

# 1 Einleitung

## 1.1 Kardiovaskuläres System

Obwohl große Fortschritte bei der Diagnose und Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen gemacht wurden, bleiben sie die häufigste Todesursache in westlichen Industrienationen (Abb.1).

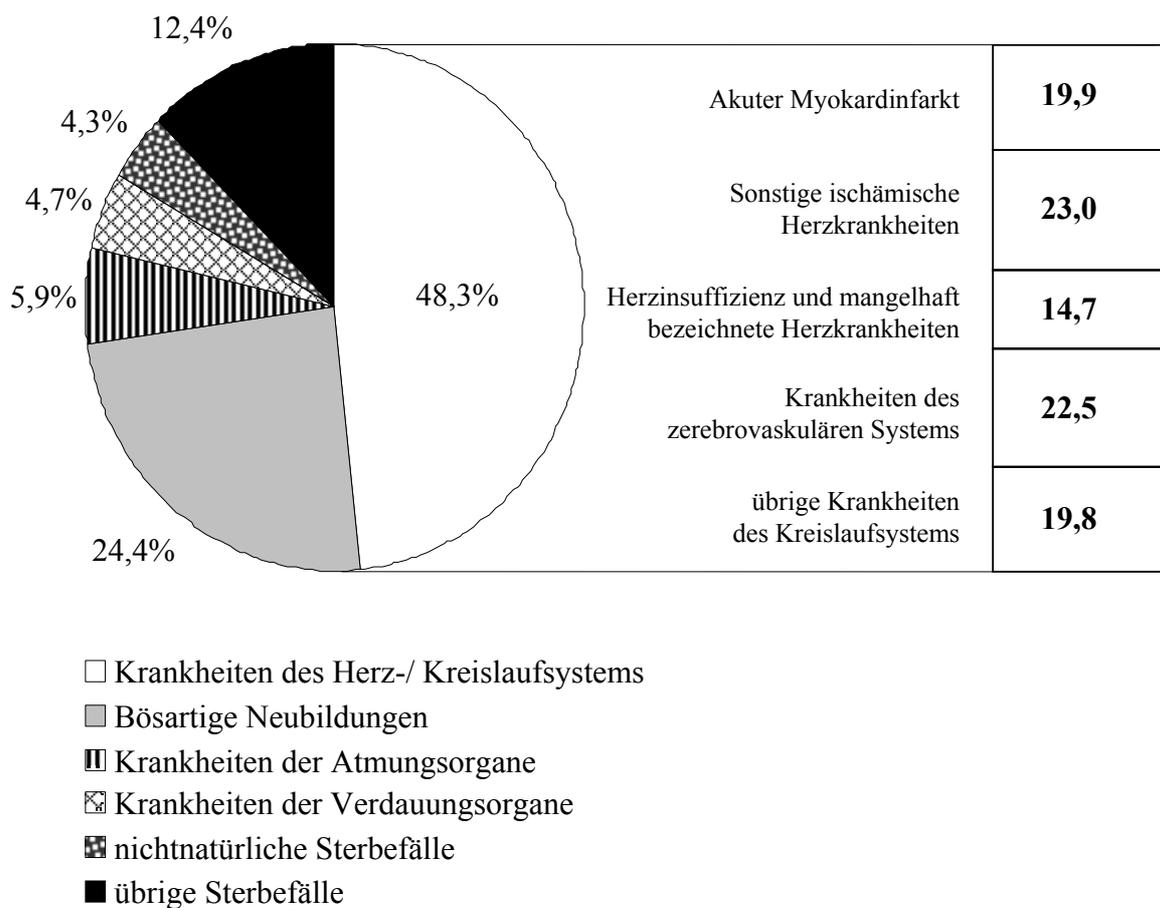


Abb. 1: Anteil ausgewählter Todesursachen 1997 in Deutschland (Quelle: Statistisches Bundesamt)

Die wichtigsten Todesursachen sind dabei der Myokardinfarkt (MI) und die koronare Herzkrankheit (KHK), gefolgt vom ischämischen Zerebralinsult und den peripheren arteriellen Verschlusskrankheiten (PAVK). Die ischämische Myokardnekrose ereignet sich meist auf dem Boden einer koronaren Herzkrankheit mit hochgradiger Stenose einer oder mehrerer Koronararterien. Meist wird der Herzinfarkt eingeleitet durch die Ruptur eines arteriosklerotischen Atheroms und die Bildung eines gefäßverschießenden Thrombus.

Zur Pathogenese der koronaren Herzkrankheit tragen verschiedene Faktoren bei, wie Blutdruck, Status des Lipidstoffwechsels, Glukosespiegel und Harnsäure, Funktion des Blutgerinnungs- und Fibrinolysesystems und viele andere. Daraus wird ersichtlich, dass die Pathogenese der koronaren Herzkrankheit, welche zu einem Myokardinfarkt führen kann, ein multifaktoriell bedingter Vorgang ist. Die zellulären und molekularen Mechanismen, die letztlich krankheitsauslösend sind, sind häufig unbekannt. So kann in den meisten Fällen nur symptomatisch therapiert werden.

Bei der Therapie der koronaren Herzkrankheit wurden große Fortschritte erzielt, insbesondere die Einführung der perkutanen transluminalen Ballonangioplastie (PTCA), die bei einer Vielzahl von Patienten die Stenose des Koronargefäßes aufheben oder zumindest verbessern kann. Die Stentimplantation hat die Effizienz dieses Verfahrens deutlich erhöht. Eine i.v. Thrombolyse (z.B. mit tPA oder Streptokinase) zeigt eine Rekanalisation des mit einem Thrombus verschlossenen Gefäßes in 70-80% der Fälle, wobei eine intrakoronare Lyse effektiver ist, als die systemische Lyse. Als ultima ratio bei einer hochgradigen Stenose gilt die Bypass-Operation.

Der gefährlichste Zeitraum nach einem Myokardinfarkt sind die ersten 72 Stunden. Arrhythmien wie z.B. ventrikuläre Extrasystolen, ventrikuläre Tachykardie und Kammerflimmern, Vorhofflimmern mit absoluter Tachyarrhythmie oder bradykarde Herzrhythmusstörungen sind die häufigsten Frühkomplikationen. Bei einer ausgedehnten Nekrose kann es zu einer Herzruptur mit Herzbeutelamponade, Ventrikelseptumruptur oder einer Papillarmuskelnekrose kommen. Kammerflimmern ist die häufigste, akute Linksherzinsuffizienz ist die zweithäufigste Todesursache nach einem Myokardinfarkt.

Seit einigen Jahren werden zahlreiche Untersuchungen durchgeführt, um die Behandlung nach einem Myokardinfarkt zu verbessern. Vor allem die zellulären Mechanismen, welche die Komplikationen wie Arrhythmien und Gewebenekrose verursachen, werden untersucht.

## 1.2 Regulation des pH-Wertes im Myokard

In eukariontischen Zellen entstehen Säuren durch eine Vielzahl an metabolischen Prozessen. Ohne eine adäquate Regulation würde das in einen kontinuierlichen Abfall des intrazellulären pH-Wertes resultieren. Für die meisten lebenden Zellen ist die Aufrechterhaltung des pH's im physiologischen Bereich von enormer Wichtigkeit für deren Wachstum und Entwicklung. Auch wichtige zelluläre Vorgänge, wie z.B. die Proteinsynthese oder die Enzymaktivierung sind stark abhängig vom pH-Wert.

Im Myokard eines Säugetieres ist die Regulation des intrazellulären pH-Wertes von besonderer Wichtigkeit. Einer der Gründe dafür ist, dass mit intrazellulärer Acidose die Kontraktilität deutlich sinkt (1). Deshalb besitzt die Herzmuskelzelle einen präzisen Mechanismus für die Erhaltung des intrazellulären pH-Wertes im physiologischen Bereich, welcher besonders unter pathologischen Bedingungen, wie die myokardiale Ischämie, wichtig ist.

Neben dem Protein Histidin sind drei Transporter in die Regulation des intrazellulären pH-Wertes einbezogen:  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher,  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter und der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher. Der  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher wird durch einen basischen intrazellulären pH aktiviert und trägt dazu bei, den pH-Wert in der Zelle zu senken (2). Der  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Cotransporter tauscht  $\text{HCO}_3^-$  und  $\text{Na}^+$  gegen saure Valenzen, schleust Natrium und Bicarbonat in die Zelle ein und Protonen aus der Zelle heraus. Er ist stetig einbezogen in die Regulation des pH-Wertes (3). Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher wird durch einen niedrigen pH-Wert aktiviert und ist vor allem bei einer Übersäuerung der Zelle aktiv. Er hilft der Zelle, sich von saueren Valenzen zu erholen, indem der Austauscher  $\text{H}^+$ -Ionen ausschleust und dafür  $\text{Na}^+$ -Ionen in die Zelle einschleust (4).

Eine besonders delikate Situation ist die pH-Regulation während der Ischämie.  $H^+$  wird dabei hauptsächlich durch die anaerobe Glykolyse,  $CO_2$ -Retention und eine ATP-Degradation produziert. Am Anfang der Ischämie werden die Protonen zuerst durch das intrazelluläre Protein Histidin gepuffert. Ungepuffertes  $H^+$  kann über dem sarcolemmalen  $H^+$ -Lactate-Cotransporter, den  $Na^+$ - $HCO_3^-$ -Cotransporter und den  $Na^+$ - $H^+$ -Austauscher die Zelle verlassen. Unter den Bedingungen der Acidose repräsentiert der Natrium-Protonen-Austauscher einen sehr wichtigen Mechanismus der Protonenausstoßung.

### 1.3 Natrium-Protonen-Austauscher (NHE)

Der Natrium-Protonen-Austauscher ist in drei verschiedene Zellprozesse involviert, welche besonders wichtig sind für die Zellphysiologie:

- die Regulation von intrazellulärem  $H^+$ , und damit von intrazellulärem pH ( $pH_i$ ),
- die Regulation von intrazellulärem  $Na^+$ ,
- und die Regulation des Zellvolumens (5).

Der Austauscher ist wegen seiner besonderen Aufgabe im proximalen Tubulus der Niere schon länger bekannt. Die Aufgabe des Austauschers an der apikalen Seite des proximalen Tubulus ist die Natriumreabsorption, verbunden mit der Ansäuerung des Urinfiltrates (6).

Sardet und Pouysségur gelang es 1989, die Struktur und die Expression des Austauschers genau zu untersuchen und den Austauscher zu klonieren (7). Die isolierte DNA war 5 kb lang und kodiert für die ubiquitär vorkommende Isoform NHE-1. Danach begann man zu untersuchen, in welchen Geweben der Austauscher sonst noch exprimiert wird und welche Rolle er dort spielt.

Der Natrium-Protonen-Austauscher existiert in mehreren verschiedenen Isoformen. Drei weitere Isoformen NHE-2, NHE-3 und NHE-4 sind identifiziert und kloniert worden (8, 9, 10). Bei den Säugern ist der Natrium-Protonen-Austauscher in die Plasmamembran integriert. Die Isoformen sind strukturell und funktionell betrachtet untereinander verwandt, zeigen aber

eine unterschiedliche Gewebeverteilung und zum Teil unterschiedliche pharmakologische Eigenschaften.

Die Gewebeverteilung der verschiedenen Isoformen:

Isoform	Gewebeverteilung
NHE-1	Überall vorkommend
NHE-2	Gastrointestinaltrakt > Skelettmuskel > Gehirn > Niere > Testis > Uterus > Herz, Lunge
NHE-3	Dickdarm > Dünndarm > Niere > Magen
NHE-4	Magen > Dünndarm, Dickdarm > Uterus, Gehirn, Niere, Skelettmuskel

Tab. 1: (Quelle: Counillon L, Pouyssegur: Structure-function studies and molecular regulation of the growth factor activatable sodium-hydrogen exchanger (NHE-1). *Cardiovascular Research* 1995; 29: 147-154)

Eine wichtige Rolle spielt der Natrium-Protonen-Austauscher auch in den glatten Muskelzellen der Gefäße. Mehrere Forschergruppen haben festgestellt, dass es einen Zusammenhang gibt zwischen dem  $\text{pH}_i$  und dem Wachstum der glatten Gefäßmuskelzellen. Eine aktiv proliferierende Gefäßmuskelzelle hat einen leicht alkalischen pH-Wert (5, 95). Die Aktivierung des Natrium-Protonen-Austauschers ist wahrscheinlich verantwortlich für die intrazelluläre Alkalisierung und den Natriumeinstrom, welcher notwendig ist für die Zellproliferation. Angiotensin II, Endothelin und Thrombin führen zu einer Alkalisierung der Zelle (96). Darüberhinaus hat man gezeigt, dass Hemmstoffe des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers das Zellwachstum blockieren (97). Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer neuen Behandlung der essentiellen Hypertonie. Zwei Studien haben gezeigt, dass die Hemmstoffe des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers die Bildung einer Neointima nach einer Ballondilatation des Gefäßes verringern (98, 99).

Der Natrium-Protonen-Austauscher kann zusätzlich zu Natrium auch Lithium transportieren (101).

Neben seiner Hauptaufgabe in der pH-Regulation der Zelle spielt der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher auch eine Rolle für den Natriumeinstrom und wirkt somit aktiv mit in der osmotischen Regulation des Zellvolumens (100). Der Natrium-Protonen-Austauscher wird im Falle einer

Zellschrumpfung schnell aktiviert und hilft zusammen mit dem  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Cotransporter, das Zellvolumen zu regulieren (5). Darüberhinaus ist es wichtig, dass der Austauscher auch in umgekehrter Richtung funktionieren kann, sollte sich der transmembranöse Gradient für Natrium umkehren.

### 1.3.1 Rolle des Austauschers während der Ischämie und Reperfusion

Im physiologischen pH-Bereich ist der Natrium-Protonen-Austauscher unbedeutend. Erst mit fallendem intrazellulären pH wird der Antiporter schnell aktiviert und erreicht seine maximale Transportrate bei einem intrazellulären pH-Wert von 1. Der Austauscher arbeitet elektroneutral mit Hilfe des elektrochemischen Gradienten, indem er ein extrazelluläres  $\text{Na}^+$  gegen ein intrazelluläres  $\text{H}^+$  durch die Plasmamembran austauscht (12, 13).

Während der Ischämie kommt es sowohl intrazellulär als auch extrazellulär zu einem pH-Abfall. Die intrazelluläre Acidose ist eine Folge des anaeroben Metabolismus und des ATP Katabolismus während der Ischämie. Der niedrige intrazelluläre pH führt zu einer Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (12). Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher schleust  $\text{H}^+$ -Ionen aus der Zelle heraus und dafür  $\text{Na}^+$  in die Zelle ein und kann zur Folge eine Akkumulation von intrazellulärem Natrium mit sich bringen. Die Ausstoßung von Natrium durch die Na/K-ATPase nimmt mit fallendem Energiegehalt der Zelle ab (13). Zusätzlich führt die extrazelluläre Akkumulation von  $\text{H}^+$  zu einer Hemmung der Na/K-ATPase (14).

Der erhöhte intrazelluläre Gehalt an  $\text{Na}^+$  kann zu einer Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers führen. Der  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher tauscht ein intrazelluläres  $\text{Na}^+$  gegen ein extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  aus. Die Folge ist eine Akkumulation von intrazellulärem Calcium. Dabei kann es zu einer Verdrängung der  $\text{H}^+$ -Ionen von den Proteinbindungsstellen durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen kommen, was wiederum in einen Abfall des intrazellulären pH-Wertes resultiert. Die Folge der Akkumulation von intrazellulärem Calcium können Zellnekrose, Kontraktionen und Arrhythmien sein (15, 16).

Während der Reperfusion wird der extrazelluläre pH durch das schnelle Auswaschen der extrazellulären  $H^+$ -Ionen und der Metaboliten schnell normalisiert. Der weitgehend normalisierte extrazelluläre pH steht dem noch immer niedrigen intrazellulären pH gegenüber, was einen großen  $H^+$ -Konzentrationsgradienten durch die Zellmembran mit sich bringt. Das führt zu einem schnellen Ausfluss der angesammelten intrazellulären  $H^+$ -Ionen sowohl durch den passiven Efflux von Laktat und Carbondioxide, als auch durch den aktiven Ausstoß mit Hilfe des  $Na^+H^+$ -Austauschers. Der Natrium-Protonen-Austauscher schleust verstärkt Protonen aus der Zelle aus, was zu einem weiteren Anstieg des intrazellulären Natriums führt. Die  $Na^+/K^+$ -ATPase, welche das intrazelluläre  $Na^+$  gegen das extrazelluläre  $K^+$  austauschen könnte, ist beeinträchtigt durch den niedrigen ATP-Gehalt der Zelle. Der  $Na^+/Ca^{2+}$ -Austauscher ist weiterhin aktiv und tauscht ein intrazelluläres  $Na^+$  gegen ein extrazelluläres  $Ca^{2+}$  aus. Das führt zu einem weiterem Anstieg des intrazellulären  $Ca^{2+}$ . Der erhöhte intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Gehalt ist verantwortlich für den Zellschaden, wie z.B. Arrhythmien, Kontraktionen, Nekrosen.

Murphy und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Natrium während der Ischämie kontinuierlich ansteigt mit einer zusätzlichen schnellen Zunahme während der initialen Phase der Reperfusion (17). Die Aktivität des  $Na^+/H^+$ -Austauschers nimmt bei extrazellulärer Acidose aufgrund der extrazellulären  $H^+$ -Akkumulation, und dem damit einhergehenden verringerten  $H^+$  transsarcolemmalen Gradienten ab (18, 19). Bei einem  $pH_e$  von 6.3, welcher innerhalb von 10-15 Minuten im ischämischen Myokard erreicht sein kann, scheint der  $Na^+/H^+$ -Austauscher still zu sein. Das bedeutet, dass sich die Aktivität des Austauschers auf die ersten 10-15 Minuten der Ischämie sowie auf den Zeitraum der Reperfusion beschränkt, da sich der  $pH_e$  während der Reperfusion sehr schnell normalisiert (20).

Es ist sicher, dass die ersten Minuten, vielleicht sogar die ersten Sekunden der Reperfusion den kritischen Zeitraum darstellen. Ibuki und Mitarbeiter zeigten, dass eine acidotische Reperfusionslösung während der ersten zwei Minuten einen protektiven Effekt hat. Danach ist die Perfusion mit einer Lösung mit einem normalen pH nicht mehr länger schädlich (21).

Tani und Neely haben gezeigt, dass eine  $(Na^+)_i$  Zunahme im ischämischen Myokard und ein erhöhtes  $(Na^+)_i$  am Ende der Ischämie im linearen Zusammenhang stehen mit der Erhöhung von  $(Ca^{2+})_i$  und der Abnahme der ventrikulären Funktion während der Reperfusion (12).

### 1.3.2 Woher kommt der Zellschaden

Die größten Zellschäden, wie z.B. Nekrose oder die Arrhythmien werden während der Reperfusion verursacht und nicht während der Ischämie (22). Der Mechanismus, welcher dafür verantwortlich ist, bezieht den Natrium-Protonen-Austauscher mit ein, gefolgt von einer bedrohlichen, intrazellulären Calciumakkumulation (12, 23).

#### 1.3.2.1 Calciumüberschuss, ein zentraler Punkt

Die biochemischen, strukturellen und funktionellen Veränderungen, welche in Verbindung stehen mit der myokardialen Ischämie, werden vor allem während der Reperfusion hervorgerufen. Der Calciumüberschuss während der Reperfusion ist der für den Zellschaden zentral verantwortliche Punkt (23, 24).

Dieser Calciumüberschuss verursacht eine Calciumakkumulation in den Mitochondrien, was zu einer mitochondrialen Funktionsstörung sowie zu einer Störung der oxidativen Phosphorylierung führt (25). Die Aktivierung einer calciumabhängigen Phospholipase und die Freisetzung von Arachidonsäure aus den Membranlipiden trägt zur Verursachung des Membranschadens sowie zum Funktionsverlust bei (26). Darüberhinaus kann das ansteigende Calcium im Cytosol die Kapazität des endoplasmatischen Retikulums überfordern. Calcium wird freigesetzt und die Folge ist eine Störung der Kontraktion und der Relaxation der Myofilamente.

Während der Acidose ist die Sensitivität der Myofilamente für Calcium eingeschränkt (27). Bei einer Normalisierung des pH-Wertes, z.B. während der Reperfusion, ist dieser Schutz nicht mehr gegeben. Es kommt daher zu unkontrollierten Kontraktionen und Relaxationen der Herzmuskelfasern.

Mehrere Versuche haben eine dramatische Zunahme der Calciumaufnahme der Zelle während der Reperfusion gezeigt (25, 28). Shine und Douglas haben nachgewiesen, dass die Reperfusion des Myokards, nach einer myokardialen Ischämie, mit einer hypocalcämischer

Lösung eine Verbesserung der metabolischen und funktionellen Genesung der Zelle, also eine Verbesserung der Kontraktion und einen höheren Gehalt an ATP, mit sich brachte (29).

In den Myokardzellen ist das  $\text{Ca}^{2+}_i$ -Niveau signifikant beeinflussbar durch die Aktivität des  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers. Diese Verbindung zwischen dem  $\text{Na}^+_i$ -Niveau und dem  $\text{Ca}^{2+}_i$ -Niveau ist mit verantwortlich dafür, dass sich eine  $\text{Na}^+_i$ -Überladung schädlich auf das Herzgewebe auswirkt. Dieser Austauscher schleust, abhängig vom Natrium-Gradienten,  $\text{Ca}^{2+}$  aus der Zelle heraus (30). Wenn sich der Natrium-Transmembranösegradient verringert, verursacht durch die steigende  $\text{Na}^+_i$ -Konzentration, versagt der  $3\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher und  $\text{Ca}^{2+}_i$  steigt an (23, 24, 17).

### 1.3.2.2 pH-Paradox

Nach einer Ischämie kann die Reperfusion, mit der Normalisierung des pH-Wertes, zu einem beschleunigten Zelltod führen, welcher sauerstoffunabhängig ist. Diese paradoxe Reaktion wird „pH-Paradox“ genannt. Sie wird vermittelt durch eine Veränderung des intrazellulären pH-Wertes (31, 32). Der NHE-Inhibitor und der acidotische pH verhindern den Zellschaden, welcher durch die Reperfusion hervorgerufen wird, in dem sie die Alkalisierung des intrazellulären pH's und dadurch die Reaktion des paradoxen pH's verhindern (33, 34).

Das pH-Paradox ist eine der möglichen Ursachen für den Zellschaden während der Reperfusion. Darüberhinaus sind auch die folgenden Punkte nicht außer Acht zu lassen (35, 36), wie z.B.:

- $\text{Ca}^{2+}$  Überschuss,
- Mitochondrien-Schaden,
- sauerstofffreie Radikalbildung,
- osmotischer Stress,
- Akkumulation und Aktivierung der neutrophilen Granulozyten.

### 1.3.2.3 Andere Ursachen für den Zellschaden

Fällt der intrazelluläre pH während der Ischämie, kommt es zu einer verminderten Kontraktilität der Herzmuskelfaser. Der negative inotropische Effekt einer Acidose ist schon an vielen Herzmodellen bewiesen worden, wie z.B. an isolierten Herzmuskelzellen (37), an isolierten perfusionierten Herzen (38) und am Kaninchenherzen in vivo (39).

Das hydrolytische Enzym Phospholipase A<sub>2</sub> birgt einen weiteren, den Zellschaden erklärenden Mechanismus in Form einer Hydrolyse der Phospholipide der Zellmembran. Die myokardiale Phospholipase A<sub>2</sub> wird nämlich durch ein erhöhtes intrazelluläres Ca<sup>2+</sup> aktiviert. Eine erhöhte Produktion der Arachidonsäure und deren Metabolite ist die Folge (40).

Die Herzmuskelzellen können sich nicht vollständig regenerieren. Jeder nekrotische (ischämische) Verlust ist gleichzeitig ein bleibender Verlust der Herzfunktion. Deshalb ist es besonders wichtig, Wege zu finden, die den Schaden, der durch die Ischämie hervorgerufen wird, verhindern oder verringern.

### 1.3.3 Hemmstoffe des Natrium-Protonen-Austauschers

Man kann zusammenfassend feststellen, dass der Natrium-Protonen-Austauscher einen wichtigen Angriffspunkt für die pharmakologische Intervention zum Schutz des Myokards vor dem Schaden während der Ischämie und der Reperfusion darstellen könnte. Das bietet eine Möglichkeit für eine neue und effektive Strategie zum Schutz des Myokards. Vom pharmakologischen Standpunkt aus steht eine große Anzahl an Arzneimitteln zur Verfügung, die sich durch eine hohe Wirksamkeit und Spezifität in ihrer Fähigkeit, den Natrium-Protonen-Austauscher zu hemmen, auszeichnen.

Die zuerst entdeckten Hemmstoffe des Natrium-Protonen-Austauschers gehören zur Familie der Amiloride (41). Amiloride sind seit 1971 bekannt als potente Hemmer des Natriumkanals

im distalen Tubulus der Niere (42) und werden als Kalium sparende Diuretika eingesetzt (43). Einige Beispiele für potente Amiloride: ethylisopropyl amiloride (EIPA), dimethyl amiloride (DMA), hexamethylene amiloride (HMA), methylisobutyl amiloride (MIA oder MIBA). Amiloride hemmen kompetitiv den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, indem sie mit Natrium an seiner Bindungsstelle an der Außenseite der Membran konkurrieren (44). Da die Amiloride nicht nur den NHE-1 Isotyp hemmen, haben die Amiloride, besonders bei hoher Dosierung, auch unspezifische Wirkungen.

Deshalb hat man neue Wirkstoffe entwickelt, die Amilorid-unabhängig sind. Die Verbindung HOE 694 ist das erste Beispiel für einen Inhibitor des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers, welcher nicht von den Amiloriden abgeleitet worden ist. Die neuen Wirkstoffe versprechen eine effektive und spezifische Hemmung des Natrium-Protonen-Austauschers (45). HOE 694 ist ein sehr spezifischer Inhibitor des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers vom Subtyp 1 (46). Der Wirkstoff zeigte in vitro und in vivo bei einer myokardialen Ischämie eine sehr gute kardioprotektive Wirkung (45, 47).

Um die Wirkung weiter zu verbessern, wurde die Substanz HOE 642 entwickelt. HOE 642 ist etwa vier mal stärker wirksam als HOE 694 (45). Darüberhinaus ist es noch spezifischer gegen NHE-1 wirksam, als HOE 694 (46). HOE 642 ist etwa 60 mal stärker wirksam gegen NHE-1 als gegen NHE-2, und 3000 mal stärker wirksam gegen NHE-2 als gegen NHE-3 (48).

Die NHE-1 Isoform hat die größte Empfindlichkeit gegenüber Amilorid und seinen Abkömmlingen. Der NHE-2 hat eine ähnliche Empfindlichkeit gegenüber Amilorid, ist aber gegenüber 5N substituierten Derivaten von Amilorid und gegenüber dem HOE 694 weniger empfindlich. Der NHE-3 ist gegenüber Amilorid, seinen Abkömmlingen und gegenüber HOE 694 weniger empfindlich, als NHE-1 (48).

### 1.3.4 Hemmung des Natrium-Protonen-Austauschers

Wird der Natrium-Protonen-Austauscher gehemmt, bleibt die intrazelluläre Natriumkonzentration, und damit auch die intrazelluläre Calciumkonzentration, weitgehend

unverändert. Die pH-Erholung ist durch die Inhibitoren des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers während der Reperfusion verlangsamt (13). Dieser Effekt, verbunden mit der protektiven Reduktion der  $\text{Ca}^{2+}$ -Überladung während der Ischämie und der Reperfusion, macht die intrazelluläre Calciumkonzentration weniger schädlich (50).

Da die Protonen durch einen aktivierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher ausgeschleust werden, liegt die Vermutung nahe, dass die Hemmer des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers den intrazellulären pH weiter senken. Diese Vermutung konnte jedoch mit NMR am isolierten Ratten-Myokard nicht bestätigt werden. Im allgemeinen wurde der Abfall des  $\text{pH}_i$  durch die Hemmer des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers nicht (13), bzw. nur gering beeinflusst (51).

Vandenberg zeigte kürzlich, dass nach einer 10 min globalen Ischämie bei 30°C die Wiederherstellung des intrazellulären pHs in einem perfusiertem Myokard von Lactat Efflux zu 40%,  $\text{CO}_2$  Efflux zu 20-25% und dem Natrium abhängigen  $\text{HCO}_3^-$  Transporter zu 20-25% gewährleistet wird (52). Das bedeutet, dass die Beteiligung des Natrium-Protonen-Austauschers an der Wiederherstellung des intrazellulären pH-Wertes weniger als 10-20% beträgt.

Toxische Effekte der NHE-Inhibitoren sind wahrscheinlich sehr gering, weil der Antiporter unter physiologischen Bedingungen eine niedrige Aktivität aufweist. Außerdem verringert die Entwicklung von selektiven, gewebespezifischen NHE-Inhibitoren das Potential für ungewollte Effekte.

Wird der Natrium-Protonen-Austauscher während der Ischämieperiode mit EIPA gehemmt, kann man eine Abnahme der Infarktgröße beobachten. Im Gegensatz dazu ist bei einer Hemmung des Austauschers nur während der Reperfusion keine Abnahme der Infarktgröße festzustellen (53).

Man hat gezeigt, dass eine Zugabe von Dimethylamiloriden zur cardioplegischen Lösung zu Beginn der Ischämie (z.B. in der Herzchirurgie oder Herztransplantation) zu einer Verbesserung der Ventrikelfunktion während der darauf folgenden Reperfusion führt. Dieser Effekt steht im Zusammenhang mit einer Erhöhung der intrazellulären Acidose während der späten Ischämie und der frühen Reperfusion. Eine Verringerung der postischämischen Dysfunktionen des Herzens steht im Zusammenhang mit der Abnahme der intrazellulären

Na<sup>+</sup>- und Ca<sup>+</sup>-Überladung. Die Prävention vor Arrhythmien ist die Folge des Gewebeschutzes während der Ischämie und der Reperfusion (54).

Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauscher-Inhibitoren Amilorid und Methyloisobutylamilorid, infundiert während der Ischämie und der Reperfusion, verbessern die Wiedererlangung der Ventrikelfunktion im Kaninchenmyokard. Diese Verbesserung der Ventrikelfunktion kann nicht beobachtet werden, wenn der Wirkstoff nur während der Reperfusion gegeben wird (55).

Im Gegensatz dazu haben Meng und Pierce am rechten Ventrikel des Rattenmyokards einen protektiven Effekt von Dimethylamiloriden auch nur während der Reperfusion gezeigt (56).

Amilorid unterdrückte das Auftreten für die induzierte ventrikuläre Tachykardie nach einem Myokardinfarkt, bei etwa 50% der Hunde. Duff und Mitarbeiter haben einen ähnlichen Versuchsaufbau an Menschen durchgeführt. Amilorid wurde Patienten, die einen Myokardinfarkt hatten, gegeben. Sechs von 31 Patienten (19%) unterdrückten das Auftreten für die induzierte ventrikuläre Tachykardie (57).

Im Rahmen der Reduktion des anaeroben Metabolismus durch die Hemmung des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers mit HOE 694 hat man einen erhaltenen ATP-Gehalt vorgefunden. Das lässt vermuten, dass der Verbrauch an ATP gesunken ist. Die Hemmer des Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>-Austauschers verursachen diesen Effekt durch eine verminderte ischämische Na<sup>+</sup><sub>i</sub>-Überladung und damit eine Reduktion der Aktivität der Na/K-ATPase (45).

Der Wirkstoff HOE 642 wirkt während der Ischämie und der Reperfusion cardioprotektiv und antiarrhythmogen, besonders gegen VES, ventrikuläre Tachykardie und gegen das Kammerflimmern (48). HOE 642, infundiert während der Ischämie und der Reperfusion, verringert nicht nur die Inzidenz, sondern verkürzt auch die Dauer der Arrhythmien während der Reperfusion. Es reduziert auch die Freisetzung der Laktatdehydrogenase und der Kreatinkinase und bewahrt den Gehalt an Glykogen, ATP und Kreatinphosphat. Mit HOE 642 vorbehandelte Herzen zeigen eine verringerte Freisetzung von Laktat und einen verminderten Gehalt an Laktat im Gewebe. Daraus folgt eine Abnahme des anaeroben Stoffwechsels während der Ischämie und der Reperfusion. Eine Reduktion der Infarktgröße ist auch zu beobachten. Mit diesem Wirkstoff hat man daher eine potentielle therapeutische Möglichkeit,

den Zellschaden im Myokard während der Ischämie und der Reperfusion effizient zu verringern (48).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die wichtigsten cardioprotektiven Effekte der Inhibitoren des Natrium-Protonen-Austauschers die verminderte Überladung von  $\text{Na}^+_i$  und  $\text{Ca}^{2+}_i$  und aufgrund der intrazellulären Acidose die verminderte Empfindlichkeit der Kardiomyozyten für das intrazelluläre Calcium sind (50).

### 1.3.5 Molekulare Regulation des Natrium-Protonen-Austauschers

Der Natrium-Protonen-Austauscher existiert als Dimer, der in die Plasmamembran (72) integriert ist. NHE-1 ist die am besten untersuchte Isoform, da sie überall vorkommt und ihre cDNA als erste kloniert worden ist (7). Alle bisher klonierten  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher besitzen zwei verschiedene funktionelle Domänen. Die N-terminale hydrophobe Domäne durchquert die Plasmamembran 10 bis 12 mal. Die andere hydrophile Hälfte des Moleküls, welches aus mehreren hundert Aminosäuren besteht, ist frei im Cytoplasma (7). Die Isoformen stimmen in 40% des transmembranösen Teils überein. Im cytoplasmatischen Teil besteht fast keine Übereinstimmung (73).

Der N-terminale transmembranöse Teil des Proteins ist verantwortlich und notwendig für den Transport der Ionen. Die cytoplasmatische Domäne fungiert als  $\text{H}^+$ -Sensorsystem und ist für die hormonelle Regulation des Proteins erforderlich (74). Die transmembranösen Segmente 5a und 5b sind in allen Antiportern nahezu identisch. Sie repräsentieren das Herz des Austauschers, ohne die der Transport der Ionen unmöglich wäre (75).

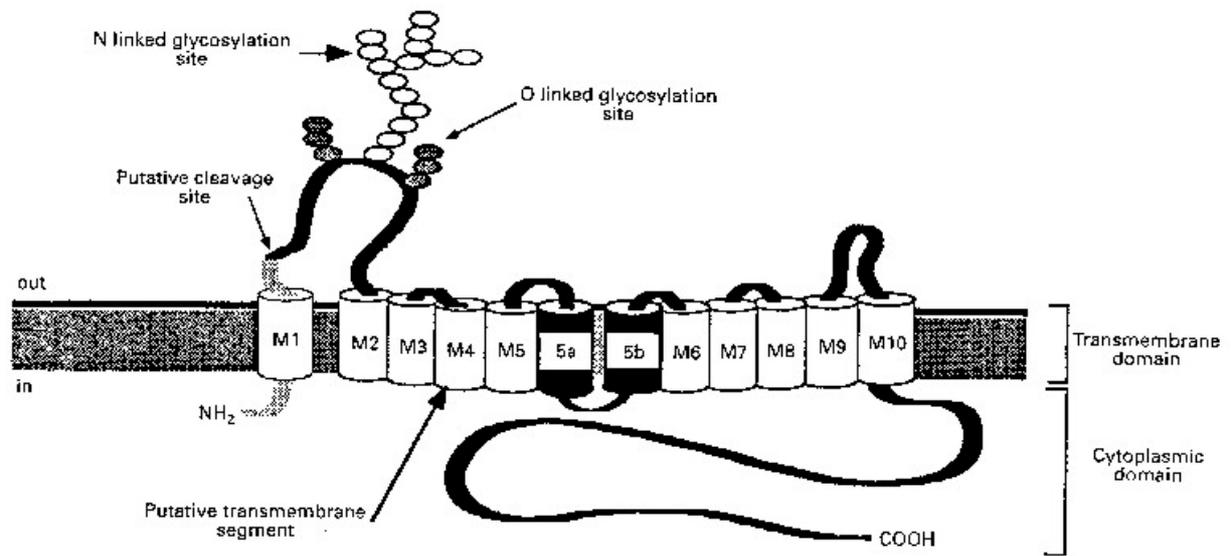


Abb. 2: Verallgemeinertes Modell der NHE-1-Isoform (76)

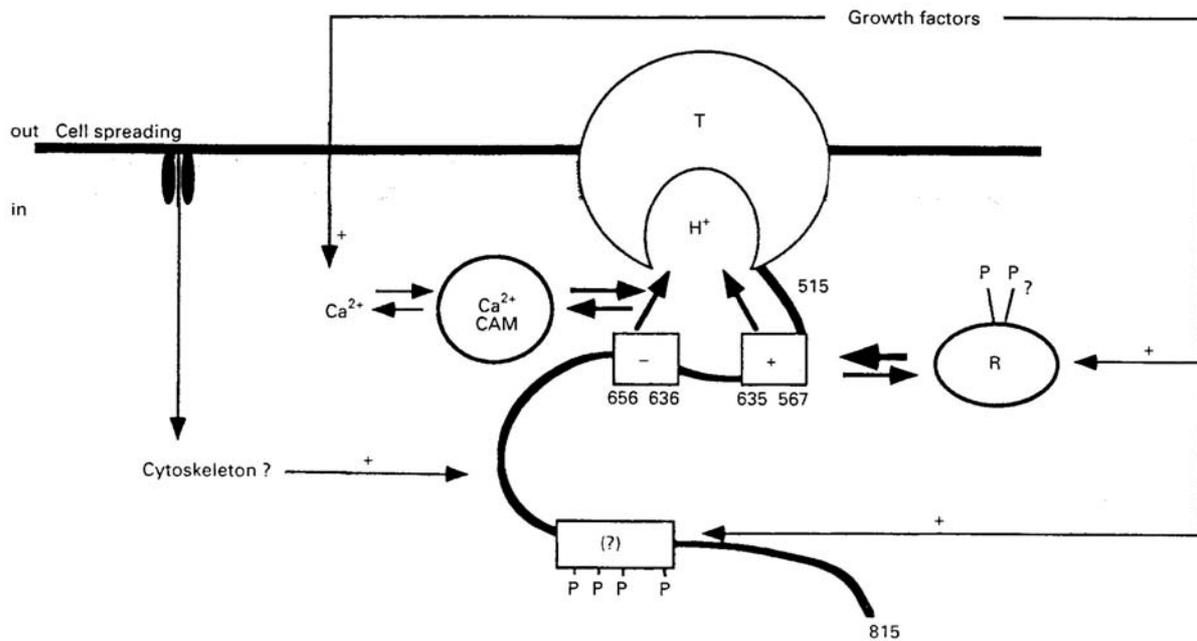


Abb. 3: Verallgemeinertes Modell der NHE-1-Aktivierung, T = Transportdomäne, welche die Protonenbindungsstelle beinhaltet, Ca<sup>2+</sup>-CAM = Calmodulin, P = Phosphorisationsstelle, R = Regulationsproteine (76)

Die cytoplasmatische Domäne von NHE-1 bindet einen Calcium-Calmodulin-Komplex. Calmodulin vermittelt intrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  als second messenger. Der Komplex aus Calmodulin und 4  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen steuert die Aktivität von Proteinkinasen, Ionenpumpen, die Bildung und den Abbau von cAMP, die Glykolyse sowie die Muskelkontraktion (76). Der Antiporter wird wahrscheinlich durch eine direkte Phosphorylierung des Proteins aktiviert (76).

Neben der Protonentransportstelle gibt es noch eine zweite Protonenbindungsstelle, welche als Protonensensor funktioniert. Der Austauscher arbeitet elektroneutral mit Hilfe des elektrochemischen Gradienten, indem er ein extrazelluläres  $\text{Na}^+$  gegen ein intrazelluläres  $\text{H}^+$  durch die Plasmamembran austauscht.

Die Kontrolle der posttranskriptionellen Regulationsmechanismen ist nicht bis ins letzte Detail untersucht worden. Man hat jedoch entdeckt, dass die mRNA von NHE-1 Elemente enthält, die die Aktivität der Translation niedrig hält (74). Das relativ geringe Expressionsniveau der mRNA des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers kann das Ergebnis einer niedrigen Transkription oder einer hohen Degradation sein. Die höhere Stabilität der mRNA könnte auch durch die Überregulation der mRNA als eine Antwort auf die Acidose begründet sein (77).

Die chronische Verminderung des extrazellulären pH-Wertes kann sowohl zu einer Erhöhung der  $V_{\max} \text{Na}^+/\text{H}^+$  führen, als auch eine Erhöhung der mRNA von NHE-1 mit sich bringen (78, 79, 80). Die chronische metabolische Acidose der isolierten und gezüchteten renalen epithelialen Zellen, verursacht durch  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , führte zu einem Anstieg der mRNA-Produktion von NHE-1 (79, 81).

Deshalb ist es besonders wichtig zu untersuchen, welche Rolle der Austauscher bei einer chronischen Ischämie spielt. Denn eine Erhöhung des Gehaltes an mRNA, verursacht durch eine chronische extrazelluläre Acidose, ist möglicherweise verantwortlich für das Vorkommen von Arrhythmien (78).

### 1.3.6 Neurohumorale Modulation des Natrium-Protonen-Austauschers

Die Affinität des Protonensensors zu den Protonen wird z.B. durch Neurotransmitter oder chemotaktische Peptide, gesteigert. Dadurch wird der Natrium-Protonen-Austauscher schneller aktiviert.

Wallert und Fröhlich haben gezeigt, dass  $\alpha_1$ -Sympathomimetika eine Aktivierung des Natrium-Protonen-Austauschers in den Kardiomyozyten bewirken können. Das deutet darauf hin, dass der intrazelluläre pH und der Natrium-Protonen-Austauscher eine Rolle bei der Induktion der Inotropie durch  $\alpha_1$ -Sympathomimetika spielen können (82). Die  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation der Purkinjefaser induzierte eine Alkalisierung des intracellulären pH's, und es wird bestätigt, dass  $\alpha_1$ -adrenerge Stimulation der Kardiomyozyten den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher aktiviert (83). Die Folge der  $\alpha_1$ -adrenergen Stimulation am  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher ist eine Steigerung der maximalen Transportrate beim Ionenaustausch (84). Die Freisetzung der  $\alpha$ -Sympathomimetika, wie es bei der myokardialen Ischämie der Fall ist (92), verstärkt die Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (88).

Das Gleichgewicht zwischen der Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers und des  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Symports scheint durch  $\alpha$ -adrenerge Rezeptoren beeinflussbar zu sein (88). Bicarbonat hat ebenfalls einen antagonistischen Effekt am  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher.

Die Stimulation des  $\alpha_{1a}$ -Subtypen der Adrenergerezeptoren führt zu einer gesteigerten Aktivität des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers. Überraschenderweise führt die Stimulation des  $\alpha_{1b}$ -Subtypen zu einer Hemmung des Antiporters und zu einer schwachen intracellulären Acidose (85). Der biochemische Mechanismus ist nicht bekannt.

Kramer und Smith haben festgestellt, dass Endothelin den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher aktiviert und dadurch den intrazellulären pH erhöht. Die Folge ist eine verbesserte Kontraktilität der Kardiomyozyten. Der genaue biochemische Mechanismus der Aktivierung des Antiporters ist nicht bekannt, aber man vermutet, dass Proteinkinase C daran beteiligt ist (86).

Adrenalin aktiviert den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher in Kardiomyozyten von Meerschweinchen. Der Agonist an den adrenergen Rezeptoren verschiebt die  $\text{pH}_i$ -Abhängigkeit des Antiporters um 0.07 Einheiten zur alkalischen Seite, d.h. der Austauscher wird schon bei höheren pH-Werten aktiviert (87).

Isoprenalin verlangsamt die Erholung des intrazellulären pHs nach einer Acidose. Das lässt vermuten, dass die  $\beta$ -adrenerge Stimulation den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher in den Kardiomyozyten der Meerschweinchen hemmt (88). Der genau Mechanismus ist nicht bekannt.

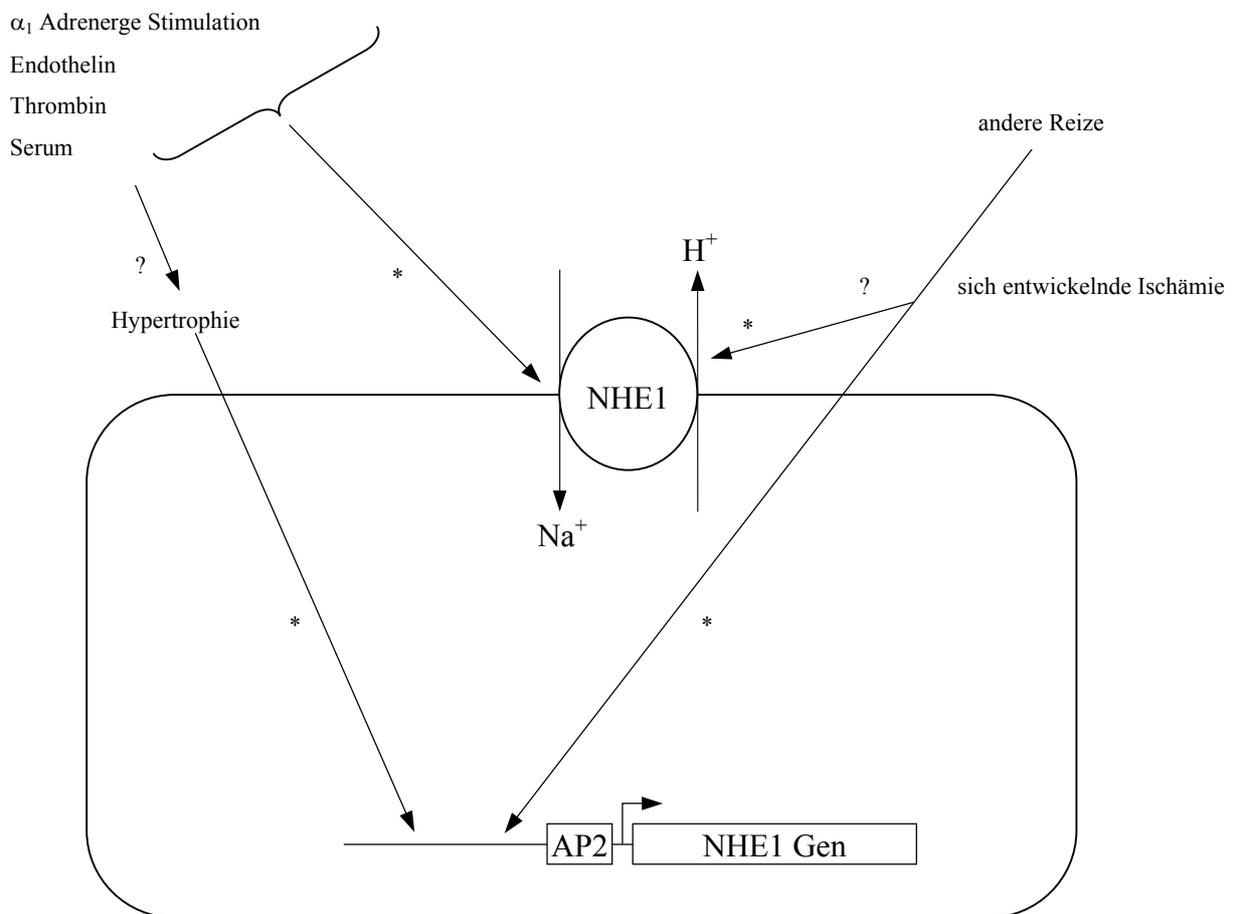
Grace und Vandenberg haben festgestellt, dass Angiotensin II die Wiederherstellung des intrazellulären pH's nach einer Acidose erleichtert, indem er den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher aktiviert (89).

Aldesteron aktiviert innerhalb von nur ein bis zwei Minuten den Natrium-Protonen-Austauscher. Der genaue biochemische Mechanismus der Aktivierung des Antiporters ist nicht bekannt. Die Aktivierung erfolgt wahrscheinlich direkt an der Zellmembran mit Hilfe der cyclischen Nukleotide cAMP und cGMP. Dieser Effekt von Aldosteron ist nicht mit Spironolacton antagonisierbar, dem klassischen Antagonisten der Mineralkortikoide. Der Wirkmechanismus von Aldosteron-Antagonisten auf der Ebene der Zellmembran könnte eine neue Strategie für die Behandlung der Hypertension darstellen (90).

Bereits in der RALES-Studie ist nachgewiesen, dass eine tägliche Einnahme von 25 mg Spironolacton bei Patienten mit Herzinsuffizienz im NYHA II bis IV (EF > 35%) das Risiko des plötzlichen Herztodes und des Todes infolge der Verschlechterung der Herzfunktion um 30% senkt. Aldosteron steigert die Rückresorption von Natrium und die Ausscheidung von Kalium im distalen Nierentubulus, aktiviert den Sympathikus, deaktiviert den Parasympathikus und fördert die myokardiale und vasculäre Fibrose und Dysregulation der Barorezeptoren. Spironolacton ist der klassische Antagonist von Aldosteron und die bereits erwähnte Senkung der Fälle des plötzlichen Herztodes und des Todes infolge der Verschlechterung der Herzfunktion steht offensichtlich im Zusammenhang mit dem verminderten Verlust von Kalium, aber auch andere der o.g. Mechanismen sind von Bedeutung. Wie bereits oben erwähnt aktiviert Aldosteron den Natrium-Protonen-Austauscher, wobei dieser Effekt jedoch nicht mit Spironolacton antagonisierbar ist (108).

Die Glukokortikoide sind etwa 10 000-fach schwächer wirksam am  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher, als die Mineralkortikoide (90). Eine chronische Behandlung mit den Glukokortikoiden steigert aber die Expressionsrate von NHE-1 und NHE-3 in den Kardiomyozyten der Kaninchen (91).

Von besonderer Wichtigkeit ist auch, dass Laktatsäure zur Aktivierung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers während der Ischämie und der Reperfusion beiträgt (93). Karmazyn hat festgestellt, dass die Akkumulation von Laktatsäure sowohl während der Ischämie als auch während der Reperfusion die Herzfunktion beeinträchtigt. Dieser Funktionsverlust läßt sich aber durch die NHE-Inhibitoren verbessern (93, 94).



\* bedeutet Stimulation entweder der Proteinaktivität oder der Transkription des  $\text{Na}^+ / \text{H}^+$  Promoters

Abb. 4: Schematisches Diagramm der Beeinflussung von Expression und Aktivität des Natriumprotonenaustauschers.  $\alpha_1$  adrenerge Stimulation, Endothelin und Thrombin stimulieren die Aktivität und Expression des Proteins. Die druckinduzierte Hypertrophie steigert die Expression des Natriumprotonenaustauschers (107).