

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

Einfluß von supraphysiologisch dosiertem Testosteron auf das  
Remodeling nach Myokardinfarkt bei der Ratte

Inaugural – Dissertation  
zur Erlangung der Doktorwürde der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg  
vorgelegt von  
Constantin von zur Mühlen  
aus Hannover

Würzburg, Februar 2004

***Referent:*** Prof. Dr. med Bruno Allolio  
***Koreferent:*** Prof. Dr. med Olaf Elert  
***Dekan:*** Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2004

Der Promovend ist Arzt

*In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet*

# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Fragestellung	1
1.1.	Androgene und kardiovaskuläre Effekte	1
1.2.	Androgene und myokardiale Effekte	2
1.3.	Sexueller Dimorphismus des postinfarziellen Remodelings	3
2.	Grundlagen	4
2.1.	<b>Myokardinfarkt</b>	<b>5</b>
2.1.1.	Phase I: Zelltod	5
2.1.2.	Phase II: Entzündung	6
2.1.3.	Phase III: Granulationsgewebe	6
2.1.4.	Phase IV: Reparatur und Remodeling	7
2.2.	Anatomische Ebene des postinfarziellen Remodelings	7
2.3.	Zelluläre und molekulare Basis des postinfarziellen kardialen Remodelings	9
2.4.	Arrhythmien, Fibrose und Kardiales Remodeling	11
2.5.	Therapeutische und experimentelle Optionen zur Beeinflussung des Remodelings	11
3.	Material und Methodik	13
3.1.	Versuchstiere	13
3.2.	Vorversuche zur Ermittlung der adäquaten Testosterondosis und -applikation	13
3.2.1.	Gruppeneinteilung der Pharmakokinetik-Versuche	14
3.2.1.1.	Placebo-Gruppe	15
3.2.1.2.	Orchiektomie-Gruppe	15
3.2.1.3.	Testosteronundekanoat-Gruppe (TUD)	15
3.2.1.4.	Testosteron Pellet-Gruppe (TP)	16

3.2.2.	Blutentnahme	16
3.3.	Versuchsprotokolle „Chronisches Infarktmodell“	17
3.3.1.	Zeitliche Abfolge der Versuche	18
3.4.	Behandlung der einzelnen Gruppen	19
3.4.1.	Medikamentöse und operative Behandlung	19
3.4.1.1.	Placebogruppe (PLAC)	19
3.4.1.2.	Testosterongruppe (TUD)	19
3.4.1.3.	Orchiektomie (ORCH)	19
3.4.1.4.	Gewährleistung konstanter Hormonspiegel	20
3.4.2.	Scheininfarzierung/Infarzierung (SHAM/MI)	20
3.4.3.	Blutentnahme	21
3.5.	NMR-Messungen	21
3.6.	Echokardiographie	22
3.7.	In-vivo Hämodynamik	23
3.8.	Langendorff-Perfusion	25
3.8.1.	Präparation des Rattenherzens	25
3.8.2.	Messung der mechanischen Herzfunktion	26
3.9.	Molekularbiologische Methoden	27
3.9.1.	RNA-Isolierung	27
3.9.1.1.	Homogenisierung der Gewebeproben	27
3.9.1.2.	Phasenseparation	28
3.9.1.3.	RNA-Präzipitation und Waschung	28
3.9.1.4.	RNA-Auflösung und Quantifizierung	28
3.9.1.5.	Sondensynthese für Northern-Blot	28
3.9.2.	Northern-Blot	29
3.9.2.1.	Agarose-Formaldehyd-Gel-Elektrophorese	29
3.9.2.2.	Crosslinking	30
3.9.2.3.	Prähybridisierung und Hybridisierung	30
3.9.3.	Messungen für myosin heavy chains (MHC)	31
3.9.4.	Polarisationsmikroskopische Kollagenmessung	32
3.10.	Auswertung/ Ergebnisse	33

3.10.1.	Immunoassay für Testosteron	33
3.10.2.	Bestimmung der Osmolalität	33
3.10.3.	Einteilung der Infarktgruppen	33
3.10.4.	Beurteilung der Mortalität	34
3.10.5.	Statistische Auswertung der Versuchsdaten	34
4.	Ergebnisse	35
4.1.	Pharmakokinetik-Abschnitt	35
4.2.	Mortalität	37
4.3.	Gewichte	38
4.4.	Serumtestosteronspiegel und Osmolalität	39
4.5.	Infarktgrößen	40
4.6.	Absolute Herzgewichte	40
4.7.	Relative Herzgewichte	40
4.7.1.	Quotient Linker Ventrikel/Körpergewicht	41
4.7.2.	Quotient Rechter Ventrikel/Körpergewicht	43
4.8.	Echokardiographie	44
4.8.1.	Fractional Shortening	44
4.8.2.	Mitrales E/A	45
4.8.3.	Linksventrikuläre Diameter	46
4.9.	NMR-Messungen	47
4.9.1.	Enddiastolische Wanddicke	47
4.9.2.	Veränderungen der linksventrikulären Masse über die Zeit	48
4.10.	In-vivo Hämodynamik	49
4.10.1.	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck	49
4.11.	Langendorff-Hämodynamik	51
4.11.1.	Linksventrikuläre Druckdifferenz	51
4.12.	Molekularbiologische Ergebnisse	53
4.12.1.	Atriales natriuretisches Peptid (ANP) im Northern-Blot	53
4.12.2.	Myosin Heavy Chains (MHC)	55
4.12.3.	Kollagengehalt der freien Ventrikelwand	57

4.12.4. IGF-1 mRNA-Expression im Northern-Blot	58
5. Diskussion	60
5.1. Vorversuche - Testosteronundekanoat erzeugt stabile Testosteronkonzentrationen	60
5.2. Einfluss der Therapieform auf die infarktassoziierte Mortalität	61
5.3. Körpergewicht, Herzgewicht und kardiale Androgenrezeptoren	61
<b>5.4. Kardiale Hypertrophie und ihre Bedeutung</b>	<b>63</b>
5.5. Kollagengehalt und Androgene	65
5.6. Mechanismen der testosteroninduzierten Hypertrophie	66
5.7. Echokardiographie und NMR	68
5.8. In-vivo-Hämodynamik und Langendorff-Perfusion	70
5.9. Testosteron und kardiale Toxizität	72
5.10. Einschränkungen	73
6. Zusammenfassung	74
7. Literaturverzeichnis	76

## Verzeichnis der Abkürzungen

ACE	Angiotensin-Conversions-Enzym
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AUC	Fläche unter der Kurve (area under the curve)
BW	Körpergewicht (body weight)
CF	Koronarfluss (coronary flow)
CK	Kreatinkinase
CO	Herzeitvolumen (cardiac output)
CR	Kardiales Remodeling (cardiac remodeling )
DHT	Dihydrotestosteron
E/A	Verhältnis frühdiastolischer/spätdiastolischer Einstrom
EF	Ejektionsfraktion
FS	Verkürzungsfraktion (fractional shortening)
GH	Wachstumshormon (growth hormone)
GOT	Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
IGF-1	Insulin- ähnlicher Wachstumsfaktor I
IL	Interleukin
KHK	Koronare Herzkrankheit
LV	Linker Ventrikel
LVDP	Linksventrikuläre Druckamplitude
LVED k	Linksventrikuläre enddiastolische Steifigkeitskonstante
LVEDP	Linksventrikulärer enddiastolischer Druck
LVSP	Linksventrikulärer systolischer Druck
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MHC	Myosin-Schwerketten (myosin-heavy-chains)
MI	Herzinfarkt (myocardial infarction)
MMP	Matrixmetalloproteinase
NMR	Kernspinresonanz (nuclear magnetic resonance)
NO	Stickstoffmonoxid (nitric oxide)



ORCH	Orchiektomie
PLAC	Placebo
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RIA	Radioimmunassay
RV	Rechter Ventrikel
RWT	Relative Wanddicke
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SERCA	Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums
TEST	Testosteron
TP	Testosteron-Pellet
TUD	Testosteronundekanoat

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1. Androgene und kardiovaskuläre Effekte

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist in der westlichen Welt weiterhin die Haupttodesursache beider Geschlechter. Vor dem 50. Lebensjahr ist die Inzidenz an kardiovaskulären Erkrankungen bei Männern im Vergleich zu altersgleichen prämenopausalen Frauen fünffach erhöht. Ursache hierfür könnte die höhere Androgen/Östrogen-Ratio des Mannes sein [1-3]. Andererseits sind die kardioprotektiven Eigenschaften von Östrogenen derzeit umstritten, nachdem in der HERS-Studie gezeigt wurde, dass gerade zu Beginn einer Östrogentherapie bei Frauen in der Menopause die kardiovaskuläre Mortalität signifikant erhöht war [4].

Die kardiovaskuläre Bedeutung der Androgene für den Mann ist bislang nicht geklärt [5]. Nachdem die Testosteronsubstitution als etablierte Therapie des männlichen Hypogonadismus gilt [6], wird in den letzten Jahren eine Testosteronsubstitution bei älteren Männern mit altersbedingt niedrigen Serumtestosteronkonzentrationen mit entsprechenden Beschwerden diskutiert. Dabei unterscheidet sich aber die Erhöhung der Testosteronspiegel bei älteren Männern grundlegend von der bei manifestem primären oder sekundärem Hypogonadismus dahingehend, dass hierbei u. U. sehr schnell supraphysiologische Serum-Testosteronkonzentrationen erreicht werden. Daneben ist der Einsatz von Androgenen im Rahmen des Anabolikamissbrauchs weit verbreitet, und es wurden gehäuft kardiovaskuläre Ereignisse mit ihrer Einnahme in Verbindung gebracht [7-9]. Meistens handelt es sich jedoch um Einzelfallberichte. Zudem existieren keine placebokontrollierten Studien, die individuelle Eigenschaften (genetische Prädisposition, Alter, Geschlecht, Ernährungszustand), Trainingszustand und Umweltfaktoren (Art des Androgenderivates, eiweißreiche Ernährung) mitberücksichtigen. Ein weiteres Problem ist, dass Bodybuilder meist nicht nur Androgene benutzen, sondern gleichzeitig z. B. auch Wachstumshormon oder Schilddrüsenhormone, welche ebenfalls kardiovaskuläre Wirkungen haben. Die dabei applizierten Androgendosen überschreiten die Dosen der

Hormonersatztherapie beim Hypogonadismus oft um ein Vielfaches und werden in meist steigender Dosierung („stacking“) eingenommen.

Es gibt aber auch Daten, die zeigen, dass eine Androgenbehandlung sicher und vorteilhaft sein kann. In einer retrospektiven Studien überprüften van Kesteren et al. [10] die Mortalität und Morbidität von Transsexuellen, die mit den jeweils gegengeschlechtlichen Hormonen behandelt wurden. Sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Transsexuellen war die Gesamtmortalität nicht höher als in der Gesamtbevölkerung, die beobachtete Mortalität innerhalb dieser Gruppen konnte nicht mit der Hormonbehandlung korreliert werden. Zgiczyński et al. [11] untersuchten die Effekte einer langfristigen Testosteron-Substitutionstherapie bei hypogonaden und bei älteren Männern mit niedrigem Testosteronspiegel auf Lipide und Lipoproteine; dabei konnte unter Testosteronsubstitution ein signifikant positiver Effekt auf das Lipidprofil gezeigt werden.

Die kurzfristige Gabe von Testosteron scheint einen vasorelaxierenden Effekt zu haben. So zeigte sich, dass eine Testosteronsubstitution einen vorteilhaften Effekt auf die belastungsabhängige kardiale Ischämie bei Männern mit Angina Pectoris hat, so dass die Zeit bis zur ST-Streckensenkung und die Gesamtbelastungsdauer signifikant verlängert werden konnte [12]. Auch eine kurzzeitige intrakoronare Gabe von Testosteron in physiologischer Konzentration induziert bei Männern mit bekannter KHK eine koronare Vasodilatation und eine Steigerung des Blutflusses [13].

## 1.2. Androgene und myokardiale Effekte

Direkte Wirkungen von Androgenen auf das Myokard sind wahrscheinlich. Spezifische Androgenrezeptoren wurden im Herzmuskel bei verschiedenen Spezies nachgewiesen [14, 15]. Mehrere Studien haben einen Zusammenhang zwischen Androgengabe und kardialer Hypertrophie konstatiert [8, 16, 17], ohne dass der genaue Wirkmechanismus bekannt ist. Neben der linksventrikulären Hypertrophie zeigte sich eine gestörte diastolische bei jedoch unveränderter systolischer Funktion des Herzens [18]. Dass eine linksventrikuläre Hypertrophie nicht in jedem Fall

zwingend eine hämodynamische Verschlechterung bedeutet, zeigt die kompensatorische linksventrikuläre Hypertrophie nach Herzinfarkt. Sie ist Ausdruck einer chronischen Adaptation mit einer Verbesserung der kardialen Ejektionsfraktion in Ruhe [19].

### 1.3. Sexueller Dimorphismus des postinfarziellen Remodelings

Das postinfarzielle Remodeling kann durch Sexualsteroiden beeinflusst werden. Litwin et al. [20] fanden, dass weibliche Ratten ein anderes Remodelingmuster als männliche Ratten haben; sie hatten eine geringere Hypertrophie des nichtinfarzierten Areal, während linksventrikuläre Dilatation und systolische Dysfunktion vergleichbar waren.

In einer anderen Studie hatte ein chronisch endogenes Östrogenmangel keinen großen Effekt auf die Entwicklung einer Herzhypertrophie, Dysfunktion und Dilatation nach einem Infarkt [21]. Auf der anderen Seite konnte durch eine hochdosierte Östrogentherapie die nach Myokardinfarkt auftretende linksventrikuläre Dilatation und Dysfunktion verhindert werden. Die hämodynamischen Untersuchungen zeigten eine Reduktion des enddiastolischen linksventrikulären Druckes durch Östrogentherapie, der unbehandelt nach Myokardinfarkt deutlich anstieg [22].

Welchen Einfluss jedoch eine chronisch anabole Testosterongabe auf das Remodeling nach einem Herzinfarkt hat, ist bisher nicht geklärt. Ziel der Untersuchung war es, den Einfluß einer chronisch anabolen Testosterongabe auf das Remodeling nach Myokardinfarkt bei männlichen Ratten abzuklären.

## 2. Grundlagen

Das kardiale Remodeling ist ein Vorgang, der am Herzen zu tiefgreifenden strukturellen, anatomischen zellulär-molekularen Veränderungen führt. Dieses initiiert eine Myozytenhypertrophie, Zelluntergang und eine interstitielle Fibrose.

In der vorliegenden Untersuchung soll das Remodeling als Folge eines Herzinfarktes untersucht werden. Dazu ist das Grundverständnis des kardialen Remodelings, das im ungünstigsten Fall in eine Herzinsuffizienz münden kann, unerlässlich. Im Folgenden sollen nun die einzelnen Phasen des kardialen Remodelings nach einem Herzinfarkt beschrieben werden.

Myozyten sind ausdifferenzierte Zellen, die nicht mehr in der Lage sind, sich nach einem Infarkt zu regenerieren [23]. Beltrami et al. [24] konnten jedoch zeigen, dass Myozyten im infarktnahen Gebiet in geringer Zahl wieder in einen Replikationszyklus eintreten können. Ob diese Regeneration eine funktionell-klinische Bedeutung hat, ist weiter unklar. Umgeben sind die Myozyten von einem dichten Netz aus Kapillaren, die für die Sauerstoffversorgung essentiell sind und eine hexagonale Anordnung haben. Das strukturelle Gerüst des Herzens wird aus Kollagen gebildet: Kollagen findet sich in der Basalmembran um die Myozyten, um die Koronararterien und im Interstitium. Ebenfalls dort finden sich Myofibroblasten, die extrazelluläre Matrixproteine synthetisieren. Myozyten reagieren schnell auf veränderte Belastungen, indem sie atrophieren oder innerhalb einer Stunde die Proteinbiosyntheserate erhöhen. So kann die akute Belastung des Herzens, zum Beispiel nach einem Herzinfarkt, zu einer Veränderung der zellulären Matrix führen und so das Remodeling vorantreiben.

## 2.1. Myokardinfarkt

### 2.1.1. Phase I: Zelltod

Nach der signifikanten Okklusion oder Stenose eines Koronargefäßes, sei es durch Embolien, lokale Thromben oder Gefäßspasmen, kommt es aufgrund des Endarteriencharakters des versorgenden Gefäßes im nachgeschalteten Gewebe zu einer Hypoxie und einer metabolischen Minderversorgung. Nun folgen akute Veränderungen, die sowohl das ischämische als auch das nicht-ischämische Herzgewebe betreffen. In den letzten Jahren ist man zu der Überzeugung gekommen, dass diese ischämischen, nekrotischen Areale keineswegs nur totes Gewebe sind, sondern einen wichtiger Zielpunkt für therapeutische Eingriffe darstellen.

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass der Wundheilungsprozeß im Herzen dem von anderen Geweben ähnelt. Ein wichtiger Unterschied ist jedoch der oben erwähnte Regenerationsverlust. Somit spielt die Bildung eines Granulationsgewebes eine wichtigere Rolle als die Regeneration von Myozyten. Eine weitere Besonderheit ist die rhythmische Kontraktion des Herzens, die einen dauernden Zug auf das Wundgebiet ausübt.

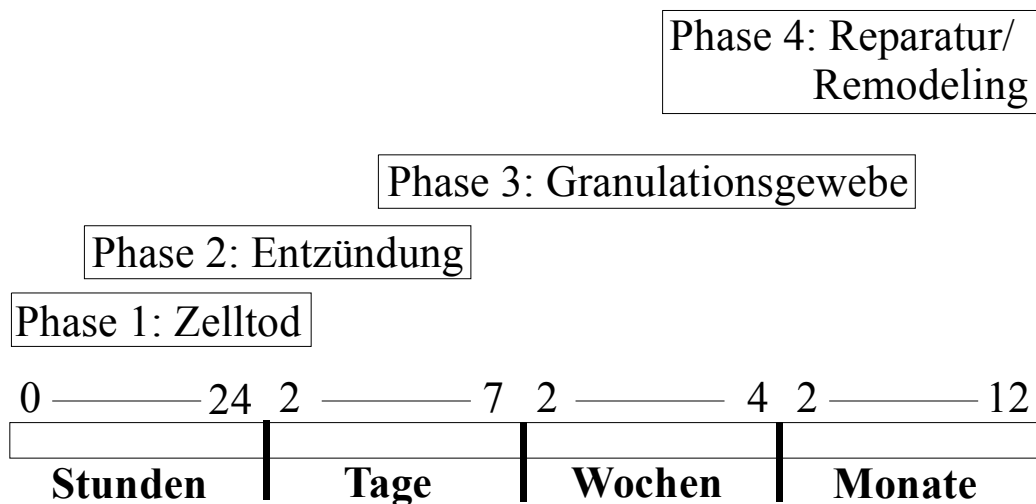


Abbildung 1: Phasen nach einem Myokardinfarkt [25]

Die erste Phase ist durch den Myozytentod gekennzeichnet; hier werden die diagnostischen Enzyme CK-MB, SGOT sowie Troponin freigesetzt. Der Zelltod kann dabei durch Nekrose, aber auch durch Apoptose verursacht sein [26, 27]. Hier wurden Versuche mit Caspase-Inhibitoren durchgeführt, die einen hemmenden Einfluß auf Apoptose haben sollen; aber auch Östrogene scheinen hier einen positiven Effekt zu haben, indem sie in kultivierten Myozyten die Aktivität der Caspase-3 vermindern [28].

### 2.1.2. Phase II: Entzündung

Durch den Zelluntergang wird eine Entzündungsreaktion hervorgerufen (Phase 2) mit Aktivierung des Komplementsystems und Freisetzung von IL-6 und IL-8. Auch diese Veränderungen dienen als Marker des frühen Myozytenunterganges [29].

Im Rahmen der Entzündung und der Bildung des Granulationsgewebes wandern Granulozyten in den Infarktbereich ein, gefolgt von Lymphozyten, Makrophagen und Plasmazellen.

### 2.1.3. Phase III: Granulationsgewebe

Nach zwei bis drei Tagen werden sowohl am Rande des Infarktes als auch im Infarktbereich selbst neue extrazelluläre Matrixproteine abgelagert, wodurch die Stabilität der Narbe verstärkt und so eine Herzwandruptur verhindert wird. Myofibroblasten produzieren interstitielles Kollagen, vor allem Kollagen Typ III und später Typ I. In der ersten Woche jedoch ist auch eine erhöhte kollagenolytische Aktivität zu beobachten, verursacht durch sog. Matrix-Metalloproteinasen (MMPs). Es stellt sich mit der Zeit ein neues Gleichgewicht zwischen Kollagenauf- und Abbau ein. Innerhalb weniger Wochen entsteht so ein stabiles, aber nicht mehr geordnetes Kollagennetzwerk.

#### 2.1.4. Phase IV: Reparatur und Remodeling

In dieser vierten Phase verschwinden auch die Entzündungszellen aus dem Narbenbereich. Bereits schon vorher hat der Prozeß des kardialen Remodelings eingesetzt. Unter Remodeling versteht man Veränderungen, die Folge eines Herzinfarktes sind und eine Neuordnung normal existierender Herzstrukturen bedingen. Das CR ist das Ergebnis einer Expansion akinetisch-dyskinetischer Segmente und einer Volumenbelastung des Herzens mit Hypertrophie nichtinfarzierter Segmente [30]. Verstärkt wird das Remodeling durch mechanische Dehnung, wobei Ischämie, Hormone und vasoaktive Peptide als modifizierende Faktoren der ventrikulären Funktion eine Rolle spielen. Das Remodeling führt zur Hypertrophie der restlichen Myozyten, zu Zelluntergang, interstitieller Fibrose und linksventrikulärer Dilatation.

#### 2.2. Anatomische Ebene des postinfarziellen Remodelings

Durch das kardiale Remodeling resultiert auf anatomischer Ebene eine Zunahme der linksventrikulären Masse sowie eine Dilatation des linken Ventrikels [31]. Beim postinfarziellen Remodeling kann es in der frühen Phase zu einer Ausbreitung des infarzierten Areals kommen, was nicht allein durch eine myokardiale Nekrose erklärt werden kann. Man beobachtet ein Auseinanderweichen („slippage“) der Myozyten, wodurch das Volumen des Ventrikels, sein Diameter und somit auch der Wandstress vergrößert wird. Klinisch kommt es bei Patienten mit großen Infarkten in Folge zu Herzinsuffizienz, Herzwandaneurysmen oder aber auch Herzwandrupturen.

Folgendes pathogenetisches Modell des kardialen Remodelings nach Myokardinfarkt wird hypothetisiert [32]: die systolische Funktionseinschränkung aufgrund zugrundegegangener kontraktile Fasern resultiert in einem erhöhten endsystolischen Volumen und sekundär in einer Erhöhung des enddiastolischen Füllungsdruckes. Auf der Frank-Starling-Kurve erfolgt somit eine Verschiebung der



Druck-Volumen-Kurve nach rechts, wobei die erhöhte Vorlast nur begrenzt durch eine erhöhte systolische Auswurffrac­tion ausgeglichen werden kann [33].

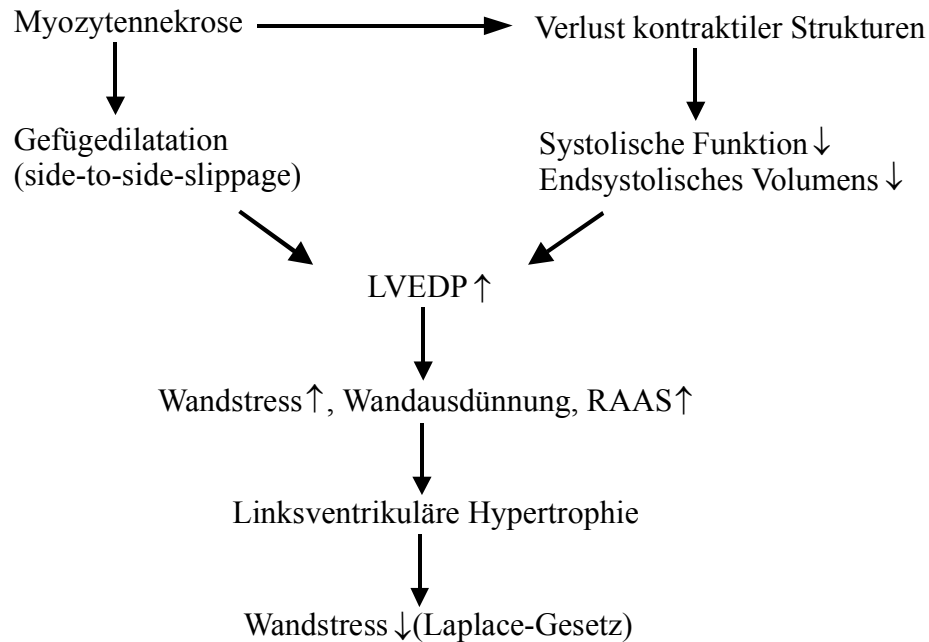


Abbildung 2: Pathophysiologie des kardialen Remodelings

Durch periphere Mechanismen, wie z.B. Induktion des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) und der daraus folgenden Flüssigkeitsretention und Vasokonstriktion, werden Vor- und Nachlast gesteigert. Dieses wiederum erhöht den Wandstress und treibt die Ausdünnung der Herzwand voran. In den nichtinfarzierten Arealen des Herzens kommt es durch die Erhöhung des enddiastolischen Stresses zu einer Volumen-Überlastungshypertrophie, wodurch tendenziell der Wandstress gemäß dem Laplace'schen Gesetzes verringert wird. Nach dieser Beziehung hängt der intraventrikuläre Druck bei gegebener Wandspannung von der Herzgröße ab. Also sind kleinere Herzen mit dicker Wand besser geeignet, einen hohen Druck zu entwickeln als große Herzen mit relativ dünner Wand.

## 2.3. Zelluläre und molekulare Basis des postinfarziellen kardialen Remodelings

Auf zellulär-molekularer Basis läuft das Remodeling über die oben erläuterte Myozytenhypertrophie und interstitielles Zellwachstum. Die Hypertrophie der Kardiomyozyten ergibt sich aus der Neusynthese von Sarkomeren, die sich parallel anordnen [34], die Dilatation hingegen ist mit Myozytenverlängerung assoziiert, wobei die neuen Sarkomere hier hintereinander angeordnet werden.

Während der mechanischen Überlastung kommt es zur Reexpression eines fetalen Programmes, wodurch das Herz in der Lage ist, auf einem energetisch niedrigeren, dafür aber „primitiverem“ Level zu arbeiten.

### Reexprimierte Gene

$\beta$ -myosin-heavy-chains ( $\beta$ -MHC)

$\alpha_3$ -Subunit der Na/K-ATPase

Wechsel von Fettsäureoxidation zu Glykolyse

Ventrikuläre Expression von ANP

### Verminderte Genexpression

Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA)

$\beta_1$ -adrenerger Rezeptor

Myoglobin

*Abbildung 3: „Fetales Programm“ beim kardialen Remodeling [30]*

Auf Transkriptionsebene kommt es im Rattenventrikel zur verminderten Expression derjenigen Gene, die für die „schnelle“ Isoform des Myosins im Myozyten kodieren ( $\alpha$ -myosin-heavy-chain,  $\alpha$ -MHC ) und zu einer verstärkten Expression der „langsamen“ Isoform ( $\beta$ -myosin-heavy-chain,  $\beta$ -MHC ); die Angabe „schnell“ bzw. „langsam“ bezieht sich auf die Aktivität der ATPase und somit auf die  $V_{\max}$  der Muskelfasern. Dieser Wechsel ist ein Zeichen der chronischen mechanischen Überlastung und gleichzeitig ein etablierter Hypertrophiemarker [35]; der Wechsel

ist bei Behandlung mit ACE-Hemmern reversibel [36]. Bei der Ratte findet der Wechsel der Isoformen innerhalb von zwei Stunden statt [35]. Der menschliche Ventrikel hingegen besteht hauptsächlich aus dem langsamen  $\beta$ -MHC, weswegen der Switch hier eine geringere Bedeutung hat. Trotzdem wird, bei entsprechendem Reiz, der geringe Anteil der  $\alpha$ -Isoform zugunsten der  $\beta$ -Isoform vermindert exprimiert [37].

Generell verkürzen sich bei jeder Säugetierspezies die atrialen Muskeln schneller als die ventrikulären. Das Atrium besteht daher aus mehr  $\alpha$ -MHC als aus  $\beta$ -MHC. Eine atriale Überlastung geht folglich mit einer Abnahme des Gehaltes an  $\alpha$ -MHC einher, während sich parallel dazu echokardiographisch eine Vorhofdilatation zeigt [38].

Nach Herzinfarkt kommt es außerdem zu einer Expression des atrialen natriuretischen Peptids (ANP) im linken Ventrikel, das normalerweise nur im Vorhof exprimiert wird. Dieser Zusammenhang ist beim Menschen schon im Rahmen eines Infarktes [39] oder des Remodelings [40] nachgewiesen worden und gilt als etablierter Marker eines chronischen kardialen Overloads und einer Hypertrophie.

Weitere Veränderungen im Rahmen des fetalen Programmes betreffen auch die Aktivität der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, deren Aktivität beim kardialen Remodeling vermindert ist und zu einem Wechsel der Isoformen führt ( $\alpha_1 \rightarrow \alpha_3$ -Isoform) sowie die Glykolyse, deren regulierende Enzyme im Rahmen einer kardialen Hypertrophie verstärkt exprimiert werden.

Eine Verminderung der Genexpression findet sich hingegen beim Myoglobin, was somit ein kardiales Energiedefizit verursacht, und bei den Calcium-ATPasen (SERCA) des sarkoplasmatischen Retikulums, deren Enzymkonzentration nach einem Infarkt absinken und die kardiale Überlastung anzeigen. Auch der  $\beta_1$ -adrenerge Rezeptor wird im Rahmen des kardialen Remodelings vermindert exprimiert, dieser Effekt wird durch die sowieso vermehrt zirkulierenden Katecholamine noch verstärkt.

## 2.4. Arrhythmien, Fibrose und kardiales Remodeling

Extrazellulär spielt beim CR die Fibrose eine wichtige Rolle. Hierbei muß man zwischen einer reparativen und einer reaktiven Fibrose unterscheiden. Die reparative Fibrose ist eine Reaktion auf Apoptose und Nekrose von Myozyten und tritt vor allem im Narbengewebe auf. Im Gegensatz zu ihr tritt die reaktive Fibrose ohne Zelluntergang auf, ist meist perivaskulär lokalisiert und kann sich auf den gesamten interstitiellen Raum ausdehnen [41]. Während des kardialen Remodelings finden reaktive und reparative Fibrose meist parallel statt.

Eine erhöhte interzelluläre Ablagerung von Kollagen, wie wir sie z. B. beim CR finden, kann zu einer verminderten Compliance des Ventrikels führen; hierdurch kann die diastolische Relaxation und somit die Füllung des Ventrikels mit Blut verschlechtert werden. Da so auch die myokardiale Heterogenität beeinflusst wird, kann es zu einem verstärkten Auftreten von Arrhythmien kommen.

Arrhythmien können nicht nur durch eine Fibrose, sondern auch durch die Hypertrophie bedingt sein. So kommt es bei mechanischer Überlastung zu einer Verlängerung des Aktionspotentiels, der QT-Zeit und zu verlängerten Calcium-Strömen über die Membranen; alle diese Veränderungen wirken potentiell arrhythmogen [42].

Auch das Geschlecht hat einen Einfluß auf die Inzidenz von Herzrhythmusstörungen. So haben Frauen gegenüber Männern eine geringere Neigung, Vorhofflimmern zu entwickeln oder am plötzlichen Herztod zu sterben.

## 2.5. Therapeutische und experimentelle Optionen zur Beeinflussung des postinfarziellen kardialen Remodelings

In klinischen Studien wurden in den letzten Jahren therapeutische Strategien entwickelt, die das Remodeling mit Hilfe von ACE-Hemmern,  $\beta$ -Blockern oder Spironolacton [43] positiv beeinflussen und die Entwicklung einer späteren Herzinsuffizienz verzögern oder verhindern können. So reduzieren ACE-Hemmer

signifikant die linksventrikuläre Masse und Volumen [31] und haben somit einen positiven hämodynamischen Effekt.  $\beta$ -Blocker zeigen eine signifikante Verbesserung der Ejektionsfraktion und eine Erniedrigung des ventrikulären Volumens bei Patienten mit systolischer Dysfunktion [44].

Neben diesen bereits klinisch etablierten Methoden gibt es auch bisher rein experimentelle Ansätze im Tierexperiment und beim Menschen. So wurden in mehreren Veröffentlichungen die positiven Effekte von Wachstumshormon (GH) auf das Herz diskutiert. Bei Patienten mit Wachstumshormonmangel verbesserte die Substitution die kardiale Funktion. In anderen Studien zeigte die akute und chronische Substitution von Wachstumshormon bei Patienten mit idiopathischer oder ischämischer Kardiomyopathie positive Effekte, indem eine kardiale Hypertrophie induziert wurde [45]. Auch insulin-like growth-factor (IGF-1) scheint eine wichtige Funktion bei der Kompensation einer Herzinsuffizienz zu haben: so haben Patienten mit Herzinsuffizienz im Stadium NYHA II und III erhöhte IGF-1 Plasmaspiegel, welche positiv mit der Verkürzungsfraktion (FS) korrelierten [46].

## 3. Material und Methodik

### 3.1. Versuchstiere

Der Fragestellung entsprechend wurden die Versuche mit männlichen Wistar-Ratten (Charles River, Deutschland; Tierversuchs-Genehmigungsnummer AZ 621-2531.01-75/98) durchgeführt. Das Gewicht betrug zu Beginn der Versuche im Durchschnitt 180-200g; die Tiere waren 16 Wochen alt, waren also postpubertär. Sie wurden zu fünf in einem Käfig gehalten und waren einem zwölfstündigen Tag/Nacht-Rhythmus unterworfen. Sie erhielten Trockenfutter (Altromin GmbH, D-32791 Lage, Deutschland) und Wasser in beliebiger Menge. Die Unterbringung der Tiere erfolgte in einem klimatisiertem Tierstall mit einer Temperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50-60%. Alle Versuche wurden gemäß der „Position of the American Heart Association on research animal use“ der American Heart Association (AHA) durchgeführt.

### 3.2. Vorversuche zur Ermittlung der adäquaten Testosterondosis und -applikation („Pharmakokinetik-Abschnitt“)

Die hier erwähnten Versuche stellen eine eigene Versuchseinheit dar; an diesen Tieren wurden keine anderen Methoden angewendet außer in diesem Punkt 3.2. beschrieben.

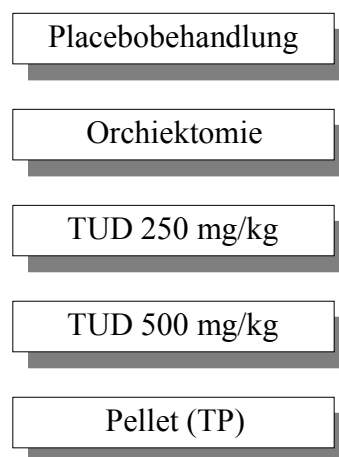
Ziel dieser tierexperimentellen Vorversuche war die Ermittlung einer praktikablen Applikationsform von Testosteronderivaten mit verlässlicher kontinuierlicher Testosteronfreisetzung.

In klinischen Studien ist eine günstige Pharmakokinetik von Testosteronundekanoat (TUD; Jenapharm, Jena, Deutschland) beschrieben. So hat Testosteronundekanoat ein gleichmäßiges pharmakokinetisches Profil und eine längere Halbwertszeit als das vergleichbare Testosteronenanthat [47]. Es wird auch bei wiederholter Injektion

von Patienten gut toleriert und kann unter Aufrechterhaltung relativ konstanter Hormonspiegel in Abständen gegeben werden, die bei über sechs Wochen liegen [48]. Vergleichbare tierexperimentelle Daten sind hierzu bislang nicht publiziert. Eine andere, invasive Methode stellt die subkutane Applikation von kommerziell erhältlichen Testosteron-Pellets dar [49]; obwohl diese schon seit Jahren in Tierversuchen eingesetzt werden, existieren hierzu keinerlei pharmakokinetische Daten.

### 3.2.1. Gruppeneinteilung der Pharmakokinetik-Versuche

Die Tiere wurden am ersten Tag mit einer Injektionsmischung aus Ketamin HCl (50mg/kg; Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und Xylazin (20mg/kg; BayerVital, Leverkusen, Deutschland) intraperitoneal anästhesiert und anschließend gewogen, jedes Tier wurde mit einer Versuchstiernummer markiert. Danach erfolgte die randomisierte Zuteilung in einer folgenden fünf Gruppen:



*Abbildung 4: Pharmakokinetik-Gruppeneinteilung*

#### 3.2.1.1. Placebo-Gruppe

Nach Rasur und Desinfektion wurde eine intramuskuläre Injektion einer öligen Vehikellösung mit demselben Volumen wie das der Testosterongruppe (Berechnung der Menge siehe „Testosterongruppe“) in den M. quadriceps femoris appliziert, wobei das gesamte Volumen auf beide Muskeln verteilt wurde.

#### 3.2.1.2. Orchiektomie-Gruppe

Nach Desinfektion wurde die Skrotalhaut auf einer Länge von 10-15 mm inzidiert und zunächst einer der beiden Hoden dargestellt. Die tunica vaginalis testis wurde vorsichtig inzidiert, so dass die Hodenkanälchen mit der umgebenen tunica albuginea herausgedrückt werden konnten. Der ductus deferens mit umgebenden Gefäßen wurde mit einem Faden (3-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) ligiert und der Hoden über der Ligatur mit einer Schere abgetrennt.

Nach Entfernung beider Hoden wurde das Skrotum mit Metallclips (Michel Klips, Tübingen, Deutschland) verschlossen. Danach erfolgt in der oben genannten Technik die Injektion einer Vehikellösung (=Placebo).

#### 3.2.1.3. Testosteronundekanoat-Gruppe (TUD)

Zur Injektion verwendeten wir Testosteronundekanoat (TUD; Ampullen zu 1000mg/ml; Jenapharm GmbH&Co KG, Jena, Deutschland), ein synthetischer Androgenester (Abb. 5), in einer Dosierung von 250mg/kg und 500mg/kg Körpergewicht. Dieses wurde ebenfalls in den M. quadriceps femoris injiziert.



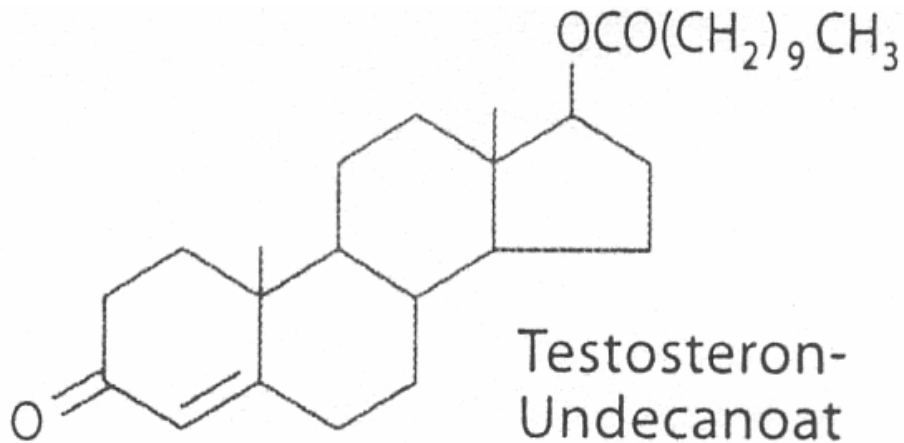


Abbildung 5: Chemische Struktur von Testosteronundekanoat [50]

#### 3.2.1.4. Testosteron Pellet-Gruppe (TP)

Hier erfolgte die subkutane Implantation von Testosteron-Pellets (Innovative Research of America, Sarasota Florida, USA) gemäß den Angaben des Herstellers. Die Freisetzungsrate war mit 100mg/90 Tagen angegeben.

#### 3.2.2. Blutentnahme

Die Blutentnahmen erfolgten vor Therapiebeginn („baseline“) und dann jeweils nach zwei, drei, vier, fünf und sechs Wochen.

Die Tiere wurden mit Ketamin HCl (50mg/kg; Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und Xylazin (20mg/kg; BayerVital, Leverkusen, Deutschland) intraperitoneal narkotisiert. Dieses gewährte eine Narkosedauer von ca. 30 min. Das Erreichen des Toleranzstadiums, welches durch absolute Schmerzfreiheit und vollständige Bewusstlosigkeit ohne motorische Erregungen gekennzeichnet ist, ließ sich durch die Reflexlosigkeit (z.B. Ausbleiben des Zwischenzehenreflexes) überprüfen. Die Tiere wurden danach, auf dem Rücken liegend, mit Silikonschläuchen auf einer Korkplatte fixiert: ein Schlauch wurde, hinter der unteren Zahnreihe entlangführend, mit Heftzwecken auf der Korkplatte verankert, der andere Schlauch (hinter der

oberen Zahnreihe entlangführend) so in der Korkplatte fixiert, dass der Mund der Ratte weit geöffnet und die Zunge gut sichtbar war. Die Zunge wurde mit einer Pinzette behutsam herausgezogen, danach wurde mit einer Injektionskanüle (1,0 ml Omnifix Tuberkulinspritze mit 26G-Nadel, Braun Melsungen, Deutschland) die V. sublingualis punktiert und ca. 0,5 ml Blut abgezogen.

Das Blut wurde ohne Zugabe von Antikoagulantien in ein Eppendorf-Cap überführt und in einer Zentrifuge ( Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland) für 10 min bei 4500 rpm zentrifugiert, ebenso wurde mit dem nach 6 Wochen durch die Tötung des Tieres und Exzision des Herzens gewonnenen Blutes verfahren. Das Serum wurde bei  $-20^{\circ}\text{C}$  weggefroren.

### 3.3. Versuchsprotokolle „Chronisches Infarktmodell“

Für die Versuche, die sich mit dem Einfluß der Testosteronsubstitution auf das Remodeling befassen, erfolgte die randomisierte Aufteilung von Wistar-Ratten gemäß der Fragestellung in 6 Behandlungsgruppen:

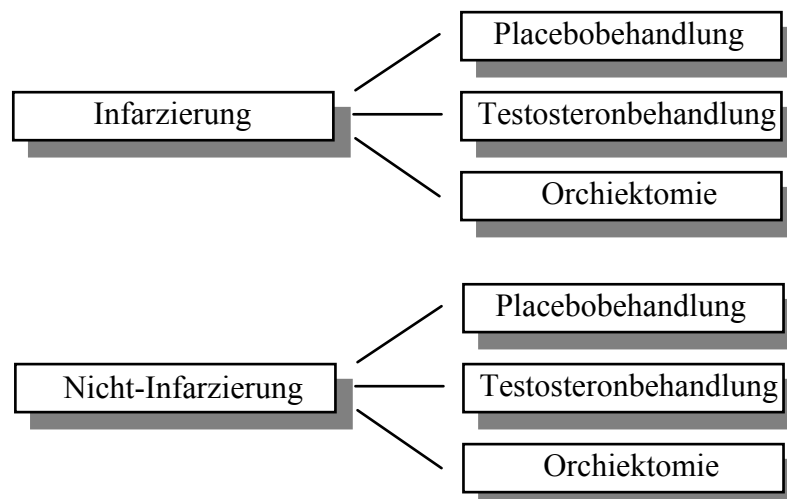


Abbildung 6: Behandlungsgruppen „chronisches Infarktmodell“

### 3.3.1. Zeitliche Abfolge der Versuche

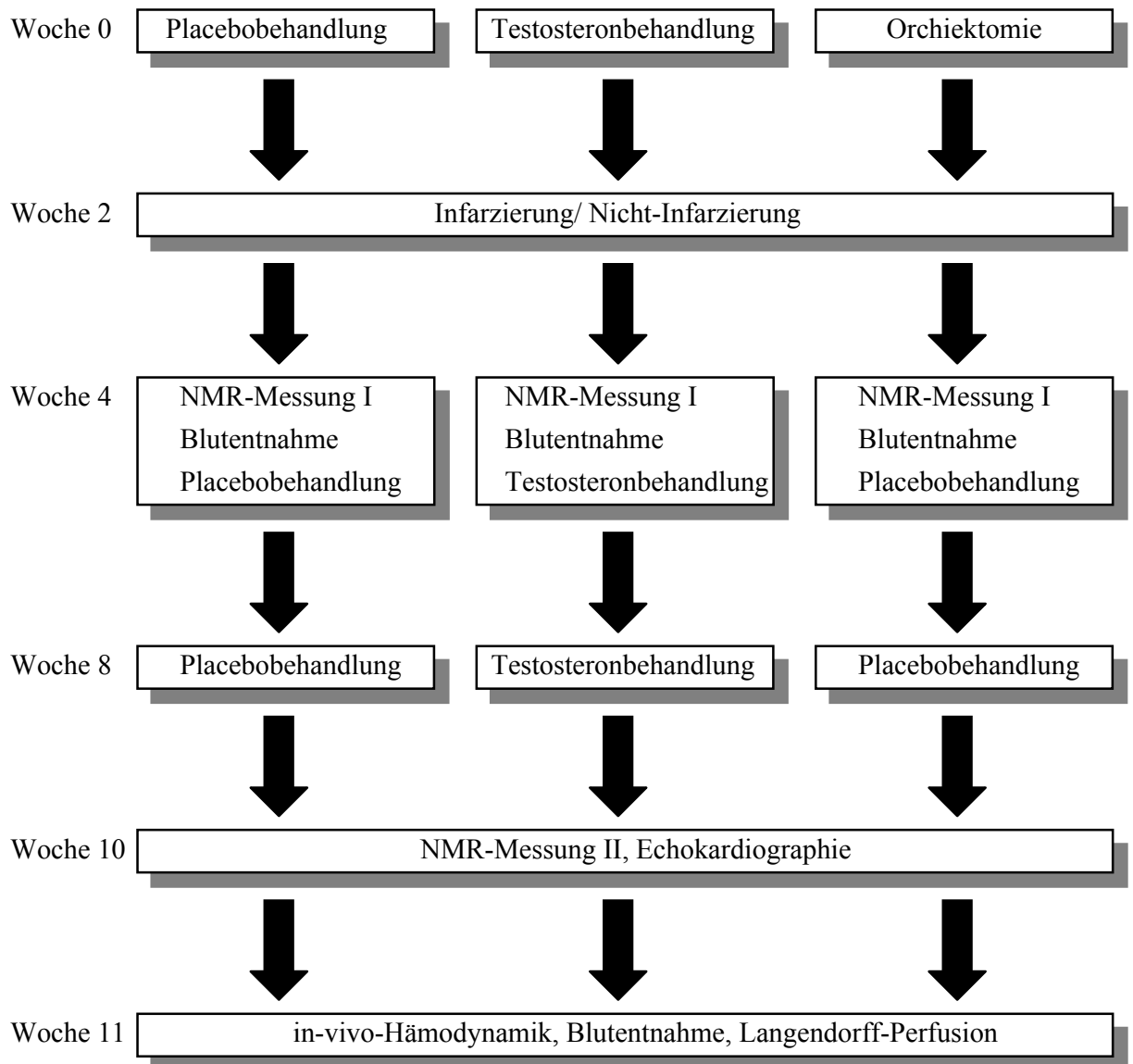


Abbildung 7: Versuchsablauf „chronisches Infarktmodell“

## 3.4. Behandlung der einzelnen Gruppen

### 3.4.1. Medikamentöse und operative Behandlung

Die Tiere wurden in Woche 0 nach oben beschriebener Methodik intraperitoneal anästhesiert und anschließend gewogen, jedes Tier wurde mit einer Versuchstiernummer markiert. Anschließend erfolgte eine randomisierte Zuordnung der Tiere zu einer der folgenden drei Versuchsgruppen:

#### 3.4.1.1. Placebogruppe (PLAC)

Nach Rasur und Desinfektion erfolgte die intramuskuläre Injektion einer öligen Vehikellösung entsprechend bereits oben erläuterter Methodik.

#### 3.4.1.2. Testosterongruppe (TUD)

Durch diese Gruppe sollte der Hormonstatus des Bodybuilders mit Androgenmißbrauch oder des hypogonaden Mannes mit Testosteronsubstitution imitiert werden.

Gemäß den Ergebnissen aus dem Pharmakokinetik-Abschnitt injizierten wir Testosteronundekanoat in einer Dosierung von 500mg/kg Körpergewicht nach oben beschriebener Methodik.

#### 3.4.1.3. Orchiectomie (ORCH)

Durch diese Gruppe wird der hypogonadale Status repräsentiert. Die operative Behandlung entspricht der des Pharmakokinetik-Abschnittes.

#### 3.4.1.4. Gewährleistung konstanter Hormonspiegel

Zur Aufrechterhaltung konstanter Hormonspiegel erfolgten in Woche 4 und in Woche 8 (siehe 3.3.1. „Zeitliche Abfolge der Versuche“) eine erneute Injektion von Teststeronundekanoat bzw. Placebo-Vehikel nach der oben beschriebenen Technik.

#### 3.4.2. Scheininfarzierung/Infarzierung (SHAM/MI)

In Woche 2 erfolgte, je nach Gruppenzuteilung, eine Infarzierung (MI) oder Scheininfarzierung (SHAM).

Der Myokardinfarkt wurde durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie induziert; hierbei wurde eine etablierte Methode angewandt [51-53].

Nach Einleitung der Narkose mit Äther und Erreichen des Toleranzstadiums wurde die Ratte gewogen und mit einer Plastikkanüle intubiert (PE 200, Portex, England). Sofort nach der Intubation erfolgte der Anschluß an ein Beatmungsgerät. Es wurde ein Beatmungsgerät für Nagetiere (Rodent Ventilator Typ UB 7025, Fa. Hufo Sachs Elektronik, March, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden mit einer Frequenz von 90/min und einem Atemzugvolumen von 2,5 ml beatmet. Im Nebenschluß war ein Äthertopf zur Aufrechterhaltung der Narkose geschaltet.

Nach Rasur und Desinfektion des Thorax erfolgte die Durchtrennung der Haut und des M. pectoralis mit einer Schere. Nachdem die Thoraxhöhle mit einem Spreizer gedehnt und dadurch offen gehalten wurde, erfolgte die Luxation des Perikardsackes aus dem Thorax heraus und die Eröffnung desselben mit einer Schere. Dann erfolgte die Umstechung des Ramus interventricularis anterior an proximaler Stelle mittels eines Fadens (Prolene 5/0 RB-1, Ethicon, Norderstedt, Deutschland). Anschließend wurde das Herz wieder in die Thoraxhöhle zurückgedrängt, der Thorax vernäht (2-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland), die Hautnaht mit Metallclips (Michel Klips, Tübingen, Deutschland) verschlossen und anschließend erneut desinfiziert. Direkt nach der Operation wurde die Ätherzufuhr gestoppt und ein EKG zur Bestätigung des Infarktes beschrieben.

Die Scheininfarzierung (SHAM) erfolgte auf dem gleichen Wege, nur dass die Koronararterie nicht mit einem Faden umstochen wurde.

Sobald die Tiere spontan atmeten, extubierten sie sich nach Wiedererlangen des Bewusstseins selbst. Postoperativ wurden die Ratten fünf Stunden überwacht und bei Herzrhythmusstörungen mechanisch reanimiert.

Für die Gruppen ergab sich in den Stunden und Tagen nach der Operation die in Kapitel 4 angegebene Mortalität.

### 3.4.3. Blutentnahme

Blutentnahmen erfolgten in Woche 4 und Woche 10 nach bekannter Methodik. Sie dienten zur Überwachung des Serumtestosteronspiegels. Ferner wurde hier in Woche 10 die Serumosmolalität bei den infarzierten Tieren bestimmt.

Die Blutentnahme in Woche 10 erfolgte nach der Tötung des Tieres und der Exzision des Herzens.

### 3.5. NMR-Messungen

Die Messungen erfolgten in Woche 4 und Woche 10 des Protokolls; die Ergebnisse sind in einer anderen Arbeit bereits veröffentlicht worden, für die ausführliche Methodik sei auf diese Arbeit verwiesen [54]. In der vorliegenden Arbeit wurden nur einige Daten aus dieser Arbeit berücksichtigt.

Die NMR-Messungen wurden mit einem 7,05 Tesla BIOSPEC 70/21 (Bruker, Deutschland) durchgeführt, nachdem die Tiere mit einer Maskeninhalationsnarkose (Isofluran 1,5 Vol%, dazu 0,5 l Sauerstoff/min) narkotisiert worden waren. Die myokardialen und ventrikulären Schichtvolumina wurden aus enddiastolischen und endsystolischen Bildern durch Multiplikation der Kompartimentfläche und der Schichtdicke (1 mm) errechnet. Die Infarktgröße wurde für jede Schicht einzeln bestimmt, wobei als Kriterien eine Akinesie und eine signifikante Ausdünnung der Wand galten. Die relative Infarktgröße wurde als Quotient aus der Summe der

endokardialen und epikardialen Umfänge für den Infarkt und der Summe der totalen epikardialen und endokardialen Umfänge errechnet. Die Bestimmung der Herzmuskelwand- und Narbendicke erfolgte aus einer Schicht in der Mitte des Herzens. Die Dicke des Herzmuskels wurde hierzu in 3 Segmenten der scheininfarzierten Regionen der linksventrikulären Wand (Hinter- und Vorderwand, Septum) gemessen, woraus ein Mittelwert bestimmt werden konnte.

### 3.6. Echokardiographie

In Woche 10 wurde bei den Ratten eine transthorakale Doppler-Echokardiographie durchgeführt. Schon frühere Studien haben die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit dieses Verfahrens für die linksventrikuläre Funktion gezeigt [55, 56].

Die Ratten wurden mit der üblichen Mischung aus Ketamin HCl (50mg/kg; Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und Xylazin (20mg/kg; BayerVital, Leverkusen, Deutschland) intraperitoneal anästhesiert. Die vordere Thoraxwand wurde rasiert, und die Ratten wurden auf einer speziell angefertigten Kunststoffplatte mit einer Aussparung im Thoraxbereich gelegt.

Die Echokardiographie selbst wurde mit einem handelsüblichen Echokardiographie-Gerät (Toshiba SSH-140A), ausgestattet mit einem 7.0 MHz Schallkopf (Toshiba Medical Systems, München, Deutschland), durchgeführt. Die Ausmessungen erfolgten gemäß der American Society of Echocardiography, die angegebenen Messwerte errechneten sich aus dem Mittel dreier aufgezeichneter Herzzyklen.

Zuerst erfolgte im B- und M-Mode in der parasternalen langen Achse in Höhe der Aortenklappe die Ermittlung folgender Werte:

- Dicke der Vorderwand und Hinterwand (diastolisch/systolisch)
- Diameter linker Ventrikel (systolisch/diastolisch)
- Berechnung der Verkürzungsfraction (fractional shortening, FS) gemäß folgender Formel:

$$FS = \frac{\text{LV diastolischer Durchmesser} - \text{LV systolischer Durchmesser}}{\text{LV diastolischer Durchmesser}} * 100$$

Danach erfolgte in der parasternalen kurzen Achse in Höhe des Papillarmuskels zusätzlich die Vermessung des linken Ventrikels in B- und M-Mode. Es erfolgte die Bestimmung folgender Parameter:

- Dicke der Vorderwand und Hinterwand (diastolisch/systolisch)
- Diameter linker Ventrikel (systolisch/diastolisch)
- Überprüfung der regionalen Kontraktilität
- Berechnung der Verkürzungsfraction (s.o.)

Schließlich wurde in der apikalen Achse (Vierkammerblick) ein PW-Doppler der Mitral- und Aortenklappe durchgeführt mit der Erfassung des transmitralen diastolischen Einstromprofil mit Ermittlung von mitralem E/A (E-Welle: entsteht durch frühdiastolischen Einstrom aufgrund der linksventrikulären Relaxation; A-Welle entsteht durch spätdiastolischer Einstrom aufgrund der Vorhofkontraktion).

Rechnerisch ließ sich aus den ermittelten Werten ferner die relative Wanddicke (RWT), d.h. das Verhältnis von Wanddicke zu Diameter, gemäß folgender Formel errechnen:

$$RWT = \frac{2 \times \text{Hinterwanddicke diastolisch}}{\text{linksventrikulärer Diameter diastolisch}}$$

### 3.7. in-vivo Hämodynamik

Die hämodynamischen Parameter wurden in Woche 11 (siehe Flusschema Kapitel 3.3.1.) vor und nach einer Thorakotomie unter Verwendung einer etablierten Methodik gemessen [51-53].



Die Ratten wurden mit Äther in einem dafür geeigneten Topf narkotisiert, endotracheal intubiert und mit einer Frequenz von 90/min und einem Atemzugvolumen von 2,5 ml beatmet. Die Narkose wurde aufrechterhalten durch endotracheal zugeführtes Isofluran (Dräger Vapor 2000, Dräger Medizintechnik, Lübeck, Deutschland). Die Kontrolle der Narkosetiefe erfolgte durch regelmäßige Kontrolle des Muskeltonus. Dadurch wurden Narkosezwischenfälle vermieden und die Vergleichbarkeit der Narkose erreicht. Anschließend wurde die A. carotis communis und die V. jugularis interna dargestellt und mit einem Faden (5-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) zweifach ligiert. Die Gefäße wurden zwischen den Ligaturen mit einer kleinen Schere eröffnet und mit einer Plastikkanüle (PE 50, Portex, England) katheterisiert. Der arterielle Druck wurde mit einem Katheterspitzenmanometer (Millar Modell SPC-350, Millar Instruments Inc, Houston, Texas, USA), der venöse Druck mit einem Statham Druckaufnehmer (Statham P23 Db pressure transducer, Glouster Statham Instruments Inc, Hato Rey, Puerto Rico, USA) gemessen. Die Kanülen waren durch Dreiwegehähne mit den Druckmessern verbunden. Der arterielle Katheter wurde im linken Ventrikel, der venöse im rechten Vorhof platziert. Die Lagekontrolle fand durch Beurteilung der Druckkurve statt. Die Signale wurden durch ein moduläres Biosystem (Polygraph, Fa. ZAK, Simbach/Inn, Deutschland) verarbeitet und mit einem Achtkanalschreiber (Graphtec Linearorder Mark VII WR 3101, ZAK, Simbach/Inn, Deutschland) registriert.

Die ersten Messungen wurden unter Beatmung in flacher Narkose durchgeführt. Im linken Ventrikel erfolgte die Registrierung von systolischem und diastolischem Blutdruck, der Geschwindigkeit des linksventrikulären Drückanstiegs und Druckabfalls, des zentralen Venendrucks, des mittlere arterielle Drucks (MAP) und der Herzfrequenz. Bei der Auswertung aller physischen Meßwerte wurde der Mittelwert aus zehn Herzzyklen errechnet.

Nach diesen Messungen wurde die Narkose wieder vertieft und die Ratten weiter maschinell beatmet. Danach wurde mit einem Hitzekauter (EFF, Hamburg, Deutschland) eine mediosternale Längsthorakotomie durchgeführt, die Aorta ascendens freipräpariert und mit einem Faden (2-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) locker umschlungen. Durch kurzzeitige Aortenocclusion

wurden die isovolumetrischen Druckmaxima bestimmt. Die Aortenocclusion erreichte man, indem ein Faden für 1-2 sec um die Aorta ascendens gezogen wurde. Vor diesem Hindernis kam es, abgesehen vom koronaren Blutfluß, zu isovolumetrischen Kontraktionen des Herzens, und der linksventrikuläre systolische Blutdruck stieg steil an. Dieses Vorgehen wurde mehrfach wiederholt und für die Auswertung die Sequenz ausgewählt, die für 5 Schläge möglichst konstante isovolumetrische Druckmaxima und steigende Füllungsdrücke zeigte. In der Analyse ging die maximale Druckentwicklung ein.

Nach diesen Messungen wurde ein elektromagnetischer Signalwandler (Gould Blood Flow Transducer 2,5mm, Gould Statham Instruments Inc., Hato Rey, Puerto Rico, USA) zur Messung der aortalen Flußgeschwindigkeit um die aorta ascendens herumführend angelegt. Aus den phasischen und gemittelten Signalen des Signalwandlers der o.g. Geräte wurde der maximale aortale Blutfluß und das Herzzeitvolumen (cardiac output, CO) ermittelt. Gleichzeitig wurden bei gleichbleibender Narkosetiefe folgende Parameter gemessen: systolischer, diastolischer, mittlerer aortaler Blutdruck, zentraler Venendruck und Herzfrequenz. Nach der Durchführung dieser Messungen wurde die Narkose wieder vertieft und es konnte mit dem Versuchsprotokoll der Langendorff-Perfusion fortgefahren werden.

## 3.8. Langendorff-Perfusion

### 3.8.1. Präparation des Rattenherzens

Die Langendorff-Perfusion erfolgte unmittelbar nach der in-vivo Hämodynamik. Bei dem noch mit Isofluran narkotisierten Tier wurde durch eine transverse Laparotomie und eine beidseitige anterolaterale Thorakotomie das Herz freigelegt, exzidiert und in eiskalten Krebs-Henseleit Puffer (siehe unten) gelegt. Nach Freipräparation der Aorta wurde diese unterhalb des Abganges des Truncus brachiocephalicus gekürzt und an einer Kanüle befestigt, die mit einer Perfusionsapparatur verbunden ist [57]. Das Herz wurde bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einem konstanten Druck von 100 mmHg retrograd nach Langendorff perfundiert. Um den Abfluß des

Perfusats aus dem rechten Ventrikel zu ermöglichen, wurde der Truncus pulmonalis eingeschnitten. Ein Ventil aus Polyethylen wurde durch die Spitze des linken Ventrikels gestoßen, um den Abfluß aus den Venae Thebesiae zu gewährleisten.

Zur Perfusion wurde phosphatfreier Krebs-Henseleit-Puffer (Sigma CR-0177) verwendet, der sich aus NaCl (118 mM), KCl (4,7 mM), CaCl (1,75mM), MgSO<sub>4</sub> (1,2 mM), EDTANa<sub>2</sub> (0,5 mM), NaHCO<sub>3</sub> (25mM), Glukose (11 mM) (SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland) zusammensetzt. Diese Bestandteile wurden in demineralisiertem Wasser (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) gelöst. Equilibrierung des Puffers mit 95% O<sub>2</sub> und 5% CO<sub>2</sub> ergab einen pH-Wert von 7,4. Der Koronarfluß wurde mit Hilfe eines Ultraschall-Flowmeters (Transsonic Inc, Ithaca, NY, USA) gemessen. Das Perfusionssystem erhält das Herz für mindestens 90 min in einem steady state mit Änderungen <5% für alle mechanischen und metabolischen Parameter.

### 3.8.2. Messung der mechanischen Herzfunktion

Durch eine Inzision im linken Vorhof wurde ein wassergefüllter, luftfreier Latexballon (Ritex, Bielefeld, Deutschland) über die Mitralklappe in den linken Ventrikel eingeführt und mittels eines Fadens gesichert. Der Ballon wurde über einen Polyethylenschlauch mit einer Statham P23Db Drucksonde (Gould Instruments, Oxnard, CA, USA) verbunden, um kontinuierliche Druckmessungen des linken Ventrikels und Herzfrequenzmessungen über eine ZAK-Einheit (ZAK, Heidelberg, Deutschland) auf einem 8-Kanal Graphtec WR 3310-Schreiber (Graphtec Inc., Tokio, Japan) aufzuzeichnen.

In den rechten Ventrikel wurde über die A. pulmonalis ein Messkatheter eingeführt, der mit einer Sauerstoff-Meßsonde und einer Messanzeige (Microprozessor Oximeter Oxi 537, WTW Weilheim, Deutschland) verbunden war, so dass man mit dem zuvor bestimmten Wert des Sauerstoffgehalts des Puffers den myokardialen Sauerstoffverbrauch errechnen konnte.

Nach der so erfolgten Präparation des Herzens wurden in den Ballon schrittweise erhöhte definierte Volumina hineingegeben, was kardiomechanisch eine schrittweisen Erhöhung der Vorlast (Preload) gleichkommt. Der so künstlich erzeugte Streß am isolierten Herzen konnte dann über die Messapparatur registriert werden.

Dieser Versuchsaufbau lieferte die folgenden Parameter für die jeweiligen Ballonvolumina: Koronarfluss (CF), linksventrikuläre Druckamplitude (LVDP),  $dp/dt$  max,  $dp/dt$  min, Sauerstoffverbrauch, rate-pressure-product und die Herzfrequenz.

Nach Beendigung der Messungen wurde zunächst der rechte Ventrikel vom linken Herzen separiert. Nachdem beide Herzen getrennt und gewogen waren, wurde der rechte Ventrikel in flüssigen Stickstoff überführt, um ihn für die molekularbiologischen Untersuchungen zu asservieren. Dasselbe geschah mit dem unteren Teil des linken Ventrikels, nachdem dieser in der Mitte auseinandergeschnitten worden war; der obere Teil wurde für morphologische Untersuchungen in Formaldehyd 37% (Merck, Darmstadt, Deutschland) fixiert.

## 3.9. Molekularbiologische Methoden

### 3.9.1. RNA-Isolierung

#### 3.9.1.1. Homogenisierung der Gewebeproben

In ein Rundboden-Röhrchen wurden 1 ml Trizol-Reagenz/100 mg Gewebe gegeben (Life Technologies, GibcoBRL Nr. 15596-018, USA); es handelte sich bei den Proben um den oben in Stickstoff asservierten unteren Teil des linken Ventrikels, der im Durchschnitt 300mg wog. Nachdem diese tiefgefrorene Probe dem Trizol-Reagenz hinzugegeben worden waren, wurde für ca. 20 sec homogenisiert und die Probe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

#### 3.9.1.2. Phasenseparation

Zu der Probe wurden 600 µl Trizol (200ul/ml Trizol) pipettiert, die Probe kurz geschüttelt und dann 2-3 min bei Raumtemperatur stehengelassen. Bei 7000 U/min wurde dann zentrifugiert, danach waren die 3 Phasen erkennbar (wässriger Überstand mit RNA, DNA-Phase, Proteinphase).

#### 3.8.1.3. RNA-Präzipitation und Waschung

Nachdem der Überstand abpipettiert worden war, wurden 1,5 ml Isopropanol (Merck, 1.00994.0500) zu dem Überstand gegeben, 10 min bei Raumtemperatur gelagert und dann für 10 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und mit 1 ml 75%iger Ethanol-DEPC-Wasser (DEPC Sigma, Nr. D-5758) Lösung rekonstituiert. Schließlich wurde bei 13000 U/min zentrifugiert.

#### 3.9.1.4. RNA-Auflösung und Quantifizierung

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das entstandene Pellet bei Raumtemperatur im offenen Cap getrocknet. Es folgte die Rekonstitution mit 10 µl DEPC-Wasser und die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration; jetzt konnte die Probe weggefroren oder weiterverarbeitet werden.

#### 3.9.1.5. Sondensynthese für Northern-Blot

Hier wurde der Vektor, der unsere Zielsequenz für ANP oder IGF-1 (ANP-Vektor freundlicherweise überlassen von C. Seidmann, Boston; IGF-1-Vektor freundlicherweise überlassen von L. Tsao, Boston) enthielt, zusammen mit einem entsprechenden Restriktionsenzym in einem Gel laufengelassen (1% Agarosegel + 3µl Ethidiumbromid). Unter UV-Licht wurde dann die Bande herausgeschnitten und

gemäß dem „QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol“ (QIAGEN, Heidelberg, Deutschland) verarbeitet. Davon wurden 2 µl mit 10 µl destilliertem Wasser zusammenpipettiert und für 5 min auf einem Wärmeblock bei 100°C gekocht; so trennten sich die DNA-Stränge auf. Danach wurde die Probe für 5 min auf Eis gestellt, wobei sich beim Abkühlen die Stränge wieder zusammenlagerten.

Zu diesen 12 µl Probe wurde nun das RadPrime Labeling System (Gibco Nr. 18428-011) pipettiert (1 µl 500µM dATP, 1 µl 500µM dGTP, 1 µl 500µM dTTP, 20 µl 2,5x Random Primer Solution).

Danach wurden 5 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]dCTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml) (Amersham, Braunschweig, Deutschland) zugegeben und das gesamte Volumen mit aqua destillata auf 49 µl aufgefüllt. Es wurden schließlich noch 1 µl Klenow-Fragment zur Probe hinzugegeben.

Nun stelle man eine QIAQICK Spin Column (QIAGEN, Heidelberg) in ein Cap und zentrifugierte für 1 min bei 3000 rpm; das Zentrifugat wurde verworfen, das Probenmaterial mittig in die Säule gegeben und für 2 min bei 3000 rpm zentrifugiert. Hierbei wurden eingebaute Nukleotide von freien Nukleotiden getrennt. Durch die Zentrifugation verblieben die freien Nukleotide in der Säule und die markierten Nukleotide befanden sich im Zentrifugat.

Zum Zentrifugat wurden 100 µl Salmon Sperm (Sigma S3126, Deutschland) pipettiert, für 5 min gekocht und danach auf Eis abgekühlt.

### 3.9.2. Northern-Blot

#### 3.9.2.1. Agarose-Formaldehyd-Gel-Elektrophorese

Für ein 100 ml 1% Agarose-Gel wurden 1 g Agarose (Sigma, A-9539) mit 73 ml DEPC-Wasser aufgekocht, nach Abkühlen auf ca. 70°C wurden 16,67 ml 37% Formaldehyd (Merck, Nr. 1.04003.1000), 10 ml 10xMOPS und 2 µl Ethidiumbromid (10mg/ml; Roth, Nr. 2218.1) hinzugegeben. Danach konnte das Gel gegossen werden und härtete danach mindestens eine Stunde aus. Entsprechend

der RNA-Quantifizierung wurden zum Auftragen in die Geltaschen 15 µg RNA/Lane verwendet; die errechnete Probenmenge wurde im Verhältnis 1:3 mit Loading-Buffer versetzt. Die RNA wurde nun für 10 min bei 68°C linearisiert und konnte dann auf Eis gelagert werden. Das Gel wurde in die Gelkammer gelegt und mit Laufpuffer überschichtet (35 ml 20xMOPS und 665 ml DEPC-Wasser). Die Proben konnten nun in die Slots pipettiert werden, als Marker diente ein RNA-Marker (0,24-9,5 kb RNA-Ladder, Gibco Nr. 15620-016). Bei 85 V Spannung wird das Gel nun ca. 1 Stunde laufen gelassen. Das Ergebnis wird dann unter UV-Licht beurteilt, wobei die 18s- und 28s-RNA-Banden scharf begrenzt sein sollten.

Eine zur Gelgröße passende Nylonmembran (Nytran Supercharge, Schleicher&Schuell, Keene NH, USA) wurde ausgeschnitten und für 15 min in 20xSSC-Puffer gelegt.

Nach Anleitung wurde nun der Turbo-Blotter (TurboBlotter System NYTRAN, Schleicher&Schuell Nr. 482302) geschichtet; Luftblasen dürfen sich weder am Gel noch an den Membranen befinden und müssen evtl. ausgestrichen werden. Nach der Schichtung wird der Rahmen des Blotters mit 20xSSC bis zum Rand gefüllt. Der Turbo-Blotter wurde über Nacht, mit Frischhaltefolie abgedeckt, bei Raumtemperatur stehengelassen.

#### 3.9.2.2. Crosslinking

Die Membran wurde in SSC-Puffer geschwenkt, um restliches Formaldehyd abzuwaschen und dann in einem UV-Stratalinker (Bio-Rad, GS Gene Linker) für 1 min bei 150 Joule zum Crosslinking eingebracht.

#### 3.9.2.3. Prähybridisierung und Hybridisierung

Ein Hybridisierungsofen (Bellco Glass Inc., Vineland NJ, USA) wurde auf 68°C vorgeheizt, die Membran in eine Glasröhre mit 15 ml QuickHyb-Lösung (Stratagene Nr. 201220) eingebracht und dann für 10 min rotierend im Ofen inkubiert. Die

oben vorbereitete Probe konnte danach in die Glasröhre eingebracht werden. Hybridisiert wurde nun für 1-1,5 Stunden bei 68°C.

Die Flüssigkeit konnte dann aus der Röhre abgegossen werden und mit 100ml 2xSSC, 0,1% SDS-Puffer bei 25°C im Ofen gewaschen werden. Danach wurde noch zweimal für jeweils 15 min mit derselben frischen Lösung gewaschen und schließlich mit 100 ml 0,1xSSC, 0,1% SDS-Puffer für 30 min bei 60°C gewaschen.

Die Membran wurde zwischen zwei Folien gelegt und durch Klebeband luftdicht abgeschlossen; die Membran durfte dabei an keiner Stelle trocken werden. Sie wurde in eine Röntgenkassette mit einem Film gelegt und bei -80°C für 12-24 Stunden gelagert; danach konnte der Film entwickelt werden.

### 3.9.3. Messungen für myosin heavy chains (MHC)

Protein für die elektrophoretische Bestimmung der myosin heavy chains wurde für alle sechs Gruppen aus den bei -80°C weggefrorenen Proben isoliert. Dazu wurden 40 mg des Gewebes in 400 µl eiskaltem Probenpuffer homogenisiert (0.3 M NaCl, 0.1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>\*H<sub>2</sub>O, 50 mM N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 10 mM Natrium Pyrophosphat, 1 mM MgCl<sub>2</sub>\* 6H<sub>2</sub>O, 10 mM EDTA, pH 7.4), wobei ein Proteasinh inhibitor zugegeben wurde (Roche). Das homogenisierte Gewebe wurde für 30 min bei 4°C und 15000 g zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und aliquotiert bei -80°C weggefroren.

Die Proteinkonzentration wurde mit Hilfe des Bradford-Assays bestimmt (BioRad). Für die Elektrophorese selbst wurden 0,5 µg Protein benötigt. Diese Probe wurde zuerst bei 95°C für 5 min in 2x Laemmli Sample Buffer (BioRad) gekocht, welcher 5% Mercaptoethanol enthielt. Die Probenauftrennung erfolgte in vertikal positionierten Gelen (Multigel- Long system, Biometra), in welchen ein 6%iges Trenngel (5% glycerol, 6% acrylamide/bisacrylamide (50:1), 0.2M Tris (pH 8.8), 0.1 M Glycin, 0.4% SDS, 0.05% TEMED, 0.1% APS) und ein 4%iges Sammelgel (5% Glycerol, 4% Acrylamide/Bisacrylamid (50:1), 0.07M Tris (pH 6.8), 4 mM EDTA, 0.4% SDS, 0.05% TEMED, 0.1% APS) geschichtet waren. Der Elektrophoresepuffer enthielt 25mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS. Vor dem



Laufenlassen des Gels bei 130 V über 18 Stunden wurden 800 µl/l Mercaptoethanol zu der Oberphase des Puffers gegeben. Danach wurden die Gele gemäß dem Herstellerprotokoll mit Silber versetzt (Silver Stain Plus kit, BioRad), eingescannt und am Computer ausgewertet (ScanPacK 3.0).

Dieser Versuch wurde freundlicherweise von Frau Virginja Jazbutyte, Medizinische Universitätsklinik Würzburg, durchgeführt.

#### 3.9.4. Polarisationsmikroskopische Kollagenmessung

Der obere Teil des Herzens war, wie bereits oben erwähnt, in Formalin fixiert worden. Die Herzen wurden dann in Paraffin gebettet und mittels eines Mikrotoms in Schichten von 1-3µm geschnitten. Auf einem Reagenzglas wurden diese Schnitte dann mit Picro-Sirius-Red Färbung angefärbt und konnten dann im Polarisationsmikroskop betrachtet werden. Es erfolgten zwei digitale Bildaufnahmen: eine im Durchlicht und eine im polarisierten Licht.

Im Durchlicht stellte sich das Kollagen als rot gefärbt dar, der Muskel war gelblich. Im Polarisationslicht befand sich das Präparat zwischen Polarisator und Analysator, welche orthogonal zueinander ausgerichtet waren. Gefärbtes Kollagen drehte die Schwingungseben des polarisierten Lichtes.

Aus dem Durchlichtbild wurde eine binäre Maske erstellt, um Artefakte des Polarisationsbildes zu eliminieren und die Messfläche planimetrieren zu können. Danach wurden Maske und Polarisationslicht mittels AND-Verknüpfung übereinandergelegt und im bereinigten Bild die Rottöne in Graustufen umgewandelt; dabei wurden Farben, bei denen Rot nicht überwiegt, gelöscht. Diese Dichtebilder hatten 256 Graustufen, welche an einer Geraden einer Prozentskala zugeordnet wurden. Hieraus ergab sich eine maximale Genauigkeit von ca. 0,4%. Aus diesem Maskenbild wurde dann die Fläche ermittelt, auf die die Dichte bezogen wurde. Die gewonnenen Daten wurden danach automatisch in von Microsoft Excel lesbare Textdateien exportiert.

Dieser Versuch wurde freundlicherweise von Ralf Kaiser, Klinikum Mannheim der Universität Heidelberg, durchgeführt.

## 3.10. Auswertung/ Ergebnisse

### 3.10.1. Immunoassay für Testosteron

Das Serumtestosteron wurde mit einem kommerziell erhältlichen RIA (Diagnostic Products Corporation, USA) mit einer Sensitivität von 0,06 ng/ml durchgeführt. Die Intra- und Interassay-Varianzbreite betrug 6-15% bzw. 9-16%.

### 3.10.2. Bestimmung der Osmolalität

Die Serumosmolalität wurde an einem kommerziell erhältlichen Osmometer (Osmomat 010, Gonotec GmbH, Berlin, Deutschland) durch Gefrierpunktsbestimmung errechnet.

### 3.10.3. Einteilung der Infarktgruppen

Die Bestimmung der Infarktgröße erfolgte nach oben genannter Methodik im NMR. Für die weitere Auswertung wurden die Infarkte >30% einbezogen, bei Infarktgrößen von 0-5 % erfolgte die Zuordnung zur SHAM-Gruppe (= kein Infarkt).

Die Charakteristika des Infarktes sind von entscheidender Bedeutung, da auch beim Menschen signifikante hämodynamische und geometrische Veränderungen erst bei transmuralen Infarkten auftreten. So sind bei Infarktgrößen von <20% diese Veränderungen minimal, da hier das übrige Myokard den Wandstress gut kompensieren kann [52, 58].

#### 3.10.4. Beurteilung der Mortalität

Durch eine Infarzierung starben erfahrungsgemäß ca. 50% der operierten Tiere. Um zu sehen, ob die Mortalität innerhalb der drei infarzierten Gruppen sich unterschied, führten wir einen Chi-Quadrat-Test durch.

Von der Statistik ausgeschlossen wurden die Tiere, die innerhalb der ersten 30 min nach der Ligatur der A. coronaria sinistra gestorben waren. Da es sich hierbei meist um Tod infolge der Operationstechnik oder Tagesform des Operateurs handelt, kann durch diese frühe Mortalität nicht auf einen Einfluss der Therapieform auf die Operation geschlossen werden. In die Gruppe der gestorbenen Tiere gehören die Tiere, die innerhalb eines Zeitraumes von mehr als 30 min nach der Operation gestorben waren, d.h. in den ersten Stunden postoperativ oder über Nacht. Haupttodesursachen in dieser Phase sind v.a. Herzrhythmusstörungen oder aber ein kardiogener Schock.

#### 3.10.5. Statistische Auswertung der Versuchsdaten

Alle Messergebnisse wurden für jeden Parameter statistisch gemittelt. Mit Hilfe der faktoriellen ANOVA-Analyse wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen für jeden Parameter bestimmt. Signifikanzen sind dargestellt für den Inter- und Intragruppenvergleich. Berechnungen wurden mittels des StatView SE+Graphics Programmes (Abacus Concepts, Berkeley, CA, USA) durchgeführt. P-Werte  $<0,05$  wurden als signifikant bezeichnet, angegeben sind die Standardfehler (SEM). Die Gruppen bestehen bei allen durchgeführten quantitativen, hämodynamischen und molekularbiologischen Messungen aus fünf bis neun Tieren.

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Pharmakokinetik

Alle Injektionen wurden von den Tieren gut toleriert. Nur bei den Tieren mit den subkutan applizierten Pellets entwickelte sich ein fibrotisches Areal um den Fremdkörper herum.

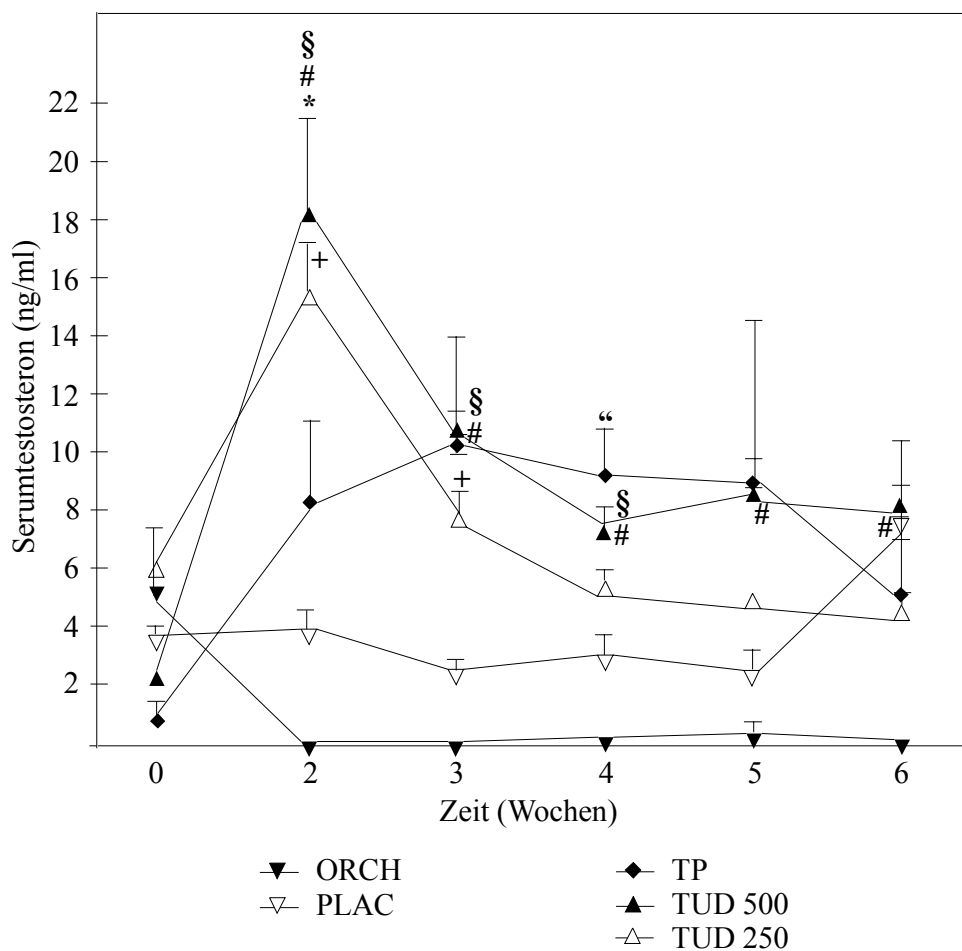


Abbildung 9: Testosteronserumspiegel über 6 Wochen; \* TUD 500 vs. PLAC:  $p < 0.05$ ; # TUD 500 vs. „baseline“ (Wert der Woche 0 in dieser Gruppe):  $p < 0.05$ ; § TUD 500 vs. ORCH:  $p < 0.05$ ; + TUD 250 vs. ORCH:  $p < 0.05$ ; " TP vs. PLAC:  $p < 0.05$

Die placebobehandelten Tiere (PLAC) dienten als Kontrolle zur Feststellung des basalen Serumtestosteronspiegels. Kastration (ORCH) führte erwartungsgemäß zu einem Absinken der Androgenspiegel unter die Nachweisgrenze.

Die Testosteron-Pellets (TP) führten zu einem Anstieg des Serumtestosterons in den supraphysiologischen Bereich, wobei jedoch die interindividuellen Serumspiegel stark variierten (zwischen 0.4-38.7 ng/ml nach 5 Wochen)..

Auch bei den Tieren mit der Injektion von Testosteronundekanoat (TUD) befanden sich die Spiegel im supraphysiologischen Bereich mit jedoch geringerer individueller Varianz, wobei die Tiere mit einem Injektionsvolumen von 500mg/kg noch höhere Spiegel erreichten.

<b>Gruppe</b>	<b>C<sub>max</sub> (ng/ml)</b>	<b>AUC (ng x Wochen/ml)</b>
Placebo (PLAC)	3.1±0.6	18.1±2.2
Orchiektomie (ORCH)	0,4±0.3	2,8±0,8
TUD 250 mg/kg	13.9±2.7	43.6±4.2
TUD 500 mg/kg	18.2±3.7	58.1±7.3
Pellet (TP)	10.9±4.5	48.3±13.7

*Tabelle 1:* durchschnittlich maximal erreichter Serumtestosteronspiegel (C<sub>max</sub>) und Fläche unter der Kurve (AUC); Signifikanzen ergeben sich für TUD 250/500 und TP vs. PLAC und ORCH: p<0,05; PLAC vs. ORCH: p<0,05

## 4.2. Akutmortalität

<b>Gruppe</b>	<b>Überlebt</b>	<b>Gestorben</b>
MI/PLAC	11 (31,4%)	24 (68,6%)
MI/TUD	19 (38,8%)	30 (61,2%)
MI/ORCH	24 (48%)	26 (52%)

*Tabelle 2:* Mortalität; Überlebt = kein letales Ereignis innerhalb der ersten 24 Stunden; Gestorben = letales Ereignis innerhalb der ersten 24 Stunden

Zwischen den Gruppen ergaben sich keine signifikanten Mortalitätsunterschiede. Die Art der Behandlung hatte somit keinen erkennbaren Einfluss auf die Mortalität.

## 4.3. Infarktgrößen

Es zeigten sich keine signifikant unterschiedlichen Infarktgrößen zwischen den Gruppen, so dass ein direkter Gruppenvergleich zwischen den Gruppen möglich war.

<b>Gruppe</b>	<b>Infarktgröße (%)</b>
MI/ ORCH	37,8±1,9
MI/PLAC	40,3±1,8
MI/TUD	37,8±1,8

*Tabelle 3:* Infarktgrößen

## 4.4. Gewichte

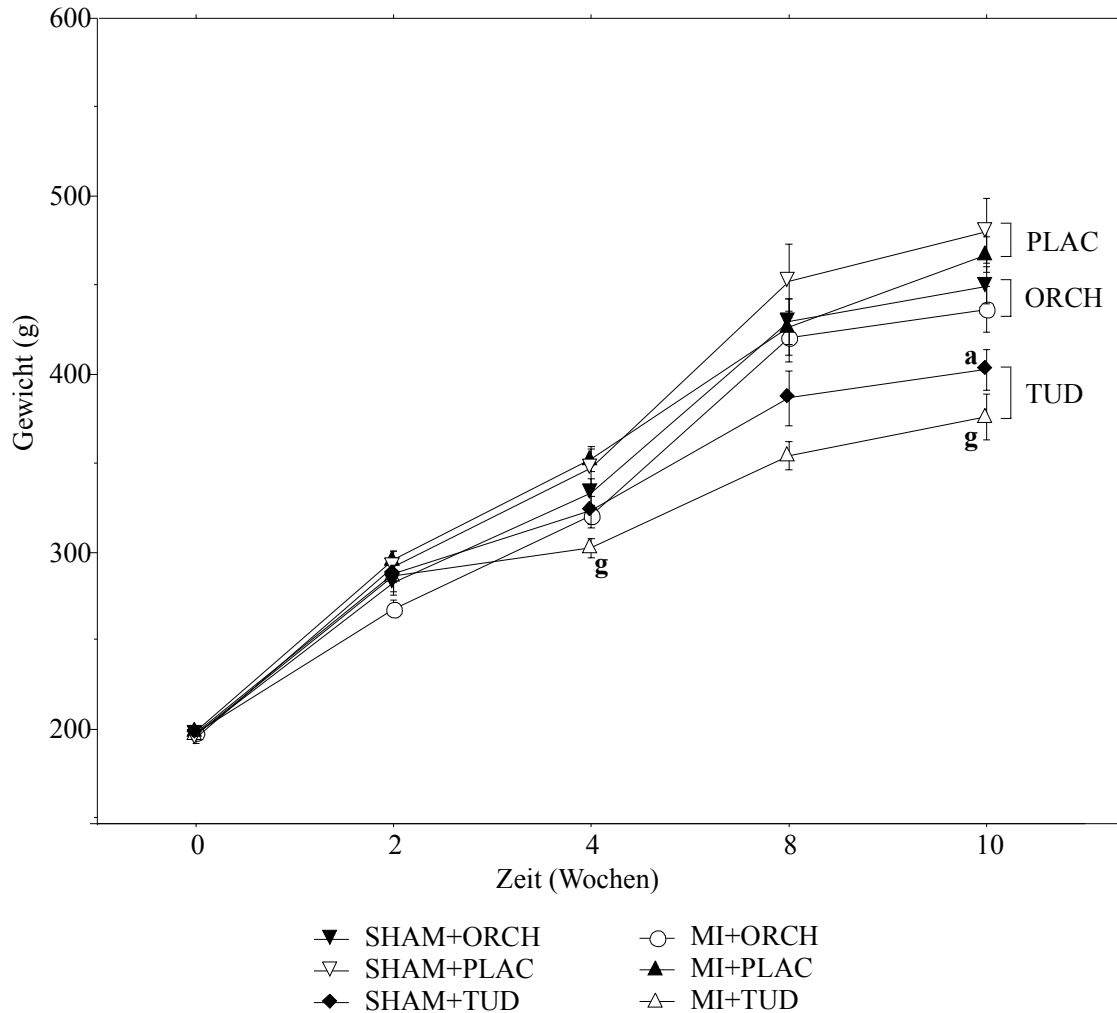


Abbildung 10: Gewichtsentwicklung über 10 Wochen; <sup>g</sup> MI/PLAC vs. MI/TUD:  $p=0,01$ ; Woche 10: <sup>a</sup> S/PLAC vs. S/TUD:  $p=0,04$ ; <sup>g</sup> MI/PLAC vs. MI/TUD:  $p=0,02$

Nach 4 Wochen zeigte sich, dass die infarzierten testosteronbehandelten Tiere signifikant leichter waren als die infarzierten Placebotiere. In Woche 10 traf dieses zusätzlich für die scheininfarzierten Tiere derselben Therapiekonstellation zu. Nach chronischer Testosteronsubstitution über 10 Wochen wurden die Tiere also, unabhängig von Infarzierung oder Scheininfarzierung, im Verlauf leichter.

## 4.5. Serumtestosteronspiegel und Osmolalität

Gemäß der oben beschriebenen Methodik erfolgten Blutentnahmen zum Zeitpunkt 4 und 10 Wochen für die Serumtestosteronbestimmung. Wie bereits im Pharmakokinetik-Abschnitt erläutert, reichten vierwöchige Testosteronundekanoatinjektionen aus, um stabile supraphysiologische Serumtestosteronkonzentrationen zu erhalten. Die Orchiektomie führte erwartungsgemäß zu Serumtestosteronspiegeln unterhalb der Nachweisgrenze.

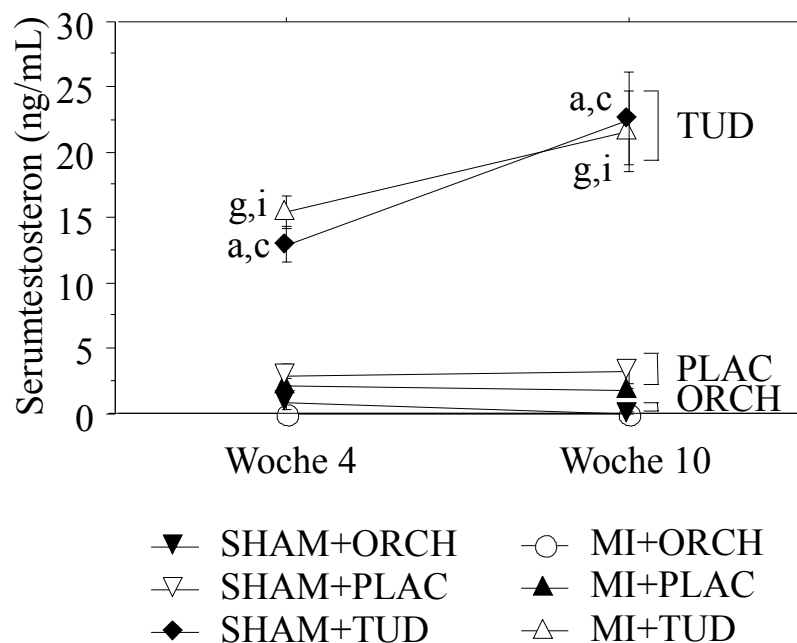


Abbildung 11: Serumtestosteron; <sup>a</sup> SHAM/PLAC vs. SHAM/TUD:  $p < 0,0001$ ; <sup>c</sup> SHAM/TUD vs. SHAM/ ORCH:  $p < 0,0001$ ; <sup>g</sup> MI/PLAC vs. MI/TUD:  $p < 0,0001$ ; <sup>i</sup> MI/TUD vs. MI/ ORCH:  $p < 0,0001$

Bei der Serumosmolalität, welche aus der letzten Bluprobe nach Tötung des Tieres bestimmt wurde, ergaben sich in der infarzierten Gruppe keine signifikanten Unterschiede zwischen orchiektomierten und testosteronbehandelten Tieren ( $298 \pm 4,5$  mosm/kg vs.  $290,6 \pm 1,4$  mosm/kg;  $p = 0,31$ ).



## 4.6. Absolute Herzgewichte

Die Gewichtsangaben bezogen sich auf den Zeitpunkt nach Beendigung der Langendorff-Perfusion, d.h. das Herz war frei von Blut oder Blutkoageln. Es ergaben sich folgende Werte:

<b>Gruppe</b>	<b>Gesamtherzgewicht (g)</b>	<b>Linker Ventrikel (g)</b>	<b>Rechter Ventrikel (g)</b>
SHAM/PLAC	1,6±0,06	1,3±0,04	0,3±0,09
SHAM/TUD	1,7±0,06	1,4±0,06	0,3±0,01
SHAM/ ORCH	1,5±0,06	1,2±0,06	0,3±0,02
MI/PLAC	2,2±0,94	1,7±0,09	0,5±0,04
MI/TUD	2,4±0,2	1,9±0,15	0,5±0,07
MI/ ORCH	2,5±0,13	1,7±0,1	0,4±0,04

*Tabelle 4: absolute Herzgewichte*

Im Intergruppenvergleich ergaben sich keine signifikanten Unterschiede im absoluten Herzgewicht.

## 4.7. Relative Herzgewichte

Hierbei wurde sowohl das rechts- als auch das linksventrikuläre Herzgewicht auf das Körpergewicht bezogen; es ergab sich also der Quotient Herzgewicht/Körpergewicht.

#### 4.7.1. Quotient Linker Ventrikel/Körpergewicht

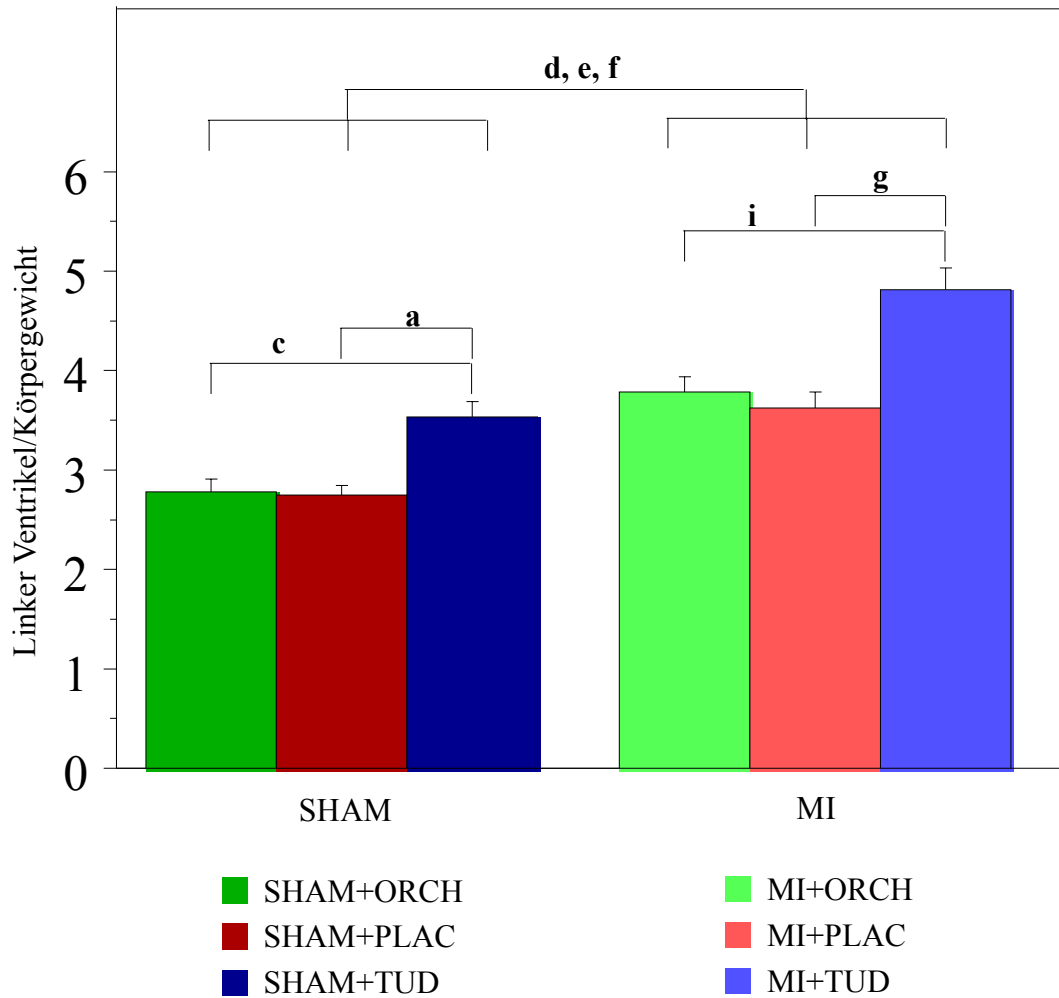


Abbildung 12: Quotient Linker Ventrikel/Körpergewicht; <sup>a</sup> SHAM/TUD vs. SHAM/PLAC:  $p=0,02$ ; <sup>c</sup> SHAM/TUD vs. SHAM/ ORCH:  $p<0,01$ ; <sup>d</sup> SHAM/PLAC vs. MI/PLAC:  $p<0,01$ ; <sup>e</sup> SHAM/ ORCH vs. MI/ ORCH:  $p<0,01$ ; <sup>f</sup> SHAM/TUD vs. MI/TUD:  $p<0,001$ ; <sup>g</sup> MI/PLAC vs. MI/TUD:  $p<0,01$ ; <sup>i</sup> MI/TUD vs. MI/ ORCH:  $p<0,01$

In der Infarktgruppe waren, bezogen auf das Körpergewicht, die linken Ventrikel signifikant schwerer als in der scheininfarzierten Gruppe.

Innerhalb der infarzierten und scheininfarzierten Gruppen zeigte sich bei den testosteronbehandelten Tieren, dass diese signifikant schwerere Ventrikel hatten als die orchietomierten und die placebobehandelten Tiere.

#### 4.7.2. Quotient Rechter Ventrikel/Körpergewicht

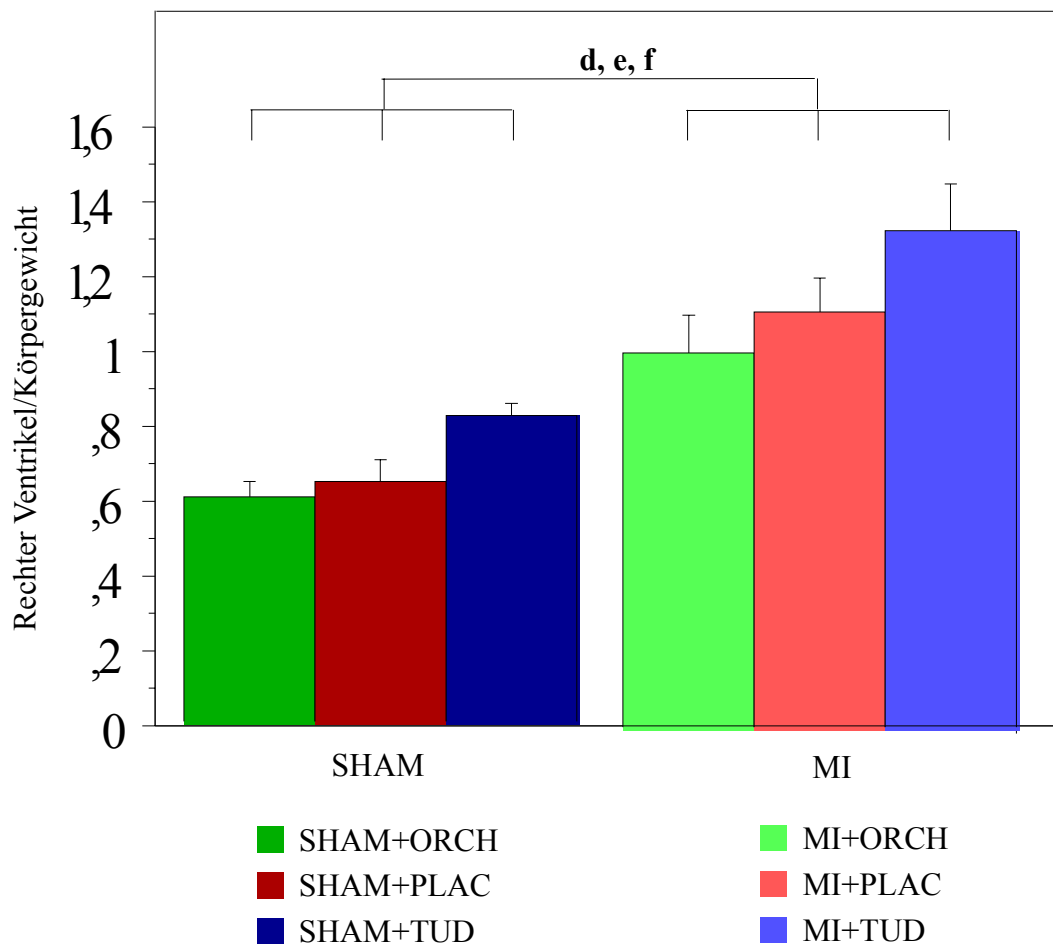


Abbildung 13: Quotient Rechter Ventrikel/Körpergewicht; <sup>d</sup> SHAM/PLAC vs. MI/PLAC:  $p < 0,001$ ; <sup>e</sup> SHAM/ ORCH vs. MI/ ORCH:  $p = 0,04$ ; <sup>f</sup> SHAM/TUD vs. MI/TUD:  $p < 0,01$

Bezogen auf das Körpergewicht fand sich beim rechten Ventrikel nur noch ein signifikanter Unterschied zwischen den infarzierten Gruppen verglichen mit der scheininfarzierten Gruppen. Die Testosterongabe hatte also, auf das Körpergewicht bezogen, keinen Effekt auf den rechten Ventrikel.

## 4.8. Echokardiographie

### 4.8.1. Fractional Shortening

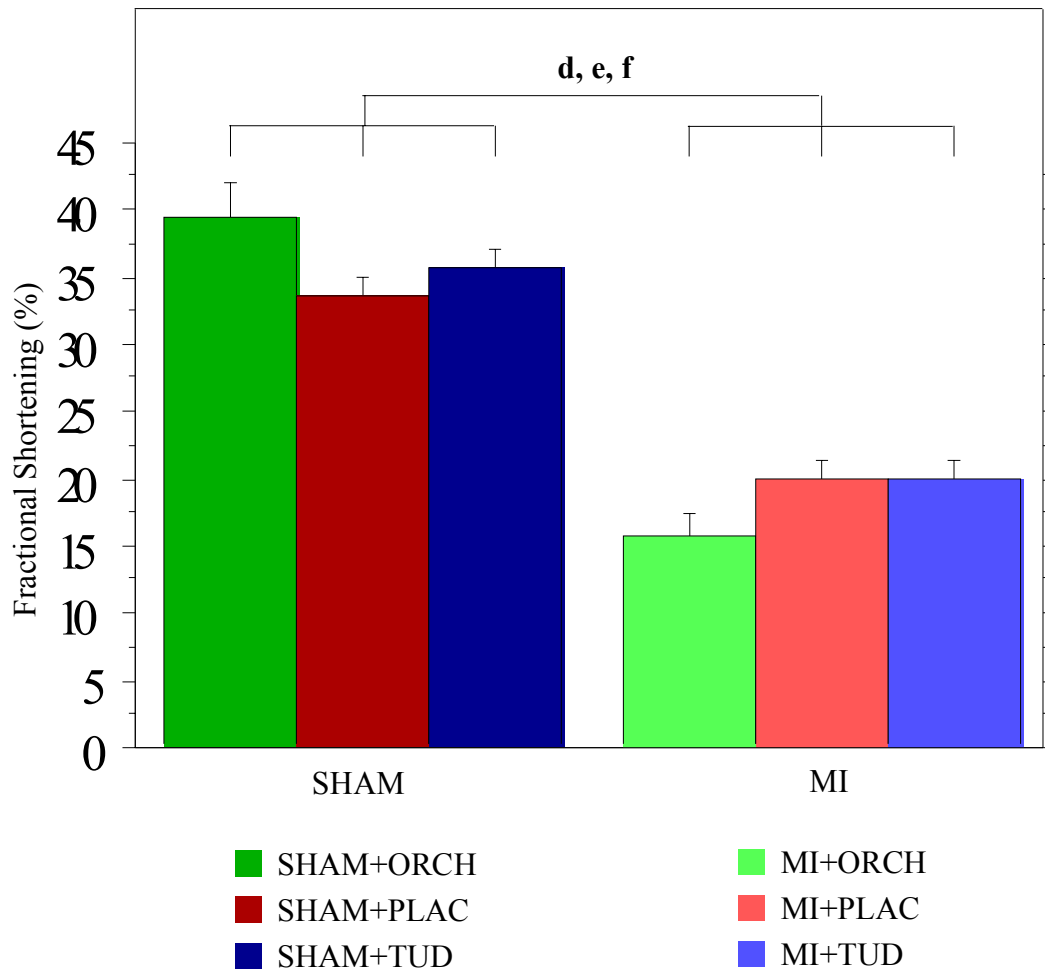


Abbildung 14: Fractional shortening; <sup>d</sup> SHAM/PLAC vs. MI/PLAC:  $p < 0,0001$ ; <sup>e</sup> SHAM/ ORCH vs. MI/ORCH:  $p < 0,0001$ ; <sup>f</sup> SHAM/TUD vs. MI/TUD:  $p < 0,0001$

Nach der Infarzierung fiel das fractional shortening erwartungsgemäß ab, ohne das die testosteroninduzierte Hypertrophie einen Effekt darauf hatte.

#### 4.8.2. Mitrales E/A

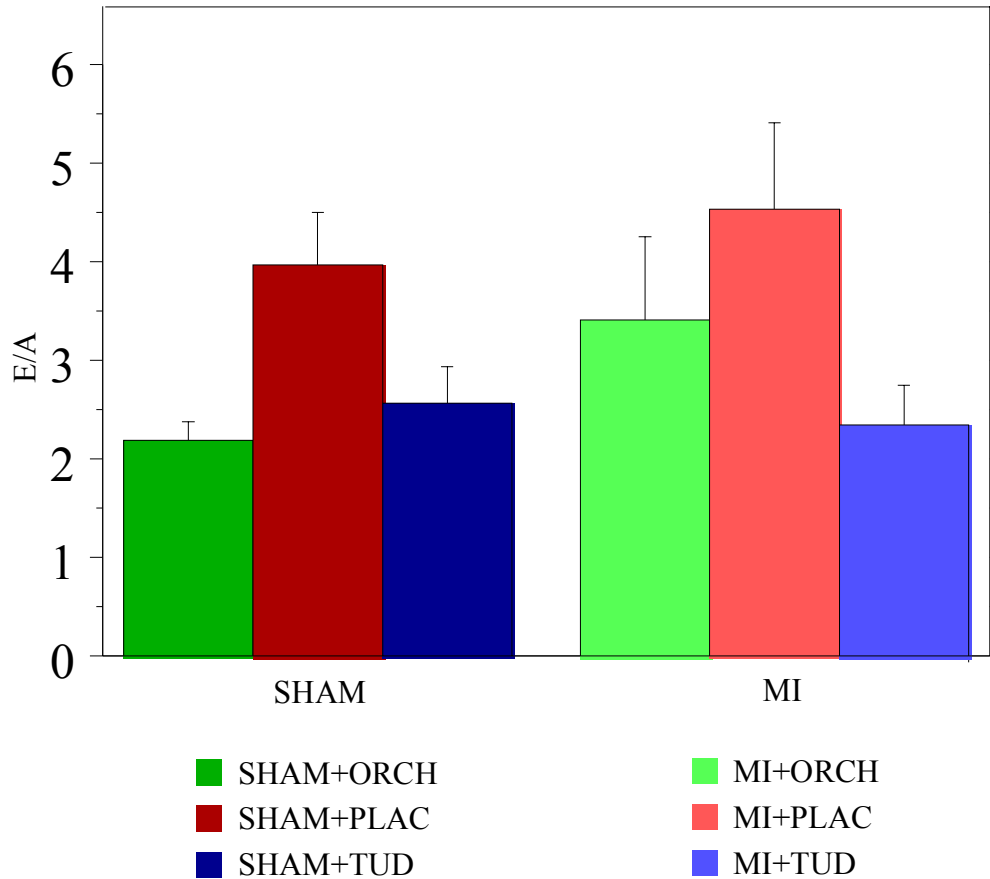


Abbildung 15: Quotient E/A; hier ergeben sich keine Signifikanzen

Keine Signifikanzen, jedoch ein Trend zu einem niedrigeren Quotienten bei MI/TUD im Vergleich zu den anderen infarzierten Behandlungsgruppen, fand sich bei dem Verhältnis des frühen und späten transmitralen Flusses .

### 4.8.3. Linksventrikuläre Diameter

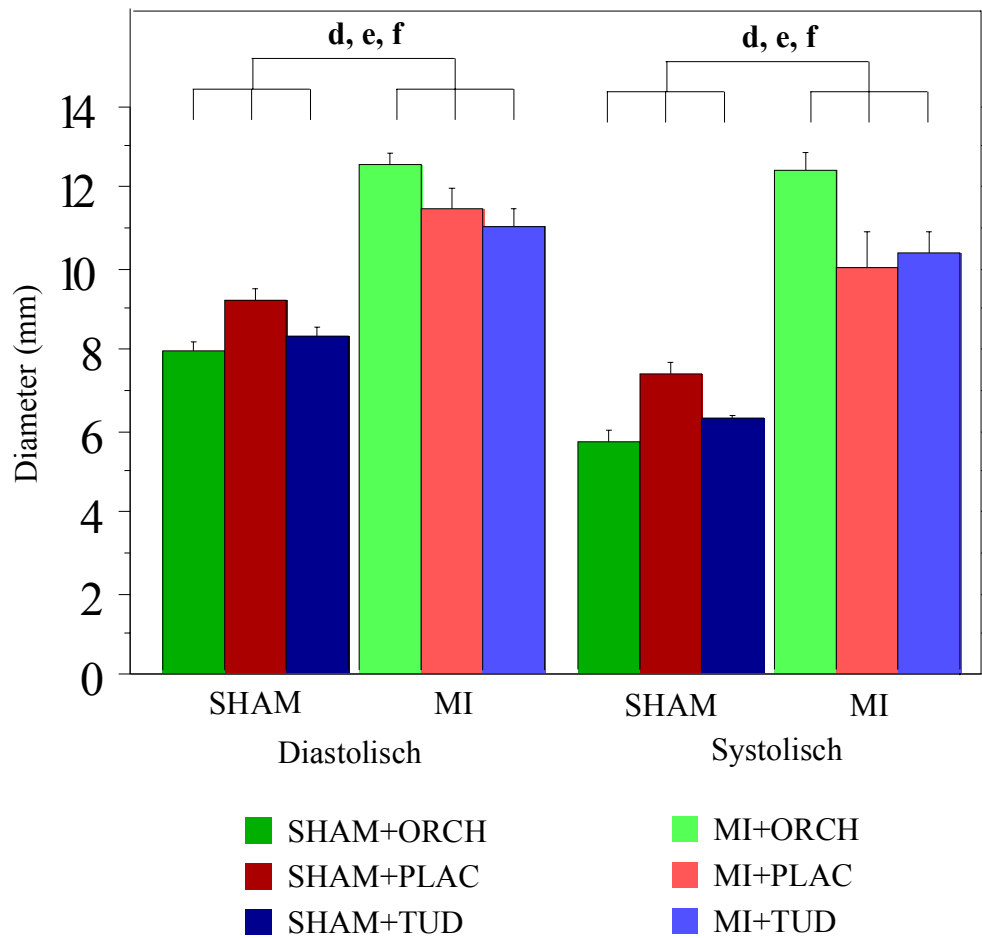


Abbildung 16: Linksventrikuläre Diameter; Kurze Achse diastolisch und systolisch jeweils: <sup>d</sup> SHAM/PLAC vs. MI/PLAC:  $p < 0,05$ ; <sup>e</sup> SHAM/ ORCH vs. MI/ORCH:  $p < 0,05$ ; <sup>f</sup> SHAM/TUD vs. MI/TUD:  $p < 0,05$

Nach Infarzierung kam es erwartungsgemäß zu einer Zunahme der linksventrikulären diastolischen und systolischen Diameter. Die Art der Therapie hatte auf diesen Parameter keinen Einfluß.

## 4.9. NMR-Messungen

### 4.9.1. Enddiastolische Wanddicke

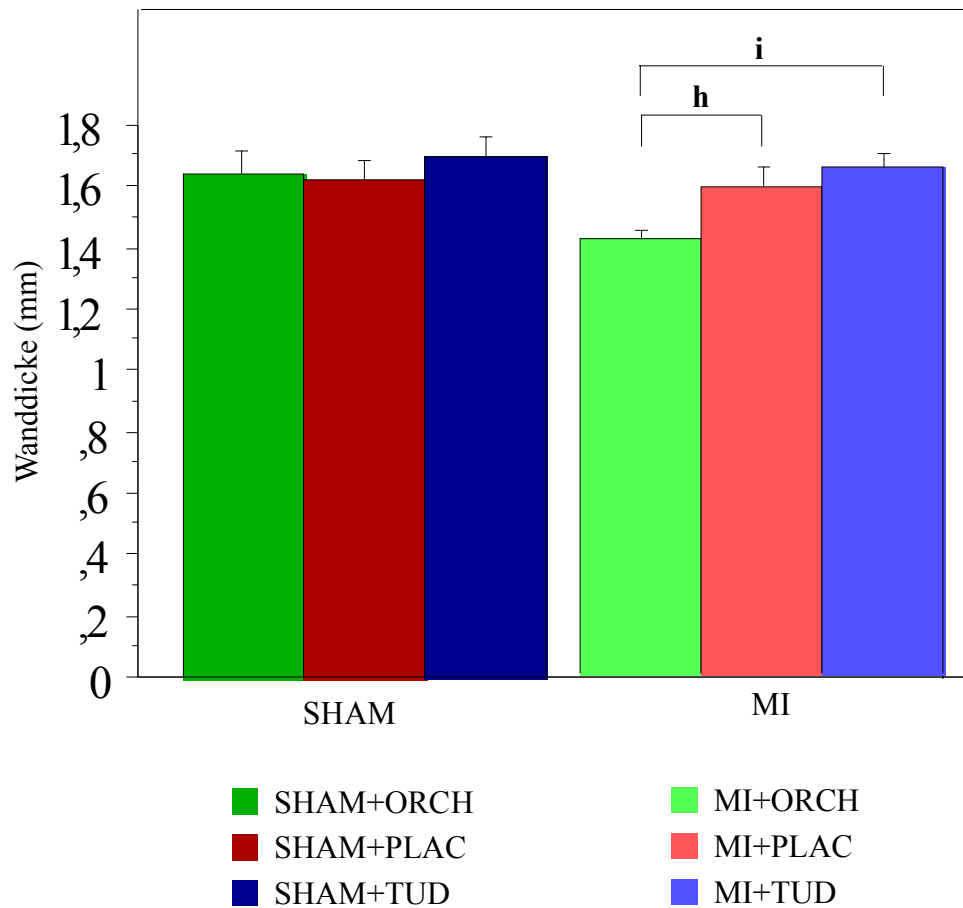


Abbildung 17: Diastolische Wanddicken; <sup>h</sup> MI/PLAC vs. MI/ORCH:  $p < 0,05$ ; <sup>i</sup> MI/TUD vs. MI/ ORCH:  $p < 0,05$

Hier zeigte sich, dass nach der Infarzierung die orchiektomierten Tiere eine signifikant niedrigere diastolische Wanddicken hatten als die Tiere der anderen Behandlungsgruppen.



#### 4.9.2. Veränderungen der linksventrikulären Masse über die Zeit

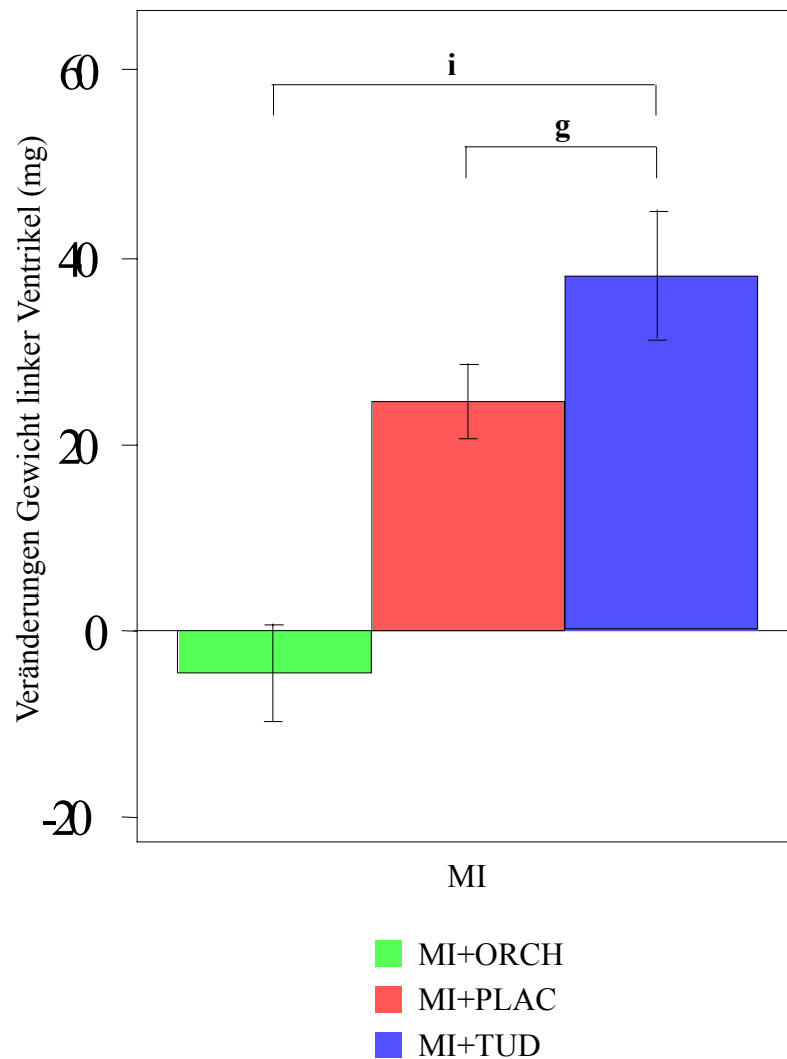


Abbildung 18: Veränderungen des linksventrikulären Gewichtes zwischen den beiden Messzeitpunkten (Wochen 4 und 10) ; <sup>g</sup> MI/PLAC vs. MI/TUD:  $p < 0,05$ ; <sup>i</sup> MI/TUD vs. MI/ ORCH:  $p < 0,05$

Innerhalb der infarzierten Gruppe zeigte sich, dass sich bei den testosteronbehandelten Tieren im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen das linksventrikuläre Gewicht im Zeitverlauf signifikant erhöhte, während es sich bei den orchiektomierten Tieren reduzierte.

## 4.10. in-vivo Hämodynamik

### 4.10.1. Linksventrikulärer enddiastolischer Druck

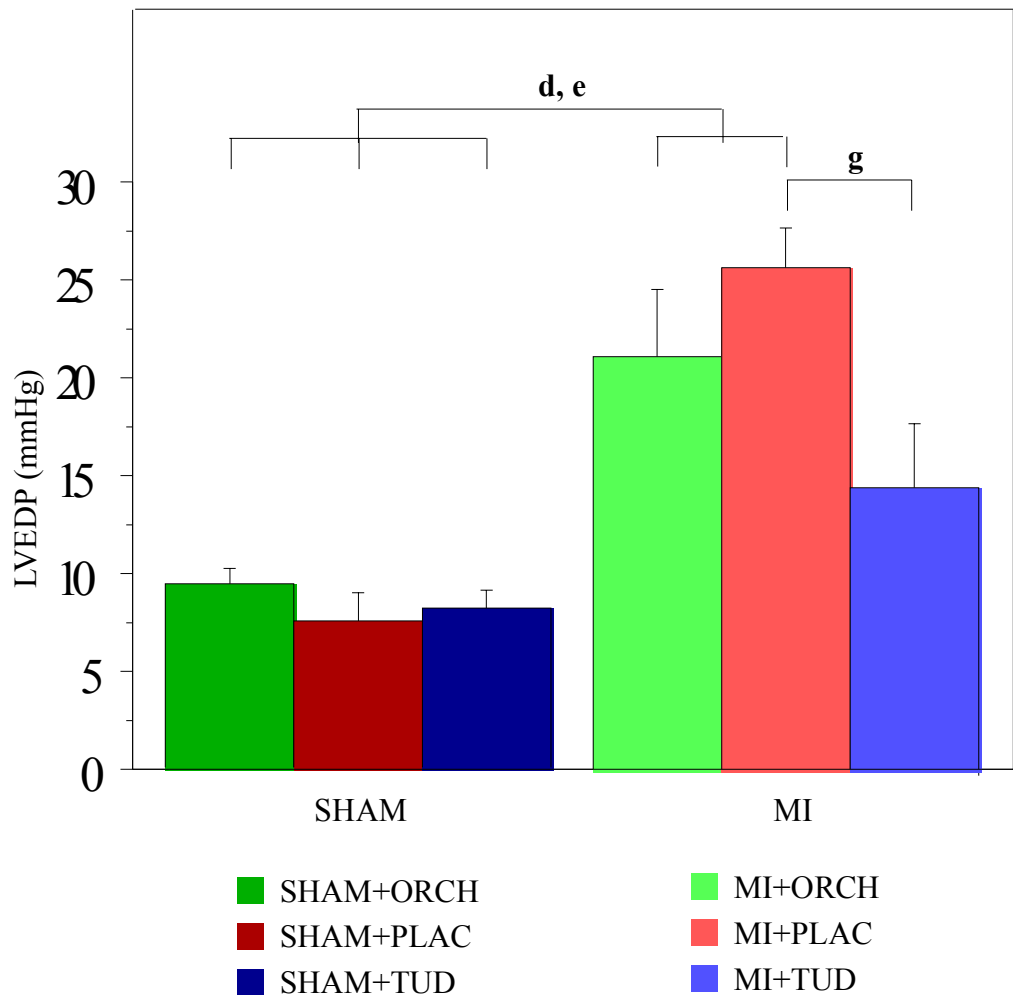


Abbildung 19: linksventrikulärer enddiastolischer Druck; <sup>d</sup> SHAM/PLAC vs. MI/PLAC:  $p < 0,0001$ ; <sup>e</sup> SHAM/ ORCH vs. MI/ ORCH:  $p = 0,002$ ; <sup>g</sup> MI/PLAC vs. MI/TUD:  $p = 0,03$

Erwartungsgemäß zeigte sich zwischen den scheininfarzierten und infarzierten Gruppen (placebobehandelte- und orchiektomierte Tiere) ein signifikanter Unterschied beim LVEDP. Chronisch-anaboler Testosterongabe aber führte nach Infarkt zu einem signifikant niedrigerem linksventrikulären enddiastolischen Druck im Vergleich zu der infarzierten Placebogruppe.

## 4.11. Langendorff-Hämodynamik

### 4.11.1. Linksventrikuläre Druckdifferenz

Die linksventrikuläre Druckdifferenz ließ sich folgendermaßen errechnen:

$$\text{LVDP} = \text{Systolischer Druck} - \text{Diastolischer Druck}$$

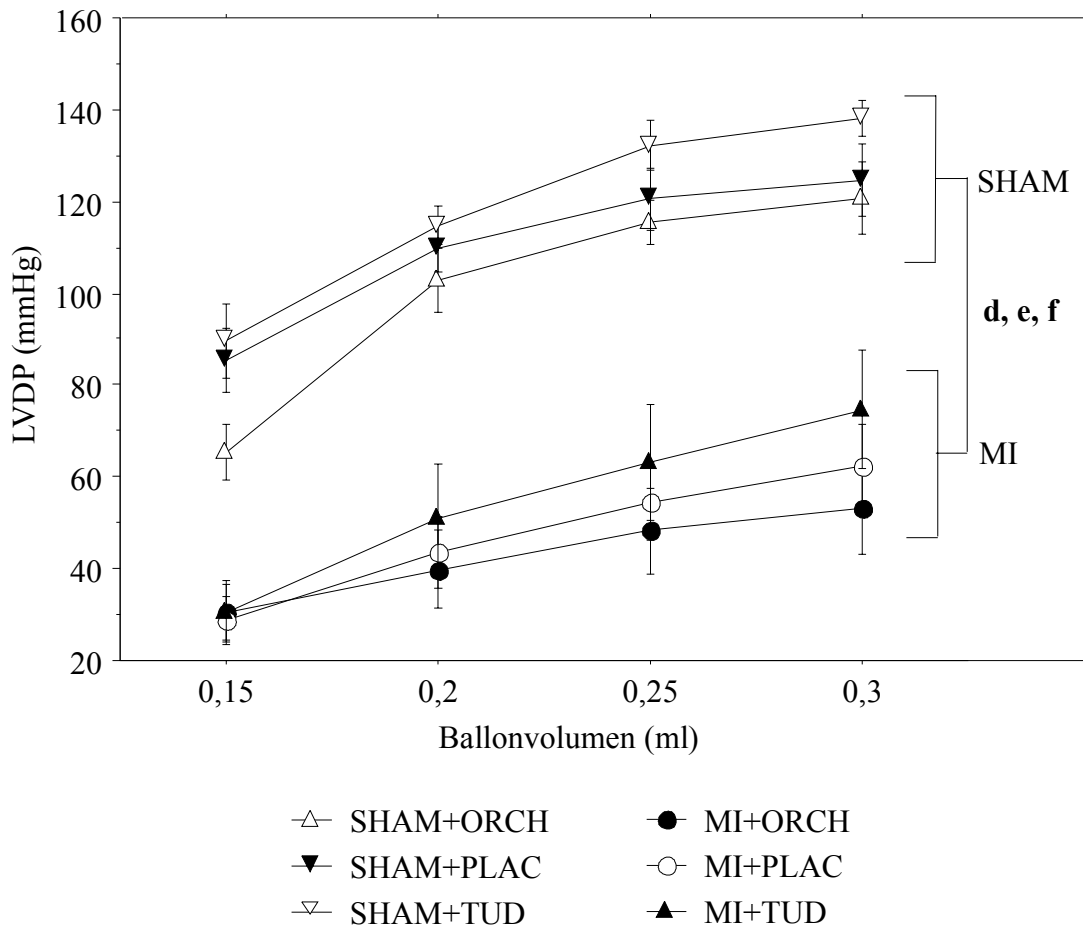


Abbildung 20: Linksventrikuläre Druckdifferenz; <sup>d,e,f</sup> SHAM vs. MI:  $p < 0,05$

Bei der Langendorff- Perfusion zeigte sich, dass die infarzierten Herzen erwartungsgemäß eine niedrigere Druckdifferenz aufbauen konnten als die scheininfarzierten Herzen. Signifikanzen ergaben sich dabei lediglich zwischen den infarzierten und scheininfarzierten Gruppen.

Die Kurve für die infarzierten, orchiektomierten Tiere war, im Vergleich zu den anderen Gruppen, nach unten rechts verschoben; dies ist ein Hinweis auf eine Dilatation und linksventrikuläre Dysfunktion.

## 4.12. Molekularbiologische Ergebnisse

### 4.12.1. Atriales natriuretisches Peptid (ANP) im Northern-Blot

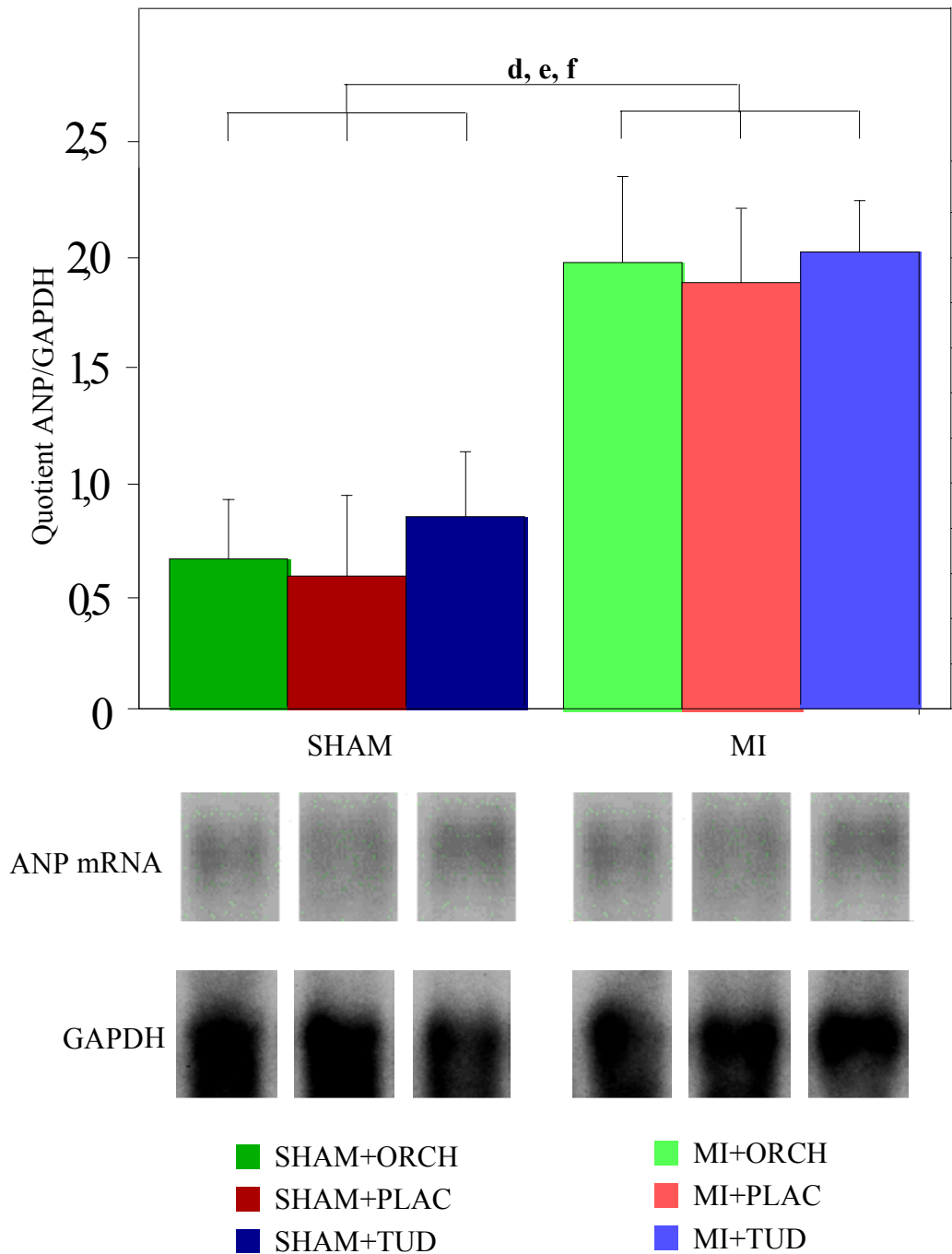
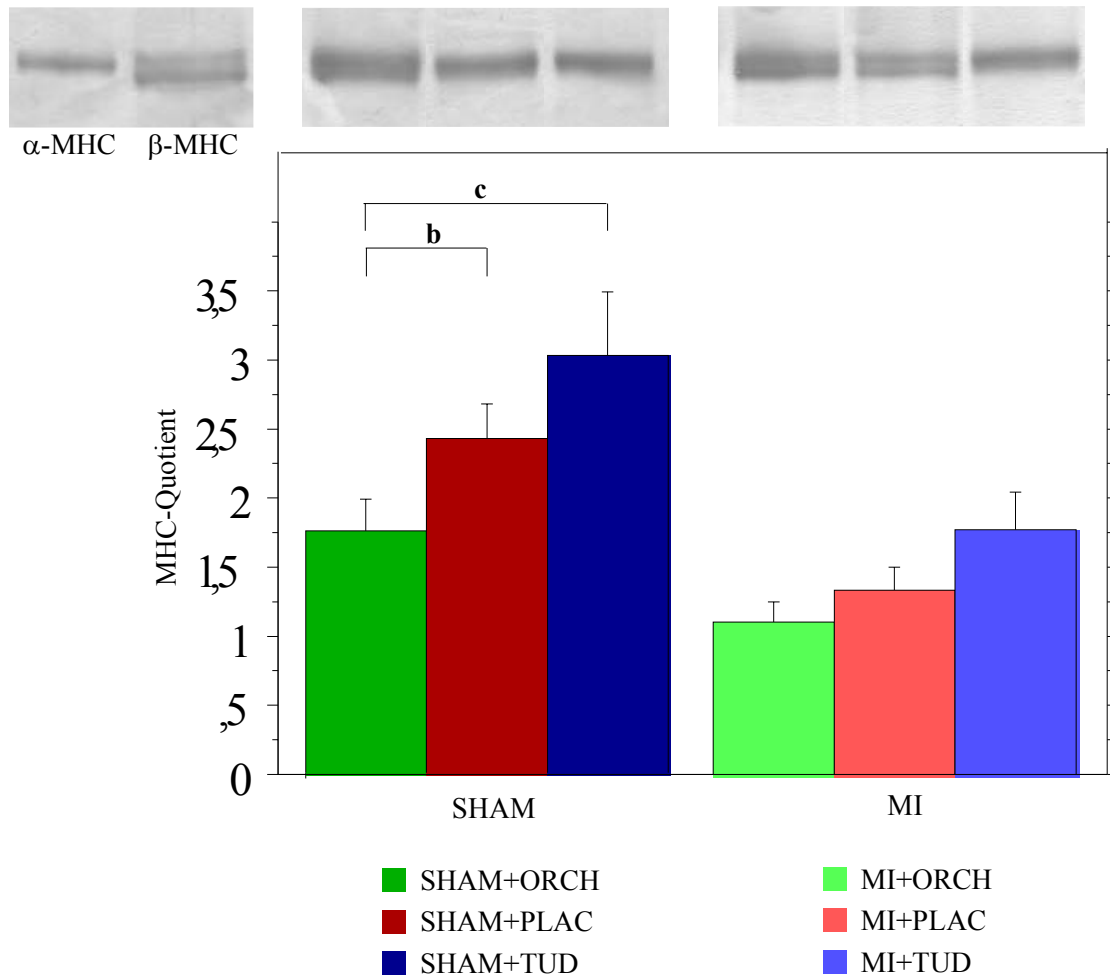


Abbildung 21: Quotient ANP/GAPDH; <sup>d,e,f</sup> SHAM vs. MI:  $p < 0,05$

Nach Infarzierung erhöhte sich die ANP-mRNA-Expression in allen infarzierten Gruppen.

Trotz der signifikanten Hypertrophie unter Testosteron fanden sich jedoch keine Unterschiede innerhalb der infarzierten und scheininfarzierten Gruppen.

#### 4.12.2. Myosin Heavy Chains (MHC)



*Abbildung 22:* im oberen Teil der Abbildung: Silbergefärbte Gele für myosin-heavy-chains (MHC); links sind die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Banden als Kontrollen dargestellt: Einzelbande für  $\alpha$ -MHC und Doppelbande für  $\beta$ -MHC.

Im unteren Teil der Abbildung: Nach Einlesen dieser Bilder konnten die Banden nach der oben erwähnten Methodik am Computer ausgewertet werden. Dabei ergaben sich folgende Signifikanzen: <sup>b</sup> SHAM/PLAC vs. SHAM/ ORCH:  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> SHAM/TUD vs. SHAM/ ORCH:  $p < 0,05$



Bei den scheininfarzierten Ratten führte die Testosteronbehandlung zu einem signifikanten Anstieg der  $\alpha/\beta$ -MHC-Ratio (SHAM/TUD vs. SHAM / ORCH und SHAM/PLAC). Zwischen den infarzierten Gruppen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

### 4.12.3. Kollagengehalt der freien Ventrikelwand

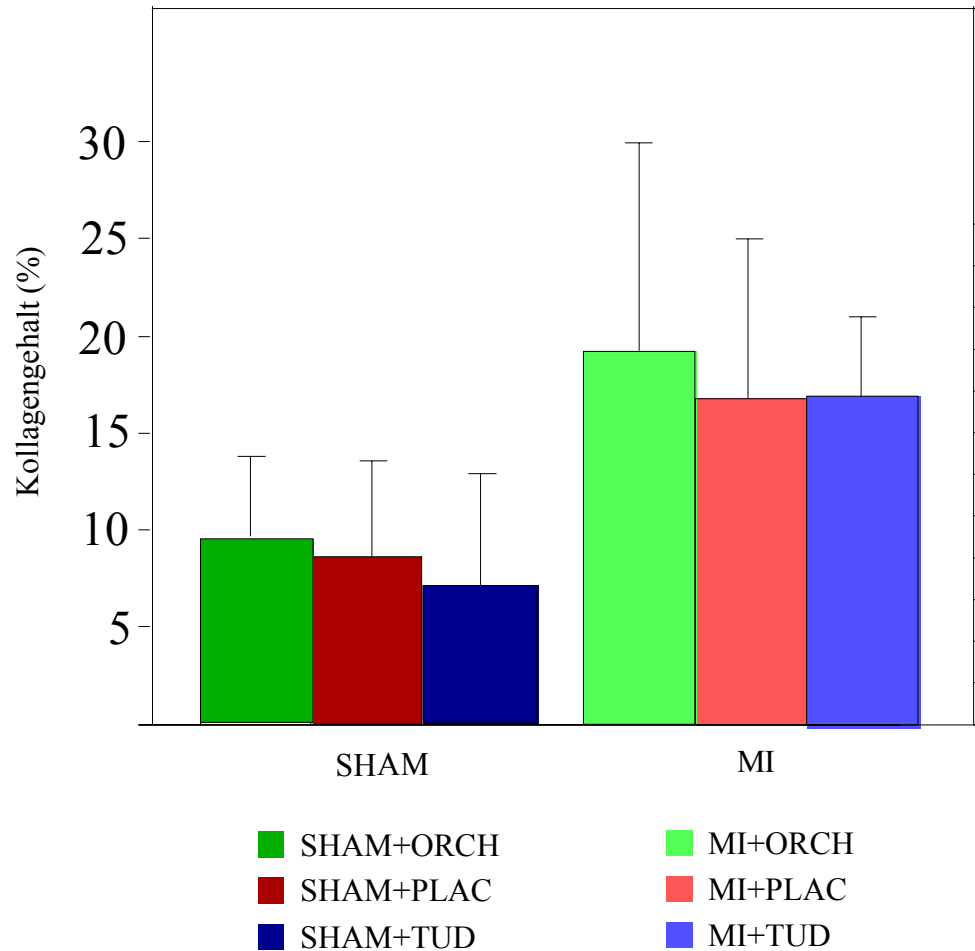
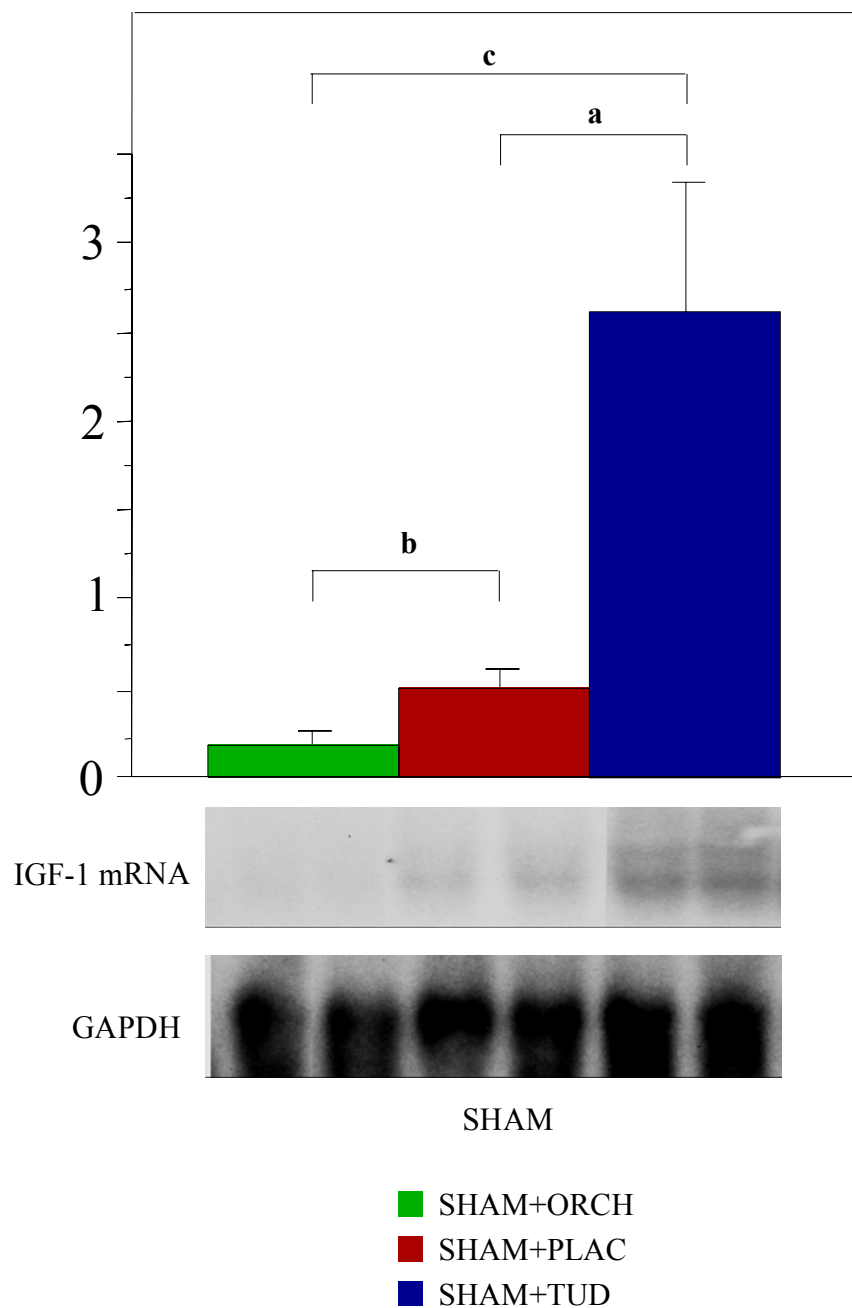


Abbildung 23: Kollagengehalt freie Ventrikelwand; <sup>f</sup> SHAM/TUD vs. MI/TUD: p<0,05

Testosteron führte nicht zu einer verstärkten ventrikulären Kollagenakkumulation, auch nach Infarzierung konnten wir keine Erhöhung der Kollagenkonzentration zeigen.

#### 4.12.4. IGF-1 mRNA-Expression im Northern-Blot



*Abbildung 24:* im oberen Teil der Abbildung: Computergestützte Quantifizierung der IGF-1 mRNA- Expression nach Einscannen des Northern-Blots (unterer Teil der Abbildung) im linken Ventrikel von scheininfarzierten Tieren.

Dabei ergaben sich folgende Signifikanzen: <sup>a</sup> SHAM/PLAC vs. SHAM/TUD:  $p < 0,05$ ; <sup>b</sup> SHAM/PLAC vs. SHAM/ ORCH:  $p < 0,05$ ; <sup>c</sup> SHAM/TUD vs. SHAM/ORCH:  $p < 0,05$

Testosteronsubstitution verfünfachte die Expression von IGF-1 mRNA im linken Ventrikel, während die mRNA-Expression bei orchiektomierten Tieren signifikant niedriger war als bei den unbehandelten Tieren.

## 5. Diskussion

Der Einsatz von Testosteron zum Ausgleich der mit dem Alter abfallenden Serumtestosteronspiegel hat in den letzten Jahren eine immer breitere Anwendung und Akzeptanz gefunden [59]. Dabei ist es jedoch immer noch unklar, ob der Abfall von Testosteron mit dem Alter ein physiologisches Phänomen ist oder ob es sich um den Zustand eines wirklichen Defizites handelt („climacterium virile“). Es stellt sich somit die Frage, welche gesundheitlichen Risiken eine solche Substitution mit sich bringt. Von besonderem Interesse sind mögliche ungünstige kardiale Wirkungen, da bei älteren Männern die koronare Herzkrankheit weit verbreitet ist. Bei dieser Fragestellung bot sich das hier verwendete Rattenmodell des kardialen postinfarziellen Remodelings an.

### 5.1. Vorversuche - Testosteronundekanoat erzeugt stabile Testosteronkonzentrationen

Die Pharmakokinetikversuche zeigten, dass Testosteronundekanoat (TUD) in einer Dosis von 500mg/kg ausgezeichnet geeignet ist, um konstante supraphysiologische Serumtestosteronspiegel bei Ratten zu erreichen. Dieses Ergebnis deckt sich mit Beobachtungen am Menschen, wo in Phase I-Studien TUD zur langfristigen Behandlung des männlichen Hypogonadismus eingesetzt wurde [47]. Hier wurde auch gezeigt, dass sich durch zwei gleichzeitige Injektionen die Resorptionsfläche vergrößern lässt, wodurch Testosteron schneller systemisch verfügbar gemacht werden kann.

Die Implantation von Testosteronpellets führte hingegen bei unseren Tieren zu einer weniger zuverlässigen Pharmakokinetik, da die Serumtestosteronspiegel entweder interindividuell zu weit streuten oder aber supraphysiologische Spiegel nur über einen kurzen Zeitraum aufrechterhalten werden konnte. Ferner war diese Technik mit invasiveren Methoden verknüpft und wurde von den Tieren offenbar wegen der Bildung einer derben fibrotischen Kapsel nicht optimal vertragen.

## 5.2. Einfluss der Therapieform auf die infarktassoziierte Mortalität

Die Mortalität zwischen den Gruppen unterschied sich nach der Infarzierung nicht signifikant (MI/ORCH vs. MI/PLAC vs. MI/ TUD: 52 % vs. 68,6 % vs. 61,2 %), wobei diese Mortalitätsrate generell mit der in anderen Studien vergleichbar war [60, 61].

Beim Menschen zeigte sich in mehreren Studien ein Einfluss des Geschlechts auf die Mortalität nach Myokardinfarkt [62]. Dabei scheint das männliche Geschlecht eine bessere Prognose zu haben. So zeigte sich, dass vor allem Frauen unter 75 Jahren, auch wenn sie häufiger als Männer noch das Krankenhaus erreichen, nach einem Infarkt eine höhere frühe Mortalität hatten als gleichaltrige Männer [63]. Auch die Überlebensrate zwei Jahre nach Infarkt war bei Männern höher als bei Frauen [64]. Dieses könnte durch unterschiedliche Verläufe des kardialen Remodelings bei Männern und Frauen bedingt sein. So konnte bei mit Nandrolondekanoat behandelten Hamstern mit genetisch bedingter Kardiomyopathie langfristig eine geringere Mortalität beobachtet werden [65].

## 5.3. Körpergewicht, Herzgewicht und kardiale Androgenrezeptoren

Infarzierte Ratten nahmen im Verlauf weniger an Gewicht zu als scheininfarzierte Ratten, was sich mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen deckt [55] und Ausdruck einer kardialen Kachexie sein könnte. Nach der Infarzierung beobachteten wir, dass im Verlauf die testosteronbehandelten Tiere signifikant weniger wogen als die placebobehandelten Tiere. Am Ende der Experimente war dies auch bei den scheininfarzierten Tieren der Fall. Eine geringere Zunahme des Körpergewichtes unter chronischem Androgeneinfluß im Rattenmodell wurde bereits beschrieben, wobei die Autoren jedoch Nandrolondekanoat verwendet hatten [66], das im Gegensatz zu Testosteronundekanoat nicht zu Östrogenen aromatisiert wird. Es scheint sich hierbei

also um einen über Androgenrezeptoren vermittelten Effekt zu handeln, wobei die genaueren Mechanismen unklar sind.

Sowohl in den infarzierten als auch in den scheininfarzierten Gruppen konnte man einerseits die signifikante Erhöhung des Herzgewichtes nach Infarzierung, andererseits den signifikanten Effekt der Testosteronbehandlung auf das Herzgewicht erkennen, was sich in der Erhöhung des Quotienten Linker Ventrikel/Körpergewicht widerspiegelte. Die relative Zunahme des Herzgewichtes über die Zeit wird besonders auch durch die kernspintomographischen Untersuchungen deutlich, welche die Differenz zum 4- und zum 10-Wochen-Termin zeigen. Die Zunahme des Herzgewichtes nach Infarzierung ist Ausdruck einer vermehrten Volumen- und Druckbelastung des insuffizienten linken Ventrikels und somit als Kompensationsmechanismus zur Aufrechterhaltung der Herzleistung anzusehen. Die darüber hinausgehende relative Herzgewichtszunahme bei den mit Testosteron behandelten Ratten ist am ehesten auf eine Hypertrophie der Kardiomyozyten zurückzuführen, die für Androgene unter anderem schon in der Zellkultur gezeigt werden konnte [67]. Auch beim Menschen wurde eine regelmäßige hochdosierte Androgeneinnahme mit einer ventrikulären Hypertrophie in Verbindung gebracht [8, 68].

Dass unterschiedliche Androgene jedoch auch unterschiedliche myokardiale Effekte besitzen, zeigen die Ergebnisse von Trifunovic et al. [66]. Nach Behandlung der Tiere mit Nandrolon beobachteten sie eine Abnahme von Körper- und Herzgewicht, was auf eine Downregulation zytoplasmatischer Steroidrezeptoren oder einer verminderten Rezeptorantwort auf exogen zugeführte Androgene zurückgeführt wurde.

Es ist auch weiterhin nicht klar, ob die Wirkungen von anabolen Steroiden rein über Androgenrezeptoren vermittelt werden; denn schon die endogenen Konzentrationen an Androgenen sind in der Lage, die Androgenrezeptoren weitgehend zu sättigen. Sullivan et al. [69] hypothetisieren deswegen, dass einige Effekte von Androgenen über nichtandrogene Rezeptoren vermittelt werden können. So haben Studien an Menschen gezeigt, dass Testosteron auch Progesteronrezeptoren aktivieren kann. Auch Glukokortikoidrezeptoren sind am menschlichen Skelettmuskel beschrieben worden.

So bewirken sie bei physiologischen Androgenspiegeln einen katabolen Prozeß am Skelettmuskel, welcher durch suprphysiologische Konzentrationen an anabolen Steroiden verhindert werden kann. In der Gegenwart von Östrogen, Testosteron und dem nicht-aromatisierbaren Trenbolon wurden so katabole Vorgänge endogener Glukokortikoide durch Interaktion mit dem Glukokortikoidrezeptor verhindert. [70].

#### 5.4. Kardiale Hypertrophie und ihre Bedeutung

Der funktionelle Effekt und somit die Dignität einer androgen-induzierten Hypertrophie ist immer noch strittig [8, 68]. Besonders wichtig wäre diese Frage im Zusammenhang mit einer postinfarziellen Hypertrophie unter Testosteron, wie wir sie bei unseren Versuchen beobachtet haben.

So wurde bei männliche Ratten nach Infarkt eine stärkere Hypertrophie nichtinfarzierten Muskelgewebes beobachtet als bei weiblichen Tieren [20], was durch die unterschiedlichen Testosteronspiegel erklärt wurde. In einer klinischen Studie hatten Patienten mit einer Hypertrophie des nichtinfarzierten Myokards sowohl in Ruhe als auch unter Belastung eher eine verbesserte Ejektionsfraktion (EF) [71]. Deswegen könnte eine postinfarzielle myokardiale Hypertrophie eine gute kompensatorische Antwort und somit eine sinnvolle Adaptation nach dem Verlust von Herzmuskel sein [19].

Es gibt jedoch auch ausreichend Hinweise dafür, dass eine Hypertrophie eher nachteilig sein könnte, da sie in hypertrophiertem Myokard bei Ratten eine verringerte Kapillardichte und damit einen negativ veränderten epikardialen und endokardialen Blutfluß bedingt [72]. Man vermutet hier deswegen, dass eine postinfarzielle Hypertrophie eine negative Antwort ist, da sie zu einer chronischen Ischämie führen und somit weitere Infarkte begünstigen kann.

In unserer Studie konnte die Frage nach der Dignität durch die nähere Betrachtung von Hypertrophie markern und hämodynamischen Parametern weiter vertieft werden.



So beobachteten mehrere Autoren nach Infarzierung einen remodeling-induzierten Anstieg des Hypertrophiemarkers „atriales natriuretisches Peptid“ (ANP) im Rahmen der „volume-overload“-Hypertrophie [73, 74]. ANP korrelierte auch mit der Höhe des linksventrikulären enddiastolischen Volumens und so mit dem hämodynamisch-anatomischen Ausmaß des kardialen Remodelings [75]. Die m-RNA Expression von ANP in unseren mit Testosteron behandelten und somit signifikant hypertrophierten Herzen war nicht erhöht. Ein vergleichbares Ergebnis fand sich auch in Zellkulturexperimenten von Marsh [67], wo auch mit nicht-aromatisierbarem Dihydrotestosteron (DHT) gearbeitet wurde; beide Androgene (DHT und Testosteron) führten hier zu einer Hypertrophie, wobei ANP nur bei den DHT-behandelten Tieren anstieg. Er schloß daraus, dass es unterschiedliche Testosteronrezeptor-Isoformen gäbe, die für diesen unterschiedlichen Effekt verantwortlich seien. Bei seinen Experimenten handelte es sich jedoch um neonatale Zellen, die keiner Ischämie und somit auch keinem Remodeling ausgesetzt waren.

Die Frage, ob die von uns beobachtete, postinfarzielle und testosteroninduzierte Hypertrophie einer oben beschriebenen remodelinginduzierten „volume-overload“-Hypertrophie entspricht, könnte also folgendermaßen beantwortet werden: trotz einer signifikant stärkeren Hypertrophie bei den mit Testosteron behandelten Tieren kam es im Vergleich zu den anderen Tieren nicht zu einer verstärkten Expression von ANP. Daher könnte es sich um eine eher „physiologische“ Form der Hypertrophie handeln, da sich insbesondere die hämodynamischen Parameter bei den infarzierten testosteronbehandelten Tieren nicht verschlechterten, sondern der linksventrikuläre enddiastolische Druck als Maß der Herzinsuffizienz signifikant absank.

Auch die Myosin-Schwerketten (myosin-heavy-chains, MHC) sind ein zuverlässiger und etablierter Marker der kardialen Hypertrophie [76]. Bei den nichtinfarzierten Ratten führte die Testosteronbehandlung zu einem signifikanten Anstieg der  $\alpha/\beta$ -MHC-Ratio (SHAM/TUD vs. SHAM/ORCH und SHAM/PLAC) im Ventrikel, die „schnelle“  $\alpha$ -Isoform war also verstärkt exprimiert. Die hämodynamischen Parameter blieben parallel dazu unverändert. Es ist bekannt, dass eine reine Testosterongabe bei nichtinfarzierten Ratten zu einer vermehrten Expression von mRNA der  $\alpha$ -MHC-Isoform im linken Ventrikel führt [77]. Mehrere Autoren haben nach Gonadektomie sowohl bei weiblichen als auch männlichen Tieren einen Wechsel zur  $\beta$ -MHC-Form

mit niedrigerem Blutdruck und verschlechterter Herzfunktion gefunden [77 - 79], während der direkte Einfluß auf die ventrikuläre Funktion weiterhin nicht ganz geklärt werden konnte; ein Hinweis darauf fand sich bei unseren nichtinfarzierten orchiektomierten Tieren nicht. Auch ein von Lengsfeld et al. [79] beschriebener Blutdruckanstieg mit Erhöhung von  $\alpha$ -MHC unter Androgengabe fand sich nicht, wobei in dieser Studie jedoch mit Dihydrotestosteron gearbeitet wurde.

Bei uns zeigte sich zwei Monate nach der Infarzierung beim MHC-Quotienten kein signifikanter Unterschied zwischen den infarzierten Behandlungsgruppen, trotz signifikant verstärkter Hypertrophie bei den testosteronbehandelten Tieren. Diese zusätzliche Hypertrophie war also nicht von einer verstärkten Expression von „langsamen“  $\beta$ -MHC-Isoformen begleitet, die sonst beim postinfarziellen Remodeling zu beobachten ist und als ein Marker der pathologischen „volume-overload“-Hypertrophie bezeichnet wurde [80]. Dieses könnte bei fehlender Verschlechterung der Herzfunktion also ebenfalls für eine eher „physiologische“, benigne Form der Hypertrophie sprechen.

Diese Vermutung wird auch durch eine Studie von Orenstein et al. [76] gestützt: hier beeinflusste nach einem Myokardinfarkt bei schon eingetretenem Remodeling körperliches Training mit myokardialer Hypertrophie die MHC-Expression positiv, indem der Anteil an  $\beta$ -MHC reduziert, der Wandstress vermindert und die Dilatation aufgehalten wurde. In einem anderen Modell war eine verstärkte Expression von  $\beta$ -MHC, wie sie durch Bluthochdruck verursacht wird, durch Training reversibel [ 81, 82].

## 5.5. Kollagengehalt und Androgene

Die Veränderung des Kollagengehaltes und somit der Einfluß auf die Compliance sowohl unter Training als auch unter Androgenen wird kontrovers diskutiert. Es ist bekannt, dass nach Infarzierung im Rahmen des Remodelings und einer Hypertrophie das kollagene Netzwerk umgebaut wird, wobei der Anteil von Kollagen (Typ I und

Typ III) an der extrazellulären Matrix ansteigt [30]. Dieser Befund eines signifikant erhöhten Kollagengehaltes der freien Wand zeigte sich bei uns jedoch nicht.

Beobachtungen einer durch Training induzierten kardialen Hypertrophie haben gezeigt, dass es bei Ratten nach 16 Wochen habitueller Arbeit zu einer Hypertrophie und gleichzeitig einer Reduktion der linksventrikulären enddiastolischen Steifigkeitskonstante (LVED k) kam. Gleichzeitig veränderte sich aber die Konzentration an Kollagen nicht, weswegen die verbesserte Compliance durch Änderungen der extrazellulären Matrix nicht erklärt werden konnte [83]. Eine dazu ergänzende Beobachtung konnte von Trifunovic et al. gemacht werden [66]: Hier zeigte sich, dass der myokardiale Kollagengehalt unter Nandrolondekanoat über drei Monate unverändert blieb, während sich jedoch die LVED k erhöhte. Man führte diesen Befund nicht auf die Änderung der extrazellulären Matrix zurück, sondern auf eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumgehaltes, da die erhöhte LVED k bei mit Nandrolon behandelten Tieren durch Infusion von Verapamil reversibel war und auf die Werte der Kontrollgruppe abfiel.

## 5.6. Mechanismen der testosteroninduzierten Hypertrophie

Der genaue zelluläre Mechanismus einer testosteroninduzierten myokardialen Hypertrophie ist noch nicht aufgeklärt.

Die durch Anabolika hervorgerufene Hypertrophie könnte direkt über zytoplasmatische Androgenrezeptoren und eine dadurch erhöhte Proteinbiosynthese verursacht sein; so fand McGill als erster spezifische Androgenrezeptoren im Pavianherz [14]. Eine in-vitro-Studie von Marsh et al. [67] konnte eine direkte androgenrezeptor-vermittelte Hypertrophie in Kardiomyozyten nachweisen. Hier verursachten sowohl Testosteron als auch Dihydrotestosteron eine solche Hypertrophieantwort, die durch den Androgenrezeptorantagonisten Cyproteronacetat aufgehoben werden konnte.

Auch ein indirekter Weg über die neurohumorale Achse (GHRH-IGF-1-Achse) [84] ist denkbar. Hobbs et al. [84] konnten zeigen, dass eine chronische Testosterongabe zu erhöhten IGF-1 Serumspiegeln bei Männern führte. Auch ist bereits seit längerem bekannt, dass IGF-1 eine proliferationsfördernde Wirkung auf eine Vielzahl von Geweben hat, darunter auch das Herz [85, 86]. In einem Ischämie-Reperusionsmodell konnten Buerke et al. [87] zeigen, dass vor der Ischämie appliziertes IGF-1 einen antiapoptotischen Effekt auf Kardiomyozyten hatte, was immunhistochemisch nachgewiesen wurde. Auch zeigten Ratten mit linksventrikulärer Hypertrophie eine verstärkte Expression von IGF-1 mRNA parallel zum Grad der Hypertrophie [88, 89]. Ferner wurde die Vermutung angestellt, IGF-1 könne eine *physiologische* Form der Hypertrophie begünstigen [90, 91]. So verursachte eine GH-Behandlung von infarzierten Ratten eine konzentrische myokardiale Hypertrophie, die kardiale Funktion verbesserte sich; hier war auf Myozytenebene jedoch die mRNA-Expression von IGF-1 nicht erhöht bei gleichzeitig erhöhten IGF-1 Serumspiegeln [90].

Im Northern-Blot konnten wir nun zeigen, dass Testosteron dosisabhängig zu einer erhöhten myokardialen IGF-1-mRNA-Expression führte. Diese Beobachtung legt nahe, dass IGF-1 bei der in unseren Versuchen beobachteten Form der testosteroninduzierten Hypertrophie eine wichtige Rolle spielt oder diese gar erklären könnte.

Die Rolle von Androgenen in Bezug auf die Expression von IGF-1 im Skelettmuskel wurde in der Literatur schon beschrieben; hier führte Hypogonadismus bei jungen Männern zu einer Abnahme von IGF-1 im Skelettmuskel [92]. Die Substitution von älteren Männern mit IGF-1 hingegen führte zu einer verstärkten IGF-1- mRNA-Expression in Muskelbiopsien [93]. Also könnten Skelett- und Herzmuskel auf eine ähnliche Art und Weise mit einer erhöhten lokalen IGF-1-Expression auf Testosteron antworten.

Zusammenfassend sei hier das durch Testosteron angeschaltete Hypertrophieprogramm dem der „overload“- Hypertrophie gegenübergestellt.

	<i>„overload“-Hypertrophie</i>	<i>Testosteron-Hypertrophie</i>
<i>ANP</i>	↑	↔
<i>α/β-MHC</i>	↓	↑
<i>IGF-1</i>	↔↑	↑
<i>Kollagen</i>	↑	↔

*Abbildung 25: Unterschiede in der Hypertrophie*

## 5.7. Echokardiographie und NMR

In den kernspintomographischen Untersuchungen zeigte sich nach Infarzierung keine Zunahme der enddiastolischen Wanddicken im Vergleich zu den scheininfarzierten Tieren. Dies steht im Widerspruch zu mehreren Studien, wo die Wanddicke der infarzierten Wände, also meist der Vorderwände, deutlich abnahm, während die Dicke der Hinterwand signifikant zunahm [22, 55, 76]. Auffällig ist, dass bei der infarzierten Gruppe die orchiektomierten Tiere eine signifikant niedrigere Wanddicke hatten im Vergleich zu den anderen beiden infarzierten Gruppen. Ein chronisches Androgendefizit zum Zeitpunkt eines Infarktes scheint hier also die Ausbildung einer kompensatorischen Hypertrophie nach Infarkt zu verringern.

Bei den systolischen und diastolischen linksventrikulären Diametern zeigte sich erwartungsgemäß, dass diese nach der Infarzierung generell anstiegen. Dieser Befund ist schon vielfach beschrieben worden [20, 55, 94, 95] und wird unter anderem darauf zurückgeführt, dass die kompensatorische postinfarzielle Hypertrophie den Wandstress nicht normalisieren kann und nun eine inadäquate Hypertrophie im Myokard vorliegt. Dieses wiederum würde in einer inadäquat hohen Nachlast resultieren und eine weitere Beeinträchtigung der systolischen Funktion im nichtinfarzierten Myokard verursachen [17].

Klinische Beobachtungen stehen in Widerspruch zu unseren tierexperimentellen Daten. So konnten Sachtleben et al. [96] zeigen, dass bei Bodybuildern, die eigenmächtig Androgene in anaboler Dosis einnahmen, es zu einer Vergrößerung der linksventrikulären Masse im Gegensatz zu normalen Sportlern kam; parallel dazu erhöhten sich auch die echokardiographisch bestimmten diastolischen linksventrikulären Diameter [96]. Eine testosteroninduzierte ventrikuläre Dilatation fand sich bei uns im Tierversuch nicht; jedoch ist eine solche Studie auch nur schwer auf unsere Experimente zu übertragen, da Bodybuilder meist mehrere Androgene missbrauchen, „Stacking“ betreiben und Androgene ja deutlich unterschiedliche Wirkungen am Myokard zeigen.

Auch eine tierexperimentelle Studie widerspricht unseren Ergebnissen. Hier reduzierten sich bei Ratten die Werte der relativen Wanddicke (RWT, d.h. dem Quotienten aus Wanddicke und Diameter) unter Nandrolondekanoat, nachdem bei den Tieren zuvor durch Training eine physiologische Hypertrophie mit verbesserter kardialer Funktion induziert worden war. Dieser Effekt war auf eine Vergrößerung der internen ventrikulären Diameter zurückzuführen. Hier wurden also durch eine anabole Androgengabe die positiven Effekte der physiologischen Hypertrophie und der erhöhten linksventrikulären Wanddicke reduziert [97].

Bei der Verkürzungsfraction (fractional shortening, FS) finden sich im Intragruppenvergleich keine Unterschiede. Beim Hund wurde beobachtet, dass sich die FS nach dem Infarkt progressiv mit dem Grad der Hypertrophie verbesserte, bei der Ratte hatte sich dieser Befund bisher noch nicht bestätigen lassen [98]. Auch bei Bodybuildern zeigte sich bei signifikanter myokardialer Hypertrophie keine Verbesserung der FS [96].

Bei dem Verhältnis zwischen frühdiastolischen Einstrom aufgrund der linksventrikulären Relaxation und spätdiastolischer Einstrom aufgrund der Vorhofkontraktion (E/A) konnten wir keine signifikanten Unterschiede zeigen. Nach einer Infarzierung spräche ein hoher Quotient aus E/A am ehesten für ein restriktives Füllungsverhalten des linken Ventrikels: die erhöhte E-Welle könnte aus einem

erhöhten linksatrialen Druck resultieren, was den frühen diastolischen Gradienten zwischen linkem Vorhof und Kammer betonen würde [55]. Hierdurch würde sich die Mitralklappe vorzeitig öffnen, und E würde einen großen Wert annehmen. Erhöhtes enddiastolisches Volumen und verminderte Compliance würden das restriktive Muster bei der linksventrikulären Füllung verstärken, wobei der ventrikuläre Druck bei kleinen Volumenerhöhungen rapide ansteige. Auf unsere Studie übertragen könnte man hypothetisieren, dass ein niedrigeres postinfarzielles E/A-Verhältnis mit einer weniger beeinträchtigten kardialen Funktion und ventrikulären Compliance einherginge; dieses deckt sich mit unserer Beobachtung eines erniedrigten linksventrikulären enddiastolischen Druck (LVEDP) bei den infarzierten, testosteronebehandelten Tieren.

Dieser Befund steht somit im Widerspruch zu Aussagen in der Literatur, nach denen das Verhältnis von E/A nach Infarzierung signifikant anstieg, was zeigt, dass hier der Beitrag der Vorhofkontraktion (A) weit verringert war [55, 99]. Ferner zeigte sich in einer Studie bei männlichen Ratten nach Infarzierung ein deutlich restriktiveres E/A-Verhältnis als bei weiblichen Ratten, was auf eine erhöhte Kammersteifigkeit bei beobachteter Hypertrophie der männlichen Herzen zurückgeführt wurde [20]. Jedoch war hier der Wandstress bei den Weibchen durch eine geringere Hypertrophie gemäß dem Laplace-Gesetz erhöht. Es blieb also die Frage offen, ob auf Dauer ein schlechteres E/A-Verhältnis der Männchen oder ein erhöhter Wandstress der Weibchen eine negativere Auswirkung hat. Cerisano et al. [100] konnten ferner zeigen, dass ein restriktives Füllungsmuster einen negativen prognostischen Indikator für das kardiale Remodeling darstellt .

In unserem Rattenmodell ließ sich aus den Ergebnissen für das E/A keine eindeutige Aussage über die kardiale Funktion treffen, die letztgenannten Studien weisen aber zumindest nicht auf eine nachteilige Veränderung von E/A in unserer Studie hin.

## 5.8. In-vivo-Hämodynamik und Langendorff-Perfusion

Acht Wochen nach der Infarzierung zeigte sich in-vivo eine signifikante Abnahme des linksventrikulären enddiastolischen Druckes (LVEDP), ein Parameter, der nach großen

Infarkten ansteigt [94]. Diese Veränderung war nicht hervorgerufen durch Veränderungen der systolischen Funktion oder der linksventrikulären enddiastolischen/endsystolischen Diameter. Auch war dieser Befund nicht durch einen diuretischen Effekt des Testosterons zu erklären, der die Vor- und Nachlast zugunsten eines niedrigeren ventrikulären Stresses vermindern könnte: zwischen Kalium, Natrium und Serumosmolalität fanden sich innerhalb der infarzierten Gruppen keine Unterschiede. Die kardiale Nachlast könnte auch durch IGF-1 beeinflusst werden. IGF-1 zeigte nämlich eine vaskuläre Wirkung beim Menschen und im Tierexperiment, wobei sich der periphere vaskuläre Widerstand NO-vermittelt verringerte [101, 102]. Eine andere Studie an Ratten zeigte, dass nach Infarzierung und IGF-1-Substitution der LVEDP signifikant im Vergleich zu den Kontrollen absank [91].

Auch unter Testosteron selbst sind vasodilatatorische Effekte beobachtet worden. So hatte beim Menschen eine kurzzeitige intracoronare Gabe von Testosteron schon in physiologischen Dosen einen dilatierenden Effekt auf Koronarien und erhöhte den Blutfluß; allerdings war dies eher ein akuter Effekt [13]. Eine ähnliche Beobachtung machten Rosano et al. [12], wo eine kurzfristige Gabe von Testosteron einen vorteilhaften Effekt auf die belastungsabhängige kardiale Ischämie bei KHK zeigte. Diese intracoronare Vasodilatation könnte auch positive Wirkungen haben, da so die Perfusion im infarktnahen Gebiet und somit die kardiale Leistung verbessert werden könnte. Allerdings zeigte sich in den eben genannten Studien nur ein akuter Effekt, über chronische Effekte einer Testosterongabe gibt es nach dem aktuellen Kenntnisstand keine Daten. In einer anderen Studie jedoch konnte gezeigt werden, dass 17 $\beta$ -Östradiol, Progesteron und Testosteron eine Abnahme des nach innen gerichteten Kalziumstromes in den glatten koronaren Muskelzellen von Schweinen induzieren und so eine Vasokonstriktion vermindern [103]; hier wurde mit deendothelialisierten Koronargefäßen gearbeitet und damit gezeigt, dass die Wirkung von Testosteron nicht ausschließlich NO-vermittelt ist. Da Testosteron undenkanoat auch mittels Aromatase zu Östradiol aromatisiert werden kann, könnte der Effekt auch durch Östrogene hervorgerufen werden. Hügel et al. [104] konnten bei weiblichen Ratten zeigen, dass ein akuter vasodilatatorischer Effekt von Östrogenen in erster Linie durch Blockade von Kalziumkanälen hervorgerufen wird; dieser Effekt war jedoch bei männlichen Ratten geringer ausgeprägt.



In Bezug auf Hypertrophie und LVEDP ist auch eine Studie von Litwin [17] interessant: er arbeitete hier mit TDGA, welches die Oxidation langkettiger Fettsäuren verhindert und so eine myokardiale Hypertrophie induziert. Nach Infarzierung solcher Tiere beobachtete er im Vergleich mit unbehandelten infarzierten Tieren, dass diese ebenfalls einen geringeren LVEDP bei signifikanter kardialer Hypertrophie hatten, wobei die kardiale Funktion (MAP, LVSP) bei behandelten Tieren besser war. Er schloß daraus, dass eine durch TDGA induzierte Hypertrophie eine übermäßige Dilatation des Herzens verhinderte, den Wandstress verminderte und so die reaktive Fibrose nach Myokardinfarkt unterband; letztendlich könnte so das pathologische Remodeling nach Myokardinfarkt aufgehalten und das Auftreten einer Herzinsuffizienz verzögert werden.

In der Langendorff-Hämodynamik lagen die infarzierten Tiere auf der Druck-Volumen-Kurve erwartungsgemäß signifikant unter den Tieren der Kontrollgruppen. Innerhalb der Infarktgruppen ergaben sich für die testosteronbehandelten Tiere keine signifikanten Unterschiede für die linksventrikuläre Druckentwicklung (LVDP), auch wenn ihre Druck-Volumenkurve leicht oberhalb der anderen infarzierten Tiere lagen.

## 5.9. Testosteron und kardiale Toxizität

Angesichts bis zu zehnfach erhöhter Serumtestosteronspiegel in unserem Modell ist zu überlegen, ob noch ein anderer Aspekt auf unsere Versuche zutrifft: die Toxizität von Androgenen, die in der Literatur immer wieder diskutiert wird. Behrendt et al. [105] beobachteten in Zellkulturen eine Größezunahme der Mitochondrien unter Einfluß von Methandrostenolon; diese Veränderungen an den Zellen waren ähnlich wie die bei Herzinsuffizienz. Sie zeigten entweder Desintegration und erweiterte Z-Banden oder eine komplette Auflösung der Sarkomere. Auch Melchert beobachtete, dass Androgene bei Myozyten in Zellkultur den Energiestoffwechsel, die Kontraktilität und so letztendlich die kardiale Funktion verschlechtern [106]. Jedoch muss auch hier berücksichtigt werden, dass es sich nicht um in-vivo-Studien sowie um verschiedene Androgenderivate handelte und natürlich auch die Dosis eine wichtige Rolle spielt.

Eine direkte Toxizität anaboler Dosen von Androgenen, wie sie bei Mensch und Tier in-vivo beschrieben worden ist [69], steht ebenfalls im Widerspruch zu unseren Beobachtungen, da sich die kardiale Funktion nicht verschlechtert und somit toxische Einflüsse unwahrscheinlich sind.

### 5.10. Einschränkungen

Einige Einschränkungen der Aussagekraft der vorliegenden Studie müssen berücksichtigt werden. So untersuchten wir nicht die Veränderungen, die Androgene auf die thrombotische Aktivität oder die Serumlipide ausüben. Diese stellen jedoch eigene Risikofaktoren der koronaren Herzkrankheit dar. Weiterhin ist die Wirkung von Testosteron über IGF-1 am Myokard zwar plausibel, jedoch molekularbiologisch nicht direkt nachgewiesen. Bei der Erklärung der Hypertrophie könnten auch noch andere Faktoren eine wichtige Rolle spielen, zumal Testosteron peripher zu Östrogenen aromatisiert wird. Auch die Serumöstrogene bei unseren Tieren waren erhöht, weswegen die kardialen Effekte das Ergebnis eines Zusammenspiels beider Sexualhormone sein könnten.

## 6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren wurden verstärkt die Auswirkungen von Androgenen auf das kardiovaskuläre System des Menschen untersucht, wobei das mögliche Wirkspektrum sowohl positive als auch negative Aspekte umfasst. Anzumerken ist jedoch, dass gerade negative Beobachtungen, wie der plötzliche Herztod von Bodybuildern nach Androgenmissbrauch, jeweils Einzelfalldarstellungen sind und klinische Studien hierzu fehlen. Epidemiologische Daten zeigen wiederum eine höhere Lebenserwartung von Männern nach Herzinfarkt im Vergleich zu Frauen. Es existieren jedoch keinerlei Angaben darüber, welchen Einfluss Androgene auf das kardiovaskuläre Remodeling nach einem Herzinfarkt haben.

Dazu wurden von uns männliche Wistar-Ratten entweder orchiektomiert (ORCH), nicht orchiektomiert (PLAC) oder aber mit supraphysiologischen Dosierungen von Testosteronundecanoat (TUD) intramuskulär behandelt. Vierzehn Tage später erfolgte entweder eine Infarzierung (MI) oder Scheininfarzierung (SHAM) dieser Tiere, acht Wochen danach die kernspintomographische, echokardiographische und hämodynamische Evaluierung der linksventrikulären Funktion. Ferner wurden molekularbiologische Marker wie ANP, MHC und IGF-1 untersucht, um so das kardiale Remodeling näher zu charakterisieren.

Bei den scheininfarzierten Tieren führte die Testosteronapplikation zu einer kardialen Hypertrophie (SHAM/TUD vs. SHAM/PLAC und SHAM/ORCH,  $p < 0,02$ ) ohne Erhöhung von ANP-mRNA. Der Quotient aus  $\alpha/\beta$ -MHC war nach Testosteronbehandlung durch verstärkte Expression von  $\alpha$ -MHC signifikant höher (SHAM/ORCH vs. SHAM/TUD,  $p < 0,05$ ). Als potentieller Mechanismus dieser Hypertrophieform war die Expression von IGF-1-mRNA fünffach erhöht (SHAM/PLAC und SHAM/ORCH vs. SHAM/TUD,  $p < 0,05$ ).

Nach Infarzierung war die Infarktgrösse mit durchschnittlich 38 % und auch die infarktassoziierte Mortalität mit ca. 60% zwischen den Gruppen vergleichbar. Bei der auf das Körpergewicht bezogenen linksventrikulären Masse führte Testosteron zu einer signifikant verstärkten Hypertrophie (MI/TUD vs. MI/PLAC und MI/ORCH

p<0,01), der linksventrikuläre enddiastolische Druck war unter Testosteronbehandlung niedriger (MI/TUD vs. MI/PLAC, 14±3 vs. 26±2 mmHg, p<0.02). Durch die Infarzierung erhöhte sich in allen Gruppen die Expression von ANP im Vergleich zu scheininfarzierten Tieren (SHAM vs. PLAC p<0,05), der Quotient aus  $\alpha/\beta$ -MHC unterschied sich trotz testosteroninduzierter Hypertrophie innerhalb der infarzierten Gruppen nicht. Keine Unterschiede zeigten sich auch im myokardialen Kollagengehalt (MI/PLAC vs. MI/TUD vs. MI/ORCH 16.8±8% vs. 16.6±5% vs. 19.0±11%, p=ns).

Chronische Testosteronbehandlung führte zu einer spezifischen kardialen Hypertrophie mit signifikanter Erhöhung des linksventrikulären Gewichtes, die nicht durch einen Anstieg von ANP als einem Marker der remodelinginduzierten Hypertrophie charakterisiert war. Ferner führte Testosteron zu einer verstärkten Expression der „schnellen“  $\alpha$ -MHC-Isoform, so dass der beim kardialen Remodeling sonst sinkende Quotient aus  $\alpha/\beta$ -MHC unter Testosteronbehandlung nicht beobachtet wurde. Möglicherweise sind diese Effekte auf eine erhöhte Expression von IGF-1-mRNA zurückzuführen. Bei gleichzeitig erniedrigtem LVEDP als einem wichtigen Prognosefaktor der Herzinsuffizienz kann eine physiologische Form der Hypertrophie hypothetisiert werden.

Testosteron scheint also am Herz ein spezifisches „physiologisches“ Hypertrophieprogramm zu induzieren, das die kardiale Funktion nach Myokardinfarkt möglicherweise langfristig positiv beeinflusst.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Barrett-Connor E, Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men; a perspective population based study. *Circulation*, 1988. 78: p. 539-545.
2. Phillips GB, Sex hormones, risk factors and cardiovascular disease. *Am J Med*, 1978. 65: p. 7-11.
3. Phillips GB, Relationship between serum sex hormones and glucose, insulin, and lipid abnormalities in men with myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1977. 74: p. 1729-1733.
4. Hulley S, Bush T, Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA*, 1998. 280: p. 605-613.
5. Rockhold RW, Cardiovascular toxicity of anabolic steroids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1993. 33: p. 497-520.
6. Nieschlag E, Handelsman DJ, Swerdloff RS, Wu FCW, Einer-Jensen N, Guidelines for the use of androgens. WHO Special Programme of Research Development and Research Training in Human Reproduction, 1992.
7. Corrado D, Nava A, Rossi L, Sudden death in young competitive athletes: clinicopathologic correlations in 22 cases. *Am J Med*, 1990. 89: p. 588-596.
8. Luke JL, Virmani R, Sample RH, Sudden cardiac death during exercise in a weight lifter using anabolic androgenic steroids: pathologic and toxicological findings. *J Forensic Sc*, 1990. 35(6): p. 1441-1447.

9. Ferrera PC, Verdile VP, Anabolic steroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. *Cardiology*, 1997. 88(2): p. 218-220.
10. van Kesteren PJ, Megens JA, Gooren LJ, Mortality and morbidity in transsexual subjects treated with cross-sex hormones. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 1997. 47(3): p. 337-342.
11. Zgliczynski S, Slowinska-Srzednicka J, Brzezinska A, Zgliczynski W, Soszynski P, Effect of testosterone replacement therapy on lipids and lipoproteins in hypogonadal and elderly men. *Atherosclerosis*, 1996. 121(1): p. 35-43.
12. Rosano GM, Pagnotta P, Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary heart disease. *Circulation*, 1999. 99(13): p. 1666-1670.
13. Webb CM, Hayward GS, Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation*, 1999. 100(16): p. 1690-1696.
14. Mc Gill HC, Buchanan JM, Sheridam PJ, The heart is target organ for androgens. *Science Wash DC*, 1980. 207: p. 755-777.
15. Krieg M, Bartsch W, Demonstration of a specific androgen receptor in rat heart muscle: relationship between binding, metabolism, and tissue level of androgens. *Endocrinol*, 1978. 103 (5): p. 1686-1694.
16. Grindlay Moore L, Effects of sex hormones on cardiovascular and hematologic responses to chronic hypoxia in rats. *Proc Soc Exp Biol Med*, 1978. 158: p. 658-662.

17. Litwin SE, Anderson PG, Inducion of myocardial hypertrophy after coronary ligation in rats decreases ventricular dilationand improves systolic function. *Circulation*, 1991. 84: p. 1819-1827.
18. Urhausen A, Kindermann W, One- and two-dimensional echocardiography in bodybuilders using anabolic steroids. *Eur J Appl Physiol*, 1989. 58: p. 633-640.
19. Ginzton LE, Rodrigues DM, Laks MM, Functional significance of hypertrophy of the noninfarcted myocardium after myocardial infarction in humans. *Circulation*, 1989. 80(4): p. 816-22.
20. Litwin SE, Litwin CM, Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling. *Cardiology*, 1999. 91: p. 173-183.
21. Hügel S, Strömer H, Winning J, Horn M, Dienesch C, Mora P, Schmidt HH, Allolio B, Neubauer S, Evidence against a role of physiological concentrations of estrogen in post-myocardial infarction remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 1999. 34(5): p. 1427-34.
22. Hügel S, Neubauer S, Chronic pharmacological estrogen therapy improves outcome after large myocardial infarction. unpublished data
23. Soonpaa J, Potential approaches for myocardial regeneration. *Ann NY Acad Sci*, 1995. 752: p. 446-454.
24. Beltrami AP, Kajstura J, Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New Engl J Med*, 2001. 344: p. 1750-1757.
25. Cleutjens JPM, The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res*, 1999. 44: p. 232-241.

26. Haunstetter A, Apoptosis: basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*, 1998. 82: p. 1111-1129.
27. Olivetti G, Quaini F, Apoptosis in the failing human heart. *New Engl J Med*, 1997. 336: p. 1131-1141.
28. Pelzer T, Neumann M, 17beta-estradiol prevents programmed cell death in cardiac myocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. 268(1): p. 192-200.
29. Sturk A, Aarden LA, Interleukin-6 release and the acute-phase reaction in patients with acute myocardial infarction: a pilot study. *J Lab Clin Med*, 1992. 119: p. 574-579.
30. Swynghedauw B, Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Am Physiol Soc*, 1999. 79(1): p. 215-262.
31. Cohn JN, Structural basis for heart failure: ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation*, 1991. 91: p. 2504-2507.
32. McKay RG, Pasternak RC, Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation*, 1986. 74: p. 693-702.
33. Schmidt RF, *Physiologie des Menschen*. Springer, 1997: p. 457-460.
34. Gerdes AM, Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Biol*, 1995. 27: p. 849-856.
35. Lompré AM, Myosin isoenzymes redistribution in chronic heart overloading. *Nature*, 1979. 282: p. 105-107.
36. Michel JB, Salzmänn JL, Hormonal and cardiac effects of converting enzyme inhibition in rat myocardial infarction. *Circ Res*, 1988. 62: p. 641-650.



37. Bouvagnet P, Pons F, Local changes in myosin types in diseased human atrial myocardium: a quantitative immunofluorescence study. *Circulation*, 1984. 72: p. 272-279.
38. Mercadier JJ, Menasche P, Alpha-myosin heavy chain isoform and atrial size in patients with various types of mitral valve dysfunction: a quantitative study. *Am Coll Cardiol*, 1987. 9(5): p. 1024-30.
39. Michel JB, Left ventricular remodeling following experimental myocardial infarction. *Eur Heart J*, 1995. 16: p. 49-57.
40. Feldman A, Silan MC, Selective gene expression in failing human heart. Quantification of steady-state levels of messenger RNA in endomyocardial biopsies using the polymerase chain reaction. *Circulation*, 1991. 83: p. 1866-1872.
41. Silver MA, Brilla CG, Reactive and reparative fibrillar collagen remodeling in the hypertrophied rat left ventricle: two experimental models of myocardial fibrosis. *Cardiovasc Res*, 1990. 24: p. 741-747.
42. Swynghedauw B, Charlemagne D, Cardiac hypertrophy, arrhythmogenicity and the new myocardial phenotype. *Cardiovasc Res*, 1997. 35: p. 6-12.
43. Zannad F, Angiotensin-converting enzyme inhibitor and spironolactone combination therapy. New objectives in congestive heart failure treatment. *Am J Cardiol*, 1993. 71: p. 34A-39A.
44. Eichborn EJ, Medical therapy can improve the biological properties of the chronically failing heart. A new era in the treatment of heart failure. *Circulation*, 1996. 94: p. 2285-2296.

45. Volterrani M, Manelli F, Cicoira MA, Lorusso R, Giordano A, Role of growth hormone in chronic heart failure: therapeutic implications. *Ital Heart J*, 2000. 1(11): p. 732-8.
46. Al-Obaidi MK, Alaghband-Zadeh J, Plasma insulin-like growth factor-1 elevated in mild-to-moderate but not severe heart failure. *Am Heart J*, 2001. 142(6): p. E10.
47. Behre HM, Oettel M, Huebler D, Nieschlag E, Intramuscular injection of testosterone undecanoate for the treatment of male hypogonadism: phase I studies. *Europ J Endocrinol*, 1999. 140: p. 414-419.
48. Nieschlag E, Eckardstein S, Repeated intramuscular injections of testosterone undecanoate for substitution therapy in hypogonadal men. *Clin Endocrin*, 1999. 51: p. 757-763.
49. Gill RK, Wronski TJ, Bell NH, Orchiectomy markedly reduces the concentration of the three isoforms of transforming growth factor beta in rat bone, and reduction is prevented by testosterone. *Endocrinology*, 1998. 139(2): p. 546-550.
50. Nieschlag E, Behre H, *Andrologie - Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Verlag, 2000: p. 316 ff.
51. Gaudron P, Schamberger R, Budin M, Walter B, Ertl G, Effect of endurance training early or late after coronary artery occlusion on left ventricular remodeling, hemodynamics and survival in rats with chronic transmural myocardial infarction. *Circulation*, 1994. 89: p. 402-412.
52. Pfeffer MA, Fletcher PJ, Spadaro J, Kloner RA, Braunwald E, Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res*, 1979. 44: p. 503-512.

53. Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E, Progressive ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol*, 1991. 260: p. 1406-1414.
54. Nahrendorf M, Frantz S, Hu K, Callies F, Effect of testosterone on post-myocardial infarction remodeling and function. *Cardiovasc Res*. 2003 Feb;57(2):370-8.
55. Litwin SE, Morgan JP, Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*, 1994. 89: p. 345-354.
56. De Simone G, Volpe M, Echocardiographic measurement of left ventricular mass and volume in normotensive and hypertensive rats: necropsy validation. *Am J Hypertension*, 1990. 3: p. 688-696.
57. Bittl J, Reaction rate of creatine kinase and ATP synthesis in the isolated rat heart. *J Biol Chem*, 1985. 260: p. 3512-3517.
58. Pfeffer MA, Ventricular remodeling after myocardial infarction. *Circulation*, 1990. 81: p. 1161-1172.
59. Basaria S, Hypogonadism and androgen replacement therapy in elderly men. *Am J Med*, 2001. 110: p. 563-72.
60. Wagner JA, Bauersachs J, Karcher J, Wiesler M, Goparaju SK, Kunos G, Ertl G, Endogenous cannabinoids mediate hypotension after experimental myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2001. 38(7): p. 2048-54.
61. Nahrendorf M, Hiller KH, Han H, Hu K, Waller C, Ruff J, Haase A, Ertl G, Bauer WR, In vivo assessment of cardiac remodeling after myocardial infarction in rats by cine-magnetic resonance imaging. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2000. 2(3): p. 171-80.

62. Demirovic J, McGovern PG, Sex differences in early mortality after acute myocardial infarction (The Minnesota Heart Survey). *Am J Cardiol*, 1995. 75(16): p. 1096-1101.
63. MacIntyre Kate, Capewell S, Gender differences and survival: a population-based study of 201, 114 men and women following a first acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 2001. 38: p. 729-735.
64. Vaccarino V, Nathan BS, Sex-based differences in early mortality after myocardial infarction. *N Engl J Med*, 1999. 341: p. 217-225.
65. Davis WM, Lin TL, Nandrolone decanoate reduces the premature mortality of cardiomyopathic hamsters. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1993. 81(1): p. 21-32.
66. Trifunovic B, Duffield M, Novel attributes of an androgenic steroid mediated increase in cardiac and diastolic stiffness in rats. *Can J Physiol Pharmacol*, 1998. 76: p. 657-664.
67. Marsh JD, Ritchie RH, Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*, 1998. 98: p. 256-261.
68. Dickerman RD, Zachariah NY, McConathy WJ, Left ventricular size and function in elite bodybuilders using anabolic steroids. *Clin J Sport Med*, 1997. 7(2): p. 90-93.
69. Sullivan ML, Gennis P, The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog in Cardiovasc Dis*, 1998. 41: p. 1-15.

70. Danhaive PA, Evidence of sex-dependent anabolic response to androgenic steroids mediated by the muscle glucocorticoid receptors in the rat. *J Steroid Biochem*, 1988. 29: p. 575-581.
71. Rubin SA, Compensatory hypertrophy in the heart after MI in the rat. *Am Coll Cardiol*, 1983. 1(6): p. 1435-1441.
72. Anversa P, Kikkawa Y, Myocardial infarction in rats: Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res*, 1986. 58: p. 26-37.
73. Gidh-Jain M, Jain P, Gick G, El-Sherif N, Alterations in cardiac gene expression during ventricular remodeling following experimental myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*, 1998. 30(3): p. 627-37.
74. Eberli FR, Ngoy S, Apstein CS, Colucci WS, Left-ventricular structural and functional remodeling in the mouse after myocardial infarction: assessment with the isovolumetrically-contracting Langendorff heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1998. 30(7): p. 1443-1447.
75. Yoshitomi Y, Kojima S, Kuramochi M, Takishita S, Kangawa K, Matsuo H, Plasma natriuretic peptides as indicators of left ventricular remodeling after myocardial infarction. *Int J Cardiol*, 1998. 64(2): p. 153-160.
76. Orenstein TL, Butany JW, Favorable left ventricular remodeling following large myocardial infarction by exercise training. *J Clin Invest*, 1995. 96: p. 858-866.
77. Schaible TF, Ciambone G, Scheuer J, The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. *Circ Res*, 1984. 54: p. 38-49.

78. Morano I, Ruegg JC, Ganten U, Ganten D, Vosberg HP, Regulation of myosin heavy chain expression in the hearts of hypertensive rats by testosterone. *Circ Res*, 1990. 66(6): p. 1585-90.
79. Lengsfeld M, Ganten U, Ganten D, Ruegg JC, Gonadectomy and hormonal replacement changes systolic blood pressure and ventricular myosin isoenzyme pattern of spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*, 1988. 63(6): p. 1090-1094.
80. Mercadier JJ, Wisnewsky C, Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, 1981. 49: p. 525-532.
81. Shapiro LM, Effect of training on left ventricular structure and function. An echocardiographic study. *Br Heart J*, 1983. 50(6): p. 534-539.
82. Scheuer J, Hirsch C, Capasso J, Schaible TF, Physiologic cardiac hypertrophy corrects contractile protein abnormalities associated with pathologic hypertrophy in rats. *J Clin Invest*, 1982. 70(6): p. 1300-5.
83. Woodiwiss AJ, Norton GR, Reduced cardiac stiffness following exercise is associated with preserved myocardial collagen characteristics in the rat. *Eur J Appl Physiol*, 1998. 78: p. 148-154.
84. Hobbs CJ, Rosen CJ, Adler R, Testosterone administration increases insulin-like growth factor-I levels in normal men. *J Clin Endocrinol Metab*, 1993. 77: p. 776-779.
85. Rubin SA, Malhotra A, Melmed S, Fishbein MC, Cardiac physiology, biochemistry and morphology in response to excess growth hormone in the rat. *Mol Cell Cardiol*, 1990. 22: p. 429-438.

86. Donohue TJ, Lango MN, Fliegner K, Lango RP, Benstein JA, Induction of myocardial insulin-like growth factor-I gene expression in left ventricular hypertrophy. *Circulation*, 1994. 89: p. 799-809.
87. Buerke M, Skurk C, Cardioprotective effect of insulin-like growth factor I in myocardial ischemia followed by reperfusion. *Physiology*, 1995. Vol 92: p. 8031-8035.
88. Guler HP, Scheiwiller E, Froesch ER, Recombinant human insulin-like growth factor I stimulates growth and has a distinct effects on organ size in hypophysectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988. 85: p. 4889-4893.
89. Clark RG, Carlsson LMS, Robinson ICAF, Insulin-like growth factor-1 and growth hormone (GH) have distinct and overlapping anabolic effects in GH-deficient rats. *Endocrine*, 1995. 3: p. 297-304.
90. Cittadini A, Napoli R, Katz SE, Strömer H, Smith RJ, Growth hormone attenuates early left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats with large myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1997. 29: p. 1109-1116.
91. Yang R, Gillet N, Clark R, Jin H, Growth hormone improves cardiac performance in experimental heart failure. *Circulation*, 1995. 92: p. 262-267.
92. Mauras N, Welch S, Testosterone deficiency in young men: marked alterations in whole body protein kinetics, strength, and adiposity. *J Clin Endocrinol Metab*, 1998. 83: p. 1886-92.
93. Urban RJ, Gilkison C, Testosterone administration to elderly men increases skeletal muscle strength and protein synthesis. *Am J Physiol*, 1995. 269: p. E820-6.

94. Olivetti G, Lagrasta C, Cellular basis of chronic ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Cardioscience*, 1995. 6(2): p. 101-106.
95. Omerovic E, Basetti M, Bioenergetic, functional and morphological consequences of postinfarct cardiac remodeling in the rat. *J Mol Cell Cardiol*, 1999. 31: p. 1685-1695.
96. Sachtleben TR, Elias BA, The effects of anabolic steroids on myocardial structure and cardiovascular fitness. *Med Sci Sports Exerc.*, 1993. 25: p. 1240-1245.
97. Woodiwiss AJ, Philippides M, Norton GR, Effects of an androgenic steroid on exercise-induced cardiac remodeling in rats. *J Appl Physiol*, 2000. 88(2): p. 409-415.
98. Solomon SD, Rayan M, Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in the rat. *J Card Failure*, 1999. 5(3): p. 213-223.
99. Greenberg B, Parmley WW, The influence of left ventricular filling pressure on on atrial contribution to cardiac output. *Am Heart J*, 1979. 98: p. 742-751.
100. Cerisano G, Carrabba N, Doppler-derived mitral deceleration time: an early strong predictor of left ventricular remodeling after reperfused anterior acute myocardial infarction. *Circulation*, 1999. 99: p. 230-236.
101. Tsukahara H, Tousehoff B, Gelato MC, Goligorsky MS, Direct demonstration of insulin-like growth factor-1-induced nitric oxide production by endothelial cells. *Kidney Int*, 1994. 45: p. 598-604.
102. Sakai K, Masaki H, Takeshita A, Intra-arterial infusion of insulin attenuates vasoreactivity in human forearm. *Hypertension*, 1993. 22: p. 67-73.



103. Murphy JG, Decreased  $[Ca^{2+}]_i$  during inhibition of coronary smooth muscle contraction by  $17\beta$ -estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther*, 1999. 291(1): p. 44-52.
104. Hügel S, Neubauer S, Lie SZ, Multiple mechanism are involved in the acute vasodilatory effect of  $17\beta$ -Estradiol in the isolated perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1999. 33(6): p. 852-858.
105. Behrendt H, Myocardial cell lesions caused by an anabolic hormone. *Cell Tissue Res*, 1977. 181(3): p. 423-426.
106. Melchert RB, Welder AA, The effect of anabolic-androgenic steroids on primary myocardial cell cultures. *Med Sci Sports Exerc*, 1992. 36(2): p. 75-90.

## Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht in:

Nahrendorf M, Frantz 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 Feb;57(2):370-8.

Callies F, Kollenkirchen 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 Jun;111(4):203-8.

## Danksagung

Herrn Professor Dr. med. B. Allolio danke ich für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats und seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Professor Dr. med. O. Elert und Priv.-Doz. Dr. med. J. Bauersachs danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Herrn Dr. med. F. Callies danke ich für die optimale Betreuung und seinen unermüdlichen Einsatz für die Doktoranden. Ferner danke ich Herrn Dr. S. Frantz für sein Engagement innerhalb dieses Projektes und Herrn Dr. K. Hu für die Hilfe bei den hämodynamischen Messungen.

Frau V. Jazbutyte und Herrn R. Kaiser möchte ich für die Durchführung der Teilerperimente "Myosin-Schwerketten" und "Kollagenmessung" danken.

Auch möchte ich mich herzlich bei Heidi Scheuermann, Helga Wagner sowie Charlotte Dienesch für ihre Hilfe und ihr Engagement bedanken.

# Lebenslauf

Name: Constantin von zur Mühlen

Geburtsdatum: 09. Juni 1977

Geburtsort: Hannover

Wohnsitz: Hauptstrasse 11a

79104 Freiburg

Tel.: 0172-5419367

constantin@muehlen.net

Eltern: Prof. Dr. med. Alexander von zur Mühlen, Internist/ Endokrinologe

Ulrike von zur Mühlen, geb. Warneke

Schulbildung: Grundschule: 1983-1987 Grundschule Wasserkamp, Hannover

Orientierungsstufe: 1987-1989 OS Birkenstrasse, Hannover

Gymnasium: Ratsgymnasium Hannover

Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium: 1997-2003 Julius-Maximilian-Universität Würzburg

März 1999 Physikum

März 2000 Erstes Staatsexamen

September 2002 Zweites Staatsexamen

November 2003 Drittes Staatsexamen

Praktisches Jahr:

Neurochirurgie: 10/02-2/03: Uniklinik Würzburg

Innere Medizin: 2/02-4/03: John Radcliffe Hospital, Oxford, UK

4/03-5/03: Medizinische Uniklinik Würzburg

Chirurgie: 6/03-7/03: Kantonsspital Basel, Schweiz

8/03: Chirurgische Uniklinik Würzburg

