Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

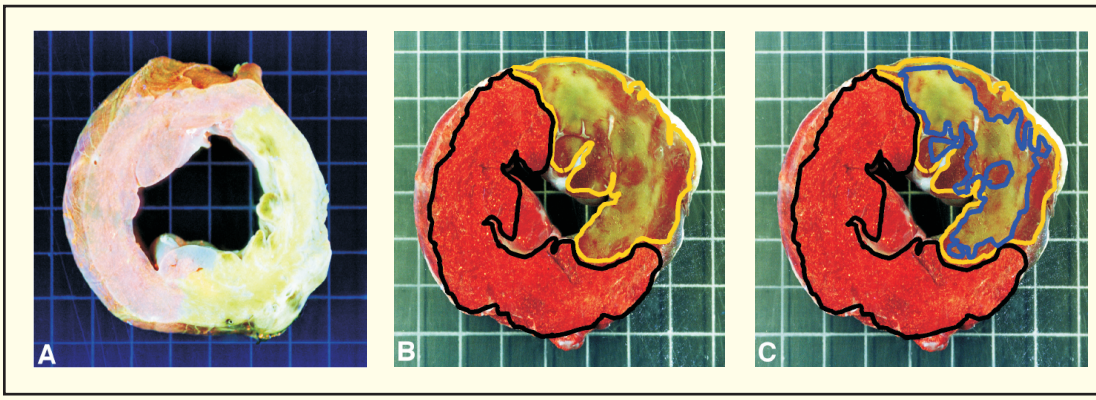
Die Wirkung von Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren auf die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion am Schweineherzen

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

MARIE-LUISE VON BRÜHL

Gießen 2002



VVB LAUFERSWEILER VERLAG

édition scientifique

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Die Wirkung von Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren auf die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion am Schweineherzen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Marie-Luise von Brühl

Gießen 2002

Aus dem Max-Planck-Institut für Physiologische und Klinische Forschung,
W.G. Kerckhoff-Institut, Abteilung für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim
Betreuer: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

Eingereicht über das Institut für Veterinär-Anatomie, -Histologie und Embryologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. med. vet. Monika Kressin

Die Wirkung von Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren auf die Infarktgröße nach Ischämie/Reperfusion am Schweineherzen

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
Marie-Luise von Brühl
Tierärztin aus Gadernheim (Odenwald)

Gießen 2002

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. B. Hoffmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wolfgang Schaper

2. Berichterstatterin: Prof. Dr. med. vet. Monika Kressin

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2002

für meine Eltern und meine Brüder

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

I. EINLEITUNG 1

II. LITERATURÜBERSICHT 3

1. Natrium-Protonen-Austauscher (NHE) 3

1.1. NHE-Isoformen 3

1.2. Struktur und Lokalisation der NHE1-Isoform 4

1.3. Regulation der NHE1-Aktivität 6

1.3.1. Intrazellulärer pH-Wert 6

1.3.2. Extrazelluläre Natriumionen 7

1.3.3. Zellvolumen 8

1.3.4. Intrazelluläres ATP 8

1.3.5. Regulatorische Proteine 9

1.3.5.1. Calmodulin 9

1.3.5.2. „calcineurin B homolog protein“ 9

1.3.5.3. „heat shock protein 70“ 10

1.3.6. Weitere Regulatoren des NHE1 10

2. Mitogen aktivierte Proteinkinasen (MAPK) 10

2.1. MAPK vermittelte Signaltransduktion 11

2.2. p38-MAPK 12

3. Myokardiale Na^+/H^+-Austauscher in der Ischämie 14

3.1. Rolle der Na^+/H^+-Austauscher in der Reperfusion 15

4. Inhibitoren des kardialen Na^+/H^+-Austauschers 16

5. Rolle der p38-MAPK bei Ischämie/Reperfusion 19

6. Ischämische Präkonditionierung 21

6.1. Mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle 22

6.2. Physiologische Rolle der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle am Herzen 22

6.3. Kardioprotektive Rolle der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle 23

III. MATERIAL UND METHODEN 25

1. Substanzen zur intravenösen und intramyokardialen Applikation am Schwein 25

1.1. BIIB722CL 25

1.2. BIIB513 25

1.3. Glibenclamid 26

1.4. 5-Hydroxydecanoat 26

2. Tiermodell der myokardialen Ischämie 27

2.1. Versuchstiere 27

2.2. Prämedikation und Narkose 27

2.3. Operationstechnik 27

2.4. Versuchsprotokoll und experimentelle Gruppen 29

2.5. Myokardbiopsien 34

2.6. Intramyokardiale Pharmakonapplikation 34

2.7. Myokardfärbung *in vivo* 35

3. Bestimmung der Infarktgröße 36

3.1. PBS-Lösung 36

3.2. Herzaufarbeitung 36

3.3. Planimetrierung 37

4. Immunologische Nachweisverfahren 39

4.1. Probenaufarbeitung 39

4.1.1. Homogenisierungspuffer zur Biopsieaufarbeitung 39

4.2. Proteinbestimmung 39

4.3. Gelelektrophorese 40

4.4. Western-Blot-Analyse 41

4.4.1. Ponceaufärbung 42

4.4.2. Blockierung und Immunodetektion 42

4.5. Quantitative Analyse 43

5. Auswertung und Statistik 43

IV. ERGEBNISSE 44

1. Etablierung des Tiermodells 44

1.1. EKG 44

1.2. Hämodynamik 45

2. Infarktgröße bei pharmakologischer NHE1-Inhibierung 45

2.1. Auswirkung der NHE1-Inhibierung auf die Infarktgröße 45

2.1.1. Systemische Applikation des NHE1-Inhibitors BIIB513 45

2.1.2. Lokal-intramyokardiale Applikation des NHE1-Inhibitors BIIB513 46

2.1.3. Systemische Applikation des NHE1-Inhibitors BIIB722 47

2.1.4. Lokal-intramyokardiale Applikation des NHE1-Inhibitors BIIB722 49

2.2. Auswirkung der NHE1-Inhibierung auf die Infarktgröße bei 90 minütiger Ischämie 51

3. Auswirkungen der K_{ATP}-Kanal-Blockade auf die lokale NHE1-Inhibierung 52

3.1. Auswirkungen der selektiven mitochondrialen K_{ATP}-Kanal-Blockade auf die lokale NHE1-Inhibierung 53

4. Auswirkung der ischämischen Präkonditionierung auf die Infarktgröße 54

5. Western-Blot-Analyse 56

5.1 Biochemische Untersuchung der Wirkung von BIIB722 auf die Phosphorylierung der p38-MAPK während der Ischämie 56

5.2. Biochemische Untersuchung der Wirkung von BIIB722 auf die p38-MAPK während der Ischämie 58

6. Zusammenfassung der Ergebnisse 59

V. DISKUSSION 61

1. Tiermodell der regionalen Ischämie 61

2. Kardioprotektiver Effekt der pharmakologischen NHE1-Inhibierung 62

3. Auswirkung der NHE1-Inhibierung auf die p38-MAPK 66

4. Vergleich der ischämischen Präkonditionierung mit der NHE1-Inhibierung und die Rolle der K_{ATP}-Kanäle 70

4.1. Vergleich der kardioprotektiven Effizienz 70

4.2. Mitochondriale K_{ATP}-Kanäle als Effektoren der ischämischen Präkonditionierung. 72

4.3. Rolle der K_{ATP}-Kanäle bei der NHE1-Inhibierung 73

5. Schlußfolgerung 76

VI. ZUSAMMENFASSUNG 77

VII. SUMMARY 79

VIII. ABKÜRZUNGEN 81

IX. LITERATURVERZEICHNIS 83

X. DANKSAGUNG 121

I. EINLEITUNG

In den letzten zehn Jahren ist die Todesrate aufgrund von Herzversagen dramatisch gestiegen. In der Bundesrepublik Deutschland waren 1999 nach einer Veröffentlichung des Bundesamtes für Statistik Krankheiten des Kreislaufsystems mit 406 122 Todesfällen die häufigste Todesursache. Dabei lag die Zahl der Sterbefälle mit der Todesursache „akuter Myokardinfarkt“ bei insgesamt 76 961 Personen [1].

Diesbezüglich gilt die 1986 erstmals beschriebene [2] ischämische Präkonditionierung heutzutage als sogenannter experimenteller goldener Standard zur Reduktion der Infarktgröße. Mittlerweile wurden verschiedene Faktoren erforscht, die für den kardioprotektiven Effekt verantwortlich sind. Dazu zählen die ATP-abhängigen Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle) [3], Adenosin [4] und die Proteinkinase C (PKC) [5]. Andererseits konnte nachgewiesen werden, daß die klinisch häufig eingesetzen Sulfonylharnstoffderivate bei Diabetes und die bei Asthma verwendeten Methylxanthin-Präparate den kardioprotektiven Effekt der ischämischen Präkonditionierung blockieren [3,4]. Man führt dies auf die Blockade der K_{ATP}-Kanäle durch die Sulfonylharnstoffderivate bzw. der Adenosinrezeptoren durch die Methylxanthine-Präparate zurück. Entsprechende klinische Studien zeigten, daß Patienten, die Sulfonylharnstoffderivate einnahmen, eine erhöhte Therapieresistenz sowie eine erhöhte Sterberate durch Herzversagen verzeichneten [6,7].

Unabhängig davon entdeckten Karmazyn et al. [8] 1988 eine weitere Methode der Kardioprotektion: die pharmakologische Na^+/H^+-Austauscher (NHE) -Inhibition. Während der myokardialen Ischämie und Reperfusion kommt es zu einer Aktivierung der pH-Wert regulierenden sarkolemmalen Na^+/H^+-Austauscher, welche im 1:1-Verhältnis extrazelluläre Natriumionen gegen intrazelluläre Wasserstoffprotonen austauschen. Dies führt im Verlauf der Ischämie zunächst zu einer Natriumionenakkumulation und dann über die Aktivierung der Natrium-Kalzium-Ionenaustauscher zu einer Kalziumionenüberladung in den Kardiomyozyten [9]. Der Kalziumionenakkumulation wird eine Verursachung von Zellschädigungen wie Nekrose, myokardiale kontraktile Dysfunktionen, „Stunning“ und ventrikuläre Arrhythmien zugeschrieben [10,11]. Diese Ergebnisse führten zu der Hypothese, daß die Aktivität der myokardialen Na^+/H^+-Austauscher eine Voraussetzung für Ereignisse ist, die zum Zelluntergang und letztendlich zum Herzversagen führen [12-14].

Zuerst wurden Kalium-schonende diuretische Amiloride und 5-Amino-substituierten Derivate als Na^+/H^+-Austauscher-Blocker eingesetzt [8]. Diese

Medikamente wurden durch selektivere und effektivere pharmakologische Inhibitoren der im Myokard identifizierten NHE1-Isoform [14] ersetzt. An verschiedenen experimentellen Modellen zeigten diverse NHE1-Blocker kardioprotektive Wirksamkeit [15-17]. Folglich könnte die NHE1-Inhibition eine lebensverlängernde alternative Therapieform für Herzpatienten darstellen, die mit Sulfonylharnstoffderivaten oder Methylxanthinen behandelt werden.

Im ersten Teil der vorliegenden Studie wurde die Infarktgröße-reduzierende Wirksamkeit der neuen pharmakologischen NHE1-Inhibitoren BIIB722 und BIIB513 am Schweineherz untersucht. Es sollte zudem geklärt werden, ob die kardioprotektive Wirksamkeit der NHE1-Inhibition auch bei simultaner K_{ATP}-Kanal-Blockade erhalten bleibt. Im zweiten Teil sollte die in der Literatur beschriebene Hypothese, daß die ischämische Präkonditionierung und die NHE1-Inhibition auf verschiedenen Mechanismen basieren, getestet werden [17-19]. Dazu wurde die Infarktgröße-reduzierende Effizienz beider Phänomene verglichen und neben der Aktivität der K_{ATP}-Kanäle auch die Rolle der p38-MAPK bei der NHE1-Inhibition untersucht. Es zeigte sich in vorhergehenden Studien, daß schon während den kurzen Ischämie- und Reperfusionzyklen der ischämischen Präkonditionierung eine fortschreitende Deaktivierung der p38-MAPK induziert wird, welche in der folgenden länger aufrechterhaltenen Ischämie kardioprotektiv wirkt [20,21].

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Natrium-Protonen-Austauscher

Die Na^+/H^+-Austauscher haben Teil an einer Reihe essentieller zellulärer Prozesse, wie der Kontrolle des intrazellulären pH-Wertes, der Aufrechterhaltung des Zellvolumens und der Reabsorption von Natriumionen in renalen, intestinalen und anderen Epithelien [22,23]. Ihre Aktivierung ermöglicht die Wachstumsfaktor-induzierte Proliferation bestimmter Zellen [22] und ist assoziiert mit den zur Apoptose führenden Prozessen [24-26].

Der Austausch von Natriumionen gegen Wasserstoff-Protonen mittels Na^+/H^+-Austauschern (NHE) ist der effektivste Mechanismus der Zelle ihren intrazellulären pH-Wert und ihr Volumen zu regulieren [12,27,28].

1.1. NHE-Isoformen

Heute sind sechs Isoformen der Na^+/H^+-Austauscher (NHE1-6) bekannt. Die Formen NHE1-5 sind in der Plasmamembran lokalisiert, NHE6 wurde in der mitochondrialen Membran gefunden [29-31]. Während NHE1 und NHE6 ubiquitär vorhanden sind, kommen NHE2-5 gewebsspezifisch vor. In vielen Zellen sind verschiedene NHE-Isoformen parallel auf speziellen Membranorten zu finden [31,32].

Die verschiedenen NHE-Isoformen repräsentieren unterschiedliche Genotypen, und sie variieren in ihrer Gewebeverteilung, in der Molekularstruktur, in ihrer Sensitivität gegenüber Inhibitoren und in ihrer zellulären Funktion [12]. NHE1-NHE5 zeigen Sequenzhomologien zwischen 34-60% und ihr Molekulargewicht liegt zwischen 81-93kDa, während bei NHE6 nur 20% der Aminosäuren mit denen der anderen Isoformen identisch sind [33].

Bisher ist wenig über die Tertiär- bzw. Quartärstruktur der Na^+/H^+-Austauscher bekannt. Man geht davon aus, daß sie in der Membran als Homodimer vorliegen, wobei die beiden Monomere im Bereich der transmembranalen Region interagieren und durch Disulfidbrücken verbunden sind [33].

Die NHE1-Isoform wird in nahezu allen Zellen und Gewebeformen exprimiert und wird als die ubiquitäre „Haushalts-Isoform“ bezeichnet. Sie ist für die Aufrechterhaltung des zytosolischen pH-Wertes und des Zellvolumens verantwortlich [13,14,33,34]. In epithelialen Zellen wird diese Isoform in der basolateralen Membran gefunden [35]. In Zelllinien aus der Niere vom Opossum oder Madin-Darby-Hunden wurde NHE1 sowohl in der apikalen wie basalen Membran

epithelialer Zellen gefunden [36]. Sie ist neben NHE6 die häufigeste im Myokard der Säugetiere gefundene Isoform der Na^+/H^+-Austauscher und wird im folgenden umfassend beschrieben.

Im Verdauungsapparat wurden NHE1, NHE2 und NHE3 in der submandibulären Speicheldrüse [37], NHE1, NHE2 und NHE4 in der Magenwand, NHE1-NHE4 im exokrinen Pankreas [38-40] und sowohl NHE1 als auch NHE3 im Dünn- und Dickdarm [41,42] entdeckt. NHE1-4 wurden zudem in der Niere gefunden [32,43,44]. Dabei haben die Isoformen NHE1 [45,46], NHE2 [46-48], NHE3 [49,50] und NHE4 [51,52] spezifische Lokalisationen und Funktionen in der Niere.

Im Gehirn sind die Isoformen NHE1-5 vorhanden [53,54]. Dort spielen sie eine wichtige Rolle, da Neuronen und Gliazellen aufgrund ihrer hohen metabolischen Aktivität besonders empfindlich gegenüber Veränderungen des pH-Wertes sind [55].

In den Epithelien der Luftwege wurden die Isoformen NHE1 und NHE2 beschrieben [43,56].

Die Isoform NHE5 kommt zudem in nichtepithelialen Geweben (Gehirn > Milz > Hoden > Skelettmuskel) vor [53].

NHE6 wurde ubiquitär in der Mitochondrienmembran gefunden. Deswegen ist NHE6 besonders häufig in Mitochondrien-reichen Geweben wie Gehirn, Skelettmuskel und Herz vorhanden [30].

1.2. Struktur und Lokalisation der NHE1-Isoform

Die im Säugetiermyokard vorhandene NHE1-Isoform ist ein integrales Membranprotein. Sie besteht aus 815 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 91 kDa. Es wird die 500 Aminosäuren umfassende, N-terminale, transmembranale Domäne von der 315 Aminosäuren langen C-terminalen, zytoplasmatischen Domäne unterschieden [34]. Das erste transmembranale Segment ist glykolysiert, wodurch das Molekulargewicht auf 110 kDa ansteigt. [12].

Die Anzahl der Membrandurchgänge variiert zwischen den NHE-Isotypen. NHE1 verfügt über 10-12 solcher Regionen (M1-M12). Die genaue Anzahl, Lokalisierung und Bezeichnungen dieser Membrandurchgänge sowie der hydrophoben Domänen der NHE1-Isoform wurden von Autoren unterschiedlich beschrieben. Die Membrandurchgänge sind bedeutsam für die Ionentranslokation, sowie für die pharmakologische Modulation und die allosterische Regulation des Austauschers durch intrazelluläre Protonen [31].

Der zentrale Teil (Domänen M5a und M5b), bestehend aus den Aminosäuren 226 bis 281, ist bei allen Isoformen zu 95% identisch. Ihm wird die zentrale katalytische Funktion des Austauschers zugesagt [29,33]. Dieser Teil des Polypeptids besitzt negativ geladene Reste (Aspartat 226, 238 und 267 und Glutamat 247, 248, 253 und 262 beim humanen NHE1), welche in einem hydrophoben Sequenzstück eingeschlossen sind. Die Entfernung von Glu-262 bei der NHE1-Isoform resultiert in einer Inaktivierung des Austauschers [58]

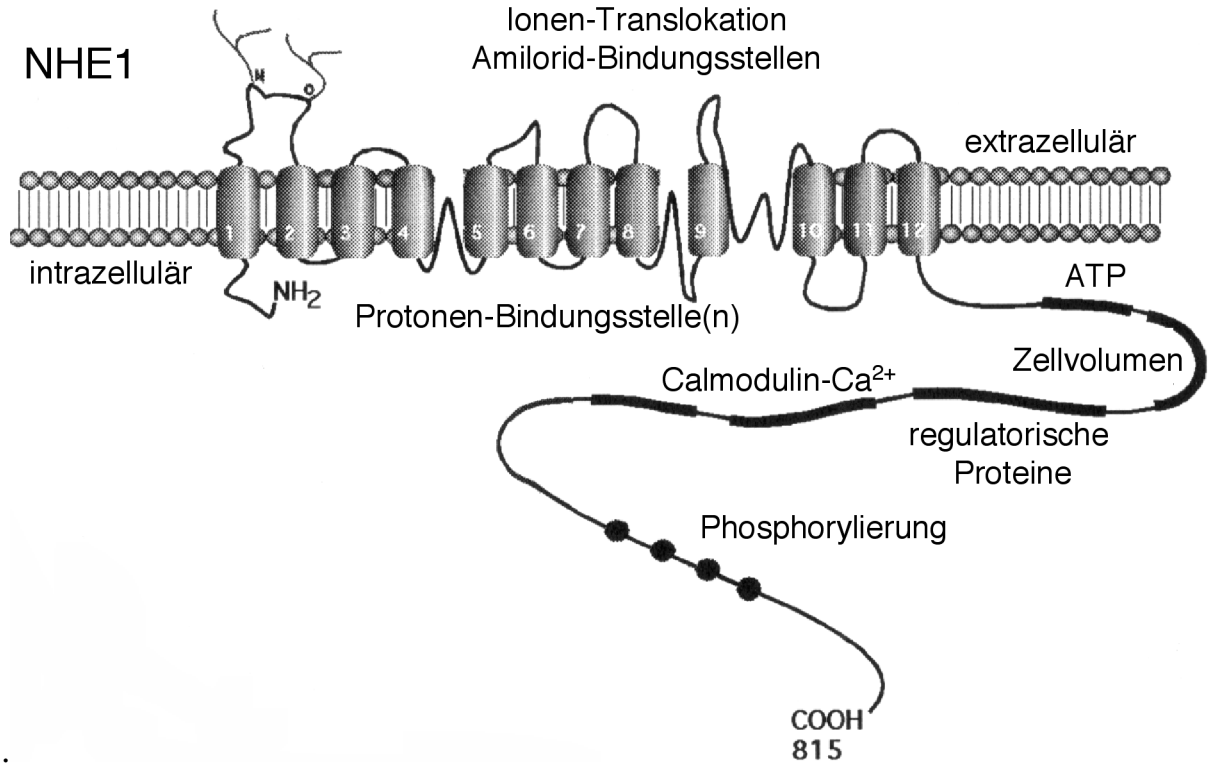


Abb.1 Modell des humanen myokardialen NHE1 Proteins modifiziert nach einer Studie von Wakabayashi et al. [57]. Die Abbildung ist übernommen aus M.Ritter, 2001 [31]. Das humane NHE1-Protein ist aus 815 Aminosäuren zusammengesetzt und es wird die membranassoziierte N-terminale Region von der zytoplasmatischen C-terminalen Region unterschieden. Die N-terminale Domäne weist 10-12 Membrandurchgänge auf und vermittelt den Ionenaustausch. Sie verfügt über Bindungsstellen für pharmakologische Substanzen und über die allosterischen Regulationsseiten für intrazelluläre Protonen. Die zytosolische Domäne besteht aus funktionellen Subdomänen. An diesen Subdomänen findet die Regulation durch den intrazellulären pH-Wert, durch intrazelluläres Kalzium, durch Phosphorylierungsreaktionen, durch ATP, durch mechanische Stimuli und durch Interaktionen mit Hilfsproteinen statt.

Die hydrophile, C-terminale zytoplasmatische Domäne setzt sich aus funktionellen Subdomänen zusammen, welche für die Regulation des Austauschers verantwortlich sind. Sie ist bei den Isoformen nur zu 24-56% identisch [33]. Der intrazelluläre pH, intrazelluläres Kalzium, die Phosphorylierung, intrazelluläres ATP, mechanische Stimuli inklusive dem Zellvolumen, setzten hier regulierend an [31]. Diese Subdomänen sind spezifisch für die NHE-Isoformen und sie bestimmen deren Regulation durch unterschiedliche Faktoren oder Stimuli [12].

Die Na^+/H^+-Austauscher sind nicht gleichmäßig auf der Plasmamembran verteilt. In kultivierten Fibroblasten akkumulierten sie entlang der Grenzzone der Lamellipodia. Zudem wurde eine Konzentrierung von Vinculin, Talin und F-Aktin an diesen Punkten gefunden, weswegen man von einer Assoziierung der NHE1-Isoform mit dem Zytoskelett ausgeht [59].

NHE1 wurde vor allem in der Region der „Disci intercalares“ atrialer und ventrikulärer Myozyten gefunden, nahe beim „gap-junction“ Protein „Connexin 43“. Zusätzlich wurde NHE1 im transversalen T-System entdeckt. Eine regulierende Funktion des Austauschers wird einerseits auf das Verhalten der „gap junctions“ impliziert und andererseits durch die Modulation protonenabhängiger Kalziumkanäle auf den intrazellulären Kalziumgehalt [60].

1.3. Regulation der NHE1-Aktivität

1.3.1. Intrazellulärer pH-Wert

Der intrazelluläre pH-Wert wird vor allem durch die Aktivität folgender Membrantransporter reguliert: einerseits durch den Na^+/H^+-Austauscher und den Na^+/HCO_3^--Symport, welche beim Absinken des intrazellulären pH-Werts aktiviert werden und den Säureefflux bewirken, und andererseits durch die Cl^-/HCO_3^-- und Cl^-/OH^--Austauscher, welche beim Anstieg des intrazellulären pH-Wertes aktiv werden und den Protoneneinstrom vermitteln [61].

In tierischen Zellen entstehen kontinuierlich Säureequivalente als Nebenprodukte einer Reihe metabolischer Prozesse. Infolgedessen besteht im Zytosol die Tendenz zu einer fortschreitenden Säuerung. Diese Tendenz wird begünstigt durch die passive Aufnahme extrazellulärer Säureequivalente in die Zelle, welche durch das negative Membranpotential an der Zellinnenwand zustandekommt. Protonen müssen deswegen aktiv aus der Zelle ausgeschleust werden, um den intrazellulären physiologischen pH-Wert aufrechtzuerhalten [27]. Der Na^+/H^+-Austauscher ist hierbei der effektivste Mechanismus zur Aufrechterhaltung des physiologischen

intrazellulären pH-Wertes, indem er kontinuierlich die im Zellstoffwechsel erzeugten Protonen aus der Zelle heraus befördert [12].

Unter physiologischen Bedingungen transportiert der Na^+/H^+-Austauscher in einem elektroneutralen Austausch für ein extrazelluläres Natriumion ein intrazelluläres Proton in einer 1:1 Stoichiometrie [62]. Die Sättigungsfunktion folgt dabei einer einfachen Michaelis-Menten-Kinetik [63]. Der zelluläre Ein- und Austritt von Natriumionen bzw. Protonen wird über den transmembranalen chemischen Gradienten der Ionen gesteuert und ist ATP-abhängig. Dieser Gradient wird vor allem durch aktive Ionentransporter wie der Na^+/K^+-ATPase erzeugt. Zusätzlich beeinflussen die H^+-ATPase, die H^+/K^+-ATPase und die im Stoffwechsel entstandenen H^+-Ionen den Gradienten [31].

Die Aktivität des Na^+/H^+-Antiporters steht unter der Kontrolle seiner allosterischen protonenbindenden Seite, welche als "pH-Stat" bezeichnet wird. Diese liegt im transmembranalen Teil auf der zytosolischen Seite des Austauschers, und sie aktiviert den Kationenaustausch, wenn der intrazelluläre pH-Wert unter einen physiologischen Sollwert fällt [64]. Das einfachste Modell besteht darin, daß der zytoplasmatische Anteil regulatorisch mit dem zentralen pH-Sensor zusammenarbeitet, um den pH-Schwellenwert zu senken [29]. Der zytoplasmatische Teil des Austauschers kann als „Signalintegrator" verstanden werden, welcher regulierende Signale, wie z.B. die der Wachstumsfaktoren zum eingebauten transmembranalen pH-Sensor weiterleitet [64]. Dabei wird der Austauscher durch eine steigende Affinität an der allosterischen Modifikationsstelle gegenüber den intrazellulären Protonen aktiviert [28,65,66]. Die Aktivität des NHE1 wird so durch eine Vielzahl an Stimuli wie Hormone, Wachstumsfaktoren, parakrine und autokrine Regulatoren (vermittelt durch Rezeptor-Tyrosinkinasen und rezeptorgekoppelte G-Proteine), sowie mechanische Reize und hyperosmotische Zustände reguliert [13].

Der intrazelluläre pH-Wert-Abfall bleibt jedoch der Hauptstimulus für die Aktivierung des NHE1. Etwa 60% des Protonentransportes aus der Zelle wird durch den NHE1 gewährleistet [67]. In einer Studie von Lazdunski wurde zudem eine Aktivitätssteigerung des Austauschers bei ansteigendem extrazellulärem pH-Wert festgestellt. Eine halb-maximale Aktivität wurde bei einem pH von 7,05 erreicht. [9].

1.3.2. Extrazelluläre Natriumionen

Die extrazelluläre Natriumionenkonzentration beeinflußt zwar die Aktivität des NHE1, ist jedoch kein maßgeblicher Regulator [12]. Das einfachste Modell für die Funktionsweise der Na^+/H^+-Austauscher sagt aus, daß Natrium an der

extrazellulären Seite gebunden und dann transloziert wird. Unter Normalbedingungen sind die Na^+/H^+-Austauscher nahezu gesättigt mit extrazellulärem Natrium und kleine Schwankungen der Natriumkonzentration haben keinen Einfluß auf ihre Funktion [29].

Die extrazelluläre Seite der Na^+/H^+-Austauscher ist nicht selektiv für Natriumionen. Auch die kompetitive Bindung von H^+- und Li^+-Ionen kann stattfinden [68-70]. K^+-Ionen, welche größer sind als die Natriumionen, werden nicht transportiert, sie hemmen jedoch den Austauscher [29].

1.3.3. Zellvolumen

Der Na^+/H^+-Austauscher ist zudem bedeutend für die Regulation des Zellvolumens. Seine Aktivierung bei osmotischer Zellvolumenverkleinerung wurde für viele Zellen und Gewebearten beschrieben [71]. Es wurde festgestellt, daß Hypertonizität NHE1 aktiviert, während Hypotonizität einen inhibierenden Effekt hat [72]. Die Aktivierung durch Hypertonizität wird durch eine Verschiebung des pH-Sollwertes in Richtung alkalischer Werte erreicht [73,74], was eine gesteigerte Protonenaffinität der allosterischen Seite zur Folge hat [62,65].

Die NHE1-Aktivierung resultiert in einem Nettoimport von Na^+-Ionen. Die Zusammenarbeit mit den meist parallel arbeitenden $Cl^-/HCO3^-$-Antiportern bewirkt eine zelluläre Aufnahme von NaCl. Es kommt zu einem osmotischen Wassereinstrom in die Zelle und zur Volumenvergrößerung [31]. Es wird angenommen, daß dieselbe molekulare Veränderung an der allosterischen Seite, wie bei der pH-Wert-Regulation, eine Modifizierung des Zellvolumen-Sollwerts in Richtung größeren Volumens bewirkt [31].

1.3.4. Intrazelluläres ATP

In früheren Studien an ATP-freien epithelialen Bürstensaumvesikeln wurde eine ATP-unabhängige Na^+/H^+-Austauscher-Aktivität festgestellt [75,76]. Heute wird davon ausgegangen, daß der Kationenaustausch ohne den direkten Verbrauch metabolischer Energie stattfindet und somit passiv vom chemischen Membranpotential der Na^+-Ionen und H^+-Ionen getrieben wird [77]. Es wurde jedoch auch festgestellt, daß für eine optimale NHE1-Aktivität eine relativ hohe Konzentration an intrazellulärem ATP benötigt wird [78]. Bei einer Absenkung des intrazellulären ATP-Gehalts kommt es zu einer Hemmung der NHE1-Aktivität [79,80]. Dabei wurde der hemmende Effekt nicht durch Verschiebungen der Ionengradienten ausgelöst, sondern durch eine allosterische Regulation des Na^+/H^+-Antiporters durch ATP [81] mittels einer Senkung der Protonenbindungs-Affinität.

Der Austauscher bleibt bei pH-Werten über 6,5 inaktiv [79]. Der genaue Zusammenhang der ATP-Abhängigkeit von NHE1 wird derzeit noch diskutiert. Auch kommt es zu einer Senkung der Maximalgeschwindigkeit des Na^+/H^+-Antiporters [78]. Eine direkte Bindung von ATP an den Austauscher scheint jedoch nicht stattzufinden [78], und sie ist unabhängig von einer direkten NHE1-Phosphorylierung. Die deutliche Hemmung der Austauscher-Aktivität bei ATP-Verlust geht nicht mit Veränderungen in seinem Phosphorylierungsstatus einher [82]. Bei der NHE1-Isoform bleibt die ATP-Regulation sogar erhalten, wenn mutmaßlich alle Phosphorylierungsstellen durch Mutagenese entfernt wurden [82,83]. Man vermutet, daß noch unentdeckte Hilfsproteine den regulierenden Effekt des ATP-Verlustes auf die Aktivität von NHE1 vermitteln: möglicherweise indem eine Interaktion dieser Hilfsproteine mit NHE1 bei niedrigem ATP-Gehalt nicht möglich ist [77,81,82]. Alternativ wird dabei eine Interaktion mit dem Zytoskelett vermutet [82].

1.3.5. Regulatorische Proteine

1.3.5.1. Calmodulin

In der zytoplasmatischen Domäne sind zwei Ca^{2+}/Calmodulin bindende Stellen lokalisiert. Die eine Domäne verfügt über eine hohe (CaM-A, $K_d \approx 20nM$) die andere über eine niedrige (CaM-A, $K_d \approx 350nM$) Bindungsaffinität. Der CaM-A Domäne mit hoher Bindungsaffinität (Reste 636-656) wird eine auto-inhibierende Rolle des Austauschers zugeschrieben. Bei physiologischen Konzentrationen an intrazellulärem Kalzium bewirkt die unbesetzte Domäne einen inhibierenden Effekt auf die Austauscheraktivität, der mit steigenden Kalziumkonzentrationen aufgehoben wird [84]. Es wurde gezeigt, daß die Deletion oder Mutation der CaM-A Domäne zu einer allosterischen Aktivierung des Austauschers führte, indem die Affinität gegenüber intrazellulären Protonen gesteigert war. So wird davon ausgegangen, daß der inhibierende Effekt dieser Domäne in einer Senkung der Bindungsaffinität des Austauschers für Protonen besteht [85].

1.3.5.2. „calcineurin B homolog protein“

Ein weiteres Kalziumionen-bindendes Protein interagiert mit NHE1, das „calcineurin B homolog protein“ (CHP). Auf dem zytosolischen Teil des Austauschermoleküls wurden CHP-Bindungsstellen entdeckt. In einer früheren Studie wurde der Phosphorylierungsstatus dieses Proteins als ein kontrollierendes Signal der mitogenen NHE1-Regulation vermutet [86]. Vor kurzem wurde die Bindungsstelle im Bereich der Aminosäuren 515-530 lokalisiert und zudem festgestellt, daß eine Bindung von CHP für eine optimale Austauscheraktivität

notwendig ist. Es wurde vermutet, daß das gebundene CHP mit der transmembranalen Domäne interagiert und den Ionentransport ermöglicht [87].

1.3.5.3. „heat shock protein 70“

Das „heat shock protein 70“ (hsp70) wurde als ein weiteres mit NHE1 interagierendes Protein entdeckt. Man untersucht derzeit die Interaktion, bisher wird ein Zusammenhang der hsp70-Bindung an NHE1 mit der ATP-Regulation des Austauschern vermutet [88].

1.3.6. Weitere Regulatoren des NHE1

Eine α_1-adrenerge Stimulation zeigte an isolierten Myozyten und an isolierten Rattenherzen eine erhöhte Na^+/H^+-Austauscher-Aktivität, wobei bei letzteren eine erhöhte Inzidenz an Reperfusionsarrhythmien auftrat [89]. Eine Stimulierung mit Enothelin-1 [90], Angiotensin II [91] und Thrombin [92] bewirkten eine Aktivitätssteigerung der myokardialen Na^+/H^+-Austauscher.

2. Mitogen aktivierte Proteinkinasen

Die Regulation des NHE1 durch die „mitogen-activating-proteinkinase“ (MAPK) wurde in vielen Studien untersucht. Sie sind involviert bei der NHE1-Phosphorylierung und -Aktivierung [93,94]. Man stellte bei mit Wachstumsfaktoren stimulierten Zellen eine erhöhte NHE1-Aktivität und einen Anstieg der Phosphorylierung fest [93,95-97].

Die Carboxyl-Domäne der NHE1 ist zytoplasmatisch und deswegen geeignet für eine Interaktion mit den MAPKs [96,98]. Es wird postuliert, daß die Phosphorylierung an distalen Serin/Threonin Resten des Carboxylendes stattfindet [29]. Ser703 wurde *in vivo* als eine Phosphorylierungsstelle für mehrere Proteinkinasen eruiert, wie der ERK1/2 und der $p90^{RSK}$ [99], und außerdem neben dem MAPK-Signaltransduktionsweg auch für p160 ROCK [100]. Es konnte jedoch auch bei Verlust des distalen zytoplasmatischen Anteils inklusive Ser703 und weiterer Phosphorylierungsstellen noch eine halbmaximale Aktivierung des Austauschers durch Wachstumsfaktoren festgestellt werden [29,101]. Deswegen vermutet man zusätzliche regulierende Proteine, welche eventuell selbst für eine Aktivierung phosphoryliert werden und mit verschiedenen zytoplasmatischen Subdomänen des Austauschers interagieren [29].

Die Mechanismen, welche NHE1 speziell während der Reperfusion und bei längerfristigen Prozessen modulieren, sind noch nicht bekannt. Die Aktivität wird durch Veränderungen der Proteinexpression und durch Phosphorylierung der existierenden Austauscher oder eines eng assoziierten Modulationsproteins reguliert. Beide Regulationsarten verbessern die maximale Transportkapazität, wobei die Phosphorylierung die intrazelluläre H^+-Affinität der protonenbindenden Seite über eine Modulierung des „pH-Sensors" des Austauschers Richtung alkalischer pH-Werte verstärkt [96,97,102]. In Myozyten ist die Art der Regulation abhängig von der Dauer des ischämischen Zustandes. Genexpression scheint eine wichtige Rolle bei chronischer Ischämie zu spielen, Phosphorylierung ist entscheidend bei akuter Ischämie/Reperfusion [103].

2.1. MAPK-vermittelte Signaltransduktion

Die MAPKs können durch Rezeptor-Tyrosinkinasen, PKC, G-Protein gekoppelte Rezeptoren und verschiedene zelluläre Stressoren aktiviert werden.

Sie sind Teil einer Kaskade von hintereinander geschalteten Proteinkinasen, welche der Weiterleitung extrazellulärer Signale ins Zellinnere in Form einer Stimulation der Tyrosin-Phosphorylierung nachgeschalteter Effektormoleküle dienen. Das extrazelluläre Signal wird dabei von einem Transmembranrezeptor registriert und meist über ein sogenanntes „rat sarcoma protein" (Ras) mit Hilfe der Proteinkinasenkaskade ins Zellinnere weitergeleitet. Man unterscheidet bisher vier MAP-Kinasen, welche zur Familie der Ser/Thr-Proteinkinasen gehören: die 42- und 44-kDa „extracellular–signal–regulated-kinase" (ERK) und die zwei stress-aktivierten MAPK-Familien (SAPK) nämlich die 46/54-kDa „c-jun-NH_2-terminal kinase" (JNK) und die p38-MAP-Kinase [104]. Kürzlich wurde die vierte MAP-Kinase entdeckt, welche man als ERK3 (auch ERK5/big MAPK 1 (BMK 1)) bezeichnet, über sie ist jedoch noch wenig bekannt [105]. Die drei klassischen MAPK-Wege sind zwar parallel verlaufende Wege, welche von sehr unterschiedlichen extrazellulären Signalen aktiviert werden können, es wird aber davon ausgegangen, daß die verschiedenen Wege vernetzt sind. Deswegen können Interaktionen zwischen den Signaltransduktionswegen auf allen Ebenen stattfinden, so daß dieselben Substrate durch verschiedene MAPK-Wege reguliert werden können [106].

Die MAPK-Proteine stehen am unteren Ende der Signalübertragung der MAPK-Wege und haben zwei weitere Proteinkinasen vorgeschaltet. Die den MAPKs vorgeschaltete zweifach spezifische Proteinkinase, welche als MAP-Kinase-Kinase (MAPKK) oder auch als MAP/ERK-Kinase (MEK) bezeichnet wird, aktiviert die MAPKs durch ihre Phosphorylierung an ihren Threonin- und Tyrosin-Resten (Thr-

X-Tyr) [107]. Die Phosphorylierung beider Reste ist notwendig für die Aktivierung der MAPKs. Die MAP-Kinase-Kinase dient wiederum einer vorgeschalteten Proteinkinase als Substrat, der MAP-Kinase-Kinase-Kinase (MAPKK-Kinase) oder auch MAP/ERK-Kinase-Kinase (MEKK), welche die MAPKK an ihren Serin/Threonin-Resten phosphoryliert [104]. Die Position der verschiedenen Proteinkinasen in der Kaskade der MAPK-Wege ist durch ihre Substratspezifität festgelegt [106]. Die MAPKs selbst sind Prolin-gerichtete Serin/Threonin Kinasen, welche Serin- und Threoninreste mit einer Pro-X-Ser/Thr-Pro Sequenz phosphorylieren [107].

Die Substrate der MAPK-Wege sind sehr vielfältig. Sie umfassen unter anderem Transkriptionsfaktoren, durch deren Phosphorylierung eine Aktivierung der Genexpression stattfindet.

2.2. p38-MAPK

Die p38-MAPK ist eingebunden in eine ganze Reihe von Prozessen, wie Entzündungsprozesse, Zellwachstum, Zelldifferenzierung, Zellzyklus und Zelltod, aber auch in die zelluläre Osmoregulation und die Zellantwort auf extrazelluläre Stresstimuli [108,109] wie UV-Licht, osmotischen Schock, Zytokine, Lipopolysaccharide und Ischämie (Abb. 2).

Sechs Isoformen der p38-MAP-Kinase wurden bei Säugetieren entdeckt: p38α_1 und p38α_2 [110,111], p38$\beta_1$und p38β_2 [112,113], p38γ [114,115] und p38δ [116,117]. Die in dieser Studie untersuchten Isoformen p38α_1/p38α_2 werden ubiquitär exprimiert. Im Myokard wurden bisher nur die Isoformen der p38α und p38β gefunden [108]. Die Isoformen der p38α können von den vorgeschalteten Proteinkinasen MAPKK3, MAPKK4 und MAPKK6 phosphoryliert werden [108]. Alle Isoformen der p38-Gruppe haben zwei Phosphorylierungsstellen (Thr-Gly-Tyr (TGY)) an der regulatorischen Schleife zwischen den Kinasesubdomänen VII und VIII [118], durch deren Phosphorylierung eine Aktivierung der Proteinkinase stattfindet. Die *in vivo* Spezifität der MAPKKs wurde noch nicht vollständig untersucht. *In vitro* Ergebnisse lassen jedoch vermuten, daß jede in einem oder zwei MAPK-Signaltransduktionswegen aktiv ist [119,120], und daß die MAPKKs Substrate für vier oder fünf vorgeschaltete MAPKKKs sind [121]. Kontrovers wird noch die Rolle der PKC innerhalb des Signaltransduktionswegs der p38-MAPK diskutiert [109,122]. Der Mechanismus der Aktivierung der MAPKKKs ist noch nicht klar. Wie bei der ERK-Kaskade wird die Involvierung der kleinen G-Proteine der Ras-Superfamilie (Ras, Rac1 und Cdc42) vermutet. Diese könnten dann über Proteinkinasen, wie die „p21-activating kinase“ und die „mixed-lineage kinase“ die p38-MAPK-Kaskade aktivieren [123-125].

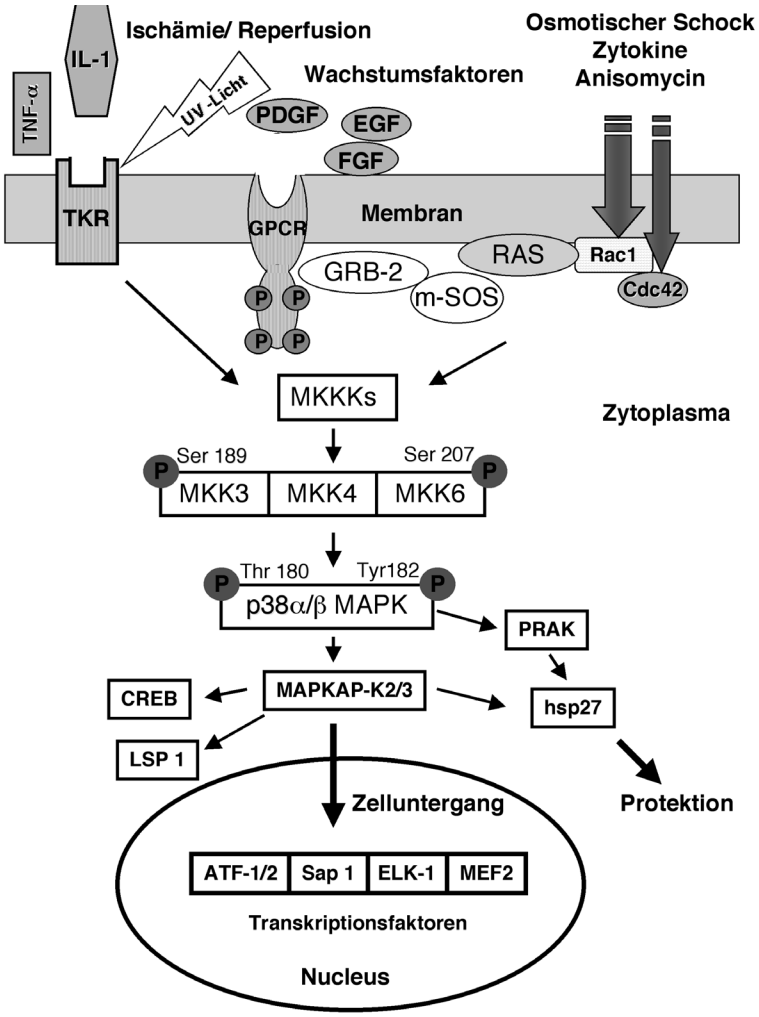


Abb.2 ***Schema des Signaltransduktionswegs der p38-MAPK***
IL-1: *Interleukin-1;* ***TNFα:*** *„tumor necrosis factor α“;* ***TKR:*** *“tyrosin kinase receptor“;* ***PDGF:*** *„plateled dirived growth factor“;* ***EGF:*** *„epidermal growth factor“;* ***FGF:*** *„fibroblast growth factor“,* ***GPCR:*** *„G-protein coupeled factor“;* ***GRB-2:*** *growth factor receptor-bound protein 2;* ***m-SOS:*** *„mammalian-son of sevenless protein“;* ***RAS:*** *„rat sarcoma protein“;* ***Rac1:*** *„RAS-related C3 botulinumtoxin“;* ***Cdc42:*** *„cell division cycle 42“;* ***MKKK:*** *„MAPK kinase kinase;* ***MKK:*** *MAPK kinase“;* ***PRAK:*** *„p38 regulated/activated kinase“;* ***hsp27:*** *„heat shock protein 27“;* ***MAPKAP-K2/3:*** *„MAPK activated protein kinase“;* ***CREB:*** *„cAMP-response element-binding protein“;* ***LSP:*** *“lymphocyte-specific protein“;* ***ATF:*** *„activation transcription factor 2“;* ***Sap:*** *„SRF-accessory protein“;* ***ELK-1:*** *human homolog of the avian erythroblastosis E26 oncogene“;* ***MEF2:*** *„myocyte enhance factor“.*

Die Substrate der p38α-MAPK beinhalten Proteinkinasen [126-128] und Transkriptionsfaktoren [129,130]. Proteinkinasen sind die „MAPK-activating proteinkinase-2“ (MAPKAP-K2), sowie MAPKAP-K3 [128]. Die Aktivierung von MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 kann *in vivo* durch SB203580, einen spezifischen Inhibitor der p38α- und p38β-MAPK blockiert werden [128], wobei trotz der SB-Inhibierung eine Phosphorylierung von p38α- und p38β-MAPK stattfindet [131]. Die Aktivität von „p38 regulated/activated kinase“ (PRAK) wird ebenfalls durch p38α-

und p38β-MAPK reguliert [132]. MAPKAP-K2, MAPKAP-K3 und PRAK phosphorylieren wiederum das „small heat shock protein" HSP27 [132-134]. Weitere Substrate der MAPKAP-K2 und MAPKAP-K3 sind „lymphocyte-specific protein 1" (LSP1) [135], „cAMP-response element-binding protein" (CREB) [136], „activating-transcription factor 1" (ATF1) [136], „serum-responsive elements" (SRF) [137] und Tyrosin-Hydroxylase [138].

Es sind weitere Transkriptionsfaktoren bekannt, welche von p38α aktiviert werden, dazu zählen „activating transcription factor-2" (ATF-2), „SRF-accessory protein 1" (Sap 1), CHOP („growth arrest and DNA damage inducible gene 153", oder GADD153), p53, C/CEBPβ, „myocyte enhance factor 2C" (MEF2C) und MEF2A [139]. Der Mechanismus, durch den p38-MAPK die Genexpression reguliert, ist größtenteils unbekannt. Außerdem scheinen die verschiedenen p38-MAPK-Isoformen unterschiedliche Funktionen zu haben [139].

3. Myokardiale Na^+/H^+-Austauscher in der Ischämie

Bei myokardialer Ischämie, der resultierenden Azidose und der Abnahme der Kontraktilität der betroffenen Gebiete, hat der Na^+/H^+-Austauscher innerhalb der Pathogenese der Gewebeschädigung während Ischämie und Reperfusion eine bedeutende Funktion [140,141].

Die ischämische NHE1-Aktivierung kommt nicht allein durch die Azidose, sondern auch durch NHE-Stimulatoren wie andere ischämische Metaboliten, Hydrogen-Peroxide, Lysophosphatidylcholine und parakrine und autokrine Faktoren mittels Phosphorylierung des Austauschers zustande [12]. Myokardiale Ischämie hat zwei direkte Konsequenzen: einmal die durch Sauerstoffmangel sinkende Energieproduktion der Zelle, andererseits die verstärkte Anhäufung von Metaboliten wie Laktat, CO_2 und Protonen. Abhängig vom Reduktionsgrad der koronaren Durchblutung und vom Ausmaß des Sauerstoffverbrauchs sinkt der intrazelluläre pH-Wert von Normalwerten von 7,2 [142] auf 6,3 [143] oder auf noch geringere Werte[144].

Bei niedrigem intrazellulären pH-Wert (pH ≤ 6,5) ist der NHE1-Austauscher maximal aktiviert. Der Hill-Koeffizient der Aktivierung bei myokardialen Na^+/H^+-Austauschern zwischen einem pH-Wert von 7,0 und 7,6 liegt bei drei [9]. Diese pH-Wert-abhängige Aktivierungskurve ist somit steiler als bei NHE-Austauschern in anderen Organen. Das bedeutet, daß die Ionenbindung kooperativ geschieht, daß also die Bindung von einem Proton die folgenden Protonenbindungen erleichtert. Es findet sogar eine maximale siebenfache Austauscheraktivierung innerhalb eines

geringen pH-Bereichs zwischen 6,5 und 5,9 statt [145]. Der Austauscher stellt bei Ischämie den wichtigsten pH-regulierenden Mechanismus der Myozyten dar [9].

Schon länger ist bekannt, daß die Na^+/H^+-Austauscher-Aktivität eng mit dem Natrium- und Kalziumhaushalt der Myozyten verbunden ist. In vielen Studien wurde bestätigt, daß Veränderungen des intrazellulären pH-Wertes und der intrazellulären Kalziumkonzentration miteinander korrelieren [9,146].

Unter physiologischen Bedingungen besteht eine Balance zwischen dem Natriumioneneintritt durch den Na^+/H^+-Austauscher und der Natriumionen-Ausschleusung mittels der Na^+/K^+-ATPase und des Na^+/Ca^{2+}-Austauschers [70,147]. Bei ischämischen Konditionen findet eine Hemmung der Na^+/K^+-ATPase statt, so daß die Natriumionenausschleusung nicht mehr stattfinden kann. Durch die weiterlaufende Natriumioneneinschleusung mittels der Na^+/H^+-Austauscher und durch Natriumionenkanäle kommt es zu einer intrazellulären Natrium-akkumulation im Verlauf der Ischämie [148-150]. Dies spricht für eine Austauscher-Aktivierung schon während der Ischämie und nicht erst in der Reperfusion [151-156].

Kardiomyozyten besitzen neben den Na^+/H^+-Austauschern auch sarkolemmale Na^+/Ca^{2+}-Austauscher, welche intrazelluläre Natriumionen im Austausch gegen extrazelluläre Kalziumionen aus der Zelle heraustransportieren. Die Hypothese, daß die Aktivität des Na^+/Ca^{2+}-Austauschers, die der intrazellulären Natrium-akkumulation folgt, zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumkonzentration führt [9,146,157-159], wurde in vielen Studien bestätigt. Die Konsequenz des intrazellulären Kalziumkonzentrationsanstiegs sind Ischämie/Reperfusions-schädigungen wie z.B. ventrikuläre Arrhythmien, myokardiale kontraktile Dysfunktionen, Stunning und Nekrose [10,11].

3.1. Rolle der Na^+/H^+-Austauscher in der Reperfusion

In der Reperfusionsphase kommen die sich in der Ischämie etablierenden myokardialen Schäden und die kontraktile Dysfunktion zum Ausdruck [160].

Viele Studien sprechen dafür, daß die in der Ischämie gestartete Aktivität der Austauscher während der Reperfusion beibehalten wird. Diese wird ausgelöst durch den transsarkolemmalen Protonengradienten, welcher durch die hohe intrazelluläre und die durch das Auswaschen bedingte niedrige extrazelluläre Protonenkonzentration zustande kommt [13,161-164]. In einigen Studien wurde zu Beginn der Reperfusion zunächst noch ein Anstieg der Natriumionenkonzentration beobachtet, bevor sie wieder Basiswerte erreichte [9,156]. Bezüglich dieser Ergebnisse

ging man davon aus, daß mit Reperfusionsbeginn eine erhöhte Austauscheraktivität gegeben ist.

Dagegen sank in anderen Studien direkt mit dem Einsetzen der Reperfusion die Natriumionenkonzentration exponentiell auf präischämische Werte, wobei bei einer Ischämiedauer von über 25 Minuten die Natriumionenkonzentration auch nach dreiminütiger Reperfusion keine präischämischen Basiswerte erreichte [151]. Dieses Absinken der Natriumionenkonzentration wurde in erster Linie auf die Aktivität der myokardialen Na^+/Ca^{2+}-Austauscher zurückgeführt. In einer Studie von van Emous et al. [165] wurde zusätzlich in der frühen Reperfusionsphase eine Na^+/K^+-ATPase-Aktivität festgestellt, so daß die Natriumionen-Konzentrationsabnahme nicht allein auf die ausschleusende Funktion der Na^+/Ca^{2+}-Austauscher zurückgeführt wurde, sondern auch zu einem geringeren Teil auf die Funktion der Na^+/K^+-ATPase.

Zu welchem Zeitpunkt genau die Kalziumüberladung der Myozyten durch die Aktivität der Na^+/Ca^{2+}-Austauscher stattfindet, ob schon während der Ischämie oder erst in der frühen Reperfusion, wird jedoch kontrovers diskutiert. In vielen Studien wird postuliert, daß erst in der Reperfusion die Kalziumüberladung der Myozyten stattfindet [156,162,166-169]. In anderen Studien wurde jedoch schon bei einer kurzzeitigen Ischämie ein Kalziumanstieg festgestellt. [155,170-172].

Als eine alternative Hypothese, welche von einem Kalzium-unabhängigen zellschädigenden Mechanismus des Na^+/H^+-Austauschers ausgeht, wird das „pH-Paradox“ genannt. Dabei wird davon ausgegangen, daß während der Ischämie der intrazelluläre ATP-Verlust in der Aktivierung von Phospholipasen und Proteasen resultiert. Diese zellschädigenden Enzyme haben alkalische pH-Optima, weswegen ihre schädigende Wirkung während der Ischämie und dem resultierenden pH-Wert-Abfall nicht eintreten kann. Mit der realkalisierenden Aktivität der Na^+/H^+-Austauscher in der Reperfusion wird die Inhibierung dieser Enzyme aufgehoben, was zur Zellschädigung führt [173].

4. Inhibitoren des kardialen Na^+/H^+-Austauschers

Am deutlichsten konnte in experimentellen Modellen die pathophysiologische Rolle des Na^+/H^+-Austauschers mittels der deutlich kardioprotektiven Effekte spezifischer pharmakologischer NHE1-Inhibitoren bewiesen werden. Folgende verbesserte Konditionen des ischämischen Myokards wurden durch eine Austauscherblockade in experimentellen und klinischen Studien an verschiedenen Ischämiemodellen erzielt: eine verbesserte Funktionswiederherstellung des linken

Ventrikels nach der Reperfusion [19,174-178], eine Reduktion der Infarktgröße [17,175,179-184], eine Reduktion der Nekrose und der Apoptose [185-187], eine reduzierte ischämie- und reperfusionsinduzierte Kontraktilität [175,177] sowie eine Reduktion von Arrhythmien [16,176,182,188-192] und in klinischen Studien eine reduzierte postinfarzielle Sterblichkeit [12].

Mit dem Einsatz der Kalium-schonenden diuretischen Amiloride und ihrer effizienteren 5-Amino-substituierten Derivate am Herzen wurden erstmals Inhibitoren der Na^+/H^+-Austauscher entdeckt [8], welche jedoch auch mit anderen Kationen-transportierenden Proteinen interagierten [193].

Heute sind viele spezifische pharmakologische Inhibitoren des kardialen Na^+/H^+-Austauschers bekannt. Das „4-Isopropyl-3-Methylsulfonylbenzoyl-Guanidin Methansulfonat“ (HOE 642, Cariporid) erzielte unabhängig von der Tierspezies in verschiedenen experimentellen Modellen und auch in klinischen Studien kardioprotektive Effekte [194], wie z.B. antiarrhythmische Wirkungen, Infarktgröße-Reduktion, antiapoptotische Effekte, Reduktion der ischämischen intrazellulären Natriumakkumulation und der kontraktilen Dysfunktion [15,19,156,178,183-185,195-198]. In der GUARDIAN-Studie („Guard During Ischaemia Against Necrosis“) wurden 11590 Patienten mit diagnostizierten akuten koronaren Syndromen entweder mit Placebokontrollen oder Cariporiden behandelt und über einen Zeitraum von 36 Tagen beobachtet. Ein anti-nekrotischer Effekt durch intravenöse Verabreichung von 120 mg Cariporid alle acht Stunden wurde bei Bypass-operierten Patienten beobachtet. Zusätzlich wurde eine Reduktion von myokardialen Q-Wellen-Infarkten erzielt [199]. In einer weiteren klinischen Cariporid-Studie wurden 100 akute Infarktpatienten vor einer operativen Ballon-Angioplastie mit Cariporid mediziert. Sie zeigten eine verbesserte Erholung der Funktion des linken Ventrikels [200]. Die in den klinischen Studien getesteten neueren und spezifischeren Inhibitoren zeigten eine geringe Toxizität und weniger Nebenwirkungen.

Viele der in klinischen Studien getesteten Inhibitoren wurden dahingehend untersucht, ob die kardioprotektive Wirksamkeit auch bei einer erstmaligen Applizierung vor der Reperfusion, das heißt, für die Behandlung akuter Herzinfarktpatienten, gegeben ist. Viele der Inhibitorsubstanzen zeigten kardioprotektive Effekte bei erstmaliger präreperfusorischer Verabreichung, jedoch waren sie weniger wirksam als bei präischämischer Medikation. Diese schwächere Wirksamkeit läßt sich durch die schon während der Ischämie stattfindende Aktivität des Austauschers mit der resultierenden myozytenschädigenden Natrium- und Kalziumüberladung erklären. Optimale Effizienz wäre demnach durch die Verabreichung der Inhibitoren vor und während der Ischämie und zusätzlich während der Reperfusion zu erzielen [194].

Auch in experimentellen Modellen wurde die Wirksamkeit der Inhibitoren bei erstmaliger präreperfusorischer Verabreichung getestet. Die Verabreichung von „3-Methylsulphonyl-4-Piperidinobenzoyl-Guanidin-Methansulfonat“ (HOE-694), bewirkte sowohl im Ischämie-Modell des isolierten Rattenherzens [174] als auch am Schweineherz *in vivo* [175] nur eine geringgradige Infarktgröße-Reduktion [175] bzw. Funktionsverbesserung des linken Ventrikels während der Reperfusion [174,175], im Gegensatz zu den präischämisch medizierten Gruppen. In einem weiteren Schweine-Ischämiemodell hatte die Gabe von HOE642 direkt vor Beginn der Reperfusion ebenfalls keine Infarktgröße-reduzierende Wirksamkeit [182]. Auch bei Amiloriden [156,201], Cariporid [184] oder EMD85131 [180] wurde eine geringgradigere kardioprotektive Effizienz bei erstmaliger Applikation vor der Reperfusion festgestellt.

Kontrovers dazu stehen die Ergebnisse einer *in vivo* Studie von Rohmann et al. [202] am Schweineherz, bei welcher auch mittels präreperfusorische Applikation eine deutliche Infarktgröße-reduzierende Wirksamkeit erzielt wurde, wobei auch hier eine präischämische Verabreichung die Infarktgröße stärker reduzierte. Die Autoren begründeten ihre Ergebnisse damit, daß sie die für eine präreperfusorische Verabreichung angemessene hohe Dosierung des Inhibitors HOE694 verabreicht hätten. Diese war zehnfach höher, als die bei einer präischämischen Verabreichung benötigte Dosis. Am ischämischen Schweineherz, bei welchem ein kollateraler Blutfluß nahezu vollständig fehlt, ist es fraglich, inwiefern ein intravenös verabreichter pharmakologischer Inhibitor die ischämische Region überhaupt erreicht. Um Aussagen über die Wirksamkeit einer präreperfusorischen Verabreichung zu treffen, müßte das tatsächliche Vorhandensein des Pharmakons im ischämischen Gewebe untersucht werden.

Ein weiterer bekannter NHE1-spezifischer Inhibitor, das Eniporid „EMD-96785“, erzielte ebenfalls in experimentellen Studien eine kardioprotektive Wirksamkeit [180] und wird zur Zeit in klinischen Studien getestet.

Die in der vorliegenden Studie verwendete Substanz BIIB513 (Benzamide, N-(aminoiminomethyl)-4-[4- (2-furanylcarbonyl)-1-piperazinyl]-3-(methylsulfonyl) methanesulfonate), ein weiterer selektiver NHE1-Inhibitor, wurde bereits *in vivo* an Herzen von Hunden und Ratten getestet. Die BIIB513-Substanz, welche vor einer jeweils 30, 60 oder 90 minütigen Ischämie intravenös appliziert wurde, reduzierte sowohl die Infarktgröße, als auch das Auftreten von Arrhythmien und den Gehalt an Kreatinphosphokinase [17,179]. Als eine Folge des Ischämie/Reperfusionsschadens wurde ein Anstieg der Gehalt an Kreatinphosphokinase gezeigt [203,204]. Die Infarktgröße-reduzierende Effizienz von BIIB513 und BIIB722 wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals am Schwein getestet. BIIB513 zeigte sich in einer

Studie von Gumina et al. [17] achtmal wirksamer als HOE642, bezüglich der Wiederherstellung eines physiologischen pH-Wertes nach einer Ansäuerung von „NHE1-wild-type“-exprimierenden Zellen und 37000 mal selektiver für NHE1 als gegenüber NHE3.

Der kardioprotektive Effekt der pharmakologischen Na^+/H^+-Austauscher-Inhibierung wurde an diversen *in vivo* Tiermodellen gezeigt. Als Tierspezies wurden Hunde [180,205], Ratten [186,206], Kaninchen [184] und Schweine [175,207] verwendet. Prinzipielle methodische Unterschiede dieser Modelle bestanden in der Dauer der Ischämie, der Dauer der Reperfusion und dem Zeitpunkt der Verabreichung des Inhibitors. Zusammenfassend stellt also die Kardioprotektion mittels einer pharmakologischen NHE1-Blockade ein speziesübergreifendes Schutzphänomen dar. Es ist auch im menschlichen Myokard auslösbar und ist sowohl bei kurzzeitiger als auch länger aufrechterhaltener Ischämie kardioprotektiv wirksam. Außerdem kann es noch nach Beginn der Ischämie induziert werden.

Der genaue Mechanismus der NHE1-Inhibition ist noch nicht bekannt. Es wird vermutet, daß die pharmakologischen Inhibitoren an der transmembranalen lipophilen Region zwischen den Proteinsegmenten M8 und M10 binden, wobei aber auch andere Regionen des Austauschers die Sensitivität für die Inhibitoren beeinflussen [208]. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, daß der Histidinrest 349 für die Interaktion des Austauschers mit Amilorid-Inhibitoren von Bedeutung ist [209].

5. Rolle der p38-MAPK bei Ischämie/Reperfusion

Die Rolle der p38-MAPK während der Ischämie und Reperfusion *in vivo* ist die am meisten umstrittene der MAPKs. Die meisten Studien gehen jedoch von einer negativen Funktion innerhalb der myokardialen Reaktion auf die Ischämie aus.

Ansteigende Aktivitäten der p38-MAPK bei lang andauernder Ischämie wurde *in vivo* am freigelegten Schweineherzen [131,210] und Hundeherzen [211] gezeigt. Auch bei anderen Tierarten und experimentellen Modellen, wie z.B. dem isolierten Ratten- [21,212-214] und Kaninchenherzen [215] wurde eine ansteigende Phosphorylierung der p38-MAPK nachgewiesen. Nur in wenigen Studien wurde kein Aktivitätsanstieg festgestellt [216-218].

Das Maximum der Aktivierung von p38-MAPK liegt dabei zwischen der 8. und 20. Minute der Ischämie, mit fortlaufender Dauer nimmt die Kinaseaktivität wieder ab [131,213,214,219,220]. Auch in der Reperfusion wurde ein erneuter Anstieg bzw. eine Aufrechterhaltung der p38-MAPK-Phosphorylierung festgestellt[21,213,220,221].

Dafür, daß die Aktivierung der p38-MAPK während einer längeren Ischämie bei der Entstehung der myokardialen Apoptose bzw. Nekrose involviert ist, spricht, daß in Studien unter Verwendung von Imidazolderivaten (z.B. SB 203580), spezifischer Inhibitoren der p38-MAPK, welche vor und während der Ischämie appliziert wurden, ein kardioprotektiver Effekt am Schweineherz *in vivo* [131], am isolierten Kaninchen- [215,220] und am isolierten Rattenherzen [214,222] erzielt wurde. In einer ganzen Reihe von Studien an diversen ähnlichen experimentellen Modellen wurde durch die SB-induzierte pharmakologische Blockade der p38-MAPK ein Anstieg der überlebenden Myozyten [21,223,224], eine Reduzierung der myokardialen Apoptose [220] und eine Verbesserung der postischämischen Herzfunktion [214,220,222] erreicht. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse anderer Studien, bei welchen eine SB-Applikation die Ischämie/Reperfusion-induzierte Herzschädigung nicht beeinflußte [211,225]. Vergleicht man diese Studien miteinander, so sind die unterschiedlichen Ergebnisse mit den verschiedenen Applikationszeitpunkten des SB-Inhibitors zu begründen.

Auch wurde die Phosphorylierung der p38-MAPK innerhalb des kardioprotektiven Effektes der sogenannten ischämischen Präkonditionierung (IP) studiert. Bei der ischämischen Präkonditionierung handelt es sich um ein Phänomen, bei dem kurzzeitige Abfolgen von Ischämie und Reperfusion das Myokard gegen die nachfolgende langandauernde Indexischämie schützen. Innerhalb der längeren Indexischämie, welche dem Präkonditionierungsprotokoll folgt, wurde *in vivo* bei Hundeherzen [211] und am Schweineherzen [20] sowie am isolierten Ratten- [21,214] und Kaninchenherzen [215] eine gesenkte Phosphorylierungsintensität der p38-MAPK festgestellt. Der Grad der Phosphorylierung der p38-MAPK des ersten kurzen Ischämie-/Reperfusionszyklus nahm schon im Verlauf des Präkonditionierungsprotokolls fortschreitend ab [20,21]. Die ischämische Präkonditionierung induziert demzufolge den kardioprotektiven Effekt einer p38-MAPK-Deaktivierung.

Andererseits gibt es auch hier kontroverse Ergebnisse, welche einen Anstieg der p38-MAPK-Phosphorylierungsintensität während der Indexischämie, trotz eines vorgeschalteten Präkonditionierungsprotokolls darstellten [218].

In neueren Studien wird vermutet, daß die im Myokard vorhandenen Isoformen p38α- und p38β-MAPK verschiedene Substrate phosphorylieren, welche eine proapoptotische Rolle der p38α- und eine kardioprotektive Funktion für die p38β-MAPK-Isoform erklären [226,227]. Bei Hypoxie wurde eine selektive Aktivierung der p38α- und p38γ-MAPK-Isoformen festgestellt, jedoch keine Aktivierung der p38β-MAPK [228]. Die während der Indexischämie vermittelte Kardioprotektion mittels SB-Inhibierung und mittels Präkonditionierung könnte durch die deaktivierende Regulation der selektiven, bei lang andauernder Ischämie stattfindenden p38α-

MAPK-Aktivierung zustande kommen [223]. p38β-MAPK blieb bei lang andauernder Indexischämie deaktiviert [223]. Andererseits könnte die spezifische Aktivierungskaskade von p38β-MAPK über MAPKAPK-2 und PRAK [139] zur Phosphorylierung von HSP27 [132,229,230] und zur Protektion führen.

6. Ischämische Präkonditionierung

Kurze vorgeschaltete Ischämieperioden machen das Myokard widerstandsfähiger gegenüber einer nachfolgenden längeren Ischämie. Dieser protektive Mechanismus mit der Verminderung einer resultierenden Infarktgröße wird als ischämische Präkonditionierung bezeichnet [231]. Bei der ischämischen Präkonditionierung handelt es sich um einen ubiquitären protektiven Mechanismus, welcher bei allen bisher untersuchten Tierarten, wie Ratte, Kaninchen [232], Meerschweinchen, Hund [233] und Schwein [234,235] ausgelöst werden konnte. Auch an humanen Myozyten [236] und humanen ventrikulären Trabekeln [237] konnte der präkonditionierende Mechanismus bestätigt werden.

Die ischämische Präkonditionierung kann als eine metabolische Anpassung mit vermindertem Energieumsatz der Zelle an die ischämische Situation verstanden werden. Beim präkonditionierten Myokard wurde im Verlauf der nachfolgenden langen Okklusion ein verminderter Abfall des myokardialen ATPs [238] und ein verringerter Anstieg des Laktatspiegels [239] beobachtet. Auch eine Infarktgröße-Reduktion, eine verringerte ultrastrukturelle Schädigung, eine verbesserte Erholung der mechanischen Ventrikelfunktion und eine Reduktion von Reperfusionsarrhythmien kennzeichnen diesen Schutzmechanismus [240].

Am Schweinemodell der myokardialen Ischämie zeigte sich, daß bei einer Vorbehandlung der Tiere mit zwei Zyklen einer zehnminütigen Ischämie gefolgt von einer zehnminütigen Reperfusion, eine signifikante Infarktgröße-Reduktion erwirkt werden konnte [241]. Diesbezüglich war auch ein Präkonditionierungsprotokoll von zwei Zyklen einer zehnminütigen Ischämie mit jeweils folgender 30 minütiger Reperfusion wirksam [235,242,243].

Die Dauer des protektiven Effektes ist abhängig von der Tierspezies. Beim Schwein hält der protektive Effekt eine Stunde an [243], bei anderen Spezies wie Hund und Kaninchen war der Schutzmechanismus schon nach kürzerer Zeit nur noch partiell [244] oder gar nicht mehr nachweisbar [183,245]. Bei Hund und Kaninchen gibt es nach 24 Stunden eine zweite jedoch schwächere Phase der Protektion, welche als „second window“ bezeichnet wird [246,247]. Beim Schwein ist diese zweite Schutzphase

nicht nachweisbar, man konnte jedoch nach 24 Stunden durch ein erneutes Präkonditionierungsprotokoll den protektiven Effekt wieder auslösen [235].

Der schützende präkonditionierende Effekt kann nicht nur durch kurzzeitige Ischämiephasen, sondern auch durch Stimulation des Adenosin-A1-, des adrenergen α1-, des muskarinischen M2- und des Brandykinin-B2-Rezeptors und durch Öffnung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle) ausgelöst werden. Er wird durch G-Proteine und einer Aktivierung und Translokation der Proteinkinase C (PKC) vermittelt [248].

6.1. Mitochondriale ATP-abhängige Kaliumkanäle

Heute wird davon ausgegangen, daß die ATP-abhängigen Kaliumkanäle der mitochondrialen Membran wichtige Effektoren der ischämischen Präkonditionierung sind [249,250], im Gegensatz zu den oberflächlichen sarkolemmalen ATP-abhängigen Kaliumkanälen [251-253]. Bei präischämischer Applikation des selektiv sarkolemmalen K_{ATP}-Kanal-Inhibitors „HMR 1098“ wurde im Gegensatz zur mitochondrialen K_{ATP}-Kanal-Blockierung der kardioprotektive Effekt der ischämischen Präkonditionierung nicht beeinflußt [254].

ATP-abhängige Kaliumkanäle verbinden den metabolischen Status der Myozyten mit dem Membranpotential, sie werden bei physiologischem intrazellulären ATP-Gehalt inhibiert und öffnen sich, wenn der ATP-Spiegel fällt, wie es auch bei der myokardialen Ischämie nachgewiesen wurde [255].

Die myokardialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle wurden als Heterooctomer definiert. Dies wird gebildet aus einem Kir6.2-Untereinheiten-Tetramer, welches die Kanalpore umschließt und einer pro Kir6.2-Untereinheit, einem Sulfonylurea-Rezeptor vom Typ 2A (SUR2A) [256]. Die Sulfonylurea-Rezeptor-Untereinheit vermittelt die Sensibilität der Kaliumkanäle bezüglich pharmakologischer Substanzen.

6.2. Physiologische Rolle der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle am Herzen

Man nimmt an, daß eine wichtige Funktion der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle am Herzen in einer Aufrechterhaltung des mitochondrialen Matrixvolumens besteht. Wenn das arbeitende Herz in ein höheres Leistungsniveau übergeht, in welchem der ATP- und Sauerstoffverbrauch bis zu achtfach ansteigen kann, bewirkt die gesteigerte Aktivierung des mitochondrialen Elektronentransportsystems mit einem Austausch von intramitochondrialen Protonen gegen Kaliumionen, welche in

das Mitochondrieninnere transloziert werden, einen Abfall des elektrischen Potentials und eine Depolarisation der mitochondrialen Membran [257]. Dabei hängt der Grad der Depolarisierung direkt ab vom Anstieg der Kaliumionen-einschleusung. Diese Depolarisierung würde eine 50 prozentige Reduzierung des Kaliumioneneinstroms in das Mitochondrium bewirken, wenn sich nicht die mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle kompensatorisch öffnen würden [258]. So wird eine Verringerung des Matrixvolumens durch die Öffnung der K_{ATP}-Kanäle verhindert und eine Aufrechterhaltung der gesteigerten ATP-Synthese ist möglich. So wurde vermutet, daß ohne die kompensatorische Öffnung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle mit einer Kontraktion der Matrix und einer folglichen Ausweitung des inneren Membranraumes eine Interaktion der mitochondrialen Kreatinkinase und der ATP/ADP-Translokase an der inneren Membran mit dem an der äußeren Membran lokalisierten Porin nicht möglich ist, und damit eine Aufrechterhaltung der gesteigerten Phosphorylierung nicht gegeben wäre [257,259,260].

Andere Gruppen vermuten hingegen, daß die Öffnung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle zu einer massiven Depolarisierung und einer sekundären Reduktion der mitochondrialen Kalziumaufnahme führt [250,261,262].

6.3. Kardioprotektive Rolle der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle

Die mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle spielen eine entscheidende Rolle bei der kardioprotektiven Wirkung der ischämischen Präkonditionierung und bei dem durch pharmakologische K_{ATP}-Kanal-Öffner erzielten Herzschutz.

Diazoxid ist ein Öffner der K_{ATP}-Kanäle, welcher gegenüber den mitochondrialen K_{ATP}-Kanälen eine 2000fach höhere Affinität besitzt als gegenüber den sarkolemmalen [263,264]. Es wurde gezeigt, daß Diazoxid eine herzschützende Wirkung hat. Es bewirkte eine Verbesserung der funktionellen Erholung isolierter Rattenherzen nach Ischämie/Reperfusion [249] und eine Infarktgröße-Reduktion an Ratten- [265] und Kaninchenherzen [266]. Andererseits wurde mittels des pharmakologischen Blockes 5-Hydroxydecanoate (5-HD), einem selektiven mitochondrialen K_{ATP}-Kanal-Inhibitor, der kardioprotektive Effekt von Diazoxid [249,250,266] und der ischämischen Präkonditionierung [265,267,268] aufgehoben.

Glibenclamid ist ein Blocker der mitochondrialen und sarkolemmalen K_{ATP}-Kanäle und wurde in Studien am Schwein [242], Hund [269] und Kaninchen [270] zur Blockade der myokardialen K_{ATP}-Kanäle verwendet. Auch hier zeigte sich, daß sowohl die Kardioprotektion durch pharmakologische K_{ATP}-Kanal-Öffnung als auch durch eine

ischämische Präkonditionierung durch präischämische Glibenclamidverabreichung partiell oder vollständig aufgehoben wurde.

Auch am präkonditionierten menschlichen Herz wurde die durch die Aktivität der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle erzielte Kardioprotektion bestätigt [271].

Der Zeitpunkt der pharmakologischen Applikation der K_{ATP}-Kanal-Inhibitoren zeigte sich als entscheidend für ihren Effekt. So mußten die Substanzen jeweils schon vor oder zu Beginn des Präkonditionierungsprotokolls appliziert werden, um die Schutzwirkung aufzuheben [270]. Es wird angenommen, daß eine Öffnung der K_{ATP}-Kanäle sowohl während der Präkonditionierung als auch während der länger dauernden Indexischämie für die kardioprotektive Wirkung notwendig ist [248].

III. MATERIAL UND METHODEN

Es handelt sich um ein Modell des Vorderwandinfarkts, welcher am Schwein *in vivo* durch den Verschluss des Ramus interventricularis paraconalis der linken absteigenden Koronararterie ausgelöst wurde.

Die Studie des hier beschriebenen experimentellen Tierversuchs, das Tierversuchsmodell sowie die Versuchsdurchführung erfolgte nach Prüfung und Genehmigung des bioethnischen Komitees des Veterinärdezernats des Regierungspräsidiums Darmstadt. Alle Tiere wurden unter tierschutzrechtlichen Gesichtspunkten des Tierschutzgesetzes in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. Mai 1998 (BGBI. Jahrgang 1998 Teil I, Nr. 30, S: 1106 fff.) ordnungsgemäß behandelt. Die Versuche erfolgten unter Aufsicht des Leiters des Tierversuchsvorhabens, Prof. Dr. med. Dr. hc W. Schaper und nach Absprache mit dem Tierschutzbeauftragten und Tierstalleiter Prof. Dr. med. vet. F. Pierau.

1. Substanzen zur intravenösen und intramyokardialen Applikation am Schwein

1.1. BIIB722CL

BIIB722CL ist ein spezifischer Inhibitor der NHE1 und wurde von der Firma „Boehringer Ingelheim“ zur Verfügung gestellt. BIIB722CL wurde in 6,7% Dimethyl-Sulfoxid (DMSO) gelöst und systemisch in zwei Dosierungen von 1,5 mg/kg Körpergewicht (KGW) oder 3 mg/kg KGW verabreicht. Als weitere Applikationsform wurde BIIB722CL lokal-intramyokardial am Herzen in einer 50μM Lösung infundiert.

1.2. BIIB513

BIIB513 (Benzamide, N-(aminoiminomethyl)-4-[4- (2-furanylcarbonyl)-1-piperazinyl]-3-(methylsulfonyl) methanesulfonate) (Abb. 3) ist ein weiterer spezifischer Inhibitor der NHE1 und wurde von der Firma „Boehringer Ingelheim“ zur Verfügung gestellt. BIIB513 wurde zur systemischen Infusion in einer Dosierung von 1,5 mg/kg KGW in 6,7% DMSO verabreicht. Zudem wurde BIIB513 lokal-intramyokardial in einer 50μM Lösung am Herzen infundiert.

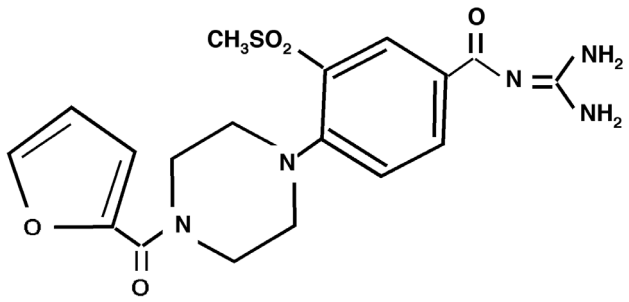


Abb.3 Strukturformel BIIB513

1.3. Glibenclamid

Glibenclamid (N-p-(2-[5-Chloro-2-methoxybenzamido]ethyl) benzenesulfonyl-N'-cyclohexylurea) (Abb. 4) ist ein Blocker der sarkolemmalen und mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle am Herzen. Es wurde in einer Dosierung von 0,5 mg/kg KGW, in 0,084% $NaHCO_3$ gelöst, systemisch verabreicht.

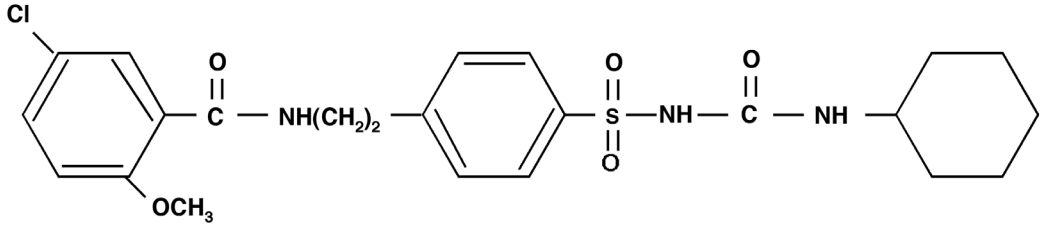


Abb.4 Strukturformel Glibenclamid

1.4. 5-Hydroxydecanoat

5-Hydroxydecanoat (Kaprinsäure oder Decansäure) (5-HD) (Abb. 5) ist ein spezifischer Blocker der mitochondrialen ATP-abhängigen Kaliumkanäle. 5-HD wurde gelöst in 0,24% NaCl in einer Dosierung von 3 mg/kg KGW systemisch verabreicht.

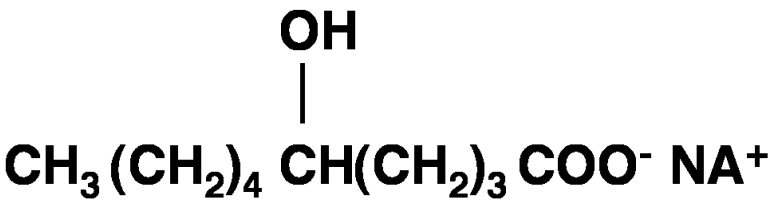


Abb.5 Strukturformel 5-Hydroxydecanoat

2. Tiermodell der myokardialen Ischämie

2.1. Versuchstiere

Es wurden männlich-kastrierte Läuferschweine der deutschen Landrasse mit einem Körpergewicht zwischen 29-45 kg verwendet. Die Tiere, welche von einem Aufzuchtbetrieb aus Hungen-Obbornhofen stammen, wurden nach einer zweiwöchigen Einstallungszeit im Institutshof in den Versuch genommen. Ergab die Kontrolle der Körpertemperatur vor Versuchsbeginn einen Wert über 39,5°C, so wurde das Tier vom Versuch ausgeschlossen.

2.2. Prämedikation und Narkose

Die für eine Injektionsnarkose verwendete α-Chloraloselösung wurde vor Versuchsbeginn vorbereitet. Dazu wurden 12 g α-Chloralose (1,2-O-(2,2,2-trichloroethylidene)- α-D-glucofuranose, Sigma, Taufkirchen) mit 8 g Borax (Sigma, Taufkirchen) in 200 ml 0,9% NaCl (Braun, Melsungen) bei 90°C gelöst. Die Lösung wurde anschließend auf 50°C gekühlt und mit einem 0,45 μm Mikrofilter (Millipore, Eschborn) filtriert.

Die Prämedikation erfolgte mit 20-25 mg/kg Ketaminhydrochlorid 10% (Medistar) i.m. 30 Minuten vor Versuchsbeginn. Die Vollnarkose wurde mittels intravenöser Gabe von bis zu 15 mg/kg Ketamin, von 2 mg/kg Piritramid (Dipidolor) und 25 mg/kg α-Chloralose nach vorherigem Legen eines Venenverweilkatheters (Vasodrop, 20 G, 1,0 x 0,75 mm, Braun) in die Ohrvene eingeleitet. Aufrechterhalten wurde die Narkose durch die intravenöse Dauerinfusion von 25 mg/kg/h α-Chloralose wobei nach Bedarf mit Piritramid und Ketamin nachdosiert wurde.

2.3. Operationstechnik

Nach einer Tracheotomie wurde das Tier mit einem Endotrachealtubus (Nr.8, Rüsch AG, Kernen) intubiert und mit einem pressluftgesteuertem Beatmungsgerät (Stephan Respirator ABV) mit 3 l/min Raumluft und 1 l/min Sauerstoff beatmet. Infundiert wurde in die große Ohrvene über den gesamten Versuchszeitraum mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl, B Braun, Melsungen).

Nach der Freipräparation der linken Arteria carotis communis und der rechten Vena jugularis interna (Abb. 6) wurde anschließend jeweils mit einem arteriellen

Sheath-Katheter (7F-8F) und einem zentralvenösen Katheter (Sheath-Katheter (7F)) kanüliert. Über einen mit 0,9% NaCl gefüllten PVC-Schlauch wurde die kanülierte linke Arteria carotis communis an einen Statham transducer angeschlossen und über ein Druckmeßgerät invasiv der Blutdruck gemessen. Es wurde fortlaufend der arterielle und der linksventrikuläre Blutdruck aufgezeichnet. Der Katheter in der Vena jugularis diente der systemischen Applikation zu testender Substanzen. Die gelösten Testsubstanzen wurden im Falle einer systemischen Gabe in eine Perfusorspritze gefüllt und mittels des Perfusionsgerätes (Fresenius, Bad Homburg) über den zentralvenösen Katheter in die rechte Vena jugularis interna infundiert.

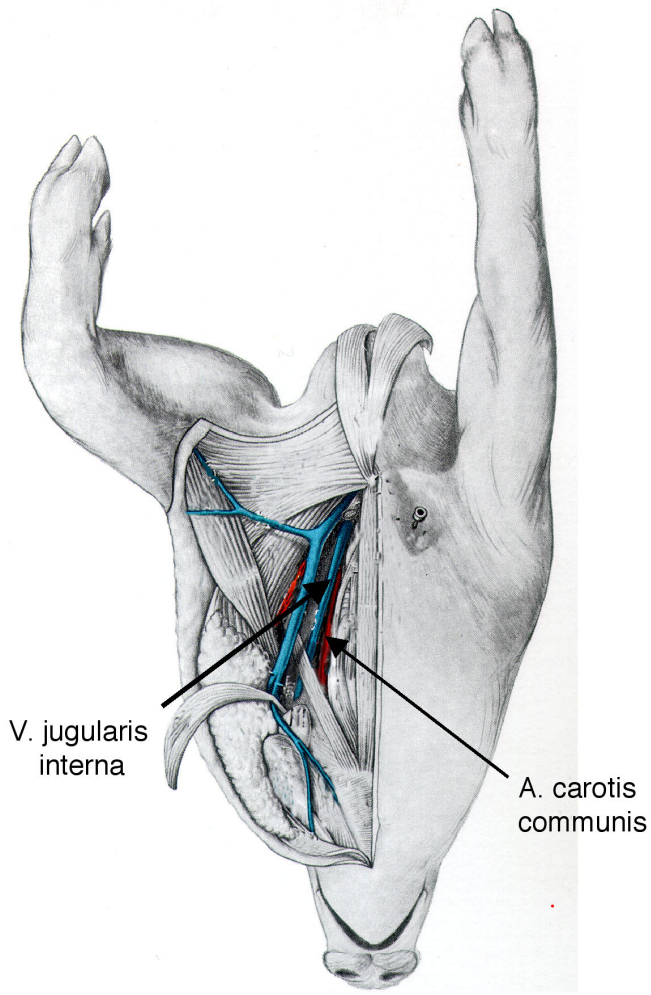


Abb.6 Ventralansicht der großen Halsgefäße zur Kanülierung. Darstellung der Arteria carotis communis und der Vena jugularis interna. Modifiziert nach Nickel-Schummerle-Seiferle; Anatomie der Haustiere (Nickel,1996 #227)

Zusätzlich wurden die Tiere an ein EKG mit drei Ableitungen nach Einthoven angeschlossen.

Nach der Durchtrennung von Haut und Unterhaut über dem Sternum und der Koagulierung kleiner blutender Gefäße mit einem Elektrokauter (Electrosurgical

Generator Force 2, Valley Lab, Hamburg) wurde das Zwerchfell mit einer stumpfen Schere in kranialer Richtung in Höhe des Xyphoidknorpels durchstoßen. Anschließend wurde für die Sternotomie die Pleura thoracalis mit dem Finger unterhalb des Sternums von der Brustwandinnenfläche gelöst. Mit einer Knochensäge (Medicon, Tuttlingen) wurde das Sternum angesägt und mittels einer Knochenschere (Medicon, Tuttlingen) längs gespalten. Auftretende Blutungen wurden mit dem Elektrokauter koaguliert.

Der Thorax wurde mit einem Thoraxspreizer (Medicon, Tuttlingen) offen gehalten und der Herzbeutel zunächst mit dem Finger freipräpariert. Das Perikard wurde durchtrennt und mit Permahandseide (Ethicon GmbH) derart an der Hautschnittstelle fixiert, daß eine „Herzwiege“ entstand. Dies diente der besseren Überschaubarkeit.

Der Ramus interventricularis paraconalis der linken absteigenden Koronararterie (LAD) wurde mit einer Perma–Handseide-Nadel-Fadenkombination (USP 2-0; 3 metric, Ethicon GmbH) in seinem proximalen Drittel umstochen. Auf die Fadenenden wurde ein Knöpfchen gefädelt, bei welchem die beiden Bohrkänäle in einer oberen gemeinsamen Öffnung münden. Auf die austretenden Fäden wurde ein etwa 4 cm langer Infusionsschlauch geschoben. Presste man den Infusionsschlauch mit dem Knöpfchen auf die linke absteigende Koronararterie und fixierte diesen mit einer Aortenklemme an den Fäden, so konnte das Gefäß reversibel verschlossen werden (Abb. 9).

2.4. Versuchsprotokoll und experimentelle Gruppen

Nach Abschluß der operativen und instrumentellen Vorbereitungen wurden die beatmeten und narkotisierten Versuchstiere über 20 Minuten zur Adaption an die Versuchsbedingungen keinen weiteren Maßnahmen ausgesetzt.

Danach wurde 5000IE Heparin intravenös verabreicht und eine arterielle Blutprobe entnommen.

Folgende Blutparameter wurden zur Beatmungskontrolle unter Berücksichtigung der rektal gemessenen Körperinnentemperatur untersucht:

pH	Normalwert (Schwein): 7,35-7,45
p CO_2	Normalwert (Schwein): 35,0-45,0 mmHg
p O_2	Normalwert (Schwein): 75,0-100,0 mmHg

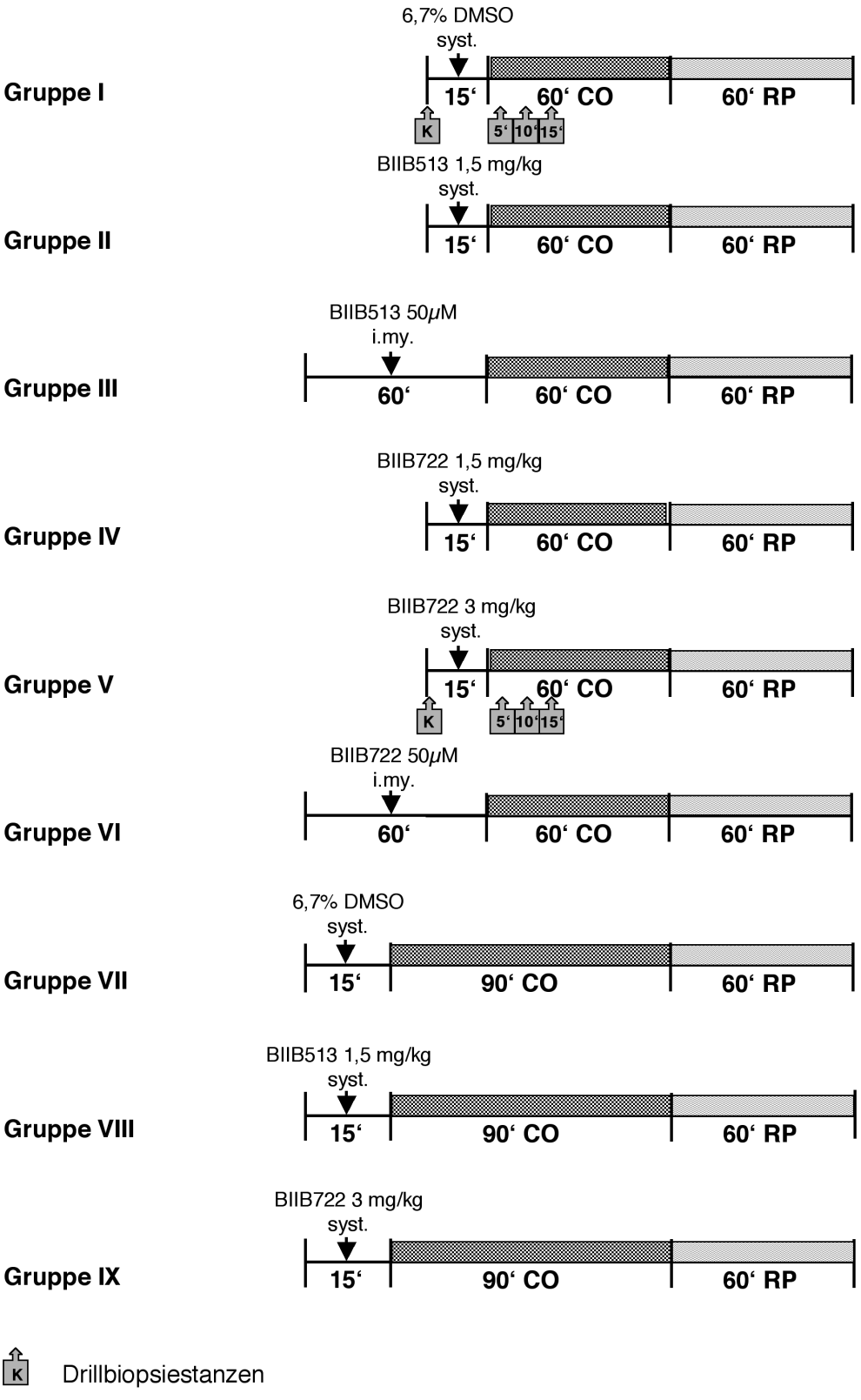


Abb.7 Protokoll der Gruppen I-IX. CO: Ischämie; RP: Reperfusion; sys.: systemische Substanzapplikation; i.my.: intramyokardiale Substanzapplikation.

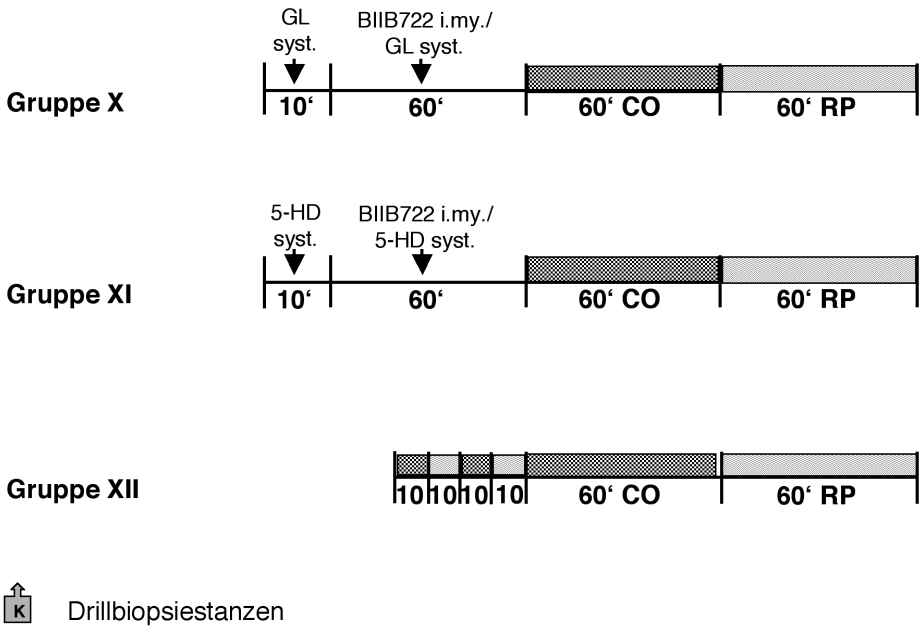


Abb.8 Protokoll der Gruppen X-XII. CO: Ischämie; RP: Reperfusion; sys.: systemische Substanzapplikation; i.my.: intramyokardiale Substanzapplikation.

Das Versuchsprotokoll wurde jeweils mit einer Vorlaufphase begonnen, in welcher die zu untersuchenden gelösten Substanzen entweder systemisch über den zentralvenösen Katheter in der Vena jugularis interna oder intramyokardial in das Herz über die Mikroinfusionsnadeln infundiert wurden. Direkt im Anschluß an die Vorlaufphase wurde durch Straffung der Okklusionszügel um den Ramus interventricularis paraconalis der LAD eine 60 oder 90 minütige Ischämiephase induziert. Ventrikelfibrillationen wurden mittels elektrischer Defibrillierung behandelt. Dabei wurde mir einer Stärke von 100 J begonnen und für die Durchführung weiterer Defibrillationen im Verlauf des Versuchs die Stärke bis hin zu 350 J gesteigert.

Eine Ischämische Präkonditionierung (Gruppe XII) wurde durch zwei Zyklen einer zehnminütigen Okklusion mit nachfolgender zehnminütigen Reperfusion erzielt.

Im Falle einer Entnahme von Drillbiopsien wurden diese als Kontrollbiopsie noch vor Beginn der Vorlaufphase einer Substanzverabreichung und zu den Zeitpunkten einer fünf-, zehn- und 15 minütigen Ischämie entnommen und der Versuch durch Euthanasie des Tieres beendet.

Im Falle einer Infarktgröße-Bestimmung wurden direkt im Anschluß an die Okklusionsphase der 60 oder 90 minütigen Ischämie die Okklusionszügel wieder geöffnet, um eine 60 minütige Reperfusion im ischämischen Gebiet zu erreichen und anschließend eine *in vivo* Färbung des Herzens durchgeführt.

Tab.1 Tierexperimentelle Gruppen I-XII: IP: Ischämische Präkonditionierung, CO: Ischämie, RP: Reperfusion, GL: Glibenclamid, 5-HD: 5-Hydroxydecanoat, system.: systemisch, i.my.: intramyokardial

	Pharmakon/ IP	**Anzahl Tiere**	**Dosis (mg/kg)**	**Applikations-Zeitpunkt**	**Index-ischämie**	**Applikation**
I	**DMSO/ Aq.dest.**	5	6,7% DMSO	über 15‘ vor CO	60‘ CO/ 60‘ RP	system.
II	**BIIB 513**	5	1,5 mg/kg	über 15‘ vor CO	60‘ CO/ 60‘ RP	system.
III	**BIIB 513**	3	50 μM	über 60‘ vor CO (20 μl/min)	60‘ CO/ 60‘ RP	i. my.
IV	**BIIB 722**	5	1,5 mg/kg	über 15‘ vor CO	60‘ CO/ 60‘ RP	system.
V	**BIIB 722**	5	3 mg/kg	über 15‘ vor CO	60‘ CO/ 60‘ RP	system.
VI	**BIIB 722**	4	50 μM	über 60‘ vor CO (20 μl/min)	60‘ CO/ 60‘ RP	i. my.
VII	**DMSO/ Aq.dest**	3	6,7% DMSO	über 15‘ vor CO	90‘ CO/ 60‘ RP	system.
VIII	**BIIB 513**	3	1,5 mg/kg	über 15‘ vor CO	90‘ CO/ 60‘ RP	system.
IX	**BIIB 722**	4	3 mg/kg	über 15‘ vor CO	90‘ CO/ 60‘ RP	system.
X	**BIIB 722/ GL**	5	50 μM/ 0,5 mg/kg	über 60‘ vor CO (20 μl/min)/ 10‘ Bolus+60‘ simultan	60‘ CO/ 60‘ RP	i. my./ system.
XI	**BIIB 722/ 5-HD**	3	50 μM/ 3 mg/kg	über 60‘ vor CO (20 μl/min)/ 10‘ Bolus+60‘ simultan	60‘ CO/ 60‘ RP	i. my./ system.
XII	**IP**	3	-	2 Zyklen 10‘ CO/ 10‘ RP	60‘ CO/ 60‘ RP	-

Gruppe I diente als Kontrollgruppe, sowohl für die Bestimmung der Infarktgröße nach 60 minütiger Ischämie, als auch zur Gewinnung von Kontrollgewebe für Western-Blot-Analysen. Das Lösungsmittel 6,7% DMSO der zu testenden Substanzen wurde systemisch über 15 Minuten infundiert. Hieran schloß sich eine 60 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusionsphase an.

In **Gruppe II** wurde die in 6,7% DMSO gelöste Substanz BIIB513 in einer Dosis von 1,5 mg/kg über 15 Minuten systemisch über den zentralvenösen Katheter verabreicht, es schloß sich eine 60 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusion an.

In **Gruppe III** wurde BIIB513 50 µM in einer Vorlaufphase mit Mikroinfusionsnadeln über 60 Minuten in das Myokard infundiert. Hieran schloß sich eine 60 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusionsphase an.

In den **Gruppen IV** und **V** wurde BIIB722 in 6,7% DMSO in einer Dosis von 1,5 mg/kg bzw. 3 mg/kg systemisch über 15 Minuten verabreicht. Hieran schloß sich eine 60 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusionsphase an. Bei **Gruppe V** wurden bei drei Tieren vor Protokollbeginn und zu den Zeitpunkten einer fünf-, zehn- und 15 minütigen Ischämie Drillbiopsien entnommen.

Bei **Gruppe VI** wurde BIIB722 50 µM mit Mikroinfusionsnadeln über 60 Minuten in das Myokard infundiert. Hieran schloß sich eine 60 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusionsphase an.

Gruppe VII diente als Kontrollgruppe für eine 90 minütige Ischämie. 6,7% DMSO wurde systemisch über 15 Minuten infundiert. Hieran schloß sich eine 90 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusionsphase an.

In **Gruppe VIII** wurden die Tiere über 15 Minuten mit BIIB513 in 6,7% DMSO in einer Dosierung von 1,5 mg/kg systemisch infundiert. Eine 90 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusion folgte.

In **Gruppe IX** wurde BIIB722 in 6,7% DMSO, in einer Dosis von 3 mg/kg über 15 Minuten systemisch über den zentralvenösen Katheter verabreicht, es schloß sich eine 90 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusion an.

In den **Gruppen X** und **XI** wurde jeweils Glibenclamid in einer Konzentration von 0,5 mg/kg in 0,084% $NaHCO_3$ oder 0,24% 5-Hydroxydecanoat in einer Dosis von 3 mg/kg systemisch verabreicht. Sie wurden zunächst als Bolusgabe über 10 Minuten verabreicht und anschließend simultan zu einer 60 minütigen intramyokardialen Gabe von BIIB722 50 µM infundiert. Hieran schloß sich eine 60 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusionsphase an.

Die Tiere aus **Gruppe XII** wurden ischämisch präkonditioniert. Hierfür wurden sie zweimalig einem Zyklus von zehnminütiger Okklusion und zehnminütiger Reperfusion unterzogen mit einer anschließenden Indexischämie von 60 Minuten mit folgender 60 Minütiger Reperfusion.

2.5. Myokardbiopsien

Für Western-Blot-Untersuchungen wurden zu bestimmten Zeitpunkten des Versuchsprotokolls Drillbiopsien entnommen. Ein rotierender zylinderförmiger Stanzenkopf wurde jeweils derart auf das Myokard gehalten, daß ein zylinderförmiges, etwa 6 mm langes und 80 mg schweres Gewebestück entnommen werden konnte. An den Drillbiopsiebohrer waren eine Vakuumpumpe und ein Druckluftzugang angeschlossen. Durch das Vakuum von 15 mmHg wurde die aus dem Myokard herausgedrehte Biopsie in den Zylinder gesaugt und mittels Pressluft (2 bar/cm^2) anschließend herausgedrückt. Die Biopsien wurden direkt in flüssigen Stickstoff getaucht und bei -80°C gelagert. Die Biopsien (Gruppe V) bzw. Kontrollbiopsien (Gruppe I) wurden aus dem ischämischen Risikogebiet distal der Okklusionsstelle des Ramus interventricularis paraconalis der linken absteigenden Koronararterie entnommen (Abb. 9).

2.6. Intramyokardiale Pharmakonapplikation

Um die lokale Wirkung der zu testenden Substanzen zu überprüfen, wurden diese in gelöster Form über Mikroinfusionsnadeln in das Myokard infundiert.

Dafür wurden vor Versuchsbeginn acht feine Nadeln (26 gauge), welche über Schläuche (non-sterile Polythene Tubing, 0,4 mm ID) mit einer Mikroinfusionspumpe (Minipuls 2, Gilson/Abimed, Düsseldorf) verbunden waren, etwa 4 mm tief in das Myokard des zu erwartenden Ischämiegebietes gesteckt. Die Nadeln wurden dabei paarweise in einem Abstand von 1 cm senkrecht zum Verlauf des Ramus interventricularis paraconalis der LAD angeordnet (Abb. 9).

Das basale Nadelpaar wurde als Kontrolle zur Applikation der Lösungsmittel (0,1% DMSO in physiologischer Kochsalzlösung) genutzt, während simultan die Testsubstanzen über die drei weiteren Nadelpaare infundiert wurden. Es wurde vor Versuchsbeginn mit einer Geschwindigkeit von 20 µl/min über 60 Minuten infundiert.

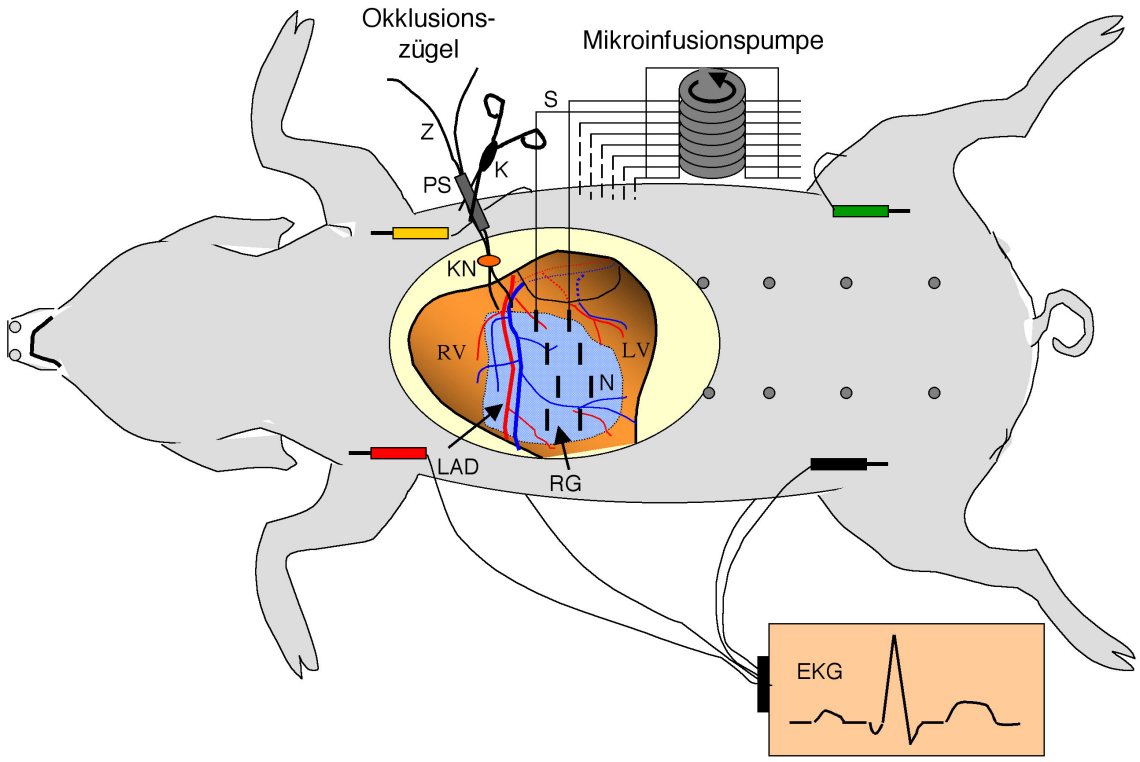


Abb.9 Schema der Ventralansicht eines Schweines nach midsternaler Thorakotomie. ***RV****: rechter Ventrikel,* ***LV****: linker Ventrikel,* ***RG****: Risiko-Gebiet. Darstellung der Okklusionsvorrichtung des Ramus interventricularis paraconalis der LAD (****Z:*** *Okklusionszügel,* ***K****: Klemme,* ***PS****: Plastikschlauch,* ***KN****: Knöpfchen) Darstellung der Mikroinfusionsapparatur:* ***N****: Mikroinfusionsnadel,* ***S****: Mikroinfusionsschläuche. Schema der EKG-Ableitungen.*

2.7. Myokardfärbung *in vivo*

War die Bestimmung der Infarktgröße Ziel des Versuchs, so wurde in der Reperfusionsphase 15 Minuten vor Ende des Protokolls 1 g Fluoreszin (Sigma, Taufkirchen) in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung (Braun, Melsungen) gelöst und in den rechten Ventrikel injiziert. Die Fluoreszinfärbung des Risikogebietes, welche nach Versuchsende unter UV-Licht kontrolliert werden konnte, diente als Reperfusionsmarker, das heißt als Beweis dafür, daß mit der Öffnung der Verschlußzügel eine erneute Durchblutung des ischämischen Risikogebietes stattfand.

Mit Ende des Versuchsprotokolls wurde die LAD erneut okkludiert und die Aorta mit einer Aortenklemme (Medicon, Tuttlingen) verschlossen. Anschließend wurden 0,5 g 2-15 μm große, orange-fluoreszierender Zink-Cadmium-Sulfid gekoppelte Mikrosphären (Duke-Scientific Corp., AC Leusden, Niederlande), welche in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst wurden, in die Apex des linken Ventrikels injiziert. So konnte später unter UV-Licht das Risikogebiet vom Nicht–Risikogebiet

unterschieden werden. Die Mikrosphären wurden mit dem Blut ausschließlich in die Nicht-ischämischen Gebiete des Herzens transportiert, so daß dieses umgrenzt werden konnte. Dabei wurde ihre Einschwemmung in das Risikogebiet mittels der Reokklusion des Ramus interventricularis paraconalis der LAD und ihre Ausschwemmung in den großen Kreislauf mittels der Aortenklemme verhindert.

Nach der Mikrosphäreninjektion wurden etwa 3-5 Herzkontraktionen abgewartet und nach Vertiefung der Narkose mit einer Gabe von 25 mg/kg α-Chloralose das Tier mit 1,5 ml/kg einer 20% Kaliumchloridlösung euthanasiert. Das Herz wurde vom Mesenterium abgetrennt, entnommen und in PBS (pH 7,4) gewaschen.

3. Bestimmung der Infarktgröße

3.1. PBS-Lösung

PBS 10 x (pH 7,0):

2 g	KCl
80 g	NaCl
11,5 g	Na_2HPO_4
2 g	KH_2PO_4

ad 1 l ddH_2O

3.2. Herzaufarbeitung

Am entnommenen und gewaschenen Herzen wurden der rechte Ventrikel und die Atrien vollständig abpräpariert. Anschließend wurde der linke Ventrikel mit Gazetupfer ausgestopft und bei -80 Grad für 20 Minuten gelagert. Dann wurde der erhärtete linke Ventrikel von apikal nach basal in sechs etwa 1 cm dicke Scheiben geschnitten. Die Scheiben wurden gewogen und zwischen zwei Plexiglasscheiben fixiert, unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 366 nm von beiden Seiten fotografiert (Abb. 11).

Anschließend wurden die Scheiben für 15 min bei 37°C in 2,3,5-TTC (2,3,5-Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid, Sigma, Taufkirchen) (TTC) (gelöst in PBS pH 7) gefärbt und beidseitig doppeltbelichtet mit UV-Licht (366 nm) und Weißlicht fotografiert (UV-Lichtanlage, Cabuvis, Desaga-Sarstedt, Nümbrecht) (Abb. 11).

Das Tetrazoliumsalz färbt ausschließlich normales Myokardium rot, während infarziertes ungefärbt-weiß bleibt [272]. So konnten infarzierte Myokardgebiete von

ungeschädigten Gebieten unterschieden werden. Im normalen Myokardium wird TTC durch die Reaktion mit oxidiertem NADH zum purpurrotem Formazan reduziert. Entsprechend findet im irreversibel infarziertem Myokardium, in welchem die Coenzyme nicht mehr in ausreichender Menge vorhanden sind, keine Farbstoffreaktion statt [272]. Für eine präzise Abgrenzung des infarzierten Gewebes mußte während der Reperfusion das Rest-NADP aus dem infarziertem Gebiet ausgewaschen worden sein, um bei der anschließenden TTC-Färbung falsch positive Ergebnisse zu vermeiden [273]. Als Marker für eine vollständige Reperfusion diente die Fluoreszinfärbung, die jeweils am Versuchsende durchgeführt wurde. Mit UV-Licht wurde jedes Herz auf eine vollständige Reperfusion hin überprüft, indem kontrolliert wurde, ob das gesamte Risikogebiet mit dem fluoreszierenden Farbstoff angefärbt war.

3.3. Planimetrierung

Von jeder Scheibe distal der Okklusionsstelle wurden jeweils die Bildnegative der basalen und apikalen Ansicht eingescannt (35 mm Film Scanner, LS-1000, Nikon). Bei der Apexscheibe wurde dabei nur die Basalansicht, bei der direkt an der Okklusionstelle grenzenden Scheibe nur die Apikalansicht berücksichtigt.

Mittels der Planimetrierung im Computer mit einem NHI-Image-Programm wurde für eine Scheibenansichtsseite jeweils die gesamte Anschnittsfläche des linken Ventrikels abzüglich des Ventrikellumens, die Flächengröße des Risikogebietes und des infarzierten Gebietes ermittelt (Abb. 10). Für jede der vorher gewogenen Scheiben wurde mittels beider Ansichtsseiten das gewichtskorrigierte Risikogebiet und das gewichtskorrigierte Infarktgebiet berechnet. Das Infarktgebiet des gesamten Herzens wurde als Quotient der Summe des gewichtskorrigierten Risikogebietes aller Scheiben relativ zur Summe des gewichtskorrigierten Infarktgebietes aller Scheiben ermittelt (Abb. 10).

$$IGr\ [\%] = \frac{wtIG}{wtRG} = \frac{\sum_{i=1}^{k} wt_i \cdot \frac{IG_{Ai} + IG_{Bi}}{LV_{Ai} + LV_{Bi}}}{\sum_{i=1}^{k} wt_i \cdot \frac{RG_{Ai} + RG_{Bi}}{LV_{Ai} + LV_{Bi}}} \cdot 100$$

Abb.10 ***Infarktgröße-Berechnung****.* ***IGr:*** *Infarktgröße (%),* ***IG:*** *Infarktgebiet (cm^2),* ***RG:*** *Risikogebiet (cm^2),* ***LV:*** *Linker Ventrikel (cm^2),* ***wt****: Herzscheibengewicht (g),* ***wtIG****: gewichtskorrigiertes Infarktgebiet,* ***wtRG:*** *gewichtskorrigiertes Risikogebiet,* ***k:*** *Anzahl der Herzscheiben,* ***A:*** *apikale Herzscheibenseite,* ***B:*** *basale Herzscheibenseite.*

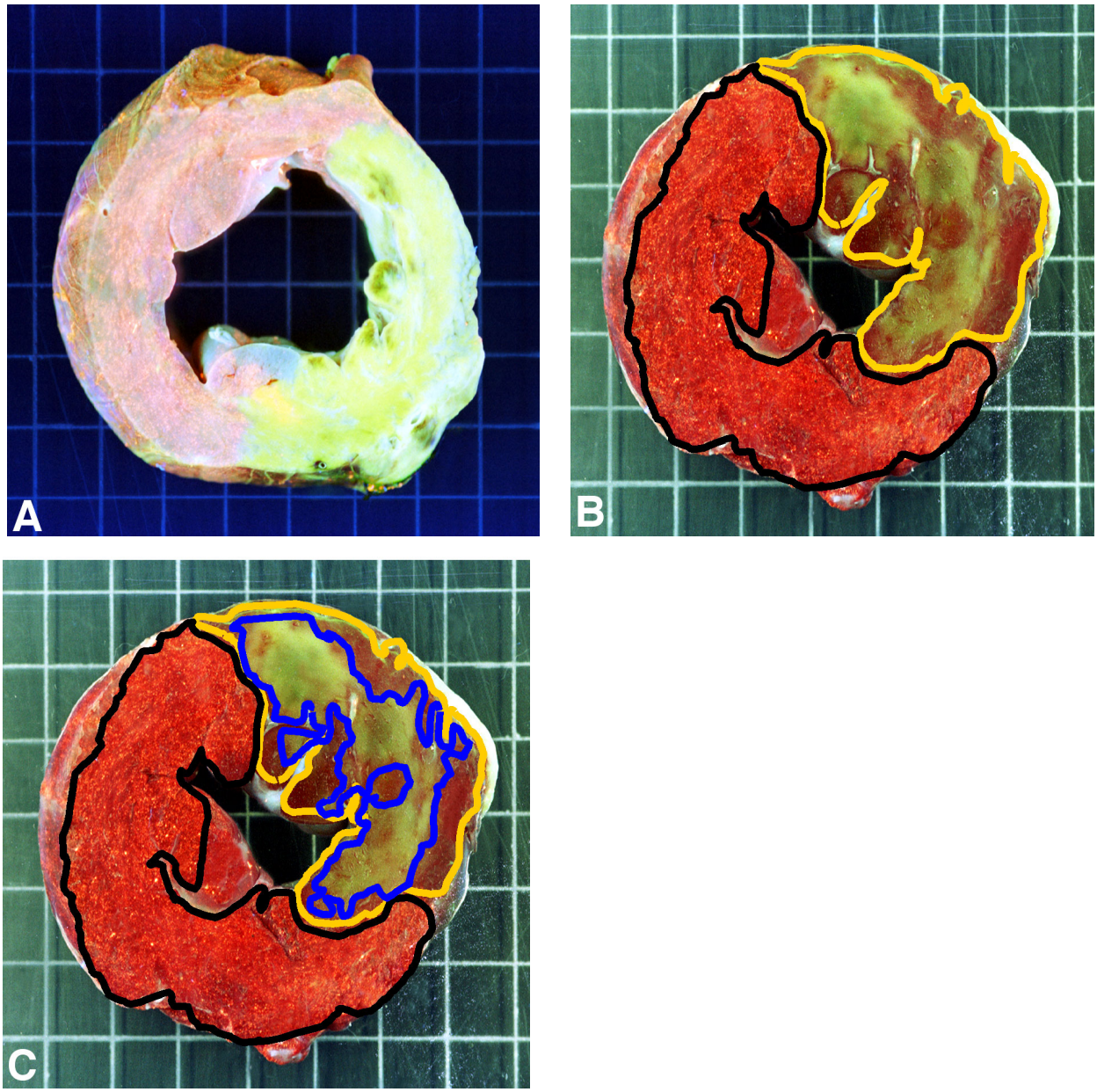


Abb.11 ***Herzscheiben des linken Ventrikels.***

(A): *Herzscheibe fotografiert mit UV-Licht (366 nm; bei Blende 2,8; 1 sec Belichtungszeit). Das Herzgewebe wurde in vivo mit Fluoreszin und Mikrosphären gefärbt.*

*(**B):** Herzscheibe fotografiert mit Doppelbelichtung: UV-Licht (366 nm; Blende 2,8; 1 sec Belichtungszeit) und Weißlicht (Blende 8; 1/15 sec Belichtungszeit). Das Herzgewebe wurde in vivo mit Fluoreszin und Mikrosphären gefärbt und anschließend im TTC-Bad inkubiert. Schwarz umrandetes Gebiet: Nicht-Risiko-Gebiet; gelb umrandetes Gebiet: Risikogebiet.*

(C): *Basalansicht einer Herzscheibe fotografiert mit Doppelbelichtung: UV-Licht (366 nm; Blende 2,8; 1 sec Belichtungszeit) und Weißlicht (Blende 8; 1/15 sec Belichtungszeit). Färbung in vivo mit Fluoreszin/Mikrosphären und anschließend im TTC-Bad inkubiert. Schwarz umrandete Fläche: Nicht-Risiko-Gebiet; gelb umrandete Fläche: Risikogebiet; blau umrandete Fläche: infarziertes Gebiet.*

4. Immunologische Nachweisverfahren

4.1. Probenaufarbeitung

4.1.1. Homogenisierungspuffer zur Biopsieaufarbeitung

Tris-HCl	20 mM
Glucose	250 mM
DTT	1 mM
EGTA	1 mM
EDTA	1 mM
PMSF (in 500 µl Ethanol)	0,5 mM
Natriumorthovanadat	0,1 mM
NaF	10 mM

ad 100 ml ddH_2O, pH 7,4

Alle für den Biopsie-Homogenisierungspuffer verwendeten Chemikalien wurden bei Sigma, Taufkirchen bezogen. Die *in vivo* entnommenen Biopsien wurden bei -80 °C gelagert. Zur Homogenisierung wurden die Gewebestücke mit Hilfe eines Homogenisatorstabes und unter Zugabe von 500 µl eisgekühltem Homogenisierungspuffer in Eppendorfröhrchen zerkleinert, bis eine homogene Lösung entstand. Anschließend wurden die Homogenate bei 3000 g 30 Minuten zentrifugiert, so daß sich der zytosolische Überstand vom Niederschlag (nukleäre und partikuläre Fraktion) absetzen konnte. Anschließend wurde der zytosolische Überstand abpippetiert. Während des gesamten Zeitraumes der Probenaufarbeitung wurde streng darauf geachtet, daß die Homogenate sich nicht auf eine Temperatur über 4°C erwärmten. Dafür wurden die Proben zwischen den Arbeitsschritten jeweils wieder auf Eis gestellt.

4.2. Proteinbestimmung

Es wurde eine Proteinkonzentrationsbestimmung anhand der photometrischen Bestimmung des “Bio-Rad DC Protein Assay“ nach Lowry durchgeführt. Diese Untersuchung basiert auf einer Reaktion des Proteins mit einer alkalischen Kupfertartatlösung und Folinreagenz. Wie bei der Bestimmung nach Lowry sind zwei Reaktionsschritte für die Farbentwicklung nötig: die Reaktion von Protein und Kupfer im alkalischen Medium und dann die Reduktion des Folinreagenz durch das kupferbehandelte Protein. Die Farbentwicklung basiert auf den Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan. Die Proteine erwirken eine Reduktion des Folinreagenz

durch die Abgabe von einem, zwei oder drei Sauerstoffatomen, wodurch ein oder mehrere mögliche reduzierte Formen produziert werden, welche die charakteristische blaue Farbe mit der Maximalabsorbtion von 750 nm und der Minimalabsorbanz von 405 nm besitzen.

Es wurde ein BSA-Proteinstandard (Sigma, Taufkirchen) mit Proteinkonzentrationen von 25 bis 800 µg/ml angesetzt. Ein Teil des zytosolischen Überstandes wurde zunächst 1:10 mit Aq. bidest. verdünnt. Dann wurde jeweils 5 µl der Strandardreihe oder des verdünnten Probenzytosols in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Dazu wurden jeweils 25 µl der Lösung A (1 ml A + 20 µl S=A) und 200 µl der Lösung B hinzupipettiert. Nachdem die Mikrotiterplatte geschwenkt worden war, wurde 15 Minuten inkubiert und dann bei 570 nm die Extinktion (Biomek) gemessen. Die Proteinkonzentration der Proben wurde anhand der Regressionsgerade der gemessenen Standardwerte ermittelt.

4.3. Gelelektrophorese

Tab.2 Elektrophorese-Puffer und Gele. Alle verwendeten Substanzen wurden von Sigma, Taufkirchen bezogen.

Elektrophorese-Laufpuffer (pH 8,3)	80 mM Glycin 10 mM Tris 0,04% SDS	
Trenngel 10%	10% SDS 1 M Tris-HCL (pH 8,8) Aq. dest. 1,5% Ammoniumpersulfat TEMED 40% Acrylamid	0,10 ml 3,75 ml 3,46 ml 0,13 ml 0,013 ml 2,5 ml
Sammelgel 5%	10% SDS 1 M Tris-HCL (pH 6,8) Aq. dest. 1,5% Ammoniumpersulfat TEMED 40% Acrylamid	0,05 ml 0,625 ml 3,7 ml 0,19 ml 0,007 ml 0,625 ml

Die Zytosolhomogenate der Biopsien wurde zunächst im Verhältnis 2:1 mit Lämmlipuffer (Biorad, Frankfurt), der bereits ß-Mercaptoethanol enthielt, versetzt und dann 5 Minuten bei 95°C denaturiert. Das im Puffer enthaltene SDS bindet an

die hydrophoben Regionen der Proteine, wodurch diese in ihre Untereinheiten dissoziert werden. Durch die Bindung wird eine stark negative Ladung in die denaturierten Polypetidketten eingeführt, welche alle vorhandenen Ladungen verdeckt. Die durch Disulfidbrücken zusammengehaltenen Untereinheiten können durch Erhitzen mit SDS und ß-Mercaptoethanol, das die Disulfidbrücken zu Sulfhydryl-Gruppen reduziert, dissoziiert werden. Eine Blockierung mit entsprechenden alkalysierenden Reagenzien verhindert die Wiedervereinigung. So war die Beweglichkeit der linearisierten Proteine während der Elektrophorese abhängig von ihrer Molekülgröße.

Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli wurden 10%-Tris-Glycine-Fertiggele mit 10 Proben-Kammern und eine Elektrophorese-Zelle (Invitrogen, Groningen) verwendet. Alternativ wurden auch Gele in Gelkammern (Biorad) gegossen. Dabei wurde zunächst das untere Trenngel (Tab.2) gemischt und in die Gelkammer eingefüllt und nach dessen Erhärtung das Sammelgel (Tab.2) obenauf gegossen. Alle für den Aufbau der Elektrophoreseapparatur benötigten Teile wurden vorher gründlich gereinigt. Der Gel-Kamm wurde gezogen und die entstandenen Kammern (bis 37 µl Füllvolumen) mehrmals mit dem Laufpuffer gespült. Die Gele wurden in der Elektrophorese-Zelle plaziert und der innere Raum zwischen den Gelen mit Laufpuffer aufgefüllt. Anschließend wurde jeweils das berechnete Volumen der zytosolischen Proben, in welchem 100 µg Gesamtprotein enthalten war, in die Kammern pipettiert. Zusätzlich wurden 5 µl eines Proteinmarkers (GibCo Lifetechnologies, Eggenstein) zur Markierung der Molekulargewichte zwischen 10 und 220 kDa in die 10. Kammer eingefüllt. Anschließend wurde der äußere Raum der Elektrophorese-Zelle mit Laufpuffer gefüllt und die Gelelektrophorese bei 125-150 V für 90 Minuten durchgeführt.

4.4. Western-Blot-Analyse

Tab.3 Transferpuffer

Transferpuffer	20 mM Tris	(Sigma, Taufkirchen)
	150 mM Glycin	(Sigma, Taufkirchen)
	20% Methanol	(Roth, Karlsruhe)

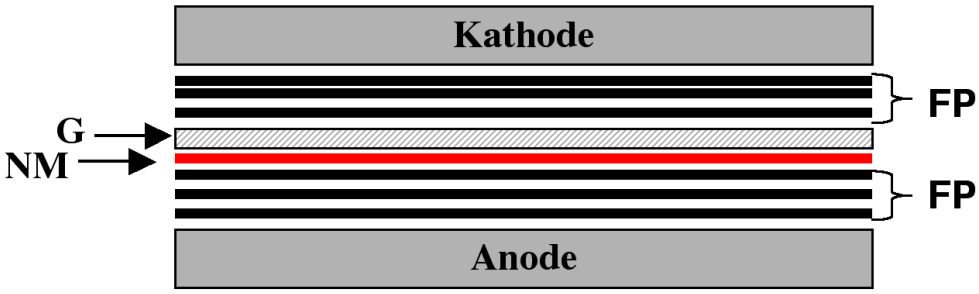


Abb.12 ***Schema der Semi-trockenen Transferapparatur. FP:*** *Filterpapier,* ***G:*** *Gel,* ***NM:*** *Nitrozellulosemembran.*

Die in der Elektrophorese aufgetrennten Proteine wurden nach dem Verfahren nach Towbin elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, Freiburg) übertragen. Hierfür wurden die Filterpapiere (Schleicher, Dassel), die Nitrozellulosemembran und die aus den Kammern entnommenen Gele für 10 Minuten in Transferpuffer inkubiert und dann zwischen zwei horizontal gelegenen Plattenelektroden übereinandergeschichtet (Abb. 12) und zur Entfernung von Luftblasen mit einem Glasstäbchen überrollt. Der Transfer wurde anschließend über zwei Stunden bei einer Spannung von 9 V durchgeführt.

4.4.1. Ponceaufärbung

Tab.4 TBS-Puffer

TBS-Puffer 10x, (pH 7,4)	0,5 M 1,0 M NaCl	(Sigma, Taufkirchen) (Roth, Karlsruhe)

Für eine Überprüfung der Proteinbanden wurde die Nitrozellulosemembran für eine Minute in Ponceau S-Lösung (Sigma, Taufkirchen) inkubiert und anschließend mehrfach in A. dest. gewaschen, bis sich nur noch die rot gefärbten Banden von einem weißen Hintergrund hervorhoben. Anschließend wurde die Membran mit TBS-Puffer über 5 Minuten gewaschen, bis sie wieder entfärbt war.

4.4.2. Blockierung und Immunodetektion

Tab.5 TBS-Puffer

TBS 10x (pH 7,4)	0,5 M Tris 1M NaCl

Die Nitrozellulosemembran wurde über Nacht bei 4°C in einer 5% Magermilchlösung (Amersham, Freiburg) (Magermilchpulver gelöst in TBS)

geblockt. Dabei wurden hydrophobe Bindungsstellen der Membran blockiert und falsch positive Hintergrundsignale verhindert. Die Membran wurde über 20 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde sie mit dem ersten Antikörper „Phospho-p38-Map Kinase (Thr180/Tyr182)“ (New England Biolabs,) in einer Verdünnung von 1:500 oder „p38-MAPK“ (Santa Cruz, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:3000 in Magermilchlösung bei 4°C über Nacht inkubiert.

Daraufhin wurde die Membran über 40 Minuten in TBS-Puffer gewaschen und der „horse-radish“ Peroxidase gekoppelte Sekundärantikörper „Anti-rabbit-IgG“ (New England Biolabs oder Santa Cruz, Heidelberg) in einer Verdünnung von 1:5000 in 2% Magermilchlösung bei Raumtemperatur über 1 1/2 Stunden eingesetzt. Im Anschluß daran wurde die Membran über 60 Minuten mit TBS-Puffer gewaschen.

Für die „enhanced chemiluminescence“ (ECL)-Detektion wurde ein ECL-Western-Blot-Detektion-Kit (Amersham, Freiburg) verwendet und diese nach Vorschrift durchgeführt. Die ECL-Detektion, bei der blaues Licht durch eine „horse radish peroxidase“ (HRP)-katalysierte Oxidation von Luminol entsteht, wurde auf blaulicht-sensitiven Film (Hyperfilm ECL, Amersham, Freiburg) in Form von Banden dargestellt.

4.5. Quantitative Analyse

Für eine qualitative und quantitative Auswertung wurden die Filme mit einer Medicine 260-Entwicklungsapparatur belichtet. Die Auswertung wurde mit einem „Phosphoimager Storm 860“ (Molecular Dynamics; Krefeld) durchgeführt, indem die betreffenden Ausschnitte des belichteten Filmes eingescannt und im Computer mit dem Pogramm IQ Mac (Version 1,2) bearbeitet wurden. Die eingescannten Banden wurden im Adobe Photoshop beschriftet und zur Dokumentation auf der Festplatte gespeichert.

5. Auswertung und Statistik

Alle Daten wurden mit Hilfe des Programmes Excel (Microsoft Corporation) ausgewertet und graphisch dargestellt. Die Ergebnisse wurden als Mittelwerte mit dazugehörigen Standardfehlern dargestellt. Mit einem SigmaStat Pogramm wurde die vergleichende Statistik durchgeführt. Mittels des t-Testes wurden zwei Gruppen verglichen, auch wurde bei gegebenen Voraussetzungen die einfaktorielle Varianz-analyse für abhängigen Stichproben (RM ANOVA) mit anschließenden multiplen Vergleichen nach Tukey benutzt. Ein Ergebnis galt als signifikant, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ betrug.

IV. ERGEBNISSE

1. Etablierung des Tiermodells

Durch das in dieser Studie verwendete Tiermodell war es möglich, durch die reversible Okklusion des Ramus interventricularis paraconalis der linken absteigenden Koronararterie eine regional und zeitlich begrenzte Ischämie bzw. Reperfusion des linken Ventrikels zu induzieren. Die anti-nekrotischen Schutzmechanismen des Herzens bzw. Interaktionen der vermuteten Effektoren wurden anhand der Bestimmung der Infarktgröße untersucht. Hierzu wurden pharmakologische Blocker der myokardialen Na^+/H^+-Antiporter und der K_{ATP}-Kanäle verwendet. Ein kombinierter Einsatz dieser Substanzen erfolgte zur Untersuchung möglicher Wechselwirkungen dieser Effektoren bzw. zur Untersuchung der möglichen Existenz eines gemeinsamen Signaltransduktionsweges. Zusätzlich wurde die Rolle der p38-MAPK bei der NHE1-Aktivierung eruiert.

Die pharmakologischen Inhibitoren wurden systemisch und auch intramyokardial verabreicht. Kontrolltiere (Gruppe I) für eine systemische Pharmakongabe erhielten das Lösungsmittel 6,7% DMSO über 15 Minuten vor der Ischämie in die rechte Jugularvene. Tiere der Gruppe I durchliefen anschließend eine 60 minütige Ischämie gefolgt von einer 60 minütigen Reperfusion. Die mittlere Infarktgröße betrug hier 61,1 ± 2,6% (SEM) (Abb. 13/14A). Die Kontrolltiere der Gruppe VII wurden einer 90 minütigen Ischämie, gefolgt von einer 60 minütigen Reperfusion unterzogen, was in einer mittleren Infarktgröße von 70,3 ± 1,7% (SEM) resultierte (Abb. 17/18A). Als Kontrolle der lokal-intramyokardialen Substanzapplikation wurde simultan über das basale Nadelpaar das Lösungsmittel 0,1% DMSO in physiologischer Kochsalzlösung infundiert.

Die Infarktgröße eines Herzens wurde anhand der Planimetrierung aller Herzscheiben ermittelt, wobei jeweils deren apikale und basale Ansichtsseite berücksichtigt wurde. Die Berechnung der Infarktgröße ist ausführlich im Methodenteil beschrieben (Abb. 10).

1.1. EKG

Eine elektrokardiographische Kontrolle der Versuchstiere erfolgte während des gesamten Protokollverlaufs. Nach dem akuten Verschluß des „Ramus interventricularis paraconalis“ der linken absteigenden Koronararterie zeigten sich

bei allen Tieren die infarkttypischen Veränderungen wie die ST-Strecken-Anhebung. Fast regelmäßig kam es zu Beginn der Reperfusion zu ventrikulären Extrasystolen bzw. Kammertachykadie, welche mit 1-3 Defibrillationen im Bereich von 100-300 J behandelt wurden.

1.2. Hämodynamik

Die Okklusion des Ramus interventricularis paraconalis der linken absteigenden Koronararterie resultierte in einem vorübergehenden stärkeren Abfall des Blutdruckes und der Herzfrequenz. Diese Parameter stabilisierten sich im Verlauf der Ischämie bei etwa 60-80 mm/Hg bzw. 60-70 Schlägen/min und nahmen im Verlauf der Reperfusion geringgradig ab. Es waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrolltieren und den pharmakologisch behandelten Tieren vorhanden.

2. Infarktgröße bei pharmakologischer NHE1-Inhibierung.

Die im folgenden gezeigten Abbildungen stellen nur eine kleine Auswahl des planimetrisch ausgewerteten Materials dar, geben aber einen repräsentativen Querschnitt der Tiere einer Gruppe wieder.

2.1. Auswirkung der NHE1-Inhibierung auf die Infarktgröße bei 60 minütiger Ischämie.

2.1.1. Systemische Applikation des NHE1-Inhibitors BIIB513.

BIIB513, ein selektiver Inhibitor der myokardialen Na^+/H^+-Austauscher wurde den Tieren der Gruppe II verabreicht, um die Rolle der Na^+/H^+-Austauscher bei der Entstehung von transmuralen Infarkten zu untersuchen. Für eine Induzierung transmuraler Infarkte wurde eine Ischämie-/Reperfusionsdauer von jeweils 60 Minuten gewählt.

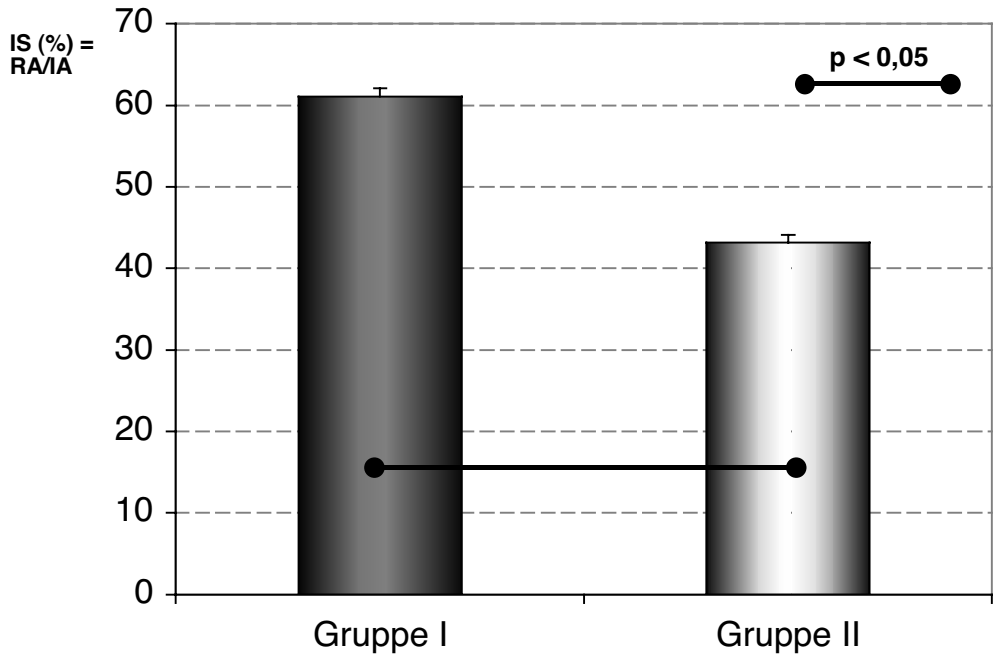


Abb.13 Infarktgröße nach systemischer BIIB513-Infusion (Gruppe II; n=5) bei jeweils 60 minütiger Ischämie und Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe I (n=5). Die Resultate sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. IS: Infarktgröße; RA: Risikogebiet; IA: Infarktgebiet.

Der Ramus interventricularis paraconalis der linken absteigenden Koronararterie wurde für 60 Minuten okkludiert, anschließend folgte eine 60 minütige Reperfusion. Bei den systemisch mit dem Lösungsmittel 6,7% DMSO/NaCl vorbehandelten Kontrolltieren resultierte dies in einer Infarktgröße von 61,1 ± 2,6% (Gruppe I; n = 5). Die Gruppe I war somit die Kontrollgruppe für alle Gruppen, welche systemisch mit einer Substanz behandelt wurden und eine 60 minütige Ischämie und Reperfusion durchliefen. Wurde der selektive NHE1-Inhibitor BIIB513 vor der Ischämie systemisch infundiert (1,5 mg/kg), so bewirkte dies eine signifikante Abnahme der Infarktgröße von 61,1 ± 2,6% der Kontrollgruppe auf 43,1 ± 3,6% (Gruppe II; n=5) ($p < 0,05$) (Abb. 13/14B).

2.1.2. Lokal-intramyokardiale Applikation des NHE1-Inhibitors BIIB513

Durch eine lokale Applikation des BIIB513-Inhibitors sollte untersucht werden, ob sich die Infarktgröße-Abnahme, die durch die systemische BIIB513-Verabreichung erzielt werden konnte, in einer lokalen anti-nekrotischen Wirkung bestätigen ließ (Gruppe III; n = 3). BIIB513 (50μM) wurde in einer intramyokardialen Infusion über drei apikale Nadelpaare in das zu erwartende Ischämiegebiet distal der Okklusionsstelle infundiert. Simultan wurde das Lösungsmittel 0,1% DMSO/NaCl über das basale Nadelpaar infundiert. Die intramyokardiale Mikroinfusion von BIIB513 bewirkte nach einer Ischämiedauer von 60 Minuten und 60 minütiger

Reperfusion die Entstehung keilförmiger, TTC-rot-gefärbter, geschützter Gebiete von etwa 1 cm Durchmesser rund um die feinen, im Myokard fixierten, BIIB513-Infusionsnadeln (Abb. 14C). Die intramyokardiale Infusion des Lösungsmittels 0,1% DMSO/NaCl über das basale Nadelpaar hatte dagegen keinen sichtbaren Effekt auf die Infarktentstehung. Hier war weiß-infarziertes, TTC-ungefärbtes Gewebe um die DMSO/NaCl-Infusionsnadeln zu beobachten.

Bei der intramyokardial-lokalen Applikationsform besteht die Problematik, daß das Pharmakon, welches über die Mikroinfusionsnadeln verabreicht wird, nicht gleichmäßig in das gesamte Risikogebiet diffundiert. In Pilotversuchen zeigte sich, daß die Bindung des Pharmakons an einen Farbstoff nicht möglich war, um das genaue Diffusionsgebiet jeder Nadel festzulegen. So wurde bei der lokal-intramyokardialen Applikationsform auf eine Quantifizierung der Infarktgröße verzichtet. Die lokal-anti-nekrotische Wirkung wurde über einen qualitativen Ja/Nein-Effekt bewertet.

2.1.3. Systemische Applikation des NHE1-Inhibitors BIIB722

Der selektive Inhibitor der myokardialen Na^+/H^+-Austauscher BIIB722 wurde verwendet, um mit einem weiteren pharmakologischen Inhibitor die Rolle der Na^+/H^+-Austauscher bei der Entstehung von transmuralen Infarkten zu testen. BIIB722 wurde in zwei Dosierungen systemisch verabreicht, um eine Dosis-Wirkungs-Beziehung zu untersuchen. Gruppe IV (n = 5) erhielt BIIB722 in einer Dosierung von 1,5 mg/kg und Gruppe V (n = 5) erhielt BIIB722 in einer Dosierung von 3 mg/kg.

Die Tiere der Gruppe IV (Abb. 16A) und der Gruppe V (Abb. 16B) erhielten BIIB722 systemisch über 15 Minuten. Es schloß sich eine 60 minütige Ischämie an, gefolgt von einer 60 minütigen Reperfusion. Gegenüber der Kontrollgruppe, bei welcher die Infarktgröße 61,1 ± 2,6% betrug, wurde die Infarktgröße bei Gruppe IV auf 41,4 ± 6,3% und Gruppe V auf 40,0 ± 4,6% signifikant gesenkt ($p < 0,05$) (Abb. 15).

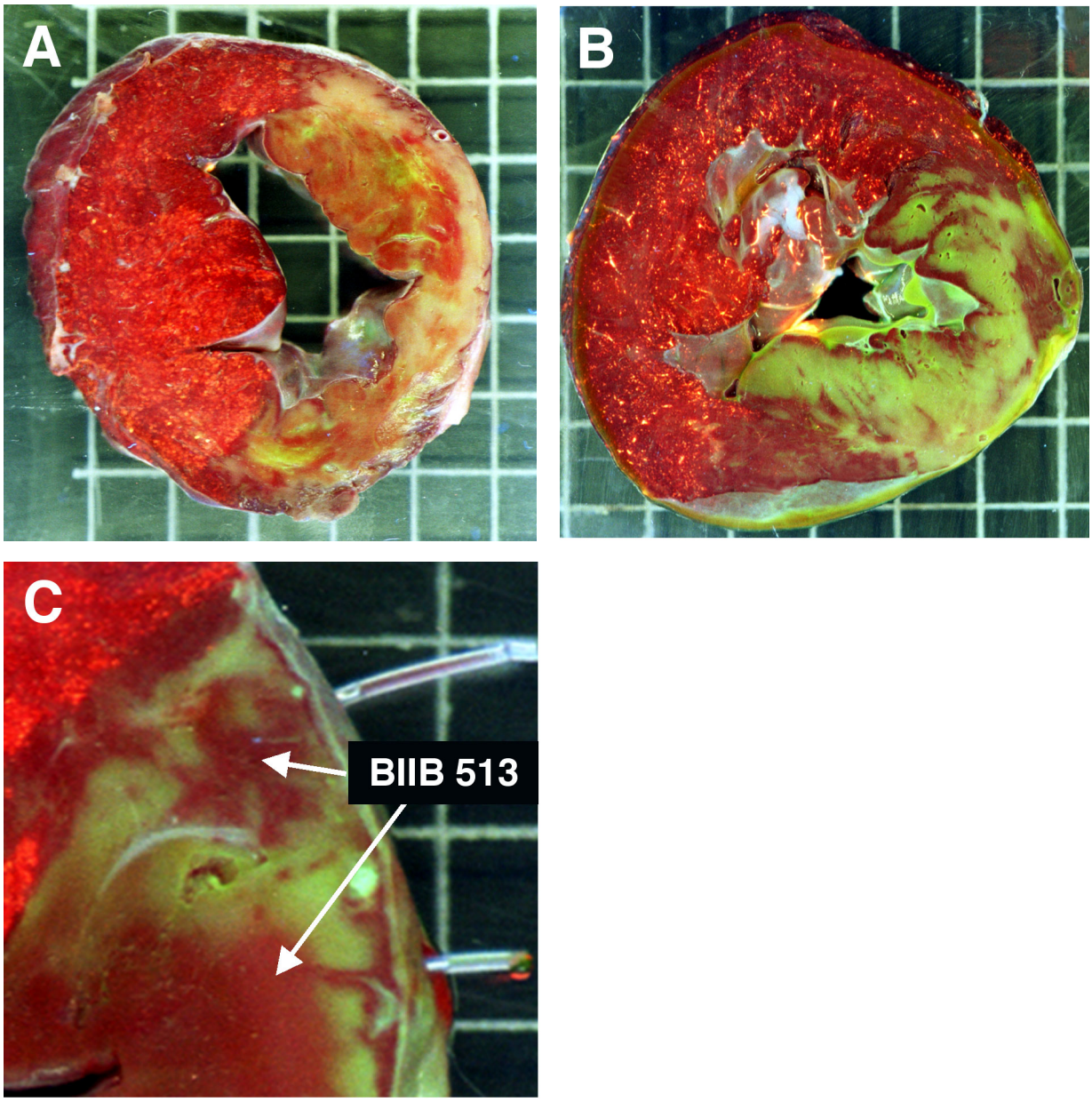


Abb.14 Mit UV-Licht (366nm) und Weißlicht doppelbelichtete Herzscheiben nach TTC-Färbung.
***(A):** Gruppe I. Herzscheibe eines syst. mit 6,7% DMSO/NaCl behandelten Kontrolltieres nach 60 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion.*
***(B):** Gruppe II. Nach syst. BIIB513 Gabe (1,5 mg/kg) sowie 60 Minuten Okklusion und 60 Minuten Reperfusion.*
***(C):** Gruppe III. Ausschnitt einer Herzscheibe eines mit intramyokadialer BIIB513-Infusion (50µM) sowie 60 minütiger Okklusion und 60 minütiger Reperfusion behandelten Tieres. Das Gewebe um beide BIIB513-Infusionsnadeln ist TTC-rotgefärbt.*

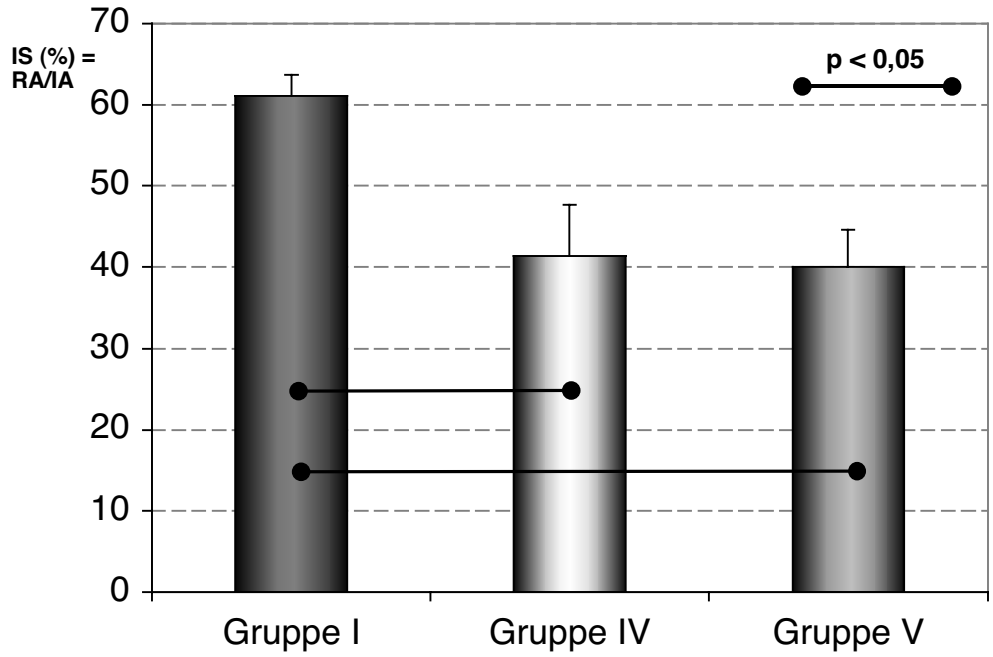


Abb.15 Infarktgröße bei systemischer BIIB722 Applikation in einer Dosierung von 1,5 mg/kg (Gruppe IV; n = 5) bzw. 3 mg/kg (Gruppe V; n = 5) und jeweils 60 Minuten Ischämie- und Reperfusionsphase. Dazu im Vergleich die syst. mit 0,1% DMSO/NaCl behandelte Kontrollgruppe (Gruppe I). Die Resultate sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. IS: Infarktgröße; RA: Risikogebiet; IA: Infarktgebiet.

2.1.4. Lokal-intramyokardiale Applikation des NHE1-Inhibitors BIIB722

Hier wurde mittels einer intramyokardialen Infundierung von BIIB722 (50μM) getestet, ob die anti-nekrotische Wirksamkeit der NHE1-Blockade auch lokal am Herzen gegeben ist (Gruppe VI, n = 4). Simultan mit der BIIB722-Verabreichung wurde das Lösungsmittel 0,1% DMSO/NaCl durch das basale Nadelpaar infundiert. Der 60 minütigen Pharmakonapplikation folgte eine jeweils 60 minütige Ischämie und Reperfusion. Die Lösungsmittelgabe blieb im Bereich der Mikroinfusionsnadeln ohne sichtbaren Effekt auf das infarzierte Myokardgewebe. Die BIIB722-Infusion resultierte in einer keilförmigen TTC-Rotfärbung des Myokardgewebes im Bereich der Nadeln. Somit war hier das Myokard lokal geschützt (Abb. 16C). Auch hier wurde die lokal-anti-nekrotische Wirkung über einen qualitativen Ja/Nein-Effekt bewertet.

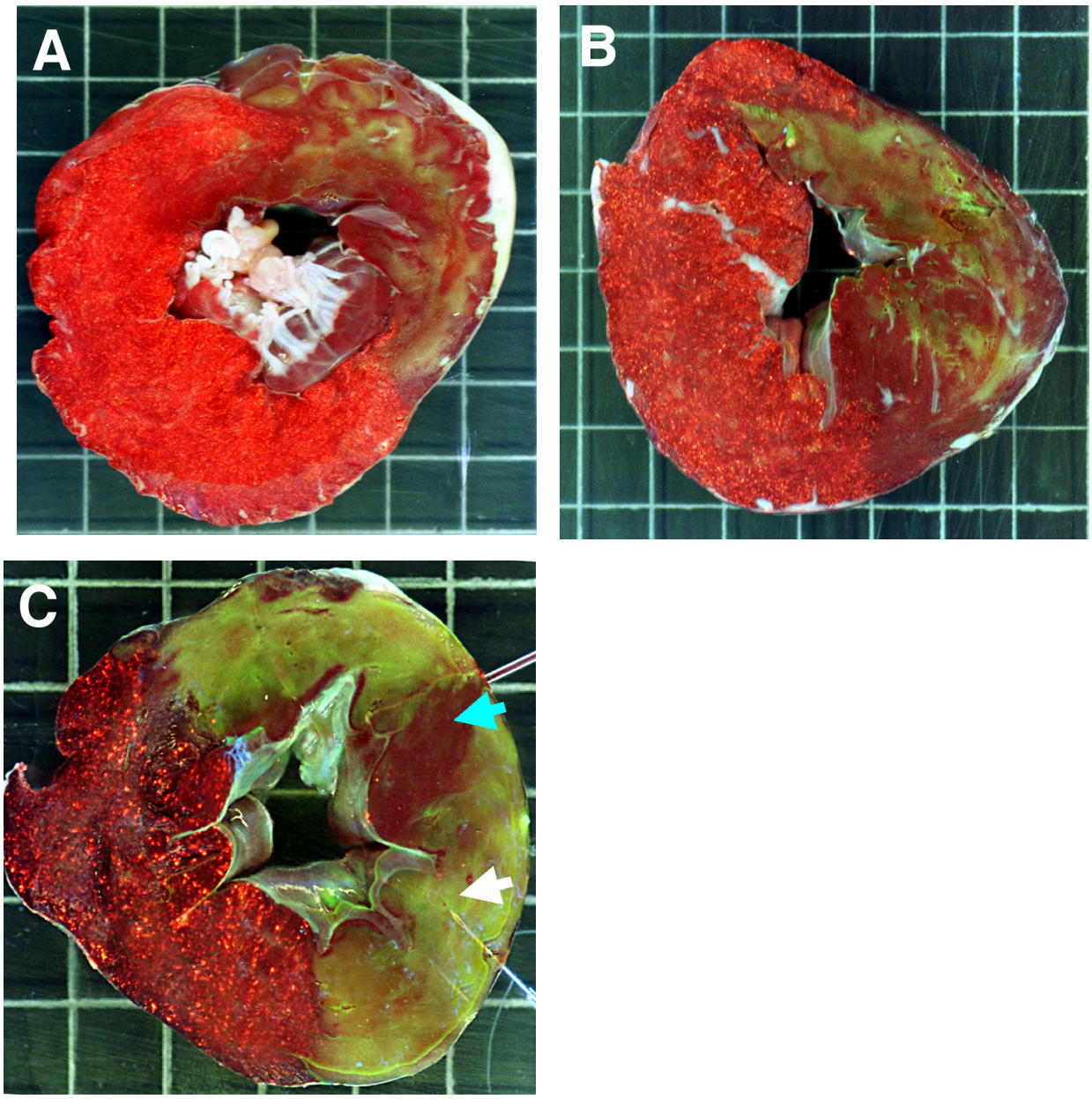


Abb.16 Mit UV-Licht (366nm) und Weißlicht doppelbelichtete Herzscheiben nach TTC-Färbung.
***(A):** Gruppe IV. Herzscheibe eines syst. mit BIIB722 (1,5 mg/kg) behandelten Tieres nach 60 minütiger Ischämie sowie 60 Minuten Reperfusion.*
***(B):** Gruppe V. Herzscheibe eines syst. mit BIIB722 (3 mg/kg) behandelten Tieres nach 60 minütiger Ischämie sowie 60 Minuten Reperfusion.*
***(C):** Gruppe VI. Herzscheibe nach intramyokadialer BIIB722-Infusion (50µM) sowie 60 Minuten Ischämie und 60 minütiger Reperfusion. **Weißer Pfeil:** DMSO/NaCl-Mikroinfusionsnadel (Kontrolle): hier ist weiß-infarziertes Myokard im Diffusionsgebiet der Nadel zu erkennen; **blauer Pfeil:** BIIB722- Mikroinfusionsnadel: das die Nadel umgebende Gewebe ist TTC-rotgefärbt, von ca.1 cm Durchmesser und keilförmig vom Epi- in Richtung des Endokards hin ausgebreitet.*

2.2. Auswirkung der NHE1-Inhibierung auf die Infarktgröße bei 90 minütiger Ischämie

Um die Rolle der myokardialen Na^+/H^+-Austauscher bei länger aufrechterhaltener Ischämie zu testen, wurde die Dauer der Okklusion auf 90 Minuten verlängert. Um die Wirkung des BIIB513-Inhibitors auf die Infarktgröße zu untersuchen, wurde BIIB513 (1,5 mg/kg) systemisch über 15 Minuten verabreicht. Es folgte eine 90 minütige Ischämie und eine 60 minütige Reperfusion (Gruppe VIII, n = 3) (Abb. 18B). Die Kontrolltiere wurden mit 6,7% DMSO/NaCl vorbehandelt und sie wurden ebenfalls einer Ischämie von 90 Minuten und einer 60 minütigen Reperfusion unterzogen (Gruppe VII; n = 3) (Abb. 18A). Die Infarktgröße der mit BIIB513 behandelten Gruppe betrug 61,7 ± 2,2% und zeigte eine Abnahme gegenüber der Infarktgröße der Kontrollgruppe von 70,3 ± 1,7% (Abb. 17).

Auch mittels BIIB722 wurde die Involvierung der Na^+/H^+-Austauscher bei einer verlängerten 90 minütigen Ischämiedauer untersucht. Die Tiere wurden systemisch mit BIIB722 (3 mg/kg) vor der folgenden 90 minütigen Okklusion behandelt. Anschließend wurde eine Reperfusionsphase von 60 Minuten durchgeführt. Die BIIB722-Applikation bewirkte eine Infarktgröße-Abnahme auf 58,1 ± 3,4% (Gruppe IX; n = 4) gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 17).

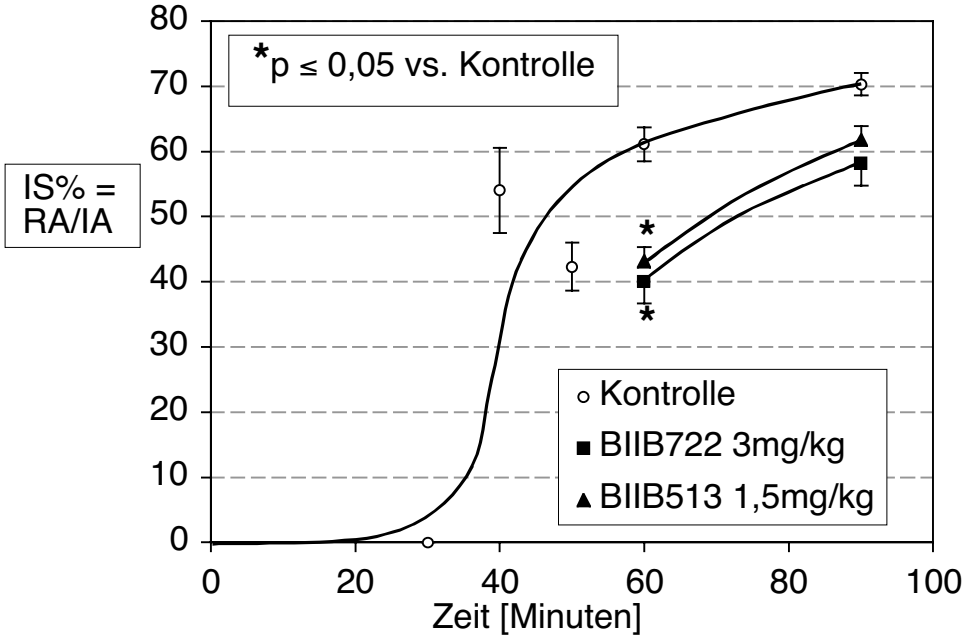


Abb. 17 Standardinfarktverlaufskurve (historische Kontrollen des Max-Planck-Instituts für Experimentelle Kardiologie, Bad Nauheim). Die mit BIIB513 und BIIB722 behandelten Tiere zeigten bei 60 minütiger Ischämie eine signifikante Reduktion der Infarktgröße. Bei einer 90 minütigen Okklusionsdauer konnte keine deutliche Infarktgrößenreduktion mehr erzielt werden.

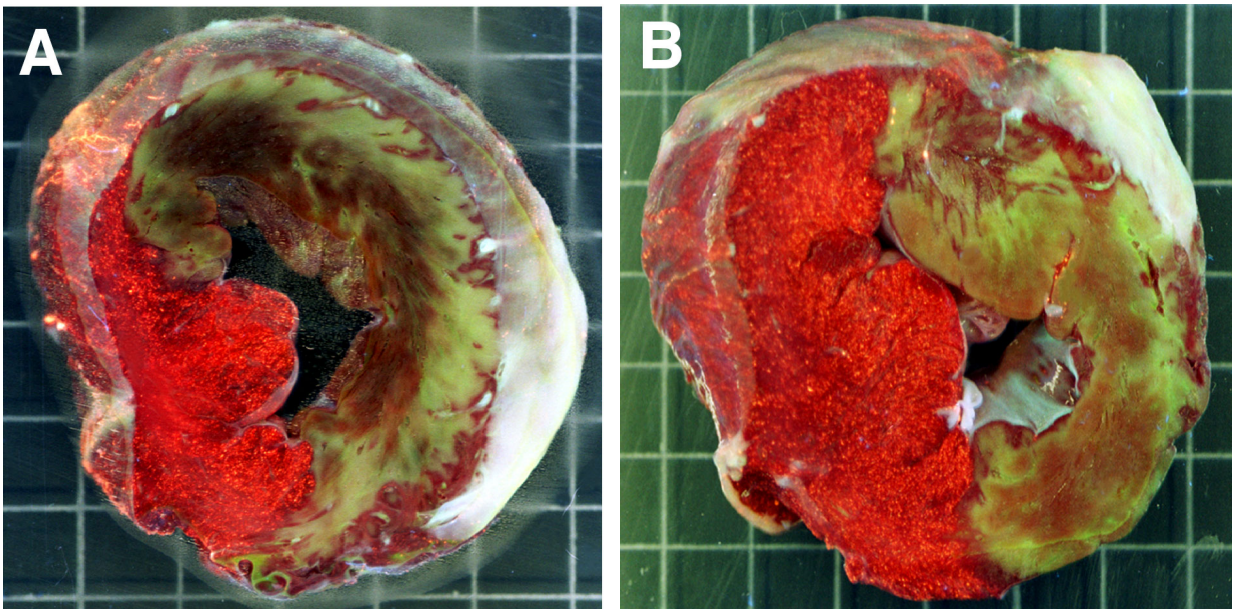


Abb. 18 Mit UV-Licht (366nm) und Weißlicht doppelbelichtete Herzscheiben nach TTC-Färbung.
***(A):** Gruppe VII. Herzscheibe eines syst. mit BIIB722 (1,5 mg/kg) behandelten Tieres nach 90 minütiger Ischämie sowie 60 Minuten Reperfusion.*
***(B):** Gruppe VIII. Herzscheibe eines syst. mit BIIB513 (1,5 mg/kg) behandelten Tieres nach 90 minütiger Ischämie sowie 60 Minuten Reperfusion.*

3. Auswirkungen der K_{ATP}-Kanal-Blockade auf die lokale NHE1-Inhibierung

Es wurde untersucht, ob die ATP-abhängigen Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle) am Herzen, bei der kardioprotektiven Signaltransduktionskette der NHE1-Inhibierung involviert sind. Glibenclamid, ein pharmakologischer Blocker der sarkolemmalen und mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle, wurde systemisch eingesetzt. So konnte die Auswirkung der K_{ATP}-Kanal-Blockade auf die lokal-anti-nekrotische Wirkung der NHE1-Inhibierung getestet werden.

Die Tiere der Gruppe X (n = 3) erhielten über 10 Minuten in systemischer Verabreichung Glibenclamid (0,5 mg/kg). Anschließend wurden die Tiere über eine Stunde mit Glibenclamid systemisch (0,5 mg/kg) und simultan mit BIIB722 (50μM) intramyokardial behandelt. Es schloß sich eine 60 minütige Ischämie mit folgender 60 minütiger Reperfusion an. Im Diffusionsgebiet der BIIB722-Infusionsnadeln zeigten sich TTC-rotgefärbte keilförmige Gebiete des Myokards. Diese waren im Gegensatz zu dem die Lösungsmittelinfusionsnadeln (basales Nadelpaar) umliegenden weiß-infarziertem Gewebe, vor der Infarzierung geschützt (Abb. 19). So konnte gezeigt werden, daß die lokal-anti-nekrotischen Schutzwirkung der NHE1-Inhibierung von einer Aktivierung der myokardialen K_{ATP}-Kanäle unabhängig ist.

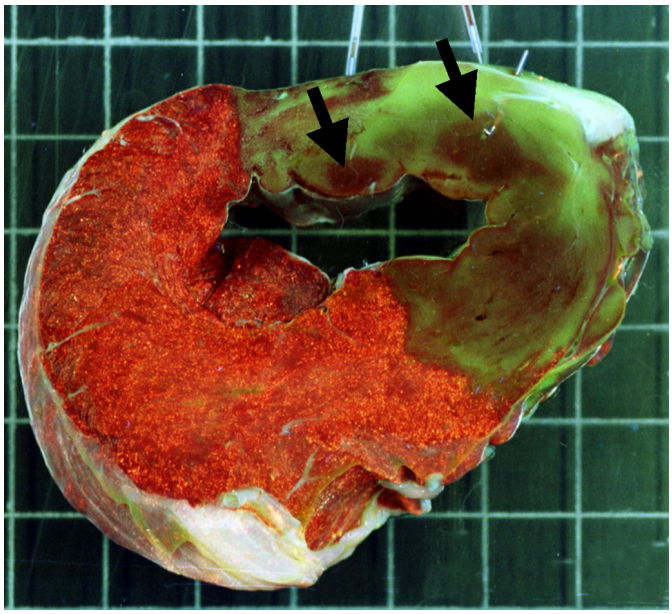


Abb.19 ***Gruppe X.*** *Herzscheibe eines intramyokardial mit BIIB722 (50µM) behandelten Tieres bei gleichzeitiger systemischer Glibenclamidgabe (0,5 mg/kg) sowie 60 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion (n = 3). Die schwarzen Pfeile bezeichnen die TTC-rotgefärbten BIIB722-Infusionsgebiete.*

3.1. Auswirkungen der selektiven mitochondrialen K_{ATP}-Kanal-Blockade auf die lokale NHE1-Inhibierung

Durch die pharmakologische spezifische Blockade der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle sollte gezeigt werden, ob innerhalb des Schutzmechanismus der NHE1-Inhibierung eine Aktivierung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle von Bedeutung ist. Die Auswirkungen einer selektiv mitochondrialen K_{ATP}-Kanal-Blockade mittels 5-Hydroxydecanoat (5-HD) auf die lokal-anti-nekrotische Schutzwirkung der NHE1-Inhibition wurde getestet.

Tiere der Gruppe XI (n = 3) wurden nach einem zehnminütigen systemischen Vorlauf mit 5-HD, über eine Stunde systemisch mit 5-HD (3 mg/kg) und simultan mit BIIB722 (50μM) lokal-intramyokardial infundiert. Hieran schloß sich wiederum eine 60 minütige Okklusionsphase und eine 60 minütige Reperfusion an. Das die BIIB722-Mikroinfusionsnadeln umgebende Myokard zeigte TTC-rotgefärbte, geschützte Diffusionsgebiete (Abb. 20). Das Myokard im Diffusionsgebiet des basalen Nadelpaars, über welches gleichzeitig mit der BIIB722-Verabreichung das Lösungsmittel 0,1% DMSO/NaCl appliziert wurde, zeigte eine weiß-infarzierte Färbung. Somit konnte gezeigt werden, das unabhängig von einer Aktivierung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle eine lokal-anti-nekrotische Wirkung des kardio-protektiven NHE1-Inhibierungsmechanismus auszulösen war.

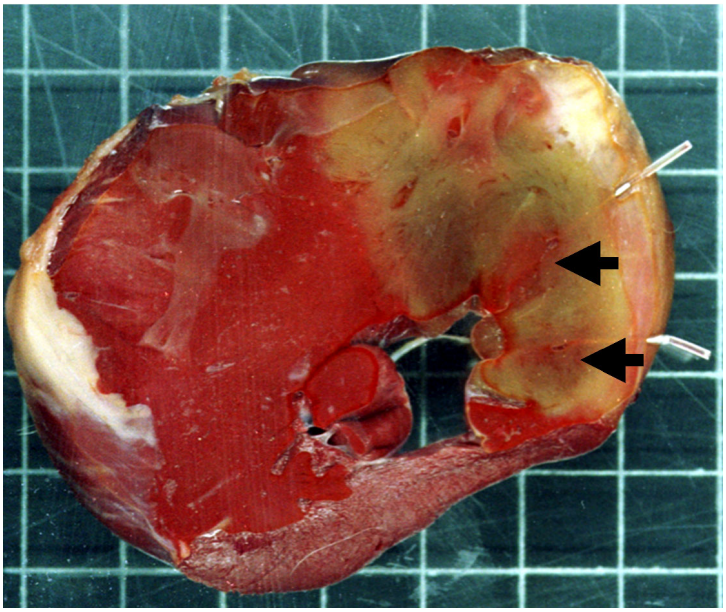


Abb.20 ***Gruppe XI.*** *Herzscheibe eines intramyokardial mit BIIB722 (50µM) behandelten Tieres bei simultaner systemischer Gabe von 5-HD (3 mg/kg) nach 60 Minuten Ischämie und 60 Minuten Reperfusion (n = 3). Die schwarzen Pfeile bezeichnen die TTC-rotgefärbten BIIB722-Infusionsgebiete.*

4. Die Auswirkung der ischämischen Präkonditionierung auf die Infarktgröße

Um die kardioprotektive Effizienz der ischämischen Präkonditionierung mit der Schutzwirkung der NHE1-Inhibierung zu vergleichen, wurde die Auswirkung einer vorgeschalteten Präkonditionierung auf die Infarktgröße untersucht. Das Präkonditionierungsprotokoll bestand in einem zweimaligen Zyklus einer jeweils zehnminütigen Ischämie und Reperfusion. Anschließend folgte die 60 minütige Indexischämie und eine 60 minütige Reperfusion. Die ischämische Präkonditionierung bewirkte eine signifikante Infarktgröße-Abnahme auf 31 ± 3,9% im Vergleich zu den Kontrolltieren (Gruppe I; n = 5) mit einer Infarktgröße von 61,1 ± 2,6% (Abb. 21/22) ($p < 0,05$).

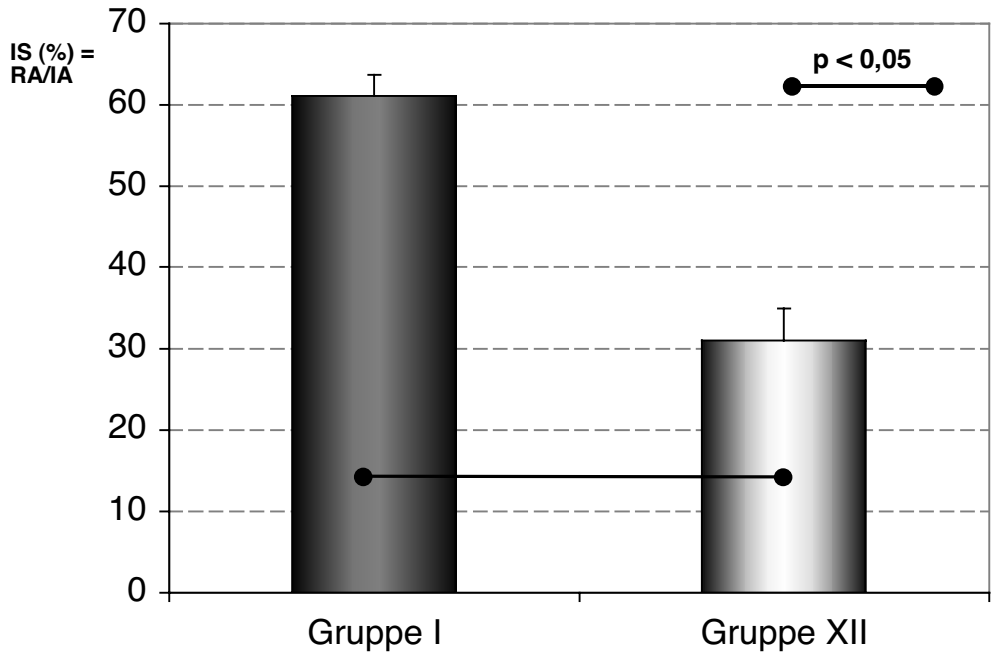


Abb.21 Infarktgröße der Gruppe XII (n = 3) mit vorgeschalteten zweimaligem Zyklus einer zehnminütigen Ischämie und zehnminütiger Reperfusion mit folgender 60 minütiger Indexischämie und 60 minütigen Reperfusion. Dazu im Vergleich die Kontrollgruppe I (n = 5). Die Resultate sind als Mittelwerte ± SEM angegeben. IS: Infarktgröße; RA: Risikogebiet; IA: Infarktgebiet.

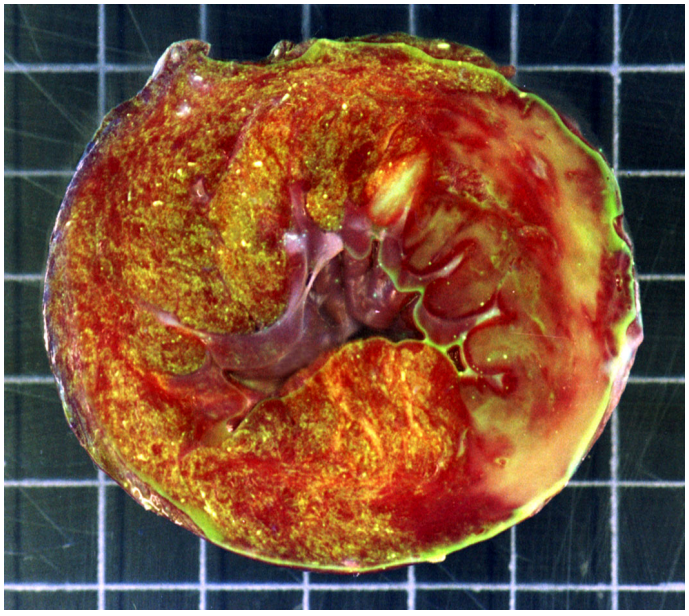


Abb.22 Gruppe XII:. Herzscheibe eines ischämisch präkonditionierten Tieres bei anschließender Indexischämie von 60 Minuten Okklusion und 60 Minuten Reperfusion. Hier wurden grün-fluoreszierende Mikrosphären verwendet.

5. Western-Blot-Analyse

5.1 Biochemische Untersuchung der Wirkung von BIIB722 auf die Phosphorylierung der p38-MAPK während der Ischämie.

Anhand der Western-Blot-Analyse der zweifach phosphorylierten Form der p38-MAPK (Thr 180/Tyr 182) (P-p38-MAPK) mittels eines polyklonalen Antikörpers wurden Banden im Bereich von 38 kDa identifiziert. Als Kontrolle der Verhältnisse im unbehandelten und präischämischen Myokard, wurden vor Beginn des Versuchsprotokolls Drillbiopsien aus dem Ischämiegebiet des linken Ventrikels distal der Okklusionsstelle entnommen. Es zeigte sich, daß sich unter diesen physiologischen „Normalbedingungen“ in der zytosolischen Fraktion der Myokardbiopsien in der Western-Blot-Analyse keine Bande der P-p38-MAPK abbildet und folglich die p38-MAPK in ihrer phosphorylierten Form nicht vorliegt.

Die zytosolischen Fraktionen von Biopsien, welche bei Kontrolltieren (Gruppe I) nach einer 15 minütigen systemischen Vorbehandlung mit dem Lösungsmittel 6,7% DMSO zu den Zeitpunkten einer fünf-, zehn- und 15 minütigen Ischämie entnommen wurden, zeigten in der Western-Blot-Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen die P-p38-MAPK, Banden im Bereich von 38kDa, welche mit der zunehmenden Dauer der Ischämie eine verstärkte Färbung aufwiesen (Abb. 23). Die densiometrische Auswertung dieser Banden erbrachte im Vergleich zu Kontrollbiopsien des unstimulierten Myokards (K) mit 100% P-p38-MAPK, einen mit der Dauer der Ischämie ansteigenden P-p38-MAPK-Gehalt. So wurde für den Zeitpunkt einer fünfminütigen Ischämie ein Ansteigen der P-p38-MAPK auf 217% ± 35,2 (SEM), nach zehn Minuten auf 323,2% ± 26,4 (SEM) und nach 15 Minuten auf 489,1% ± 84,9 (SEM) im Vergleich zur Kontrolle beobachtet. Zu diesen beiden Zeitpunkten zeigte sich ein signifikanter Anstieg des P-p38-MAPK-Gehaltes gegenüber den präischämisch entnommenen Kontrollbiopsien des unstimulierten Myokards ($p < 0,05$).

Die P-p38-MAPK wurde ebenfalls in der zytosolischen Fraktion von Gewebeproben von Tieren bestimmt, welche nach einer 15 minütigen systemischen Vorbehandlung mit BIIB722 (3 mg/kg), zu den Zeitpunkten einer fünf-, zehn- und 15 minütigen Ischämie entnommen wurden (Gruppe V, n = 4). Hier sollte der Effekt der Inhibierung des Natrium-Protonen-Austauschers mittels BIIB722 auf die Phosphorylierung der p38-MAPK untersucht werden. Die beobachteten Banden waren deutlich schwächerer Ausprägung als die der Kontrolltiere zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 23). Die P-p38-MAPK zeigte einen verhaltenen Anstieg zu Beginn der Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe I und zeigte im Verlauf der Ischämie

keinen weiteren Anstieg. Zum Zeitpunkt einer fünfminütigen Ischämie stieg der Gehalt der P-p38-MAPK auf 154,5% ± 18,6 (SEM). Nach zehn Minuten zeigte sich der maximale Gehalt der P-p38-MAPK bei 158,3% ± 23,1 (SEM), welcher gegenüber dem der präischämisch entnommenen Kontrollbiopsien signifikant angestiegen war ($p < 0,05$). Nach 15 Minuten sank er wieder auf 148,8% ± 17,5 (SEM) (Abb. 24). Zu den Zeitpunkten einer zehn- und 15 minütigen Ischämie war die Ausprägung der P-p38-MAPK-Bande der mit BIIB722 behandelten Gruppe somit signifikant geringer im Vergleich zu dem Gehalt der P-p38-MAPK der Kontrollgruppe ($p < 0,05$).

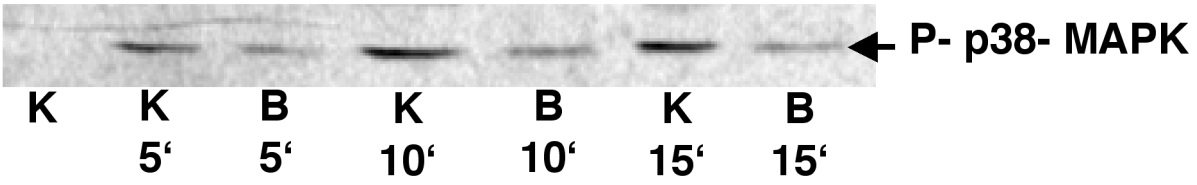


Abb.23 Repräsentative Western-Blot-Analyse der phosphorylierten Form der p38-MAPK.
***K:** Kontrolle vor Beginn des Versuchsprotokolls aus dem zu erwartenden Risikogebiet.*
***K5‘, K10‘, K15‘:** Kontrollgewebe der DMSO/NaCl behandelten Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie (Gruppe I).*
***B5‘, B10‘, B 5‘:** Biopsien des Risikogebietes des linken Ventrikels der systemisch mit BIIB722 behandelten Tiere (3 mg/kg) zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie (Gruppe V).*

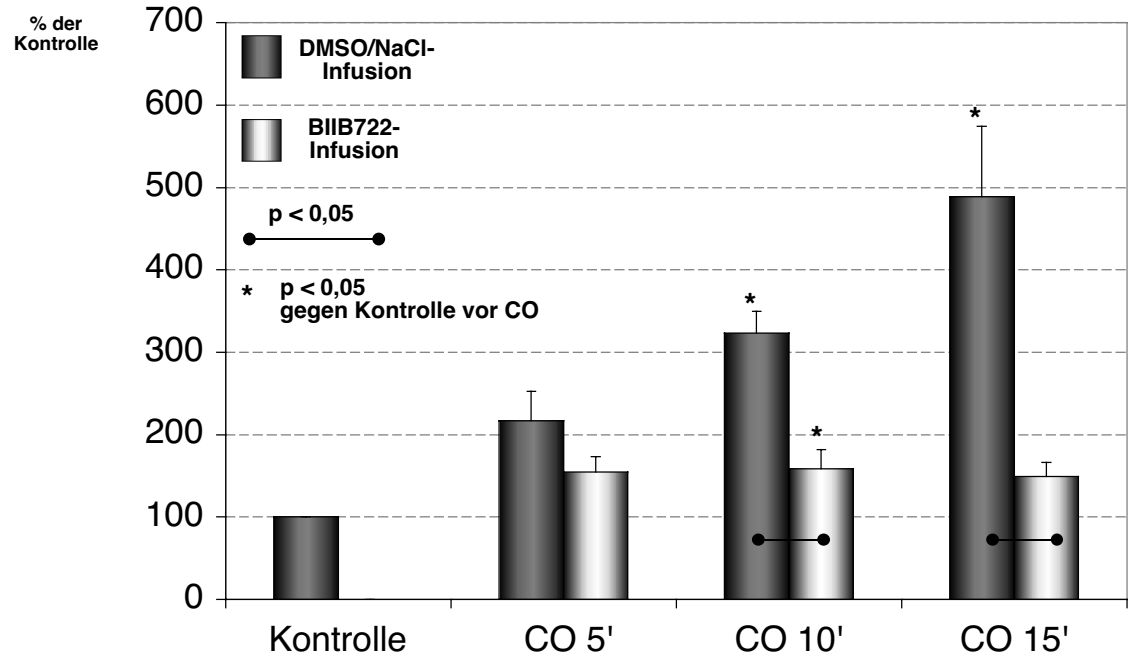


Abb.24 Densiometrische Quantifizierung der Protein-Banden. Dunkelgraue Säulen: Kontrollgruppe I; hellgraue Säulen: BIIB722-behandelte Tiere (Gruppe V; n = 4); CO5‘, CO10‘, CO15‘: Biopsieentnahme nach fünf- bzw. zehn- und 15 minütiger Ischämie. Resultate sind die Mittelwerte ± SEM einer Gruppe im Vergleich zu präischämisch entnommenen Biopsien unbehandelter Kontrolltiere.

5.2. Biochemische Untersuchung der Wirkung von BIIB722 auf die p38-MAPK während der Ischämie.

Mittels eines polyklonalen Antikörpers, gerichtet gegen die nicht-phosphorylierte Form der p38-MAPK, wurde in Western-Blot-Analysen der Inhalt der p38-MAPK untersucht. Dabei wurden die Kontrollbiopsien unbehandelter Tiere, entnommen vor der Ischämie sowie Kontrollbiopsien von mit dem Lösungsmittel behandelten Tieren und systemisch mit BIIB722 (3 mg/kg) behandelten Tieren (Gruppe V, n = 4) zu den Zeitpunkten einer fünf-, zehn- und 15 minütigen Ischämie miteinander verglichen. Es zeigte sich anhand der gleich stark ausgeprägten Banden auf einer Höhe von 38 kDa ein gleichbleibender Gehalt der unphosphorylierten p38-MAPK (Abb. 25).

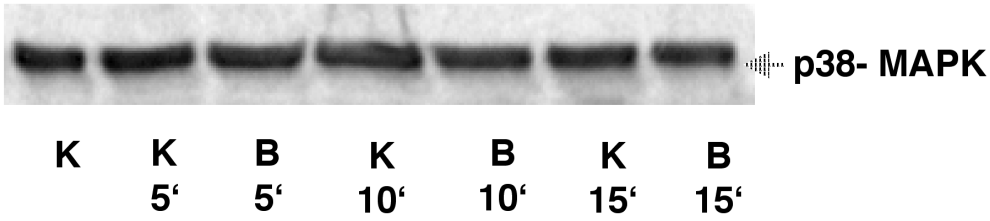


Abb.25 Western-Blot-Analysen der nicht-phosphorylierten Form der p38-MAPK. ***K5‘, K10‘, K15‘:*** *Kontrollgewebe der mit dem Lösungsmittel 6,7% DMSO/NaCl behandelten Tiere zu den Zeitpunkten einer fünf-, zehn- und 15 minütigen Ischämie. (Gruppe I).*
B5‘, B10‘, B15‘: *Biopsien des Risikogebietes des linken Ventrikels der systemisch mit BIIB722 (3 mg/kg) behandelten Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten der Ischämie (Gruppe V).*

6. Zusammenfassung der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte getestet werden inwieweit die ischämische Präkonditionierung und die Auswirkungen der NHE1-Inhibierung miteinander vergleichbar sind. Ihre kardioprotektive Effizienz wurde untersucht. In diesem Zusammenhang wurde der Einfluß der K_{ATP}-Kanäle und der p38-MAPK auf den Signaltransduktionsweg der NHE1-Inhibierung beurteilt.

Im ersten Schritt der Untersuchung wurde an einem *in vivo* Schweinemodell der regionalen Ischämie die kardioprotektive Wirksamkeit der ischämischen Präkonditionierung und der NHE1-Inhibierung mittels der selektiven Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren BIIB513 und BIIB722 untersucht.

a) BIIB513 reduzierte bei präischämischer systemischer Applikation die Infarktgröße signifikant auf 43,1 ± 3,6% bei jeweils 60 minütiger Ischämie und folgender Reperfusion. Die Kontrollgruppe zeigte dagegen eine Infarktgröße von 61,1 ± 2,6% ($p < 0,05$).

b) BIIB722 wurde in zwei systemischen Dosierungen von 1,5 und 3 mg/kg bei 60 minütiger LAD-Okklusion und Reperfusion getestet. In beiden Gruppen konnte eine signifikante Senkung der Infarktgröße auf 41,4 ± 6,3% bzw. 40,0 ± 3,2% erzielt werden gegenüber der Kontrollgruppe mit 61,1 ± 4,6% ($p < 0,05$).

c) Damit zeigte sich, daß die Effizienz der myokardialen Na^+/H^+-Inhibierung bezüglich der Infarktgröße-Reduktion mit der ischämischen Präkonditionierung vergleichbar ist, welche die Infarktgröße auf 31 ± 3,9% reduzierte ($p < 0,05$).

d) Bei einer Verlängerung der Ischämiedauer auf 90 Minuten konnte durch eine NHE1-Blockade keine signifikante Infarktgrößensenkung erzielt werden gegenüber der Kontrollgruppe mit 70,3 ± 1,7%. Die systemische Verabreichung von BIIB513 resultierte in einer Infarktgröße von 61,7 ± 2,2%. BIIB722 reduzierte die Infarktgröße auf 58,1 ± 3,4%.

e) Durch die NHE1-Inhibierung konnte auch mittels der intramyokardialen Mikroinfusion der pharmakologischen Inhibitoren ein lokal-anti-nekrotischer Schutzeffekt am Myokardgewebe gezeigt werden.

Im weiteren Verlauf der Studie wurden mögliche Interaktionen bzw. Gemeinsamkeiten zwischen dem Signaltransduktionsweg der ischämischen Präkonditionierung, bei welchem es zu einer Aktivierung der myokardialen K_{ATP}-Kanäle und zu einer Inhibierung der p38-MAPK kommt, und dem kardioprotektiven Mechanismus der pharmakologischen NHE1-Blockade untersucht.

f) Anhand der ubiquitären Blockade der myokardialen K_{ATP}-Kanäle mittels Glibenclamid konnte gezeigt werden, daß die lokal-anti-nekrotische Wirksamkeit der NHE1-Inhibition unabhängig von einer K_{ATP}-Kanal-Aktivierung geschieht. BIIB722 erzielte bei lokal-intramyokardialer Verabreichung trotz einer simultanen Glibenclamidverabreichung, einen lokalen kardioprotektiven Effekt.

g) Auch bei selektiver Blockade der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle mittels 5-HD blieb die lokal-anti-nekrotische Wirksamkeit der NHE1-Inhibition erhalten.

h) Bei gleichbleibendem Gehalt an p38-MAPK-Protein wurde bei fortlaufenden Zeitpunkten der Ischämie bei Kontrolltieren eine gesteigerte Phosphorylierung der p38-MAPK festgestellt. Der Anstieg der Phosphorylierung der p38-MAPK im Ischämieverlauf wurde unter dem Einfluß der NHE1-Blockade deutlich inhibiert.

Schlußfolgerung:

Die durch Na^+/H^+-Austauscher-Inhibition *in vivo* erzielte Kardioprotektion ist mit der ischämischen Präkonditionierung vergleichbar. Sie ist bei 90 minütiger Ischämiedauer nicht mehr wirksam. Die Na^+/H^+-Austauscher-Inhibition ist unabhängig von einer Aktivierung myokardialer K_{ATP}-Kanäle und geht mit einer Senkung der p38-MAPK-Phosphorylierung im Verlauf der Ischämie einher. Diese Ergebnisse sprechen dafür, daß die Schutzmechanismen der ischämischen Präkonditionierung und der NHE1-Inhibition auf unterschiedlichen Signaltransduktionswegen beruhen. Gemeinsam ist ihnen jedoch eine kardioprotektive Deaktivierung der p38-MAPK.

V. DISKUSSION

In der vorliegenden Studie wurde die pharmakologische Na^+/H^+-Austauscher (NHE)-Inhibition mit der ischämischen Präkonditionierung verglichen. Dabei wurde die anti-nekrotische Wirksamkeit mit Hilfe der Infarktgröße-Bestimmung beurteilt und gezeigt, daß beide Schutzmechanismen bei 60 minütiger Ischämie vergleichbar effizient waren. Im weiteren Verlauf der Studie wurde das Verhalten der K_{ATP}-Kanäle und der p38-MAPK bei der pharmakologischen NHE1-Modulation untersucht. Diesbezüglich findet sich in der Literatur, daß die ischämische Präkonditionierung zu einer Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle und einer Inhibierung der p38-MAPK führt [3,131,266,274]. Unsere Ergebnisse belegen erstmals, daß eine lokal-anti-nekrotische Herzprotektion durch NHE1-Inhibition, keiner Aktivierung der myokardialen K_{ATP}-Kanäle bedarf. Die pharmakologische NHE1-Inhibition resultierte jedoch ebenfalls in einer Deaktivierung der p38-MAPK während der Ischämie. Aufgrund dieser Ergebnisse wird im wesentlichen die in der Literatur bereits verbreitete Meinung unterstützt, daß die kardioprotektive Wirkung der ischämischen Präkonditionierung und der pharmakologischen NHE1-Inhibierung zwar vergleichbar ist und daß sie jedoch nicht auf einem gemeinsamen Mechanismus basieren [18,19,275].

1. Tiermodell der regionalen Ischämie

Das in dieser Studie verwendete *in vivo* Schweinemodell der regionalen Ischämie, ist das dem menschlichen Herzen ähnlichste, gebräuchliche experimentelle Tiermodell. Die akute Infarktentwicklung, fehlende Kollateralen, eine ähnliche Hämodynamik und ein vergleichbarer Gefäßverlauf läßt eine Übertragbarkeit der experimentell gewonnenen Erkenntnisse auf den Menschen zu. Am Schweineherz ist bei einer akuten koronaren Okklusion ein kollateraler Blutfluß fast nicht vorhanden [276]. Entsprechend führt ein akuter koronarer Verschluß sehr schnell zur transmuralen Infarzierung des gesamten anatomischen Risikogebietes [277]. Schon nach 45 minütiger Ischämie ist das Risikogebiet fast komplett infarziert [278]. In der vorliegenden Studie wurde nach 90 minütiger Okklusionsdauer eine Infarktgröße von 70% erreicht.

Die regionale Ischämie des linken Ventrikels, welche in dem hier verwendeten Tiermodell durch eine Okklusion des Ramus interventricularis paraconalis der linken absteigenden Koronararterie hervorgerufen wurde, stellte ein geeignetes Modell des Vorderwandinfarktes des Menschen dar. Die Ergebnisse dienen der Erforschung der bei Ischämie ablaufenden Signalkette und der molekularen

Zustände am menschlichen ischämischen Herzen und letztendlich der Entwicklung neuer Therapieansätze. Im Hinblick auf die Fragestellungen, konnte die Auswirkungen der pharmakologischen Modulation der NHE1 sowohl auf molekularer Ebene, als auch bezüglich der anti-nekrotischen Wirkung untersucht werden. In diesem Tiermodell wurde eine Ischämiedauer von 60 bzw. 90 Minuten gewählt, um die anti-nekrotischen Effekte der pharmakologischen Inhibitoren zu demonstrieren.

Ähnliche experimentelle Protokolle wie die der vorliegenden Studie wurden auch an anderen Tierspezies wie Hund und Ratte durchgeführt. Der Hund ist eine experimentell sehr umfassend studierte Tierspezies, die sich jedoch bezüglich der Infarktentwicklung aufgrund des gut entwickelten Kollateralkreislaufs vom menschlichen Herz unterscheidet. Folglich können am Hundeherz experimentell gewonnene Erkenntnisse nur bedingt auf den Menschen übertragen werden. Bei dieser Spezies beträgt die kollaterale Blutflußrate bei regionaler Ischämie noch etwa 16% der nicht-ischämischen Blutflußrate. Im Vergleich dazu liegt der kollaterale Blutfluß beim ischämischen Schweineherz nur bei 0,6% des nicht-ischämischen Blutflusses [279]. Die finale Infarktgröße umfaßt so beim Hund erst nach dreistündiger Okklusion 75% des Risikogebietes [280]. Das Rattenherz entwickelt bei akuter Koronarokklusion großflächige transmurale Infarkte, was für ein Nicht-Vorhandensein von Kollateralgefäßen spricht [280]. Hier beträgt der ischämische gemessene Blutfluß nur noch 2% des nicht–ischämischen Blutflusses [279]. Das Rattenherz eignete sich aber aufgrund seiner geringen Größe weniger gut, für die in dieser Studie untersuchten Parameter, als das Schweineherz.

2. Kardioprotektiver Effekt der pharmakologischen NHE1-Inhibierung

Die kardioprotektive Eigenschaft der pharmakologischen Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren wurde umfassend beschrieben. Kontroverse Ergebnisse gibt es jedoch bezüglich des notwendigen frühesten Zeitpunktes der Verabreichung dieser Substanzen [175,180,202]. Im Hinblick darauf, daß bei Patienten meist zwischen dem Einsetzen der Symptome des akuten myokardialen Infarktes und dem Beginn der klinischen Behandlung eine längere Zeitspanne von bis zu mehreren Stunden vergeht, wurde in vielen experimentellen Studien nicht nur die präischämische Verabreichung der Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren getestet, sondern auch ihre Wirksamkeit bei der Applikation zu einem späteren Zeitpunkt kurz vor oder zu Beginn der Reperfusion. Es wird postuliert, daß eine optimale Effizienz der

pharmakologischen Inhibitoren nur bei ihrer Präsenz vor und während der Ischämie und Reperfusion gegeben ist [194]. Eine Verabreichung der Na^+/H^+-Austauscher-Blocker erst zu Beginn der Reperfusion resultierte in einer weniger effizienten kardioprotektiven Wirksamkeit [15,174,180,184], denn schon während der Ischämie kommt es zu der myozytenschädigenden Natrium- und Kaliumionen-akkumulation [9]. Diese experimentellen Resultate wurden in klinischen Studien bestätigt. In der GUARDIAN-Studie zeigte sich, daß nur bei der Bypass-operierten Patientengruppe eine Reduktion der Todes- und myokardialen-Infarktrate erzielt werden konnte, sowie eine Reduktion von Q-Wellen- und Nicht-Q-Wellen-Infarkten über sechs Monate. Diese Patienten erhielten das Cariporid noch vor der globalen Ischämie und zudem während der Reperfusion. Bei Patienten mit unstabiler Angina oder myokardialem Infarkt (ohne ST-Anhebung), welche erst zu einem späteren Zeitpunkt während der Ischämie mediziert werden konnten, verringerte das Cariporid jedoch nur das Auftreten von Q-Wellen-Infarkten [199].

In der vorliegenden Untersuchung wurden, um eine optimale Effizienz zu erreichen, die pharmakologischen NHE1-Inhibitoren vor der LAD-Okklusion verabreicht. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß bei spezifischer pharmakologischer NHE1-Inhibierung neben der signifikanten Reduktion der Infarktgröße, d.h. der systemisch-anti-nekrotischen Wirkung, auch ein lokaler anti-nekrotischer Schutz erzielt werden konnte. Der Infarktgröße-verringernde Effekt der NHE1-Inhibierung war bei 60 minütiger Ischämie zu beobachten, jedoch bei einer Verlängerung der Ischämie auf 90 Minuten nicht mehr vorhanden. So handelt es sich bei der NHE1-Inhibierung ähnlich wie bei der ischämischen Präkonditionierung um einen zeitlich begrenzten transienten Effekt, welcher lediglich die Entwicklung transmuraler Infarkte verzögert, jedoch bei länger aufrechterhaltener Ischämie ein Erreichen der finalen Infarktgröße nicht verhindern kann.

Die Kontrolltiere entwickelten nach einer 60 minütigen Okklusion im proximalen Drittel des Ramus interventrikularis paraconalis der LAD einen transmuralen Infarkt, welcher einen 61,1 ± 2,6% großen Anteil des ischämischen Risikogebietes umfaßte. Die systemische Infundierung der selektiven NHE1-Inhibitoren BIIB513 oder BIIB722 konnte die Infarktentwicklung bei 60 minütiger Okklusion jeweils um etwa ein Drittel senken. Bei BIIB513-Verabreichung betrug die Infarktgröße nur noch 43,1 ± 3,6%. Bei BIIB722-Applikation wurde sie auf 41,4 ± 6,3% (1,5 mg/kg) und 40,0 ± 4,6% (3 mg/kg) reduziert. Wurde die Dauer der Okklusion auf 90 Minuten verlängert, so konnte durch die NHE1-Inhibition keine signifikante Infarktgröße-Verringerung erzielt werden.

Es wurde zudem der lokal-anti-nekrotische Effekt einer intramyokardialen Verabreichung der Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren getestet. Dazu wurden die pharmakologischen BIIB-Substanzen mit feinen Nadeln direkt in das Myokard des Risikogebiets infundiert. Beide Inhibitoren bewirkten trotz einer Ischämiedauer von 60 Minuten, daß das Myokardgewebe, welches die feinen Infusionsnadeln umgab, lokal vor einer Infarktentstehung geschützt wurde, während das Gewebe außerhalb des Diffusionsgebietes der Nadeln transmurale Infarkte entwickelte. Diese lokale Applikationsform wurde bisher in keiner weiteren Studie zur kardioprotektiven Wirkung der Na^+/H^+-Austauscher-Inhibition angewendet. Das hier erzielte Ergebnis einer deutlichen lokalen Wirkung der pharmakologischen Na^+/H^+-Austauscher-Blockade unterstützt und bestätigt die Feststellung einer effizienten Infarktgröße-reduzierenden Wirkung der beiden Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren BIIB513 und BIIB722 bei systemischer Infusion.

Bei den phamakologischen Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren BIIB513 und dem nahe verwandten BIIB722 handelt es sich um potente und selektive Blocker der myokardialen Na^+/H^+-Austauscher. In einer Studie von Gumina et al. [17] wurde BIIB513 (Benzamide, N-(aminoiminomethyl)-4-[4- (2-furanylcarbonyl)-1-piperazinyl]-3-(methylsulfonyl) methanesulfonate) mit HOE642, einem weiteren selektiven NHE1-Blocker verglichen. BIIB513 zeigte sich achtfach wirksamer, bezüglich seines inhibierenden Effekts auf die Wiederherstellung eines physiologischen pH-Wertes in NHE1-Wildtyp expressierenden Zelllinien. BIIB513 war außerdem 37000 mal selektiver für die Isoform 1 der Na^+/H^+-Austauscher, als für die Isoform 3.

Die in dieser Untersuchung verwendete Substanz BIIB513 wurde bisher *in vivo* an Hunde- und Rattenherzen untersucht und außerdem an isolierten Meerschweinchenherzen. In einer ersten Studie von Gumina et al. [17] wurde vor der Koronarokklusion BIIB513 in zwei systemischen Dosierungen von 0,75 und 3,0 mg/kg über die Femoralisvene infundiert. Es wurde in einer Gruppe eine 60 minütige Okklusion der LAD und in einer weiteren Gruppe eine 90 minütige Okklusion durchgeführt, gefolgt von einer dreistündigen Reperfusionsphase in beiden Gruppen. Die prozentuale Infarktgröße des Risikogebietes wurde anhand des TTC-gefärbten Myokards berechnet. Es zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie, daß die Verabreichung von BIIB513 bei 60 minütiger Ischämiedauer eine deutliche anti-nekrotische Kardioprotektion erzielt. Im Gegensatz dazu wurde jedoch auch noch bei 90 minütiger Ischämie eine kardioprotektive Wirksamkeit erzielt. Dies könnte neben den Variationen der experimentellen Protokolle die Konsequenz der unterschiedlichen Kollateralisierung des Herzens bei Hund und Schwein sein. Diesbezüglich wurde in Studien

gezeigt, daß die finale Infarktgröße von 75% beim Hundeherz erst nach dreistündiger Okklusionsdauer erreicht wird, während das anatomische Risikogebiet des Schweineherzens schon nach 45 minütiger Ischämie fast vollständig infarziert ist [278].

Die Ergebnisse einer weiteren Untersuchung von An et al. [281] am isolierten Meerschweinchenherzen zeigen, daß die kardioprotektive Wirkung der NHE1-Blockade während der Ischämie und Reperfusion besteht. Hier wurden die Tiere einer 30 minütigen Ischämie und einer 70 minütigen Reperfusion unterzogen. Die intrazelluläre Natrium- und Kalziumionenkonzentration wurde mittels Fluoreszenzindikatoren gemessen. Es zeigte sich, daß bei Kontrolltieren die intrazelluläre Natriumionenkonzentration während der Ischämie stetig und mit Beginn der Reperfusion steil anstieg und im Verlauf der Reperfusion wieder absank. Die mit BIIB513 behandelte Gruppe zeigte eine vollständige Inhibierung der ischämischen intrazellulären Natriumionenakkumulation. Der Natriumionen-Konzentrationsanstieg während der Reperfusion wurde bei den mit BIIB513 behandelten Tieren um 40% gesenkt. Die Messung des intrazellulären Kalziums, ergab nur einen 44 prozentigen Konzentrationsanstieg zu Beginn der Reperfusion im Vergleich zu den Kontrolltieren. Zusätzlich wurde die Infarktgröße als prozentualer Anteil des Gewichtes des freipräparierten und gewogenen Infarktgebietes vom Gesamtgewicht des Herzens bestimmt. Auch hier zeigte sich in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie eine Abnahme der Infarktgröße bei den mit BIIB513 behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrolltieren.

Auch an Rattenherzen wurde in einer weiteren *in vivo* Studie von Wu et al. [179] die anti-nekrotische Wirksamkeit der NHE1-Inhibition mittels BIIB513 demonstriert. BIIB513 wurde in verschiedenen systemischen Dosierungen verabreicht und anschließend die linke Koronararterie 30 Minuten okkludiert, gefolgt von einer Reperfusionsphase. Die anhand einer TTC-Färbung gemessene Infarktgröße sowie ventrikuläre Arrhythmien, wurden proportional zur pharmakologischen Dosierung von BIIB513 reduziert. Folglich konnte also die Infarktgröße-reduzierende anti-nekrotische Wirkung von BIIB513 am Schweine-, Hunde-, Ratten- und Meerschweinchenherzen nachgewiesen werden. Dies spricht für die spezies-übergreifende Wirksamkeit dieses pharmakologischen NHE1-Inhibitors.

Auch mittels anderer selektiver Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren und unter Verwendung verschiedenen Tierspezies wurden eine ganze Anzahl an *in vivo* Studien zur Reduzierung der Infarktgröße durchgeführt. Klein et al. [175] zeigte in einer *in vivo* Studie am Schweinemodell einer myokardialen 45 minütigen regionalen Ischämie und 24 stündiger Reperfusion eine reduzierte histochemisch

und histologisch nachgewiesene Infarktgröße nach intravenöser Applikation von HOE 649, einem weiteren potenten und selektiven Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitor der Isoform 1. In einer weiteren Studie von Klein et al. [15] am gleichen experimentellen Schweinemodell wurde in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit festgestellt, daß zwar bei einer Ischämiedauer von 45 Minuten, gefolgt von einer 24 stündigen Reperfusion eine Infarktgröße-Reduktion bei Verabreichung von HOE642 stattfand, jedoch bei einer Verlängerung der Ischämiedauer auf 70 bzw. 90 Minuten der Infarktgröße-reduzierende Effekt des Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitors gegenüber der Kontrollgruppe ausblieb.

Eine weitere Bestätigung der Infarktgröße-reduzierenden anti-nekrotischen Wirkung der Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitoren am *in vivo* Schweinemodell zeigten die Resultate einer Studie von Garcia-Dorado et al. [182]. Nach einer Okklusionsdauer von 55 Minuten und fünfstündiger Reperfusion konnte die Infarktgröße durch die Verabreichung von HOE642 verringert werden. Auch an Kaninchenmodellen wurden diese Ergebnisse erzielt, wobei nach 30 minütiger regionaler Ischämie durch Okklusion eines Astes der LAD und zwei bzw. dreistündiger Reperfusion eine deutliche Infarktgröße-Reduktion gefunden wurde [183,184].

3. Auswirkung der NHE1-Inhibierung auf die p38-MAPK

Im Hinblick auf den hier angestrebten Vergleich der Signaltransduktionskette der ischämischen Präkonditionierung und der NHE1-Inhibition war die Fragestellung einer möglichen Interaktion der Na^+/H^+-Austauscher mit der p38-MAPK von besonderem Interesse. In vorhergehenden biochemischen Untersuchungen der myokardialen p38α/β-MAPK-Isoformen am gleichen *in vivo* Schweinemodell der regionalen Ischämie wurde durch unsere Arbeitsgruppe gezeigt, daß die p38-MAPK einen deutlichen Anstieg ihrer Phosphorylierung mit einem Maximum zum Zeitpunkt einer 20 minütigen Ischämie verzeichnet [131]. Es zeigte sich zudem, daß sowohl die systemische als auch intramyokardiale Verabreichung des spezifischen p38-MAPK-Inhibitors SB203580 eine Infarktgröße-reduzierende Wirkung hatte [131]. Außerdem wurde festgestellt, daß innerhalb der längeren Indexischämie, welche einem durchlaufenen Präkonditionierungsprotokoll folgt, eine gesenkte Phosphorylierungsintensität vorliegt. Auch dort korrelierte die verringerte p38-MAPK-Aktivierung mit einer durch die Präkonditionierung induzierten Kardioprotektion [20]. Auch bei anderen Tierspezies wurde diese Beobachtung *in vivo* an Hundeherzen [211] und an isolierten Ratten- [21,214] und Kaninchenherzen [215] bestätigt. Die Aktivierung der p38-MAPK wird demnach als ein Ereignis

angesehen, welches letztendlich Teil einer Signaltransduktions-Kaskade ist, die zum Zelluntergang führt [131].

Um die Auswirkung der pharmakologischen NHE1-Inhibierung auf den Phosphorylierungsstatus der p38-MAPK zu untersuchen, wurden sowohl bei Kontrolltieren, als auch bei intravenös mit 3 mg/kg BIIB722 behandelten Tieren nach einer fünf-, zehn- und 15 minütigen Ischämie Drillbiopsien aus dem ischämischen Risikogebiet entnommen und biochemisch untersucht. Die Western-Blot-Analysen der jeweils zytosolischen Fraktion der Biopsien der Kontrolltiere ergaben einen mit der Dauer der Ischämie ansteigenden Gehalt an phosphorylierter p38-MAPK. So wurde für den Zeitpunkt einer fünfminütigen Ischämie ein Ansteigen der P-p38-MAPK auf 217 ± 35,2% (SEM), nach zehn Minuten auf 323,2 ± 26,4% und nach 15 Minuten auf 489,1 ± 84,9% im Vergleich zu der vor der Ischämie entnommenen Kontrolle beobachtet. Nach einer zehn- und 15 minütigen Ischämie war der Anstieg signifikant ($p < 0,05$).

Verglich man dies mit den systemisch mit BIIB722 vorbehandelten Tieren, so zeigte sich in dieser Gruppe eine inhibierte p38-MAPK-Phosphorylierung. Die P-p38-MAPK zeigte einen verhaltenen Anstieg der Phosphorylierung zu Beginn der Ischämie im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im folgenden Verlauf der Ischämie war jedoch kein weiterer Anstieg zu vermerken. Zu den Zeitpunkten einer zehn- und 15 minütigen Ischämie war die Ausprägung der P-p38-MAPK-Bande in der mit BIIB722 behandelten Gruppe signifikant schwächer als die Bande der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Dabei konnte jedoch mittels der Western-Blot-Analyse ein gleichbleibender Proteingehalt der unphosphorylierten Form der p38-MAPK sowohl bei den Kontrolltieren als auch bei den systemisch mit BIIB722 behandelten Tieren zu allen untersuchten Zeitpunkten der Ischämie festgestellt werden. Diese Inhibierung des zellschädigenden p38-MAPK-Signaltransduktionsweges wurde ebenfalls bei der ischämischen Präkonditionierung bewiesen und wäre damit beiden Schutzphänomenen gemeinsam.

Im Hinblick auf den Zusammenhang der p38-MAPK-Phosphorylierung und der NHE1-Aktivität, wurden viele gemeinsame Stimuli, wie Endothelin-1, Phenylephrin [90,282,283], osmotischer Schock [72,283] und auch der Ischämie/Reperfusion-Stress [12,108] gefunden. Es ist noch unklar, inwieweit die Aktivierung der p38-MAPK und die Stimulation des Ionenaustauschers miteinander verbunden sind. Die durch die NHE1-Aktivität regulierten intrazellulären Konditionen, wie die gesteigerte Natriumionenkonzentration und die pH-Wert-Verschiebung, könnten die Aktivität der Proteinkinasen beeinflussen. In einer *in vitro* Arbeit von Shrode et al. [284] wurde ebenfalls der Zusammenhang der NHE1-Aktivierung und des Phosphorylierungsstatus der p38-MAPK getestet.

Hier wurde der pH-Wert von U937-Zellen mittels schwacher Basen manipuliert, welcher steil anstieg und innerhalb von zehn Minuten wieder Basiswerte erreichte. Die p38-MAPK zeigte fünf Minuten nach der Alkalisierung eine gesteigerte Aktivierung, welche 30 Minuten anhielt. Die Autoren folgerten, daß Stressituationen sowohl eine Aktivierung des Na^+/H^+-Austauscher als auch der p38-MAPK bewirken, und daß einerseits die Proteinkinasenaktivierung erst nach der Austauscheraktivierung stattfindet. Andererseits wurde die Möglichkeit einer p38-MAPK-induzierten NHE1-Aktivierung nicht ausgeschlossen. Als dritte Möglichkeit wurde die Existenz paralleler Signalwege angenommen, bei denen beide vorher genannten Aktivierungsmuster stattfinden können. Diese parallelen Wege könnten in der Aktivierung gemeinsamer Substrate münden.

Es wurde gezeigt, daß die kleinen GTP-bindenden Proteine der Rho-Familie, welche innerhalb des Signaltransduktionsweges „oberhalb“ der p38-MAPK eingeordnet sind, auch die NHE-Aktivität stimulieren[285]. Bemerkenswert ist zudem, daß Cdc42, welches wiederum über das Rac-Protein Rho aktivieren kann, die Anordnung der „filopodia“ der „lammelipodia“ und der „stress fibers“ reguliert. Für NHE1 wurde eine Akkumulation nahe dieser Strukturen nachgewiesen. Folglich könnte eine Aktivierung von Cdc42 und von Rac und/oder Rho über die Interaktion zwischen NHE1 und dem Zytoskelett, sowohl in einer NHE1-Stimulation als auch in einer Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges resultieren. In der vorliegenden Studie zeigte sich, daß bei BIIB722-Applikation die Phosphorylierungsintensität der p38-MAPK im Verlauf der Ischämie gesenkt wurde. Diese Ergebnisse sprechen für eine Interaktion der p38-MAPK mit der myokardialen Isoform der Na^+/H^+-Austauscher. Eine mögliche Erklärung der kardioprotektiven Wirksamkeit der NHE1-Inhibierung wäre demzufolge, daß neben der Verhinderung einer schädigenden Kalziumionenakkumulation als ein weiterer Effekt eine kardioprotektive Deaktivierung der p38-MAPK stattfindet.

Es gibt Arbeiten, die für eine Phosphorylierung des Austauschers durch die p38-MAPK sprechen. Moor et al. [286] behandelten isolierte Ventrikelmyozyten mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB202190 und unterzogen diese einer hochgradigen chemischen Ischämie, welche sowohl die oxidative Phosphorylierung als auch die Glykolyse hemmt. Dies resultierte in einer Blockierung der Wiedererlangung eines physiologischen pH-Wertes, was wiederum für eine gehemmte Na^+/H^+-Austauscheraktivität bei p38-MAPK-Inhibierung spricht. Kusuhara et al. [287] untersuchten an „vascular smooth muscle cells“ (VSMC) die Wechselwirkungen zwischen NHE1 und der p38-MAPK nach Stimulation mit Angiotensin II. Zur Untersuchung einer pH-regulierenden NHE1-Aktivität wurden Fluoreszenzmessungen bezüglich einer Wiederherstellung eines physiologischen pH-Wertes

nach Ansäuerung der Zellen durchgeführt. Die Stimulierung mit Angiotensin II alleine resultierte in einer verbesserten Wiederherstellung des pH-Wertes. Bei Zugabe des p38-Inhibitors SKF-86002 kam es zu einer schnelleren Wiederherstellung des pH-Wertes und zu einer gesteigerten Alkalisierung im Vergleich zu den Kontrollzellen und zu den Zellen, die nur mit Angiotensin II behandelt wurden. Die Autoren folgerten, daß es durch die p38-MAPK zu einer negativen Regulation des Na^+/H^+-Austauschers kommt. Zusätzlich konnte die Phosphorylierung des NHE1 in seinem Aminosäurenabschnitt 625-747 durch die p38-MAPK nachgewiesen werden, und daß die Angiotensin II vermittelte Aktivierung der p38-MAPK mit einer Hemmung der ERK1/2 Aktivierung einhergeht. Es zeigte sich zudem eine Stimulierung der p90RSK, welche durch die ERK1/2 reguliert ist und welche als NHE1 regulierende Kinase diskutiert wird [99,286]. Die Autoren vermuteten zwei mögliche Mechanismen: einerseits eine direkte Phosphorylierung des Austauschers durch die p38-MAPK, gefolgt von einer inaktivierenden Konformationsänderung, oder andererseits, daß die aktivierte p38-MAPK eine Aktivitätssenkung der NHE1-regulierenden ERK1/2 sowie ihrer Kinasen wie z.B. der p90RSK bewirkt. So wurde bei Stimulierung mit Angiotensin II eine negativ regulierende Rolle für die p38-MAPK und eine positiv regulierende Rolle für ERK1/2 angenommen [287].

Vergleicht man diese Arbeiten mit der vorliegenden Studie, so sind die Unterschiede bezüglich der experimentellen *in vitro* Modelle und unserem *in vivo* Modell offensichtlich. Die festgestellte Phosphorylierung des Carboxylendes des NHE1 durch die p38-MAPK bei Stimulation mit Angiotensin II spricht in Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen für eine stressinduzierte Interaktion des Na^+/H^+-Austauschers mit der p38-MAPK. Die Hypothese der vorliegenden Arbeit besteht in der Annahme einer simultanen Deaktivierung der p38-MAPK innerhalb des kardioprotektiven Mechanismus der Na^+/H^+-Austauscher-Inhibierung. Unterschiedliche Rollen der im Myokard vorhandenen Isoformen p38α- und p38β-MAPK bezüglich ihrer Aktivierung und Deaktivierung durch den myokardialen Na^+/H^+-Austauscher wäre denkbar. Ein Erklärungsansatz wäre eine Interaktion des Austauschers mit der p38α-MAPK-Isoform. Bei Hypoxie wurde in einer Studie von Conrad et al. [228] eine selektive Aktivierung der p38α- und p38γ-MAPK-Isoformen festgestellt. Die p38α-MAPK-Isoform könnte mit NHE1 interagieren. Eine Stimulierung der p38α-MAPK-Isoform durch die Aktivität des Austauschers, welcher den intrazellulären pH-Wert verschiebt und zudem die Akkumulation der Natrium- und Kalziumionen herbeiführt, könnte gleichzeitig zu einer rückkoppelnden Phosphorylierung des Austauschers führen und damit zu einer weiteren Aktivitätssteigerung des NHE1. Die zweite im Myokard vorkommende p38β-MAPK-Isoform, welche bei lang andauernder Indexischämie

deaktiviert blieb [223], könnte bei anderen Stresstimuli wie z.B. mit Angiotensin II eine negative NHE1-Regulation bewirken.

4. Vergleich der ischämischen Präkonditionierung mit der NHE1-Inhibierung und die Rolle der K_{ATP}-Kanäle

4.1. Vergleich der kardioprotektiven Effizienz

Die ischämische Präkonditionierung ist ein Phänomen, bei welchem kurze Perioden der myokardialen Ischämie das Herz vor einer nachfolgenden lang andauernden Ischämie schützen [2]. Es gibt bisher nur wenige Studien, die die ischämische Präkonditionierung und die NHE1-Inhibition miteinander vergleichen bzw. mögliche Interaktionen untersuchen. Bei beiden biologischen Phänomenen handelt es sich um bekannte, reproduzierbare und effiziente Schutzmechanismen des Myokards bei Ischämie, welche bei diversen Tierspezies beobachtet werden konnten.

Vergleicht man die in der vorliegenden Studie erzielten Ergebnisse, so zeigt sich, daß bei 60 minütiger LAD-Okklusion das verwendete Präkonditionierungsprotokoll, die Infarktgröße etwa gleich stark reduzierte wie die pharmakologische Inhibierung des myokardialen Na^+/H^+-Austauschers. Der Präkonditionierungs-Schutz führte zu einer Senkung der Infarktgröße auf 31 ± 4% gegenüber der Kontrollgruppe mit 61,1 ± 2,6% ($p < 0,05$). Die Infarktgröße bei den mit BIIB513 behandelten Tieren wurde auf 43,1 ± 3,6% reduziert. Bei den beiden mit BIIB722 behandelten Gruppen wurde die Infarktgröße auf 41,4 ± 6,3% (1,5 mg/kg) und 40 ± 4,6% (3 mg/kg) gesenkt. Diese vergleichbare Effizienz der beiden kardioprotektiven Phänomene spricht wiederum für Gemeinsamkeiten dieser zwei Mechanismen im Schweinemyokard. Interaktionen zwischen beiden Signalketten auf einer oder mehreren Ebenen sind somit denkbar.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stimmen mit Studien an anderen Tierspezies und verschiedenen experimentellen Protokollen überein, in welchen eine vergleichbare Effizienz der beiden Schutzmechanismen erreicht wurde [17,19,288]. In einer *in vivo* Untersuchung [288] an Kaninchenherzen wurden bei 45 minütiger regionaler Ischämie und 150 minütiger Reperfusion die Tiere vorher entweder mit dem NHE1-Inhibitor EIPA oder einem Präkonditionierungszyklus mit einer fünfminütigen Ischämie und zehnminütiger Reperfusion behandelt. Beide experimentellen Protokolle führten zu einer gleich starken Reduktion der Infarktgröße. Die Verabreichung von HOE642 in einer am isolierten Rattenherzen

durchgeführten Studie [19] mit einer 60 minütigen globalen Indexischämie und 40 minütiger Reperfusion resultierte ebenfalls in einer gleich großen kardioprotektiven Effizienz wie ein Präkonditionierungsprotokoll mit einem Zyklus einer dreiminütigen Ischämie und dreiminütiger Reperfusion und einem zweiten Zyklus einer fünfminütigen Ischämie und einer 15 minütigen Reperfusion. Beide Behandlungsweisen erbrachten eine verbesserte und vergleichbare postischämische Erholung der Kontraktilität und der koronaren Perfusion und eine reduzierte Kreatinkinasefreisetzung während der Reperfusion.

Die Gruppe von Gumina et al. [17] kam ebenfalls zu dem Ergebnis einer bei 60 minütiger Okklusion vergleichbaren Wirksamkeit dieser beiden Schutzphänomene. Hier wurde in einer *in vivo* Studie an Hundeherzen die Effizienz der ischämischen Präkonditionierung und der NHE1-Inhibition mittels BIIB513 verglichen und Interaktionen zwischen beiden Mechanismen untersucht. Es zeigte sich, daß sich bei 60 minütiger regionaler Ischämie eine vergleichbare Infarktgröße-Reduktion durch beide Schutzmechanismen erzielen ließ. In einem 90 minütigen Okklusionsmodell wirkte dagegen nur noch die durch die NHE1-Blockierung erzielte Kardioprotektion. Beide verwendete Präkonditionierungsprotokolle, waren hier nicht mehr wirksam.

Es gibt Studien, die dafür sprechen, daß eine ischämische Präkonditionierung zu einer Steigerung der NHE1-Aktivität führt. So wurde gezeigt, daß die Stimulierung der PKC, wie sie auch in der ischämischen Präkonditionierung stattfindet, in einer NHE1-Aktivitätssteigerung resultiert [289] und daß an isolierten Rattenherzen die intrazelluläre Natriumionenkonzentration als Anzeichen einer NHE1-Aktivität bei präkonditionierten Tieren schon während der Präkonditionierungszyklen anstieg. In einer Arbeit von Ramasamy et al. [290] zeigte die intrazelluläre Natriumionenkonzentration während der Indexischämie einen steileren Anstieg bzw. in der Reperfusion einen rasanteren Konzentrationsabfall im Vergleich zu Kontrolltieren. Bei Zusatz von NHE1-Inhibitoren zum Perfusat konnten diese Effekte der Präkonditionierung abgeschwächt werden. Die Autoren schlossen auf einen Mechanismus, durch welchen die Aktivität der kardialen Na^+/H^+-Austauscher und des Natrium-Kalzium-Austauschers durch die ischämische Präkonditionierung gesteigert würde. Sie hypothetisierten, daß bei präkonditionierten Tieren die präischämische Aktivierung und Translokation der PKC zu einer Stimulierung der Na^+/H^+-Austauscher führen würde und damit zu einer Begrenzung des pH-Wertabfalls während der Indexischämie, so daß die NHE1-Aktivität notwendig sei für den Mechanismus der Präkonditionierung. Folglich wäre die Aktivität der Na^+/H^+-Austauscher innerhalb des Präkonditionierungsgeschehens von Bedeutung. Aufgrund des nachgewiesenen schädigenden Einflusses der NHE1, ist jedoch eher

davon auszugehen, das es sich bei einer induzierten NHE1-Aktivität während der ischämischen Präkonditionierung um einen Nebeneffekt handelt, der den Präkonditionierungseffekt negativ beeinflußt, und der bei gleichzeitiger NHE1-Inhibition verhindert werden kann, wie es der additive Effekt einer simultanen NHE1-Blockade bei der ischämischen Präkonditionierung zeigte. Es wurde festgestellt, daß eine Kombination der Präkonditionierung mit einer BIIB513-Verabreichung bei 90 minütiger Ischämie zu einer mehr als additiven Reduktion der Infarktgröße führte. Auch die schon oben erwähnten Studien an isolierten Rattenherzen zeigten einen additiven Effekt bei simultaner NHE1-Inhibition und ischämischer Präkonditionierung [19]. Die Autoren beider Studien schlossen auf entweder verschiedene Schutzmechanismen oder als weitere Möglichkeit, daß die bei einer Präkonditionierung stimulierte NHE1-Aktivität ein schädigendes Begleitphänomen darstelle, welche die kardioprotektive Effizienz der Präkonditionierung mindere [17,19].

4.2. Mitochondriale K_{ATP}-Kanäle als Effektoren der ischämischen Präkonditionierung

Am Schweineherz wurde der Myokardschutz, welcher einem Präkonditionierungsprotokoll folgt, vielfach bewiesen [234,235,241]. Die Aktivierung der ATP-abhängigen Kaliumkanäle gilt seit einigen Jahren als ein wichtiger Mechanismus innerhalb der ischämischen Präkonditionierung. In Studien am Schwein wurde *in vivo* einerseits gezeigt, daß durch die pharmakologische Öffnung der K_{ATP}-Kanäle mit Bimakalim bei 60 minütiger Okklusion und 120 minütiger Reperfusion eine Reduktion der Infarktgröße erzielt wird, welche vergleichbar war mit der präkonditionierten Gruppe [291]. Andererseits führte die Blockade der K_{ATP}-Kanäle mittels einer Verabreichung von Glibenclamid zu einer Aufhebung des Präkonditionierungsschutzes [242,291]. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte in vorausgehenden Studien die Rolle der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle. Diese werden heute im Gegensatz zu den sarkolemmalen K_{ATP}-Kanälen als die Effektoren der ischämischen Präkonditionierung angesehen [274]. Es konnte *in viv*o am Schweineherz gezeigt werden, daß bei einer 60 minütigen Indexischämie der Präkonditionierungsschutz zwar mittels des ubiquitären K_{ATP}-Kanal-Blockers Glibenclamid, jedoch nicht durch die Verabreichung von HMR1098, einem selektiven sarkolemmalen K_{ATP}-Kanal-Blocker, inhibiert wurde. Dies wies auf eine entscheidende Rolle der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle im Präkonditionierungs-Mechanismus am Schweineherzen hin [292].

Auch in einer Studie von van Winkle et al. [293] konnte am Schweinemodell gezeigt werden, daß die alleinige Inhibierung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle durch 5-Hydroxydecanoate einen durch einen Adenosinagonisten ausgelösten Präkonditionierungsschutz blockieren konnte.

Andere Gruppen erzielten an anderen Tierspezies unterstützende Ergebnisse dieser Hypothese [254,266,274]. Am Hundeherz wurde in einer *in vivo* Studie von Gross et al. [3] gezeigt, daß Glibenclamid und der selektiv mitochondriale K_{ATP}-Kanal-Blocker 5-Hydroxydecanoate (5-HD) den durch die Präkonditionierung erzielten Herzschutz blockieren. Zudem konnte demonstriert werden, daß der K_{ATP}-Kanal-Öffner Aprikalim den Infarktgröße-reduzierenden Präkonditionierungseffekt auslösen konnte. Auch am Kaninchenherzen wurden *in vivo* ähnliche Ergebnisse erzielt, dahingehend daß unter Verwendung des selektiv mitochondrialen K_{ATP}-Kanal-Öffners Diazoxid die gleiche Infarktgröße-Verminderung wie durch ein Präkonditionierungsprotokoll erreicht wurde. Dieser Effekt konnte durch 5-Hydroxydecanoate aufgehoben werden [266].

In einer neuesten Studie [294] wurde an submitochondrialen Partikeln vom Schweinemyokard gezeigt, daß Diazoxid den Succinatstoffwechsel hemmt und zusätzlich keine Membrandepolarisierung auslöst, welche bei einer K_{ATP}-Aktivierung stattfinden sollte [262]. Außerdem stellte man fest, daß 5-HD ein Substrat der Acetyl-CoA-Synthetase ist und folglich als 5-HD-CoA-Komplex auch andere unspezifische Effekte hat, wie beispielsweise eine Beeinflussung der Elektronentransportkette. Es wurde hypothetisiert, daß die bekannten kardioprotektiven Effekte der pharmakologischen Präkonditionierung mittels K_{ATP}-Kanal-Modulatoren auf eine Hemmung der mitochondrialen Atmungskette und nicht ausschließlich auf die Aktivierung mitochondrialer K_{ATP}-Kanäle zurückzuführen ist. Sollten sich diese *in vitro* Ergebnisse in weiteren Studien bestätigen, so spricht dennoch die Tatsache der trotz 5-HD-Applikation aufrechterhaltenen NHE1-Protektion für zwei verschiedene Signaltransduktionswege im Vergleich der ischämischen Präkonditionierung und NHE1-Inhibition. Während die ischämische Präkonditionierung von Prozessen auf mitochondrialer Ebene abhängt, funktioniert die NHE1-Inhibition wahrscheinlich unabhängig vom mitochondrialen Stoffwechsel.

4.3. Rolle der K_{ATP}-Kanäle bei der NHE1-Inhibierung

In der vorliegenden Studie wurde die Rolle der K_{ATP}-Kanäle bei der NHE1-Inhibierung untersucht. Auch im Hinblick darauf, ob die Aktivierung dieser Effektoren einen beiden Schutzphänomenen gemeinsamen Mechanismus darstellt.

Im experimentellen Modell wurde in systemischer Gabe entweder Glibenclamid, ein sowohl sarkolemmaler als auch mitochondrialer K_{ATP}-Kanal-Blocker, oder 5-Hydroxydecanoat, ein selektiv mitochondrialer K_{ATP}-Kanal-Blocker, verabreicht und simultan der Na^+/H^+-Austauscher-Inhibitor BIIB722 lokal in das Myokardium des zu erwartenden Risikogebietes infundiert. Anschließend wurde das Ischämie-Reperfusionsprotokoll durchgeführt. Es wurde trotz K_{ATP}-Kanal-Blockade ein lokaler Myokardschutz im Gebiet um die BIIB722-Infusionsnadeln erzielt. Dies spricht innerhalb der kardioprotektiven Inhibierung der Na^+/H^+-Austauscher für einen Mechanismus unabhängig von einer Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle. Somit scheinen die beiden Schutzphänomene der ischämischen Präkonditionierung und der NHE1-Inhibierung auf verschiedenen Mechanismen zu basieren.

Im Einklang mit unseren Ergebnissen standen die Resultate der Gruppe Sato et al. [295], welche eine Studie an isolierten Kaninchenherzen durchführten. Hier wurde der durch den NHE1-Inhibitor „5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride“ (EIPA) erzielte Myokardschutz bei simultaner Glibenclamidverabreichung nicht aufgehoben. Isolierte Kaninchenherzen wurden einer 30 minütigen Ischämie und einer darauffolgenden zweistündigen Reperfusion unterzogen. Eine präischämische Gabe von EIPA konnte die Infarktgröße reduzieren. Bemerkenswert ist, daß auch die simultane Gabe des PKC-Inhibitors Polymyxin B und EIPA den durch NHE1-Blockade resultierenden Schutzeffekt nicht beeinflusste. Die Inhibierung der PKC führte in den meisten Studien zu einer Blockierung des Schutzeffektes der ischämischen Präkonditionierung und gilt als ein weiterer wesentlicher Faktor. Zudem wurden zur Untersuchung einer möglichen additiven Wirkung die ischämische Präkonditionierung und die NHE1-Inhibition kombiniert. Die resultierende Infarktgröße entsprach jedoch der bei alleiniger Präkonditionierung oder NHE1-Blockade erzielten. Die Autoren folgerten aus ihren Ergebnissen, daß die Na^+/H^+-Austauscher-Blockade und die ischämische Präkonditionierung das ischämische Herz durch verschiedene Mechanismen schützen [295].

Auch die Ergebnisse zweier weiterer Untersuchungen sprechen für unterschiedliche Mechanismen der ischämischen Präkonditionierung und der NHE1-Inhibition. Hier wurde einerseits *in vivo* an Hundeherzen gezeigt, daß eine bei 60 minütiger Okklusionsdauer durch NHE1-Inhibition mit EMD85131 erreichte Infarktgröße-Reduktion auch bei einer Blockade der K_{ATP}-Kanäle mittels Glibenclamid und auch bei einer Gabe des nicht-selektiven Adenosin-Rezeptorantagonisten PD 115119 aufrechterhalten wurde [296]. In einer weiteren Studie von Gross et al. [297] am selben Hundemodell konnte demonstriert werden, daß auch bei Herzen, bei welchen der zeitlich begrenzte Schutzeffekt der ischämischen Präkonditionierung nicht mehr

ausgelöst werden konnte, die kardioprotektive Effizienz der NHE1-Inhibition noch erzielt werden konnte.

Kontroverse Ergebnisse wurden in einer Untersuchung von Miura et al. [298] erzielt, in welcher Kaninchenherzen *in vivo* einer 30 minütigen koronaren Okklusion und einer dreistündigen Reperfusion unterzogen wurden. Der selektive Na^+/H^+-Austauscher 1-Inhibitor Cariporid, welcher die Infarktgröße um die Hälfte reduzierte, verlor in Kombination mit der Gabe von Glibenclamid seine Wirksamkeit. Es konnte keine Abnahme der Infarktgröße erreicht werden. Weiterhin wurde an isolierten Kaninchenherzen, bei welchem nach 30 minütiger Ischämie, eine zweistündige Reperfusion folgte, der Effekt des selektiv mitochondrialen K_{ATP}-Kanal-Blockers 5-HD und des selektiv sarkolemmalen K_{ATP}-Kanal-Blockers HMR1098 auf die auch hier Infarktgröße-mindernde Wirkung des Cariporids getestet. Der Cariporidschutz wurde mittels 5-HD aufgehoben, HMR1098 zeigte keine Wirkung. Es wurde daraus geschlossen, daß im Schutzmechanismus der NHE1-Inhibition eine Aktivierung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle stattfindet. Jedoch konnte an Kardiomyozyten anhand der Messung der endogenen Flavoprotein-Fluoreszenz kein Effekt des NHE1-Inhibitors EIPA auf die Aktivität der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle festgestellt werden. Es erfolgte keine mitochondriale Flavoprotein-Oxidation. Die Autoren folgerten, daß eine indirekte Modulation der Kanäle durch regulatorische Faktoren möglich sei und daß die Inhibierung der kardialen Na^+/H^+-Austauscher über eine Öffnung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle zu einer Minderung der mitochondrialen Kalziumüberladung führe. Diese wird als ein möglicher Mechanismus des Myozytenschadens angesehen.

Diese gegensätzlichen Ergebnisse könnten dahingehend erklärbar sein, daß die Aktivierung der mitochondrialen K_{ATP}-Kanäle des weiteren von den experimentellen Konditionen, insbesondere der Tierspezies abhängig ist. Erwähnenswert ist, daß eine frühere Studie der Gruppe Miura et al. [183], in der am gleichen experimentellen Modell die Wirkung des PKC-Inhibitors Polymyxin B auf den durch HOE642 verliehenen Myokardschutz getestet wurde, keine Blockierung der Infarkt-reduzierenden Wirkung des NHE1-Inhibitors HOE642 zu verzeichnen war. So zeigte sich, daß auch in diesem Modell ein unterschiedlicher Mechanismus der ischämischen Präkonditionierung und der NHE1-Inhibition gegeben sein muß.

5. Schlußfolgerung

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß am Schweinemyokard die NHE1-Inhibition mittels BIIB513 und BIIB722 bei 60 minütiger Ischämie zu einer deutlichen Reduktion der Infarktgröße führte. Diese erzielte Infarktgrößen-Verringerung ist vergleichbar mit der ischämischen Präkonditionierung. Bei einer Verlängerung der Ischämie auf 90 Minuten ist die NHE1-Inhibition, wie es auch für die ischämische Präkonditionierung gezeigt wurde, nicht mehr kardioprotektiv wirksam. Außerdem war die lokale anti-nekrotische Wirksamkeit der NHE1-Inhibierung unabhängig von einer Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle. Zudem führte die pharmakologische NHE1-Blockade zu einer Deaktivierung der p38-MAPK während der Ischämie. Diese Ergebnisse liefern einen entscheidenden Hinweis für die Richtigkeit der Hypothese, daß die ischämische Präkonditionierung und die pharmakologische NHE1-Inhibierung auf Schutzmechanismen beruhen, welche sich auf mitochondrialer Ebene unterscheiden, welche jedoch bezüglich ihrer vergleichbaren kardioprotektiven Effizienz und der deaktivierenden Wirkung auf die p38-MAPK Gemeinsamkeiten innerhalb der Signaltransduktionskette haben könnten. Auch wären Interaktionen zwischen beiden Schutzmechanismen denkbar.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es am Schweinemodell *in vivo* die kardioprotektive Wirkung der Inhibition der myokardialen Natrium-Protonen-Austauscher (NHE1) mit den neuen pharmakologischen Blockern BIIB513 und BIIB722 sowie den dazugehörigen Wirkungsmechanismus zu untersuchen und mit der ischämischen Präkonditionierung zu vergleichen. Hierzu wurden die NHE1-Inhibitoren sowohl systemisch als auch über feine Nadeln lokal-intramyokardial verabreicht und eine 60 oder 90 minütige Ischämie induziert, indem der Ramus interventricularis paraconalis der linken absteigenden Koronararterie (LAD) reversibel okkludiert wurde. Es folgte jeweils eine 60 minütige Reperfusion. Bei der Kontrollgruppe zeigte sich nach 60 minütiger Ischämie eine Infarktgröße (IS) von 61,1%. Die systemische Verabreichung von BIIB513 reduzierte diese auf 43,1% (1,5mg/kg). Bei systemischer BIIB722-Applikation verringerte sie sich auf 41,4% (1,5mg/kg) und 40,0% (3mg/kg) ($p < 0,05$). Die NHE1-Blockade zeigte auch bei intramyokardialer Applikation eine lokal-anti-nekrotische Wirksamkeit, indem das Myokard im Infusionsgebiet der Nadeln vor der Infarktentstehung geschützt blieb. Im Vergleich mit der NHE1-Inhibition zeigte die ischämische Präkonditionierung eine etwa gleich starke Infarktgröße-reduzierende Effizienz. Das Präkonditionierungsprotokoll von jeweils zwei Zyklen einer 10 minütigen Ischämie und 10 minütiger Reperfusion reduzierte die Infarktgröße auf 31%. Außerdem wurde gezeigt, daß bei einer Verlängerung der Ischämiedauer auf 90 Minuten die NHE1-Inhibierung keine Infarktgröße-verringernde Wirkung mehr hatte.

Im weiteren Verlauf der Studie wurde, im Hinblick auf den Vergleich der beiden Wirkungsmechanismen der NHE1-Inhibierung und der ischämischen Präkonditionierung, die Rolle der ATP-abhängigen Kaliumkanäle (K_{ATP}-Kanäle) und der p38-MAPK bei der NHE1-Inhibierung untersucht. Diesbezüglich findet sich in der Literatur, daß innerhalb der Signaltransduktionskette der ischämischen Präkonditionierung eine Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle und eine Inhibierung der p38-MAPK stattfindet [131,266,274].

Hierfür wurde eine simultane Blockade der K_{ATP}-Kanäle während der BIIB722 vermittelten NHE1-Inhibition erzeugt. Es wurden jeweils die pharmakologischen K_{ATP}-Kanal-Blocker Glibenclamid und 5-Hydroxydecanoat systemisch verabreicht und gleichzeitig BIIB722 intramyokardial infundiert. Der BIIB722-vermittelte lokal-anti-nekrotische Myokardschutz blieb erhalten. Dies spricht dafür, daß eine Aktivierung der K_{ATP}-Kanäle innerhalb des Schutzphänomens der NHE1-Blockade nicht stattfindet.

Zudem wurde mittels einer Western-Blot-Analyse die phosphorylierte Form der p38-MAPK (P-p38-MAPK) in der zytosolischen Fraktion von Gewebeproben von Tieren bestimmt, welche nach einer Vorbehandlung mit BIIB722, zu den Zeitpunkten eines fünf-, zehn- und 15 minütigen LAD-Verschlusses aus dem Ischämiegebiet des linken Ventrikels entnommen wurden. Bei Kontrolltieren ergab sich ein mit zunehmenden Dauer der Ischämie ansteigender P-p38-MAPK-Gehalt, welcher nach zehn minütiger (323,2%) und 15 minütiger Ischämie (489,1%) im Vergleich zu präischämisch entnommenen Kontrollbiopsien des unstimulierten Myokards (100%) signifikant war ($p \leq 0,05$). Die Untersuchung des Phosphorylierungsstatus der p38-MAPK bei Ischämie unter dem Einfluß der NHE1-Inhibierung, ergab hingegen nur eine verhaltene Zunahme zu Beginn der Ischämie und zeigte im Verlauf keinen weiteren Anstieg. Nach zehn Minuten zeigte sich der maximale Gehalt der P-p38-MAPK bei 158,3% ($p < 0,05$), welcher nach 15 Minuten wieder absank. Die P-p38-MAPK-Bande der mit BIIB722 behandelten Gruppe war somit signifikant geringer im Vergleich zu dem Gehalt der P-p38-MAPK der Kontrollgruppe ($p < 0,05$). Diese kardioprotektive p38-MAPK-Dephosphorylierung ist somit beiden Schutzphänomenen gemeinsam. Untersuchte man die unphosphorylierte Form der p38-MAPK, so zeigte sich anhand der gleich stark ausgeprägten Banden auf einer Höhe von 38 kDa ein gleichbleibender Gehalt der unphosphorylierten p38-MAPK.

Die in der Literatur oftmals vertretene Hypothese, daß die ischämische Präkonditionierung und die Na^+/H^+-Austauscher-Inhibition nicht auf einem gemeinsamen Wirkmechanismus zurückzuführen sind, wird durch die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung bestätigt: Es wurde gezeigt, daß die pharmakologische NHE1-Inhibition K_{ATP}-Kanal-unabhängig ist, während die ischämische Präkonditionierung nachweislich eine K_{ATP}-Kanal-Aktivierung bewirkt. Die beiden Phänomene zeigten jedoch auch vergleichbare Effekte: Erstens eine gleich starke Infarktgröße-reduzierende Effizienz bei 60 Minuten, welche zeitlich auf eine Stunde begrenzt und somit transient war und zweitens eine kardioprotektive Deaktivierung der p38-MAPK. Diese Überschneidungen sprechen für Gemeinsamkeiten dieser beiden Schutzmechanismen im Schweinemyokard. Interaktionen zwischen beiden Signalketten auf einer oder mehreren Ebenen sind somit denkbar.

VII. SUMMARY

This study compared the cardioprotective efficacy of ischemic preconditioning (IP) and myocardial sodium-hydrogen-exchanger (NHE1) inhibition and examined the interactions between NHE1-inhibition and IP. In a porcine model of left anterior descending artery (LAD)-occlusion, either IP, produced by two cycles of 10-minute LAD-occlusion and 10-minute of reperfusion, or one of the the new pharmacological inhibitors BIIB513 (1.5 mg/kg) and BIIB722 (1.5 and 3 mg/kg) were administered before a 60-minute LAD-occlusion followed by one hour of reperfusion. BIIB722 was also tested in pigs treated with 90-minute ischemia and one hour of reperfusion. The infarct size (IS) was determined by TTC-staining and expressed as a percentage of the area at risk. Althrough both IP and the NHE1-inhibition produced comparable and significant reductions in IS in the 60-minutes occlusion model, insignificant reduction in IS by BIIB722 was observed in the 90-minute occlusions model. Compared with control animals (IS=61.1%), IP reduced the IS to 31%, BIIB513 (1.5 mg/kg) to 43.1% and BIIB722 (1.5 and 3 mg/kg) to 41.4% and 40.0%. Furthermore BIIB722 was also given via intramyocardial (50μM in NaCl/DMSO) microinfusion-needles into the prospective area at risk before a 60-minute ischemia followed by one hour of reperfusion. A marked myocardial protection was shown by the presence of viable (TTC-stained) myocardium around microinfusion-needles delivering BIIB722 that was not seen around needles with solvent.

Since IP was first described numerous factors such as the K_{ATP}-channel-activation and the p38-MAPK-pathway have been shown to contribute to its cardioprotective effect. Pharmacologic inhibition of the K_{ATP}-channel has been shown to block IP [266,274]. Furthermore, p38-MAPK-stimulation, which is known to be the cause for accelerated cell death, is inhibited by IP [131]. To investigate whether IP and NHE1-Inhibition convey protection through distinct or similar mechanisms the role of K_{ATP}-channel-activation and the p38-MAPK-pathway in NHE1-inhibition were explored. Despite the simultaneous systemic application of either Glibenclamide, a sarcolemmal and mitochondrial K_{ATP}-channel-blocker or 5-Hydroxydecanoate (5-HD), a specific mitochondrial K_{ATP}-channel-blocker, the local-antinecrotic effect of intramyocardial BIIB722-microinfusion was maintained. Apparently K_{ATP}-channel-activation does not occur during NHE1-Inhibition.

Next the amount of dual-phosphorylated p38-MAPK (Thr180/Tyr182) was measured by Western blot analysis during index ischemia that followed the systemic infusion of BIIB722 or the solvent. The ventricular drill biopsies were taken from nonischemic (control) and also from the ischemic myocardium at various timepoints of LAD-occlusion. In the solvent-treated group there was a significant

increase of phospho-p38-MAPK during ischemia with a maximum reached at 15 minutes of occlusion (489.1%) compared with nonischemic myocardium (100%). The BIIB722 treatment significant reduced the content of phospho-p38-MAPK of myocardium at 10-minute of ischemia (158.3% vs. 323.2% of solvent treated group). Thus, cardioprotective p38-MAPK-dephosphorylation, which also occured during IP, is a common mechanism of NHE1-inhibition and IP induced cardioprotection. The content of nonphosphorylated p38-MAPK remained unchanged in solvent- and BIIB722 treated tissue.

The results of these study support the hypothesis that the cardioprotective effects of IP and NHE1-inhibition do not occur via identical pathways. The cardioprotection by pharmacological NHE1-inhibiton appears to be independent of mitochondrial processes, while IP is at least partly mediated by mitochondrial K_{ATP}-channel-activation. On the other hand, both IP and NHE1-inhibition provide comparable cardioprotection against 60 minutes of myocardial ischemia and also both result in a deactivation of the detrimental p38-MAPK-pathway. Furthermore, NHE1-inhibition failed to protect the heart against a prolonged ischemic insult (90 minutes), like it has been reported for the IP phenomenon. Thus, while the cardioprotective effects of IP and NHE1-inhibition in the pig myocardium are not mediated by identical pathways, there may still be some overlapping mechanisms or crosstalk between these pathways.

VIII. Abkürzungen

5-HD	5-Hydroxydecanoat
A.	Arteria
ATF	activation transcription factor 2
ATP	Adenosintriphosphat
BMK1	big-MAPK1 (ERK3/ERK5)
BSA	Bovines Serumalbumin
CaM	Calmodulin
Cdc42	cell division cycle 42
CHP	calcineurin B homolog protein
CO	koronare Okklusion/Ischämie
CREB	cAMP-response element-binding protein
DTT	Dithiotreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylene-Glycol-bis-(Aminoethylether)-tetraacetic acid
ELK-1	human homolog of the avian erythroblastosis E26 oncogene
ERK	extrazellulär regulated kinase
FGF	fibroblast growth factor
GPCR	G-protein coupeled factor
GRB-2	growth factor receptor-bound protein 2
HCl	Salzsäure
hsp70	heat shock protein 70
IA	Infarktgebiet
Il-1	Interleukin 1
IS	Infarktgröße
JNK	c-jun-NH_2–terminal kinase
K	Kontrolle
K_{ATP}-Kanal	ATP-abhängiger Kalzium-Kanal
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
Konz.	Konzentration
LAD	linke absteigende Koronararterie
LSP	lymphocyte-specific protein
μM	Mikromolar
M	Molar (mol/l)
MAPK	mitogen activating proteinkinase
MAPKAP-K2/3	MAPK activated protein kinase
MAPKK	mitogen activating proteinkinase kinase

MAPKKK	mitogen activating proteinkinase kinase kinase
MEF2	myocyte enhance factor
MEK	MAP/ERK kinase
MEKK	MAP/ERK kinase kinase
m-SOS	mammalian-son of sevenless protein
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (oxidierte Form)
$NADH_2$	Nicotinamid-adenin-dinucleotid (reduzierte Form)
NaF	Natriumflurid
NHE	Natrium-Protonen-Austauscher
p38-MAPK	p38-mitogen activating proteinkinase (nicht phosphoryliert)
P-p38-MAPK	phospho-p38-mitogen activating proteinkinase (phosphoryliert)
PBS	Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PDGF	plateled dirived growth factor
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenyl-Methyl-Sulfonyl-Fluoride
PRAK	p38 regulated/activated kinase
Pro	Prolin
RA	Risikogebiet
Rac1	RAS-related C3 botulinumtoxin
Ras	rat sarcoma protein
RP	Reperfusion
Sap	SRF-accessory protein
SAPK	stress activated protein kinases
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
Ser	Serin
TBS	Tris-Base-Saline
Thr	Threonin
TNFα	tumor necrosis factor α
TKR	tyrosin kinase receptor
Tyr	Tyrosin
U	Enzymaktivitätseinheit
V	Vena

IX. Literaturverzeichnis

1. Deutschland SB. Statistisches Jahrbuch für die Bundesrepublick Deutschland. 1999;

2. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74:1124-36.

3. Gross GJ, Auchampach JA. Blockade of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res*. 1992;70:223-33.

4. Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol*. 1993;264:H1327-36.

5. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol*. 1994;266:H1145-52.

6. Garratt KN, Brady PA, Hassinger NL, Grill DE, Terzic A, Holmes DR, Jr. Sulfonylurea drugs increase early mortality in patients with diabetes mellitus after direct angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 1999;33:119-24.

7. Cleveland JC, Jr., Meldrum DR, Cain BS, Banerjee A, Harken AH. Oral sulfonylurea hypoglycemic agents prevent ischemic preconditioning in human myocardium. Two paradoxes revisited. *Circulation*. 1997;96:29-32.

8. Karmazyn M. Amiloride enhances postischemic ventricular recovery: possible role of Na+-H+ exchange. *Am J Physiol*. 1988;255:H608-15.

9. Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol*. 1985;17:1029-42.

10. Tani M, Neely JR. Na+ accumulation increases Ca2+ overload and impairs function in anoxic rat heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1990;22:57-72.

11. Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res*. 1990;66:135-46.

12. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na(+)-H(+) exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circulation Research*. 1999;85:777-86.

13. Fröhlich O, Karmazyn M. The Na-H exchanger revisited: an update on Na-H exchange regulation and the role of the exchanger in hypertension and cardiac function in health and disease. *Cardiovascular Research*. 1997;36:138-148.

14. Fliegel L, Fröhlich O. The Na+/H+ exchanger: an update on structure, regulation and cardiac physiology. *Biochemical Journal*. 1993;296:273-85.

15. Klein HH, Bohle RM, Pich S, Lindert-Heimberg S, Wollenweber J, Nebendahl K. Time delay of cell death by Na+/H+-exchange inhibition in regionally ischemic, reperfused porcine hearts. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1997;30:235-40.

16. Sack S, Mohri M, Schwarz ER, Arras M, Schaper J, Ballagi-Pordany G, Scholz W, Lang HJ, Scholkens BA, Schaper W. Effects of a new Na+/H+ antiporter inhibitor on postischemic reperfusion in pig heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1994;23:72-8.

17. Gumina RJ, Buerger E, Eickmeier C, Moore J, Daemmgen J, Gross GJ. Inhibition of the Na(+)/H(+) exchanger confers greater cardioprotection against 90 minutes of myocardial ischemia than ischemic preconditioning in dogs. *Circulation*. 1999;100:2519-26; discussion 2469-72.

18. Bugge E, Ytrehus K. Inhibition of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart--a protective additive to ischaemic preconditioning. *Cardiovasc Res*. 1995;29:269-74.

19. Shipolini AR, Yokoyama H, Galinanes M, Edmondson SJ, Hearse DJ, Avkiran M. Na+/H+ exchanger activity does not contribute to protection by ischemic preconditioning in the isolated rat heart. *Circulation*. 1997;96:3617-25.

20. Barancik M, Htun P, Maeno Y, Zimmermann R, Shaper W. Differential regulation of distinct protein kinase cascades by ischemia and ischemia/reperfusion in porcine myocardium. *Circulation*. 1997;96:I-252 (abstr).

21. Marais E, Genade S, Huisamen B, Strijdom JG, Moolman JA, Lochner A. Activation of p38 MAPK induced by a multi-cycle ischaemic preconditioning protocol is associated with attenuated p38 MAPK activity during sustained ischaemia and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:769-778.

22. Grinstein S, Rotin D, Mason MJ. Na+/H+ exchange and growth factor-induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1989;988:73-97.

23. Mahnensmith RL, Aronson PS. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. *Circulation Research*. 1985;56:773-88.

24. Rajotte D, Haddad P, Haman A, Cragoe EJ, Jr., Hoang T. Role of protein kinase C and the Na+/H+ antiporter in suppression of apoptosis by granulocyte macrophage colony-stimulating factor and interleukin-3. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:9980-7.

25. Li J, Eastman A. Apoptosis in an interleukin-2-dependent cytotoxic T lymphocyte cell line is associated with intracellular acidification. Role of the Na(+)/H(+)-antiport. *Journal of Biological Chemistry*. 1995;270:3203-11.

26. Zhu WH, Loh TT. Effects of Na+/H+ antiport and intracellular pH in the regulation of HL-60 cell apoptosis. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1995;1269:122-8.

27. Demaurex N, Grinstein S. Na+/H+ antiport: modulation by ATP and role in cell volume regulation. *Jounal of Experiental Biology*. 1994;196:389-404.

28. Moolenaar WH, Tsien RY, van der Saag PT, de Laat SW. Na+/H+ exchange and cytoplasmic pH in the action of growth factors in human fibroblasts. *Nature*. 1983;304:645-648.

29. Counillon L, Pouyssegur J. The expanding family of eucaryotic Na(+)/H(+) exchangers. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275:1-4.

30. Numata M, Petrecca K, Lake N, Orlowski J. Identification of a mitochondrial Na+/H+ exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. 1998;273:6951-9.

31. Ritter M, Fuerst J, Wöll E, Chwatal S, Gschwentner M, Lang F, Deetjen P, Paulmichl M. Na+/H+ exchangers: linking osmotic dysequilibrium to modified cell funktion. *Cell Physiol Biochem*. 2001;11:1-18.

32. Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. 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. *Journal of Biological Chemistry*. 1992;267:9331-9.

33. Orlowski J, Grinstein S. Na+/H+ exchangers of mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*. 1997;272:22373-6.

34. Wakabayashi S, Shigekawa M, Pouyssegur J. Molecular physiology of vertebrate Na+/H+ exchangers. *Physiological Reviews*. 1997;77:51-74.

35. Coupaye-Gerard B, Bookstein C, Duncan P, Chen XY, Smith PR, Musch M, Ernst SA, Chang EB, Kleyman TR. Biosynthesis and cell surface delivery of the NHE1 isoform of Na+/H+ exchanger in A6 cells. *American Journal of Physiology*. 1996;271:C1639-45.

36. Noel J, Roux D, Pouyssegur J. Differential localization of Na+/H+ exchanger isoforms (NHE1 and NHE3) in polarized epithelial cell lines. *Journal of Cell Science*. 1996;109:929-39.

37. Lee MG, Schultheis PJ, Yan M, Shull GE, Bookstein C, Chang E, Tse M, Donowitz M, Park K, Muallem S. Membrane-limited expression and regulation of Na+-H+ exchanger isoforms by P2 receptors in the rat submandibular gland duct. *Journal of Physiology*. 1998;513:341-57.

38. Anderie I, Blum R, Haase W, Grinstein S, Thevenod F. Expression of NHE1 and NHE4 in rat pancreatic zymogen granule membranes. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1998;246:330-6.

39. Lee MG, Ahn W, Choi JY, Muallem S, Kim KH. A novel Na+-dependent transporter and NHE3 mediate H+ efflux in the luminal membrane of the pancreatic duct: regulation by cAMP. *Journal of Korean Medical Science*. 2000;15:S29-30.

40. Roussa E, Alper SL, Thevenod F. Immunolocalization of anion exchanger AE2, Na(+)/H(+) exchangers NHE1 and NHE4, and vacuolar type H(+)-ATPase in rat pancreas. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 2001;49:463-74.

41. Bookstein C, DePaoli AM, Xie Y, Niu P, Musch MW, Rao MC, Chang EB. Na+/H+ exchangers, NHE-1 and NHE-3, of rat intestine. Expression and localization. *Journal of Clinical Investigation*. 1994;93:106-13.

42. Hoogerwerf WA, Tsao SC, Devuyst O, Levine SA, Yun CH, Yip JW, Cohen ME, Wilson PD, Lazenby AJ, Tse CM, Donowitz M. NHE2 and NHE3 are human and rabbit intestinal brush-border proteins. *American Journal of Physiology*. 1996;270:G29-41.

43. Wang Z, Orlowski J, Shull GE. Primary structure and functional expression of a novel gastrointestinal isoform of the rat Na/H exchanger. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:11925-8.

44. Tse CM, Levine SA, Yun CH, Montrose MH, Little PJ, Pouyssegur J, Donowitz M. Cloning and expression of a rabbit cDNA encoding a serum-activated ethylisopropylamiloride-resistant epithelial Na+/H+ exchanger isoform (NHE-2). *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:11917-24.

45. Biemesderfer D, Reilly RF, Exner M, Igarashi P, Aronson PS. Immunocytochemical characterization of Na(+)-H+ exchanger isoform NHE-1 in rabbit kidney. *American Journal of Physiology*. 1992;263:F833-40.

46. Soleimani M, Singh G, Bizal GL, Gullans SR, McAteer JA. Na+/H+ exchanger isoforms NHE-2 and NHE-1 in inner medullary collecting duct cells. Expression, functional localization, and differential regulation. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:27973-8.

47. Sun AM, Liu Y, Dworkin LD, Tse CM, Donowitz M, Yip KP. Na+/H+ exchanger isoform 2 (NHE2) is expressed in the apical membrane of the medullary thick ascending limb. *Journal of Membrane Biology*. 1997;160:85-90.

48. Chambrey R, Warnock DG, Podevin RA, Bruneval P, Mandet C, Belair MF, Bariety J, Paillard M. Immunolocalization of the Na+/H+ exchanger isoform NHE2 in rat kidney. *American Journal of Physiology*. 1998;275:F379-86.

49. Biemesderfer D, Pizzonia J, Abu-Alfa A, Exner M, Reilly R, Igarashi P, Aronson PS. NHE3: a Na+/H+ exchanger isoform of renal brush border. *American Journal of Physiology*. 1993;265:F736-42.

50. Brant SR, Yun CH, Donowitz M, Tse CM. Cloning, tissue distribution, and functional analysis of the human Na+/N+ exchanger isoform, NHE3. *American Journal of Physiology*. 1995;269:C198-206.

51. Chambrey R, Achard JM, St John PL, Abrahamson DR, Warnock DG. Evidence for an amiloride-insensitive Na+/H+ exchanger in rat renal cortical tubules. *American Journal of Physiology*. 1997;273:C1064-74.

52. Bookstein C, Musch MW, DePaoli A, Xie Y, Villereal M, Rao MC, Chang EB. A unique sodium-hydrogen exchange isoform (NHE-4) of the inner medulla of the rat kidney is induced by hyperosmolarity. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:29704-9.

53. Klanke CA, Su YR, Callen DF, Wang Z, Meneton P, Baird N, Kandasamy RA, Orlowski J, Otterud BE, Leppert M. Molecular cloning and physical and genetic mapping of a novel human Na+/H+ exchanger (NHE5/SLC9A5) to chromosome 16q22.1. *Genomics*. 1995;25:615-22.

54. Ma E, Haddad GG. Expression and localization of Na+/H+ exchangers in rat central nervous system. *Neuroscience*. 1997;79:591-603.

55. Chesler M. The regulation and modulation of pH in the nervous system. *Prog Neurobiol*. 1990;34:401-427.

56. Dudeja PK, Hafez N, Tyagi S, Gailey CA, Toofanfard M, Alrefai WA, Nazir TM, Ramaswamy K, Al-Bazzaz FJ. Expression of the Na+/H+ and Cl-/HCO-3 exchanger isoforms in proximal and distal human airways. *American Journal of Physiology*. 1999;276:L971-8.

57. Wakabayashi S, Pang T, Su X, Shigekawa M. A novel topology model of the human Na(+)/H(+) exchanger isoform 1. *J Biol Chem*. 2000;275:7942-9.

58. Fafournoux P, Noel J, Pouyssegur J. Evidence that Na+/H+ exchanger isoforms NHE1 and NHE3 exist as stable dimers in membranes with a high degree of specificity for homodimers. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:2589-96.

59. Grinstein S, Woodside M, Waddel TK, Downey GP, Orlowski J, Pouyssegur J, Wong DC, Foskett JK. Focal localization of the NHE-1 isoform of the Na+/H+ antiport: assessment of effects on intracellular pH. *EMBO J*. 1993;12:5209-18.

60. Petrecca K, Atanasiu R, Grinstein S, QOrlowski J, Shrier A. Subcellular localization of the Na+/H+ exchanger in rat myocardium. *American Journal of Physiology*. 1999;276:H709-H717.

61. Leem CH, Ladiac-Gossman D, Vaughan-Jones RD. Characterization of intracellular pH in the guinea-pig ventricular myocyte. *Jounal of Physiology*. 1999;517:159-180.

62. Aronson PS. Kinetic properties of the plasma membrane Na+-H+ exchanger. *Annual Rev Physiol*. 1985;47:545-60.

63. Levine SA, Montrose MH, Tse CM, Donowitz M. Kinetics and regulation of three cloned mammalian Na+/H+ exchangers stably expressed in a fibroblast cell line. *Journal of Biological Chemistry*. 1993;268:25527-35.

64. Wakabayashi S, Fafournoux P, Sardet C, Pouyssegur J. The Na+/H+ antiporter cytoplasmic domain mediates growth factor signals and controls "H(+)-sensing". *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89:2424-2428.

65. Aronson PS, Nee J, Suhm MA. Modifier role of internal H+ in activating the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Nature*. 1982;299:161-163.

66. Paris S, Pouyssegur J. Growth factors activate the Na+/H+ antiporter in quiescent fibroblasts by increasing its affinity for intracellular H+. *Journal of Biological Chemistry*. 1984;259:10989-94.

67. Lagadic-Grossman D, Buckler KJ, Vaughan-Jones RD. Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricle myocyte. *Journal of Physiology*. 1992;458:361-384.

68. Paris S, Pouyssegur J. Biochemical characterization of the amiloride-sensitive Na+/H+ antiport in Chinese hamster lung fibroblasts. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258:3503-8.

69. Aronson PS, Suhm MA, Nee J. Interaction of external H+ with the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *Journal of Biological Chemistry*. 1983;258:6767-71.

70. Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. The role of the Na+/H+ exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na+ concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart. *J Biol Chem*. 1984;259:8880-5.

71. Lang F, Busch GL, Volkl H. The diversity of volume regulatory mechanisms. *Cell Physiol Biochem*. 1998;8:1-45.

72. Kapus A, Grinstein S, Wasan S, Kandasamy R, Orlowski J. Functional characterization of three isoforms of the Na+/H+ exchanger stably expressed in Chinese hamster ovary cells. ATP dependence, osmotic sensitivity, and role in cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:23544-52.

73. Grinstein S, Rothstein A, Cohen S. Mechanism of osmotic activation of Na+/H+ exchange in rat thymic lymphocytes. *Journal of General Physiology*. 1985;85:765-87.

74. Grinstein S, Cohen S. Cytoplasmic [Ca2+] and intracellular pH in lymphocytes. Role of membrane potential and volume-activated Na+/H+ exchange. *Journal of General Physiology*. 1987;89:185-213.

75. Kinsella JL, Aronson PS. Properties of the Na+-H+ exchanger in renal microvillus membrane vesicles. *American Journal of Physiology*. 1980;238:F461-9.

76. Murer H, Hopfer U, Kinne R. Sodium/proton antiport in brush-border-membrane vesicles isolated from rat small intestine and kidney. *Biochemical Journal*. 1976;154:597-604.

77. Aharonovitz O, Zaun HC, Balla T, York JD, Orlowski J, Grinstein S. Intracellular pH regulation by Na(+)/H(+) exchange requires phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Journal of Cell Biology*. 2000;150:213-24.

78. Demaurex N, Romanek RR, Orlowski J, Grinstein S. ATP dependence of Na+/H+ exchange. Nucleotide specificity and assessment of the role of phospholipids. *J Gen Physiol*. 1997;109:117-28.

79. Cassel D, Katz M, Rotman M. Depletion of cellular ATP inhibits Na+/H+ antiport in cultured human cells. Modulation of the regulatory effect of intracellular protons on the antiporter activity. *Journal of Biological Chemistry*. 1986;261:5460-6.

80. Grinstein S, Cohen S, Goetz JD, Rothstein A. Osmotic and phorbol ester-induced activation of Na+/H+ exchange: possible role of protein phosphorylation in lymphocyte volume regulation. *Journal of Cell Biology*. 1985;101:269-76.

81. Aharonovitz O, Demaurex N, Woodside M, Grinstein S. ATP dependence is not an intrinsic property of Na+/H+ exchanger NHE1: requirement for an ancillary factor. *American Journal of Physiology*. 1999;276:C1303-11.

82. Goss GG, Woodside M, Wakabayashi S, Pouyssegur J, Waddell T, Downey GP, Grinstein S. ATP dependence of NHE-1, the ubiquitous isoform of the Na+/H+ antiporter. Analysis of phosphorylation and subcellular localization. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:8741-8.

83. Wakabayashi S, Bertrand B, Shigekawa M, Fafournoux P, Pouyssegur J. Growth factor activation and "H(+)-sensing" of the Na+/H+ exchanger isoform 1 (NHE1). Evidence for an additional mechanism not requiring direct phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry*. 1994;269:5583-8.

84. Bertrand B, Wakabayashi S, Ikeda T, Pouyssegur J, Shigekawa M. The Na+/H+ exchanger isoform 1 (NHE1) is a novel member of the calmodulin-binding proteins. Identification and characterization of calmodulin-binding sites. *J Biol Chem*. 1994;269:13703-9.

85. Wakabayashi S, Ikeda T, Iwamoto T, Pouyssegur J, Shigekawa M. Calmodulin-binding autoinhibitory domain controls "pH-sensing" in the Na+/H+ exchanger NHE1 through sequence-specific interaction. *Biochemistry*. 1997;36:12854-61.

86. Lin X, Barber DL. A calcineurin homologous protein inhibits GTPase-stimulated Na-H exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:12631-6.

87. Pang T, Su X, Wakabayashi S, Shigekawa M. Calcineurin homologous protein as an essential cofactor for Na+/H+ exchangers. *J Biol Chem*. 2001;276:17367-72.

88. Silva NL, Haworth RS, Singh D, Fliegel L. The carboxyl-terminal region of the Na+/H+ exchanger interacts with mammalian heat shock protein. *Biochemistry*. 1995;34:10412-20.

89. Yasutake M, Avkiran M. Exacerbation of reperfusion arrhythmias by alpha 1 adrenergic stimulation: a potential role for receptor mediated activation of sarcolemmal sodium-hydrogen exchange. *Cardiovasc Res*. 1995;29:222-30.

90. Khandoudi N, Ho J, Karmazyn M. Role of Na(+)-H+ exchange in mediating effects of endothelin-1 on normal and ischemic/reperfused hearts. *Circ Res*. 1994;75:369-78.

91. Matsui H, Barry WH, Livsey C, Spitzer KW. Angiotensin II stimulates sodium-hydrogen exchange in adult rabbit ventricular myocytes. *Cardiovasc Res*. 1995;29:215-21.

92. Yasutake M, Haworth RS, King A, Avkiran M. Thrombin activates the sarcolemmal Na(+)-H+ exchanger. Evidence for a receptor-mediated mechanism involving protein kinase C. *Circ Res*. 1996;79:705-15.

93. Wang H, Silva NL, Lucchesi PA, Haworth R, Wang K, Michalak M, Pelech S, Fliegel L. Phosphorylation and regulation of the Na+/H+ exchanger through mitogen- activated protein kinase. *Biochemistry*. 1997;36:9151-8.

94. Sabri A, Byron KL, Samarel AM, Bell J, Lucchesi PA. Hydrogen peroxide activates mitogen-activated protein kinases and Na+- H+ exchange in neonatal rat cardiac myocytes. *Circ Res*. 1998;82:1053-62.

95. Livne AA, Sardet C, Pouyssegur J. The Na+/H+ exchanger is phosphorylated in human platelets in response to activating agents. *FEBS Lett*. 1991;284:219-22.

96. Sardet C, Counillon L, Franchi A, Pouyssegur J. Growth factors induce phosphorylation of the Na+/H+ antiporter, glycoprotein of 110 kD. *Science*. 1990;247:723-6.

97. Sardet C, Fafournoux P, Pouyssegur J. Alpha-thrombin, epidermal growth factor, and okadaic acid activate the Na+/H+ exchanger, NHE-1, by phosphorylating a set of common sites. *J Biol Chem*. 1991;266:19166-71.

98. Sardet C, Franchi A, Pouyssegur J. Molecular cloning, primary structure, and expression of the human growth factor-activatable Na+/H+ antiporter. *Cell*. 1989;56:271-80.

99. Takahashi E, Abe J, Gallis B, Aebersold R, Spring DJ, Krebs EG, Berk BC. p90(RSK) is a serum-stimulated Na+/H+ exchanger isoform-1 kinase. Regulatory phosphorylation of serine 703 of Na+/H+ exchanger isoform-1. *J Biol Chem*. 1999;274:20206-14.

100. Sahai E, Alberts AS, Treisman R. RhoA effector mutants reveal distinct effector pathways for cytoskeletal reorganization, SRF activation and transformation. *Embo J*. 1998;17:1350-61.

101. Bianchini L, L'Allemain G, Pouyssegur J. The p42/p44 mitogen-activated protein kinase cascade is determinant in mediating activation of the Na+/H+ exchanger (NHE1 isoform) in response to growth factors. *J Biol Chem*. 1997;272:271-9.

102. Lucchesi PA, Berk BC. Regulation of sodium-hydrogen exchange in vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res*. 1995;29:172-7.

103. Dyck JR, Maddaford TG, Pierce GN, Fliegel L. Induction of expression of the sodium-hydrogen exchanger in rat myocardium. *Cardiovasc Res*. 1995;29:203-8.

104. Robinson MJ, Cobb MH. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol*. 1997;9:180-86.

105. Takeishi Y, Abe J, Lee J, Kawakatsu H, Walsh RA, Berk BC. Differential Regulation of p90 Ribosomal S6 Kinase and Big Mitogen–Activated Protein Kinase 1 by Ischemia/Reperfusion and Oxidative Stress in Perfused Guinea Pig Hearts. *Circulation Research*. 1999;84:1164-1172.

106. Krauss G. Biochemie der Regulation und Signaltransduktion.

107. Sugden PH, Bogoyevitch MA. Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res*. 1995;30:478-92.

108. Sugden PH, Clerk A. "Stress-responsive" mitogen-activated protein kinases (c-Jun N-terminal kinases and p38 mitogen-activated protein kinases) in the myocardium. *Circ Res*. 1998;83:345-52.

109. Raingeaud J, Gupta S, Rogers JS, Dickens M, Han J, Ulevitch RJ, Davis RJ. Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogen-activated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine. *J Biol Chem*. 1995;270:7420-6.

110. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, McNulty D, Blumenthal MJ, Heys JR, Landvatter SW, et al. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*. 1994;372:739-46.

111. Han J, Lee JD, Bibbs L, Ulevitch RJ. A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*. 1994;265:808-11.

112. Kumar S, McDonnell PC, Gum RJ, Hand AT, Lee JC, Young PR. Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;235:533-8.

113. Jiang Y, Chen C, Li Z, Guo W, Gegner JA, Lin S, Han J. Characterization of the structure and function of a new mitogen- activated protein kinase (p38beta). *J Biol Chem*. 1996;271:17920-6.

114. Li Z, Jiang Y, Ulevitch RJ, Han J. The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases. *Biochem Biophys Res Commun*. 1996;228:334-40.

115. Mertens S, Craxton M, Goedert M. SAP kinase-3, a new member of the family of mammalian stress-activated protein kinases. *FEBS Lett.* 1996;383:273-6.

116. Goedert M, Cuenda A, Craxton M, Jakes R, Cohen P. Activation of the novel stress-activated protein kinase SAPK4 by cytokines and cellular stresses is mediated by SKK3 (MKK6); comparison of its substrate specificity with that of other SAP kinases. *Embo J.* 1997;16:3563-71.

117. Jiang Y, Gram H, Zhao M, New L, Gu J, Feng L, Di Padova F, Ulevitch RJ, Han J. Characterization of the structure and function of the fourth member of p38 group mitogen-activated protein kinases, p38delta. *J Biol Chem.* 1997;272:30122-8.

118. Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb J.* 1995;9:576-96.

119. Brunet A, Pouyssegur J. Identification of MAP kinase domains by redirecting stress signals into growth factor responses. *Science.* 1996;272:1652-5.

120. Robinson MJ, Cheng M, Khokhlatchev A, Ebert D, Ahn N, Guan KL, Stein B, Goldsmith E, Cobb MH. Contributions of the mitogen-activated protein (MAP) kinase backbone and phosphorylation loop to MEK specificity. *J Biol Chem.* 1996;271:29734-9.

121. Wang XS, Diener K, Jannuzzi D, Trollinger D, Tan TH, Lichenstein H, Zukowski M, Yao Z. Molecular cloning and characterization of a novel protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen-activated protein kinase kinase kinase. *J Biol Chem.* 1996;271:31607-11.

122. Zanke BW, Rubie EA, Winnett E, Chan J, Randall S, Parsons M, Boudreau K, McInnis M, Yan M, Templeton DJ, Woodgett JR. Mammalian mitogen-activated protein kinase pathways are regulated through formation of specific kinase-activator complexes. *J Biol Chem.* 1996;271:29876-81.

123. Lim L, Manser E, Leung T, Hall C. Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras- related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur J Biochem.* 1996;242:171-85.

124. Kyriakis JM, Avruch J. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *J Biol Chem.* 1996;271:24313-6.

125. Fanger GR, Gerwins P, Widmann C, Jarpe MB, Johnson GL. MEKKs, GCKs, MLKs, PAKs, TAKs, and tpls: upstream regulators of the c- Jun amino-terminal kinases? *Curr Opin Genet Dev*. 1997;7:67-74.

126. Fukunaga R, Hunter T. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. *Embo J.* 1997;16:1921-33.

127. Ludwig S, Engel K, Hoffmeyer A, Sithanandam G, Neufeld B, Palm D, Gaestel M, Rapp UR. 3pK, a novel mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase, is targeted by three MAP kinase pathways. *Mol Cell Biol.* 1996;16:6687-97.

128. McLaughlin MM, Kumar S, McDonnell PC, Van Horn S, Lee JC, Livi GP, Young PR. Identification of mitogen-activated protein (MAP) kinase-activated protein kinase-3, a novel substrate of CSBP p38 MAP kinase. *J Biol Chem.* 1996;271:8488-92.

129. Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*. 1996;272:1347-9.

130. Han J, Jiang Y, Li Z, Kravchenko VV, Ulevitch RJ. Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. *Nature.* 1997;386:296-9.

131. Barancik M, Htun P, Strohm C, Kilian S, Schaper W. Inhibition of the cardiac p38-MAPK pathway by SB203580 delays ischemic cell death. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35:474-483.

132. New L, Jiang Y, Zhao M, Liu K, Zhu W, Flood LJ, Kato Y, Parry GC, Han J. PRAK, a novel protein kinase regulated by the p38 MAP kinase. *Embo J*. 1998;17:3372-84.

133. Freshney NW, Rawlinson L, Guesdon F, Jones E, Cowley S, Hsuan J, Saklatvala J. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. *Cell*. 1994;78:1039-49.

134. Stokoe D, Engel K, Campbell DG, Cohen P, Gaestel M. Identification of MAPKAP kinase 2 as a major enzyme responsible for the phosphorylation of the small mammalian heat shock proteins. *FEBS Lett*. 1992;313:307-13.

135. Huang CK, Zhan L, Ai Y, Jongstra J. LSP1 is the major substrate for mitogen-activated protein kinase- activated protein kinase 2 in human neutrophils. *J Biol Chem*. 1997;272:17-9.

136. Tan Y, Rouse J, Zhang A, Cariati S, Cohen P, Comb MJ. FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *Embo J*. 1996;15:4629-42.

137. Heidenreich O, Neininger A, Schratt G, Zinck R, Cahill MA, Engel K, Kotlyarov A, Kraft R, Kostka S, Gaestel M, Nordheim A. MAPKAP kinase 2 phosphorylates serum response factor in vitro and in vivo. *J Biol Chem*. 1999;274:14434-43.

138. Thomas GM, Haavik J, Cohen P. A stress-activated kinase cascade can mediate the activation of tyrosine hydroxylase in chromaffin cells. *Biochem Soc Trans*. 1997;25:S571.

139. Ono K, Han J. The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal*. 2000;12:1-13.

140. Jeffrey FM, Malloy CR, Radda GK. Influence of intracellular acidosis on contractile function in the working rat heart. *Am J Physiol*. 1987;253:H1499-505.

141. Katz AM, Hecht HH. Editorial: the early "pump" failure of the ischemic heart. *Am J Med*. 1969;47:497-502.

142. Roos A, Boron WF. Intracellular pH. *Physiol Rev*. 1981;61:296-434.

143. Opie LH. Effects of regional ischemia on metabolism of glucose and fatty acids. Relative rates of aerobic and anaerobic energy production during myocardial infarction and comparison with effects of anoxia. *Circ Res*. 1976;38:I52-74.

144. Dennis SC, Grevers W, Opie LH. Protons in ischemia: where do they come from; where do they go to ? *J Mol Cerll Cardiol*. 1991;23:1077-1086.

145. Wallert MA, Frohlich O. Na+-H+ exchange in isolated myocytes from adult rat heart. *Am J Physiol*. 1989;257:C207-13.

146. Frelin C, Vigne P, Ladoux A, Lazdunski M. The regulation of the intracellular pH in cells from vertebrates. *Eur J Biochem*. 1988;174:3-14.

147. Piwnica-Worms D, Jacob R, Horres CR, Lieberman M. Na/H exchange in cultured chick heart cells. pHi regulation. *J Gen Physiol*. 1985;85:43-64.

148. van Emous JG, Nederhoff MG, Ruigrok TJ, van Echteld CJ. The role of the Na+ channel in the accumulation of intracellular Na+ during myocardial ischemia: consequences for post-ischemic recovery. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:85-96.

149. Duan J, Moffat MP. Contractile and electrophysiologic effects of realkalization in cardiac tissues: role of Na/H exchange and increased [Ca]i. *Adv Exp Med Biol*. 1992;311:435-6.

150. Cross HR, Radda GK, Clarke K. The role of Na+/K+ ATPase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: a 31P, 23Na and 87Rb NMR spectroscopic study. *Magn Reson Med*. 1995;34:673-85.

151. Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K, Yoshioka J, Yamaguchi H, Nishimura T. Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circ Res*. 1999;84:1401-6.

152. Pike MM, Kitakaze M, Marban E. 23Na-NMR measurements of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol*. 1990;259:H1767-73.

153. Malloy CR, Buster DC, Castro MM, Geraldes CF, Jeffrey FM, Sherry AD. Influence of global ischemia on intracellular sodium in the perfused rat heart. *Magn Reson Med*. 1990;15:33-44.

154. van Echteld CJ, Kirkels JH, Eijgelshoven MH, van der Meer P, Ruigrok TJ. Intracellular sodium during ischemia and calcium-free perfusion: a 23Na NMR study. *J Mol Cell Cardiol*. 1991;23:297-307.

155. Murphy E, Perlman M, London RE, Steenbergen C. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res*. 1991;68:1250-8.

156. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na+ in Ca2+ overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H+-Na+ and Na+-Ca2+ exchange. *Circ Res*. 1989;65:1045-56.

157. Piwnica-Worms D, Jacob R, Shigeto N, Horres CR, Lieberman M. Na/H exchange in cultured chick heart cells: secondary stimulation of electrogenic transport during recovery from intracellular acidosis. *J Mol Cell Cardiol*. 1986;18:1109-16.

158. Kim D, Cragoe EJ, Jr., Smith TW. Relations among sodium pump inhibition, Na-Ca and Na-H exchange activities, and Ca-H interaction in cultured chick heart cells. *Circ Res*. 1987;60:185-93.

159. Siffert W, Akkerman JW. Na+/H+ exchange and Ca2+ influx. *FEBS Lett*. 1989;259:1-4.

160. Hearse DJ. The protection of the ischemic myocardium: surgical success v clinical failure? *Prog Cardiovasc Dis*. 1988;30:381-402.

161. Maddaford TG, Pierce GN. Myocardial dysfunction is associated with activation of Na+/H+ exchange immediately during reperfusion. *Am J Physiol*. 1997;273:H2232-9.

162. Meng H, Pierce GN. Involvement of sodium in the protective effect of 5-(N,N-dimethyl)- amiloride on ischemia-reperfusion injury in isolated rat ventricular wall. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991;256:1094-100.

163. Karmazyn M. The sodium-hydrogen exchange system in the heart: its role in ischemic and reperfusion injury and therapeutic implications. *Can J Cardiol*. 1996;12:1074-82.

164. Pierce GN, Czubryt MP. The contribution of ionic imbalance to ischemia/reperfusion-induced injury. *J Mol Cell Cardiol*. 1995;27:53-63.

165. Van Emous JG, Schreur JH, Ruigrok TJ, Van Echteld CJ. Both Na+-K+ ATPase and Na +-H+ exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:337-48.

166. Nayler WG, Panagiotopoulos S, Elz JS, Daly MJ. Calcium-mediated damage during post-ischaemic reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1988;20 Suppl 2:41-54.

167. Henry PD, Schuchleib R, Davis J, Weiss ES, Sobel BE. Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart. *Am J Physiol*. 1977;233:H677-84.

168. du Toit EF, Opie LH. Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion. *Circ Res*. 1992;70:960-7.

169. Tani M. Mechanisms of Ca2+ overload in reperfused ischemic myocardium. *Annu Rev Physiol*. 1990;52:543-59.

170. Marban E, Koretsune Y, Corretti M, Chacko VP, Kusuoka H. Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1989;80:IV17-22.

171. Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, Yue DT, Chacko VP, Pike MM. Quantification of [Ca2+]i in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circ Res*. 1990;66:1255-67.

172. Ward CA, Moffat MP. Modulation of sodium-hydrogen exchange activity in cardiac myocytes during acidosis and realkalinisation: effects on calcium, pHi, and cell shortening. *Cardiovasc Res*. 1995;29:247-53.

173. Bond JM, Herman B, Lemasters JJ. Protection by acidotic pH against anoxia/reoxygenation injury to rat neonatal cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991;179:798-803.

174. Hendrikx M, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Van Hecke P, Vanstapel F, Van Lommel A, Verbeken E, Lauweryns J, Flameng W. New Na(+)-H+ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function and high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca2+ overload in isolated perfused rabbit heart. *Circulation*. 1994;89:2787-98.

175. Klein HH, Pich S, Bohle RM, Wollenweber J, Nebendahl K. Myocardial protection by Na(+)-H+ exchange inhibition in ischemic, reperfused porcine hearts. *Circulation*. 1995;92:912-7.

176. Shimada Y, Hearse DJ, Avkiran M. Impact of extracellular buffer composition on cardioprotective efficacy of Na+/H+ exchanger inhibitors. *Am J Physiol*. 1996;270:H692-700.

177. Mathur S, Karmazyn M. Interaction between anesthetics and the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide) in ischemic and reperfused rat hearts. *Anesthesiology*. 1997;87:1460-9.

178. Eng S, Maddaford TG, Kardami E, Pierce GN. Protection against myocardial ischemic/reperfusion injury by inhibitors of two separate pathways of Na+ entry. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:829-35.

179. Wu D, Stassen JM, Seidler R, Doods H. Effects of BIIB513 on ischemia-induced arrhythmias and myocardial infarction in anesthetized rats. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:449-56.

180. Gumina RJ, Mizumura T, Beier N, Schelling P, Schultz JJ, Gross GJ. 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*. 1998;286:175-83.

181. Klein HH, Bohle RM, Pich S, Lindert-Heimberg S, Wollenweber J, Schade-Brittinger C, Nebendahl K. Time-dependent protection by Na+/H+ exchange inhibition in a regionally ischemic, reperfused porcine heart preparation with low residual blood flow. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:795-801.

182. Garcia-Dorado D, Gonzalez MA, Barrabes JA, Ruiz-Meana M, Solares J, Lidon RM, Blanco J, Puigfel Y, Piper HM, Soler-Soler J. Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na(+)-H+ exchange. *Cardiovasc Res*. 1997;35:80-9.

183. Miura T, Ogawa T, Suzuki K, Goto M, Shimamoto K. Infarct size limitation by a new Na(+)-H+ exchange inhibitor, Hoe 642: difference from preconditioning in the role of protein kinase C. *J Am Coll Cardiol*. 1997;29:693-701.

184. Linz W, Albus U, Crause P, Jung W, Weichert A, Scholkens BA, Scholz W. Dose-dependent reduction of myocardial infarct mass in rabbits by the NHE-1 inhibitor cariporide (HOE 642). *Clin Exp Hypertens*. 1998;20:733-49.

185. Chakrabarti S, Hoque AN, Karmazyn M. A rapid ischemia-induced apoptosis in isolated rat hearts and its attenuation by the sodium-hydrogen exchange inhibitor HOE 642 (cariporide). *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:3169-74.

186. Humphreys RA, Haist JV, Chakrabarti S, Feng Q, Arnold JM, Karmazyn M. Orally administered NHE1 inhibitor cariporide reduces acute responses to coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol*. 1999;276:H749-57.

187. Gottlieb RA, Gruol DL, Zhu JY, Engler RL. Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis. *J Clin Invest*. 1996;97:2391-8.

188. Duan J, Karmazyn M. Protective effects of amiloride on the ischemic reperfused rat heart. Relation to mitochondrial function. *Eur J Pharmacol*. 1992;210:149-57.

189. Scholz W, Albus U, Lang HJ, Linz W, Martorana PA, Englert HC, Scholkens BA. Hoe 694, a new Na+/H+ exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. *Br J Pharmacol*. 1993;109:562-8.

190. Yasutake M, Ibuki C, Hearse DJ, Avkiran M. Na+/H+ exchange and reperfusion arrhythmias: protection by intracoronary infusion of a novel inhibitor. *Am J Physiol*. 1994;267:H2430-40.

191. Xue YX, Aye NN, Hashimoto K. Antiarrhythmic effects of HOE642, a novel Na(+)-H+ exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in animal hearts. *Eur J Pharmacol*. 1996;317:309-16.

192. Dhein S, Krusemann K, Engelmann F, Gottwald M. Effects of the type-1 Na+/H+-exchange inhibitor cariporide (Hoe 642) on cardiac tissue. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1998;357:662-70.

193. Kleyman TR, Cragoe EJ, Jr. Amiloride and its analogs as tools in the study of ion transport. *J Membr Biol*. 1988;105:1-21.

194. Karmazyn M, Sostaric JV, Gan XT. The myocardial Na+/H+ exchanger: a potential therapeutic target for the prevention of myocardial ischaemic and reperfusion injury and attenuation of postinfarction heart failure. *Drugs*. 2001;61:375-89.

195. Aye NN, Komori S, Hashimoto K. Effects and interaction, of cariporide and preconditioning on cardiac arrhythmias and infarction in rat in vivo. *Br J Pharmacol*. 1999;127:1048-55.

196. Eigel BN, Hadley RW. Contribution of the Na(+) channel and Na(+)/H(+) exchanger to the anoxic rise of [Na(+)] in ventricular myocytes. *Am J Physiol*. 1999;277:H1817-22.

197. Hartmann M, Decking UK. Blocking Na(+)-H+ exchange by cariporide reduces Na(+)-overload in ischemia and is cardioprotective. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:1985-95.

198. Wirth KJ, Maier T, Busch AE. NHE1-inhibitor cariporide prevents the transient reperfusion-induced shortening of the monophasic action potential after coronary ischemia in pigs. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:192-7.

199. Theroux P, Chaitman BR, Danchin N, Erhardt L, Meinertz T, Schroeder JS, Tognoni G, White HD, Willerson JT, Jessel A. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation*. 2000;102:3032-8.

200. Rupprecht HJ, vom Dahl J, Terres W, Seyfarth KM, Richardt G, Schultheibeta HP, Buerke M, Sheehan FH, Drexler H. Cardioprotective effects of the Na(+)/H(+) exchange inhibitor cariporide in patients with acute anterior myocardial infarction undergoing direct PTCA. *Circulation*. 2000;101:2902-8.

201. Moffat MP, Karmazyn M. Protective effects of the potent Na/H exchange inhibitor methylisobutyl amiloride against post-ischemic contractile dysfunction in rat and guinea-pig hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:959-71.

202. Rohmann S, Weygandt H, Minck KO. Preischaemic as well as postischaemic application of a Na+/H+ exchange inhibitor reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Res*. 1995;30:945-51.

203. Blumenthal MR, Wang HH, Pang LM. Experimental coronary arterial occlusion and release. Effects on enzymes, electrocardiograms, myocardial contractility and reactive hyperemia. *Am J Cardiol*. 1975;36:225-33.

204. Shell WE, Kjekshus JK, Sobel BE. Quantitative assessment of the extent of myocardial infarction in the conscious dog by means of analysis of serial changes in serum creatine phosphokinase activity. *J Clin Invest*. 1971;50:2614-25.

205. Ito Y, Imai S, Ui G, Nakano M, Imai K, Kamiyama H, Naganuma F, Matsui K, Ohashi N, Nagai R. A Na+-H+ exchange inhibitor (SM-20550) protects from microvascular deterioration and myocardial injury after reperfusion. *Eur J Pharmacol*. 1999;374:355-66.

206. Sugiyama A, Aye NN, Sawada N, Hashimoto K. Cariporide, a highly selective Na+/H+ exchange inhibitor, suppresses the reperfusion-induced lethal arrhythmias and "overshoot" phenomenon of creatine phosphate in situ rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1999;33:116-21.

207. Fukuta M, Wakida Y, Iwa T, Uesugi M, Kobayashi T. Role of Na(+)-H+ exchange on reperfusion related myocardial injury and arrhythmias in an open-chest swine model. *Pacing Clin Electrophysiol*. 1996;19:2027-33.

208. Orlowski J, Kandasamy RA. Delineation of transmembrane domains of the Na+/H+ exchanger that confer sensitivity to pharmacological antagonists. *J Biol Chem*. 1996;271:19922-7.

209. Wang D, Balkovetz DF, Warnock DG. Mutational analysis of transmembrane histidines in the amiloride- sensitive Na+/H+ exchanger. *Am J Physiol*. 1995;269:C392-402.

210. Lüss H, Neumann J, Schmitz W, Schulz R, Heusch G. The stress-responsive MAP kinase p38 is activated by low-flow ischemia in the in situ porcine heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:1787-1794.

211. Sanada S, Kitakaze M, Papst PJ, Hatanaka K, Asanuma H, Aki T, Shinozaki Y, Ogita H, Node K, Takashima S, Asakura M, Yamada J, Fukushima T, Ogai A, Kuzuya T, Mori H, Terada N, Yoshida K, Hori M. Role of phasic dynamism of p38 mitogen-activated protein kinase activation in ischemic preconditioning of the canine heart. *Circ Res*. 2001;88:175-180.

212. Lochner A. p38 MAPK activation: trigger or mediator in ischaemic preconditioning (PC)? *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:A70 (abstract).

213. Yin T, Sandhu G, Wolfgang CD, Burrier A, Webb RL, Rigel DF, Hai T, Whelan J. Tissue specific pattern of stress kinase activation in ischemia/reperfused heart and kidney. *J Biol Chem*. 1997;272:19943-19950.

214. Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E. Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H499-508.

215. Gysembergh A, Simkhovich BZ, Kloner RA, Przyklenk K. p38 MAPK activity is not increased early during sustained coronary artery occlusion in preconditioned versus control rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*. 2001;33:681-690.

216. Nakano A, Baines CP, Kim CO, Pelech SL, Downey JM, Cohen MV, Critz SD. Ischemic preconditioning activates MAPKAPK2 in isolated rabbit heart. Evidence for involvement of p38 MAPK. *Circ Res*. 2000;86:144-151.

217. Omura T, Yoshiyama M, Shimada T, Shimizu N, Kim S, Iwao H, Takeuchi K, Yoshikawa J. Activation of mitogen-activated protein kinases in *in vivo* ischemia/reperfused myocardium in rats. *J Mol Cell Cardiol*. 1999;31:1269-1279.

218. Weinbrenner C, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. Phosphorylation of tyrosine 182 of p38 mitogen-activated protein kinase correlates with the protection of preconditioning in the rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2383-2391.

219. Yue TL, Wang C, Gu JL, Ma XL, Kumar S, Lee JC, Feuerstein GZ, Thomas H, Maleeff B, Ohlstein EH. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circ Res*. 2000;86:692-699.

220. Ma XL, Kumar S, Gao F, Louden CS, Lopez BL, Christopher TA, Wang C, Lee JC, Feuerstein GZ, Yue TL. Inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and improves cardiac function after myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation*. 1999;99:1685-1691.

221. Bogoyevitch MA, Gillespie-Brown J, Ketterman AJ, Fuller SJ, Ben-Levy R, Ashworth A, Marshall CJ, Sugden PH. Stimulation of the stress-activated mitogen-activated protein kinases subfamilies in perfused heart. p38/RK mitogen-activated protein kinases and c-jun N-terminal kinases are activated by ischemia/reperfusion. *Circ Res*. 1996;79:162-173.

222. Sato M, Cordis GA, Maulik N, Das DK. SAPKs regulation of ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;279:H901-907.

223. Saurin AT, Martin JL, Heads RJ, Foley C, Mockridge JW, Wright MJ, Wang Y, Marber MS. The role of differential activation of p38-mitogen-activated protein kinase in preconditioned ventricular myocytes. *Faseb J*. 2000;14:2237-46.

224. Saurin AT, Heads RJ, Foley C, Wang Y, Marber MS. Inhibition of p38-alpha activation may underlay protection in a surrogate model of ischemic preconditioning. *Circulation*. 1999;100 (suppl):I-492 (abstract).

225. Nakano A, Cohen MV, Critz S, Downey JM. SB 203580, an inhibitor of p38 MAPK, abolishes infarct-limiting effect of ischemic preconditioning in isolated rabbit hearts. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:466-71.

226. Nemoto S, Xiang J, Huang S, Lin A. Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*. 1998;273:16415-16420.

227. Wang Y, Huang S, Sah VP, Ross J, Jr., Brown JH, Han J, Chien KR. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J Biol Chem*. 1998;273:2161-8.

228. Conrad PW, Rust RT, Han J, Millhorn DE, Beitner-Johnson D. Selective activation of p38alpha and p38gamma by hypoxia. Role in regulation of cyclin D1 by hypoxia in PC12 cells. *J Biol Chem*. 1999;274:23570-6.

229. Martin JL, Mestril R, Hilal-Dandan R, Brunton LL, Dillmann WH. Small heat shock proteins and protection against ischemic injury in cardiac myocytes. *Circulation*. 1997;96:4343-8.

230. Huot J, Houle F, Marceau F, Landry J. Oxidative stress-induced actin reorganization mediated by the p38 mitogen-activated protein kinase/heat shock protein 27 pathway in vascular endothelial cells. *Circulation Research*. 1997;80:383-392.

231. Strasser R, Vogt A, Schaper W. -Myocardial protection by preconditioning. Experimental and clinical significance. *Z Kardiol*. 1996;85:79-89.

232. Cohen MV, Liu GS, Downey JM. Preconditioning causes improved wall motion as well as smaller infarcts after transient coronary occlusion in rabbits. *Circulation*. 1991;84:341-9.

233. Li GC, Vasquez JA, Gallagher KP, Lucchesi BR. Myocardial protection with preconditioning. *Circulation*. 1990;82:609-19.

234. Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res*. 1990;66:1133-42.

235. Strasser R, Arras M, Vogt A, Elsaesser A, Schwarz ER, Schlepper M, Schaper W. Preconditioning of porcine myocardium: How much ischemia is required for induction ? What is duration ? Is a renewal of effect possible ? *Circulation*. 1994;

236. Ikonomidis JS, Tumiati LC, Weisel RD, Mickle DA, Li RK. Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia. *Cardiovasc Res*. 1994;28:1285-91.

237. Cleveland JC, Jr., Meldrum DR, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Adenosine preconditioning of human myocardium is dependent upon the ATP-sensitive K+ channel. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:175-82.

238. Henrichs KJ, Matsuoka H, Schaper J. Influence of repetitive coronary occlusions on myocardial adenine nucleosides, high energy phosphates and ultrastructure. *Basic Res Cardiol*. 1987;82:557-65.

239. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res*. 1990;66:913-31.

240. Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res*. 1998;37:21-33.

241. Strohm C, Barancik T, Bruhl ML, Kilian SA, Schaper W. Inhibition of the ER-kinase cascade by PD98059 and UO126 counteracts ischemic preconditioning in pig myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;36:218-29.

242. Schulz R, Rose J, Heusch G. Involvement of activation of ATP-dependent potassium channels in ischemic preconditioning in swine. *Am J Physiol*. 1994;267:H1341-52.

243. Sack S, Mohri M, Arras M, Schwarz ER, Schaper W. Ischaemic preconditioning--time course of renewal in the pig. *Cardiovasc Res*. 1993;27:551-5.

244. Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol*. 1991;260:H796-804.

245. Yao Z, Gross GJ. A comparison of adenosine-induced cardioprotection and ischemic preconditioning in dogs. Efficacy, time course, and role of KATP channels. *Circulation*. 1994;89:1229-36.

246. Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation*. 1993;88:1264-72.

247. Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, Fuji H, Oe H, Hori M, Kamada T, Tada M. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res*. 1993;72:1293-9.

248. O'Rourke B. Myocardial K(ATP) channels in preconditioning. *Circ Res*. 2000;87:845-55.

249. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K+ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*. 1997;81:1072-82.

250. Liu Y, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection? *Circulation*. 1998;97:2463-9.

251. Grover GJ, D'Alonzo AJ, Dzwonczyk S, Parham CS, Darbenzio RB. Preconditioning is not abolished by the delayed rectifier K+ blocker dofetilide. *Am J Physiol*. 1996;271:H1207-14.

252. Liang BT. Direct preconditioning of cardiac ventricular myocytes via adenosine A1 receptor and KATP channel. *Am J Physiol*. 1996;271:H1769-77.

253. Yao Z, Gross GJ. Effects of the KATP channel opener bimakalim on coronary blood flow, monophasic action potential duration, and infarct size in dogs. *Circulation*. 1994;89:1769-75.

254. Gross GJ. The role of mitochondrial KATP channels in cardioprotection. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:280-4.

255. Snyders DJ. Structure and function of cardiac potassium channels. *Cardiovasc Res*. 1999;42:377-90.

256. Clement JPt, Kunjilwar K, Gonzalez G, Schwanstecher M, Panten U, Aguilar-Bryan L, Bryan J. Association and stoichiometry of K(ATP) channel subunits. *Neuron*. 1997;18:827-38.

257. Garlid KD. Opening mitochondrial K(ATP) in the heart--what happens, and what does not happen. *Basic Res Cardiol*. 2000;95:275-9.

258. Garlid KD, Beavis AD, Ratkje SK. On the nature of ion leaks in energy-transducing membranes. *Biochim Biophys Acta*. 1989;976:109-20.

259. Saks VA, Khuchua ZA, Vasilyeva EV, Belikova O, Kuznetsov AV. Metabolic compartmentation and substrate channelling in muscle cells. Role of coupled creatine kinases in in vivo regulation of cellular respiration--a synthesis. *Mol Cell Biochem*. 1994;133-134:155-92.

260. Saks V, Dos Santos P, Gellerich FN, Diolez P. Quantitative studies of enzyme-substrate compartmentation, functional coupling and metabolic channelling in muscle cells. *Mol Cell Biochem*. 1998;184:291-307.

261. Holmuhamedov EL, Jovanovic S, Dzeja PP, Jovanovic A, Terzic A. Mitochondrial ATP-sensitive K+ channels modulate cardiac mitochondrial function. *Am J Physiol*. 1998;275:H1567-76.

262. Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K+ channel openers prevent Ca2+ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol*. 1999;519 Pt 2:347-60.

263. Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Sun X, Schindler PA. The mitochondrial KATP channel as a receptor for potassium channel openers. *J Biol Chem*. 1996;271:8796-9.

264. Paucek P, Mironova G, Mahdi F, Beavis AD, Woldegiorgis G, Garlid KD. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide-sensitive, ATP-dependent K+ channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem*. 1992;267:26062-9.

265. Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H305-12.

266. Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol*. 1999;276:H1361-8.

267. Auchampach JA, Grover GJ, Gross GJ. Blockade of ischaemic preconditioning in dogs by the novel ATP dependent potassium channel antagonist sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res*. 1992;26:1054-62.

268. Hide EJ, Thiemermann C. Limitation of myocardial infarct size in the rabbit by ischaemic preconditioning is abolished by sodium 5-hydroxydecanoate. *Cardiovasc Res*. 1996;31:941-6.

269. Sanada S, Kitakaze M, Asanuma H, Harada K, Ogita H, Node K, Takashima S, Sakata Y, Asakura M, Shinozaki Y, Mori H, Kuzuya T, Hori M. Role of mitochondrial and sarcolemmal K(ATP) channels in ischemic preconditioning of the canine heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H256-63.

270. Pain T, Yang XM, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Opening of mitochondrial K(ATP) channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res*. 2000;87:460-6.

271. Ghosh S, Standen NB, Galinanes M. Evidence for mitochondrial K ATP channels as effectors of human myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res*. 2000;45:934-40.

272. Klein HH, Puschman S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the Tetrazolium reaction identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch (Pathol Anat)*. 1981;393:287-297.

273. Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, Schäfer HJ, Mathley D, Bhakdi S. Infarct size measurements by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol*. 1996;29:2169-2175.

274. Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K+ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res*. 1999;84:973-9.

275. Gumina RJ, Gross GJ. If ischemic preconditioning is the gold standard, has a platinum standard of cardioprotection arrived? Comparison with NHE inhibition. *J Thromb Thrombolysis*. 1999;8:39-44.

276. Millard RW. Induction of functional coronary collaterals in the swine heart. *Basic Res Cardiol*. 1981;76:468-73.

277. Klein HH, Nebendahl K, Schubothe M, Kreuzer H. Intracoronary hyperosmotic mannitol during reperfusion does not affect infarct size in ischemic, reperfused porcine hearts. *Basic Res Cardiol*. 1985;80:251-9.

278. Schaper W. Experimental infarcts and the microcirculation. In: Hearse DJ, Yellon DM, eds. *Therapeutic Approaches to Myocardial Infarct Size Limitation*. New York: Raven Press; 1984: 79-90.

279. Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res*. 1987;21:737-46.

280. Schaper W, Görge G, Winkler B, Schaper J. The collateral circulation of the heart. *Progr Cardiovasc Dis*. 1988;31:57-77.

281. An J, Varadarajan SG, Camara A, Chen Q, Novalija E, Gross GJ, Stowe DF. Blocking Na(+)/H(+) exchange reduces [Na(+)](i) and [Ca(2+)](i) load after ischemia and improves function in intact hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;281:H2398-H2409.

282. Yokoyama H, Yasutake M, Avkiran M. Alpha1-adrenergic stimulation of sarcolemmal Na+-H+ exchanger activity in rat ventricular myocytes: evidence for selective mediation by the alpha1A-adrenoceptor subtype. *Circ Res*. 1998;82:1078-85.

283. Clerk A, Michael A, Sugden PH. Stimulation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway in neonatal rat ventricular myocytes by the G protein-coupled receptor agonists, endothelin-1 and phenylephrine: a role in cardiac myocyte hypertrophy? *J Cell Biol*. 1998;142:523-35.

284. Shrode LD, Rubie EA, Woodgett JR, Grinstein S. Cytosolic alkalinization increases stress-activated protein kinase/c- Jun NH2-terminal kinase (SAPK/JNK) activity and p38 mitogen-activated protein kinase activity by a calcium-independent mechanism. *J Biol Chem*. 1997;272:13653-9.

285. Hooley R, Yu CY, Symons M, Barber DL. G alpha 13 stimulates Na+-H+ exchange through distinct Cdc42-dependent and RhoA-dependent pathways. *J Biol Chem*. 1996;271:6152-8.

286. Moor AN, Gan XT, Karmazyn M, Fliegel L. Activation of Na+/H+ exchanger-directed protein kinases in the ischemic and ischemic-reperfused rat myocardium. *J Biol Chem*. 2001;276:16113-22.

287. Kusuhara M, Takahashi E, Peterson TE, Abe J, Ishida M, Han J, Ulevitch R, Berk BC. p38 Kinase is a negative regulator of angiotensin II signal transduction in vascular smooth muscle cells: effects on Na+/H+ exchange and ERK1/2. *Circ Res*. 1998;83:824-31.

288. Munch-Ellingsen J, Lokebo JE, Bugge E, Ytrehus K. Equal reduction in infarct size by ethylisopropyl-amiloride pretreatment and ischemic preconditioning in the in situ rabbit heart. *Mol Cell Biochem*. 1998;186:13-8.

289. Slotki IN, Schwartz JH, Alexander EA. Na(+)-H+ exchange is stimulated by protein kinase C activation in inner medullary collecting duct cells. *Am J Physiol*. 1990;259:F666-71.

290. Ramasamy R, Liu H, Anderson S, Lundmark J, Schaefer S. Ischemic preconditioning stimulates sodium and proton transport in isolated rat hearts. *J Clin Invest*. 1995;96:1464-72.

291. Rohmann S, Weygandt H, Schelling P, Lues I. ATP-sensitive potassium channel (KATP) opener bimakalim mimics preconditionig protection in swine. *Circulation*. 1992;I(86-4):I-555.

292. Kilian SA, Strohm C, Schaper W In *J Mol Cell Cardiol*; 1999;pp Fr74 (abstr).

293. Van Winkle DM, Chien GL, Wolff RA, Soifer BE, Kuzume K, Davis RF. Cardioprotection provided by adenosine receptor activation is abolished by blockade of the KATP channel. *Am J Physiol*. 1994;266:H829-39.

294. Hanley PJ, Mickel M, Löffler M, Brandt U, Daut JM. ATP-sensitive K+(KATP) channel-independent targets of diazoxide and 5-hydroxydecanoate in the heart. *Journal of Physiology*. 2002;

295. Sato H, Miki T, Vallabhapurapu RP, Wang P, Liu GS, Cohen MV, Downey JM. The mechanism of protection from 5 (N-ethyl-N-isopropyl)amiloride differs from that of ischemic preconditioning in rabbit heart. *Basic Res Cardiol*. 1997;92:339-50.

296. Gumina RJ, Beier N, Schelling P, Gross GJ. Inhibitors of ischemic preconditioning do not attenuate Na+/H+ exchange inhibitor mediated cardioprotection. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2000;35:949-53.

297. Gross G, Schultz J. In dogs tolerant to ischemic preconditioning (IPC), the sodium-hydrogen exchange (NHE) inhibitor, EMD85131 retains its efficacy to reduce myocardial infarct size (IS). *Circulation*. 1997;00 (SUPPl. I):1743.

298. Miura T, Liu Y, Goto M, Tsuchida A, Miki T, Nakano A, Nishino Y, Ohnuma Y, Shimamoto K. Mitochondrial ATP-sensitive K+ channels play a role in cardioprotection by Na+-H+ exchange inhibition against ischemia/reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*. 2001;37:957-63.

X. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich all denen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, ganz herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt:

- Herrn Professor Dr. Dr. h.c. Wolfgang Schaper für die Überlassung des interessanten Themas und seine sehr herzliche und intensive Betreuung im Verlauf der Erstellung dieser Dissertation. Desweiteren bedanke ich mich für die optimalen Arbeitsbedingungen in ihrer Arbeitsgruppe,
- Der Firma Boehringer Ingelheim Pharma KG für die gewährte finanzielle Unterstützung in dieser Zeit,
- Frau Professor Dr. Monika Kressin für die kritische Durchsicht des Manuskripts und die Betreuung dieser Dissertation von Seiten des veterinärmedizinischen Fachbereichs der Justus-Liebig-Universität Gießen,
- meiner veterinärmedizinischen Kollegin Claudia Strohm für ihre detaillierte Einführung in die operativen und biochemischen Arbeitstechniken, ihre fortwährende tatkräftige Unterstützung und für ihre Freundschaft,
- Miroslav Barancik vom Herzforschungsinstitut der Slovakischen Akademie der Wissenschaften in Bratislava/Slovakische Republik für seine Hilfe bei biochemischen Fragestellungen und seine fortwährend freundschaftliche Unterstützung,
- Gerhard Stämmler und Gunther Schuster für Ihren besonderen Einsatz bei der Lösung von EDV-Problemen,
- Matthias Heil, Armin Helisch, Silvia Thomas und Lieven Pool für das Korrigieren der Arbeit
- Annemarie Möbs für ihre Mühe bei photographischen Arbeiten, Elisabeth Cortes und Ulrike Jahn für die verlässliche Tierbetreuung, Silvia Thomas für ihre freundschaftliche Unterstützung bei labortechnischen Problemen, Frederik Pipp für seine Hilfe bei operativen Eingriffen und Helmut Kreutzer für die schnelle Abwicklung von Literaturrecherchen,
- Sven Kilian und Uta Hoffmann für das Vermitteln der Arbeit,
- den Kollegen innerhalb unserer Abteilung für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre,
- meinen Eltern, für ihre liebevolle Unterstützung und daß sie mir diesen Weg ermöglicht haben.