicher Stöchiometrie (Dart et al. 1992, Camilion de Hurtado et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, daß der  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -Cotransport in PC12-Zellen eine bedeutende Rolle einnimmt. Blockade des Transporters durch Elimination des Bikarbonats aus der Pufferlösung verminderte die Fähigkeit zur Erholung beträchtlich. Der ausgeprägte Effekt einer Inhibition des  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -Cotransport läßt sich auch aus der Tatsache erklären, daß der Influx von Bikarbonat-Ionen nicht nur zu einem Netto-Efflux von Säureäquivalenten führt, sondern auch zu einer Erhöhung der intrazellulären Pufferkapazität, und es somit der Zelle ermöglicht, auch auf schnelle Änderungen des  $\text{pH}_i$  adäquat zu reagieren (Pucéat et al. 1995).

In Ruhe beträgt der  $\text{pH}_i$  in PC12-Zellen 7,5 und es scheinen sowohl der NHE als auch der  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -Cotransport inaktiv zu sein. Ähnlich wie der NHE wird auch der  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -Cotransport innerhalb eines sehr kleinen pH-Bereichs maximal aktiviert (Pucéat et al. 1995). Im Säugetierherzen sind für die Erholung nach einer Azidose beide Carrier zu etwa 50% beteiligt (Grace et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß auch in sympathoadrenergen Zellen die pH-Regulation zu etwa gleichen Teilen vom Natrium-Protonen-Exchanger und vom  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$ -

Cotransport getragen wird. Das Fehlen einer pH-Erholung nach Entfernen des Natriums aus der Lösung weist darauf hin, daß andere potentielle, nicht natriumabhängige pH-Regulatoren in der PC12-Zelle keine Rolle spielen.

#### 4.5 Einfluß der anoxischen Präkonditionierung auf den intrazellulären pH

Die ischämische oder anoxische Präkonditionierung führt nun zu einer deutlichen Veränderung der oben beschriebenen pH-Antwort auf eine prolongierte Ischämie oder Anoxie.

Während der Präkonditionierung kommt es zu einem repetitiven Wechsel zwischen intrazellulärer Azidose und Ausgleich derselben, verdeutlicht durch den zyklisch schwankenden  $pH_i$ . Kurz vor Beginn der simulierten Ischämie war der  $pH_i$  in der Präkonditionierungsgruppe immer noch leicht erniedrigt. Der konsekutive Abfall während des 20-minütigen Energiemangels war hingegen deutlich geringer. Statt 1,44 pH-Einheiten in der Anoxiegruppe fiel der  $pH_i$  in der Präkonditionierungsgruppe nur noch um 0,89 ab, während der minimale  $pH_i$  in beiden Gruppen gleich war (6,05 bzw. 6,07). Durch zyklische Induktion einer intrazellulären Azidose mittels  $NH_4^+$ -Prepulse konnte ein ähnlich abgemilderter pH-Verlauf während der simulierten Ischämie erreicht werden wie in der Präkonditionierungsgruppe. Wurde hingegen der Zelle während der Präkonditionierung die Möglichkeit genommen, die repetitiven intrazellulären Azidosen auszugleichen – durch Zwischenperfusion mit azidem Puffer und einer dadurch bewirkten Inhibition des NHE -, wirkte die Präkonditionierung nicht mehr protektiv, der pH-Verlauf glich wieder dem der Anoxiegruppe.

Die Geschwindigkeit der pH-Erholung während der Reperfusionphase in den Interventionsgruppen unterschied sich nur in den ersten 5 Minuten signifikant von der Anoxiegruppe. Anschließend und für den Rest der Reperfusionphase glichen sich die pH-Erholungsraten von Anoxie-, Präkonditionierungs- und Prepulsegruppe wieder an. Im Gegensatz dazu stieg die Erholungsrate in der Gruppe der präkonditionierten und azide reperfundierten Zellen noch an.

Einige Autoren berichten von einer Abmilderung der ischämischen Azidose in präkonditionierten Herzen (Liu H et al. 1998, Asimakis et al. 1992). Dies führt letztendlich über einen geringeren Protongradienten in der Reperfusion zu einer geringeren Aktivierung des Carriers, einer verminderten postischämischen Natriumbeladung und schließlich zu einer niedrigeren Calciumkonzentration in den Zellen.

Andere Autoren konnten hingegen im isoliert perfundierten Rattenherzen keinen abmildernden Effekt der Präkonditionierung auf den ischämischen  $pH_i$  feststellen und folgerten, daß der intrazelluläre pH während der Ischämie keine Aussage über die spätere Erholung liefert (Cave et al. 1997).

Die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß Ähnliches auch für neuronale Zellen gilt. Der niedrigste in der Ischämie erreichte  $pH_i$  war in allen Gruppen vergleichbar. Allerdings zeigte sich, daß der relative Abfall des  $pH_i$  vom präischämischen Wert niedriger ausfiel, wenn die Zellen zuvor präkonditioniert oder mit intermittierender, intrazellulärer Azidose vorbehandelt worden waren.

Es scheint also weniger der absolute  $pH_i$  während einer Ischämie entscheidend zu sein, sondern vielmehr der relative pH-Abfall während des Energiemangels. Dieser gibt eine bessere Annäherung an die tatsächlich von der Zelle zu bewältigende Protonenmenge und den daraus resultierenden transmembranären

Protonengradienten. Wird die Zelle nun reperfundiert, kommt es in der Regel zu einem schnellen Ausgleich der intrazellulären Azidose. Eine schnelle Erholung des  $pH_i$  nach einer Ischämie führt via Natrium-Protonen-Exchanger und  $Na^+HCO_3^-$  - Cotransport zu einer starken Akkumulation von Natrium in der Zelle, das wiederum über den  $Na^+Ca^{2+}$ -Exchanger gegen Calcium ausgetauscht wird (Liu H et al. 1998). Die Geschwindigkeit der Erholung nach einer Ischämie scheint demnach eine besonders wichtige Rolle für die spätere Funktion der Zelle zu spielen, wobei ein schneller Ausgleich der intrazellulären Azidose mit einem schlechteren funktionellen Ergebnis assoziiert ist (Xiao et al. 1999).

Welche Rolle spielen nun die protonenregulierenden Systeme im Präkonditionierungsgeschehen? Mehrere Gruppen konnten zeigen, daß der Natrium-Protonen-Exchanger nach Präkonditionierung stärker aktiv ist als in der Kontrollgruppe. Paradoxe Weise führte dies zu einer verminderten Natrium-Aufnahme während der Ischämie und einem geringeren Calcium-Einstrom in der Reperfusionphase (Ramasamy et al. 1995, Liu H et al. 1998, Steenbergen et al. 1993). Während der Präkonditionierung könnte es zu einer Modifikation der intrazellulären Bindungsstellen für Protonen kommen, mit einer daraus resultierenden Abnahme der Affinität für Protonen und einer nachfolgenden verminderten überschießenden pH-Antwort in der Ischämie und Reperfusion.

Für die Notwendigkeit eines transmembranären Protonengradienten für die Präkonditionierung spricht auch der Erfolg einer Vorbehandlung ausschließlich mit intrazellulärer Azidose. Sowohl in Zellen als auch im isolierten Rattenherzen führte diese „azide Präkonditionierung“ zu einer ähnlich starken Protektion wie ischämische Präkonditionierung – sowohl hinsichtlich des pH-Verlaufs als auch der ischämischen Katecholaminfreisetzung (Seyfarth et al. 1997). Die exakten Veränderungen an den protonenregulierenden Systemen sind jedoch nicht bekannt.



Im Gegensatz hierzu stehen Ergebnisse, die keinen Einfluß der Protonenregulatoren – vor allem des NHE – auf die Präkonditionierung in myokardialen Zellen fanden (Aye et al. 1999, Shipolini et al. 1997, Sato et al. 1997). Inhibition des Natrium-Protonen-Exchanger führte zu keinem Verlust der protektiven Wirkung der Präkonditionierung auf den pH-Verlauf. Während in zwei Arbeiten in Rattenherzen aber noch ein additiver Effekt der NHE-Blockade gesehen wurde, also ein zusätzlich zur Präkonditionierung zu erreichender Schutz (Aye et al. 1999, Shipolini et al. 1997), konnte dies in Kaninchenherzen nicht bestätigt werden (Sato et al. 1997).

Vermutlich zeigt sich hierbei auch ein grundlegendes Problem der Präkonditionierung. In unterschiedlichen Geweben werden durch ischämische Präkonditionierung verschiedene Mechanismen der Protektion aktiviert. Während zum Beispiel in Myozyten Proteinkinase C durch ischämische Präkonditionierung stark aktiviert wird und somit protektive Signaltransduktionswege gebahnt werden, scheint dies in Neuronen keine Bedeutung zu haben (Tauskela et al. 1999, Perez-Pinzon et al. 1999, Seyfarth et al. 1997).

Durchaus vorstellbar ist also, daß die protonenregulierenden Systeme in Myozyten für die Präkonditionierung tatsächlich nicht notwendig sind, in Neuronen hingegen eine Bedeutung haben. In den untersuchten neuronalen Zellen sympathoadrenerger Herkunft führte ischämische Präkonditionierung zu einem deutlich veränderten pH-Verlauf während der Ischämie. Durch den geringeren relativen Abfall des pH in den präkonditionierten Zellen kommt es auch zu einem geringeren Austausch von Protonen und Natrium über den NHE, und somit zu einer geringeren Natrium- und Calciumakkumulation in der Zelle in der Phase der Reperfusion. Dies führt letztendlich zu einer verbesserten Erholung nach Ischämie. Wie in der vorgelegten Arbeit gezeigt wurde, ist insbesondere die Induktion eines zyklisch wechselnden transmembranären pH-Gradienten vor der Ischämie für den „Erfolg“ der

Präkonditionierung, also eine verminderte Protonenbeladung während Ischämie und Reperfusion, notwendig. Hinderte man die Zellen an diesen zyklischen Schwankungen, so konnte keine Protektion erreicht werden.

Es ließ sich hiermit zum ersten Mal zeigen, daß transmembranärer Protonengradient und ischämische Präkonditionierung in neuronalen Zellen unmittelbar miteinander verknüpft sind.

## 5. Zusammenfassung

Während einer protrahierten Ischämie kommt es im Myokard zu einer massiven Akkumulation von Noradrenalin, das aufgrund der ischämischen Schädigung aus den kardialen sympathoadrenergen Neuronen ausgeschüttet wird und für eine Vielzahl schädlicher Effekte, wie zum Beispiel die Induktion maligner Arrhythmien, verantwortlich gemacht wird. Eine notwendige Bedingung für diesen Austritt von Noradrenalin ist ein erhöhtes intrazelluläres Natrium, das während der Ischämie und der nachfolgenden Reperfusion vor allem über den Natrium-Protonen-Exchanger, eines der Hauptproteine der pH-Regulation, in die Zelle gelangt. Aus Kardiomyozyten weiß man, daß ischämische Präkonditionierung - die intermittierende Abfolge subletaler ischämischer Stimuli – diese Natriumakkumulation abmildern oder sogar verhindern kann und damit zu einer besseren Erholung der Zellen nach Ischämie führt. Es bestand somit die Vermutung, daß die ischämische Präkonditionierung zu einer Modifikation der protonenregulierenden Systeme führt, insbesondere des NHE, und hierüber die Protektion der Zellen bewirkt.

Die vorliegende Arbeit sollte klären, inwieweit die Protonentransporter und der von ihnen erzeugte transmembranäre pH-Gradient für die ischämische Präkonditionierung von Bedeutung sind.

Unterzog man PC12-Zellen einer simulierten Ischämie so konnte ein reversibler, ausgeprägter Abfall des  $pH_i$  während des Energiemangels beobachtet werden. Eine vorausgegangene Präkonditionierung milderte den pH-Abfall deutlich ab.

Wurden die Zellen zwischen den Präkonditionierungsintervallen mit azidem Puffer perfundiert, so kam es zu einer Aufhebung des protektiven Effekts durch Präkonditionierung.

Die Induktion einer intermittierenden intrazellulären Azidose mittels  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -Prepulse führte zu einem ähnlichen protektiven Effekt wie Präkonditionierung. Auch in dieser Gruppe kam es zu einem geringer ausgeprägten Abfall des intrazellulären pH während der Ischämie.

Einen Einfluß der geschilderten Maßnahmen auf die Geschwindigkeit der pH-Erholung nach dem Energiemangel konnte nur in den ersten 5 Minuten der Reperfusion beobachtet werden. Anschließend glichen sich die Erholungsraten in allen Gruppen aneinander an, mit Ausnahme der Zellen, die während der Präkonditionierung azide zwischenperfundiert worden waren. In diesen kam es sogar noch zu einer Steigerung der Erholungsgeschwindigkeit.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß die Erzeugung eines transmembranären Protongradienten während der Präkonditionierung eine hinreichende und notwendige Bedingung für den „Erfolg“ einer Präkonditionierung ist. Wahrscheinlich führt die wechselnde Aktivierung und Inaktivierung der Protonencarrier zu einer Modifikation ihrer Transporteigenschaften, am ehesten wohl zu einer Inhibition. Dies könnte erklären, warum präkonditionierte Herzen eine geringere Beladung mit Natrium und Calcium aufweisen.

Die geringere Belastung der sympathoadrenergen Nervenenden des Herzens mit Natrium führt dann zu einem geringeren nach außen gerichteten Gradienten für Natrium und Noradrenalin und im Endeffekt zu einer verminderten nicht-exozytotischen Noradrenalinfreisetzung.

Über die intrazellulär gelegenen Signaltransduktionswege, die das Präkonditionierungssignal in Neuronen weitervermitteln, gibt es zur Zeit nur wenige Daten. Es scheinen aber deutliche Unterschiede zu den Signalkaskaden des Myozyten zu bestehen.

## 6. Verwendete Abkürzungen

BCECF	2',7'-bis-(2-carboxyethyl)-5,6-carboxyfluorescein acetoxymethylester
$\beta_i$	intrazelluläre Pufferkapazität
DIDS	4,4'-Diisothiocyanostilbene-2,2'-Disulfonsäure
HOE 694	(3-methylsulphonyl-4-piperidinobenzoyl)guanidine methanesulphonat
NHE	Natrium-Protonen-Exchanger
$\text{pH}_i$	intrazellulärer pH
SITS	4-Acetamido-4'-Isothiocyanatostilbene-2,2'-Disulfonsäure
$J_H$	Protonenfluß

## 7. Literaturverzeichnis

Asimakis GK, Inners-McBride K, Medellin G, Conti VR: Ischemic preconditioning attenuates acidosis and postischemic dysfunction in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1992; 263 : H887 - H894

Attaphitaya S, Park K, Melvin JE: Molecular cloning and functional expression of a rat  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger (NHE5) highly expressed in brain. *J Biol Chem* 1999; 274 : 4383 - 4388

Avkiran M, Ibuki C: Reperfusion-induced arrhythmias - a role for washout of extracellular protons ? *Circ Res* 1992; 71 : 1429 - 1440

Aye NN, Komori Y, Hashimoto K: Effects an interaction, of cariporide and preconditioning on cardiac arrhythmias and infarction in rat in vivo. *Br J Pharmacol* 1999; 127 : 1048 - 1055

Barone FC, White RF, Spera PA, Ellison J, Currie RW, Wang X, Feuerstein GZ: Ischemic preconditioning and brain tolerance: temporal histological and functional outcomes, protein synthesis requirement, and interleukin-1 receptor antagonist and early gene expression. *Stroke* 1998; 29 : 1937 - 1950

Bolli R, Bhatti ZA, Tang XL, Zhang Q, Guo Y, Jadoon AK: Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ Res* 1997; 81 : 42 - 52

Bolli R, Dawn R, Tang XL, Qiu Y, Ping P, Xuan YT, Jones WK, Takano H, Guo Y, Zhang J: The nitric oxide hypothesis of late preconditioning. *Basic Res Cardiol* 1998; 93 : 325 - 338

Boniece IR, Wagner JA: Growth factors protect PC12 cells against ischemia by a mechanism that is independent of PKA, PKC, and protein synthesis. *J Neurosci* 1993; 10 : 4220 - 4228

Bruer U, Weih MK, Isaev NK, Meisel A, Ruscher K, Bergk A, Trendelenburg G, Wiegand F, Victorov IV, Dirnagl U: Induction of tolerance in rat cortical neurons : hypoxic preconditioning. *FEBS Lett* 1997; 414 : 117-121

Bugge E, Ytrehus K: Inhibition of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart - a protective additive ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1995; 29 : 269 - 274

Camilion de Hurtado MC, Perez NG, Cingolani HE: An electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in the regulation of myocardial intracellular pH. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27 : 231-242

Camilion de Hurtado MC, Alvarez BV, Perez NG, Cingolani HE: Role of an electrogenic Na-HCO<sub>3</sub>-Cotransport in determining myocardial pH after an increase in heart rate. *Circ Res* 1996; 79 : 698-704

Cave AC, Garlick PB: Ischemic preconditioning and intracellular pH: a  $^{31}\text{P}$  NMR study in the isolated rat heart. *Am J Physiol* 1997; 272 : H544-H552

Chen W, Wetsel W, Steenbergen C, Murphy E: Effect of ischemic preconditioning and PKC activation on acidification during ischemia in rat heart. *JMCC* 1996; 28 : 871-880

Cohen MV, Liu Y, Liu GS, Wang P, Weinbrenner C, Cordis GA, Das DK, Downey JM: Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. *Circ* 1996; 94 : 1713 - 1718

Counillon L, Pouysségur J: Structure-function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1). *Cardiovasc Res* 1995; 29 : 147 - 154

Dart C, Vaughan-Jones D:  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  Symport in the sheep cardiac purkinje fibre. *J Physiol* 1992; 451 : 365 - 385

Dennis SC, Gevers W, Opie LH: Editorial: Protons in ischemia: Where do they come from; where do they go to? *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23 : 1077 - 1086

Fliegel L, Wang H: Regulation of the Na-H exchanger in the mammalian myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29 : 1991 -1999



Gorgias N, Maidatsi P, Tsolaki M, Alvanou A, Kiriazis G, Kaidoglou K, Giala M: Hypoxic pretreatment protects against neuronal damage of the rat hippocampus induced by severe hypoxia. *Brain Res* 1996; 714 : 215 - 225

Grace AA, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Smith GA, Weissberg PL, Cragoe EJ, Vandenberg JI: Regulation of intracellular pH in the perfused heart by external HCO<sub>3</sub> and Na-H exchange. *Am J Physiol* 1993; 265 : H289 - H298

Ito K, Kagaya Y, Ishizuka T, Ito N, Ishide N, Shirato K: Diacylglycerol delays pH(i) overshoot after reperfusion and attenuates contracture in isolated, paced myocytes. *Am J Physiol* 1999; 277 : H1708 - H1717

Kandasamy RA, Yu FH, Harris R, Boucher A, Hanrahan JW, Orłowski J: Plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger isoforms (NHE-1, -2, and -3) are differentially responsive to second messenger agonists of the protein kinase A and C pathways. *J Biol Chem* 1995; 270 : 29209 - 29216

Kita H, Miura T, Tsuchida A, Hasegawa T, Shimamoto K: Suppression of reperfusion arrhythmias by preconditioning is inhibited by an ATP-sensitive potassium channel blocker, 5-hydroxydecanoate, but not by protein kinase C blockers in the rat. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; 32 : 791 - 797

Lagadic-Gossmann D, Vaughan-Jones RD, Buckler KJ: Adrenaline and extracellular ATP switch between two modes of acid extrusion in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 1992; 458 : 385-407

Lagadic-Gossman D, Vaughan-Jones RD: Coupling of dual acid extrusion in the guinea-pig isolated ventricular myocyte to alpha and beta-adrenergic receptors. *J Physiol* 1993; 464 : 49 - 73

Lazdunski M, Frelin C, Vigne P: The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17 : 1029-1042

Liu H, Cala PM, Anderson SE: Ischemic preconditioning : effects on pHi, Na and Ca in newborn rabbit hearts during ischemia/reperfusion. *JMCC* 1998; 30 : 685-697

Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K: Protection of rat hippocampus against ischemic neuronal damage by pretreatment with sublethal ischemia. *Brain Res* 1992 ; 586 : 121 - 124

Liu Y, Kato H, Nakata N, Kogure K: Temporal profile of heat shock protein 70 synthesis in ischemic tolerance induced by preconditioning ischemia in rat hippocampus. *Neuroscience* 1993; 56 : 921 -927

Mellergard P, Ouyang YB, Siesjö BK: Intracellular pH regulation in cultured rat astrocytes in CO<sub>2</sub>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> containing media. *Exp Brain Res* 1993; 95 : 371 - 380

Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JB, Harken AH, Banerjee A: Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res* 1995; 76 : 73 - 81

Murry CE, Jennings RB, Reimer KA: Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74 : 1124 - 1136

Myers ML, Farhangkhoue P, Karmazyn M: Hydrogen peroxide induced impairment of post-ischemic ventricular function is prevented by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *Cardiovasc Res* 1998; 40 : 290 - 296

Opie LH, Coetzee WA: Role of calcium-ions in reperfusion arrhythmias: Relevance to pharmacologic intervention. *Cardiovasc Drug Ther* 1988; 2 : 623 - 636

Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes L, Experimental Cardiology Group: Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changes to cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. *Circ* 1996; 94 : 10 - 13

Perez-Pinzon MA, Born JG: Rapid preconditioning neuroprotection following anoxia in hippocampal slices: role of the K<sup>+</sup> ATP channel and protein kinase C. *Neuroscience* 1999; 89 : 453 - 459

Ping P, Zhang J, Huang S, Cao C, Tang XL, Li RC, Zheng YT, Qiu Y, Clerk A, Sugden P, Han J, Bolli R: PKC-dependent activation of p46/p54 JNKs during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1999; 277 : H1771 - H1785

Ping P, Zhang J, Zheng YT, Li RC, Dawn B, Tang XL, Takano H, Balafanova Z, Bolli R: Demonstration of selective protein kinase C-dependent activation of Src and Lck

tyrosine kinases during ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Circ Res* 1999; 85 : 542 - 550

Pucéat M, Vassort G: Neurohumoral modulation of intracellular pH in the heart. *Cardiovasc Res* 1995; 29 : 178 - 183

Ramasamy R, Liu H, Anderson S, Lundmark J, Schaefer S: Ischemic preconditioning stimulates sodium and proton transport in isolated rat hearts. *J Clin Invest* 1995;96 : 1464 – 1472

Rehring RF, Shapiro JI, Cain BS, Meldrum DR, Cleveland JC, Harken AH, Banerjee A: Mechanisms of pH preservation during global ischemia in preconditioned rat heart: roles for PKC and NHE. *Am J Physiol* 1998; 275 : H805 - H813

Reshef A, Sperling O, Zoref-Shani E: Opening of ATP-sensitive potassium channels by chromakalim confers tolerance against chemical ischemia in rat neuronal cultures. *Neurosci Lett* 1998; 250 : 111-114

Rona G: Catecholamine cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17 : 291 - 306

Ruscher K, Isaev N, Trendelenburg G, Weih M, Iurato L, Meisel A, Dirnagl U: *Neurosci Lett* 1998; 254 : 117 - 120

Sabri A, Byron KL, Samarel AM, Bell J, Lucchesi PA: Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res* 1998; 82 : 1053 - 1062

Sato H, Miki T, Vallbhapurapu RP, Wang P, Liu G-S, Cohen MV, Downey JM: The mechanism of protection from 5(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride differs from that of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Bas Res Cardiol* 1997; 92 : 339-350

Sato T, O'Rourke B, Marban E: Modulation of mitochondrial ATP-dependent K<sup>+</sup> channels by protein kinase C. *Circ Res* 1998; 83 : 110 - 114

Schömig A, Dart AM, Dietz R, Mayer E, Kübler W: Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. A: Locally mediated release. *Circ Res* 1984; 55 : 689 - 701

Schömig A, Kurz T, Richardt G, Schömig E: Neuronal sodium homeostasis and axoplasmic amine concentration determine calcium-independent noradrenaline release in normoxic and ischemic rat heart. *Circ Res* 1988; 63 : 214 - 226

Schömig A, Haass M, Richardt G: Catecholamine release and arrhythmias in acute myocardial ischemia. *Eur Heart J* 1991; 12 (suppl F): 38 - 47

Scholz W, Albus U: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1993; 88 : 443 - 455

Schultz JE, Quian YZ, Gross GJ, Kukreja RC: The ischemia-selective KATP channel antagonist, 5-hydroxydecanoate, blocks ischemic preconditioning in the rat heart. *J Moll Cell Cardiol* 1997; 29 : 1055 - 1060

Seyfarth M, Richardt G, Mizsnyak A, Kurz T, Schömig A: Transient ischemia reduces norepinephrine release during sustained ischemia: Neural preconditioning in isolated rat heart. *Circ Res* 1996; 78 : 573 - 580

Seyfarth M, Bott-Flügel L, Laugwitz KL, Ungerer M, Schömig A: Effects of ischemic preconditioning on norepinephrine release and ventricular fibrillation are related to a transmembranal proton gradient in rat hearts. *Circ Res* 1999 (in Revision)

Shindo T, Akiyama T, Yamazaki T, Ninomiya I: Regional myocardial interstitial norepinephrine kinetics during coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol* 1996; 270 : H245 - H251

Shipolini AR, Yokoyama H, Galinanes M, Edmondson SJ, Hearse DJ, Avkiran M: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger activity does not contribute to protection by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Circulation* 1997; 96 : 3617 - 3625

Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE: Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990; 66 : 135 - 146

Steenbergen C, Perlman ME, London RE, Murphy E: Mechanism of preconditioning : Ionic alterations. *Circ Res* 1993; 72 : 112 - 125

Tani M, Neely JR: Na<sup>+</sup> accumulation increases Ca<sup>2+</sup> overload and impairs function in anoxic rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22 : 57 - 72

Tauskela JS, Chakravarthy BR, Murray CL, Wang Y, Comas T, Hogan M, Hakim A, Morley P: Evidence from cultured rat cortical neurons of differences in the mechanism of ischemic preconditioning of brain and heart. *Brain Res* 1999; 827 : 143 - 151

Tolkovsky AM, Richards CD: Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange is the major mechanism of pH regulation in cultured sympathetic neurons: Measurements in single cell bodies and neurites using a fluorescent pH indicator. *Neurosci* 1987; 22 : 1093 - 1102

Vannucci RC, Towfigh J, Vannucci SJ: Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: pathologic and metabolic correlates. *J Neurochem* 1998; 71 : 1215 - 1220

Vaughan-Jones RD, Wu M-L: Extracellular H<sup>+</sup> inactivation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in the sheep cardiac purkinje fibre. *J Physiol* 1990; 428 : 441 - 466

Wakabayashi S, Bertrand B, Ikeda T, Pouyssegur J: Mutation of calmodulin-binding site renders the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger (NHE1) highly H<sup>+</sup>-sensitive and Ca<sup>2+</sup> regulation-defective.

*J Biol Chem* 1994; 269 : 13710 - 13715

Wallert MA, Fröhlich O: Alpha1-adrenergic stimulation of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 1992; 263 : C1096 - C1102

Wang Y, Hirai K, Ashraf M: Activation of mitochondrial ATP-sensitive K(+) channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. Circ Res 1999; 85 : 731 - 741

Weih M, Bergk A, Isaev NK, Ruscher K, Megow D, Riepe M, Meisel A, Victorov IV, Dirnagl U: Induction of ischemic tolerance in rat cortical neurons by 3- nitropropionic acid: chemical preconditioning. Neurosci Lett 1999; 272 : 207 – 210

Wu M-L, Min Lih T, Yung-Zu T: DIDS-sensitive pHi regulation in single rat cardiac myocytes in nominally HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> free conditions. Circ Res 1994; 75 : 123 – 132

Xiao X-H, Allen DG: Role of Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger during ischemia and preconditioning in the isolated rat heart. Circ Res 1999; 85 : 723 - 730



## 7. Eigene Veröffentlichungen

Seyfarth M, Bott-Flügel L, Laugwitz KL, Ungerer M, Richardt G, Schömig A:  
Bedeutung des transmembranären pH-Gradienten bei der ischämischen  
Präkonditionierung sympathischer Nervenenden im Rattenherzen. Z Kardiol 1997;  
86 : 87

Seyfarth M, Bott-Flügel L, Laugwitz KL, Ungerer M, Schömig A: Effects of ischemic  
preconditioning on norepinephrine release and ventricular fibrillation are related to a  
transmembranal proton gradient in rat hearts. Circ Res 1999; (in Revision)

Seyfarth M, Bott-Flügel L, Laugwitz KL, Ungerer M, Prinz C: Preconditioning reduces  
drop of intracellular pH during energy depletion in PC12 cells. Circulation 1999; 100 :  
I 134

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Melchior Seyfarth für die Überlassung des Themas sowie die vielen anregenden Diskussionen und tatkräftige Begleitung dieser Arbeit.

Ebenso danke ich Herrn PD Dr. Christian Prinz für die Betreuung und Anleitung bei den Arbeiten am Fluoreszenzmikroskop.

Weiterhin möchte ich insbesondere Frau Sonja Fendt für ihre ständige Hilfe und Unterstützung vor allem während des experimentellen Teils der Arbeit danken.

Dieser Dank gebührt auch allen anderen Mitarbeitern des Katecholaminlabors.