

## 4 Diskussion

In dieser Arbeit wurde die frühe Expression der Isoformen des Natrium-Protonen-Austauschers im experimentellen Myokardinfarkt der Ratte untersucht. Aus den Versuchen kann man erkennen, dass die NHE-Isoformen im Myokard einer differentiellen frühen Regulation unterliegen. Die Frühphase nach einem Myokardinfarkt ist vom klinischen Standpunkt aus besonders wichtig, da in dieser Phase die vulnerable Randzone des Infarktes noch erfolgreich reperfundiert werden könnte. Darüberhinaus ist es ein langfristiges Ziel, der progressiven Entwicklung der Krankheit vorzubeugen und damit die Apoptose der Herzmuskelzellen zu verhindern.

Die Ergebnisse der Untersuchungen lassen zwar eindeutige Tendenzen erkennen, jedoch ist es aufgrund der geringen n-Zahl und der Individualität der Tiere nicht möglich, absolute Aussagen zu treffen. Die Operation, sowohl die permanente Ligation der Arteria coronaria sinistra, als auch die Scheinoperation, bei welcher der Knoten neben der A. coronaria sinistra gesetzt wurde, ist bei allen Tieren in gleicher Weise durchgeführt worden. Dennoch ist innerhalb gewisser Grenzen mit Abweichungen zu rechnen. Darüberhinaus ist es möglich, dass die Tiere unterschiedlichen Versorgungstypen angehören. Neben dem ausgeglichenen Typ gibt es außerdem den Linkstyp, bei dem die Versorgung durch die A. coronaria sinistra überwiegt. Beim Rechtstyp überwiegt die Versorgung durch die A. coronaria dextra. In diesem Falle würde das Infarktgebiet kleiner ausfallen. Dieser Umstand führt dazu, dass jedes Tier auf die Operation innerhalb gewisser Grenzen anders reagiert.

Die mRNA-Expression ist abhängig vom Ausmaß des Zellschadens. Der zelluläre Mechanismus, welcher für die mRNA-Expression verantwortlich ist, kann nicht mehr reagieren, wenn die Gewebeschädigung durch die Ischämie weit fortgeschritten ist (65).

Mit Hilfe der rt-PCR wurde zunächst untersucht, welche Isotypen im Herzen exprimiert werden. Dieses Verfahren mit seiner hohen Sensitivität erlaubt es, eine qualitative Aussage zu machen. Eine quantitative Aussage mit Hilfe der rt-PCR ist jedoch nicht möglich, da

- der RNA-Gehalt unterschiedlich sein kann,
- die RNA teilweise degradiert sein kann,
- jedes PCR-Tube ein eigenes Reaktionsgefäß ist.

Aus diesem Grunde wurde anschließend die in situ Hybridisierung durchgeführt. Die in situ Hybridisierung ist jedoch ein weitaus weniger sensitives Verfahren, als die rt-PCR. Für den Nachweis mit der in situ Hybridisierung ist eine wesentlich größere Menge an mRNA erforderlich. Vorteilhaft ist jedoch, dass die Untersuchung direkt am gewünschten Gewebe erfolgt. Dabei wurden die Gewebeschnitte für die in situ Hybridisierung im Bereich des mittleren bis unteren Drittels des Herzens gewonnen, welche im Infarktgebiet bzw. im äquivalenten Herzabschnitt liegen. Die Auswertung erfolgte in Form des ungepaarten t-Tests. Die Signifikanz wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt und nach Bonferroni adjustiert.

Zur Zeit sind mindestens vier verschiedene NHE-Isoformen bekannt (8). Die ubiquitär vorkommende Isoform ist die NHE-1, welche auch im Myokard predominant zu sein scheint (8).

Mittels der rt-PCR ist die ubiquitär vorkommende Isoform NHE-1 in allen Rattenherzen, sowohl im Infarkt-, als auch im Kontrollmyokard, grundsätzlich nachgewiesen worden. Mit einem computergestützten Bildanalyseverfahren (*NIH-Image*) wurde die Zyklenzahl von 36 Zyklen als optimal ausgewertet. Die relativ niedrige Zyklenzahl von 36 Zyklen deutet auf eine größere Menge an mRNA sowohl im ischämischen wie auch im Kontrollmyokard hin. Eine quantitative Aussage ist, wie bereits erläutert, nicht möglich.

Durch die anschließende in situ Hybridisierung erfolgte die quantitative Untersuchung. Die Versuchsgruppe derjenigen Tiere, die 30 min nach der Operation getötet wurden, zeigte zum Teil unterschiedliche Ergebnisse. Das Tier Nr. 2 (Myokardinfarkt) wies einen deutlich signifikanten Unterschied gegenüber dem Kontrolltier Nr. 9 (Sham) auf. Im Gegensatz dazu aber war die NHE-1-Expression des Tieres Nr. 1 (ebenfalls Myokardinfarkt) geringer, als beim Kontrolltier Nr. 9 (Sham). Die Ursache hierfür ist nicht bekannt. Es ist jedoch möglich, dass die oben genannte Individualität der einzelnen Versuchstiere bzw. der unterschiedliche Versorgungstyp dieses Ergebnis begründen. Die nächste Gruppe wurde 3 h nach der Operation getötet und untersucht. Das Tier Nr. 4 (Myokardinfarkt) wies wiederum einen signifikanten Unterschied gegenüber dem Kontrolltier Nr. 10 (Sham) auf. Nur ein geringer

Unterschied war zwischen dem Versuchstier Nr. 3 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 10 festzustellen. Bei den nach 6 h nach der OP getöteten und untersuchten Tiere wurde ein deutlicher Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 5 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 11 (Sham) festgestellt, der jedoch nicht signifikant war. Die Versuchsgruppe der 24 h nach der OP getöteten Tiere ergab nur einen geringen Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 6 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 12. Auch die nach 72 h nach der OP getöteten Tiere zeigten nur einen geringen Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 7 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 13. Fast keinen Unterschied gab es zwischen dem Versuchstier Nr. 8 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 14, die 7 Tage nach der OP getötet wurden.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass es einen deutlichen Unterschied in der NHE-1-Expression zwischen den Versuchstieren (Myokardinfarkt) und den Kontrolltieren (Sham) gab. Bei den Tieren, die 30 min bzw. 3 h nach der Operation untersucht wurden, war der Unterschied zum Teil signifikant. Eine Angleichung der Expression zwischen Versuchs- und Kontrolltier war in der Gruppe festzustellen, die 7 Tage nach der Operation untersucht wurde.

Die rt-PCR von rNHE-2 ergab, dass rNHE-2 weder im Infarktmyokard noch im Kontrollmyokard exprimiert wurde. Trotz der hohen Zyklenzahl von 45 Zyklen und der niedrigen Hybridisierungstemperatur von 56°C war kein positives Signal zu sehen. Die zum gleichen Zeitpunkt durchgeführte rt-PCR vom Kontrollgewebe (Dünndarm) zeigte dreimal eine deutliche Bande. Somit lässt sich feststellen, dass die rNHE-2-Isoform weder im Infarktmyokard noch im Kontrollmyokard exprimiert wurde. Es wurde bereits festgestellt, dass die in situ Hybridisierung weitaus weniger sensitiv ist, als die rt-PCR. Aus diesem Grunde wurde die in situ Hybridisierung für rNHE-2 nicht durchgeführt.

Mittels der rt-PCR konnte die rNHE-3-Isoform in allen Rattenherzen, sowohl im Infarkt-, als auch im Kontrollmyokard, nachgewiesen werden. Zur positiven Kontrolle diente die Nieren-cDNA. Die relativ hohe Zyklenzahl von 45 Zyklen deutet auf eine relativ geringere Menge an mRNA sowohl im Infarkt-, als auch im Kontrollmyokard hin.

Die quantitative Untersuchung erfolgte anschließend durch die in situ Hybridisierung. Die Versuchsgruppe 30 min post OP zeigte auch hier zum Teil unterschiedliche Ergebnisse. Ein deutlicher Unterschied war zwischen dem Versuchstier Nr. 2 (Myokardinfarkt) und dem

Kontrolltier Nr. 9 (Sham) zu erkennen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Das Versuchstier Nr. 1 (Myokardinfarkt) ließ gegenüber dem Kontrolltier Nr. 9 eine geringere Expression des NHE-3 erkennen. Dieses Ergebnis ist jedoch mit der Expression der NHE-1-Isoform tendenziell vergleichbar. Bei der Versuchsgruppe, die 3 h nach der Operation getötet wurde, gab es einen signifikanten Unterschied, und zwar zwischen dem Versuchstier Nr. 4 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 10 (Sham). Zwischen dem Versuchstier Nr. 3 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 10 gab es nur einen geringen Unterschied. Die Versuchsgruppe 6 h post OP ergab einen signifikanten Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 5 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 11. Bei den nach 24 h post OP untersuchten Tieren war lediglich ein geringer Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 6 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 12 feststellbar. Auch die Untersuchung der Gruppe der 72 h nach der OP getöteten Tiere, Versuchstier Nr. 7 (Myokardinfarkt) und Kontrolltier Nr. 13, lieferte einen relativ geringen Unterschied. In der Versuchsgruppe 7 Tage post OP konnte zwischen dem Versuchstier Nr. 8 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 14 lediglich ein geringer Unterschied festgestellt werden.

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Untersuchungsergebnisse der rNHE-3-Isoform und der rNHE-1-Isoform grundsätzlich vergleichbar sind. Ein deutlicher Unterschied ist auch hier in den Versuchsgruppen 30 min, 3 h und 6 h post OP erkennbar. Die übrigen Versuchsgruppen wiesen auch bei der rNHE-3-Isoform relativ geringfügige Unterschiede in der Expression auf.

Die rt-PCR der rNHE-4-Isoform zeigte, dass rNHE-4 sowohl im Infarktmyokard als auch im Kontrollmyokard exprimiert wurde. Die Expression von rNHE-4 scheint im Infarktmyokard höher zu sein, als im Kontrollmyokard. Mit der rt-PCR ist es jedoch nicht möglich, diesen Unterschied zu quantifizieren.

Durch die anschließende *in situ* Hybridisierung erfolgte die Quantifizierung. In der Versuchsgruppe der Tiere, die 30 min nach der OP untersucht wurden, war ein deutlicher Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 1 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 9 festzustellen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Einen signifikanten Unterschied ergab der Vergleich von Versuchstier Nr. 2 (Myokardinfarkt) mit dem Kontrolltier Nr. 9. In der nächsten Gruppe der nach 3 h nach der OP getöteten Tiere war der Unterschied gegenüber dem Kontrolltier Nr. 10 sowohl beim Versuchstier Nr. 3 (Myokardinfarkt) als auch beim

Versuchstier Nr. 4 (Myokardinfarkt) signifikant. Auch die Untersuchung der Versuchsgruppe 6 h nach OP führte zu einem signifikanten Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 5 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 11. Der Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 6 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 12 war deutlich signifikant. In der Versuchsgruppe 72 h nach OP lässt sich ebenfalls ein signifikanter Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 7 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 13 feststellen. 7 Tage nach OP war immer noch ein signifikanter Unterschied zwischen dem Versuchstier Nr. 8 (Myokardinfarkt) und dem Kontrolltier Nr. 14 zu sehen.

Es lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die Expression der rNHE-4-Isoform bei den Versuchstieren signifikant höher war, als bei den Kontrolltieren. Diese deutliche Expression lässt sich auch nach mehreren Tagen nachweisen. Darüberhinaus ist der Unterschied zwischen den Versuchstieren und den Kontrolltieren bei der rNHE-4-Isoform deutlicher, als bei den übrigen Isoformen.

Fliegel und Mitarbeiter haben die Expression des Natrium-Protonen-Austauschers im Kaninchenmyokard nach einer myokardialen Ischämie untersucht. Sie haben eine differenzierte Expression der Isoformen festgestellt. Das Kaninchenmyokard reagierte auf die Ischämie mit einem kurzen Anstieg der NHE-1 mRNA-Expression, welche 5 kb lang war. Sie haben auch einen lang andauernden Anstieg einer mRNA von 3,8 kb Länge festgestellt. Die Identität dieser 3,8 kb langen mRNA war nicht bekannt. Es ist möglich, dass es sich dabei um die NHE-4-Isoform handelt (87).

Dieses Ergebnis können wir bestätigen. Wir haben eine kurzfristige Erhöhung der Expression der rNHE-1- und zusätzlich der rNHE-3-Isoform bei den Infarktieren beobachtet. Darüberhinaus konnten wir eine langfristige Erhöhung der Expression der rNHE-4-Isoform nachweisen. Das rNHE-4-Gen ist ca. 4 kb lang. Dabei könnte es sich um den Anstieg handeln, den Fliegel und Mitarbeiter festgestellt haben.

Orlowski und Mitarbeiter haben die Expression des Natrium-Protonen-Austauschers im Rattenmyokard untersucht. Sie haben festgestellt, dass die hauptsächlich vorkommende Isoform im Myokard die rNHE-1-Isoform ist (49). Die rNHE-2-Isoform ist etwa 4,4 - 4,6 kb lang und kommt hauptsächlich im Magen und Darm vor (10). Orlowski und Mitarbeiter haben mittels Northern blot, mit langen Expositionszeiten, eine geringe Menge an rNHE-2 im

intakten Rattenmyokard festgestellt. Die rNHE-3-Isoform ist 5,4 kb lang und wird vor allem in den Nieren und im Darm exprimiert (8, 9). Lange Expositionszeit von einem Northern blot zeigte, dass eine geringe Menge an NHE-3 im intakten Rattenmyokard nachweisbar ist (8). Die rNHE-4-Isoform ist etwa 4,2 kb lang und wird vor allem im Magen exprimiert. Die Untersuchung mit dem Northern blot zeigte keinen Nachweis für eine Expression des rNHE-4 im intakten Rattenmyokard (8).

Dieses Ergebnis können wir nur zum Teil bestätigen. Bei den meisten Modellen handelt es sich um isolierte Herzen, die im Langendorfsystem perfusioniert wurden, oder um gezüchtete Herzmuskelzellen. Das Tier als lebendes Modell ist selten. Vielleicht erklärt das den Unterschied. Die isolierten cDNA Klone und die beobachteten Signale könnten auch von nicht myokardialen Zellen stammen, wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen und glatten Muskelzellen.

Wir konnten auch feststellen, dass die am häufigsten vorkommende Isoform im Myokard die rNHE-1-Isoform ist. Die Ergebnisse zu den übrigen Isoformen wichen jedoch teilweise ab. Die rNHE-2-Isoform konnten wir mit Hilfe der rt-PCR, welche als ein besonders sensitives Verfahren gilt, und der hohen Zyklenzahl von 45 Zyklen nicht nachweisen. Es ist möglich, dass die Signale aus dem Northern blot von nicht myokardialen Zellen stammen. Um dieses zu untersuchen, müsste man Myocyten, frei von anderen Zelltypen, isolieren und mit Hilfe des Northern blots und der rt-PCR das Vorhandensein von mRNA nachweisen. Die rNHE-3-Isoform haben wir sowohl im intakten Myokard, als auch im ischämischen Myokard nachweisen können. Bei der rNHE-4-Isoform weichen die Ergebnisse wieder voneinander ab. Wir haben sowohl in der rt-PCR, als auch in der in situ Hybridisierung die rNHE-4-Isoform nachweisen können. Jedoch wird die Isoform im ischämischen Myokard deutlich stärker exprimiert, als im intakten Myokard. Orłowski und Mitarbeiter haben die Expression des Natrium-Protonen-Austauschers im intakten Myokard untersucht. Möglicherweise ist dies die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse.

Das Expressionsniveau des Natrium-Protonen-Austauschers ist in den meisten Geweben verhältnismäßig niedrig. Fliegel und Mitarbeiter haben festgestellt, dass in der menschlichen Plazenta der Gehalt an mRNA und Protein des Natrium-Protonen-Austauschers, verglichen mit anderen Geweben, noch am größten ist. Dennoch ist er im Vergleich zu anderen Proteinen eher gering (67). Diese geringe Expression des Natrium-Protonen-Austauschers macht die

Untersuchung besonders schwierig. Warnock und Mitarbeiter haben in einer Untersuchung des Expressionsniveaus der mRNA im Northern blot nachgewiesen, dass die mRNA von NHE-1 im Myokard signifikant niedriger exprimiert wird, als in der Plazenta oder in vielen anderen Geweben (103).

Die Kontrolle der Translation ist nicht bis ins letzte Detail untersucht worden. Man hat aber schon jetzt entdeckt, dass die mRNA von NHE-1 Elemente enthält, welche die Aktivität der Translation niedrig halten (74). Das relativ geringe Expressionsniveau der mRNA des Natrium-Protonen-Austauschers kann das Ergebnis einer niedrigen Transkription oder einer hohen Degradation sein. Kaiser und Curthoys vermuten, dass die höhere Stabilität der mRNA als Antwort auf die Acidose in Form einer Überregulation der mRNA zu sehen ist (77).

Mehrere Arbeitsgruppen haben festgestellt, dass die chronische Verminderung des extrazellulären pH-Wertes sowohl zu einer Erhöhung von  $V_{\max}$  des Natrium-Protonen-Austauschers, als auch zu einer Erhöhung der mRNA von NHE-1 führen kann (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 (81, 79).

Deshalb ist es besonders wichtig zu untersuchen, welche Rolle der Austauscher bei einer chronischen Ischämie spielt. Denn eine Erhöhung der Expression der mRNA des Natrium-Protonen-Austauschers, verursacht durch eine chronische extrazelluläre Acidose, ist möglicherweise für das häufige Vorkommen von zum Teil lebensbedrohlichen Arrhythmien verantwortlich (78).

Der therapeutische Ansatz zur Regulation des Natrium-Protonen-Austauschers ist vielschichtig. Eine vielversprechende Indikation für den Inhibitor des Natrium-Protonen-Austauschers ist der Fall, in dem der Zeitpunkt der Ischämie bekannt ist und der NHE-Inhibitor während des gesamten Zeitraumes präsent sein kann. In der Herzchirurgie ist dieses im allgemeinen der Fall. Mögliche Indikationen sind z.B. Bypass-Operationen, Herzklappen-Operationen und Operationen an den großen Gefäßen. Die Herztransplantation wäre eine andere Indikation. Belzer und Mitarbeiter haben durch Therapie mit einem Inhibitor des Natrium-Protonen-Austauschers eine Verlängerung der tolerierten Ischämie-Zeit des Transplantats und eine Verbesserung der post-Transplantations-Leistung festgestellt (104).

Neben der Anwendung in der Herzchirurgie ist es auch möglich, den NHE-Inhibitor während der perkutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA) zu geben, da der Blutfluss für Minuten nicht gewährleistet ist. Ein ischämischer Brustschmerz, EKG-Veränderung und Enzymerhöhungen können in diesen Situationen beobachtet werden (105). Protektive Effekte der NHE-Inhibitoren während der Reperfusion könnten nützlich sein bei Patienten mit einem akuten Myokardinfarkt, die sich einer Thrombolyse oder einer PTCA unterziehen.

Es könnte nützlich sein, Patienten mit vermutetem myokardialen Infarkt gut tolerierte NHE-Inhibitoren so früh wie möglich zu geben. Scholz und Mitarbeiter konnten am Tiermodell zeigen, dass der Inhibitor am ischämischen Myokard die Gewebenekrose verringert und den lebensbedrohlichen Arrhythmien vorbeugt (45).

Eine Vorbehandlung mit NHE-Inhibitoren könnte bei Patienten mit myokardialen Infarkt von Vorteil sein. Das würde eine Selektion der gefährdeten Patienten für eine chronische Behandlung voraussetzen. Eine dauerhafte Behandlung könnte bei Patienten indiziert sein, die bereits einen myokardialen Infarkt erlitten haben. Bei solchen Patienten könnte der NHE-Inhibitor die myokardiale Überlebenszeit verlängern und die Therapie während der Reperfusion verbessern.

Eine weitere Indikation für eine dauerhafte Behandlung könnte die Angina pectoris sein. Bei Patienten, die unter einer chronischen, stabilen Angina pectoris leiden, besteht die Gefahr von Arrhythmien oder myokardialen Infarkt. Langfristig gesehen tendieren Patienten mit Angina pectoris zu congestiven Herzfehlern, welche wahrscheinlich durch eine Vielzahl von Microinfarkten im Myokard verursacht werden. Dieses könnte möglicherweise mit Hilfe der NHE-Inhibitoren verhindert werden (106).

Generell gehen wir von der Notwendigkeit einer langfristigen Therapie nach einem Myokardinfarkt bzw. bei einer chronisch stabilen Angina pectoris aus. Diese Therapie könnte neben der Medikation mit Thrombozytenaggregationshemmern, beta-Blockern und eines ACE-Hemmers darüberhinaus einen Inhibitor des Natrium-Protonen-Austauschers beinhalten. Es sind jedoch noch weitere Studien erforderlich, um den Benefit der Hemmstoffe des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers vor allem klinisch zu untersuchen.