

**Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik I
der Universität Würzburg**

Direktor: Professor Dr. med. Georg Ertl

**Untersuchungen über die Effekte von Testosteron bei
Reperfusion nach myokardialer Ischämie auf die
linksventrikuläre Funktion bei der Ratte.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Isabel Christina Kirsch
aus Merzig**

Würzburg, Mai 2006

Referent: Prof. Dr. med. B. Allolio

Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. S. Maier

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.11.2006

Die Promovendin ist Ärztin

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG	1
1.1.	Hintergrunddaten	1
1.2.	Östrogene und kardiovaskuläre Effekte	1
1.3.	Sexuelle Steroidhormone und myokardiale Effekte	2
1.4.	Überblick zur Testosteronkinetik	4
1.5.	Grundlagen zum Myokardinfarkt	5
1.6.	Zeitliche Abläufe	6
1.7.	Ventrikuläres Remodeling	8
1.8.	Therapeutische Ansätze	9
1.9.	Fragestellung	10
2.	MATERIAL UND METHODIK	11
2.1.	Tiermodell	11
2.2.	Präparation des isolierten Rattenherzens	13
2.3.	Aufzeichnung des linksventrikulären Drucks	15
2.4.	Aequorin-Applikation und Normalisierung der Aequorin-Lumineszenz	16
2.5.	Analyse der Ca^{2+} -Überladung in den ersten Minuten der Reperfusion	18
2.6.	Experimentelle Protokolle (Aequorin-Experiment)	19
2.7.	Quantifizierung des intrazellulären Ca^{2+}	21
2.8.	Berechnung von σ_s und σ_d und der relativen Wanddicke	23
2.9.	Analyse der calciumregulierenden Proteine	23

2.10. Immunoblot-Auswertung	24
2.11. Materialien	25
2.12. Immunoassay	26
2.13. Statistische Auswertung	26
3. ERGEBNISSE	27
3.1. Tiercharakteristika	27
3.2. Hormonbestimmung	28
3.3. Behandlungseffekt auf physiologische und mechanische Funktionsleistungen vor Beginn der Ischämie	29
3.4. Herzfunktion während Ischämie und Reperfusion	32
3.5. Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Präischämisch, während Ischämie und Reperfusion	35
3.6. Expression calciumregulierender Proteine [Phospholamban/ Na^+ - Ca^{2+} -Exchanger/Ryanodin- Rezeptor Typ2/SERCA 2a]	38
4. DISKUSSION	44
4.1. Klinische Bedeutung	48
4.2. Limitationen des Modells	49
5. ZUSAMMENFASSUNG	50
6. LITERATURNACHWEIS	52

1. Einleitung und Fragestellung

1.1. Hintergrunddaten

In den westlichen Industrienationen stellen Herz-Kreislaufkrankungen nach wie vor die häufigste Todesursache dar, wobei in dieser Gruppe der Myokardinfarkt und die Herzinsuffizienz an erster Stelle stehen [1]. Allein die Kosten für Diagnose, Behandlung und Prävention der jährlich ca. 200 000 Neuerkrankungen betragen etwa 2% des Gesundheitsbudgets der Bundesrepublik [2]. Als Risikofaktoren der Entstehung einer koronaren Herzerkrankung werden Alter, Geschlecht, Hyperlipid- bzw. Hypercholesterinämie, HDL/LDL-Quotient, Nikotinkonsum, Hypertonus, Diabetes mellitus, Adipositas, Familiengeschichte und bereits vorhandene Herz-Kreislauf-Erkrankungen [3] genannt. Betrachtet man das Verteilungsmuster der Erkrankten hinsichtlich Alter und Geschlecht ergibt sich ein heterogenes Bild.

1.2. Östrogene und kardiovaskuläre Effekte

Interessant ist, dass die Inzidenz der koronaren Herzerkrankung (KHK) bei prämenopausalen Frauen deutlich geringer ist im Vergleich zu Männern gleichen Alters [4], [5]. Dieser signifikante Geschlechtsunterschied wurde ursprünglich auf die positive Wirkung von 17β -Östradiol (E_2) zurückgeführt [6]. Eine Reihe tierexperimenteller Studien zeigten mehrere günstige Wirkungen von E_2 auf das kardiovaskuläre System [7], einschließlich einer Besserung des ischämie- und reperfusion-induzierten Myokardschadens [8]. Eine dieser kardioprotektiven Östrogenwirkungen ist zum Beispiel der antiarrhythmogene Effekt des E_2 , was auf eine Beeinflussung des intrazellulären Calciums $[Ca^{2+}]_i$ am Herzen zurückzuführen ist. Im Gegensatz hierzu konnten jedoch klinische Studien an postmenopausalen Frauen diesen protektiven Effekt der Östrogene nicht bestätigen [9]. So erfolgte der vorzeitige Abbruch der WHI-Studie („Women`s Health Initiative“) zur Östrogen-Gestagen-Kombination (konjugierte Östrogene und Medroxyprogesteronacetat) aufgrund des erhöhten Risikos für das Auftreten kardiovaskulärer Ereignisse

(Lungenembolien, Herzinfarkte, Schlaganfälle), das bereits im ersten Jahr der Hormoneinnahme deutlich wurde. Nach dem vierten Behandlungsjahr zeigte sich außerdem eine sichtbare Zunahme der Brustkrebsinzidenz. Diese Risiken wurden von vielen Fachgesellschaften, wie zum Beispiel der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie (DGE), sowie der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie (DGK), höher bewertet als der potentielle Nutzen (→ vermindertes Risiko für Frakturen, Gebärmutterkrebs und kolorektale Karzinome) [6]. So ist derzeit auch nach Ansicht des Bundesinstitutes für Arzneimittel- und Medizinprodukte (BfArM) die Gabe von Östrogenen zur Primär- und Sekundärprävention der KHK nicht angeraten: “Eine Behandlung mit Östrogen/Gestagen-Kombinationen zum Zweck der Vorbeugung vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen..., erscheint nach dieser Studie keinesfalls mehr sinnvoll“(Zitat aus der Pressemitteilung der BfArM vom 12.Juli 2002).

Im Vergleich dazu ist die Rolle der männlichen Geschlechtshormone hinsichtlich ihrer kardiovaskulären Bedeutung lange Zeit vernachlässigt worden.

1.3. Sexuelle Steroidhormone, myokardiale Effekte und Kinetik

Man weiß heute, dass sexuelle Steroidhormone sowohl direkte als auch indirekte Effekte auf die kardiovaskuläre Funktion besitzen. Die Beeinflussung des koronaren Gefäßtonus durch Sexualsteroidhormone ist bereits in zahlreichen Studien beobachtet worden. Crews et al.[10] untersuchten die Wirkungen von E_2 , Progesteron und Testosteron auf die vaskuläre Reaktivität an isolierten de-endothelialisierten Koronararterienstreifen von kastrierten männlichen Schweinen. Die drei Hormone bewirkten eine Relaxation koronarer glatter Muskelzellen und führten zu einer Abnahme der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$, hauptsächlich durch Inhibition des Calciumeinstroms aus dem Extrazellulärraum. Der Einfluss des koronaren Gefäßtonus durch Sexualsteroidhormone auf Nitrit-oxidativem (NO) Wege ist immer noch Gegenstand von Diskussionen: Während Östradiol das NO in Endothelzellen hochreguliert [11] [12], existieren Unstimmigkeiten hinsichtlich der Wirkung des Testosterons. Yue et al. [13] zeigten, dass Testosteron eine endothelunabhängige koronare Gefäßrelaxation induziert. Balfagón et al. [14] verdeutlichten, dass wiederum der supraphysiologische Gebrauch anaboler

Androgene (aA) mit einer abgeschwächten Aktivität des vaskulären NO-Systems in vitro einhergeht.

Lediglich in Einzelfalldarstellungen konnte gezeigt werden, dass die anabole Gabe von männlichen Steroidhormonen mit dem vermehrten Auftreten von Myokardinfarkten, dem plötzlichen Herztod und einem arteriellen Hypertonus [15] [16] [17] [18] assoziiert war. Kontrollierte klinische Studien fehlen hierzu jedoch.

Diese Einzelfallberichte führten jedoch zu der Annahme, dass Androgene schädlich für das kardiovaskuläre System sind.

Die im allgemeinen als „Anabolika“ bekannten Stoffe setzen sich aus einer Vielzahl unterschiedlichster Steroide mit unterschiedlichen pharmakologischen Eigenschaften zusammen. Deshalb ist es schwierig, die Inzidenz von kardiovaskulärer Morbidität, die in Assoziation mit der Einnahme von anabolen männlichen Steroiden steht, zu bestimmen. Erschwerend kommt noch die zunehmende Dunkelziffer verdeckten Anabolikaabusus hinzu. Ebenfalls belastet die Tatsache, dass im Leistungssport Androgene oft in Kombination mit anderen Medikamenten, wie zum Beispiel Schilddrüsen- oder Wachstumshormonen, eingenommen werden, eine kontrollierte Ermittlung der oben erwähnten Inzidenz. Bis jetzt ist es noch keiner klinischen Studie gelungen eine schlüssige Verknüpfung zwischen der anabolen Einnahme männlicher Steroide und den tödlichen kardiovaskulären Ereignissen darzustellen. Epidemiologische Daten sowie eine neuere Interventionsstudie deuten sogar eher auf eine neutrale oder auch günstige Wirkung der physiologisch zirkulierenden Androgene auf die KHK bei Männern hin [19] [20] .

Der zunehmende Einsatz von Testosteron beim alternden Mann zur Therapie des Hypogonadismus gab nur den Anlass, die Wirkungen der männlichen Geschlechtshormone auf das kardiovaskuläre System genauer zu untersuchen [21] . Die Tatsache, dass sich gerade in dieser Altersgruppe viele Patienten mit potentieller oder aber bekannter KHK befinden, wirft die Frage nach kardialen androgenen Langzeiteffekten auf. Da in Deutschland die meisten Herzkatheterinterventionen vorgenommen werden, hat die Prävention und Therapie reperfusionsbedingter

Myokardschäden aufgrund der zunehmenden Verfügbarkeit interventioneller Therapieverfahren für ein immer breiter werdendes Patientenkollektiv an Bedeutung gewonnen. Ferner führt der Gebrauch von Testosteronestern, wie dem Testosteron-*enanthat*, bei Männern zu kurzzeitigen supraphysiologischen Androgenspiegeln. Die Wirkung von Testosteron auf die kardiovaskuläre Gesundheit ist damit auch deshalb von großer Bedeutung für das Gesundheitswesen. Die Assoziation von anabolen androgenen Steroiden mit dem Myokardinfarkt und dem plötzlichen Herztod [10] deuten an, dass Androgene negative Auswirkungen auf die Ischämietoleranz des Herzmuskelgewebes besitzen könnten. Aus diesem Grund untersuchten wir am isolierten Rattenherzmodell den Einfluss einer Testosteronbehandlung auf die ventrikuläre (Dys-)Funktion, die durch globale Ischämie und die nachfolgende Reperfusion verursacht wird.

1.4. Überblick zur Testosteronkinetik

Zum besseren Verständnis ist es sinnvoll einen kurzen Überblick über die Kinetik der sexuellen Steroidhormone am Beispiel des Testosterons zu geben. Wie die übrigen Sexualhormone unterliegt auch das Testosteron dem komplexen Rückkopplungs-Regulationssystem der hypothalamisch/hypophysären Achse. Durch die Bindung von LH (Luteinisierendes Hormon) an spezifische Membranrezeptoren der Leydig-Zellen wird die Bildung von Testosteron aus dem Grundbaustein Cholesterin über verschiedene Zwischenstufen, u.a. Pregnenolon, Dehydroepiandrosteron und Androstendion, stimuliert [22]. Dabei erfolgt die Testosteronausschüttung nicht kontinuierlich sondern unterliegt einer zirkadianen Rhythmik mit einem Maximum am Morgen [23]. Über ein spezielles Trägermolekül, dem Testosteron-Östrogenbindenden Protein, wird Testosteron im Plasma zu den Zielgeweben transportiert und in der Peripherie über die 5α -Reduktase zu Dihydrotestosteron mit einer etwa zweieinhalbfachen biologischen Wirksamkeit reduziert. An den Zielzellen angelangt dockt das Steroidhormon an einem spezifisch cytosolischen Rezeptor an und kann so u.a. seine typische androgene und anabole Wirkung entfalten [22].

Für eine valide Aussage hinsichtlich der androgenen Wirkung auf kardiovaskuläre Effekte war es wichtig, ein Testosteronderivat zu substituieren, das möglichst einfach

zu handhaben ist und gleichzeitig konstante Wirkspiegel garantiert. Mit dem mittlerweile unter dem Handelsnamen Nebido® zugelassenem Testosterondecanoat fand sich eine derartige Substanz. Sie kann intramuskulär appliziert werden, hat ein gleichmäßiges pharmakologisches Profil ohne die unerwünschten supraphysiologischen Wirkspiegel und weist eine deutlich längere Halbwertszeit als das vergleichbare Testosteronenanthat auf [24]. Durch die intramuskuläre Verabreichung in öliger Suspension kommt es zu einer kontinuierlichen Freisetzung von Testosteron unter Umgehung des first-pass-Effektes durch die Leber, wodurch - verglichen mit einer oralen Substitution - niedrige Gesamtdosen erforderlich werden.

1.5. Grundlagen zum Myokardinfarkt

Die Ursachen einer myokardialen Ischämie sind unterschiedlicher Natur. Seltenerere Ereignisse sind u.a. Embolien, Vasospasmen oder entzündliche Veränderungen an den Koronararterien. Am weitaus häufigsten lassen sich atherosklerotische Veränderungen der Herzkranzgefäße nachweisen, die zu einer hochgradigen Stenose oder zu einem kompletten thrombembolischen Verschluss einer Koronararterie führen. Hierbei entstehen durch subendotheliale Ablagerungsprozesse atherosklerotische Plaques, die das Gefäßlumen einengen. Kommt es an diesen vermehrt vulnerablen Stellen zu einer Schädigung des Gefäßendothels, führt dies zur Freilegung von Extrazellulärmatrix, wodurch die Blutgerinnung aktiviert wird und die Bildung eines Thrombus resultiert. Dieser verschließt das Gefäß oder engt es soweit ein, dass eine Versorgung des nachstehenden Gewebes nicht in ausreichendem Umfang gewährleistet wird [3]. Die Folge ist eine irreversible Zellschädigung oder ein Myokardinfarkt, dessen Ausdehnung vom Versorgungsgebiet des infarktassoziierten Gefäßes, einer möglichen Kollateralversorgung sowie der Dauer des Koronarverschlusses abhängt [25]. Wird dieses Akutereignis überlebt, kommt es zu weitreichenden Umbau- und Anpassungsprozessen des Organismus, was auch als Remodeling bezeichnet wird. Diese Prozesse zielen darauf ab, das verlorengegangene Myokard zu kompensieren [26], was allerdings häufig nicht gelingt. Es kommt zur Hypertrophie, Fibrosierung und Dilatation des Ventrikels. Das äußert sich klinisch u.a. in Stauungserscheinungen, Leistungsschwäche, Kurzatmigkeit etc. und wird

unter dem Syndrom der Herzinsuffizienz subsummiert. Zahlreiche Therapieschemata versuchen diesen deletären Veränderungen entgegenzuwirken.

Ein entscheidender Faktor, der zur Senkung der Mortalität und Morbidität nach einem Myokardinfarkt beiträgt, ist die frühe Reperfusion [27]. Hierunter versteht man die Wiedereröffnung eines okkludierten Gefäßes, wodurch die Versorgung des nachfolgenden Gewebes mit Sauerstoff und Substrat sowie der Abtransport von Stoffwechselprodukten ermöglicht werden.

Als konservative Reperfusionsmöglichkeit steht die frühzeitige pharmakologische Lysetherapie mit unterschiedlichen Fibrinolytika (Streptokinase, Urokinase, PTase u.a.) zur Auflösung eines Thrombus zur Verfügung.

Als interventionelle Therapieform ist die frühe Revaskularisierung durch PTCA im Herzkatheterlabor fester Bestandteil der Myokardinfarktbehandlung [26].

Beiden Therapieansätzen ist gemeinsam, dass der therapeutische Erfolg stark von der Zeit zwischen Symptombeginn und Revaskularisierung abhängt. Linksventrikuläre Pumpfunktion, Infarktausdehnung und als Langzeitwirkung das Remodeling werden durch eine frühe Behandlung deutlich günstiger beeinflusst als mit zeitverzögerter Therapie [27]. Aber auch die späte Reperfusion bringt, wie neuere Untersuchungen zeigen konnten, noch deutliche Vorteile gegenüber der Nicht-Reperfusion [28].

1.6. Zeitliche Abläufe

Durch die signifikante Okklusion oder Stenose eines Koronargefäßes kommt es bei unzureichender Kollateralisierung der myokardialen Blutversorgung im nachgeschalteten Gewebe zu Hypoxie und metabolischer Minderversorgung. Es resultiert ein intrazelluläres Energiedefizit mit Anhäufung von Endprodukten des anaeroben Stoffwechsels (Laktat, NADH/H⁺ und Protonen). Daraus resultiert eine Störung des Elektronenmilieus der Kardiozyten, insbesondere eine Kaliumverarmung. Dies führt zu Veränderungen des Membranpotentials, sichtbar als infarktspezifische ST-Veränderungen im EKG, mit schwerwiegenden elektrophysiologischen Konsequenzen wie ventrikuläre Ektopien und Kammerflimmern. Gleichzeitig häuft sich zytosolisches Kalzium an, was zu verzögerten Nachdepolarisationen führt und die

Entstehung ventrikulärer Arrhythmien fördert. Darüber hinaus führt die zytosolische Kalziumanhäufung zur Einschränkung der Kontraktilität des Myokards [29] .

Durch den intrazellulären Energiemangel, der sich in einer Verarmung an ATP niederschlägt, kommt es zu einem Ausfall der Na^+/K^+ -ATPase. Dies bedingt den unkontrollierten Natriumeinstrom nach intrazellulär, mit dem gleichzeitig ein Wassereinstrom verbunden ist. Es entwickelt sich im Zeitraum von 1-4 Stunden ein intrazelluläres Ödem mit konsekutiver Ruptur des Sarkolemmes [3] .Durch freigesetzte Enzyme, freie Fettsäuren, kalziumaktivierte Phospholipasen und freie Radikale werden Zellstrukturen irreversibel geschädigt. Es kommt zur Entstehung einer Nekrose. Diese ist makroskopisch und lichtmikroskopisch erst ab einem Infarktalter von ca. 4 Stunden durch zunehmende Zelleosinophilie, nukleäre Pyknose und beginnender Zelldegeneration sichtbar.

Etwa 12-24 Stunden nach Infarktbeginn lässt sich lichtmikroskopisch die Einwanderung von neutrophilen Granulozyten nachweisen, welche nach ca. 2-4 Tagen ihre maximale Konzentration erreichen. Eingeleitet wird diese Migration durch eine vom Zelluntergang hervorgerufene Entzündungsreaktion mit Aktivierung von Komplement und Freisetzung von Interleukin 6 und 8 (IL-6, IL-8). Durch die Granulozyten erfolgt eine Auflockerung des Gewebes und Anlockung von Makrophagen, welche das nekrotische Material abräumen, sowie von Lymphozyten und Plasmazellen. Im weiteren Verlauf von 11-14 Tagen beginnt an den Infarktträndern die Einsprossung von Granulationsgewebe, u.a. bestehend aus Fibroblasten und Angioblasten. Es kommt zur Bildung von Extrazellulärmatrix, v.a. von Kollagen III, später von Kollagen I. Im Laufe der Zeit tritt eine fortschreitende Zellverarmung der Narbe ein. Es resultiert eine reife Narbe [29] . Diese ist zwar belastungsstabil, kann aber die Funktion des verlorengegangenen Myokards nicht ersetzen. Die Folge sind tiefgreifende Umbauprozesse, die, wie bereits erwähnt, mit dem Schlagwort „Remodeling“ bezeichnet werden.

1.7. Ventrikuläres Remodeling

In der Frühphase des Infarktes und in den nachfolgenden Monaten kommt es zu Umbauvorgängen des gesamten linken Ventrikels. Diese sind Zeichen der Anpassung des Herzens in Form, Größe und Funktion an veränderte mechanische und neurohumorale Bedingungen.

Schon frühzeitig nach einem Infarkt lässt sich die Abnahme der Wandstärke und Ausdehnung des Infarktgebietes mit konsekutiver Dilatation des gesamten linken Ventrikels feststellen. Durch die infarktbedingte Zunahme des ventrikulären Umfangs und der geänderten Ventrikelgeometrie kommt es zum Anstieg der diastolischen Wandspannung. Es entsteht kompensatorisch eine inadäquate Hypertrophie des nichtinfarzierten Myokards mit systolischer Funktionseinschränkung und weiterer Zunahme der Füllungsdrücke. Daraus resultieren ein Fortschreiten der linkventrikulären Dilatation sowie ein Anstieg des myokardialen Sauerstoffverbrauches [26].

Die anatomisch-physiologischen Veränderungen finden wiederum auf biochemischer Ebene ihr Korrelat. Die oben beschriebene Ausdehnung der Infarktzone resultiert aus dem Abbau von Kollagen durch Serinproteasen und Metalloproteinasen (MMPs) mit der Folge der ventrikulären Dilatation. Diese ist verantwortlich für einen Anstieg des Wandstresses. Durch die Wirkung von MMPs und Integrinen kommt es weiterhin zu einer vermehrten Sklerosierung des Restmyokards. Hämodynamische Störungen stimulieren das sympathisch adrenerge System zur Synthese von Katecholaminen, aktivieren das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) und fördern die Bildung von natriuretischen Peptiden (ANP, BNP). Diese Faktoren scheinen zunächst durch Reduktion des Gefäßvolumens, Anstieg des systemischen Gefäßwiderstands, durch Normalisierung des ventrikulären Füllungsvolumens und einer Verbesserung der Pumpfunktion günstigen Einfluss zu haben. Letztendlich führt aber der erhöhte Level dieser humoralen Faktoren zu einer Hypertrophie und Sklerosierung des Myokards, was sich negativ auf die Pumpfunktion und die Ökonomie des Herzens auswirkt. Im weiteren Verlauf gelingt es durch diese Umbauprozesse dem Herzen nicht sich an die veränderten Bedingungen anzupassen und es resultiert eine Herzinsuffizienz, welche mit einer hohen Morbidität und Mortalität einhergeht [18,25,28].

1.8. Therapeutische Ansätze

Die unterschiedlichen Ansätze zur Therapie des akuten Myokardinfarktes zielen darauf ab, die hohe Mortalität und Morbidität entscheidend zu reduzieren. Zum Einsatz kommen pharmakologische und interventionelle Therapieschemata, wobei hier noch zwischen der Akut- und der Langzeittherapie zu unterscheiden ist.

Die Akuttherapie des Myokardinfarktes zielt darauf ab, die Kreislaufsituation des Patienten zu stabilisieren und den schnellstmöglichen Transport in eine entsprechende Klinik zu ermöglichen. Im Vordergrund stehen die maximale Schonung des Herzens zur Senkung des Sauerstoffverbrauchs, eine ausreichende Analgosedierung sowie die Beherrschung von Rhythmusstörungen. Gleichzeitig wird versucht, ein Vorranschreiten des Infarktgeschehens durch Gabe von Antikoagulationen (Heparin, ASS u.a.) zu minimieren. Letztendlich sollte die Wiedereröffnung des okkludierten Gefäßes angestrebt werden, da sich so die Mortalität, die Infarktausdehnung und später die Herzinsuffizienzrate reduzieren lässt. Gleichzeitig werden eine verbesserte linksventrikuläre Funktion und günstige Auswirkungen auf das Remodeling erreicht [27].

Wird das Akutereignis überlebt, richtet sich die weitere Therapie darauf, einen Folgeinfarkt zu verhindern, das Remodeling günstig zu beeinflussen und somit einer Herzinsuffizienz entgegenzuwirken. Eine manifeste Herzinsuffizienz wird am Schweregrad der Beeinträchtigung gemessen - meist nach der Einteilung der New York Heart Association (NYHA I-IV) – und entsprechend den subjektiven Beschwerden therapiert. Zum Einsatz kommen ACE-Hemmer, AT1-Blocker, Diuretika, β -Blocker, Herzglykoside und Aldosteron-Antagonisten.

Besonders unter ökonomischen Gesichtspunkten spielt in Zeiten knapper finanzieller Mittel die Prävention eine immer größere Rolle. Präventivmaßnahmen können das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko reduzieren und somit einen Beitrag zur Kostendämpfung im Gesundheitssystem leisten [2].

Eine entscheidende Rolle spielt die Minimierung der beeinflussbaren Risikofaktoren. Dazu ist die aktive Mitarbeit des Patienten unabdingbar, um Ziele wie Reduktion des Übergewichts, regelmäßige körperliche Aktivität und - allen voran - die Nikotinabstinenz zu erreichen.

Weitere Maßnahmen erfordern eine enge Kooperation zwischen Patient und behandelndem Arzt, da vielfach nicht nur ein Risikofaktor behandelt werden muss, sondern Patienten an mehreren Erkrankungen leiden, die ein beträchtliches kardiovaskuläres Risiko bergen. Umso wichtiger sind deshalb eine straffe Einstellung des Diabetes mellitus und Hypertonus, eine Reduktion der Hyperlipoproteinämie und der Dyslipoproteinämie, da besonders diese Patienten von einer Präventivtherapie profitieren [2,28] .

Weitere Risikofaktoren wie Alter, Geschlecht und familiäre Belastung sind präventiv nicht zu beeinflussen. Allerdings stellen wir, wie bereits erwähnt, Unterschiede im kardiovaskulären Risiko zwischen prämenopausalen Frauen und Männern gleichen Alters fest. Als mögliche Ursache wurde die kardioprotektive Wirkung weiblicher Geschlechtshormone angeführt. Da männliche Sexualhormone sowohl direkten als auch indirekten Einfluss auf die kardiovaskuläre Funktion haben, könnte sich hieraus eine therapeutische Konsequenz ableiten lassen.

1.9. Fragestellung

Die weiblichen Geschlechtshormone galten, wie bereits erwähnt, lange Zeit als protektiver Faktor für das kardiovaskuläre System und sind auch gegenwärtig Gegenstand intensiver Forschung. Im Gegensatz dazu wurden die androgenen Steroidhormone für das Herz-Kreislauf-System als eher schädlich angesehen, was mit der erhöhten Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen bei Männern begründet wurde. Die Datenlage hierzu ist jedoch nicht eindeutig und bedarf einer weitergehenden Untersuchung.

Diese Arbeit soll nun klären, welchen Einfluss die männlichen Sexualhormone während einer Myokardischämie mit nachfolgender Reperfusion auf das kardiovaskuläre System im Hinblick auf den Ischämie-Reperfusionsschaden haben.

Insbesondere soll dargestellt werden, wie sich hierunter die hämodynamischen und morphologischen Parameter ändern.

Weiterhin soll ein Einblick darin gegeben werden, wie der intrazelluläre Calciumstoffwechsel nach einem Myokardinfarkt unter dem Einfluss von Stereoidhormonen beeinflusst wird und welche Auswirkungen sich auf die biochemischen Prozesse der calciumregulierenden Proteine ergeben.

In Anbetracht der schlechten Prognose für Herzinfarktpatienten ist es notwendig die Grundlage für neue Behandlungsstrategien zu schaffen, welche die hohe Mortalität und Morbidität der Herzinsuffizienz reduziert. Hierzu ist es wichtig zu untersuchen, welchen Effekt die männlichen Sexualhormone auf das kardiovaskuläre System haben, um daraus zusätzlich zur standardisierten Pharmakotherapie weitere Therapiemöglichkeiten ableiten zu können.

2. Material und Methodik

2.1. Tiermodell

Die Versuche wurden mit insgesamt 104 männlichen Wistar-Ratten (Alter:8-10 Wochen; Körpergewicht:180-200g) durchgeführt. Die Tiere wurden von der Firma Charles River (Kisslegg, Deutschland; Tierversuchsgenehmigungsnummer: 621-2531.01-75/98) bezogen. Die Tiere erhielten Wasser und normales Rattentrockenfutter zur freien Verfügung und waren in genormten Käfigen untergebracht. Sie wurden in einem klimatisierten Tierstall mit einer Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60% gehalten und einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus ausgesetzt .

In der ersten der zwei aufeinander folgenden Versuchsreihen erfolgte eine randomisierte Zuteilung der Tiere in eine der folgenden 3 Experimental-Gruppen:

► **1. P-Gruppe:** non-orchiectomiert (non-ORX) und Placebo-Gabe (**P**) [n=27]

► **2. TUD-Gruppe:** non-orchiectomiert (non-ORX) und einmalige Gabe des langwirksamen Testosteronesters Testosteronundecanoat (500mg/kgKörpergewicht) (**TUD**) [n=32]

► **3. ORX+P-Gruppe:** orchiectomiert (ORX) und Placebo-Gabe (**ORX+P**) [n=30]

In der zweiten Versuchsreihe schlossen wir dann noch eine vierte Gruppe mit ein.

► **4. DHT-Gruppe:** non-orchiectomiert (non-ORX) und subkutane (s.c.) Implantation eines 5- α Dihydrotestosteron-Pellets (**DHT**) (75 mg/Pellet/21-day release) [n=15]

Die Orchiectomie und jeweilige medikamentöse Behandlung wurden unter standardisierten Bedingungen bereits 14 Tage vor Entnahme der Herzen vorgenommen.

Um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte von Testosteronundecanoat (TUD) auf eine vermehrte Aromatisierung zu Östrogenen zurückzuführen waren, wurde direkt im Anschluss an die erste (s.o. 1.-3.) eine 2. Versuchsreihe initiiert. Zusätzlich zu den 3 Behandlungsgruppen der ersten Versuchsreihe umfasste die 4. Gruppe Ratten, die mit DHT, einem nicht aromatisierbaren Testosteronester, behandelt wurden. So erklären sich letztendlich auch die unterschiedlichen Endzahlen der einzelnen Behandlungsgruppen (P n=27, TUD n=32, ORX+P n=30, DHT n=15).

Das Testosteronundecanoat (TUD) entspricht einem synthetischen Androgenester, (1000mg in 4ml Trägeröl, Jenapharm GmbH&Co KG, Jena, Deutschland). Dieser wurde intramuskulär in den M.quadriceps femoris appliziert. Die Dosierung entsprach 500 mg/kg Körpergewicht. Die 5- α -Dihydrotestosteron-Pellets (DHT) wurden gemäß den Angaben des Herstellers (Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA) subkutan implantiert und besaßen eine konstante Freisetzungsrate von 21 Tagen. Die Placebogabe (P) entsprach der intramuskulären Injektion einer öligen Vehikellösung (Trägeröllösung ohne TUD) mit

entsprechendem Volumen der Testosterongruppe und entsprechenden Pellets mit konstanter Freisetzungsrates jedoch ohne DHT-Gehalt .

Es wurden jeweils für TUD [30]und DHT [31] supraphysiologische Dosierungen gewählt.

Alle Versuche erfolgten in Übereinstimmung mit den „Principles for Research Involving Animals and Human Beings“ der American Physiological Society [Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (7th ed.), Washington,DC:Natl Acad.Press 1996].

2.2. Präparation des isolierten Rattenherzens

Die isolierten Herzen wurden präpariert und retrograd nach Langendorf perfundiert - wie bereits ausführlich durch Strömer et al. beschrieben[32] . Die Anästhesie geschah durch eine intraperitoneale Applikation von Pentobarbital-Natrium (Narcoren®, Rhone Merieux GmbH, Laupheim, Deutschland) und anschließend erfolgte die Präparation der Vena femoralis superficialis zur intravenösen Injektion von 0,2ml eines Heparinmischungs (200IE). Nach sicherer Anästhesie wurde eine transverse Laparotomie und eine beidseitige Thorakotomie vorgenommen. Das Herz war freigelegt, es wurde exzidiert und sofort nach Entnahme in einen auf 4 °C abgekühlten Krebs- Henseleit –Puffer gebracht und gereinigt. Nach zügiger Freipräparation, Feststellung des reinen Herzgewichtes und anschließender Kürzung der Aorta unterhalb des Abgangs des Truncus brachiocephalicus, wurde die Aorta mittels Faden an einer Kanüle befestigt, die mit einer Perfusionsapparatur verbunden war. Das Ende der Kanüle sollte oberhalb der Klappenebene in der Aorta ascendens liegen. Innerhalb von 2-3 Minuten nach Thorakotomie war das Herz retrograd perfundiert unter Verwendung einer oxygenierten gefilterten (Gelman Science P/N60173, Supor®-450, Ø 47mm, Porengröße 45 µm) Krebs-Henseleit Lösung [Sigma CR-0177] , die sich aus NaCl (118mM), KCl (4,7mM), NaHCO₃ (23mM), MgCl₂ (1,2mM), CaCl₂ (1,5mM), und Dextrose (5,2mM) zusammensetzt (SIGMA Chemie,Deisenhofen, Deutschland). Die Bestandteile wurden in demineralisiertem Wasser (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) gelöst, und der Puffer bei 37°C mit 95% O₂ und 5% CO₂ auf einen pH von 7.4 equilibriert.

Die retrograde Perfusion erfolgte mit einem anfangs erniedrigten Flow (60-70%) und bei einer Temperatur von 27 °C.

Durch eine Inzision im linken Atrium wurde ein flüssigkeitsgefüllter, luftfreier Latexballon (Ritex, Bielefeld) am Ende eines 10cm langen Polyethylenschlauches (Portex, England, ID 1,4mm, OD 1.9mm) über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingebracht und mittels Faden gesichert. Der Ballon war über diesen Polyethylenschlauch mit einem Statham P23 XL Transducer (Gould Inc., Oxnard, CA, USA) verbunden, um kontinuierlich den Druck des linken Ventrikels zu registrieren. Der Ballon besaß ein ausreichend großes Volumen, so dass es auch bei maximaler Füllung (0,4 ml) nur zu einer vernachlässigbaren (<1,0 mmHg) ballonbedingten, diastolischen Druckerhöhung kam. Um die Drainage aus der Venae Thebesiae zu gewährleisten, wurde ein Schlauch aus Polyethylen (10 x 0,2mm) an der Herzspitze parallel zu dem Ballon angebracht. Ein rechtsventrikulärer Perfusatsabfluss war durch Inzision des Truncus pulmonalis möglich.

Anschließend wurde der Sinusknoten exzidiert. Bei Erreichen von stabilen Bedingungen und nach einer Temperaturerhöhung auf 37°C erfolgte die Platzierung der Schrittmacherelektrode subepikardial an der Seitenwand des rechten Ventrikels. Die Herzen wurden - außer in der no-flow-Ischämiephase - mit monophasischen, rechteckigen Impulsen eines HSE Stimulators P Typ 201 (Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) mit einer Impulsdauer von 5ms mit 5Hz (Spannung:5 bis 10V, 20% über der Stimulationsschwelle) stimuliert – entsprechend der Ratten-Herzfrequenz von 300 Schlägen/min. Um für die gesamte Dauer des Versuchs isotherme Bedingungen zu garantieren ($37,0^{\circ} \pm 0,3^{\circ}\text{C}$) wurden das Organbad sowie der mit der Aortenkanüle verbundene Blasenfänger mittels Wasserbad erwärmt (Wärmepumpe Thermomix 1442D, Firma Braun, Melsungen, Deutschland). Die intracavitäre Temperatur wurde durch eine im rechten Ventrikel liegende Sonde aufgezeichnet (Digitalthermometer GTH 1200A:Greisinger Electronic, Regenstaut, Deutschland).

Eine konstante Perfusion war durch eine Schlauchquetschpumpe (Ismatec, Reglo Analog MS-4/8, Glattbrugg-Zürich, Schweiz) gewährleistet. Der koronare Flow wurde auf 12ml/min/mg Herzgewicht festgesetzt, so dass man einen koronaren Perfusionsdruck von 60 bis 70 mmHg erreichen konnte. Dieser Flow war außer

während der No-flow-Ischämie-Phase konstant. Der koronare Perfusionsdruck (cPP) wurde über einen mit dem Seitenarm der Aortenkanüle verbundenen Statham P 23 XL Transducer dargestellt und kontinuierlich von einem Multikanal-Recorder aufgezeichnet. Dieser Versuchsaufbau ermöglichte außerdem die Messung der linksventrikulären Druckamplitude (LVDP) und des sich enddiastolisch entwickelnden Druckes (LVEDP) mittels des intrakardial liegenden Ballons. Der Ballon wurde zu diesem Zweck, jeweils nach Anfertigung einer computererrechneten Druck-Volumen-Kurve, mit 50% des Volumens gefüllt, das bei maximal entwickeltem Druck entsteht [33].

2.3. Aufzeichnung des linksventrikulären Drucks (LV)

Die linksventrikulären Drucksignale wurden registriert, verstärkt (BTM Typ 9003/3, Berlin, Deutschland) und auf einem Vierkanalschreiber (Graphtec, Seefeld, Deutschland) aufgezeichnet, außerdem mittels eines 12-bit-Analog-Digital-Wandlers (Microstar DAP 800, Bellvue, WA, USA) mit einer Abtastrate von 1kHz digitalisiert und auf einer Computerfestplatte zur weiteren Auswertung gespeichert. Mittels einer eigens dafür programmierten Software konnten aus den digitalisierten Daten folgende mechanische Funktionsparameter ermittelt werden:

- Die maximale **linksventrikuläre Druckamplitude** bzw. der **linksventrikuläre enddiastolische Druck** (*LVDP bzw. LVEDP*),
- Die **Zeit** vom Beginn der Kontraktion bis zum Erreichen der maximalen Kontraktion (*TP; time-to-peak*);
- Die **Zeitkonstante des exponentiellen Druckabfalls** (*tau*; unter Anwendung der variablen Asymptoten Methode);
- Die Maximal- und Minimalwerte der **Druckanstiegsgeschwindigkeit** bezogen auf LVDP ($+dP/dt/LVDP$ und $-dP/dt/LVDP$);
- Die **Zeit** vom Peak P_s bis zum Erreichen von 90% Relaxation (*T 90*).

2.4. Aequorin-Applikation und Normalisierung der Aequorin-Lumineszenz

Aequorin, ein biolumineszierendes Protein, kann, wie bereits von Y.Kihara et al. beschrieben, zur Bestimmung der intrazellulären Kalziumkonzentration in vivo herangezogen werden [34]. Das bei der Reaktion von Aequorin mit freiem intrazellulären Kalzium $[Ca^{2+}]_i$ ausgesendete Licht wird mit Hilfe der fraktionierten Biolumineszenz in Kalziumkonzentrationswerte umgerechnet und ermöglicht somit eine reproduzierbare Darstellung von Kalziumtransienten am schlagenden Herzen.

Zur Applikation des Calciumindikators Aequorin (Friday Harbor Photoproteins, WA, USA) wurden 2-5 μ l einer Aequorin-Lösung (1 μ g Aequorin/ml) mittels einer Glasmikropipette (Hirschmann, Deutschland) vorsichtig in das Interstitium der inferoapikalen Region des linken Ventrikels zur Beladung der subepikardialen Myozyten makroinjiziert. Das infiltrierte Areal umfasst dabei ungefähr eine Region von ca. 3mm Durchmesser. Der größte Teil des Aequorins wird anschließend durch die im Vergleich zum intrazellulären Milieu hohe extrazelluläre Kalziumkonzentration innerhalb weniger Minuten verbraucht. Ein kleiner Teil gelangt jedoch in die Kardiomyozyten, und fungiert dort als Kalziumindikator durch Aussenden von Licht in Abhängigkeit von $[Ca^{2+}]_i$.

Das Herz wurde anschließend wieder so in das Organbad positioniert, dass die mit Aequorin beladene Region des linken Ventrikels direkt über der Kathode des Photomultiplers lag wie bereits von Kihara et al. beschrieben [23]. Um Störeinflüsse durch einfallendes äußeres Licht zu vermeiden, erfolgte eine Verdunklung des Versuchsaufbaues durch einen eigens angefertigten Fotobalg.

Die entstandenen Aequorin-Lichtsignale wurden über diesen Photomultiplier (Modell 9635QA, Thorn-EMI Electron Tubes, Gencom, Inc) simultan mit den linksventrikulären mechanischen Parametern auf einem Vierkanalschreiber aufgenommen, im Anschluss digitalisiert und genauso auf einer Computerfestplatte gespeichert wie es bereits für den linksventrikulären Druck (LV) beschrieben ist [23]. Die Lichtsignale wurden sowohl für den systolischen Peak (L_{sys}) als auch für den diastolischen Peak (L_{dia}) bestimmt.

Zur Reduktion des Signal-Rausch-Verhältnisses sind an den zu analysierenden Abschnitten, eine stabile Herzaktion vorausgesetzt (Bedingungen: <math><5\%</math> Schwankung im LVDP bei konstanter Stimulation mit 5Hz), ca. 10-100 Transienten gemittelt worden. Da die Amplitude der Aequorin-Lichtsignale abhängig ist von der Menge an Aequorin, welches während der Ladeprozedur in die Zelle gelangt, und dies von Versuch zu Versuch variiert, müssen die Lichtsignale vorher normalisiert werden.

Abbildung 1:

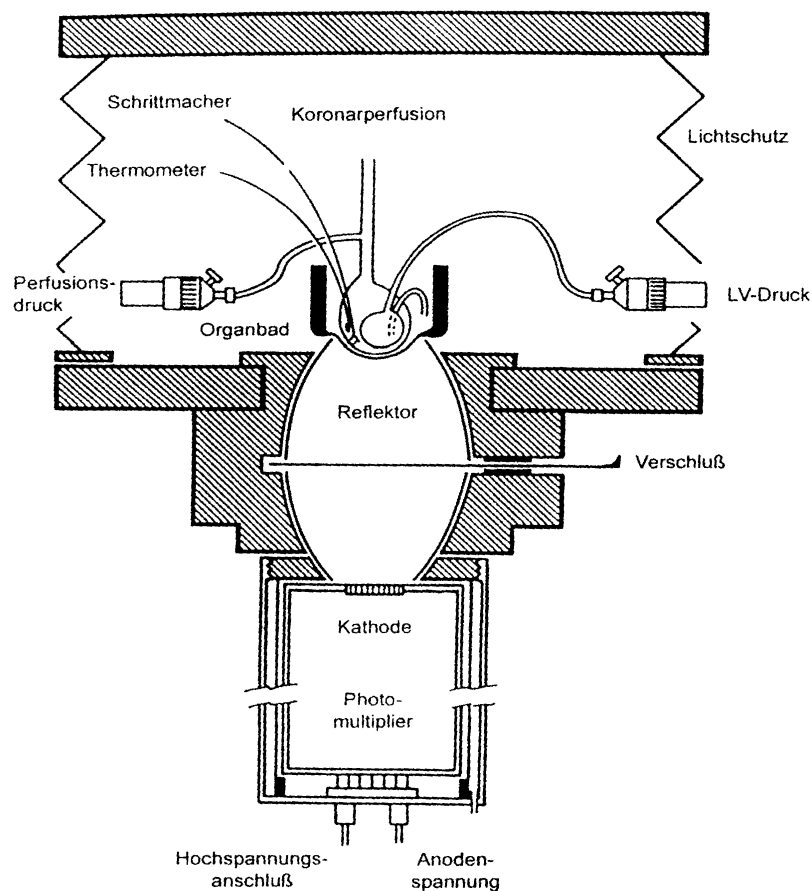


Abbildung 1: Schematischer Versuchsaufbau nach Kihara et al. [23] Die Abbildung zeigt die Positionierung des Herzens im abgedunkelten Versuchsaufbau sowie im Photomultiplier, die Kanüle zur retrograden Perfusion, die Druckaufnehmer zur

Messung des cPP (koronarer Perfusionsdruck) und des LV-Drucks (isovolumetrischer linksventrikulärer Druck).

Aus diesem Grund wurde die präischämische Amplitude der Ca^{2+} -Lichttransienten (ΔL) als Referenzwert für die Normalisierung gewählt. Da sich Aequorin während des gesamten Experiments verbraucht, können die gemessenen Lichtsignalwerte nicht automatisch mit einem als 100% festgelegten präischämischen Wert in Beziehung gesetzt werden. Vielmehr muss der Aequorinverbrauch in den Berechnungen berücksichtigt werden. Zur Umrechnung von Aequorin-Lichtsignalen in Calciumkonzentrationen, also zur Untersuchung der Veränderungen des intrazellulären $[\text{Ca}]^{2+}$, wird die Methode der fraktionierten Lumineszenz angewandt [23].

2.5. Analyse der Ca^{2+} -Überladung in der ersten Minute der Reperfusion

Es ist bekannt, dass es mit Beginn der Reperfusion zu einer nur wenige Minuten anhaltenden ausgeprägten Ca^{2+} -Überladung der Zelle kommt. Diese Reperfusion-induzierte intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung schädigt die Myofilamente und führt zu einem postischämischen Funktionsverlust. Zur Analyse dieser Ca^{2+} -Überladung, v.a. während der ersten Minute der Reperfusion, wurden folgende Parameter verwendet:

- ▶ $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{endischämisch}}$ entspricht der endischämischen intrazellulären Ca^{2+} Konzentration
- ▶ *Peak* entspricht dem initialen Maximum des Ca^{2+} -Signals in der ersten Minute der Reperfusion und dem Ca-Influx
- ▶ *Oscill_{max}* entspricht dem Maximum der ersten 10 Transienten der Ca^{2+} -Ozillationen in der ersten Minute der Reperfusion und spiegelt die Menge des aus dem sarkoplasmatischen Retikulum

freigesetzten Ca^{2+} während jeder Oszillation zum Zeitpunkt der maximalen Ca^{2+} -Überladung im Zytosol wieder

► $I_{(0-60)}$ entspricht dem Zeitintegral der ersten 60 Sekunden der Reperfusion normalisiert mit $L_{\max}(t)$, einem allgemeinen Index der Ca^{2+} -Überladung

$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{endischämisch}}$ repräsentiert das während der Ischämie angehäuften $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Der Peak-Wert entspricht dem ersten Kalziumeinstrom, der durch die Aktivierung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers als Folge des Na^+/H^+ -Austausches entsteht.

Oscill_{\max} repräsentiert die Menge des Ca^{2+} , welches aus dem mit Ca^{2+} überladenen sarkoplasmatischen Retikulum zusätzlich zur Ca^{2+} -Überladung freigesetzt wird. Die endischämische Ca^{2+} -Konzentration wurde direkt vor Beginn der Reperfusion berechnet.

Das Zeitintegral $I_{(0-60)}$ wurde in Übereinstimmung mit vorausgegangen Experimenten gewählt, die gezeigt hatten, dass das Maximum der reperfusioninduzierten Ca^{2+} -Überladung innerhalb der ersten Minute stattfindet und keine signifikanten Unterschiede integrierter Lichtsignalmessungen für $t \geq 1$ Minute festgestellt werden konnten [21].

2.6. Experimentelle Protokolle (Aequorinexperimente)

Wie schon dargestellt wurde eine Aufteilung in 4 Versuchsgruppen vorgenommen:

- **1. P-Gruppe:** non-orchiectomiert (non-ORX) und Placebo [n=27]
- **2. TUD-Gruppe:** non-orchiectomiert (non-ORX) und Gabe des langwirksamen Testosteronesters Testosteronundecanoat (500mg/kg Körpergewicht) [n=32]
- **4. ORX+P-Gruppe:** orchiectomiert (ORX) und Placebo [n=30]
- **3. DHT-Gruppe:** non-orchiectomiert (non-ORX) und Gabe des nicht-aromatisierbaren 5α -Dihydrotestosteron in Form eines Pellets (75mg/Pellet/21-day-release) [n=15]

Eine Analyse des intrazellulären Calciumtransienten konnte schließlich an 89 Rattenherzen (11-29/Gruppe) durchgeführt werden:

In der P-Gruppe:	21 Herzen
In der TUD-Gruppe:	28 Herzen
In der ORX+P-Gruppe:	29 Herzen
In der DHT-Gruppe:	11 Herzen

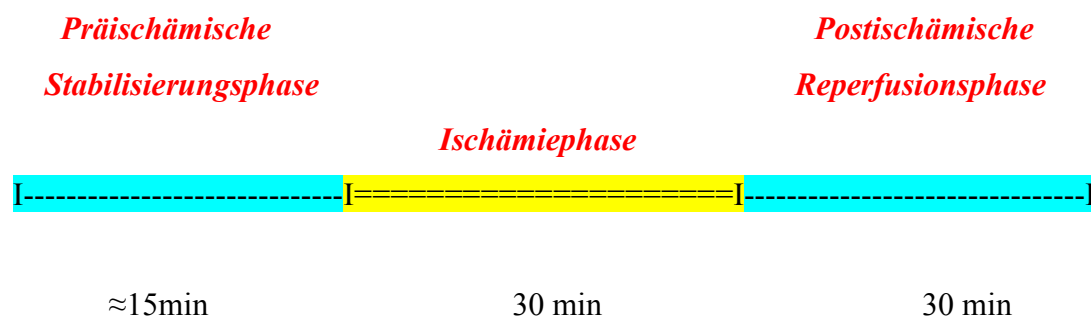
15 Tiere mussten letztendlich aufgrund nicht verwendungsfähiger Calciumtransienten aus dem jeweiligen Analyseteil ausgesondert werden.

Nach der Aequorinapplikatur wurden die Temperatur der Krebs-Henseleit-Lösung innerhalb von 10 Minuten auf 37°C erhöht und die Herzen mit einer Frequenz von 5Hz stimuliert. Nach Erreichen von stabilen mechanischen Herzfunktionen wurde eine computererrechnete Druck-Volumen-Kurve zur Ermittlung des Ballonvolumens (Vol_{max}) bei maximaler Druckamplitude angefertigt - wie bereits von Strömer et al. beschrieben [22].

Dazu diente ein Ballon, der mit dem geringst möglichen Volumen gefüllt war, welches eine Druckregistrierung ermöglichte ($< 1\text{mmHg}$). Dieses Volumen wurde als Nullwert definiert, das Ballonvolumen in Schritten von 10-20 μl erhöht. 1-2 Minuten nach Erreichen einer Stabilisierungsphase erfolgte die Speicherung der LV-Funktionsparameter auf einer Computerfestplatte. Das Volumen wurde bis zum Erreichen von Vol_{max} erhöht, dem Punkt der maximal entwickelten Druckamplitude (LVDP) der entstandenen Frank-Starling-Kurve. Eine weitere Volumenbelastung führte zu einem Abfall des LVDP. Da die Gesamtherzfunktion mit 100% des Vol_{max} die Situation eines unphysiologischen Preloads darstellen würde, soll die Funktion bei 50% verglichen werden. Um vergleichbare Preloads (i.e. Ballonvolumina Vol) in Herzen unterschiedlicher Größe zu erhalten, dient somit für die gesamte Dauer des Experimentes 50% von Vol_{max} als Füllungsvolumen des Ballons. Diese Festlegung entspricht denen anderer Autoren, die mit dem unversehrten Herzmodell gearbeitet haben [35].

Nachdem sich die mechanischen Funktionen und die Aequorin-Lichtsignale stabilisiert hatten, wurde nach 15 Minuten die No-Flow-Ischämie-Phase eingeleitet. Die Stimulation mit 5Hz wurde noch 5 Minuten nach Beginn der Ischämie fortgeführt und dann abgebrochen. Nach Beendigung einer 30-minütigen Ischämiephase erfolgte die erneute Perfusion der Herzen, wobei bei fast allen Versuchen vorübergehend Kammerflimmern auftrat. Die Stimulierung der Herzen mit 5 Hz wurde ungefähr 5 Minuten nach spontaner Defibrillation und Erreichen eines stabilen kardialen Rhythmus wieder aufgenommen. Die Herzen wurden 30 Minuten lang reperfundiert .

Versuchsverlauf:



2.7. Quantifizierung des intrazellulären Ca^{2+}

Die intrazelluläre Calciumkonzentration wurde in allen Langendorff-Präparationen gemessen. Um jedoch Artefakte, wie zum Beispiel Auswasch-, Leck- oder Bleichphänomene, auszuschließen, sind nur Experimente mit durchweg ausgezeichneten intrazellulären Calciumsignalen für die Analysen ausgewählt worden [21]. Parallel zu den Aequorinlichtsignalen, die ein Vierkanalschreiber aufzeichnete, wurden der linksventrikuläre Druck und der koronare Perfusionsdruck gemessen,

digitalisiert, gespeichert und - wie bereits für den linksventrikulären Druck beschrieben - analysiert. Am Ende jedes Experimentes wurde das Herz kurz mit einer Lösung, welche 20mmol/l Ca^{2+} und 5% Triton X-100 [t-Octylphenoxypolyethoxyethanol] (SIGMA) enthielt, perfundiert, um die aequorinbeladenen Myokardzellen aufzulösen und den verbleibenden Aequorinrest am Ca^{2+} zu erhalten. Daraus resultierte eine augenblickliche Lichtemission, die innerhalb von 10 bis 20 Minuten auf den Basiswert abnahm.

Abbildung 2:

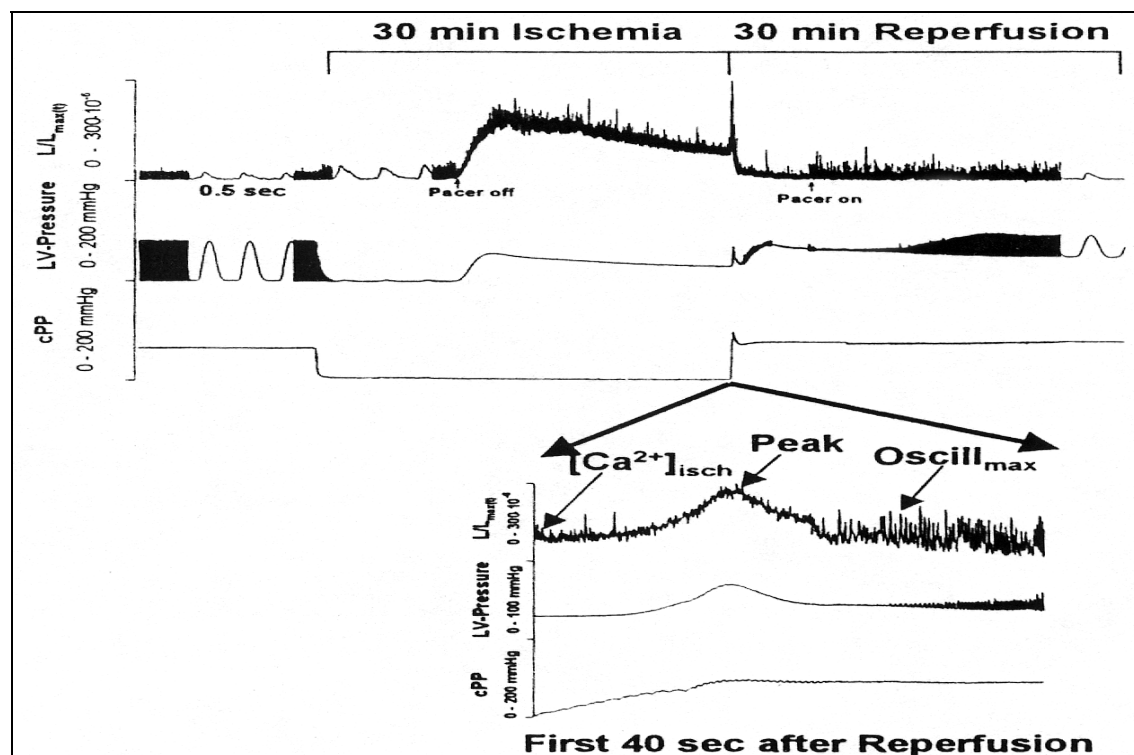


Abbildung 2 : Originaldarstellung der Aufzeichnung der Aequorin-Lichtsignale , des linksventrikulären Druckes und des koronaren Perfusionsdruckes während eines repräsentativen Experimentes

Die Fläche unter der Kurve musste ergänzt werden, um einen Wert für die gesamte Lichtmenge (L_{\max}) zu erhalten, die das in den subepikardialen Myozyten geladene Aequorin emittiert. Das Verhältnis des jeweiligen Lichtsignals zu L_{\max} entspricht der fraktionellen Lumineszenz. Diese kann dann in die entsprechenden $[Ca^{2+}]_i$ - Konzentrationen unter Verwendung der in vitro hergeleiteten Kalibrierungskurve umgewandelt werden [23]. Die Lichtsignale wurden quantifiziert nach Mittelwerten kürzlich hergeleiteter Formeln und mittels einer zeitabhängigen Normalisierungskonstante $L_{\max}(t)$ in Übereinstimmung zu Strömer et al. [21]. Die Signale sind parallel zur Analyse der mechanischen Parameter für einen systolischen Ca^{2+} -Peak und einen diastolischen Ca^{2+} -Peak analysiert worden.

2.8. Berechnung von σ_s und σ_d und der relativen Wanddicke

Die Berechnung von σ_s und σ_d (i.e.= systolischer und enddiastolischer Maximalwert des circumferenten Wandstress) und der relativen Wanddicke - bei angenommenen sphärischen isovolumischen Bedingungen - wurde vorgenommen wie bereits ausführlich von Strömer et al. beschrieben [22].

2.9. Analyse der calciumregulierenden Proteine [Phospholamban / Na^+ - Ca^{2+} -Austauscher/Ryanodin-Rezeptor /SERCA 2a]

Das Myokardgewebe wurde sofort nach den Messungen in flüssigen Stickstoff überführt, um es für die Molekularbiologie zu asservieren. Für die Analyse wurden dann $1,22 \pm 0,14$ g Myokardgewebe der linksventrikulären Wand in flüssigen Stickstoff gebettet und anschließend in 3 verschiedenen Volumina geeister Pufferzubereitung (in mM: Sucrose 300, PMSF 1, Pipes 20, EDTA 10, NaH_2PO_4 50, pH 7.4) aufgetaut, vgl. Münch et al. [36]. Das Myokardgewebe wurde sorgfältig von eventuellen Bindegewebsresten, Gefäßen und Epikard getrennt. Anschließend wurden die Proben für 3x30 Sekunden bei 4°C mittels einer Ultra Turrax T8 (Janke & Kunkel KG, IKA-Werke, Staufen i. Breisgau, Deutschland) zerkleinert und mittels eines Glas-Teflon-Apparates (B.Braun AG, Melsungen, Deutschland) homogenisiert.

Das entstandene Homogenat ist des weiteren mit einem Aufbewahrungspuffer, welcher Sucrose 400, HEPES 5, EDTA 10, NaH₂PO₄ 50, pH 7.2 beinhaltet (in mM), im Verhältnis 1:1 verdünnt und in flüssigem Stickstoff gefroren worden. Dieses war bis zu seiner Verwendung für die Westernblots bei -80°C aufzubewahren. Die Myokardzubereitung (Homogenate) wurde dann wieder mit dem obigen Aufbewahrungspuffer bis zu einer Konzentration von 2500 µg/ml verdünnt. Die Proteinkonzentration konnte letztendlich durch den Bradyford Assay überprüft werden.

2.10. Immunoblot-Auswertung

Die Proteine wurden in Übereinstimmung mit dem Verfahren nach Towbin et al. mit beschriebenen Abänderungen [37][38] immungeblottet. 40 µg des Protein-homogenats wurden auf Eis und in Puffers (Tris HCl 0,5 mM; Glycerol 10%; SDS 2%; 2-Miercaptoethanol 5%; Bromphenolblau 0,05%) schwebend aufgetaut. Die Proteine konnten mittels einer diskontinuierlichen Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) mit 4% und 17% Acrylamid getrennt und mittels nassem Blotten auf PVDF-Membrane gebracht werden. Die Transferleistungsfähigkeit sollte durch eine Gesamtproteinfärbung der Gele mit Coomassie-Brilliant-Blau und durch das Färben der Proteinbanden auf den PVDF-Membranen (Western-Blots) mittels Ponceau S-Lösung (Sigma, gebrauchsfertig in 5 Min) überprüft werden. Die Blots wurden dazu in fettarmer Milch geblockt und mit trisgepufferter Salzlösung (150 mmol/l NaCl; 10mmol/l Tris HCl; pH 7.5) und trisgepufferter Salzlösung mit Tween (150 mmol/l NaCl; 10 mmol/l Tris-HCl; 0,05% Tween 20; pH 7.5) gewaschen. Die Membrane wurden mit Antikörpern gegen Phospholamban (1:1000), SERCA 2a (1:1250), Na⁺-Ca²⁺-Austauscher (1:1000) und Ryanoide-Rezeptor –Antikörpern Typ 2 (monoklonale Maus-Anti-Ryanoide-Rezeptor-Antikörper, IgG1, 1:1000) inkubiert. Zur Kontrolle wurde Calsequestrin mitdetektiert (1:1250). Nach den Waschvorgängen wurden die Membranen einen zweitem Antikörper, einem Peroxidase-konjugierten Antikörper (1:2500), ausgesetzt. Die Proteine wurden durch einen erhöhten Chemolumineszenz-Assay (ECL Kit, Amersham, Amersham-Life science, Buckinghamshire, England) detektiert, anschließend mit einem X-Ray-Film (Kodak X-OMAT

engineering) belichtet und dichteentsprechend mit einem kommerziell erhältlichen Computerprogramm (ImageQuant, Molecular Dynamics, Krefeld, Deutschland) ausgewertet. Die Proteinniveaus sind entsprechend einem kardialen Gesamtprotein aus dem Myokard genormt, durch den Bradford-Assay bestimmt und als Dichte/Units/ μg Protein ausgedrückt worden. Das Färben von Proteinbanden der Ca^{2+} -Regulatorproteine auf den PVDF-Membranen mittels Ponceau S-Lösung zeigte eine hohe Transferleistungsfähigkeit. Die Position der korrespondierenden Proteinbanden wurde durch zwei Marker mit gegebenen Molekulargewichten verifiziert.

2.11. Materialien

Die Salze kamen von der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland); PIPES (Piperazine-N, N-bis[2-ethansulfonsäure]) und PMSF (Phenylmethylsulfonfluorid) von der Firma Sigma (Sigma Chemical Co, St.Louis, MO), das 30%ige Acrylamid/Bisacrylamid von der Firma BioRad (Hercules, CA). Der erste Antikörper, welcher für die SERCA 2a -Detektion gebraucht wurde, war ein monoklonaler IgG_1 -Antikörper gegen ein Hunde- SERCA 2a -Protein (ABR, Affinity Bioreagents Inc, Golden, CO). Der Anti-Phospholamban-Antikörper war ein monoklonaler IgG -Antikörper gegen Hunde-Phospholamban, der von der Firma Upstate Biotechnology Inc.(Lake Placid, NY) erworben wurde. Der Antikörper gegen Calsequestrin war ein polyklonaler Hasen-Antikörper gegen Hunde-Calsequestrin von der Firma Swant (Bellizona, Schweiz). Der Antikörper gegen den Ryanodin-Rezeptor war ein polyklonaler Hasen-Antikörper (ABR) und der Antikörper gegen den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauscher war ein polyklonaler Hasen-Anti-NCX-Antikörper von der Firma Swant. Die zweiten Antikörper waren entweder monoklonale peroxidasekonjugierte Schaf-Anti-Maus-IgGs oder peroxidasekonjugierte Ziegen-Anti-Hasen-IgGs, von der Firma Sigma Immunochemicals (St.Louis, MO).

2.12. Immunoassay für Testosteron und DHT

Wir ließen die bei den Versuchen entnommenen Blutproben gerinnen. Das Serum wurde mittels Zentrifuge getrennt und anschließend bei -20°C bis zu dessen Untersuchung gelagert.

Das Serumtestosteron wurde durch einen kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay (Diagnostic Products Corporation, USA) mit einer Sensitivität von $0,06\text{ng/ml}$ bestimmt. Die intra- und inter-Assay-Varianz erstreckte sich von 6-15%, beziehungsweise von 9-16%.

Das Serum-DHT wurde durch einen ebenfalls kommerziell erhältlichen Radioimmunoassay ACTIVE™-DHT RIA (Diagnostic Systems Laboratories Inc., Sinsheim, Deutschland; Katalog-Nr. DSL-9600) mit einer Sensitivität von $0,004\text{ng/ml}$ bestimmt. Die intra- und inter-Assay-Varianz erstreckte sich von 3-6%, beziehungsweise von 2-8%.

2.13. Statistische Auswertung

Die angegebene Werte entsprechen Mittelwerten \pm Standardfehler (SEM). Mit Hilfe der fraktionellen ANOVA- Analyse wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen für jeden Parameter statistisch ermittelt. Mit unseren 4 experimentellen Gruppen waren entsprechend 6 statistische Vergleiche denkbar. Die Untersuchung dieser hohen Zahl von Vergleichen mittels der multifaktoriellen Varianzanalyse würde die Signifikanzniveaus „überkorrigieren“. Aus diesem Grund limitierten wir die statistische Analyse auf „biologisch sinnvolle“ Vergleiche. Die Vergleiche der Variablen zwischen 2 Gruppen wurden mittels des ungepaarten Student-t-Tests durchgeführt. Bonferronies Korrektur für multiple Vergleiche wurde angewendet, um ein Signifikanzniveau von $0.05:5=0.01$ zu erreichen. Die Berechnungen erfolgten mittels des Stat View SE + Graphics- Programm (Brainpower Inc., Calabasas, California).

3. Ergebnisse

3.1. Tiercharakteristika

Das Körpergewicht der Tiere (KG), das links- und rechtsventrikuläre Herzgewicht (LV-,RVG) sowie das jeweilige Verhältnis von linksventrikulärem bzw. rechtsventrikulärem Herzgewicht zum Körpergewicht (LVG/KG bzw. RVG/KG) wurden ebenso wie die Serumtestosteron- und Dihydrotestosteron-Konzentrationen (siehe unten) 2 Wochen nach einmaliger Hormonbehandlung für alle Tiere bestimmt. Tabelle 1 zeigt, dass sowohl das Körpergewicht als auch das LVG bzw. das RVG zwischen den unterschiedlichen Behandlungsgruppen annähernd gleich waren und sich keine signifikanten Unterschiede zeigten. Hingegen war das Verhältnis LVG/KG signifikant höher nach Testosteronundecanoat (TUD)-Behandlung gegenüber der ORX+P-Gruppe ($p < 0.008$).

Tabelle 1:

	P	TUD	<u>ORX+P</u>	DHT
<u>KG</u> (g)	348±13	312±10	338±12	307±5
<u>LVG</u> (g)	1.09±0.04	1.05±0.02	1.05±0.03	1.05±0.03
<u>RVG</u> (g)	0.25±0.1	0.25±0.01	0.24±0.01	0.25±0.007
<u>LVG/KG</u> (g/g)	3.14±0.07	3.39±0.07 ^a	3.11±0.06	3.4±0.10
<u>RVG/KG</u> (g/g)	0.73±0.03	0.79±0.02	0.72±0.03	0.82±0.04
Vol _{max} (µl)	176.3±13	145.9±7	153.5±4	160.0±17

^a $p < 0.008$ TUD vs. ORX+P

Tabelle 1: Charakteristika: Körpergewicht (KG) (g); linksventrikuläres (LVG) (g) und rechtsventrikuläres (RVG) (g) Gewicht; Quotient aus LVG bzw. RVG/KG (LVG/KG) (g/g) und (RVG/KG) (g/g); Volumen des sich maximal entwickelnden Druckes (Vol_{max}) (μ l);

3.2. Hormonbestimmung

Die Hormonbestimmungen von Testosteron und dem nicht aromatisierbaren DHT erfolgten 2 Wochen nach einmaliger Hormon- bzw. Placebogabe mittels Immunoassays.

Testosteron-Präzision: Intra-Assay-Varianz: 6-15%
 Inter-Assay-Varianz: 9-16%
 DHT-Präzision: Intra-Assay-Varianz: 3-6%
 Inter-Assay-Varianz: 2-8%)

Tabelle 2: Serumtestosteron-Konzentration (ng/ml) und Serum-DHT (Dihydrotestosteron)-Konzentration (ng/ml) der einzelnen Versuchsgruppen 2 Wochen nach Hormonbehandlung

Tabelle 2:

	<i>P</i>	<i>TUD</i>	<i>ORX+P</i>	<i>DHT</i>
Testosteron [ng/ml]	2.84±0.3	12.44±1.1 ^{a,b}	0.18±0.0	0.14±0.0
<i>DHT</i> [ng/ml]	0.04±0.008	0.32±0.04 ^{a,b}	0.025±00.002	1.23±0.16 ^{c,d,e}

^ap<0.008 TUD vs. ORX+P

^bp<0.0001 TUD vs. P

^cp<0.0001 DHT vs. P

^dp<0.001 DHT vs. TUD

^ep<0.0001 DHT vs. ORX+P

Die Serum-DHT- und Testosteron-Konzentrationswerte waren wie zu erwarten signifikant niedriger bei den ORX+P-Tieren, entsprechend kam es zum Testosteronanstieg bei den TUD-behandelten Tieren bzw. zu einem DHT-Anstieg bei den DHT-behandelten Tieren.

Die endogene Testosteronsekretion wurde bei den mit DHT behandelten Tieren aufgrund der Suppression der hypophysären Gonadotropine (LH und FSH) unterdrückt.

3.3. Behandlungseffekte auf die physiologische mechanische Funktionsleistung des Herzens vor Beginn der Ischämie

Es konnte keine Verschlechterung der kardialen Funktion, die sich in den Werten P_s , P_d , LVDP und T90 widerspiegelt, zwischen TUD, ORX+P und P unter präischämischen Bedingungen festgestellt werden (Abbildungen 1 A bis C).

Die DHT-Behandlung führte zu einer besseren Kontraktilität, einem signifikant höheren P_s und LVDP und zu einer höheren σ_s im Vergleich zur ORX+P-Gruppe (DHT vs. ORX+P: +dP/dt: 25.5 ± 0.3 vs. 26.4 ± 0.2 mmHg; $P=0.01$; σ_s : 23.5 ± 1.2 vs. 20.1 ± 0.5 mmhg; $P=0.004$)

Abbildung 1:

Phase der Präischämie: P_s und P_d (A), LVDP (B) und T90 (C) 2 Wochen nach Hormonbehandlung mit TUD, DHT oder Orchiektomie (ORX+P) verglichen mit Sham-behandelten Kontrollgruppen (P) in Relation zum Ballonvolumen (Vol). Die Werte wurden aufgezeichnet gegen Vol/Vol_{max} , wobei Vol_{max} das intrakardiale Ballonvolumen des Kontrollpeaks darstellt

Abbildung 1 A:

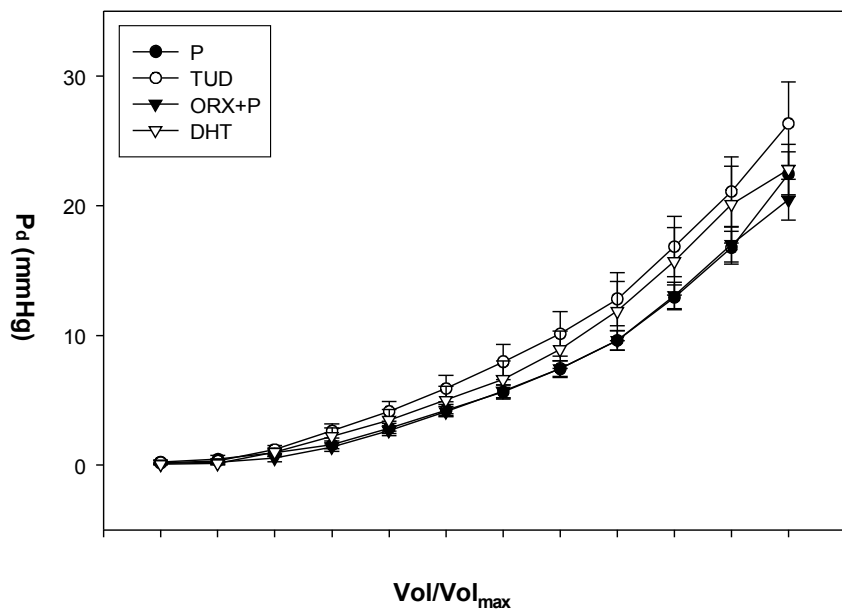
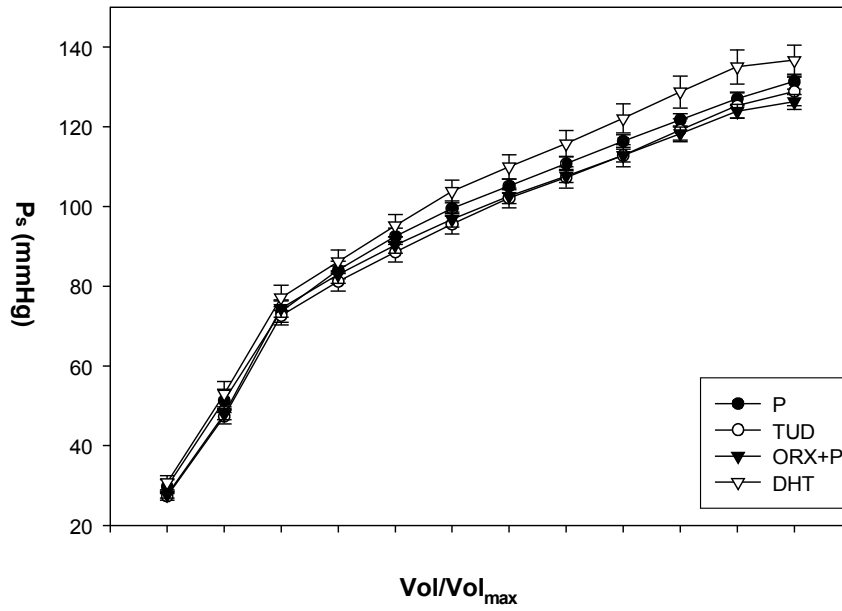


Abbildung 1 B:

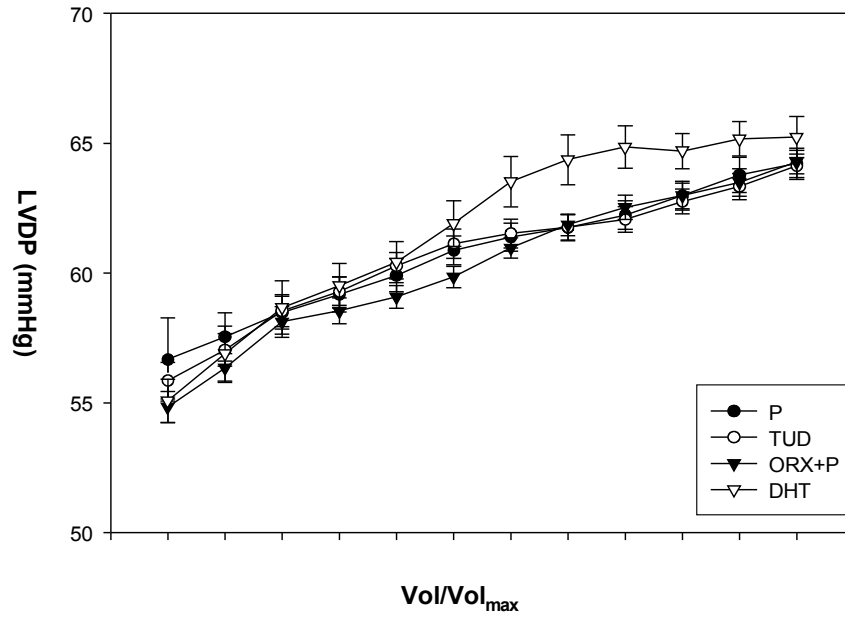
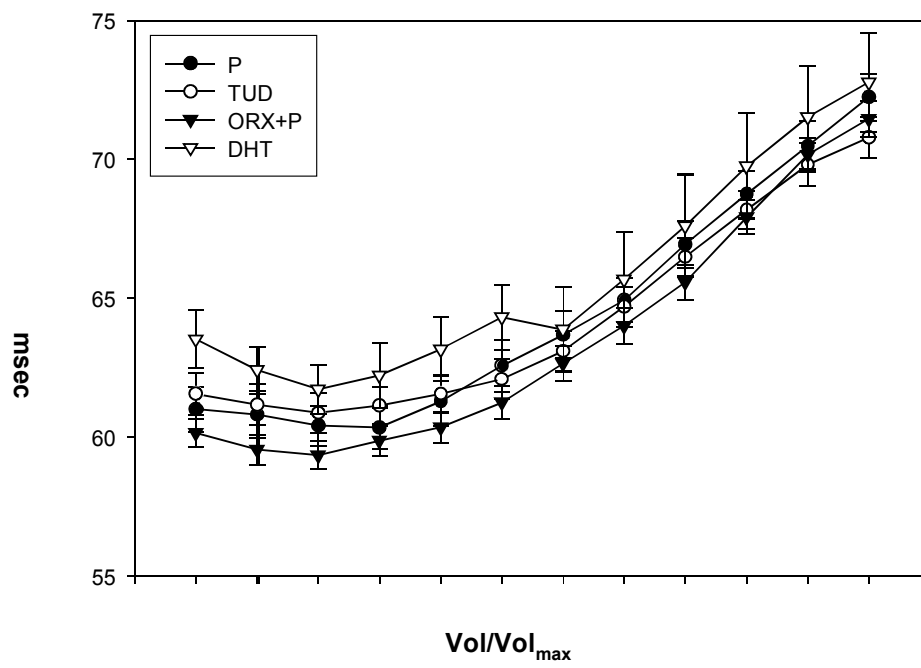


Abbildung1C:



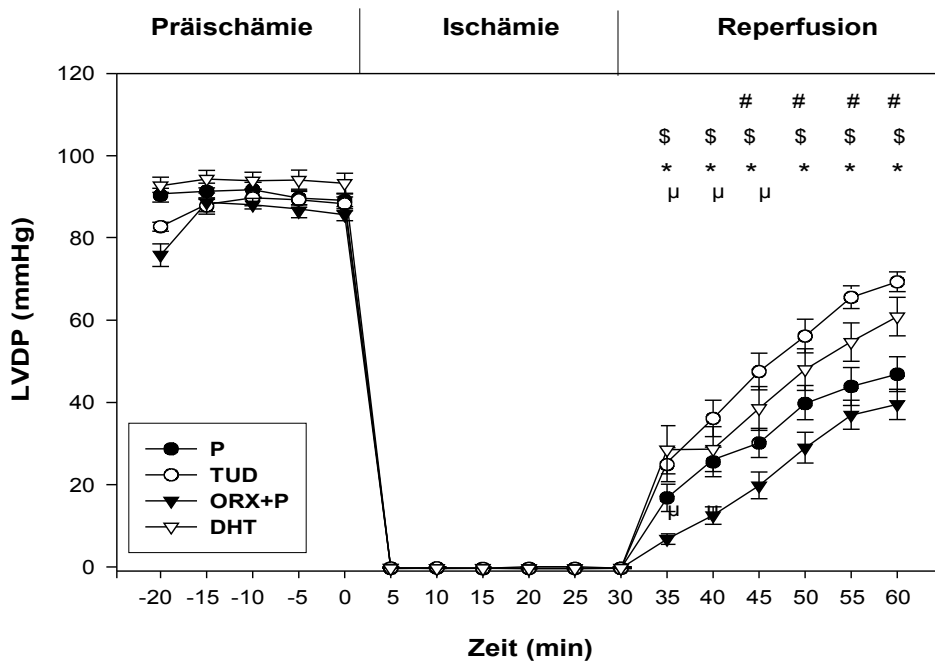
3.4. Kardiale Funktion während Ischämie und Reperfusion

Nach Beginn der No-Flow-Ischämie-Phase fiel der LVDP-Wert innerhalb von 5 Minuten auf Null in allen Versuchsgruppen (Abbildung 2) ab.

Die ischämische Kontraktur entwickelte sich nach ungefähr 5 Minuten bis zu einem LVEDP-Wert von ungefähr 40 mmHg. Im Verlauf der zweiten Hälfte der Ischämie kam es zu einem leichten Rückgang des LVEDP-Wertes auf ca. 30 mmHg endischämisch in allen Versuchsgruppen (vgl. Abb.3). Bis zu diesem Zeitpunkt zeigten sich keine hormonabhängigen Unterschiede bezüglich der mechanischen Herzfunktion und der ischämischen Kontraktur.

Während der Reperfusion zeigten die Testosteron-behandelten Tiere eine signifikant bessere kontraktile Funktion (LVDP, LVEDP, cPP) im Vergleich zur ORX+P- und P-Gruppe (Abbildung 2, 3 und 4). Im engeren Sinne bedeutet dies einen signifikant höheren LVDP-Wert (Abbildung 2), einen signifikant niedrigeren LVEDP (Abbildung 3) und cPP-Wert (Abbildung 4) bei den TUD behandelten Tieren.

Abbildung 2:



p<0.01 P vs. TUD; \$ p<0.001 ORX+P vs. TUD;
* p<0.01 ORX+P vs. DHT; ^μ p<0.01 P vs. ORX+P

Abbildung 2:

Darstellung des linksventrikulär sich maximal entwickelnden Drucks (LVDP) [mmHg] präischämisch, während der Ischämie- und Reperfusionperiode, aufgetragen gegen die Zeit [min]. Ischämie wurde bei t=0 Minuten begonnen.

(P[Placebo] n=27; TUD[Testosteronundecanoat] n=32; DHT[Dihydrotestosteron] n=15; ORX+P[Orchiectomiert] n=30)

Abbildung 3:

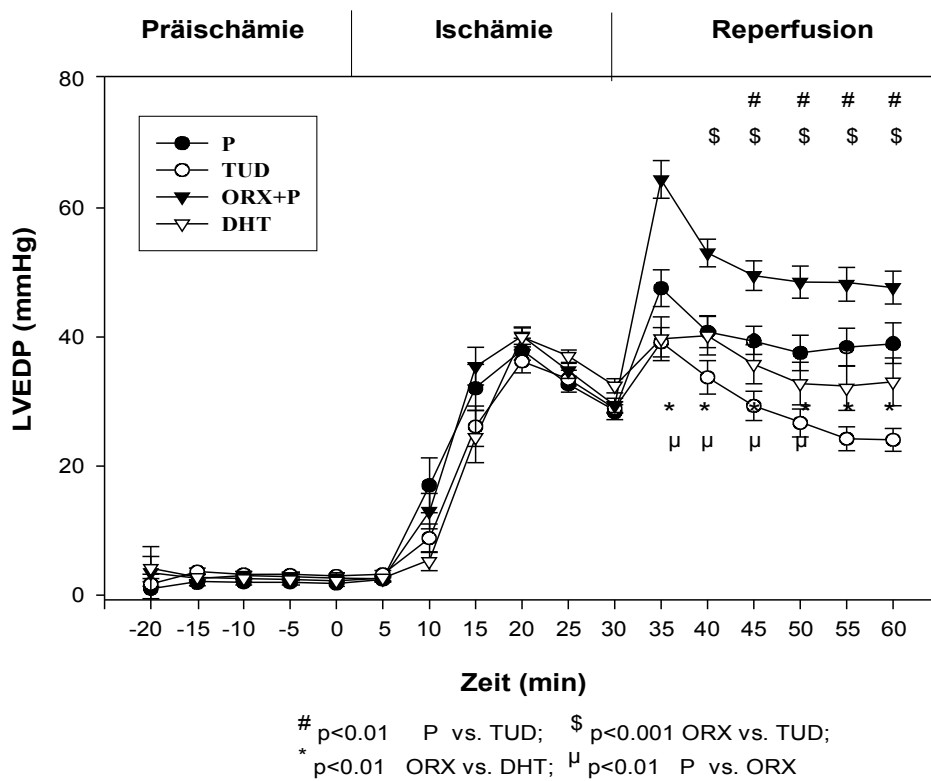
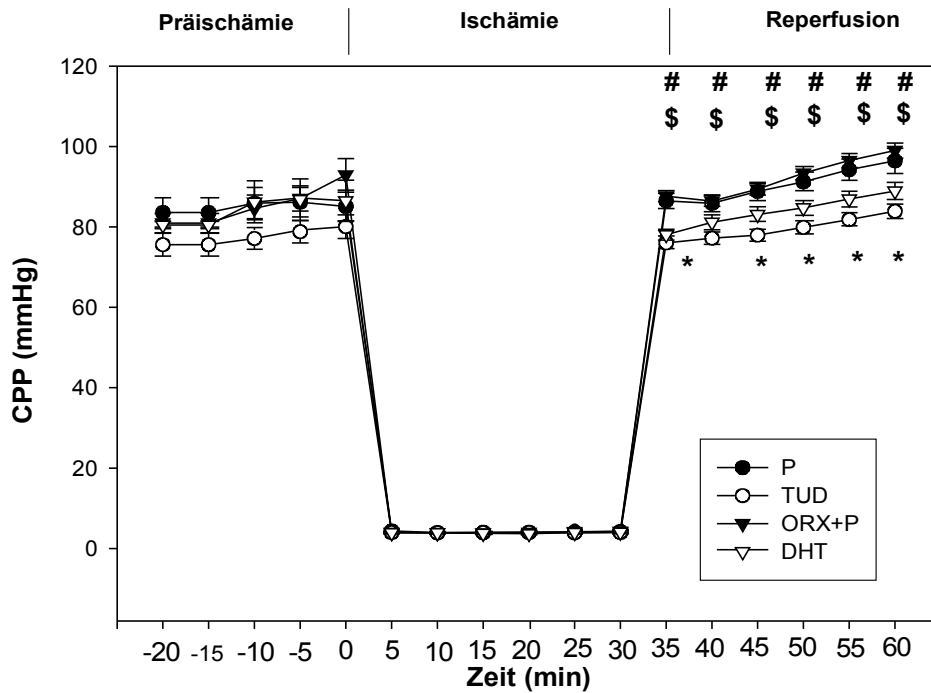


Abbildung 3:

Darstellung des linksventrikulären enddiastolischen Drucks (LVEDP) [mmHg] präischämisch, während der Ischämie- und Reperfusionperiode, aufgetragen gegen die Zeit [min]. Ischämie wurde bei t=0 Minuten begonnen.

(P[Placebo] n=27; TUD[Testosteronundecanoat] n=32; DHT[Dihydrotestosteron] n=15; ORX+P[Orchiectomiert] n=30).

Abbildung 4:



$p < 0.001$ P vs. TUD, \$ $p < 0.001$ ORX+P vs. TUD, * $p < 0.01$ ORX+P vs. DHT

Abbildung 4:

Darstellung des koronaren Perfusionsdrucks (CPP) [mmHg] präischämisch, während der Ischämie- und Reperfusionsperiode, aufgetragen gegen die Zeit [min]. Ischämie wurde bei $t=0$ Minuten begonnen.

(P[Placebo] $n=27$; TUD[Testosteronundecanoat] $n=32$; DHT[Dihydrotestosteron] $n=15$; ORX+P[Orchiectomiert] $n=30$)

3.5. Intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$: Präischämisch, während der Ischämie- und Reperfusion-Phase

Die systolische (s) und diastolische (d) präischämisch gemessene $[\text{Ca}^{2+}]_i$ war in allen Versuchsgruppen gleich (in $\mu\text{mol/l}$: P (n=6) d:0.3±0.049, s:0.918±0.11; TUD (n=6) d:0.4±0.06, s:1.05±0.06; DHT (n=4) d:0.4±0.02, s:1.01±0.04; ORX+P (n=10) d:0.37±0.02, s:0.92±0.29) (Abbildung 5).

Abbildung 5:

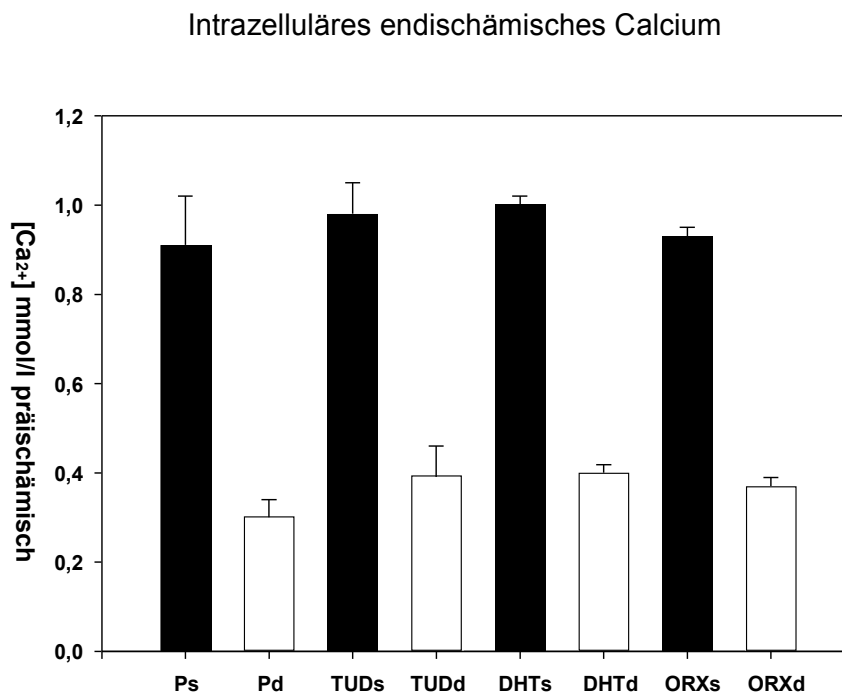


Abbildung 5:

Darstellung der präischämischen systolischen (s) [=schwarze Säulen] und diastolischen (d) [=weisse Säulen] intrazellulären Calciumkonzentration $[\text{Ca}^{2+}]_i$.

Es fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen.

(P[Placebo] n=27 ; TUD[Testosteronundecanoat] n=32 ; DHT[Dihydrotestosteron] n=15 ; ORX+P[Orchiectomiert] n=30)

Am Ende der Ischämie war das intrazelluläre Calcium $[Ca^{2+}]_{\text{endisch}}$ (genormt gegen präischämische Werte) signifikant erhöht in den Rattenherzen der ORX+P-Gruppe im Vergleich zu den TUD behandelten Ratten (Abbildung 6). Der ischämische Calcium-Peak, der repräsentiert wird durch den initialen Peak des $[Ca^{2+}]_i$ -Signals in der ersten Minute der Reperfusion, war nicht signifikant erhöht in den ORX+P-Herzen. Hingegen war der Peak der systolischen Amplitude der ersten 10 Transienten der Ca^{2+} -Oszillationen signifikant erhöht bei der ORX+P-Gruppe im Vergleich zur P-Gruppe (ORX+P 2.63 ± 0.08 vs. P 1.99 ± 0.24 ; $p < 0.01$). Auch das diastolische Niveau der ersten 10 Transienten der Ca^{2+} -Oszillationen erwies sich als höher verglichen mit den TUD-Herzen (ORX+P 1.04 ± 0.12 , TUD 0.41 ± 0.09 ; $p < 0.01$).

Abbildung 6:

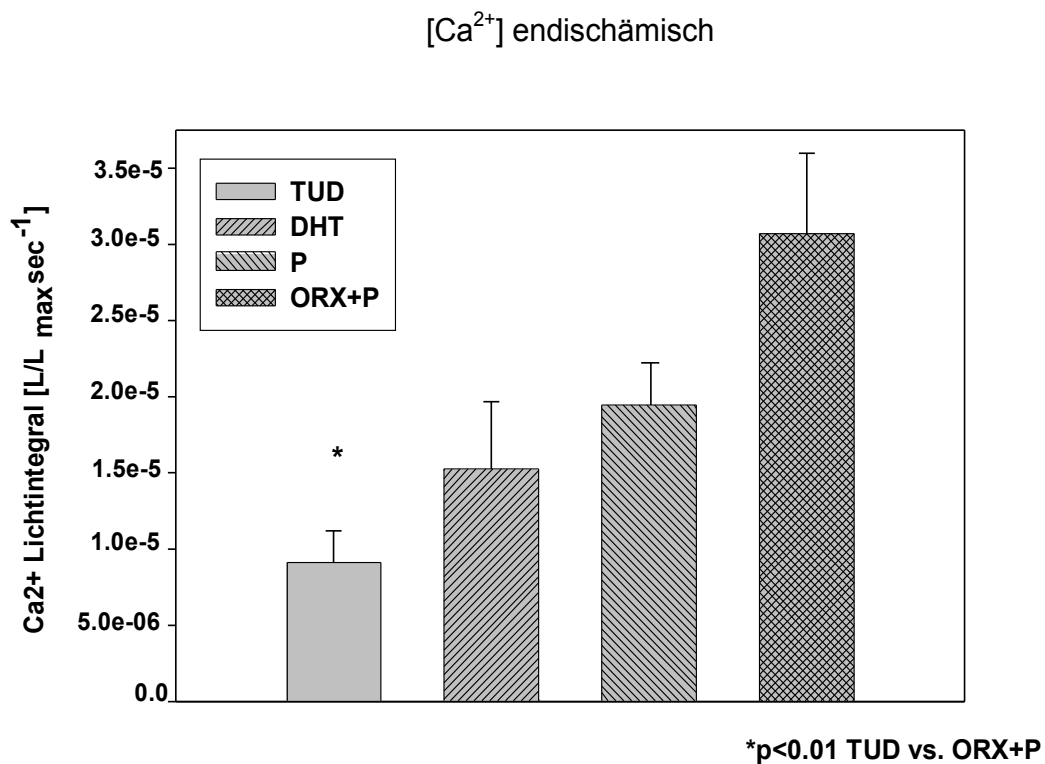
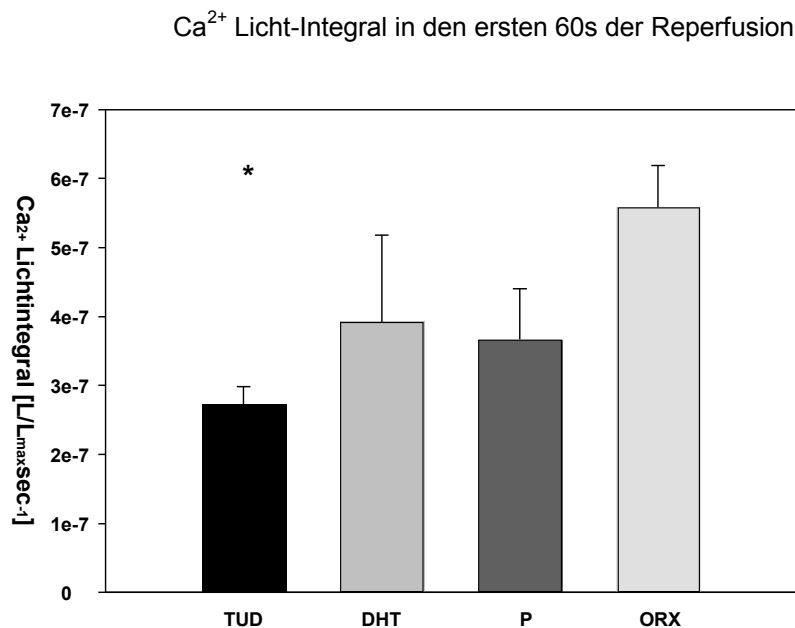


Abbildung 6: Darstellung der intrazellulären Calciumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ am Ende der Ischämie. $[Ca^{2+}]_i$ war signifikant erhöht in den Herzen der orchiektomierten Ratten im Vergleich zu den Herzen der TUD behandelten Ratten ($p < 0.01$).

(P[Placebo] n=27; TUD[Testosteronundecanoat] n=32; DHT[Dihydrotestosteron] n=15; ORX+P[Orchiectomiert] n=30)

Das Calciumintegral der ersten 60 Sekunden der Reperfusion, genormt durch L_{max} , war signifikant erhöht bei der ORX+P-Versuchsgruppe im Vergleich zu den mit TUD behandelten Ratten (ORX+P 0.027 ± 0.002 vs. TUD 0.013 ± 0.001 , $p < 0.01$) (Abbildung 7).

Abbildung 7:



* $p < 0.01$ TUD vs. ORX+P

Abbildung 7: Darstellung der intrazellulären Calciumüberladung (Integral) während der ersten 60 Sekunden nach Reperfusion. Das $[Ca^{2+}]_i$ -Integral war signifikant erhöht in den Herzen der orchiectomierten Ratten im Vergleich zu den mit TUD behandelten Tieren ($p < 0.01$). (P[Placebo] n=27, TUD[Testosteronundecanoat] n=32, DHT[Dihydrotestosteron] n=15, ORX+P[Orchiectomiert] n=30).

3.6. Expression calciumregulierender Proteine [Phospholamban/Na⁺-Ca²⁺-Exchanger/Ryanodin-Rezeptor Typ2/SERCA 2a]

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen bezüglich der Expression calciumregulierender Proteine (ausgedrückt in Units/μg Protein):

Phospholamban (ORX+P: 41.6±0.9 TUD: 39.5±0.4 DHT: 35.3±3.9 P: 39.4±0.7, n.s.)

Na⁺-Ca²⁺-Exchanger (ORX+P: 63.6±0.6 TUD: 60.8±1.29 DHT: 57.3±0.81 P: 58.3±0.4, n.s.)

Ryanodin-Rezeptor Typ2 (ORX+P: 36.5±1.6 TUD: 35.3±0.5 DHT: 35.1±1.1 P: 36.3±1.7, n.s.)

Sarkoplasmatische Calcium-ATPase (SERCA) 2a (ORX+P: 4.2±0.1 TUD: 4.13±0.05 DHT: 3.9±0.02 P: 4.25±0.08, n.s.)

Tabelle 3: Darstellung der Ergebnisse der Westernblots

Protein	ORX	DUT	DHT	Placebo
Phospholamban *	43,15± 1,43	39,6± 0,36	31,28± 1,92	34,97± 3,68
SERCA 2a *	4,4± 0,061	4,13± 0,053	3,87± 0,02	4,33± 0,079
Ryanodine-Rezeptor * Typ 2	39,31± 1,94	32,64± 1,51	35,08± 1,11	36,3± 1,73
Na⁺/Ca²⁺ Exchanger *	64,58± 0,75	60,79± 1,29	56,45± 0,99	57,21± 0,70

* in densitometrischen Einheiten/μg Protein

Tabelle 3: Gezeigt sind die Proteinmengen der unterschiedlichen calciumregulierenden Proteine in densitometrischen Einheiten/μg Protein für die jeweiligen Gruppen.

Abbildung 8: Ryanodin-Rezeptor Typ 2

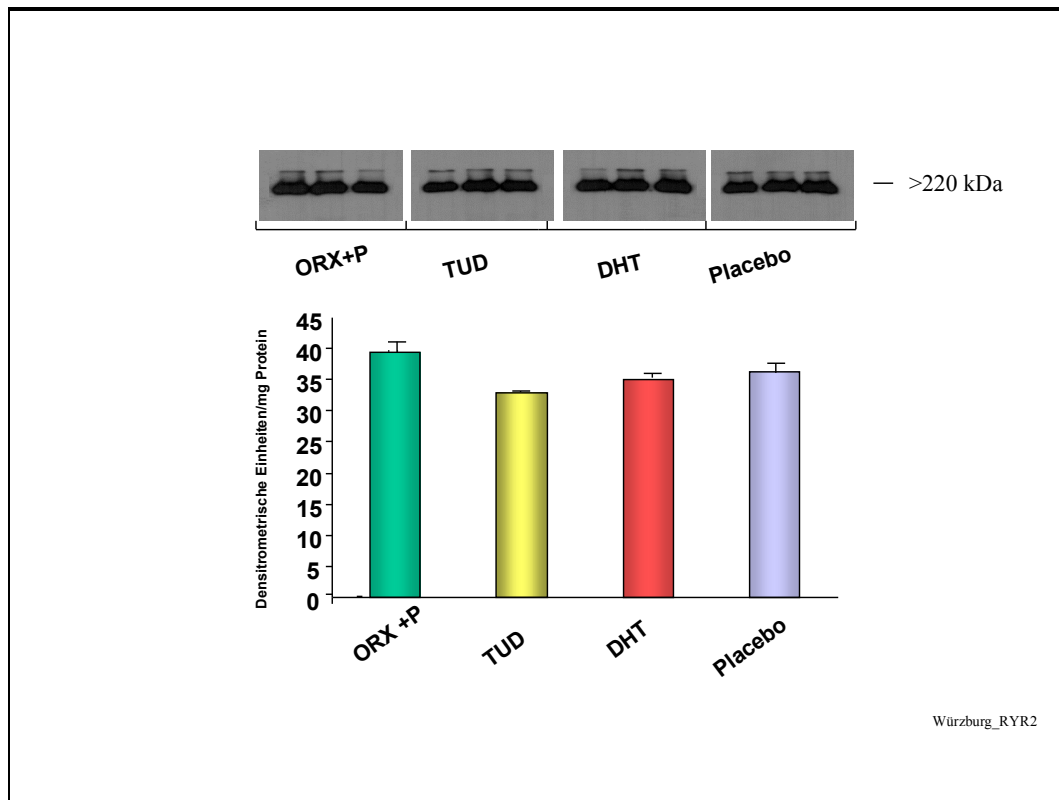


Abbildung 8: Graphische Darstellung der Expression des Ryanodin-Rezeptor Typ 2. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

Abbildung 9: Phospholamban

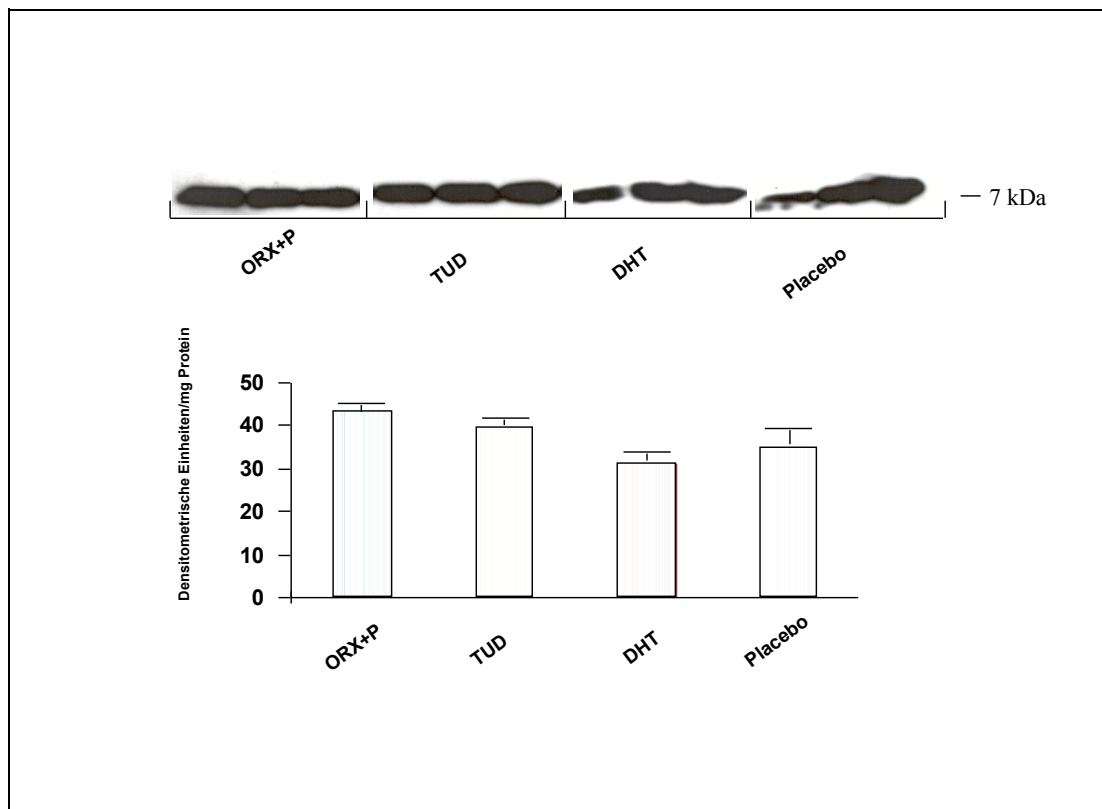


Abbildung 9: Graphische Darstellung der Expression des Phospholamban. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

Abbildung 10 : Na⁺/Ca²⁺-Exchanger

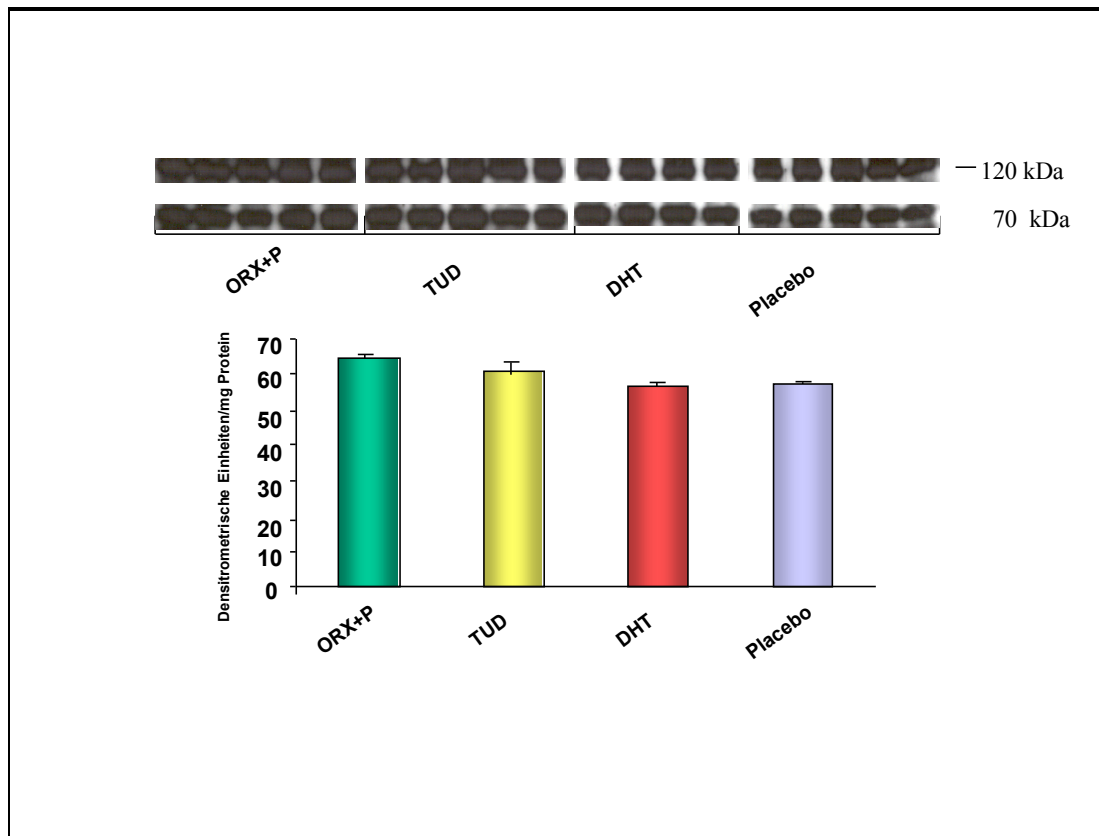


Abbildung 10: Graphische Darstellung der Expression des Na⁺/Ca²⁺-Exchangers. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen.

Abbildung 11: SERCA 2a

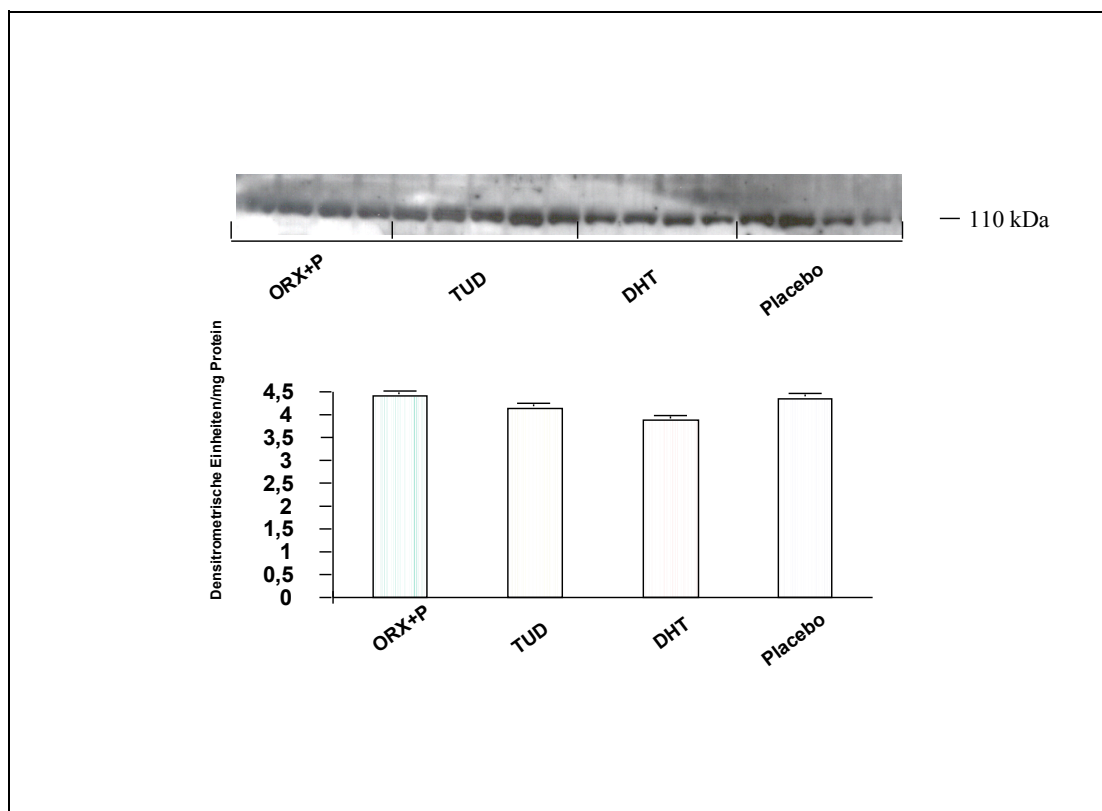


Abbildung 11: Graphische Darstellung der Expression des SERCA 2a-Proteins. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen

Abbildung 12:

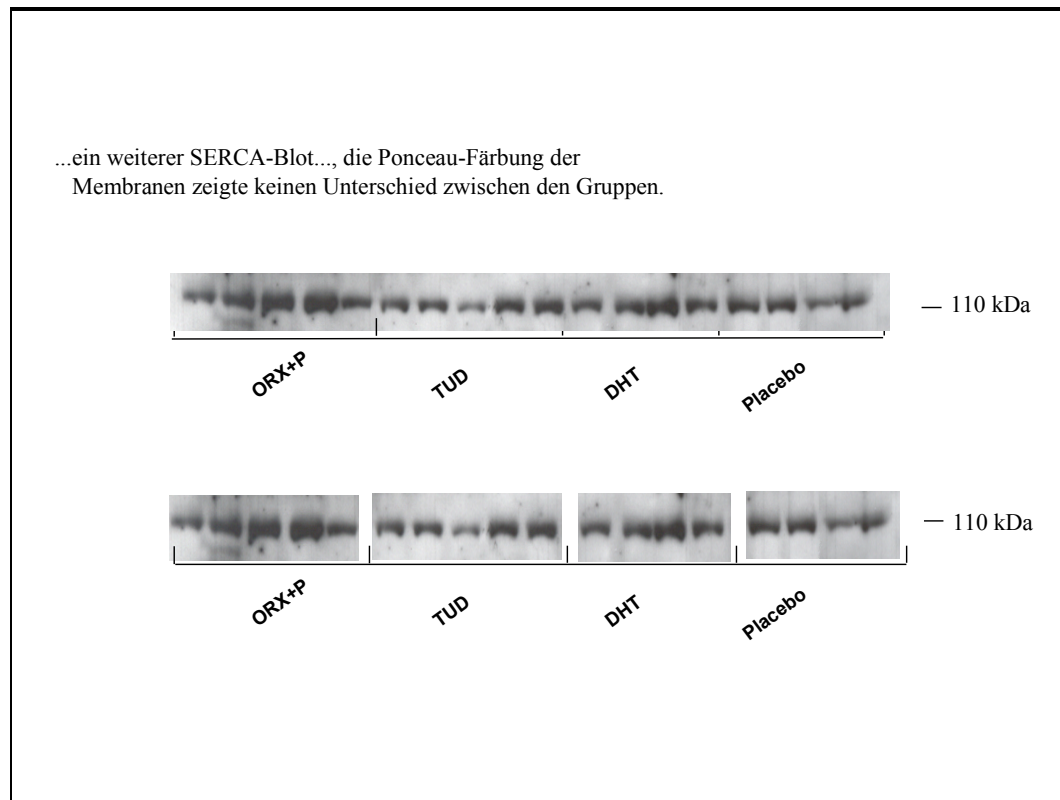


Abbildung 12: Darstellung eines weiteren SERCA-Blotes. Hier zeigt auch die Ponceau-Färbung der Membranen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die kardioprotektiven Effekte einer Testosterongabe auf den Ischämie- / Reperfusionsschaden am isolierten Rattenherz untersucht. Es zeigte sich eine verminderte Empfindlichkeit der Herzen nach Behandlung mit langwirksamen supraphysikalisch dosierten Androgenen (i.e. TUD und DHT) gegenüber myokardialer Ischämie. Die Wiederherstellung der mechanischen Herzfunktion wurde signifikant verbessert, was sich an einem signifikant höheren LVDP und einem erniedrigten LVEDP im Vergleich zur Placebogruppe und zur ORX+P -Gruppe zeigte. Dieser Effekt kann unter anderem durch eine niedrigere endischämische intrazelluläre Kalziumkonzentration $[Ca^{2+}]_i$ erklärt werden, die sowohl zu einem Abfall der $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung in der postischämischen Periode führt als auch zu einer reduzierten systolischen $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillation. Entsprechend war eine Orchiektomie mit einer schlechteren Wiederherstellung der mechanischen Herzfunktionen nach Ischämie assoziiert.

Zwei Wochen nach der Hormonbehandlung konnte eine signifikante kardiale Hypertrophie unter TUD-Applikation im Vergleich zur ORX+P -Gruppe beobachtet werden. Dies zeigte sich in einem Anstieg der LVW/BW-Relation. Diese TUD-induzierte Hypertrophie führte zu keinen negativen Auswirkungen auf die kardiale Leistung in der präischämischen Periode.

Ereignisse während der ersten Minuten nach Reperfusion werden als die Hauptdeterminanten angesehen, die für einen Reperfusionsschaden verantwortlich sind. Hauptfaktoren des Reperfusionsschadens sind „Stunning“, Nekrose und Arrhythmien (=Ca²⁺-Overloadphänomen) [39].

Braunwald und Kloner definierten 1982 den Begriff des myokardialen „Stunning“ als verlängerte, postischämische myokardiale Dysfunktion *ohne* Nekrosebildung mit der Möglichkeit einer vollständigen Wiederherstellung der mechanischen Funktion [40]. Stunning zeigt sich in mehreren klinisch relevanten Erkrankungen z.B. bei instabiler Angina pectoris, dem akuten Koronarsyndrom, ischämischer Kardioplegie, Herztransplantationen oder Koronarangioplastie [39].

Als eine der Hauptursachen für „Stunning“ (reversible postischämische Dysfunktion ohne irreversiblen Schaden), für Nekrosen, Arrhythmien und ebenso für den Reper-

fusionsschaden wurde bereits mehrfach die Überladung der Kardiomyozyten mit Kalzium verantwortlich gemacht [30-33].

Intrazelluläre $[Ca^{2+}]_i$ -Messungen während der kardialen Ischämie und Reperfusion sind von besonderem Interesse, da Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ eine bedeutende Rolle bei der Entstehung von kontraktile Dysfunktion, der Einleitung ischämischer Arrhythmien und bei Zellschäden spielen [41]. Die intrazelluläre Ca^{2+} -Überladung im Rahmen der Reperfusion nach einer Ischämie ist ein wichtiger pathophysiologischer Faktor, der zu einer postischämischen mechanischen Dysfunktion führt und damit für den Reperfusionsschaden verantwortlich gemacht werden kann [40] [42]. Die Fähigkeit der Myokardzellen die $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung zu beseitigen, um wieder eine normale Calciumhomöostase herzustellen, ist in Beziehung zu setzen zur Größe der $[Ca^{2+}]_i$ -Überladung zu Beginn der Reperfusion [42]. In unserer Arbeit zeigte sich eine verbesserte Wiederherstellung der kontraktile Funktion bei allen mit Androgenen (TUD und DHT) behandelten Tieren im Vergleich zur ORX+P-Gruppe, bei der die Ca^{2+} -Überladung vermehrt auftrat. Diese Verbesserung der Funktion wurde durch einen erhöhten LVDP-Wert am Ende der Reperusionsperiode verdeutlicht, während die Werte für CPP und LVEDP signifikant erniedrigt waren.

Untersuchungen der endischämischen $[Ca^{2+}]_i$ -Signale brachten signifikant niedrigere Niveaus in der TUD-Gruppe hervor. In der ORX+P -Gruppe fanden sich zudem signifikant höhere systolische $[Ca^{2+}]_i$ -Oszillationen, die das Auftreten von Zellschäden fördern. Die erhöhte $[Ca^{2+}]_{endisch}$ in der ORX+P -Gruppe könnte ferner zur Beeinflussung der Calciumsensitivität der Myofilamente geführt haben. Es konnte ein vermindertes Ansprechen der Myofilamente ohne Desensibilisierung gegenüber Calcium während der Reperusionsperiode gezeigt werden. Dies führte nicht nur zu einer Schwächung der kontraktile Leistungsfähigkeit, sondern war auch mit einer transienten Calciumüberladung nach Einleitung der Reperfusion assoziiert [43]. Dieser durch Testosteron bedingte Schutz vor Reperfusionsschäden kann nicht durch dessen Einfluss auf die Expression der hier untersuchten „klassischen“ calciumregulierenden Proteine erklärt werden. Ischämische Zustände verursachen eine funktionelle Änderung von Membranproteinen wie z.B. eine verminderte Aktivität der $Na^+/-K^+$ -ATPase, des Na^+-Ca^{2+} -Exchangers, der SERCA und des

Ryanodin-Rezeptors [44]. Es fanden sich aber keine quantitativen Unterschiede in der Proteinmenge des Phospholambans , des Na^+ - Ca^{2+} -Exchangers, des Ryanoid-Rezeptors Typ2 und des SERCA 2a zwischen den einzelnen Versuchsgruppen. Es ist jedoch nicht möglich Unterschiede in der Aktivität dieser Proteine ausschließen, da dieses zu Veränderungen des Phosphorylierungsstatus führen würde [45] , was von uns nicht gemessen worden ist.

Die Calciumüberladung während der Reperfusion ermöglicht es, eine calciumsensitive neutrale Protease (Calpain) zu aktivieren, welche teilweise den Ryanodin-Rezeptor spalten und seine Fähigkeit, Calcium aus dem sarkoplasmatischen Retikulum freizusetzen, reduzieren kann [46] . Dieser dosisabhängige Effekt könnte zu einem Abbau der Myofilamente und zu einer daraus folgenden verminderten Calciumsensitivität führen. Die Wiederherstellung myofilamentärer Integrität des Myokards nach der Reperfusion dauert länger an, als die Post-Beobachtungsperiode von 60 Minuten in unserer Arbeit zeigen konnte. Es deutet darauf hin, dass Testosteron den Ca^{2+} -Eintritt aus dem extrazellulären Raum durch spannungsabhängige Ca^{2+} -Kanäle behindert, wie dies schon in isolierten vaskulären glatten Muskelzellen aufgezeigt werden konnte [47] . Es wäre denkbar, dass Testosteron ebenso die intrazelluläre pH-Erniedrigung verlängert und somit die Myofilamente gegen Reperfusionsschäden schützt [48] .

Zusammenfassend kann man sagen, dass das Niveau des steigenden endischämischen Calciums fähig ist, pleiotrope Effekte auszulösen, die assoziiert sind mit einer Beeinträchtigung der funktionellen Wiederherstellung des postischämischen Myokardgewebes.

Vorangegangene Studien zeigten, dass die Gabe von Testosteron die koronare Vasodilatation sowohl durch NO-abhängige [49] [50] als auch NO-unabhängige Wege [13] verbessert.

Durch intrakoronare Testosteronverabreichung war es möglich, eine koronare Dilatation bei Männern mit vorhandener koronar-arterieller Gefäßerkrankung zu verursachen [51] .

Es stellte sich heraus, dass eine koronare Gefäßrelaxation sowohl bei Östrogen- als auch bei Testosteron-behandelten Koronararterien vorhanden war, wobei die Wirkung von 17 β -Estradiol sogar stärker war als die von Testosteron. Beide Sexualhormone wirken durch Inhibition des Prostaglandin F_{2 α} (PGF_{2 α}) und durch eine Depolarisation, welche wiederum eine calciumvermittelte Koronarkontraktion induziert [47].

Die verbesserte postischämische Wiederherstellung – wie sie diese Arbeit aufzeigt – könnte von einer optimierten koronaren Dilatation unterstützt worden sein, was einen erhöhten koronaren Blutfluss während der Reperfusionphase erlaubt und so den myokardialen Reperfusionsschaden mindert. In unserem Versuch wurde die Erholung des Gewebes nach der globalen Ischämie sowohl durch das zu Östrogen aromatisierbare TUD als auch durch das nicht aromatisierbare DHT verbessert. Das Ergebnis legt nahe, dass dieser Effekt in Beziehung gesetzt werden kann zu der androgenen Aktivität beider Präparationen.

Ebenso scheint es, dass die TUD-Behandlung effektiver war als jene mit DHT. Die Attenuierung des nützlichen postischämischen Effekts von testosteronbehandelten gegenüber DHT-behandelten Ratten, könnte mit einem additiven Effekt von Testosteron und Östrogen in Beziehung gesetzt werden. Dieser resultiert aus der partiellen Aromatisierung von Testosteronundecanoat zu Östrogen bei den testosteronbehandelten Tieren, die bei den mit nichtaromatisiertem DHT-behandelten Ratten ausblieb.

Nichts desto weniger könnte der verbesserte koronare Perfusionsdruck (CPP) ebenso Ergebnis des verminderten postischämischen diastolischen Druckes und des somit verminderten Kompressionsdrucks des Myokards auf die Mikrovaskularisation sein.

Da jedoch keine direkten Messungen des koronaren Blutflusses in unserer Arbeit vorgenommen wurden, ist hier nur der indirekte Beweis, durch einen signifikant erhöhten CPP in der Reperfusionsperiode bei der Placebo- und der ORX+P -Gruppe verglichen mit den TUD- und DHT-behandelten Ratten gegeben (siehe Abbildung 4). Dies könnte einen verminderten mikrozirkulären Widerstand durch eine androgeninduzierte Dilatation der Makro- und Mikrogefäße nahe legen. Der verbesserte CPP kann also Ergebnis des verminderten postischämischen diastolischen Druckes sein - also des oben erwähnten verminderten Kompressionsdruckes.

Außerdem konnten wir in einer anderen Untersuchung unserer Arbeitsgruppe zum ersten Mal aufzeigen, dass eine Testosteronbehandlung zu einer Induktion der kardialen IGF-1-messenger-RNA-Expression und seiner „downstream target“ Phospho-AKT (pAKT) führt [52]. Dies ist interessant, da IGF-1 ein wichtiger Regulator der vaskulären Funktion ist und durch Stimulation der NO-Freisetzung aus kultiviertem vaskulärem Endothel wirkt [53]. Entsprechend konnte in Tierexperimenten bewiesen werden, dass sowohl die IGF-1-Gabe als auch die pAKT-Aktivierung einen Schutz gegen ischämieinduzierte Reperfusionsschäden durch Verhinderung der Apoptose mit sich bringen [54][55]. Somit scheint es möglich, dass die Hochregulation von antiapoptischen Signalwegen durch Androgene zu dem protektiven Effekt von Androgenen, der in dieser Arbeit beobachtet wurde, beiträgt.

Zusammenfassend kann man sagen, dass eine Testosteronbehandlung zu einer Erhaltung der akuten mechanischen myokardialen Funktion nach globaler No-Flow-Ischämie führt. Diese Verbesserung korreliert mit einer niedrigeren intrazellulären Ca^{2+} -Überladung während der Reperfusionsphase. Dieser protektive Effekt scheint primär androgenvermittelt zu sein.

4.1. Klinische Bedeutung

Weitere Untersuchungen werden folgen müssen, um Klarheit über einen klinisch-medizinischen Nutzen hinsichtlich der Testosterongabe in Situationen, in denen es zu Ischämie- und Reperfusionssituationen kommt, zu schaffen. Als Beispiel solcher Situationen seien die Kardioplegie im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe, das akute Koronarsyndrom, Situationen vor einer operativen oder interventionellen Revaskularisation oder Thrombolyse genannt. Ob oder wie man die von uns dargestellten positiven bzw. protektiven Effekte auf die Wiederherstellung der Myokardfunktion nach No-Flow-Ischämie nutzen kann, wird in weiteren klinischen Studien erarbeitet werden müssen. Natürlich stellt sich auch hier die Frage, in wie weit die im Tierexperiment erhobenen positiven Effekte auf den menschlichen Organismus übertragbar sind und ob es sich hierbei um „Langzeiteffekte“ handelt.

4.2. Limitationen des Modells

Da die Herzen nach Beendigung des Experiments entweder für die vorgesehene Analyse der Calcium-regulierenden Proteine in flüssigem Stickstoff bei einer Temperatur von -70°C gelagert worden oder mittels Triton-X-100 für die Kalibrierung des intrazellulären Calciumsignals lysiert worden sind, konnte kein Myokardgewebe für histologische Untersuchungen zurückbehalten werden. Aus diesem Grund konnten keine möglichen reperfusionsinduzierten morphologischen Veränderungen infolge calciuminduzierter Zerstörung der Myozyten untersucht werden.

Ein Teil des Anstiegs des Aequorin-Lichtsignals bei der Reperfusion könnte auch vom Zelltod herrühren, da Aequorin aus den Zellen in den Extrazellularraum läuft. Dies stellt eine potentielle Fehlerquelle dar. Vor- und Nachteile der Kalziumbestimmung mittels dieser Messmethode wurden bereits detailliert diskutiert [56] [57].

5. Zusammenfassung

In dieser Arbeit untersuchten wir den Einfluss von Testosteron auf den myokardialen Ischämie- Reperfusionsschaden und den entsprechenden intrazellulären Calciumstoffwechsel ($[Ca^{2+}]_i$).

Non-orchiektomierte geschlechtsreife männliche Wistar-Ratten wurden zufällig Gruppen mit verschiedener hormoneller Behandlung zugewiesen; einer Placebo-Gruppe, einer Gruppe mit Testosteronundecanoat-Behandlung und einer Gruppe mit 5- α Dihydrotestosteron-Behandlung. Zusätzlich wurden in weiteren Serien orchiektomierte Ratten mit Placebo behandelt.

Zwei Wochen nach der jeweiligen hormonellen Behandlung wurden die Herzen entnommen und in eine Langendorff-Apparatur platziert.

Die isolierten, mit Puffer perfundierten Herzen wurden 30 Minuten lang einer no-flow-Ischämie-Phase und anschließend einer 30minütigen Reperfusionphase ausgesetzt.

Die Wiederherstellung der myokardialen Funktion wurde gemessen durch Untersuchungen des prä- und postschämischen linksventrikulären (LV) systolischen bzw. diastolischen Drucks, des koronaren Perfusionsdrucks und der Veränderungen der $[Ca^{2+}]_i$ (mittels Aequorin-Lumineszenz-Methode).

Calciumregulierende Proteine wurden mittels Westernblotting analysiert.

Der Quotient aus linksventrikulärem Gewicht zum Körpergewicht (LVG/KG) stieg unter Testosteronbehandlung im Vergleich zu den orchiektomierten Ratten an.

Die Wiederherstellung der kontraktilen Funktion war verbessert bei den mit Testosteron behandelten Tieren: Am Ende der Reperfusion war bei den testosteron-behandelten Ratten der linksventrikuläre systolische Druck höher und der enddiastolische Druck niedriger.

Die endischämische $[Ca^{2+}]_i$ und die intrazelluläre Calciumüberladung erwiesen sich ebenfalls nach Reperfusion als signifikant niedriger bei den testosteronbehandelten

Tieren im Vergleich zu den orchiektomierten Ratten. Jedoch blieben die Niveaus der calciumregulierenden Proteine unberührt.

Zusammenfassend kann man nun sagen, dass die Gabe von Testosteron zur Erhaltung der akuten mechanischen myokardialen Funktion nach globaler Ischämie führt. Dieser begünstigende Effekt war mit einer Verminderung der reperfusionsinduzierten intrazellulären Calciumüberladung assoziiert.

6. Literaturnachweis

1. WHO, world health report. 2000: p. 169.
2. Szucs TD, S.E., Economic significance of heart failure. An overview of costs and economics of therapy. *Herz*, 2000. 25 (5): p. 538-46.
3. Grundmann, E., Einführung in die allgemeine Pathologie. Vol. 9. 1994, München: Urban&Fischer Verlag. 196-198.
4. Isles CG, H.D., Hawthorne VM, Lever AF, Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey: comparison with men. *Lancet*, 1992. 339: p. 702-706.
5. Barrett-Conor E, Sex differences in coronary heart disease: why are women so superior? *Circulation*, 1997. 95: p. 252-264.
6. Collins P, R.G., Jiang C, Lindsay D, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Cardiovascular protection by oestrogen -- a calcium antagonist effect? *Lancet*, 1993. 341: p. 1264-1265.
7. Mendelson ME, K.R., The protective effect of estrogen on the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine*, 1999. 340(1801-1811).
8. Delyani JA, M.T., Nossuli TO, Lefer AM, Protection from myocardial reperfusion injury by acute administration of 17 β -estradiol. *J Mol Cell Cardiol*, 1996. 28: p. 1001-1008.
9. Rossouw JE, A.G., Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators, Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal result from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 2002. 288(321-333).
10. Crews JK, K.R., Antagonistic effects of 17 β -Estradiol, Progesterone, and Testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *American Heart Association*, 1999. 19: p. 1034-1040.
11. Weiner CP, L.L., Baylis SA, Knowles RG, Charles IA, Moncada S, Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994. 91: p. 5212-5216.

12. Hayashi T, F.J., Ignarro LJ, Chaudhuri G, Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992. 89: p. 11259-11263.
13. Yue P, C.K., Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P, Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation*, 1995. 91: p. 1154-1160.
14. Ferrer M, E.A., Marin J, Balfagon G, Chronic treatment with the anabolic steroid, nandrolone, inhibites vasodilator responses in rabbit aorta. *Eur J Pharmacol*, 1994. 3: p. 233-41.
15. Luke LJ; Farb A, V.R., Sample RHB, Suddencardiac death during exercise in a weight lifters using anabolic androgenic steroids: Pathologic and toxicological findings. *Journal of Forensic Sciencology*, 1990. 35: p. 1441-1447.
16. Appleby M, F.M., Martin M, Myocardial infarction, hyperkalemia and ventricular tachycardia in a young male body-builder. *International Journal of Cardiology*, 1994. 44: p. 171-174.
17. Dickermann RD, S.F., Prather I, McConathy WJ, Sudden cardiac death in a 20-year-old bodybuilder using anabolic steroids. *Cardiology*, 1995. 86: p. 172-173.
18. Campbell SE, F.A., Weber KT,, Pathologic remodeling of the myocardium in a weightlifter taking anabolic steroids. *Blood Pressure*, 1993. 2: p. 213-216.
19. Barrett-Conor E, K.K.-T., Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A perspective population based study. *Circulation*, 1988. 78(539-545).
20. Alexandersen P, H.J., Christiansen C, The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: review. *Atherosclerosis*, 1996. 125: p. 1-13.
21. Bhasin S, B.C., Bremner WJ, Plymate SR, Tenover JL, Korenman SG, Nieschlag E, Issues in testosterone replacement in older men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83: p. 3435-3448.
22. Georg Löffler, P.E.P., *Biochemie und Pathobiochemie*. Vol. 6. 1998, Berlin: Springer Verlag. 836-849.
23. Vermeulen A, K.J., Deslypere JP, Thomas G, Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to

- plasma androgens in hypogonadism of obese men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 76: p. 1140-6.
24. Behre HM, A.K., Oettel M, Hubler D, Nieschlag E, Intramuscular injection of testosterone undecanoate for the treatment of male hypogonadism: phase I studies. *Eur J Endocrinol*, 1999. 140: p. 414-9.
 25. G. Ertl, D.F., P Gaudron, K. Hu, A. Laser, S. Neubauer, W. Schorb, Übergang von Myokardischämie in Herzinsuffizienz. *c. Z Kardiol*, 1998. 87: p. 667-675.
 26. Renz-Polster H., B.J., *Innere Medizin*. Vol. 2. Auflage. 2001, München/Jena: Urban&Fischer Verlag. 70.
 27. Brodie BR, S.T., Kissling G, Hansen CJ, Muncy DB, Importance of time to reperfusion for 30 days and late survival and recovery of left ventricular function after primary angioplasty for acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1998. 32(5): p. 1312-9.
 28. Yousef ZR, R.S., Bucknall CA, Sulke AN, Marber MS, Late intervention after anterior myocardial infarction: effects on left ventricular size, function, quality of life and exercise tolerance: results of the Open Artery Trial (TOAT Study). *J Am Coll Cardiol*, 2002. 40: p. 869-76.
 29. M.J., O., *Pathologie verstehen*, ed. G.T. Verlag. Vol. 2. Auflage. 2001, Stuttgart. 274.
 30. Callies F, K.U., von zur Mühlen C, Tomaszewski M, Beer S, Allolio B, Testosterone undecanoate: a useful tool for testosterone administration in rats. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2003. 111: p. 203-208.
 31. Cowley BD Jr, R.J., Muessel MJ, Gattone VH 2nd, Gender and effect of gonadal hormones on the progression of inherited polycystic kidney disease in rats. *Am J Kidney Dis*, 1997. 29: p. 265-272.
 32. Strömer H, d.G.M.H., Horn M, et al., Na⁺/H⁺ exchange inhibition with HOE642 improves postischemic recovery due to attenuation of Ca²⁺ overload and prolonged acidosis of reperfusion. *Circulation*, 2000. 101: p. 2749-2755.
 33. Strömer H, C.A., Szymanska G et al., Validation of different methods of compare cardiac function in isolated hearts of varying sizes. *American Journal of Physiology*, 1997. 272: p. H501-H510.

34. Kihara Y, G.W., Morgan JP, Direct measurements of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. *Circ Res*, 1989. 65: p. 1029-1044.
35. Eberli FR, S.H., Ferrell MA, Varma N, Morgan JP, Neubauer S, Apstein CS, Lack of direct role for calcium in ischemic diastolic dysfunction in isolated hearts. *Circulation*, 1992. 102: p. 2643-2649.
36. Münch G, B.B., Hoischen S, Brixius K, Bloch W, Reuter H, Schwinger RH, Unchanged protein expression of sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase, Phospholamban, and calsequestrin in terminally failing human myocardium. *J Mol Med*, 1998. 76: p. 434-441.
37. Münch G, B.B., Sugaru A, Schwinger RHG, Isoform expression of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release channel (ryanodine channel) in human myocardium. *J Mol Med*, 2000. 78: p. 352-360.
38. Towbin H, S.T., Gordon J, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979. 76: p. 4350-4354.
39. Gao WD, A.D., Brackx PH, Marban E, Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium: direct evidence for decreased myofilament responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circulation Research*, 1995. 76: p. 1036-1048.
40. Braunwald E, K.R., The Stunned Myocardium: Prolonged, Postischemic Ventricular Dysfunction. *Circulation*, 1982. 66: p. 1146-1149.
41. Murphy JG, M.J., Smith TW, The role of calcium in the ischemic myocardial injury. *Circ Res*, 1987. 75: p. 15-24.
42. Kusuoka H, P.J., Weisman HF, Weisfeldt ML, Marban JP, Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium: depressed Ca²⁺-activation as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest*, 1987. 79: p. 950-961.
43. Carrozza JP Jr, B.L., Williams CP, Kuntz RE, Grossman W, Morgan JP, Decreased myofilament responsiveness in myocardial stunning follows transient calcium overload during ischemia and reperfusion. *Circulation Research*, 1992. 71: p. 1334-1340.

44. Assayag P, C.D., Marty I, de Leiris J, Lompre AM, Bouc F, Valere PE, Lortet S, Swynghedauw B, Besse S, Effects of sustained low-flow ischemia on myocardial function and calcium-regulating proteins in adult and senescent rat hearts. *Cardiovasc Res*, 1998. 38: p. 169-80.
45. Vittone L, M.-W.C., Said M, Ferrero P, Mattiazzi A, Time course and mechanisms of phosphorylation of phospholamban residues in ischemia-reperfused rat hearts. Dissociation of phospholamban phosphorylation pathways. *J Mol Cell Cardiol*, 2002. 34: p. 39-50.
46. Lokuta AJ, M.M., Sander PR, Fishman GI, Valdivia HH, Modulation of cardiac ryanodine receptors by sorcin. *J Biol Chem*, 1997. 272: p. 25333-25338.
47. Murphy JG, K.R., Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17β -estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 291: p. 44-52.
48. Kitakaze M, W.M., Marban E, Acidosis during early reperfusion prevents myocardial stunning in perfused hearts. *J Clin Invest*, 1988. 82: p. 920-927.
49. Chou TM, S.K., Hutchinson SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K, Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance in arteries in vivo. *Circulation*, 1996. 94: p. 2614-2619.
50. Collins P, R.G., Sarrel PM, et al., 17β -Estradiol attenuates acetylcholin-induced coronary artery constriction in women but not in men with coronary artery disease. *Circulation*, 1995. 92: p. 24-30.
51. Webb CM, M.J., Hayward CS, Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary artery disease. *Circulation*, 1999. 100: p. 1690-1699.
52. Nahrendorf M, F.S., Hu K, von zur Mühlen C, Tomaszewski M, Scheuermann H, Kaiser R, Jazbutyte V, Beer S, Bauer W, Neubauer S, Ertl G, Allolio B, Callies F, Effect of testosterone on post-myocardial infarction remodeling and function. *Cardiovasc Res*, 2003. 57: p. 370-378.
53. Tsukahara H, G.D., Tonshoff B, Gelato MC, Goligorsky MS, Direct demonstration of insulin-like growth factor I -induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int*, 1994. 45: p. 598-604.

54. Buerke M, M.T., Skurk C, Nuss C, Tomaselli K, Lefer AM, Cardioprotective effects of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995. 92: p. 8031-8035.
55. Wolfman JC, P.T., Der CJ, Wolfman A, Cellular N-Ras promotes cell survival by downregulation of jun N-terminal protein kinase and p38. *Mol Cell Biol*, 2002. 22: p. 1589-1606.
56. Cobbold PH, R.T., Fluorescence and bioluminescence measurement of cytoplasmic free calcium. *Biochem Journal*, 1987. 248: p. 313-328.
57. Blinks JR, W.W., Hess P, Prendergast FG, Measurement of Ca²⁺ concentrations in living cells. *Prog Biophys Mol Biol*, 1982. 40: p. 1-114.

ISABEL KIRSCH

Birkenweg 17
D-66663 Merzig
Telefon privat (0049) 06861-992268

LEBENS LAUF

Angaben zur Person:

Name : Isabel Christina Kirsch
Wohnort: Birkenweg 17
66663 Merzig
Tel.: 06861-992268
01520-4653121
aktueller Wohnort (bis 07/06): Hochhauserstrasse 4
26121 Oldenburg
Tel.: 0441-8007280
Geburtstag und -ort: 11.11.1977 in Merzig
Familienstand: ledig
Konfession: römisch katholisch
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1984-1986 Grundschule Ballern-Rech
1986.1988 Grundschule Merzig-Kreuzberg
1988.1992 Gymnasium am Stefansberg Merzig
1992.1997 Robert-Schuman-Gymnasium Saarlouis
24.6.1997 Abitur

Berufsausbildung:

1997/98 Vorklinisches Studium / Martin-Luther-Universität Halle-Saale
1998.1999 Vorklinisches Studium / Julius-Maximilians-Universität Würzburg
14.09.1999 Ärztliche Vorprüfung
1999.2000 Klinisches Studium / Julius-Maximilians-Universität Würzburg
29.08.2000 1.Staatsexamen
2000.2003 Klinisches Studium / Julius-Maximilians-Universität Würzburg
31.3.2003 2.Staatsexamen

28.4.2003 Beginn des Praktischen Jahres / Innere Medizin / Universitätsklinik Würzburg
18.8.2003 Praktisches Jahr / Gynäkologie und Geburtshilfe / Universitäts-Frauenklinik
Würzburg
8.12.2003 Praktisches Jahr / Chirurgie / Universitätsklinik Würzburg
19.05.2004 3.Staatsexamen

Studienbegleitende Tätigkeiten:

Pflegepraktika:

08.1997-09.1997 St.Nikolaus Hospital / Fachklinik für geriatrische Rehabilitation / Wallerfangen
9.1998.10.1998 St.Nikolaus Hospital / Fachklinik für geriatrische Rehabilitation / Wallerfangen

Famulaturen:

3.2000.4.2000 Innere Medizin-Famulatur / SHG-Klinik Merzig
2.2001.3.2001 Chirurgie-Famulatur / Policlinique Gentilly -Nancy / Docteur Grosdidier
9.2001 Gynäkologie und Geburtshilfe-Famulatur / Charité –Universitätsklinikum Berlin
2.2002.3.2002 Allgemeinarzt-Famulatur / Allgemeinarztpraxis Merzig-Ballern
09.2002-10.2002 Anästhesie-Famulatur / Universitätsklinik für Anästhesie und Allgemeine
Intensivmedizin Wien

Freiwillige Fortbildung:

2000-2003 Mitarbeit in der endokrinologisch-kardiologischen Arbeits-/Forschungsgruppe der Inneren Medizin der Universität Würzburg Prof.Dr.Ertl/Prof.Dr.Allolio
2001 Teilnahme an der Lehrveranstaltung: Französisch für Mediziner / Zentrum für Sprachen und Mediendidaktik der Universität Würzburg
2001/2002 Teilnahme an dem Kursus: Einführung in die abdominelle Ultraschalldiagnostik Anfänger
2002 Teilnahme an dem Kursus: Einführung in die abdominelle Ultraschalldiagnostik Fortgeschrittene
2002/2003 Teilnahme an dem Kursus: Einführung in die radiologische Diagnostik der Herz-Thorax-Erkrankungen

Klinische Berufsausbildung:

ÄIP/Assistenzarztzeit:

09/04 -06/06 Städtisches Klinikum Oldenburg,
Fachrichtung: Gynäkologie und Geburtshilfe, Chefarzt Prof. Dr. med. Mühlenstedt
Ab 07/06 Klinikum Süd Nürnberg, Frauenklinik II; Chefärztin Prof. Dr. med. Brucker

Isabel Kirsch

Oldenburg, den 11.05.2006

