

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

Die kardiale Wirkung einer chronisch-anabolen Gabe des Hormons Testosteron
auf das Remodeling nach Myokardinfarkt bei weiblichen Ratten-

Hinweise auf geschlechtsspezifische Effekte

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Barbara Weckler
aus Ellwangen/Jagst

Würzburg, August 2005

Referent: Prof. Dr. med. Bruno Allolio
Koreferent: Priv.-Doz. Dr. med. Matthias Spindler
Dekan: Professor Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 20.02.2006

Die Promovendin ist Ärztin

In Dankbarkeit meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
2.	GRUNDLAGEN	5
2.1.	Aufbau und Struktur des gesunden Herzens	5
2.2.	Der Wundheilungsprozess nach Myokardinfarkt.....	6
2.2.1.	Phase I: Zelltod.....	7
2.2.2.	Phase II: Entzündung.....	7
2.2.3.	Phase III: Granulationsgewebe.....	7
2.2.4.	Phase IV: Reparatur und Remodeling	8
2.3.	Physiologische Grundlagen des postinfarziellen Remodelings	9
2.4.	Zelluläre und molekulare Grundlagen des postinfarziellen Remodelings	11
3.	MATERIAL UND METHODIK	15
3.1.	Versuchstiere	15
3.2.	Versuchsablauf	15
3.3.	Versuchsgruppen	17
3.3.1.	Hormonelle Behandlung der Versuchsgruppen	17
3.3.1.1.	Östradiol-Gruppe (E2).....	18
3.3.1.2.	Testosteronundecanoat-Gruppe (T).....	19
3.3.1.3.	Testosteronundecanoat- und Östradiol-Gruppe (T/E2).....	20
3.3.2.	Operative Behandlung der Versuchsgruppen: Scheininfarzierung (S)/Infarzierung (MI)	20
3.3.3.	Gewährleistung und Überwachung konstanter Hormonspiegel	21
3.3.3.1.	Gewährleistung konstanter Hormonspiegel	21
3.3.3.2.	Überwachung konstanter Hormonspiegel	22
3.4.	Echokardiographie.....	23
3.5.	In-vivo-Hämodynamik	24
3.6.	Langendorff-Perfusion („isoliertes isovolumetrisches Herz“)	26
3.6.1.	Präparation des Herzens	26
3.6.2.	Messung der kardialen Funktion	28
3.7.	Anfertigung histologischer Schnitte des linken Ventrikels sowie deren Färbung und Planimetrie	29

3.8.	Molekularbiologische Methoden.....	31
3.8.1.	RNA-Isolierung	31
3.8.1.1.	Homogenisierung der Gewebeprobe.....	31
3.8.1.2.	Phasenseparation	31
3.8.1.3.	RNA-Präzipitation und Waschung.....	31
3.8.1.4.	RNA-Auflösung und Quantifizierung.....	32
3.8.1.5.	Sondensynthese für Northern-Blot.....	32
3.8.2.	IGF-1-Northern-Blot	33
3.8.2.1.	Agarose-Formaldehyd-Gel-Elektrophorese	33
3.8.2.2.	Crosslinking.....	34
3.8.2.3.	Prähybridisierung und Hybridisierung	34
3.8.3.	α/β -MHC-Messung.....	34
3.8.4.	Polarisationsmikroskopische Kollagenmessung	35
3.9.	Auswertung der Ergebnisse.....	35
3.9.1.	Einteilung der Infarktgruppen	35
3.9.2.	Beurteilung der Mortalität	36
3.9.3.	Statistische Auswertung der Versuchsdaten.....	36
4.	ERGEBNISSE.....	37
4.1.	Mortalitätsstatistik.....	37
4.2.	Charakteristika der einzelnen Versuchsgruppen	37
4.2.1.	Hormonserumspiegel.....	37
4.2.2.	Infarktgrößen	38
4.3.	Gewichte.....	39
4.3.1.	Körpergewichte	39
4.3.2.	Herzgewichte.....	40
4.3.3.	Nierengewichte.....	43
4.4.	Echokardiographie.....	45
4.5.	In-vivo-Hämodynamik	46
4.6.	Langendorff-Perfusion	47
4.7.	Planimetrie.....	49
4.8.	Molekularbiologische Untersuchungen.....	50
4.8.1.	α/β -MHC-Quotient	50
4.8.2.	IGF-1/GAPDH-Expression	51
4.8.3.	Kollagengehalt der Wand des linken Ventrikels.....	52

5.	DISKUSSION	53
5.1.	Mortalität der Infarktgruppen	53
5.2.	Körper-, Herz- und Nierengewichte	54
5.3.	Morphologie des linken Ventrikels	55
5.4.	Funktion des linken Ventrikels.....	57
5.5.	α/β -MHC-Quotient und Kollagen	57
5.6.	Geschlechtsspezifische Effekte von Testosteron	59
5.7.	Einschränkungen	64
6.	ZUSAMMENFASSUNG	65
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	67
8.	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	77

1. Einleitung und Fragestellung

Im Mittelpunkt dieser Studie steht der Effekt von Androgenen auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt.

Androgene wurden in der Vergangenheit häufig mit schädigenden Wirkungen auf das kardiovaskuläre System assoziiert, indem sie beispielsweise mit dem plötzlichen Herztod [1], dem Myokardinfarkt [2] und der dilatativen Kardiomyopathie [3-4] in Verbindung gebracht wurden. Die Aussagekraft dieser Studien ist jedoch dadurch eingeschränkt, dass es sich zumeist um Einzelfallberichte handelt. Zudem existieren keine placebokontrollierten Studien, die auf individuelle Eigenschaften (genetische Prädisposition, Alter, Ernährungs- und Trainingszustand) und auf Umweltfaktoren (Art des Androgenderivats, eiweißreiche Kost, gleichzeitige Einnahme anderer Hormonpräparate wie zum Beispiel Wachstums- oder Schilddrüsenhormone) eingehen. Darüber hinaus wurde in den meisten Studien keine Trennung nach dem Geschlecht durchgeführt, weshalb androgeninduzierte geschlechtsspezifische Effekte keine Berücksichtigung fanden.

Da die kardiovaskuläre Bedeutung der Androgene für den Mann bis heute nicht geklärt ist [5], wurden Untersuchungen an männlichen Ratten durchgeführt [6]. Diese ergaben neutrale bis positive Wirkungen einer chronisch-anabolen Gabe des Hormons Testosteron auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt, welche sich in einer spezifischen „physiologischen“ Form der kardialen Hypertrophie manifestierten. Diese war durch eine signifikante Zunahme des Quotienten aus Herz- und Körpergewicht charakterisiert, ohne dass die Testosteronbehandlung Einfluss auf die Expression des kardialen Hypertrophiemarkers ANP nahm, der auf eine chronische Überlastung des Herzens hinweist. Zudem war diese testosteroninduzierte „physiologische“ Hypertrophie bei männlichen Ratten als Ausdruck einer guten kardialen Leistungsfähigkeit mit einem Anstieg des alpha/beta-MHC-Quotienten verbunden und möglicherweise durch eine verstärkte Expression von IGF-1-mRNA vermittelt. Des Weiteren wurde an männlichen Ratten nachgewiesen [7], dass die chronisch-anabole Gabe von Testosteron nach globaler kardialer Ischämie zu einer verbesserten Erholungsfähigkeit des Herzens führt, die sich sowohl in einer signifikant höheren Druckamplitude als auch in einem signifikant erniedrigten enddiastolischen Druck des linken Ventrikels äußerte. Außerdem wurde der kardioprotektive Effekt einer Testosteronbehandlung

bei männlichen Ratten nach globaler kardialer Ischämie in einer verminderten intrazellulären Calciumüberladung des linken Ventrikels manifest, wobei in früheren Studien [8] belegt worden war, dass eine geringere intrazelluläre Konzentration an freiem Calcium mit einem reduzierten Ausmaß an ischämischen Myokardschäden einhergeht.

Somit existieren also Hinweise darauf, dass supraphysiologische Testosteronspiegel bei männlichen Ratten das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt nicht negativ beeinflussen, sondern vielmehr neutrale bis positive Wirkungen auf den Prozess des postinfarziellen Remodelings am Herzen entfalten.

Welche Rolle aber spielt eine Hyperandrogenämie beim weiblichen Geschlecht?

Ein pathophysiologisches Modell der weiblichen Hyperandrogenämie stellt das Syndrom der polyzystischen Ovarien (PCOS) dar. Es wurde bereits gezeigt, dass dieses Krankheitsbild mit einem 6-fach erhöhten Risiko für einen Diabetes mellitus Typ II, einem 3-fach erhöhten Hypertonierisiko und einem 7-fach gesteigerten Risiko für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit verbunden ist [9]. Zudem haben experimentelle Studien an weiblichen Affen eine positive Korrelation zwischen einer Hyperandrogenämie und der Entwicklung einer Atherosklerose [10] nachgewiesen, die konsekutiv zu einer Beeinträchtigung der endothelabhängigen vasodilatorischen Antwort führt. Dadurch werden die Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt verstärkt und es ist sogar belegt, dass das PCOS mit einer signifikant erhöhten Wahrscheinlichkeit für einen Myokardinfarkt assoziiert ist [11].

Wenn nun aber das Risiko für einen Myokardinfarkt beim weiblichen Geschlecht durch supraphysiologische Testosteronspiegel signifikant zunimmt, kommt der Kenntnis über die Androgenwirkung auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt beim weiblichen Geschlecht besondere Bedeutung zu, weil man therapeutischen Einfluss darauf nehmen könnte.

Zudem stellt sich die Frage, ob eine Hyperandrogenämie bei weiblichen Ratten ebenso wie bei männlichen Ratten neutrale bis positive Wirkungen auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt entfaltet oder ob es geschlechtsspezifische Effekte von Testosteron auf das postinfarzielle Remodeling gibt.

Bislang ist über die geschlechtsspezifischen Effekte von Testosteron bekannt, dass die Gabe von Testosteron bei männlichen Ratten nach Orchiektomie zu einer signifikant verminderten Zunahme des Körpergewichts [6, 12] gegenüber einer Behandlung mit Placebo führt,

während das Körpergewicht beim weiblichen Geschlecht unter supraphysiologischem Testosteroneinfluss signifikant zunimmt [12-13].

Des Weiteren zeigen sich geschlechtsspezifische Wirkungen von Testosteron auf den Stoffwechsel. So werden bei Männern mit erniedrigtem Testosteronserumspiegel erhöhte Nüchternblutzucker-, Triglycerid- und LDL-Serumkonzentrationen sowie geringere HDL-Konzentrationen beobachtet, wobei eine Testosteronbehandlung bei Männern zu einer Verbesserung des Glukosemetabolismus und des Lipidprofils führt [14]. Im Unterschied dazu induziert eine Hyperandrogenämie beispielsweise bei Frauen mit dem Syndrom der polyzystischen Ovarien (PCOS) eine Insulinresistenz und begünstigt konsekutiv eine diabetische Stoffwechsellage [9]. Außerdem führen supraphysiologische Androgenspiegel beim weiblichen Geschlecht zu einer Zunahme der Triglycerid- und LDL-Serumkonzentrationen und einer Abnahme der HDL-Konzentrationen im Blut.

An männlichen Kaninchen wurde nachgewiesen, dass ein Testosterondefizit nach Orchiektomie im Vergleich zu natürlicherweise im Blut vorherrschenden Testosteronspiegeln eine signifikant ausgeprägtere Atherosklerose der Aorta hervorruft, die durch die Therapie mit Testosteron abgemildert werden kann [15]. Dieser protektive Effekt von Testosteron auf das kardiovaskuläre System beim männlichen Geschlecht wurde durch Untersuchungen am Menschen gestützt, in denen ein Zusammenhang zwischen einem niedrigeren Testosteronserumspiegel und einer höheren Wahrscheinlichkeit für das Auftreten einer koronaren Herzkrankheit konstatiert wurde [16]. Untersuchungen an weiblichen Affen dagegen ergaben eine ungefähr doppelt so große Ausdehnung der Atherosklerose an den Koronararterien unter selektiver Testosterontherapie im Vergleich zur Placebobehandlung [10]. Dieser die Atherosklerose begünstigende Effekt von Testosteron im weiblichen Tiermodell wurde auch beim Menschen gezeigt, indem bei Frauen mit supraphysiologischen Testosteronserumkonzentrationen eine signifikant stärkere Ausprägung der koronaren Herzkrankheit nachgewiesen wurde [17].

Somit existieren Belege für geschlechtsspezifische Effekte von Testosteron. Dabei werden das Körpergewicht, der Metabolismus, das kardiovaskuläre System und konsekutiv die Risikofaktoren für einen Myokardinfarkt beim männlichen Geschlecht durch Testosteron in vorteilhafter Art und Weise beeinflusst, während sich beim weiblichen Geschlecht negative Effekte unter einer Testosterontherapie zeigen. Diese eben beschriebenen geschlechtsspezifischen Auswirkungen von Testosteron haben die Frage aufgeworfen, ob es

auch in Bezug auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt geschlechtsspezifische Effekte gibt.

Weil jedoch bis heute nur sehr wenig darüber bekannt ist, wie supraphysiologische Testosteronspiegel das postinfarzielle Remodeling beim weiblichen Geschlecht beeinflussen, ist das Ziel dieser Arbeit, die kardiale Wirkung einer chronisch-anabolen Gabe des Hormons Testosteron auf das Remodeling nach Myokardinfarkt bei weiblichen Ratten zu untersuchen.

2. Grundlagen

2.1. Aufbau und Struktur des gesunden Herzens

Den anteilmäßig größten Teil des Herzens bilden ausdifferenzierte Kardiomyozyten, über deren mögliche Regenerationsfähigkeit nach einem Herzinfarkt widersprüchliche Erkenntnisse existieren: So gibt es die Auffassung, Kardiomyozyten seien nicht zur Regeneration fähig [18], während andere Autoren [19] belegen konnten, dass Kardiomyozyten in der Umgebung des Infarkts in geringer Zahl wieder in einen Replikationszyklus eintreten könnten. Dabei besteht allerdings Unklarheit über die funktionelle und klinische Bedeutung. Als Hauptaufgabe kommt den Kardiomyozyten die koordinierte und rhythmische Kontraktion zu, um die suffiziente Blutversorgung des Körpers zu gewährleisten.

Kardiomyozyten sind in hexagonaler Anordnung von Kapillaren umgeben, die für die Sauerstoffversorgung und den Abtransport von Stoffwechselendprodukten zuständig sind.

Die extrazelluläre Matrix, deren Proteine von Myofibroblasten im Interstitium produziert werden, bildet das Grundgerüst des Herzens. Sie enthält Kollagen Typ IV als Bestandteil der die Kardiomyozyten umgebenden Basalmembran und die Kollagentypen I, III und VI, die in den Koronararterien sowie im Interstitium vorkommen. Insgesamt macht das Kollagen im Interstitium eines gesunden Herzens ungefähr 1-2% des Herzvolumens aus.

Die Myozyten, die Vaskularisierung und die extrazelluläre Matrix des Herzens sind wichtige Determinanten der kardialen Leistungsfähigkeit, für die außerdem das Adaptationsvermögen des Herzens an verschiedene Anforderungen eine herausragende Rolle spielt. Diesen Anpassungsmechanismen des Herzens im Rahmen des Wundheilungsprozesses nach Myokardinfarkt kommt ein besonderer Stellenwert beim postinfarziellen Remodeling zu.

2.2. Der Wundheilungsprozess nach Myokardinfarkt

Durch Okklusion eines Koronargefäßes wird ein Myokardinfarkt induziert, der Folge der Ischämie und der metabolischen Minderversorgung sowie des anschließenden Untergangs des nachfolgenden Gewebes ist. Die strukturellen postinfarziellen Veränderungen des Herzens sind allerdings nicht nur auf das eigentliche Infarktareal beschränkt, sondern umfassen zugleich Adaptationsmechanismen des nicht-infarzierten Myokards und des Interstitiums (Remodeling).

Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass neben dem nicht-infarzierten Herzgewebe auch das eigentliche Infarktareal einen wichtigen Angriffspunkt therapeutischer Bemühungen darstellt und keineswegs nur leblosem Gewebe entspricht [20].

Größtenteils ereignet sich der postinfarzielle Wundheilungsprozess am Herz in Analogie zu dem anderer Gewebe, zusätzlich gibt es aber einige Besonderheiten: Wie bereits im vorigen Kapitel dargestellt, haben Kardiomyozyten überwiegend ihre Teilungs- und Regenerationsfähigkeit verloren. So nehmen Faktoren zur Regulierung und Beeinflussung der Zellregeneration in ihrer Bedeutung ab, während der Bildung eines Granulationsgewebes eine wesentliche Rolle zukommt. Ein weiterer Unterschied ist durch die rhythmischen Kontraktionen des Myokards bedingt, die einen ständig wiederkehrenden Zug auf das Wundgebiet ausüben.

Im Folgenden werden vier Phasen des Wundheilungsprozesses unterschieden:

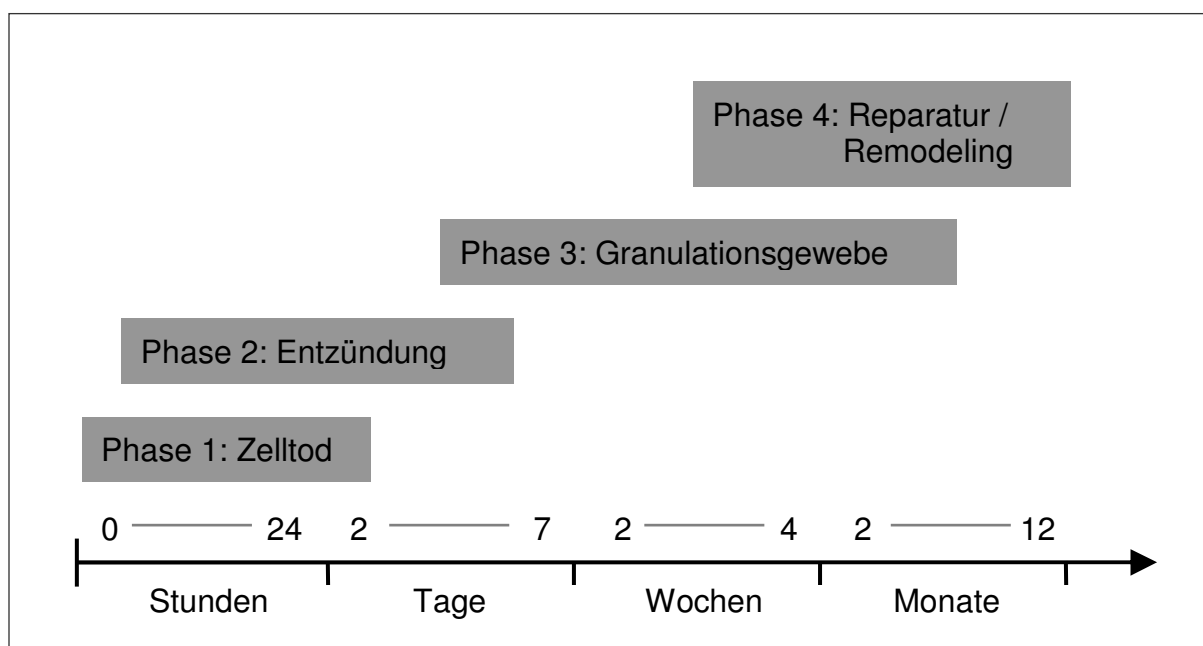


Abb. 1: Phasen nach einem Myokardinfarkt [20]

2.2.1. Phase I: Zelltod

In dieser Phase kommt es zum Myozytenuntergang, für den die Freisetzung von Troponin T, Creatinkinase des Muskel-Gehirn-Typs (CK-MB) und Serum-Glutamat-Oxalazetat-Transaminase (S-GOT) kennzeichnend ist. Die Erhöhung dieser Parameter im Plasma gilt als diagnostischer Beleg für den Myozytentod, der durch Apoptose oder Nekrose [21][22] hervorgerufen wird. Als Hauptursache für den Myozytenuntergang gilt die Apoptose, deren Maximum ungefähr 6-8h nach Infarkt erreicht wird. Im Zeitraum zwischen 12 Stunden und 4 Tagen nach Infarkt vollzieht sich die Nekrose der Myozyten, wodurch eine frühe Entzündungsreaktion hervorgerufen und die Phase II des Wundheilungsprozesses eingeleitet wird.

2.2.2. Phase II: Entzündung

Aktivierung des Komplementsystems und Freisetzung der Interleukine IL-6 und IL-8 innerhalb von 12-16 h nach Infarkt sind Charakteristika dieser Entzündungsreaktion und stellen frühe Marker des Myozytenuntergangs [23] dar, die einen Ansatzpunkt für therapeutische Interventionen in der Zukunft bieten könnten.

Neutrophile Granulozyten immigrieren in das Infarktareal und sind an der Beseitigung der untergegangenen Myozyten durch Phagozytose beteiligt, gefolgt von Lymphozyten, Plasmazellen und Makrophagen.

2.2.3. Phase III: Granulationsgewebe

Zwei bis drei Tage nach Infarkt werden zunächst in der Grenzzone zwischen infarziertem und nicht-infarziertem Gewebe und später auch im zentralen Infarktbereich neu gebildete Matrixproteine wie beispielsweise Fibronectin abgelagert, wodurch die Zugfestigkeit des geschädigten Infarktareals erhöht und einer Herzwandruptur vorgebeugt wird. Myofibroblasten wandern ein und produzieren interstitielles Kollagen, wobei vorwiegend Kollagen Typ III und in etwas geringeren Mengen Kollagen Typ I gebildet wird. Die Folge dieser Kollagenbildung ist die Stabilisierung und Festigung der geschädigten Herzwand. Daneben wird in der ersten Woche nach Infarkt zugleich die kollagenolytische Aktivität der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) gesteigert, die interstitielles Kollagen spalten [24-25] und dadurch zum Abbau von Kollagen beitragen. Nach ungefähr zwei bis drei Wochen stellt sich

ein Gleichgewicht im Kollagenstoffwechsel ein, und ein relativ stabiles, noch nicht vollständig verknüpftes Kollagennetzwerk entsteht.

Außerdem kennzeichnend für das Granulationsgewebe ist die forcierte Vaskularisierung durch Angiogeneese - ein Prozess, der über eine Steigerung der Durchblutung sehr effizient zu einer Verbesserung der metabolischen Situation im Wundheilungsgebiet führt.

2.2.4. Phase IV: Reparatur und Remodeling

Diese vierte Phase im Wundheilungsprozess wird mit der Abwanderung der Entzündungszellen aus dem Infarktareal eingeleitet und ist durch die Bildung eines Narbengewebes mit kompletter Vernetzung der Kollagenfibrillen charakterisiert.

Die infarktbedingten Umbauvorgänge des Herzens werden in ihrer Gesamtheit als kardiales Remodeling (CR) bezeichnet. Man versteht darunter postinfarzielle Veränderungen, die Folge einer Neuordnung normal existierender Herzstrukturen sind. Das kardiale Remodeling ist das Ergebnis einer Expansion akinetisch-dyskinetischer Segmente und einer Volumenbelastung des Herzens mit Hypertrophie nichtinfarzierter Segmente [26]. Es wird durch mechanische Überlastung nach kardialer Schädigung verstärkt und führt vorrangig im Infarktbereich zum Zelluntergang, zur Hypertrophie der Myozyten des nichtinfarzierten Herzareals, zur Dilatation des Ventrikels und zur interstitiellen Fibrose. Dabei besitzen verschiedene Faktoren wie Ischämie, vasoaktive Peptide und Hormone einen modifizierenden Einfluss, so dass das postinfarzielle Remodeling des Herzens ein sehr komplexer dynamischer Vorgang ist.

2.3. Physiologische Grundlagen des postinfarziellen Remodelings

Das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt ist assoziiert mit einer Zunahme der linksventrikulären Masse und einer Dilatation des linken Ventrikels [27]. In der Frühphase nach Myokardinfarkt wird eine akute Ausdehnung des infarzierten Gebiets beobachtet, die nicht mit einer zusätzlichen Myokardnekrose begründet werden kann, sondern vielmehr durch den Untergang und das Auseinanderrücken („side to side slippage“) der Myozyten verursacht wird. In der Folge kommt es am linken Ventrikel neben einer Verringerung der Myozytenzahl zur Gefügedilatation und Beeinträchtigung der systolischen Funktion mit Reduktion des Schlagvolumens, woraus eine Erhöhung des enddiastolischen Füllungsdruckes (LVEDP) verbunden mit einer Zunahme des enddiastolischen Wandstress und einer Ausdünnung der Herzwände resultiert (siehe Abb.2: Pathophysiologie des kardialen Remodelings [28]).

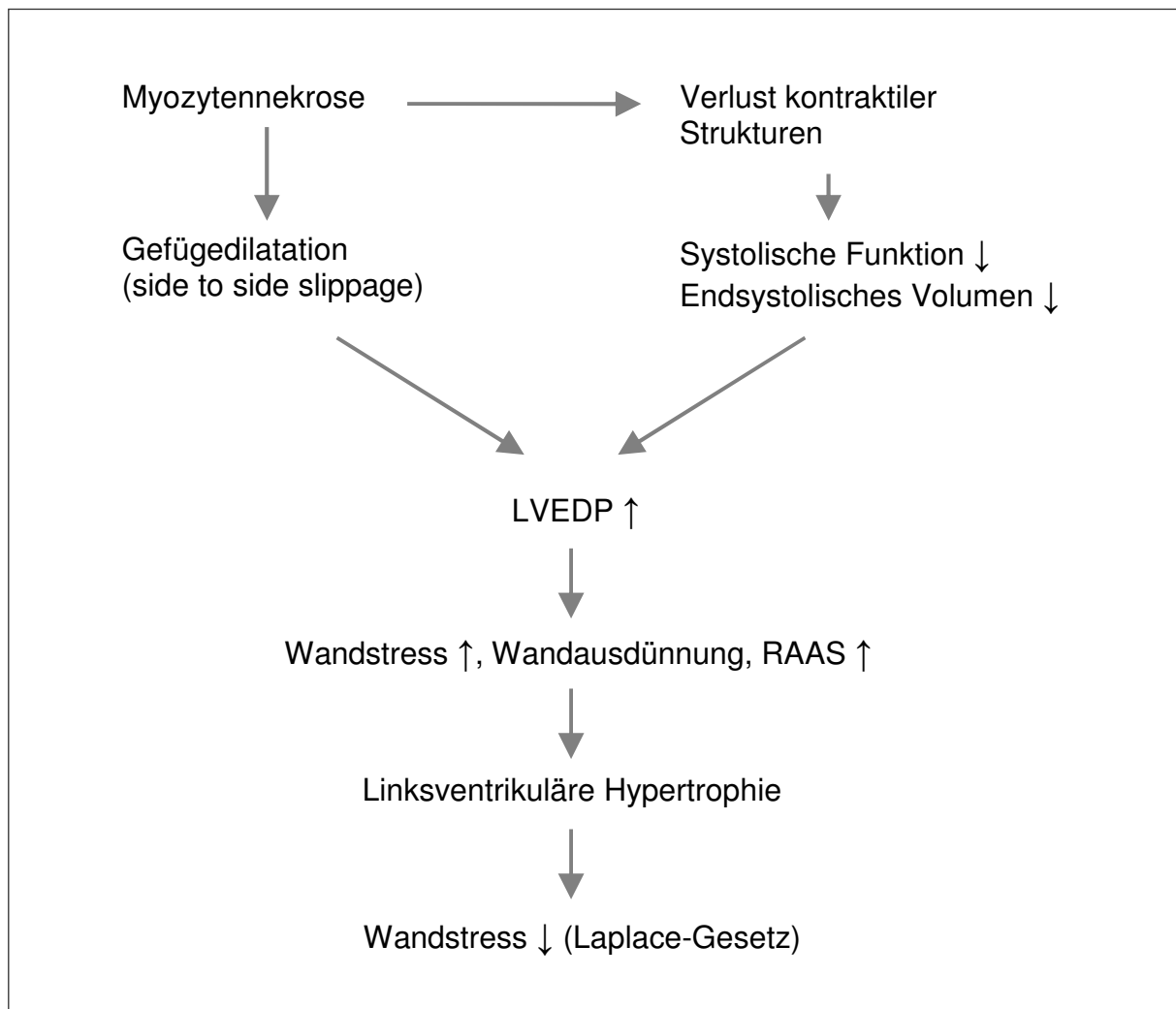


Abb. 2: Pathophysiologie des kardialen Remodelings [28]

Aufgrund des erniedrigten Schlagvolumens nach Infarkt wird über einen Feedback-Mechanismus das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) aktiviert. Dieses bewirkt durch die natriumretinierende Wirkung von Aldosteron eine Vergrößerung des intravasalen Flüssigkeitsvolumens im Körper und zieht aufgrund der Steigerung des Sympathikus sowohl eine Vasokonstriktion mit Erhöhung des peripheren Widerstandes als auch eine Zunahme der Herzfrequenz mit Anstieg des kardialen Sauerstoffbedarfs nach sich. Der physiologische Sinn dieses Regelkreislaufes besteht darin, eine vermehrte enddiastolische Füllung des linken Ventrikels zu erreichen, die mit einer Erhöhung der Vorlast korreliert. Auf diese Weise reagiert das Herz innerhalb eines gewissen Bereichs gemäß dem „Frank-Starling-Mechanismus“ automatisch mit einer Steigerung des Schlagvolumens, die der vorübergehenden Kompensation der systolischen Dysfunktion des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt dient. Grundlage dieses Vorgangs ist die bei Vorlasterhöhung durch Dehnung des Myokards heraufgesetzte Kalzium-Empfindlichkeit der kontraktilen Proteine, die direkt eine verbesserte Kontraktilität zur Folge hat. Zusätzlich wird die Kontraktionsfähigkeit dadurch gesteigert, dass bei Dehnung der Sarkomere die effektive Überlappung der Myofibrillen größer wird. Der „Frank-Starling-Mechanismus“ kann im Druck-Volumen-Diagramm des linken Ventrikels anschaulich gemacht werden, wobei eine Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurve eine Dilatation anzeigt, während eine Abwärtsverschiebung entlang der X-Achse auf eine Einschränkung der systolischen Funktion hinweist. Unter physiologischen Bedingungen ist der Frank-Starling-Mechanismus zum Beispiel für die Bewältigung eines vermehrten venösen Rückflusses zum rechten Herzen, wie er beispielsweise bei Beinhoch-Lage auftritt, oder für die Feinabstimmung der Schlagvolumina des rechten und linken Ventrikels verantwortlich.

Allerdings wird durch die Induktion des RAAS zugleich die Nachlast erhöht, welche letztlich die Auswurfleistung des Herzens behindert und dadurch in Richtung einer Erhöhung des Wandstress wirkt. Der kardiale Adaptationsmechanismus besteht in einer Hypertrophie des nicht infarzierten Herzgewebes mit dem Ziel, den Wandstress entsprechend dem Laplace'schen Gesetz zu reduzieren bzw. normalisieren. Nach diesem Gesetz wird der Wandstress verringert, wenn der Ventrikelradius ab- bzw. die Wanddicke zunimmt. Daraus folgt, dass kleinere Herzen mit einer relativ dicken Wand, wie sie beispielsweise im Rahmen einer konzentrischen Hypertrophie bei arterieller Hypertonie vorkommen, bei gleichem Füllungsdruck einem geringeren Wandstress ausgesetzt sind als große dilatierte Herzen.

Klinisch relevante Komplikationen nach großen Infarkten und dekompensiertem Wandstress sind Herzwandaneurysmen und -rupturen mit häufig letalem Ausgang.

2.4. Zelluläre und molekulare Grundlagen des postinfarziellen Remodelings

Die zellulär-molekulare Basis des kardialen Remodelings besteht aus Hypertrophie der Kardiomyozyten sowie aus Hyperplasie und Wachstum der Zellen im Interstitium, zu denen beispielsweise die Fibroblasten und Endothelzellen gehören. Die Kardiomyozytenhypertrophie stellt dabei das Ergebnis einer parallelen Anordnung neu synthetisierter Sarkomere [29] dar, während die Dilatation des linken Ventrikels aus einer längs gerichteten Aneinanderreihung neuer Sarkomere mit konsekutiver Zunahme des Myozytendurchmessers resultiert. Dieses Phänomen der Myozytenverlängerung wird bei Ratten ebenfalls in den ersten zwei bis sechs postpartalen Tagen beobachtet. Es weist darauf hin, dass beim kardialen Remodeling beispielsweise nach Infarkt ein „fetales Programm“ induziert wird, das sowohl die Reexpression als auch die verminderte Expression spezifischer Gene beinhaltet:

Reexprimierte Gene	Verminderte Genexpression
β -myosin-heavy-chains (β -MHC)	Myoglobin
Ventrikuläre Expression von ANP	Kalzium-ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA)
Wechsel von Fettsäureoxidation zu Glykolyse	β 1-adrenerger Rezeptor
α 3-Subunit der Na/K-ATPase	M2-muscarinerge Rezeptoren

Abb. 3: „Fetales Programm“ beim kardialen Remodeling [26]

Im Rahmen dieses „fetalen Programms“ erfolgt beispielsweise eine Veränderung im Expressionsmuster des Myosinmoleküls, das zu den kontraktilen Proteinen gehört. Myosin setzt sich aus zwei unterschiedlichen Teilen der Myosin Light Chains (MLC) und der Myosin Heavy Chains (MHC) zusammen, an deren kugelförmigem Kopf die Myosin-ATPase mit der Fähigkeit zur ATP-Abspaltung lokalisiert ist. Die Aktivität dieser Myosin-ATPase kann durch Hormone wie beispielsweise Thyroxin, Insulin, Katecholamine und Testosteron modifiziert werden, wobei eine gesteigerte Myosin-ATPase-Aktivität mit einer schnelleren Kontraktionsgeschwindigkeit des Herzens verbunden ist.

Am Herz der Ratte gibt es die drei Myosin-Isoformen V1, V2 und V3, welche zwar die gleichen MLCs besitzen, sich aber in ihrer MHC-Zusammensetzung unterscheiden: $\alpha\alpha$ in V1 (α -MHC), $\alpha\beta$ in V2 und $\beta\beta$ in V3 (β -MHC). Im Folgenden werden lediglich die α -MHC- und die β -MHC-Isoform berücksichtigt.

Die α -MHC-Isoform besitzt eine sehr hohe Leistungsfähigkeit und ist in der Lage, sich aufgrund ihrer stark ausgeprägten ATP-ase-Aktivität mit großer Maximalgeschwindigkeit unter hohem Energieverbrauch zu kontrahieren. Im Unterschied dazu arbeitet die β -MHC-Isoform auf energetisch niedrigerem Niveau mit im Vergleich zur α -MHC-Isoform entsprechend niedrigerer Geschwindigkeit.

Beim kardialen Remodeling beispielsweise nach Infarkt kommt es bei der Ratte auf Transkriptionsebene [30] zu einer verminderten Expression der für die α -MHC-Isoform kodierenden Gene und zu einer Hochregulierung der Expression der β -MHC-Isoform. Dieser Switch von der α -MHC- zur β -MHC-Isoform wird als kardialer Adaptationsvorgang an chronische mechanische Überlastung verstanden und gilt zugleich als etablierter genereller Hypertrophiemarker [31].

Dieser eben beschriebene Expressionswechsel von der α -MHC- zugunsten der β -MHC-Isoform findet am Rattenherz bereits innerhalb von zwei Stunden nach Beginn der kardialen Überlastung statt [32] und ist durch die Behandlung mit ACE-Hemmern reversibel [33]. Er spielt bei der Ratte im Vergleich zum humanen Herz eine größere Rolle, weil dort die α -MHC-Isoform etwa 70% des Gesamtmyosins ausmacht, wohingegen beim menschlichen Herz der relative Anteil der α -MHC-Isoform geringer ist. Aber auch hier erfolgt bei entsprechendem Reiz ein Wechsel von der α -MHC- zur β -MHC-Isoform [34].

Studien bei verschiedenen Säugetierarten haben gezeigt, dass die Muskulatur des Atriums eine schnellere Kontraktionsfähigkeit als die Ventrikelmuskulatur besitzt. Dieser Sachverhalt kann zumindest partiell auf den anteilmäßig viel größeren prozentualen Gehalt an α -MHC im Vorhof zurückgeführt werden. Auch beim atrialen Remodeling findet im Gefolge einer kardialen Schädigung entsprechend den ventrikulären Adaptationsvorgängen ein Wechsel der α -MHC- zur β -MHC-Isoform statt, der sich in einer Vorhofdilatation manifestiert und dadurch echokardiographisch auch beim Menschen nachgewiesen werden konnte [35].

Nach kardialer Schädigung wird außerdem das atriale natriuretische Peptid (ANP) im linken Ventrikel verschiedener Säugetierspezies exprimiert [36, 37], das unter physiologischen Bedingungen lediglich im Vorhof zu finden ist.

Beim Menschen wurde der Zusammenhang zwischen der ANP-Expression des linken Ventrikels nach einem Infarkt ereignis [38] und dem kardialen Remodeling [39] ebenfalls wissenschaftlich belegt, wobei ANP ebenfalls als kardialer Hypertrophiemarker gilt und auf eine chronische Überlastung des Herzens hinweist.

In Untersuchungen am Herz der Ratte und auch des Menschen [40] wurde belegt, dass es postinfarziell sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene zu einer verminderten Konzentration an Myoglobin kommt. Dieses spielt eine bedeutende Rolle bei der Versorgung des Myokards mit Sauerstoff und stellt damit einen limitierenden Faktor bei der Deckung des kardialen Energiebedarfs dar.

Darüber hinaus wird beim kardialen Remodeling von Ratten die Enzymexpression so modifiziert, dass sich eine Veränderung im Energiestoffwechsel ergibt. Dabei wird die Expression der Enzyme für die Fettsäureoxidation verringert, wohingegen die Enzyme für die Glykolyse [41] verstärkt exprimiert werden und der kardiale Metabolismus verstärkt auf Glukosestoffwechsel umgeschaltet wird.

Ferner konnte am Kaninchenventrikel nachgewiesen werden, dass nach kardialer Schädigung die Calcium-ATPasen des sarkoplasmatischen Retikulums (SERCA) dezimiert [42] werden. Die erniedrigte Konzentration der SERCAs ist kennzeichnend für eine chronische Überlastung des Herzens und zieht im weiteren Verlauf eine verminderte Calciumwiederaufnahme in das sarkoplasmatische Retikulums nach sich. Die Konsequenz ist ein Anstieg der intrazellulären freien Calciumkonzentration, die unter anderem über die Bildung von Radikalen zur Schädigung des Herzens beiträgt.

Außerdem wird die Calciumhomöostase durch den $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauscher und die Na^+/K^+ -ATPase der Zellmembran reguliert, wobei die erste für den Calciumausstrom der Zelle verantwortlich ist und im Rahmen des kardialen Remodelings hoch reguliert wird [43], während die zweite die dabei notwendige niedrige Natrium- und hohe Kaliumkonzentration innerhalb des Intrazellulärraumes aufrecht erhält. Am humanen Herzen wurde nachgewiesen, dass sich bei kardialer Dekompensation ein Wechsel der Isoformen der Na^+/K^+ -ATPase von der $\alpha 1$ - zur $\alpha 3$ -Isoform ereignet. Daraus resultiert eine schwächere Natriumaffinität [44] mit konsekutiv herabgesetzter Funktion der Na^+/K^+ -ATPase, wodurch die Aktivität des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ -Austauschers beeinträchtigt und die cytosolische Calciumüberladung mit ihren schädigenden Auswirkungen auf die Zelle unterstützt wird.

Daneben kommt es zu einer Down-Regulation der β_1 -adrenergen Rezeptoren - ein Vorgang, der hauptsächlich durch den bei kardialer Dekompensierung nach Infarkt vorherrschenden erhöhten Katecholaminspiegel verursacht wird.

Ebenfalls vermindert werden am Rattenventrikel die Anzahl der muscarinergen Rezeptoren und deren m-RNA [45], so dass das Verhältnis der muskarinergen zu den β_1 -adrenergen Rezeptoren unverändert bleibt. Man nimmt daher an, die verringerte Expression sowohl der muskarinergen als auch der β_1 -adrenergen Rezeptoren erfolge in kompensatorischer Art und Weise.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass das Herz durch die Re-Expression des „fetalen Programms“ im Rahmen des postinfarziellen Remodelings in die Lage versetzt wird, auf einem energetisch günstigeren, zugleich aber auch „primitiveren“ Level zu arbeiten. Die einzelne Muskelfaser vermag dabei mehr Arbeit pro Molekül ATP zu leisten, wodurch der kardiale Energiebedarf reduziert und die Ermüdungsresistenz des Herzens verbessert wird. Das nicht infarzierte Herzgewebe soll so die Fähigkeit erlangen, möglichst lange den angestiegenen Anforderungen nach einer kardialen Schädigung gerecht zu werden und den Funktionsausfall des infarzierten Areals zu kompensieren. Dies gelingt in den meisten Fällen allerdings nicht vollständig, sondern ist mit einer Verminderung des kardialen Leistungsvermögens assoziiert, die im langfristigen Verlauf oder bei weiterer Schädigung zur terminalen Herzinsuffizienz führen kann.

3. Material und Methodik

3.1. Versuchstiere

Die Versuche wurden an weiblichen Wistar-Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland; Tierversuchs-Genehmigungsnummer 621-2531.01-75/98) durchgeführt, welche sich bei Versuchsbeginn in postpubertärem Zustand befanden und durchschnittlich zwischen 180 und 200 Gramm wogen. Die Tiere waren während des Versuchszeitraums in einem klimatisierten Tierstall untergebracht, in dem die Temperatur 22°C und die Luftfeuchtigkeit 50-60% betrug. Sie unterlagen einem zwölfstündigen Tag/Nacht-Rhythmus, wurden jeweils zu fünf in Käfigen gehalten und bekamen sowohl Trockenfutter (Altromin GmbH, D-32791 Lage) als auch Wasser ad libitum.

Alle Versuche erfolgten entsprechend der „Position of the American Heart Association (AHA) on research animal use“.

3.2. Versuchsablauf

Die einzelnen Versuchsschritte erstreckten sich über einen elfwöchigen Zeitraum, dessen Beginn in Woche 0 mit einer Ovariectomie (OVX) und einer sich direkt anschließenden Östradiol- (E2) bzw. Testosteronundecanoatbehandlung (T) entsprechend der Gruppenzugehörigkeit der Tiere (s. Abb. 5: Versuchsgruppeneinteilung) eingeleitet wurde. Auf die Scheininfarzierung (S) bzw. Infarzierung (MI) der Woche 2 folgten in Woche 4 die Blutentnahme zur Bestimmung der Hormonspiegel im Serum sowie die erneute Applikation von T, die in Woche 8 wiederholt wurde. Nach der Echokardiographie der Woche 10 wurden in Woche 11 die Messung der In-vivo-Hämodynamik, eine postmortale Blutentnahme und die Langendorff-Perfusion vorgenommen, an die sich die histologische Aufarbeitung sowie planimetrische und molekularbiologische Untersuchungen der Herzen anschlossen.

Das Ziel der nachstehenden Abbildung besteht darin, einen graphischen Überblick über den eben beschriebenen zeitlichen Rahmen der Versuche zu geben:

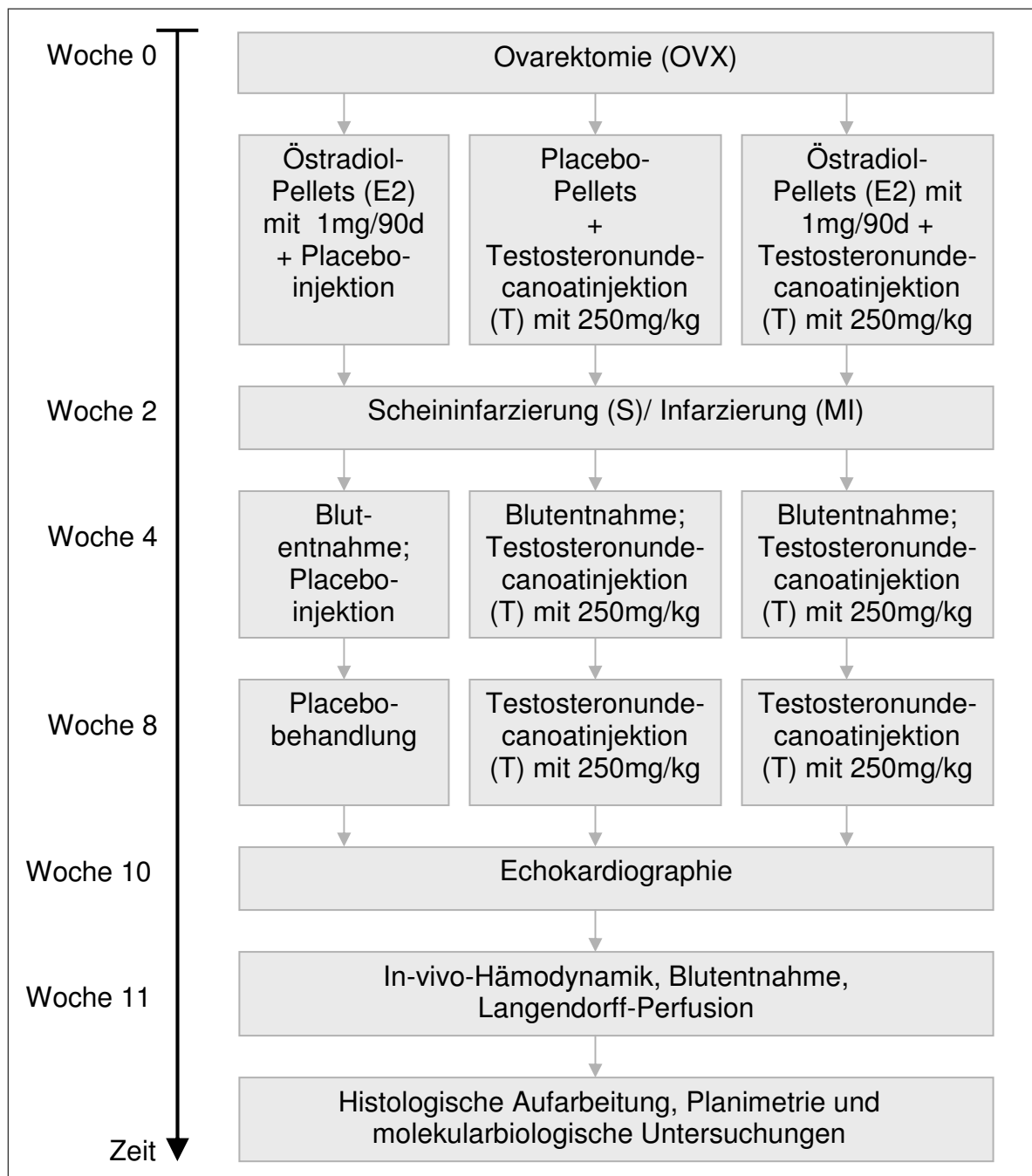


Abb. 4: Versuchsablauf

3.3. Versuchsgruppen

In Abhängigkeit von der hormonellen Vorbehandlung wurden die Tiere randomisiert 3 Gruppen zugeordnet, in denen jeweils zur Hälfte eine Scheininfarzierung (S) bzw. Infarzierung (MI) durchgeführt wurde, so dass 6 Versuchsgruppen entstanden.

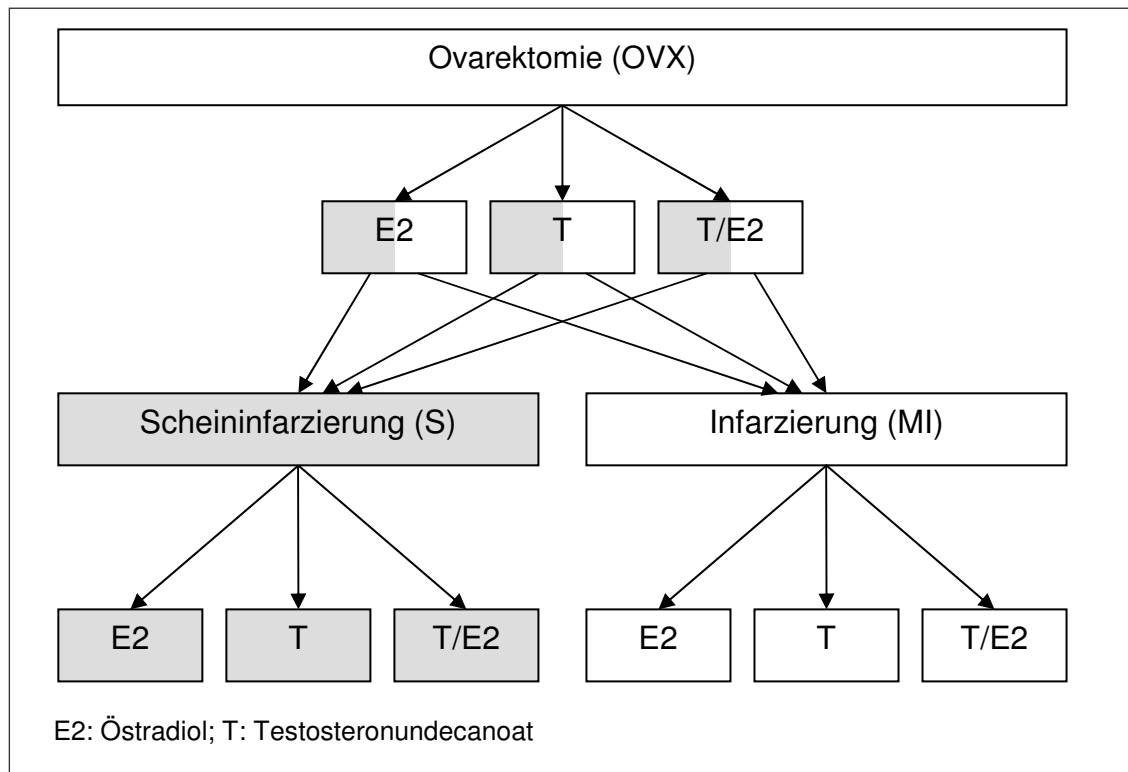


Abb. 5: Versuchsgruppen

3.3.1. Hormonelle Behandlung der Versuchsgruppen

In Woche 0 der Behandlung (s. Abb. 4: Versuchsablauf) wurden die Tiere mittels intraperitonealer Gabe einer Injektionslösung aus Ketanest (Wirkstoff: (S)-Ketaminhydrochlorid; 25mg/ml; Parke-Davis GmbH, Berlin, Deutschland) und Rompun (2%; Wirkstoff: Xylazinhydrochlorid Xylazin; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) narkotisiert, wobei eine Narkosedauer von ungefähr 30min

erreicht wurde. Alle Tiere wurden gewogen und mit einer tätowierten Nummer am Ohr gekennzeichnet.

Im Anschluss erfolgte die bilaterale Ovariectomie (OVX) aller Tiere:

Nach Rasur und Desinfektion der Flanken wurde eine Laparatomie durchgeführt, bei welcher Haut, Unterhautfettgewebe, Bauchmuskulatur einschließlich der Faszien und Peritoneum parietale mit einem Schnitt durchtrennt wurden. So entstand in einer Länge von 10-20mm eine Bauchhöhlenöffnung, durch die das Ovar mit einer Pinzette vorsichtig nach extrakorporal hervorgeholt werden konnte. Das Ovar wurde durch Ligatur des Eileiters zusammen mit den das Ovar versorgenden Blutgefäßen mithilfe eines Fadens (3-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) abgebunden und distal der Ligatur mit einem Messer abgetrennt. Nach anschließender Reposition des Eileiterreststückes wurde der Bauchwanddefekt durch Muskelnäht mit einem Faden (3-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) behoben und der Hautschnitt mit Metallclips (Michel Klips, Tübingen, Deutschland) verschlossen.

Die Ovariectomie hatte den Zweck, durch die Eliminierung von Zyklusschwankungen bei allen Tieren eine gleiche hormonelle Ausgangslage zu schaffen und so die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erhöhen.

In Abhängigkeit von der Hormonbehandlung wurden die Tiere randomisiert in drei Versuchsgruppen eingeteilt:

3.3.1.1. Östradiol-Gruppe (E2)

Direkt im Anschluss an die Ovariectomie wurde im Bereich des Kreuzbeines ein Hautschnitt in der Länge von 10-15mm angefertigt. Östradiol-Pellets (17 β -Estradiol, Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA) mit einer Freisetzungsrate von 1mg/90d wurden subkutan implantiert, so dass physiologische Östrogenspiegel gewährleistet wurden. Die für die Implantation der Pellets notwendige Hautinzision wurde mit Metallclips (Michel Klips, Tübingen, Deutschland) versorgt. Zusätzlich wurde dieser Versuchsgruppe eine ölige Lösung in den Musculus biceps femoris injiziert, welche als Placebo für das Testosteronundecanoat der beiden im

Nachfolgenden beschriebenen Versuchsgruppen fungierte und gleichmäßig in der Muskulatur des rechten und linken Oberschenkels verteilt wurde.

Diese Versuchsgruppe diente als experimentelles Tiermodell für gesunde Frauen mit ausgeglichenem Hormonhaushalt, die sich in der Lebensphase zwischen Menarche und Menopause befinden und damit dem Einfluss physiologischer Östradiolkonzentrationen unterliegen.

Beim Vergleich der Versuchsgruppen untereinander und bei der Bewertung der Ergebnisse erfüllte diese Gruppe die Funktion einer Kontrollgruppe.

3.3.1.2. Testosteronundecanoat-Gruppe (T)

Nach Ovariectomie wurden in bereits oben dargestellter Vorgehensweise (s. Kap. 3.3.1.1.) subkutan Placebo-Pellets (Innovative Research of America, Sarasota, Florida, USA) implantiert, die in Größe und Gewicht den Östradiol-Pellets entsprachen. Um pharmakologische Testosteronspiegel zu erreichen, wurde Testosteronundecanoat (T; Ampullen zu 1000mg/ml; Jenapharm GmbH&Co KG, Jena), ein synthetischer Androgenester (s. Abb. 6), in einer Dosierung von 250mg/kg Körpergewicht entsprechend der Gabe der Placeboinjektionen intramuskulär appliziert.

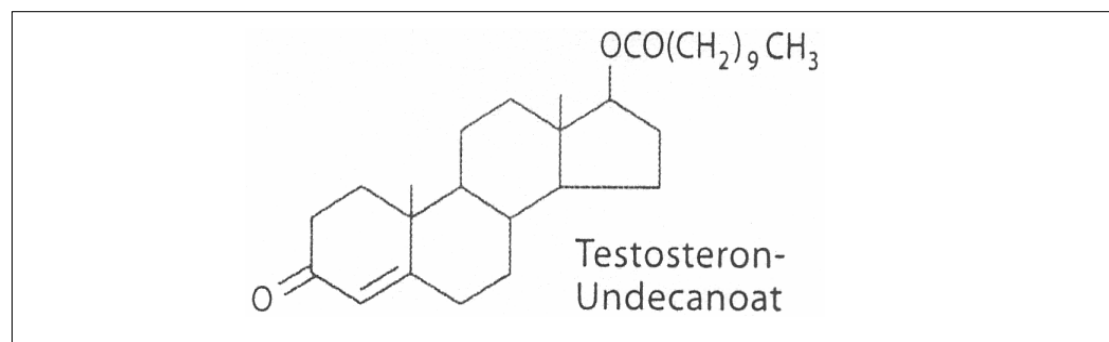


Abb. 6: Chemische Struktur von Testosteronundecanoat [46]

Der Hintergrund dieser Versuchsgruppe waren Frauen in der Postmenopause, bei denen erniedrigte Östradiol- und supraphysiologisch erhöhte Androgenspiegel vorherrschen.

3.3.1.3. Testosteronundecanoat- und Östradiol-Gruppe (T/E2)

Nach Ovariectomie erfolgte die Östradiolsubstitution in physiologischer Dosierung mittels subkutan implantierter Östradiol-Pellets wie bereits in Kap. 3.3.1.1. beschrieben. Analog der oben beschriebenen Methodik wurde eine intramuskuläre Injektion von Testosteronundecanoat in einer pharmakologischen Dosierung von 250mg/kg Körpergewicht verabreicht.

Diese Versuchsgruppe fungierte als experimentelles Tiermodell für Frauen, die physiologische Östradiolkonzentrationen aufweisen und gleichzeitig an mit Hyperandrogenämie einhergehenden Krankheiten wie beispielsweise dem „Syndrom der polyzystischen Ovarien“ (PCOS) leiden. Des Weiteren wurden durch diese Versuchsgruppe Frauen imitiert, die bei regelmäßigem ovariell gesteuertem Zyklus unter Anabolikaeinfluss im Hochleistungssport stehen.

3.3.2. Operative Behandlung der Versuchsgruppen: Scheinfarzierung (S)/ Infarzierung (MI)

In Abhängigkeit von der Gruppenzugehörigkeit wurde in Woche 2 eine Scheinfarzierung (S) bzw. Infarzierung (MI) durch Ligatur des Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie durchgeführt, wobei eine etablierte Methode [47-49] zur Anwendung kam.

Nach Einleitung der Narkose mit Äther wurden die Tiere gewogen und mithilfe einer Plastikkanüle (PE 200, Portex, England) endotracheal intubiert. Unmittelbar danach wurden die Tiere an ein Beatmungsgerät für Nagetiere (Rodent Ventilator Typ UB 7025, Fa. Hufo Sachs Elektronik, D-March) angeschlossen, das eine Beatmungsfrequenz von 90/min und ein Atemzugvolumen von 2,5ml gewährleistete. Der Aufrechterhaltung und Vertiefung der Narkose diente endotracheal appliziertes Isofluran (Dräger Vapor 2000, Dräger Medizintechnik, Lübeck, Deutschland), welches parallel zum Sauerstoff zugeführt wurde.

Nach Rasur und Desinfektion der vorderen Thoraxhälfte erfolgte eine linksseitige Thorakotomie, bei der Haut, Unterhautfettgewebe, Musculus pectoralis, Musculi

intercostales, Pleura parietale und Perikard mit einer Schere durchtrennt wurden. Nach Dehnung eines Interkostalraumes wurde das Herz durch behutsames Ausüben eines Drucks auf beiden Seiten des Brustkorbes aus der Thoraxhöhle geholt und der Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie an proximaler Stelle mit einem Faden (Prolene 5/0 RB-1, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) ligiert, wodurch ein Myokardinfarkt induziert wurde. Im Folgenden wurde das Herz in die Thoraxhöhle reponiert, das Perikard und die Brustwand vernäht (2-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, D-Norderstedt) sowie der Hautschnitt verschlossen. Nach Beendigung der Operation wurde die Isofluranzufuhr unterbrochen und ein EKG abgeleitet, wobei eine ST-Streckenhebung als erster Beleg für eine erfolgreich verlaufene Infarzierung galt.

Die Vorgehensweise bei der Scheininfarzierung war identisch bis auf den Unterschied, dass keine Ligatur um den Ramus interventricularis anterior der linken Koronararterie gesetzt, sondern lediglich eine Naht unterhalb der linken Koronararterie angefertigt wurde.

Nach dem Erwachen aus der Narkose und der spontanen Extubation fand postoperativ eine fünfstündige Beaufsichtigung der Tiere statt, während der beim Auftreten von Asystolie oder Herzrhythmusstörungen mechanisch mittels Herzdruckmassage reanimiert und gegebenenfalls erneut intubiert wurde.

3.3.3. Gewährleistung und Überwachung konstanter Hormonspiegel

3.3.3.1. Gewährleistung konstanter Hormonspiegel

Die gewünschten Östradiolspiegel wurden während des ganzen Versuchsablaufs durch die in Woche 0 subkutan implantierten Östradiol-Pellets aufrechterhalten, die über einen Zeitraum von 90 Tagen für eine gleichmäßige Hormonfreisetzung sorgten und deshalb keine erneute Verabreichung von Östradiol notwendig machten.

Um die erforderlichen Testosteronspiegel zu gewährleisten, wurden außer in Woche 0 zusätzlich in Woche 4 und 8 intramuskuläre Injektionen von Testosteronundecanoat appliziert.

3.3.3.2. Überwachung konstanter Hormonspiegel

Weil sich diese Arbeit mit dem chronischen Einfluss von Testosteron und Östradiol auf das Remodeling nach Myokardinfarkt beschäftigt, war es wichtig zu überprüfen, ob die gewünschten Hormonspiegel während des gesamten Versuchsablaufs bestanden. Diesem Zweck der Überwachung der Hormonspiegel dienten die Blutentnahmen zur Bestimmung des Testosteron- und Östradiolspiegels im Serum, die in Woche 4 und 11 vorgenommen wurden.

Bei der Blutentnahme in Woche 4 wurden die Tiere nach intraperitonealer Narkotisierung (siehe Kap. 3.3.1.) in Rückenlage gebracht und in dieser Körperhaltung mithilfe von Silikonschläuchen und Haftzwecken auf einer Korkunterlage so fixiert, dass Ober- und Unterkiefer durch Zug der Silikonschläuche nach kranial bzw. kaudal weit auseinander gehalten wurden und einen hinreichenden Zugang zur Mundhöhle einschließlich der Zunge frei gaben. Nachdem die Zunge vorsichtig mit einer Pinzette in Richtung Mundaussgang gestreckt worden war, erfolgten die Punktion der Vena sublingualis mit einer Injektionskanüle (1,0ml Omnifix Tuberkulinspritze mit 26G-Nadel, Braun Melsungen, Deutschland) und die Entnahme von ungefähr 0,5ml Blut.

Das Blut wurde in einem Eppendorf-Cap ohne Zugabe von Antikoagulantien 10min lang bei 4500rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Biofuge 17RS, Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland), danach wurde das entstehende Serum mit einer Pipette in ein weiteres Eppendorf-Cap überführt und bei -20°C tiefgefroren.

Die Blutentnahme in Woche 11 fand post mortem aus der eröffneten Thoraxhöhle statt, nachdem das Herz für die Langendorff-Perfusion exzidiert worden war. Anschließend wurde mit dem Blut entsprechend dem Blut der Woche 4 verfahren.

Für die Bestimmung der Östradiolserumkonzentration wurde eine Solid-Phasen-¹²⁵I-Radioimmunassay-Technik (DPC Bierman, Bad Nauheim, Germany) entsprechend den Anweisungen des Herstellers verwendet, wobei die Sensitivität 5,0 pg/ml betrug.

Die Testosteronserumkonzentration wurde mithilfe eines kommerziell erhältlichen RIAs (Diagnostic Products Corporation, USA) mit einer Sensitivität von 0,06 ng/ml gemessen.

3.4. Echokardiographie

In Woche 10 wurden die Ratten einer transthorakalen Doppler-Echokardiographie unterzogen, deren Genauigkeit und Reproduzierbarkeit für Messungen der Größe und Funktion des linken Ventrikels bereits früher belegt wurden [50, 51].

Zur Durchführung der Echokardiographie wurde ein handelsübliches Echokardiographie-Gerät (Toshiba SSH-140A) mit einem 7.0 MHz Schallkopf (Toshiba Medical Systems, München, Deutschland) verwendet. Die Messungen, deren Ergebnisse als Mittelwerte aus drei aufeinander folgenden Herzzyklen ermittelt wurden, erfolgten entsprechend der „American Society of Echocardiography“.

Nach intraperitonealer Narkotisierung mit Ketamin HCL (50mg/kg; Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und Xylazin (20mg/kg; BayerVital, Leverkusen, Deutschland) sowie Rasur der vorderen Thoraxwand wurden die Ratten in Bauchlage auf einer speziell hergestellten Kunststoffplatte mit einer Aussparung so positioniert, dass mit dem Schallkopf Zugang zum Herzen gewonnen werden konnte.

Zunächst wurden im B- und M-Mode in der parasternalen langen Achse folgende Parameter bestimmt:

- Diastolischer und systolischer Diameter des linken Ventrikels (LV Diam d und LV Diam s in mm)
- Verkürzungsfraktion (fractional shortening, FS in %) gemäß folgender Formel:

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

Die Verkürzungsfraktion dient als Maß für die Kontraktilität und die Dilatation des Herzens: Eine höhere relative Verkürzungsfraktion spricht für eine bessere Kontraktilität und eine geringer ausgeprägte Dilatation des Herzens.

Im Anschluss wurde der linke Ventrikel in der parasternalen kurzen Achse auf Höhe des Papillarmuskels im B- und M-Mode vermessen, wobei ebenfalls die gerade genannten Parameter ermittelt wurden (s.o.).

Schließlich wurde in der apikalen Achse (Vierkammerblick) ein PW-Doppler über der Mitralklappe mit der Erfassung des transmitralen diastolischen Einstromprofils (E/A) durchgeführt. Dabei entsteht die E-Welle durch den frühdiastolischen Einstrom, der aus der Relaxation des linken Ventrikels mit konsekutivem relativem Unterdruck und der daraus folgenden passiven Sogwirkung gegenüber dem linken Atrium während der Diastole resultiert. Die A-Welle geht auf den spätdiastolischen Einstrom zurück, der aufgrund der aktiven Vorhofkontraktion zustande kommt.

3.5. In-vivo-Hämodynamik

Die hämodynamischen Messungen der Woche 11 (s. Abb.4: Versuchsablauf) wurden gemäß einer etablierten Methodik [47-49] durchgeführt.

Nach Narkotisierung der Ratten, die in Analogie zu derjenigen bei der Infarzierung (s. Kap. 3.3.2.) erfolgte, wurde ein Hautschnitt im Bereich des rechtsseitigen Trigonum caroticum am Hals angefertigt und die Arteria carotis communis dargestellt. An dieser wurden mit einem Faden (5-0 Perma-Hand Seide, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) im Abstand von ungefähr 1,5cm zwei Ligaturen angebracht, zwischen denen nach Eröffnung des Gefäßes ein Katheter (Millar Instruments, Houston, Texas) eingeführt und über den Aortenbogen retrograd im linken Ventrikel positioniert wurde. Der Katheter seinerseits hatte Verbindung mit einer Drucksonde (Piezoresistive Pressure Transmitter, Type PRC-21/8603-, -50+300mmHg, Föhr Medical Instruments, Seeheim/Ober Beerbach, Deutschland), deren Signale von einer ZAK-Einheit (ZAK GmbH, Simbach/Inn, Deutschland) verarbeitet und mit einem 8-Kanal-Schreiber (Graphtec Corp., Type WR3300, Japan) aufgezeichnet wurden. Ob sich der Katheter in der gewünschten Lage befand, wurde anhand der Druckkurve kontrolliert.

Dem bis zu diesem Zeitpunkt tief narkotisierten Tier wurde solange Zeit gewährt, bis es einen Zustand kurz vor dem Erwachen aus der Narkose erreichte, was mit dem Zwischenzehenreflex überprüft wurde. Die anschließend stattfindenden hämodynamischen Messungen wurden bei Spontanatmung des Tieres unter leichter Ätheranästhesie durchgeführt, wobei zunächst der enddiastolische (LVEDP in

mmHg) und der systolische Druck (LVSP in mmHg) des linken Ventrikels einschließlich der Herzfrequenz (HR in Schläge/min) registriert wurden. Unmittelbar danach wurde der Katheter vorsichtig bis zum Aortenbogen zurückgezogen, um dort den diastolischen (DAP in mmHg) und systolischen Aortendruck (SAP in mmHg) zu messen, aus denen sich der mittlere arterielle Blutdruck (MAP in mmHg) nach folgender Formel ergab: $MAP = (SAP - DAP) / 3 + DAP$.

Außerdem wurde der Index der myokardialen Kontraktilität des linken Ventrikels (dP/dt max in mmHg/s) bestimmt, der Informationen über den linksventrikulären Druckanstieg pro Zeit liefert und eine Aussage über die systolische Funktion des Herzens zulässt. Als Maß für die diastolische Relaxationsfähigkeit des linken Ventrikels wurde der Druckabfall pro Zeit (dP/dt min in mmHg/s) ermittelt.

Nach Beendigung der hämodynamischen Messungen wurde das Tier durch die forcierte endotracheale Gabe von Isofluran in ein tiefes Narkosestadium versetzt, so dass die Präparation zur Langendorff-Perfusion nahtlos angeschlossen werden konnte.

3.6. Langendorff-Perfusion („isoliertes isovolumetrisches Herz“)

3.6.1. Präparation des Herzens

Im Rahmen einer transversalen Laparotomie und einer beidseitigen anterolateralen Thorakotomie wurde das Herz freigelegt, exzidiert und in eiskalten Krebs-Henseleit-Puffer (Zusammensetzung: siehe unten) überführt, wodurch der Zustand der Kardioplegie erreicht wurde. Auf die anschließende Denudierung und Kürzung der Aorta proximal des Truncus brachiocephalicus folgte die Fixierung der Aorta an eine Kanüle, die ihrerseits mit einer Perfusionsapparatur verbunden war.

Die Langendorff-Perfusion des Herzens fand bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einem gleich bleibendem Perfusionsdruck von 100mmHg retrograd über die Aorta statt (s. Abb. 7: Schema der kardialen Perfusion nach Langendorff). Der für die Perfusion benötigte phosphatfreie Krebs-Henseleit-Puffer (Sigma CR-0177) war zusammengesetzt aus NaCl (118 mM), KCl (4,7 mM), CaCl (1,75mM), MGSO₄ (1,2mM), EDTANa₂ (0,5mM), NaHCO₃ (25mM) sowie Glukose (11mM) (SIGMA Chemie, Deisenhofen, Deutschland) und wurde in demineralisiertem Wasser (Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) gelöst. Nach Äquilibration des Puffers mit 95% O₂ und 5% CO₂ wurde ein pH-Wert von 7,4 erreicht.

Sofort nach beginnender Perfusion setzten aufgrund der Autonomie des Herzens rhythmische Kontraktionen des Myokards ein, und die nachfolgende Präparation wurde am schlagenden Herzen fortgesetzt. Der linke Vorhof wurde auf einer Länge von 4-6mm inzidiert, so dass ein Ventil aus Polyethylen eingeführt und nach Überwindung der Mitralklappe durch die Spitze des linken Ventrikels perforiert werden konnte. Der Zweck dieses Ventils bestand darin, den Abfluss des Puffers aus dem linken Ventrikel zu gewährleisten und dadurch eine unnötige Druck- und Volumenbelastung mit konsekutiver Schädigung des linken Ventrikels zu vermeiden.

3.6.2. Messung der kardialen Funktion

Nach Einschnitt des Truncus pulmonalis wurde entlang der Arteria pulmonalis im rechten Ventrikel ein Messkatheter platziert, der Verbindung mit einer Sauerstoff-Meßsonde und einer Messanzeige (Microprozessor Oximeter Oxi 537, WTW Weilheim, Deutschland) hatte. So konnte aus der Differenz des vor Versuchsbeginn im Puffer gemessenen Sauerstoffgehaltes und des jeweils aktuell im Puffer des rechten Ventrikels ermittelten Sauerstoffgehaltes der kardiale Sauerstoffverbrauch bestimmt werden.

Durch die bereits vorhandene Inzision des linken Vorhofs (s. Kap. 3.6.1.) wurde ein mit Wasser gefüllter, luftfreier Latexballon (Ritex, Bielefeld) in den linken Vorhof eingeführt, über die Mitralklappe im linken Ventrikel positioniert und mit einem Faden fixiert. Der Ballon war durch einen Polyethylenschlauch mit einer Drucksonde (Piezoresistive Pressure Transmitter, Type PRC-21/8603-, -50+300mmHg, Föhr Medical Instruments, Seeheim/Ober Beerbach, Deutschland) verbunden, so dass kontinuierliche Aufzeichnungen des linksventrikulären Drucks und der Herzfrequenz über eine ZAK-Einheit (ZAK GmbH, Simbach/Inn, Deutschland) auf einem 8-Kanal-Schreiber (Graphtec Corp., Type WR3300, Japan) erfolgten. Druck-Volumen-Kurven des linken Ventrikels wurden erstellt, indem die Vorlast des Herzens durch die schrittweise Erhöhung des Ballonvolumens um jeweils 0,03ml vergrößert und die entsprechende Druckentwicklung registriert wurde. Die Abbruchkriterien für die Messung waren erfüllt, sobald die entwickelte Druckamplitude des linken Ventrikels (LVDP), welche der Differenz zwischen systolischem (SVP) und diastolischem Druck (EDP) entspricht, ihr Maximum erreicht hatte oder ein enddiastolischer Druck (EDP) von 50mmHg überschritten worden war.

Außer dem bereits erwähnten diastolischen (EDP in mmHg) und dem systolischen Druck (SVP in mmHg) sowie der daraus berechenbaren linksventrikulären Druckamplitude (LVDP in mmHg) konnte bei der Langendorff-Perfusion der Koronarfluss (CF in ml/min) mithilfe eines Ultraschall-Flowmeters (Transsonic Inc, Ithaca, NY) gemessen werden, das in den mit der Aorta verbundenen Perfusionsschlauch eingebaut war (s. Abb 7: Schema der kardialen Perfusion nach

Langendorff). Zudem wurden die maximal entwickelte Druckamplitude (LVDP max in mmHg) und die dafür notwendige Vorlast (Vol max in ml) ermittelt.

Vor Beginn jeder Messung erhielten die Herzen eine Zeitspanne von 5-10 Minuten zur Stabilisierung, in denen der enddiastolische Druck nach Adjustierung des Ballonvolumens ungefähr 10 mmHg betrug. In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass das Perfusionssystem nach Langendorff das Herz für mindestens 90 Minuten in einem stabilen Funktionszustand hält, so dass Änderungen mechanischer und metabolischer Parameter bei weniger als 5% liegen [52].

Nach Abschluss der Messungen wurden beide Vorhöfe abpräpariert, der rechte vom linken Ventrikel getrennt und jeweils einzeln gewogen. Beim linken Ventrikel wurde auf mittlerer Höhe orthogonal zur Längsachse ein repräsentativer Gewebering exzidiert, der für die Bestimmung der Infarktgröße, der Wanddicken und des Ausmaßes der Dilatation mittels Planimetrie zur Verfügung stand. Der Gewebering sowie der entstehende obere und untere Teil des linken Ventrikels wurden ebenso wie der rechte Ventrikel unmittelbar in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und im Anschluss bei -80°C für histologische und molekularbiologische Untersuchungen konserviert.

3.7. Anfertigung histologischer Schnitte des linken Ventrikels sowie deren Färbung und Planimetrie

Zur Herstellung von histologischen Schnitten des linken Ventrikels wurde ein Kryostat (Kryostat Mycrotom Jung CM 3000; Leica, Nussloch, Deutschland) verwendet, der einem Tiefkühlgerät mit eingebautem Rotationsmikrotom entspricht.

Eine Sichtscheibe gewährte Einblick in das Kryostatgehäuse, welches im Innern einen Objektisch als Unterlage für das zu schneidende Gewebe und ein Mikrotom enthielt. Das Mikrotom seinerseits stand mit einer von außen am Gehäuse befestigten Transportkurbel in Verbindung, so dass während des Schneidevorgangs nicht im Innern des Kryostaten gearbeitet wurde.

Der Gewebering des linken Ventrikels wurde auf dem Objektisch in einem Tropfen Tissue Tek eingebettet, das sich bei Raumtemperatur in flüssigem Zustand befand

und auf dem bei -20°C gekühlten Objektisch erstarrte. Dadurch wurde der Gewebering des linken Ventrikels während des gesamten Schneidevorgangs in gefrorenem Zustand gehalten und auf dem Objektisch fixiert. Der Objektisch wurde anschließend so arretiert, dass mit dem Mikrotom im rechten Winkel zur Längsachse des linken Ventrikels $7\mu\text{m}$ dicke Schnitte angefertigt wurden, die bei -80°C auf einem Objektträger aufbewahrt wurden.

Nach Färbung der histologischen Schnitte mit Picro-Sirius-Red (Sirius red: Chroma-Gesellschaft Schmidt GmbH and Co., Köngen/N., Deutschland; picroacid: E. Merck, Darmstadt, Deutschland), welches selektiv Kollagen rot darstellt, war eine eindeutige Abgrenzung der roten Infarktnarbe vom nicht infarzierten gelben Herzbereich möglich.

Die histologischen Schnitte wurden digitalisiert und mittels Planimetrie wurden sowohl die epi- und endokardiale Länge der Infarktnarbe als auch der epi- und endokardiale Umfang des gesamten linken Ventrikels bestimmt. Aus dem Verhältnis der epi- und endokardialen Infarktlänge zum gesamten epi- und endokardialen Umfang des linken Ventrikels ergab sich die endgültige Infarktgröße, die einem Durchschnittswert aus 5 histologischen Schnitten eines Herzens entsprach und in Prozent angegeben wurde.

Außerdem wurden mithilfe der planimetrischen Messung des linken Ventrikels die maximale Innenquerschnittsfläche des Lumens (I in mm^2), die Gesamtquerschnittsfläche (G in mm^2), die Dicke der Vorderwand (AW in mm) und die des Herzseptums (PW in mm) bestimmt.

3.8. Molekularbiologische Methoden

3.8.1. RNA-Isolierung

3.8.1.1. Homogenisierung der Gewebeproben

In ein Rundboden-Röhrchen wurde 1 ml Trizol-Reagenz/100 mg Gewebe gegeben (Life Technologies, GibcoBRL Nr. 15596-018, USA), wobei es sich bei den Gewebeproben um Anteile des in Stickstoff asservierten linken Ventrikels handelte. Nach einer Homogenisierung von 20 Sekunden wurde die Probe für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.8.1.2. Phasenseparation

Der Probe wurden 600 µl Trizol (200ul/ml Trizol) zugefügt. Danach wurde sie geschüttelt, für 2-3 min bei Raumtemperatur aufbewahrt und bei 7000 U/min zentrifugiert, so dass schließlich 3 Phasen erkennbar waren (wässriger Überstand mit RNA, DNA-Phase, Proteinphase).

3.8.1.3. RNA-Präzipitation und Waschung

Nachdem der Überstand abpipettiert worden war, wurde dieser um 1,5 ml Isopropanol (Merck, 1.00994.0500) ergänzt. Die entstehende Mischung wurde 10 min bei Raumtemperatur gelagert und dann für 10 min bei 10000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde danach verworfen und es wurde 1 ml 75%iger Ethanol-DEPC-Wasser (DEPC Sigma, Nr. D-5758) Lösung zugegeben. Schließlich wurde bei 13000 U/min zentrifugiert.

3.8.1.4. RNA-Auflösung und Quantifizierung

Nach der Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das verbleibende Pellet bei Raumtemperatur im offenen Cap getrocknet. Es folgte die Zugabe von 10 µl DEPC-Wasser und die photometrische Bestimmung der RNA-Konzentration.

3.8.1.5. Sondensynthese für Northern-Blot

Hier wurde der Vektor, der unsere Zielsequenz IGF-1 (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 für 5 min auf einem Wärmeblock bei 100°C gekocht; wodurch sich die DNA-Stränge auftrennten. Danach wurde die Probe für 5 min auf Eis gestellt, wobei sich beim Abkühlen die Stränge wieder zusammenlagerten. Dieser Probe wurde das RadPrime Labeling System (Gibco Nr. 18428-011) zugefügt (1 µl 500µM dATP, 1 µl 500µM dGTP, 1 µl 500µM dTTP, 20 µl 2,5x Random Primer Solution). Es wurden 5 µl [α^{32} P]dCTP (3000 Ci/mmol, 10mCi/ml) (Amersham, Braunschweig, Deutschland) zugegeben, um die entstehende Probe schließlich mit aqua destillata bis zu einem Volumen von 49 µl aufzufüllen und um 1 µl Klenow-Fragment zu ergänzen.

Nun wurde eine QIAQICK Spin Column (QIAGEN, Heidelberg) in ein Cap gestellt und für 1 min bei 3000 U/min zentrifugiert. Das resultierende Zentrifugat wurde verworfen, während das Probenmaterial in die Mitte der Säule gegeben und für 2 min bei 3000 U/min zentrifugiert wurde. Dadurch wurden eingebaute Nukleotide von freien Nukleotiden getrennt, indem die freien Nukleotide in der Säule und die markierten Nukleotide im Zentrifugat verblieben.

Das Zentrifugat wurde um 100 µl Salmon Sperm (Sigma S3126, Deutschland) ergänzt, für 5 min gekocht und danach auf Eis abgekühlt.

3.8.2. IGF-1-Northern-Blot

3.8.2.1. 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. Anschließend wurde das Gel gegossen, das danach mindestens eine Stunde aushärtete. Entsprechend der RNA-Quantifizierung wurden zum Auftragen in die Geltaschen 15 µg RNA/Lane verwendet; wobei die errechnete Probenmenge im Verhältnis 1:3 mit Loading-Buffer versetzt wurde. Die RNA wurde nun für 10 min bei 68°C linearisiert und dann auf Eis gelagert. Das Gel wurde in die Gelkammer gelegt und mit Laufpuffer überschichtet (35 ml 20xMOPS und 665 ml DEPC-Wasser). Die Proben wurden nun in die Slots pipettiert, als Marker wurde ein RNA-Marker (0,24-9,5 kb RNA-Ladder, Gibco Nr. 15620-016) verwendet. Das Gel wurde für 1 Stunde unter eine Spannung von 85V gebracht. Danach wurde das Ergebnis 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 durften sich weder am Gel noch an den Membranen befinden und mussten bei Bedarf ausgestrichen werden. Nach der Schichtung wurde der Rahmen des Blotters mit 20xSSC bis zum Rand gefüllt und der Turbo-Blotter wurde über Nacht mit Frischhaltefolie abgedeckt bei Raumtemperatur aufbewahrt.

3.8.2.2. 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.

3.8.2.3. Prähybridisierung und Hybridisierung

Ein Hybridisierungsöfen (Bellco Glass Inc., Vineland NJ, USA) wurde auf 68°C vorgeheizt. Die Membran wurde in eine Glasröhre mit 15 ml QuickHyb-Lösung (Stratagene Nr. 201220) eingeführt und dann für 10 min rotierend im Ofen inkubiert. Die oben vorbereitete Probe wurde danach in die Glasröhre eingebracht und es wurde für 1-1,5 Stunden bei 68°C hybridisiert.

Die Flüssigkeit wurde aus der Röhre abgegossen und mit 100ml 2xSSC, 0,1% SDS-Puffer bei 25°C im Ofen gewaschen. Im Anschluss wurde noch zweimal für jeweils 15 min mit derselben frischen Lösung und danach 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; wobei die Membran an keiner Stelle trocken werden durfte. Sie wurde in eine Röntgenkassette mit einem Film gelegt und bei -80°C für 12-24 Stunden gelagert. Danach konnte der Film entwickelt werden.

3.8.3. α/β -MHC-Messung

Protein für die elektrophoretische Bestimmung der myosin heavy chains wurde für alle sechs Gruppen aus den bei -80°C gefrorenen Proben isoliert. Dazu wurden 40mg des Gewebes in 400 μ l kaltem Probenpuffer homogenisiert (0.3 M NaCl, 0.1M NaH₂PO₄*H₂O, 50 mM N₂HPO₄, 10 mM Sodium Pyrophosphat, 1 mM MgCl₂*6H₂O, 10 mM EDTA, pH 7.4), wobei ein Protease-Inhibitor zugegeben wurde (Roche). Das homogenisierte Gewebe wurde für 30 min bei 4°C und 15000U/min zentrifugiert, der Überstand wurde abpipettiert und aliquotiert bei -80°C gefroren.

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).

3.8.4. Polarisationsmikroskopische Kollagenmessung

Zur Bestimmung des Kollagengehaltes wurde an den mit Piko-Sirius-Red gefärbten histologischen Schnitten (s. Kap. 3.7.) analog zu früheren Studien [31] eine Messung mit dem Polarisationsmikroskop durchgeführt.

3.9. Auswertung der Ergebnisse

3.9.1. Einteilung der Infarktgruppen

Die Infarktgrößen wurden wie in Kap. 3.7. beschrieben mittels Planimetrie bestimmt. Bei Infarktgrößen von 0-5 Prozent des linken Ventrikels erfolgte die Zuordnung zur S-Gruppe, während Infarktgrößen zwischen 30 und 50 Prozent des linken Ventrikels in die MI-Gruppen eingingen. Von der Statistik ausgeschlossen wurden Infarktgrößen <30 und >50 Prozent sowie nicht-transmurale Infarkte, um die Homogenität der Infarktgrößen zu optimieren und so die Vergleichbarkeit der MI-Gruppen zu erhöhen.

3.9.2. Beurteilung der Mortalität

Frühere Studien zeigten, dass nach einer Infarzierung gemäß der oben beschriebenen Methodik ungefähr 50 Prozent der operierten Tiere versterben. Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Hormonbehandlung mit Östradiol und Testosteron die Mortalität der drei MI-Gruppen entscheidend beeinflusst, wurde ein Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Als „Überlebende“ gingen in die Statistik alle diejenigen Tiere ein, die eine Infarktgröße zwischen 30 und 50 Prozent aufwiesen und den gesamten Versuchsablauf von 11 Wochen überlebten. In der Gruppe der „Gestorbenen“ fanden die Tiere Berücksichtigung, bei denen der Exitus nach mehr als 30 Minuten postinfarziell eingetreten war. Aus der Mortalitätsstatistik ausgeschlossen wurden Tiere mit einem Exitus von weniger als 30 Minuten nach der Infarzierung, weil diese frühe Mortalität eher auf Ursachen wie beispielsweise die Operation selbst als auf die Auswirkungen der Hormontherapie zurückgeführt werden kann.

3.9.3. Statistische Auswertung der Versuchsdaten

Alle Ergebnisse wurden dargestellt als der Durchschnittswert \pm Standardfehler. Mithilfe der faktoriellen ANOVA-Analyse wurden die Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen für jeden Parameter bestimmt, wobei Unterschiede mit $p < 0,05$ als signifikant bezeichnet wurden. Bei sechs Versuchsgruppen sind mathematisch 15 statistische Vergleiche möglich, von denen in dieser Arbeit lediglich die Signifikanzen der „biologisch sinnvollen“ Vergleiche angegeben wurden. Diese umfassten Vergleiche zwischen den verschiedenen Hormonbehandlungen innerhalb der S- oder der MI-Gruppen (Intergruppenvergleich) und Vergleiche der S-Gruppen mit den entsprechend hormonell therapierten MI-Gruppen (Intragruppenvergleich). Vergleiche von Parametern zwischen zwei Versuchsgruppen wurden mithilfe des Unpaired Student t-Test durchgeführt und die aus diesem Test resultierenden Signifikanzen sind zusätzlich gekennzeichnet.

Die statistischen Berechnungen erfolgten mithilfe des StatView SE+Graphics Programms (Brainpower Inc., Calabasas, California).

4. Ergebnisse

4.1. Mortalitätsstatistik

Bezüglich der Mortalität zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den MI-Gruppen (MI/ E2 vs. MI/ T vs. MI/ T/E2: 38% vs. 34 % vs. 31%).

4.2. Charakteristika der einzelnen Versuchsgruppen

4.2.1. Hormonserumspiegel

Die Serumkonzentrationen von Testosteron in Woche 4 (T 4) und 11 (T 11) sind gemeinsam mit denjenigen von Östradiol der Woche 11 (E2 11) in Tab. 1 aufgeführt.

Übersicht über die Hormonserumspiegel (T und E2):

Parameter	Scheinfarzung			Infarzung		
	E2	T	T/E2	E2	T	T/E2
Anzahl n	9	11	11	8	12	12
T 4 [ng/ml]	0,5±0,3	11,4±2,0 ^a	10,6±1,8 ^b	0,5±0,2	11,7±1,8 ^d	16,0±2,1 ^e
T 11 [ng/ml]	0,4±0,2	16,7±2,9 ^c	11,9±1,2 ^b	0,3±0,2	11,0±0,9 ^d	12,66±2,4 ^f
E2 11 [pg/ml]	23,2±7,1	9,1±1,7	19,4±7,3	17,2±6,0	8,5±1,9	23,2±6,5

Signifikanzen:
^a: E2_S vs. T_S mit p<0,05 ^b: E2_S vs. T/E2_S mit p<0,05 ^c: E2_S vs. T_S mit p<0,001
^d: E2_{MI} vs. T_{MI} mit p<0,05 ^e: E2_{MI} vs. T/E2_{MI} mit p<0,001 ^f: E2_{MI} vs. T/E2_{MI} mit p<0,05

Tab. 1: Übersicht über die Hormonserumspiegel (T und E2)

Sowohl innerhalb der S- als auch innerhalb der MI-Gruppen waren die Testosteronserumkonzentrationen bei den mit T und T/E2 behandelten Versuchsgruppen gegenüber den mit E2 substituierten Versuchsreihen in Woche 4 und 11 signifikant erhöht.

Die Östradiolserumkonzentrationen der mit E2 und T/E2 therapierten Versuchsreihen lagen auf annähernd dem doppelten Niveau im Vergleich zu den mit reinem T behandelten Versuchsgruppen, wobei sich die Unterschiede nicht als signifikant erwiesen.

4.2.2. Infarktgrößen

Die Messung der Infarktgrößen (s. Abb. 8) ergab keine signifikanten Abweichungen zwischen den MI-Gruppen, wodurch sehr homogene Ausgangsbedingungen für den Versuchsaufbau gewährleistet waren. Die mittlere Infarktgröße lag bei $43 \pm 1\%$.

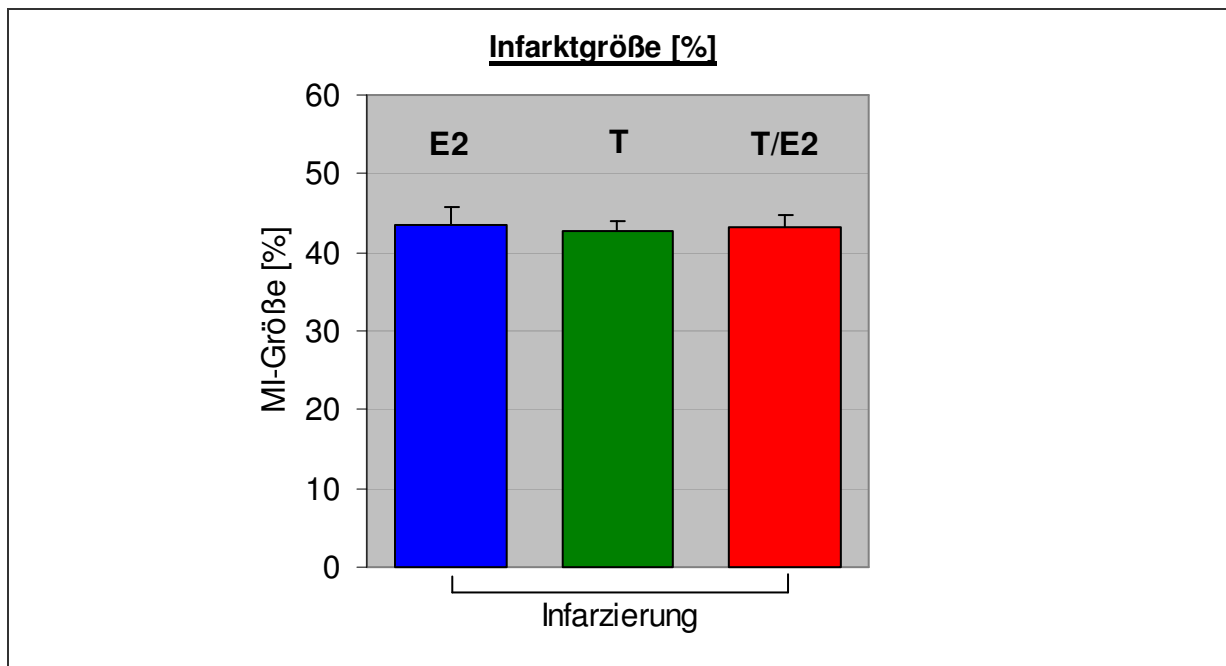


Abb. 8: Infarktgröße [%]

4.3. Gewichte

4.3.1. Körpergewichte

Die Körpergewichte der Woche 0 (KG 0), 2 (KG 2), 4 (KG 4), 8 (KG 8), 10 (KG 10) und 11 (KG 11) sind in Tab. 2 angegeben und in Abb. 9 dargestellt.

Übersicht über die Körpergewichte:

Parameter	Scheinfarziierung			Infarziierung		
	E2	T	T/E2	E2	T	T/E2
Anzahl n	15	15	14	10	14	17
KG 0 [g]	196±3	192±3	195±3	194±2	195±2	192±2
KG 2 [g]	207±4	243±4 ^{a, b}	217±5	197±2	241±3 ^{e, f}	202±3
KG 4 [g]	215±5	277±5 ^{a, c}	238±7	201±4	272±5 ^{e, f}	219±4
KG 8 [g]	240±8	309±8 ^{a, b}	258±7	247±12	301±6 ^{f, g}	245±6
KG 10 [g]	254±7	313±10 ^d	278±7	278±19	317±9 ^h	270±9
KG 11 [g]	271±7	318±9 ^d	288±5	261±13	320±8 ^g	285±9

Signifikanzen:
^a: E2_S vs. T_S mit p<0,001 ^b: T/E2_S vs. T_S mit p<0,05 ^c: T/E2_S vs. T_S mit p<0,001
^d: E2_S vs. T_S mit p<0,05 ^e: E2_{MI} vs. T_{MI} mit p<0,001 ^f: T/E2_{MI} vs. T_{MI} mit p<0,001
^g: E2_{MI} vs. T_{MI} mit p<0,05 ^h: T/E2_{MI} vs. T_{MI} mit p<0,05

Tab. 2: Übersicht über die Körpergewichte

Bei der Messung des Körpergewichts in Woche 0 (s. Tab. 2 und Abb. 9), das sich im Durchschnitt bei den einzelnen Versuchsgruppen im Bereich zwischen 192 und 196g befand, wurden zwischen den Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede festgestellt. Dagegen zeichnete sich bereits nach 2, 4 und 8 Wochen (s. Tab. 2 und Abb. 9) innerhalb der S- und MI-Gruppen eine signifikant stärkere Zunahme des Körpergewichts unter selektiver T-Behandlung gegenüber der Therapie mit E2 ab. Diese signifikant stärkere Zunahme des Körpergewichts unter reinem T-Einfluss wurde durch die kombinierte Gabe von T mit E2 abgeschwächt, so dass bei den mit T/E2 behandelten Versuchsreihen ein signifikant niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu den Versuchsgruppen unter T-Therapie registriert wurde. Der eben beschriebene Gewichtsverlauf in Abhängigkeit von der Hormontherapie wurde durch die Ergebnisse der Gewichtsmessung in Woche 10 und 11 (s. Tab. 2 und Abb. 9) bestätigt.

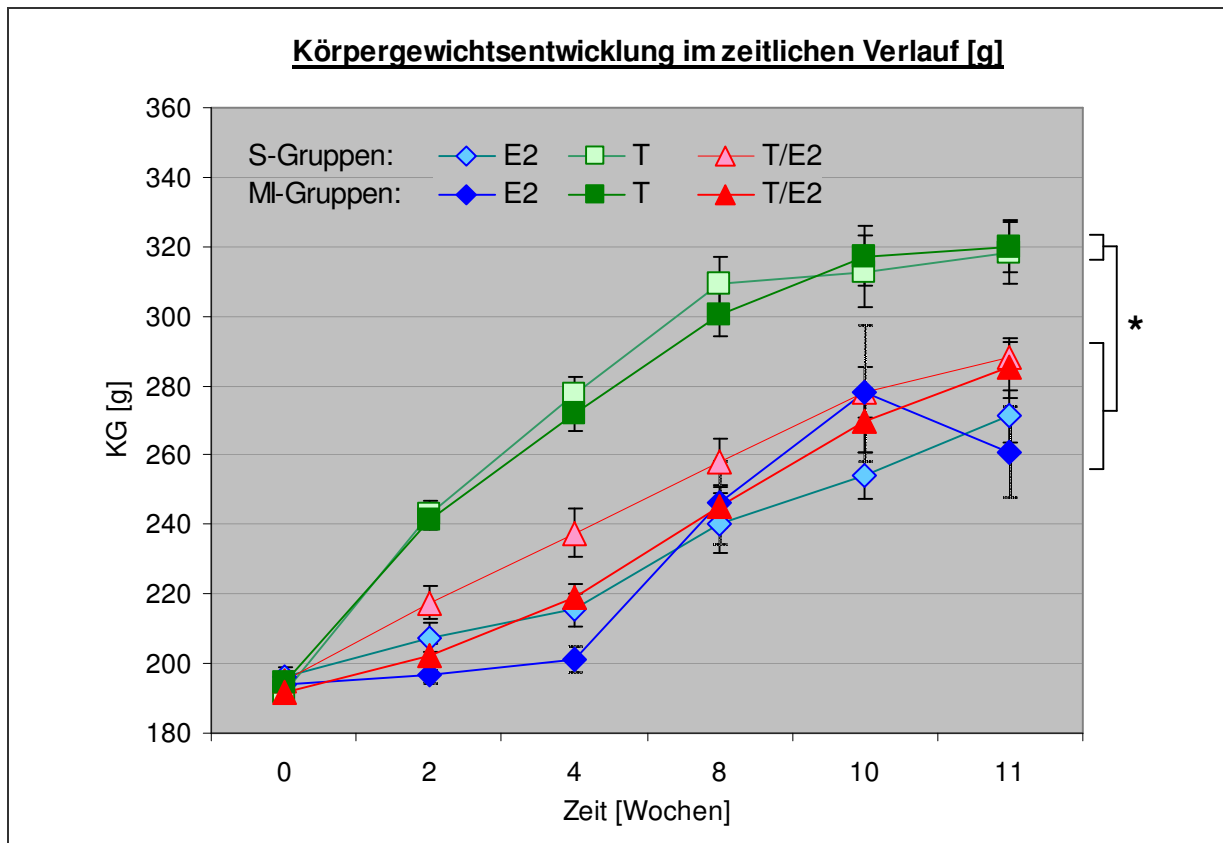


Abb. 9: Körpergewichtsentwicklung [g] im zeitlichen Verlauf

4.3.2. Herzgewichte

Die Messung des Gesamtherzgewichts (s. Abb.10) sowie der Einzelgewichte des linken (s. Abb. 11) und rechten Ventrikels (s. Abb. 12) ergab eine Zunahme bei den MI-Gruppen gegenüber den entsprechend hormonell behandelten S-Gruppen, wobei sich nur die Gewichtsunterschiede der selektiv mit T behandelten Versuchsreihen als signifikant erwiesen. Zwischen den S-Gruppen ergaben sich keine Unterschiede im Herzgewicht, während bei den MI-Gruppen unter reiner T-Behandlung im Vergleich zur E2-Substitution eine kardiale Gewichtszunahme sichtbar wurde, die in Bezug auf das Gewicht des gesamten Herzens und das Gewicht des linken Ventrikels signifikant war. Somit konnte neben einer postinfarziellen Gewichtszunahme des Herzens eine zusätzliche Steigerung des Herzgewichts unter reiner T-Behandlung belegt werden, die durch die gleichzeitige Gabe von T mit E2 abgemildert wurde. In Bezug auf das Gewicht des rechten Ventrikels wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nachgewiesen.

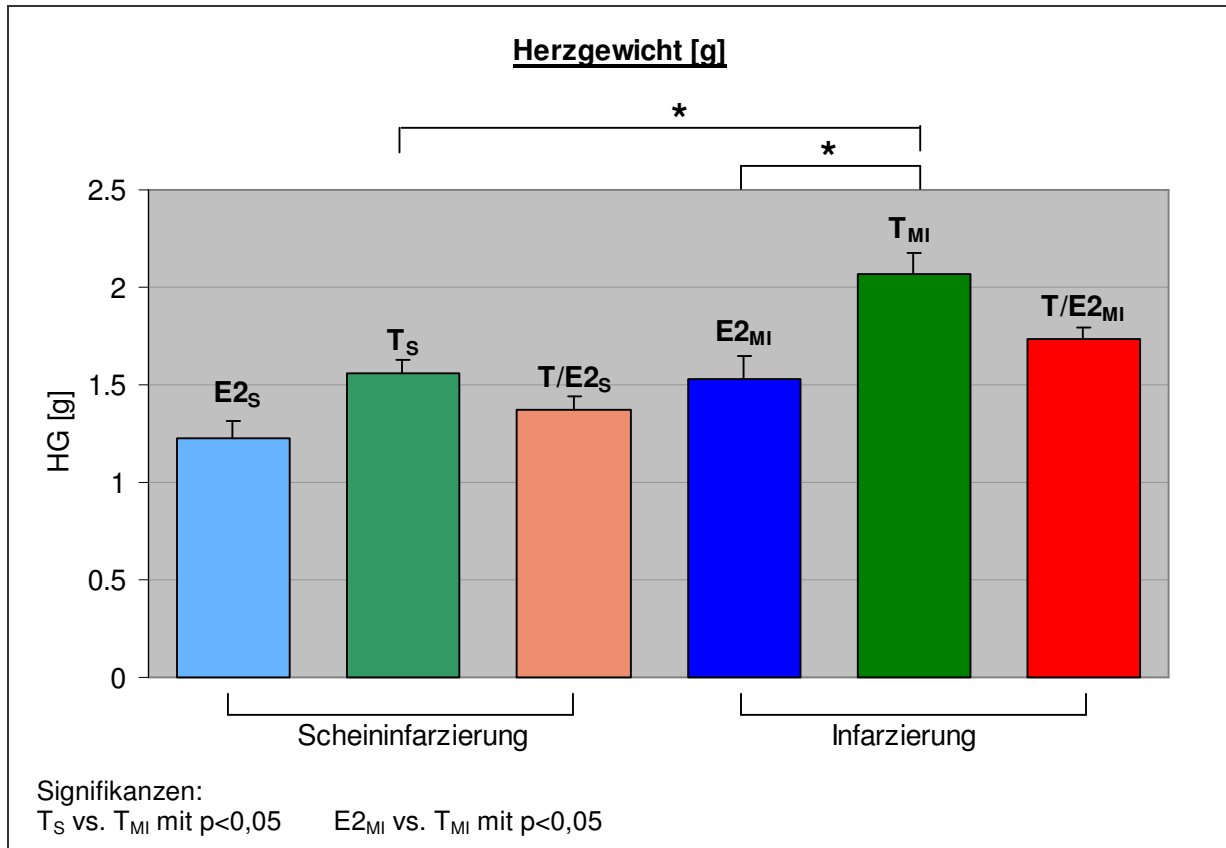


Abb. 10: Herzgewicht [g]

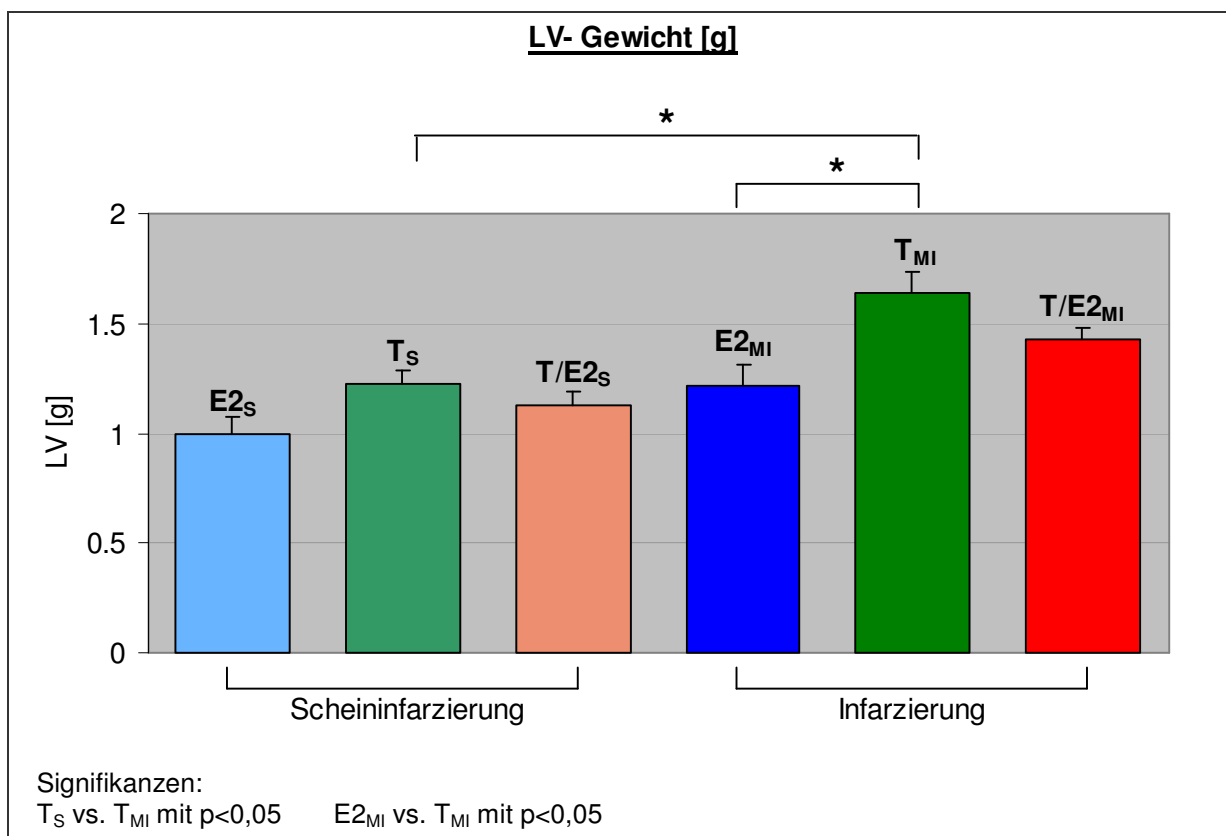


Abb. 11: Gewicht des linken Ventrikels [g]

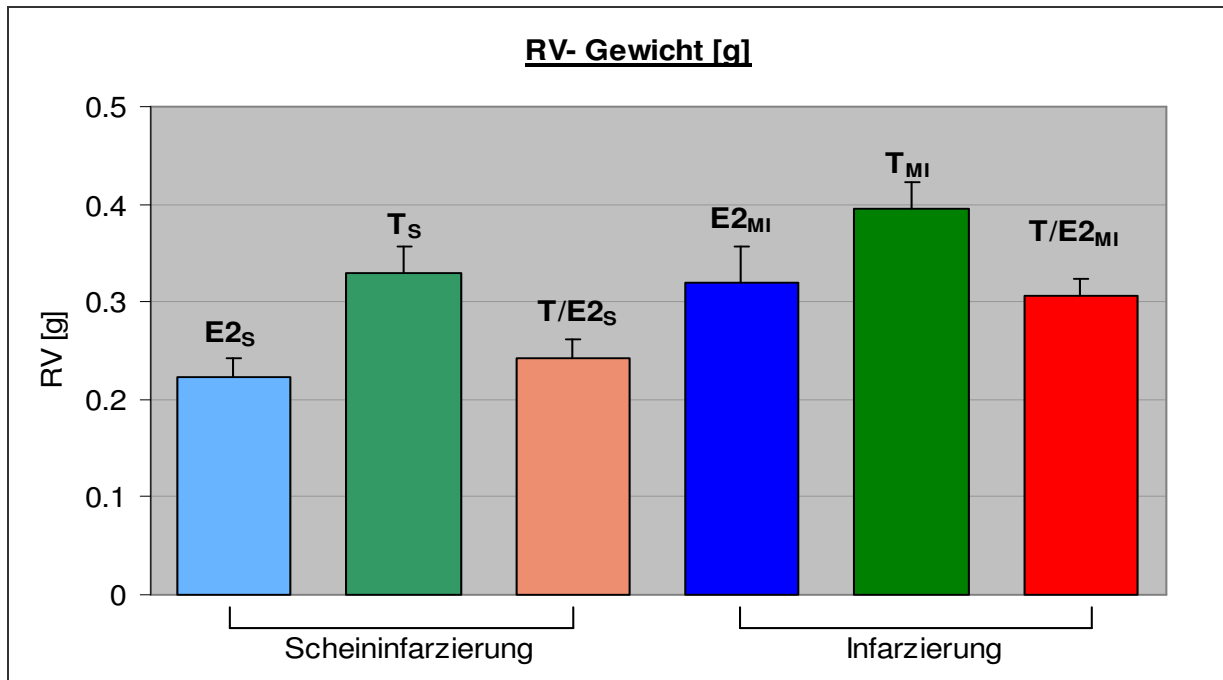


Abb. 12: Gewicht des rechten Ventrikels [g]

Zur Beurteilung einer kardialen Hypertrophie wurden das Gesamtherzgewicht sowie die Gewichte des jeweils linken und rechten Ventrikels in Beziehung zum Körpergewicht (HG/KG, LV/KG, RV/KG) gesetzt. Die dabei resultierenden Quotienten (s. Tab. 3) zeigten eine im Unpaired Student t-Test signifikante kardiale Hypertrophie der MI-Gruppen gegenüber den korrespondierenden S-Gruppen an. Zugleich wurde innerhalb der MI-Gruppen eine kardiale Hypertrophie des linken Ventrikels unter der Behandlung mit Testosteron gegenüber einer Substitution mit Östrogen nachgewiesen, die zwischen der E2- und der T/E2-Behandlung im Unpaired t-Test als Signifikanz sichtbar wurde.

Übersicht über die Herzgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht:

Parameter	Scheininfarzierung			Infarzierung		
	E2	T	T/E2	E2	T	T/E2
Anzahl n	13	14	10	7	11	15
(HG/KG)*1000	4,75±0,3	5,08±0,3	5,22±0,2	5,81±0,3 ^a	6,27±0,4 ^b	6,32±0,2 ^c
(LV/KG)*1000	3,90±0,3	4,06±0,2	4,36±0,2	4,55±0,2	5,04±0,4 ^b	5,19±0,1 ^{c, d}
(RV/KG)*1000	0,84±0,1	0,99±0,1	0,86±0,1	1,26±0,2 ^a	1,22±0,1 ^b	1,13±0,1 ^e

Signifikanzen (im Unpaired Student t-Test):
^a: E2_s vs. E2_{MI} mit p<0,05 ^b: T_s vs. T_{MI} mit p<0,05 ^c: T/E2_s vs. T/E2_{MI} mit p<0,01
^d: E2_{MI} vs. T/E2_{MI} mit p<0,05 ^e: T/E2_s vs. T/E2_{MI} mit p<0,05

Tab. 3: Übersicht über die Herzgewichte im Verhältnis zum Körpergewicht

4.3.3. Nierengewichte

Das Gesamtgewicht der linken und rechten Niere (s. Abb. 13), die wichtige Einflussgrößen im kardiovaskulären System darstellen, war in Woche 11 bei der unter selektivem T-Einfluss stehenden S-Gruppe signifikant und bei der mit der Kombinationstherapie aus T/E2 behandelten S-Gruppe tendenziell gegenüber der mit E2 substituierten S-Gruppe erhöht, während die MI-Gruppen sowohl unter T- als auch unter T/E2-Behandlung signifikant größere Nierengewichte im Vergleich zur E2-Therapie demonstrierten. Somit konnte unter reiner T-Behandlung und unter der T/E2-Kombinationstherapie eine Zunahme des Nierengewichts belegt werden, die in keinem Zusammenhang mit der Infarzierung stand.

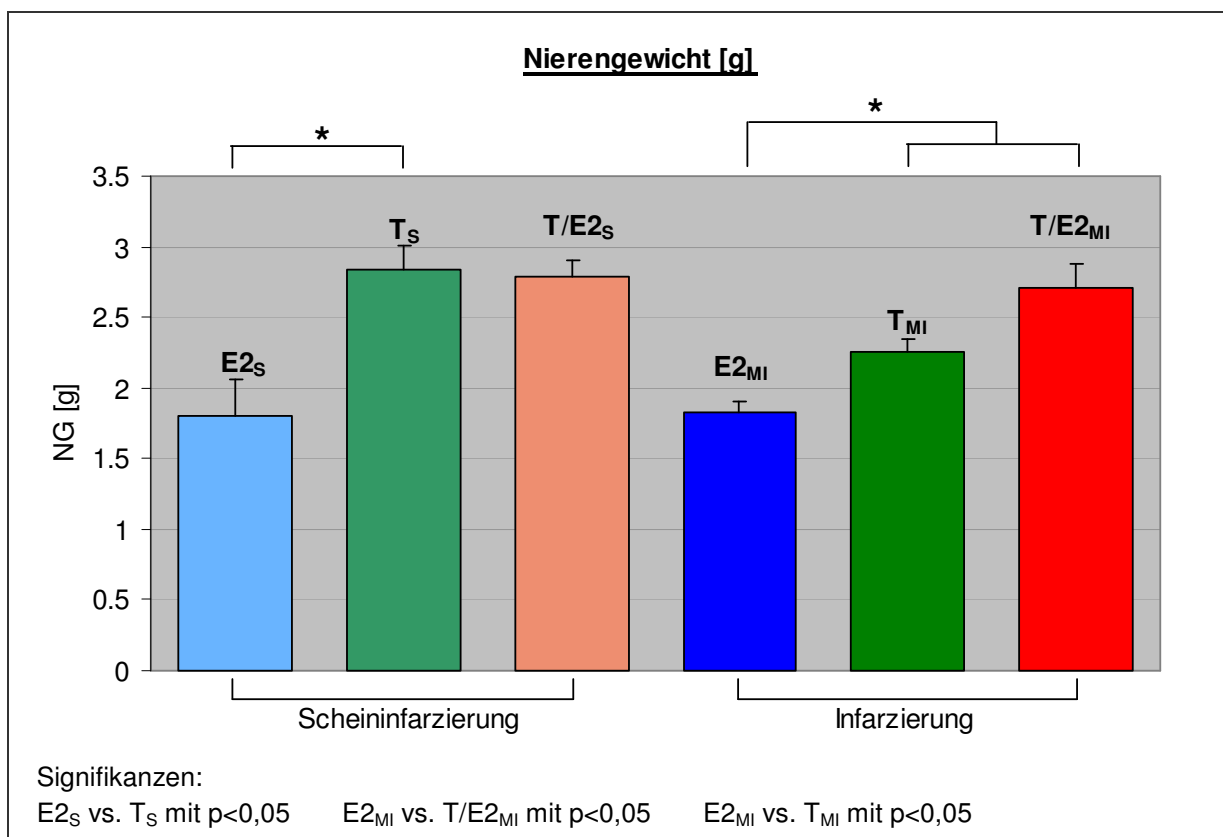


Abb. 13: Nierengewicht [g]

Die Berechnung des Quotienten aus Nieren- und Körpergewicht (s. Abb. 14) ergab bei den S- und MI-Gruppen einen Anstieg der mit T und T/E2 behandelten Versuchsgruppen gegenüber den mit E2 substituierten Versuchsreihen. Dadurch wurde bei den unter selektivem T- bzw. T/E2- Einfluss stehenden Versuchsgruppen eine renale Hypertrophie nachgewiesen, die sich bei den S-Gruppen zwischen der E2- und der T-Therapie und bei den MI-Gruppen zwischen der E2- und der T/E2-Behandlung als signifikant darstellte.

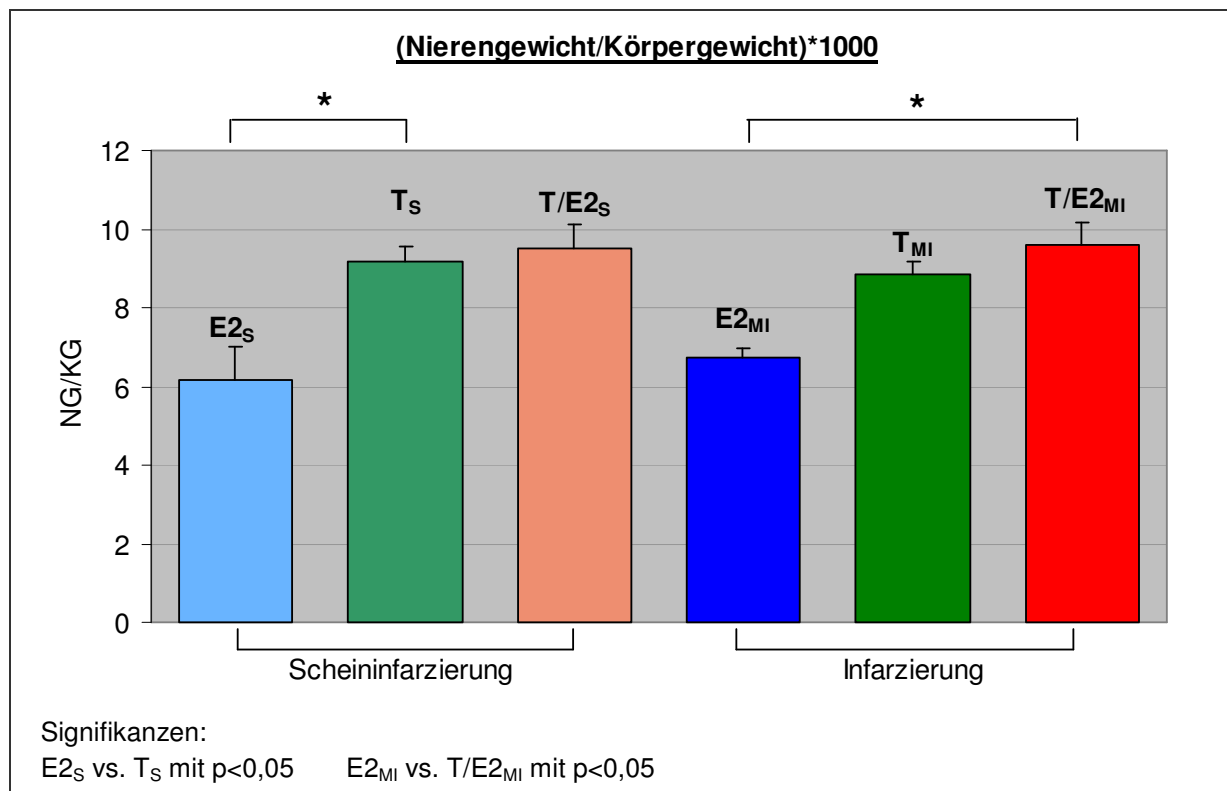


Abb. 14: Nierengewicht/Körpergewicht

4.4. Echokardiographie

Die Verkürzungsfraction (FS) des linken Ventrikels sowie der diastolische (EDD) und systolische Diameter (ESD) des linken Ventrikels sind in Tab. 4 gezeigt.

Übersicht über die Ergebnisse der Echokardiographie:

Parameter	Scheinfarzierung			Infarzierung		
	E2	T	T/E2	E2	T	T/E2
Anzahl n	19	19	14	10	15	16
FS [%]	43,8±2,0 ^a	43,8±1,1 ^b	48,1±2,5 ^c	33,4±4,2	21,8±2,2 ^d	19,3±1,8 ^f
EDD [mm]	7,0±0,3 ^a	6,8±0,3 ^b	7,2±0,3 ^c	8,6±0,6	9,9±0,3 ^d	9,8±0,3 ^e
ESD [mm]	4,0±0,3 ^a	4,1±0,2 ^b	3,8±0,3 ^c	5,9±0,7	7,7±0,3 ^d	8,1±0,4 ^f

Signifikanzen:
^a: E2_S vs. E2_{MI} mit p<0,05 ^b: T_S vs. T_{MI} mit p<0,01 ^c: T/E2_S vs. T/E2_{MI} mit p<0,01
^d: E2_{MI} vs. T_{MI} mit p<0,05 ^e: E2_{MI} vs. T/E2_{MI} mit p<0,05 ^f: E2_{MI} vs. T/E2_{MI} mit p<0,01

Tab. 4: Übersicht über die Ergebnisse der Echokardiographie

Die Verkürzungsfraction war bei allen MI-Gruppen gegenüber den entsprechenden S-Gruppen signifikant reduziert. Innerhalb der MI-Gruppen war die Verkürzungsfraction unter reiner T- und unter T/E2-Therapie gegenüber derjenigen unter E2-Behandlung signifikant reduziert, während bei den S-Gruppen keine vom Hormonstatus abhängigen Unterschiede verzeichnet wurden.

Die MI-Gruppen präsentierten als Ausdruck einer postinfarziellen Dilatation eine signifikante Zunahme des diastolischen und systolischen Diameters im Vergleich zu den S-Gruppen. Innerhalb der MI-Gruppen führte die T- und T/E2-Behandlung zu einer signifikanten Zunahme sowohl des diastolischen als auch des systolischen Durchmesser des linken Ventrikels, wodurch eine zusätzliche postinfarzielle Dilatation der mit T und T/E2 therapierten MI-Gruppen belegt wurde. Bei den S-Gruppen wurden durch die Hormonbehandlung keine Veränderungen induziert.

4.5. In-vivo-Hämodynamik

Der enddiastolische Druck des linken Ventrikels (LVEDP) und der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) sind in Tab. 5 zusammengefasst.

Übersicht über die Ergebnisse der Hämodynamik:

Parameter	Scheininfarzierung			Infarzierung		
	E2	T	T/E2	E2	T	T/E2
LVEDP [mmHg]	7,4±1,2	7,3±1,4	8,4±1,7	25,0±3,6 ^a	18,4±3,5 ^b	17,4±2,3 ^c
MAP [mmHg]	129±5	140±6	127±6	117±6	113±6 ^b	120±5

Signifikanzen:
^a: E2_S vs. E2_{MI} mit p<0,05 ^b: T_S vs. T_{MI} mit p<0,05 ^c: T/E2_S vs. T/E2_{MI} mit p<0,05

Tab. 5: Übersicht über die Ergebnisse der Hämodynamik

Alle MI-Gruppen demonstrierten einen signifikanten Anstieg des enddiastolischen Druckes im linken Ventrikels gegenüber den entsprechenden S-Gruppen, wohingegen der Hormonstatus keine wesentlichen Unterschiede hervorrief.

Hinsichtlich des mittleren arteriellen Blutdruckes zeigte sich ein Abfall der MI- im Vergleich zu den S-Gruppen, der sich bei den mit T behandelten Versuchsreihen als signifikant erwies. Weder innerhalb der S- noch der MI-Gruppen traten von der Hormontherapie abhängige Veränderungen des mittleren arteriellen Blutdruckes in Erscheinung.

4.6. Langendorff-Perfusion

Die Druck-Volumen-Kurve des linken Ventrikels, die für die Druckamplitude (LVDP) aufgezeichnet wurde, ist in Abb. 15 dargestellt. Die sich daraus ergebende maximal entwickelte Druckamplitude (LVDP max) und die dafür benötigte Vorlast der einzelnen Versuchsgruppen sind in Abb. 16 und Tab. 6 wiedergegeben.

Die Druck-Volumen-Kurven (s. Abb. 15) aller MI-Gruppen demonstrierten im Vergleich zu den entsprechenden S-Gruppen eine zu erwartende Verschiebung nach „rechts“ bzw. nach „unten“ entlang der X-Achse, wodurch sowohl eine Dilatation des linken Ventrikels als auch eine Einschränkung der systolischen Funktion nach Myokardinfarkt angezeigt wurden. Innerhalb der S-Gruppen hatte die Hormontherapie keinen signifikanten Einfluss auf die linksventrikuläre Druck-Volumen-Kurve. Dagegen wurde bei der selektiv mit T behandelten MI-Gruppe gegenüber der mit E2 therapierten MI-Gruppe eine signifikante Rechtsverschiebung der Druck-Volumen-Kurve sichtbar, die durch die kombinierte Gabe von T mit E2 in signifikantem Ausmaß verringert wurde. Diese signifikante Rechtsverschiebung belegte eine testosteroninduzierte zusätzliche Dilatation nach Myokardinfarkt und wurde in Abb. 16 anhand der Vorlast, die für das Erreichen der maximalen Druckamplitude benötigt wurde, in der Senkrechten aufgetragen.

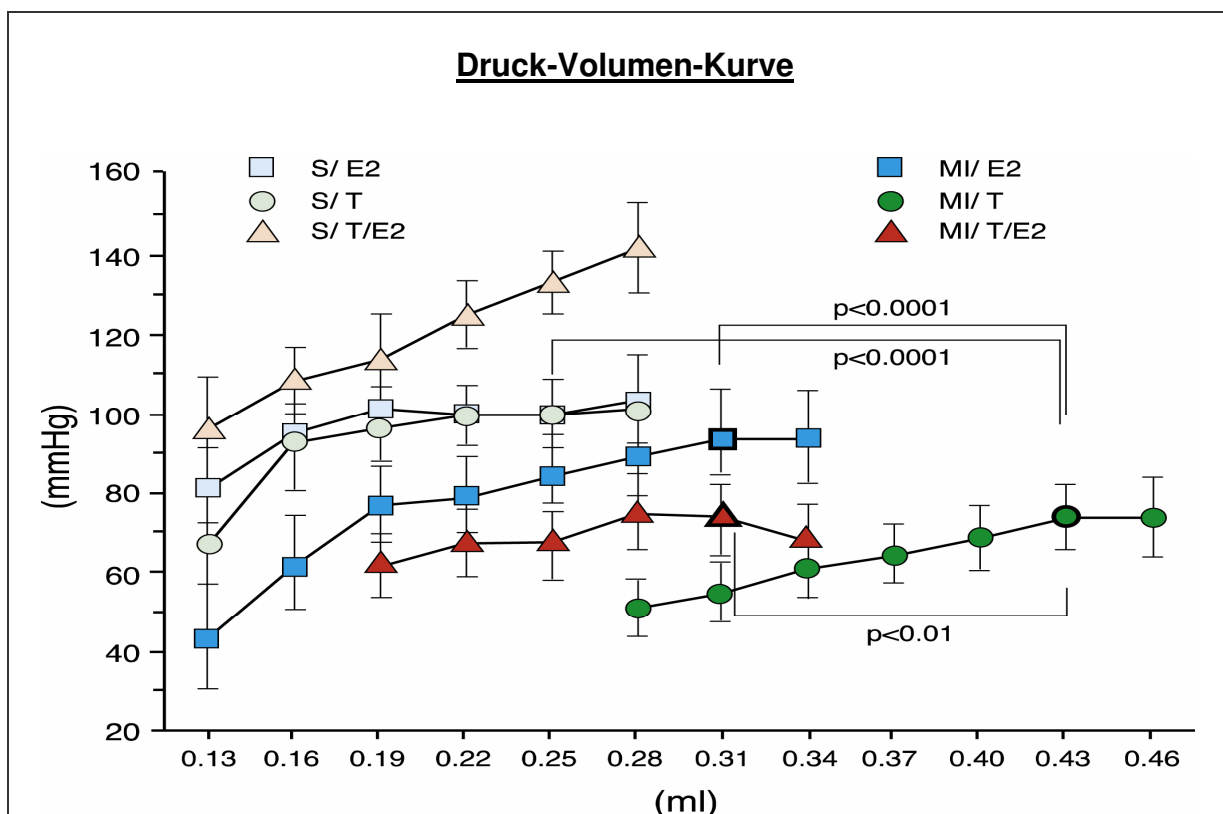


Abb. 15: Druck-Volumen-Kurve

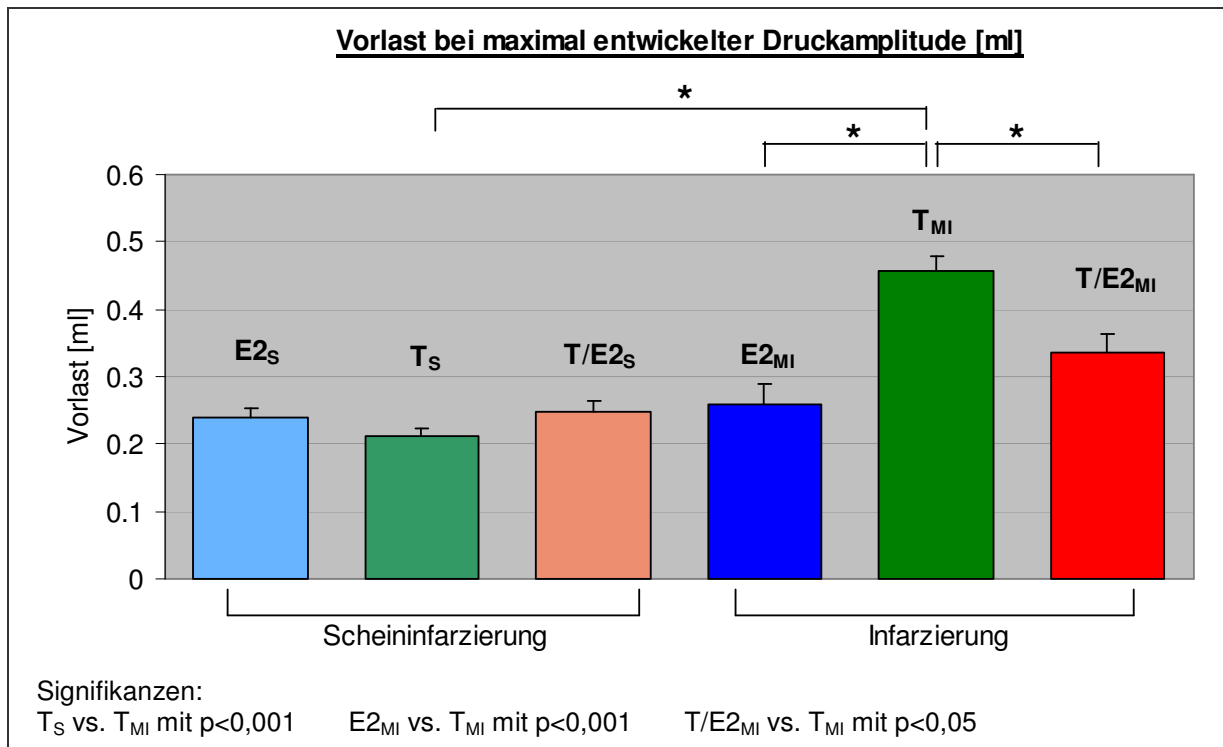


Abb. 16: Vorlast bei maximal entwickelter Druckamplitude [ml]

Die maximal entwickelte Druckamplitude (s. Tab. 6) war bei allen MI-Gruppen gegenüber den jeweiligen S-Gruppen reduziert, wobei sich der Unterschied bei den mit T/E2 therapierten Versuchsreihen als signifikant erwies. Innerhalb der S-Gruppen hatte der Hormonstatus keine signifikante Auswirkung auf die maximal entwickelte Druckamplitude, während die unter T-Einfluss stehende MI-Gruppe gegenüber der mit E2 behandelten MI-Gruppe eine tendenzielle Verringerung der maximal entwickelten Druckamplitude zu erkennen gab.

Übersicht über die Ergebnisse der Langendorff-Perfusion:

Parameter	Scheininfarzung			Infarzung		
	E2	T	T/E2	E2	T	T/E2
Anzahl n	8	9	10	8	12	16
LVDpmax [mmHg]	112±12	103±10	128±9	98±7	73±8	87±6 ^a
Vorlast [ml]	0,24±0,01	0,21±0,01	0,25±0,02	0,26±0,03	0,46±0,02 ^{b,c,d}	0,34±0,03

Signifikanzen
^a: T/E2_s vs. T/E2_{MI} mit p<0,05 ^b: T_s vs. T_{MI} mit p<0,001 ^c: E2_{MI} vs. T_{MI} mit p<0,001
^d: T/E2_{MI} vs. T_{MI} mit p<0,05

Tab. 6: Übersicht über die Ergebnisse der Langendorff-Perfusion

4.7. Planimetrie

Die Messung der Innenquerschnittsfläche des linken Ventrikels (s. Abb. 17) bewies bei den MI-Gruppen eine signifikante Zunahme unter der Therapie mit T vs. E2 und lieferte dadurch einen Beleg für die zusätzliche postinfarzielle Dilatation der unter chronischem T-Einfluss stehenden MI-Gruppe. Die gleichzeitige Applikation von T mit E2 führte zu einer Abschwächung der testosteroninduzierten zusätzlichen Dilatation nach Myokardinfarkt, weshalb sich die mit T/E2 therapierte MI-Gruppe in Bezug auf die Innenquerschnittsfläche des linken Ventrikels zwischen den beiden anderen MI-Gruppen befand.

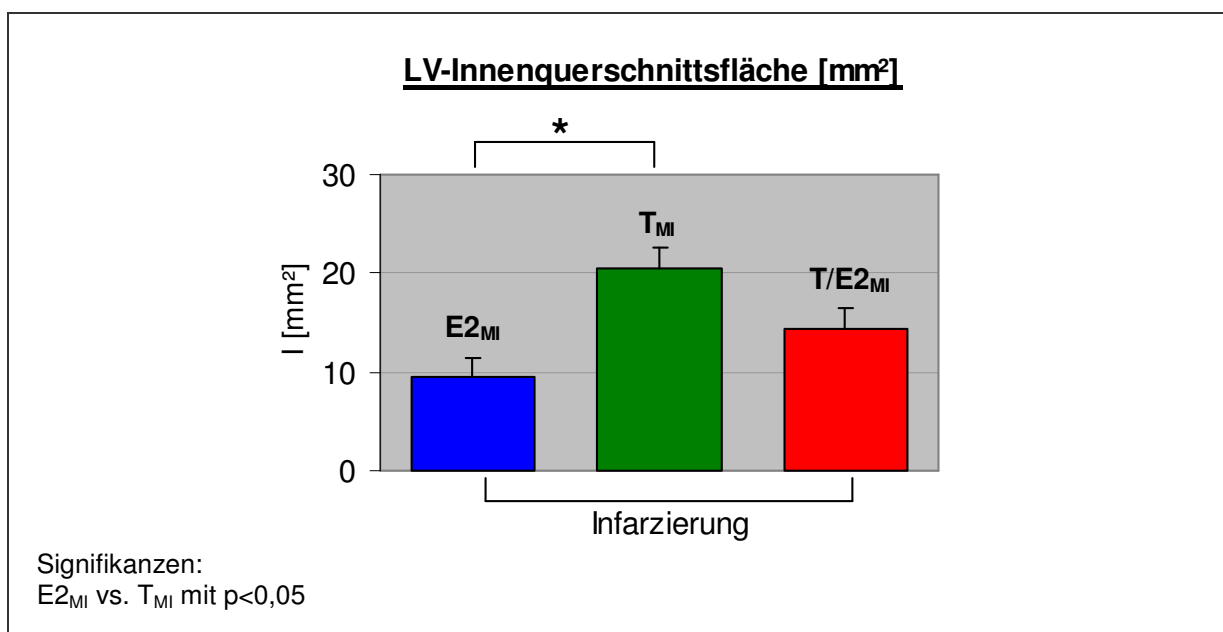


Abb. 17: Innenquerschnittsfläche des linken Ventrikels [mm²]

Sowohl auf die Dicke der linksventrikulären Vorderwand (AW) als auch auf die Septumdicke (PW) der MI-Gruppen zeigte die Hormonbehandlung keinen Effekt (s. Tab. 7: Übersicht über die Ergebnisse der Planimetrie).

Übersicht über die Ergebnisse der Planimetrie:

Parameter	Infarzierung		
	E2	T	T/E2
Anzahl n	6	10	11
AW [mm]	1,5±0,5	0,9±0,1	0,9±0,2
PW [mm]	4,0±0,2	4,1±0,2	3,7±0,2

Tab. 7: Übersicht über die Ergebnisse der Planimetrie

4.8. Molekularbiologische Untersuchungen

4.8.1. α/β -MHC-Quotient

Der Quotient aus α - und β -Myosin Heavy Chains (s. Abb. 18) war bei der mit E2 substituierten MI-Gruppe gegenüber der zugehörigen S-Gruppe signifikant vermindert, wohingegen der Vergleich der mit T bzw. T/E2 behandelten MI-Gruppen mit ihren hormonell entsprechenden S-Gruppen keine wesentlichen Unterschiede ergab. Zugleich wurde bei den mit T und T/E2 behandelten S-Gruppen im Vergleich zur mit E2 therapierten S-Gruppe eine tendenzielle Abnahme des α/β -MHC-Quotienten festgestellt, so dass die α/β -MHC-Quotienten der unter chronischem T- und T/E2-Einfluss stehenden S-Gruppen in der Folge eher auf dem Niveau der MI-Gruppen als auf dem der S-Gruppe unter E2-Therapie lagen. Innerhalb der MI-Gruppen wurden keine von der Hormontherapie abhängigen Veränderungen in Bezug auf den α/β -MHC-Quotienten registriert.

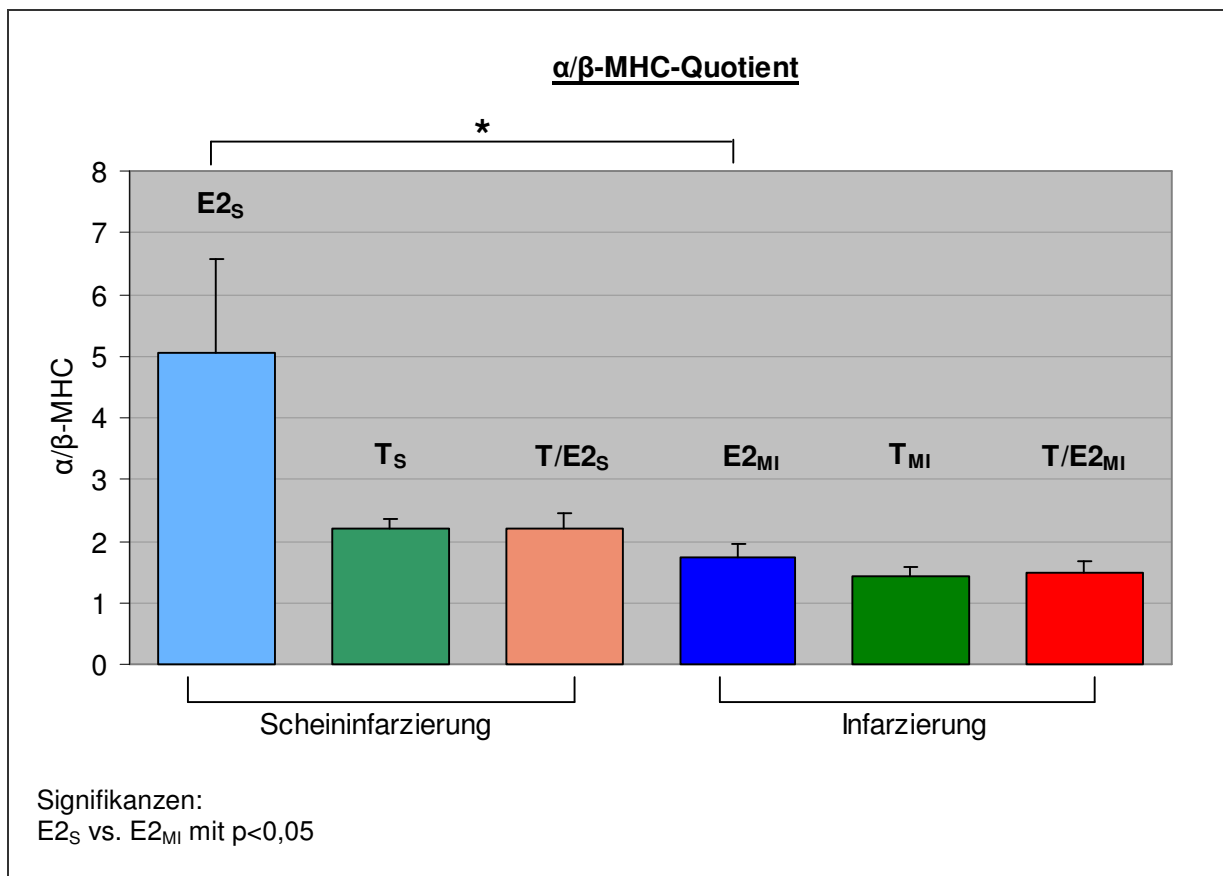


Abb. 18: α/β -MHC-Quotient

4.8.2. IGF-1/GAPDH-Expression

Die Messung von IGF-1 (s. Abb. 19) ergab nach Normierung auf GAPDH einen signifikanten Anstieg der mit reinem T behandelten S-Gruppe im Vergleich zur mit E2 behandelten S-Gruppe. Dieser IGF-1 Anstieg, der unter selektiver T-Behandlung zu beobachten war, wurde durch die gemeinsame Therapie von T mit E2 abgeschwächt, so dass sich bei der unter T/E2-Einfluss stehenden S-Gruppe gegenüber der lediglich mit T behandelten S-Gruppe ein signifikant geringerer Quotient aus IGF-1 und GAPDH manifestierte.

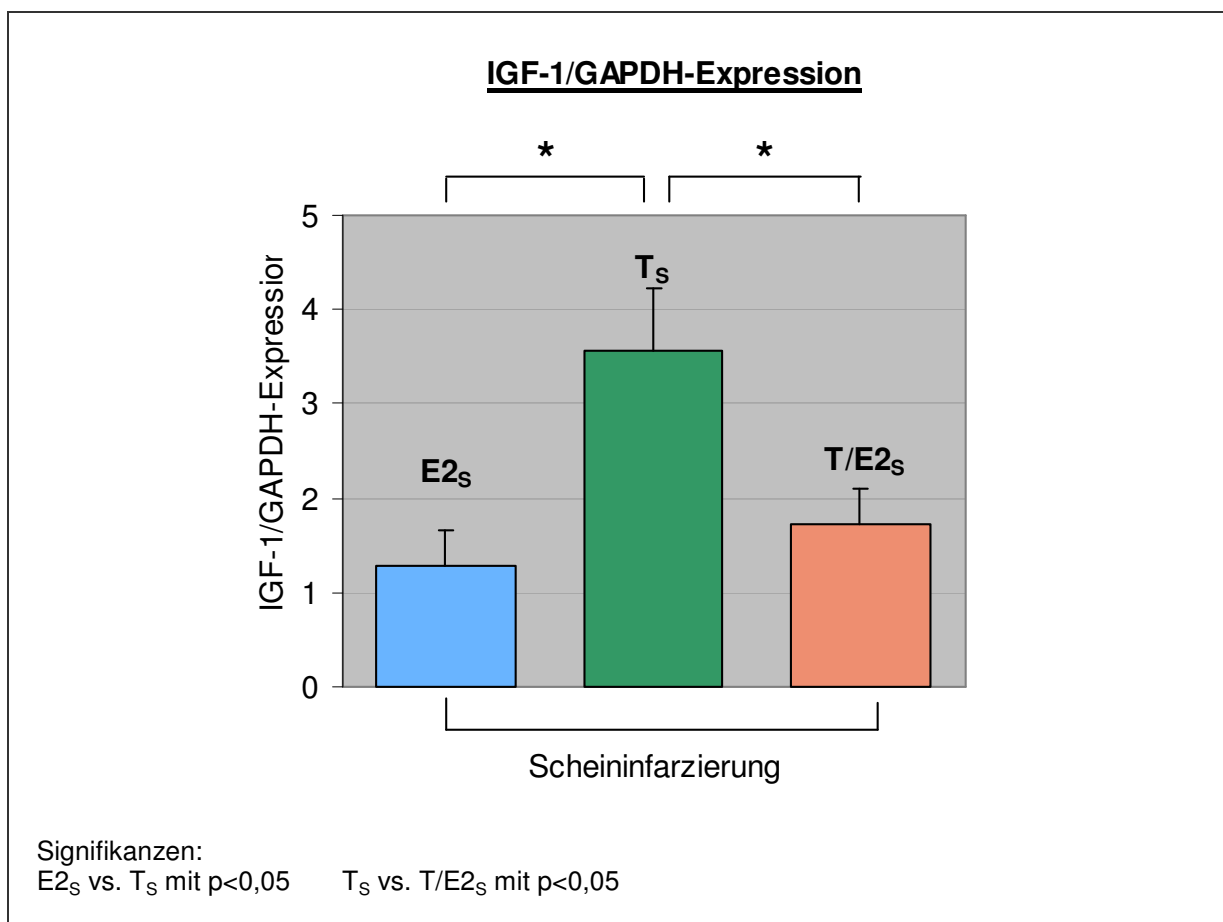


Abb. 19: IGF-1/GAPDH

4.8.3. Kollagengehalt der Wand des linken Ventrikels

Der Hormonstatus hatte nach Myokardinfarkt keine wesentlichen Auswirkungen auf den Kollagengehalt (Coll des LV) der Wand des linken Ventrikels (s. Abb. 20), so dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Myokardgruppen nachgewiesen wurden.

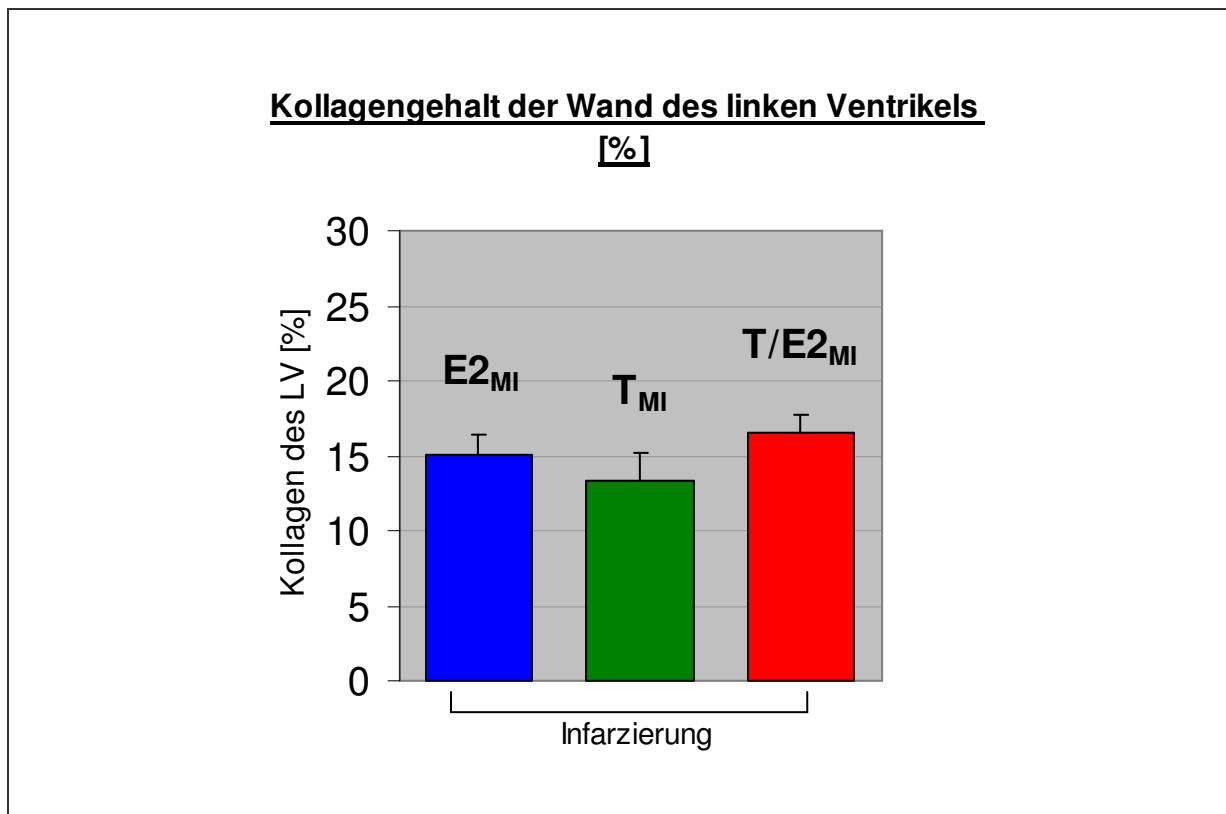


Abb. 20: Kollagengehalt des linken Ventrikels

5. Diskussion

Androgene wurden lange Zeit mit schädigenden Effekten auf das kardiovaskuläre System in Verbindung gebracht und deshalb zum Gegenstand zahlreicher Studien. Um die kardiovaskuläre Bedeutung von Testosteron beim männlichen Geschlecht abzuklären, wurden Untersuchungen an männlichen Ratten durchgeführt, die allerdings neutrale bis positive Effekte einer chronisch-anabolen Gabe des Hormons Testosteron auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt ergaben [6]. Über den Einfluss von Testosteron auf das postinfarzielle Remodeling beim weiblichen Geschlecht ist bislang nicht viel bekannt. Weil man allerdings weiß, dass Frauen mit Hyperandrogenämie ein erhöhtes kardiovaskuläres Risiko mit einer signifikant größeren Wahrscheinlichkeit für einen Myokardinfarkt haben [11], ist die Kenntnis über die pathophysiologischen Zusammenhänge der Testosteronwirkung auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt beim weiblichen Geschlecht von besonderer Bedeutung. Darüber hinaus stellt sich die Frage, ob sich bei weiblichen und männlichen Ratten unter supraphysiologischen Testosteronserumkonzentrationen die gleichen Wirkungen auf das postinfarzielle Remodeling am Herzen entfalten oder ob es geschlechtsspezifische Effekte von Testosteron gibt. Der Gegenstand der vorliegenden Studie war deshalb die Wirkung von Testosteron auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt bei weiblichen Ratten.

5.1. Mortalität der Infarktgruppen

Die Berechnung der akuten Mortalität nach Myokardinfarkt, die generell mit den Mortalitätsraten anderer Studien vergleichbar [53, 54] war, ergab keine vom Hormonstatus abhängigen signifikanten Unterschiede zwischen den MI-Gruppen (MI/ E2 vs. MI/ T vs. MI/ T/E2: 38% vs. 34 % vs. 31%).

Diese Ergebnisse bezüglich der akuten Mortalität der vorliegenden Studie stehen im Widerspruch zu einer früheren Untersuchung [55] an weiblichen Mäusen, die unter einer Testosterontherapie eine höhere akute Mortalitätsrate sowohl bei ovariectomierten als auch bei nicht-ovariectomierten Tieren im Vergleich zu einer Behandlung mit Placebo nachgewiesen hatte. Ein Grund für die Mortalitätsunterschiede könnte die zu geringe Anzahl der Tiere in beiden Studien sein, die eine endgültige Beurteilung des Testosteroneinflusses auf die Mortalitätsrate bei weiblichen Ratten nicht zulassen. Die Frage nach der Wirkung von Testosteron auf die akute Mortalität nach Myokardinfarkt bei weiblichen Ratten ist deshalb bislang nicht eindeutig geklärt, so dass sich Ansatzpunkte für zukünftige Studien bieten.

5.2. Körper-, Herz- und Nierengewichte

Bereits zwei Wochen nach Beginn der Hormontherapie demonstrierten die Versuchsreihen, bei denen ein Östrogenmangel kombiniert mit einer Hyperandrogenämie bestand, gegenüber den Versuchsgruppen unter selektiver E2-Therapie eine signifikant stärkere Zunahme des Körpergewichts. Diese im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen ausgeprägtere Zunahme des Körpergewichts unter reiner T-Behandlung nach Ovariectomie zog sich durch den gesamten Versuchsablauf und stand in keinem Zusammenhang mit der Infarzierung. Zahlreiche Studien am Tiermodell [12, 56-59] haben bereits belegt, dass ein Östrogenmangel bei weiblichen Ratten eine Zunahme des Körpergewichts begünstigt, und auch bei Frauen nach der Menopause wurde dieses Phänomen der Gewichtszunahme gehäuft beobachtet [60]. Daher liegt der Gedanke nahe, dass die verstärkt positive Gewichtsentwicklung der selektiv mit Testosteron behandelten Versuchsreihen in unserer Studie zumindest teilweise auf den Östrogenmangel nach Ovariectomie zurückzuführen ist. Bei den mit der Kombinationstherapie T/E2 behandelten Versuchsgruppen war wie bei den lediglich mit E2 substituierten Versuchsreihen keine derartige Zunahme des Körpergewichts zu verzeichnen- verantwortlich dafür könnte eine supprimierende Wirkung von E2 auf die Entwicklung des Körpergewichts sein, die sich schon in früheren Untersuchungen gezeigt hatte [61, 62].

Welche Rolle aber spielt eine Hyperandrogenämie für die Entwicklung des Körpergewichts beim weiblichen Geschlecht?

Denkbar wäre ein die E2-Wirkung antagonisierender Effekt von Testosteron, wodurch Testosteron die Signaltransduktion von E2 unterbrechen und somit quasi einen Östrogenmangelzustand mit der Folge einer Körpergewichtszunahme induzieren könnte. Solch ein die E2-Wirkung antagonisierender Testosteroneffekt könnte zugleich auch begründen, warum das Körpergewicht beim weiblichen Geschlecht sowohl nach Ovariectomie als auch unter Androgeneinfluss zunimmt, wie es in unserer Studie und in vorausgegangenen Arbeiten [12] zu beobachten war.

Weiterhin wurde in der aktuellen Studie postinfarziell unter reiner Testosterontherapie im Vergleich zur selektiven E2-Substitution eine signifikante Erhöhung des Gewichts des linken Ventrikels und des gesamten Herzens sichtbar, wobei die kombinierte Behandlung von Testosteron mit E2 eine Abschwächung der kardialen Gewichtszunahme nach Myokardinfarkt bewirkte. Diese Ergebnisse werden durch die Befunde früherer Untersuchungen gestützt, in denen E2 bei weiblichen Ratten ebenfalls eine supprimierende Wirkung auf die Entwicklung des Herzgewichts entfaltete, während die Behandlung mit Testosteron eine kardiale Gewichtszunahme induzierte [12]. Dabei stellt sich die Frage, auf

welche Art und Weise diese hormonelle Beeinflussung des Herzgewichts geschieht. Eine Antwort darauf könnte wiederum ein die E2-Wirkung antagonisierender Effekt von Testosteron bieten, der über eine Abschwächung des supprimierenden E2-Effektes auf das Herzgewicht zu einer Gewichtszunahme des linken Ventrikels und des Gesamtherzens nach Myokardinfarkt führen könnte.

So konnte in unserer Studie gezeigt werden, dass die selektive Gabe von Testosteron im Vergleich zur Therapie mit E2 oder T/E2 eine Zunahme des Körper- und des Herzgewichts nach Myokardinfarkt induzierte. Zudem konnte neben der postinfarziellen Hypertrophie der Herzen, charakterisiert durch eine Zunahme des Quotienten aus Herz- und Körpergewicht, innerhalb der Infarktgruppen eine Hypertrophie des linken Ventrikels unter der Behandlung mit Testosteron versus Östradiol nachgewiesen werden.

Sowohl unter T- als auch unter T/E2-Therapie wurden gegenüber einer reinen E2-Substitution nach Ovariectomie eine Zunahme des Nierengewichts und ein Anstieg des Quotienten aus Nieren- und Körpergewicht als Ausdruck einer verstärkten renalen Hypertrophie festgestellt, die offensichtlich in keinem Zusammenhang mit der Infarzierung standen. Grund dafür könnte wiederum ein inhibitorischer Einfluss von E2 sowie ein fördernder Einfluss von Testosteron auf die Gewichtsentwicklung der Niere sein.

Somit zeigen die vorliegenden Ergebnisse und vorausgegangene Studien eine positive Korrelation zwischen einer Therapie mit Testosteron und einer Gewichtszunahme des Körpers, des Herzens und der Niere. Dabei nahmen Östrogen und Testosteron in antagonistischer Art und Weise Einfluss, indem E2 eine Gewichtszunahme des Körpers, des Herzens und der Niere verhinderte, während Testosteron möglicherweise über eine Abschwächung der supprimierenden E2-Wirkung zu einer Gewichtszunahme des Körpers, des Herzens und der Niere führte.

5.3. Morphologie des linken Ventrikels

Ein Hauptbefund dieser Arbeit war, dass die chronisch-anabole Gabe des Hormons Testosteron unter Östrogenmangelbedingungen bei weiblichen Ratten nach Myokardinfarkt ein geschlechtsspezifisches Remodeling mit führender linksventrikulärer Dilatation induzierte. Diese zusätzliche postinfarzielle Dilatation des linken Ventrikels unter der Therapie mit Testosteron zeigte sich in-vivo in der Echokardiographie sowie in-vitro als Rechtsverschiebung der linksventrikulären Druck-Volumen-Kurven, die in der signifikant erhöhten Vorlast bis zum Erreichen der maximal entwickelten Druckamplitude bei der Langendorff-Perfusion zum Ausdruck kam. Außerdem wurde davon unabhängig die

zusätzliche postinfarzielle Dilatation unter der Therapie mit Testosteron durch die Ergebnisse der Planimetrie verifiziert, mit welcher eine signifikante Zunahme der Innenquerschnittsfläche des linken Ventrikels quantifiziert wurde. Eine solche die postinfarzielle Dilatation begünstigende Wirkung von Testosteron wurde bereits in einer früheren Untersuchung [55] festgestellt, die an ovariectomierten weiblichen Mäusen nach Myokardinfarkt ebenfalls eine signifikant stärkere Zunahme des diastolischen und systolischen Durchmessers des linken Ventrikels unter dem chronischen Einfluss von Testosteron versus Placebo nachweisen konnte. Unter selektiver E2-Therapie wurde in unserer Studie gegenüber der Behandlung mit reinem Testosteron eine Abschwächung der postinfarziellen Dilatation beobachtet- ein Zusammenhang, der bereits durch frühere Studien belegt wurde [62].

Welche Bedeutung hat diese zusätzliche testosteroninduzierte Dilatation nach Myokardinfarkt? Solomon et al. [63] haben bereits belegt, dass das Ausmaß einer postinfarziellen Dilatation umgekehrt proportional zur initialen Funktion des linken Ventrikels unmittelbar nach Myokardinfarkt ist. Dabei wurde gezeigt, dass die postinfarzielle Dilatation 9 Wochen nach Myokardinfarkt umso ausgeprägter ist, je geringer die Verkürzungsfraction und damit die Funktion des linken Ventrikels innerhalb der ersten 24 Stunden nach Myokardinfarkt ist. Da in unserer Studie die chronisch-anabole Behandlung mit Testosteron gegenüber einer Substitutionstherapie mit E2 eine zusätzliche postinfarzielle Dilatation zur Folge hatte, könnte im Gegenzug auf eine reduzierte Funktion des linken Ventrikels unmittelbar nach Myokardinfarkt bei den unter Testosteroneinfluss stehenden Versuchstieren geschlossen werden. Es wäre somit ein interessanter Ansatz zukünftiger Forschung, solch eine testosteroninduzierte Funktionseinschränkung des linken Ventrikels unmittelbar nach Myokardinfarkt beispielsweise durch eine frühzeitig nach der Infarzierung durchgeführte Echokardiographie zu quantifizieren, um dadurch eine mögliche androgeninduzierte Schädigung des Herzens bei weiblichen Ratten nachzuweisen.

Des Weiteren wurde in zahlreichen Untersuchungen [64-67] festgestellt, dass eine postinfarzielle Dilatation des LV mit einer Verschlechterung der Langzeitprognose nach MI und damit einer Verringerung der Überlebensrate assoziiert ist. Weil sich in unserer Studie eine zusätzliche postinfarzielle Dilatation bei den mit Testosteron behandelten MI-Gruppen zeigte, könnte man folgern, dass supraphysiologische Testosteronserumspiegel bei weiblichen Ratten nach Myokardinfarkt die Langzeitprognose negativ beeinflussen.

5.4. Funktion des linken Ventrikels

Die Verkürzungsfraktionen der mit T und T/E2 behandelten MI-Gruppen waren gegenüber der mit E2 substituierten MI-Gruppe nach Myokardinfarkt signifikant verringert. Eine vergleichbare Verminderung der postinfarziellen Funktion des linken Ventrikels unter Testosteroneinfluss wurde auch schon in vorausgegangenen Untersuchungen [55] dokumentiert, indem an ovariectomierten Mäusen nach Myokardinfarkt unter einer Behandlung mit Testosteron versus Placebo eine signifikant erniedrigte Ejektionsfraktion nachgewiesen wurde. Somit könnte man aus dieser testosteroninduzierten Verschlechterung der linksventrikulären Funktion nach Myokardinfarkt schließen, dass Testosteron auf das postinfarzielle Remodeling bei weiblichen Tieren einen negativen Einfluss ausübt.

5.5. α/β -MHC-Quotient und Kollagen

In der Vergangenheit wurde belegt [68], dass eine kardiale Schädigung zu einer verstärkten Expression von β -MHC und damit konsekutiv zu einer Abnahme des α/β -MHC-Quotienten führt. Dabei gilt die β -MHC-Form, die mit einer niedrigeren ATPase-Aktivität und einer geringeren Kontraktionsgeschwindigkeit des Herzens verbunden ist, als Marker einer pathologischen Hypertrophie [69-73]. In unserer Studie zeigte sich erwartungsgemäß eine signifikante Abnahme des α/β -MHC-Quotienten der mit E2 behandelten MI-Gruppe in Relation zur entsprechenden S-Gruppe.

Warum aber konnte eine solche Abnahme des α/β -MHC-Quotienten nicht bei den mit T bzw. T/E2 behandelten MI-Gruppen gegenüber den entsprechend hormonell therapierten S-Gruppen nachgewiesen werden? Eine Antwort auf diese Frage ist zumindest zum Teil der tendenzielle Abfall des α/β -MHC-Quotienten bei den mit T und T/E2 behandelten S-Gruppen gegenüber der lediglich mit E2 substituierten S-Gruppe. In der Folge befanden sich die mit T und T/E2 behandelten S-Gruppen eher auf dem Niveau der MI-Gruppen als auf dem der mit E2 substituierten S-Gruppe, weshalb sich die Unterschiede zwischen den mit T bzw. T/E2 therapierten S-Gruppen und den jeweiligen MI-Gruppen als nicht signifikant erwiesen.

Die Tatsache, dass in unserer Studie eine Hyperandrogenämie per se ebenso wie eine Infarzierung zu einem Switch von α - nach β -MHC bei weiblichen Ratten führte, könnte als Indiz für eine androgeninduzierte Schädigung des Herzens gewertet werden. Im experimentellen Tiermodell [74] an weiblichen Ratten hat sich bereits gezeigt, dass eine Ovariectomie im Vergleich zur Scheinoperation ebenfalls mit einem signifikanten Abfall der

α -MHC-Isoform und einem signifikanten Anstieg der β -MHC-Isoform einhergeht. Somit führen sowohl eine Ovariectomie als auch supraphysiologische Testosteronspiegel bei weiblichen Ratten zu einer verstärkten Expression der β -MHC-Isoform. Eine Erklärung dafür könnte analog zur Beeinflussung des Herzgewichts und zur postinfarziellen Dilatation ein die E2-Wirkung antagonisierender Testosteroneffekt am Herzen bieten, der durch eine Unterbrechung der durch E2 vermittelten Effekte quasi einen Östrogenmangelzustand-vergleichbar mit der hormonellen Situation nach Ovariectomie- induzieren könnte.

Ein weiterer Faktor, der für die negativen Effekte von Testosteron auf das postinfarzielle Remodeling verantwortlich sein könnte, ist der myokardiale Kollagengehalt. Es ist bekannt, dass Testosteron die Kollagensynthese in-vitro steigern kann [75], die ihrerseits eine wichtige Rolle im Prozess der Wundheilung und des kardialen Remodelings nach Myokardinfarkt spielt [76]. Allerdings wurde der myokardiale Kollagengehalt durch die Behandlung mit Testosteron in unserer Studie in Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen [55] nicht verändert, so dass Kollagen offensichtlich keinen wichtigen Faktor bei den testosteroninduzierten Effekten auf das postinfarzielle Remodeling bei weiblichen Ratten darstellt.

5.6. Geschlechtsspezifische Effekte von Testosteron

Frühere Studien [6], die im Versuchsablauf und der Methodik weitgehend der vorliegenden Studie entsprachen, hatten die Wirkung einer chronisch-anabolen Gabe von Testosteron auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt an männlichen Ratten untersucht. Wenn man die bei männlichen Ratten zu beobachtenden Effekte von Testosteron auf das postinfarzielle Remodeling mit denjenigen bei weiblichen Ratten in der aktuellen Studie vergleicht, zeigen sich wesentliche geschlechtsspezifische Unterschiede (s. Tab. 8).

Geschlechtsspezifische Effekte von Testosteron bei weiblichen und männlichen Ratten

Parameter	Weibliche Ratten	Männliche Ratten
Körpergewicht [g]	↑	↓
Absolutes Gewicht des linken Ventrikels nach MI [g]	↑	→
Verkürzungsfraction des linken Ventrikels nach MI [%]	↓	→
Diameter (diastolisch und systolisch) des linken Ventrikels nach MI [mm]	↑	→
Linksventrikulärer enddiastolischer Druck in-vivo [mmHg] nach MI	→	↓
α/β-MHC-Quotient des linken Ventrikels	↓ (tendenziell)	↑

Tab. 8: Geschlechtsspezifische Effekte von Testosteron bei weiblichen und männlichen Ratten

Während die isolierte Testosteronbehandlung unabhängig von der Infarzierung bei weiblichen Ratten eine signifikant stärkere Gewichtszunahme des Körpers im Vergleich zur E2-Substitution und zur T/E2-Kombinationstherapie induzierte, führte die Gabe von Testosteron im Vergleich zu Placebo bei männlichen Ratten sowohl bei den infarzierten als auch bei den nicht infarzierten Versuchstieren zu einer signifikant verminderten Körpergewichtszunahme [6].

Die absoluten Gewichte des linken Ventrikels und des Gesamtherzens nahmen unter reiner Testosteronbehandlung gegenüber der Kombinationstherapie aus Testosteron und E2 sowie gegenüber der ausschließlichen Behandlung mit E2 bei weiblichen ovariectomierten Ratten nach Myokardinfarkt signifikant zu, wohingegen sich bei männlichen Ratten kein relevanter Einfluss von Testosteron auf die Entwicklung der absoluten Herzgewichte zeigte [6].

Während sich bei den weiblichen Ratten in der Echokardiographie, der Langendorff-Perfusion und der Planimetrie eine zusätzliche postinfarzielle Dilatation unter der Behandlung mit Testosteron manifestierte, wurde bei den männlichen Ratten kein entscheidender Testosteroneinfluss auf den Diameter des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt und damit keine zusätzliche postinfarzielle Dilatation unter der Therapie mit Testosteron nachgewiesen [6].

Durch Studien [63] wurde bereits belegt, dass die postinfarzielle Dilatation umso ausgeprägter ist, je geringer die initiale Funktion des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt war. Deshalb könnte man aufgrund der zusätzlichen postinfarziellen Dilatation unter dem Einfluss von Testosteron bei weiblichen Ratten auf eine unmittelbar nach Myokardinfarkt sehr schlechte kardiale Funktion dieser Tiere schließen. Bei den männlichen Ratten unter Testosterontherapie dagegen könnte man aus dem nahezu unveränderten Diameter des linken Ventrikels acht Wochen nach Myokardinfarkt ableiten, dass der chronische Einfluss von Testosteron die linksventrikuläre Funktion direkt nach Myokardinfarkt nicht beeinträchtigt. Wie bereits erwähnt ergaben wissenschaftliche Untersuchungen [64-67] einen Zusammenhang zwischen einer zunehmenden postinfarziellen Dilatation des linken Ventrikels und einer Verschlechterung der Langzeitprognose nach Myokardinfarkt. Weil sich in unserer Studie an weiblichen Ratten unter der Therapie mit Testosteron eine zusätzliche postinfarzielle Dilatation manifestierte, könnte man folgern, dass supraphysiologische Testosteronserumspiegel bei weiblichen Ratten nach Myokardinfarkt langfristig die Mortalität erhöhen und damit negative kardiale Effekte ausüben. Dagegen könnte die Tatsache, dass sich bei männlichen Ratten unter Testosterontherapie keine zusätzliche postinfarzielle Dilatation der Herzen zeigte, für einen neutralen Effekt supraphysiologischer Testosteronspiegel auf die Langzeitprognose nach Myokardinfarkt bei männlichen Ratten sprechen.

Mittels Echokardiographie wurde bei den unter Testosteroneinfluss stehenden weiblichen Ratten gegenüber der Behandlung mit Östradiol eine signifikant reduzierte Verkürzungsfraction erfasst, während bei männlichen Ratten ein neutraler Effekt von Testosteron auf die Verkürzungsfraction belegt wurde [6]. Damit könnte man bei weiblichen im Gegensatz zu männlichen Ratten aufgrund der Messung der Verkürzungsfraction auf einen negativen Effekt von Testosteron auf das postinfarzielle Remodeling schließen.

Die Gabe von Testosteron führte bei weiblichen, nicht-infarzierten Ratten zu einem Abfall des α/β -MHC-Quotienten. Dabei lag der resultierende α/β -MHC-Quotient der mit Testosteron behandelten nicht-infarzierten Versuchsgruppen eher auf dem Niveau der MI-Gruppen als auf

dem der nicht-infarzierten Kontrollgruppe unter Östradiol-Behandlung. Im Gegensatz zu den weiblichen Ratten konnte an männlichen nicht-infarzierten Ratten ein Zusammenhang zwischen einer supraphysiologischen Testosterontherapie und einem signifikanten Anstieg des α/β -MHC-Quotienten nachgewiesen werden [6], der in erster Linie auf eine verstärkte Expression der α -MHC-Isoform zurückzuführen und gleichzeitig mit einer verbesserten kardialen Leistungsfähigkeit vergesellschaftet war. Erniedrigte Testosteronkonzentrationen nach Orchiektomie gingen bei männlichen Ratten mit einem Abfall des α/β -MHC-Quotienten einher [74]. Folglich kann sowohl der Anstieg des α/β -MHC-Quotienten unter einer chronischen Behandlung mit Testosteron als auch der Abfall des α/β -MHC-Quotienten bei männlichen Ratten mit Testosterondefizit als Hinweis auf einen positiven Testosteroneffekt am Herzen dienen.

Sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Ratten zeigte sich unter der Behandlung mit Testosteron ein Anstieg von IGF-1. Einige Untersuchungen [77-80] in der Vergangenheit haben bereits einen kardioprotektiven Effekt von IGF-1 belegt, der beispielsweise das Ausmaß des Myozytenuntergangs nach Herzinfarkt reduziert und die Dilatation, den Wandstress und die Hypertrophie des Herzens nach Myokardinfarkt günstig beeinflusst. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass IGF-1 die Proteinkinase Akt zu Phospho-Akt aktiviert, welche ihrerseits die Apoptose in kultivierten Kardiomyozyten inhibiert und die kardiale Schädigung nach Ischämie-Reperfusion vermindert [81, 82].

Deshalb könnten die neutralen bis positiven Effekte von Testosteron auf das kardiale Remodeling bei männlichen Ratten indirekt durch IGF-1/Phospho-Akt vermittelt sein. Andererseits aber stellt sich die Frage, warum es bei weiblichen Ratten unter Testosterontherapie ebenfalls zu einem IGF-1-Anstieg kam, ohne dass sich die bei männlichen Ratten zu beobachtenden kardioprotektiven Effekte zeigten. Ein denkbarer Grund dafür könnte sein, dass Testosteron bei weiblichen Ratten die Signaltransduktion distal von IGF-1 unterbricht, indem Testosteron beispielsweise die Phosphorylierung von Akt und damit die protektive Wirkung von IGF-1/Phospho-Akt aufs Herz verhindern könnte. Eine sehr interessante Aufgabe weiterführender Studien wäre es daher, Phospho-Akt und auch Phospho-Forkhead, eines der distalen Zielmoleküle in der von Phospho-Akt ausgelösten Signalkaskade, unter einer Therapie mit Testosteron versus Placebo bei weiblichen Ratten zu quantifizieren. So könnte man Aufschluss darüber gewinnen, ob es unter der Therapie mit Testosteron bei weiblichen Ratten zu einer Unterbrechung der Signaltransduktion von IGF-1 am Herzen kommt, wodurch ein kardioprotektiver Effekt von IGF-1 verhindert werden könnte.

Abgesehen davon könnte Testosteron bei weiblichen Ratten über einen von IGF-1 unabhängigen Mechanismus zu negativen kardialen Effekten führen. Bislang fehlen allerdings

eindeutige Daten zum allgemeinen Mechanismus, über den Testosteron auf das kardiale Remodeling am Herzen von sowohl weiblichen als auch männlichen Ratten wirkt. Festzuhalten bleibt jedoch, dass Testosteron auf das kardiale Remodeling bei weiblichen und männlichen Ratten unterschiedlich wirkte. Damit stellt sich die Frage, wie diese geschlechtsspezifischen Effekte und ein damit verbundener sexueller Dimorphismus von Testosteron zustande kommen könnten.

Es gibt bereits andere Beispiele aus dem Bereich der Therapie des postinfarziellen Remodelings am Herzen, die einen sexuellen Dimorphismus belegen. In früheren Untersuchungen wurde am Beispiel der Therapie mit ACE-Hemmern nachgewiesen, dass Frauen von einer solchen Behandlung nach Myokardinfarkt weniger profitieren als Männer [83, 84]. Als möglicher Grund dafür wurde in früheren Studien [85] nachgewiesen, dass bei weiblichen Ratten die diastolische Füllung des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt weniger beeinträchtigt und die postinfarzielle Hypertrophie der nicht vom Infarkt betroffenen Hinterwand am linken Ventrikel geringer ausgeprägt sind als bei männlichen Ratten. Weil aber einer der Haupteffekte einer Therapie mit ACE-Hemmern [86] in einer Verbesserung des restriktiven diastolischen Füllungsmusters und in einer Abmilderung der reaktiven Hypertrophie nach Myokardinfarkt besteht, ist die Therapie mit ACE-Hemmern nach Myokardinfarkt bei weiblichen Ratten möglicherweise weniger effektiv als bei männlichen Ratten. Eine molekularbiologische Ursache dieser geschlechtsspezifischen Effekte von ACE-Hemmern könnte eine geschlechtsspezifische Expression des Enzyms ACE sein, wie in weiterführenden Untersuchungen [87] gezeigt werden konnte. Dabei wurde bei adulten weiblichen im Vergleich zu altersentsprechenden männlichen Ratten sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene ein geringerer Gehalt an ACE nachgewiesen, der für die an weiblichen Ratten zu beobachtende geringere Wirksamkeit von ACE-Hemmern verantwortlich sein könnte.

Wenn man diese an ACE-Hemmern gewonnenen Ergebnisse auf die Therapie mit Testosteron überträgt, könnte man annehmen, dass Testosteron bei weiblichen und männlichen Ratten ebenfalls auf geschlechtsspezifische Formen des postinfarziellen Remodelings verbunden mit einem unterschiedlichen Genexpressionsmuster trifft und deshalb zu unterschiedlichen Effekten führt. In experimentellen Vergleichsstudien zwischen weiblichen und männlichen Ratten wurden Unterschiede im mRNA-Gehalt für wichtige kardiale Proteine dokumentiert [88], indem beispielsweise ein höherer mRNA-Gehalt für die kontraktilen Proteine α - und β -MHC in den Herzen von adulten weiblichen Ratten im Vergleich zu entsprechenden männlichen Tieren nachgewiesen wurde. Obwohl diese Ergebnisse auf geschlechtsspezifische Unterschiede in der Expression verschiedener Gene am Herzen von adulten Ratten hinweisen, konnten keine Unterschiede im mRNA-Level für kardiale Proteine zwischen neonatalen

weiblichen und männlichen Ratten gezeigt werden. Dass diese geschlechtsspezifischen Phänomene erst bei adulten Ratten auftreten, weist auf eine Regulation der kardialen Genexpression durch Sexualhormone hin, die damit ursächlich an Unterschieden in der kardialen Reaktivität und Anpassungsfähigkeit zwischen weiblichen und männlichen Ratten beteiligt sein und damit einen sexuellen Dimorphismus von Testosteron bedingen könnten. Weil jedoch bis heute nicht eindeutig geklärt ist, wie der sexuelle Dimorphismus von Testosteron beim kardialen Remodeling zustande kommt, sind in diesem Bereich weiterführende Studien nötig.

5.7. Einschränkungen

Die Aussagekraft der vorliegenden Studie ist aus einigen Gründen eingeschränkt. Eine Limitation ist die geringe Anzahl der Tiere pro Versuchsgruppe, weshalb alle Ergebnisse mit der notwendigen Zurückhaltung gewertet und durch weiterführende Untersuchungen bestätigt werden sollten. Zudem wurden einige mögliche Nebenwirkungen von Testosteron, wie zum Beispiel der Einfluss von Testosteron auf das Gerinnungssystem und Lipidveränderungen, in der aktuellen Studie nicht berücksichtigt. Diese Nebenwirkungen von Testosteron stellen unabhängige eigene Risikofaktoren für kardiovaskuläre Erkrankungen dar und könnten das postinfarzielle Remodeling am Herzen beeinflussen. Außerdem kann Testosteron zu Östrogen aromatisiert werden, weshalb die in dieser Studie beobachteten Effekte auf das kardiovaskuläre System nicht allein auf die Androtherapie zurückgeführt werden könnten, sondern das Ergebnis von sowohl androgener als auch östrogenen Aktivität sein könnten. Darüber hinaus könnten auch Interaktionen zwischen Testosteron und Angiotensin bzw. Endothelin [89-90] an den kardialen Wirkungen von Testosteron beteiligt sein, die in unserer Studie keine Berücksichtigung fanden.

6. Zusammenfassung

In den letzten Jahren rückten Androgene verstärkt ins Zentrum der Diskussion, weil sie mit negativen Wirkungen auf das kardiovaskuläre System assoziiert wurden. Ein methodisches Problem vieler Studien bestand jedoch darin, dass individuelle Eigenschaften (genetische Prädisposition, Alter, Ernährungs- bzw. Trainingszustand) und Umweltfaktoren (Art des Androgenderivats, eiweißreiche Kost, gleichzeitige Einnahme anderer Hormonpräparate) unberücksichtigt blieben. Zudem wurde oftmals keine Trennung nach dem Geschlecht vorgenommen. Zur Erforschung der kardiovaskulären Bedeutung von Testosteron wurden daher Untersuchungen an männlichen Ratten durchgeführt, die neutrale bis positive Effekte des Hormons Testosteron auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt ergaben. Dagegen ist über den Einfluss von Testosteron auf das postinfarzielle Remodeling beim weiblichen Geschlecht bis heute nicht viel bekannt. Deshalb war es das Ziel dieser Arbeit, die Effekte von Testosteron auf das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt bei weiblichen Ratten zu untersuchen.

Dazu wurden weibliche Wistar-Ratten nach Ovariectomie physiologisch mit Östradiol substituiert, selektiv mit supraphysiologischen Dosierungen von Testosteronundecanoat behandelt oder mit einer Kombination aus Östradiol und Testosteronundecanoat therapiert. In Woche 2 nach Beginn der Hormonbehandlung wurde eine Scheininfarzierung bzw. Infarzierung durchgeführt, in Woche 10 erfolgte eine Echokardiographie und in Woche 11 fanden hämodynamische Untersuchungen sowie die Perfusion der Herzen nach Langendorff statt. Im Anschluss wurden molekularbiologische Bestimmungen des α/β -MHC-Quotienten, von IGF-I und des Kollagengehalts am Herzen vorgenommen.

Der Hauptbefund dieser Studie war, dass die chronisch-anabole Gabe des Hormons Testosteron bei weiblichen Ratten ein geschlechtsspezifisches Remodeling mit führender linksventrikulärer Dilatation nach Myokardinfarkt induzierte. Diese zusätzliche postinfarzielle Dilatation des linken Ventrikels unter der Behandlung mit Testosteron wurde in der Echokardiographie und der Rechtsverschiebung der linksventrikulären Druck-Volumen-Kurven bei der Langendorff-Perfusion sichtbar, die mit einer signifikant erhöhten Vorlast bis zum Erreichen der maximalen Druckamplitude des linken Ventrikels verbunden war. Unabhängig davon zeigte sich die zusätzliche testosteroninduzierte Dilatation nach Myokardinfarkt in der Planimetrie durch eine signifikante Zunahme der Innenquerschnittsfläche des linken Ventrikels. Studien in der Vergangenheit haben bereits einen Zusammenhang zwischen einer postinfarziellen Dilatation des linken Ventrikels und einer Verschlechterung der Langzeitprognose nach Myokardinfarkt belegt, weshalb die

zusätzliche testosteroninduzierte Dilatation des linken Ventrikels nach Myokardinfarkt als Indiz für einen negativen Testosteroneffekt auf den Prozess des postinfarziellen Remodelings bei weiblichen Ratten gewertet werden könnte. Zudem wurden unter der Behandlung mit Testosteron versus Östradiol bei weiblichen Ratten eine signifikant stärkere Zunahme des absoluten Körper- und Herzgewichts nach Myokardinfarkt sowie eine Hypertrophie des linken Ventrikels nachgewiesen. Einen weiteren Hinweis auf einen nachteiligen Effekt von Testosteron auf das postinfarzielle Remodeling bei weiblichen Ratten gab die signifikant reduzierte Verkürzungsfraktion nach Gabe von Testosteron versus Östradiol in der Echokardiographie, wodurch eine testosteroninduzierte Verschlechterung der kardialen Funktion nach Myokardinfarkt angezeigt wurde. Zudem konnte bereits an den scheininfarzierten Versuchsreihen auf Proteinebene eine tendenzielle Abnahme des α/β -MHC-Quotienten unter der Therapie mit Testosteron im Vergleich zu Östradiol nachgewiesen werden, wodurch ein weiterer Beleg für eine Einschränkung der kardialen Leistungsfähigkeit unter supraphysiologischem Testosteroneinfluss geliefert wurde. Mittels Northern-Blot wurde bei den weiblichen scheininfarzierten Versuchsreihen unter der Behandlung mit Testosteron ein Anstieg von IGF-1 registriert, während der Kollagengehalt des linken Ventrikels durch den Hormonstatus nicht beeinflusst wurde.

Zusammenfassend scheint Testosteron am Herzen von weiblichen Ratten geschlechtsspezifische Wirkungen zu entfalten, die das kardiale Remodeling nach Myokardinfarkt möglicherweise auch langfristig negativ beeinflussen.

7. Literaturverzeichnis

- [1] 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.
- [2] Mc Nutt RA, Ferenchick GS, Kirlin PC and Hamlin NJ. Acute myocardial infarction in a 22-year-old world class weight lifter using anabolic steroids. *Am. J. Cardiol.*, 1988. 62: p. 164.
- [3] Ferrera PC, Verdile VP, Anabolic steroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. *Cardiology*, 1997. 88(2): p. 218-220.
- [4] Touchette, N. Meeting highlights: `roid rage at FASEB.J.N.I.H. Res., 1990. 2: p. 42-44.
- [5] Rockhold RW, Cardiovascular toxicity of anabolic steroids. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1993. 33: p. 497-520.
- [6] 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. 57(2): p. 370-8.
- [7] Callies F, Stromer H, Schwinger RH, Bolck B, H K, Frantz S, Leupold A, Beer S, Allolio B, Bonz AW. Administration of testosterone is associated with a reduced susceptibility to myocardial ischemia. *Endocrinology*, 2003. 144(10): p. 4478-83.
- [8] Murphy JG, Marsh JD, Smith TW. The role of calcium in ischemic myocardial injury. *Circ Res*, 1987. 75: p. 15-24.
- [9] Allolio B, Schulte HM. *Praktische Endokrinologie*, 1996. p. 461.
- [10] Adams MR, Williams JK, Kaplan JR. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*, 1995. 15: p. 562-570.

- [11] Dahlgren E, Janson PO, Johansson S, Lapidus L, Oden A. Polycystic ovary syndrome and risk for myocardial infarction. Evaluated from a risk factor model based on a prospective population study of women. *Acta Obstet Gynecol Scand*, 1992. 71(8): p. 599-604.
- [12] Scheuer J, Malhotra A, Schaible TF, Capasso J. Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat hearts. *Circulation Res*, 1987. 61: p. 12-19.
- [13] Utiger RD. Insulin and the polycystic ovary syndrome. *N Engl J Med*, 1996. 335: p. 657-658.
- [14] Shapiro J, Christiana J, Frishmann WH. Testosterone and other anabolic steroids as cardiovascular drugs. *American Journal of Therapeutics*, 1999. 6: p. 167-174.
- [15] Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis. *Circ Res*, 1999. 84: p. 813-819.
- [16] Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb*, 1994. 14: p. 701-706.
- [17] Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. Relationship between serum sex hormones and coronary artery disease in postmenopausal women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 1997. 17: p. 695-701.
- [18] Soonpaa J. Potential approaches for myocardial regeneration. *Ann NY Acad Sci*, 1995. 752: p. 446-454.
- [19] Beltrami AP, Kajstura J. Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *New Engl J Med*, 2001. 344: p. 1750-1757.
- [20] Cleutjens JPM, Blankesteijn WM, Daemen MJAP, Smits JFM. The infarcted myocardium: Simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovascular Res* 44, 1999. p. 232-241.
- [21] Haunstetter A, Izumo S. Apoptosis: Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res*, 1998. 82: p. 1111-1129.

- [22] Olivetti G, Abbi R, Quaini F et al. Apoptosis in the failing human heart. *New Engl J Med*, 1997. 336: p. 1131-1141.
- [23] Sturk A, Hack CE, Aarden LA et al. 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.
- [24] Cleutjens JPM, Verluyten M, Smits JFM, Daemen MJAP. Collagen remodeling after myocardial infarction in the rat heart. *Am J Pathol.*, 1995. 147: p. 325-338.
- [25] Tyagi SC, Campbell SE, Reddy HK, Tjahja E, Voelker DJ. Matrix metalloproteinase activity expression in infarcted, noninfarcted and dilated cardiomyopathic human hearts. *Mol Cell Biochem*, 1996. 155: p. 13-21.
- [26] Swynghedauw B, Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Am Physiol Soc*, 1999. 79(1): p. 215-262.
- [27] Cohn JN, Structural basis for heart failure: ventricular remodeling and its pharmacological inhibition. *Circulation*, 1991. 91: p. 2504-2507.
- [28] McKay RG, Pasternak RC, Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation*, 1986. 74: p. 693-702.
- [29] Gerdes AM, Structural remodeling and mechanical dysfunction of cardiac myocytes in heart failure. *J Mol Cell Biol*, 1995. 27: p. 849-856.
- [30] Boheler KR, Schwartz K. Gene expression in cardiac hypertrophy trends. *Cardiovasc Med*, 1992. 2: p. 176-182.
- [31] Frantz S, Hu K, Widder J, Bayer B, Witzel CC, Schmidt I, Galuppo P, Strotmann J, Ertl G, Bauersachs J. Peroxisome proliferator activated-receptor agonism and left ventricular remodeling in mice with chronic myocardial infarction. *Br J Pharmacol*, 2004. 141: p. 9-14.

- [32] Lompré AM, Schwartz K, D'Albis A, Lacombe G, Thiem NV, and Swynghedauw B. Myosin isozymes redistribution in chronic heart overloading. *Nature*, 1979. 282: p. 105-107.
- [33] Michel J-B, Lattion A-L, Salzmann J-L, De Lourdes Cerol M, Philippe M, Camilleri J-P, and Corvol P. Hormonal and cardiac effects of converting enzyme inhibition in rat myocardial infarction. *Circ. Res*, 1988. 62: p. 641-650.
- [34] Bouvagnet P, Pons F, Local changes in myosin types in diseased human atrial myocardium: a quantitative immunofluorescence study. *Circulation*, 1984. 72: p. 272-279.
- [35] 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.
- [36] Drexler H, Hanze J, Finckh M, Lu W, Just H, and Lang RE. Atrial natriuretic peptide in a rat model of cardiac failure: Atrial and ventricular mRNA, atrial content, plasma levels, and effect of volume loading. *Circulation*, 1989. 79: p. 620-633.
- [37] Franch HA, Dixon RAF, Blaine EH, and Siegl PKS. Ventricular atrial natriuretic factor in the cardiomyopathic hamster model of congestive heart failure. *Circ Res*, 1988. 62: p. 31-36.
- [38] Michel J-B, Nicoletti A, and Arnal JF. Left ventricular remodelling following experimental myocardial infarction. *Eur Heart J*, 1995. 16, Suppl. I: p. 49-57.
- [39] 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.
- [40] O'Brien PJ, O'Grady M, McCutcheon LJ, Shen H, Nowak L, Horne RD, Mirsalimi SM, Julian RJ, Grima EA, Moe GW, and Armstrong PW. Myocardial myoglobin deficiency in various models of congestive heart failure. *J Mol Cell Cardiol*, 1992. 24: p. 721-730.

- [41] Kagaya Y, Kanno Y, Takeyama D, Ishide N, Maruyama Y, Takahashi T, Ido T, and Takishima T. Effects of longterm pressure overload on regional myocardial glucose and free fatty acid uptake in rats. A quantitative autoradiographic study. *Circulation*, 1990. 81: p. 1353-1361.
- [42] Ito Y, Suko J, and Chidsey A. Intracellular calcium and myocardial contractility. V. Calcium uptake of sarcoplasmic reticulum fractions in hypertrophied and failing rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1974. 6: p. 237-247.
- [43] Studer R, Reinecke H, Bilger J, Eschenhagen T, Böhm M, Hasenfuss G, Just H, Holtz J, and Drexler H. Gene expression of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger in end-stage human heart failure. *Circ. Res*, 1994. 75: p. 443-453.
- [44] Shamraj OI, Grupp IL, Grupp G, Melvin D, Gradoux N, Kremers W, Lingrel JB, and De Pover A. Characterization of Na/K-ATPase, its isoforms, and the inotropic response to ouabain in isolated failing human hearts. *Cardiovasc Res*, 1993. 27: p. 2229-2237.
- [45] Mansier P, Chevalier B, Barnett DB, and Swynghedauw B. β_1 -adrenergic and muscarinic receptor densities in compensatory cardiac hypertrophy of the adult rat. *Pflügers Arch*, 1993. 424: p. 354-360.
- [46] Nieschlag E, Behre H. *Andrologie – Grundlagen und Klinik der reproduktiven Gesundheit des Mannes*. Springer Verlag, 2000: p. 316ff.
- [47] 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.
- [48] 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.
- [49] Pfeffer MA, Fletcher PJ, Braunwald E, Progressive ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *Am J Physiol*, 1991. 260: p. 1406-1414.

- [50] 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.
- [51] 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.
- [52] Neubauer S, Ertl G, Haas U, et al. Effects of endothelin-1 in the isolated perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1990. 16: p. 1-8.
- [53] 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.
- [54] 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.
- [55] Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H1560-9.
- [56] Dagnault A, Richard D. Lesions of hypothalamic paraventricular nuclei do not prevent the effect of estradiol on energy and fat balance. *Am J Physiol*, 1994. 267: E32-8.
- [57] Morrissey SE, Edwards TJ, Wilson KJ. Effect of ovariectomy and steroid hormone replacement on the recovery of arterial blood pressure following haemorrhage in anaesthetized Brattleboro rats. *Eur J Endocrinol*, 1997. 136: p. 330-7.
- [58] Conrad KP, Mosher MD, Brinck-Johnsen T. Effects of 17 β -estradiol and progesterone on pressor responses in conscious ovariectomized rats. *Am J Physiol*, 1994. 266: R1267-72.
- [59] Ferrer M, Meyer M, Osol G. Estrogen replacement increases β -adrenoceptor-mediated relaxation of rat mesenteric arteries. *J Vasc Res*, 1996. 33: p. 124-31.

- [60] Wing RR, Matthews KA, Kuller LH, et al. Weight gain at time of menopause. *Arch Intern Med*, 1991. 151: p. 97-102.
- [61] Hügel S, Reincke M, Strömer H, Winning J, Horn M, Dienesch C, Mora P, Schmidt HHHW, Allolio B, Neubauer S. Evidence against a role of physiological concentrations of estrogen in post-myocardial infarction remodeling. *J Am Coll Cardiol*, 1999. 34: p. 1427-34.
- [62] Smith PJW, Ornatsky O, Stewart DJ, Picard P, Dawood F, Wen W-H, Liu PP, Webb DJ, Monge JC. Effects of estrogen replacement on infarct size, cardiac remodeling, and the endothelin system after myocardial infarction in ovariectomized rats. *Circulation*, 2000. 102 (24): p. 2983-9.
- [63] Solomon SD, Greaves SC, Rayan M, Finn P, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Temporal dissociation of left ventricular function and remodeling following experimental myocardial infarction in rats. *Journal of Cardiac Failure*, 1999. 5(3): p. 213-223.
- [64] White HD, Norris RM, Brown MA, Brandt PWT, Whitlock RML, Wild CJ. Left ventricular end-systolic volume as the major determinant of survival after recovery from myocardial infarction. *Circulation*, 1987. 76: p. 44-51.
- [65] Hammermeister KE, DeRouen TA, Dodge HT. Variables predictive of survival in patients with coronary disease. Selection by univariate and multivariate analyses from the clinical electrocardiographic, exercise, arteriographic, and quantitative angiographic evaluations. *Circulation*, 1979. 59: p. 421-430.
- [66] Kostuk WJ, Kazamias TM, Gander MP, Simon AL, Ross J. Left ventricular size after acute myocardial infarction: Serial changes and their prognostic significance. *Circulation*, 1973. 47: p. 1174-1179.
- [67] Shanoff HM, Little JA, Csima A, Yano R. Heart size and ten-year survival after uncomplicated myocardial infarction. *Am Heart J*, 1969. 78: p. 608-614.
- [68] Lompré AM. Myosin isoenzymes redistribution in chronic heart overloading. *Nature*, 1979. 282: p. 105-107.

- [69] Mercadier JJ, Lompre AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, and Schwartz K. Myosin isoenzymic changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ. Res.*, 1981. 49: p. 525-532.
- [70] Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, and Mahdavi V. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. *J. Clin. Invest.*, 1987. 79: p. 970-977.
- [71] Takahashi T, Schunkert H, Isoyama S, Wei JY, Nadal-Ginard B, Grossman W, and Izumo S. Age-related differences in the expression of proto-oncogene and contractile protein genes in response to pressure overload in the rat myocardium. *J. Clin. Invest.*, 1992. 89: p. 939-946.
- [72] Morkin E. Regulation of myosin heavy chain genes in the heart. *Circulation*, 1993. 87: p. 1451-1460.
- [73] Morgan HE. Cellular aspects of cardiac failure. *Circulation*, 1993. 87(suppl): IV4-6.
- [74] 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.
- [75] Falanga V, Greenberg AS, Zhou L, Ochoa SM, Roberts AB, Falabella A, Yamaguchi Y. Stimulation of collagen synthesis by the anabolic steroid stanozolol. *J Invest Dermatol*, 1998; 111: p.1193-7.
- [76] Nwogu JI, Geenen D, Bean M, Brenner MC, Huang X, Buttrick PM. Inhibition of collagen synthesis with prolyl 4-hydroxylase inhibitor improves left ventricular function and alters the pattern of left ventricular dilatation after myocardial infarction. *Circulation*, 2001. 104: p. 2216-21.
- [77] Li Q, Li B, Wang X, Leri A, Jana KP, Liu Y, Kajstura J, Baserga R, Anversa P. Overexpression of insulin-like growth factor-1 in mice protects from myocyte death after infarction, attenuating ventricular dilation, wall stress, and cardiac hypertrophy. *J. Clin Invest*, 1997. 100: p. 1991-1999.

- [78] Lee WL, Chen JW, Ting CT, Ishiwata T, Lin SJ, Korc M, Wang PH. Insulin-like growth factor I improves cardiovascular funktion and suppresses apoptosis of cardiomyocytes in dilated cardiomyopathy. *Endocrinology*, 1999. 140: p. 4831-4840.
- [79] Wang L, Ma W, Markovich R, Chen J-W, Wang PH. Regulation of cardiomyocyte apoptotic signaling by insulin-like growth factor I. *Circ Res*, 1998. 83: p. 516-522.
- [80] Otani H, Yamamura T, Nakao Y, Hattori R, Kawaguchi H, Osako M, Imamura H. Insulin-like growth factor-I improves recovery of cardiac performance during reperfusion in isolated rat heart by a wortmanninsensitive mechanism. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2000. 35: p. 275-281.
- [81] Matsui T, Li L, del Monte F, Fukui Y, Franke TF, Hajjar RJ, Rosenzweig A. Adenoviral gene transfer of activated posphatidylinositol 3'-kinase and Akt inhibits apoptosis of hypoxic cardiomyocytes in vitro. *Circulation*, 1999. 100: p. 2373-2379.
- [82] Fujio Y, Nguyen T, Wencker D, Kitsis RN, Walsh K. Akt promotes survival of cardiomyocytes in vitro and protects against ischemia-reperfusion injury in mouse heart. *Circ Res*, 2000. 101: p. 660-667.
- [83] Pfeffer MA, Braunwald E, Moye LA, Basta L, Brown EJ, Cuddy TE, Davis BR, Geltman EM, Goldman S, Flaker GC, Klein M, Lamas GA, Packer M, Rouleau J, Rouleau JL, Rutherford J, Werthheimer JH, Hawkins CM, on behalf of the SAVE investigators: Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: Results of the survival and ventricular enlargement trial. *N Engl J Med*, 1992. 327: p. 669-677.
- [84] ISIS-4 collaborative group: ISIS-4: A randomized factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulfate in 58050 patients with suspected acute myocardial infarction. *Lancet*, 1995. 345: p. 669-685.
- [85] Litwin SE, Katz SE, Litwin CM. Gender differences in postinfarction left ventricular remodeling. *Cardiology*, 1999. p. 173-183.

- [86] Litwin SE, Katz SE, Morgan JP, Douglas PS: Long-term captopril treatment improves diastolic filling more than systolic performance in rats with large myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*, 1996. 28: p. 773-781.
- [87] Freshour JR, Chase SE, Vikstrom KL. Gender differences in cardiac ACE expression are normalized in androgen-deprived male mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2002. 283(5): H1997-2003.
- [88] Rosenkranz-Weiss P, Tomek RJ, Mathew J, Eghbali M. Gender-specific differences in expression of mRNAs for junctional and structural proteins in rat ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1994. 26(2): p. 261-70.
- [89] Leung PS, Wong TP, Lam SY, Chan HC, Wong PY. Testicular hormonal regulation of the renin-angiotensin system in the rat epididymis. *Life Sci*, 2000. 66(14): p. 1317-24.
- [90] Lim YK, Retnam L, Bhagavath B, Sethi SK, Bin Ali A, Lim SK. Gonadal effects on plasma ACE activity in mice. *Atherosclerosis*, 2002. 160(2): p. 311-6.

8. Abkürzungsverzeichnis

ANP	Atriales natriuretisches Peptid
ACE	Angiotensin converting enzyme
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
AW	Dicke der Vorderwand des linken Ventrikels
Coll	Kollagengehalt der Wand des linken Ventrikels
DAP	Diastolischer Aortendruck
dP/dt max	Index der myokardialen Kontraktilität des linken Ventrikels
dP/dt min	Index der diastolischen Relaxation des linken Ventrikels
E/A	Transmitrales diastolisches Einstromprofil
E2	Östradiol
FS	Verkürzungsfraction (= Fractional shortening)
G	Gesamtquerschnittsfläche des linken Ventrikels
HG	Herzgewicht
HR	Herzfrequenz
I	Innenquerschnittsfläche des linken Ventrikels
KG	Körpergewicht
LA Diam d	Diastolischer Diameter des linken Atriums
LV	Linker Ventrikel
LV Diam d	Diastolischer Diameter des linken Ventrikels
LV Diam s	Systolischer Diameter des linken Ventrikels
LVDP	Druckamplitude des linken Ventrikels
LVDP max	Maximal entwickelte Druckamplitude des linken Ventrikels
LVEDP	Enddiastolischer Druck des linken Ventrikels
LVSP	Systolischer Druck des linken Ventrikels
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MHC	Myosin Heavy Chains
MI	Infarzierung
MI-Größe	Infarktgröße
MLC	Myosin Light Chains
NG	Nierengewicht
OVX	Ovarektomie
PCOS	Syndrom der polyzystischen Ovarien
PW	Dicke des Herzseptums
RV	Rechter Ventrikel
S	Scheininfarzierung
SAP	Systolischer Aortendruck
SERCA	Calcium-ATPasen des Sarkoplasmatischen Retikulums
TUD	Testosteronundecanoat
Vol max	Vorlast bei maximal entwickelter Druckamplitude

Danksagung

Bei Herrn Professor Dr. med. B. Allolio bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, die Übernahme des Referats, seine Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit und vor allem für die Freiheit, an der Gestaltung des Projekts aktiv mitwirken zu dürfen.

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. Spindler danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Bei Herrn Dr. med. F. Callies möchte ich mich für die gute Betreuung und seinen tatkräftigen Einsatz für die Doktoranden bedanken. Ferner danke ich Herrn Dr. S. Frantz für die Messung von IGF-I und Kollagen sowie für sein Engagement innerhalb dieses Projekts.

Bei Isabel Kirsch und Constantin von zur Mühlen, die zur gleichen Zeit im endokrinologischen Forschungslabor promovierten, bedanke ich mich für die stets gute und freundschaftliche Zusammenarbeit.

Auch sehr herzlich möchte ich Heidi Scheuermann, Charlotte Dienesch und Helga Wagner für ihre unermüdliche Hilfe und den ausgezeichneten Beistand im Labor danken.

Lebenslauf

Name: Barbara Christine Weckler
 Geburtsdatum: 16.07.1976
 Geburtsort: Schwäbisch Hall
 Wohnsitz: Am Römertor 20
 55116 Mainz
 Tel.: 0177 40 492 40
 Emailadresse: barbara.weckler@gmx.de

Schulbildung: 1983-1987 Buchenbergschule Ellwangen
 1987-1996 Peutinger-Gymnasium Ellwangen

Studium: 10/1996-11/2004 Julius-Maximilians-Universität Würzburg
 10/1996-03/1998 Diplompädagogik
 03/1998 Vordiplom in Pädagogik
 Seit 04/1998 Humanmedizin
 09/2000 Physikum
 09/2001 1. Staatsexamen
 09/2003 2. Staatsexamen
 11/2004 3. Staatsexamen

Praktisches Jahr: 10/2003-02/2004 Gynäkologie an der Universität Würzburg
 02/2004-04/2004 Chirurgie an der University of San Francisco
 04/2004-05/2004 Chirurgie an der University of Melbourne
 05/2004-10/2004 Innere Medizin an der Universität Würzburg

Berufstätigkeit: 01/2005-heute Internistische Facharztausbildung an der
 Universitätsklinik Mainz

Mainz, 8. August 2005