

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

Glucoseaufnahme am infarzierten Rattenherzen

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Jens Höning
aus Mitterfels
Würzburg, Oktober 2003

Referent: Prof. Dr. med. S. Neubauer

Korreferent: Prof. Dr. med. L. Hein

Dekan: Prof. Dr. med. S. Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2004

Der Promovend ist Arzt im Praktikum

gewidmet
meiner Familie

Inhalt

1. Einleitung	1
1.1 Der Myokardinfarkt	1
1.2 Mechanische Folgen des Myokardinfarkts	2
1.3 Remodeling nach Myokardinfarkt	3
1.4 Folgen des Myokardinfarkts auf den Energiestoffwechsel	6
2. Fragestellung	9
3. Grundlagen	10
3.1 Physikalische Grundlagen	10
3.2 Anwendung der NMR Techniken am Herzen	14
3.3 Der Glucosestoffwechsel	15
3.3.1 Aerobe und anaerobe Oxidation der Glucose	15
3.3.2 ATP-Bildung	17
3.3.3 Glycolyse	18
3.3.4 Glucose-Transporter	20
4. Methodik	21
4.1 Tiermodell	21
4.1.1 Tiere und Tierhaltung	21
4.1.2 Chronischer Myokardinfarkt	21
4.1.3 Das isolierte, perfundierte Herz	22
4.1.4 Messung der mechanischen Herzfunktion	22
4.1.5 Einschlusskriterien für isolierte Herzen	23
4.1.6 Perfusionslösungen	23
4.1.7 Infarktgrößenbestimmung mit histologischen Methoden	24
4.2 Magnetresonanz-Verfahren	25
4.3 Experimentelles Protokoll	26
4.3.1 Versuch zur Bestimmung der Glucoseaufnahme ohne Insulinstimulation	26
4.3.2 Versuch zur Bestimmung der Glucoseaufnahme mit Insulinstimulation	27
4.4 Datenanalyse	28
5. Ergebnisse	29
5.1 Mechanische Funktion	29
5.2 Energiemetabolismus	34
5.3 Aufnahme von Deoxyglucose	35
6. Diskussion	36
6.1 Definition des Modells	36
6.2 Infarktgröße, Herzgewicht, Körpergewicht	37
6.3 Koronarfluss	38
6.4 Veränderungen der mechanischen Funktion nach chronischem Myokardinfarkt	38
6.5 Veränderungen des Energiemetabolismus nach chronischem Myokardinfarkt	39

6.6 Veränderungen der Glucoseaufnahme nach chronischem Myokardinfarkt	41
6.7 Limitationen des Modells	43
7. Zusammenfassung	45
8. Literaturverzeichnis	47

Abkürzungen und Formeln

ADO	Adenosin
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
B_0	Äußeres Magnetfeld
B_{eff}	Effektives Magnetfeld
B_{lokal}	Lokales Magnetfeld
BW	Körpergewicht
°C	Grad Celsius
CK	Creatinkinase
CO ₂	Kohlendioxid
CoA	Coenzym A
d	Wanddicke
dpi	dots per inch
e	Exponentialfunktion
EDP	Enddiastolischer Druck
FABP	Fettsäure bindendes Protein
FID	Freier Induktionszerfall
GLUT	Glucosetransporter
H ⁺	Wasserstoff-Proton
HF	Hochfrequenzimpuls
Hf	Herzfrequenz
HPLC	Hochdruckflüssigkeits- Chromatographie
HW	Herzgewicht
HYPO	Hypoxanthin
I	Kernspin-Quantenzahl
INO	Inosin

K	Kraftentwicklung
KG	Körpergewicht
LVDA	Linksventrikuläre Druckamplitude
m	Magnetische Quantenzahl
MHz	Megahertz
mM	Millimol
MRI	Magnetic resonance imaging
MRS	Magnetic resonance spectroscopy
mU	Milli Units
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADPH	Reduziertes Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat
NMR	Nuclear magnetic resonance
p	Ventrikeldruck
PCr	Phosphocreatin
P _i	Anorganisches Phosphat
ppm	parts per million
QH ₂	Reduziertes Coenzym Q
r	Radius
RIVA	Ramus interventricularis anterior
RPP	Doppelprodukt aus Herzfrequenz und linksventrikulärer Druckamplitude
s	Sekunden
SEM	Mittelwertsfehler
SGOT	Serum-Glutamat-Oxalazetat-Transaminase
WHO	Weltgesundheitsorganisation
ω	Larmorfrequenz
γ	Gyromagnetische Konstante

1. Einleitung

1.1 Der Myokardinfarkt

Der akute Myokardinfarkt ist die häufigste Form der koronaren Herzerkrankung und die häufigste Todesursache in den Industrieländern. Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind 30 Prozent (rund 17 Millionen) der geschätzten 55,7 Millionen Todesfälle pro Jahr auf einen akuten Herzinfarkt zurückzuführen (WHO, 2001). In Deutschland zeigen epidemiologische Untersuchungen eine Inzidenz für den akuten Myokardinfarkt von 330/100000 Personen/Jahr (Herold G, 2000).

Unter einem Herzinfarkt versteht man eine umschriebene Nekrose der Herzmuskelfasern und des Interstitiums infolge einer länger dauernden Ischämie (Thomas C et al., 1994). Klinische Ursache ist eine Stenose der Herzkranzarterien verschiedener Pathogenese. Die Infarktgröße wird ganz wesentlich von der Grunderkrankung, und der damit verbundenen Kollateralisierung, dem Ort der Stenose, sowie der Dauer der Ischämie bestimmt (Bolognese L et al., 1999). In unserer Arbeit wurde der experimentelle Myokardinfarkt an männlichen Wistar-Ratten durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior (RIVA) induziert. Am Modell des Rattenherzens können linksventrikuläre Veränderungen beobachtet werden, die der Situation am Menschen vergleichbar sind. Die vier Phasen der kardialen Wundheilung (Cleutjens JPM et al., 1999) sind bei Tier und Mensch identisch, jedoch findet der Prozess im Tiermodell beschleunigt statt, so dass die vollständige Narbenbildung an der Ratte nach ca. sechs Wochen, der Situation des Menschen nach zwei bis drei Jahren entspricht. So stellten Fishbein und Mitarbeiter bei mikroskopischen Untersuchungen fest, dass das nekrotische Myokard innerhalb von 21 Tagen nach Infarkt komplett durch Bindegewebe ersetzt ist (Fishbein MC et al., 1978).

Damit lässt das Modell des isolierten Rattenherzens Rückschlüsse auf die Situation am Menschen zu.

1.2 Mechanische Folgen des Myokardinfarkts

Nach dem akuten Verschluss einer Koronararterie unterliegen sowohl das ischämische wie auch das nicht-ischämische Myokard Veränderungen. Das ischämische Myokard verliert schnell seine Funktion und die systolische Kontraktion wandelt sich zur systolischen Erweiterung. Wenn der Koronarverschluss weiterbesteht, entwickelt sich eine myokardiale Nekrose und schreitet wie eine Welle von subendocardialen zu epicardialen Schichten fort, so dass sich letztendlich ein transmuraler Infarkt ausbildet (*Ertl G, Gaudron P und Hu K, 1993*).

Nach dem Infarktereignis drohen, je nach Lokalisation, Ausdehnung und Vernarbung, außer den unterschiedlichen Arrhythmien eine Reihe herzmechanischer Folgen (*Silbernagl S, 1998*). Neben einem Abriss der Sehnenfäden mit der Folge einer akuten Mitralinsuffizienz oder einer Kammerseptum-Perforation mit Links-rechts-Shunt, kommt dem Absinken des Herzzeitvolumens eine besondere Bedeutung zu, was zusammen mit einer narbigen Versteifung (Akinese) der Kammerwand zu einem hohen enddiastolischen Druck führt. Noch ungünstiger als eine steife Infarktnarbe ist eine dehnbare Infarktstelle, da sich diese während der Systole nach außen wölbt (Dyskinese) und daher - bei vergleichbarer Narbenfläche - das Herzzeitvolumen stärker in bedrohliche Bereiche absinken lässt (kardiogener Schock); schließlich kann die Kammer an der Infarktstelle nach außen einreißen, so dass es zur akut lebensbedrohlichen Perikardtamponade kommt. Außerdem kann es durch den erhöhten linksventrikulären enddiastolischen Druck zum funktionellen und morphologischen Remodeling des Pulmonalkreislaufs kommen. Dies steigert dann die Arbeitsbelastung des rechten Ventrikels, was in einer globalen Herzinsuffizienz enden kann (*Zimmer H-G et al., 1990*).

1.3 Remodeling nach Myokardinfarkt

Veränderungen des ischämischen Myokards nach Koronararterienverschluss, einschließlich der aktiven und passiven Funktionen, aber auch adaptive Veränderungen des nicht-ischämischen, überlebenden Myokards werden unter dem Begriff „linksventrikuläres Remodeling“ zusammengefasst (*Ertl G, Gaudron P und Hu K, 1993*). Hierbei findet sich eine Veränderung der Geometrie des Herzens mit Bildung eines asymmetrischen linken Ventrikels, eine Zunahme der linksventrikulären Wanddicke (Hypertrophie), ein Anstieg der Wandspannung und eine Reduktion des Schlagvolumens. Da es sich bei den Kardiomyozyten um ausdifferenzierte Zellen handelt, kommt als Kompensationsmechanismus nur die Hypertrophie zum Tragen, nicht aber die Hyperplasie. Um diese vergrößerten Zellen mit genügend Nährstoffen zu versorgen, findet auch ein Wachstum des kapillären Netzwerks statt. Außerdem nimmt der Gehalt an interstitiellem Kollagen zu, welches indirekt die Masse an überlebenden, intakten ventrikulären Gewebe reflektiert (*Laser A et al., 1996*).

All diese Vorgänge werden durch die kardiale Wundheilung erklärt, die in vier Phasen aufgeteilt werden kann (*Cleutjens JPM et al., 1999*):

1. Tod der Kardiomyozyten (mit den Veränderungen von CK-MB, SGOT, FABP, etc.). Dies kann auf zwei Wegen stattfinden, der Zellnekrose mit Zellschwellung oder der Apoptose mit Zellschrumpfung, dessen Maximum bei Mensch und Ratte zeitgleich sechs Stunden nach Infarkt gefunden wird.
2. Akute Entzündung, die durch die Nekrose hervor gerufen wird, mit der Aktivierung des Komplementsystems, der Ausschüttung verschiedener Zytokine und der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten, gefolgt von anderen Entzündungszellen, wie Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen.
3. Zwei bis drei Tage nach Infarkt sind neue extrazelluläre Matrixproteine abgelagert. Diese finden sich zuerst in der Grenzzone zwischen infarzierten und nicht-infarzierten Gewebe, und später im Zentralgebiet des Infarkts. Die Bildung des Granulationsgewebes, welches die

Zugfestigkeit stärkt und eine Ruptur verhindert, zeichnet die dritte Phase der Wundheilung am Herzen aus. Die Kollagensynthese wird aktiviert, und neue Blutgefäße erscheinen. Diese Neovaskularisierung hat ihren Ausgang in präexistenten Blutgefäßen oder stammt von Endothelzellen ab, die aus der Randzone in die Wunde wandern.

4. Ein zwei bis drei Wochen altes Granulationsgewebe im infarzierten Herz ist als zellreich charakterisiert, welches interstitielles Kollagen, Makrophagen, Blutgefäße und (Myo-) Fibroblasten enthält. Nachfolgend beginnen die Zellen - ausgenommen die Mehrheit der (Myo-) Fibroblasten - aus der Wunde zu verschwinden. Dies ist das Hauptmerkmal der Phase vier, der Periode der Narbenformation. In dieser Zeit verschwinden die Zellen nicht einfach aus der Wunde, sondern unterliegen am wahrscheinlichsten der Apoptose; das Kollagen wird fast vollständig verbunden. Die so formierte Wunde hat eine permanente Natur, da die Kardiomyozyten, wie oben erwähnt, ausdifferenzierte Zellen sind, die nicht nachgebildet werden. Dieser Prozess läuft wie schon unter 1.1 erwähnt bei Ratte und Mensch identisch ab, bei der Ratte jedoch schneller, so dass die vollständige Narbenbildung an der Ratte nach ca. sechs Wochen, der Situation des Menschen nach zwei bis drei Jahren entspricht.

Das Remodeling wird durch hämodynamische, endokrine und auto- bzw. parakrine Einflüsse modifiziert. So stellt die Funktion eines Ventrikels nach Myokardinfarkt eine komplexe Interaktion verschiedener Faktoren dar, einschließlich dem Zustand der nicht verschlossenen Koronararterien, der zugrundeliegenden Verformbarkeit des lebensfähigen Myokards, der Intaktheit des Reizleitungssystems, Veränderungen der ventrikulären Compliance, den erwähnten neurohumoralen Einflüssen, die auf das Herz einwirken, dem Ausmaß der kompensatorischen Hypertrophie des nicht infarzierten Myokards, den Auswirkungen von Vor- und Nachlast, sowie der Infarktgröße selbst (*Pfeffer MA et al., 1979*).

Das in der Infarktnarbe entstandene Bindegewebe ist nicht kontraktionsfähig und behindert somit die diastolische Relaxation. Bei größeren Infarkten ergeben

sich zusätzlich v.a. durch die Ventrikeldilatation Probleme. Nach dem Gesetz von Laplace ($K = pr^2/d$; K = Kraftentwicklung, p = Ventrikeldruck, r = Radius, d = Wanddicke) bedingt ein vergrößerter Radius des Ventrikels, dass zur selben Kraftentwicklung eine höhere Wandspannung aufgebracht werden muss (Litwin SE et al., 1991). Mit zunehmender Dilatation wird das Myokard also systolisch stärker belastet, was einer Vergrößerung der Nachlast gleichkommt. Dies bewirkt eine Zunahme des enddiastolischen Volumens und somit eine Steigerung der Vorlast, was wiederum durch eine gesteigerte Dilatation kompensiert wird. Es kommt also zu einem Circulus vitiosus. Das Ausmaß der Dilatation gilt als Prädiktor der Mortalität der Herzinsuffizienz nach Myokardinfarkt (Pfeffer MA et al., 1987). Die Vorgänge sind in Abbildung 1.1 dargestellt.

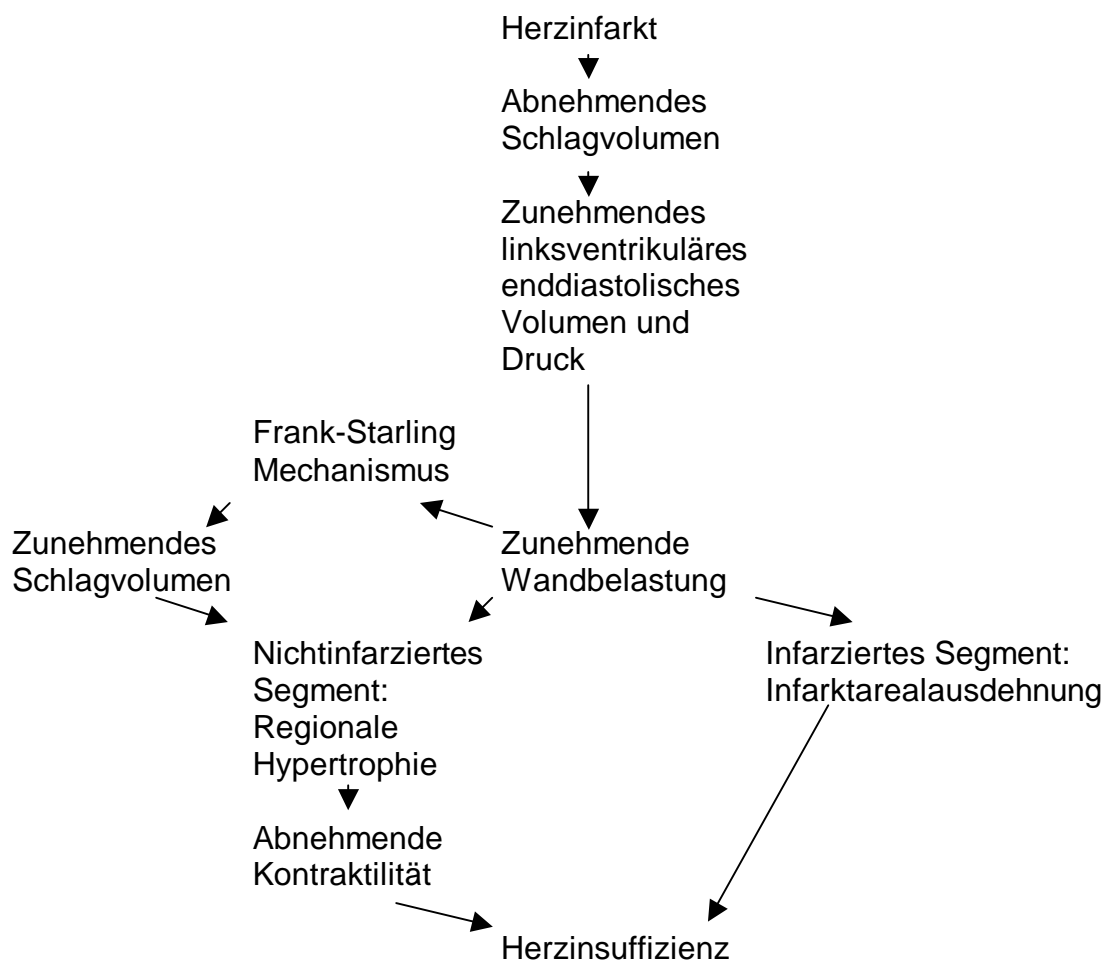


Abb. 1.1 Schematische Darstellung akuter und chronischer Veränderungen nach Myokardinfarkt

1.4 Folgen des Myokardinfarkts auf den Energiestoffwechsel

Das Myokard benötigt für Ionen-transport, elektrische Aktivität und mechanische Funktion Energie. Diese wird einerseits aus der Produktion energiereicher Phosphate über die oxidative Phosphorylierung und Glycolyse (aerob), andererseits über die Metabolisierung von Laktat (anaerob) bereitgestellt (*Taegtmeyer H et al., 1998*), (*Stanley WC et al., 1997*). ATP stellt in lebenden Zellen die wichtigste Speicherform chemischer Energie dar. Jede Herzmuskelaktivität ist mit einem Verbrauch von ATP verbunden, welches während des Kontraktionszyklus von der MyosinATPase gespalten wird. Reaktionsprodukte sind ADP und anorganisches Phosphat (P_i). ADP reagiert, je nach Stoffwechsellage, umkehrbar mit Phosphocreatin (PCr).

ATP-Hydrolyse: $ATP + H_2O \rightarrow ADP + P_i + H^+$

Creatinkinase: $PCr + ADP + H^+ \leftarrow \rightarrow Creatin + ATP$

Formel 1.1 ATP-Verbrauch und Resynthese (*Ingwall JS*)

Etwa 99% des Phosphocreatins wird unmittelbar resynthetisiert, so dass unter normalen Bedingungen die ATP-Konzentration nahezu konstant bleibt (*Krück F, 1994*). Der Stoffwechselprozess wird durch direkte und indirekte Kontrollmechanismen moduliert.

Im gesunden Myokard stellen Fettsäuren mit ca. 70% die Hauptquelle für die Energie im Stoffwechsel. Glucose wird zwar auch metabolisiert, besonders in der Postabsorptionsphase, doch ist diese Utilisation im Vergleich zu den Fettsäuren nur sekundär (*Myers DW et al., 1987*). Anders verhält es sich unter Ischämie. Die Fettsäureoxidation wird reduziert und Glucose wird bevorzugt umgesetzt. Allerdings kann diese nur noch anaerob metabolisiert werden, was den Nettogewinn an ATP mindert. Während im aeroben Stoffwechsel durch Glycolyse, Citrat-Zyklus und Atmungskette aus einem Molekül Glucose 32 ATP-Moleküle gewonnen werden, sind dies unter anaeroben Bedingungen nur zwei Moleküle ATP pro Glucosemolekül (*Koolman J et al., 1998*). Dabei entsteht

Milchsäure, die zu Protonen und Laktat dissoziiert. Unter anaeroben Bedingungen kann das Herz Laktat nicht verbrauchen, hingegen fällt dieses, wie beschrieben, sogar an. Zusätzlich sammeln sich die H^+ -Ionen wegen der sistierenden Durchblutung an. Beide Mechanismen führen zu einem pH-Abfall (Azidose) (Taegtmeyer H, 2000). Ein intrazellulärer pH-Abfall behindert den Kalzium-Influx durch eine Hemmung der langsamen Kalziumkanäle und führt so zu einer herabgesetzten Kontraktilität (Taegtmeyer H et al., 1998). Außerdem bleiben während der Ischämie die Hydrolyseprodukte von ATP ($ATP \rightarrow ADP \rightarrow AMP \rightarrow$ Adenosin (ADO) \rightarrow Inosin (INO) \rightarrow Hypoxanthin (HYPO) \rightarrow Xanthin) und aus PCr freigesetztes Creatin, sowie P_i im Herzen retiniert (Ingwall JS).

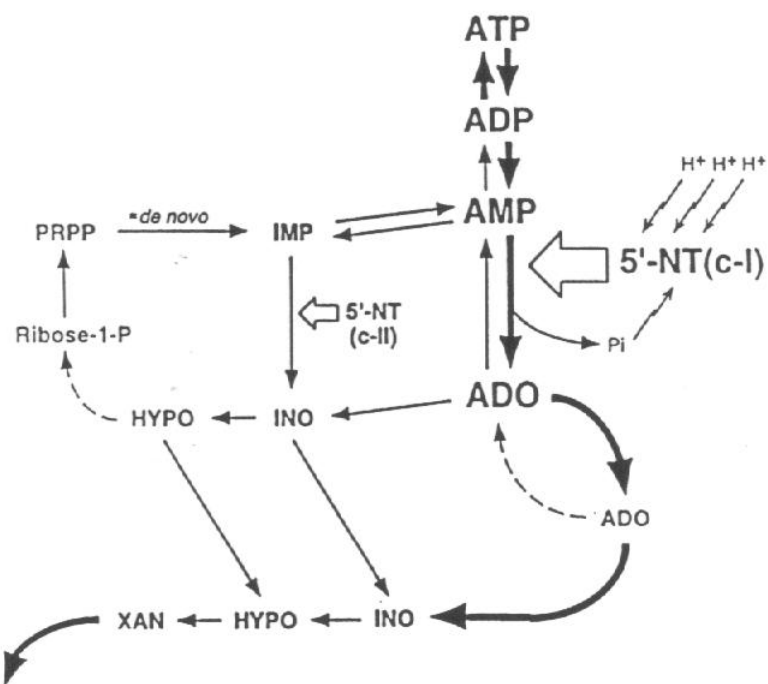


Abb. 1.2 Abbau von ATP (Ingwall JS)

Neubauer et al. (Neubauer S et al., 1995) zeigten, dass sich die Verhältnisse von PCr/ATP und P_i /ATP als sensitive Marker darstellen, die vom

Substratangebot und der mechanischen Funktion des Herzens abhängen. Wie gezeigt wurde, war der Gehalt an PCr und Creatin, sowie die Energiereserve des Creatinkinase-Systems im überlebenden Myokard verringert, der Gehalt an ATP wies jedoch keinen Unterschied zwischen infarzierten Herzen und Kontrollen auf.

2. Fragestellung

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob 1.) die Glucoseaufnahme in die Zelle acht Wochen nach Myokardinfarkt an der Ratte verändert ist. Falls dies der Fall sein sollte, ergeben sich weitere Fragen, die im Einzelnen wie folgt lauten:

- 2.) Lässt sich die Einschränkung der mechanischen Funktion auf eine reduzierte Glucoseaufnahme zurückführen?
- 3.) Korreliert die Glucoseaufnahme mit der Metabolisierung der energiereichen Phosphate?

3. Grundlagen

3.1 Physikalische Grundlagen der NMR

Das Phänomen der „nuclear magnetic resonance“ (NMR) wurde unabhängig voneinander von den Forschergruppen um Edward Purcell, Harvard Universität, (*Purcell EMT et al., 1946*) und Felix Bloch, Stanford Universität, (*Bloch F, 1946*) im Jahr 1946 beschrieben. Das Phänomen beruht auf der Tatsache, dass eine große Anzahl von Atomkernen einen sogenannten Kernspin besitzen. Dies sind Atomkerne mit einer ungeraden Protonen- oder ungeraden Neutronenzahl oder beidem. Der Kernspin kann als Rotation des magnetischen Moments des Kerns um dessen eigene Achse verstanden werden. Beim Einbringen von magnetisch aktiven Kernen in ein äußeres Magnetfeld B_0 findet eine Ausrichtung der Kernspins entlang der Achse des Magnetfelds (per Definition die z-Achse) statt, die diskreten Energiezuständen entspricht. Die Anzahl der möglichen Energiezustände ist hierbei von der Kernspin-Quantenzahl I abhängig. Die Anzahl der möglichen Energiezustände ergibt sich aus der Formel $m = 2I + 1$ (*Gadian DG, 1982*), wobei m die Anzahl der magnetischen Quantenzahl ist. Damit sind bei dem in dieser Arbeit benutzten Kern ^{31}P ($I = \frac{1}{2}$) zwei Energiezustände möglich, nämlich parallel oder antiparallel zum Magnetfeld B_0 (vgl. Abb. 3.1).

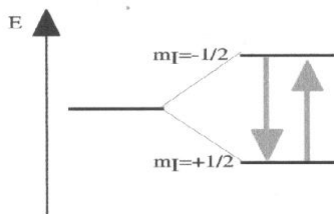


Abb. 3.1 Mögliche Energiezustände und Übergänge für den NMR-sensitiven Kern ^{31}P mit $I = \frac{1}{2}$

Allgemein kann gesagt werden, dass Kerne mit einer Spin-Quantenzahl $I = \frac{1}{2}$ einfachere Spincharakteristika haben, als solche deren $I > \frac{1}{2}$ ist (Gadian DG, 1982). Bei den meisten in vivo Untersuchungen werden deshalb Kerne mit einer Spin-Quantenzahl $I = \frac{1}{2}$ benutzt, wie zum Beispiel ^1H , ^{13}C , ^{19}F , ^{31}P (siehe Tab. 3.1). Durch die Energiedifferenz zwischen den Energiezuständen kommt es zu einer ungleichen Besetzung der Niveaus, wobei im thermischen Gleichgewicht Zustände mit geringerer Energie häufiger besetzt werden (Gadian DG, 1982). Zusätzlich zur Besetzung der unterschiedlichen Energieniveaus präzidiert das magnetische Moment um eine zu B_0 parallele Achse mit einer vom Kern und B_0 abhängigen Frequenz. Diese ist die sog. Larmorfrequenz ω .

$$\omega = \gamma * B_0$$

γ = gyromagnetische Konstante

Mathematisch exakt lässt sich NMR nur mit Hilfe der Quantenmechanik beschreiben (Gadian DG, 1982), das Vektorenmodell ist jedoch für die Vorstellung leichter zugänglich. Hier werden die Kernspins als Vektoren, also einer gerichteten Größe, dargestellt. Die Kerne präzidieren um die z-Achse und bilden einen Doppelkegel. Um die Erklärung weiter zu vereinfachen, wird nur der sog. Summenvektor, dieser entspricht der Summe aller Einzelvektoren, in einem rotierenden Koordinatensystem betrachtet. Die Ausrichtung des Summenvektors im äußeren Magnetfeld B_0 ist im Gleichgewichtszustand gleich der Richtung von B_0 .

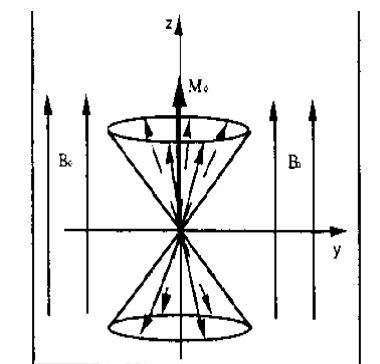


Abb. 3.2 Doppelpräzisionskegel

Bei Einstrahlung eines Hochfrequenzimpulses HF, der dieselbe Frequenz wie die Larmorfrequenz ω hat, kommt es zur Wechselwirkung und die Magnetisierung wird aus der B_0 -Richtung ausgelenkt. Aus der Zeitdauer des HF-Impulses ergibt sich die Auslenkung aus der B_0 -Richtung (Abb. 3.3).

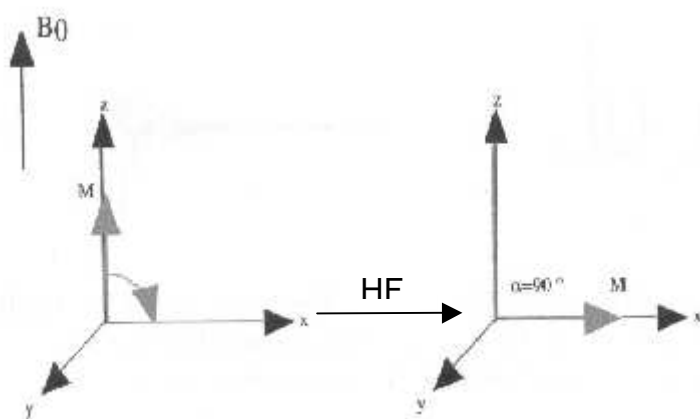


Abb. 3.3 Auslenkung der Nettomagnetisierung der Kernspins aus der B_0 -Richtung durch einen HF-Impuls in der xy -Ebene. Die Zeitdauer ist hier so gewählt, dass eine Auslenkung um 90° stattfindet. Durch den HF-Impuls wird die Nettomagnetisierung in die xy -Ebene gedreht und dort detektierbar.

Bei langer HF-Einstrahlung findet eine Gleichbesetzung der Energieniveaus statt und das Signal ist nicht mehr detektierbar. Eine Relaxation, die zur Rückkehr des Kernspins in die B_0 -Richtung führt, erfolgt, nachdem der HF-Impuls beendet worden ist. Diese Relaxation stellt die sog. longitudinale oder Spin-Gitter-Relaxation dar. Die Zeit bis zur Rückkehr der Magnetisierung auf $(1 - 1/e)$ der Ausgangsamplitude, d.h. etwa 63%, wird als T_1 -Zeit bezeichnet.

Neben der longitudinalen Relaxation kommt es durch die Dephasierung der einzelnen Kernspins in der xy -Ebene auch noch zur transversalen, auch Spin-Spin-Relaxation genannt. Dieses Phänomen führt zu einem Verlust an Nettomagnetisierung. Die Zeit bis zum Abbau der Nettomagnetisierung in der xy -Ebene auf $(1 - 1/e)$ wird als T_2 -Zeit bezeichnet.

Das in der xy -Ebene detektierte Signal stellt den FID (free induction decay = freier Induktionszerfall, Abb. 3.4) dar. Bei der Fouriertransformationstechnik

wird die Signalamplitude über die Zeit aufgenommen und nach der Messung mathematisch in die Frequenzdomäne umgeformt.

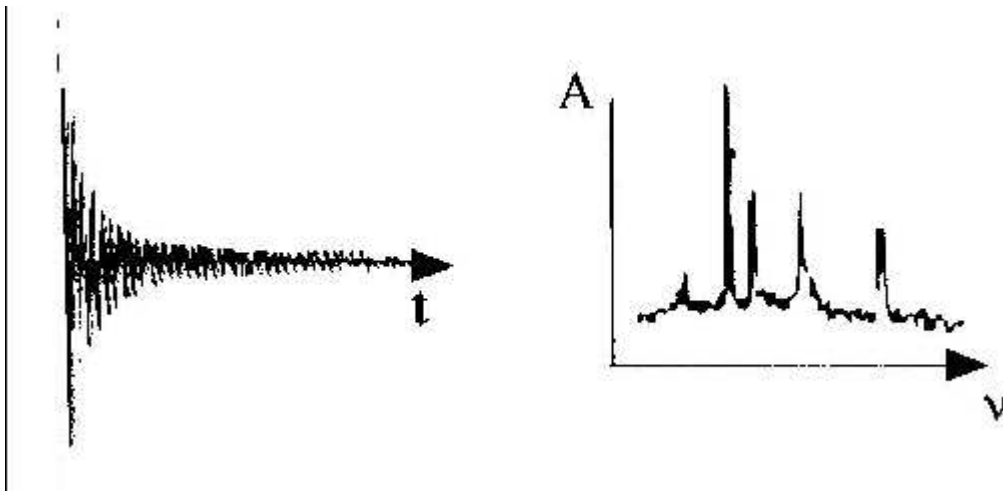


Abb. 3.4 Detektiertes NMR-Signal als FID (links) in der Zeitdomäne und als Spektrum in der Frequenzdomäne (rechts). Der Informationsgehalt der beiden Darstellungen ist gleich; der FID stellt die Summe aller abklingenden Frequenzen dar.

Falls sich die Kerne in verschiedener, chemischer Umgebung befinden, kommt es durch unterschiedliche Verteilungen in der Elektronendichte und verschiedenen Ladungen innerhalb des Moleküls zur Modulation des B_0 -Feldes und damit zu verschiedenen effektiven Feldern (B_{eff}) für die einzelnen Kerne. Deshalb weicht die Resonanzfrequenz ω gering von der Anregungsfrequenz ab.

$$\omega = \gamma * (B_0 - B_{\text{lokal}}) = \gamma * B_{\text{eff}}$$

Dies hat zur Folge, dass unterschiedlich gebundene Kerne geringe Unterschiede in der Resonanzfrequenz aufweisen und so im Spektrum unterschieden werden können. Diese Unterschiede werden im Vergleich zu einer Referenzsubstanz, in biologischen Systemen zu Phosphocreatin, als Verschiebungsdifferenz angegeben. Die Fläche unter dem Resonanzsignal kann durch Integration berechnet werden und ist der Menge an gemessenen Atomkernen proportional.

Für die medizinische und biologische Forschung steht eine Anzahl von Kernen zur Verfügung, die Einblick in den Metabolismus gewähren. In Abhängigkeit vom untersuchten Kern können Aussagen über Metabolitenverteilung und/oder Umsatz getroffen werden. Bei einer Reihe von Kernen ist es aufgrund niedriger Sensitivität und evtl. niedrigem, natürlichem Vorkommen empfehlenswert oder sogar notwendig, Isotopen-angereicherte Substrate einzusetzen. Tabelle 3.1 gibt einen Überblick über das natürliche Vorkommen, die Sensitivität, die gyromagnetische Konstante γ und die Kernspin-Quantenzahl I .

Tab. 3.1 Natürliches Vorkommen, relative Sensitivität, gyromagnetische Konstante und Spin-Quantenzahl einiger ausgewählter Kerne (adaptiert nach (Hesse M et al., 1979) und (Derome AE, 1990))

Kern	Natürliches Vorkommen (%)	Relative Sensitivität (%)	γ 10^7 Hz/T	I
^1H	99,98	1	4,25	$1/2$
^{13}C	1,11	$1,76 \cdot 10^{-4}$	1,07	$1/2$
^{23}Na	100	$9,25 \cdot 10^{-2}$	1,13	$3/2$
^{31}P	100	$6,63 \cdot 10^{-2}$	1,72	$1/2$
^{39}K	93,26	$4,73 \cdot 10^{-4}$	0,19	$3/2$

Eine vollständige und vertiefte Einführung in die NMR ist an dieser Stelle nicht möglich, es sei daher auf entsprechende Literatur mit diesem Schwerpunkt verwiesen (Gadian DG, 1982).

3.2 Anwendung der NMR Techniken am Herzen

Die Informationen aus der klinischen Anwendung der NMR-Verfahren am Herzen haben in der letzten Dekade des vergangenen Jahrtausends begonnen, in der Kardiologie Anwendung zu finden. Hier sind vor allem die bildgebenden

Verfahren, MRI („magnetic resonance imaging“), zur Bestimmung von Anatomie, Morphologie und Funktion etabliert (*Nagel E et al., 1998*). Untersuchungen, bei denen die Perfusion des Herzens gemessen wurden, sind erfolgreich durchgeführt worden und zur klinischen Routineanwendung gekommen (*Engels G et al., 1993*). Im Bereich des MRS („magnetic resonance spectroscopy“) des Herzens wurden in einigen hochspezialisierten Forschungseinrichtungen trotz bestehender Limitationen, wie Untersuchungsdauer, Voxelgrößen und Selektivität der Volumenauswahl, gute Erfolge erzielt, die einen Einsatz in der klinischen Routine möglich erscheinen lassen. Für Untersuchungen zum Verständnis bei Herzerkrankungen wurde meist das Modell des isolierten Rattenherzens verwendet, welches der klinischen, pharmakologischen und pathophysiologischen Situation des Menschenherzens am nächsten kommt (*Laser A et al., 1996*).

3.3 Der Glucosestoffwechsel

3.3.1 Aerobe und anaerobe Oxidation der Glucose

In Gegenwart von Sauerstoff (aerobe Bedingungen) sind die meisten tierischen Zellen in der Lage, verschiedene Arten von Substraten (Lipide, Aminosäuren und Kohlenhydrate) zu „veratmen“, d.h. durch oxidative Prozesse abzubauen. Fehlt Sauerstoff (anaerobe Bedingungen), kann nur noch Glucose zur ATP-Bildung herangezogen werden. Obwohl der Glucoseabbau unter diesen Bedingungen bereits beim Laktat endet und nur geringe Mengen an ATP liefert, ist er für das Überleben der Zellen unter Sauerstoffmangel von entscheidender Bedeutung.

Unter aeroben Bedingungen wird ATP fast ausschließlich durch oxidative Phosphorylierung gewonnen. Fettsäuren gelangen mit Hilfe von Carnitin in die Mitochondrien und werden dort durch die β -Oxidation in CoA-gebundene Acetyl-Reste zerlegt. Glucose wird im Zytoplasma durch die Glycolyse in Pyruvat umgewandelt (*Camici P et al., 1989*). Auch dieses wird in die Mitochondrien-Matrix transportiert und dort durch den Pyruvat-Dehydrogenase-

Komplex oxidativ zu Acetyl-CoA decarboxyliert. Die in der Glycolyse anfallenden Reaktionsäquivalente ($2 \text{ NADH} + \text{H}^+$ pro Molekül Glucose) erreichen über den Malat-Shuttle die Mitochondrien-Matrix. Die gebildeten Acetyl-Einheiten werden im Citrat-Zyklus zu CO_2 oxidiert. Auch der Abbau von Aminosäuren erzeugt Acetyl-Einheiten oder Produkte, die direkt in den Citrat-Zyklus einfließen können. Die gewonnenen Reduktionsäquivalente werden bei Bedarf durch die Atmungskette auf Sauerstoff übertragen. Dabei wird chemische Energie frei, die über einen Protonengradienten zur ATP-Bildung genutzt wird.

In Abwesenheit von Sauerstoff, d.h. im anaeroben Zustand, ändert sich das Bild völlig: Weil der Elektronenakzeptor für die Atmungskette fehlt, können $\text{NADH} + \text{H}^+$ und QH_2 (reduziertes Coenzym Q) nicht mehr reoxidiert werden. Dadurch kommt nicht nur die mitochondriale ATP-Synthese zum Erliegen, sondern fast der gesamte Stoffwechsel der Mitochondrien-Matrix. Eine wesentliche Ursache dafür ist die hohe NADH -Konzentration, die u.a. den Citrat-Zyklus und die Pyruvat-Dehydrogenase hemmt. Die β -Oxidation und der Malat-Shuttle, die auf freies NAD^+ angewiesen sind, liegen ebenfalls still. Da auch der Aminosäureabbau nicht mehr zur Energiegewinnung beitragen kann, ist die Zelle völlig auf die ATP-Bildung durch den Abbau von Glucose über die Glycolyse angewiesen. Soll dieser Prozess kontinuierlich ablaufen, muss das gebildete $\text{NADH} + \text{H}^+$ ständig wieder reoxidiert werden. Weil dies nicht mehr in den Mitochondrien geschehen kann, reduzieren die Zellen unter anaeroben Bedingungen Pyruvat zu Laktat und geben dieses ans Blut ab. Die ATP-Ausbeute dieser Prozesse ist gering; so entstehen bei der Laktat-Bildung nur zwei ATP pro Molekül Glucose (*Koolman J et al., 1998*).

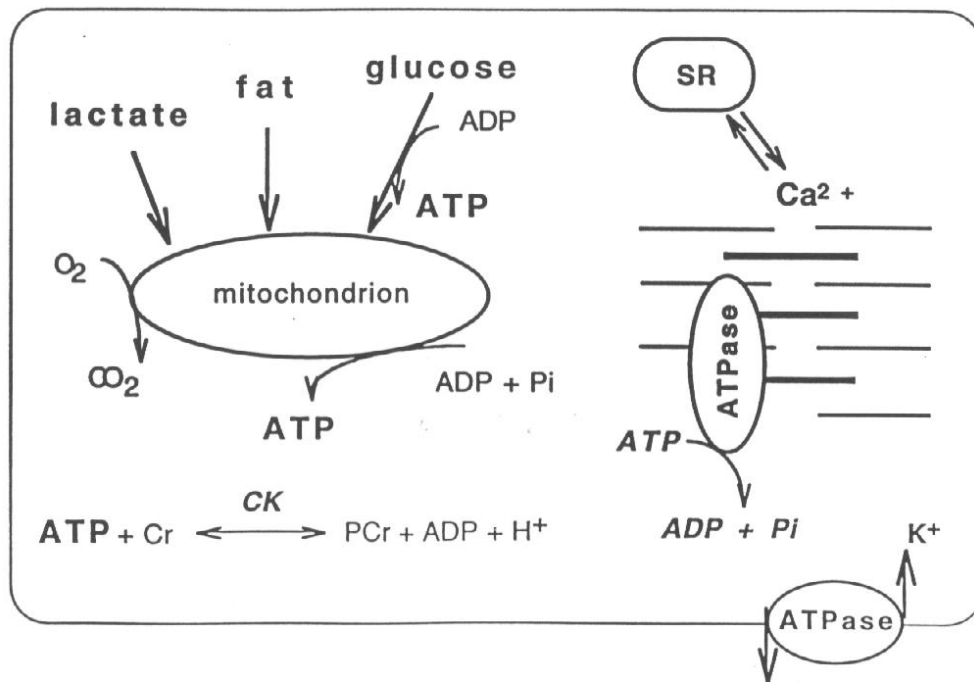


Abb. 3.5 Stoffwechselwege der Synthese und Utilisation von ATP (Ingwall JS)

3.3.2 ATP-Bildung

Da die ATP-Synthese stark endergon ist, muss sie mit exergonen Prozessen gekoppelt werden, um stattfinden zu können. Im Laufe der Evolution haben sich zwei wichtige Formen der ATP-Synthese herausgebildet, die in ähnlicher Weise in allen Zellen ablaufen.

Die effizientere Form der ATP-Bildung nutzt die in elektrochemischen Gradienten gespeicherte Energie zur Bildung von ATP aus ADP und P_i. Die Energie zum Aufbau solcher Gradienten wird durch Redoxprozesse aufgebracht. Man nennt diesen Mechanismus deshalb oxidative Phosphorylierung. H⁺-transportierende ATP-Synthasen machen schließlich die im Gradienten gespeicherte Energie für die ATP-Synthese nutzbar. In Eukaryonten ist die oxidative Phosphorylierung nur in Gegenwart von Sauerstoff (aerob) möglich.

Die zweite, entwicklungsgeschichtlich ältere Form der ATP-Bildung findet auch unter anaeroben Bedingungen statt. Sie beruht auf der Übertragung von Phosphat-Resten auf ADP durch Metabolite mit hohem Phosphat-Übertragungspotential. Als Beispiel sei die ATP-Bildung aus Phosphocreatin genannt, einer Verbindung, die der Muskulatur als Energiereserve dient. Formal ist die Phosphat-Übertragung von Phosphocreatin auf ADP die Summe von Phosphocreatin-Hydrolyse und ATP-Synthese (*Koolman J et al., 1998*), (*Taegtmeyer H et al., 1998*).

3.3.3 Glycolyse

Glucose, welche die Gewebe dem Blut entnehmen können, wird in der Zelle zunächst phosphoryliert. Mit Hilfe der Hexokinase entsteht unter ATP-Verbrauch Glucose-6-phosphat. Nach Isomerisierung zu Fructose-6-phosphat wird erneut phosphoryliert, und man erhält Fructose-1,6-bisphosphat. Die Phosphofruktokinase, die diesen Schritt katalysiert, ist ein wichtiges Schlüsselenzym der Glycolyse. Bis zu diesem Punkt werden pro Molekül Glucose zwei ATP verbraucht. Fructose-1,6-bisphosphat wird nun durch die Aldolase in zwei phosphorylierte C₃-Fragmente gespalten. Die Bruchstücke Glyceral-3-phosphat und Glyceron-3-phosphat werden durch die Triosephosphat-Isomerase ineinander überführt. Glyceral-3-Phosphat wird nun durch die Glyceral-3-phosphat-Dehydrogenase unter Bildung von NADH + H⁺ oxidiert. Dabei wird anorganisches Phosphat in das Molekül aufgenommen („Substratkettenphosphorylierung“) und es entsteht 1,3-Bisphosphoglycerat. Dieses Intermediat enthält eine gemischte Säureanhydrid-Bindung, deren Spaltung stark exergon ist. Im nächsten Schritt, katalysiert durch die Phosphoglycerat-Kinase, wird die Hydrolyse dieser Bindung mit der Bildung von ATP gekoppelt.

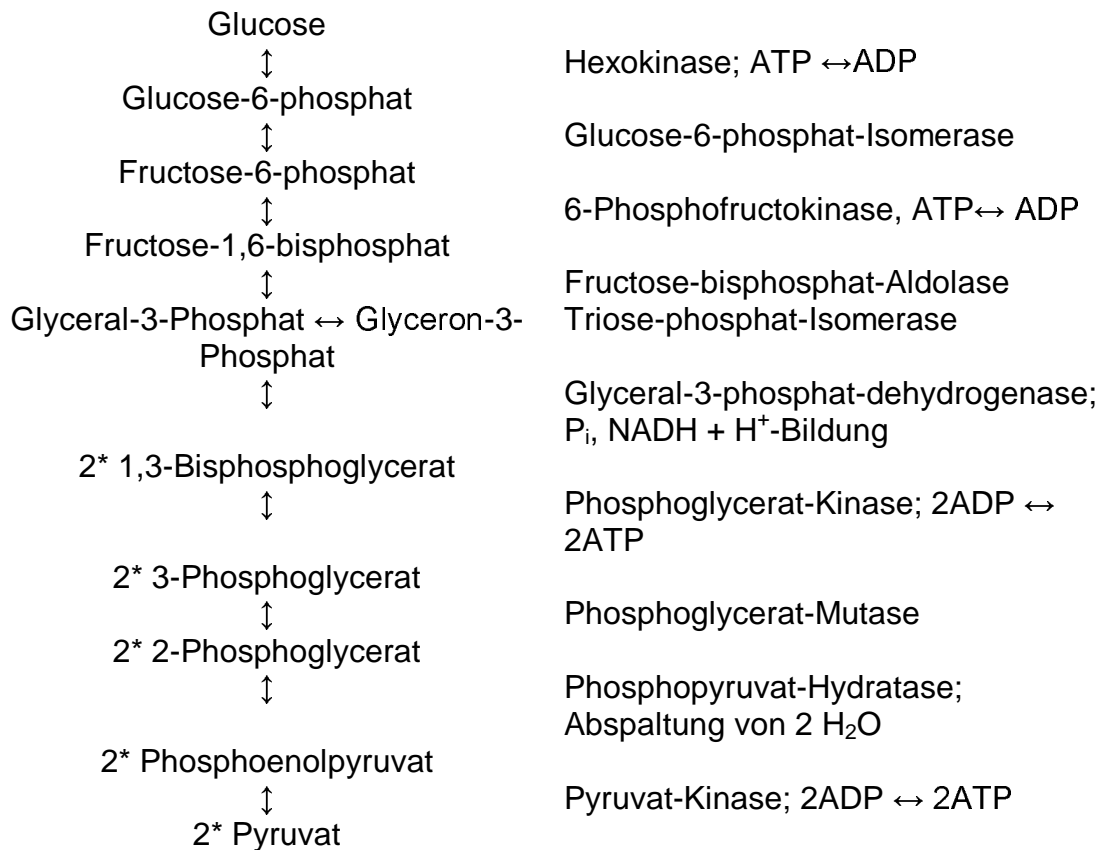


Abb. 3.6 Glycolyse

Ein weiteres Zwischenprodukt, dessen Hydrolyse sich mit der Synthese von ATP koppeln lässt, entsteht durch Isomerisierung des in der letzten Reaktion gebildeten 3-Phosphoglycerats (Enzym: Phosphoglycerat-Mutase) und Abspaltung von Wasser (Enzym: Enolase). Das Produkt ist der Phosphorsäure-Ester der Enol-Form des Pyruvats und heißt deshalb Phosphoenolpyruvat (PEP). Im letzten Schritt der Kette, der durch die Pyruvat-Kinase katalysiert wird, entstehen Pyruvat und ATP. Dies ist neben dem Schritt, in dem Glycerinal-3-Phosphat oxidiert wird, und der Thiokinase-Reaktion im Citrat-Zyklus die dritte Reaktion, die ATP, unabhängig von der Atmungskette, erzeugen kann. Trotz der Bildung von ATP ist sie stark exergon und deshalb kaum umkehrbar. In der Glycolyse werden pro Glucose zwei Moleküle ATP zur Aktivierung verbraucht. Andererseits werden pro C₃-Fragment zwei Moleküle ATP gebildet. Insgesamt

bleibt also ein kleiner Nettogewinn von 2 mol ATP / mol Glucose (*Koolman J et al., 1998*), (*Depre C et al., 1999*).

3.3.4 Glucose-Transporter

Die Aufnahme von Glucose in die Zellen ist mit wenigen Ausnahmen ein passiver Transportprozess. Die Glucose wird von einem Glucose-Transporter (GLUT) gebunden, der in der Zellmembran lokalisiert ist. Eine Konformationsänderung innerhalb des Transporters erlaubt dann die Passage der Glucose durch die Membran.

Die Glucosetransporter bilden eine Familie von strukturverwandten Membranproteinen mit unterschiedlicher Funktion. GLUT1 und GLUT3 zeigen für Glucose eine vergleichsweise hohe Affinität (k_d etwa 1mM). Sie kommen in fast allen Zellen vor und sorgen für eine kontinuierliche Glucose-Aufnahme. GLUT2 tritt in Leber- und Pankreaszellen auf. GLUT4 findet sich auf der Plasmamembran von Muskel und Fettzellen. Er hat eine k_d von etwa 5mM und steht unter der Kontrolle des Insulins. Dieses Hormon erhöht die Zahl von GLUT4-Molekülen auf der Oberfläche der Zellen und fördert dadurch die Glucoseaufnahme. GLUT5 kommt auf den Zellen des Intestinaltraktes vor (*Koolman J et al., 1998*), (*Ohira Y et al., 1994*), (*Paternostro G et al., 1995*).

4. Methodik

4.1 Tiermodell

4.1.1 Tiere und Tierhaltung

Männliche Wistar-Ratten wurden in einem 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Gemäß den Bestimmungen des Tierschutzgesetzes wurden die Tiere in Abhängigkeit von Ihrem Gewicht in Käfigen zu je vier bis sechs Tieren bei freiem Zugang zu kommerziellen Haltungsfutter (Altromin, Lage) und Wasser gehalten. Die Untersuchungen waren von der Regierung von Unterfranken genehmigt (Aktenzeichen: 621-2531.01-25/98).

4.1.2 Chronischer Myokardinfarkt

Die Infarktoperation wurde an 12 Wochen alten, männlichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 250 g nach der von Pfeffer et al. beschriebenen Methode durchgeführt (*Pfeffer MA et al., 1979*). Nachdem die Narkose der Ratte mit Ether eingeleitet worden ist, wurde das Tier intubiert und die Narkose mit Ether unter Druckbeatmung aufrechterhalten. Anschließend wurde mit einem 2-3 cm langen Schnitt die linksseitige Thorakotomie durchgeführt. Nach Eröffnung des Perikards wurde das Herz durch sanften, beidseitigen Druck aus dem Thorax luxiert. Der RIVA (Ramus interventricularis anterior) wurde proximal mit einem nicht resorbierbaren Faden ligiert, das Herz in den Thorax und das Perikard reponiert, die Lungen durch positiven endexpiratorischen Druck entfaltet und die Operationswunde mit Klammern verschlossen. Die Letalität der operierten Tiere lag bei 40 – 50% innerhalb der ersten 24 Stunden. Die Kontrollgruppe (sham: scheinoperiert) wurde gleichermaßen behandelt, jedoch der unterhalb des Koronargefäßes verlaufende Faden nicht verknotet.

4.1.3 Das isolierte, perfundierte Herz

Die Tiere wurden, acht Wochen nach Durchführung der experimentellen Infarktoperation, durch intraperitoneale Injektion von 60 mg/kg KG Natriumpentobarbital anästhesiert. Als bei den Ratten keinerlei Reflexe mehr auslösbar waren, wurde über eine transversale Laparotomie, sowie einer beidseitigen lateralen Thorakotomie und Durchtrennung des Diaphragmas das Herz mit Mediastinum, Thymus und Lungenanteilen entnommen und sofort in eisgekühlten Puffer gegeben. Die Herzen wurden nach Langendorff präpariert: Die Aorta wurde stumpf präpariert und proximal des Truncus brachiocephalicus durchtrennt. Die Aorta wurde nun über eine Kanüle an die Perfusionsanlage gehängt und mit auf 37° C erwärmten, modifizierten (phosphatfreien) und oxygenierten Krebs-Henseleit-Puffer bei einem koronaren Perfusionsdruck von 100 mmHg retrograd perfundiert. Der Vorgang von der Thoraxeröffnung bis zur Perfusion dauerte weniger als drei Minuten.

Die Restanteile der Lunge wurden entfernt, der Truncus pulmonalis aufgesucht und inzidiert. Sodann wurde das linke Herzohr freipräpariert, inzidiert und hierüber eine dünne Drainage aus Polyethylen durch die Mitralklappe so in den linken Ventrikel platziert, dass das Perfusat aus den Thebesischen Venen transmural durch die Herzspitze abgeleitet wurde. Der Koronarfluss wurde durch eine Ultraschallsonde (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA), die den Fluss kontinuierlich aufzeichnete, vor dem Eintritt in das Herz gemessen.

4.1.4 Messung der mechanischen Herzfunktion

Ein wassergefüllter, entlüfteter Latex-Ballon wurde durch eine Inzision im linken Vorhof über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingebracht und mit einer Ligatur gesichert. Der Ballon war mit einem Statham P23Db Druckaufnehmer (Gould Instruments, Glen Burnie, MD, USA) über einen dünnlumigen Polyethylenschlauch verbunden, so dass Herzfrequenz H_f und linksventrikuläre Drücke kontinuierlich mit einem MacLab System (Version 3.5, AD Instruments, Castle Hill, Australien) aufgezeichnet werden konnten. Der Ballon wurde so weit

gefüllt, dass der enddiastolische Druck bei 10 mmHg lag (Döring HJ et al., 1987). Die mechanische Funktion RPP wurde als Produkt ($H_f \cdot LVDA$) in mmHg/min bestimmt. Die linksventrikuläre Druckamplitude (LVDA) ergibt sich aus der Differenz von systolischen und diastolischen Wert.

Mit dieser Art der Präparation erhält man ein Herz, das für mindestens 90 Minuten mechanisch und metabolisch stabil bleibt (Veränderungen über diesen Zeitraum sind kleiner als 10% des Ausgangswertes).

4.1.5 Einschlusskriterien für isolierte Herzen

Folgende Kriterien müssen erfüllt sein, damit ein Herz in die Auswertung einbezogen wird:

Enddiastolischer Druck (experimentell gesetzt)	EDP	10	mmHg
Linksventrikuläre Druckamplitude	LVDA	70-160	mmHg
Herzfrequenz	H_f	200-330	1/min
Doppelprodukt ($H_f \cdot LVDA$)	RPP	15000-50000	mmHg/min
Koronarfluss	CF	13-30	ml/min
	PCr/ATP	> 1,1	

Tab. 4.1 Einschlusskriterien für isolierte Herzen

Diese Einschlusskriterien gelten nur für intakte, nichtinfarzierte Rattenherzen.

4.1.6 Perfusionslösungen

Zur Perfusion der Herzen wurde Krebs-Henseleit-Puffer mit folgender Zusammensetzung verwendet.

NaCl	118	KCl	4,7
CaCl ₂	1,75	MgSO ₄	1,2
Na ₂ EDTA	0,5	NaHCO ₃	25
Glucose	11		

Tab. 4.2 Zusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers in mM

Äquibrillierung des Puffers mit 95% O₂ und 5% CO₂ ergab einen pH-Wert von 7,4. Das in der Originalzusammensetzung des Krebs-Henseleit-Puffers enthaltene KH₂PO₄ stört aufgrund seines Phosphatgehaltes bei der ³¹P-NMR Spektroskopie und wurde in allen Untersuchungen nicht zugemischt.

4.1.7 Infarktgrößenbestimmung mit histologischen Methoden

Nach Ende der jeweiligen Versuchsreihe wurden die Herzen in Formalin fixiert, entwässert, in Paraffin gebettet und in 10 µm dicke Schichten mit einem Schichtabstand von 1 mm geschnitten. Die Paraffinschnitte wurden auf Objektträger aufgebracht und mit Picrosirius Rot gefärbt. Die Infarktnarbe stellte sich rot dar, während das Restmyokard gelb erschien. Die erhaltenen histologischen Präparate wurden im Durchlichtverfahren mit einer Auflösung von 600 dpi gescannt (Nikon EF Scanner, Tokio, Japan). Die endo- und epikardiale Länge der Infarktnarbe, sowie des Gesamtumfangs wurde mit dem Programm „NIH Image“ (Version 1.59, National Institute of Health, Bethesda, USA) auf einem Computer (Apple Macintosh) ausgemessen. Der endo- und epikardiale Mittelwert des Verhältnisses der Narben- zu Gesamtlänge wurde berechnet und in Prozent angegeben. Herzen mit einer Infarktgröße unter 30% wurden ausgeschlossen.

4.2 Magnetresonanz-Verfahren

³¹P-NMR Spektroskopie

Die perfundierten Herzen wurden in ein NMR-Röhrchen (Wilmad, Buena Vista, NJ, USA) mit einem Außendurchmesser von 20 mm eingebracht und in einen selektiven ³¹P/²³Na-NMR Probenkopf (Paul Morris, Gloucester, OT, Kanada) in der Bohrung eines supraleitenden Magneten (Bruker, Rheinstetten) bei einer Feldstärke von 7,05 T eingeführt. Die Herzen wurden von ihrem Perfusat umspült, welches kontinuierlich oberhalb des Herzens aus dem NMR-Röhrchen abgesaugt wurde. Die Hochfrequenzimpulse wurden von einem Aspect 3000 Computer in einer Bruker AM 300 Konsole (Bruker, Rheinstetten) bei einer Frequenz von 121,5 MHz erzeugt. Mittels einer 14 Kanal Shim-Einheit wurde das Magnetfeld homogenisiert und die Halbhöhenbreite des Natriumsignals aus dem Puffer auf Werte kleiner 10 Hz optimiert. Die ³¹P-NMR-Daten wurden innerhalb von 5 Minuten durch Mittelung von 152 FID bei einem Pulswinkel von 45° und einer Pulsdauer von 37,6 µs sowie einer Pulsrepetitionszeit von 1,93 s erhalten. Die erhaltenen Daten wurden mit einer abklingenden Exponentialfunktion ($t_{1/e} = 50$ ms) multipliziert, Fourier transformiert und spektrenspezifisch phasenkorrigiert. Abb. 4.1 zeigt ein typisches Beispiel eines solchen Spektrums. Aufgrund der kurzen Pulsrepetitionszeit waren die Spektren geringgradig gesättigt und die erhaltenen Integralwerte für die Fläche der einzelnen Resonanzsignale wurden mit Multiplikationsfaktoren (PCr 1,12; P_i 1,08) korrigiert. Diese Werte wurden durch Vergleich gesättigter und ungesättigter Spektren erhalten.

Für ein Set von Spektren wird die PCr-Frequenz des ersten Spektrums auf Null und das Integral des γ -ATP des ersten Spektrums auf 100 gesetzt, und als Referenzwert für die anderen Signale verwendet.

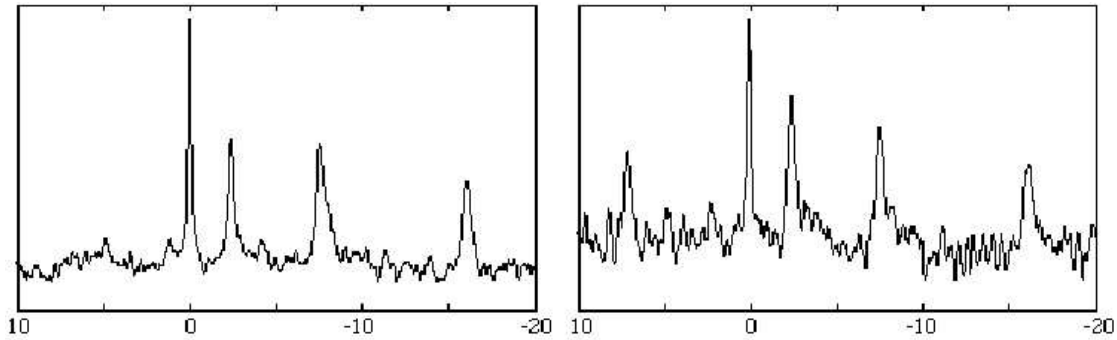


Abb. 4.1 Typische ^{31}P -NMR Spektren eines isolierten Rattenherzens, das mit Glucose (linke Abbildung) und Deoxyglucose (rechtes Bild) perfundiert wurde.

Es lassen sich fünf Resonanzfrequenzen abgrenzen: anorganisches Phosphat (P_i ; bei ca. 4,8 ppm), Phosphocreatin (PCr; auf 0 ppm gesetzt), γ -ATP (bei ca. – 2,5 ppm), α -ATP (bei ca. –7,5 ppm) und β -ATP (bei ca. –16 ppm). Im rechten Bild ist die Perfusion mit Deoxyglucose dargestellt. Deoxyglucose wird phosphoryliert, aber nicht weiter verstoffwechselt, so dass die Aufnahme in die Zelle selektiv dargestellt werden kann, da die phosphorylierte Deoxyglucose als zusätzliche Resonanz bei 8 ppm erscheint (*Doenst T et al., 1998*).

Aus dem Spektrum ergibt sich der zyttoplasmatische pH-Wert des Herzens (*Moon RB et al., 1973*). Die Verschiebungsfrequenz zwischen anorganischen Phosphat P_i und Phosphocreatin PCr ändert sich pH-abhängig und hat einen sigmoiden Kurvenverlauf. Mit Hilfe einer Eichkurve kann somit der intrazelluläre pH bestimmt werden.

4.3 Experimentelles Protokoll

4.3.1 Versuch zur Bestimmung der Glucoseaufnahme ohne Insulinstimulation

Nach Bestimmung des Körpergewichts wurden die Herzen von sechs infarzierten und acht scheinoperierten (sham) Ratten acht Wochen nach der Operation für die ^{31}P -MRS Untersuchungen entnommen und perfundiert. Durch schrittweise Erhöhung des Ballonvolumens im linken Ventrikel wurde der

enddiastolische Druck auf 10 mmHg eingestellt. Nach Homogenisierung des Magnetfeldes und Optimierung der Halbhöhenbreite des Natriumsignals aus dem Puffer auf Werte kleiner 10 Hz, wurden die ^{31}P -NMR Daten für die ^{31}P -Metaboliten in 5 Minuten Intervallen aufgezeichnet. Die Herzen wurden für 10 Minuten mit Krebs-Henseleit-Puffer, der in seiner Zusammensetzung 11 mM Glucose aufwies, perfundiert. Die Relativkonzentrationen der energiereichen Phosphate und P_i wurden mittels ^{31}P -NMR bestimmt. Nachdem die ersten beiden Datensätze akquiriert waren, wurde das Substrat gewechselt. Dem Puffer wurden anstatt 11 mM Glucose nun 5 mM Pyruvat und 5 mM Deoxyglucose zugesetzt. Nun wurde zusätzlich zu den Relativkonzentrationen der energiereichen Phosphate und P_i auch die Deoxyglucosekonzentration mittels ^{31}P -NMR gemessen. Deoxyglucose wird phosphoryliert, aber nicht weiter verstoffwechselt, so dass die Aufnahme in die Zelle selektiv dargestellt werden kann, da die phosphorylierte Deoxyglucose als zusätzliche Resonanz bei 8 ppm erscheint (siehe Abb. 4.1). Die Messung erfolgte über 30 Minuten, was weiteren sechs Datensätzen entspricht. Über die gesamte Versuchsdauer wurden der Koronarfluss, die Herzfrequenz, sowie die linksventrikuläre Druckamplitude aufgezeichnet. Der pH-Wert wurde aus der Verschiebedifferenz aus Phosphocreatin und P_i errechnet. Nach Versuchsende wurden die Herzen für die Infarktgrößenbestimmung in Formalin fixiert.

4.3.2 Versuch zur Bestimmung der Glucoseaufnahme mit Insulinstimulation

Die Untersuchungen verliefen analog den oben beschriebenen, jedoch wurde dem Puffer, nach dem Wechsel von Glucose zu Pyruvat und Deoxyglucose als Substrate, 2 mU/ml Insulin über einen Perfusor zugesetzt. Hier untersuchten wir sechs infarzierte und vier scheinoperierte Tiere.

4.4 Datenanalyse

Die Daten der einzelnen Gruppen wurden gemittelt und mit Hilfe des Programms StatView (Version 4.51, Abacus Concepts Inc., Berkeley, CA, USA) statistisch untersucht. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte \pm Mittelwertsfehler (SEM).

Der Vergleich zwischen den Gruppen wurde mit einem ungepaarten, zweiseitigen t-Test mit Bonferroni-Korrektur für zwei Vergleiche durchgeführt. p-Werte kleiner 0,05 wurden als statistisch signifikant betrachtet.

5. Ergebnisse

5.1 Mechanische Funktion

Tab. 5.1: Infarktgröße, Herz (HW)- und Körpergewicht (BW), sowie deren Verhältnis (HW/BW), Koronarfluss, Herzfrequenz und linksventrikuläre Druckamplitude (LVDA), RPP als Produkt von Herzfrequenz und linksventrikulärer Druckamplitude, sowie der enddiastolische Druck (EDP), der experimentell auf 10 mmHg gesetzt wurde, von scheinoperierten und infarzierten Herzen

		Scheinoperiert	Myokardinfarkt
Anzahl	n	12	12
Infarktgröße	%	0	45,7 ± 1,4*
Herzgewicht	g	1,25 ± 0,09	1,30 ± 0,09
Körpergewicht	g	392 ± 22	460 ± 12*
HW/BW	g/kg	3,04 ± 0,07	2,63 ± 0,21
Koronarfluss	ml/min	26,3 ± 1,9	22,4 ± 1,9
Herzfrequenz	1/min	278 ± 6	260 ± 10
LVDA	mmHg	134 ± 17	64 ± 8*
RPP	mmHg/min	36745 ± 4258	15272 ± 1616*
EDP	mmHg	10 ± 0	10 ± 0

* $p < 0,05$ Scheinoperiert versus Myokardinfarkt

Die Werte wurden jeweils am Anfang der Messreihen bestimmt, da zu diesem Zeitpunkt der Puffer sowohl für die Insulinstimulierten, wie auch für die Herzen ohne Insulinstimulation identisch war, und somit keinen Einfluss auf die mechanische Funktion der Herzen nehmen konnte.

Das Herzgewicht war bei den scheinoperierten Tieren im Vergleich zu dem der Ratten mit Myokardinfarkt nicht verändert. Das Körpergewicht der infarzierten Tiere war signifikant höher, als das der scheinoperierten. Das Verhältnis von

Herz- zu Körpergewicht war jedoch in beiden Gruppen ähnlich. Die Herzfrequenzen, ebenso der Koronarfluss, der beiden Gruppen waren in der Kontrollphase nicht signifikant unterschiedlich. Bei der linksventrikulären Druckamplitude (LVDA) lagen die infarzierten Tiere signifikant unter den Werten der scheinoperierten. Ebenso war das Doppelprodukt (RPP) aus Herzfrequenz und linksventrikulärer Druckamplitude in der Infarktgruppe signifikant erniedrigt. Der enddiastolische Druck (EDP) wurde zu Versuchsbeginn durch Variation des Ballonvolumens auf 10 mmHg gesetzt.

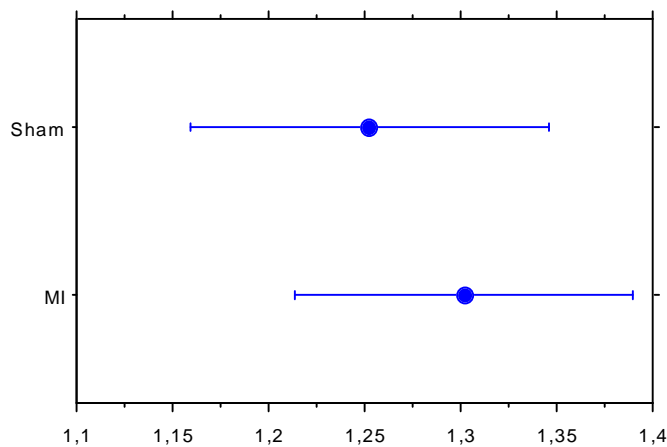
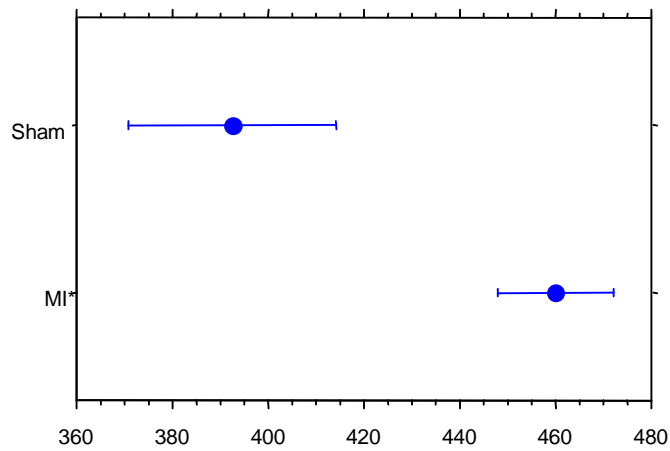


Abb. 5.1 Herzgewicht in Gramm (g) von scheinoperierten und infarzierten Herzen, dargestellt als Mittelwerte \pm Mittelwertsfehler (SEM).



* $p < 0,05$ Scheinoperiert versus Myokardinfarkt

Abb. 5.2 Körpergewicht in Gramm (g) von scheinoperierten und infarzierten Tieren, dargestellt als Mittelwerte \pm Mittelwertsfehler (SEM).

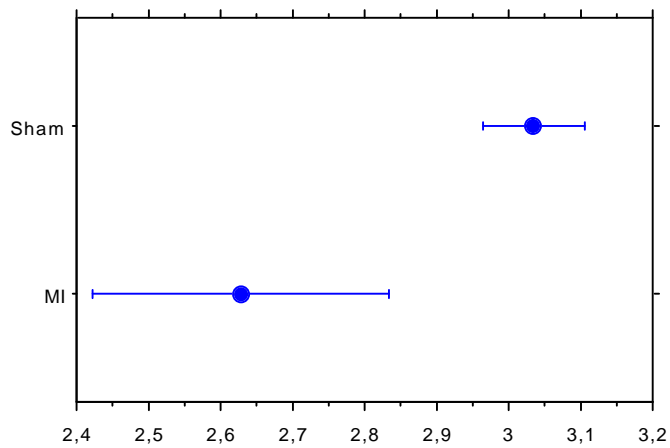


Abb. 5.3 Verhältnis von Herzgewichten und Körpergewichten in Gramm pro Kilogramm (g/kg) von scheinoperierten und infarzierten Tieren, dargestellt als Mittelwerte \pm Mittelwertsfehler (SEM).

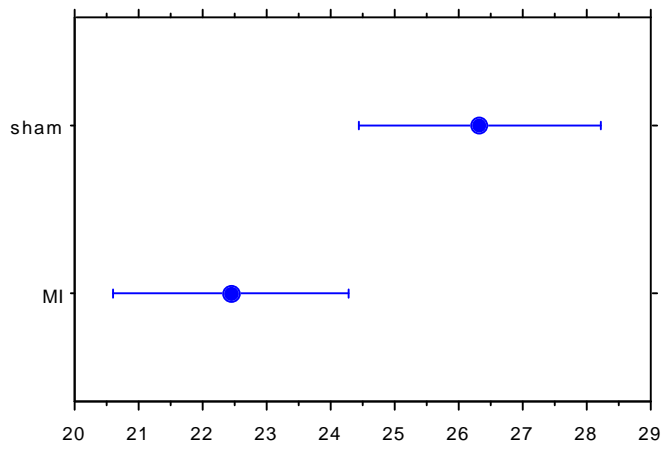


Abb. 5.4 Koronarfluss in Milliliter pro Minute (ml/min) von scheinoperierten und infarzierten Herzen, dargestellt als Mittelwert \pm Mittelwertsfehler (SEM).

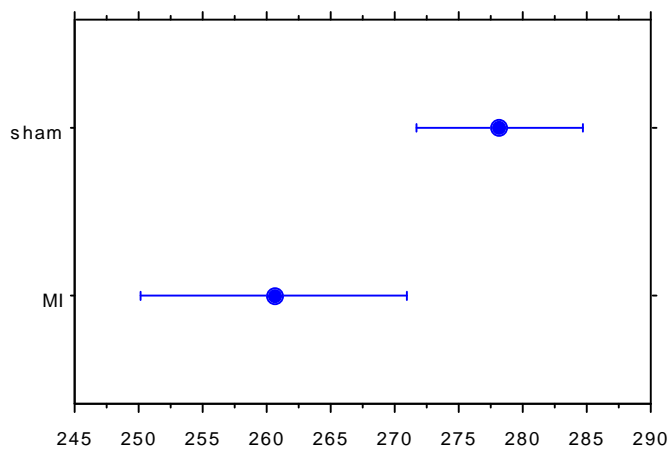
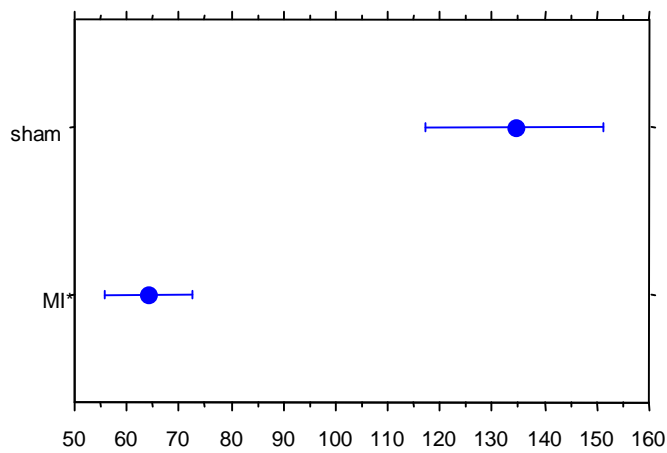
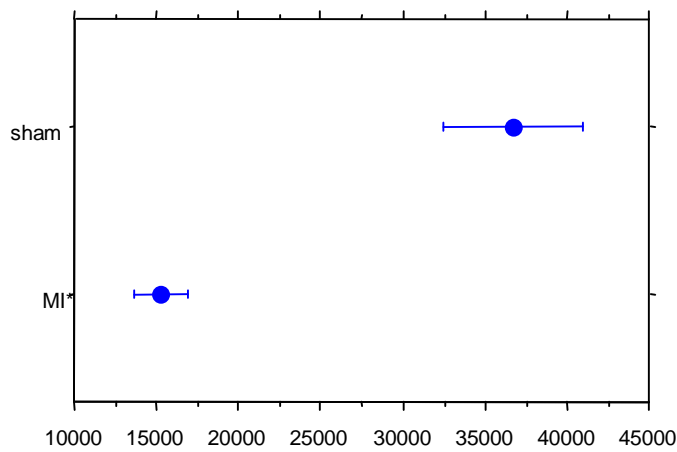


Abb. 5.5 Herzfrequenz in Schlägen pro Minute (1/min) von scheinoperierten und infarzierten Herzen, dargestellt als Mittelwert \pm Mittelwertsfehler (SEM).



* $p < 0,05$ Scheinoperiert versus Myokardinfarkt

Abb. 5.6 Linksventrikuläre Druckamplitude (LVDA) in mmHg von scheinoperierten und infarzierten Herzen, dargestellt als Mittelwert \pm Mittelwertsfehler (SEM).



* $p < 0,05$ Scheinoperiert versus Myokardinfarkt

Abb. 5.7 RPP als Produkt von Herzfrequenz und linksventrikulärer Druckamplitude in mmHg/min von scheinoperierten und infarzierten Herzen, dargestellt als Mittelwert \pm Mittelwertsfehler (SEM).

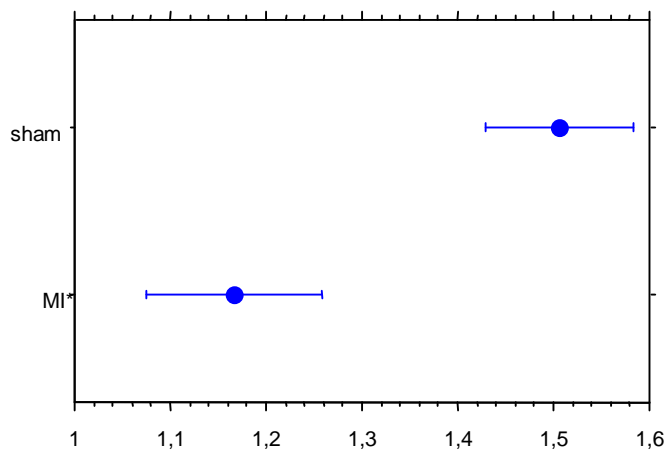
5.2 Energiemetabolismus

Tab. 5.2 Absolute (P_i) und relative (PCr/ATP) Konzentrationen der energiereichen Phosphate und pH von scheinoperierten und infarzierten Herzen

	Scheinoperiert	Myokardinfarkt
PCr/ATP	$1,51 \pm 0,08$	$1,17 \pm 0,09^*$
P_i mM	$3,4 \pm 0,7$	$3,4 \pm 0,8$
pH	$7,14 \pm 0,03$	$7,06 \pm 0,04$

* $p < 0,05$ Scheinoperiert versus Myokardinfarkt

Die Werte wurden jeweils zu Beginn der Messreihen bestimmt, da zu diesem Zeitpunkt der Puffer mit als auch ohne Insulinstimulierung identisch war, und somit keinen Einfluss auf den Energiemetabolismus der Herzen nehmen konnte.



* $p < 0,05$ Scheinoperiert versus Myokardinfarkt

Abb. 5.8 Das Verhältnis von Phosphocreatin (PCr) zu Adenosintri-phosphat (ATP), dargestellt als Mittelwert \pm Mittelwertsfehler (SEM).

Das Verhältnis von Phosphocreatin (PCr) zu Adenosintri-phosphat (ATP) war bei den Tieren mit Myokardinfarkt, im Vergleich zu den scheinoperierten, signifikant

erniedrigt. Die Menge des anorganischen Phosphats (Pi) war in beiden Gruppen gleich. Der intrazelluläre pH Wert zeigte keinen Unterschied zwischen den beiden Gruppen.

5.3 Aufnahme von Deoxyglucose

Zur Bestimmung der Menge an aufgenommener Deoxyglucose, wurde die Menge an phosphorylierter Deoxyglucose gemessen, die als zusätzliche Spektrallinie bei 8 ppm erscheint.

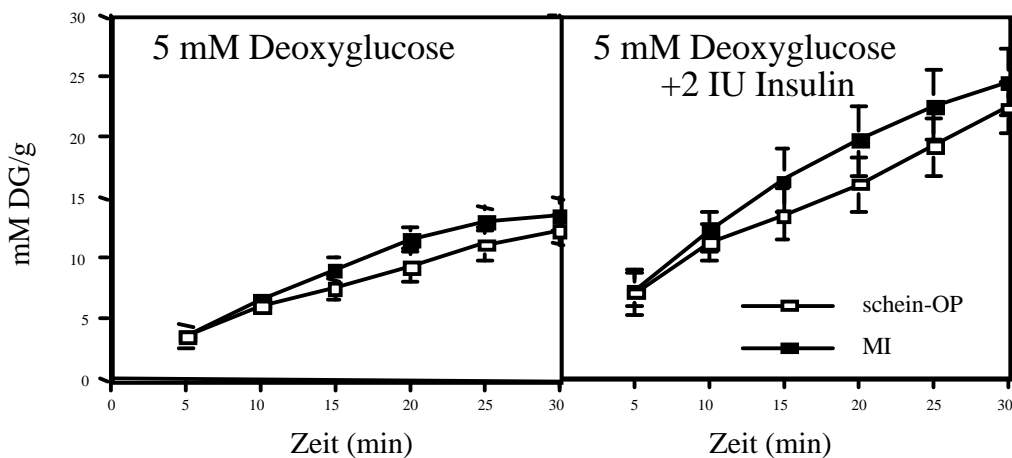
Tab. 5.3 Aufnahme der phosphorylierten Deoxyglucose (P-DG) in mM/min/g Herzgewicht ohne und mit Insulinstimulation von scheinoperierten und infarzierten Herzen

	Ohne Insulin	Mit 2 mU/ml Insulin
Scheinoperiert	0,36 ± 0,04	0,61 ± 0,08 ^a
Myokardinfarkt	0,40 ± 0,04	0,69 ± 0,10 ^b

^a p < 0,05 scheinoperiert ohne Insulin versus scheinoperiert mit Insulin

^b p < 0,05 MI ohne Insulin versus MI mit Insulin

Es zeigen sich keine Unterschiede zwischen scheinoperierten und infarzierten Herzen, jedoch kommt es durch Insulin zu einem signifikanten Anstieg der Glucoseaufnahme in beiden Gruppen.



6. Diskussion

6.1 Definition des Modells

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die Glucoseaufnahme in die Zelle nach einem Myokardinfarkt limitiert ist. Falls dies der Fall sein sollte, sollte weiter festgestellt werden, ob dies zu Veränderungen in der mechanischen Funktion und im Energiestoffwechsel führt. Außerdem wurde der Einfluss der Insulinstimulation auf die Glucoseaufnahme, die mechanische Funktion und den Gehalt an Phosphocreatin untersucht.

Hierzu wurde an 12 Wochen alten, männlichen Wistar-Ratten mit einem Körpergewicht von ca. 250 g nach der von Pfeffer et al. beschriebenen Methode eine Ligatur des RIVA (Ramus interventricularis anterior) durchgeführt (*Pfeffer MA et al., 1979*). Acht Wochen nach der Infarktoperation wurden die Herzen der Tiere entnommen, nach Langendorff präpariert und retrograd perfundiert.

Die Herzen wurden für 10 Minuten mit Krebs-Henseleit-Puffer mit 11 mM Glucose als Substrat perfundiert. Die Relativkonzentrationen der energiereichen Phosphate, P_i und Deoxyglucose wurden mittels ^{31}P -NMR bestimmt. Nach der Akquisition der ersten beiden Datensätze wurde das Substrat gewechselt. Der Puffer enthielt als Substrat anstatt 11 mM Glucose nun 5 mM Pyruvat und 5 mM Deoxyglucose. Die Messung erfolgte über 30 Minuten, was weiteren sechs Datensätzen entspricht. Die Untersuchungen zur Bestimmung der Glucoseaufnahme mit Insulinstimulation verliefen analog, jedoch wurden dem Puffer ab der Substratumstellung 2 mU/ml Insulin über einen Perfusor zugesetzt.

Die ^{31}P -NMR-Spektroskopie erlaubt es, energiereiche Phosphate nichtinvasiv zu bestimmen. Dabei werden die Mittelwerte der Metaboliten der gesamten Probe gemessen. Es handelt sich fast ausschließlich um die Metabolite intakter Muskelzellen, da die Narbe nur ca. 14% des Herzgewichts ausmacht und der Gehalt der Narbe an energiereichen Phosphaten sehr gering ist (weniger als 1% der Konzentration energiereicher Metabolite des nichtinfarzierten Muskelgewebes) (*Neubauer S et al., 1995*).

6.2 Infarktgröße, Herzgewicht, Körpergewicht

Das Modell des chronischen Myokardinfarkts bei Ratten ist bereits von verschiedenen Autoren angewandt und charakterisiert worden (*Neubauer S et al., 1995*), (*Cleutjens JPM et al., 1999*), (*Solomon SD et al., 1999*). Bei höheren Infarktgrößen (wie z.B. ca. 45% in dieser Studie) kommt es zu einer Zunahme des Herzgewichts (*Ertl G, Gaudron P, Neubauer S et al., 1993*), (*Pfeffer JM et al., 1985*). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich eine geringfügige, nicht signifikante Erhöhung des Herzgewichts nach Myokardinfarkt ($1,25 \pm 0,09$ Gramm für scheinoperierte versus $1,30 \pm 0,09$ Gramm für infarzierte Herzen). Autoren wie Anversa, Zimmer und andere berichteten über die genaue Bestimmung der myokardialen Hypertrophie im chronisch infarzierten Herz, die sowohl makroskopisch (erhöhtes Gewicht), als auch mikroskopisch (vermehrtes Zellvolumen und Zunahme der Myozytenlänge) erscheint (*Zimmer H-G et al., 1990*), (*Anversa P et al., 1986*), (*Remondino A et al., 2000*). Das Körpergewicht erwies sich bei den Infarkttieren als signifikant erhöht (392 ± 22 Gramm für scheinoperierte versus 460 ± 12 Gramm für Tiere mit Myokardinfarkt; $p < 0,05$). Dies führte zu einem höheren Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht bei den scheinoperierten Ratten als bei den Infarkttieren (HW/BW in Gramm pro Kilogramm: $3,04 \pm 0,07$ für scheinoperierte versus $2,63 \pm 0,21$ für infarzierte Tiere). Die Erhöhung des Körpergewichts steht in Einklang mit Ergebnissen von Horn et al. (*Horn M et al., 1999*). Neubauer et al. zeigten eine signifikante Erhöhung des Herzgewichts, als auch eine signifikante Abnahme des Körpergewichts bei den Infarkttieren. Somit resultierte auch ein signifikant erhöhtes Verhältnis von Herzgewicht zu Körpergewicht bei den Ratten mit Myokardinfarkt (*Neubauer S et al., 1995*). Laser et al. beobachteten einen Anstieg des rechts- und des linksventrikulären Gewichts, allerdings veränderte sich das Verhältnis aus dem Gewicht des linken Ventrikels des überlebenden Myokards und dem Körpergewicht bei den Infarkttieren nicht. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass das Gewebe, welches durch die Narbenformation verloren ging, durch neues Gewebe des intakten linken Ventrikels ersetzt wurde (*Laser A et al., 1996*).

6.3 Koronarfluss

Der Koronarfluss war während des gesamten Versuchs bei den Infarkttieren ($22,4 \pm 1,9$ ml/min) geringer als bei den scheinoperierten ($26,3 \pm 1,9$ ml/min). Die Unterbindung des RIVA (Ramus interventricularis anterior) führt zum Ausfall eines der drei großen Gefäße des Herzens und damit zu einer Reduktion des Koronarflusses, der durch das Wachstum von Kollateralen nicht vollständig ausgeglichen werden kann. Allerdings ist die Neovaskularisation bei Ratten sehr effizient. Cleutjens und andere Autoren berichten, dass bei Ratten der Koronarfluss bereits innerhalb einer Woche nach Myokardinfarkt normalisiert ist (Cleutjens JPM et al., 1999), (Ertl G, Gaudron P und Hu K, 1993).

Bassingthwaighe und Li berichten, dass der regionale Blutfluss im linken Ventrikel bemerkenswert unterschiedlich ist. So wird der Koronarfluss den regionalen Substratanforderungen angepasst (Bassingthwaighe JB et al., 1999). Diese Ergebnisse sind von Caldwell et al. in deren Studien bestätigt worden (Caldwell JH et al., 1994).

In unserer Arbeit wurde der Koronarfluss durch eine Ultraschallsonde (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA), die den gesamten Fluss kontinuierlich aufzeichnete, gemessen. Daher bleibt unklar, ob der nur gering verminderte Koronarfluss bei den Infarkttieren auf einer bereits stattgefundenen Kollateralisierung oder auf einer Dilatation der nicht verschlossenen Koronargefäße beruht.

6.4 Veränderungen der mechanischen Funktion nach chronischem Myokardinfarkt

Die Mechanik des chronisch infarzierten Herzens wurde unter isovolumetrischen Bedingungen untersucht, d.h. der enddiastolische Druck wurde auf 10 mmHg gesetzt. Hierbei sind die linksventrikuläre Druckamplitude und das Doppelprodukt bei infarzierten Tieren signifikant vermindert (LVDA in mmHg: 64 ± 8 für infarzierte Tiere versus 134 ± 17 für scheinoperierte; RPP in mmHg/min: 15272 ± 1616 für infarzierte Tiere versus 36745 ± 4258 für

scheinoperierte; $p < 0,05$), wie bereits früher beschrieben (*Vleeming W et al., 1991*). Neubauer et al. (*Neubauer S et al., 1995*) konnten zeigen, dass der enddiastolische Druck bei infarzierten Tieren in vivo im Mittel bei 23 ± 4 mmHg liegt. Setzte man in vitro die Vorlast bei infarzierten Tieren auf den jeweiligen in vivo gemessenen Wert, ergaben sich keine Unterschiede in Bezug auf die linksventrikuläre Druckamplitude und das Doppelprodukt zwischen scheinoperierten und infarzierten Tieren. Eine experimentelle Vorlastreduktion im Vergleich zur in vivo Situation in diesem Versuchsaufbau kann also als Ursache der kleineren linksventrikulären Druckamplitude bei Myokardinfarkt in vitro angesehen werden.

Obwohl die linksventrikuläre Druckamplitude nur bei einem enddiastolischen Druck von 10 mmHg gemessen wurde, kann man davon ausgehen, dass die linksventrikuläre Druckamplitude im Bereich der gesamten Frank-Starling-Kurve bei infarzierten Tieren gegenüber scheinoperierten Tieren vermindert ist. Belegt wird dies durch eine Studie von Tian und Mitarbeitern (*Tian R et al., 1996*), (*Gaudron P et al., 1993*). Sie fanden außerdem eine Reduktion der maximalen linksventrikulären Druckamplitude bei infarzierten Tieren. Wenn man diese Veränderungen als Druck-Volumen-Kurve darstellt, zeigt sich für infarzierte Herzen eine Verschiebung in Richtung des höheren Volumens (Dilatation) und zu niedrigeren Drücken (Dysfunktion; dargestellt als linksventrikuläre Druckamplitude: LVDA) (*Horn M et al., 1999*).

Die Herzfrequenz ist in diesem Modell nicht verändert, wie bereits früher gezeigt (*Horn M et al., 1999*), (*Neubauer S et al., 1995*).

6.5 Veränderungen des Energiemetabolismus nach chronischem Myokardinfarkt

Mit Hilfe der ^{31}P -NMR-Spektroskopie konnten Neubauer und Mitarbeiter zeigen, dass nach Myokardinfarkt innerhalb von zwei Monaten im verbleibenden Restmyokard der Phosphocreatin Gehalt um ca. 40% abnimmt, der ATP-Gehalt im intakten Restmyokard jedoch unverändert bleibt. Daraus ergibt sich, dass das Verhältnis Phosphocreatin zu Adenosintriphosphat ebenfalls abnimmt

(Neubauer S et al., 1995). Ähnliche Werte werden von Sanbe und Mitarbeitern bei Ratten berichtet (Sanbe A et al., 1993).

In der vorliegenden Studie verkleinerte sich das Verhältnis von Phosphocreatin zu Adenosintriphosphat nach Myokardinfarkt um 22% (PCr/ATP: $1,51 \pm 0,08$ für scheinoperierte versus $1,17 \pm 0,09$ für infarzierte Herzen, $p < 0,05$).

Phosphocreatin verändert sich in Abhängigkeit vom Energiestatus des Herzens, wohingegen die ATP-Konzentration weitgehend stabil bleibt. Bedingt ist dies dadurch, dass das Gleichgewicht der Creatinkinase-reaktion ganz auf der Seite der ATP-Bildung liegt (Ingwall JS):

$$(\text{MgATP}^{2-} \cdot \text{Creatin}) / (\text{MgADP}^- \cdot \text{Phosphocreatin}^{2-} \cdot \text{H}^+) = 140 = K_{\text{eq}}$$

(Saks VA et al., 1975)

Ein Grund für die verminderte Menge an Phosphocreatin fand sich in einer reduzierten Aktivität der Creatinkinase, wobei sich deren Isoenzyme (CK BB, CK MB, CK MM und CK_{mito}) in unterschiedlichen Ausmaß veränderten, und einem um 35% reduzierten Gehalt an Creatin. Allerdings schien dies im Ruhestoffwechsel nicht der limitierende Faktor zu sein, da der Austausch des Phosphatrestes immer noch fünf-mal höher war, als die durch den Sauerstoffverbrauch errechnete ATP-Synthese-Rate, obwohl die Reaktionsgeschwindigkeit der Creatinkinase nach Myokardinfarkt um 50% im Restmyokard erniedrigt war. Dies bedeutet eine reduzierte Kapazität des CK-Energie-Shuttles; d.h. die Übertragung von ATP von den Mitochondrien, dem Ort der Bildung, zu den Myofibrillen, dem Ort des Verbrauchs, ist verringert (Ingwall JS), (Neubauer S et al., 1995).

Die CK-Isoenzym-Verteilung ändert sich, wie erwähnt, nach Myokardinfarkt dramatisch.

Die Menge des intrazellulären, anorganischen Phosphats war in dieser Arbeit zwischen scheinoperierten und infarzierten Tieren gleich (P_i : $3,4 \pm 0,7$ in mM für scheinoperierte versus $3,4 \pm 0,8$ für infarzierte Herzen). Auch beim pH-Wert, der mit Hilfe einer Eichkurve aus dem chemischen Shift zwischen anorganischem Phosphat und Phosphocreatin bestimmt wurde, fand sich keine

signifikante Veränderung zwischen scheinoperierten und infarzierten Tieren (pH: $7,14 \pm 0,03$ für scheinoperierte versus $7,06 \pm 0,04$ für infarzierte Herzen). Neubauer et al. fanden in ihrer Studie ebenfalls keine signifikanten Unterschiede des intrazellulären Gehalts an anorganischen Phosphat und des intrazellulären pH-Werts zwischen Herzen nach Myokardinfarkt und Kontrollen (Neubauer S et al., 1995).

6.6 Veränderungen der Glucoseaufnahme nach chronischem Myokardinfarkt

In der vorliegenden Arbeit wurde die Glucoseaufnahme am chronisch infarzierten Rattenherz untersucht. Die Glucoseaufnahme wird durch Benutzung von 2-Deoxy-D-Glucose nachgewiesen, welche wie Glucose in die Zellen aufgenommen, zu 2-Deoxyglucose-6-Phosphat phosphoryliert, aber nicht weiter metabolisiert wird (Doenst T et al., 1998), (Sokoloff L et al., 1977).

Es wurden im Modell des chronisch infarzierten Herzens acht Wochen nach Myokardinfarkt keine Unterschiede in der Glucoseaufnahme zwischen den scheinoperierten und den infarzierten Tieren gefunden (Aufnahme der phosphorylierten Deoxyglucose P-DG in mM/min/g: $0,36 \pm 0,04$ für scheinoperierte versus $0,40 \pm 0,04$ für infarzierte Herzen), das heißt, dass sich die Glucoseaufnahme im vitalen Herzmuskel zwei Monate nach Infarkt nicht verändert.

Bei Herzen in der akuten Ischämie wurde ein Shift vom Fettstoffwechsel zum Glucosestoffwechsel und eine Stimulation des Glycogenabbaus und der Glycolyse beschrieben (McNulty PH et al., 1996), (Rosenblatt-Velin N et al., 2001).

Sun berichtet eine substantielle Ischämie-bedingte Translokation von GLUT4-Molekülen zur Plasmamembran. Dabei kommt es bei Hypoxie und Ischämie zur 2,4-fachen bzw. 3,1-fachen Erhöhung der GLUT4-Moleküle in der Plasmamembran und einem 47%-igen bzw. 40%-igen Abfall des GLUT4-Gehalts in der Mitochondrienmembran (Sun D et al., 1994). Dies wurde auch von

anderen Autoren beschrieben (*Lopaschuk GD et al., 1997*), (*Young LH et al., 1997*).

Da GLUT4 insulinabhängig ist, wurde der Einfluss von Insulin auf die Glucoseaufnahme untersucht. Auch hier fanden wir keine signifikanten Unterschiede in der Glucoseaufnahme zwischen scheinoperierten und infarzierten Tieren (Aufnahme von Deoxyglucose bei einem Zusatz von 2mU/ml Insulin in mM/min/g: $0,61 \pm 0,08$ für scheinoperierte versus $0,69 \pm 0,10$ für infarzierte Herzen). Verglichen mit den Versuchsergebnissen ohne Insulinstimulation zeigte sich erwartungsgemäß eine signifikante Erhöhung der Glucoseaufnahme, um 170% bei den scheinoperierten (Aufnahme der phosphorylierten Deoxyglucose in mM/min/g: $0,36 \pm 0,04$ für scheinoperierte ohne Insulinstimulation versus $0,61 \pm 0,08$ für scheinoperierte mit Insulinstimulation; $p < 0,05$). Eine signifikant gesteigerte Aufnahmerate um 173% war auch bei den Herzen mit Myokardinfarkt nachzuweisen (Aufnahme der phosphorylierten Deoxyglucose in mM/min/g: $0,40 \pm 0,04$ für Infarktherzen ohne Insulinstimulation versus $0,69 \pm 0,10$ für Infarktherzen mit Insulinstimulation; $p < 0,05$).

Ein Defekt oder eine Downregulation der Glucosetransporter, insbesondere GLUT4, erscheinen unwahrscheinlich, da auch bei den Versuchen mit Insulinstimulation keine signifikanten Unterschiede zwischen den scheinoperierten und infarzierten Tieren festzustellen waren. Die Gruppe um Remondino hat durch ihre Untersuchungen festgestellt, dass die Expression von GLUT1 und GLUT4 acht Wochen nach dem akuten Myokardinfarkt zwischen Infarkttieren und Shams keine Unterschiede mehr aufwies, obwohl bei Untersuchungen, 24 Stunden nach der Infarktoperation, ein Anstieg von GLUT1 und ein Abfall von GLUT4 verzeichnet wurde (*Remondino A et al., 2000*). Zu diesem Ergebnis kamen auch Rosenblatt-Velin et al., wobei bei deren Versuchen ein erneuter Anstieg von GLUT1 und ein Abfall von GLUT4 20 Wochen nach der Infarktoperation bei den Herzen, die eine Herzinsuffizienz entwickelten, zu finden war. Bei den Herzen, die keine Herzinsuffizienz entwickelten, waren auch nach 20 Wochen keine Unterschiede zwischen den Infarkttieren und den scheinoperierten Herzen erkennbar (*Rosenblatt-Velin N et*

al., 2001). Insgesamt scheint die zelluläre Glucoseaufnahme nach Myokardinfarkt nur dann verändert zu sein, wenn eine Herzinsuffizienz nach dem Infarkt eintritt. In der Zeitspanne zwischen Infarkt ereignis und Herzinsuffizienz scheiden die Unterschiede der Glucoseaufnahme als Ursache für die Veränderungen von Funktion und Energiestoffwechsel am chronisch infarzierten Herzen aus. Auch die von Young et al. postulierte Hypothese, dass eine schwerere Ischämie die myokardiale Glucoseaufnahme trotz der Transportertranslokation in vivo durch einen Abfall der Glucosebereitstellung limitieren und die Glycolyse durch einen Abfall des intrazellulären pH-Werts inhibieren kann, scheint in unserer Arbeit durch das in acht Wochen nach Infarkt zu erwartende Kollateralenwachstum und durch den unveränderten pH-Wert zwischen scheinoperierten und infarzierten Herzen keinen Einfluss zu haben (*Young LH et al., 1997*).

Insgesamt scheinen die Veränderungen des Glucosestoffwechsels nur in der Phase des akuten Myokardinfarkts, sowie bei einsetzender Herzinsuffizienz von Bedeutung zu sein, so dass zu diesem Zeitpunkt eventuell therapeutisch interveniert werden kann. Während der Ausbildung der myokardialen Hypertrophie wäre eine mögliche therapeutische Intervention über diesen Mechanismus fraglich.

6.7 Limitationen des Modells

In dieser Arbeit wurde die mechanische Funktion und der Energiestoffwechsel des chronisch infarzierten Rattenherzens untersucht. Eine weiterführende biochemische Analyse, z.B. auf den Glucosegehalt der Infarkt narbe, des umgebenden Gewebes und des vitalen Myokards, wurde nicht durchgeführt. Da das Herz bei unseren Untersuchungen zur Bestimmung der Infarktgröße nach Versuchsende vollständig in Formalin fixiert und entwässert wurde, war die für die biochemischen Analysen notwendige Gewebeentnahme nicht möglich.

Die Ergebnisse der ³¹P-NMR-Spektroskopie im vorliegenden Versuchsaufbau stellen einen Mittelwert der Metabolite des Gesamtherzens dar. Lokale

Unterschiede im Energie- und Glucosestoffwechsel können mit der angewandten Technik nicht bestimmt werden.

Ebenso wurde das Ausmaß der Hypertrophie nicht direkt bestimmt. Die Veränderungen des Herzgewichts und des Körpergewichts stimmen aber mit Daten anderer Studien überein (*Horn M et al., 1999*), (*Neubauer S et al., 1995*). Damit kann man davon ausgehen, dass die von anderen Autoren bestimmten makroskopischen (erhöhtes Gewicht) und mikroskopischen Veränderungen (vermehrtes Zellvolumen und Zunahme der Myozytenlänge) eingetreten sind (*Zimmer H-G et al., 1990*), (*Remondino A et al., 2000*), (*Anversa P et al., 1986*).

Eine weitere Einschränkung besteht darin, dass der enddiastolische Druck zu Versuchsbeginn auf 10 mmHg gesetzt wurde. Obwohl dies einen Vergleich der einzelnen Herzen bei gleichem Preload gestattet, können dadurch die Daten der linksventrikulären Druckamplitude nicht unreflektiert bleiben. Die Gruppe um Neubauer konnte zeigen, dass der enddiastolische Druck bei infarzierten Tieren in vivo im Mittel bei 23 ± 4 mmHg liegt. Setzte man in vitro die Vorlast bei infarzierten Herzen auf den jeweiligen in vivo gemessenen Wert, ergaben sich keine Unterschiede in Bezug auf die linksventrikuläre Druckamplitude und damit auf das Doppelprodukt (linksventrikuläre Druckamplitude * Herzfrequenz als Parameter für die mechanische Funktion) zwischen scheinoperierten und infarzierten Tieren (*Neubauer S et al., 1995*). Andererseits kommt es durch den erhöhten enddiastolischen Druck zu einer Erhöhung des Wandstress bei den Herzen nach Myokardinfarkt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Glucoseaufnahme acht Wochen nach Myokardinfarkt keine Veränderungen im vitalen Myokard zeigt, sowohl ohne Insulinstimulation, als auch mit 2 mU/ml Insulinstimulierung. Die protektiven Eigenschaften von Glucose und Insulin in Bezug auf Funktion und Energiestoffwechsel sind scheinbar nur in der Akutphase und bei einsetzender Herzinsuffizienz wirksam.

7. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die Hypothese untersucht, ob die Glucoseaufnahme in die Zelle nach chronischem Myokardinfarkt limitiert ist. Falls dies der Fall sein sollte, ergibt sich die Frage, ob die eingeschränkte Glucoseaufnahme zu den oben beschriebenen Veränderungen in der mechanischen Funktion führt und/oder auch den Gehalt an Phosphocreatin limitiert. Außerdem soll untersucht werden, ob durch Insulinstimulation die Glucoseaufnahme und die mechanische Funktion verbessert und der Gehalt an Phosphocreatin erhöht werden kann.

Zu diesem Zweck wurden Wistar-Ratten nach der von Pfeffer et al. beschriebenen Methode infarziert (*Pfeffer MA et al., 1979*). Nach acht Wochen wurde das Herz nach der Methode von Langendorff isoliert und isovolumetrisch bei einem enddiastolischen Druck von 10 mmHg perfundiert. Mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie werden kontinuierlich energiereiche Phosphate (Phosphocreatin, ATP, Monophosphorsäureester) und der intrazelluläre pH gemessen.

Nach Stabilisierung und Aufnahme der Basiswerte wurden 5 mM Pyruvat und 5 mM Deoxyglucose als Substrat zur Verfügung gestellt. Deoxyglucose wird intrazellulär aufgenommen, phosphoryliert, und als phosphorylierte Deoxyglucose mit einer Resonanzlinie bei 8 ppm im ^{31}P -NMR-Spektrum detektiert. Parallele Untersuchungen zur Bestimmung der Glucoseaufnahme mit Insulinstimulation (2 mU/ml Insulin) wurden durchgeführt.

Die durchschnittliche Infarktgröße lag bei 45,7%. Das Herzgewicht war bei den Infarkt Herzen um 4% erhöht. Das Körpergewicht zeigte eine signifikante Zunahme um 17% bei den Infarkt Tieren. Daraus ergab sich ein um 15% erhöhtes Verhältnis von Herz- zu Körpergewicht bei den Kontrolltieren. Der Koronarfluss und die Herzfrequenz sind in beiden Gruppen unverändert. Die linksventrikuläre Druckamplitude hingegen zeigt eine signifikante Reduktion um

52% bei den Herzen nach Myokardinfarkt. Daraus ergibt sich ein signifikant erniedrigtes Doppelprodukt um 58% bei den Infarkttieren.

Das Verhältnis der energiereichen Phosphate (Phosphocreatin zu ATP) ist in der Infarktgruppe signifikant vermindert (23%). P_i und der pH-Wert zeigten keine signifikanten Unterschiede.

Bei den Untersuchungen zur Glucoseaufnahme zeigten sich keine Unterschiede zwischen Kontrolltieren und Ratten mit Myokardinfarkt (Aufnahme der phosphorylierten Deoxyglucose in mM/min/g: $0,36 \pm 0,04$ für scheinoperierte versus $0,40 \pm 0,04$ für infarzierte Herzen). Auch unter 2mU/ml Insulinstimulation kam es zu keiner Veränderung ($0,61 \pm 0,08$ für scheinoperierte versus $0,69 \pm 0,10$ für infarzierte Herzen), jedoch zu einer Steigerung der Glucoseaufnahme um das 1,7-fache im Vergleich zu den nicht Insulin stimulierten.

Da sich sowohl unter Kontrollbedingungen, wie auch unter der Insulinstimulation keine Unterschiede in der Glucoseaufnahme von Infarkt Herzen im Vergleich zu scheinoperierten Herzen zeigten, kann daraus geschlossen werden, dass die zelluläre Glucoseaufnahme acht Wochen nach einem Myokardinfarkt nicht limitierend ist und scheidet somit als Ursache für die Veränderungen von Funktion und Energiestoffwechsel aus. Dies deckt sich mit der literaturbekannten Veränderung von GLUT4 in der Akutphase und zum späteren Zeitpunkt bei Entwicklung einer Herzinsuffizienz

8. Literaturverzeichnis

Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y und Olivetti G: Myocardial infarction in rats: infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res* (58) 26-37; 1986

Bassingthwaigthe JB und Li Z: Heterogeneities in Myocardial Flow and Metabolism: Exacerbation with Abnormal Excitation. *Am J Cardiol* (83) 7H-12H; 1999

Bloch F: Nuclear induction. *Phys Rev* (70) 460-474; 1946

Bolognese L und Cerisano G: Early predictors of left ventricular remodeling after acute myocardial infarction. *Am Heart J* (138) 79-83; 1999

Caldwell JH, Martin GV, Raymond GM und Bassingthwaigthe JB: Regional myocardial flow and capillary permeability - surface area products nearly proportional. *Am. J. Physiol.* (267) H654-H666; 1994

Camici P, Ferrannini E und Opie LH: Myocardial Metabolism in Ischemic Heart Disease: Basic Principles and Application to Imaging by Positron Emission Tomography. *Progress in Cardiovascular Diseases* (32) 217-238; 1989

Cleutjens JPM, Blankesteyn WM, Daemen MJAP und Smits JFM: The infarcted myocardium: Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovascular Research* (44) 232-241; 1999

Depre C, Vanoverschelde J-LJ und Taegtmeyer H: Glucose for the Heart. *Circulation* (99) 578-588; 1999

Derome AE: Modern NMR techniques for chemistry research. Baldwin JE *Oxford Pergamon Press* 280; 1990

Doenst T und Taegtmeyer H: Complexities Underlying the Quantitative Determination of Myocardial Glucose Uptake with 2-Deoxyglucose. *Mol Cell Cardiol* (30) 1595-1604; 1998

Döring HJ und Dehnert H: The Isolated Perfused Warm-Blooded Heart According to Langendorff. Biological Measurement Techniques V *Biomesstechnik-Verlag March GmbH* Preprint of the 1st English Edition; 1987

Engels G, Muller E, Reynen K, Wilke N und Bachmann K: Evaluation of left ventricular inflow and volume by MR. *Magn Reson Imaging* (11) 957-964; 1993

Ertl G, Gaudron P und Hu K: Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental and clinical studies. *Basic Res Cardiol* (88) 125-137; 1993

Ertl G, Gaudron P, Neubauer S, Bauer B, Horn M, Hu K und Tian R: Cardiac dysfunction and development of heart failure. *European Heart Journal* (14) 33-37; 1993

Fishbein MC, MacLean D und Maroko PR: Experimental myocardial infarction in the rat. *Am J Pathol* (90) 57-70; 1978

Gadian DG: Nuclear magnetic resonance and its application to living systems. *New York: Oxford University Press*; 1982

Gaudron P, Eilles C, Kugler I und Ertl G: Progressive Left Ventricular Dysfunction and Remodeling After Myocardial Infarction Potential Mechanisms and Early Predictors. *Circulation* (87) 755-763; 1993

Herold G: Herzinfarkt, Innere Medizin. *G Herold* 192-203; 2000

Hesse M, Meier H und Zeeh B: Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie *Thieme Verlag* 478; 1979

Horn M, Remkes H, Dienesch C, Hu K, Ertl G und Neubauer S: Chronic high-dose creatine feeding does not attenuate left ventricular remodeling in rat hearts post-myocardial infarction. *Cardiovascular Research* (43) 117-124; 1999

Ingwall JS: Myocardial Energetics and Cardiac Contractility. Teaching material of Harvard Medical School, Boston

Koolman J und Röhm K-H: Energie- und Kohlenhydratstoffwechsel Taschenatlas der Biochemie. *Thieme Verlag* 116-152; 1998

Krück F: Herz-Kreislaufsystem Pathophysiologie, Pathobiochemie. Fricke G *Urban&Schwarzenberg Verlag* 1-64; 1994

Laser A, Ingwall JS, Tian R, Reis I, Hu K, Gaudron P, Ertl G und Neubauer S: Regional Biochemical Remodeling in Non-Infarcted Tissue of Rat Heart Post-Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* (28) 1531-1538; 1996

Litwin SE, Raya TE, Anderson PG, Litwin CM, Bressler R und Goldman S: Induction of Myocardial Hypertrophy After Coronary Ligation in Rats Decreases Ventricular Dilatation and Improves Systolic Function. *Circulation* (84) 1819-1827; 1991

Lopaschuk GD und Stanley WC: Glucose Metabolism in the Ischemic Heart. *Circulation* (95) 313-315; 1997

McNulty PH, Sinusas AJ, Shi CQ-X, Dione D, Young LH, Cline GC und Shulman GI: Glucose Metabolism Distal to a Critical Coronary Stenosis in a Canine Model of Low-Flow Myocardial Ischemia. *J. Clin. Invest* (98) 62-69; 1996

Moon RB und Richards JH: Determination of Intracellular pH by ³¹P Magnetic Resonance. *Journal of Biological Chemistry* (248) 7276-7278; 1973

Myers DW, Sobel BE und Bergmann SR: Substrate use in ischemic and reperfused canine myocardium: quantitative considerations. *Am. J. Physiol.* (253) H107-H114; 1987

Nagel E, Underwood R, Pennell D, Sechtem UP, Neubauer S, Wickline S, Hess OM, Schwaiger M und Fleck E: New developments in non-invasive cardiac imaging: critical assessment of the clinical role of cardiac magnetic resonance imaging. *European Heart Journal* (19) 1286-1293; 1998

Neubauer S, Horn M, Naumann A, Tian R, Hu K, Laser M, Friedrich J, Gaudron P, Schnackerz K, Ingwall JS und Ertl G: Impairment of Energy Metabolism in Intact Residual Myocardium of Rat Hearts with Chronic Myocardial Infarction. *J. Clin. Invest* (95) 1092-1100; 1995

Ohira Y, Ishine S, Tabata I, Kurata H, Wakatsuki T, Sugawara S, Yasui W, Tanaka H und Kuroda Y: Non-Insulin and Non-Exercise Related Increase of Glucose Utilization in Rats and Mice. *Japanese Journal of Physiology* (44) 391-402; 1994

Paternostro G, Clarke K, Heath J, Seymour AML und Radda GK: Decreased GLUT-4 mRNA content and insulin-sensitive deoxyglucose uptake show insulin resistance in the hypertensive rat heart. *Cardiovascular Research* (30) 205-211; 1995

Pfeffer JM, Pfeffer MA und Braunwald E: Influence of Chronic Captopril Therapy on the Infarcted Left Ventricle of the Rat. *Circ Res* (57) 84-95; 1985

Pfeffer MA und Pfeffer JM: Ventricular Enlargement and Reduced Survival after Myocardial Infarction. *Circulation* (75) IV93-IV97; 1987

Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA und Braunwald E: Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats. *Circ Res* (44) 503-512; 1979

Purcell EMT und Pound RV: Resonance absorption by nuclear magnetic moments in a solid. *Phys Rev* (69) 37-38; 1946

Remondino A, Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Tardy I, Papageorgiou I, Dorsaz P-A, Jorge-Costa M und Lerch R: Altered Expression of Proteins of Metabolic Regulation during Remodeling of the Left Ventricle after Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* (32) 2025-2034; 2000

Rosenblatt-Velin N, Montessuit C, Papageorgiou I, Terrand J und Lerch R: Postinfarction heart failure in rats is associated with upregulation of GLUT-1 and downregulation of genes of fatty acid metabolism. *Cardiovascular Research* (52) 407-416; 2001

Saks VA, Chernousova GB, Gukovsky DE, Smirnov VN und Chavoz EI: Studies of Energy Transport in Heart Cells. *European Journal of Biochemistry* (57) 273; 1975

Sanbe A, Tanonaka K, Hanaoka Y, Katoh T und Takeo S: Regional Energy Metabolism of Failing Hearts Following Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* (25) 995-1013; 1993

Silbernagl S: Herzinfarkt Taschenatlas der Pathophysiologie. Silbernagl S und Lang F *Thieme Verlag* 220-223; 1998

Sokoloff L, Reivich M, Kennedy C, des Rosiers MH, Patlak CS, Pettigrew KD, Sakurada O und Shinohara M: The [14C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: Theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat. *J Neurochem* (28) 897-916; 1977

Solomon SD, Greaves SC, Rayan M, Finn P, Pfeffer MA und Pfeffer JM: Temporal Dissociation of Left Ventricular Function and Remodeling Following Experimental Myocardial Infarction in Rats. *Journal of Cardiac Failure* (5) 213-223; 1999

Stanley WC, Lopaschuk GD und McCormack JG: Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart. *Cardiovascular Research* (34) 25-33; 1997

Sun D, Nguyen N, DeGrado TR, Schwaiger M und Brosius III FC: Ischemia Induces Translocation of the Insulin-Responsive Glucose Transporter GLUT 4 to the Plasma Membrane of Cardiac Myocytes. *Circulation* (89) 793-798; 1994

Taegtmeyer H: Metabolism - The Lost Child of Cardiology. *Journal of the American College of Cardiology* (36) 1386-1389; 2000

Taegtmeyer H, King LM und Jones BE: Energy Substrate Metabolism, Myocardial Ischemia, and Targets for Pharmacotherapy. *Am J Cardiol* (82) 54K-60K; 1998

Thomas C, Schmitz-Moormann P und Gebert G: Herzinfarkt Allgemeine Pathologie. *Schattauer Verlag* 215; 1994

Tian R, Gaudron P, Neubauer S, Hu K und Ertl G: Alterations of Performance and Oxygen Utilization in Chronically Infarcted Rat Heart. *J Mol Cell Cardiol* (28) 321-330; 1996

Vleeming W, van Rooij HH, Wemer J und Porsius AJ: Cardiovascular Responses to the Stereoisomers of Dobutamin in Isolated Rat Hearts 48 Hours after acute Myocardial Infarction. *Journal of Cardiovascular Pharmacology* (17) 634-640; 1991

WHO: The World Health Report 2001.
<http://www.who.int/whr2001/2001/main/en/pdf/annex2.en.pdf>; 2001

Young LH, Renfu Y, Russell R, Hu X, Caplan M, Ren J, Shulman GI und Sinusas AJ: Low-Flow Ischemia Leads to Translocation of Canine Heart GLUT-4 and GLUT-1 Glucose Transporters to the Sarcolemma In Vivo. *Circulation* (95) 415-422; 1997

Zimmer H-G, Gerdes AM, Lortet S und Mall G: Changes in Heart Function and Cardiac Cell Size in Rats with Chronic Myocardial Infarction. *J Mol Cell Cardiol* (22) 1231-1243; 1990

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. S. Neubauer danke ich recht herzlich für die freundliche Überlassung des Themas, für die große Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit, sowie für die interessanten Fortbildungen.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch Herrn Prof. Dr. rer. nat. Dipl.-Chem. M. Horn für die wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit sehr beigetragen haben.

Mein Dank gilt weiterhin Frau Wagner und Frau Leupold für die Einführung in die Präparation der Tiere, Frau Dienesch für die Unterstützung bei den Infarktoperationen, Frau Bauer für die Hilfe beim Färben der Präparate und der Bestimmung der Infarktgröße, und Frau Meister für die hilfreiche Unterstützung bei der Literatursuche in der Bibliothek.

Ebenfalls danken möchte ich an dieser Stelle meiner Frau Martina, meinen Eltern, sowie meinen Geschwistern. Ihre mentale Unterstützung hat mit zum erfolgreichen Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Jens Höning
Geburtsdatum	28.11.1974
Geburtsort	Weiden i. d. OPf., Deutschland
Familienstand	verheiratet
Staatsangehörigkeit	deutsch
Konfession	römisch-katholisch

Schulbildung

09/1981-07/1985	Volksschule Mitterfels-Haselbach
09/1985-07/1994	Johannes-Turmair-Gymnasium Straubing Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung

10/1994-09/1995	Studium der Forstwissenschaft Ludwig-Maximilians-Universität München
seit 04/1996	Studium der Humanmedizin Bayer. Julius-Maximilians-Universität Würzburg
03/1998	Physikum
03/1999	Erstes Staatsexamen
03/2002	Zweites Staatsexamen
05/2003	Drittes Staatsexamen
seit 08/2003	AiP in der Abteilung für Innere Medizin Kreiskrankenhaus Bogen/Niederbayern

Praktische Erfahrung

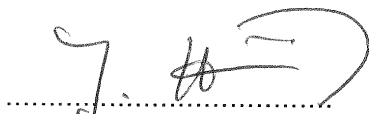
08/1998	Famulatur: Anaesthesie und operative Intensivmedizin Stiftung Juliusspital Würzburg
04/1999	Famulatur: Innere Medizin Kreiskrankenhaus Bogen/Niederbayern

04/2000	Famulatur: Orthopädie Gemeinschaftspraxis Dres. Eichhorn, Strobel, Bertagnoli et. al. Straubing/Niederbayern
08/2000	Famulatur: Gynäkologie Bezirkskrankenhaus Schwaz/Tirol, A
04/2002-08/2002	1. PJ-Tertial: Chirurgie: Stiftung Juliusspital, Würzburg
08/2002-12/2002	2. PJ-Tertial: Anaesthesiologie Klinik für Anaesthesiologie der Universität Würzburg
12/2002-03/2003	3. PJ-Tertial: Innere Medizin Stiftung Juliusspital, Würzburg
11/2000-12/2001	Sitzwache: Anaesthesiologische Intensivstation der Universität Würzburg

Außerstudentische Aktivitäten

10/1995-01/1996 seitdem	Ausbildung zum Rettungssanitäter Ehrenamtliche Tätigkeit als Rettungssanitäter beim BRK Straubing- Bogen und Würzburg mit regelmäßigen Einsätzen auf Rettungswagen
----------------------------	--

Bogen, Oktober 2003



Jens Höning