

Aus der Medizinischen Klinik
der Universität Würzburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. Ertl

Einfluss des ACE-Hemmers Quinapril auf das Kapillarwachstum-
Morphologische Charakterisierung am chronisch ischämischen
Rattenherzen

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Philipp Ruile
aus München

Würzburg, Juli 2004

Referent: Prof. Dr. med. Georg Ertl

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. rer. nat. Wolfgang Bauer

Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 24.2.2005

Der Promovent ist Arzt.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Vorarbeiten zur morphologischen Charakterisierung der chronischen Koronarstenose der Ratte	1
1.2 Vorarbeiten zur Untersuchung des Einflusses des ACE-Hemmers Quinapril auf das mikrovaskuläre Remodeling	2
1.3 Eigene Zielsetzung	2
2. Material & Methoden	4
2.1 Tierpräparation	4
2.2 Protokoll	5
2.3 Herzaufbereitung	5
2.4 Verwendete Färbungen	6
2.4.1 Standardfärbung Hämatoxylin-Eosin (H.E.)	6
2.4.2 Lectinfärbung	6
2.4.2.1 Lectin GSI-Isolectin B4	7
2.4.2.2 Technisches Vorgehen	7
2.5 Auswertung	8
2.5.1 Nekrosegebiet	8
2.5.2 Myozyten	9
2.5.3 Kapillardichte	9
2.6 Die Orientatormethode	11
2.6.1 Allgemeines zur Orientatormethode	11
2.6.2 Tierpräparation	11
2.6.3 Protokoll	11
2.6.4 Herzaufbereitung	11
2.6.5 Präparateherstellung	12
2.6.6 Morphometrie	12
2.6.7 Messung mit der Integrationsplatte	13
3. Ergebnisse	16
3.1 Charakterisierung der chronischen Koronarstenose	16
3.1.1 Nekroseanteil am Gesamtmyokard	16
3.1.2 Myozytengröße	16
3.1.3 Kapillardichte	17
3.2 Einflüsse des ACE-Hemmers Quinapril	17
3.2.1 Nekroseanteil am Gesamtmyokard	17
3.2.2 Myozytenfläche	18
3.2.3 Kapillardichte	18
3.2.4 Längendichte	19
4. Diskussion	20
4.1 Charakterisierung der chronischen Koronarstenose	21
4.1.1 Stenosegrad der chronischen Koronarstenose	21
4.1.2 Nekrosefläche nach chronischer Koronarstenose	22
4.1.3 Koronarstenose und Herzfunktion	22
4.1.4 Veränderung der Myozyten nach chronischer Koronarstenose	23
4.1.5 Einfluss der chronischen Koronarstenose auf die Kapillardichte	24
4.1.6 Kritik der Methode	24
4.2 Untersuchung des Einflusses des ACE-Hemmers Quinapril	25
4.2.1 Einfluss auf die Nekrosefläche	25
4.2.2 Einfluss auf die Myozytengröße	25
4.2.3 Effekte auf das mikrovaskuläre Remodeling	25

4.2.4 Anmerkung zur Bewertung der Angiogenese	27
4.2.5 Kritik der Methode	28
5. Zusammenfassung	29
Literatur	30

1. Einleitung

Nach wie vor ist die KHK, die koronare Herzkrankheit, in den westlichen Industrienationen die häufigste Todesursache.

Trotz vermehrter Prävention und besser werdender Therapieansätze weisen 50 % der Männer über 65 Jahre eine kardiovaskuläre Erkrankung auf, ca. 30 % aus dieser Gruppe eine KHK [1]. Während Frauen vor der Menopause seltener an einer KHK erkranken, trifft es sie postmenopausal gleich oft wie die Männer [1]. Die klinische Erstmanifestation der KHK ist sehr unterschiedlich. Bei ca. 50 % der männlichen Patienten wird sie durch einen Infarkt manifest, die andere Hälfte leidet an unterschiedlichen Stärken der Angina Pectoris.

Kommt es als Folge der KHK zu einer verminderten Blutversorgung des Myokards, hat das Ausmaß des entstehenden Zellschadens entscheidenden Einfluss auf die klinische Symptomatik. Wie viel Gewebe geschädigt wird, hängt maßgeblich von der Sauerstoffversorgung ab, die vor allem durch die myokardiale Mikrozirkulation gewährleistet wird. Diese besteht aus Arteriolen, Kapillaren (Haargefäßen) und Venulen.

Die Kapillaren mit einem Durchmesser zwischen 4 und 15 µm übernehmen hierbei die wichtige Aufgabe des Stoffaustausches und der Nährstoffabgabe ins Gewebe.

Eine genauere Untersuchung der myokardialen Mikrozirkulation ist daher für das Verständnis der KHK ebenso wichtig wie für die Erforschung neuer Therapieformen zur Behandlung der ischämischen Herzerkrankung.

1.1 Vorarbeiten zur morphologischen Charakterisierung der chronischen Koronarstenose der Ratte

Zur Untersuchung der Ischämie am Tiermodell sind verschiedene experimentelle Modelle entwickelt worden. Neben den Tiermodellen an Hunden [2] und Schweinen [3] konnte sich zur Untersuchung der chronischen Ischämie besonders das Kleintiermodell der Ratte etablieren.

Guski et al. [4] etablierte bereits 1975 die Fadenumschlingung als eine operative Methode zur Erzeugung einer Koronarstenose an der Ratte.

Mit Hilfe dieses Modells konnten Anversa et al. [5] und Capasso et al. [6, 7] zeigen, dass es nach 4 Wochen alter Koronarstenose zu Myokardzellnekrosen und Herzinsuffizienz kommt.

1.2 Vorarbeiten zur Untersuchung des Einflusses des ACE-Hemmers Quinapril auf das mikrovaskuläre Remodeling

Die heute vor allem in der Hypertonie-, aber auch in der Herzinsuffizienzbehandlung eingesetzten ACE-Hemmer blockieren das Angiotensin Converting Enzym. Dieses wandelt körpereigenes Angiotensin I in Angiotensin II um, wobei Angiotensin II stark vasokonstriktorisch wirkt. Außerdem erhöhen ACE-Hemmer die Konzentration des vasodilatatorisch wirkenden Bradykinins.

Neben der blutdrucksenkenden Wirkung sind weiter folgende Effekte der ACE-Hemmer auf das Myokard bekannt:

Sie eignen sich sowohl im Tierversuch als auch am Patienten gut zur Prävention von Herzinsuffizienz und Ventrikeldilatation nach Infarkt und senken die Postinfarkt-Mortalität [8-10].

Ihre Wirkung auf das Gefäßbett und die Angiogenese (Entstehung neuer Kapillaren auf einen ischämischen Reiz) am Herzmuskel ist noch nicht hinreichend untersucht worden. Volpert et al. [11] konnte eine Hemmung der Angiogenese an der Hornhaut durch Captopril nachweisen.

Fabre et al. [12] hingegen zeigte in seinen Untersuchungen einen proangiogenen Effekt der ACE-Hemmer nach Stenose einer Femoralarterie am Kaninchen. Hier waren die Effekte des ACE-Hemmers Quinapril entsprechend denen von rhVEFG, einem Wachstumsfaktor.

Fabris et al. [13] untersuchte 1992 verschiedene ACE-Hemmer und fand heraus, dass Quinapril am potentesten das Angiotensin Converting Enzym in verschiedenen Geweben, so auch im Myokard, hemmt.

1.3 Eigene Zielsetzung

Erstes Ziel dieser Arbeit war es, das in unserem Labor etablierte Modell der chronischen Koronarstenose an der Ratte morphologisch zu charakterisieren. Untersucht werden sollten dabei das mikrovaskuläre Remodeling zwei Wochen nach Myokardischämie. Unter mikrovaskulärem Remodeling versteht man hierbei die mikrovaskulären Umbauvorgänge am ischämischen Herzen, die sich aus Hypertrophie und Narbenbildung im Laufe der Zeit ergeben.

Da Guski et al. [4] nachweisen konnte, dass die chronische Koronarstenose an der Ratte ein progredienter Prozess ist, sollten in der vorliegenden Arbeit die Untersuchungen zu einem frühen Zeitpunkt (2 Wochen alte Koronarstenose) stattfinden, um eine

Progredienz der Stenose hin zum Infarkt zu vermeiden. Da an der Ratte die Narbenbildung nach Infarkt erst ab 4 Wochen abgeschlossen ist, ist der von uns gewählte Zeitpunkt als subakut bzw. subchronisch zu bezeichnen.

Zur spezifischen Anfärbung des Kapillarendothels an in Formalin fixiertem Gewebe wurde eine neue immunhistochemische Färbung, die Lectinfärbung, in unserem Labor etabliert. Lectin färbt spezifisch das Endothel der Kapillaren an und erlaubt so die Kapillardichtebestimmung im Querschnitt. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass andere endothelspezifische Marker (CD 31, CD 34, Faktor VIII) an in Formalin fixiertem Gewebe keine spezifische Anfärbung ermöglichen [14].

In einem zweiten Schritt sollte untersucht werden, ob der ACE-Hemmer Quinapril einen proangiogenen Effekt auf die chronisch ischämische Herzmuskulatur ausüben könnte, wie dies bereits von Fabre et al. [12] für den Skelettmuskel gezeigt werden konnte.

Um die Effekte von Quinapril auf die Kapillarisation zu untersuchen, sollte neben der Lectinfärbung die Orientator-Methode zum Einsatz kommen [15]. Diese Methode ermöglicht es, Aussagen über dreidimensionale Strukturen aus der zweidimensionalen Ebene zu machen. So können Aussagen über Längenveränderungen der Gefäße als weiterer Hinweis eines Gefäßwachstums getroffen werden.

2. Material & Methoden

2.1 Tierpräparation

Als Versuchstiere dienten weibliche Wistar-Ratten, mit einem Gewicht von 260-290 g bei Versuchsdurchführung. Die Versorgung und Unterbringung der Tiere erfolgte nach standardisierten Bedingungen:

Sie wurden in Käfigen bei 20 Grad Celsius und einem 12 Stunden Tag/Nachtrhythmus untergebracht, die Ernährung erfolgte mit Standard-Trockenfutter und Wasser.

Die Tierpräparation wurde wie folgt vorgenommen:

Unter Äther-Inhalationsnarkose wurden die Tiere endotracheal intubiert und die Narkose mit Isofluran fortgesetzt. Eine Beatmung erfolgte volumenkontrolliert (~65 Atemzüge/min) mit einem speziellen Kleintier-Respirator (Rodent Ventilator, Hugo Sachs Elektronik).

Nach Thorakotomie und Perikardiotomie in Höhe des 4./5. ICR links parasternal wurde das Herz durch leichten Druck auf den Brustkorb vorgelagert.

Am vorgelagerten Herzen wurde nun die linke Koronararterie dargestellt und eine Fadenschlinge am proximalen Abschnitt 1-2 mm unterhalb ihres Abgangs angebracht. Hierzu wurde ein Faden mit einer feinen Nadel unter der Arterie durchgezogen und ein 300 µm dicker Draht mit eingebunden, der nach der Ligatur sofort wieder entfernt wurde. Diese Methode wurde von der Arbeitsgruppe um Guski et al. [4] etabliert und später von Capasso et al. [16] übernommen. Mit dieser Methode werden Stenosen mit einer Lumeneinengung zwischen 50-90 % erzeugt [6, 7, 17, 18]. Danach wurde das Herz wieder in den Thorax zurückverlagert und die Wunde mittels Metallclips verschlossen.

Eine Gruppe von Tieren wurde scheinoperiert (Shams), die als Kontrolltiere dienen. Hierzu wurden die Tiere in gleicher Weise operiert, allerdings wurde der Faden nur unter der Arterie durchgezogen und anschließend sofort wieder entfernt.

Nach Beendigung der Narkose und Wiederaufnahme einer selbstständigen Atmung wurden die Tiere extubiert.

Postoperativ wurden die Tiere über 5 Stunden beobachtet und bei auftretenden Herzrhythmusstörungen reanimiert. Die Letalität lag 24 Stunden postoperativ bei 35 %. Alle in dieser Arbeit verwendeten Tiere waren Teil einer Magnet-Resonanz-Studie zur Darstellung der funktionellen Mikrozirkulation.

Nach MR-Messung in der 1. und 2. Woche nach Operation in vivo wurden die Tiere mittels einer Überdosis Narcoren (Pentobarbital) getötet und die Herzen für eine Langendorff-Perfusion entnommen. An diesen Herzen wurde eine hochauflösende MR-Koronarangiographie gemessen, die zum Nachweis eines stenosierten, jedoch perfundierten Koronargefäßes und damit zum Ausschluss eines Myokardinfarktes diente.

Danach wurden die Vorhöfe abgetrennt und die Herzen zum Fixieren mindestens 24 h in 4%-ige gepufferte Formalinlösung eingelegt.

2.2 Protokoll

Zur Auswertung herangezogen wurden insgesamt 37 Rattenherzen.

20 Tiere wurden operiert und wiesen eine Koronarstenose auf. 10 Tiere davon waren unbehandelt (Gruppe 1), 10 Tiere erhielten Quinapril in unten aufgeführter Dosis (Gruppe 2). 17 Tiere waren sham-operiert, 10 davon waren nicht behandelt (Gruppe 3), 7 erhielten Quinapril (Gruppe 4).

Die Quinapril-behandelten Tiere erhielten 2 Wochen lang 6 mg Quinapril/kg Körpergewicht/Tag über das Trinkwasser in 25 ml gelöst, danach Wasser ad libitum. Die Verabreichung erfolgte ab dem Tag der Operation und wurde einen Tag vor Versuchsende beendet, um akute Medikamenteneffekte zu vermeiden.

2.3 Herzaufbereitung

Am intakten Herzen wurde zunächst die linke Koronararterie makroskopisch aufgesucht und mit einem Tätowierfarbstoff markiert. Anschließend wurde der Faden mit Hilfe einer Federschere und einer Federpinzette vorsichtig entfernt.

Nun wurde das Herz in sechs gleichstarke Scheiben von jeweils 2-3 mm geschnitten, wobei die Schnitte senkrecht zur Herzachse gelegt wurden.

So entstanden folgende Herzblöcke (Abb. 1):

- Block A und B, jeweils oberhalb der markierten Ligatur
- Block E, unmittelbar unterhalb der Ligatur, die Koronarligatur beinhaltend
- Blöcke F-H, unterhalb der Ligatur bis zur Herzspitze

Die Blöcke wurden entwässert und per Hand in der kurzen Herzachse möglichst flach in Paraffin eingebettet. Daraufhin wurden sie am Mikrotom in 2-3 µm Scheiben geschnitten, wobei bei den immunhistologischen Färbungen spezielle sialinisierte

Objektträger zur Anwendung kamen. Diese sollten eine Ablösung der Schnitte während der Färbung verhindern.

Nur die Schnitte der poststenotischen Blöcke E und F wurden in die Auswertung mit einbezogen. Diese entsprachen in der Höhe dem im MR gewählten Bildausschnitt.

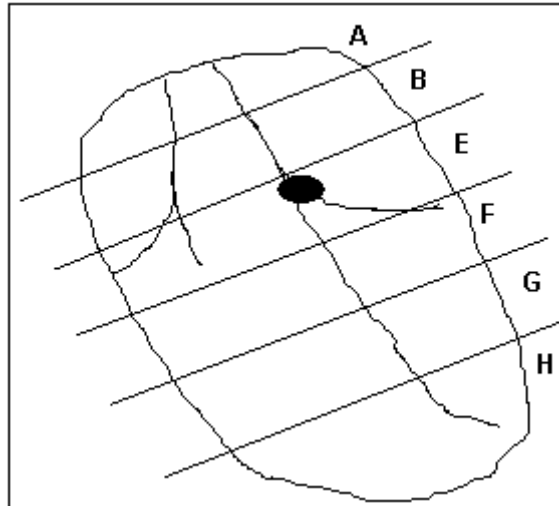


Abb. 1: Herzskizze mit Blöcken A-H, Ligatur

2.4 Verwendete Färbungen

2.4.1 Standardfärbung Hämatoxylin-Eosin (H.E.)

Von allen Blöcken wurde die Standardfärbung Hämatoxylin-Eosin (H.E.) angefertigt. Diese diente zur Quantifizierung des Gesamtvolumens des Herzmuskels, des Nekroseausmaßes und der Myozytengröße.

2.4.2 Lectinfärbung

Für die Auszählung der Kapillardichte wurde eine Lectinfärbung verwendet, die in unserem Labor etabliert wurde und im Folgenden näher erläutert werden soll.

Unter Lectine versteht man Glykoproteine, die in allen Organismen vorkommen. Sie verfügen über zwei oder mehrere Bindungsstellen, mit denen sie spezifische Abschnitte von Zuckern über hydrophobe Wechselwirkungen reversibel binden können.

Lectine sind z.B. verantwortlich für die Agglutination von Erythrozyten, für die Anheftung von E.coli an die Darmwand und Zell-Zell-Interaktionen.

Die an Bindungsstellen auf der Zelloberfläche verankerten Lectine binden an Glykokonjugate auf der Zelloberfläche anderer Zellen. Aus mehreren schwachen Wechselwirkungen der einzelnen Lectinbindungen entsteht dann im Zusammenspiel eine starke Bindung.

Als eine vom Immunsystem unabhängige Bindung unterliegt die Lectinbindung auch keinen typischen Immunsystemeffekten, wie z.B. dem Memoryeffekt.

2.4.2.1 Lectin GSI-Isolectin B4

Für die Färbung wurde das Isoenzym GS1-Isolectin B 4 (GS1-B4) verwendet. Das GS1-B4, ein Protein der Glücksbohne (*Griffonia simplicifolia*), bindet spezifisch an α -D-Galaktosyl-Reste auf Endothelzellen [19].

Als Marker für Endothelzellmembranen an paraffin-fixiertem Rattengewebe wurde es 1992 von Kuizinga et al. [14] erstmals beschrieben.

2.4.2.2 Technisches Vorgehen

Zunächst wurden die Schnitte in Xylol 20 min entparaffiniert.

Nach zwei absteigenden Alkoholreihen mit jeweils 100 % wurde die endogene Peroxidase durch ein Methanol/H₂O₂- Gemisch 20 min bei Raumtemperatur inhibiert.

Nun folgten absteigende Alkoholreihen von 1 x 100 %, 2 x 90 %, 2 x 80 % und schließlich 2 x 70 %. Anschließend wurden die Präparate gewässert. Nach dem 10 min Blocken mit Blocking Reagenz erfolgte die Inkubation mit Biotinylated Lectin GSI 1:200 über 60 min bei Raumtemperatur. Danach wurde dreimal mit PBS gespült. Nun wurde über 10 min mit Peroxidase konjugiertes Streptavidin (Bio Genex, San Ramon, USA) inkubiert, woraufhin wieder 3 x mit PBS gespült wurde. Im Anschluss an die Spülungen wurden die Präparate 5 min in ein DAB-Gemisch (Diaminobenzidin mit H₂O₂) bei Raumtemperatur gebracht (Abb. 2). Nach einer Wässerung erfolgte eine Gegenfärbung mit Hämatoxylin über 3 min und eine erneute Wässerung. Die Dehydrierung wurde mit einer aufsteigenden Alkoholreihe erreicht.

Vor der Eindeckung wurden die Präparate nochmals 2 x in Xylol gebracht (Abb. 3).

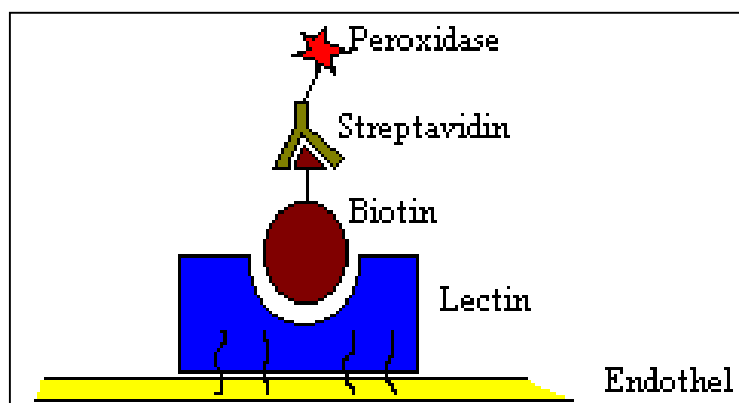


Abb. 2: Schematische Darstellung der Lectinfärbung

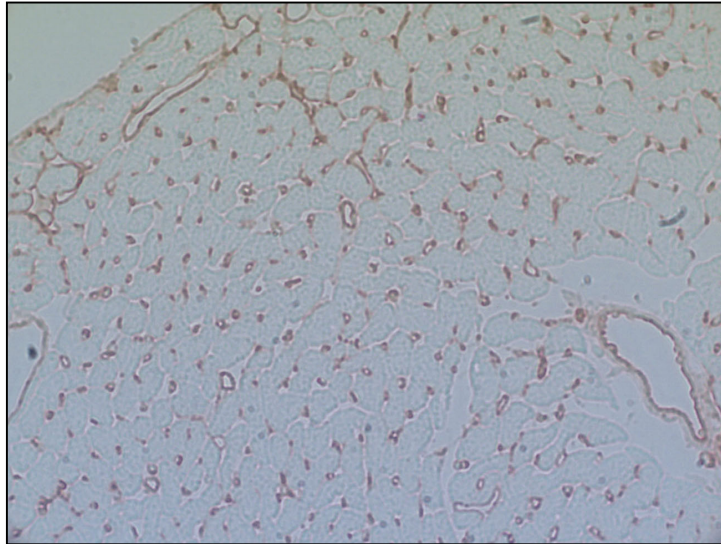


Abb. 3: Lectinfärbung, 32 x Vergrößerung

2.5 Auswertung

2.5.1 Nekrosegebiet

An jeweils 9-10 Schnitten der Blöcke E und F, die mit den Standardfärbungen HE und EvG gefärbt waren, wurde die Nekroseausdehnung bestimmt. Hierzu wurde die Gesamtmuskelfläche des linken Ventrikels an einem LaborluxS-Lichtmikroskop (Leitz, Wetzlar, Deutschland) mit Color Video Camera 3CCD (Sony, Köln, Deutschland) und dem Programm Scan®Pro Version 2.0 (Jandel Sigma, Erkrath, Deutschland) bei 1,6facher Vergrößerung bestimmt. Die Ausmessung der poststenotischen Nekrosefläche erfolgte an einem Lichtmikroskop (Zeiss, Jena, Deutschland) mit digitaler Kamera und einer digitalen Bildverarbeitungssoftware (Meta Imaging Series, Visitron Systems, Puchheim, Deutschland) bei 2,5facher Vergrößerung (Abb. 4).

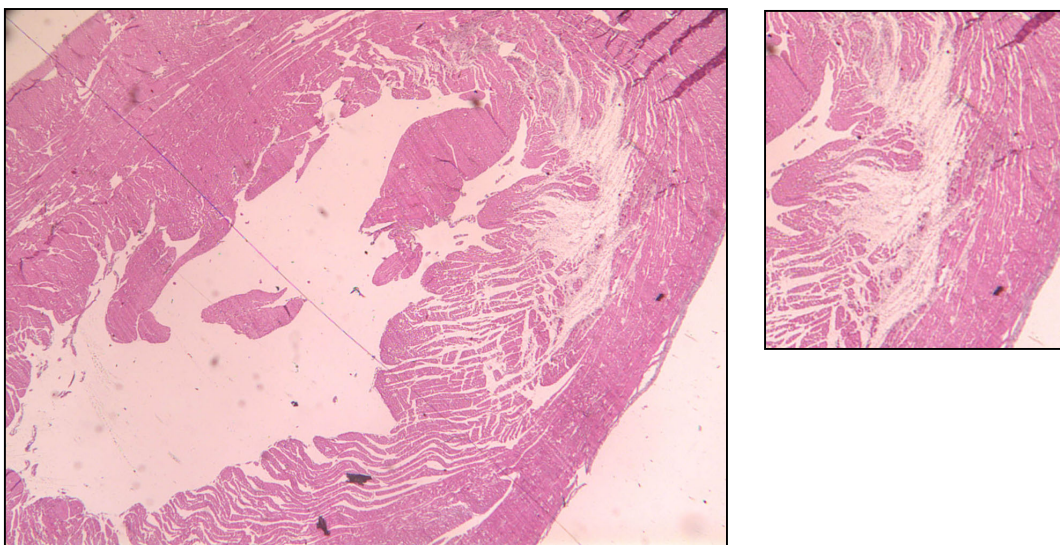


Abb. 4: Herzmuskulatur mit Nekrose (hell), 2,5 x Vergrößerung; rechts Nekroseausschnitt

Den prozentualen Anteil der Nekrosefläche an der Gesamtmyokardfläche des linken Ventrikels erhielt man nach folgender Formel:

$$\text{Poststenotische Nekrosefläche in \%} = \frac{\sum \text{Nekrosefläche} \times 100}{\sum \text{Gesamtmuskelfläche linker Ventrikel}}$$

2.5.2 Myozyten

Pro Herz wurden 20 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder mit je 0,0125 mm² aus dem intakten Restmyokard zur Myozytengrößenbestimmung herangezogen. Bei der Gesichtsfeldauswahl wurde auf eine gleichmäßige Repräsentierung von epikardialen, myokardialen und endomyokardialen Gesichtsfeldern geachtet. In jedem der Gesichtsfelder wurden 5 quergetroffene Myozyten ausgewählt, die einen in der Schnittebene möglichst zentral gelegenen Kern enthielten. Die Myozyten wurden manuell umfahren und ihre Querschnittfläche von der Software bestimmt (Abb. 5).

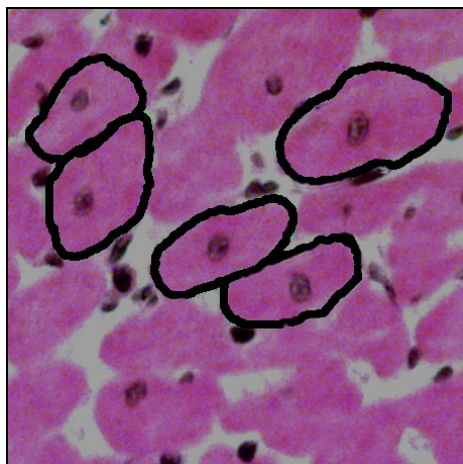


Abb. 5: Markierte Myozyten in HE-Färbung, 32 x Vergrößerung, Bild vergrößert dargestellt

2.5.3 Kapillardichte

Auch zur Kapillardichtebestimmung wurden 20 Gesichtsfelder mit jeweils 0,0125 mm² aus dem intakten Restmyokard zufällig ausgewählt, wobei auch hier wieder auf eine gleichmäßige Repräsentanz von epikardialen, myokardialen und endomyokardialen Gesichtsfeldern geachtet wurde.

Die Gesichtsfelder sollten möglichst quer getroffene Myozyten und kaum Interzellularspalten enthalten (Abb. 6).

Über einen Farbfilter und einen auf über 1 µm² Objektgröße eingestellten Größenfilter der Auswertesoftware wurden die durch die Lectinfärbung blau-braun dargestellten

Kapillaren automatisch markiert. Anschließend musste per Hand nachselektiert werden, um eventuell nicht berücksichtigte oder mehrfach gezählte Kapillaren zu korrigieren. Aus der pro Gesichtsfeld gefundenen Anzahl an Kapillaren ließ sich dann deren Zahl pro mm^2 und daraus der Mittelwert pro Herz errechnen.



Abb. 6: Gesichtsfeld der Lectinfärbung, 32 x Vergrößerung, Bild vergrößert dargestellt

2.6 Die Orientatormethode

Um eine eventuelle angiogenetische Wirkung der ACE-Hemmer auf die Kapillarisation des Myokards nachzuweisen, sollte neben der Lectinfärbung die Orientatormethode zum Einsatz kommen. Diese erlaubt neben der Bestimmung der Querschnittsdichte der Kapillaren auch Aussagen über deren Längenveränderung als einen weiteren Hinweis eines Gefäßwachstums.

Die Orientatormethode soll im Folgenden näher beschrieben werden.

2.6.1 Allgemeines zur Orientatormethode

Das Herz stellt, ebenso wie z.B. Knochen- oder Nervengewebe, ein sogenanntes anisotropes Gewebe dar. Dies bedeutet, dass die einzelnen Gewebekomponenten eine bestimmte Orientierung im Raum aufweisen. Demzufolge hat die Schnittführung bei der Herstellung von Myokardproben entscheidenden Einfluss auf deren histologisches Aussehen. Eine Ermittlung von dreidimensionalen Größen aus den Werten der Ebene ergibt nun verfälschte Werte, da das Myokard diese Gewebsausrichtungen aufweist. Um nun gültige Aussagen über räumliche Strukturen treffen zu können, muss die Schnittführung bei der Präparateherstellung zufällig auf die Achsen des Raumes bezogen sein. Dies wurde durch die Orientatormethode ermöglicht [15].

2.6.2 Tierpräparation

Die Präparation der Tiere erfolgte wie unter Kap. 2.1 beschrieben.

2.6.3 Protokoll

Ausgewertet wurden insgesamt 19 Rattenherzen. 11 Tiere erhielten operativ eine Koronarstenose, 5 Tiere davon blieben unbehandelt (Gruppe 1), 6 Tiere wurden mit Quinapril in der unter Kap. 2.1 beschriebenen Dosierung behandelt (Gruppe 2). Von den 8 sham-operierten Tieren waren 4 unbehandelt (Gruppe 3), 4 erhielten Quinapril (Gruppe 4).

2.6.4 Herzaufbereitung

Der linke Ventrikel wurde in der Längsachse des Herzens geschnitten, so dass zwei gleich große, halbkugelige Gewebestücke entstanden. Diese wurden wiederum in der Kurzachse des Herzens in jeweils 5 gleich starke Scheiben geschnitten. Nun wurde aus jeder Ventrikelhälfte jeweils eine Scheibe zufällig ausgewählt. Die beiden

Gewebsstücke wurden in einen Agarzylinder gegossen. Hierfür kann man z.B. eine an der Spitze abgeschnittene 10 ml Injektionsspritze verwenden, die mit warmem, flüssigem Agar aufgefüllt wird. Die zufällig eingenommene Position der Proben in dem im Kühlschrank erstarrten Zylinder ergab dann den 1. Freiheitsgrad des Raumes.

Nach Entnahme der Proben aus dem Zylinder wurden die runden Proben auf einen Tisch gelegt. Durch einen leichten Stoß wurden die Proben über die Tischebene gerollt. Sie kamen dann in einer zufälligen Position zum Liegen, wobei der Winkel der Proben zur Tischebene den 2. Freiheitsgrad im Raum darstellte.

In dieser Stellung wurden 4 Scheiben aus den Proben herausgeschnitten. Dies geschah in jeweils zufällig ermittelten Winkeln, die den 3. Freiheitsgrad im Raum bedeuteten.

So erhielt man 8 Gewebestücke pro Herz, aus denen histologische Präparate gewonnen werden konnten.

2.6.5 Präparateherstellung

Die Proben wurden für 24 Stunden in 3%-igem Glutaraldehyd fixiert. Danach erfolgte eine Spülung in Phosphatpuffer mit 5 % Saccharoseanteil bei einem pH-Wert von 7,2-7,4. Nun wurden die Proben 75 Minuten lang in eine 1%-ige Osmiumtetroxidlösung (gleiche Anteile OsO_4 und Kaliumcyanoferrat) eingebracht. Nach einer Entwässerung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Proben in Epon-Araldit gelagert. Die anschließend angefertigten Semidünnschnitte (1 μm) wurden dann mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt.

2.6.6 Morphometrie

Wie oben beschrieben erlaubt die Orientatormethode die Bestimmung von dreidimensionalen Größen und Werten aus der Ebene. Für die histologische Beurteilung und Auswertung werden verschiedene morphometrische Parameter benötigt, auf die nun kurz eingegangen werden soll.

Aus der Stereologie (griech.: Raumlehre) werden folgende Größen übernommen: Der Punkt (P), die Länge (L), die Fläche (A), das Volumen (V) und der Querschnitt (Q).

Zudem unterscheidet man Absolut- und Relativwerte. Letztere werden als Verhältniszahlen geschrieben und als Dichten bezeichnet.

Nun zu den Werten im Einzelnen:

Die Punktdichte P_p in % gibt die Anzahl der Punkte eines Messgitters wieder, die auf einer bestimmten Gewebestruktur zum Liegen kommen. Unter der Flächendichte A_a in

Prozent versteht man den Flächenanteil eines Gewebsbestandteils bezogen auf die Einheitsfläche. Während die Längendichte L_v in mm/mm^3 die Länge einer Gewebekomponente im Einheitsvolumen bezeichnet, zeigt die Volumendichte V_v in % den Volumenanteil eines Gewebebestandteils am Einheitsvolumen. Die Querschnittsdichte Q_a in $1/\text{mm}^2$ gibt die pro Einheitsfläche angeschnittenen Strukturen wieder.

Folgende Formeln besitzen nun ihre Gültigkeit:

1. $P_p = V_v$ [20]
2. $L_v [\text{mm}/\text{mm}^3] = 2 * Q_a [1/\text{mm}^2]$ [20]

2.6.7 Messung mit der Integrationsplatte

Die Ermittlung der morphometrischen Dichten erfolgte an einem Lichtmikroskop der Firma Zeiss in Ölimmersion bei 1000facher Vergrößerung. In einem Okular befand sich eine Integrationsplatte, d.h. ein quadratisches Punktgitter mit einer Seitenlänge von 0,125 mm. Das Gitter bestand aus 11 horizontalen und 11 vertikalen Linien, wobei bei der Dichtermittlung jeweils eine Linie weggelassen wurde, so dass sich 100 Schnittpunkte ergaben (Abb. 8). Pro Schnitt wurden 8 Gesichtsfelder ausgewertet, wobei das erste Gesichtsfeld zufällig ausgewählt wurde. Die anderen Gesichtsfelder erhielt man durch mäanderförmiges Abfahren des Schnittes und Auswahl der Gesichtsfelder in gleichmäßigen Abständen (Abb. 7). In den Gesichtsfeldern wurde ausgezählt, auf welche Strukturen sich die einzelnen Schnittpunkte projizierten, und so deren Volumendichte ermittelt. Hierbei wurden folgende Gewebekomponenten unterschieden:

- Kapillaren besitzen ein Lumen kleiner 15 μm ohne erkennbare Gefäßwand
- Venolen sind größer als Kapillaren und haben eine dünne Gefäßwand
- Arteriolen besitzen eine deutliche, muskuläre Gefäßwand
- Die Endothelzellen wurden zu den zugehörigen Gefäßen gezählt
- Bindegewebe bezeichnet z.B. fibrotische Areale oder kommt in der Umgebung von Gefäßen vor
- Der Abzug bedeutet Messpunkte, die sich auf Artefakte projizierten oder auf Flächen unter dem Okular, die kein Parenchym enthielten

Punkte, die sich auf Arterien, Venen und Abzug projizierten, gingen nicht in die Auswertung mit ein und wurden von der Gesamtfläche subtrahiert.

Es ergaben sich also pro Tier 64 Einzelwerte (8 Schnitte à 8 Gesichtsfelder) für die Punktdichte der einzelnen Strukturen.

Aus deren Mittelwert ließ sich dann nach der Formel 1 die Volumendichte bestimmen.

Durch Auszählen der Kapillaranschnitte innerhalb des Gitternetzes konnte zudem die Querschnittsdichte Q_a [$1/\text{mm}^2$] und Längendichte L_a [mm/mm^3] der Kapillaren bestimmt werden. Von der Bezugsfläche des Gitternetzes von $0,0156 \text{ mm}^2$ (Seitenlänge des Quadrates $0,125 \text{ mm}$) musste noch die Fläche abgezogen werden, die sich auf Artefakte, parenchymfreie Areale oder große Gefäße projizierte. Diese erhielt man durch Auszählen der auf selbige Strukturen fallenden Messpunkte.

Zudem sollte vermieden werden, Kapillaren doppelt zu zählen. Dies geschah mit Hilfe der Gundersen-Regel: Kapillaren wurden nicht mitgezählt, wenn sie den linken oder oberen Rand des Gitternetzes schnitten [21].

Aus der Querschnittsdichte konnte dann nach der Formel 2 die Längendichte der Kapillaren berechnet werden.

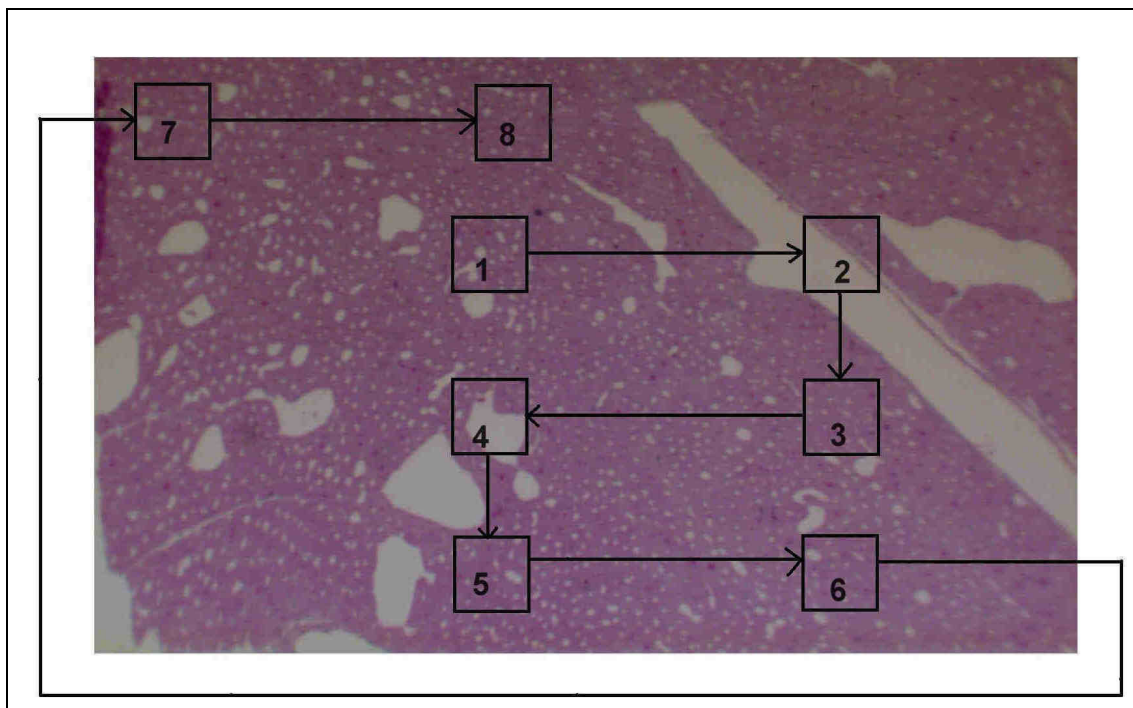


Abb. 7: Auswahl der Gesichtsfelder durch mäanderförmiges Abfahren des Präparates

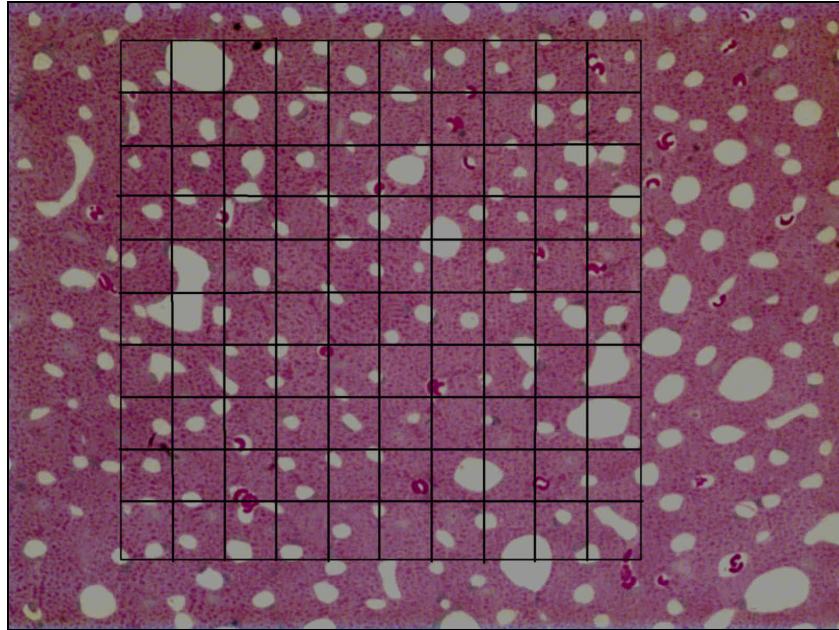


Abb. 8: Integrationsplatte auf einem Präparat

3. Ergebnisse

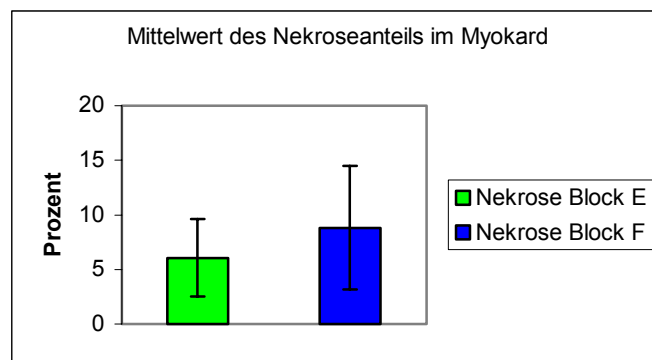
Im Folgenden werden die Ergebnisse der Charakterisierung der chronischen Koronarstenose und der Untersuchung des Einflusses von Quinapril getrennt aufgeführt.

3.1 Charakterisierung der chronischen Koronarstenose

3.1.1 Nekroseanteil am Gesamtmyokard

In Ebene E ließ sich bei einem Tier die Nekrosefläche nicht bestimmen, da das Präparat durch Fixation und Schneiden zu sehr in Mitleidenschaft gezogen war. Hier wurde die Ebene E aus der Wertung herausgenommen. Bei einem weiteren Tier war in Ebene F keine Nekrose mehr nachweisbar, auch hier wurde die Ebene nicht in das Gesamtergebnis mit einbezogen.

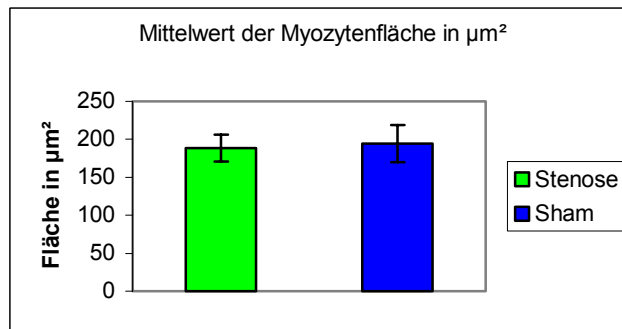
Wie aus Grafik 1 ersichtlich, ergab sich ein mittlerer Nekroseanteil im Block E von $6,05 \pm 3,55$ % und im Block F von $8,82 \pm 5,65$ %.



Grafik 1

3.1.2 Myozytengröße

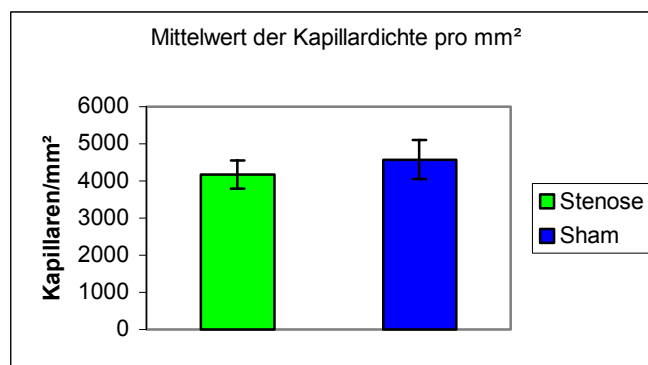
Die Myozytenquerschnittsfläche der Stenostiere war mit $194,50 \pm 24,24 \mu\text{m}^2$ vergleichbar mit der der Shamtiere ($188,52 \pm 17,88 \mu\text{m}^2$) (siehe Grafik 2). Es ließ sich also nach 2 Wochen keine Myokardhypertrophie durch die Stenose feststellen.



Grafik 2

3.1.3 Kapillardichte

Die Kapillardichte der Stenostiere war mit $4168,24 \pm 381,30$ pro mm^2 nicht signifikant verändert gegenüber der der Shamtiere mit $4571,05 \pm 525,36$ pro mm^2 (siehe Grafik 3).

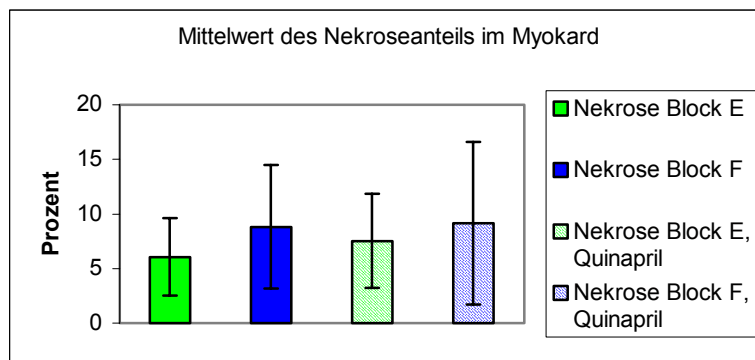


Grafik 3

3.2 Einflüsse des ACE-Hemmers Quinapril

3.2.1 Nekroseanteil am Gesamtmyokard

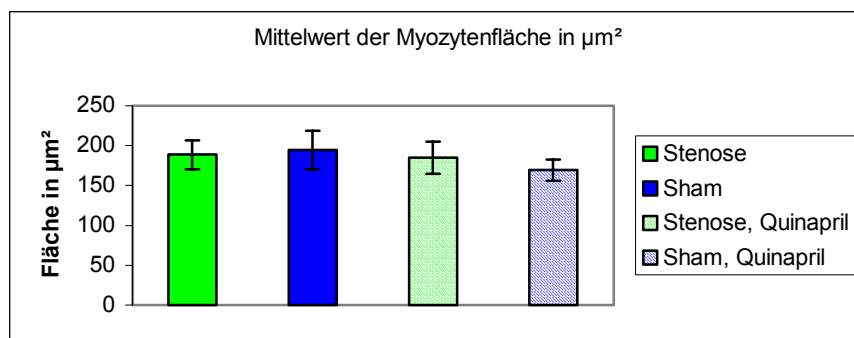
Der Nekroseanteil am Gesamtmyokard wurde durch die Behandlung mit Quinapril nicht signifikant verändert. So ergab sich im Block E eine Zunahme der Nekrosefläche von $6,05 \pm 3,55$ % auf $7,51 \pm 4,31$ % bei den behandelten Tieren. Der Nekroseanteil im Block F war bei den behandelten Tieren mit $9,17 \pm 7,44$ % nahezu gleich mit dem der unbehandelten Tiere ($8,82 \pm 5,65$ %) (Grafik 4).



Grafik 4

3.2.2 Myozytenfläche

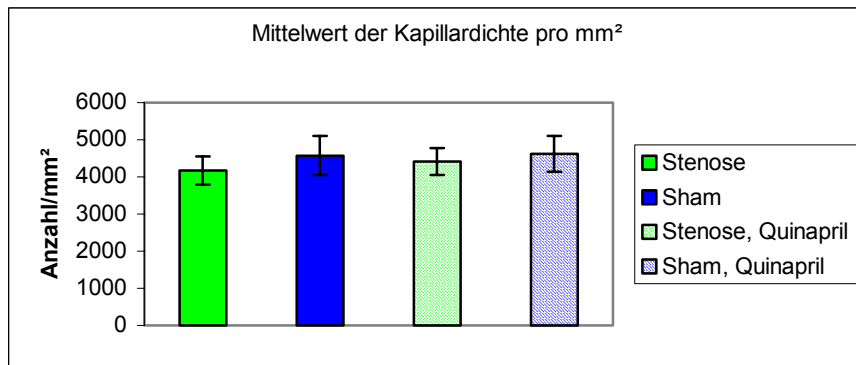
Die Myozytenfläche der behandelten Tiere war im Mittel etwas niedriger als die der unbehandelten Tiere. Bei den Stenose-Tieren sank sie von $188,52 \pm 17,88 \mu\text{m}^2$ (unbehandelt) auf $185,13 \pm 20,08 \mu\text{m}^2$ (behandelt). Als Sham-Werte ergaben sich Flächen von $195,20 \pm 24,24 \mu\text{m}^2$ (unbehandelt) und $169,28 \pm 13,50 \mu\text{m}^2$ (behandelt). Diese Unterschiede waren jedoch nicht signifikant (Grafik 5).



Grafik 5

3.2.3 Kapillardichte

Durch die Behandlung mit Quinapril zeigte sich eine leichte, jedoch nicht signifikante Kapillardichtesteigerung. Der Wert der Stenose-Tiere stieg von $4168,24 \pm 381,30$ pro mm^2 (unbehandelt) auf $4410,19 \pm 366,03$ pro mm^2 (behandelt), der der Sham-Tiere von $4571,05 \pm 525,36$ pro mm^2 (unbehandelt) auf $4618,09 \pm 488,47$ pro mm^2 (behandelt). Auch hier waren die Werte nicht signifikant unterschiedlich (Grafik 6).

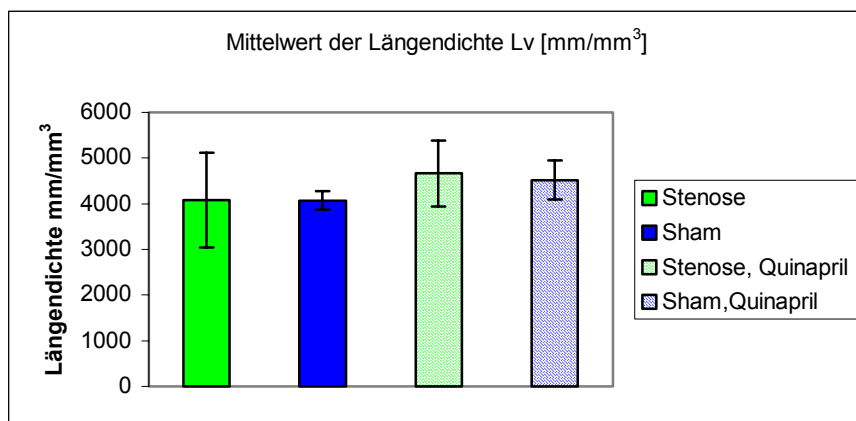


Grafik 6

3.2.4 Längendichte

Die mittels Orientatormethode bestimmte Längendichte wurde durch die Verabreichung von Quinapril nicht signifikant verändert.

Bei Quinaprilgabe zeigte sich eine leichte Steigerung der Längendichte in mm/mm³ von 4078,8±1037,55 mm/mm³ auf 4665,17±720,15 mm/mm³ bei den Stenostieren bzw. von 4071,5±202,65 mm/mm³ auf 4518±426,45 mm/mm³ bei den Shamtieren (Grafik 7).



Grafik 7

4. Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war primär die histologische Charakterisierung der 2 Wochen alten chronischen Koronarstenose an der Ratte. Darüber hinaus sollten Einflüsse des ACE-Hemmers Quinapril auf das mikrovaskuläre Remodeling unter chronischer Ischämie untersucht werden. Zusätzlich sollten mögliche angiogene Effekte von Quinapril auf das ischämische Myokard erforscht werden.

Die Untersuchungen wurden mit in unserem Labor neu etablierten histologischen und immunhistochemischen Methoden vorgenommen, mit Hilfe derer die morphologischen Parameter Nekrosefläche, Querschnittsfläche der einzelnen Myozyten und Kapillardichte quantitativ bestimmt wurden.

Zusätzlich kam im Rahmen dieser Arbeit die neue Orientatormethode zum Einsatz, mit deren Hilfe Aussagen über dreidimensionale Strukturen aus der Ebene getroffen werden können. So ließ sich das Längenwachstum der myokardialen Kapillaren als ein weiterer Hinweis eines angiogenetischen Geschehens untersuchen.

Zwei Wochen nach Koronarstenosierung zeigten die Tiere poststenotisch deutliche Nekroseareale von 1,7 % bis 21,6 % (im Mittel $7,44 \pm 4,6$ %).

Trotz dieses Zelluntergangs am Herzmuskel ließ sich keine Hypertrophiereaktion der Myozyten nachweisen.

Es konnte auch kein Einfluß der chronischen Koronarstenose auf die Kapillardichte des Myokards gefunden werden.

Im Gegensatz zu Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe, die Hypertrophiereaktion und relative Kapillardichteänderung am chronischen Infarktmodell nachweisen konnten, zeigen unsere Ergebnisse, dass eine chronische Koronarstenosierung bis 2 Wochen nach Operation zu keinem mikrovaskulären Remodeling und Myozytenhypertrophie führt.

Mit unseren zusätzlichen MR-Koronarangiographien konnten wir die tatsächliche Durchgängigkeit des ligierten Gefäßes überprüfen. Im Rahmen dieser Untersuchungen zeigte sich, dass bereits nach 2 Wochen alter Koronarstenose von 17 gemessenen Tieren 3 einen totalen Gefäßverschluss und damit einen Infarkt hatten. Die Koronarstenose der Ratte ist jedoch ein progredienter Prozess [4]. Dies lässt vermuten, dass bei Untersuchungen über einen längeren Beobachtungszeitraum, wie ihn die meisten Arbeitsgruppen wählten, ein erheblicher Teil der Tiere einen Infarkt und nicht nur eine Stenose entwickelt hatten.

Der Einsatz des ACE-Hemmers Quinapril hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Narbenausdehnung und die Myozytengröße.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Fabre et al. [12] konnte ein proangiogener Effekt auf den Herzmuskel in unserem Tiermodell nicht nachgewiesen werden.

Im Folgenden soll noch einmal auf die beiden Untersuchungsschwerpunkte im Detail eingegangen werden.

4.1 Charakterisierung der chronischen Koronarstenose

4.1.1 Stenosegrad der chronischen Koronarstenose

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte eine Methode etabliert werden, mit der man den Grad der Koronarstenose quantifizieren kann [22]. Diese Methode geht zurück auf die Arbeit von Guski et al. [4] und wurde später von anderen Arbeitsgruppen übernommen [5, 16]. Mit Hilfe dieser Methode konnte für die operierten Tiere ein Stenosegrad von im Mittel $49,9 \pm 11,7$ % ermittelt werden. Vergleichbare Werte finden sich bereits in früheren Untersuchungen [6, 7, 18]).

Ähnliche Stenosegrade führen allerdings bei der Koronarstenose an der Ratte zu unterschiedlich starken Veränderungen der Herzfunktion, von moderater Dysfunktion bis zu schwerem Herzversagen [7]. So zeigten in der Arbeit von Capasso et al. [7] von 25 operierten Ratten 10 Tiere nur eine leichte Herzdysfunktion, 9 eine schwere Dysfunktion und 6 ein Herzversagen einen Monat nach Koronarstenosierung. Auch bei Patienten mit vergleichbaren Stenosegraden variiert das klinische Bild sehr stark [23, 24].

Der direkte Vergleich der chronischen Koronarstenose der Ratte mit der des Menschen ist allerdings nicht möglich, da die Ratte ein im Vergleich zum Menschen gering ausgeprägtes Koronargefäßkollateralsystem besitzt [25]. So führt bereits eine gering ausgeprägte Stenose zur deutlichen Narbenbildung.

Zudem wird die Koronarstenose an der Ratte mit dieser Methode akut erzeugt, während die Entstehung einer chronischen Koronarstenose am menschlichen Herzen ein langsam progredienter Prozess ist. Allerdings ist auch die Koronarstenose im Tiermodell einem progredientem Prozess unterworfen. Während bei einer 7 Tage alten Koronarstenose nur 30 % der Ratten einen Stenosegrad von über 50 % aufwiesen, zeigten nach 21 Tage alter Koronarstenose 100 % der Versuchstiere einen Stenosegrad über 50 % [4]. Osswald et al. [17] nahm an, dass hierfür eine Intimaproliferation der Gefäßwand als Reaktion auf den chronischen Fremdkörperreiz verantwortlich sei.

4.1.2 Nekrosefläche nach chronischer Koronarstenose

Ebenfalls wurde in unserer Arbeitsgruppe eine Methode zur Bestimmung des linksventrikulären Nekroseanteils am Gesamtmyokard nach Koronarstenose etabliert. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Tieren lag der Nekroseanteil am Gesamtmyokard im Mittel bei $7,44 \pm 4,6$ %. Die bereits von Osswald et al. [17] beschriebene unterschiedlich starke Intimaproliferation könnte eine Ursache für die erheblichen Differenzen in der Ausdehnung der Nekrosefläche der in dieser Arbeit untersuchten Tiere sein (von 3,1 % bis 14,2 % des Gesamtmyokards).

Zu den vorliegenden Werten des Nekroseanteils gibt es in der Literatur keine direkten Vergleichswerte. Anversa et al. [5] untersuchte zwar Zelluntergänge an der Koronarstenose genauer, vermaß aber nicht die Nekrosefläche, sondern wertete den Verlust an Myozytenkernen aus. Er fand einen Myozytenverlust von 10-20 % bei 4 Wochen alter Koronarstenose.

Die in unserer Arbeitsgruppe gefundenen Werte verdeutlichen, dass an der Ratte bereits ein Gefäßverschluß von knapp 50 % zur Entstehung von Nekrosearealen führt.

Bei Anversa et al. [5] zeigten über die Hälfte der Ratten mit 4 Wochen alten Koronarstenosen bereits ein Herzversagen, wobei auch hier die Lumeneinengung nur im Mittel 45 % betrug.

Untersuchungen am menschlichen Herzen konnten zeigen, dass es erst bei höhergradiger Lumeneinengung zu Zellnekrosen kommt. Allerdings können hier bereits moderate Zellschäden zu unterschiedlich schweren klinischen Symptome führen [26].

4.1.3 Koronarstenose und Herzfunktion

Das Modell der chronischen Koronarstenose muss von dem des Infarkts an der Ratte unterschieden werden. Während es bei der Koronarstenose bereits durch relativ geringen Zellverlust zum Herzversagen kommen kann, werden bei kleineren Infarkten Zelluntergänge bis zu 30 % toleriert [27]. Anversa et al. [5] vermutete bei seinen Untersuchungen an 4 Wochen alten Koronarstenosen, dass durch die fixierte chronische Koronarstenose eine Form des Myokardschadens entsteht, der die normalen Reservemechanismen des verletzten Ventrikels außer Kraft setzt. Die Einbußen bei der Herzfunktion von Tieren mit chronischer Koronarstenose führt er auf ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot zurück. Dieses entstehe durch eine Kombination aus Reduktion der koronaren Reserve, erhöhtem koronarem Widerstand und zusätzlich erhöhtem Wandstress im Ventrikel [18].

Bereits 45 Minuten nach Koronarstenosierung der Ratte konnte Capasso et al. bei einem durchschnittlichen Stenosegrad von 42 % eine deutliche Zunahme des enddiastolischen Drucks im linken Ventrikel und erste Hinweise auf Zellschäden feststellen [16]. Außerdem fand sich ein erheblich vergrößerter Ventrikel bei nur wenig veränderter Verlängerung der Sarkomerlänge der Myozyten. Der Hauptanteil der Volumenzunahme wurde auf side-to-side-slippage, ein Verrücken der Muskelfasern, zurückgeführt, das schon beim Remodeling des Myokardinfarkts gefunden werden konnte [16, 28].

Capasso et al. konnte nachweisen, dass bei 5 Tage alter Koronarstenose an der Ratte mit einem mittleren Stenosegrad von 62 % die maximale Perfusion um 43 % bei normaler Ruheperfusion abgenommen hatte. Dies könnte darauf hindeuten, dass Myokardischämien in diesem Modell erst unter Stressbedingungen entstehen [6]. In anderen Tierversuchen an Hunden zeigte sich eine Reduktion der Ruheperfusion erst bei Einengung des Gefäßlumens über 70 % [29]. Es konnte jedoch kein direkter Zusammenhang zwischen Veränderungen beim koronaren Blutfluss und Ausmaß und Ort des Myokardschadens festgestellt werden [6]. Also scheint die Minderperfusion nicht alleine ausschlaggebend für den Zelluntergang zu sein. Zusätzlich wirksam könnten hier Gefäßspasmen, kleine Emboli oder erhöhte Katecholamin-Konzentrationen sein [6].

4.1.4 Veränderung der Myozyten nach chronischer Koronarstenose

Die Untersuchung der Myozytenquerschnittsfläche ergab in der hier vorgelegten Arbeit einen Sham-Wert von im Mittel $195 \pm 24 \mu\text{m}^2$. Dies korreliert sehr gut mit den von der Arbeitsgruppe um Anversa et al. [30] ermittelten Werte. Hier wurden die Sham-Werte elektronenmikroskopisch bestimmt und lagen im Mittel bei ca. $200 \mu\text{m}^2$.

Obwohl die von uns untersuchten Tiere zum Teil doch erhebliche Nekroseareale aufwiesen, zeigte sich in den untersuchten Präparaten keine signifikante Hypertrophie der Myozyten im Vergleich zu den Sham operierten Tieren. Allerdings umfasste der Untersuchungszeitraum bei uns nur 2 Wochen. Anversa et al. fand bei 4 Wochen alter Koronarstenose mit einem Stenosegrad zwischen 19 und 61 % eine deutliche Zunahme des Myozytenvolumens [5]. Hier lagen die Werte zwischen 34 und 53 % über denen der Kontrolltiere. Das Gewicht des linken Ventrikels erhöhte sich bei diesen Tieren um 23 – 30 % [5]. Auch bei anderen Untersuchungen nach 11-13 Wochen konnte eine deutliche Hypertrophie der Myozyten nachgewiesen werden [31].

4.1.5 Einfluss der chronischen Koronarstenose auf die Kapillardichte

Für die Kapillardichte wurde in der vorliegenden Arbeit ein Sham-Wert von im Mittel 4571 ± 525 pro mm^2 ermittelt. Auch dieser Wert liegt wieder in der Größenordnung der von der Arbeitsgruppe um Anversa et al. ermittelten Sham-Werte. Hier wurde elektronenmikroskopisch eine mittlere Kapillardichte von ca. 4100 pro mm^2 bestimmt [30].

An dem von uns untersuchten Tiermodell der Koronarstenose zeigten sich keine Veränderungen der Kapillardichte im Vergleich zu den Sham-Tieren. Untersuchungen zur Kapillardichte an diesem chronischen Stenosemodell fehlen bisher in der Literatur. Am isolierten Rattenherzen konnte nach einer 30 minütigen Ischämiezeit eine deutliche Abnahme der Kapillardichte nachgewiesen werden [32]. An diesem akuten Modell ist sicherlich eine Ödembildung verantwortlich für eine relative Abnahme der Kapillardichte. Hier änderte sich durch das Ödem nur die pro mm^2 gemessene Zahl der Kapillaren, die tatsächliche Kapillarzahl blieb wohl unverändert.

Andere Arbeitsgruppen ermittelten Sham-Werte für Myozytenfläche und Kapillardichte, die zum Teil erheblich von den von uns und Anversa gefundenen Werten abweichen. So bestimmte z.B. Xie et al. [33] bei seinen Sham-Tieren den Myozytendurchmesser mit im Durchschnitt $507 \mu\text{m}^2$ und die Kapillardichte mit 2096 pro mm^2 . Hier kam eine Doppelfärbung zum Einsatz, die venöse und arterielle Kapillaren getrennt anfärben sollte. Möglicherweise war diese Färbung nicht spezifisch genug, alle Kapillaren zu erfassen.

4.1.6 Kritik der Methode

Möglicherweise war der gewählte Zeitraum von 2 Wochen zu kurz, um lichtmikroskopisch signifikante Veränderungen festzustellen.

Der Beobachtungszeitraum bis 2 Wochen wurde jedoch in unseren Experimenten bewusst so gewählt, weil in früheren Arbeiten ein längerer Beobachtungszeitraum eine Progredienz der Stenose bis hin zum Infarkt zeigen konnte.

Zudem konnte in unserer Arbeitsgruppe durch den Einsatz der MR-Technologie (Angiographie) nachgewiesen werden, dass bereits bei 2 Wochen alter Koronarstenose ein Teil der Tiere einen totalen Gefäßverschluß und damit einen Infarkt hatte.

4.2 Untersuchung des Einflusses des ACE-Hemmers Quinapril

4.2.1 Einfluss auf die Nekrosefläche

In unseren Untersuchungen zeigte sich kein antifibrotischer Effekt des ACE-Hemmers Quinapril auf den Herzmuskel, da sich die Nekrose nach Koronarstenose nicht signifikant änderte.

Nach einem Myokardinfarkt konnten in Untersuchungen positive Effekte von ACE-Hemmern sowohl auf das kardiale Remodeling als auch die Fibrosierung des Nekroseareals nachgewiesen werden. Eine Behandlung mit ACE-Hemmern führte hier zu einer Abnahme der reaktiven Hypertrophie und einer Abschwächung der Ventrikeldilatation sowohl im Tierversuch als auch am humanen Myokard [9, 34]. Bei diesen Untersuchungen, in denen sich ein antifibrotischer Effekt nachweisen ließ, war der Beobachtungszeitraum mit 3 Monaten allerdings erheblich länger als bei unseren Experimenten.

4.2.2 Einfluss auf die Myozytengröße

Im Rahmen dieser Arbeit zeigte auch die histologische Untersuchung der einzelnen Muskelzellen keine Veränderungen durch den Einsatz von Quinapril. Es ließen sich keine antihypertrophen Effekte finden. Allerdings wiesen unsere Präparate, wie oben beschrieben, auch keine Hypertrophie auf.

Möglicherweise war auch hier der Beobachtungszeitraum mit 2 Wochen zu kurz, um Veränderungen wie Hypertrophie und damit eine eventuelle antihypertrophe Wirkung des ACE-Hemmers festzustellen.

4.2.3 Effekte auf das mikrovaskuläre Remodeling

Fabre et al. [12] zeigte in seinen Untersuchungen an ischämischer Skelettmuskulatur von Kaninchen eine angiogene Wirkung des ACE-Hemmers Quinapril.

Basierend auf der Arbeit von Fabre et al. [12] sollten im Rahmen unserer Untersuchungen die Effekte des ACE-Hemmers Quinapril auf das mikrovaskuläre Remodeling und die Angiogenese bei der chronischen Koronarstenose der Ratte untersucht werden.

Aus der Gruppe der ACE-Hemmer wurde für unsere Untersuchungen Quinapril ausgewählt, da Quinapril die beste Hemmung des Angiotensin Converting Enzyms im Gewebe erreicht [13].

Zwei Wochen nach Koronarstenosierung konnten in unseren Untersuchungen keine signifikanten Veränderungen der Kapillaranzahl durch den Einsatz von Quinapril nachgewiesen werden.

Die Längendichte der Kapillaren wurde mittels der Orientatormethode bestimmt und lag für die Sham-Tiere bei $4071,5 \pm 202,65 \text{ mm/mm}^3$.

Eine Behandlung der Tiere mit Quinapril hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Längendichte der Kapillaren.

Der ermittelte Sham-Wert liegt in der Größenordnung der Sham-Werte, die von Amann et al. bestimmt wurden [35]. Hier fand sich ein Sham-Wert von $4796 \pm 913 \text{ mm/mm}^3$ für die Längendichte der Kapillaren.

Diese Arbeitsgruppe untersuchte den Einfluss des ACE-Hemmers Ramipril auf die Längendichte der myokardialen Kapillaren an einem Rattenmodell mit Nierenversagen. Sowohl bei 3wöchiger als auch 8wöchiger Behandlung zeigten sich keine signifikanten Effekte des ACE-Hemmers auf die Längendichte. Allerdings ließ sich ein positiver Einfluss auf die bei Nierenversagen typischerweise auftretende Herzhypertrophie nachweisen [35]. In einer früheren Untersuchung dieser Arbeitsgruppe fand sich ein antihypertropher Effekt von Ramipril auf die Gefäßmuskulatur. Zudem zeigte sich hier ein protektiver Einfluss auf die myokardialen Kapillaren, deren Dichte in diesem Modell oftmals reduziert ist [36]. Darüber hinaus reduzierte der ACE-Hemmer auf unbekannte Weise das Körpergewicht der betroffenen Ratten [37].

An verschiedenen anderen Tiermodellen wurden bisher Untersuchungen zu Einflüssen von ACE-Hemmern auf die Angiogenese bzw. das mikrovaskuläre Remodeling unternommen.

Kalkman et al. [38] untersuchte die Effekte des ACE-Hemmers Captopril auf das Kapillarwachstum an infarzierten Rattenherzen. Nach dreiwöchiger Behandlung fanden sich eine erhöhte maximale Perfusion des Myokards, während die maximale Gefäßkapazität unverändert blieb. Die verbesserte Perfusion führte er auf relative Durchblutungsverbesserung durch Prävention einer Hypertrophie zurück.

Die Arbeitsgruppe um Olivetti et al. [39] befasste sich mit den Effekten des ACE-Hemmers Spirapril auf die Herzen spontaner hypertensiver Ratten. Es konnte eine Zunahme der Kapillardichte um 28 % nach dreimonatiger Behandlung festgestellt werden. Zusätzlich wurde eine Abnahme der Muskelmasse um 21 % gefunden, so dass die 28%-ige Zunahme der Kapillardichte nur eine relative und keine absolute

Kapillardichteveränderung darstellt. Eine Angiogenese hat demnach nicht stattgefunden.

Auch in den Untersuchungen von Clozel et al. [40] fand sich am Herzen spontaner hypertensiver Ratten eine Kapillardichtesteigerung durch den ACE-Hemmer Cilazapril. Gohlke et al. [41] konnte an spontanen hypertensiven Ratten eine Kapillardichtesteigerung und Hypertrophieprävention durch einen ACE-Hemmer, Zabicipril, nachweisen. Hier zeigten sich Effekte von ACE-Hemmern auf das vaskuläre Remodeling bereits in Dosen, die noch keinen antihypertensiven Effekt hatten [42].

4.2.4 Anmerkung zur Bewertung der Angiogenese

Allgemein ist es wichtig, bei der Bewertung der Ergebnisse zur Angiogenese neben der Kapillardichteveränderung auch Veränderungen der Muskulatur zu beachten. Verändert sich die Myozytenmasse, sinkt die Kapillardichte möglicherweise nur relativ und es hat tatsächlich gar keine Angiogenese stattgefunden. Bei der Beurteilung muss daher die Muskelmasse mit bestimmt werden, um eine absolute Kapillardichteveränderung und damit Angiogenese nachzuweisen.

So finden sich z.B. in der Arbeit von Fabre et al. [12] keinerlei Aussagen über die Histologie der Muskulatur, so dass eine reine relative Kapillardichteveränderung durch Prevention von Hypertrophie der Muskulatur nicht ausgeschlossen werden kann.

Autor	Angiogenese (+)/ Angiogenese- hemmung (-) durch ACE-Hemmer	Experimentelles Modell	Untersuchung der einzelnen Myozyten
Unger et al. [43]	+	Spontane Hypertensive Ratten	k.A.
Fabre et al. [12]	+	Ischämische Skelettmuskulatur an Kaninchen	k.A.
Olivetti et al. [39]	+	Spontane Hypertensive Ratten	21 % Abnahme der Myozytenmasse vs. 28 % Zunahme der Kapillardichte
Gohlke et al. [42]	+	Spontane Hypertensive Ratten	k.A.
Wang et al. [44]	-	Hypertensive und normotensive Ratten	k.A.
Cameron et al. [45]	+	Muskulatur und Nerven von Streptozotocin-Diabetes-Ratten	k.A.

Tabelle 1: Arbeiten zum Thema Angiogenese durch ACE-Hemmer

4.2.5 Kritik der Methode

Möglicherweise war auch für diese Untersuchung der gewählte Zeitraum von 2 Wochen zu kurz, um lichtmikroskopisch signifikante Veränderungen festzustellen. Allerdings hätte, wie bereits beschrieben, ein längerer Beobachtungszeitraum zu einer Progredienz der Stenose bis hin zum Infarkt führen können.

Zudem ist zu berücksichtigen, dass auch die Effekte und Potenzen der einzelnen ACE-Hemmer untereinander variieren. So scheint z.B. eine Sulfhydryl-Gruppe am ACE-Hemmer entscheidenden Einfluss auf dessen Wirkung zu haben. Van Gilst et al. verglich die Effekte von ACE-Hemmern mit und ohne Sulfhydryl-Gruppe auf den Koronarfluß am isolierten Rattenherzen. Hier setzten die flusssteigernden Effekte von ACE-Hemmern ohne Sulfhydrylgruppe wesentlich später ein als bei Medikamenten mit dieser Gruppe [46].

Außerdem stellt sich die Frage, ob sich die Effekte von ACE-Hemmern im Tiermodell auch wirklich auf den Menschen übertragen lassen. Pepine et al. berichtete bereits in seinem Review, dass ACE-Hemmer zwar an Ratten einen antiproliferativen Effekt bei Gefäßverletzungen besitzen, dieser jedoch bei höheren Spezies oder dem Menschen nicht gefunden werden konnte [47].

5. Zusammenfassung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, das in unserem Labor etablierte Modell der chronischen Koronarstenose der Ratte morphologisch zu charakterisieren. Besonderes Augenmerk galt hierbei dem mikrovaskulären Remodeling zwei Wochen nach myokardialer Ischämie.

Darüber hinaus sollten Effekte des ACE-Hemmers Quinapril auf das mikrovaskuläre Remodeling unter chronischer Ischämie untersucht werden.

Zur Kapillardichtebestimmung wurde eine neue immunhistochemische Färbung, die Lectinfärbung, in unserem Labor etabliert. Sie erlaubt eine selektive Anfärbung des Kapillarendothels und damit eine exakte Kapillardichtebestimmung im Querschnitt. Zusätzlich kam die Orientatormethode zum Einsatz, mit deren Hilfe Aussagen über dreidimensionale Strukturen aus der zweidimensionalen Ebene möglich sind. So lassen sich Längenveränderungen der myokardialen Kapillaren als weiterer Hinweis eines angiogenen Geschehens untersuchen.

In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten Hypertrophiereaktionen und relative Kapillardichteänderungen am chronischen Infarktmodell nachgewiesen werden. Die vorliegende Arbeit zeigte jedoch, dass eine chronische Koronarstenosierung bis 2 Wochen nach Operation trotz eines deutlichen Zelluntergangs zu keinem signifikantem mikrovaskulären und myozytären Remodeling führt.

Die in anderen Arbeiten gefundenen angiogenen Effekte von Quinapril auf die ischämische Skelettmuskulatur konnten für den Herzmuskel der Ratte 2 Wochen nach Operation nicht gefunden werden. Möglicherweise sind unsere Ergebnisse auf die korrekte Bestimmung der Hypertrophie-unabhängigen, absoluten Kapillardichtebestimmung zurückzuführen, die in Arbeiten anderer Gruppen nicht berücksichtigt wurden.

Literatur

1. Hausmann, D., A. Mügge, W. Daniel, *Thiemes Innere Medizin*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1999: p. 1096.
2. Canty, J., *Coronary pressure-function and steady-state pressure-flow relations during autoregulation in the unanesthetized dog*. *Circ Res*, 1988. **63**(4): p. 821-836.
3. Fallavollita, J., J. Bryan, and J. Canty, *18F-2-Deoxyglucose Deposition and Regional Flow in Pigs With Chronically Dysfunctional Myocardium*. *Circulation*, 1997. **95**(7): p. 1900-1909.
4. Guski, H., D. Kunde, and I. Fuhrmann, [*Tying with thread of the rat coronary arteries, a method for the production of experimental coronary stenosis*]. *Acta Biol Med Ger*, 1975. **34**(4): p. 573-7.
5. Anversa, P., X. Zhang, P. Li, and J.M. Capasso, *Chronic coronary artery constriction leads to moderate myocyte loss and left ventricular dysfunction and failure in rats*. *J Clin Invest*, 1992. **89**(2): p. 618-29.
6. Capasso, J.M., P. Li, and P. Anversa, *Nonischemic myocardial damage induced by nonocclusive constriction of coronary artery in rats*. *Am J Physiol*, 1991. **260**(3 Pt 2): p. H651-61.
7. Capasso, J.M., A. Malhotra, P. Li, X. Zhang, J. Scheuer, and P. Anversa, *Chronic nonocclusive coronary artery constriction impairs ventricular function, myocardial structure, and cardiac contractile protein enzyme activity in rats*. *Circ Res*, 1992. **70**(1): p. 148-62.
8. Pfeffer, M.A., J.M. Pfeffer, C. Steinberg, and P. Finn, *Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril*. *Circulation*, 1985. **72**(2): p. 406-12.
9. Pfeffer, J.M., M.A. Pfeffer, and E. Braunwald, *Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat*. *Circ Res*, 1985. **57**(1): p. 84-95.
10. Pfeffer, M.A., E. Braunwald, L.A. Moyer, L. Basta, E.J. Brown, Jr., T.E. Cuddy, B.R. Davis, E.M. Geltman, S. Goldman, G.C. Flaker, and et al., *Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction. Results of the survival and ventricular enlargement trial. The SAVE Investigators*. *N Engl J Med*, 1992. **327**(10): p. 669-77.

11. Volpert, O.V., W.F. Ward, M.W. Lingen, L. Chesler, D.B. Solt, M.D. Johnson, A. Molteni, P.J. Polverini, and N.P. Bouck, *Captopril inhibits angiogenesis and slows the growth of experimental tumors in rats*. J Clin Invest, 1996. **98**(3): p. 671-9.
12. Fabre, J.E., A. Rivard, M. Magner, M. Silver, and J.M. Isner, *Tissue inhibition of angiotensin-converting enzyme activity stimulates angiogenesis in vivo*. Circulation, 1999. **99**(23): p. 3043-9.
13. Fabris, B., B.Z. Chen, V. Pupic, R. Perich, and C.I. Johnston, *Inhibition of angiotensin-converting enzyme (ACE) in plasma and tissue*. J Cardiovasc Pharmacol, 1990. **15**(Suppl 2): p. S6-13.
14. Kuizinga, M., J. Cleutjens, J. Smits, and D. M., *Griffonia simplicifolia I (GSI): A suitable rat cardiac microvascular marker on paraffin embedded tissue*. J Mol Cell Cardiol, 1992. **24**(Supplement V).
15. Mattfeldt, T., G. Mall, H. Gharehbaghi, and P. Moller, *Estimation of surface area and length with the orientator*. J Microsc, 1990. **159**(Pt 3): p. 301-17.
16. Capasso, J.M., M.W. Jeanty, T. Palackal, G. Olivetti, and P. Anversa, *Ventricular remodeling induced by acute nonocclusive constriction of coronary artery in rats*. Am J Physiol, 1989. **257**(6 Pt 2): p. H1983-93.
17. Osswald, U., H. Braselmann, D. Kunde, and H. Guski, *[Coronary flow measurements on the isolated rat heart following experimental coronary artery stenosis]*. Acta Biol Med Ger, 1975. **34**(4): p. 579-82.
18. Anversa, P., A. Malhotra, X. Zhang, P. Li, J. Scheuer, and J.M. Capasso, *Long-term coronary stenosis in rats: cardiac performance, myocardial morphology, and contractile protein enzyme activity*. Am J Physiol, 1992. **263**(1 Pt 2): p. H117-24.
19. Kirkeby, S. and D. Moe, *Binding of Griffonia simplicifolia I isolectin B4 (GSI B4) to alpha-galactose antigens*. Immunol Cell Biol, 2001. **79**(2): p. 121-7.
20. Weibel, E., *Stereological Methods: Practical Methods for Biological Morphometry*. Academic Press, London 1979.
21. Gundersen, H.J., T.F. Bendtsen, L. Korbo, N. Marcussen, A. Moller, K. Nielsen, J.R. Nyengaard, B. Pakkenberg, F.B. Sorensen, A. Vesterby, and et al., *Some new, simple and efficient stereological methods and their use in pathological research and diagnosis*. Apmis, 1988. **96**(5): p. 379-94.

22. Pfaff, D., *Histopathologische und immunhistochemische Charakterisierung von Narbenbildung & Kapillarisation an chronisch ischämischen Rattenherzen*. Würzburg 2003.
23. Roberts, W.C. and A.A. Jones, *Quantitation of coronary arterial narrowing at necropsy in sudden coronary death: analysis of 31 patients and comparison with 25 control subjects*. Am J Cardiol, 1979. **44**(1): p. 39-45.
24. Warnes, C.A. and W.C. Roberts, *Sudden coronary death: relation of amount and distribution of coronary narrowing at necropsy to previous symptoms of myocardial ischemia, left ventricular scarring and heart weight*. Am J Cardiol, 1984. **54**(1): p. 65-73.
25. Schaper, W., *Experimental infarcts and the microcirculation; in "Therapeutic approaches to myocardial infarct size limitation" (Hearse D.J., Yellon D.M., eds.)*. Raven Press, New York 1984: p. 79-90.
26. Schuster, E.H. and B.H. Bulkley, *Ischemic cardiomyopathy: a clinicopathologic study of fourteen patients*. Am Heart J, 1980. **100**(4): p. 506-12.
27. Pfeffer, M.A., J.M. Pfeffer, M.C. Fishbein, P.J. Fletcher, J. Spadaro, R.A. Kloner, and E. Braunwald, *Myocardial infarct size and ventricular function in rats*. Circ Res, 1979. **44**(4): p. 503-12.
28. Weisman, H.F., D.E. Bush, J.A. Mannisi, M.L. Weisfeldt, and B. Healy, *Cellular mechanisms of myocardial infarct expansion*. Circulation, 1988. **78**(1): p. 186-201.
29. Klocke, F.J., *Measurements of coronary blood flow and degree of stenosis: current clinical implications and continuing uncertainties*. J Am Coll Cardiol, 1983. **1**(1): p. 31-41.
30. Anversa, P., C. Beghi, Y. Kikkawa, and G. Olivetti, *Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth*. Circ Res, 1986. **58**(1): p. 26-37.
31. Li, P., X. Zhang, J.M. Capasso, L.G. Meggs, E.H. Sonnenblick, and P. Anversa, *Myocyte loss and left ventricular failure characterise the long term effects of coronary artery narrowing or renal hypertension in rats*. Cardiovasc Res, 1993. **27**(6): p. 1066-75.
32. McDonagh, P.F., D.M. Cohen, J. Suaudeau, and H. Laks, *The effects of myocardial ischemia followed by reperfusion on perfused coronary capillarity. Microcirc Endothelium Lymphatics*, 1985. **2**(1): p. 67-84.

33. Xie, Z., M. Gao, S. Batra, and T. Koyama, *The capillarity of left ventricular tissue of rats subjected to coronary artery occlusion*. *Cardiovasc Res*, 1997. **33**(3): p. 671-6.
34. Sharpe, N., H. Smith, J. Murphy, S. Greaves, H. Hart, and G. Gamble, *Early prevention of left ventricular dysfunction after myocardial infarction with angiotensin-converting-enzyme inhibition*. *Lancet*, 1991. **337**(8746): p. 872-6.
35. Amann, K., P. Gassmann, M. Buzello, S.R. Orth, J. Tornig, M.L. Gross, A. Magener, G. Mall, and E. Ritz, *Effects of ACE inhibition and bradykinin antagonism on cardiovascular changes in uremic rats*. *Kidney Int*, 2000. **58**(1): p. 153-61.
36. Amann, K., C. Nichols, J. Tornig, U. Schwarz, M. Zeier, G. Mall, and E. Ritz, *Effect of ramipril, nifedipine, and moxonidine on glomerular morphology and podocyte structure in experimental renal failure*. *Nephrol Dial Transplant*, 1996. **11**(6): p. 1003-11.
37. Tornig, J., K. Amann, E. Ritz, C. Nichols, M. Zeier, and G. Mall, *Arteriolar wall thickening, capillary rarefaction and interstitial fibrosis in the heart of rats with renal failure: the effects of ramipril, nifedipine and moxonidine*. *J Am Soc Nephrol*, 1996. **7**(5): p. 667-75.
38. Kalkman, E.A., P. van Haren, P.R. Saxena, and R.G. Schoemaker, *Early captopril prevents myocardial infarction-induced hypertrophy but not angiogenesis*. *Eur J Pharmacol*, 1999. **369**(3): p. 339-48.
39. Olivetti, G., E. Cigola, C. Lagrasta, R. Ricci, F. Quaini, A. Monopoli, and E. Ongini, *Spirapril prevents left ventricular hypertrophy, decreases myocardial damage and promotes angiogenesis in spontaneously hypertensive rats*. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1993. **21**(3): p. 362-70.
40. Clozel, J.P., H. Kuhn, and F. Hefti, *Effects of chronic ACE inhibition on cardiac hypertrophy and coronary vascular reserve in spontaneously hypertensive rats with developed hypertension*. *J Hypertens*, 1989. **7**(4): p. 267-75.
41. Gohlke, P., M. Stoll, V. Lamberty, T. Mattfeld, G. Mall, P. van Even, P. Martorana, and T. Unger, *Cardiac and vascular effects of chronic angiotensin converting enzyme inhibition at subantihypertensive doses*. *J Hypertens Suppl*, 1992. **10**(6): p. S141-4.
42. Gohlke, P., I. Kuwer, S. Bartenbach, A. Schnell, and T. Unger, *Effect of low-dose treatment with perindopril on cardiac function in stroke-prone*

- spontaneously hypertensive rats: role of bradykinin.* J Cardiovasc Pharmacol, 1994. **24**(3): p. 462-9.
43. Unger, T., T. Mattfeldt, V. Lamberty, P. Bock, G. Mall, W. Linz, B.A. Scholkens, and P. Gohlke, *Effect of early onset angiotensin converting enzyme inhibition on myocardial capillaries.* Hypertension, 1992. **20**(4): p. 478-82.
 44. Wang, D.H. and R.L. Prewitt, *Captopril reduces aortic and microvascular growth in hypertensive and normotensive rats.* Hypertension, 1990. **15**(1): p. 68-77.
 45. Cameron, N.E., M.A. Cotter, and S. Robertson, *Angiotensin converting enzyme inhibition prevents development of muscle and nerve dysfunction and stimulates angiogenesis in streptozotocin- diabetic rats.* Diabetologia, 1992. **35**(1): p. 12-8.
 46. van Gilst, W.H., E. Scholtens, P.A. de Graeff, C.D. de Langen, and H. Wesseling, *Differential influences of angiotensin converting-enzyme inhibitors on the coronary circulation.* Circulation, 1988. **77**(6 Pt 2): p. I24-9.
 47. Pepine, C.J., *Angiotensin converting enzyme inhibition and coronary artery disease.* J Hypertens Suppl, 1994. **12**(4): p. S65-71.

Danksagung

Bedanken möchte ich mich ganz besonders bei meiner Betreuerin, Frau Dr. Christiane Waller, für die engagierte Betreuung, die mich durch diese Arbeit begleitete.

Bei Frau Yvonne Vogt und Frau Sabine Voll möchte ich mich für die logistische Betreuung meiner Arbeit, die Versorgung der Tiere und die Herzentnahme bedanken.

Frau Schmidt danke ich für die histologischen Färbungen meiner Präparate.

Herrn Dr. Kai Hu und Frau Charlotte Dienesch gilt mein Dank für die Präparation der Tiere.

Ein weiterer Dank geht an Herrn Dr. Karl-Heinz Hiller für die kernspintomographische Messung der Tiere.

Besonders danken möchte ich auch der Arbeitsgruppe um Frau Prof. Amann am pathologischem Institut der Universität Erlangen für die Einarbeitung in die Orientatormethode und die Herstellung der Präparate für diese Methode.

Außerdem geht ein Dank an Herrn PD Dr. Dr. med. Wolfgang Bauer für die Mitbetreuung der Arbeit.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name: Philipp Ruile
Wohnort: Prinzenstr. 55
80639 München
Tel.:089/17997255
Mobil: 0177/2924091

Geburtstag und –ort: 16.05.1977, Regensburg
Familienstand: ledig, keine Kinder
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

09/1983-07/1987 Grundschule Grandlstrasse, München
09/1987-06/1996 Karlsgymnasium München
28.06.1996 Abitur

Werdegang

07/1996-11/1997 Studentische Hilfskraft, Labor PD. Dr. Heiss,
Klinische Forschung Chirurgie, Universitätsklinikum
Großhadern, LMU München
03/1997-04/1997 Pflegepraktikum an der Universitätsklinik Regensburg
07/1997-08/1997 Summer Session an der University of California, Berkeley,
USA

Studium

11/1997-03/2003 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
04/2003-05/2004 Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-
Universität München

Studienbegleitende Tätigkeiten

1998-1999 Temporärer Mitarbeiter bei der Unternehmensberatung
Bain & Company

seit 2000 Freier Mitarbeiter bei medical text; Agentur für
Marketing, Text, IT, Public Relations

Fremdsprachen

Englisch fließend in Wort und Schrift

Latein Großes Latinum

Altgriechisch Graecum

Sonstige Kenntnisse

EDV Microsoft Word, Excel, Powerpoint



München, 20.06.04