

Aus dem Physiologischen Institut.....
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand:Prof. Dr. med. Ulrich Pohl.....

Thema der Dissertation:

Die Effekte der Angiotensin II - Rezeptorblockade
bei hypoxieinduzierter rechtsventrikulärer Hypertrophie in der Ratte

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

.....Tobias Michael Lerner.....

aus

.....Osnabrück.....

Jahr

.....2006.....

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: ... Prof. Dr. rer. nat. Bernhard F. Becker.....

Mitberichterstatter: ... Priv. Doz. Dr. M. Näbauer.....

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: ... Dr. med. Michael Irlbeck.....

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: ...30.03.06.....

Widmung

Diese Arbeit ist meinen Eltern, Drs. med. Reinhold und Heidelinde Lerner, gewidmet, die mir meinen beruflichen Werdegang ermöglicht haben und für mich fachlich und insbesondere auch menschlich immer ein Vorbild bleiben werden.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1-5
2. Material und Methoden	6
2.1. Tiere	6
2.2. Hypoxie	6-7
2.3. Medikation	8-9
2.4. Hämodynamische Messungen	9
2.4.1. Narkose und Präparation	9-10
2.4.2. Rechts- und linksventrikuläre Katheterisierung und Messung	10
2.4.3. Messung des Herzzeitvolumens (CO)	11
2.4.4. Entnahme der Herzen	11-12
2.5. Kardiomyozytenisolation aus dem rechten und linken Ventrikel	12-15
2.6. Biochemische Analyse zur Protein- und Enzymbestimmung	16
2.6.1. Enzymaktivitätsmessung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD) und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD)	16
2.6.1.1. Vorbereitung der Zellen	16-17
2.6.1.2. Durchführung der spektralphotometrischen Messung	17-19
2.6.1.3. Bestimmung des Proteingehaltes	19
2.6.1.4. Statistische Auswertung	20
3. Ergebnisse	21
3.1. Linksventrikuläre und systemische Kreislaufparameter	21-23
3.2. Rechtsventrikuläre Parameter	23-24
3.3. Gewicht, Größe und Volumen der Kardiomyozyten	24-26
3.4. Biochemische Parameter	26-27
4. Diskussion	28
4.1. Linksventrikuläre und systemische Kreislaufparameter	29
4.2. Funktionelle Parameter des rechten Ventrikels	30-31
4.3. Herz und Zellgrößen	32-33
4.4. Biochemische Parameter	33-36
5. Zusammenfassung	37-38
Literaturverzeichnis	39-42
Danksagung	43

1. Einleitung

Die Rolle von Angiotensin und des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) steht schon lange im Mittelpunkt des Interesses kardiovaskulärer Forschung. So werden für verschiedene pathophysiologische Mechanismen, wie bei der Entstehung des systemischen Bluthochdrucks, der ventrikulären Hypertrophie, der Proliferation und Hypertrophie von Gefäßmuskelzellen und der Intimahyperplasie nach Gefäßverletzung Angiotensin II und das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) verantwortlich gemacht. Der Subtyp I der Angiotensin II Rezeptoren (AT_1 -Rezeptor) wird als Aktivator speziell für die wachstumsfördernden und vasokonstriktorisches Eigenschaften von Angiotensin II angesehen. Den Zusammenhang zwischen pulmonaler Vasokonstriktion, daraus resultierender rechtsventrikulärer Hypertrophie und Blockade des AT_1 -Rezeptors experimentell an der Ratte zu untersuchen, war Ziel dieser Arbeit.

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) ist pharmakologischer Angriffspunkt für die ACE- und Angiotensin II Rezeptor-Blockade. Durch erhöhte sympathische Aktivität kommt es über Betarezeptorstimulation zu gesteigerter Reninsekretion. Daraus resultiert über die Zwischenstufen Angiotensinogen und Angiotensin I die vermehrte Bildung des Angiotensin II. Angiotensin II bewirkt eine Vasokonstriktion an der glatten Muskulatur der Gefäße [26] und die Freisetzung von Aldosteron aus der Zona glomerulosa der Nebennierenrinde [1].

Unter Angiotensin II kommt es zudem zu einer Stimulation der Hypertrophie von Gefäßmuskelzellen [2] und einer verstärkten Genexpression von Wachstumsfaktoren [19].

Mit der Blockade des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) gelang es erstmals, dieses humorale Regulationssystem zu beeinflussen.

Hemmstoffe des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE-Hemmer) verhindern die Umwandlung von Angiotensin I in Angiotensin II, wodurch die direkten vasokonstriktorisches Eigenschaften des Angiotensin II und die Freisetzung von Aldosteron vermindert werden.

Angiotensin II Rezeptorblocker hingegen wirken antagonistisch am Subtyp I des Angiotensin II Rezeptors (AT₁-Rezeptor), über den Subtyp II vermittelte Aktivität wird jedoch nicht beeinflusst.

Bereits vor über 50 Jahren beschrieben von *Euler* und *Liljestrand* die pulmonale Vasokonstriktion durch alveoläre Hypoxie [29]: Ein vaskulärer Feedback-Mechanismus der pulmonalen Gefäße führt zu einer Blutumverteilung von den weniger ventilierten Lungenabschnitten zugunsten einer verbesserten Durchblutung der mehr ventilierten Regionen. Dies geschieht durch eine Vasokonstriktion der arteriellen Pulmonalgefäße in den schlechter belüfteten Lungenarealen. Hiermit wird eine verbesserte Oxygenierung des Blutes durch Verminderung des intrapulmonalen Shunts erreicht. Langanhaltende inspiratorische hypoxische Bedingungen führen folglich zu einer generellen pulmonalen Vasokonstriktion und damit zu einem erhöhten Widerstand in den Pulmonalarterien. Daraus resultiert eine erhöhte Druckbelastung des rechten Ventrikels mit konsekutiver Hypertrophie ohne Beteiligung des linken Ventrikels. Rabinovitch beschrieb erstmals die Entwicklung einer pulmonalen Hypertrophie durch chronische Hypoxie im Tiermodell an Ratten [24].

Unterschiedlichste experimentelle Modelle zeigen inzwischen, dass chronische Hypoxiebedingungen an der Ratte eine rechtsventrikuläre Hypertrophie erzeugen. Der hieraus resultierende pulmonale Druckanstieg kann durch ACE-Hemmer günstig beeinflusst werden. Morrell et al. erzeugten durch hypobare Umweltbedingungen eine chronische Hypoxie und damit eine rechtsventrikuläre Hypertrophie [18].

Es gibt jedoch viele verschiedene experimentelle Modelle um eine rechtsventrikuläre Hypertrophie zu erzeugen.

In dem hier angewendeten Versuchsaufbau wurden die Tiere unter intermittierend hypoxischen Bedingungen gehalten. Dabei leben die Tiere einige Stunden pro Tag unter Hypoxiebedingungen, die übrige Zeit des Tages und am Wochenende jedoch unter Raumlufatmosphäre.

Alle bekannten physiologischen Effekte von Angiotensin II werden durch den Angiotensin-II-Rezeptor vom Subtyp 1 (AT₁) vermittelt. Eine neu entwickelte Klasse von Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten, spezifisch wirksam am AT₁-Rezeptor, hat sich als sinnvolle Ergänzung zur Erforschung des Renin-Angiotensin-Systems und der kardialen Hypertrophie erwiesen.

Losartan (LO), der bekannteste Vertreter dieser Gruppe, ist weltweit im Einsatz bei der Behandlung der essentiellen Hypertonie, der linksventrikulären Hypertrophie und der Herzinsuffizienz.

Verschiedene Untersuchungen bewiesen, dass Angiotensin II zur Entwicklung einer kardialen Hypertrophie beiträgt [2, 14, 27, 30].

In scheinbarem Widerspruch hierzu stehen die Ergebnisse einer Arbeit von Rabinovitch et al aus dem Jahr 1988. Diese Untersuchungen ergaben, dass Angiotensin II sowohl den akuten und den chronischen, hypoxieinduzierten Anstieg des Pulmonalarteriendrucks als auch die

chronische, hypoxieinduzierte Hypertrophie des rechten Ventrikels verhindern konnte. Vermutlich bewirkt eine über Angiotensin vermittelte Prostazyklinfreisetzung eine pulmonale Vasodilatation [25]. Jedoch konnte sowohl in einem Modell von Nossaman mit isoliert perfundierter Lunge [21, 22] und auch in einer Studie mit intakten Tieren von Morrell [18], keine Wirkung von Losartan (LO) auf den akuten hypoxieinduzierten Anstieg des Pulmonalarteriendrucks beobachtet werden. Im Gegensatz dazu konnte aber sowohl Losartan (LO) als auch der ACE-Hemmer Captopril die Ausprägung einer rechtsventrikulären Hypertrophie während einer chronischen Hypoxiebehandlung verringern [18]. Im Hinblick auf diese widersprüchlichen Ergebnisse bleibt die genaue Funktion des Angiotensin bei der Entwicklung und Beeinflussung einer rechtsventrikulären Hypertrophie ungeklärt.

Um die Rolle des Angiotensin II bei der Entstehung einer hypoxieinduzierten rechtsventrikulären Hypertrophie besser zu verstehen, wurden in dieser Arbeit die präventiven Effekte von Losartan (LO) auf die resultierenden morphologischen, hämodynamischen und biochemischen Veränderungen untersucht.

Neben den vasokonstriktorisches Effekten von Angiotensin II sollten auch wachstumsstimulierende Eigenschaften nachgewiesen werden. Diese bewirken sowohl eine Induktion der Proteinsynthese und der mitotischen Zellteilung der Gefäßmuskelzellen als auch eine gesteigerte Synthese von Kollagen I und III in den Fibroblasten, die zur Myokardfibrose führt.

Deshalb wurden in Ergänzung zu den hämodynamischen Messungen die Veränderungen in der Größe der Kardiomyozyten und die Aktivitäten der Enzyme des Pentosephosphatweges, Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase und 6-Phospho-Gluconat-Dehydrogenase, untersucht.

2. Material und Methoden

2.1. Tiere

Als Versuchstiere wurden 29 weibliche „Sprague Dawley“ Ratten verwendet (*Charles River Wiga GmbH* in Sulzfeld, Deutschland). Die Tiere wogen bei Versuchsbeginn 160g-200g und waren ca. 8 Wochen alt.

Die Ratten konnten sich zu jeder Zeit frei im Käfig, bzw. in der Kammer bewegen und hatten freien Zugang zu Wasser und zu Trockenfutter („Altromin C 100“, *Altromin GmbH*, Lage, Deutschland).

2.2. Hypoxie

Das Modell der intermittierenden Hypoxie sah wie folgt aus:

Die Tiere wurden über 4 Wochen acht Stunden am Tag, fünf Tage die Woche (von Montag bis Freitag), unter hypoxischen Bedingungen gehalten, in der Nacht und die übrige Zeit bei Raumluft. Dazu wurde eine Plexiglaskammer (siehe Abbildung) verwendet, in der sich maximal sechs Tiere gleichzeitig befanden.

Die erniedrigte Sauerstoffkonzentration in der Kammer wurde durch eine Pressluft/Stickstoff-Mischung erreicht, die mit einem konstanten Fluss von ca. 150 l/h durch einen Einfluss im Kammerdeckel einströmte und der durch „Dräger Gasflussmessuhren“ (*Drägerwerk AG*, Lübeck, Deutschland), eingestellt wurde.

Der Sauerstoffgehalt in der Kammer wurde zu Beginn der Hypoxiebehandlung auf 16 vol.% eingestellt und durch einen „Dräger Oxydig O₂-Sensor“ (*Drägerwerk AG*, Lübeck,

Deutschland) in der Abluft der Kammer kontrolliert. Innerhalb von 3 Tagen wurde der Sauerstoffgehalt in der Kammer dann schrittweise auf 10 vol.% reduziert.

(siehe Abbildung)

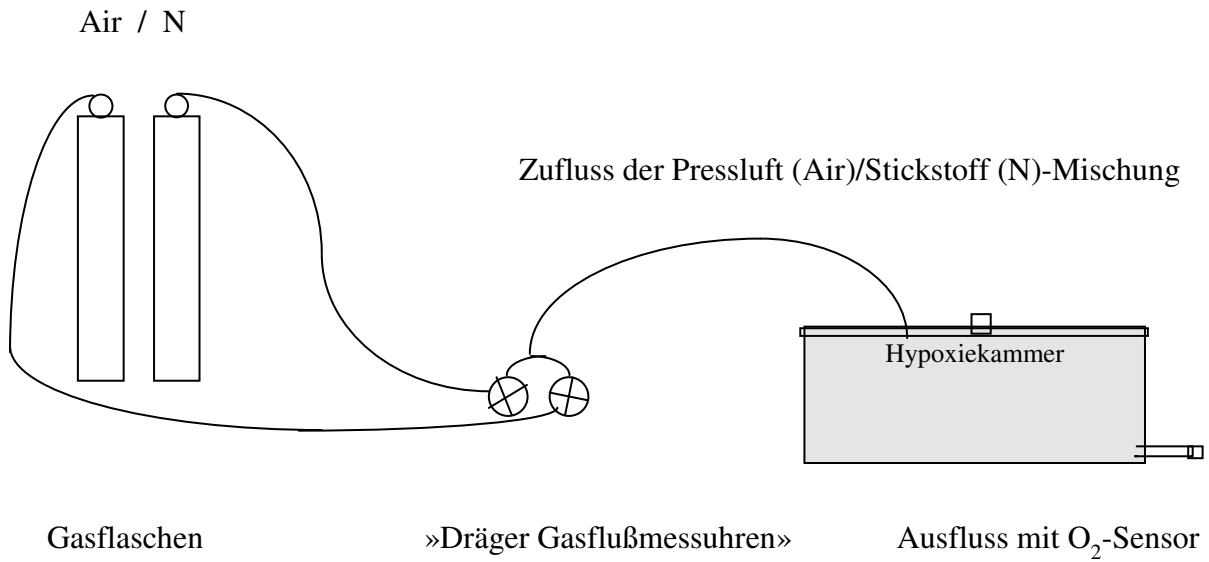


Abbildung:

Skizze der Hypoxiekammer

2.3. Medikation

Die Tiere wurden mit dem AT₁-Rezeptorblocker *Losartan* (12 mg/kg/d) behandelt, die Kontrollgruppe erhielt keine Medikation.

Für eine kontinuierliche Zufuhr von Losartan wurden den Tieren osmotische Minipumpen (*alza*, Palo alto, USA) intraperitoneal implantiert, einen Tag bevor mit der Hypoxiebehandlung begonnen wurde. Die Kontrolltiere, die kein Losartan erhalten sollten, bekamen ein Stück Silikonschlauch implantiert, welches der Größe der Pumpe entsprechend war.

Dazu wurde unter Äthernarkose die Bauchhöhle mit einem ca. 1 cm langen Schnitt eröffnet und die Pumpe, bzw. der Silikonschlauch intraperitoneal eingebracht. Es folgte die Naht von Muskulatur und Haut. Alle Eingriffe verliefen komplikationslos.

Die Förderrate der Pumpe betrug konstant 0.5 µl/h über 14 Tage. Für eine Behandlung über vier Wochen war daher ein Wechsel der Pumpen nach 14 Tagen nötig, ebenso wurden die Silikonschlauchstücke gewechselt, um gleiche Bedingungen für die Kontrolltiere und die mit Losartan behandelten Tiere zu gewährleisten.

Die Tiere wurden zu Beginn des Versuchs und nach Beendigung der hämodynamischen Messungen (nach 4 Wochen) gewogen. Zur Unterscheidung wurden die Tiere außerdem an den Schwänzen mit Farbe markiert.

Versuchsgruppen (4 Tiere pro Gruppe)	Mittelwert*	Mittelwert*
	Anfangsgewicht (g)	Endgewicht (g)
<i>Gruppe 1</i> Hypoxiebehandlung mit Losartan	175	233
<i>Gruppe 2</i> Hypoxiebehandlung ohne Losartan	178	236
<i>Gruppe 3</i> Keine Hypoxiebehandlung (Kontrolle) mit Losartan	192	252
<i>Gruppe 4</i> Keine Hypoxiebehandlung (Kontrolle) ohne Losartan	175	227

Tabelle: Übersicht Behandlungsgruppen, * Mittelwerte gerundet

2.4. Hämodynamische Messungen

2.4.1. Narkose und Präparation

Die Tiere wurden mindestens eine Stunde vor den hämodynamischen Messungen aus der Hypoxiekammer genommen, um eine Äquilibration unter Raumluftbedingungen zu erreichen. Zur Narkose während der hämodynamischen Messungen erhielten die Tiere 80 mg/kg Thiopental („*Trapanal*“, Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) vor den Messungen intraperitoneal appliziert. Sobald eine ausreichende Narkosetiefe erreicht war, überprüft durch entsprechende Schmerzreize (z.B. wurde eine Extremität mit einer chirurgischen Pinzette gekniffen), wurde eine Tracheotomie durchgeführt und eine Trachealkanüle eingelegt.

Danach wurden lateral der Trachea die Arteria carotis und die Vena jugularis aufgesucht und freipräpariert. Auch bei der Ratte sind die beiden Gefäße durch die muskuläre Wandstruktur und Pulsation der Arterie und den zarten Wandaufbau der Vene klar zu unterscheiden.

2.4.2. Rechts- und linksventrikuläre Katheterisierung und Messung

Zur Messung der Hämodynamik wurden Ultraminiatur-Tip-Katheter von »Millar Instruments INC.« (Houston, Texas) verwendet (model SPR-249, 3 French und model SPR-503, 2 French). Vor jeder Messung wurden die Katheter mit einem Manometer (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) kalibriert.

Der Katheter für die linksventrikuläre Messung wurde über die Arteria carotis in den linken Ventrikel eingeführt. Sobald der Katheter die Aortenklappe passiert hatte und sicher im linken Ventrikel lag, was sich anhand der Druckunterschiede zwischen Ventrikel und Aorta klar differenzieren ließ, wurden über 15 Minuten Herzfrequenz (HR), maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dp/dt_{max}) und Druck (P) parallel und kontinuierlich mit einem Schreiber (*Gould Instrument Systems*, Dietzenbach, Deutschland) aufgezeichnet.

Danach wurde der Katheter in die Aorta zurückgezogen, und es wurden systolischer und diastolischer Aortendruck (SAP, DAP) gemessen. Der mittlere arterielle Druck (MAP) wurde dann als Mittelwert aus diesen beiden Größen errechnet.

Nachdem die linksventrikuläre Messung beendet war, wurde der Katheter für die Messung der rechtsventrikulären Parameter unter Druckkontrolle über die Vena jugularis in den rechten Ventrikel eingebracht.

2.4.3. Messung des Herzzeitvolumens (CO)

Das Herzzeitvolumen (CO) wurde mit der Thermodilutionsmethode gemessen.

Dazu wurde der Tip-Katheter in der Vena jugularis durch einen Polyethylenschlauch (innerer Durchmesser 0.58 mm) und der Tip-Katheter in der Arteria carotis durch eine thermosensitive Sonde ersetzt (1.5 F, *Columbus Instruments*, Columbus, Ohio).

Dann wurde über den Polyethylenschlauch 0.1 ml gekühlte Kochsalzlösung (18° C) in den rechten Vorhof injiziert und die Temperaturänderung durch die in der Aorta liegende Sonde gemessen. Die dadurch entstehende Temperaturkurve wurde durch einen Cardiomax II Computer (*Columbus Instruments*, Columbus, Ohio) aufgezeichnet.

Es wurden bei jedem Tier fünf aufeinanderfolgende Messungen durchgeführt und daraus ein Mittelwert errechnet.

Der totale periphere Widerstand (TPR) wurde aus dem Quotienten von mittlerem arteriellen Druck (MAP) und Herzzeitvolumen (CO) berechnet.

Die Schlagarbeit des Herzens (SW) wurde durch Multiplikation des Schlagvolumens (SV) mit dem systolischen Aortendruck (SAP) ermittelt.

2.4.4. Entnahme der Herzen

Nach Abschluss der hämodynamischen Messungen wurde der Thorax und danach das Perikard eröffnet. Das Herz wurde nun rasch von den großen Gefäßen abgetrennt und herausgenommen.

Bei den Herzen (n = 14), die für die biochemische Analyse vorgesehen waren, wurde dann in die Aorta eine stumpfe Kanüle eingeführt, und das Herz langsam retrograd mit eisgekühlter

Kochsalzlösung gespült. Danach wurden auch die Vorhöfe entfernt, und die freie Wand des rechten Ventrikels wurde abgetrennt. Nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff wurden die beiden Ventrikel gewogen.

Die Herzen (n = 15), die zur Isolierung der Kardiomyozyten entnommen wurden, mussten mit einem Zellseparationsverfahren (wie in 2.5. beschrieben) behandelt werden.

2.5. Kardiomyozytenisolation aus dem rechten und linken Ventrikel

Um die Auswirkungen der Behandlung auf das Kardiomyozytenvolumen (CV) und die Zelllänge zu beurteilen, wurden Kardiomyozyten unter Anwendung der Kollagenase-Zellseparation aus dem rechten Ventrikel isoliert.

Dazu wurden die Herzen vorsichtig mit 20 ml 37° C warmer, oxygenierter, *kalziumhaltiger Tyrode-Lösung* gespült und danach an einem modifizierten Langendorff-Perfusions-Aufbau 10-30 Minuten lang mit *kalziumfreier Tyrode-Lösung* perfundiert, um das noch im Herz verbliebene Blut und die *kalziumhaltige Tyrode-Lösung* auszuwaschen. Im Anschluss wurden die Herzen in der Langendorff-Perfusion 30 Minuten lang mit einer *Isolutionslösung* mit Kollagenase behandelt.

Nun wurden auch bei diesen Herzen die Ventrikel voneinander getrennt, diese dann in *kalziumfreier Tyrode-Lösung* erst grob zerkleinert und dann mit einem Glaspasteur zu einer Zellsuspension homogenisiert. Danach wurde diese Suspension durch ein Nygonsieb (Maschenweite 200 µm) filtriert, um Bindegewebe sowie grobe Zellreste zurückzuhalten.

Die Kardiomyozyten wurden dann in *Fixans* mit Glutaraldehyd und Puffer (G-6257 Sigma, München, Deutschland) fixiert und mikroskopisch zur Qualitätskontrolle des Isolationsvorgangs untersucht.

Die Messungen des Zellvolumens erfolgten unter Verwendung eines *Coulter Counter Channelyzer* (*Coulter Electronics*, Krefeld, Deutschland) [20]. Für die genauere Berechnung des Zellvolumens der stabförmigen Kardiomyozyten wurde ein Formfaktor von 1,05 mit einbezogen [8].

Die Messung der Zelllänge wurde lichtmikroskopisch mit einem *Zeiss Axioskop* (*Carl Zeiss*, München, Deutschland) durchgeführt. Für jeden Ventrikel wurde der Durchschnittswert von 30 gemessenen Kardiomyozyten verwendet. Der Kardiomyozytendurchmesser wurde aus dem Quotienten von Zellvolumen (CV) und Zelllänge ermittelt.

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen (in mmol/l):

kalziumhaltige Tyrode-Lösung pH 7,35 mit NaOH 10%ig

NaCl	137,0
KCl	5,4
MgCl ₂	0,5
CaCl ₂	1,8
HEPES	11,6
Glucose	5,0

kalziumfreie Tyrode-Lösung pH 7,35 mit NaOH 10%ig

NaCl	130,0
KCl	5,4
KH ₂ PO ₄	1,2
MgSO ₄	1,2
HEPES	6,0
Glucose	10,0

Isolutionslösung:

150 ml *kalziumfreie Tyrode-Lösung*

22 U Kollagenase

(Typ II in kalziumfreier Tyrode-Lsg., Sigma, München,
Deutschland)

72 U Pronase

750 mg bovines Albumin

(U = Einheit)

Fixans:

84 ml Aqua bidest.

16 ml 25% Glutaraldehyd (Sigma, München, Deutschland)

23 ml Na H₂ PO₄ (0,15 Molar, pH 7,2)

77 ml Na₂ H PO₄ (0,15 Molar, pH 7,2)

2.6. Biochemische Analyse zur Protein- und Enzymbestimmung

2.6.1. Enzymaktivitätsmessung der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD) und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD)

Bei der Messung der spezifischen Aktivitäten der myokardialen G-6-PD und 6-PGD wurde nach den Methoden von *Glock and Mc Lean* [6] vorgegangen.

2.6.1.1. Vorbereitung der Zellen

Bei Entnahme der Herzen wurden diese mit eisgekühlter Kochsalzlösung gespült und in Stickstoff gefroren.

Dann wurde ein Stück der freien Wand des rechten Ventrikels mit dem Mörser homogenisiert und in ein Perfusionsmedium mit Kaliumchloridpufferlösung gegeben, welches dann auf pH 7,0 eingestellt und zentrifugiert wurde (*Beckman* Ultrazentrifuge, Modell L5-65, 30 Minuten bei 4°C unter Vakuum und 20000 U/min). Der bei der Zentrifugation entstandene Überstand wurde danach in Kaliumchloridpufferlösung über 12 Stunden bei 4°Celsius in Dialyseschläuchen aufbewahrt, in denen sich ein osmotisches Gleichgewicht einstellen konnte. Nun konnte die Enzymaktivität im Spektralphotometer gemessen werden.

Es wurden folgende Reagenzien für den Messansatz verwendet:

Triethanolamin-Hydrochlorid (TREA)-Puffer

9,3g Triethanolamin in 500g bidestilliertem Wasser (Aqua bidest.), wurde mit Natronlauge (NaOH) auf pH 7,60 eingestellt.

Magnesiumchlorid 0,1 M (MgCl₂)

NADP (C₂₁ H₂₆ N₁₇ O₁₇ P₃ Na₂) 80 mg in 8 ml Aqua bidest. gelöst.

Homogenat

Aqua bidest.

Glukose-6-Phosphat 40 mg in 4 ml Aqua bidest. gelöst

6-Phosphoglukonat 36 mg in 3 ml Aqua bidest. gelöst

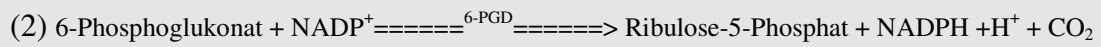
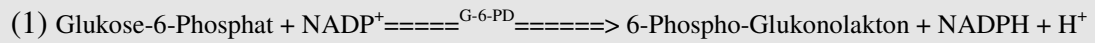
Zuerst wurden nun Puffer (TREA), Magnesiumchlorid und bidestilliertes Wasser (Aqua bidest.) im Wasserbad auf 37°C erwärmt.

Die Proben (Homogenat), NADP, Glukose-6-Phosphat und 6-Phosphoglukonat wurden bis zur Messung in Eis gekühlt.

2.6.1.2. Durchführung der spektralphotometrischen Messung

Mit der spektralphotometrischen Messung wurde die Aktivität der G-6-PD und 6-PGD durch den Umsatz an NADP⁺ zu NADPH festgestellt. G-6-PD katalysiert die Reaktion in Gleichung (1), 6-PGD die Reaktion in Gleichung (2). Gemessen wurde hierbei die Auslöschung (Extinktion) durch NADPH bei einer Wellenlänge von 340 nm.

Die Reaktionen verlaufen nach folgenden Gleichungen:



Ansatz/ Reagenzien	Leerwert	Probe 1			
		Probenleerwert	G-6-P	6-PG	G-6-P+6-PG
Küvette (Nr.)	1	2	3	4	5
Puffer TREA	2,5	2,4	2,4	2,4	2,4
MgCl ₂	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NADP	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Homogenat	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Aqua bidest.	0,1	0,2	0,1	0,1	-
Glukose-6-Phosphat	0,1	-	0,1	-	0,1
6-Phosphoglukonat	-	-	-	0,1	0,1

Tabelle: Aktivitätsmessung der G-6-PD und 6-PGD (Alle Angaben in ml)

Ansatz/ Reagenzien	Leerwert	Probe 1		Probe 2	
		Probenleerwert	Probe	Probenleerwert	Probe
Küvette	1	2	3	4	5
Puffer TREA	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
MgCl ₂	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
NADP	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Homogenat	-	0,1	0,1	0,1	0,1
Aqua bidest.	0,1	0,1	-	0,1	-
Glukose-6-Phosphat	0,1	-	0,1	-	0,1

Tabelle: Aktivitätsmessung der G-6-PD (Alle Angaben in *ml*)

Die Aktivität der Enzyme wurde in Einheit pro Gramm Protein (U/g) ausgedrückt.

2.6.1.3. Bestimmung des Proteingehaltes

Die Bestimmung des Proteingehaltes des ventrikulären Homogenats mit einem Analysekit

(Sigma; München, Deutschland) erfolgte nach den Methoden von *Lowry* [15].

2.6.1.4. Statistische Auswertung

Die Daten wurden als Mittelwerte +/- S.E.M. analysiert und dargestellt. Für die Erhebung der statistischen Signifikanz wurde ANOVA und das Vergleichsverfahren nach den Methoden von Duncan verwendet. Ein Wert von $P < 0.05$ wurde als signifikant festgelegt.

3. Ergebnisse

3.1. Linksventrikuläre und systemische Kreislaufparameter

Wie die in den *Tabellen 1 und 2* dargestellten Werte zeigen, erzeugte die intermittierende Hypoxie über 4 Wochen nur einen leichten Abfall der Herzfrequenz (HR).

Die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (LV dp/dt_{max}), der linksventrikuläre Druck und der Aortendruck (LVSP, MAP, DAP) waren bei den Tieren unter Hypoxiebehandlung im Vergleich zu den Kontrolltieren unverändert.

Das Herzzeitvolumen (CO) war nach 4 wöchiger intermittierender Hypoxiebehandlung leicht, aber nicht signifikant erhöht.

Dagegen waren nach der Hypoxiebehandlung der totale periphere Widerstand (TPR) signifikant erniedrigt und das Schlagvolumen (SV) ebenso wie die Schlagarbeit (SW) des linken Ventrikels gegenüber den Kontrolldaten deutlich erhöht.

Der linksventrikulären Druck (LVSP) und der Aortendruck (MAP, DAP) (siehe auch *Tab. 2*) wurde durch Blockade der Angiotensin-1-Rezeptoren (AT_1) mit Losartan (LO) sowohl in den Tieren der Kontrollgruppe als auch in der hypoxiebehandelten Gruppe gesenkt.

Die linksventrikuläre maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (LV dp/dt_{max}) wurde durch Losartan (LO) nur in der Hypoxiegruppe reduziert.

Das Herzzeitvolumen (CO) und das Schlagvolumen (SV) blieben unbeeinflusst durch die Behandlung mit Losartan.

Versuchsgruppe	Herzfrequenz [HR; Schläge/min.]	Herzeitvolumen [CO; ml/kg/min.]	Schlagvolumen [SV; ml/kg]	Totaler peripherer Widerstand [TPR; mmHg•kg•min/ml]
<i>Kontrollgruppe ohne LO</i>	391,6 ± 5,2 (14)	412,0 ± 11,3 (13)	1,05 ± 0,03 (13)	0,327 ± 0,018 (13)
<i>Kontrollgruppe mit LO</i>	367,0 ± 6,8*(14)	443,1 ± 29,3 (14)	1,21 ± 0,08 (14)	0,260 ± 0,014*(14)
<i>Hypoxiegruppe ohne LO</i>	360,3 ± 7,1*(15)	464,9 ± 13,0 (15)	1,30 ± 0,05*(15)	0,274 ± 0,014*(15)
<i>Hypoxiegruppe mit LO</i>	342,2 ± 10,0*+(14)	412,6 ± 15,6 (11)	1,18 ± 0,06 (11)	0,257 ± 0,021*(11)

Tabelle 1

Herzfrequenz, Herzeitvolumen, Schlagvolumen und totaler peripherer Widerstand in allen Gruppen der Studie.

**p<0,05 v Kontrollgruppe ohne LO; +p<0,05v Kontrollgruppe mit LO*

Versuchs- Gruppe	LVSP [mmHg]	DAP [mmHg]	MAP [mmHg]	LV dP/dt_{max} [mmHg/s]	LV SW [mmHg•ml/kg]
<i>Kontrollgruppe ohne LO</i>	149,4 ± 3,3 (14)	114,1 ± 3,9 (14)	132,0 ± 3,6 (14)	11936 ± 544 (14)	156,5 ± 4,0 (13)
<i>Kontrollgruppe mit LO</i>	126,6 ± 2,7*(14)	94,8 ± 3,4*(14)	110,9 ± 3,0*(14)	10957 ± 356 (14)	153,7 ± 11,5 (14)
<i>Hypoxiegruppe ohne LO</i>	147,7 ± 5,0+(15)	104,7 ± 5,7 (15)	126,3 ± 5,1+(15)	11626 ± 425 (15)	190,8 ± 7,8*+(15)
<i>Hypoxiegruppe mit LO</i>	116,1 ± 3,8*# (14)	80,4 ± 4,6*+##(14)	98,5 ± 4,1*+## (14)	8971 ± 444*+##(14)	140,1 ± 4,4#(11)

Tabelle 2

Aortendruck und linksventrikuläre Parameter;

Linksventrikulärer systolischer Druck (LVSP), Diastolischer Aortendruck (DAP), Mittlerer Aortendruck (MAP), Linksventrikuläre maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (LV dP/dt_{max}), Linksventrikuläre Schlagarbeit (LV SW).

**p<0,05 v Kontrollgruppe ohne LO; +p<0,05 v Kontrollgruppe mit LO; #p<0,05 v Hypoxiegruppe ohne LO*

Der totale periphere Widerstand (TPR) wurde durch die Losartanbehandlung nur bei den Kontrolltieren signifikant erniedrigt.

Außerdem verminderte Losartan die linksventrikuläre Schlagarbeit (LVS_W) bei den hypoxiebehandelten Tieren.

3.2. Rechtsventrikuläre Parameter

Bei allen hypoxiebehandelten Tieren wurde, wie in *Tabelle 3* dargestellt, eine deutliche Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP; 52%) der maximalen Druckanstiegsgeschwindigkeit (RV dp/dt_{max} ; 49%) und der Schlagarbeit (RVSW; 89%) festgestellt.

Losartan hatte auf diese rechtsventrikulären Parameter bei den Tieren, die unter Kontrollbedingungen gehalten wurden, keinen Effekt, jedoch konnte der hypoxie-induzierte Anstieg verringert werden. Die Schlagarbeit (RVSW) und der rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) blieben hingegen im Vergleich zu den Kontrollwerten auch nach Losartangabe erhöht. Auch der enddiastolische rechtsventrikuläre Druck (RVEDP) war nach der Hypoxiebehandlung erhöht (siehe auch *Tab. 3*) und konnte durch Losartangabe nicht signifikant beeinflusst werden.

Versuchsgruppe	RVSP [[mmHg]	RV dP/dt _{max} [mmHg/s]	RVEDP [mmHg]	RV SW [mmHg•ml/kg]
Kontrollgruppe ohne LO	38,1 ± 0,83 (16)	2,704 ± 102 (16)	2,50 ± 0,38 (11)	39,9 ± 1,5 (13)
Kontrollgruppe mit LO	36,8 ± 0,97 (15)	2,640 ± 83 (15)	3,06 ± 0,35 (8)	45,2 ± 3,6 (14)
Hypoxiegruppe ohne LO	58,1 ± 1,42*+(15)	3,782 ± 191*+(15)	3,87 ± 0,35*(13)	75,4 ± 3,1*+(15)
Hypoxiegruppe mit LO	49,5 ± 2,06*+#(13)	3,046 ± 263#(13)	3,23 ± 0,51 (11)	59,5 ± 3,1*+#(11)

Tabelle 3

Rechtsventrikuläre Parameter:

Rechtsventrikulärer systolischer Druck (RVSP), Rechtsventrikuläre maximale Druckerhöhungsgeschwindigkeit (RV dP/dt_{max}), Rechtsventrikulärer enddiastolischer Druck (RVEDP), Rechtsventrikuläre Schlagarbeit (RV SW).

*p<0,05 v Kontrollgruppe ohne LO; +p<0,05 v Kontrollgruppe mit LO; #p<0,05 v Hypoxiegruppe ohne LO

3.3. Gewicht, Grösse und Volumen der Kardiomyozyten

Weder Myokardmasse noch Kardiomyozytenvolumen zeigten im linken Ventrikel nach vierwöchiger intermittierender Hypoxiebehandlung oder Langzeitgabe von Losartan eine signifikante Veränderung (siehe auch Tab. 4, 5).

Dagegen waren im rechten Ventrikel das Verhältnis von Ventrikelgewicht zu Körpergewicht (RVW/BW) und das Zellvolumen der Kardiomyozyten (RVCV) nach intermittierender Hypoxie über 4 Wochen deutlich erhöht (siehe auch Tab. 4).

Da die Zelllänge der Kardiomyozyten in allen Gruppen nahezu identisch war, konnte die Zunahme des Zellvolumens (RVCV) nur durch einen Anstieg des Zellquerschnitts bedingt sein.

Losartan (LO) verminderte unter Raumluftbedingungen im rechten Ventrikel weder das Verhältnis von Ventrikelgewicht zu Körpergewicht (RVW/BW), noch das Zellvolumen (RVCV) signifikant. Der Gewichtszuwachs des rechtsventrikulären Herzmuskels (RVW)

wurde in den hypoxiebehandelten Tieren parallel zum rechtsventrikulären, systolischen Druck (RVSP) durch die Losartanbehandlung signifikant verringert.

Versuchsgruppe	Tag 1 [Körpergewicht in g]	Tag 20 [Körpergewicht in g]	LVW [mg]	LVW/BW [mg/g]	RVW [mg]	RVW/BW [mg/g]
Kontrollgruppe ohne LO	194,9 ± 4,4 (16)	243,3 ± 5,6 (16)	706,1 ± 40,4 (8)	2,925 ± 0,189 (8)	204,1 ± 12,1 (8)	0,844 ± 0,053 (8)
Kontrollgruppe mit LO	207,9 ± 5,0 (16)	256,6 ± 5,9 (16)	632,0 ± 27,9 (8)	2,515 ± 0,173 (8)	200,0 ± 10,4 (8)	0,784 ± 0,029 (8)
Hypoxiegruppe ohne LO	206,1 ± 5,9 (15)	255,7 ± 4,8 (15)	756,5 ± 51,8 (8)	2,925 ± 0,200 (8)	302,5 ± 16,0*+ (8)	1,166 ± 0,049*+ (8)
Hypoxiegruppe mit LO	200,4 ± 7,6 (14)	255,2 ± 9,9 (14)	662,1 ± 51,8 (7)	2,549 ± 0,135 (7)	254,9 ± 18,4*+# (7)	0,990 ± 0,072+# (7)

Tabelle 4

Links- und rechtsventrikuläre morphologische Parameter:

Links- und rechtsventrikuläres Gewicht (LW; RW), Verhältnis von links- und rechtsventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht (LVW/BW; RVW/BW)

* $p < 0,05$ v Kontrollgruppe ohne LO; + $p < 0,05$ v Kontrollgruppe mit LO; # $p < 0,05$ v Hypoxiegruppe ohne LO

Versuchsgruppe	LVCV [μm^3]	RVCV [μm^3]	RVCL [μm]	RV CSA [μm^2]
Kontrollgruppe ohne LO	27,084 ± 1,924 (4)	24,248 ± 1,193 (8)	132,3 ± 2,1 (8)	183,2 ± 7,9 (8)
Kontrollgruppe mit LO	26,703 ± 3,234 (5)	22,896 ± 0,855 (8)	129,5 ± 1,7 (8)	176,6 ± 4,9 (8)
Hypoxiegruppe ohne LO	25,342 ± 2,250 (4)	29,541 ± 1,765*+(7)	130,9 ± 1,6 (7)	225,1 ± 11,4*+(7)
Hypoxiegruppe mit LO	23,729 ± 1,740 (6)	24,524 ± 2,370#(7)	127,6 ± 1,4 (7)	191,7 ± 17,1#(7)

Tabelle 5

Links- und rechtsventrikuläre Kardiomyozytenparameter:

Links- und rechtsventrikuläres Kardiomyozytenvolumen (LVCV; RVCV), rechtsventrikuläre Zelllänge (RVCL), rechtsventrikuläre Zellquerschnittsfläche (RV CSA)

* $p < 0,05$ v Kontrollgruppe ohne LO; + $p < 0,05$ v Kontrollgruppe mit LO; # $p < 0,05$ v Hypoxiegruppe ohne LO

Der Anstieg des rechtsventrikulären Zellvolumens (RVCV) konnte durch die Gabe von Losartan (LO) vollkommen verhindert werden.

3.4. Biochemische Parameter

Die Aktivität von Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD) und 6-Phospho-Glukonat-Dehydrogenase (6-PGD) wurde im linken Ventrikel (LV) weder durch die Hypoxiebehandlung noch durch die Gabe von Losartan (LO) beeinflusst.

Beide Enzymaktivitäten waren dagegen im rechten Ventrikel (RV) nach intermittierender Hypoxie deutlich erhöht.

Versuchsgruppe	LV G-6-PD [U/mg Protein]	RV G-6-PD [U/mg Protein]	LV 6-PGD [U/mg Protein]	RV 6-PGD [U/mg Protein]
Kontrollgruppe ohne LO	4,63 ± 0,31 (8)	5,08 ± 0,29 (8)	14,35 ± 0,55 (8)	15,70 ± 0,31 (8)
Kontrollgruppe mit LO	4,43 ± 0,30 (8)	4,99 ± 0,35 (7)	13,44 ± 0,48 (8)	12,77 ± 1,09 (7)
Hypoxiegruppe ohne LO	5,52 ± 0,72 (9)	9,58 ± 1,26*+(9)	13,88 ± 0,68 (9)	20,69 ± 1,36*+(9)
Hypoxiegruppe mit LO	5,40 ± 0,40 (7)	7,40 ± 0,62 (7)	13,29 ± 0,44 (7)	17,67 ± 1,34+(7)

Tabelle 6:

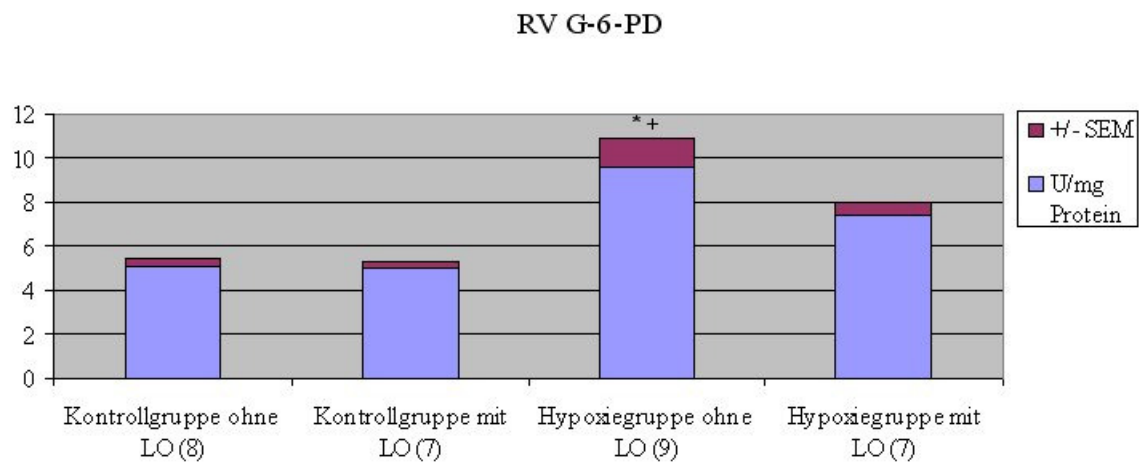
Links- und rechtsventrikuläre Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (RV G-6-PD) und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD)

* $p < 0,05$ v Kontrollgruppe ohne LO; + $p < 0,05$ v Kontrollgruppe mit LO; # $p < 0,05$ v Hypoxiegruppe ohne LO

Tabellen 1 bis 6: LO = Losartan (12 mg/kgKG/d). Anzahl der Experimente in Klammern.

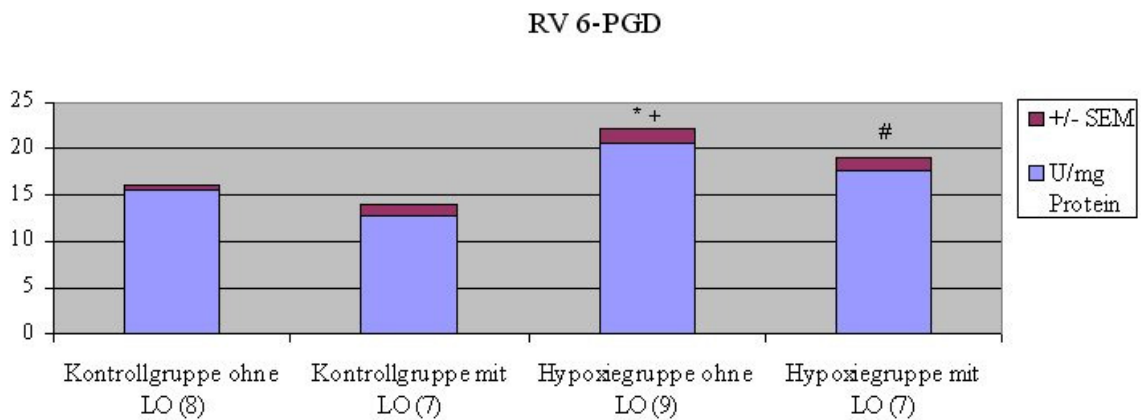
Losartan (LO) hatte keinen eindeutigen Einfluss auf andere Enzymaktivitäten im rechten Ventrikel (RV) unter Kontrollbedingungen, erniedrigte jedoch den hypoxie-induzierten

Anstieg der 6-Phospho-Glukonat-Dehydrogenase (6-PGD), wie in den *Grafiken 1 und 2* dargestellt.



Grafik 1:

Rechtsventrikuläre Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (RV G-6-PD)



Grafik 2:

Rechtsventrikuläre 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD)

Losartan (LO), Anzahl der Experimente in Klammern, SEM in roter Säule dargestellt.

**p<0,05 v Kontrollgruppe ohne LO; +p<0,05 v Kontrollgruppe mit LO; #p<0,05 v Hypoxiegruppe ohne LO*

4. Diskussion

Eine rechts- und linksventrikuläre Hypertrophie am Herz der Ratte wurde nach experimentell induzierter chronischer Infarzierung des Myokards durch Ligatur der linken absteigenden Koronararterie [35, 36] als auch nach Infusion von Katecholaminen [9] und nach Behandlung mit Trijodthyronin [34] beobachtet. Eine isolierte rechtsventrikuläre Hypertrophie ohne Anzeichen einer Beteiligung des linken Ventrikels konnte bisher nach experimenteller Pulmonalarterienstenose [32], nach Entwicklung einer pulmonalen Hypertonie nach Bestrahlung der Lunge [34] und auch nach andauernder Hypoxiebehandlung nachgewiesen werden [13, 23, 24].

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit vorgestellten Experimente zeigen, dass das Modell der intermittierenden Hypoxiebehandlung über vier Wochen geeignet war, um eine Hypertrophie des rechten Ventrikels zu erzeugen. Diese Hypertrophie war auf den rechten Ventrikel beschränkt, weder das Verhältnis von linksventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht (LVW/BW) noch das linksventrikuläre Kardiomyozytenvolumen (LVCV) waren bei den hypoxiebehandelten Ratten erhöht.

Bei der Medikation war, wie auch bereits in früheren Untersuchungen, eine Dosis von 12 mg/kg/d Losartan (LO) gewählt worden. In einer Studie mit normotensiven „Sprague Dawley“ Ratten hatte diese Dosierung nach kontinuierlicher zweiwöchiger Applikation keine wesentliche Auswirkung auf den systemischen Blutdruck gezeigt [10]. Gleichzeitig war diese Dosierung in einer anderen Untersuchung von Timmermans et al. ausreichend effektiv, um den Blutdruck in spontan-hypertensiven Tieren zu senken [28].

4.1. Linksventrikuläre und systemische Kreislaufparameter

Der totale periphere Widerstand (TPR) war in der Hypoxiegruppe um etwa 15% gegenüber den Kontrolltieren erniedrigt. Jedoch zeigten die linksventrikulären Druckwerte und die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) keine deutliche Beeinflussung durch die intermittierende Hypoxiebehandlung. Dagegen blieben rechtsventrikulärer systolischer Druck und auch die Kontraktilität im rechten Ventrikel für mehrere Stunden erhöht, auch nachdem wieder Raumlufbedingungen hergestellt worden waren.

Der beobachtete Abfall der Herzfrequenz (HR) der hypoxiebehandelten Tiere steht in Konsens mit früheren Berichten in der Literatur. Bei Menschen und anderen Säugetieren ist eine Erniedrigung der Herzfrequenz (HR) nach anhaltender Hypoxieexposition zu beobachten [17].

Die Effekte des Angiotensin-II-Rezeptorantagonisten Losartan (LO) auf die hämodynamischen Werte unter Raumlufbedingungen bestanden hauptsächlich aus einem Druckabfall im linken Ventrikel und der Aorta. Der totale periphere Widerstand (TPR) war auch reduziert, während das Herzzeitvolumen leicht erhöht war. Diese Druckreduktion im systemischen Kreislauf war in einem früheren Experiment an Ratten von Irlbeck et al [10], in dem Losartan (LO) intravenös über zwei Wochen gegeben worden war, nicht zu finden. Auch in einer Studie von Wong et al [31], in der man Losartan (LO) wachen, normotensiven Tieren infundierte, konnte keine Blutdrucksenkung beobachtet werden.

Das Ergebnis in der hier präsentierten Studie wird als ein leichter vasodilatierender Effekt von Losartan (LO) interpretiert. Dieser Effekt könnte durch die Hemmung einer basalen Angiotensinaktivität in Gefäßen des großen Kreislaufs erklärt werden. Die linksventrikuläre Kontraktilität wurde jedoch nicht beeinflusst, da die maximale Druckanstiegsgeschwindigkeit (dP/dt_{max}) im linken Ventrikel durch Losartan (LO) nicht vermindert wurde.

4.2. Funktionelle Parameter des rechten Ventrikels

Die intermittierende Hypoxieexposition bewirkte im rechten Ventrikel einen deutlich messbaren und anhaltenden Anstieg des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP) von $38,1 \pm 0,83$ auf $58,1 \pm 1,42$. In Vorversuchen war die Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP) nach vierwöchiger intermittierender Hypoxiebehandlung festgestellt worden, nachdem die Ratten bereits mehr als 16 Stunden wieder unter Raumluftbedingungen gehalten worden waren. Dies ließ die Vermutung zu, dass sich durch die intermittierende Hypoxie ein fixierter pulmonaler Hochdruck entwickelt hatte.

Die Pulmonalarterie der Tiere mit einem Katheter zu sondieren war nicht möglich, so dass der pulmonalarterielle Widerstand nicht festgestellt werden konnte. Die wahrscheinlichste Erklärung ist jedoch, dass die Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP) die Folge einer Erhöhung der rechtsventrikulären Nachlast war, welche durch eine hypoxiebedingte, pulmonale Vasokonstriktion hervorgerufen worden war [24]. Losartan (LO) hatte auf die rechtsventrikulären Parameter unter Kontrollbedingungen keinen Einfluss, verminderte jedoch die Ausprägung eines hypoxieinduzierten, rechtsventrikulären Hochdrucks. Werte, wie unter Kontrollbedingungen gemessen, wurden aber nicht erreicht.

Es wird vermutet, dass diese Druckverringerung im rechten Ventrikel durch einen vasodilatativen Effekt von Losartan (LO) im Lungenkreislauf oder durch eine direkte Hemmung der hypoxiebedingten, pulmonalen Vasokonstriktion hervorgerufen sein könnte.

Unter Kontrollbedingungen zeigte Losartan (LO) aber keinen messbaren Effekt auf den systolischen Druck im rechten Ventrikel. Außerdem konnten Morrell et al. zeigen [18], dass Losartan (LO) die vasokonstriktorische Reaktion der Pulmonalgefäße als Folge einer akuten Hypoxie nicht beeinträchtigt. Auf der anderen Seite zeigten Studien von Kiely et al. an

gesunden Probanden, die mit Losartan vorbehandelt worden waren [12], eine deutlich niedrigere Ausprägung einer pulmonalen Vasokonstriktion aufgrund akuter Hypoxie.

Als Erklärung hierfür werden Unterschiede zwischen den verschiedenen Spezies vermutet.

Andere Ergebnisse von Morrell et al. [18] in einem vergleichbaren Hypoxiemodell an Ratten zeigten, dass Losartan die Entwicklung einer Mediaverdickung und eines peripheren Muskelzuwachses in kleinen Pulmonalarterien einschränken konnte.

Es ist daher anzunehmen, dass die Blockade von AT₁-Rezeptoren eine Hypertrophie der Pulmonalarterien und dadurch auch die Entwicklung eines pulmonalen Hochdrucks verhindern kann.

Die Senkung des rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP) könnte auch durch einen negativen inotropen Effekt auf den rechten Ventrikel bedingt sein. Dies ist trotz der niedrigeren, rechtsventrikulären maximalen Druckerhöhungsgeschwindigkeit (RV dp/dt_{max}) eher unwahrscheinlich. Bei einer Reduktion der rechtsventrikulären Kontraktilität und einem konstant hohen Pulmonalarteriendruck hätte man einen Anstieg des enddiastolischen Drucks (RVEDP) beobachten müssen, besonders da das Herzzeitvolumen (CO) unverändert blieb.

Der enddiastolische Druck (RVEDP) war jedoch bei den hypoxischen Tieren, die mit Losartan (LO) behandelt wurden, nicht erhöht. Deshalb ist der erniedrigte rechtsventrikuläre systolische Druck (RVSP) am ehesten auf eine Hemmung der Angiotensinaktivität an den Pulmonalgefäßen zurückzuführen.

4.3. Herz und Zellgrößen

Wie erwartet, verursachte die intermittierende Hypoxiebehandlung eine isolierte rechtsventrikuläre Hypertrophie, die durch einen Anstieg des Verhältnisses von rechtsventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht (RVW/BW) (Kap.3; Tabelle 4) und einer Erhöhung des Kardiomyozytenvolumens belegt werden konnte (Kap.3; Tabelle 5). Da sich die rechtsventrikuläre Kardiomyozytenzelllänge bei den hypoxiebehandelten Tieren nicht von den Kontrolltieren unterschied und gleichzeitig die Zellquerschnittsfläche (CSA) erhöht war, handelte es sich um eine Hypertrophie vom konzentrischen Typ.

Diese Behauptung stützt sich auf die von Linzbach erstmals 1960 beschriebene konzentrische und exzentrische Hypertrophie als Folge einer Druck- bzw. Volumenbelastung [16], die auch Gerdes [36] übernommen hat. Eine Druckbelastung führt hierbei zu einem Anstieg der Ventrikelwandstärke bei überwiegend unverändertem Ventrikelvolumen. Hingegen zeigt sich bei einer Volumenbelastung ein erhöhtes Ventrikelvolumen bei variablen Veränderungen in der Wandstärke des Ventrikels. Deshalb ist die Zellquerschnittsfläche (CSA) und folglich das Zellvolumen bei druckbelastetem Ventrikel erhöht, es besteht eine konzentrische Hypertrophie. Bei Volumenbelastung findet sich ein Anstieg der Zelllänge und des –volumens und damit eine exzentrische Hypertrophie.

Dies wurde durch die morphologischen Veränderungen bei Ratten bestätigt, welche über vier Wochen eine ausgedehnte Infarzierung des linken Ventrikels durch Ligatur der linken Koronararterie (*LAD = left anterior descending*) entwickelt hatten. Hierbei korrelierte die Erhöhung des rechtsventrikulären systolischen Drucks und die Zunahme der Schlagarbeit des rechten Ventrikels deutlich mit einem Anstieg von rechtsventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht, einem vergrößerten Zellvolumen und erhöhter Zellquerschnittsfläche der

Kardiomyozyten des rechten Ventrikels. Dabei musste registriert werden, dass die Tiere mit einem linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) von 32 ± 2 mmHg ein schweres Linksherzversagen aufwiesen, verglichen mit den Kontrolltieren, bei denen der linksventrikuläre enddiastolische Druck (LVEDP) lediglich bei 3.4 ± 0.8 mmHg lag [36]. In der hier vorliegenden Studie verminderte Losartan (LO) die Gewichtszunahme des rechten Ventrikels (RVW/BW) ebenso wie den rechtsventrikulären systolischen Druck (RVSP). Werte wie bei den Kontrollen konnten aber nicht vollständig erreicht werden. Interessanterweise wurde jedoch der Anstieg des Zellvolumens und die Querschnittsvergrößerung der Kardiomyozyten durch Losartan (LO) vollkommen verhindert. Hieraus lässt sich ableiten, dass eine AT_1 -Rezeptorblockade durch Losartan die Entwicklung einer konzentrischen Hypertrophie verhindern kann, auch wenn eine Gewichtszunahme des rechten Ventrikels gegenüber den Kontrolltieren zu beobachten war. Hierfür muss letztendlich eine Zunahme des Bindegewebes verantwortlich gemacht werden, insbesondere das Kollagen scheint dabei eine Rolle zu spielen.

4.4. Biochemische Parameter

Die Enzyme Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) und 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGD) sind wichtige Größen, um die Aktivität in der Zelle, beispielsweise im Rahmen einer Hypertrophie, zu beurteilen. Sie katalysieren Reaktionen im Pentosephosphatweg, wobei es zur Regenerierung von $NADP^+$ zu $NADPH/H^+$ kommt. $NADPH/H^+$ wird vor allem bei der Fettsäure- und Steroidbiosynthese benötigt, wobei $NADPH/H^+$ zu $NADP^+$ reoxidiert wird.

Die Aktivitäten der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD) lassen sich am Umsatz von NADP^+ zu NADPH/H^+ bestimmen.

Das erste Enzym des Pentose-Phosphat-Weges, Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PD), ist aufgrund seiner Aktivität das limitierende und Durchsatz-regulierende Enzym.

Es wurde schon in früheren Experimenten mit der myokardialen Hypertrophie in Verbindung gebracht. Die Aktivität der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) war sowohl bei der katecholamininduzierten Myokardhypertrophie [10], bei der durch Thyroxin induzierten Hypertrophie in spontan-hypertensiven Ratten [7], als auch bei Hypertrophie nach Stenosierung des Aortenbogens [33] erhöht. In einem Modell mit chronischer Myokardinfarzierung war die Aktivität der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) ebenfalls erhöht [37, 38].

Diese Ergebnisse bestätigen die Annahme, dass die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) als Marker für Myokardhypertrophie zu betrachten ist.

In einem anderen Versuchsmodell von Zierhut et al. [32], in dem durch Konstriktion der Pulmonalarterie für zwei Wochen eine rechtsventrikuläre Hypertrophie erzeugt worden war, kam es zu keiner Erhöhung der Aktivität der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD).

In diesen hier vorliegenden Versuchen induzierte eine intermittierende Hypoxiebehandlung einen Anstieg der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) Aktivität im rechten Ventrikel, welcher vergleichbar mit dem Anstieg der Aktivität im linken Ventrikel bei anderen Versuchsmodellen mit kardialer Hypertrophie war. Das Fehlen des Anstiegs der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) Aktivität im linken Ventrikel in unserem Modell zeigte, dass die Veränderungen im Myokard nicht durch die systemische Hypoxie herbeigeführt worden waren. Es wurde auch klar, dass der Anstieg der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase-Aktivität, der in den anderen Modellen mit kardialer Hypertrophie gesehen

worden war, nicht etwa auf einen Sauerstoffmangel, sondern vielmehr auf die zusätzliche kardiale Belastung (erhöhte Nachlast) zurückzuführen ist.

Ein anderes Enzym des Pentose-Phosphat-Weges ist die 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD), welches ebenso wie die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD) einen Hauptlieferanten von NADPH in der Herzmuskelzelle darstellt. Keines der früheren Experimente hatte einen Zusammenhang zwischen kardialer Hypertrophie und der Aktivität des Enzyms 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD) gezeigt.

Bei dem hier präsentierten Versuch über vier Wochen konnte jedoch ein signifikanter hypoxie-induzierter Anstieg der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD) Aktivität im rechten Ventrikel beobachtet werden (Kap.3; Tabelle 6, Grafik 2), wenn auch weniger stark ausgeprägt als der Anstieg der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (G-6-PD). Diese erhöhte 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6-PGD) Aktivität im hier vorliegenden Modell könnte durch die längere Dauer des Versuchs erklärt werden, denn frühere Experimente liefen lediglich über maximal zwei Wochen. Möglicherweise benötigt ein Anstieg der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase-Aktivität mehr Zeit.

Losartan (LO) verringerte beide Enzymaktivitäten nach vierwöchiger intermittierender Hypoxie auf Werte, die fast den Kontrollen entsprachen. Es ging aus den Experimenten nicht klar hervor, ob dieser Effekt von Losartan (LO), ebenso wie die Effekte auf die Kardiomyozytenzellgröße und das Ventrikelgewicht, eine direkte Folge einer AT₁-Rezeptorblockade oder nur eine indirekte Folge durch eine Senkung des ventrikulären Drucks waren.

Da Losartan (LO) aber das hypoxie-induzierte Myozytenzellwachstum trotz eines immer noch erhöhten rechtsventrikulären systolischen Drucks (RVSP) vollständig verhinderte, erscheinen direkte Effekte durch eine AT₁-Rezeptorblockade denkbar.

Aufgrund dieser Ergebnisse und schon bekannter klinischer Erfahrungen mit AT₁-Rezeptorantagonisten besteht Hoffnung, mit dieser relativ neuen Gruppe im Kreis der Antihypertensiva eine Ergänzung oder auch Alternative zu bisherigen Therapiemöglichkeiten zu bieten. Die selektive Blockade des AT₁-Rezeptors erweist sich als besonders günstig, da Gefäßkontraktion, Wachstum und Aldosteronproduktion offenbar AT₁-Rezeptor vermittelt sind.

Die biologische Funktion des AT₂-Rezeptors ist hingegen noch nicht vollständig geklärt. Möglicherweise werden über diesen Rezeptortyp, der sich vorwiegend in fetalem Gewebe, aber auch im Uterus, Nebenniere, Gefäßendothel und Gehirn finden lässt [1, 19, 21, 26, 27], Vorgänge reguliert, die pathophysiologische Mechanismen günstig beeinflussen können. So stellte Rabinovitch schon 1988 fest, dass eine pulmonale Vasodilatation, vermutlich durch eine Angiotensin vermittelte Prostacyclinfreisetzung, einen akuten und chronischen hypoxieinduzierten Anstieg des Pulmonalarteriendrucks und die darauf folgende rechtsventrikuläre Hypertrophie verhindern konnte [24].

Eine selektive AT₁-Blockade, die vermutlich eine vermehrte Stimulierung des Angiotensin-II-Rezeptor Subtyps 2 (AT₂-Stimulierung) zur Folge hat, könnte noch mehr Bedeutung gewinnen, wenn sich bestätigen sollte, dass diese antiproliferativen Effekte und auch die Hemmung der Akkumulation verschiedener Proteine über den AT₂-Rezeptor gesteuert werden. Damit könnte dann möglicherweise eine wirksame Blockade der unerwünschten Angiotensinwirkungen erreicht werden und erwünschte, über den AT₂-Rezeptor vermittelte Effekte, würden erhalten bleiben. Hier bedarf es sicherlich noch längerer klinischer Erfahrung und weiterer Erkenntnisse über die Funktionen des Angiotensin und der einzelnen Subtypen der Angiotensinrezeptoren.

5. Zusammenfassung

Es wurden die hämodynamischen, biochemischen und morphologischen Effekte einer Angiotensin-II-Rezeptorblockade auf eine hypoxie-induzierte rechtsventrikuläre Hypertrophie an der Ratte untersucht. In weiblichen „Sprague Dawley“ Ratten wurde eine isolierte rechtsventrikuläre Hypertrophie durch intermittierende Hypoxie hervorgerufen. Nach Beendigung der Hypoxiebehandlung wurden links- und rechtsventrikuläre hämodynamische Parameter unter Raumlufbedingungen an narkotisierten Tieren mit speziellen Ultraminiaturtipkathetern gemessen. Das Herzzeitvolumen wurde mit der Thermodilutionsmethode bestimmt. Herzmuskelzellen wurden aus dem rechten und linken Ventrikel isoliert. Als Stoffwechselfparameter wurden die Enzyme Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase gemessen.

Die intermittierende Hypoxie bewirkte einen Anstieg des rechtsventrikulären Drucks und eine Erhöhung des Verhältnisses von Ventrikelgewicht zu Körpergewicht im rechten Ventrikel, die Hypoxiebehandlung hatte keinen Einfluss auf die linksventrikulären Kreislaufparameter oder das Herzzeitvolumen. Die Aktivitäten der Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase und der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase waren nach der Hypoxiebehandlung im rechten Ventrikel erhöht, jedoch nicht im linken Ventrikel. In der Hypoxiegruppe ohne Losartan war das Zellvolumen der isolierten Kardiomyozyten erhöht, die Kardiomyozytenzelllänge unverändert, so dass man von einer hypoxieinduzierten rechtsventrikulären Hypertrophie vom primär konzentrischen Typ ausgehen muss.

Losartan verringerte den hypoxie-induzierten Anstieg des rechtsventrikulären systolischen Druckes, die Zunahme des Verhältnisses von rechtsventrikulärem Gewicht zu Körpergewicht und die Enzymaktivitätserhöhung signifikant, wenn auch nicht vollständig. Die Zunahme des

Volumens und der Querschnittsfläche der isolierten Kardiomyozyten wurde durch Losartan jedoch vollkommen verhindert.

In Anbetracht dessen könnte Losartan in der Behandlung der Herzinsuffizienz und der Hypertonie einen noch deutlich höheren Stellenwert einnehmen, vor allem wenn man die Vorteile einer sehr niedrigen Nebenwirkungsrate und einer großen therapeutischen Breite, kombiniert mit einer sehr selektiven Blockade am Angiotensin-II-Rezeptor Subtyp 1 (AT₁-Blockade), mit einbezieht. Über eine selektive AT₁-Blockade könnte dann möglicherweise eine wirksame Ausschaltung der unerwünschten Angiotensinwirkungen erreicht werden und erwünschte, über den AT₂-Rezeptor vermittelte Effekte, würden erhalten bleiben.

Literaturverzeichnis

1. Cosby LA, Sartorelli AC 1971. "Studies in angiotensin induced synthesis of aldosteron in rabbit adrenal slices".
Pharmacologist 13:214-9.
2. Everett AD, Tufro-McReddie A, Fisher A, Gomez RA. 1994. "Angiotensin receptor regulates cardiac hypertrophy and transforming growth factor- β 1 expression".
Hypertension 23:587-92
3. Geisterfer AA, Peach MJ, Owens GK 1988. "Angiotensin II induces hypertrophy, not hyperplasia, of cultured rat aortic muscle cells".
Circ. Res. 62 (4):749-56.
4. Gerdes AM, Moore JA, Hines JM. 1987. "Regional changes in myocyte size and number in propranolol-treated hyperthyroid rats".
Lab invest 57:708-13
5. Glock GE, McLean P. 1953. "Further studies on the properties and assay of glucose 6 – phosphate dehydrogenase and 6 – phosphogluconate dehydrogenase of rat liver".
Biochem J. 55:400-8
6. Glock GE, McLean P. 1954. "Levels of enzymes of the direct oxidative pathway of carbohydrate metabolism in mammalian tissues and tumours".
Biochem J. 56:171-5
7. Heckmann M, Zimmer H-G 1992. „Effects of triiodothyronine in spontaneously hypertensive rats. Studies on cardiac metabolism, function and heart weight”
Basic Res. Cardiol. 87:333-343
8. Hurley J. 1970. "Sizing particles with a coulter counter".
Biophys. J. 10:74-9
9. Irlbeck M, Mühling O, Iwai T, Zimmer H-G. 1996a. "Different response of the rat left and right heart to norepinephrine"
Cardiovasc. Res 31:157-162
10. Irlbeck M, Mühling O, Iwai T, Zimmer H-G. 1996b. "Influence of angiotensin II receptor blockade on chronic noradrenalin stimulation of the rat left and right heart".
Exp. Clinic. Cardiol. 1:49-55
11. Irlbeck M, Iwai T, Lerner T, Zimmer H-G. 1997. "Effects of angiotensin II receptor blockade on hypoxia induced right ventricular hypertrophy in rats"

J. Mol. Cell Cardiol. 29:2931-2939

12. Kiely DG, Cargill RI, Lipworth BJ. 1995. "Acute hypoxic pulmonary vasoconstriction in man is attenuated by type I angiotensin II receptor blockade".
Cardiovasc. Res 30:875-80
13. Kolar F, Ostadal B. 1991. "Right ventricular function in rats with hypoxic pulmonary hypertension".
Pfluegers arch 419:121-6
14. Lopez JJ, Lorell BH, Ingelfinger JR, Weinberg EO, Schunkert H, et al. 1994. "Distribution and function of cardiac angiotensin AT1 and AT2-receptors subtypes in hypertrophied rat hearts".
Am. J. Physiol. 267:H844-52
15. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. "Protein measurement with the Folin phenol reagent".
J. Biol. Chem. 193:265-75
16. Linzbach AJ 1960. "Heart failure from the point of view of quantitative anatomy".
Am. J. Cardiol. 5:370-382
17. Maher JT, Manchanda SC, Cymerman A, Wolfe DL, Hartley LH. 1975. "Cardiovascular responsiveness to β -adrenergic stimulation and blockade in chronic hypoxia".
Am. J. Physiol. 228:477-81
18. Morrell NW, Morris KG, Stenmark KR. 1995. "Role of angiotensin-converting enzyme and angiotensin II in the development of hypoxic pulmonary hypertension".
Am. J. Physiol. 269:H1186-94
19. Naftilan AJ, Pratt RE, Dzau VJ, 1989. „Induction of platelet derived growth factor A-chain and c-myc gene expressions by angiotensin II in cultured rat vascular smooth cells".
J. Clin. Invest. 83(4):1419-24.
20. Nash GB, Tatham PER, Powell T, Twist VW, Speller RD, et al. 1979. "Size measurements on isolated rat heart cells using coulter analysis and light scatter flow cytometry".
BBA 587:99-111.
21. Nossaman BD, Feng CJ, Wang J, Kadowitz PJ, 1994. "Analysis of angiotensin I, II and III in pulmonary vascular bed of the rat".

- Am. J. Physiol.* 266:L389-96
22. Nossaman BD, Feng CJ, Kaye AD, Kadowitz PJ, 1995. „Analysis of responses to angiotensin IV: Effects of PD-123319 and DuP-753 in the pulmonary circulation of the rat.”
- Am. J. Physiol.* 268 (2 Pt 1):L302-8.
23. Ostadal B, Widimsky J. 1990. “Chronic intermittend hypoxia and cardiopulmonary system”.
- Prog. Resp. Res.* 26:1-11.
24. Rabinovitch M, Gamble W, Nadas AS, Miettinen OS, Reid L. 1979. “Rat pulmonary circulation after chronic hypoxia: hemodynamic and structural features”.
- Am. J. Physiol.* 236 (6):H818-27.
25. Rabinovitch M, Mullen M, Rosenberg HC, Maruyama K, O’Brodovich H, et al. 1988. “Angiotensin II prevents hypoxic pulmonary hypertension and vascular changes in rat”. *Am. J. Physiol.* 254:H500-8.
26. Reid IA, Morris BJ, Ganong WF 1978. “The renin-angiotensin system”
- Annu.Rev.Physiol.* 40:377-410.
27. Sadoshima J, Izumo S. 1993. “Molecular characterization of angiotensin II – induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype.”
- Circ. Res.* 73:413-23.
28. Timmermans P, Wong PC, Chiu AT, Herblin WF, Benfield P et al. 1993.
- “Angiotensin II receptors and angiotensin II receptor antagonists”.
- Pharm Reviews* 45:205-51.
29. v. Euler US, Liljestrand G. 1947. “Observations on the pulmonary arterial blood pressure in the cat”.
- Acta Physiol. Scand.* 12:301-20.
30. Weber KT, Brilla CG. 1991. “Pathological hypertrophy and cardiac interstitium. Fibrosis and renin-angiotensin-aldosterone system”.
- Circulation* 83(6):1849-65.
31. Wong PC, Price WA, Chiu AT, Duncia JV, Carini DJ, et al. 1990. “Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent.”
- J. Pharmacol. Exp. Therap.* 252 :719-25.

32. Zierhut W, Zimmer H-G, Gerdes AM, 1990. "Influence of ramipril on right ventricular hypertrophy induced by pulmonary artery stenosis in rats".
J. Cardiovasc. Pharmac. 16:480-6.
33. Zimmer H-G 1996. "Regulation of and intervention into the oxidative pentose phosphate pathway and adenine nucleotide metabolism in the heart"
Mol. Cell. Biochem. 160-161:101-9.
34. Zimmer H-G, Zierhut W, Seesko RC, Varekamp AE. 1988. "Right heart catheterisation in rats with pulmonary hypertension and right ventricular hypertrophy".
Basic Res. Cardiol. 83:48-57.
35. Zimmer H-G, Martius PA, Marschner G. 1989. "Myocardial infarction in rats: effects of metabolic and pharmacological intervention".
Basic Res. Cardiol. 84:332-43.
36. Zimmer H-G, Gerdes AM, Lortet S, Mall G. 1990. "Changes in heart function and cardiac cell size in rats with chronic myocardial infarction".
J. Mol. Cell. Cardiol. 22 :1231-43.
37. Zimmer H-G, 1992. "The oxidative pentose phosphate pathway in the heart: Regulation, physiological significance and clinical implications".
Basic Res. Cardiol. 87:303-16.
38. Zimmer H-G, Lankat-Buttgereit B, Kolbeck-Rühmkorff C, Nagano T, Zierhut W. 1992. "Effects of norepinephrine on the oxidative pentose phosphate pathway in the rat heart".
Circ. Res. 71:451-9.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt,

Prof. Dr. med. H.-G. Zimmer,

Carl-Ludwig-Institut für Physiologie, Universität Leipzig, für die Bereitstellung des Themas, seine fachliche Beratung, die konstruktiven Anregungen und große Geduld mit der er diese Arbeit begleitet hat,

Dr. med. Michael Irlbeck,

Klinik für Anästhesiologie, Klinikum Großhadern, München, für die Einführung in die Thematik und Untersuchungstechniken, sowie die Unterstützung bei der Ausarbeitung und Gestaltung,

Heike Kartmann und Eveline Musiol

für ihre hervorragende technische Assistenz bei der Durchführung der Versuche im physiologischen Institut der LMU in München

Lebenslauf

Name	Lerner
Vorname	Tobias
Geboren am	16.01.69
Familienstand	verheiratet
Nationalität	deutsch
Konfession	evangelisch
Vater	Dr. Reinhold Lerner, Kinderarzt i. R.
Mutter	Dr. Heidelinde Lerner, Ärztin
Sep. 80 bis Mai 89	Pestalozzi-Gymnasium München, Abitur im Mai 89
Dez. 89 bis März 91	Zivildienst bei der Johanniter-Unfall-Hilfe in Ottobrunn, Ausbildung zum Rettungssanitäter. Januar 95 bis April 99 ehrenamtlicher Bereitschaftsleiter im Kreisverband Ottobrunn.
Mai 91 bis Aug. 94	Humanmedizinisches Studium (Vorklinik) an der Ludwig-Maximilians-Universität München
Aug. 94 bis April 98	Humanmedizinisches Studium (Klinik) an der Technischen Universität München
April 98 bis Mai 99	Praktisches Jahr: Beth Israel Hospital, New York, USA; Klinikum Großhadern, München Städt.Krankenhaus München-Neuperlach
25.08.94	Ärztliche Vorprüfung/ Physikum
21.03.96	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
02.04.98	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
19.05.99	3. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Aug. 99 - Aug. 00	Anästhesie im Klinikum Großhadern (AIP)
Sep. 00 – Jan. 03	Innere Medizin im KH Neuperlach in der 5. Med. und 3. Med. Abteilung
Feb. 03 – Aug. 03	Weiterbildungsassistent in der Pädiatrie
Sep. 03 – März 04	Weiterbildungsassistent in der Arbeitsmedizin Betriebsarztzentrum Ottobrunn, EADS
April 04 – Juni 04	Weiterbildungsassistent in der Allgemeinmedizin
Juli 04 – Dez. 04	Weiterbildungsassistent in der Chirurgie
Jan. 05 – Dez. 05	Weiterbildungsassistent in der Allgemeinmedizin
5. April 2006	