

Stefan Horst Gerber

Dr. med.

Bedeutung der intrazellulären Natrium- und Kalziumkonzentration für die durch Nikotin induzierte Noradrenalinfreisetzung aus Rindernebennierenmarkszellen

Geboren am 15.01.1970 in Lampertheim

Reifeprüfung am 17.05.1989 in Bensheim

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1989/90-WS 1995/96

Physikum am 05.09.1991 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr in Heidelberg

Staatsexamen am 13.05.1996 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Innere Medizin

Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. M. Haass

Nikotin führt über Stimulation peripherer sympathischer Nervenendigungen sowie des Nebennierenmarks zu einer Sympathikusaktivierung mit konsekutivem Anstieg von Herzfrequenz und Blutdruck. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bedeutung einer Veränderung intrazellulärer Kationenkonzentrationen für die durch Nikotin induzierte Katecholaminfreisetzung näher charakterisiert. Die Untersuchungen wurden an Rindernebennierenmarkszellen, einem etablierten Modellsystem für die Analyse der Katecholaminfreisetzung, durchgeführt. In Einzelzellen wurden die intrazellulären Konzentrationen von Natrium ($[Na^+]_i$) und Kalzium ($[Ca^{2+}]_i$) mikrofluorimetrisch mit Hilfe der Fluoreszenzindikatoren SBFI (sodium-binding-benzofuran-isophthalate) bzw. Fura-2 bestimmt, die eine kontinuierliche, quantitative Analyse der jeweiligen Kationenkonzentration ermöglichen. Zur Quantifizierung der Katecholaminfreisetzung wurden die Zellen zuvor mit tritiummarkiertem ($[^3H]$ -)Noradrenalin beladen. Die Untersuchungen wurden nicht nur unter Kontrollbedingungen, sondern auch nach Hemmung der Natrium/Kalium-ATPase und während metabolischer Inhibition (Cyanid und Glukoseentzug) durchgeführt, da vermutet wird, daß es hierunter zu einer Sensibilisierung sympathischer Nervenendigungen gegenüber Nikotin kommt.

Bevor die mikrofluorimetrische Bestimmung von $[Na^+]_i$ mittels SBFI in der vorliegenden Arbeit erstmals erfolgreich an Rindernebennierenmarkszellen durchgeführt werden konnte, war zunächst eine sorgfältige Charakterisierung durch Erstellung entsprechender *in vitro*- und *in vivo*-Eichkurven erforderlich. Für beide Ansätze konnte

gezeigt werden, daß die SBFI-Mikrofluorimetrie bis zu einer $[Na^+]_i$ von ca. 25 mmol/l hochsensibel ist (Auflösung < 1 mmol/l), während im Bereich höherer Konzentrationen keine präzise Auflösung mehr gewährleistet ist.

$[Na^+]_i$ und $[Ca^{2+}]_i$ betragen in unstimulierten Zellen unter Kontrollbedingungen $3,2 \pm 0,4$ mmol/l bzw. 64 ± 1 nmol/l. Nikotin induzierte eine konzentrationsabhängige Zunahme von $[Na^+]_i$ (auf maximal $25,8 \pm 0,5$ mmol/l), $[Ca^{2+}]_i$ (auf maximal 467 ± 17 nmol/l) sowie der $[^3H]$ -Noradrenalinfreisetzung. Im Gegensatz zu der durch Nikotin ausgelösten Zunahme von $[Ca^{2+}]_i$ und $[^3H]$ -Noradrenalinfreisetzung war der durch Nikotin induzierte Anstieg von $[Na^+]_i$ kalziumunabhängig. Auch weitere Untersuchungen mit Hemmung nikotinischer Rezeptoren (durch Hexamethonium), des Natriumeinstroms (versuchsweise durch Tetrodotoxin), des Kalziumeinstroms (durch verschiedene Kalziumkanalblocker) sowie des Natrium/Kalzium-Austauschers (durch kalziumfreien Superfusions- bzw. Inkubationspuffer), sowie die potentiellen Hemmstoffe des Natrium/Kalzium-Austauschers DMTU (Dimethylthioharnstoff) und Nickelchlorid erlauben den Schluß, daß Nikotin nach Koppelung an den nikotinischen Rezeptor primär einen Natriumeinstrom induziert. Sekundär wird durch den Natriumeinstrom ein Einstrom von Kalziumionen über spannungsabhängige Kalziumkanäle hervorgerufen, welcher schließlich die Freisetzung von Katecholaminen triggert.

Die Hemmung der Natrium/Kalium-ATPase bzw. des Energiestoffwechsels der Zellen hatte einen dualen Einfluß auf die Katecholaminfreisetzung:

I) Beide führten bereits in Abwesenheit von Nikotin zu einer kontinuierlichen Zunahme von $[Na^+]_i$ und $[^3H]$ -Noradrenalinfreisetzung, wobei der stimulatorische Effekt durch Kalziumentzug sogar gesteigert wurde. Hemmung des durch metabolische Inhibition ausgelösten Anstiegs von $[Na^+]_i$ durch einen Blocker des Natrium/Protonen-Austauschers (Hoe 694) verminderte auch die Katecholaminfreisetzung. Es handelt sich daher unter diesen Versuchsbedingungen um einen kalziumunabhängigen aber natriumabhängigen Freisetzungsmechanismus.

II) Beide Interventionen hatten darüber hinaus einen signifikanten Einfluß auf die Ansprechbarkeit der Zellen auf Nikotin. Die Schwellenkonzentration für die durch Nikotin hervorgerufenen Veränderungen der intrazellulären Kationenkonzentrationen sowie der $[^3H]$ -Noradrenalinfreisetzung erniedrigte sich um den Faktor 10. Die beobachtete Erniedrigung der Schwellenkonzentration für Nikotin könnte insbesondere unter pathophysiologischen Bedingungen (wie z.B. einer Myokardischämie), unter denen eine Sympathikusaktivierung unerwünscht ist, von klinischer Relevanz sein.