

Aus dem
Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Prof. Dr. med. J. Schrader

Einfluss des Natrium-Protonen Austauschers (NHE-1) auf myo-
kardiale Funktion und intrazellulären pH in Ischämie und Reper-
fusion – NMR-spektroskopische Untersuchungen am isoliert per-
fundierten Meerschweinchenherzen

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
vorgelegt von

Lars Vogler

2007

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Nürnberg, Dekan

Referent: Prof. Dr. U.K.M. Decking

Korreferent: Prof. Dr. J. Fischer

Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Decking, UK., Vogler, L., Hartmann M. et al.

Multinuclear MR-spectroscopy on ion-homeostasis and energetics during ischemia and reperfusion.

MAGMA (Netherlands) (2000), 11: 3-4.

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Überblick	1
1.2. Regulation des intrazellulären pH in Ischämie und Reperfusion	1
1.3. Kardioprotektion durch Inhibition des Na ⁺ -H ⁺ -Austauscher	3
1.4. Fragestellung dieser Arbeit	5
2. Material und Methoden	6
2.1. Präparation	6
2.2. Das Herzmodell	6
2.3. Perfusion	9
2.3.1. Perfusionsmedien	9
2.3.2. Der Hemmer des Natrium-Protonen-Austauschers Eniporide	10
2.4. Allgemeiner Versuchsablauf	10
2.5. Versuchsreihen	11
2.5.1. NH ₄ Cl- Prepulse Versuche	11
2.5.2. Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration	12
2.5.3. pH - Messungen und Kardioprotektion	13
2.6. Kernresonanzspektroskopie	14
2.6.1. ³¹ P-Phosphor-NMR-Spektroskopie	14
2.6.2. ²³ Na-Natrium-NMR-Spektroskopie	16
2.7. Laktatbestimmung	18
2.8. Phosphatbestimmung	19
2.9. Auswertung	19
3. Ergebnisse	20
3.1. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des NHE-1 Inhibitors Eniporide am Meerschweinchenherzen	20

3.2.	Intrazelluläre Natriumkonzentration in Ischämie und Reperfusion	24
3.3.	Einfluss der NHE-Blockade durch Eniporide auf intrazellulären pH, linksventrikuläre Funktion und Energiestatus in Ischämie und Reperfusion	26
3.3.1.	Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer	27
3.3.2.	Perfusion mit substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer	33
3.3.3.	Perfusion mit Hepes-Puffer	41
4.	Diskussion	47
4.1.	Das Versuchsmodell	48
4.2.	Wirksamkeit der Inhibition von NHE-1 durch Eniporide	49
4.3.	Intrazelluläre Natriumakkumulation in Ischämie	50
4.4.	Intrazellulärer pH in Ischämie und Reperfusion	53
4.4.1.	NHE-1 und NBC in Ischämie und Reperfusion	53
4.4.2.	Monocarboxylate-Protonen-Transporter in Ischämie und Reperfusion	56
4.4.3.	Zusammenfassung	57
4.5.	Kardioprotektion durch Inhibition des Na ⁺ -H ⁺ -Austauschers durch Eniporide in Ischämie und Reperfusion	58
4.6.	Ausblick	63
5.	Zusammenfassung	66
6.	Literaturverzeichnis	67
7.	Danksagung	81

1. Einleitung

1.1. Überblick

In den letzten beiden Jahrzehnten des 20. Jahrhunderts wurde eine Vielzahl von Studien initiiert, die die Pathomechanismen, die zur myokardialen Schädigung in Ischämie und Reperfusion führen, untersuchten. Ziel dieser Arbeiten war es, durch das bessere Verständnis der Pathophysiologie auf zellulärer Ebene möglicherweise neue therapeutische Strategien im Rahmen der Herzinfarkttherapie, aber auch der Kardiochirurgie zu entwickeln.

Patienten, die einen Myokardinfarkt erleiden, werden heutzutage entweder thrombolytisch oder primär angioplastisch behandelt (Allen und Xiao, 2002). Allerdings müssen diese Verfahren frühzeitig nach Eintreten des Infarkts einsetzen, um eine optimale Wirkung zu entfalten (Zijlstra et al., 2002).

Bei einer kurz andauernden Ischämie ist der Ischämie-Reperfusionsschaden noch reversibel. Studien an isolierten Herzen verschiedener Spezies konnten deutlich zeigen, dass die Schädigung des Myokards nach länger dauernder Ischämie und Reperfusion nur unvollständig reversibel ist. Es konnte gezeigt werden, dass wiederholte kurze Ischämien („Preconditioning“) des Herzens die Erholung der Funktionalität nach längerer Ischämie verbesserten (Murry et al., 1986). Darüber hinaus konnte ein kardioprotektiver Effekt im Rahmen von Ischämie-Reperfusionen-Studien auch für die Inhibition des Natrium-Protonen-Austauschers am Herzen (NHE-1) nachgewiesen werden (Menown und Adgey, 2001).

1.2. Regulation des intrazellulären pH in Ischämie und Reperfusion

Die Aufrechterhaltung eines physiologischen intrazellulären pH (pH_i) gewährleistet zum einen die intrazelluläre Protonenpufferung durch zytosolische Proteine und das CO_2 - HCO_3^- -System (Roos und Boron, 1981), zum anderen sind sarkolemmale Transportproteine (Sun et al., 1996) von entscheidender Bedeutung zur Aufrechterhaltung und Wiederherstellung

eines physiologischen pH_i nach intrazellulärer Azidose oder Alkalose. Der $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Transporter (NHE-1) und der $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Transporter (NBC) sind für den Efflux von Protonen von entscheidender Bedeutung; der $\text{Cl}^-\text{-HCO}_3^-$ und der $\text{Cl}^-\text{-OH}^-$ -Austauscher vermitteln indirekt die Aufnahme von Säureäquivalenten in die Zelle durch Auswärtstransport von Basen (Leem et al., 1999, Lagadic-Gossmann et al., 1992). Außerdem wird das durch eine in Ischämie hohe Glykolyseaktivität gebildete Laktat durch den Monokarboxylat-Protonen-Transporter (MCT) aus der Zelle transportiert (Poole und Halestrap, 1993). Auch ein transmembranärer $\text{K}^+\text{-H}^+$ -Austauscher wurde am Myokard des Meerschweinchens identifiziert (Nagashima et al., 1999). Die Aktivität der Transportproteine ist abhängig vom intrazellulären pH (Leem et al., 1999). Während die Aktivität von NHE-1 bei einem pH_i von 7,2 oder mehr sehr gering ist, erreicht sie bei einem pH_i von 6,5 oder weniger ihr Maximum (Kaila und Vaughan-Jones, 1987).

Insgesamt sind in der Literatur bis heute 7 verschiedene Subtypen des Natrium-Protonen-Austauschers identifiziert (NHE 1-7). NHE-6 und NHE-7 sind an Endosomen und dem Golgiapparat lokalisiert, während die anderen Subtypen NHE-1 bis -5 zellmembranständig sind (Masereel et al., 2003). Im Herzen ist der NHE-1 das dominierende Transportprotein (Orlowski et al., 1992). Der NHE-1 arbeitet mit einer 1:1 Stöchiometrie, das heißt, dass für jedes Proton ein Natrium in die Zelle aufgenommen wird, das abgegeben wird (Pieske und Houser, 2003). Im Rahmen einer myokardialen Ischämie steigt die intrazelluläre Protonenkonzentration an. Der Stöchiometrie des NHE-1 folgend konnte in verschiedenen Untersuchungen eine Steigerung der intrazellulären Natriumkonzentration in Ischämie (Xiao and Allen, 1999; Hartmann und Decking, 1999) gezeigt werden.

Die Inhibition des NHE-1 führt zu einer signifikanten Reduktion der intrazellulären Natriumakkumulation in Ischämie. NHE-1 ist somit wesentlich an der intrazellulären Ionenhomöostase in Ischämie und Reperfusion beteiligt (Masereel et al., 2003; Wakabayashi et al., 1997; Orlowski et al., 1992). Konsequenterweise wäre auf Grund der Stöchiometrie des Transporters bei NHE-Blockade eine verminderte Protonenextrusion zu erwarten mit entsprechend stärkerem pH_i Abfall in Ischämie. Interessanterweise konnte dieser Effekt unter Verwendung von bikarbonathaltigen Perfusionsmedien bis-

her nur in einzelnen Arbeiten nachgewiesen werden (Ten Hove et al., 2005 (Cariporide); Bauza et al., 1995 (EIPA)), während in den meisten Untersuchungen ein signifikanter Unterschied im intrazellulären pH-Abfall unter Inhibition von NHE-1 in Ischämie fehlte (Knight et al., 2001; Strömer et al., 2000; Hartmann und Decking, 1999; Rehring et al., 1998; Myers et al., 1995; Murphy et al., 1991).

Daten hierzu unter Verwendung des selektiven NHE-1-Inhibitors Eniporide liegen in der Literatur bisher nicht vor.

1.3. Kardioprotektion durch Inhibition des Na⁺-H⁺-Austauschers

In vielen -vor allem tierexperimentellen Untersuchungen- konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des Na⁺-H⁺-Austauschers (NHE) am Herzen durch verschiedene Substanzen (Cariporide, Zoniporide) in Ischämie und Reperfusion einen kardioprotektiven Effekt hat (Ten Hove, 2005; Avkiran und Marber, 2002; Avkiran, 2001; Knight et al., 2001; Yoshida und Karmazyn, 2000; Rupprecht et al., 2000; Hartmann und Decking, 1999; Humpreys et al., 1999). Außerdem konnte in verschiedenen Untersuchungen nachgewiesen werden, dass die NHE-Inhibition der Entwicklung einer myokardialen Hypertrophie und Herzinsuffizienz entgegenwirkt (Aker et al., 2004; Chen et al., 2004; Loennechen et al., 2002; Kusumoto et al., 2001).

Ein wesentlicher pathophysiologischer Erklärungsansatz ist, dass es als Folge der intrazellulären Natriumakkumulation in Ischämie zu einer Verlangsamung der Aktivität des Na⁺-Ca²⁺-Austauschers (NCX) beziehungsweise zu einer Umkehr des Transportes kommt. Zwar ist der NCX im Rahmen der physiologischen Depolarisation bereits am Kalzium-Influx beteiligt, jedoch dauert dieser entsprechend der physiologischen Erregungsleitung im gesunden Myokard nur kurz an, bevor der NCX Kalzium aus der Zelle transportiert. In Ischämie kommt es durch zwei wesentliche Faktoren zu einer Umkehr des NCX. Einerseits vermindert die in Ischämie zunehmende Depolarisation die elektrische Triebkraft des elektrogenen NCX, andererseits führt der Anstieg des intrazellulären Natriums zu einer Verringerung

des Natriumgradienten. Kalzium wird in der Folge in die Zelle transportiert und Natrium aus der Zelle entfernt.

Eine Überladung der Zelle mit Ca^{2+} entsteht. Es entwickelt sich eine Hyperkontraktur und die Schädigung des Myokards in Reperfusion wird verstärkt (Pierce und Czubert, 1995; Tani, 1990).

Die verfügbaren Daten bezüglich der kardioprotektiven Wirkung von Eniporide, einem selektiven NHE-1-Inhibitor sind kontrovers. Gumina und Mitarbeiter konnten in Versuchen an Hunden sowohl eine Limitierung der Infarktgröße (Gumina et al., 1998) als auch eine verbesserte endotheliale Funktionserhaltung nach Ischämie und Reperfusion (Gumina et al., 2001) unter NHE-1 Inhibition durch Eniporide feststellen. Cox und Mitarbeiter zeigten, dass die Inhibition des NHE-1 durch Eniporide die Entstehung eines myokardialen Ödems unmittelbar nach kardiopulmonaler Bypass-Operation mit zweistündiger Kardioplegie bei Hunden verringert und die kardiale Funktion verbessert (Cox et al., 2003 und 2002). Stowe und Kollegen konnten einen protektiven Effekt der NHE-1 Inhibition durch Eniporide im Rahmen einer 6-stündigen Kaltlagerung und Kardioplegie am Meerschweinchenherzen nachweisen (Stowe et al., 2002). Andererseits fehlten die zu erwartenden positiven Effekte auf die kardiale Funktionsfähigkeit sowohl in einer großen klinischen Studie (Zeymer et al., 2001) als auch in einer Versuchsreihe am kardioplegen Schweineherzen (Klass et al., 2004).

Neben dem NHE-1 spielt der $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Kotransporter eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung der Ionenhomöostase. So wurde die Bedeutung des $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Kotransportes in Ischämie sowohl an isolierten Herzmuskelzellen (Schäfer et al., 2000) als auch an isoliert perfundierten Herzen untersucht. In Untersuchungen an isoliert perfundierten Herzen führte die Blockierung des Transportproteins zu keiner kardioprotektiven Wirkung, allerdings zeigte sich eine verstärkte kardioprotektive Potenz bei gleichzeitiger Inhibition des NHE-1 und des NBC (Bauza, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche kardioprotektive Wirkung von Eniporide zum einen durch Aufzeichnung des linksventrikulär entwickelten Druckes, zum anderen durch die Analyse der energiereichen Phosphate mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie unter bikarbonathaltiger und bikarbonatfreier Perfusion untersucht.

1.4. Fragestellung dieser Arbeit

Zunächst sollte in dieser Arbeit der Nachweis erbracht werden, dass Eniporide (Merck®) den $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher in Ischämie und Reperfusion am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen wirksam inhibiert. Dazu wurde einerseits die Wirkung von Eniporide auf den intrazellulären pH unter Verwendung der NH_4Cl -Prepulse-Technik untersucht. Andererseits wurde die ^{23}Na -NMR-Spektroskopie eingesetzt, um die intrazelluläre Natriumakkumulation in Ischämie zu analysieren und den Effekt von Eniporide hierauf zu belegen.

Darüber hinaus sollten die verschiedenen gewählten Versuchsreihen einen Beitrag zum besseren Verständnis der Regulation des intrazellulären pH in Ischämie und Reperfusion leisten. Hierzu wurden in dieser Arbeit verschiedene Modelle eingesetzt, in denen unter selektiver Inhibition des NHE-1 durch Eniporide (Merck®) die Bedeutung anderer Protonenaustauschsysteme untersucht werden konnte.

Zur Unterdrückung der HCO_3^- -abhängigen Transportproteine wurde eine bikarbonatfreie Perfusion mit HEPES-Puffer verwendet.

Die Bedeutung des Monocarboxylat- H^+ -Transporters, der Laktat und Protonen aus der Zelle entfernt (Dennis et al., 1991) ist in vivo am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen bisher nicht ausreichend untersucht. Seine Bedeutung für die Regulation des pH_i in Ischämie und Reperfusion ist wenig verstanden. In diesen Versuchen wurde eine substratfreie präischämische Perfusion durchgeführt, um so die Laktatbildung in Ischämie durch anaerobe Glykolyse durch vorherige Glykogenepletion zu reduzieren.

Sowohl zur Bestimmung des intrazellulären pH als auch zur Analyse der energiereichen Phosphate in vivo in Ischämie und Reperfusion wurde die ^{31}P -NMR-Spektroskopie eingesetzt. So sollte versucht werden, ein besseres Verständnis für die zum Teil sehr divergierenden Ergebnisse in der Literatur zu erhalten. Darüberhinaus sollten die Auswirkung der Ionenhomöostase auf den pH sowie die kardioprotektiven Eigenschaften von Eniporide in diesem Zusammenhang näher untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Präparation

Für die Arbeit wurden in getrennten Versuchsreihen Meerschweinchen mit einem mittleren Gewicht von 390 g verwendet. Bei den Meerschweinchen erfolgte die Tötung durch zervikale Dislokation. Anschließend wurde die A. carotis links eröffnet. Es folgten die Eröffnung des Abdomens und eine Thorakotomie. Unter kontinuierlicher Kühlung mit physiologischer Kochsalzlösung wurde das Herz freipräpariert und unter Mitnahme des Perikards und der Aorta ascendens entnommen. Das Herz wurde in gekühlte physiologische Kochsalzlösung hinein gegeben und dort vorsichtig mehrfach durchspült. Die Aorta wurde kanüliert und ligiert und es wurde umgehend mit der retrograden Perfusion in Langendorff-Technik (Langendorff, 1895) begonnen. Hierdurch kommt es zu einem Schluss der Aortenklappe, in deren Folge das Perfusat über die Koronararterien fließen muss, bevor es über den Sinus coronarius und die Koronarvenen das Herz verlässt.

Nun wurden das Perikard sowie nach der Präparation noch vorhandene Lungengewebsreste entfernt. Der linke Vorhof wurde eröffnet und ein luftblasenfrei mit Wasser gefüllter Latexballon in den linken Ventrikel eingeführt. Dessen Form und Größe war dem Volumen der Meerschweinchenherzen angepasst. Der Ballon war mit einem Druckaufnehmer verbunden. Es wurde ein enddiastolischer Druck von 10 mmHg eingestellt.

2.2. Das Herzmodell

Zur Durchführung der Experimente wurde ein etabliertes Herzmodell (Decking et al., 1998; Hartmann et al., 1998) verwendet, das es ermöglichte, am schlagenden Herzen ^{31}P - und ^{23}Na - Kernresonanzspektroskopie durchzuführen. Hierzu musste das Perfusionssystem in einem 9,4 Tesla-NMR-Magneten (Bruker AMX 400) mit 49 mm Innendurchmesser untergebracht werden. Das Herz selbst war im Anschluss an die Präparation in ein NMR-Röhrchen mit einem Außendurchmesser von 20 mm einge-

bracht und so fixiert worden, das es im optimalen Messbereich des Magneten hing.

Der zur Perfusion des Herzens verwendete oxygenierte Puffer wurde aus einer Glasflasche über ein Schlauchsystem zunächst in eine Blasenfalle geleitet. Von dort führte das Schlauchsystem zum Herzen. Es wurden gasdichte Schläuche verwendet (Tygon R3603 und Viton, USA), die gerade lang genug waren, damit das Herz im NMR-Gerät platziert werden konnte.

Die Perfusion erfolgte unmittelbar nach der Präparation druckkonstant, wobei der Druck durch eine Wassersäule, die an den Vorratsbehälter angeschlossen wurde, eingestellt werden konnte. In der eigentlichen Versuchsphase wurde das Herz flusskonstant mittels einer Rollenpumpe (Masterflex) perfundiert. Der sich nun einstellende Perfusionsdruck wurde aufgezeichnet.

Alle Versuche wurden bei einer Temperatur von 37° Celsius durchgeführt. Zur Gewährleistung dieser Temperatur wurde die den Puffer enthaltende Glasflasche in ein auf 37° Celsius beheiztes Wasserbad gestellt. Das gesamte Schlauchsystem war darüber hinaus von temperierten Silikonschläuchen sowie einem 1 cm dicken Schaumstoffschlauch zur Wärmeisolierung umgeben. Der Bereich des Magneten, in dem die Messungen erfolgten, war mittels eines Heizstabes, der in die Spule eingeführt wurde, ebenfalls auf 37° Celsius erwärmt.

Das koronarvenöse Effluat wurde kontinuierlich durch eine Rollerpumpe abgesaugt, so dass das Herz während der Messungen von einem konstanten Volumen umgeben war.

Der koronare Perfusionsdruck wurde mittels eines Druckaufnehmers registriert, der an die aortale Perfusionskanüle angeschlossen war. Mittels eines Ultraschall-Flowmeters (Transonics), welches in das zur Aortenkanüle führende Schlauchsystem integriert war, wurde der Fluss (ml/min) gemessen, der bei geschlossener Aortenklappe dem koronaren Fluss entspricht. Zur Herzfrequenzstimulation wurden zwei KCl-Agar-Elektroden (3 M) verwendet, von denen eine vorsichtig tangential in den linken Ventrikel gestochen wurde. Die zweite Elektrode hing frei etwa 1 cm oberhalb des Herzens im salinen Effluat.

Meerschweinchenherzen wurden mit einer Frequenz von 300 min^{-1} elektrisch gereizt.

Die Aufzeichnung des Perfusionsdruckes (mmHg), der Flussrate (ml/min) sowie des wie oben beschrieben bestimmten linksventrikulären Druckes (mmHg) erfolgte mit einem Thermoschreiber (TA4000, Gould). Dieser zeichnete zusätzlich die aus dem entwickelten Druck abgeleitete Herzfrequenz (1/min) auf.

Die Applikation der in den Versuchen verwendeten Substanzen erfolgte als seitenständige Infusion mittels Perfusorpumpen (Precidor, Infors AG, Basel).

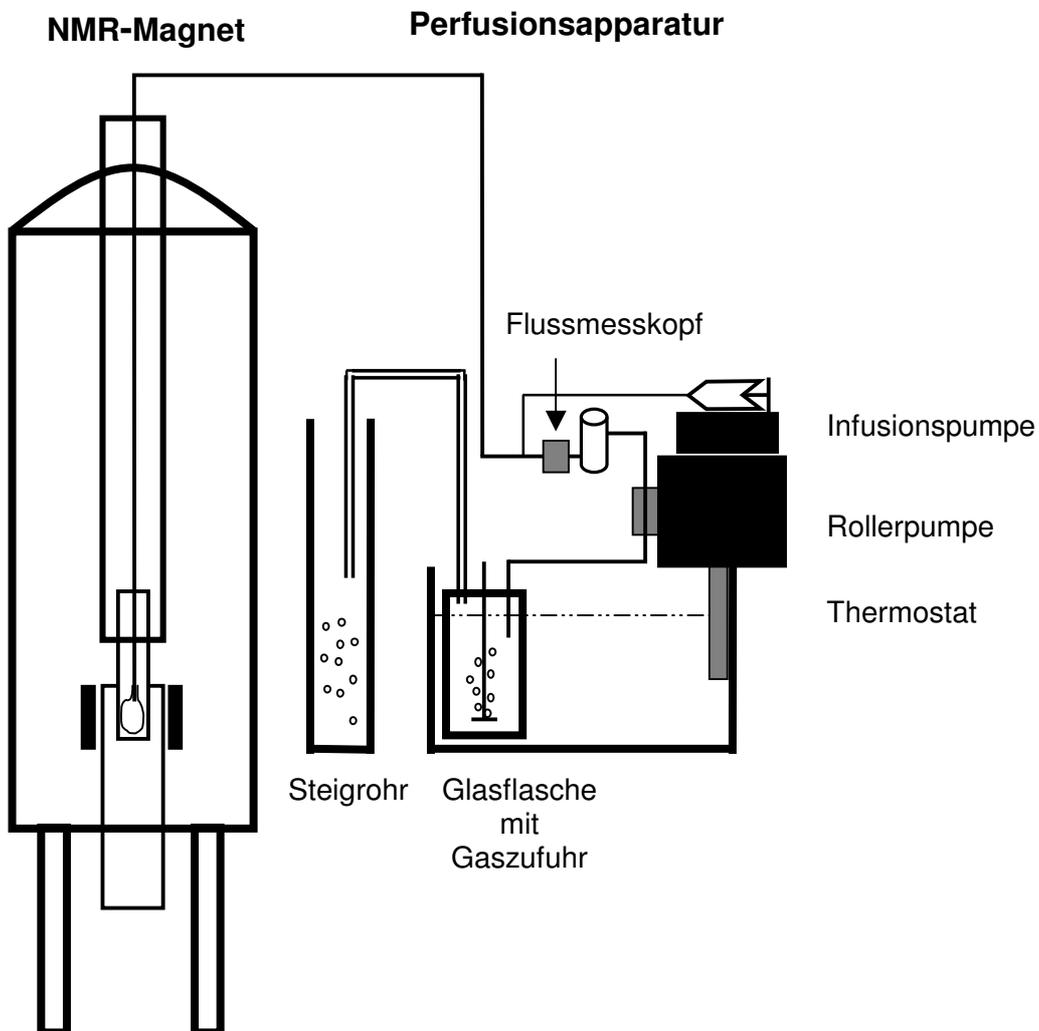


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Versuchsanlage

2.3. Perfusion

2.3.1. Perfusionsmedien

Für die Versuche wurden in getrennten Versuchsreihen insgesamt 3 verschiedene Perfusionsmedien verwendet. Im Einzelnen waren dies ein modifizierter Krebs-Henseleit-Puffer (Krebs-Henseleit, 1932), dem in einer weiteren Versuchsreihe das Substrat entzogen war, sowie ein modifizierter Hepes-Puffer (nach Nakanishi et al., 1992). Die genaue Zusammensetzung der Puffermedien ist in Tabelle 1 zusammengefasst.

Modifizierter Krebs-Henseleit Puffer		Substratfreier Krebs-Henseleit Puffer		Modifizierter Hepes-Puffer	
NaCl	116,0 mM	NaCl	116,0 mM	NaCl	142,0 mM
KCl	4,6 mM	KCl	4,6 mM	KCl	4,6 mM
MgSO ₄	1,1 mM	MgSO ₄	1,1 mM	MgSO ₄	1,1 mM
NaHCO ₃	24,9 mM	NaHCO ₃	24,9 mM	Hepes	5,0 mM
KH ₂ PO ₄	1,2 mM	KH ₂ PO ₄	1,2 mM	KH ₂ PO ₄	1,2 mM
CaCl ₂	2,5 mM	CaCl ₂	2,5 mM	CaCl ₂	2,5 mM
Glucose	8,3 mM			Glucose	8,3 mM
Pyruvat	2,0 mM			Pyruvat	2,0 mM

Tabelle 1 : Zusammensetzung der Puffermedien¹

Beide Krebs-Henseleit-Puffer wurden mit einem Gasgemisch aus 95% Sauerstoff und 5% Kohlendioxid begast. Der Hepes-Puffer wurde mit reinem Sauerstoff begast. Die Puffer wurden anschließend auf 37° Celsius erwärmt. Der pH der Pufferlösungen betrug 7,4 in allen Experimenten.

¹ Ausgleichende Veränderungen des Krebs-Henseleit-Puffers in den Versuchen zur Natriummessung sind dort beschrieben (siehe Kapitel 2.5.2.)

2.3.2. Der Hemmer des Na⁺-H⁺-Austauschers Eniporide:

Der in den Versuchen eingesetzte Inhibitor des Natrium-Protonen-Austauschers EMD 96785, Eniporide, wurde freundlicherweise von der Firma Merck KGaA, Deutschland, zur Verfügung gestellt.

Der chemische Name ist 2-Methyl-5-(methylsulfonyl)-4-pyrrolobenzoyl)-guanidine.

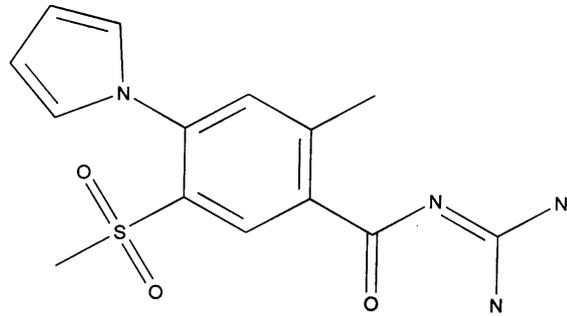


Abbildung 2: Chemische Struktur von Eniporide

Das Salz wurde zur Herstellung einer 1 mM Stammlösung in DMSO gelöst. In den jeweiligen Versuchen konnte dann durch Regulation der Infusionsrate einer seitenständigen Infusion die gewünschte Konzentration eingestellt werden.

2.4. Allgemeiner Versuchsablauf

Die wie oben beschrieben präparierten Herzen wurden in den Magneten eingebracht. Vor der eigentlichen Experimentalphase gab es eine Einschlagphase, die etwa 30-40 Minuten dauerte und der Stabilisierung der kardialen Funktion diente. Am Ende hatten sowohl der Fluss als auch der linksventrikulär entwickelte Druck ein konstantes Niveau erreicht. Während dieser Zeit wurden die Herzen druckkonstant mit einem mittleren Druck von 70 mmHg perfundiert. Nach der Einschlagphase erfolgte die Umstellung auf einen konstanten Fluß. Dieser entsprach dem am Ende der Einschlagperiode erreichten Fluß und betrug im Mittel 14 ± 2 ml/min.

Zwar entspricht die druckkonstante Perfusion des Langendorff-Herzens eher den physiologischen Bedingungen, jedoch ermöglicht die flusskonstante Perfusion die genauere Applikation von pharmakologischen Substanzen (Döring et al., 1990).

Zu Beginn der Experimentalphase wurden in allen Versuchen Referenzspektren unter Kontrollbedingungen aufgenommen. Erst danach wurden die Bedingungen den Versuchsreihen entsprechend verändert.

2.5. Versuchsreihen

2.5.1. NH_4 -Prepulse-Versuche

In dieser Versuchsreihe wurde die Auswirkung von Eniporide auf den Ausgleich einer intrazellulären Azidose untersucht. Hierzu wurde die NH_4Cl -Prepulse-Technik angewandt (Thomas, 1984). Durch eine 15 Minuten andauernde NH_4Cl -Infusion in einer Konzentration von 10 mM kommt es zu einer intrazellulären Akkumulation von NH_3 und NH_4^+Cl^- . Beendet man die Infusion, diffundiert NH_3 sehr schnell aus der Zelle hinaus, Protonen bleiben in der Zelle. Der so entstandene intrazelluläre Protonenüberschuss kann durch die der Zelle zur Verfügung stehenden pH_i -Regulationsmechanismen nicht umgehend ausgeglichen werden. Es entwickelt sich eine intrazelluläre Azidose.

Die Perfusion erfolgte mit dem oben beschriebenen modifizierten Krebs-Henseleit-Puffer. Alle Versuche begannen mit einer Kontrollphase. Die Herzen wurden zunächst für 15 Minuten perfundiert. Im Anschluss daran wurde eine 1 molare NH_4Cl -Lösung seitenständig in einem Konzentrationsverhältnis von 1/100 für 15 Minuten infundiert. Auf diese Weise konnte eine wirksame Endkonzentration von 10 mM erzielt werden. Es folgte eine 15-minütige Auswaschphase, die die Kontrollphase beendete. Danach begann die Experimentalphase mit der Applikation des NHE-Inhibitors Eniporide für 7 Minuten, bevor zusätzlich NH_4Cl infundiert wurde. Die NH_4Cl -Infusion wurde nach 15 Minuten gestoppt, die Eniporidegabe wurde für 15 Minuten fortgesetzt, um die Auswirkungen des NHE-Inhibitors auf den Ausgleich der intrazellulären Azidose zu untersuchen. Im weiteren Verlauf wurde die Eniporide-Konzentration zweimal gesteigert, so dass in einem Versuch 3 verschiedene Eniporide-Konzentrationen getestet werden konnten. In verschiedenen Versuchsreihen wurde so eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für Eniporide mit Konzentrationen von 10 nM, 100 nM, 1 μM und 10 μM erstellt.

Zur Erfassung der pH-Veränderung wurde die ^{31}P -Phosphor-NMR-Spektroskopie (s. unten) eingesetzt. Das erste Spektrum in der Kontrollphase dauerte 6 Minuten. Danach wurden die Spektren über einen Zeitraum von 3 Minuten aufgenommen. Die Höhe des pH-Abfalls unmittelbar nach Beendigung der Infusion mit NH_4Cl diente als Maß für die Wirksamkeit der Blockade des Natrium-Protonen-Austauschers Eniporide.

2.5.2. Bestimmung der intrazellulären Natriumkonzentration

Im Rahmen der Untersuchungen galt es, die Wirksamkeit von Eniporide weiter zu studieren. Dazu wurde die Auswirkung von Eniporide auf die intrazelluläre Natriumkonzentration in Ischämie untersucht. Zur Messung der Natriumkonzentration wurde die ^{23}Na -Natrium-NMR-Spektroskopie (s. unten) eingesetzt. Zur Differenzierung zwischen intra- und extrazellulärem Natrium wurde neben einer speziellen Aufnahmetechnik, dem Triple-Quantum-Filter, ein sogenanntes Shift-Reagenz eingesetzt (Pike et al., 1990; Navon et al., 1994; Ren et al., 1997). Ein Shift-Reagenz verändert in dem von ihm erfassten Raum durch molekulare Wechselwirkungen die Resonanzfrequenz z.B. der Na^+ -Ionen. In unseren Versuchen verwendeten wir das extrazelluläre Shift-Reagenz $\text{Tm}(\text{DOTP})^{5-}$ [Thulium 1,4,7,10-tetraazacclododecane-1,4,7,10-tetrakis (methylene phosphat)] in einer Konzentration von 4 mM. Da es sich bei dieser Substanz um ein Natriumsalz handelt, welches auch Kalzium bindet, wurden die Natriumkonzentration und Kalziumkonzentration des Krebs-Henseleit-Puffers wie bei Navon et al. (1994) beschrieben angepasst. In bisherigen Versuchsanordnungen befand sich das Herz in einem Reagenzglas, in das kontinuierlich das koronarvenöse Effluat abgegeben wurde und das Herz umspülte. Da das extrazelluläre Effluat viel Natrium enthält, beeinflusst es trotz Shift-Reagenz ganz entscheidend die Qualität der Erfassung des intrazellulären Natriums mittels ^{23}Na -NMR-Spektroskopie. Zur Reduktion der extrakardialen natriumhaltigen Flüssigkeit wurde das Herz in einen ausreichend großen Ballon aus nicht permeablem Material platziert und das anfallende koronarvenöse Effluat kontinuierlich oberhalb des Herzens aus dem Ballon abgesaugt. Ballon mit

Herz wurden in ein mit Aqua dest. gefülltes Reagenzglas getaucht, welches auf 37° C erwärmt war („Handschuhtechnik“).

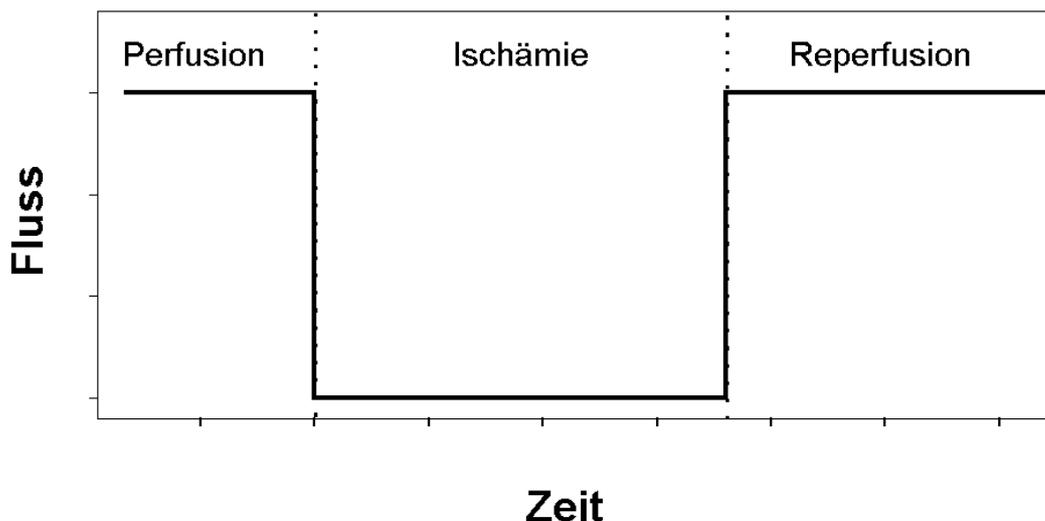
Nach einer ausreichenden Einschlagphase wurde für 20 Minuten mit Tm(DOTP)⁵⁻ perfundiert. Anschließend wurde der Zufluss zum Herzen vollständig unterbrochen, und es wurde die intrazelluläre Natriumkonzentration während einer 60-minütigen Ischämie untersucht. In der Experimentalgruppe wurde 10 Minuten vor Beginn der totalen Ischämie Eniporide seitenständig in einer Konzentration von 1µM infundiert.

Es wurden im Wechsel ²³Na-NMR-Single-Quantum und Triple-Quantum Spektren aufgezeichnet. Auf den Grund des Einsatzes dieser speziellen Aufnahmetechnik wird in Kapitel 2.6.1 näher eingegangen. Die Dauer der Spektren betrug jeweils 2 Minuten.

2.5.3. pH-Messungen und Kardioprotektion

In dieser Versuchsreihe wurden die Auswirkung von Eniporide auf den intrazellulären pH sowie eine mögliche Kardioprotektion in Ischämie und Reperfusion unter Verwendung verschiedener Perfusionsmedien untersucht. In Abbildung 3 wird der allgemeine Versuchsablauf schematisch dargestellt.

Abbildung 3: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs



Es wurden drei verschiedene Pufferlösungen eingesetzt: Krebs-Henseleit-Puffer, substratfreier Krebs-Henseleit-Puffer und Hepes-Puffer.

Zur Bestimmung des intrazellulären pH wurde die ^{31}P -Phosphor-NMR-Spektroskopie eingesetzt. Die Aufnahmezeit der Spektren betrug 3 Minuten. An die Aufzeichnung von 2 Referenzspektren im Anschluss an die Einschlagphase folgte eine 12-minütige Kontrollphase bzw. Eniporidegabe.

In den Versuchen mit substratfreiem Krebs-Henseleit- und Hepes-Puffer folgte nun eine Ischämie für 30 Minuten. Die Ischämie in den Versuchen mit normalem Krebs-Henseleit Puffer dauerte 36 Minuten, da es in Vorversuchen nach 30 Minuten zu einer vollständigen Funktionserholung auch in der Kontrollgruppe kam und daher keine Aussage über eine mögliche Kardioprotektion unter Eniporide möglich gewesen wäre.

Alle Versuche endeten mit einer 30-minütigen Reperfusion.

2.6. Kernresonanzspektroskopie

Die in den verschiedenen Versuchsreihen aufgenommenen Spektren wurden mit einem gepulsten Kernresonanzspektrometer AMX 400 WB (Bruker, Deutschland) in einem 9,4 Tesla supraleitenden Magneten (Spectrospin, Switzerland) aufgenommen. Die Einstellung eines möglichst homogenen Magnetfeldes erfolgte über die Variation des Stroms in den Shim-Spulen und Optimierung des „freien Induktionsabfall“ (FID, free induction decay) der Wasserstoffprotonen. Dabei wurde eine Breite des Protonenresonanzpeaks in halber Signalhöhe von 23 ± 9 Hz erreicht.

2.6.1. ^{31}P -Phosphor-NMR-Spektroskopie

Es wurde ein beheizbarer 20 mm ^{31}P -Probenkopf (Bruker) verwendet. Die Temperatur wurde mit einem Bruker Eurotherm K Temperatur Controller in allen Versuchen auf $37,0 \pm 0,3^\circ\text{C}$ eingestellt. Jedes Spektrum war das Ergebnis von 64 Einzelscans. Die Pulsdauer betrug 58 μs , was einem Auslenkungswinkel von 70° entsprach. Es wurden 2048 Einzeldatenpunkte über einen Spektralbereich von 35 ppm erhoben.

Die Spektren wurden am PC mittels des Programmes WinNMR ausgewertet. Dabei wurden folgende Arbeitsschritte durch das Programm automa-

tisch ausgeführt: Fouriertransformation, exponentielle Multiplikation (10 Hz Linienverbreiterung), Basislinienkorrektur und Phasierung. Durch diesen Prozess ergibt sich ein Spektrum, in dem die Phosphatmoleküle als Peaks im Bereich der jeweiligen spezifischen Resonanzfrequenzen erscheinen (siehe Abbildung 4).

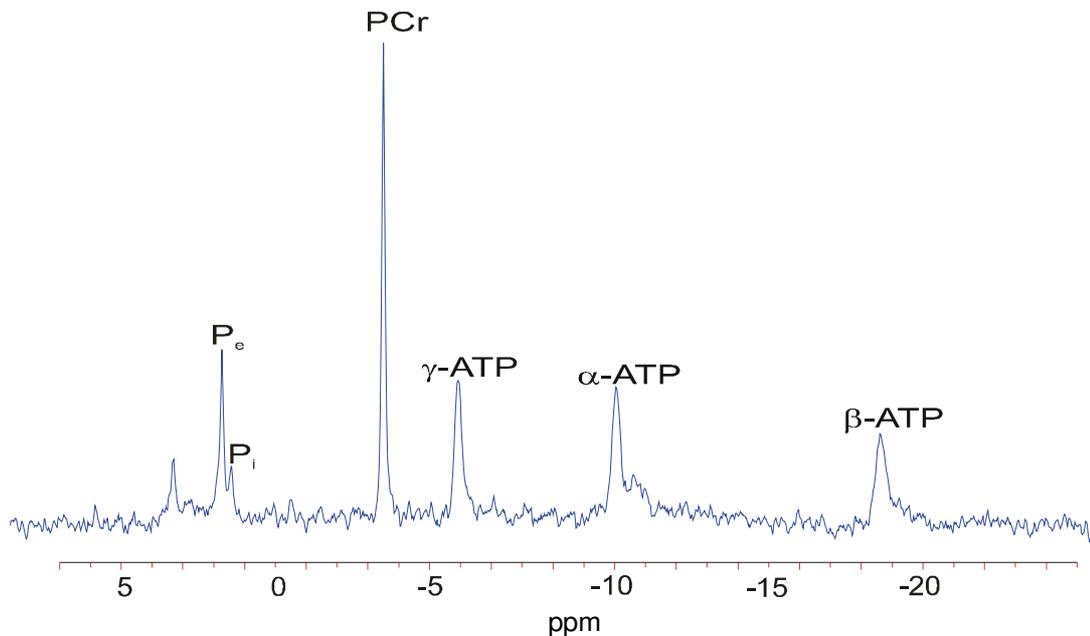


Abbildung 4: Repräsentatives Phosphorspektrum. P_e/P_i = extra/intrazelluläres anorganisches Phosphat, PCr = Kreatinphosphat und die drei Phosphatpeaks des ATP (α -, β -, γ -ATP).

Als Maß für die freie Konzentration der entsprechenden Phosphatverbindungen kann das Peakintegral gelten. Dieses Integral wurde durch eine manuell gesteuerte Integration der unter der Kurve liegenden Flächen abgeschätzt. Die Veränderung des Peakintegrals innerhalb eines Versuches ist proportional zur Änderung der Konzentration der zu untersuchenden Phosphatverbindung. Da teilrelaxierte Spektren keinen Rückschluß auf die eigentliche Konzentration erlauben, da hierbei gleichen Flächen durchaus unterschiedliche Konzentrationen zugrunde liegen können, wurden die jeweiligen Flächen in Relation zu den zu Beginn der Versuche aufgezeichneten vollrelaxierten Spektren gesetzt. Die relativen Änderungen der Flächen ermöglichten somit die Berechnung der zytosolischen ATP-, Kreatinphosphat- und anorganischen Phosphatkonzentration. Zu Beginn der Experimente wurde eine freie ATP-Konzentration von 6,93 mM angenommen.

Zur Berechnung des intrazellulären pH-Wertes wurde die chemische Verschiebung („ δ “) des intrazellulären anorganischen Phosphatpeaks zum Kreatinphosphatpeak genutzt.

Nach Petroff et al. berechnet sich der pH-Wert dann aus folgender Gleichung:

$$(1) \text{ pH} = 6,78 + \log [(\delta - 3,29) / (5,68 - \delta)]$$

2.6.2. ²³Natrium-NMR-Spektroskopie

In den Versuchen zur Natriummessung wurde ein speziell angefertigter 20 mm Probenkopf (Fraunhofer Institut St. Ingbert, Deutschland) benutzt, der für die Natriumspektren auf eine Frequenz von 105,84 MHz eingestellt wurde. Zur getrennten Darstellung des intra- und extrazellulären Natriumsignals wurde letzteres mittels des Shift-Reagenz Tm(DOTP)-5 chemisch verschoben. Darüber hinaus wurde die sogenannte Triple-Quantum-Filter Technik (Navon et al., 1994) zur Unterdrückung des Signals des extrazellulären Natriums eingesetzt. Auf diese Weise konnte die niedrige intrazelluläre Natriumkonzentration des Meerschweinchenherzens sensitiv erfasst werden. In jedem Experiment wurde zunächst der 90° Puls bestimmt (etwa 91 μ s). Es wurden ebenfalls 1024 Datenpunkte erfasst und nach Fouriertransformation über einen Frequenzbereich von 22 ppm als Spektrum abgebildet. Während der Prozessierung wurde eine exponentielle Multiplikation mit einer Linienverbreiterung von 10 Hz durchgeführt. Abbildung 5 zeigt ein repräsentatives Single-Quantum ²³Na-Spektrum eines isoliert perfundierten Meerschweinchenherzens vor und nach Perfusion mit dem Shift-Reagenz Tm(DOTP)⁵⁻.

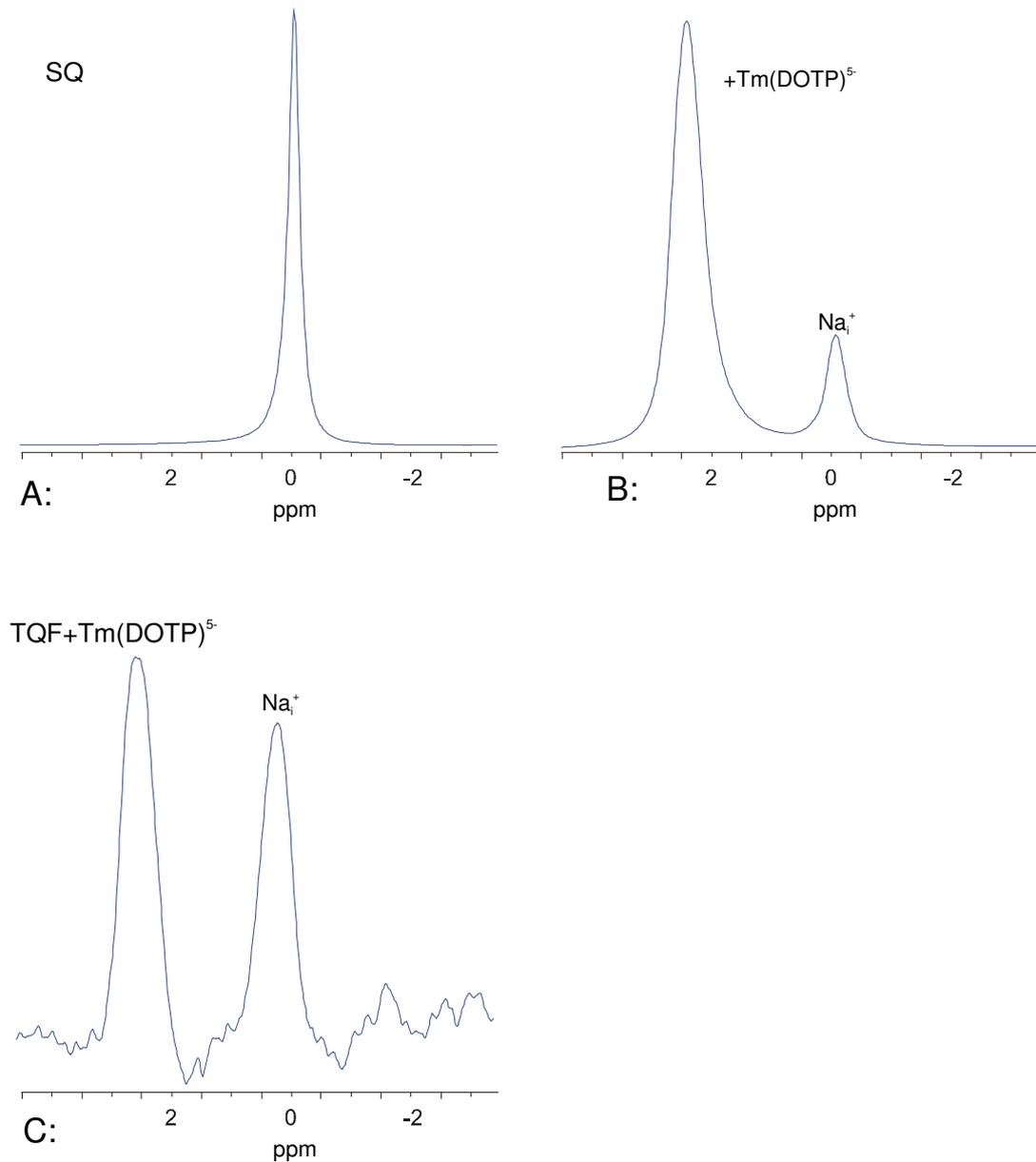


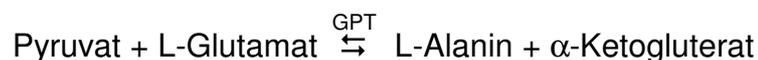
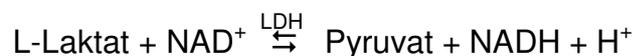
Abbildung 5: Repräsentative ^{23}Na -NMR-Spektren eines isoliert perfundierten Meer-schweinchenherzens. Das erste Spektrum (A) ist ohne Shift-Reagenz, das zweite (B) mit und das dritte (C) mit Shift-Reagenz und Triple-Quantum-Filter Technik aufgenommen worden. Diese Technik unterdrückt das Signal der extrazellulären Fraktion des Natriums mit konsekutiver Erhöhung der Sensitivität bezogen auf das intrazelluläre Natrium.

Vergleicht man dieses Single-Quantum-Spektrum mit solchen früherer Untersuchungen (Decking et al., 1998) wird deutlich, dass die in Kapitel 2.5.2. beschriebene Verringerung der extrakardialen Flüssigkeit die Qualität der Single-Quantum-Spektren bezüglich ihrer Sensitivität für das intrazelluläre Natrium verbessern konnte. Durch die Reduktion der extrazellulären Natriumkonzentration verringert sich die Fläche des entsprechenden Peaks mit

der Folge, dass nach Einsatz des Shiftreagenz der deutlich kleinere Peak des intrazellulären Natriums entsprechend größer erscheint und damit besser integrierbar ist (Abbildung 5 B). Die zusätzliche Unterdrückung des extrazellulären Natriumanteils durch Anwendung der Triple-Quantum-Filter Technik erhöhte die Sensitivität noch einmal, so dass die Kombination aus „Handschuhtechnik“, Shift-Reagenz und Aufnahmetechnik eine sensitive Verlaufsuntersuchung der intrazellulären Natriumkonzentration ermöglichte. Zur vergleichenden Darstellung wurden die Flächen unterhalb des intrazellulären Natriumpeaks in Relation zum letzten Spektrum vor Beginn der Ischämie gesetzt.

2.7. Laktatbestimmung

In den Versuchen zur pH-Bestimmung mit substratfreiem Krebs-Hensleit-Puffer wurde zusätzlich koronarvenöses Effluat gesammelt. Es wurden Proben während der Kontrollphase, unter Eniporidegabe, in Ischämie sowie in Reperfusion genommen. Hieraus wurde die Laktatkonzentration bestimmt. Als Prinzip wurde die Umwandlung von Laktat und NAD zu Pyruvat und NADH₂ durch die Laktatdehydrogenase (LDH) verwendet. Um eine Umkehrreaktion zu verhindern, wurde dann das Pyruvat in einer zweiten Reaktion mit L-Glutamat mittels der Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) zu L-Alanin und α -Ketoglutarat umgewandelt:



Messgröße ist dabei die Zunahme von NADH₂, welche sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 365 nm durch Extinktionszunahme messen ließ. Als Messkit wurde der MPR 3 von Roche verwendet. Die Konzentration des Laktats errechnet sich dann aus folgender Formel:

$$(2) [\text{L}]_{\text{mmol/l}} = \Delta E \cdot 15,3$$

2.8. Phosphatbestimmung

Das während der Versuche mit substratfreiem Puffer gewonnene Effluat (s. auch Kapitel 2.5.3.) wurde auf seinen Phosphatgehalt hin untersucht. Mittels der ^{31}P -NMR-Spektroskopie wurde zunächst ein Spektrum einer 1,18 mM Phosphatlösung aufgezeichnet. Die Fläche des Peaks wurde auf 1,18 eingestellt. Anschließend wurden die verschiedenen Proben untersucht und die Fläche der Peaks integriert und ins Verhältnis zur Referenzfläche gesetzt.

2.9. Auswertung

Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung aus den in den jeweiligen Versuchsreihen durchgeführten Experimenten berechnet. Die Anzahl der Experimente ist mit n gekennzeichnet. Zur statistischen Auswertung wurde das Programm SPSS benutzt. Wo erforderlich, wurde bei Mehrfachvergleichen eine einfaktorielle Varianzanalyse mit Bonferroni-Korrektur durchgeführt, wobei auf eine Korrektur für Messwertwiederholung verzichtet wurde. Als statistischer Test wurde der Student t-Test verwendet, der ab einer Wahrscheinlichkeit von $1 - \alpha = 0,95$ ($p < 0,05$) als signifikant gewertet wurde. In diesem Fall wurden die Ergebnisse mit einem * gekennzeichnet. Wurde ein Signifikanzniveau von $1 - \alpha = 0,99$ ($p < 0,01$) errechnet, wurden die Ergebnisse mit ** markiert.

3. Ergebnisse

3.1. Konzentrations-Wirkungs-Beziehung des NHE-1 Inhibitors Eniporide am Meerschweinchenherzen

In dieser Versuchsreihe wurde eine Konzentrations-Wirkungs-Beziehung der selektiven Hemmung des NHE-1 durch Eniporide am Meerschweinchenherzen nach maximaler Aktivierung von Protonenexport-Mechanismen durch die NH_4Cl -Prepulse-Technik etabliert. Durch die Gabe von NH_4Cl kam es zu einer intrazellulären Akkumulation von NH_3 und NH_4Cl . Sobald die Infusion von NH_4Cl beendet wurde, konnte NH_3 schnell aus der Zelle diffundieren; Protonen blieben in der Zelle zurück, und es entwickelte sich eine intrazelluläre Azidose. Zum Ausgleich der Azidose und zur Wiederherstellung physiologischer intrazellulärer pH-Werte wurden auf diese Weise alle am Protonenexport aus der Zelle beteiligten Systeme maximal aktiviert, darunter auch der Natrium-Protonen-Austauscher (NHE-1). Eine Blockade des NHE-1 führte somit zu einer dosisabhängigen Verlangsamung des Ausgleichs der intrazellulären Azidose (Abbildung 6). Auf diese Weise konnte eine qualitative Aussage über die Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Eniporide gemacht werden.

In der Kontrollgruppe lag der intrazelluläre pH unter Ausgangsbedingungen bei $7,14 \pm 0,01$. Während der Applikation von NH_4Cl in einer Konzentration von 10 mM über 15 Minuten kam es initial zu einer leichten Alkalisierung. Im weiteren Verlauf nahm der intrazelluläre pH kontinuierlich von $7,23 \pm 0,04$ auf $6,99 \pm 0,01$ ab.

Nach Beendigung der Zufuhr von NH_4Cl sank der intrazelluläre pH in der Kontrollgruppe in den ersten 3 Minuten auf $6,90 \pm 0,05$ und stieg dann im weiteren Verlauf auf den Ausgangs-pH von $7,14 \pm 0,02$ wieder an (Abbildung 7). Unter Ausgangsbedingungen unterschied sich der intrazelluläre pH zwischen Kontrollgruppe und Experimentalgruppen nicht. Die zusätzliche Gabe von Eniporide hatte auch keinen Einfluss auf den Verlauf des intrazellulären pH während der NH_4Cl -Gabe. Unmittelbar nach Beendigung der Zufuhr von NH_4Cl kam es dann aber zu deutlichen Unterschieden zwischen Kontroll- und den verschiedenen Experimentalgruppen:

Unter zusätzlicher Infusion von 10 nM Eniporide fiel der pH zum selben Zeitpunkt auf $6,86 \pm 0,03$ und unterschied sich somit nicht signifikant von der Kontrollgruppe. Schon unter Infusion von 100 nM Eniporide fiel der pH auf $6,82 \pm 0,06$ und war damit signifikant niedriger als in der Kontrollgruppe. Der Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration nach Beendigung des NH_4Cl -Prepulses konnte unter Zufuhr von 1 μM Eniporide erneut gesteigert werden. Der intrazelluläre pH betrug in dieser Experimentalgruppe unmittelbar nach Beendigung des NH_4Cl -Prepulses $6,76 \pm 0,05$. Eine weitere Reduktion des pH_i war unter 10 μM Eniporide nicht zu beobachten. In dieser Gruppe kam es zu einem initialen pH-Abfall 3 Minuten nach Beendigung der NH_4Cl -Infusion auf $6,78 \pm 0,10$. In allen Versuchsreihen erholte sich der intrazelluläre pH-Wert binnen 15 Minuten nach Ende der NH_4Cl -Infusion auf Ausgangswerte.

Somit konnte ein Beitrag des Natrium-Protonen-Austauschers für die pH-Erhholung nach Protonenüberladung nachgewiesen, dessen dosisabhängige Inhibition mittels Eniporide gezeigt und eine maximal wirksame Konzentration von 1 μM definiert werden (s. Abbildung 6 und 7).

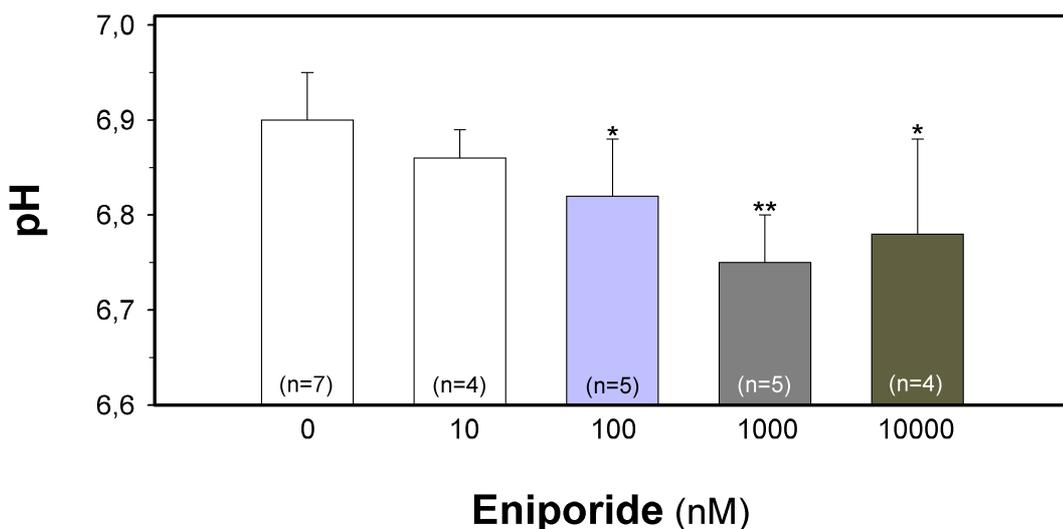


Abbildung 6: Dosisabhängige Wirkung von Eniporide auf den intrazellulären pH zum Zeitpunkt $t = 3$ Minuten nach Beendigung des NH_4Cl -Prepulses (10 mM über 15 Minuten). (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ im Vergleich zur Kontrollgruppe)

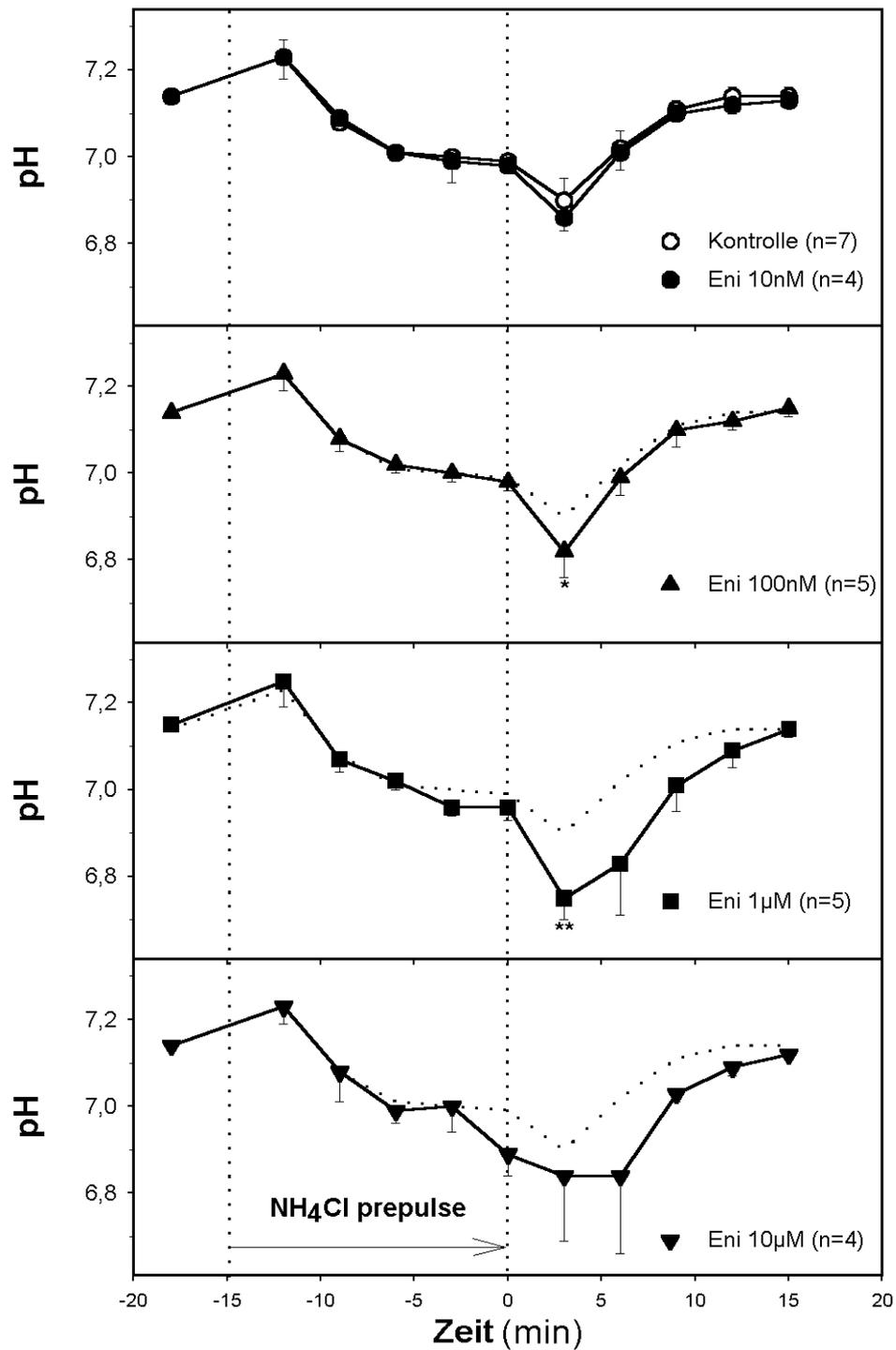


Abbildung 7: Wirkung von Eniporide auf den intrazellulären pH in Meerschweinchenherzen, die mit einem Bikarbonat-Puffer perfundiert wurden. Die intrazelluläre Azidose wurde durch die NH₄Cl-Prepulse-Technik (Konzentration 10 mM über 15 Minuten) provoziert. Die Eniporide-Infusion wurde 7 Minuten vor Beginn der NH₄Cl-Infusion begonnen. Werte sind dargestellt als Mittelwerte und Standardabweichung. (*: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$ im Vergleich mit der Kontrollgruppe) (gestrichelte Linie = Kontrollgruppe).

Die myokardiale Funktion unterlag deutlichen, pH-abhängigen Veränderungen. Zu Beginn der Versuchsreihen betrug der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP) im Mittel in allen Versuchsreihen 76 ± 5 mmHg. Nach Beginn der Infusion von 10 mM NH_4Cl kam es parallel zu der oben genannten leichten Alkalisierung zu einer geringen Zunahme des LVDP auf 87 ± 7 mmHg. Im weiteren Verlauf verringerte sich der linksventrikulär entwickelte Druck auf 34 ± 6 mmHg am Ende des NH_4Cl -Prepulses. Die Versuchsreihen unterschieden sich in diesen Verläufen nicht von der Kontrollgruppe.

Unmittelbar nach Beendigung der NH_4Cl -Zufuhr sank der LVDP unter Gabe von 1 μM Eniporide auf 15 ± 9 mmHg und unterschied sich damit signifikant von der Kontrollgruppe, die zu diesem Zeitpunkt einen mittleren LVDP von 29 ± 6 mmHg entwickelte. Am Ende der 15-minütigen Auswaschphase kam es in allen Versuchen zu einer Erholung der Ausgangsfunktion auf Ausgangswerte (s. Abbildung 8).

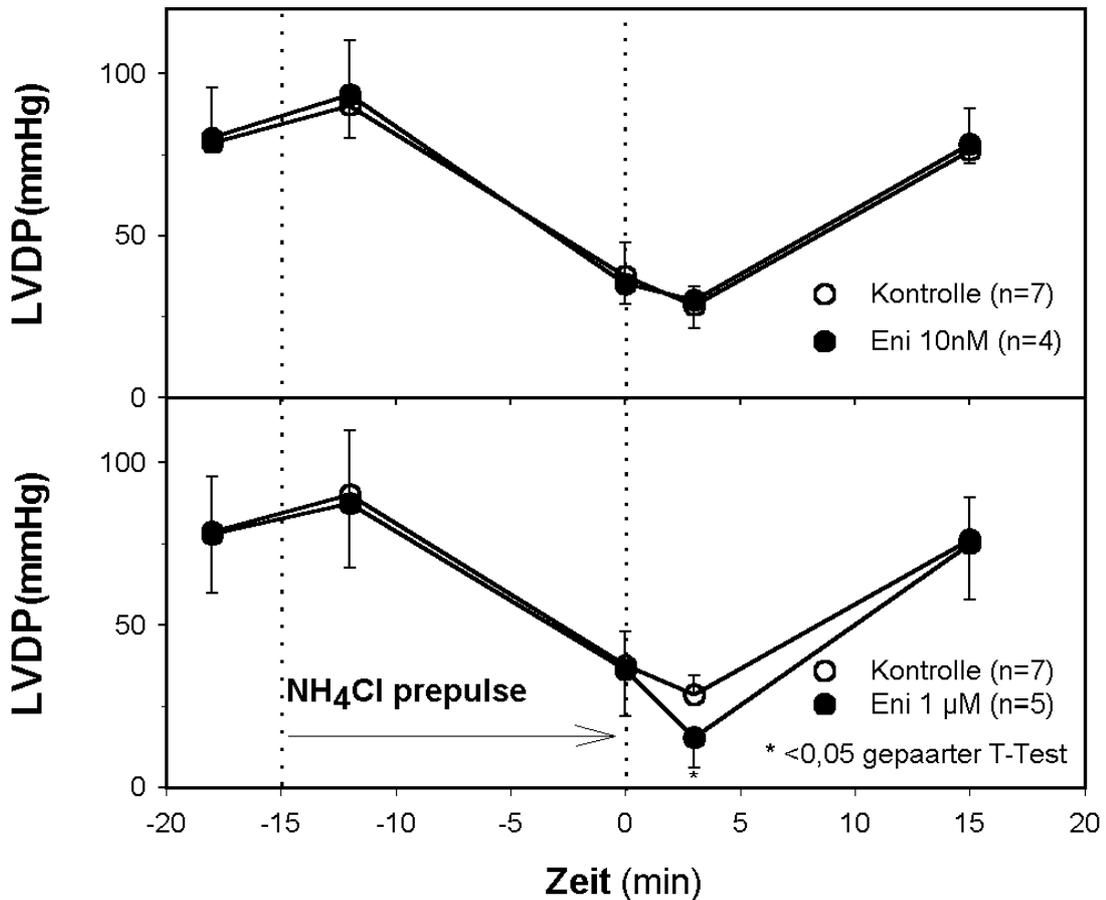


Abbildung 8: Effekt der durch die NH₄Cl-Prepulse Technik induzierten intrazellulären Azidose auf den linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP). Vergleichende Darstellung der Kontrollgruppe und unter zusätzlicher Gabe von Eniporide 10 nM und 1 µM (*: $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe)

3.2. Intrazelluläre Natriumkonzentration in Ischämie und Reperfusion

In dieser Versuchsreihe wurde der Einfluss des Natrium-Protonen-Austauschers (NHE-1) auf die intrazelluläre Natriumkonzentration in Ischämie untersucht. Durch Inhibition des NHE-1 mittels Eniporide wäre eine deutliche Abnahme der intrazellulären Natriumakkumulation in Ischämie zu erwarten. Da in diesen Versuchen die Natriumakkumulation qualitativ mittels ²³Na-NMR-Spektroskopie analysiert wurde, wurde zunächst nach einer ausreichenden Einschlagphase eine 20-minütige seitenständige Infusion von

TmDOTP durchgeführt, um das Signal des intrazellulären Natriums von dem des extrazellulären zu trennen. Danach wurde der Zufluss zum Herzen vollständig unterbunden und so eine Stop-Flow-Ischämie über einen Zeitraum von 60 Minuten induziert. In Abbildung 9 ist ein repräsentativer Verlauf der intrazellulären Natriumakkumulation in Ischämie dargestellt.

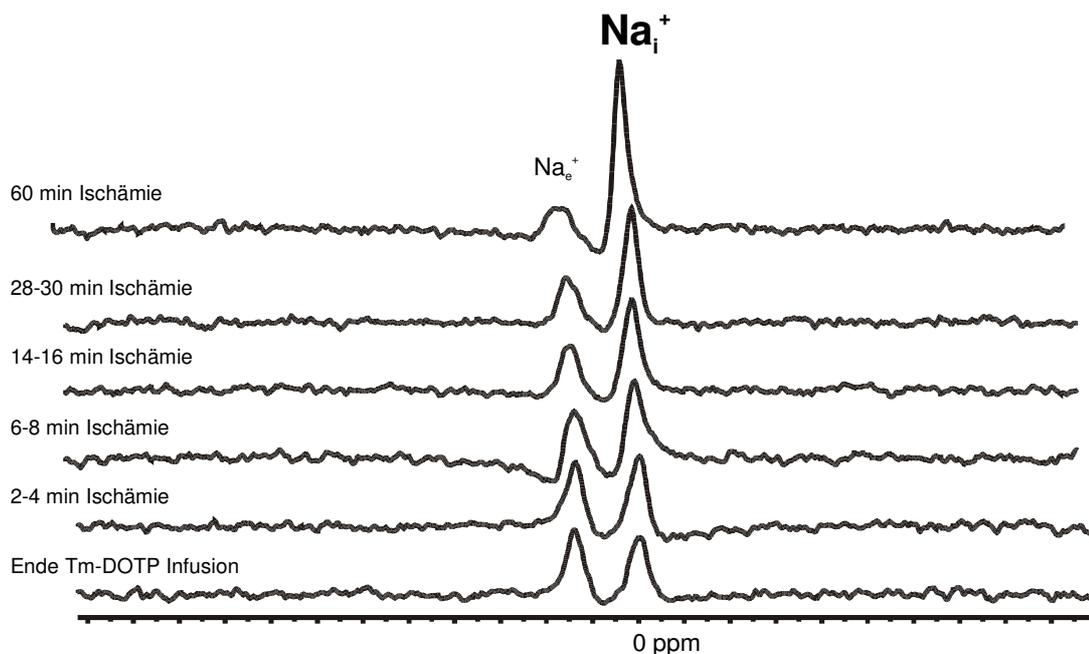


Abbildung 9: Darstellung repräsentativer ^{23}Na -NMR-Spektren vor und während 60 Minuten dauernder Stop-Flow-Ischämie. Intra- (Na_i^+) und extrazelluläres (Na_e^+) Natrium wurden vor Initiierung der Ischämie durch eine 20-minütige Infusion von TmDOTP getrennt. Zur Reduzierung des Signales des extrazellulären Natriums wurde eine Triple-Quantum-Filter (TQF) -Aufnahmetechnik verwendet.

In der Kontrollgruppe kam es zu einem annähernd linearen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration, die nach einer Stunde $249 \pm 25\%$ des Ausgangswertes vor Ischämie erreichte (Abbildung 10). Nach vorheriger Infusion von Eniporide in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ konnte die intrazelluläre Natriumakkumulation in Ischämie durch Blockierung des Natrium-Protonen-Austauschers signifikant verringert werden. In den ersten 36 Minuten der Ischämie führte die Inhibition des NHE-1 zu einer annähernd vollständigen Blockade des Natriumeinstroms. Anschließend verlief der Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration nahezu parallel zur Kontrollgruppe. Bei exakter Analyse des Kurvenverlaufes zeigt sich nach Beginn der Ischämie auch in den mit Eniporide vorbehandelten vorbehandelten Herzen ein leichter initialer Anstieg der intrazellulären

ein leichter initialer Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration auf $111 \pm 16\%$. Im weiteren Verlauf der Ischämie nahm die intrazelluläre Natriumkonzentration zunächst wieder auf $87 \pm 16\%$ ($t = 23$ min) ab. Anschließend stieg auch in der Versuchsgruppe das intrazelluläre Natrium auf $158 \pm 12\%$ nach 60 Minuten totaler Ischämie (Abbildung 10).

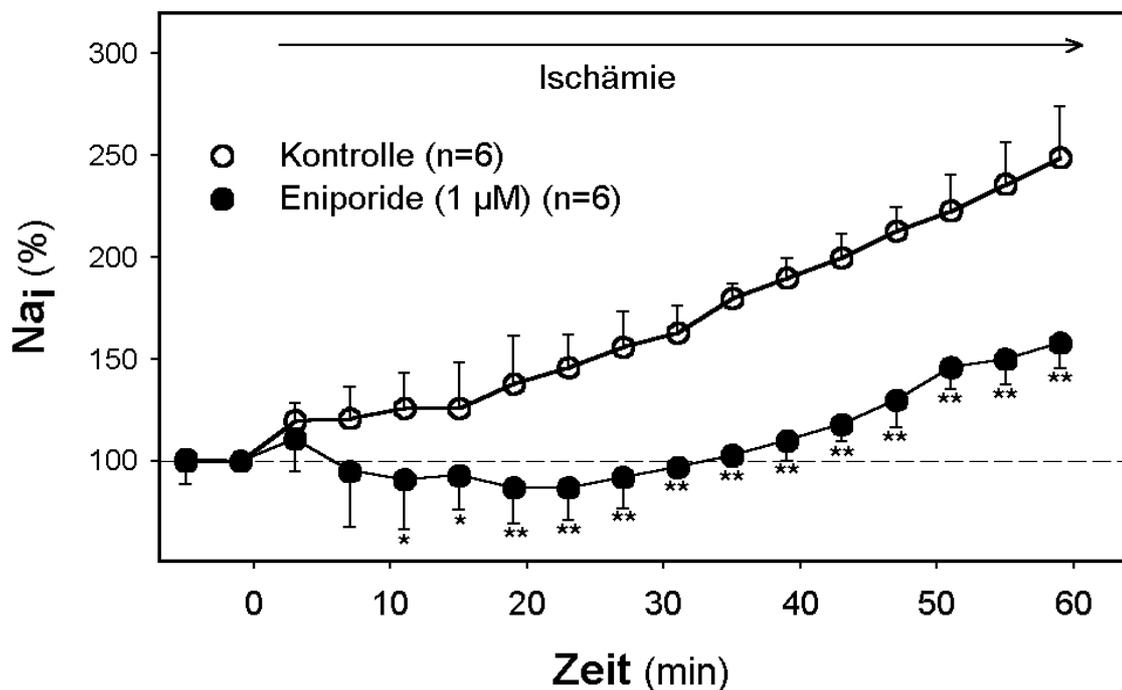


Abbildung 10: Wirkung von Eniporide (1 μM) auf die intrazelluläre Natriumakkumulation in Ischämie (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ im Vergleich mit der Kontrollgruppe).

3.3. Einfluss der NHE-Blockade durch Eniporide auf intrazellulären pH, linksventrikuläre Funktion und Energiestatus in Ischämie und Reperfusion

Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildeten die im Folgenden beschriebenen Versuche zur Vertiefung des Verständnisses der intrazellulären pH-Regulation am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen und dessen Auswirkungen auf die myokardiale Funktion in Ischämie und Reperfusion.

3.3.1. Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer

In diesen Versuchen wurde der Einfluss von Eniporide auf den intrazellulären pH sowie die Kontraktilität des nach Langendorff-Technik perfundierten Meerschweinchenherzens unter Verwendung eines bikarbonathaltigen Puffers in 36 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion untersucht (Abbildungen 11 und 12). Unter diesen Bedingungen war eine Kompensation des gehemmten $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Exports durch den bikarbonatabhängigen $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Kotransporter möglich. Auch andere alternative Transportsysteme wie der Laktat- H^+ -Symport wurden durch diese Versuchsbedingungen nicht beeinflusst. Unter Standardbedingungen betrug der intrazelluläre pH sowohl in der Kontrollgruppe als auch unter Verwendung von Eniporide $7,14 \pm 0,02$. Die zusätzliche Infusion von Eniporide veränderte den intrazellulären pH unter normoxischen Bedingungen nicht. In Ischämie kam es zu einem stetigen Abfall des intrazellulären pH auf $5,74 \pm 0,14$ in der Kontrollgruppe und $5,75 \pm 0,08$ in den mit Eniporide vorbehandelten Herzen. Ein Unterschied in der Geschwindigkeit des pH-Abfalls in Ischämie war nicht zu erkennen. In Reperfusion kam es in beiden Gruppen zu einer Normalisierung des intrazellulären pH auf Ausgangswerte ($7,13 \pm 0,02$ Kontrolle; $7,14 \pm 0,01$ Eniporide). Betrachtet man den Verlauf der pH-Erholung, so zeigte sich tendenziell –im Grunde wider Erwarten - eine raschere Normalisierung in der Versuchsgruppe. Hier war ein pH von $7,12 \pm 0,05$ nach 18 Minuten Reperfusion erreicht. In der Kontrollgruppe beträgt der pH zu diesem Zeitpunkt $7,08 \pm 0,12$ und erreicht $7,13 \pm 0,02$ nach 24 Minuten (Abbildung 11). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant. Auffällig war insbesondere in der Kontrollgruppe eine starke Streuung der pH-Werte. Zu Beginn der Reperfusion zeigte sich ein deutlich verbreiteter Peak des anorganischen Phosphats. Es kam also in Reperfusion zu einer heterogenen pH-Verteilung als Korrelat einer ausgeprägteren myokardialen Schädigung, die erst zum Ende der Reperfusion in den Hintergrund trat und eine Auswertung unmittelbar nach Beginn der Reperfusion erschwerte.

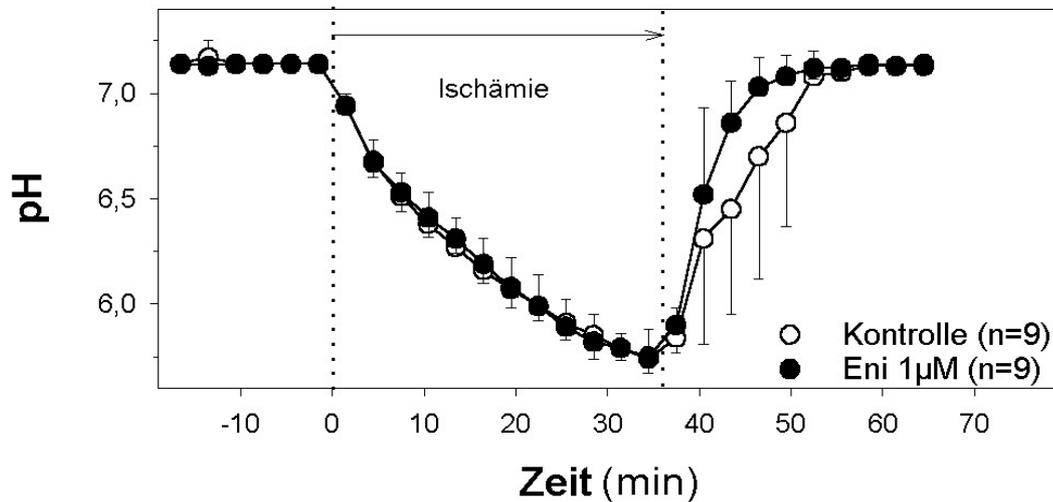


Abbildung 11: Darstellung des intrazellulären pH-Verlaufs in 36 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion. Verwendet wurde ein Krebs-Henseleit-Puffer, der Bikarbonat enthielt. Eniporide wurde 12 Minuten vor Beginn der Ischämie seiteständig in einer Konzentration von 1 μM infundiert.

Neben der Untersuchung des Einflusses von Eniporide auf den pH-Haushalt wurde die mögliche kardioprotektive Wirkung, die mit einer Blockade des NHE-1 verbunden sein könnte, untersucht. Hierzu wurden der linksventrikulär entwickelte Druck mit einem Ballonkatheter (Abbildung 12) und die ATP- und Kreatinphosphatkonzentration mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie (Abbildung 13) bestimmt.

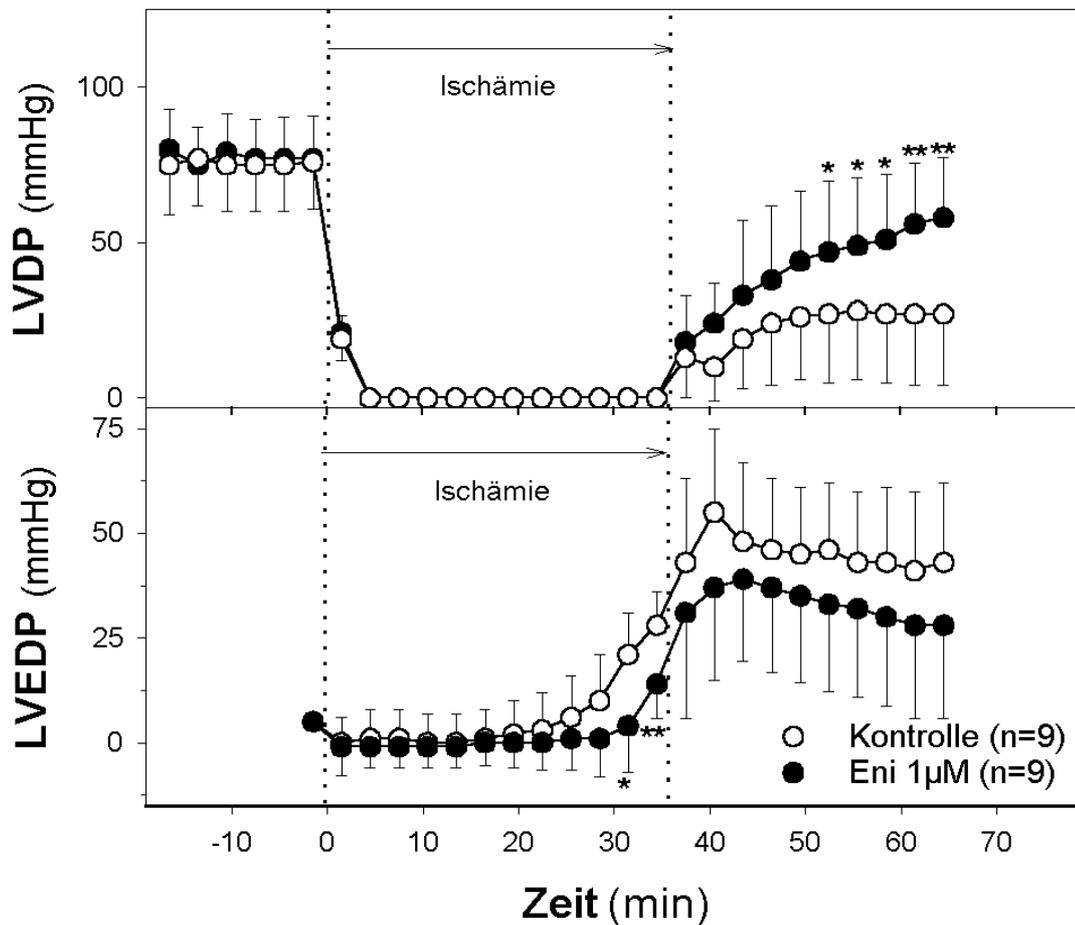


Abbildung 12: Wirkung von Eniporide auf den linksventrikulär entwickelten Druck (LVDP) und den enddiastolischen Druck (LVEDP) in 36 Minuten Ischämie und Reperfusion. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ im Vergleich mit der Kontrollgruppe)

Vor Beginn der Ischämie war der linksventrikulär entwickelte Druck in beiden Gruppen mit 76 ± 15 mmHg (Kontrolle) und 77 ± 14 mmHg (Eniporide $1 \mu\text{M}$) gleich. Eine 12-minütige präischämische Infusion von $1 \mu\text{M}$ Eniporide hatte keinen Einfluss auf die Kontraktilität. Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der Experimentalgruppe waren in dieser Zeit nicht nachzuweisen (siehe Abbildung 12). In Ischämie kam es in beiden Gruppen zu einem raschen Abfall der Kontraktilität. Eniporide hatte keinen Einfluss auf den Funktionsverlust in Ischämie. In beiden Gruppen entwickelte sich eine ischämische Kontraktur (definiert als Anstieg des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP) um mehr als 5 mmHg bezogen auf den initialen

Wert zu Beginn der Ischämie). In der Kontrollgruppe kam es bereits nach 26 Minuten, in den mit Eniporide vorbehandelten Herzen erst nach 31 Minuten, zu einer deutlichen Kontraktur. Am Ende der Ischämie stieg der LVEDP in der Kontrollgruppe auf $27,5 \pm 7,6$ mmHg an. Die Inhibition des NHE-1 durch Eniporide verringerte den endischämischen LVEDP signifikant auf $16 \pm 8,5$ mmHg. Noch deutlicher wurde der kardioprotektive Effekt von Eniporide bei Betrachtung des linksventrikulär entwickelten Druckes in Reperfusion. Am Ende der Reperfusion erholte sich die Funktion in der Experimentalgruppe auf $77 \pm 21\%$ des Ausgangswertes und betrug 58 ± 19 mmHg. In der Kontrollgruppe wurde lediglich eine Erholung auf $35 \pm 29\%$ des Ausgangswertes beobachtet.

Es zeigte sich zu Beginn der 36-minütigen Ischämie ein rapider Abfall der Kreatinphosphat-Konzentration. Vor Ischämie betrug die Kreatinphosphat-Konzentration in der Kontrollgruppe $12,8 \pm 1,3$ mM und in der Experimentalgruppe $12,6 \pm 1,2$ mM und unterschied sich somit nicht. Auch die Geschwindigkeit der Abnahme unterschied sich in der Gruppe der mit Eniporide vorbehandelten Herzen nicht von der Kontrollgruppe. Bereits nach 6 Minuten Ischämie war die Kreatinphosphatkonzentration auf Werte unter 0,5 mM in beiden Gruppen gesunken. Am Ende der Ischämie war in beiden Gruppen kein Kreatinphosphat-Peak mehr nachweisbar. In Reperfusion kam es in der Kontrollgruppe nur zu einer geringen Erholung des Kreatinphosphats auf $5,4 \pm 2,1$ mM nach 30 Minuten Reperfusion. Im Gegensatz dazu konnte in den mit Eniporide ($1 \mu\text{M}$) vorbehandelten Herzen am Ende der Reperfusion eine Erholung auf $8,6 \pm 1,1$ mM festgestellt werden. Dies entspricht einer signifikanten Verbesserung im Vergleich zur Kontrollgruppe von 59%.

Vor Beginn der Ischämie war auch die ATP-Konzentration in beiden Gruppen mit $6,71 \pm 0,44$ mM (Kontrolle) und $6,74 \pm 0,28$ mM (Eniporide) annähernd gleich.

Sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Experimentalgruppe fiel die ATP-Konzentration in 36 Minuten Ischämie kontinuierlich ab. Während sich beide Gruppen im Hinblick auf die Kreatinphosphatkonzentration während Ischämie nicht unterschieden, führte die Vorbehandlung mit Eniporide zu einer tendenziellen Verlangsamung des Abfalls der ATP-Konzentration insbesondere in den letzten 10 Minuten der Ischämie. Am Ende der Ischämie

betrug die ATP-Konzentration in der Kontrollgruppe $0,38 \pm 0,51$ mM und in der Experimentalgruppe $0,68 \pm 0,20$ mM. Dieser Unterschied erreichte aber keine Signifikanz.

In Reperfusion erholte sich die ATP-Konzentration in den mit Eniporide vorbehandelten Herzen signifikant besser. Nach 30 Minuten betrug sie in der Kontrollgruppe $1,65 \pm 0,40$ mM und in der Eniporidegruppe $3,22 \pm 0,61$ mM. Durch die präischämische Gabe von Eniporide erholte sich die ATP-Konzentration in Reperfusion also auf annähernd 50 % des Ausgangswertes.

Das anorganische intrazelluläre Phosphat stieg in beiden Gruppen in Ischämie erwartungsgemäß stark an und erreichte am Ende der Ischämie $20,93 \pm 1,82$ mM in der Kontrollgruppe und $17,86 \pm 1,08$ mM in der Experimentalgruppe.

In Reperfusion normalisierten sich die Werte in der Eniporide Gruppe zudem schneller als in der Kontrollgruppe. Auch dies bestätigte die bereits aus den pH_i -Daten in Reperfusion geschlossene ausgedehntere myokardiale Schädigung in Herzen, in denen der NHE-1 in Ischämie und Reperfusion aktiv ist.

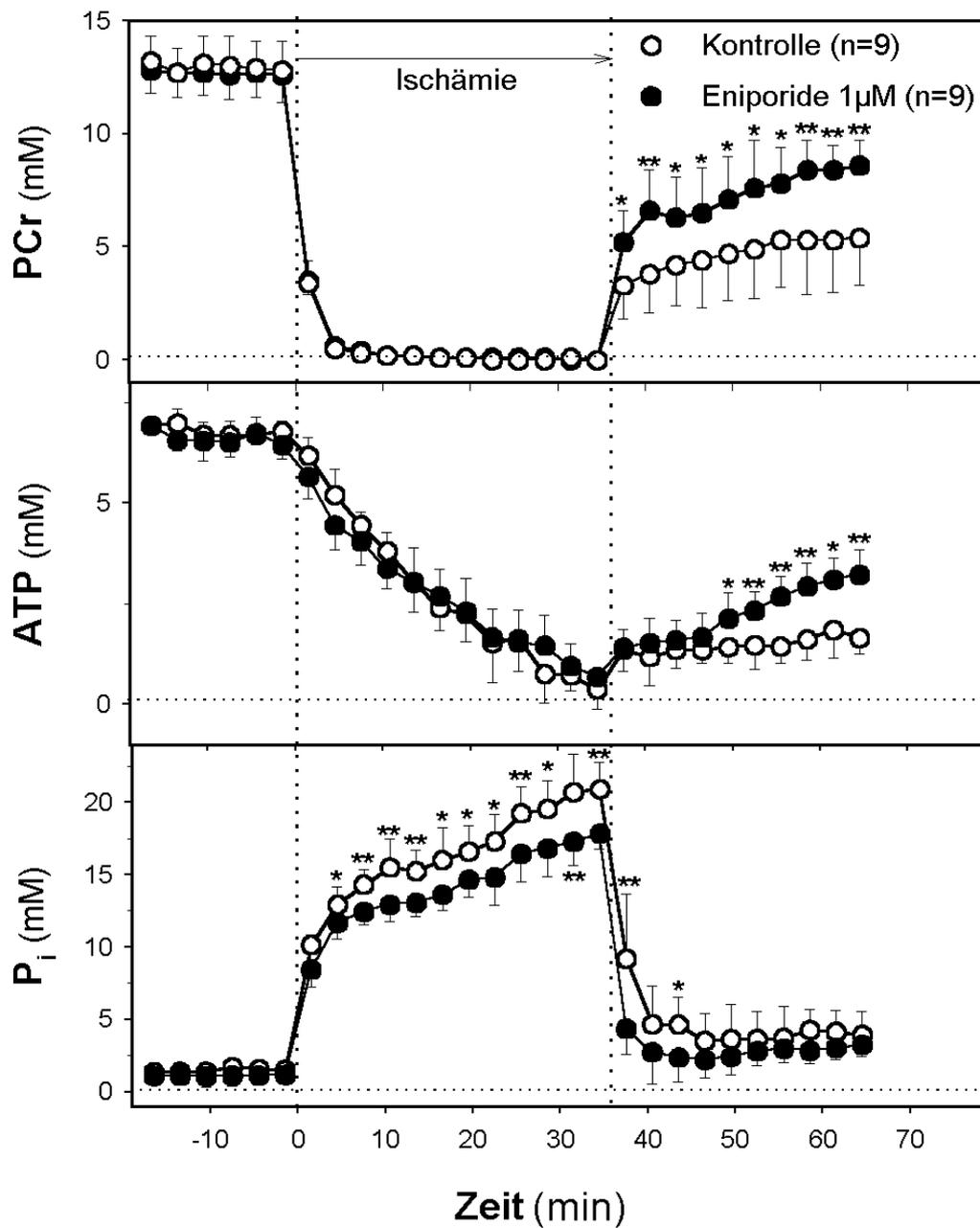


Abbildung 13: Einfluss von Eniporide auf Kreatinphosphatkonzentration (PCr), ATP-Konzentration und Konzentration des anorganischen Phosphats (P_i) vor und während 36 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion unter Verwendung eines natriumbikarbonathaltigen Krebs-Henseleit-Puffers. (*:p<0,05; **:p<0,01 im Vergleich mit der Kontrollgruppe)

In dieser Versuchsreihe konnte somit die kardioprotektive Wirkung einer Blockierung des Natrium-Protonen-Austauschers in Ischämie und Reperfusion durch Eniporide deutlich gezeigt werden. Sowohl die Kontraktilität als auch die energiereichen Phosphate verbesserten sich nach Vorbehandlung mit Eniporide signifikant.

Signifikante Veränderungen im Verlauf des intrazellulären pH in Ischämie und Reperfusion konnten hingegen bei Inhibition des NHE-1 unter Verwendung eines Natriumbikarbonat-haltigen Puffermediums erneut nicht beobachtet werden.

3.3.2. Perfusion mit substratfreiem Krebs-Henseleit-Puffer

In diesen Versuchen wurde der Einfluß von Eniporide auf den intrazellulären pH sowie auf die Kontraktilität des nach Langendorff-Technik perfundierten Herzens unter Verwendung eines substratfreien, bikarbonathaltigen Puffers in 30 Minuten Ischämie und Reperfusion untersucht. Durch die Verwendung eines substratfreien Puffers konnte die Glykolyse und die damit verbundene Laktatbildung in Ischämie reduziert werden. Dies führte zu einer Verringerung des Protonentransportes aus der Zelle durch den Monokarboxylat-Transporter. Unter diesen Bedingungen sollte die Bedeutung einer Blockade des Natrium-Protonen-Austausches mit Eniporide in Ischämie eine noch größere Rolle spielen. Um außerdem die Laktatkonzentration im koronarvenösen Effluat während der gesamten Versuchsdauer untersuchen zu können, wurden diese Versuche unter Aufrechterhaltung eines minimalen Flusses in Ischämie durchgeführt.

Der intrazelluläre pH unterschied sich in der Kontrollgruppe und der Experimentalgruppe unter Perfusion mit einem substratfreien Krebs-Henseleit-Puffer vor Ischämie nicht und betrug $7,15 \pm 0,02$ (Kontrolle) beziehungsweise $7,15 \pm 0,01$ (Eniporide). Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, hatte die Gabe von Eniporide keinen Einfluß auf den intrazellulären pH unter normoxischen Bedingungen. Die Perfusion mit substratfreiem Puffer veränderte den intrazellulären pH im Vergleich zur Perfusion mit substrathaltigem Puffer nicht. Unter normoxischen Bedingungen war die pH_i -Regulation somit stabil. In I-

schämie zeigte sich in beiden Gruppen ein kontinuierlicher Abfall des pH_i . Während in den ersten 5 Minuten der Ischämie der pH_i -Abfall in beiden Gruppen parallel verlief, kam es im weiteren Verlauf zu einem tendenziell rascheren Abfall des pH_i in der Gruppe der mit Eniporide vorbehandelten Herzen. Nach etwa 18 Minuten Ischämie verlangsamte sich der Abfall des pH_i in beiden Gruppen. Am Ende der Ischämie betrug der pH_i in der Kontrollgruppe $6,33 \pm 0,22$ und in der Experimentalgruppe $6,25 \pm 0,05$.

Weder die Geschwindigkeit der Abnahme des pH_i noch der endischämisch gemessene pH_i unterschieden sich signifikant voneinander. Die Ergebnisse liefern also nur einen Trend.

In Reperfusion kam es in beiden Gruppen weitestgehend zu einer Normalisierung des intrazellulären pH auf $7,10 \pm 0,03$ in der Kontrollgruppe und $7,09 \pm 0,05$ in der Experimentalgruppe. Ein Unterschied im pH-Verlauf fehlte in Reperfusion (Abbildung 14).

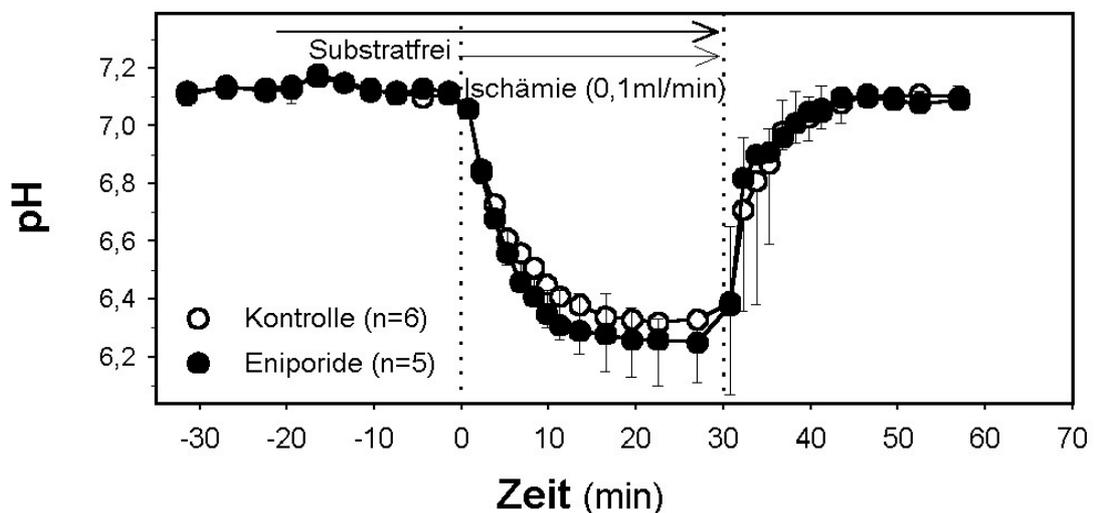


Abbildung 14: Darstellung des intrazellulären pH-Verlaufs vor und während 30 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion. Verwendet wurde zunächst ein substrathaltiger, dann ein substratfreier Krebs-Henseleit-Puffer. Beginnend 12 Minuten vor Beginn der Ischämie wurde in der Experimentalgruppe Eniporide in einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ infundiert.

Zusätzlich zur Bestimmung des intrazellulären pH wurde in dieser Versuchsreihe die Laktat- und Phosphatkonzentration im koronarvenösen Effluat gemessen. Unter Ausgangsbedingungen betrug die venöse Phosphatkonzentration in der Kontrollgruppe und in der Experimentalgruppe etwa 1,18 mM. In Ischämie kam es in etwa zu einer Halbierung der Phosphatkonzentration im koronarvenösen Effluat. In der ersten Minute der Reperfusion wurde eine höhere Phosphatkonzentration als unter Ausgangsbedingungen gemessen ($1,39 \pm 0,15$ bzw. $1,33 \pm 0,14$ mM). Erneut ließ sich kein signifikanter Unterschied erfassen (Abbildung 15).

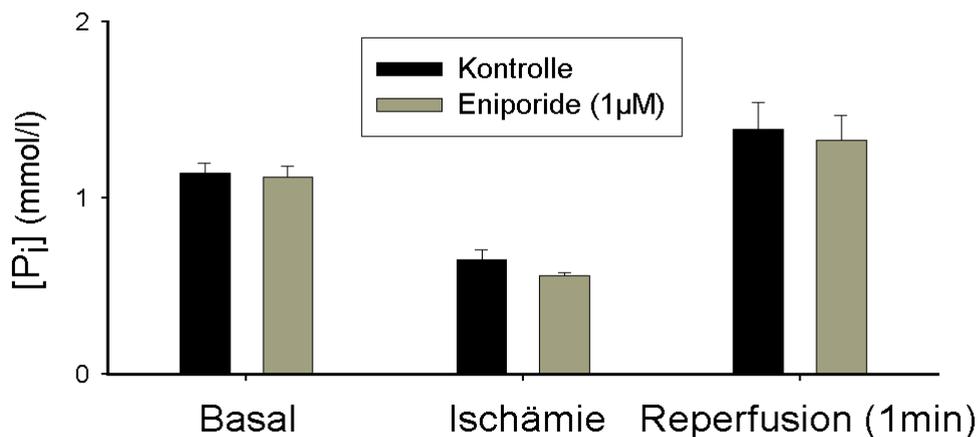


Abbildung 15: Venöse Phosphatkonzentration unter Ausgangsbedingungen, über 30 Minuten Ischämie und in der ersten Minute der Reperfusion.

Auf den ersten Blick mag überraschen, dass die koronarvenöse Phosphatkonzentration während Niedrig-Fluss-Ischämie abfiel, und erst nach Reperfusion über den Basalwert anstieg. Die erniedrigte Phosphatkonzentration während Ischämie deutet auf eine, wenn auch geringe, Netto-Aufnahme von Phosphat vermutlich in das Myokard hin. Die erhöhte Phosphatkonzentration nach Beginn der Reperfusion dürfte auf irreversible Zellschäden mit Freisetzung auch von Phosphat und energiereichen Phosphaten zurückzuführen sein. Ob diese erst mit Reperfusion einsetzte, oder bereits

am Ende der Ischämie lässt sich auf Grund der hohen Transit-Zeiten in Niedrig-Fluss-Ischämie nicht sicher beurteilen.

Die Laktatkonzentration (Abbildung 16) im koronarvenösen Effluat unterschied sich ebenfalls in Kontroll- und Experimentalgruppe nicht voneinander. Unter Perfusion mit einem substratfreien Krebs-Henseleit-Puffer betrug diese in der Kontrollgruppe $0,07 \pm 0,09$ mmol/l beziehungsweise 26% der unter Perfusion mit einem substrathaltigen Perfusionsmedium gemessenen Konzentration. In Niedrigfluß-Ischämie konnte in beiden Gruppen ein Anstieg der koronarvenösen Laktatkonzentration auf $0,38 \pm 0,14$ mmol/l gemessen werden.

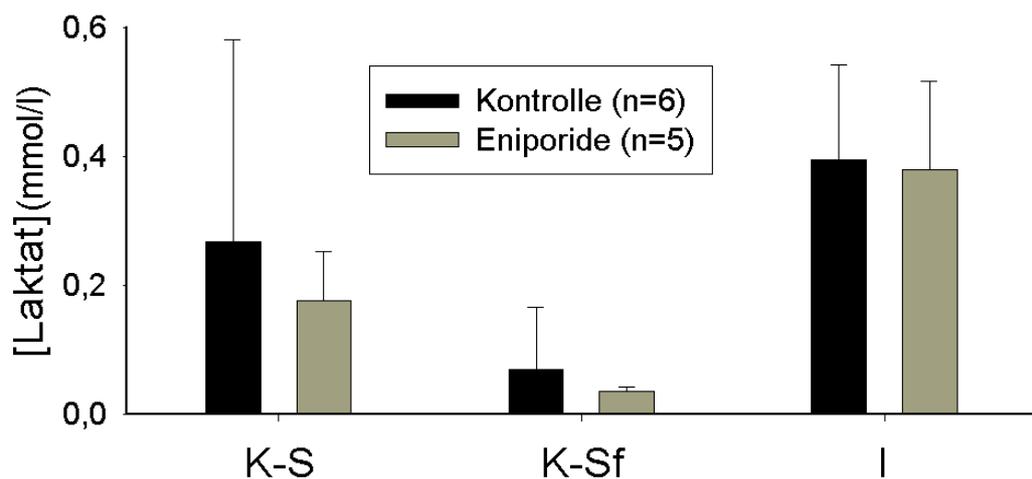


Abbildung 16: Darstellung der Laktatkonzentration unter Perfusion mit substrathaltigem (K-S), substratfreien (K-Sf) Krebs-Henseleit-Puffer vor und in Ischämie (I).

Möglicherweise bedingt durch die bereits oben angesprochene Transit-Zeit-Verzögerungen kann erst in Reperfusion (Abbildung 17) das intrakardial akkumulierte Laktat abgegeben und nachgewiesen werden und erreicht innerhalb der ersten Minute in Reperfusion eine maximale Konzentration von $2,5 \pm 1,1$ bzw. $2,4 \pm 2,1$ mmol/l (Kontroll- bzw. Experimentalgruppe), um im weiteren Verlauf etwa auf das Ausgangsniveau abzufallen .

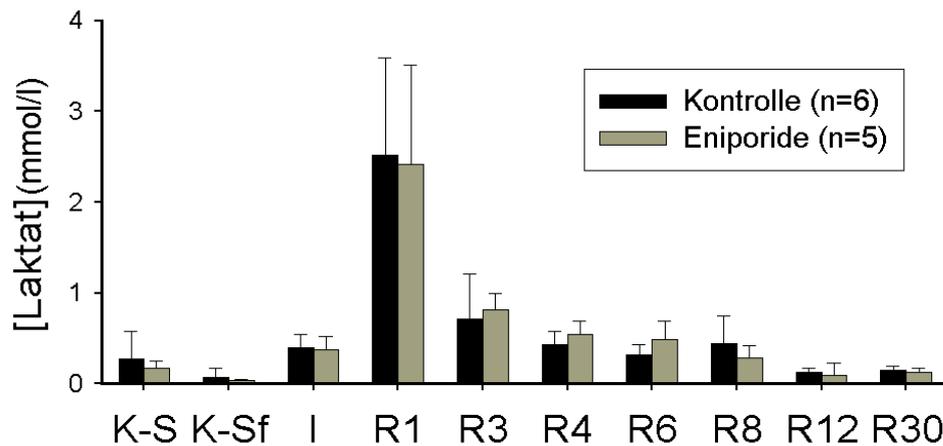


Abbildung 17: In Ergänzung zu Abbildung 16 ist hier zusätzlich der zeitliche Verlauf der Laktatkonzentration in Reperfusion dargestellt. Mit R1-R30 sind die Zeitpunkte der Probenentnahmen in Reperfusion gekennzeichnet (z.B. R1 = erste Minute in Reperfusion).

Die Kontraktilität, abgebildet als der linksventrikulär entwickelte Druck (LVDP), zeigte unter Standardbedingungen keinen Unterschied. Nach Beginn der Perfusion des Meerschweinchenherzens mit substratfreiem Puffer reduzierte sich der LVDP um etwa 15% in beiden Gruppen. Unter kontinuierlicher Perfusion ohne Substratangebot war die Kontraktilität der Herzen stabil. Eniporide hatte vor Beginn der Ischämie keinen Einfluß auf die Funktion. In Ischämie fiel der LVDP rasch ab. In Reperfusion zeigt sich zwar eine bessere Erholung des LVDP in der Experimentalgruppe, allerdings erreichten die Unterschiede bedingt durch die große Variabilität in beiden Gruppen kein signifikantes Niveau ($p=0,058$). Der LVDP erholte sich in der Experimentalgruppe auf $79\pm 46\%$ des Ausgangswertes, während er in der Kontrollgruppe nur auf etwa $29\pm 32\%$ anstieg (Abbildung 18). Grund für die fehlende Signifikanz ist die hohe Variabilität der Erholung der kontraktiven myokardialen Funktion. In der Kontrollgruppe erreichten 2 von 6 Herzen einen LVDP von etwa 40% des Ausgangsniveaus, während in der Experimentalgruppe insgesamt 3 von 5 Herzen Werte um 55 % des präischämischen LVDP erzielten. Die übrigen Herzen zeigten lediglich eine Restkontraktilität von 5-25% des Ausgangsniveaus.

Hinsichtlich der energetischen Daten induzierte Eniporide insbesondere bezüglich des Kreatinphosphats eine signifikante Verbesserung (Abbildung 18). Unter substratfreier Perfusion nahm das Kreatinphosphat von $12,28 \pm 1,74$ mM (Kontrolle) beziehungsweise $11,73 \pm 2,20$ mM (Eniporide $1 \mu\text{M}$) zunächst auf stabile Werte von $8,48 \pm 0,73$ mM (K) und $8,53 \pm 1,63$ mM (Eniporide $1 \mu\text{M}$) ab. Innerhalb der ersten 10 Minuten der Ischämie verschwindet der Peak des Kreatinphosphats im ^{31}P -NMR-Spektrum völlig. Die Geschwindigkeit des Abfalls war in Kontroll- und Experimentalgruppe identisch. In Reperfusion kommt es in beiden Gruppen zu einer Erholung der Kreatinphosphat-Konzentration. Analog zur ersten Versuchsreihe, stieg auch unter substratfreier Perfusion das Kreatinphosphat in der Gruppe der mit $1 \mu\text{M}$ Eniporide vorperfundierten Herzen deutlich stärker an und betrug am Ende der Reperfusion $10,26 \pm 1,47$ mM. In der Kontrollgruppe erholte sich das Kreatinphosphat auf $6,71 \pm 1,42$ mM.

Die ATP-Konzentration blieb unter substratfreier Perfusion konstant und lag unmittelbar vor Ischämie bei $7,04 \pm 1,30$ mM (Kontrolle) und $6,79 \pm 0,55$ mM (Eniporide) (Unterschied nicht signifikant). Innerhalb der ersten 20 Minuten der Ischämie sank die ATP-Konzentration in beiden Gruppen parallel verlaufend soweit ab, dass kein Peak in der ^{31}P -NMR-Spektroskopie mehr nachweisbar war. Im Unterschied zu der vorangegangenen Versuchsreihe erholte sich der ATP-Spiegel in Reperfusion in beiden Gruppen zunächst vergleichbar. Doch die am Ende der Reperfusion gemessenen ATP Konzentrationen von $2,21 \pm 0,81$ mM (Kontrolle) und $2,73 \pm 0,31$ mM (Eniporide) unterschieden sich signifikant.

Das anorganische intrazelluläre Phosphat stieg unter substratfreier Perfusion zunächst von $1,94 \pm 0,53$ mM (Kontrolle) und $1,38 \pm 0,48$ mM (Eniporide) auf $4,44 \pm 0,47$ mM (Kontrolle) und $3,45 \pm 1,02$ mM (Eniporide) an. Dies entsprach einer Erhöhung der intrazellulären Phosphatkonzentration um den Faktor 2,3 (K) und 2,5 (Eniporide). In Ischämie zeigte sich erneut ein ausgeprägter Anstieg in der Kontrollgruppe. Hier wurde am Ende der Ischämie eine Konzentration von $25,21 \pm 2,23$ mM erreicht. Die Blockade des Natrium-Protonen-Austauschers durch die Applikation von Eniporide $1 \mu\text{M}$ über 12

Minuten vor Beginn der Ischämie reduzierte den Anstieg des intrazellulären Phosphates auf $20,11 \pm 0,91$ mM.

In Reperfusion fiel die Konzentration in der Kontrollgruppe auf $8,73 \pm 2,97$ mM und auf $5,79 \pm 1,81$ mM in der Experimentalgruppe. Auch unter diesen Versuchsbedingungen zeigte sich also eine, wenn auch geringere, kardioprotektive Wirkung von Eniporide.

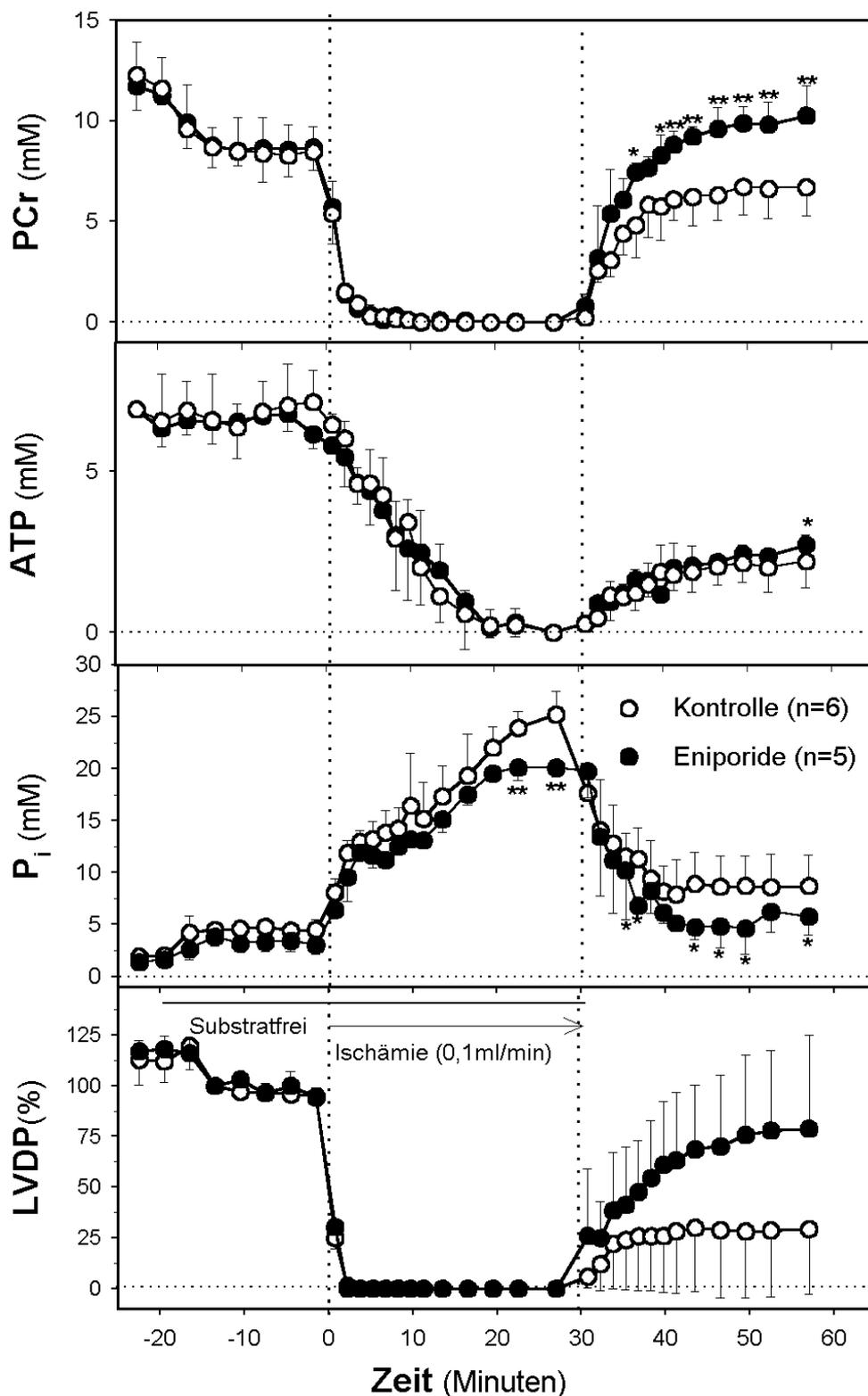


Abbildung 18: Kardioprotektive Wirkung von Eniporide in Ischämie und Reperfusion unter Perfusion mit einem substratfreien Krebs-Henseleit-Puffer. Darstellung des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP), des intrazellulären, anorganischen Phosphats (P_i), des ATP und des Kreatinphosphats (PCr) im zeitlichen Verlauf. Beginn der Ischämie zum Zeitpunkt $t = 0$ Minuten. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ im Vergleich mit der Kontrolle)

3.3.3. Perfusion mit Hepes-Puffer

Diese Versuchsreihe wurde durchgeführt, um die Bedeutung bikarbonat-abhängiger Transportproteine im Rahmen der Ischämie-induzierten, intrazellulären Azidose zu untersuchen. Ausgangspunkt war die Annahme, dass durch den Verlust der Möglichkeit des Bikarbonataustausches und der Blockade des Natrium-Protonen-Austausches durch eine präischämische Eniporide-Infusion (1 μM über 12 Minuten) der pH_i -Abfall in Ischämie deutlich verstärkt sein müßte.

Unter Perfusion mit normalem Krebs-Henseleit-Puffer war der intrazelluläre pH in beiden Gruppen mit $7,13 \pm 0,01$ (K) und $7,14 \pm 0,01$ (Eniporide 1 μM) annähernd gleich. Dieser pH_i blieb auch unter Perfusion mit Hepes-Puffer konstant (Abbildung 19). Die 12 Minuten vor Beginn der Ischämie begonnene Eniporideinfusion in einer Konzentration von 1 μM hatte keinen Einfluß auf den pH_i . Unmittelbar vor Ischämie wurde in der Kontrollgruppe ein pH_i von $7,14 \pm 0,03$ und in der Experimentalgruppe von $7,13 \pm 0,02$ gemessen.

In 30 Minuten Ischämie fiel der intrazelluläre pH in den mit Eniporide vorbehandelten Herzen schneller auf ein deutlich tieferes Niveau. Bereits in den ersten 3 Minuten fiel der pH_i in der Experimentalgruppe auf $6,94 \pm 0,10$, in der Kontrollgruppe jedoch nur auf $7,06 \pm 0,08$. Am Ende der Ischämie war der pH_i unter Blockade des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschers durch Eniporide bei gleichzeitiger Inhibition des $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Kotransporters durch Bikarbonat-Entzug auf $5,68 \pm 0,11$ gesunken. In der Kontrollgruppe wurde zu diesem Zeitpunkt ein pH_i von $5,80 \pm 0,03$ gemessen. Damit war der pH_i -Abfall in der Experimentalgruppe signifikant stärker ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. In Reperfusion erholte sich der pH_i -Wert bei fortbestehender Inhibition des NHE-1 durch Eniporide langsamer als in der Kontrollgruppe. Diese Unterschiede waren aber nicht signifikant. Am Ende der Reperfusion wurde in der Kontrollgruppe ein pH_i von $7,11 \pm 0,03$ gemessen. Der pH_i in der Experimentalgruppe war nach 30 Minuten Reperfusion auf $7,05 \pm 0,02$ angestiegen und unterschied sich nicht signifikant von der Kontrollgruppe (Abbildung 19).

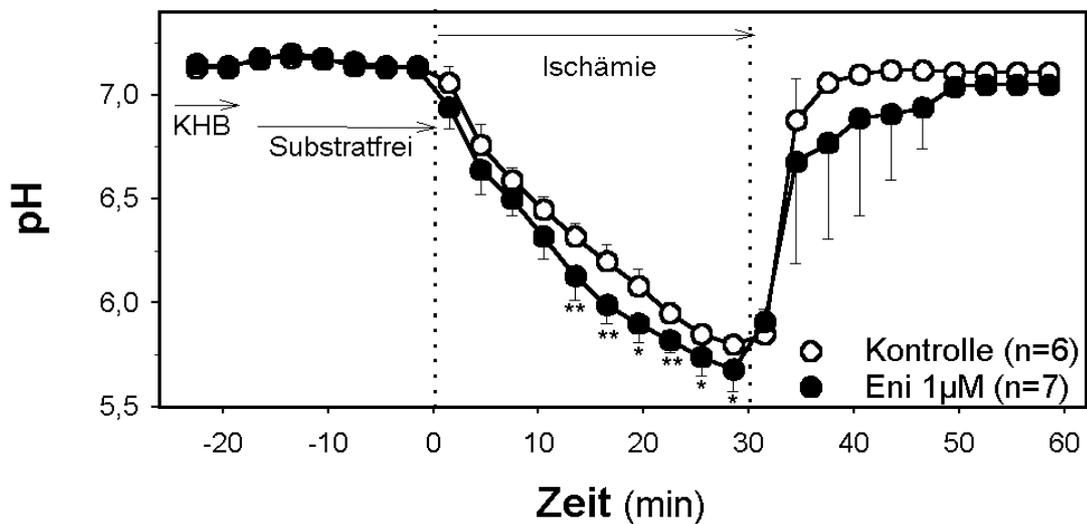


Abbildung 19: Verlauf des intrazellulären pH unter Perfusion mit Hapes-Puffer in 30 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion. Darstellung des Effektes der NHE-1 Blockade durch Eniporide 1µM. (*: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$ im Vergleich mit der Kontrolle)

Die Kontraktilität der Meerschweinchenherzen nahm unter Perfusion mit Hapes zunächst ab (Abbildung 20). Im Vergleich zur Perfusion mit normalem Krebs-Henseleit-Puffer zeigte sich eine Verringerung des linksventrikulär entwickelten Druckes (LVDP) um 23 ± 3 % in beiden Versuchsgruppen. Im weiteren Verlauf stabilisierte sich der LVDP in beiden Gruppen und betrug unmittelbar vor Induktion der Ischämie 66 ± 7 mmHg. Die seitenständige Infusion von Eniporide in einer Konzentration von 1µM 12 Minuten vor Beginn der Ischämie hatte keinen Einfluß auf die Kontraktilität in diesem Zeitraum. Vergleichbar zu den Voruntersuchungen fiel der LVDP innerhalb der ersten 3 Minuten der Ischämie auf 0 ab. In Reperfusion kam es in der Kontrollgruppe einmal, in der Gruppe der mit Eniporide vorbehandelten Herzen zweimal zu Kammerflimmern. In die Auswertung flossen die Daten zur Kontraktilität nur von den Herzen ein, die in Reperfusion kein Kammerflimmern zeigten.

Interessant war der Verlauf des LVDP in Reperfusion. Die Experimentalgruppe zeigte hier in den ersten 18 Minuten eine signifikant langsamere Erholung als die Kontrollgruppe, um dann aber im Sinne einer Kardioprotekti-

on eine bessere Kontraktilität aufzuweisen. Genau in diesem Zeitraum war auch die pH_i -Erholung in der Experimentalgruppe verlangsamt. Am Ende der Reperfusion hatte sich die Funktion der Experimentalgruppe auf Ausgangswerte vor Ischämie regeneriert, während die Kontrollgruppe 72 ± 12 % des präischämischen Ausgangswertes erreichte (Abbildung 20).

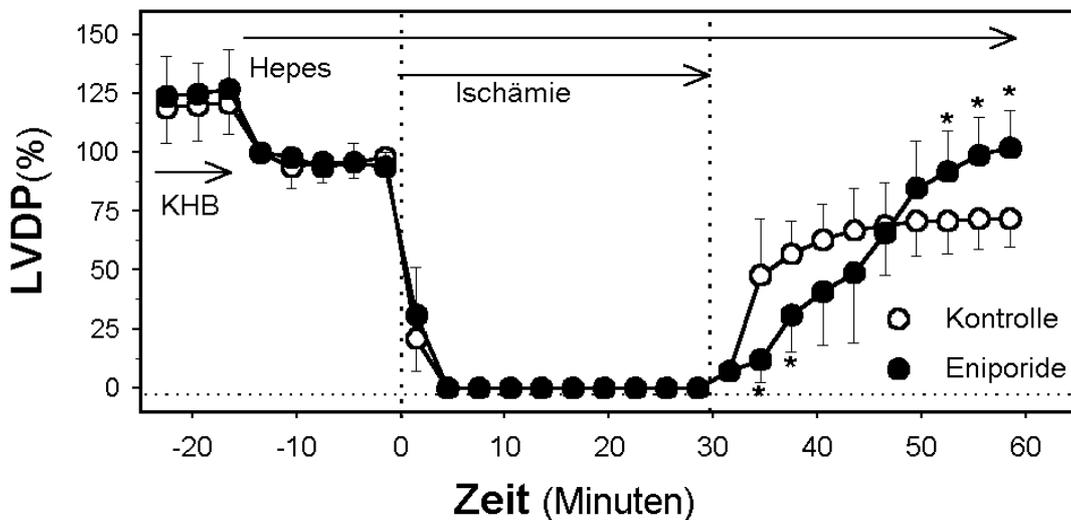


Abbildung 20: Linksventrikulärer Druck in Prozent zum prä-ischämischen Wert (Hepesperfusion). Versuchsablauf: Perfusion mit normalem Krebs-Henseleit-Puffer, dann Hepes Puffer vor, in 30 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion. Effekt von Eniporide $1 \mu\text{M}$, welches 12 Minuten vor Beginn der Ischämie seiteständig infundiert wurde. ($n=5$ in beiden Gruppen, 1x Kammerflimmern in der Kontrollgruppe; 2x Kammerflimmern in der Eniporidegruppe) (*: $p < 0,05$).

Die Analyse der energiereichen Phosphate ergab weitestgehend vergleichbare Ergebnisse mit den Voruntersuchungen (Abbildung 21). Vor Beginn der 30-minütigen Ischämie war die Kreatinphosphat-Konzentration in beiden Gruppen annähernd gleich. Auch unter Perfusion mit Hepes zeigte sich keine Veränderung des Kreatinphosphats in beiden Gruppen im Vergleich zur Perfusion mit Krebs-Henseleit-Puffer. Unmittelbar vor Ischämie betrug die Kreatinphosphat-Konzentration in der Kontrollgruppe $13,28 \pm 1,60$ mM und in der Experimentalgruppe $13,47 \pm 2,22$ mM. Analog zu den anderen Versuchsreihen kam es in Ischämie zu einem raschen Abfall der Kreatinphosphat-

konzentration. Am Ende der Ischämie war noch ein minimaler Peak in der ^{31}P -NMR-Spektroskopie bei den mit Eniporide vorperfundierten Herzen nachweisbar, entsprechend einer Konzentration von $0,13 \pm 0,09$ mM. In der Kontrollgruppe war kein Peak nachweisbar. In Reperfusion erholte sich die Kreatinphosphat-Konzentration in beiden Gruppen. Eniporide führte zu einer Erholung des Kreatinphosphats auf $11,71 \pm 2,48$ mM, das somit 87% des Ausgangsniveaus erreichte. In der Kontrollgruppe war die Erholung nicht so stark ausgeprägt. Es wurde eine Kreatinphosphat-Konzentration am Ende der Reperfusion von $9,29 \pm 1,93$ mM (70%) erreicht.

Auch die ATP-Konzentration konnte durch die Blockade des Natrium-Protonen-Austauschers durch $1 \mu\text{M}$ Eniporide im Vergleich zur Kontrolle in Reperfusion gebessert werden. Unter Ausgangsbedingungen betrug die ATP-Konzentration in beiden Gruppen im Mittel $6,48 \pm 0,21$ mM. In Ischämie fiel die Konzentration sukzessive in beiden Gruppen, wobei der Abfall unter Inhibition des NHE-1 und des NBC zum Ende der Ischämie leicht verzögert erschien. Am Ende der Ischämie war die ATP-Konzentration in der Kontrollgruppe auf $0,63 \pm 0,71$ mM gesunken. Dies entspricht einer Abnahme von etwa 90 %. In der Experimentalgruppe hingegen betrug der Abfall der ATP-Konzentration nur 80% bezogen auf den präischämisch gemessenen Wert. Diese Unterschiede waren jedoch nicht statistisch signifikant.

In Reperfusion erholte sich die ATP-Konzentration in der Kontrollgruppe auf $2,86 \pm 0,22$ mM, in der Experimentalgruppe auf $4,67 \pm 1,14$ mM. Eniporide führte somit zu einer signifikanten Verbesserung.

Das intrazelluläre anorganische Phosphat (P_i) stieg in Ischämie um den Faktor 18. Im Gegensatz zu den Versuchen mit bikarbonathaltigen Puffern konnten unter Perfusion mit HEPES keine Unterschiede in der intrazellulären Phosphatkonzentration in Ischämie und Reperfusion zwischen beiden Gruppen gefunden werden. Am Ende der Ischämie erreichte die Konzentration ein Maximum von $20,9 \pm 3,3$ mM in der Kontrollgruppe und 19 ± 3 mM in der Experimentalgruppe. Gleichzeitig waren die gemessenen P_i -Werte deutlich niedriger als in den vorangegangenen Untersuchungen.

In Reperfusion verringerte sich die Konzentration des anorganischen intrazellulären Phosphats, und fiel auf etwa das Doppelte des normoxischen Ausgangswertes ab (Abbildung 21).

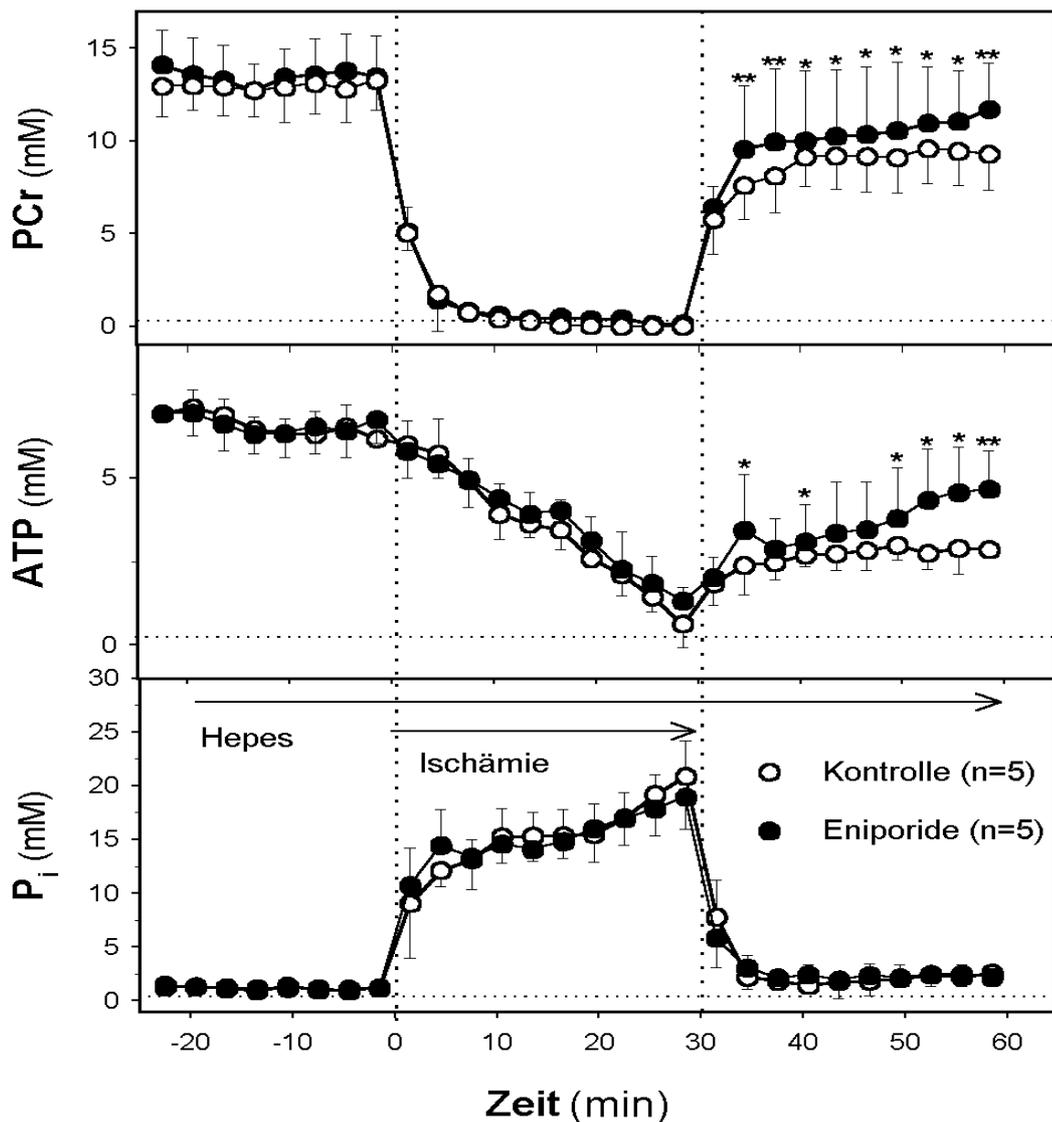


Abbildung 21: Einfluss von Eniporide auf Kreatinphosphatkonzentration (PCr), ATP-Konzentration und Konzentration des anorganischen Phosphats (P_i) vor und während 30 Minuten Ischämie und 30 Minuten Reperfusion unter Verwendung eines natriumbikarbonat-freien HEPES-Puffers. (*:p<0,05; **:p<0,01 im Vergleich mit der Kontrollgruppe)

Auch die Analyse der energiereichen Phosphate bestätigte die bereits auf der kontraktilen Ebene nachgewiesene kardioprotektive Wirkung der NHE-1 Inhibition. Daneben konnte in diesen Versuchen erstmals gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inhibition des NBC und des NHE-1 durch Eniporide in Ischämie und Reperfusion zu einem deutlich stärkeren Abfall des pH_i im Vergleich zur isolierten Inhibition des NBC oder des NHE-1 führte. Beide Transportsysteme können also den Ausfall des jeweils anderen kompensieren.

4. Diskussion

Das Ziel der vorgestellten Arbeit war es, zu klären, ob die Hemmung des Natrium-Protonen-Austauschers am Herzen (NHE-1) alleine oder nur in Kombination mit der Blockade anderer Protonen-Export-Mechanismen in Ischämie zu einem nachweisbar stärkeren Anstieg der intrazellulären Protonenkonzentration führt. Zur Hemmung des NHE-1 wurde Eniporide, ein neuer und selektiver NHE1-Inhibitor eingesetzt. Außerdem wurden dessen kardioprotektive Eigenschaften auf den Ebenen der kontraktilen Funktion, der Kontraktorentwicklung und des kardialen Energiestoffwechsels mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie untersucht.

Die wichtigsten Ergebnisse der hier vorgestellten Untersuchungen lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Eniporide hemmt bereits in Konzentrationen von 100 nM substantiell den Protonen-Export.
2. Der intrazelluläre pH-Verlauf in Ischämie wird durch die alleinige Inhibition des NHE-1 durch Eniporide nicht beeinflusst.
3. Der Monokarboxylat-Protonen-Symporter spielt im Hinblick auf den Abfall des pH_i in Ischämie keine bedeutende Rolle.
4. Die pH_i -Regulation in Ischämie ist im Wesentlichen abhängig von NHE-1 und $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ Kotransport (NBC). Durch eine bikarbonatfreie Perfusion vor Ischämie und in Reperfusion konnte unter zusätzlicher Inhibition des NHE-1 erstmalig ein signifikant stärkerer Abfall des pH_i in Ischämie beim isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen nachgewiesen und somit die regulatorische Bedeutung des NBC gezeigt werden.
5. Die selektive Inhibition von NHE-1 ist ebenso wie die Inhibition von NHE-1 und NBC während Ischämie und Reperfusion kardioprotektiv.

4.1. Das Versuchsmodell

In dieser Arbeit wurden isoliert perfundierte Meerschweinchenherzen eingesetzt, die in dem Magneten eines Kernresonanzspektrometers unter verschiedenen Versuchsbedingungen im Hinblick auf die Natriumakkumulation in Ischämie, den intrazellulären pH-Verlauf und den Energiehaushalt sowie auf die kontraktile Funktion während Ischämie und Reperfusion untersucht wurden.

Salin perfundierte isolierte Herzen wurden erstmals von Langendorff beschrieben (Langendorff, 1895).

Das isoliert perfundierte Meerschweinchenherz ist ein häufig verwendetes experimentelles Modell zur Untersuchung des kardialen Energiestatus mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie unter normoxischen Bedingungen und in Ischämie und Reperfusion (u. a. Eriksson et al., 2004; Decking et al., 2001; Sakamoto et al., 2000; Hotta et al., 1998; Yoshiyama et al., 1994; Tosaki und Braquet, 1990).

Zusätzlich zu den energetischen Daten wurde in einigen Versuchsreihen die Natriumakkumulation in Ischämie am selben Herzmodell mittels ^{23}Na -NMR-Spektroskopie untersucht. Auch dieses Verfahren ist bei verschiedenen Tierspezies und Arbeitsgruppen etabliert (Hartmann und Decking, 2003; Weidensteiner et al., 2002; Yamamoto et al., 2001; Jelicks und Siri, 1995; Hotta et al., 1994; Kohler et al., 1991).

Beide Verfahren wurden genutzt, um den Einfluss einer Blockade des Natrium-Protonen-Austauschers auf die intrazelluläre Natriumakkumulation, den intrazellulären pH in Ischämie und den Energiestatus in Ischämie und Reperfusion zu untersuchen.

Eniporide ist ein wirksamer, selektiver Inhibitor des NHE-1 (Kovar et al., 2001) und wurde in dieser Arbeit verwendet, um den Einfluss einer Inhibition von NHE-1 auf die Ionenhomöostase und die kardiale Funktion zu untersuchen.

4.2. Wirksamkeit der Inhibition von NHE-1 durch Eniporide

Durch eine kurzzeitige Perfusion mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl) entsteht nach Beendigung derselben durch Diffusion des intrazellulär akkumulierten NH_3 aus der Zelle unter Zurücklassen von Protonen eine intrazelluläre Azidose, die zu einer Aktivierung des NHE-1 führt. Durch den Einsatz eines Inhibitors des NHE-1 kommt es dann zu einem signifikant größeren pH_i -Abfall unmittelbar nach Beendigung der Ammoniumchloridgabe (Hartmann und Decking, 1999; Nakanishi et al., 1992).

Physiologischerweise kann ein Referenzbereich des intrazellulären pH von 7,1 bis 7,2 angenommen werden.

Unter Ausgangsbedingungen lag der intrazelluläre pH in diesen Versuchen bei $7,14 \pm 0,01$ und unterschied sich in Kontroll- und Versuchsgruppe nicht voneinander. Diese Ergebnisse sind somit mit anderen Untersuchungen am Meerschweinchenherzen, bei denen der intrazelluläre pH unter gleichen Versuchsbedingungen bei 7,2 (Roos et al., 1981) bzw. $7,06 \pm 0,01$ (Hartmann und Decking, 1999) lag, gut vergleichbar. In Untersuchungen an isolierten Kardiomyozyten von Ratten wurde ebenfalls ein intrazellulärer pH von 7,1 gemessen (Schäfer et al., 2000). In einer Arbeit an menschlichen, von Organtransplantierten entnommenen Kardiomyozyten wurde ein etwas höherer intrazellulärer pH von $7,31 \pm 0,02$ (Empfänger) und $7,29 \pm 0,03$ (Donor) gemessen (Yokoyama et al., 2000). Unter dem Einfluß unterschiedlicher Konzentrationen von Eniporide kam es nach Beendigung der Ammoniumchloridgabe zu einem stärkeren intrazellulären pH-Abfall als in der Kontrollgruppe, mit einem Maximum bei Verwendung einer Konzentration von Eniporide von $1 \mu\text{M}$. Hier fiel der pH_i nach Beendigung der Ammoniumchloridperfusion auf $6,76 \pm 0,05$ und unterschied sich signifikant von dem pH_i -Abfall in der Kontrollgruppe zum selben Zeitpunkt ($6,90 \pm 0,05$). Da die Perfusion mit einem bikarbonathaltigen Puffer durchgeführt wurde, waren alternative Protonen-Export-Mechanismen ebenfalls aktiv. Da Eniporide ein wirksamer und selektiver Inhibitor des NHE-1 ist, wird somit deutlich, dass der $\text{Na}^+\text{-H}^+$ Austausch eine wichtige Rolle bei der Wiederherstellung eines physiologischen, intrazellulären pH nach einer Azidose spielt. Gleichzeitig

konnte durch die Versuchsreihe eine maximal wirksame Konzentration von Eniporide von 1 μM für die weiteren Versuche bestimmt werden.

4.3. Intrazelluläre Natriumakkumulation in Ischämie

Während einer Ischämie kommt es zu einer verstärkten Bildung von Protonen. Grund hierfür ist unter anderem eine vermehrte anaerobe Glykolyse und ein Abbau von ATP in Verbindung mit einem deutlich herabgesetzten venösen Fluß (Dennis et al., 1991; Gevers, 1977). In Folge der intrazellulären Azidose wird der NHE-1 aktiviert und es kommt zu einem Austausch von Protonen und Natrium. Gleichzeitig ist die Aktivität der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, die physiologischerweise für die Aufrechterhaltung des Natriumgradienten entlang der zellulären Membran verantwortlich ist (Schmidt und Kjeldsen, 1998), auf Grund des Zusammenbruchs des ATP und der freien Energie der ATP-Hydrolyse in Ischämie in ihrer Aktivität deutlich eingeschränkt; folglich kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration.

Dementsprechend wurde mittels ^{23}Na -NMR-Spektroskopie in der Kontrollgruppe ein erheblich größerer Anstieg des intrazellulären Natriums beobachtet als in den mit Eniporide behandelten Herzen.

Eniporide beeinflusste die intrazelluläre Natriumkonzentration unter Standardbedingungen nicht, verringerte jedoch den Anstieg des intrazellulären Natriums in Ischämie signifikant. In der Kontrollgruppe wurde ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration bereits nach 30 Minuten um den Faktor 1,6 und nach 60 Minuten näherungsweise auf das dreifache Niveau des Ausgangswertes beobachtet. Nach kurzem initialen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration zu Beginn der Ischämie, die rasch auf Ausgangsniveau zurückging, verhinderte die Hemmung des NHE-1 durch Eniporide in den nächsten 30 Minuten einen Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration. Erst in der zweiten Hälfte der Ischämie ist ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration zu beobachten, die am Ende einen 1,6-fach höheren Wert erreichte als zu Beginn der Ischämie. Eniporide erreichte also eine Reduktion der intrazellulären Natriumkonzentration von 37% und verringerte den Natriumeinstrom in Ischämie somit mehr als Cariporide

(27%) in vergleichbaren Untersuchungen (Decking et al., 1999). Außerdem konnte durch Eniporide die intrazelluläre Natriumkonzentration über 30 bis 35 Minuten Ischämie auf Ausgangsniveau gehalten werden, was in dieser Form in anderen Untersuchungen bisher nicht gezeigt werden konnte (Decking et al., 1999).

Der in den ersten Minuten der Ischämie gemessene Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration ist wahrscheinlich die Folge einer Aktivierung von potentialgesteuerten Natriumkanälen. Nach dem in Ischämie raschen Ausfall der $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, des wichtigsten Natrium-Export-Mechanismus, kommt es über die potentialgesteuerten Natriumkanäle in den ersten 10 Minuten einer Ischämie zu einem weiteren Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration bei (Butwell et al., 1993; van Emous et al., 1997; Hartmann und Decking, 1998). Im weiteren ischämischen Verlauf fällt zunächst eine gleichbleibende intrazelluläre Natriumkonzentration auf. In dieser Zeit ist die Aktivität des NHE-1 maximal gesteigert in dem Versuch, die intrazellulär anfallenden Protonen aus der Zelle zu transportieren. Eniporide hemmt die Aktivität des NHE-1, die gleichbleibende intrazelluläre Natriumkonzentration ist also durch die wirksame und potente Inhibition des NHE-1 durch Eniporide zu erklären. Der langsame Anstieg des intrazellulären Natriums nach 35 Minuten Ischämie ist vergleichbar mit anderen Versuchen, in denen der NHE-1 inhibiert wurde (Decking et al., 1998). Es wurde postuliert, dass die Beteiligung anderer Transporter wie des $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Symporter oder des $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ -Antiporter sowie möglicherweise auch anderer NHE Isoformen für diesen Anstieg mit verantwortlich ist (Decking et al., 1999). Diesen Überlegungen widerspricht eine Arbeit an isolierten Kardiomyozyten von Meerschweinchenherzen, die durch Blockade von Natriumkanälen und NHE-1 eine fast vollständige Unterbindung des Natriumeinstroms unter simulierten Ischämiebedingungen zeigen konnte. Gleichzeitig merkt der Autor der Arbeit aber an, dass nicht auszuschließen sei, dass moderate Veränderungen von pH und Kaliumkonzentration bereits zu signifikanten Veränderungen des ischämischen Natriumeinstroms führen (Eigel und Hadley, 1999). Aus diesem Grund sind sicher quantitative und qualitative Unterschiede im Natriumeinstrom in verschiedenen experimentellen Modellen zu erwarten.

Der in der Kontrollgruppe gemessene Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration lag in diesen Versuchen niedriger als in einer anderen Versuchsreihe, in der ein Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration nach 60 Minuten um den Faktor 4,3 (Decking et al., 1998) gemessen wurde. Auch in anderen Untersuchungen wurden höhere intrazelluläre Natriumkonzentrationen zu vergleichbaren Zeitpunkten gemessen (Van Emous et al., 1998; Cross et al., 1995; Navon, 1994; Pike et al., 1990). Decking, Van Emous und Cross verwendeten in Ihren Modellen einen niedrigen Fluß in Ischämie im Gegensatz zu einer Ischämie ohne Restperfusion. Navon und Pike untersuchten Herzen bei niedrigeren Temperaturen.

Ein minimaler koronarer Restfluss in Ischämie ist im Gegensatz zu einer kompletten Ischämie in der Lage, oxidative Stoffwechselfvorgänge bedingt aufrecht zu erhalten und die mitochondriale Funktion zu bewahren (Ferrari et al., 1996). Unter diesen Bedingungen ist eine Phosphorylierung des NHE-1 eher möglich als bei komplett unterbrochener Perfusion. Eine stärkere Phosphorylierung wiederum steigert die Aktivität des NHE-1 und könnte somit zu einer stärkeren Natriumakkumulation beitragen (Moor et al., 2001). Dyck und Mitarbeiter (1995) konnten darüber hinaus zeigen, dass es in Niedrigfluss-Ischämie zu einer deutlichen Steigerung der Expression von NHE-1-mRNA im Vergleich zur vollständigen Ischämie kommt. Diese Vorstellung wird auch durch Daten einer neueren Arbeit unterstützt, in der unter anderem die intrazelluläre Natriumakkumulation in einer 30-minütigen Ischämie untersucht wurde und die nur einen Anstieg in dieser Zeit um den Faktor 1,26 zeigte (Varadarajan et al., 2001). Dieser lag damit noch deutlich unter den Ergebnissen der hier präsentierten Untersuchungen zum vergleichbaren Zeitraum.

Nicht auszuschließen sind auch spezifische Unterschiede in der Aktivität des NHE-1 zwischen den Spezies Meerschweinchen (vorliegende Arbeit und Decking), Ratten (van Emous, Cross und Navon) und Frettchen (Pike), wie sie für den $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$ -Kotransporter, eine weitere Eintrittspforte für intrazelluläres Natrium, im Rahmen einer ischämischen Azidose (Yamamoto et al., 2005) beschrieben sind. Auch die in verschiedenen Spezies in anderen Untersuchungen gezeigten Unterschiede in der intrazellulären Natriumkonzentration (4-16 mmol/l) unter Ausgangsbedingungen (Pieske et al.,

2002; Gray et al., 2001; Yao et al., 1998; Donoso et al., 1992; Harrison et al., 1992; Baudet et al., 1991; Wang et al., 1988; Chapman et al., 1983; Cohen et al., 1982) könnten einen Einfluss auf die Bedeutung des NHE-1 haben.

Legt man eine intrazelluläre Natriumkonzentration von 6,8 mmol/l zu Grunde (Cohen et al., 1982), so ergab sich nach 60 Minuten vollständiger Ischämie eine intrazelluläre Natriumkonzentration von 17 mmol/l in den Versuchen in dieser Arbeit.

Die in dieser Arbeit durchgeführten ^{23}Na -NMR-spektroskopischen Untersuchungen belegen, dass die Inhibition des NHE-1 durch Eniporide bereits in einer Konzentration von 1 μM die Natriumüberladung in den ersten 30 Minuten der Ischämie wirkungsvoll verhindert.

4.4. Intrazellulärer pH in Ischämie und Reperfusion

4.4.1. NHE-1 und NBC in Ischämie und Reperfusion

In der ersten Versuchsreihe wurde ein bikarbonathaltiges Perfusionsmedium verwendet. Der sowohl in der Kontrollgruppe als auch in der Experimentalgruppe gemessene intrazelluläre pH betrug $7,14 \pm 0,02$ und war somit vergleichbar mit anderen Untersuchungen sowohl an isolierten Kardiomyozyten von Ratten ($7,09 \pm 0,03$, Schäfer et al., 2000) als auch an isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen ($7,11 \pm 0,05$, Hartmann und Decking, 1999). Während einer 36-minütigen globalen Ischämie kam es zu einem raschen und deutlichen Abfall des pH_i auf $5,74 \pm 0,14$. Weder die Geschwindigkeit des Abfalls noch der am Ende der Ischämie erreichte pH_i unterschied sich in beiden Gruppen voneinander. Bei deutlicher inhibitorischer Wirkung von Eniporide, gezeigt durch die verringerte intrazelluläre Natriumakkumulation in Ischämie, müssen also alternative Puffersysteme für den fehlenden Unterschied des pH_i – Verlaufes in Ischämie verantwortlich sein.

In einem bikarbonathaltigen System ist der wahrscheinlichste Mechanismus eine kompensatorische Steigerung der Aktivität des NBC-Transportes. So konnte in der vorgestellten Arbeit erstmals gezeigt werden, dass die Inhibi-

tion des NHE-1 durch Eniporide und des NBC durch eine bikarbonatfreie HEPES-Puffer-Perfusion zu einer signifikanten Steigerung des pH_i -Abfalls in Ischämie führte. Auch unter bikarbonatfreier Perfusion unterschied sich der intrazelluläre pH unter normoxischen Bedingungen in den Versuchsgruppen zunächst nicht voneinander. Mit $7,15 \pm 0,01$ war er vergleichbar zu den in Voruntersuchungen gemessenen Werten unter bikarbonathaltiger Perfusion, was für die kompensatorische Fähigkeit alternativer Puffer- und Transportsysteme spricht. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen war der pH_i in einer anderen Untersuchung unter bikarbonatfreier Perfusion bereits erniedrigt ($6,97 \pm 0,01$ vs. $7,05 \pm 0,01$; ten Hove et al., 2005).

In Ischämie führte die Inhibition von NBC und NHE-1 zu einem signifikant stärkeren Abfall des pH_i auf $5,68 \pm 0,11$ (vs. $5,80 \pm 0,03$ Kontrolle). Diese Daten sind vergleichbar zu der Untersuchung von ten Hove und Mitarbeitern, die unter Verwendung von Cariporide zur Inhibition des NHE-1 unter bikarbonatfreier Perfusion einen pH_i -Abfall auf $5,70 \pm 0,01$ zeigen konnten. Auch Schäfer und Mitarbeiter zeigten an isolierten Herzmuskelzellen von Ratten, dass eine alleinige Inhibition von NHE-1 durch Cariporide keine Veränderung des pH_i unter ischämischen Bedingungen bewirkte, hingegen die Kombination aus Inhibition von NHE-1 und NBC den pH_i signifikant stärker abfallen ließ (Schäfer et al., 2000).

Die Bedeutung des NBC an der Regulation des intrazellulären pH im Myokard wurde in vielen Arbeiten in verschiedenen Spezies untersucht (Yamaguchi et al., 1998; Pike et al., 1993; Lagadic-Gossman et al., 1992; Dart C et al., 1992; Vaughan-Jones, 1986; Piwinca-Worm et al., 1985). Im ventrikulären Myokard beträgt der Säureefflux über den NBC 40-50% (Khandoudi et al., 2001). In einer Untersuchung an isolierten ventrikulären Myozyten von Ratten konnte eine Steigerung des säureäquivalenten Effluxes über den Na^+ - HCO_3^- -Kotransporter bei Abnahme des pH_i gezeigt werden (le Prigent et al., 1997). Daten bezüglich des intrazellulären pH-Verlaufes in Ischämie unter gleichzeitiger Inhibition sowohl des NBC durch eine bikarbonatfreie Perfusion als auch des NHE-1 zeigten in der Vergangenheit widersprüchliche Ergebnisse (Docherty et al., 1997; Bauza et al., 1995). Einschränkend muß hinzugefügt werden, dass durch die Verwendung eines bikarbonatfreien Puffermediums keine selektive Inhibition des NBC erzielt wird. Vielmehr

werden auch andere bikarbonatabhängige Transportsysteme wie der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Transporter in ihrer Funktion blockiert. Allerdings spielt dieser Transporter im adulten Herz eine untergeordnete Rolle im Rahmen des Azidoseausgleichs (v. Heel et al., 1984; Gonzalez et al., 1981; Vaughan-Jones, 1979). Über diesen Transporter und einen Cl^-/OH^- -Austauscher wird vielmehr die intrazelluläre Säureäquivalent-Aufnahme geregelt (Loh et al., 2001).

Bei der Interpretation der in Reperfusion gemessenen pH_i -Werte unter bikarbonathaltiger Perfusion sind mehrere Faktoren zu berücksichtigen. Während es in der mit Eniporide behandelten Gruppe zu einer raschen, kontinuierlichen Erholung des intrazellulären pH auf Ausgangswerte kam, zeigte sich in der Kontrollgruppe ein relativ breiter P_i -Peak in der ^{31}P -NMR Spektroskopie in Reperfusion. Durch die 36-minütige Ischämie ist es zu einer regional unterschiedlich stark ausgeprägten Schädigung des Myokards gekommen, mit entsprechend regional sehr unterschiedlichem intrazellulären pH. Da das angewandte Messverfahren über das gesamte Herz einen Mittelwert erfasst, sind auf Grund des Schädigungsgrades des Herzens durch die Dauer der Ischämie verzögerte Veränderungen des intrazellulären pH nicht erfaßbar gewesen. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit anderen Untersuchungen am vergleichbaren Modell, in denen eine Interpretation der pH_i -Werte in Reperfusion nur eingeschränkt möglich war und ebenfalls keinen Unterschied im pH_i -Verlauf zeigte (Lin et al., 2003; Decking et al., 1998). In Arbeiten, in denen eine durch Inhibition des NHE-1 durch Cariporide zu erwartende verzögerte Erholung des pH_i in Reperfusion gezeigt werden konnte, war der Reperfusion eine kürzere Dauer der Ischämie (30 Minuten versus 36 Minuten in dieser Arbeit) vorausgegangen (Strömer et al., 2000). Hierdurch ist eine geringere Schädigung des Myokards mit verbesserter zellulärer Integrität zu erwarten, wodurch die Physiologie der intrazellulären pH-Regulation besser beobachtet werden kann. Allerdings war auch in dieser Arbeit in den ersten 90 Sekunden der Reperfusion kein Unterschied des pH_i mit oder ohne Inhibition des NHE-1 durch Cariporide gesehen worden. Ursächlich war möglicherweise eine in Reperfusion initial kompensatorisch erhöhte Aktivität des Laktat-Protonen-Kotransporters in den mit Cariporide vorbehandelten Herzen (Lin und Suleiman, 2003).

Auch unter bikarbonatfreier Perfusion stieg der intrazelluläre pH in den ersten Minuten der Reperfusion identisch an, bevor es in dieser Untersuchung im Unterschied zu den Untersuchungen mit einem bikarbonathaltigen Perfusionsmedium zu einer langsameren Erholung des pH_i unter Inhibition von NBC und NHE-1 kommt. Auch der am Ende der Reperfusion erreichte pH_i lag in der Experimentalgruppe mit $7,05 \pm 0,02$ leicht unter der Kontrollgruppe ($7,11 \pm 0,03$). Allerdings erreichten diese Ergebnisse kein signifikantes Niveau und müssen durch zukünftige Experimente bestätigt werden.

4.4.2. Monocarboxylat- H^+ -Transporter in Ischämie und Reperfusion

Während die Bedeutung des Laktat-Protonen-Symportes über den Monocarboxylat-Transporter in Reperfusion wiederholt gezeigt werden konnte (s. oben und Tokuno et al., 1999), ist dessen Bedeutung für den intrazellulären pH in Ischämie bisher nur unzureichend untersucht. Während einer Hypoxie wird die anaerobe Glykolyse massiv gesteigert, um ATP zu generieren und so sowohl Kontraktionsfähigkeit als auch Ionenhomöostase des Herzmuskels aufrecht zu erhalten. Daraus resultiert ein deutlicher Anstieg der Laktat- und Protonenkonzentration in Ischämie (Poole-Wilson, 1989; Richards et al., 1987; Eisner et al., 1987; Rovetto et al., 1973; Williamson, 1966). Die daraus resultierende Azidose stimuliert den Efflux von Laktat aus der Zelle über den Monocarboxylattransporter. Hierdurch werden auch Protonen aus der Zelle entfernt. Eine substratfreie Perfusion des isolierten Meerschweinchenherzens führt zu einer kontinuierlichen Depletion der muskulären Glykogenspeicher. Hierdurch wird die Glykolyse bereits frühzeitig in Ischämie blockiert. Es bildet sich weniger Laktat. Da der Laktat- H^+ -Transport abhängig ist von dem Konzentrationsgefälle von Laktat zwischen intra- und extrazellulärem Raum, kommt es in Ischämie rasch zu einer Verringerung der Transportrate des Laktat-Protonen-Symporters, so dass dieser Transporter eine verminderte Protonenextrusion durch Inhibition des NHE-1 nicht mehr kompensieren könnte. Folglich wäre ein stärkerer Abfall des intrazellulären pH unter Inhibition des NHE-1 durch Eniporide zu erwarten.

Tatsächlich unterscheidet sich der pH_i -Abfall zwischen Kontroll- und Experimentalgruppe in den ersten Minuten der Ischämie nicht voneinander. Dies

ist in Analogie zu den Daten zur intrazellulären Natriumakkumulation, die gezeigt haben, dass die Aktivität des NHE-1 in der initialen Phase der Ischämie noch gering ist. Im weiteren Verlauf beschleunigt sich die Entwicklung einer intrazellulären Azidose in der Experimentalgruppe, ohne allerdings ein von der Kontrollgruppe signifikant unterschiedliches Niveau zu erreichen.

Der pH_i -Abfall war in diesen Versuchen deutlich geringer ausgeprägt als in den Versuchen mit vollständiger Flussunterbrechung ($6,33 \pm 0,22$ vs. $5,85 \pm 0,1$). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen, in denen vergleichbare Werte für pH_i in Niedrigfluss-Ischämie gemessen wurden (Ferrari et al., 1996). Dies ist zum einen auf die reduzierte Bildung von Laktat zurückzuführen, zum anderen auf eine längere Aufrechterhaltung eines oxidativen Metabolismus während Niedrigfluss-Ischämie (Ferrari et al., 1997). Auch die in Ischämie freigesetzte Laktat-Menge unterschied sich nicht signifikant zwischen beiden Gruppen. Der Monocarboxylattransporter spielt somit nur eine untergeordnete Rolle in der Regulation des intrazellulären pH in Ischämie. Dies wird gestützt durch die Tatsache, dass die Konzentration des Laktats im koronarvenösen Effluat in Ischämie in beiden Versuchsgruppen nahezu identisch war. Die in Ischämie gemessenen Konzentrationen stiegen in beiden Gruppen gleichermaßen erwartungsgemäß an. In Reperfusion kam es dann unter dem wieder einsetzenden Fluss in den ersten Minuten zu deutlich erhöhten Laktatkonzentrationen in beiden Versuchsgruppen. Erneut zeigten sich aber keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Auch der intrazelluläre pH Verlauf in Reperfusion unterschied sich nicht in beiden Gruppen, was durch die bereits weiter oben diskutierten Gründe zu erklären ist.

4.4.3 Zusammenfassung

Der Natrium-Bikarbonat-Sympporter und der Natrium-Protonen-Austauscher sind in Ischämie maßgeblich an der Regulation des intrazellulären pH beteiligt. Die Untersuchungen zeigen, dass der NBC eine selektive Inhibition von NHE-1 in Ischämie kompensieren kann. Alternative Transportsysteme wie der Monocarboxylat-Protonen-Transporter sind in Ischämie von untergeordneter Bedeutung. In Reperfusion ist die Analyse des intrazellulären pH-

Verlaufes sehr stark von der Gesamtschädigung des Myokards in Ischämie abhängig. Quantitative Aussagen über die Beteiligung der verschiedenen untersuchten Transportsysteme können aus den vorgestellten Untersuchungsergebnissen nicht abgeleitet werden. Die in der Literatur beschriebene Bedeutung des Laktat-Protonen-Symporters in der Frühphase der Reperfusion konnte unter den gewählten Untersuchungsbedingungen nicht bestätigt werden. Es bleibt zukünftigen Experimenten überlassen, zu klären, inwiefern auch andere Systeme die pH_i -Regulation in der Frühphase der Reperfusion beeinflussen. Wünschenswert wäre ebenfalls die Entwicklung eines selektiven NBC-Inhibitors, um so die Bedeutung dieses Transportsystems noch besser verstehen zu können.

4.5. Kardioprotektion durch Inhibition des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschers durch Eniporide in Ischämie und Reperfusion

In Analogie zu den in der Literatur verfügbaren Daten zu Cariporide und Zoniporide, zwei bekannten und ausführlich untersuchten Inhibitoren des NHE-1 am Myokard, war auch die Inhibition des NHE-1 durch Eniporide in verschiedenen Versuchsmodellen kardioprotektiv. Sowohl der linksventrikulär entwickelte Druck als auch die energiereichen Phosphate erholten sich postischämisch in der Experimentalgruppe signifikant besser. Der LVDP erholte sich unter Verwendung eines bikarbonathaltigen Perfusates nach Reperfusion in der Interventionsgruppe auf 77% des präischämisch gemessenen Wertes und lag somit 38% höher als in der Kontrollgruppe. Die energiereichen Phosphate PCr und ATP erreichten in der Experimentalgruppe eine um 59% bzw. 25% höhere Konzentration als in der Kontrollgruppe.

Unter Ausgangsbedingungen hatte die Inhibition des NHE-1 bei bikarbonathaltigem Perfusionsmedium keinen Einfluß auf die energiereichen Phosphate und den linksventrikulär entwickelten Druck. Dies stimmt mit der Literatur überein, in der eine Inhibition des NHE-1 beim Meerschweinchenherzen durch Cariporide ebenfalls keinen Einfluß unter Ausgangsbedingungen hatte (Hartmann und Decking, 1999).

Die präischämisch gemessene Druckamplitude des linken Ventrikels von 76 mmHg ist vergleichbar mit der in der Untersuchung von Hotta und Mitarbeitern gemessenen (72 mmHg) (Hotta et al., 2001).

In jener Arbeit erholte sich der LVDP nach 40-minütiger Ischämie und anschließender 40-minütiger Reperfusion auf 76% des Ausgangswertes unter Verwendung von SM-20550, einem potenten und hochselektiven Inhibitor des NHE-1 (Ito et al., 1999), während in der Kontrollgruppe eine Erholung auf 37% gemessen wurde. Zwar war die Ischämiedauer geringfügig länger, jedoch sind diese Werte durchaus mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen (77% vs 33%) vergleichbar. Eniporide verzögerte darüber hinaus die Entstehung einer ischämischen Kontraktur, gemessen an der Zunahme des linksventrikulären enddiastolischen Druckes, in Ischämie. Auch dieser Effekt ist mit der Wirkung anderer NHE-1 Inhibitoren vergleichbar (Ayoub et al., 2003; Strömer et al., 2000).

Die Untersuchung der energiereichen Phosphate konnte in Ischämie zwar keinen Unterschied im Abfall der ATP-Konzentration zeigen, jedoch wies ein in Ischämie signifikant höheres anorganisches Phosphat auf einen vermehrten (Adenin)-Nukleotid-Abbau hin. Die kardioprotektive Wirkung von Eniporide ist somit vergleichbar zu anderen Inhibitoren des NHE-1 am Herzen.

Auch unter bikarbonatfreier Perfusion war die Inhibition des NHE-1 kardioprotektiv.

Die in diesen Versuchen gemessene, präischämische Abnahme des linksventrikulär entwickelten Druckes um 23% in beiden Gruppen unter Perfusion mit bikarbonatfreier HEPES-Pufferlösung ist vergleichbar zu Daten von isoliert perfundierten Rattenherzen, in denen eine Funktionsabnahme um 18% gemessen wurde (Ten Hove et al., 2005). Die energiereichen Phosphate hingegen unterschieden sich unter der veränderten Perfusion in beiden Gruppen nicht ($13,6 \pm 1,9$ und $13,5 \pm 2,2$ mmol/l). Auch dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit der Arbeit von Ten Hove und Mitarbeitern. In Ischämie kommt es zu einer raschen Abnahme der Konzentration der energiereichen Phosphate. Allerdings ist diese nicht so stark ausgeprägt wie in den Versuchen mit bikarbonathaltiger Pufferlösung und den Versuchen mit präischämischer Glykogendepletion, so dass auch endischämisch eine

ATP-Konzentration gemessen werden konnte. Die gleichzeitige Inhibition des NHE-1 und des NBC führte zu einer höheren ATP-Konzentration am Ende der Ischämie (20% vs. 10%). Alle energiereichen Phosphate erholten sich bei gleichzeitiger Inhibition des NHE-1 und des NBC signifikant besser. Die PCr-Konzentration erreichte in der Experimentalgruppe präischämische Ausgangswerte und lag somit am Ende der Reperfusion um 17% höher als in der Kontrollgruppe. Auch die zu diesem Zeitpunkt gemessene ATP-Konzentration lag um 28% höher.

Bemerkenswert war der Verlauf des linksventrikulär entwickelten Druckes in Reperfusion. Während der ersten 15 Minuten der Reperfusion kam es bei gleichzeitiger Inhibition des NHE-1 und des NBC zu einer verringerten Erholung der Kontraktilität. Im weiteren Verlauf erholte sich die Funktion in dieser Gruppe auf das Niveau vor Ischämie, während die Kontrollgruppe nach initial rascherer Erholung der Kontraktilität ein signifikant niedrigeres Niveau erreichte. Die Vermutung liegt nahe, dass der negativ inotrope Effekt einer prolongierten Azidose in Reperfusion zunächst die Erholung des LVDP verzögert, gleichzeitig aber über eine vollständigere Erholung der energiereichen Phosphate den kardioprotektiven Effekt von Eniporide verstärkt.

Einschränkend sei an dieser Stelle hinzugefügt, dass in der Experimentalgruppe bei 2 Versuchen Kammerflimmern in Reperfusion auftrat, während dies in der Kontrollgruppe nur einmal der Fall war. Ein niedriger pH_i ist einerseits in der Lage, zu einer Schädigung von Kardiomyozyten zu führen, andererseits ist eine prolongierte Azidose in Reperfusion kardioprotektiv. Ein niedriger pH_i in Reperfusion inhibiert den Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher (Shigematsu et al., 1999; Doering und Lederer, 1993) und führt somit zu einer geringeren unmittelbar postischämisch zu messenden Kontraktilität.

Die kardioprotektive Wirkung einer gleichzeitigen Inhibition des NHE-1 durch Eniporide und des NBC bei konstantem Fluß konnte auch für Cariporide gezeigt werden (Shimada et al., 1996), allerdings ist der Verlauf der Funktionserholung am isoliert perfundierten Meerschweinchenherzen in dieser Form bisher nicht gezeigt worden.

Die Inhibition des NHE-1 unter gleichzeitig bei substratfreier Perfusion reduzierter Aktivität des Monokarboxylat-H⁺-Austauschers zeigte im Gegensatz zu obigen Messreihen einen kardioprotektiven Effekt lediglich auf der Ebene der energiereichen Phosphate. Funktionell konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Experimental- und Kontrollgruppe festgestellt werden.

In isoliert perfundierten Herzen konnte gezeigt werden, dass eine Laktatazidose maßgeblich zur Schädigung von Kardiomyozyten in Ischämie beiträgt (Dennis et al., 1991). Dabei war die Akkumulation von Laktat von größerer Bedeutung als der begleitende Abfall des pH_i (Cross et al., 1995).

Eine substratfreie Perfusion vor Beginn der Ischämie führt zu einer geringeren Bildung von Laktat in Ischämie durch präischämische Glykogeneplektion. Die kardioprotektive Wirkung der Inhibition des NHE-1 durch Eniporide wurde oben ausführlich diskutiert.

Die substratfreie Perfusion führte zu einer Reduktion des linksventrikulären Druckes um etwa 15% in beiden Gruppen. Gleichzeitig reduzierte sich das Kreatinphosphat um 30% bei Aufrechterhaltung der ATP-Konzentration. Vergleichbare Studien zur substratfreien Perfusion bei gleichzeitiger Inhibition des NHE-1 fehlen in der Literatur.

In Ischämie konnte wie in den vorangegangenen Messreihen erneut kein signifikanter Unterschied im Abfall des ATP unter Inhibition des NHE-1 gezeigt werden. Die Erholung des linksventrikulär entwickelten Druckes lag im Mittel in der Experimentalgruppe zwar um 49% höher als in der Kontrollgruppe, auf Grund von großen Schwankungen innerhalb der verschiedenen Versuche erreichten die Ergebnisse aber kein signifikantes Niveau. Die energiereichen Phosphate hingegen erreichten in Reperfusion unter Inhibition des NHE-1 signifikant höhere Werte.

Ein Grund für die fehlende Signifikanz auf funktioneller Ebene könnte ein verminderter Abfall des pH_i in Ischämie (endischämisch 6,33) in dieser Versuchsreihe sein. Ein erniedrigter pH in Ischämie und eine prolongierte Azidose in Reperfusion schützen das Langendorff-perfundierte Herz (Ebihara et al., 1996). Zwar deuteten die Daten an, dass die zusätzliche Inhibition des NHE-1 den pH_i Abfall in Ischämie verstärkt, doch diese Ergebnisse wa-

ren ebenso wie der deutliche Trend der Funktionserholung in Reperfusion nicht signifikant.

Ein wesentlicher Mechanismus, der zur kardioprotektiven Wirkung durch NHE-1 Inhibition beiträgt, ist die Verringerung der intrazellulären Natriumakkumulation, wie sie auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Die durch die Ischämie einsetzende anaerobe Glykolyse führt zu einer intrazellulären Azidose. Hierdurch müssen Mechanismen aktiviert werden, die Säureäquivalente aus der Zelle ausschleusen. Hierzu gehören, wie oben gezeigt wurde, der NHE-1, NBC und Monokarboxylat-H⁺-Austauscher. Ein in der Folge der Ischämie entstehender Anstieg der intrazellulären Natriumkonzentration führt zu einem verringerten Auswärtstransport von Kalzium bzw. sogar zu einem Einwärtstransport von Kalzium in die Zelle durch Umkehr des Na⁺-Ca²⁺-Austauschers (NCX) (Allen und Xiao, 2003; Piper et al., 2003). Die Bedeutung dieses Mechanismus für die Schädigung des Myokards und die damit verbundene Funktionseinschränkung in Reperfusion wurde bereits 1985 durch Ladzunski und Mitarbeiter postuliert (Ladzunski et al., 1985) und in vielen Übersichtsarbeiten beschrieben (Schillinger, 2003; Kamazyn et al., 1999; Avkiran et al., 1999; Murphy, 1999). In neuesten Untersuchungen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Inhibition des Na⁺-Ca²⁺-Austauschers die Schädigung des Myokards in Reperfusion effektiver verhindert als die Inhibition des NHE-1 (Matsumoto et al., 2002; Inserte et al., 2002). Eine erhöhte intrazelluläre Kalziumkonzentration führt unter anderem zu einer Hyperkontraktur und hat eine proarrhythmogene Wirkung. Darüber hinaus spielt die Kalziumkonzentration eine wichtige Rolle in der Induktion der Apoptose. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition des NHE-1 durch Cariporide in einem Ischämie-Reperfusions-Modell die Apoptoserate über eine Erniedrigung der intrazellulären Kalziumakkumulation verringern konnte (Sun et al., 2004).

In der vorgelegten Arbeit wurde die intrazelluläre Kalziumkonzentration nicht gemessen. Die verzögerte Entwicklung einer ischämischen Kontraktur kann jedoch als Hinweis auf eine reduzierte intrazelluläre Kalziumkonzentration interpretiert werden (Hartmann und Decking, 1999).

Bereits im Jahr 2000 zeigten Schäfer und Mitarbeiter an isolierten Kardiomyozyten, dass eine verbesserte Funktionserhaltung durch Inhibition des NHE-1 durch Cariporide nicht allein durch eine verstärkte intrazelluläre Azidose und eine verringerte Kalziumaufnahme erklärt werden kann (Schäfer et al., 2000). In einer kürzlich publizierten Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine NHE-1 Inhibition über die oben genannten Wirkungen hinausgehend einen protektiven Effekt auf die Funktionalität der Mitochondrien hatte (Javadov et al., 2005). Weitere Studien müssen den Zusammenhang zwischen intrazellulärer Natrium-, Kalzium- und Protonenkonzentration sowie möglichen freien Radikalen und anderen in Ischämie veränderten und gebildeten Transport-Proteinen auf mitochondrialer Ebene untersuchen.

Die Inhibition des NHE-1 durch Eniporide war auch in dieser Arbeit kardioprotektiv. Dies ist im Widerspruch zu Ergebnissen aus klinischen Studien, in denen eine eindeutige kardioprotektive Wirkung fehlte (Zeymer et al., 2001). Allerdings haben viele Arbeiten gezeigt, dass die kardioprotektive Wirkung der NHE-1 Inhibition am stärksten ausgeprägt ist bei Gabe eines Inhibitors vor Beginn der Ischämie. Die postischämische Gabe zu Beginn der Reperfusion hat widersprüchliche Ergebnisse zur Folge (Hurtado und Pierce, 2001; An et al., 2001). Der Zeitpunkt der Applikation erscheint also ein wichtiger Faktor im Rahmen der kardioprotektiven Wirkung zu sein. Gleichzeitig war in der klinischen Studie von Zeymer eine Einmalgabe von Eniporide erfolgt. Bei einer Halbwertszeit von Eniporide von etwa 2 Stunden (Kovar et al., 2001) könnte eine Einmalgabe im Rahmen einer Lysetherapie, die sich in der Regel über mehrere Stunden hinzieht, unzureichend sein zur Ausbildung eines signifikanten kardioprotektiven Effektes. Eine repetitive Gabe hätte hier vielleicht einen größeren Erfolg gebracht.

4.6 Ausblick

Die in der Diskussion aufgeführte Fähigkeit der Herzmuskelzelle, sehr schnell auf veränderte äußere Bedingungen mit Anpassung der Transportrate (NHE-1) zu reagieren, zeigt, wie wichtig weitere Untersuchungen auf molekularer Ebene zur Charakterisierung der Expression und Regulation

von Transportproteinen in Ischämie und Reperfusion sind. Während eine vermehrte Expression des NHE-1 in Ischämie nachgewiesen werden konnte (Gan et al., 1999), fehlen Daten hierzu für den zweiten wesentlichen pH_i -Regulationsmechanismus, den Na^+ - HCO_3^- -Kotransporter. Auch ein selektiver Inhibitor dieses Transportproteins steht bisher nicht zur Verfügung. In einer Arbeit mit Antikörpern gegen den Na^+ - HCO_3^- -Kotransporter konnte ein kardioprotektiver Effekt in Ischämie und Reperfusion gezeigt werden. Allerdings blieb die Selektivität des Antikörpers unklar (Khandoudi et al., 2001). Zum tieferen Verständnis der Bedeutung dieser Mechanismen für die pH_i -Regulation und die Ionenhomöostase im Hinblick auf kardioprotektive Effekte sind weitere Forschungen in diesem Bereich notwendig. In klinischen Studien zeigte die Inhibition des NHE-1 nur unzureichende kardioprotektive Effekte. Gerade das auch in der aktuellen Literatur (ten Hove et al., 2005) erneut gezeigte kardioprotektive Potential der Inhibition verschiedener Ionen-Transporter machen weitere klinische Studien in diesem Bereich sinnvoll. Gleichzeitig wäre es wünschenswert, gerade auf Grund der außerordentlichen Komplexität der pH_i -Regulation und der Störanfälligkeit dieses Systems durch Temperatur und Elektrolytunterschiede (Ch`en F.F.T. et al., 2003), möglichst einheitliche Versuchsprotokolle -Spezies-übergreifend- zu etablieren, um methodologische Fehler noch weiter zu reduzieren und die Vergleichbarkeit von Studien zu verbessern. Die Ergebnisse dieser Arbeit leisten einen Beitrag zum Verständnis der pH_i Regulation in Ischämie und Reperfusion und der kardioprotektiven Bedeutung der Inhibition des NHE-1 und des Na^+ - HCO_3^- -Kotransporter.

Die Zeitfenster, in denen zukünftig pH_i -Veränderungen und Elektrolytveränderungen in Reperfusion gemessen werden, sollten sich verkürzen. Oft spielen sich Adaptationsvorgänge binnen Sekunden oder weniger Minuten ab und werden selbst durch die NMR-Spektroskopie nur ungenügend erfasst und charakterisiert. Neue methodologische Verfahren hierzu müssten entwickelt werden. Einen weiteren wichtigen Beitrag werden Modelle leisten, in denen gezielt Transporterproteine ausgeschaltet werden, wie es an einem Mausmodell für den NHE-1 gezeigt werden konnte (Wang et al., 2003). Gleichzeitig sind Untersuchungen am nach Langendorff perfundierten, isolierten Herzen nur wenig repräsentativ für die komplexen Vorgänge

z.B. bei Patienten mit Myokardinfarkt. Das Fehlen von freien Fettsäuren im Perfusat etwa könnte die Schädigung durch Ischämie und Reperfusion verringern. Auch der Einfluß von Blutzellen wie Leukozyten und Thrombozyten in Ischämie und Reperfusion im kristallin perfundierten Herzen entfällt (Ferrari et al., 1996). Der NHE-1 unterliegt darüber hinaus vielfältigen hormonalen Regulationsmechanismen (Masereel et al., 2003), die in tierexperimentellen Untersuchungen am isolierten Herzen in ihrer Komplexität nur schwer simuliert werden können. Vor diesem Hintergrund lässt sich eine fehlende, beziehungsweise deutlich eingeschränkte Wirksamkeit der NHE-1 Inhibitoren Eniporide und Cariporide in klinischen Studien zumindest teilweise erklären. Darüberhinaus ist die richtige Dosierung der Substanzen sowie die Dauer der Gabe bei Patienten mit kardialen Erkrankungen noch nicht ausreichend untersucht (Menown et al., 2001). Dies wird Aufgabe multizentrischer Studien sein, um den in dieser Arbeit erneut aufgezeigten hoffnungsvollen Aspekt der Kardioprotektion durch den NHE-1 Inhibitor Eniporide auch in der Praxis wirkungsvoll umzusetzen.

Auch die Möglichkeit, eine kardiale Hypertrophie und myokardiales Remodelling durch Inhibition des $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauschers zu verringern (Baartscheer et al., 2005, Linz und Busch, 2003), zeigen, dass das Potential der $\text{Na}^+\text{-H}^+$ -Austauscher-Inhibitoren noch nicht vollständig ausgeschöpft ist. Daten zu Eniporide fehlen hierzu noch völlig und bieten vielfältige Möglichkeiten, die in dieser Arbeit gesammelten Daten in weiteren Versuchsmodellen zu erweitern.

5. Zusammenfassung

In der Vergangenheit zeigten Versuche an isoliert perfundierten Herzen verschiedener Spezies bei präischämischer Inhibition des Natrium-Protonen-Austauschers (NHE-1) eine Reduktion der Natrium-Überladung in Ischämie und in Reperfusion eine Verbesserung der myokardialen Funktion. Überraschenderweise zeigte sich trotz nachgewiesener potenter Hemmung des NHE-1 in zahlreichen Untersuchungen kein signifikanter Unterschied im intrazellulären pH-Verlauf in Ischämie.

In den Untersuchungen wurden nach Langendorff salin-perfundierte Meerschweinchenherzen verwendet. Zunächst wurde eine Dosis-Wirkungs-Beziehung für Eniporide unter Verwendung der NH_4Cl -Prepulse-Technik erstellt und eine optimale inhibitorische Wirkung für $1 \mu\text{M}$ Eniporide ermittelt. Untersuchungen mittels ^{23}Na -NMR-Spektroskopie unter Verwendung eines Shift-Reagens zeigten, dass die Hemmung des NHE_1 durch $1 \mu\text{M}$ Eniporide während der Ischämie die intrazelluläre Natriumakkumulation um etwa 40% reduzierte.

Schwerpunkt der Arbeit waren ^{31}P -NMR-spektroskopische Untersuchungen zum intrazellulären pH-Verlauf in Ischämie und Reperfusion. Erstmals konnte für Eniporide gezeigt werden, dass die gleichzeitige Inhibition des NHE-1 und des Natrium-Bikarbonat-Austauschers zu einem signifikant ausgeprägteren Abfall des intrazellulären pH (pH_i) in Ischämie führte (5,68 vs. 5,80 in der Kontrollgruppe). Versuche zur Laktatkonzentration im koronaren Effluat zeigten, dass der Monocarboxylat-Kotransporter keine Bedeutung für die Regulation des pH_i in Ischämie und Reperfusion hatte. Die linksventrikuläre Funktion verbesserte sich durch eine präischämische Eniporidegabe um mindestens 25%.

Eniporide ist also ein potenter Inhibitor des NHE-1, der wirkungsvoll die Natrium-Akkumulation in Ischämie reduziert und auch im salin-perfundierten Meerschweinchenherzen kardioprotektiv ist. Trotz der Blockade des NHE und damit des H^+ -Auswärtstransports während Ischämie kann nur bei gleichzeitiger Blockade des Bikarbonat-Austauschers ein stärkerer intrazellulärer pH-Abfall nachgewiesen werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Aker S.**, Snabaitis A.K., Konietzka I., v.d. Sand A., Böngler K., Avkiran M., Heusch G., Schulz R. (2004): Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger attenuates the deterioration of ventricular function during pacing-induced heart failure in rabbits. *Cardiovasc Res* 63: 273-282
2. **Allen, D.G.**, Xiao X.H. (2003): Role of the cardiac Na⁺/H⁺ exchanger during ischemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 57: 934-941
3. **An J.**, Varadarajan S.G., Camara A., Chen Q., Novalija E., Gross G.J., Stowe D.F. (2001): Blocking Na⁺/H⁺ exchange reduces [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i load after ischemia and improves function in intact hearts. *Am J Physiol* 281: H2396-H2409
4. **Avkiran M.** (1999): Rational basis for use of sodium-hydrogen exchange inhibitors in myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 83: G10-G17
5. **Avkiran M.** (2001): Protection of the ischemic myocardium by Na⁺/H⁺ exchange inhibitors: potential mechanisms of action. *Basic Res Cardiol* 96: 306-311
6. **Avkiran M.**, Marber M.S. (2002): Na⁺/H⁺ exchange inhibitors for cardioprotective therapy : progress, problems and prospects. *J Am Coll Cardiol* 39: 747-753
7. **Ayoub I.M.**, Kolarova J., Yi Z., Trevedi A., Deshmukh H., Lubell D.L., Franz M.R., Maldonado F.A., Gazmuri R.J. (2003): Sodium-Hydrogen exchange inhibition during ventricular fibrillation. *Circulation* 107: 1804-1809
8. **Baartscheer A.**, Schumacher C.A., v. Borren M.M.G.J., Beltermann C.N.W., Coronel R., Opthof T., Fiolet J.W.T. (2005): Chronic inhibition of Na⁺/H⁺-exchanger attenuates cardiac hypertrophy and prevents cellular remodeling in heart failure. *Cardiovasc Res* 65: 83-92
9. **Baudet S.**, Noireaud J., Leoty C. (1991): Intracellular Na⁺ activity measurements in the control and hypertrophied heart of the ferret : an ion-sensitive microelectrode study. *Pflügers Arch* 418: 313-318

10. **Bauza G.**, le Moyec L., Eugene M. (1995): pH regulation during ischemia-reperfusion of isolated rat hearts, and metabolic effects of 2,3-butanedione monoxime. *J Mol Cell Cardiol* 27: 1703-1713
11. **Butwell N.B.**, Ramasamy R., Lazar I., Sherry A.D., Malloy C.R. (1993): Effect of lidocaine on contracture, intracellular sodium, and pH in ischemic rat hearts. *Am J Physiol* 264: H1884-H1889.
12. **Ch`en F.F.T.**, Dilworth E., Swietach P., Goddard R.S., Vaughan-Jones R.D. (2003): Temperature dependence of Na^+ - H^+ exchange, Na^+ - HCO_3^- co-transport, intracellular buffering and intracellular pH in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 552: 715-726
13. **Chapman R.A.**, Coray A., McGuigan J.A. (1983): Sodium/calcium exchange in mammalian ventricular muscle: a study with sodium-sensitive microelectrodes. *J Physiol* 343: 253-276
14. **Chen L**, Chen C.X., Gan X.T., Beier N., Scholz W., Karmazyn M. (2004): Inhibition and reversal of myocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure by NHE-1 inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H381-H387
15. **Cohen C.J.**, Fozzard H.A., Sheu S.S. (1982): Increase in intracellular sodium ion activity during stimulation in mammalian cardiac muscle. *Circ Res* 50: 651-662
16. **Cox C.S. Jr.**, Sauer H., Allen S.J., Buja L.M., Laine G.A. (2002): Sodium/hydrogen-exchanger inhibition during cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass: an experimental study. *J Thorac Cardiovasc Surg* 123: 959-966
17. **Cox C.S.**, Allen S.J., Sauer H., Laine G.A. (2003): Improved myocardial function using a Na^+ / H^+ exchanger inhibitor during cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass. *Chest* 123: 187-194
18. **Cross H.R.**, Clarke K., Opie L.H., Radda G.K. (1995): Is lactate-induced myocardial ischaemic injury mediated by decreased pH or increased intracellular lactate? *J Mol Cell Cardiol* 27: 1369-1381
19. **Cross H.R.**, Radda G.K., Clarke K. (1995): The role of Na^+ / K^+ AT-Pase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: a ^{31}P , ^{23}Na and ^{87}Rb NMR spectroscopic study. *Magn Reson Med.* 34: 673-685

20. **Dart C.**, Vaughan-Jones R.D. (1992): Na^+ - HCO_3^- symport in the sheep cardiac Purkinje fibre. *J Physiol (Lond)* 458: 289-306
21. **Decking U.K.M.**, Williams J.P., Dahmann R., Stumpe T., Kelm M., Schrader J. (2001): The nitric oxide-induced reduction in cardiac energy supply is not due to inhibition of creatine kinase. *Cardiovasc Res.* 51: 313-321
22. **Decking U.K.M.**, Hartmann M., Rose H., Brückner R., Meil J., Schrader J. (1998): Cardioprotection by KC12291: I. Inhibition of voltage-gated Na^+ -overload. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358: 547-553
23. **Decking U.K.M.**, Hartmann M. (1999): Blocking Na^+ - H^+ Exchange by Cariporide reduces Na^+ -overload in ischemia and is cardioprotective. *J Mol Cell Cardiol* Nov, 31: 1985-1995
24. **Dennis S.C.**, Gevers W., Opie L.H. (1991): Protons in ischemia : where do they come from: where do they go to ? *J Mol Cell Cardiol* 23: 1077-1086
25. **Dick J.R.**, Maddaford T.G., Pierce G.N., Fliegel L. (1995): Induction of expression of the sodium-hydrogen exchanger in rat myocardium. *Cardiovasc Res* 29: 203-208
26. **Docherty J.C.**, Yang L., Pierce G.N., Deslauriers R. (1997): Na^+ - H^+ exchange inhibition at reperfusion is cardioprotective during myocardial ischemia-reperfusion: ^{31}P NMR studies. *Mol Cell Biochem* 176: 257-264
27. **Doering A.E.**, Lederer W.J. (1993): The mechanism by which cytoplasmic protons inhibit the sodium-calcium exchanger in guinea-pig heart cells. *J Physiol* 466: 481-499
28. **Donoso P.**, Mill J.G., O'Neil S.C., Eisner D.A. (1992): Fluorescence measurements of cytoplasmic and mitochondrial sodium concentration in rat ventricular myocytes. *J Physiol* 448: 493-509
29. **Dörning H.J.**, Dehnert H. (1990): Das isoliert perfundierte Herz nach Langendorff. Aktualisierte Kurzfassung, Biomesstechnik-Verlag
30. **Ebihara Y.**, Tani M., Shinmura K., Nakamura Y., Asakura Y. (1996): Effect of stepwise normalization of perfusate pH on postischemic

- functional recovery and Ca^{2+} overload in isolated rat hearts. *Jpn Circ J* 60: 683-690
31. **Eigel B.N.**, Hadley R.W. (1999): Contribution of the Na^+ channel and Na^+/H^+ exchanger to the anoxic rise of $[\text{Na}]$ in ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H1817-H1822
32. **Eisner D.A.**, Elliot A.C., Smith G.L. (1987): The contribution of intracellular acidosis to the decline of developed pressure in ferret hearts exposed to cyanide. *J Physiol (Lond)* 391: 99-108
33. **Emous v. J.G.**, Nederhoff M.G., Ruigrok T.J., van Echtheld C.J. (1997): The role of the Na^+ channel in the accumulation of intracellular Na^+ during myocardial ischemia: consequences for post-ischemic recovery. *J Mol Cell Cardiol* 29: 85-96
34. **Emous v. J.G.**, Schreur J.H., Ruigrok T.J., van Echtheld C.J. (1998): Both Na^+/K^+ ATPase and Na^+/H^+ exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 30: 337-348
35. **Eriksson O.**, Pollesello P., Haikala H. (2004): Effect of levosimendan on balance between ATP production and consumption in isolated perfused guinea-pig heart before ischemia or after reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 44: 316-321
36. **Ferrari R.**, Cagnoni A., Bernocchi P., Pasini E., Curello S., Ceconi C., Ruigrok T.J.C. (1996): Metabolic adaptation during a sequence of no-Flow and low-Flow ischemia. *Circulation* 94: 2587-2596
37. **Gan, X.T.**, Chakrabarti S., Karmazyn M. (1999): Modulation of Na^+/H^+ isoform 1 mRNA expression in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 277: H993-H998
38. **Gevers W.** (1979): Generation of protons by metabolic processes in heart cells. *J Mol Cell Cardiol* 9: 867-874
39. **Gonzalez N.C.**, Clancy R.L. (1981): Myocardial intracellular pH regulation during chloride depletion. *J Appl Physiol* 51: 1630-1634
40. **Gray R.P.**, McIntyre H., Sheridan D.S., Fry C.H. (2001): Intracellular sodium and contractile function in hypertrophied human and guinea-pig myocardium. *Pflügers Arch* 442: 117-123

41. **Gumina R.J.**, Mizumura T., Beier N., Schelling P., Schultz J.L., Gross G.J. (1998): A new sodium/hydrogen exchange inhibitor, EMD 85131, limits infarct size in dogs when administered before or after coronary artery occlusion. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 175-183
42. **Gumina R.J.**, Moore J., Schelling P., Beier N., Gross G.J. (2001): Na^+/H^+ exchange inhibition prevents endothelial dysfunction after I/R injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1260-1266
43. **Harrison S.M.**, McCall E., Boyett M.R. (1992): The relationship between contraction and intracellular sodium in rat and guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 449: 517-550
44. **Hartmann M.**, Decking U.K.M. (2003): R56865 exerts cardioprotective properties independent of the intracellular Na^+ -overload in the guinea pig heart. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 368: 160-165
45. **Hartmann M.**, Decking U.K.M., Schrader J. (1998): Cardioprotection by KC 12291: II. Delaying Na^+ -overload in ischemia improves cardiac function and energy status in reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 358: 554-560
46. **Heel B.**, de Hemptinne A. Leusen I. (1984): Analysis of $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ exchange during recovery from intracellular acidosis in cardiac Purkinje strands. *Am J Physiol* 246: C391-C400
47. **Hotta Y.**, Ando H., Takeya K., Sakakibara J. (1994): Direct measurement of increased myocardial cellular ^{23}Na -NMR signals in perfused guinea pig heart induced by dihydroouabain and grayanotoxin-I. *Mol Cell Biochem.* 139: 59-70
48. **Hotta Y.**, Fujita M., Nakagawa J., Ando H., Takeya K., Ishikawa N., Sakakibara J. (1998): Contribution of cytosolic ionic and energetic milieu change to ischemia- and reperfusion-induced injury in guinea pig heart: fluorometry and nuclear magnetic resonance studies. *J Cardiovasc Pharmacol.* 31: 146-156
49. **Hotta Y.**, Nakagawa, J., Ishikawa N., Wakida Y., Ando H., Takeya K., Ohashi N., Matsui K. (2001): Protective effect of SM-20550, a selective Na^+/H^+ exchange inhibitor on ischemia-reperfusion-injured hearts. *J Cardiovasc Pharm* 37: 143-154

50. **Humpreys R.A.**, Haist J.V., Chakrabarti S., Feng Q., Arnold J.M.O., Karmazyn M. (1999): Orally administered NHE1 inhibitor cariporide reduces acute responses to coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 276: H749-H757.
51. **Hurtado C.**, Pierce G.N. (2001): Sodium-hydrogen exchange inhibition: pre-versus post-ischemic treatment. *Basic Res Cardiol* 96: 312-317
52. **Inserte J.**, Garcia-Dorado D., Ruiz-Meana M., Padilla F., Barrabés J.A., Pina P., Agulló L., Piper H.M., Soler-Soler J. (2002): Effect of inhibition of Na⁺/Ca²⁺ exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* 55: 739-748
53. **Ito Y.**, Imai S., Ui G. (1999): A Na⁺/H⁺ exchange inhibitor (SM-20550) protects from microvascular deterioration and myocardial injury after reperfusion. *Eur J Pharmacol* 374: 355-366
54. **Javadov S.**, Huang C., Kirshenbaum L., Karmazyn M. (2005): NHE-1 Inhibition improves impaired mitochondrial permeability transition and respiratory function during postinfarction remodelling in the rat. *J Moll Cell Cardiol* 38: 135-143
55. **Jelicks L.A.**, Siri F.M. (1995): Effects of hypertrophy and heart failure on [Na⁺]_i in pressure-overloaded guinea pig heart. *Am J Hypertens* 8: 934-943
56. **Kaila K.**, Vaughan-Jones R.D. (1987): Influence of sodium-hydrogen exchange on intracellular pH, sodium and tension in sheep cardiac Purkinje fibres. *J Physiol (Lond)* 390: 93-118
57. **Karmazyn, M.**, Gan X.T., Humpreys R.A., Yoshida H., Kusumoto K. (1999): The myocardial Na⁺-H⁺ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res* 85: 777-786
58. **Khandoudi N.**, Albadine J., Robert P., Krief S., Berrebi-Bertrand I., Martin X., Bevensee M.O., Boron W.F., Bril A. (2001): Inhibition of the cardiac electrogenic sodium bicarbonate cotransporter reduces ischemic injury. *Cardiovasc Res* 52: 387-396
59. **Klass O.**, Fischer U.M., Perez E., Easo J., Bosse M., Fischer J.H., Paschalis T., Mehlhorn U. (2004): Effect of the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor Eniporide on cardiac performance and myocardial high energy

- phosphates in pigs subjected to cardioplegic arrest. *Ann Thorac Surg* 77: 658-663
60. **Knight D.R.**, Smith A.H., Flynn D.M., Macandrew J.T., Ellery S.S., Kong J.X., Marala R.B., Wester R.T., Guzman-Perez A., Hill R.J., Magee W.P., Trace W.R. (2001): A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, Zoniporide®, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 254-259
61. **Kohler S.J.**, Perry S.B., Stewart L.C., Atkinson D.E., Clarke K. Ingwall J.S. (1991): Analysis of ^{23}Na NMR spectra from isolated perfused hearts. *Magn Reson Med.* 18: 15-27
62. **Kovar A.**, Peters T., Beier N., Derendorf H. (2001): Pharmacokinetic and Pharmacodynamic evaluation of the NHE Inhibitor Eniporide. *J Clin Pharmacol* 41: 139-148
63. **Krebs H.A.**, Henseleit K. (1932): Untersuchungen über die Harstoffbildung im Tierkörper. *Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem* 210: 33-66
64. **Kusumoto K.**, Haist J.V., Karmazyn M. (2001): Na^+/H^+ exchange inhibition reduces hypertrophy and heart failure after myocardium infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H738-H745
65. **Ladzunsi M.**, Frelin C., Vigne P. (1985): 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* 17: 1029-1042
66. **Lagadic-Gossmann D.**, Buckler K.J., Vaughan-Jones R.D. (1992): Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 458: 361-384
67. **Lagadic-Gossmann D.**, Vaughan-Jones R.D., Buckler K.J. (1992): Adrenaline and extracellular ATP switch between two models of acid extrusion in the guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol (Lond)* 458: 385-407
68. **Langendorff O.** (1895): Untersuchungen am überlebenden Säugtierherzen. *Pflügers Arch* 61: 291-332.
69. **le Prigent K.**, Lagadic-Gossmann D., Mongodin E., Feuvray D. (1997): HCO_3^- -dependent alkalizing transporter in adult rat ventricu-

- lar myocytes : characterization and modulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273: H2596-H2603.
70. **Leem C.H.**, Lagadic-Grossmann D., Buckler K.J., Vaughan-Jones R.D. (1992): Characterization of intracellular pH regulation in the guinea-pig ventricular myocyte. *J Physiol* 517: 159-180
71. **Lin H.**, Suleiman M.S. (2003): Cariporide enhances lactate clearance upon reperfusion but does not alter lactate accumulation during global ischemia. *Pflugers Arch* Oct, 447: 8-13
72. **Linz W.J.**, Busch A.E. (2003): NHE-1 Inhibition: from protection during acute ischemia/reperfusion to prevention/reversal of myocardial remodelling. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* Oct, 368: 239-46
73. **Loennechen J.P.**, Wisloff U., Falck G., Ellingsen O. (2002): Effects of cariporide and losartan on hypertrophy, calcium transients, contractility, and gene expression in congestive heart failure. *Circulation* 105: 1380-1386
74. **Loh S.H.**, Tsai C.S., Lin C.I., Jin J.S., Vaughan-Jones R.D. (2001): Effect of S20787, a novel Cl^- - HCO_3^- exchange inhibitor on intracellular pH regulation in guinea pig ventricular myocytes. *J Biomed Sci* 8: 395-405
75. **Masareel B.**, Pochet L., Laeckmann D. (2003): An overview of inhibitors of Na^+/H^+ exchanger. *Eur J Med Chem.* 38: 547-554
76. **Matsumoto T.**, Miura T., Miki T., Genda S., Shimamoto K. (2002): Blockade of the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger is more efficient than blockade of the Na^+/H^+ exchanger for protection of the myocardium from lethal reperfusion injury. *Cardiovasc Drugs and Therapy* 16: 295-301.
77. **Menown I.B.A.**, Adgey A.A.J. (2001): Cardioprotective therapy and sodium-hydrogen exchange inhibition: current concepts and future goals. *JACC* 38: 1651-1653
78. **Moor A.N.**, Gan X.T., Karmazyn M., Fliegel L. (2001): Activation of Na^+/H^+ exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused at myocardium. *J Bio Chem* 276 : 16113-16122

79. **Murphy E.**, Cross H.R., Steenbergen C. (1999): Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange: their role in the rise of cytosolic free $[\text{Ca}^{2+}]$ during ischemia and reperfusion. *Eur Heart J Suppl* 1: G1-G13
80. **Murphy E.P.M.**, London R.E., Steenbergen C. (1991): Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 68: 1250-1258
81. **Murry C.E.**, Jennings R.B., Reimer K.A. (1986): Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74: 1124-1136
82. **Myers M.L.**, Mathur S. Li G.H., Karmazyn M. (1995): Sodium-hydrogen exchange inhibitors improve postischemic recovery of function in the perfused rabbit heart. *Cardiovasc Res* 29: 209-214
83. **Nagashima R.**, Tsuda Y., Maruyama T., Kanaya S., Fujino T., Niho, Y. (1999): Possible evidence for transmembrane K^+/H^+ exchange system I guinea pig myocardium. *Jpn Heart J* 40: 351-364
84. **Nakanishi T.**, Gu H., Seguchi M., Cragoe E.J., Momma K. (1992): HCO_3^- -Dependent intracellular pH Regulation in the premature myocardium. *Circ Res* 71: 1314-1323
85. **Navon G.**, Werrmann J.G., Maron R, Cohen S.M. (1994): ^{31}P NMR and triple quantum filtered ^{23}Na NMR studies of the effects of inhibition of Na^+/H^+ exchange on intracellular sodium and pH in working and ischemic hearts. *Magn Reson Med* 32: 556-564
86. **Orlowski, J.**, Kandasamy R.A., Shull G.E. (1992): Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family: cDNA cloning, deduced amino acid sequence, and mRNA tissue expression of the rat Na^+/H^+ exchanger NHE-1 and two structurally related proteins. *J. Biol. Chem* 267: 9331-9339
87. **Petroff O.A.C.**, Prichard J. W., Behar K.L., Alger J.R., den Hollander J.A., Shulman R.G. (1985): Cerebral intracellular pH by ^{31}P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Neurology* 35: 781-788
88. **Pierce G.N.**, Czubyrt M.P. (1995): The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. *J Mol Cell Cardiol* 27: 53-63

89. **Pieske B.**, Houser S.R. (2003): $[Na^+]_i$ handling in the failing human heart. *Cardiovasc Res* 57: 874-886
90. **Pieske B.**, Maier L.S., Piacentino V. 3rd, Weisser J., Hasenfuss G., Houser S. (2002): Rate dependence of $[Na^+]_i$ and contractility in non-failing and failing human myocardium. *Circulation* 106: 447-453
91. **Pike M.M.**, Kitakaze M., Marban E. (1990): ^{23}Na -NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 259: H1767-H1773
92. **Pike M.M.**, Luo C.S., Clark M.D., Kirk K.A., Kitakaze M., Madden M.C., Cragoe C., Pohost G.M. (1993): NMR measurements of Na^+ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na^+ - H^+ exchange. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 265: H2017-H2026
93. **Piper H.M.**, Blaser C., Ladilov Y.V. (1996): The role of Na^+/H^+ -exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 91: 191-202
94. **Piper H.M.**, Meuter K., Schäfer C. (2003): Cellular mechanisms of ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 75: 644-648
95. **Piwinca-Worm D.**, Jacob R., Horres C.R., Liebermann M. (1985): Na^+/H^+ exchange in cultured chick heart cells: pH_i regulation. *J Gen Physiol* 85: 43-64
96. **Poole R.C.**, Halestrap A.P. (1993): Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes. *Am J Physiol* 264: C761-C782
97. **Poole-Wilson P.A.** (1989): Regulation of intracellular pH in the myocardium – relevance to pathology. *Mol Cell Biochem* 89: 151-155
98. **Rehring T.F.**, Shapiro J.I., Cain B.S., Meldrum D.R., Cleveland J.C., Harken A.H., Banerjee A. (1998): Mechanism of pH preservation during global ischemia in preconditioned rat heart: roles of PKC and NHE. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275: H805-H813
99. **Ren J.**, Springer C.S. jr., Sherry A.D. (1997): Ion-Pairing between Co(en)(3)(3+) and the (23)Na NMR Frequency Shift reagent TmDOTP(5)(-). *Inorg Chem.* 36: 3493-3498
100. **Richards T.L.**, Terrier F., Sievers R.E., Lipton M.J. Moseley M.M., Higgins C.B. (1987): Lactate accumulation in ischemic and anoxic

- isolated rat hearts assessed by H1-spectroscopy. Invest Radiol 22: 638-641
101. **Roos A.**, Boron W.F. Intracellular pH. (1981): Physiol Rev 61: 296-434
102. **Rovetto M.J.**, Whitmer J.T., Neely J.R. (1973): Comparison of the effects of anoxia and whole heart ischemia on carbohydrate utilization in the working rat heart. Circ Res 32: 699-711
103. **Rupprecht H.J.**, v. Dahl J., Terres W., Seyfarth K.M., Richardt G., Schultheiß H.P., Buerke M., Sheehan F.H., Drexler H. (2000): Cardioprotective effects of the Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. Circulation 101: 2902-2908
104. **Sakamoto K.**, Ishikawa M., Koga K., Urushidani T., Nagao T. (2000): Energy preservino effect of 1-cis diltiazem in isolated ischemic and reperfused guinea pig hearts: a ³¹P-NMR study. Jpn J Pharmacol 83: 225-232
105. **Schäfer C.**, Ladilov Y., Inserte J., Schäfer M., Haffner S., Garcia-Dorado D., Piper H.M. (2001): Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. Cardiovasc Res 51: 241-250
106. **Schäfer C.**, Ladilov Y.V., Siegmund B., Piper H.M. (2000): Importance of bicarbonate transport for protection of cardiomyocytes against reoxygenation injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol 278: H1457-H1463
107. **Schäfer, C.**, Ladilov Y.V., Schäfer M., Piper H.M. (2000): Inhibition of NHE protects reoxygenated cardiomyocytes independently of anoxic Ca²⁺ overload and acidosis. Am J Physiol Heart Circ Physiol 279: H2143-H2150
108. **Schillinger W.**, Fiolet J.W., Schlottauer K., Hasenfuss G. (2003): Relevance of Na⁺-Ca²⁺ exchange in heart failure. Cardiovasc Res 57: 921-933
109. **Schmidt T. A.**, Kjeldsen K. (1998): Human myocardial Na⁺/K⁺-ATPase – quantification, regulation and relation to Ca²⁺. Cardiovasc Res 37: 335-345

110. **Shigematsu S.**, Arita M. (1999): Anoxia depresses sodium-calcium exchange currents in guinea-pig ventricular myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 31: 895-906
111. **Stowe D.F.**, Heisner J.S., An J., Camara A., Varadarajan S.G., Novalija E., Chen Q., Schelling P. (2002): Inhibition of Na(+)/H(+) isoform-1 exchange protects hearts perfused after 6-hour cardioplegic cold storage. *J Heart Lung Transplant* 21: 374-382
112. **Strömer H.**, de Groot M.C.H., Horn M., Faul C., Leupold A., Morgan J.P., Scholz W., Neubauer S. (2000): Na⁺/H⁺ Exchange inhibition with HOE642 improves postischemic recovery due to attenuation of Ca²⁺ overload and prolonged acidosis on reperfusion. *Circulation* 101: 2749-2755
113. **Sun B.**, Leem C.H., Vaughan-Jones R.D. (1996): Novel chloride-dependent acid loader in the guinea-pig ventricular myocyte: part of a dual acid-loading mechanism. *J Physiol* 495: 65-82
114. **Sun H.Y.**, Wang N.P., Halkos M.E., Kerendi F., Kin H., Wang R.X., Guyton R.A., Zhao Z.Q. (2004): Involvement of Na⁺/H⁺ exchanger in hypoxia/re-oxygenation-induced neonatal rat cardiomyocyte apoptosis. *Eur J Pharmacol* 486: 121-131
115. **Tani M.** (1990): Mechanism of Ca²⁺ overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu Rev Physiol* 52: 543-559
116. **Ten Hove, M.**, Nederhoff, M.G.J., v. Echtheld C.J.A. (2005): Relative contributions of Na⁺/H⁺ exchange and Na⁺/HCO₃⁻ cotransport to ischemic [Na⁺]_i overload in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H287-H292
117. **Thomas R.C.** (1984): Experimental displacement of intracellular pH and the mechanism of its subsequent recovery. *J Physiol Lond* 354: 3P-22P
118. **Tosaki A.**, Braquet P. (1990): DMPO and reperfusion injury : arrhythmia, heart function, electron spin resonance, and nuclear magnetic resonance studies in isolated working guinea pig hearts. *Am Heart J.* 120: 819-830
119. **Varadarajan S. G.**, An J., Novalija E., Smart S.C., Stowe D.F. (2001): Changes in [Na⁺]_i, compartmental [Ca²⁺], and NADH with dys-

- function after global ischemia in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H280-H293
120. **Vaughan-Jones R.D.** (1979): Regulation of chloride in quiescent sheep heart Purkinje fibres studied using intracellular chloride and pH sensitive microelectrodes. *J Physiol (Lond)* 295: 111-137
121. **Vaughan-Jones R.D.** (1986): An investigation of chloride-bicarbonate exchange in the sheep cardiac Purkinje fibre. *J Physiol (Lond)*,379: 377-406
122. **Wakabayashi S.**, Shigekawa M., Pouyssegur J. (1997): Molecular physiology of vertebrate Na^+/H^+ exchangers. *Physiol Rev* 77: 51-74
123. **Wang D.Y.**, Chae S.W., Gong Q.Y., Lee C.O. (1988): Role of Na^+ in positive force-frequency staircase in guinea pig papillary muscle. *Am J Physiol* 255: C798-807
124. **Wang Y.**, Meyer J.W., Ashraf M., Shull G.E. (2003): Mice with a null mutation in the NHE-1 Na^+/H^+ exchanger are resistant to cardiac ischemia-reperfusion injury. *Circ Res* 93: 776-782
125. **Williamson J.R.** (1966): Glycolytic control mechanism – kinetics of intermediate changes during the aerobic-anoxic transition in perfused rat heart. *J Biol Chem* 241: 5026-5036
126. **Xiao X.H.**, Allen D.G. (1999): Role of Na^+/H^+ exchanger during ischemia and preconditioning in the isolated rat heart. *Circ Res* 33: 410-415
127. **Yamaguchi S.**, Tamagawa M., Nakajima N., Nakaya H. (1998): Selective impairment of HCO_3^- -dependent pH_i regulation by lysophosphatidylcholine in guinea pig ventricular myocardium. *Cardiovasc Res* 37: 179-186
128. **Yamamoto S.**, Matsui K., Itoh N., Ohashi N. (2001): The effect of an Na^+/H^+ exchange inhibitor, SM-20550, on ischemia/reperfusion induced endothelial dysfunction in isolated perfused rat hearts. *Int J Tissue React.* 23: 1-7
129. **Yamamoto T.**, Swietach P., Rossini A., Loh S.H., Vaughan-Jones R.D., Spitzer K.W. (2005): Functional diversity of electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport in ventricular myocytes from rat, rabbit and guinea pig. *J Physiol* 562: 455-475

130. **Yao A.**, Su Z., Nonaka A., Zubair I., Lu L., Philipson K.D., Bridge J.H., Barry W.H. (1998): Effects of overexpression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger on [Ca²⁺]_i transients in murine ventricular myocytes. *Circ Res* 82: 657-665
131. **Yokoyama H.**, Gunasegaram S., Harding S.E., Avkiran M. (2000): Sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger activity and expression in human ventricular myocardium. *J Am Coll Cardiol* 36: 534-40
132. **Yoshida H.**, Karmzyn M. (2000): Na⁺/H⁺ exchange inhibition attenuates hypertrophy and heart failure in 1-wk postinfarction rat myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 278: H300-H304
133. **Yoshiyama M.**, Ishikawa M., Miura I., Takeuchi K., Takeda T. (1994): Time course of the recovery of adenosine triphosphate content with adenosine in post ischemic heart: a ³¹P magnetic resonance spectroscopy study. *Jpn Circ J.* 58: 662-670
134. **Zeymer U.**, Suryapranata H., Monassier J.P., Opolski G., Davies J., Rasmanis G., Linssen G., Tebbe U., Schröder R., Tiermann R., Machnig T., Neuhaus K.L. (2001): The Na⁺/H⁺ exchange inhibitor Eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 38: 1644-1650
135. **Zijlstra F.**, Patel A., Jones M., Grines CL, Ellis S, Garcia E, Grinfeld L, Gibbons RJ, Ribeiro EE, Ribichini F, Granger C, Akhras F, Weaver WD, Simes RJ. (2002): Clinical characteristics and outcome of patients with early (<2h), intermediate (2-4h) and late (>4h) presentation treated by primary coronary angioplasty or thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 23:550-557

7. Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die einen maßgeblichen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatten:

Ein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. J. Schrader, der mir freundlicherweise das Thema dieser Arbeit überließ und in dessen Institut die Versuche durchgeführt wurden. Herausragend war die tatkräftige und ausdauernde Unterstützung von Herrn Prof. Dr. U. Decking, der das Herzmodell maßgeblich entwickelt hat. Seine außergewöhnliche Betreuung, sein Enthusiasmus, seine Geduld und seine Freude an der Arbeit waren wichtige Bausteine für das Gelingen dieser Arbeit.

Der Firma Merck KgaA möchte ich für die freundliche Überlassung von Eniporide® danken.

Zuletzt danke ich meiner Familie, die mich stets durch die schwierigen Phasen dieser Arbeit getragen hat und die immer an mich geglaubt hat.

Lars Vogler

Persönliche Information	Familienstand: verheiratet mit Dipl.-Päd. Mara Vogler, geb. Thamm, zwei Töchter Nele Susanne (4) und Ella Nia (2) Geburtstag: 12.03.1974
Ausbildung/ Studium	08/84 – 08/93 Städtisches Willibrordgymnasium Emmerich 09/93 – 11/94 Zivildienst im St. Willibrord Spital Emmerich 12/94 – 03/95 OP-Assistent St. Willibrord Spital Emmerich 04/95 – 05/02 Studium der Humanmedizin an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Berufserfahrung	08/02 – 06/05 Arzt an der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder und Jugendliche Leipzig, Direktor Prof. Dr. W. Kiess 01/03 – 06/05 Mitarbeit in der Abteilung für päd. Pulmologie/Allergologie Seit 07/05 Arzt am Kinderhospital Osnabrück, Direktor Prof. Dr. Albers
Wissenschaftliche Arbeit und Lehrerfahrung	Lokaler Studienleiter und Co-Studienleiter in 10 multizentrischen Studien Organisation des 1. und 2. Leipziger Symposiums für pädiatrische Pulmologie und Allergologie Organisation und Durchführung von Neurodermitis- und Asthmaschulung als zertifizierter Neurodermitis- und Asthmatrainer Publikationen: Seit 08/02 8 Veröffentlichungen als Erst- und Zweitautor Posterpräsentation auf der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kinder- und Jugendmedizin 09/03; 09/07 Durchführung von Studierenden Seminaren, praktischen Kursen, Vorlesungen Seit 2003 Schwesternunterricht im Fach Kinderheilkunde