

Aus dem Center for Cardiovascular Research (CCR)
der Charité Berlin
eingereicht
über das Institut für Veterinär-Pathologie
der Freien Universität Berlin

**Geschlechterunterschiede bei physiologischer und pathologischer
Myokardhypertrophie im Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Kathleen Cantow
Tierärztin
aus Pasewalk

Berlin 2009

Journal-Nr.: 3330

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Leo Brunberg
Erster Gutachter: Prof. Dr. Anja Sterner-Kock
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek
Dritter Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Helmut Hartmann

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

mice, animal models, heart, myocardium, hypertrophy, sex differences,
exercise, myocardial infarction, capillaries, atrial natriuretic factor (MeSH),
natriuretic peptide, brain (MeSH), myosin heavy chains (MeSH), actin

Tag der Promotion: 03.03.2010

Bibliografische Information der *Deutschen Nationalbibliothek*

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.ddb.de> abrufbar.

ISBN: 978-3-86664-915-6

Zugl.: Berlin, Freie Univ., Diss., 2009

Dissertation, Freie Universität Berlin

D 188

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt.

Alle Rechte, auch die der Übersetzung, des Nachdruckes und der Vervielfältigung des Buches, oder Teilen daraus, vorbehalten. Kein Teil des Werkes darf ohne schriftliche Genehmigung des Verlages in irgendeiner Form reproduziert oder unter Verwendung elektronischer Systeme verarbeitet, vervielfältigt oder verbreitet werden.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Warenbezeichnungen, usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürfen.

This document is protected by copyright law.

No part of this document may be reproduced in any form by any means without prior written authorization of the publisher.

Alle Rechte vorbehalten | all rights reserved

Für meinen Opa,
Paul Cantow.

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 DEFINITION DER HYPERTROPHIE	1
1.2 AUFBAU UND FUNKTION DES MYOKARDS	2
1.3 ANPASSUNGSMECHANISMEN DES HERZENS INFOLGE ERHÖHTER BELASTUNG ODER SCHÄDIGUNG	2
1.3.1 HYPERTROPHIE DER MYOZYTEN UND ANPASSUNG DES VERSORGENDEN GEWEBES	2
1.3.2 HYPERTROPHIE-ASSOZIIERTE GENE	3
1.3.3 KAPILLAREN	5
1.4 HYPERTROPHIEFORMEN	5
1.4.1 PHYSIOLOGISCHE HYPERTROPHIE DURCH REGELMÄßIGEN AUSDAUERSPORT	6
1.4.2 PATHOLOGISCHE HYPERTROPHIE DURCH MYOKARDINFARKT	8
1.4.3 GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE UND EFFEKTE VON ÖSTROGEN BEI MYOKARDHYPERTROPHIE	10
1.5 TIERMODELL	10
1.6 ZIELE DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG	11
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 MATERIAL	13
2.1.1 GERÄTE	13
2.1.2 PHARMAKA	14
2.1.3 OPERATIONSBESTECK	15
2.1.4 VERBRAUCHSMATERIALIEN	16
2.1.5 PUFFER	16
2.1.6 (FÄRBE-)LÖSUNGEN/CHEMIKALIEN	17
2.1.7 PRIMER	19
2.1.8 SOFTWARE	19
2.2 METHODEN	20
2.2.1 VERSUCHSTIERE	20
2.2.2 FREIWILLIGES LAUFRADTRAINING	21
2.2.3 INDUKTION EINES MYOKARDINFARKTES	22

2.2.4	ECHOKARDIOGRAPHIE	25
2.2.5	ORGANENTNAHME	29
2.2.6	INFARKTGRÖßENBESTIMMUNG	30
2.2.7	RELATIVE GENEXPRESSION AUSGEWÄHLTER HYPERTROPHIEMARKER	31
2.2.8	HISTOLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN	35
2.2.9	STATISTIK	41

3. ERGEBNISSE **43**

3.1 LAUFRADTRAINING **43**

3.1.1	TRAININGSERGEBNISSE	44
3.1.2	FRAKTIONELLE FLÄCHENÄNDERUNG, EJEKTIONSFRAKTION UND HERZMINUTENVOLUMEN	45
3.1.3	LINKSVENTRIKULÄRE MASSE	46
3.1.4	LINKSVENTRIKULÄRES GEWICHT	48
3.1.5	RELATIVE GENEXPRESSION AUSGEWÄHLTER HYPERTROPHIEMARKER	50
3.1.6	KAPILLARISIERUNG	51

3.2 MYOKARDINFARKT **53**

3.2.1	MORTALITÄT	53
3.2.2	INFARKTGRÖßE	55
3.2.3	FRAKTIONELLE FLÄCHENÄNDERUNG, EJEKTIONSFRAKTION UND HERZMINUTENVOLUMEN	55
3.2.4	LINKSVENTRIKULÄRE MASSE	57
3.2.5	LINKSVENTRIKULÄRES GEWICHT	59
3.2.6	RELATIVE GENEXPRESSION AUSGEWÄHLTER HYPERTROPHIEMARKER	60
3.2.7	KAPILLARISIERUNG	63

4. DISKUSSION **66**

4.1 GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE NACH PHYSIOLOGISCHEM AUSDAUERTRAINING **66**

4.1.1	DIE AUSWAHL DES TRAININGSMODELLS	66
4.1.2	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IM TRAININGSVERHALTEN	67
4.1.3	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER ENTWICKLUNG DER PHYSIOLOGISCHEN HYPERTROPHIE UND DEREN EINFLUSS AUF DIE HERZFUNKTION	67

4.1.4	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER RELATIVEN GENEXPRESSION AUSGEWÄHLTER HYPERTROPHIEMARKER	68
4.1.5	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER KAPILLARISIERUNG	69
4.2	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE NACH MYOKARDINFARKT	71
4.2.1	MI-MODELL ZUR ERZEUGUNG EINER PATHOLOGISCHEN HYPERTROPHIE	71
4.2.2	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER MORTALITÄT NACH MI	71
4.2.3	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER INFARKTGRÖßE	72
4.2.4	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER ENTWICKLUNG EINER PATHOLOGISCHEN HYPERTROPHIE UND DEREN EINFLUSS AUF DIE KARDIALE FUNKTION	73
4.2.5	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER RELATIVEN GENEXPRESSION AUSGEWÄHLTER HYPERTROPHIEMARKER	75
4.2.6	GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE IN DER KAPILLARISIERUNG	75
4.3	WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN	76
5.	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	77
6.	<u>SUMMARY</u>	79
	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	80
	<u>DANKSAGUNG</u>	87
	<u>SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG</u>	88

Abkürzungsverzeichnis

ALCOS	<i>acute low cardiac output syndrome</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Varianzanalyse
ANP	<i>atrial natriuretic peptide</i> , atriales natriuretisches Peptid
ATPase	Adenosintriphosphatase
B-Mode	<i>brightness-Mode</i>
BNP	<i>b-type/brain natriuretic peptide</i> , zerebrales natriuretisches Peptid
bp	<i>basepair</i> , Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serumalbumin</i> , Rinderserumalbumin
BZ	<i>borderzone</i> , Infarkttrandgebiet
C57BL/6J	Inzucht-Mausstamm
CD1	Auszucht-Mausstamm
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre DNA
Ct	<i>threshold cycle</i>
D	Diastole
Dapi	4',6-Diamidin-2'-Phenylindol-Dihydrochlorid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanintrisphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintrisphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>

E0	Zeitpunkt vor Versuchsbeginn
E11	11 Tage nach Infarktsetzung bzw. Sham-Operation
E2	17 β -Östradiol
E5	Zeitpunkt am Ende der fünfwöchigen Trainings- bzw. Sedentary-Periode
EF	Ejektionsfraktion, Auswurffraktion
EKG	Elektrokardiogramm
EZM	extrazelluläre Matrix
FAC	<i>fractional area change</i> , fraktionelle Flächenänderung
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FW	<i>forward</i> , vorwärts
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GS I B4	Griffonia simplicifolia Lectin I Isolectin B4
HCl	Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HG	Herzgewicht
HI	Herzinsuffizienz
HMV	Herzminutenvolumen
HZ	Hypertrophiezone
i.p.	intraperitoneal
I.P.	isoelektrischer Punkt
I/R-Modell	Ischämie/Reperfusionen-Modell
IEI	Infarktexpansionsindex
IVC	<i>individually ventilated cage</i>
IVS	Interventrikularseptum
KG	Körpergewicht

LAD	<i>left anterior descending coronary artery</i> , linke deszendierende Koronararterie
LR	Laufрад
LRT	Laufрадtraining
LV	linker Ventrikel
LV-Masse	linksventrikuläre Masse
LVG	linksventrikuläres Gewicht
LVH	linksventrikuläre Hypertrophie
LVID	<i>left ventricular internal diameter</i> , linksventrikulärer Kammerdurchmesser
M	Männchen
MCSA	<i>myocyte cross sectional area</i> , Myozytenquerschnittsfläche
MHC	<i>myosin heavy chain</i> , Myosin schwere Kette
MI	Myokardinfarkt
MLC	<i>myosin light chain</i> , Myosin leichte Kette
M-Mode	<i>motion-mode</i>
MONICA	<i>Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
MW	Mittelwert
n	Anzahl der Tiere/Probe
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPR	natriuretische Peptidhormon-Rezeptoren
NSAID	<i>nonsteroidal antiinflammatory drugs</i> , nichtsteroidale Antiphlogistika
Ø	Durchmesser
OP	Operation
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBlec	Puffer für Isolectinfärbung

PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PW	<i>posterior wall</i> , hintere Wand
RIN	<i>RNA integrity number</i> , RNA-Integrität
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
rt-PCR	<i>real time-PCR</i>
RV	<i>reverse</i> , rückwärts
s	Strecke
S	Systole
s/st	scharf/stumpf
sed.	<i>sedentary</i> , untrainiert
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Standardfehler des Mittelwertes
sham	scheinoperiert
SPSS	<i>statistical package for social science</i>
SV	Schlagvolumen
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TL	Tibiallänge
Tris	Tris(Hydroxymethyl-)Aminomethan
W	Weibchen
xg	x-faches der mittleren Erdbeschleunigung (g)
α -cA	<i>α-cardiac actin</i>
α -MHC	<i>myosin heavy chain α</i>
α -skA	<i>α-skeletal actin</i>
β -MHC	<i>myosin heavy chain β</i>

1. EINLEITUNG

Laut Todesursachenstatistik vom Statistischen Bundesamt aus dem Jahre 2006 starben im Jahr 2005 29.896 Frauen und 36.283 Männer an den Folgen eines akuten Herzinfarktes. Das sind bei den Frauen 3,6% und bei den Männern 4,4% aller Todesfälle. Somit sind die Männer die Hauptbetroffenen des Herzinfarktes. Sie erleiden in jüngeren Jahren im Vergleich zu gleichaltrigen Frauen bis zu achtmal häufiger einen Infarkt und versterben bis zu neunmal öfter an der Erkrankung. Männer weisen nach dem 65. Lebensjahr ein dreifach höheres Risiko auf, ab dem 85. Lebensjahr kommt es in etwa zu einem Gleichstand bei beiden Geschlechtern. Erst in sehr hohem Alter versterben Frauen häufiger als Männer an den Folgen eines Infarktes. Letztendlich ist die altersstandardisierte Erkrankungs- und Sterblichkeitsrate bei Männern doppelt so hoch wie bei Frauen (MONICA/KORA Herzinfarktregister Augsburg 2000/02). Das Existieren von Geschlechterunterschieden in der Prädisposition und Mortalität kardiovaskulärer Erkrankungen löst eine erhöhte Aufmerksamkeit aus.¹ Welche Ursachen diesen Geschlechterunterschieden zugrunde liegen, wird umfangreich untersucht. Der Einfluss der Geschlechtshormone scheint dabei eine wichtige Rolle zu spielen.

Regelmäßiger Ausdauersport hat durch seine positiven Effekte in Bezug auf die Vorbeugung und Verbesserung einer Vielzahl von kardiovaskulären Erkrankungen, eingeschlossen Herzinfarkt, an Bedeutung gewonnen.² Dabei scheint das weibliche Herz von den protektiven Eigenschaften des Ausdauertrainings mehr zu profitieren als das männliche.³

Sowohl der Myokardinfarkt als auch der Ausdauersport resultieren in einer Hypertrophie des Herzens. Die der Hypertrophie zugrunde liegenden Veränderungen des linken Ventrikels sollen in der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Der Schwerpunkt wird auf die Expression anerkannter Hypertrophiemarker und die Veränderungen des Kapillarierungsgrades des Myokards gelegt. Dabei sollen eventuell auftretende Geschlechterunterschiede aufgezeigt werden.

1.1 DEFINITION DER HYPERTROPHIE

Eine Hypertrophie ist die Vergrößerung eines Organs oder eines Gewebes durch die Zunahme des Zellvolumens bei gleich bleibender Zellzahl. Im Falle des Herzens bedeutet das eine Zunahme der Herzmasse durch die Volumenzunahme der Herzmuskelzellen (Kardiomyozyten).

1.2 AUFBAU UND FUNKTION DES MYOKARDS

Das Herz besteht aus Kardiomyozyten, nicht myozytären Zellen (Fibroblasten, glatte Muskelzellen, Endothelzellen, Makrophagen und Mastzellen) und extrazellulärer Matrix. Kardiomyozyten bilden anteilmäßig den größten Teil des Herzens. Sie sind spezialisierte Muskelzellen, die aus Bündeln sogenannter Myofibrillen bestehen. Diese wiederum sind aus sich wiederholenden Einheiten, den Sarkomeren, aufgebaut. Hauptaufgabe der Myozyten ist die koordinierte und rhythmische Kontraktion des Herzens, um eine ausreichende Blutversorgung des Körpers zu gewährleisten. Dabei handelt es sich um Zellen, die bei Säugern kurz nach der Geburt ausdifferenziert und demnach nicht mehr in der Lage sind, sich zu teilen. Die Herzmuskelzelle wird in hexagonaler Form von Kapillaren umgeben, die für die Sauerstoff- sowie Nährstoffversorgung und den Abtransport von Stoffwechselendprodukten verantwortlich sind. Die extrazelluläre Matrix (EZM) bildet das Grundgerüst des Herzens. Ihre Proteine werden im Interstitium von den Myofibroblasten gebildet. Die EZM enthält Kollagene, die im Herzen für Struktur und Festigkeit sorgen. Myozyten, Vaskularisierung und EZM sind wichtige Bestandteile der kardialen Leistungsfähigkeit.

1.3 ANPASSUNGSMECHANISMEN DES HERZENS INFOLGE ERHÖHTER BELASTUNG ODER SCHÄDIGUNG

Eine erhöhte Belastung bzw. Schädigung des Herzens geht stets mit Veränderungen seiner Bestandteile einher. Diese Anpassungsmechanismen des Herzens werden als „kardiales Remodeling“ bezeichnet. Ein solcher Adaptionsprozess kommt infolge chronischer Mehrbelastung durch Wachstumsreize, Druck- oder Volumenbelastung, oder aber auch durch den Verlust an kontraktile Masse zustande. Das Herz ist nicht mehr in der Lage, den Blutbedarf zu gewährleisten und erreicht durch die Hypertrophie des Myokards einen Zuwachs an kontraktile Elementen. Dadurch gelingt es ihm, die Kontraktionskraft des Herzens (Inotropie) zu steigern, das Schlagvolumen zu erhöhen und somit den Blutbedarf - zumindest vorübergehend - zu gewährleisten.⁴

1.3.1 Hypertrophie der Myozyten und Anpassung des versorgenden Gewebes

Die Form, die die Myozyten durch Hypertrophie annehmen, ist abhängig von der Belastungsform des Herzens. Eine Druckbelastung, beispielsweise durch eine arterielle Hypertonie oder eine Aortenstenose, bewirkt eine Erhöhung des systolischen Wanddruckes.

Es erfolgt eine parallele Anlagerung benachbarter Sarkomere. Dies führt zu einer Zunahme des Myozytendurchmessers. Infolgedessen nimmt die Ventrikelwanddicke bei gleich bleibendem Kammervolumen zu. Hier spricht man von einer konzentrischen Hypertrophie. Nach erhöhter Volumenbelastung, beispielsweise infolge von Klappeninsuffizienzen, erhöht sich der diastolische Wanddruck. Es kommt es zu einer seriellen Anlagerung der Sarkomere und demnach zu einer Längenzunahme des Myozyten. Die Ventrikelwanddicke und das Kammervolumen nehmen zu. Man nennt diese Form der Hypertrophie exzentrische Hypertrophie.⁵

Zur Unterstützung des Wachstumsprozesses der Myozyten muss eine Anpassung des versorgenden Gewebes erfolgen.⁶ Dazu findet eine Vermehrung der funktionellen Substanz durch Initiation einer anabolen Stoffwechsellage, welche mit verstärkter DNA-, RNA- und Proteinsynthese einhergeht, statt.⁷

1.3.2 Hypertrophie-assoziierte Gene

Die Vergrößerung der Myozyten durch Umgestaltung des Sarkomers bewirkt eine Veränderung des zellulären Phänotyps.⁸ Sensoren vermitteln die Umwandlung der auf die Zelle wirkenden mechanischen Kräfte in biochemische Signale. Die Signaltransduktion beginnt auf der Zelloberfläche durch Aktivierung von Rezeptoren oder Kanälen. Sie aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden und verändern so die Genexpression und regulieren das Zellwachstum.⁹ Eine verdichtete Organisation der Sarkomeren und damit eine Vergrößerung der Myozyten sowie eine gesteigerte Proteinsynthese sind die daraus resultierenden, phänotypischen Veränderungen im Myokard.⁷ Sie werden durch die Reinduktion des fetalen Genprogrammes stimuliert.¹⁰ Das sogenannte „fetale Genmuster“ ist charakterisiert durch eine erhöhte Expression der natriuretischen Peptidhormone ANP (*atrial natriuretic peptide*, atriales natriuretisches Peptid) und BNP (*b-type* oder *brain natriuretic peptide*, zerebrales natriuretisches Peptid) sowie der kontraktilen Proteine β -MHC (*myosin heavy chain β*) und α -skA (*α -skeletal actin*).^{8, 11}

Natriuretische Peptidhormone

Die natriuretischen Peptidhormone regulieren Kreislauf und Herzgröße. Zu ihnen zählen ANP und BNP. ANP wird von atrialen,^{12, 13} BNP von ventrikulären¹⁴ Myozyten synthetisiert und sezerniert. Durch die Dehnung der Muskelzellen, z.B. infolge eines erhöhten Blutvolumens, erfolgt die Freisetzung von ANP und BNP. Beide werden bei einer Hypertrophie des

Myokards verstärkt exprimiert und deshalb als Hypertrophiemarker angesehen.¹⁵ Auf die Herzmuskelzelle wirken ANP und BNP antihypertroph.^{8, 16-18} Sie führen zu einer Abnahme der intrazellulären Kalzium-Konzentrationen¹⁷ und senken die kardiale Vor- und Nachlast.^{19, 20} Weiterhin hemmen sie die Proliferation kardialer Fibroblasten²¹ und supprimieren deren Kollagensynthese.²² Diese Effekte sprechen für ein umfassendes, protektives Potential von ANP und BNP in Bezug auf die maladaptive Umstrukturierung kardialen Gewebes. Erhöhte Expressionen von ANP und BNP gehen mit einer Verbesserung der linksventrikulären Funktion einher. Das wird auch in Untersuchungen genetisch manipulierter Tiermodelle sichtbar. Knockout-Tiermodelle erzeugen Hypertrophie und Fibrose, Überexpressionsmodelle wirken einer Hypertrophie entgegen.^{17, 23, 24} Außerdem wird das Herz sekundär durch den Eingriff von ANP und BNP in die Blutdruckregulation und in die Flüssigkeits-Elektrolyt-Balance geschützt. Beide Peptidhormone induzieren eine Natriurese, Diurese und Vasodilatation und inhibieren das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System sowie das sympathische Nervensystem.²⁵⁻²⁷

Kontraktile Proteine

Das Sarkomer wird aus strukturbildenden (z.B. Titin und Nebulin) und kontraktile (Aktin und Myosin) Proteinen gebildet.

Das dünne Aktin-Filament besteht aus F-Aktin, Tropomyosin und den Untereinheiten des Troponins (TnT, TnI, TnC). Das dicke Myosin-Filament wird gebildet aus zwei leichten (*myosin light chain*, MLC) und zwei schweren Ketten (*myosin heavy chain*, MHC). An ihren kugelförmigen Köpfen befindet sich die Myosin-ATPase. Sie besitzt die Fähigkeit, ATP zu spalten. Die Aktivität der ATPase kann durch Hormone stimuliert werden. Eine gesteigerte Aktivität geht mit einer schnelleren Kontraktionsgeschwindigkeit des Herzens einher.

Im Herzmuskel werden zwei verschiedene Isoformen der schweren Myosinkette exprimiert: die adulte α -MHC-Isoform und die fetale β -MHC-Isoform.^{28, 29} Die Expression von α -MHC findet überwiegend im Vorhof statt, die von β -MHC nahezu ausschließlich im Ventrikel.³⁰ Trotz geringer Unterschiede in der Aminosäuresequenz unterscheiden sich beide Isoformen in ihren mechanischen, energetischen und biochemischen Eigenschaften. Während die ATPase-Aktivität und die Verkürzungsgeschwindigkeit von α -MHC deutlich höher sind als die von β -MHC, wird die bessere Kontraktilität von α -MHC nur auf Kosten eines höheren Sauerstoffverbrauchs erzielt.

Im fetalen Herzen werden *α -cardiac Actin* (α -cA) und *α -skeletal Actin* (α -skA) coexprimiert.³¹⁻³³ Im adulten Herzen wird vorwiegend α -cA exprimiert. Bei α -skA handelt es sich um ein globuläres Protein, das zu Aktinfilamenten polymerisieren kann und in dieser Form die dünnen Filamente der Myofibrillen bildet. α -skA besitzt ein größeres Kontraktionspotential als die adulte α -cA-Isoform.

1.3.3 Kapillaren

Das Kapillarbett umfasst mehr als 90% des mikrozirkulären Systems. Die Kapillarwand besteht aus einer einfachen Endothelzellschicht. Die zu überbrückenden Wege für Sauerstoff und Substrate vom Gefäßbett in das umliegende Gewebe sind damit sehr gering. Nachdem der Stoffaustausch auf kapillärer Ebene stattgefunden hat, werden entstandene Metabolite über das venöse System abtransportiert. Störungen in der Mikrozirkulation führen zunächst zu lokaler Ischämie und Azidose, bei längerem Bestand auch zu Zelluntergängen (Nekrosen). Ursachen einer Minderdurchblutung am Herzen sind vor allem atherosklerotische Gefäßeinengungen und thromboembolische Gefäßverschlüsse, die sich in den bedeutenden Krankheitsbildern der Koronaren Herzkrankheit (KHK) und des Myokardinfarktes (MI) auswirken. Die lokale Schädigung der Myozyten nach MI ist bedingt durch eine Störung auf Höhe des Sauerstoff- und Substrataustausches, nämlich auf Kapillarebene.

Adulte Organe weisen unter normalen Bedingungen nahezu keine Angiogenese (Blutgefäßneubildung) auf, ausgenommen im weiblichen Reproduktionstrakt. Verschiedene experimentelle Studien haben jedoch gezeigt, dass ovarielle Steroidhormone wie Östrogen und Progesteron in der Lage sind, die Angiogenese durch Effekte auf die Endothelzellen zu modulieren. 17β -Östradiol (E2) beispielsweise induziert eine Endothelzellproliferation und –migration³⁴ vermittelt durch den klassischen Östrogenrezeptor.³⁵⁻³⁷ Es besitzt die Fähigkeit, die Bewegungen aus dem Knochenmark stammender Endothelvorläuferzellen zu modulieren.³⁸

Eine gut erhaltene bzw. verbesserte Kapillardichte ist assoziiert mit einer verbesserten physiologischen Leistung und mit einer herabgesetzten Inzidenz für Herzinsuffizienz.³⁹

1.4 HYPERTROPHIEFORMEN

Struktur, Funktion und Biochemie des Herzens werden je nach Form der Hypertrophie unterschiedlich reguliert. Man unterscheidet zwei Formen der Hypertrophie: die

physiologische und die pathologische Hypertrophie.

Zu der physiologischen Hypertrophie zählt die Aktivitäts- bzw. Arbeitshypertrophie. Sie entsteht als natürliche Anpassung an eine physiologisch funktionelle Mehrbelastung (z.B. Sportlerherz).⁴⁰ Durch eine physiologische Hypertrophie hervorgerufene Veränderungen des Herzens sind reversibel und bilden sich durch den Wegfall des verursachenden Stimulus zurück.⁴¹

Die kompensatorische bzw. pathologische Hypertrophie ist die krankhafte Anpassung des Myokards an eine pathologische Mehrbelastung des Herzens. Sie tritt infolge einer primären Kardiomyopathie, oder sekundär nach beispielsweise arterieller Hypertonie, Aortenstenose, Herzklappenerkrankungen oder MI auf. Die pathologische Hypertrophie wird durch einen progressiven Verlauf bestimmt und führt letztendlich zur Herzschwäche (Herzinsuffizienz, HI), die mit erhöhter Morbidität und Mortalität einhergeht.

Beide Hypertrophieformen gehen mit Veränderungen in der Genexpression einher. Struktur- und Regulationsgene, Gene des Energiemetabolismus sowie Gene der hormonellen Signaltransduktionswege sind hiervon betroffen.⁴² Im Gegensatz zur physiologischen ist die pathologische Hypertrophie durch eine charakteristische Fibrosierung des Interstitiums gekennzeichnet.⁴³

1.4.1 Physiologische Hypertrophie durch regelmäßigen Ausdauersport

Wenn die dynamische Trainingsbelastung eine individuelle Grenze überschreitet, kommt es als strukturelle Anpassung auf einen Wachstumsreiz zu einer physiologischen Herzhypertrophie (Sportlerherz).⁴⁴ Dieser Wachstumsreiz wird durch einen erhöhten Bedarf an Schlagvolumen infolge sportlicher Ausdauerbelastung ausgelöst, um eine ausreichende Blutversorgung des Körpers zu sichern. Dies wird durch eine Erhöhung der enddiastolischen Füllung durch einen vermehrten venösen Rückstrom erreicht. Der Ventrikel wirft ein größeres Schlagvolumen bei Zunahme des Restvolumens aus. Es kommt zu einer regulativen Erweiterung aller vier Herzhöhlen (Dilatation) mit kompensatorischer Verdickung der Herzmuskulatur. Man spricht von einer harmonischen (Volumen-)Hypertrophie, weil die Wanddickenzunahme immer parallel zur Vergrößerung der Innenvolumina einhergeht. Die maximale systolische Wandspannung bleibt dabei annähernd gleich.⁴⁰

Mit der dimensionalen Veränderung des Herzens geht in der Regel auch eine weitere regulative Anpassung einher. Eine Herzfrequenzabsenkung wird dabei durch eine

Schlagvolumenzunahme bereits in Ruhe ausgeglichen.⁴⁵ Bei Athleten erreichen wesentlich höhere Herzzeitvolumina eine maximale Sauerstoffaufnahme.⁴⁰ Insgesamt zeigt sich eine Verbesserung der systolischen und diastolischen Funktionen des Herzens.⁴⁶ Eine Erweiterung der Herzkranzgefäße, eine vermehrte Kapillarisation sowie eine Zunahme von Anzahl und Größe der Mitochondrien sorgen für den erhöhten Blutbedarf bzw. eine ausreichende Sauerstoffversorgung der Myozyten.⁴⁰ Somit geht mit der Hypertrophie des Sportherzens eine erhöhte Leistungsfähigkeit einher.

Ob und wie stark eine durch Ausdauertraining entstandene Hypertrophie ausgeprägt ist, hängt entscheidend von Trainingsart, -dauer und -frequenz ab.⁴⁷ In Tierexperimenten erzielt man durch Schwimmtraining eine größere Hypertrophie als durch Laufrad- oder Laufbandtraining.⁴⁸

Bei der physiologischen Hypertrophie führen hauptsächlich mechanische Belastung und Wachstumsfaktoren zur Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene.⁴⁹ Dabei existieren über die Expression Hypertrophie-assoziiierter Gene nach Ausdauersport im Tiermodell bislang unzureichende und unterschiedliche Daten. Eine Studie an männlichen Mäusen berichtet über einen signifikanten Anstieg von ANP und BNP nach Laufradtraining.⁵⁰ Andere Autoren beschreiben dagegen eine unveränderte bzw. sogar reduzierte Expression der Hypertrophie-marker durch Laufradtraining bei männlichen Mäusen.⁵¹ Schwimmtraining bei männlichen Ratten erzeugt eine verstärkte Expression der adulten MHC-Isoform, α -MHC, sowie verringerte Expressionen von ANP und BNP.⁵² Konhilas und Iemitsu zeigen somit, dass das fetale Genprogramm nicht induziert wird. Inwiefern es bei der physiologischen Hypertrophie tatsächlich zur Einschaltung des fetalen Genprogrammes kommt, bleibt dadurch ungeklärt. Die Studien untersuchen ausschließlich männliche Tiere. Ob es Geschlechterunterschiede in den Expressionen gibt, ist demnach noch nachzuweisen.

Regelmäßiger Ausdauersport erhöht die Vaskularisierung und schützt so das Myokard vor ischämischem Insult.⁵³ Im Hinblick auf die Kapillarisation nach Ausdauersport bei Nagern gibt es jedoch unterschiedliche Aussagen. In Versuchen mit männlichen Ratten und Laufbandtraining kommt es zu einer Proliferation der Kapillaren.^{54, 55} Einige dieser Studien berichten sogar über eine Zunahme der Kapillardichte ohne die Entwicklung einer Hypertrophie. Weiterhin wird beschrieben, dass es nach einem Wegfall des Stimulus zu einem Rückgang der Kapillardichte kommt. Die ursprüngliche Kapillaranzahl ist dabei nach einem Zeitraum erreicht, über den auch das Training andauerte.⁵⁶ Im Gegensatz dazu zeigt ein Versuch mit männlichen Mäusen und Schwimmtraining keine Unterschiede in der

Kapillardichte im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe.⁵⁷ Es bleibt zu berücksichtigen, dass eine Veränderung der Kapillardichte im Zusammenhang steht mit der verwendeten Tierart, dem Trainingsmodell (-intensität) und dem Trainingszeitraum. Bislang existieren keine Daten über Geschlechterunterschiede in der Kapillardichte bei männlichen und weiblichen Mäusen nach Laufradtraining.

1.4.2 Pathologische Hypertrophie durch Myokardinfarkt

Ein Myokardinfarkt wird durch die Okklusion eines Koronargefäßes induziert. Die Folgen sind Ischämie und metabolische Minderversorgung des durch das Koronargefäß zu versorgende Herzmuskelgewebes. Das führt letztlich zu einem Untergang des betroffenen Myokards. Durch Apoptose und Nekrose wird der Verlust der Myozyten bereits in der frühen Phase post-MI bestimmt. Infolge nekrotisierender Herzmuskelzellen werden Entzündungszellen in das Infarktgebiet eingeschleust, deren Ziel es ist, untergegangene Myozyten zu beseitigen.⁵⁸ Wenige Tage post-MI beginnt die Bildung von Granulationsgewebe im Bereich der Infarktregion, um die Zugfestigkeit des geschädigten Gewebes zu erhöhen und damit einer Rupturgefahr vorzubeugen. Das finale Ergebnis ist die Narbenbildung im Infarktgebiet.⁵⁹

Aber nicht nur das Infarktgebiet ist von strukturellen Veränderungen betroffen, sondern auch das nichtinfarzierte Gebiet. Infolge des Verlustes an kontraktile Masse kommt es zu einer Ausdehnung des infarzierten Gebietes durch den Verlust und ein sogenanntes „*side-to-side-slippage*“ (Aneinanderrücken) von Myozyten im überlebenden Myokard.⁶⁰ Die entstehende Dilatation des linken Ventrikels beeinträchtigt die systolische Funktion und verringert das Schlagvolumen.⁶¹ Der enddiastolische Druck steigt, und mit ihm setzt der Wandstress ein. Durch die Induktion sogenannter Stresssignale erfolgt das Remodeling des überlebenden Myokards.⁴⁴ Der Herzmuskel versucht durch die Hypertrophie einen Zuwachs an Kontraktilität zu schaffen, um die Inotropie des Herzens zu steigern, den Wandstress herabzusetzen und das Schlagvolumen zu erhöhen.⁶² Ein MI wird bestimmt durch Druck- und Volumenbelastungen,⁶³ so dass sowohl exzentrische wie auch konzentrische Hypertrophie gleichermaßen auftreten.^{64, 65} Nach dem Gesetz von LaPlace nimmt die Wandspannung proportional zu Druck und Radius sowie umgekehrt proportional zur Wanddicke zu.⁶ Kommt es nun zu Druck- und Volumenbelastungen, die einen erhöhten Radius nach sich ziehen, und gelingt es nicht, die Wandspannung zu normalisieren, ist die Folge ein erhöhter Wandstress.⁶⁶ Dieser kann zum einen mechanisch ausgelöst werden, zum anderen durch neurohumorale,

para- oder autokrine Botenstoffe. Diese Stressfaktoren können verschiedene Rezeptoren aktivieren und dadurch Signale freisetzen, die eine veränderte Genexpression sowie Proteinbiosynthese zur Folge haben.

Neben der strukturellen Veränderung der Myozyten erfolgen eine exzessive Einlagerung von interstitiellem Kollagen⁴ und eine Herabsetzung der Kapillardichte^{64, 65}. Die zunehmende Fibrosierung fördert die Reduktion der Kapillardichte, was die Diffusionswege von Sauerstoff zu den Kardiomyozyten verlängert und eine chronische, lokale Hypoxie hervorruft.⁶⁷ Es kommt zu einer Verschiebung der Energiebalance, wodurch im kardialen Interstitium der Kardiomyozyten-Phänotyp verändert wird. Dies geschieht durch die Reinduktion des fetalen Genprogrammes.^{10, 68-71} Die Folge ist eine Reexpression fetaler Gene, die demnach als sogenannte „Hypertrophiemarker“ anerkannt werden.^{15, 52} Unter dem Einfluss pathologischer Hypertrophiestimuli kommt es auf Kosten von adultem α -MHC zu einer vermehrten Expression von fetalem β -MHC⁷² und auf Kosten von adultem α -cA zu einer vermehrten Expression von fetalem α -skA. Solche Expressionswechsel führen zu einer weniger Energie benötigenden Isoform und bewirken eine Verschiebung vom Fett- in Richtung Glukosemetabolismus.^{10, 59} Östrogen hat unter anderem Einfluss auf die Plasmakonzentration von ANP und BNP bei Patienten mit HI. Der Anstieg von ANP und BNP ist bei herzinsuffizienten Frauen geringer als bei Männern mit vergleichbarem Krankheitsbild.⁷³

Eine erhöhte DNA-Synthese findet in den Endothelzellen, die die Kapillaren auskleiden, statt.⁵⁹ Annähernd ein Drittel der kompletten DNA-Synthese, die im nichtinfarzierten Myokard stattfindet, ist in den Endothelzellen lokalisiert.⁷⁴ Jedoch ist die Endothelzellproliferation nicht hoch genug, um den Umfang der Myozytenhypertrophie völlig zu kompensieren. Das Ergebnis ist ein Abfall des Kapillaren/Muskelfaser-Verhältnisses und demzufolge ein Anstieg der Sauerstoffdiffusionsdistanz. In einem Infarktmodell an männlichen Ratten zeigen Anversa et al., dass es vier Wochen post-MI im überlebenden Myokard zu einer Abnahme der Kapillardichte kommt.^{64, 75} Ovariectomierte und E2-behandelte Mäuse zeigen in der chronischen Phase post-MI eine signifikant höhere Kapillardichte im Vergleich zu Placebo-behandelten.³⁸

Trotz anfänglicher Kompensation kann die Hypertrophie später zur Maladaptation werden und das Fortschreiten der Herzinsuffizienz begünstigen, indem durch eine relative Abnahme der Kapillardichte in Relation zur Kardiomyozytenmasse eine Ischämie und eine Verminderung der Koronarreserve eintreten.⁷⁶ Die Umkehr der anfangs positiven Wirkungen der Hypertrophie wird vor allem durch eine relative Abnahme der Kapillardichte in Bezug auf

die entstandene kontraktile Masse verursacht. Energieangebot und Energiebedarf stehen dann im Widerspruch zueinander, Myozytennekrosen setzen ein und die interstitielle Fibrose schreitet voran. Außerdem entwickeln die intramyokardialen Koronararterien eine Mediazunahme sowie eine perivaskuläre Fibrose, die durch die hypertrophiebedingte Druckbelastung erzeugt werden. Die Folge können weitere Myokardischämien und damit verbundene Myozytenverluste sein.⁷⁷

1.4.3 Geschlechterunterschiede und Effekte von Östrogen bei Myokardhypertrophie

Die Tatsachen, dass MI bei Männchen eine höhere Mortalität, Rupturgefahr, Infarktexpansion, Dilatation,⁷⁸ interstielle Kollagenansammlung, Myozytenhypertrophie,⁷⁹ und eine herabgesetztere LV-Funktion⁷⁸ auslöst als bei Weibchen, könnte auf protektive Eigenschaften des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen schließen. So wurde bei weiblichen, ovariectomierten Mäusen durch die Zugabe von E2 in der chronischen Phase post-MI eine bessere LV-Funktion, höhere Kapillardichte und geringere Fibrosierung erzielt im Vergleich zu Placebo-behandelten.³⁸ Welche Strukturen von den protektiven Eigenschaften auch in der akuten Phase post-MI profitieren, bleibt zu untersuchen. Vermutlich wird durch die größere Myozytenhypertrophie der Männchen, eine höhere Expression der Hypertrophiemarker und eine größere Abnahme der Kapillardichte, auch durch die höhere Zunahme des Kollagengehalts, im Vergleich zu den Weibchen stattfinden.⁷⁹

1.5 TIERMODELL

Im letzten Jahrzehnt gab es einen Wandel bezüglich der Eignung zu operierender Tiere. Wurden anfangs bevorzugt Ratten eingesetzt - mitunter wegen ihrer größeren Gestalt gegenüber Mäusen - so kam es, dass mit der Ermöglichung mikrochirurgischer Eingriffe, Mausmodelle an Popularität gewonnen haben. Dies beruht unter anderem auf der kleineren Tiergröße, kurzer Trächtigkeitenzeiten, großer Wurfgröße, bekanntem Erbgut sowie der Möglichkeit des Einsatzes von Knockout- und Overexpressions-Modellen. Das menschliche und das murine Genom sind zu ca. 85% identisch.⁸⁰

1.6 ZIELE DER ARBEIT UND FRAGESTELLUNG

In dieser Arbeit sollen weitere Erkenntnisse über die physiologische und pathologische Myokardhypertrophie bei der Maus gewonnen werden. Dabei wird gezielt nach Geschlechterunterschieden gesucht.

Zur Induktion einer physiologischen Hypertrophie absolvieren die Tiere ein freiwilliges, fünfwöchiges Laufradtraining. Neben der Laufaktivität sollen die Herzfunktion, die morphologischen Veränderungen des linken Ventrikels, die mRNA-Expression hypertrophie-assoziiierter Gene sowie die Veränderung der Kapillardichte dargestellt und auf Geschlechterunterschiede untersucht werden.

Durch einen Myokardinfarkt soll eine pathologische Hypertrophie erzeugt werden. Dies erfolgt durch eine permanente Ligatur der linken deszendierenden Koronararterie. Nachfolgend werden die Mortalität, die Infarktgröße, die Herzfunktion, die morphologischen Veränderungen des linken Ventrikels, die mRNA-Expression ausgewählter Hypertrophiemarker und die Kapillardichte im Bereich des überlebenden Myokards sowie im Infarkttrandgebiet ermittelt und auf Geschlechterunterschiede untersucht.

Fragestellung:

Laufradtraining

- 1) Gibt es Geschlechterunterschiede in der Laufaktivität?
- 2) Gelingt es, durch das fünfwöchige Laufradtraining eine physiologische Hypertrophie zu erzeugen? Treten dabei Geschlechterunterschiede auf?
- 3) Verbessert sich die Herzfunktion durch Laufradtraining? Gibt es hierbei Geschlechterunterschiede?
- 4) Kommt es durch Laufradtraining zu einer Induktion des fetalen Genprogrammes, d.h. werden die Hypertrophiemarker höher exprimiert? Gibt es hierbei Geschlechterunterschiede?
- 5) Erhöht Laufradtraining die Kapillardichte? Treten dabei Geschlechterunterschiede auf?

Myokardinfarkt

- 1) Wird durch die Induktion eines MIs eine pathologische Hypertrophie erzeugt?
- 2) Wie hoch ist die Mortalität nach MI? Gibt es hierbei Geschlechterunterschiede?
- 3) Welche mittlere Infarktgröße wird erzeugt? Treten dabei Geschlechterunterschiede auf?
- 4) Verschlechtert sich die Herzfunktion nach MI? Gibt es hierbei Geschlechterunterschiede?
- 5) Werden die Hypertrophiemarker nach MI höher exprimiert? Gibt es hierbei Geschlechterunterschiede?
- 6) Kommt es nach MI zu einer Reduktion der Kapillardichte im überlebenden Myokard und im Infarkttrandgebiet? Treten dabei Geschlechterunterschiede auf?

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 MATERIAL

2.1.1 Geräte

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Geräte mit Firmenname und -sitz.

Bezeichnung	Firma	Ort
Hamsterlaufrad, Metall, Ø 11cm	Trixie	Tarp, D
Fahrradcomputer K44, mit Kabel	Conrad	Berlin, D
Waage	Sartorius	Göttingen, D
Kaltlichtlampe KL 1500 LCD	Schott	Mainz, D
Mouse Ventilator Minivent Type 845	Hugo Sachs Elektronik Harvard Apparatus	March, D
Stereomikroskop Leica MZ 6	Leica Microsystems	Wetzlar, D
Heizkissen Sanitas SHK 10, Typ P9	Hans Dinslage	Uttenweiler, D
InfraRot-Lampe IR 11, 150W	Petra-Electronic	Burgau, D
Vevo 770 High-Resolution Imaging System	Visualsonic Inc.	Toronto, Ont., Kanada
RMV 707-Schallkopf	Visualsonic Inc.	Toronto, Ont., Kanada
Vevo Mouse Handling Table	Visualsonic Inc.	Toronto, Ont., Kanada
Digitalkamera DSC-S75 Cybershot	Sony	Berlin, D
Präzisions-Taschenschiebelehre Vernier Caliper	Conrad	Berlin, D
Gewebeeinbettautomat Shandon Citadel 1000	Thermo Electron Corporation	Erlangen, D
Paraffin-Ausgießstation EC 350	Microm International	Walldorf, D
Mikrotom HM 325	Microm International	Walldorf, D
Schüttler IKA VibraxVXR Typ VX8	Janke & Kunkel	Staufen, D

Lichtmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss	Göttingen, D
Fluoreszenzmikroskop Leica DMIRE 2	Leica Microsystems	Wetzlar, D
Fast Prep FP 120	Thermo Fisher Scientific	Waltham, MA, USA
Schüttler Polymax 1040	Heidolph Instruments	Schwabach, D
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments	Schwabach, D
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Eppendorf	Hamburg, D
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies	Böblingen, D
Heizblock TCR 100	Carl Roth	Karlsruhe, D
TAQ MAN 7.300 RealTime PCR System	Applied Biosystems	Warrington, UK

2.1.2 Pharmaka

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Pharmaka mit Bezeichnung, Wirkstoff, Firmenname und –sitz.

Bezeichnung	Wirkstoff	Firma	Ort
K 113	Ketaminhydrochlorid- Xylazinhydrochlorid	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Rimadyl [®]	Carprofen	Pfizer	Karlsruhe, D
Isotonische Kochsalzlösung	Natriumchlorid 0,9%	Fresenius Kabi	Bad Homburg, D
Braunol [®]	Povidon-Iod	B. Braun	Melsungen, D
Isofluran FORENE [®]	1-Chloro-2,2,2- trifluoroethyl- difluoromethylether	Abbott	Wiesbaden, D

2.1.3 Operationsbesteck**Tabelle 3: Übersicht über das verwendete Operationsbesteck mit Kurzbeschreibung, Firmenname und –sitz.**

Bezeichnung	Beschreibung	Firma	Ort
Arterienklemme Baby Mixer Hemostat	gebogen 90°, 14cm	F.S.T.	Heidelberg, D
Venenverweilkanüle BD Venflon Pro	22gauge	Becton Dickinson	Heidelberg, D
Augenpinzette	gebogen, anatomisch, 10cm	Heiland	Hamburg, D
Augenpinzette	gerade, anatomisch, 10cm	Heiland	Hamburg, D
Präparierschere	gerade, st/st, 11,5cm	Heiland	Hamburg, D
Chirurgische Schere	gerade, s/st, 13cm	Heiland	Hamburg, D
Mikroschere Student vannas spring scissors		F.S.T.	Heidelberg, D
Nadelhalter	14cm	Heiland	Hamburg, D
Mikronadelhalter Castroviejo	9cm	F.S.T.	Heidelberg, D
Nadeln HSF-12 mit Federöhr	½-kreisförmig, schneidender Nadelkörper	Serag-Wiessner	Naila, D
Nadeln	½ Kreis, 9mm, Federöhr, unsteril	PRO-MED	Tuttlingen, D
Nadeln mit Langlochöhr	½-kreisförmig, runder Nadelkörper	TNI Chirurgisches Nadelwerk GmbH	Ichtershausen, D
Seidenfaden	6-0, nicht resorbierbar, 100m Flachspule	Ernst	Hannover, D
Nadel-Faden- Kombination	Prolene 7-0 Seidenfaden, Nadel TF 6	EthiH MVn	Norderstedt, D

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 4: Übersicht über die verwendeten Verbrauchsmaterialien mit Bezeichnung, Firmenname und –sitz.

Bezeichnung	Firma	Ort
Durapore, medizinische Pflaster	3M Health Care	Neuss, D
elca [®] med Enthaarungscreme	Asid-Bonz	Herrenberg, D
isabelle Wattestäbchen	Rauscher	Oederan, D
Elektrodengel Spectra 360	Parker	Fairfield, New Jersey, USA
Ultraschallgel Aquasonic	Parker	Fairfield, New Jersey, USA
Zentrifugenröhrchen 15ml	TPP Techno Plastic Products	Trasadingen, Schweiz
Eppendorf-Gefäße 0,4; 1,5 bzw. 2ml	Eppendorf	Hamburg, D
Einbettkassetten Histosette II	Simport Plastics Ltd.	Beloeil, QC, Kanada
Microtome Blade S 35	pfm	Köln, D
Adhäsionsobjektträger SuperFrost Ultra Plus	Menzel-Gläser	Braunschweig, D
Objektträgerkästen	Carl Roth	Karlsruhe, D
Deckgläser, 24 x 50mm	Carl Roth	Karlsruhe, D
Kimtech Science Präzisions-Wischtücher	Kimberly-Clark Professional	Koblenz, D
Super Pap Pen Fettstift	Zymed Laboratories	San FrancisHVM, CA, USA

2.1.5 Puffer

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Puffer mit Bezeichnung, Zusammensetzung, Firmenname und –sitz.

Bezeichnung	Zusammensetzung	Firma	Ort
Dulbecco´s PBS 1x		PAA Laboratories	Pasching, A
PBS-Tablets	10mM, pH 7,4, 140mM NaCl, 2,7mM KCl	Merck	Darmstadt, D

PBlec	10mM PBS, pH 6,8 1mM CaCl ₂ 1mM MgCl ₂ 0,1mM MnCl ₂ 1% Triton X 100		
Incubation buffer	10mM PBS, pH 7,2 0,5% BSA 0,25% Triton X 100 1:25 in PBlec		

2.1.6 (Färbe-)Lösungen/Chemikalien

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten (Färbe-)Lösungen und Chemikalien, deren Konzentration bzw. Verwendungszweck, Firmenname und –sitz.

Bezeichnung	Konzentration/Erläuterung	Firma	Ort
Formaldehydlösung	4%, pH 6,9	Merck	Darmstadt, D
Ethanol	100Vol%	Herbeta-Arzneimittel	Berlin, D
Xylol		Carl Roth	Karlsruhe, D
Paraffin 6 bzw. 9		Microm International	Walldorf, D
Weigerts Hämatoxylinlösung A		Carl Roth	Karlsruhe, D
Eosin Y Lösung		Sigma-Aldrich	Steinheim, D
VectaMount™ Permanent Mounting Medium	Einschlußmedium	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
BSA	Bovines Serum Albumin, 35%	Sigma-Aldrich	Steinheim, D
Triton X 100		Carl Roth	Karlsruhe, D
Griffonia simplicifolia Lectin I Isolectin B4,	0,5mg/ml	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA

biotinyliert			
Streptavidin Cy3	0,2mg/ml	Linaris	Wertheim-Bettingen, D
Vectashield® Mounting Medium	Einschlußmedium	Vector Laboratories	Burlingame, CA, USA
Dapi	4',6 Diamidino-2-phenylindol, 2mg/ml	Linaris	Wertheim-Bettingen, D
DEPC-treated water	Diethylpyrocarbonat, 0,1%	G-Biosciences	St. Louis, Montana, USA
RNase AWAY™ Reagent		Invitrogen	Karlsruhe, D
Lysing Matrix D		MP Biochemicals	Heidelberg, D
RNAzol B		Biozol	Eching, D
Chloroform p.A.		Carl Roth	Karlsruhe, D
Isopropanol p.A		Carl Roth	Karlsruhe, D
Random-Primer	3µg/µl	Invitrogen	Karlsruhe, D
SuperScript™ II	200units/µl	Invitrogen	Karlsruhe, D
5 X First-Strand Buffer	250mM Tris-HCl (pH 8.3, RT) 375mM KCl 15mM MgCl ₂	Invitrogen	Karlsruhe, D
DTT	Dithiothreitol, 0,1M	Invitrogen	Karlsruhe, D
RNase OUT™	5ng RNase A/unit	Invitrogen	Karlsruhe, D
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat 100mM	Invitrogen	Karlsruhe, D
TaqMan® Therm DNA Polymerase		Rapidozym	Berlin, D
Power SYBR® Green PCR Master Mix		Applied Biosystems	Warrington, UK

2.1.7 Primer**Tabelle 7: Übersicht über die in der rt-PCR verwendeten Primer, deren Sequenzen und Fragmentlängen.**

Zielgen	Primersequenz (5' zu 3')	Fragmentlänge [bp]
GAPDH	FW: ATG GTG AAG GTC GGT GTG A	84
	RV: AAT CTC CAC TTT GCC ACT GC	
ANP	FW: CCT GTG TAC AGT GCG GTG TC	91
	RV: CCT CAT CTT CTA CCG GCA TC	
BNP	FW: GCA CAA GAT AGA CCG GAT CG	108
	RV: CAG GCA GAG TCA GAA ACT GGA	
α -skA	FW: CTT CAA TGT GCC TGC CAT GT	95
	RV: CAT CGC CAG AAT CCA GAA CA	
α -MHC	FW: GCC AAG ACT GTC CGG AAT GA	131
	RV: TGG AAG ATC ACC CGG GAC TT	
β -MHC	FW: CAA AGG CAA GGC AAA GAA AG	149
	RV: TCA CCC CTG GAG ACT TTG TC	

2.1.8 Software**Tabelle 8: Übersicht über die verwendeten Softwareprogramme mit Firmenname und –sitz.**

Bezeichnung	Firma	Ort
Office 2003 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft	
Adobe Acrobat 7.0 Professional/Adobe Reader 8	Adobe Systems	München, D
Adobe Photoshop 7.0	Adobe Systems	München, D
EndNote 9	Thomson Scientific	Philadelphia, USA

ImageJ	NCBI/National Institutes of Health	Bethesda, Maryland, USA
Vevo 770	Visualsonic Inc.	Toronto, Ont., Kanada
Openlab 3.1.7.	Improvision	Tübingen, D
Agilent Expert 2100	Agilent Technologies	Böblingen, D
ABI-7000	Applied Biosystems	Warrington, UK
SPSS 15.0	SPSS Inc.	Chicago, Illinois, USA

2.2 METHODEN

Der Versuch bestand aus zwei Teilmodellen. Hierbei handelte es sich zum einen um das freiwillige Laufradtraining (LRT) zur Erzeugung einer physiologischen Hypertrophie. Zum anderen wurde ein Myokardinfarkt (MI) zur Erzeugung einer pathologischen Hypertrophie induziert.

2.2.1 Versuchstiere

Bei den für den Tierversuch mit der Nummer G 0148/06 eingesetzten Tieren handelte es sich um Inzucht-Mäuse vom Stamm C57Bl/6J. Dieser wurde wegen seiner im Vergleich zu anderen Mausstämmen besseren Laufleistung gewählt.⁸¹ Die Mäuse wurden von der Firma Harlan Winkelmann aus Borcheln erworben und im institutseigenen Tierstall nach den Vorschriften für einen spezifisch pathogenfreien Versuchsstall in IVC-Käfigen (*individually ventilated cage*) gehalten. Jeder Käfig wurde durch eine sogenannte Käfighaube verschlossen. Für eine suffiziente Atemluftversorgung der Versuchstiere waren entsprechende Gebläse für Be- und Entlüftung erforderlich. Dadurch sollte ein Hygiene- und Allergieschutz für Tier und Mensch gewährleistet werden. Den Tieren blieb eine Eingewöhnungsphase von zwei Tagen für die neue Umgebung und das neue Klima. Wasser und Standardhaltungsfutter standen den Tieren ad libitum zur Verfügung. Der simulierte Tag-Nacht-Rhythmus betrug jeweils zwölf Stunden.

2.2.2 Freiwilliges Laufradtraining

Am Trainingsmodell waren insgesamt 60 Mäuse beteiligt, von denen 15 männliche sowie 15 weibliche das fünfwöchige Laufradtraining (LRT) absolvierten. Die Tiere waren zu Versuchsbeginn sieben Wochen alt und wurden einzeln gehalten. Jeder Käfig war mit einem handelsüblichen Hamsterlaufrad ausgestattet, welches über einen Magneten und dessen Empfänger mit einem Fahrradcomputer verbunden war. Wurde das Laufrad in Bewegung gesetzt, so gab der daran befestigte Magnet bei jeder Umdrehung ein Signal an den Empfänger und dieser wiederum an den Fahrradcomputer weiter (Abb.1). Letzterer wurde zu Versuchsbeginn geeicht, um die zurückgelegte Strecke in km/h anzugeben.

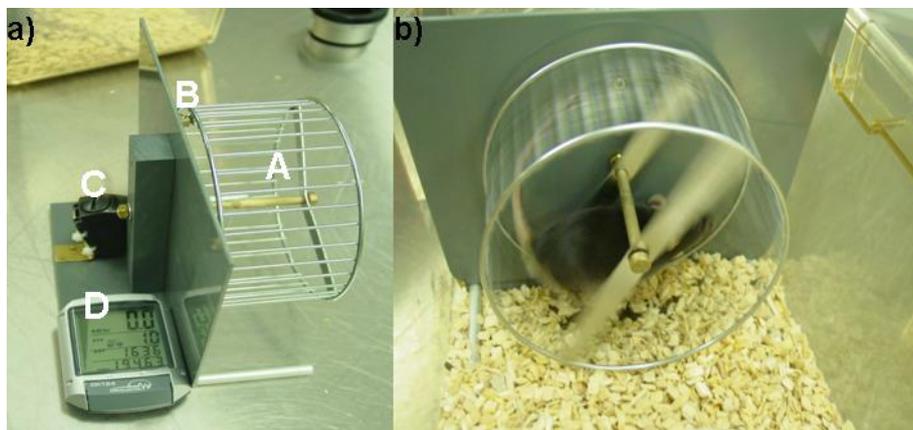


Abbildung 1: a) Laufradsystem. Es besteht aus einem herkömmlichen Hamsterlaufrad A, das über einen Magneten B und Empfänger C mit einem Fahrradcomputer D verbunden ist. **b) Eine Maus während des Trainings.**

Nach der Eingewöhnungsphase wurde jede Maus gewogen und ihr Käfig mit einem Laufrad (LR) versehen. Die Tiere begaben sich freiwillig ins das LR. Da Mäuse nachtaktiv sind, fand auch das Training überwiegend in den nächtlichen Stunden statt. Nach zwei bis drei Tagen haben sich die Mäuse an das Rad gewöhnt und die Laufleistung wurde gleichmäßig. Über einen Zeitraum von fünf Wochen wurden von Montag bis Freitag die erzielten Leistungen täglich vom Fahrradcomputer abgelesen. Die Montagswerte wurden dreigeteilt, um die Ergebnisse für Freitag, Samstag und Sonntag zu ermitteln. Bei jedem Tier wurden sowohl die Durchschnittsgeschwindigkeit in km/h als auch die über 24h zurückgelegte Strecke in km abgelesen. Die im Laufrad verbrachte Zeit ermittelte sich aus dem Quotienten von Weg geteilt durch Geschwindigkeit. Anschließend wurde der Fahrradcomputer zurückgesetzt, um am darauf folgenden Tag die Werte der letzten 24h anzuzeigen.

Das System wurde mindestens einmal wöchentlich gereinigt, gefettet und geeicht, um eine optimale Funktion zu gewährleisten.

Die Kontrollgruppen bestanden ebenfalls aus 15 männlichen und 15 weiblichen Tieren, die in Gruppen zu je drei Männchen bzw. fünf Weibchen in Käfigen ohne Laufradsystem für denselben Zeitraum gehalten wurden.

2.2.3 Induktion eines Myokardinfarktes

In diesem Modell wurden 78 Tiere operiert. Hiervon erhielten 25 Männchen und 27 Weibchen einen Myokardinfarkt (MI), indem die LAD (*left anterior descending coronary artery*) permanent ligiert wurde. 13 Männchen und 13 Weibchen dienten als Kontrollgruppen und wurden als solche nur „scheinoperiert“ (sham). Die Tiere waren zu Versuchsbeginn zwölf Wochen alt.

Operationsvorbereitung

Vor der Operation wurde jede Maus gewogen, um anhand des Gewichtes die Dosierungen von Anästhetikum und Analgetikum zu bestimmen. Als Injektionsnarkotikum wurde K113 der Firma Sigma-Aldrich eingesetzt. Es handelte sich hierbei um eine Ketaminhydrochlorid-Xylazinhydrochlorid-Solution, in der 80mg Ketaminhydrochlorid und 12mg Xylazinhydrochlorid in 1ml destilliertem Wasser gelöst waren. Da die vom Hersteller empfohlene Dosis von 1ml/kg KG keine ausreichende Narkosewirkung erzielte, wurde eine Optimierung durchgeführt, deren Ziel es war, die Anästhesie für die Operationsdauer von 45min aufrecht zu erhalten. Hierfür wurde die Solution in einem Verhältnis von 1:10 mit 0,9% NaCl (physiologische Kochsalzlösung) verdünnt.

Für das einzelne Tier berechnete sich die zu verabreichende Dosis wie folgt:

$$\text{Ketamin-Xylazin-NaCl [ml]} = 0,0071\text{ml/g} \times \text{KG [g]} + 0,1714$$

Die Maus wurde fixiert und das Narkotikum intra peritoneal (i.p.) injiziert. Ein operationsfähiger Zustand war mit dem Ausfall des „toe pinch-Reflexes“ (Zwischenzehenreflex, Flexorreflex) erreicht. Dieser trat ca. 5min nach Verabreichung des

Narkotikums ein. War der Reflex nach 8min noch immer positiv, wurden weitere 0,05ml des K113-NaCl-Gemisches i.p. injiziert. Die Maus befand sich nach dem Ausfall des *toe pinch*-Reflexes für etwa 45min in operationsfähigem Zustand.

Des Weiteren erfolgte die präventive i.p.-Injektion des Analgetikums RIMADYL[®], in dem 50mg des Wirkstoffes Carprofen in 1ml destilliertem Wasser gelöst waren. Vom Hersteller wird eine Dosis von 4,0mg/kg empfohlen. Dazu wurden 0,08ml der Stammlösung 1:100 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt. Die Einzeldosis für das jeweilige Tier berechnete sich wie folgt:

$$\text{Rimadyl-NaCl [ml]} = 0,008\text{ml/g} \times \text{KG [g]}$$

Da bei der sich anschließenden Operation (OP) der Thorax eröffnet wird und demzufolge die Lunge kollabieren könnte, musste das Tier intubiert werden (Venenverweilkanüle). Anschließend wurde die intubierte Maus an den Ventilator angeschlossen. Der Ventilator wurde auf eine Atemfrequenz von ca. 200 Atemzügen pro Minute und das Volumen auf ca. 200 μ l Raumluft eingestellt. Zur Vorbeugung einer Hypothermie befand sich unter der Operationsplatte ein Heizkissen. In rechter Seitenlage wurde die Maus unter dem Stereomikroskop (Leica MZ 6) fixiert. Das linke Vorderbein wurde vorsichtig aufgespreizt, so dass die linke Thoraxseite für die OP zugänglich war. Im weiteren Verlauf erfolgte das Entfernen des Felles im Operationsbereich mithilfe von Enthaarungscreme. Anschließend wurde der Bereich gereinigt und mit Braunol[®] desinfiziert.

Operationshergang

Ein etwa 1,5cm langer, parasternaler Schnitt im Abstand von ca. 1cm zum Sternum auf Achselhöhe beginnend in Richtung kaudal eröffnete die Haut. Die Unterhaut wurde stumpf von den Musculi pectorales major et minor getrennt. Beide Brustmuskeln wurden stumpf auseinander präpariert und aufgespannt. Um ein Austrocknen der Muskulatur zu verhindern, wurde diese während der OP hin und wieder mit physiologischer Kochsalzlösung befeuchtet. Durch das Aufspannen der beiden Brustmuskeln richtete sich die Sicht nun auf die Rippen und die Zwischenrippenmuskulatur. Der vierte Interkostalraum wurde aufgesucht. Als Orientierungshilfe diente der Ansatz des Musculus pectoralis minor. Zwei Interkostalräume in Richtung nach kaudal wurde die Zwischenrippenmuskulatur parallel zu den Rippen

durchtrennt. Als Begrenzung für das Eröffnen nach sternal diente die durch die Muskulatur durchscheinende Arteria thoracica interna, die auf keinen Fall verletzt werden durfte, da es sonst zu erheblichem Blutverlust bis hin zum Verbluten des Tieres kommen konnte. In die entgegengesetzte Richtung schnitt man bis auf Höhe der Lunge, gegebenenfalls etwas darüber hinaus. Um den OP-Bereich zu vergrößern, wurden die vierte und fünfte Rippe aufgespannt. Im Sichtfeld befanden sich nun das von Perikard umhüllte Herz und die Lunge. Der Herzbeutel wurde stumpf eröffnet und in die Brusthöhle zurück verlagert. Das Herz lag nun frei. Sichtbar waren die Vorderwand des linken Ventrikels und das linke Herzohr. Zur Ligatur der LAD wurde etwa 1mm kaudal des Herzohres die Nadel-Seidenfaden-Kombination eingestochen und parallel zum Herzohr ausreichend tief durch das Myokard geführt, so dass die nicht sichtbare LAD auch sicher erfasst wurde. Ein chirurgischer Knoten verschloss das Gefäß. War die Ligatur korrekt erfolgt, sollte sich alsbald der Versorgungsbereich der LAD distal der Ligatur als Zeichen muskulärer Ischämie deutlich entfärben (Abb.2).

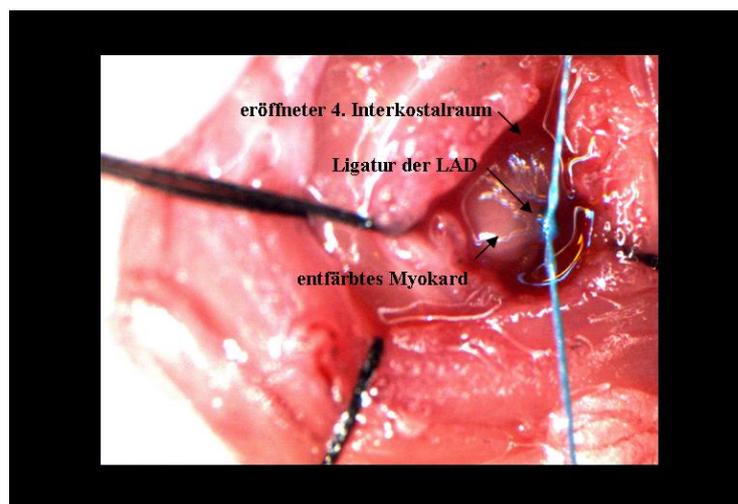


Abbildung 2: Übersicht über den Operationsbereich. Dargestellt ist der aufgespannte, vierte Interkostalraum auf der linken Thoraxseite mit Sicht auf den linken Ventrikel. Nach Ligatur der LAD zeigt sich eine deutliche Entfärbung des zu versorgenden Myokards.

Zum Verschließen der Brusthöhle dienten die beiden Fäden, mit denen die Rippen aufgespannt wurden. Bevor das zweite Heft die Brusthöhle verschloss, wurde diese mit isotoner Kochsalzlösung versehen. Der abführende Schlauch des Ventilators wurde bis zur maximalen Ausdehnung des Brustkorbs abgeklemmt. An dieser Stelle verschloss der Knoten des zweiten Heftes die Brusthöhle. Die Musculi pectorales wurden reponiert und die Haut durch eine fortlaufende Naht verschlossen. Die Maus wurde aus der Fixierung gelöst und

extubiert. In Bauchlage wurde der Brustkorb des Tieres durch leichtes Streichen über den Rücken so lange stimuliert, bis die Spontanatmung wieder einsetzte.

Die sham-OP's erfolgten nach oben genannter Vorgehensweise, jedoch ohne Ligatur der LAD.

Nachsorge

Die operierten MI-Mäuse wurden einzeln in Käfigen gehalten, die sham-Mäuse in kleinen Gruppen. Bis zum Aufwachen aus der Narkose blieben die Käfige vor einer Wärmelampe stehen. 24, 48 und 72h nach der Operation erfolgte die analgetische Nachsorge mit Rimadyl, 4mg/kg, welches 1:200 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt wurde, um eine ausreichende Volumensubstitution zu gewährleisten. Die Injektion erfolgte subkutan in den Nacken des Tieres.

2.2.4 Echokardiographie

Zeitplan

Alle Tiere wurden vor Versuchsbeginn (E0) geschallt. Die LRT- und Sed.-Gruppen wurden fünf Wochen später (E5) und die MI- und Sham-Gruppen elf Tage nach der OP (E11) echokardiographisch untersucht.

Echokardiographische Untersuchungen

Die echokardiographischen Untersuchungen wurden mit dem Ultraschallgerät *Vevo 770 High-Resolution Imaging System* vorgenommen, das mit einem RMV 707B-Schallkopf für Mäuse (30MHz) ausgestattet war.

Vor dem Schallen wurde das Tier gewogen und kam anschließend in die Narkosebox. An diese Box war ein Gaszuführungs- und Ableiteschlauch gekoppelt. Zur Einleitung der Inhalationsnarkose wurden 3Vol% Isofluran gelöst in reinem Sauerstoff (1L/min) zugeführt. Sobald die Maus in Narkose lag, wurde die Isofluranzufuhr zur Erhaltung auf 1,5Vol% gedrosselt. Ein Dreiwegehahn ermöglichte das Umstellen der Gaszu- bzw. abfuhr auf den Beatmungsschlauch der Multifunktionsplattform (*Vevo Mouse Handling Table*), auf der die Maus umgehend in Rückenlage gebracht wurde. Ihr Kopf wurde in die trichterförmige Öffnung des Beatmungsschlauches gelegt, von dem aus die Weiterversorgung des Tieres mit dem Inhalationsgemisch stattfand. Die Plattform war beheizbar und enthielt vier Elektroden, über die die Aufzeichnungen von Herzfrequenz und Elektrokardiogramm (EKG) erfolgten.

Dazu wurden alle Elektroden mit Elektrodengel versehen und jede Gliedmaße der Maus auf einer Elektrode fixiert. Es folgten die Enthaarung und Reinigung des Brustkorbs, der im Anschluss mit Ultraschallgel versehen wurde. Folgende Aufnahmen wurden zur späteren Auswertung gespeichert:

Parasternale lange Achse

Hierbei wurde im B-Mode (Brightness-Mode, zweidimensionales Bild) der linke Ventrikel im Längsschnitt dargestellt. Der Ultraschallkopf wurde über dem Sternum positioniert und in einem Winkel von ca. 30° entgegen dem Uhrzeigersinn ausgerichtet. Die größtmögliche Darstellung des linken Ventrikels erreichte man, wenn sich Herzspitze und Austritt der Aorta deutlich darstellten (Abb.3). In dieser Position wurden drei unterschiedliche Aufnahmen gespeichert, anhand derer die endokardiale Fläche des linken Ventrikels in Systole bzw. Diastole ($LV\ Area_{S/D}$) sowie dessen maximaler endokardialer Diameter ($LV\ Major_{S/D}$) gemessen wurden. Dabei wurden pro Aufnahme drei Messungen durchgeführt, von denen schließlich der Mittelwert gebildet wurde.

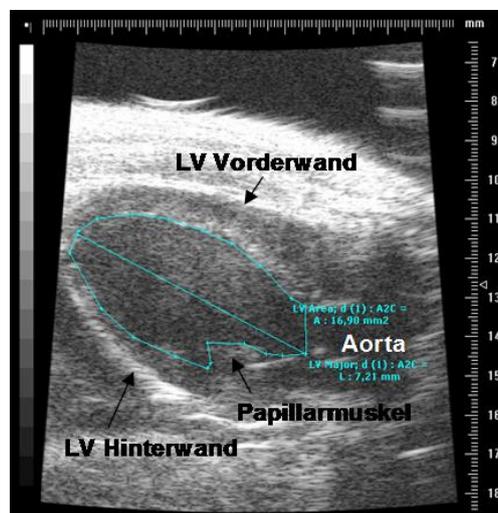


Abbildung 3: Übersicht über die echokardiographische Darstellung der „langen Achse“ des linken Ventrikels mit Einzeichnung der durchgeführten Messungen. Dargestellt ist die Längsachse des linken Ventrikels in ihrer maximalen Ausdehnung. Ausgemessen wurden der Diameter und die Fläche der linken Kammer.

Über die endokardialen Flächeninhalte in Systole und Diastole berechnete sich die prozentuale fraktionelle Flächenänderung (*Fractional Area Change*, FAC) wie folgt:

$$\text{FAC}[\%] = \frac{\text{LVArea}_D - \text{LVArea}_S}{\text{LVArea}_D} \times 100$$

Aus linksventrikulärem Kammerdiameter und Flächeninhalt, die sowohl für die Systole als auch für die Diastole bestimmt wurden, ließ sich das jeweilige Volumen (LV Vol_{S/D}) und darüber wiederum die Auswurffraktion (Ejektionsfraktion, EF) sowie unter Berücksichtigung der Herzfrequenz das Herzminutenvolumen (HMV) des linken Ventrikels nach folgenden Formeln berechnen:

$$\text{LV Vol}_S [\mu\text{l}] = \frac{4}{3} \pi \times \frac{\text{LV Major}_S}{2} \times \left(\frac{\text{LV Area}_S}{\pi \left(\frac{\text{LV Major}_S}{2} \right)} \right)^2$$

$$\text{LV Vol}_D [\mu\text{l}] = \frac{4}{3} \pi \times \frac{\text{LV Major}_D}{2} \times \left(\frac{\text{LV Area}_D}{\pi \left(\frac{\text{LV Major}_D}{2} \right)} \right)^2$$

$$\text{EF}[\%] = \frac{\text{LV Vol}_D - \text{LV Vol}_S}{\text{LV Vol}_D} \times 100$$

$$\text{HMV}[\mu\text{l}/\text{min}] = (\text{LV Vol}_D - \text{LV Vol}_S) \times \text{Herzfrequenz}$$

Parasternale kurze Achse

Hierbei wurde das Herz im Querschnitt dargestellt. Man setzte den Schallkopf im rechten Winkel zum Sternum auf die linke Seite des Brustkorbs auf Achselhöhe. Im B-Mode stellten sich der rechte Ventrikel, das Septum, der linke Ventrikel und dessen zwei Papillarmuskeln dar. Davon wurde eine Übersichtsaufnahme gefertigt (Abb.4).

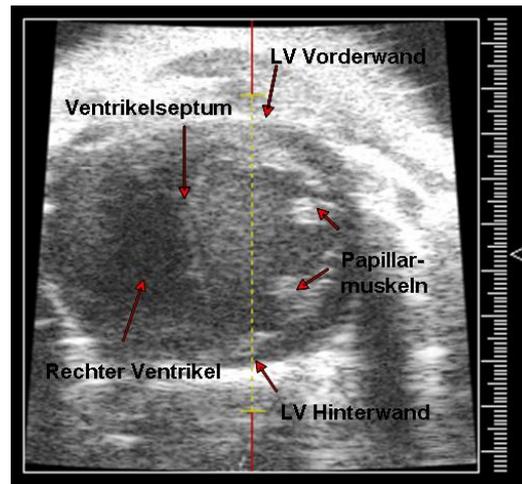


Abbildung 4: Übersicht über die echokardiographische Darstellung der „kurzen Achse“ des Herzens. Dargestellt ist ein Querschnitt des Herzens mit rechtem Ventrikel, Interventrikularseptum und linkem Ventrikel. Der Positionsmarker wird für die M-Mode-Aufnahmen mittig des linken Ventrikels positioniert.

M-Mode-Aufnahmen (*Motion-Mode*, zweidimensionales Bild des quer geschnittenen Ventrikels in Bewegung) wurden erzielt, indem der Positionsmarker mittig auf den Querschnitt des linken Ventrikels gesetzt wurde (Abb.4). Es wurden drei Aufnahmen festgehalten. Beim M-Mode wurden die Dicken der vorderen und hinteren Wand des linken Ventrikels (LV IVS_{S/D}, LV PW_{S/D}) sowie der Kammerdurchmesser (LVID_{S/D}) während der Systole bzw. der Diastole ermittelt (Abb.5). Auch hier erfolgten pro Aufnahme jeweils drei Messungen, aus denen die Mittelwerte gebildet wurden.

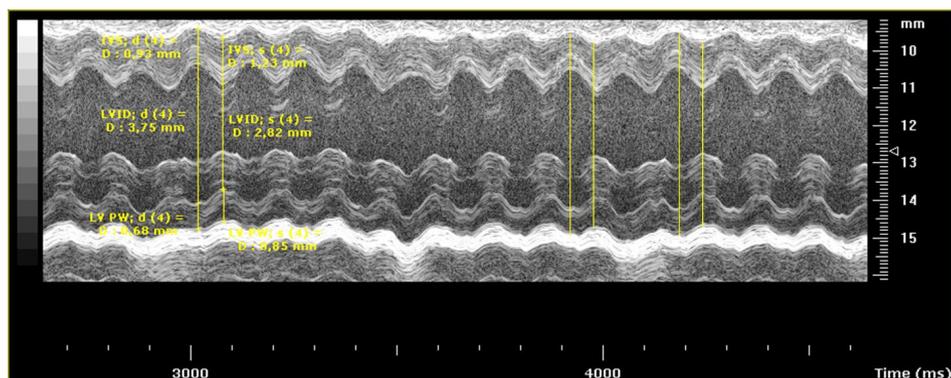


Abbildung 5: Übersicht über die echokardiographische M-Mode-Darstellung des linken Ventrikels und die dazu durchgeführten Messungen. IVS = Vorderwanddicke des linken Ventrikels, LVID = Kammerdurchmesser, LVPW = Hinterwanddicke des linken Ventrikels.

Aus den Wanddicken und dem Diameter in der Diastole konnte die Masse des linken Ventrikels anhand folgender Formel berechnet werden:

$$\text{LV-Masse [mg]} = 1,05 \times [(\text{LVID}_D + \text{LVPW}_D + \text{IVS}_D)^3 - \text{LVID}_D^3] \times 0,8$$

Nach Beendigung der Echokardiographie wurde die Zufuhr von Isofluran abgestellt, das Ultraschallgel von der Maus abgetragen, die Fixierung der Gliedmaßen gelöst und das Tier zum Aufwachen zurück in den Käfig gelegt. Über eine Rotlichtlampe wurde die Maus mit Wärme versorgt. Erst wenn sie wieder munter war und sich aktiv im Käfig bewegte, wurde sie in den Tierstall zurück gebracht.

2.2.5 Organentnahme

Die Organentnahme erfolgte im Anschluss an das fünfwöchige Laufradtraining bzw. zeitgleich bei den Kontrollgruppen sowie zwei Wochen nach OP.

Vor Beginn der Organentnahme wurde die Maus gewogen, im Anschluss daran mit Isofluran betäubt und durch einen Kehlschnitt entblutet. Das Blut wurde in einem 1,5ml Eppendorf-Gefäß aufgefangen und auf Trockeneis gelegt, um im Anschluss an die Organentnahme bei 4°C und 720xg 10min lang zentrifugiert zu werden. Das sich in der oberen Phase befindliche Serum wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und bei -80°C für später folgende Untersuchungen gelagert.

Nach dem Ausbluten wurde der Thorax eröffnet. Bei den operierten Tieren musste dabei äußerst sorgsam vorgegangen werden, denn diese wiesen in der Regel Verklebungen von Herz bzw. Herzbeutel und Thoraxwand im Bereich der Operationsnarbe auf. Nach dem Eröffnen des Perikards, wurde das Herz umgehend durch Trennung von den großen Gefäßen entnommen und in einer auf einem Kühlakku lagernden Zellkulturschale mit PBS-Puffer (Dulbecco's 1X-PBS) gewaschen, abgetupft und gewogen. Zurück in die Pufferlösung gebracht, wurden die Vorhöfe durch einen horizontalen Schnitt entlang der Herzbasis und der rechte Ventrikel entfernt. Der linke, infarzierte Ventrikel wurde aus der Pufferlösung genommen, mittels gerader Pinzette aufgespannt und von beiden Seiten fotografiert. Anhand dieser Fotos wurde später die Infarktgröße ermittelt (Siehe 2.2.6). Anschließend wurde der Ventrikel gewogen und durch drei gleich starke Horizontalschnitte in Herzbasis, Mittelstück und Herzspitze getrennt (Abb.6). Das Mittelstück kam in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß, das mit

4%-iger Formaldehydlösung (pH 6,9) gefüllt war, zur späteren histologischen Untersuchung. Herzbasis und -spitze wurden nochmals geteilt und kamen in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß in flüssigen Stickstoff, um bei -80°C solange aufbewahrt zu werden, bis sie als Material für RNA- und Proteinmessungen dienen.

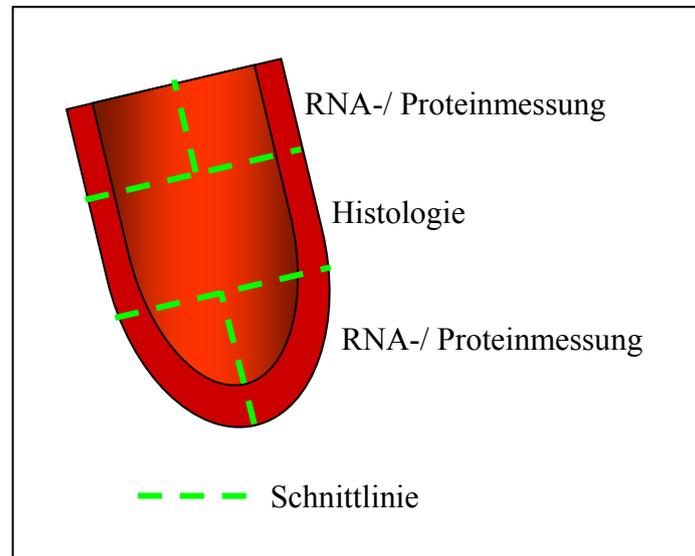


Abbildung 6: Darstellung der Aufteilung des linken Ventrikels für weiterführende Untersuchungen. Der LV wurde entlang seiner Querachse in drei gleich starke Abschnitte geteilt. Der obere Ring sowie die Spitze des LV wurden zweigeteilt und für RNA- und Proteinmessungen verwendet. Der mittlere Ring diente histologischen Untersuchungen.

Parallel zur Bearbeitung des Herzens erfolgte die Entnahme weiterer Organe. Die Lunge wurde entnommen, gewogen und verworfen. Ein Teil der Aorta descendens wurde in das mit Formalin gefüllte Eppendorf-Gefäß gegeben, in dem sich bereits der mittlere Ring des linken Ventrikels befand. Anschließend wurden eine Lebergewebeprobe, viszerales Fett aus dem Bauchraum sowie der Musculus gastrocnemius entnommen. Je ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß wurde damit bestückt und in Stickstoff aufbewahrt. Abschließend wurde die Tibia eines Hinterbeines frei präpariert und deren Länge anhand einer Präzisions-Taschenschiebelehre ermittelt. Der übrig gebliebene Mauskörper wurde verworfen.

2.2.6 Infarktgrößenbestimmung

In der vorangegangenen Organentnahme wurde bereits erwähnt, dass zwei Fotos vom LV der Infarkttiere aufgenommen wurden. Hierzu führte man die geschlossene, gerade Pinzette in den Ventrikel ein und öffnete vorsichtig ihre Schenkel. Zum Hervorheben des infarzierten

Bereiches, richtete man eine Lichtquelle von hinten auf den Ventrikel. Dabei stellte sich deutlich die dünnere, durchscheinende Infarktnarbe dar (Abb.7). Es wurden Vorder- und Rückseite des Ventrikels fotografiert. Zur Aufnahme diente die Digitalkamera DSC-S75 Cybershot von Sony.

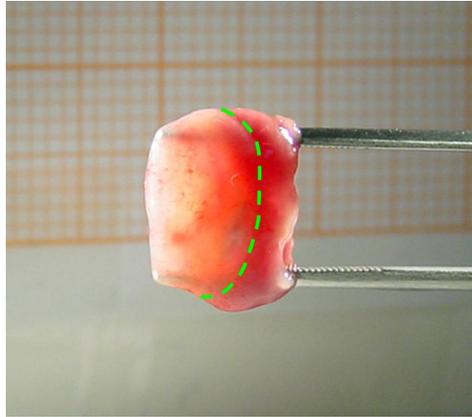


Abbildung 7: Darstellung des linken Ventrikels mit Infarktbereich zur Berechnung der Infarktgröße. Zu sehen ist der mittels gespreizter Pinzette aufgespannte LV. Der hellere, durchscheinende Bereich stellt die Infarktnarbe dar. Die grüne, gestrichelte Linie trennt das infarzierte vom nichtinfarzierten Myokard. Das im Hintergrund befindliche Millimeterpapier diente als Maßstab für die berechnete Infarktgröße.

Die Infarktgröße wurde mithilfe der Software ImageJ von NCBI bestimmt. Ein im Foto enthaltenes Stück Millimeterpapier diente dabei als Richtskala. Zum einen wurde die Größe des gesamten Ventrikels, zum anderen ausschließlich die des Infarktgebietes ermittelt. Das Programm gab sowohl die jeweiligen Flächengrößen wie auch den prozentualen Anteil der Infarktfläche am gesamten LV an.

Diese Methode war einfacher in der Handhabung, weniger zeitaufwändig und nicht ungenauer als die gebräuchlichen, histologischen Bestimmungen der Infarktgröße.

2.2.7 Relative Genexpression ausgewählter Hypertrophiemarker

Um eine Momentaufnahme der Zellaktivität zu einem bestimmten Zeitpunkt zu erhalten, wurde die RNA (*ribonucleic acid*, Ribonukleinsäure) aus den Zellen isoliert. Im Anschluss erfolgte das Umschreiben der RNA in cDNA (*complementary desoxyribonucleic acid*, komplementäre Desoxyribonukleinsäure) durch Reverse Transkription, um schließlich die Quantifizierung der DNA durch real-time-PCR (*polymerase chain reaction*, Polymerase-Kettenreaktion, rt-PCR) zu ermöglichen.

RNA-Extraktion

Alle Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Die Arbeitsfläche wurde vor Arbeitsbeginn mit RNase AWAY gereinigt. Es wurden Einmalhandschuhe getragen, die nach jeder Berührung mit möglichen Kontaminanten gewechselt wurden. Wasser und wässrige Lösungen wurden mit Diethylpyrocarbonat(DEPC)-Wasser angesetzt.

Ein 20–30mg schweres Gewebestück aus nichtinfarziertem LV (Siehe Abb.6) wurde in ein 1,5ml Eppendorf-Gefäß gegeben, das bereits zur Hälfte mit Lysis Matrix D und 600µl RNAzol B versetzt war. Das Gewebe wurde im Fast Prep FP 120 bei Stufe 4.0 20sec lang homogenisiert. Anschließend wurden weitere 400µl RNAzol B hinzu gegeben. Die Proben ließ man 5min auf Eis inkubieren, anschließend wurden sie für 30min bei 4°C stark geschüttelt. Das gesamte Homogenat wurde in ein neues 1,5ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit 200µl Chloroform versetzt. Nach zweiminütigem heftigen Vortexen ließ man die Proben für 5min auf Eis inkubieren. Anschließend wurde bei 4°C und 15.800xg 10min lang zentrifugiert. Ziel war die Trennung des Homogenates in drei Phasen. Die obere, wässrige Phase, in der sich die RNA befand, wurde abgenommen und in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Zur Fällung der RNA wurde das gleiche Volumen an Isopropanol zugegeben, nochmals kurz gevortext und über Nacht bei -20°C fällen gelassen.

Am nächsten Tag wurde bei 4°C und 15.800xg 30min lang zentrifugiert, der Überstand dekantiert und 1ml 80%-iges Ethanol hinzugegeben. Hierdurch wurden Salz- und Isopropanolreste entfernt. Die Proben wurden bei 4°C und 5.100xg 5min lang zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Der Waschvorgang mit Ethanol wurde wiederholt und im Anschluss das RNA-Pellet an der Luft getrocknet. Je nach Größe des Pellet wurde es in ca. 30-40µl DEPC-Wasser gelöst und bei -80°C bis zur Konzentrationsmessung gelagert.

Die RNA-Konzentrationsmessung erfolgte im Agilent 2100 Bioanalyzer. Basierend auf Empfehlungen der Literatur wurden Proben mit einer RIN (*RNA integrity number*) ≤ 5 aus den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.⁸²

Reverse Transkription

Da die DNA-Polymerase keine RNA amplifizieren kann, muss die RNA zunächst mit Hilfe der Reversen Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase, in cDNA umgeschrieben werden. Die erhaltene cDNA kann als Vorlage in einer anschließenden PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren. Somit kann man nachweisen, ob das untersuchte Gen in der Zelle exprimiert wird.

Für die cDNA-Synthese (Reverse Transkription) wurden die isolierte RNA, ein Primer, eine Reverse Transkriptase und die vier Desoxynukleosid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) benötigt. Als Primer wurden sogenannte „Random-Primer“ eingesetzt. Diese sehr kurzen Primer sind ein Gemisch aus Hexanukleotiden unterschiedlicher Sequenz, binden zufällig an die RNA und führen zu einem Pool unterschiedlich langer cDNAs.

Während der Reversen Transkription wurden RNasen durch RNase OUT inhibiert. 4µl RNA-Material (125ng/µl) wurden mit 6µl 0,1% DEPC-Wasser aufgefüllt und mit 2µl Random-Primer (3µg/µl) versetzt. Als Negativkontrolle dienten 10µl DEPC-Wasser. Nach kurzem Zentrifugieren ließ man die Proben bei 70°C im Thermoblock 10min lang inkubieren, zentrifugierte wieder und stellte sie dann auf Eis. Sodann wurden zu jeder Probe 9µl Mastermix hinzu gegeben, bestehend aus:

4µl 5X PCR-Puffer

2µl DTT (0,1M)

1µl RNase OUT (40U/µl)

1µl dNTP (10mM)

1µl SuperScript II (200U/µl)

Das aktuelle Volumen jeder Probe betrug nunmehr 21µl. Nach kurzem Zentrifugieren wurden die Proben 10min bei RT und anschließend 50min bei 42°C im Thermoblock inkubiert. Zum Denaturieren des Enzyms wurde die Temperatur auf 95°C erhöht und die Proben für 5min darin belassen. Zum Abkühlen stellte man das Material auf Eis. Nach letztmaligem Zentrifugieren wurde ein Teil des Materials abschließend auf 2ng/µl verdünnt, aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

Real Time-PCR

Die Real Time-PCR (rt-PCR) erlaubt eine quantitative Analyse der PCR über die Messung von laserinduzierten Fluoreszenzsignalen. Zum PCR-Ansatz wurde neben den genspezifischen Primern auch ein interkalierender, fluoreszierender Farbstoff (SYBR-Green) hinzugegeben. Dadurch war es möglich, die Menge der amplifizierten DNA im Verlauf der PCR zu bestimmen und somit Rückschlüsse auf die Menge des exprimierten Genes in der untersuchten Probe zu ziehen.

Die cDNA-Proben (2ng/μl) wurden nach folgendem Mastermix-Ansatz für die rt-PCR auf Eis in 96er-Lochplatten pipettiert:

12,5μl SYBR-Mix (Firma Applied Biosystems)

2μl Primer-Mix

5μl cDNA-Probe

Aqua dest. ad 25μl

Für den Primer-Mix wurden die genspezifischen Forward- und Reverse-Primer (Siehe 2.1.7, Tab. 7) in den Verhältnissen 1:1 bzw. 3:1 auf Endkonzentrationen von 5, 7,5 bzw. 15pmol/μl zusammengegeben.

Die 96er-Lochplatte wurde bei 4°C kurz zentrifugiert und die PCR-Reaktion nach den in Tab.9 dargestellten Bedingungen im ABI-7000 gestartet.

Tabelle 9: Exemplarische Darstellung der rt-PCR-Bedingungen. Dargestellt sind die rt-PCRs mit deren Schrittfolgen. Weiterhin sind die Zeiten sowie die Temperaturen für den jeweiligen Schritt angegeben.

	2-Schritt rt-PCR	3-Schritt rt-PCR
Denaturierung	10min, 95°C 15s, 95°C	
Annealing	60s, primerabhängige Temperatur	
Elongation	-	30s, 72°C

Die Annealing-Temperatur richtete sich nach dem Temperaturoptimum der jeweils eingesetzten Primer. Je nach Zielgen variierten Primermix-Verhältnis und Schrittzahl (Tab.10).

Tabelle 10: Übersicht über die für das jeweilige Zielgen verwendeten rt-PCR-Programme, Annealingtemperaturen und Primerverhältnisse/-konzentrationen.

Zielgen	Programm, Temperatur	Primerverhältnis
GAPDH	2-Schritt, 60°C	3:1 (15:5pmol)
ANP	2-Schritt, 58°C	1:1 (je 7,5pmol)
BNP	2-Schritt, 58°C	1:1 (je 7,5pmol)
α -skA	2-Schritt, 60°C	3:1 (15:5pmol)
α -MHC	3-Schritt, 62°C	1:1 (je 5pmol)
β -MHC	2-Schritt, 60°C	1:1 (je 5pmol)

Im Anschluss an den jeweiligen PCR-Durchlauf wurde die Dissoziationskurve ermittelt. Hierfür wurden die Amplifikate schrittweise von 60°C auf 95°C erhitzt, die Doppelstränge dissoziierten und der Fluoreszenzfarbstoff wurde freigegeben. Der messbare Anstieg des Fluoreszenzsignals bei einer bestimmten Schmelztemperatur eines Amplifikats war für jedes Zielgen unterschiedlich und diente der Überprüfung der Spezifität der PCR-Reaktion. Außerdem wurden die Amplifikate exemplarisch auf ein Agarose-Gel aufgetragen, um eine abschließende Fragmentlängenüberprüfung durchzuführen.

Auswertung

Für die Auswertung der PCR-Läufe wurde auf die Auto-Ct- und Auto-Baseline-Funktion der ABI 7000-Software zurückgegriffen. Durch Abgleich der Ct-Werte mit einem Standard-Ct-Wert ermittelte das Programm die Menge an DNA des jeweiligen Zielgens. Die Mittelwerte eines jeden Doppelansatzes wurden mithilfe der Excel-Office-Software auf die entsprechende Mittelwertprobe des Referenzgens GAPDH bezogen. Durch Vergleich der Quotienten der einzelnen Proben der verschiedenen Gruppen konnten stimulierte mit nicht-stimulierten Proben verglichen werden.

2.2.8 Histologische Untersuchungen

Fixierung und Paraffineinbettung

Der mittlere Ring des linken Ventrikels und der Abschnitt der Aorta descendens wurden für 24h in neutral gepufferter, wässriger Formalinlösung mit 4% Formaldehyd bei RT fixiert. Um dünne und gleichmäßige Schnitte herstellen zu können, musste das Material Stabilität und

eine gleichmäßige Konsistenz aufweisen. Dafür bettete man es in heißes Paraffinwachs, das durch Abkühlung erstarrte. Die Gewebeproben wurden in Einbettkassetten gebracht und durchliefen ein automatisiertes Paraffinkarussell. Die ersten Stufen dieses Einbettautomaten dienten der Lösung des Fixierungsmittels und der Dehydratation des Gewebes. Hierzu durchlief es eine aufsteigende Alkoholreihe mit 70%-, 80%-, 96%- und dreimal 100%-igem Ethanol für jeweils 1h. Die Entwässerung des Materials war notwendig, denn Paraffin ist nicht wasserlöslich. Es folgte eine einstündige Inkubation in dem Intermediärmedium Xylol. Dieses entfernte den Alkohol, löste organische Bestandteile und sorgte dafür, dass sich das Paraffin besser anlagert. Anschließend wurde das Gewebe für jeweils 1,5h in Paraffin 6 sowie Paraffin 9 bei einer Temperatur von 60°C getränkt. Paraffin Typ 9 enthält mehr Polymere als Typ 6 und eignet sich für sehr dünne Schnitte.

Um die Gewebe in einspannbare und schnittfähige Blocks einzubetten, bediente man sich metallener Ausgießformen. Ventrikel und Aorta wurden aus der Einbettkassette genommen und jeweils in eine Ausgießform gelegt. Die Proben wurden derart angeordnet, dass die zu schneidende Fläche auf dem Boden lag. An der Paraffin-Ausgießstation wurde nun 58°C heißes Paraffin Typ 9 in die Form gegossen. Die Einbettkassette mit der Fallnummer bildete den Blockträger. Die Ausgießform kam anschließend zum Aushärten für ca. 4h auf die Kälteplattform. Der Block wurde aus der Form geschlagen und bei RT aufbewahrt.

Am Mikrotom wurden die histologischen Schnitte gefertigt. 2h vor Beginn lagerte der Paraffinblock bei -20°C um auszuhärten. Die Schnittdicke betrug 2µm. Die einzelnen Schnitte wurden zuerst in einem Kaltwasserbad (ca. 20°C) aufgefangen und dann in einem Heißwasserbad (ca. 45°C) gestreckt, um möglichst glatt auf einen Objektträger aufgezogen zu werden. Zur Trocknung kamen die Objektträger über Nacht in einen 37°C warmen Brutschrank, danach wurden sie in Objektträgerkästen bei RT aufbewahrt.

Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Als Übersichtsaufnahme des Querschnittes des linken Ventrikels und um dessen Architektur und pathologischen Veränderungen beurteilen zu können, sollte die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) dienen. Ferner trug sie bei den infarzierten linken Ventrikeln zur Orientierung für den Bereich der „*Borderzone*“ (das Infarktgebiet angrenzende Gewebe) bei, um bei der später beschriebenen Kapillarfärbung das Auswählen der auszuwertenden Untersuchungsfenster zu ermöglichen.

Zum Entparaffinieren kamen die Objektträger für zweimal 10min in Xylol. Anschließend durchliefen die Schnitte eine absteigende Alkoholreihe mit 100%-, 96%-, 80%- und 70%igem Ethanol für je 5min. Sodann erfolgte eine zweimal 5-minütige Waschung in destilliertem Wasser auf dem Schüttler. Die Objektträger wurden aus dem Wasserbad genommen, die Flüssigkeit abgeklopft und für 10min in Hämatoxylin inkubiert. Nach der Färbung erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun aufgrund des niedrigen pH-Wertes der Färbelösung. Das Erhöhen des pH-Wertes durch Spülen der Objektträger für ca. 30min unter fließendem Leitungswasser bewirkte das sogenannte Bläuen der Zellkerne. Im folgenden Schritt wurde durch das zweiminütige Einwirken von Eosin, 1:10 mit Millipore und einem Tropfen Eisessig verdünnt, das Zytoplasma rot gefärbt. Die Schnitte wurden in Millipore gewaschen bis sich die Zellkerne deutlich vom Bindegewebe abhoben. Eine aufsteigende Alkoholreihe bis hin zu absolutem Alkohol sorgte für die Dehydratation des Gewebes, das organische Lösungsmittel Xylol klärte das Gewebe. Nachdem die Trocknung der Schnitte unter dem Abzug erfolgte, konnte das Gewebe mit nicht-wässrigem Einschlussmedium (VectaMount Permanent Mounting Medium) eingedeckt und mit einem Deckglas (24x50mm) verschlossen werden.

Es wurde je eine Übersichtsaufnahme der HE-gefärbten linken Ventrikel am Lichtmikroskop (Axiovert 25) mit 25-facher Vergrößerung bei Durchlicht gemacht und mit der Digitalkamera DSC-S75 Cybershot von Sony aufgenommen (Abb.8).

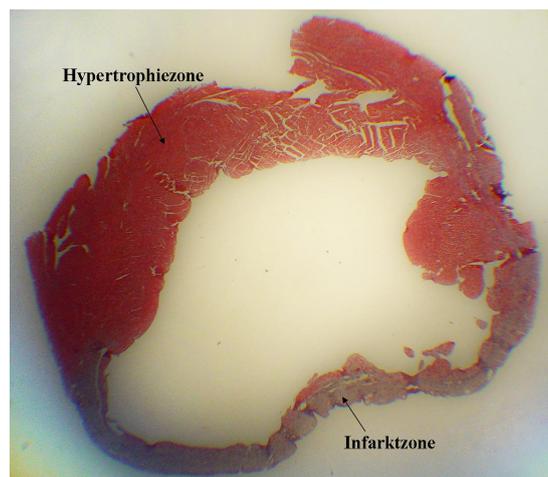


Abbildung 8: Übersichtsaufnahme eines HE-gefärbten Querschnittes des linken Ventrikels. Im oberen Bereich des Bildes stellt sich die Hypertrophiezone als deutlich rotes Areal dar. Der blau gefärbte Bereich zeigt die Infarktzone.

Griffonia simplicifolia Lectin I Isolectin B4

Lektine sind von Pflanzen oder Mikroorganismen produzierte (Glyko-)Proteine, die endständige Zucker von Kohlenhydratstrukturen der Zellmembran oder löslichen Glykokonjugaten „auswählen“ und binden. Sie agieren unabhängig vom Immunsystem und unterliegen demzufolge weder Booster- noch Memoryeffekt beim Zweitkontakt. Die Bindung an Kohlenhydrate erfolgt nicht kovalent, ist demnach recht schwach und reversibel.

Griffonia simplicifolia Lectin I Isolectin B4 (GS I B4) ist ein 114kDa schweres Glykoprotein. Es ist Teil der Familie von fünf Tetrameren der Typ I-Isolectine (IA4, IA3B, IA2B2, IAB3 und IB4). Die Familienmitglieder ähneln sich sehr und weichen nur in der Aminosäuresequenz am N-Terminus voneinander ab. Die Untereinheiten bedeuten unterschiedliche Bindungsspezifitäten. Die A-Untereinheit bindet bevorzugt an N-Acetyl-Galaktosamine-Endgruppen, während die B-Untereinheit selektiv ist für terminale α -D-Galaktosyl-Reste. GS I B4 agglutiniert Erythrozyten der Blutgruppe B und bindet spezifisch an α -D-Galaktosyl-Reste von Endothelzellmembranen. Es ist zytotoxisch zu verschiedenen physiologischen und Tumorzellen, hat eine strenge Affinität zu Mikrogliazellen des Gehirns und perivaskulären Zellen. Seine Absorption wird im pH-Bereich 6,5 – 8,5 nicht beeinträchtigt.

Protokoll:

Am ersten Tag erfolgte eine zweimal zehnmündige Entparaffinisierung der LV-Schnitte mit Xylol, gefolgt von einer Rehydratation des Gewebes mittels absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%, 50% und 30% Ethanol für jeweils 5min). Mit PBS (10mM, pH 7,4) wurden die Schnitte dreimal 5min auf dem Schüttler gewaschen, um anschließend in auf 4°C gekühlten PBlec-Puffer zweimal 10min lang zu inkubieren (PBlec-Puffer: PBS pH 6.8, 1mM CaCl₂, 1mM MgCl₂, 0,1mM MnCl₂, 1% Triton X 100). Die Objektträger wurden aus dem Pufferbad genommen, die restliche Flüssigkeit abgeklopft und gegebenenfalls mit einem Präzisionswischtuch vorsichtig um das Gewebe herum abgetrocknet. Mithilfe eines Fettstiftes wurde großzügig um die Schnitte herum ein Fettrand gezogen, der verhindern sollte, dass die Färbelösungen vom Gewebe herunterlaufen. Biotinyliertes Isolectin B4 wurde 1:25 mit PBlec-Puffer angesetzt (entspricht einer Konzentration von 20µg/ml), auf das Gewebe pipettiert und bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am zweiten Tag wurden die Objektträger dreimal 15min in 1X PBS auf dem Schüttler gewaschen und in eine feuchte Dunkelkammer gelegt. Die nachfolgenden Schritte mussten unbedingt lichtgeschützt erfolgen. Der Fluoreszenzfarbstoff Streptavidin Cy 3 wurde 1:100 mit *Incubation buffer* (PBS pH 7.2, mit 0,5% BSA und 0,25% Triton X 100 gemischt und 1:25 in PBléc gelöst) angesetzt und für 60min bei RT inkubiert. Streptavidin Cy3 bindet an Biotin (Abb.9), hat sein Emissionsmaximum bei 565nm und fluoresziert bei Anregung im sichtbaren Bereich mit roter Farbe. Im Anschluss erfolgte die Waschung mit PBS für dreimal 15min auf dem Schüttler. Als Gegenfärbung wurde 4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid (Dapi, 2mg/ml) 1:20.000 mit PBS verdünnt, auf die Schnitte aufgetragen und für 30min inkubiert. Dapi ist ebenfalls ein Fluoreszenzfarbstoff und färbt DNA, d.h. die Zellkerne. Bei Anregung mit ultraviolettem Licht fluoresziert Dapi im sichtbaren Bereich mit blauer bis cyaniner Farbe (Emissionsmaximum 461nm). Nach einem letzten Waschvorgang mit PBS für dreimal 15min, wurden die Objektträger getrocknet und mit Eindeckmedium (Vectashield Mounting Medium) sowie Deckgläschen versehen. Die gefärbten Schnitte wurden lichtgeschützt aufbewahrt, bis sie am darauffolgenden Tag am Fluoreszenzmikroskop angesehen und die Fenster zur Bestimmung der Kapillardichte gespeichert wurden.

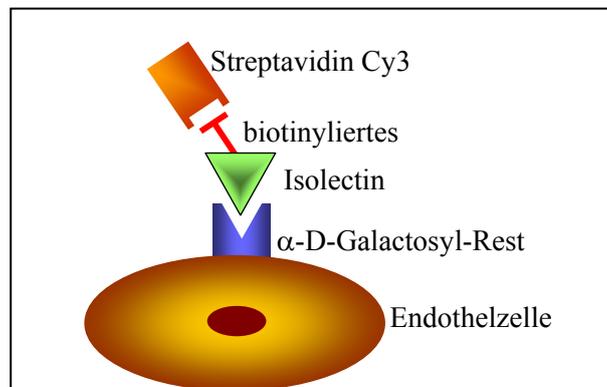


Abbildung 9: Exemplarische Darstellung der Bindungskaskaden der einzelnen Farbstoffe. An der Oberfläche der Endothelzelle befindet sich der α -D-Galactosyl-Rest. An diesen bindet das biotinylierte Isolectin. An das Biotin bindet schließlich das Streptavidin Cy3.

Aufgrund der Unbeständigkeit von Streptavidin Cy3 war eine fotografische Aufnahme der gefärbten Schnitte innerhalb von 18h notwendig. Am Fluoreszenzmikroskop (LEICA DMIRE 2) und mithilfe der Software Openlab 3.1.7. erfolgte die Aufnahme der Kapillaren. Dabei wurden bei den LRT- und Kontrollgruppen (Sed. und Sham) aus jedem Quadranten des linken Ventrikels jeweils zwei Fenster zufällig ausgewählt (Abb.10). Bei den MI Mäusen wurden

zwei Fenster in jeder Borderzone und vier Fenster in der Hypertrophiezone zufällig ausgewählt (Abb.11). So erhielt man für jedes Tier insgesamt acht Fenster. Die Aufnahmen erfolgten mit 400-facher Vergrößerung. Die Auswertung der ausgewählten Fenster erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0. Als Hilfsmittel diente ein Raster, welches über das Bild gelegt wurde. Die Quadrate dieses Rasters entsprachen der Größe eines der Quadrate der Neubauer Zählkammer, von dem eine Kantenlänge von $50\mu\text{m}$ bekannt ist. (Die Zählkammer wurde unter den gleichen Bedingungen wie die Fenster der Ventrikel am Fluoreszenzmikroskop bei 400-facher Vergrößerung aufgenommen.) In dem Raster betrug somit die Fläche eines Quadrates $2500\mu\text{m}^2$. Insgesamt konnten pro Bild bis zu 20 Quadrate ausgezählt werden (Abb.10). Dies setzte folgende Auswertungskriterien voraus: Das Quadrat musste vollständig mit Gewebe ausgekleidet sein. Quadrate, die Geweberisse aufwiesen, wurden von der Auswertung ausgeschlossen. In sämtlichen auswertbaren Quadraten wurden die Kapillaren gezählt. Gefäße mit einem Diameter von mehr als $10\mu\text{m}$ wurden als Arteriolen gedeutet und ebenso wie Farbartefakte nicht in die Auszählung einbezogen.

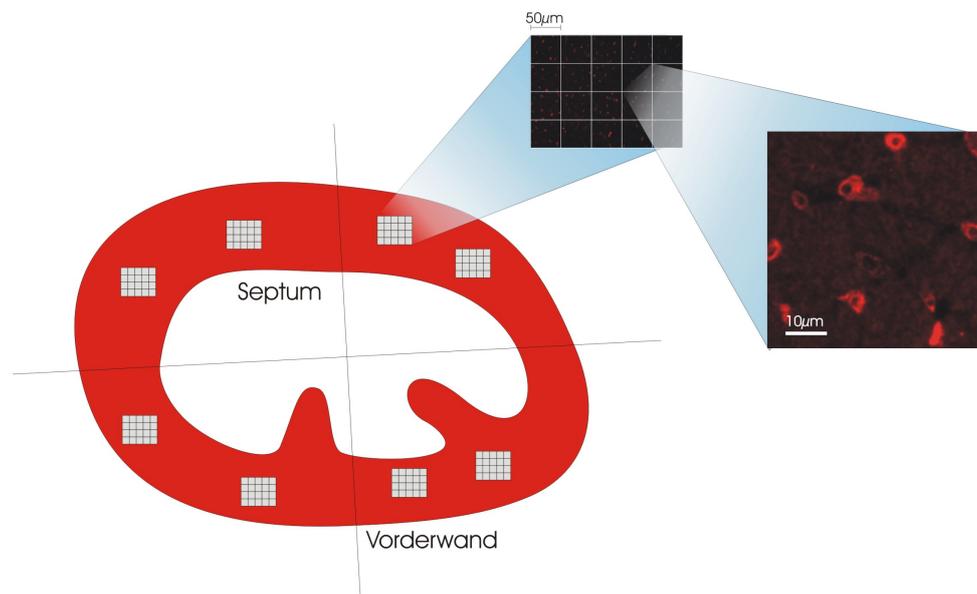


Abbildung 10: Exemplarische Darstellung der Fensterwahl zur Kapillarauszählung bei den LRT-, Sed- und Sham-Gruppen. Der LV wurde in vier Teile unterteilt. In jedem Quadranten wurden zufällig zwei Fenster gewählt, in denen die Kapillardichte ermittelt wurde.

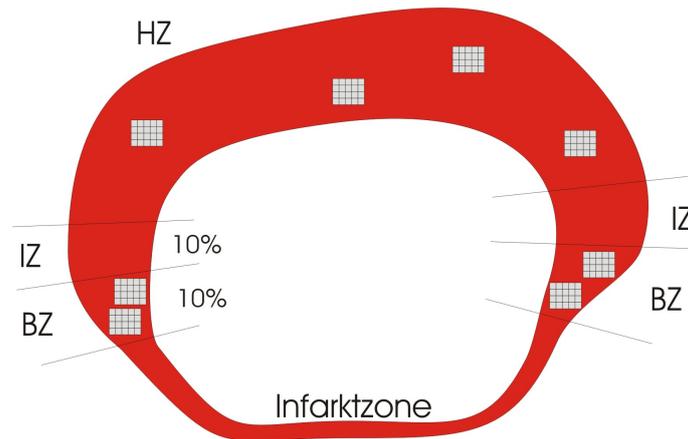


Abbildung 11: Exemplarische Darstellung der Fensteraufteilung zur Kapillarauszählung bei den MI-Gruppen. Dargestellt sind die Hypertrophiezone (HZ), die Intermediärzone (IZ) als Übergangszone zwischen BZ und HZ, die Borderzone (BZ) und die Infarktzone. In der HZ wurden per Zufall vier Fenster und in jeder BZ jeweils zwei Fenster zur Bestimmung der Kapillardichte gewählt.

Jede gezählte Kapillare wurde markiert, um Mehrfachzählungen zu vermeiden. Je nachdem wie viele Quadrate ausgezählt werden konnten, wurde die jeweilige Kapillarzahl pro μm^2 in die herkömmlich verwendete Angabe pro mm^2 umgerechnet. Von den vier (MI: BZ bzw. HZ) bzw. acht ausgewerteten Fenstern wurde der Mittelwert der Kapillaren/ mm^2 für die jeweilige Zone bzw. das jeweilige Tier berechnet.⁸³

2.2.9 Statistik

Die statistische Analyse erfolgte über das Programm SPSS 15.0 für Windows (*Statistical Package for Social Sciences*). Die Messergebnisse wurden als Mittelwerte (MW) \pm Standardfehler (SEM, *Standard Error of the Mean*) angegeben. Ein Unterschied zwischen den Gruppen wurde auf seine statistische Signifikanz geprüft. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit $<5\%$ wurde als statistisch signifikant betrachtet ($p < 0,05$). Voneinander unabhängige Gruppen (LRT-M und LRT-W, Sed.-M und Sed.-W, MI-M und MI-W, Sham-M und Sham-W) wurden mit der einfaktoriellen Varianzanalyse („ANOVA“: *Analysis of Variance*) gefolgt von einer multiplen Tukey-Korrektur untersucht. Zeitliche Unterschiede innerhalb einer Gruppe (E0 und E5, E0 und E11) wurden mithilfe des t-Tests für gepaarte Stichproben ermittelt. Für den Bezug zur Kontrollgruppe (LRT-M und Sed.-M, LRT-W und Sed.-W, MI-M und Sham-M, MI-W und Sham-W) diente der t-Test für zwei unabhängige Stichproben. Eine Überlebensstatistik wurde anhand der Kaplan-Meier-Überlebensanalyse durchgeführt, durch die die Sterblichkeit der einzelnen Gruppen (MI-M, MI-W, Sham-M, Sham-W) innerhalb des Zeitraumes zwischen Operation und Organentnahme dargestellt wurde. Die graphische

Darstellung erfolgte in Form von Balkendiagrammen. Die Fehlerbalken stellen den Standardfehler dar.

3. ERGEBNISSE

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit den Geschlechterunterschieden bei physiologischer und pathologischer Myokardhypertrophie. Zu diesem Zweck wurden Mäuse des Stammes C57BL/6J in zwei verschiedenen Hypertrophie-Modellen untersucht. Um Geschlechterunterschiede zu untersuchen, wurden sowohl männliche als auch weibliche Mäuse in den Versuchen eingesetzt.

Zur Erzeugung einer physiologischen Hypertrophie wurden die Tiere einem fünfwöchigen, freiwilligen Laufradtraining (LRT) unterzogen. Eine pathologische Hypertrophie wurde durch einen Myokardinfarkt (MI) induziert, bei dem die linke descendierende Koronararterie (LAD, *left anterior descending coronary artery*) permanent ligiert wurde.

Während des Versuches wurden echokardiographische (Ejektionsfraktion, Herzminutenvolumen, fraktionelle Flächenänderung, linksventrikuläre Masse), morphologische (linksventrikuläres Gewicht) und histologische Parameter (Kapillardichte) sowie Daten zur mRNA-Expression ausgewählter Hypertrophie-Marker (ANP, BNP, α -skA, α -MHC, β -MHC) erhoben. Im physiologischen Hypertrophie-Modell wurden weiterhin die Trainingsparameter (Strecke, Geschwindigkeit, Zeit) und im pathologischen die Überlebensraten sowie die Infarktgrößen erfasst. Die Ergebnisse wurden zum einen im zeitlichen Verlauf, das heißt vor Versuchsbeginn und zu Versuchsende, ermittelt. Zum anderen wurden Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe gesucht, das heißt die männliche LRT-Gruppe (LRT-M) wurde mit der männlichen Kontrollgruppe (Sed.-M) verglichen, die weibliche LRT-Gruppe (LRT-W) mit der weiblichen Kontrollgruppe (Sed.-W), die männliche MI-Gruppe (MI-M) mit der männlichen Kontrollgruppe (Sham-M) und die weibliche MI-Gruppe (MI-W) mit der weiblichen Kontrollgruppe (Sham-W). Letztlich wurden die Geschlechterunterschiede untersucht, so dass die LRT-M den LRT-W gegenübergestellt wurden, die Sed-M den Sed-W, die MI-M den MI-W und die Sham-M den Sham-W.

3.1 LAUFRADTRAINING

Zur Erzeugung einer physiologischen Myokardhypertrophie wurde das Modell des freiwilligen Laufradtrainings gewählt (Siehe 2.2.2). Um zu untersuchen, ob bei der Entwicklung einer physiologischen Hypertrophie Geschlechterunterschiede zu beobachten

sind, wurden je 15 männliche (LRT-M) und 15 weibliche Tiere (LRT-W) für den Versuch eingesetzt. Als Kontrolle dienten weitere 30 Tiere (je 15 Sed.-M und 15 Sed.-W), die untrainiert blieben.

Von den insgesamt 60 Mäusen konnten 57 Tiere in die Auswertung einbezogen werden, da ein LRT-M vor Beendigung des Versuches tödlich verunglückte und zwei weitere Tiere (1 LRT-M, 1 LRT-W) wegen ungenügender Laufleistung ausgeschlossen wurden.

3.1.1 Trainingsergebnisse

Zur Beurteilung der Laufleistung männlicher und weiblicher Mäuse wurden die täglich zurückgelegte Strecke, die Durchschnittsgeschwindigkeit, die täglich verbrachte Zeit im LR sowie die über fünf Wochen insgesamt zurückgelegte Strecke erfasst (Tab. 11).

Tabelle 11: Darstellung der Trainingsergebnisse. Die Gruppen wurden unterteilt in Laufradtraining-Männchen (LRT-M) und Laufradtraining-Weibchen (LRT-W). n = Anzahl der Tiere pro Gruppe. s = mittlere Tageslaufstrecke in km, v = tägliche Durchschnittsgeschwindigkeit in km/h, t = täglich verbrachte Zeit im Laufrad in h und s_{gesamt} = über fünf Wochen zurückgelegte Strecke in km. * bedeutet einen signifikanten Unterschied zwischen LRT-W und LRT-M.

Gruppe	n	s [km]	v [km/h]	t [h]	s_{gesamt} [km]
LRT-M	13	6,37 ± 0,38	1,51 ± 0,05	4,22 ± 0,23	242,01 ± 14,32
LRT-W	14	9,16 ± 0,42*	1,64 ± 0,06	5,59 ± 0,17*	347,94 ± 15,92*

Die Ergebnisse zeigen, dass die LRT-W mit 9,16km eine signifikant weitere Tagesstrecke zurücklegten im Vergleich zu den LRT-M mit 6,37km ($p < 0,001$, Abb. 12). Weiterhin liefen die Weibchen täglich über einen signifikant längeren Zeitraum von 5,59h gegenüber den Männchen, deren durchschnittliche Laufzeit 4,22h betrug ($p < 0,001$). Des Weiteren erzielten die weiblichen Tiere am Ende der fünföchigen Trainingsperiode eine signifikant weitere Gesamtstrecke von 347,94km im Unterschied zu der Gesamtstrecke von 242,01km der männlichen Mäuse ($p < 0,001$).

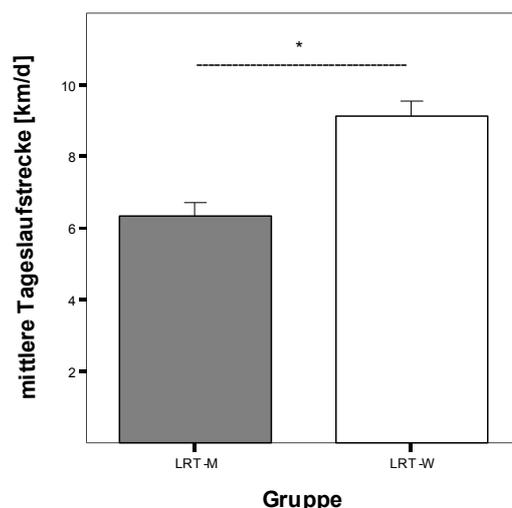


Abbildung 12: Darstellung der über 24h zurückgelegten Strecke in km. Die Gruppen wurden unterteilt in Laufradtraining-Männchen (LRT-M, n=13) und Laufradtraining-Weibchen (LRT-W, n=14). Dargestellt ist die mittlere Tageslaufstrecke in km/d. * bedeutet einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.1.2 Fraktionelle Flächenänderung, Ejektionsfraktion und Herzminutenvolumen

Um zu untersuchen, ob LRT zu einer Verbesserung der Herzfunktion führt, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurden echokardiographisch die FAC, die EF und das HMV vor und nach LRT bestimmt (Siehe 2.2.4). Die Ergebnisse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 12: Darstellung von FAC, EF und HMV vor und nach LRT/Sed. Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M), Sedentary-Weibchen (Sed.-W), Laufradtraining-Männchen (LRT-M) und Laufradtraining-Weibchen (LRT-W). Dargestellt sind die fraktionelle Flächenänderung (FAC) in %, die Ejektionsfraktion (EF) in % und das Herzminutenvolumen (HMV) in $\mu\text{l}/\text{min}$. E0 = vor Versuchsbeginn, E5 = nach Versuchsende. # bedeutet signifikante Unterschiede vor und nach LRT/Sed. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen LRT und Sed. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	FAC.E0 [%]	FAC.E5 [%]	EF.E0 [%]	EF.E5 [%]	HMV.E0 [$\mu\text{l}/\text{min}$]	HMV.E5 [$\mu\text{l}/\text{min}$]
Sed.-M n=15	33,65 \pm 2,16	26,58 \pm 1,09#	48,88 \pm 2,90	40,93 \pm 1,54#	11.195 \pm 731	10.171 \pm 582
Sed.-W n=15	32,42 \pm 1,63	24,53 \pm 1,11#	48,79 \pm 2,26	37,39 \pm 1,79#	9.166 \pm 582	7.898 \pm 497*
LRT-M n=13	33,15 \pm 1,99	23,03 \pm 1,26#	49,24 \pm 2,73	33,34 \pm 2,06#\$	9.175 \pm 568	9.248 \pm 523
LRT-W n=14	31,95 \pm 1,14	24,39 \pm 1,68#	48,12 \pm 1,77	36,43 \pm 2,41#	8.534 \pm 524	7.911 \pm 321

Zu Versuchsbeginn unterschieden sich die Gruppen nicht. Bei den LRT-M fand im Vergleich zu den Sed.-M eine signifikante Erniedrigung der EF um 19% statt ($p=0,042$, Abb. 13). Die LRT-W unterschieden sich nicht von den Sed.-W.

Das HMV ergab einen signifikanten Geschlechterunterschied zu Versuchsende innerhalb der Kontrollgruppen. So war das HMV der Sed.-W um 22% geringer als das der Sed.-M ($p=0,009$).

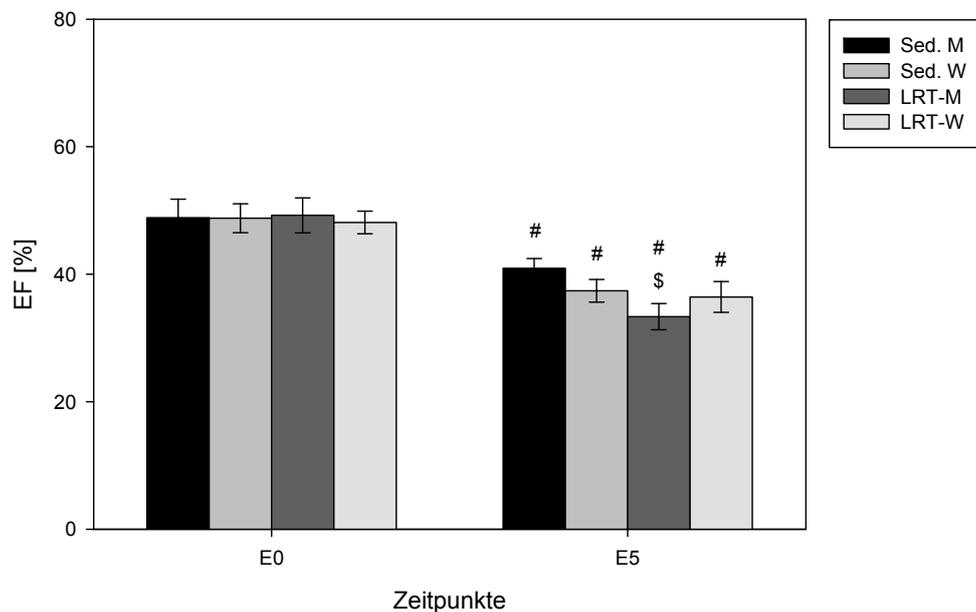


Abbildung 13: Darstellung der Ejektionsfraktion vor und nach LRT/Sed. Dargestellt ist die Ejektionsfraktion (EF) in %. E0 = vor LRT/Sed, E5 = nach LRT/Sed. # bedeutet signifikante Unterschiede vor (E0) und nach (E5) LRT/Sed. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen LRT und Sed.

3.1.3 Linksventrikuläre Masse

Um nachzuvollziehen, ob LRT zu einer Hypertrophie des LV führt, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurde die LV-Masse vor und nach LRT bestimmt (Siehe 2.2.4). Zu Versuchsende wurde die LV-Masse ins Verhältnis zur Tibialänge gesetzt. Die Ergebnisse sind Tabelle 13 zu entnehmen.

Tabelle 13: Darstellung der linksventrikulären Masse (LV-Masse) vor und nach LRT/Sed. Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M), Sedentary-Weibchen (Sed.-W), Laufradtraining-Männchen (LRT-M) und Laufradtraining-Weibchen (LRT-W). Dargestellt sind die linksventrikuläre Masse (LV-Masse) in mg zu Versuchsbeginn (E0) und zu Versuchsende (E5) sowie das Verhältnis der LV-Masse zur Tibiallänge (LV-Masse/TL). # bedeutet signifikante Unterschiede vor und nach LRT/Sed. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen LRT und Sed. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	n	LV-Masse.E0 [mg]	LV-Masse.E5 [mg]	LV-Masse.E5/TL
Sed.-M	15	111,71 ± 3,28	133,02 ± 3,38#	7,92 ± 0,20
Sed.-W	15	85,30 ± 1,46*	99,90 ± 2,63#*	6,08 ± 0,17*
LRT-M	13	117,49 ± 5,88	137,42 ± 5,43#	8,37 ± 0,35
LRT-W	14	88,58 ± 2,57*	115,58 ± 2,92#*\$	7,06 ± 0,16\$*

Zu Versuchsbeginn war die LV-Masse bei den weiblichen Gruppen signifikant niedriger als bei den männlichen (Sed. $p < 0,001$; LRT $p < 0,001$). Dieser Geschlechterunterschied blieb auch nach Versuchsende bestehen (Sed. $p < 0,001$; LRT $p = 0,001$). Bei den LRT-W fand eine signifikante Erhöhung der LV-Masse um 16% im Vergleich zu den Sed.-W statt ($p = 0,017$, Abb. 14). Die LRT-M unterschieden sich nicht von den Sed.-M. Ihre LV-Masse war lediglich 3% höher als die der Sed.-M.

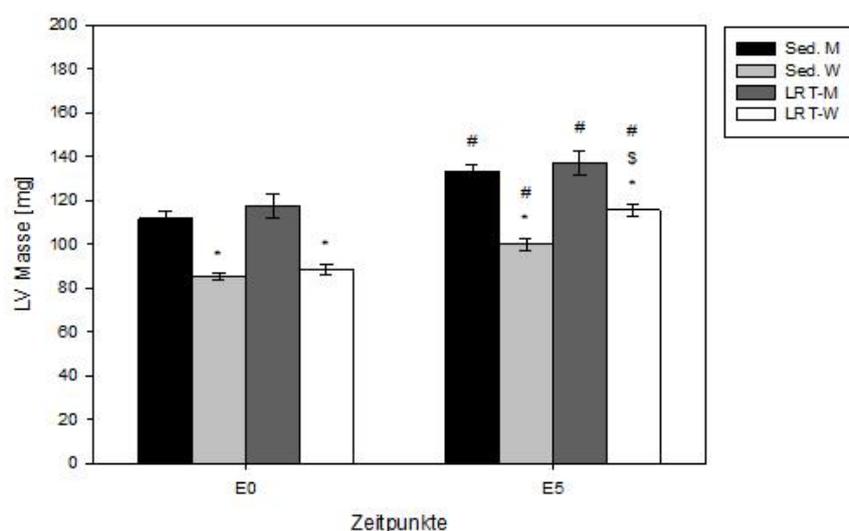


Abbildung 14: Darstellung der linksventrikulären Masse (LV Masse) vor und nach LRT/Sed. Dargestellt ist die linksventrikuläre Masse (LV Masse) in mg. E0 = vor LRT/Sed, E5 = nach LRT/Sed. # bedeutet signifikante Unterschiede zwischen vor (E0) und nach (E5) LRT/Sed. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen LRT und Sed. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Auch in Relation zur Tibiallänge zeigten sich Geschlechterunterschiede innerhalb der Sed.- und LRT-Gruppen. Bei beiden war das Verhältnis LV-Masse/TL bei den Männchen höher als bei den Weibchen (Sed. $p < 0,001$; LRT $p = 0,001$). Die LRT-W erzielten ein signifikant höheres LV-Masse/TL-Verhältnis im Vergleich zu den Sed.-W ($p = 0,015$). Die LRT-M unterschieden sich nicht von den Sed.-M (Abb. 15).

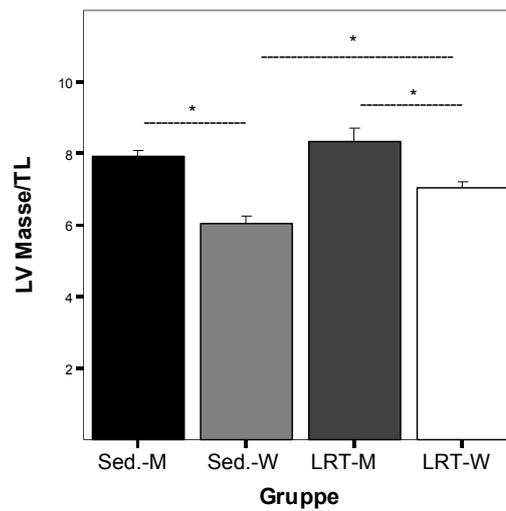


Abbildung 15: Darstellung der LV-Masse/TL nach LRT/Sed. Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M, $n=15$), Sedentary-Weibchen (Sed.-W, $n=15$), Lauftradtraining-Männchen (LRT-M, $n=13$) und Lauftradtraining-Weibchen (LRT-W, $n=14$). Dargestellt ist das Verhältnis LV-Masse zu Tibiallänge (LV-Masse/TL). * bedeutet einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.1.4 Linksventrikuläres Gewicht

Um zu untersuchen, ob LRT zu einer Zunahme des linksventrikulären Gewichtes (LVG) führt, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurden zu Versuchsende die Gewichte der linken Ventrikel bestimmt. Ebenso wurden die Tibialängen ermittelt (Siehe 2.2.5). LVG und TL wurden letztlich ins Verhältnis gesetzt. Die Ergebnisse sind Tabelle 14 zu entnehmen.

Tabelle 14: Darstellung von LVG, TL und LVG/TL nach LRT/Sed. Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M), Sedentary-Weibchen (Sed.-W), Lauftraining-Männchen (LRT-M) und Lauftraining-Weibchen (LRT-W). Dargestellt sind das linksventrikuläre Gewicht (LVG) in mg, die Tibialänge (TL) in mm sowie das Verhältnis LVG zu Tibialänge (LVG/TL). \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen LRT und Sed. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	n	LVG [mg]	TL [mm]	LVG/TL
Sed.-M	15	97,80 ± 1,43	16,80 ± 0,11	5,82 ± 0,08
Sed.-W	15	78,73 ± 1,72*	16,45 ± 0,13	4,79 ± 0,09*
LRT-M	13	101,77 ± 2,11	16,44 ± 0,13	6,19 ± 0,11
LRT-W	14	90,00 ± 2,48\$*	16,36 ± 0,13	5,50 ± 0,13\$*

Das LVG war bei den männlichen Gruppen signifikant höher als das der weiblichen (Sed. $p < 0,001$, LRT $p = 0,001$). Bei den LRT-W war das LVG 14% höher im Vergleich zu den Sed.-W ($p = 0,001$). Die LRT-M unterschieden sich nicht von den Sed.-M. Ihr LVG erhöhte sich um lediglich 4%. Bei der Tibialänge gab es keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Im Verhältnis LVG/TL wurden die signifikanten Geschlechterunterschiede der LRT- und Sed.-Gruppen bestätigt (Sed. $p < 0,001$; LRT $p < 0,001$). Ein höheres LVG/TL-Verhältnis zeigten die LRT-W im Vergleich zu den Sed.-W ($p < 0,001$; Abb. 16). Zwischen den männlichen Gruppen wurde dies nicht erreicht.

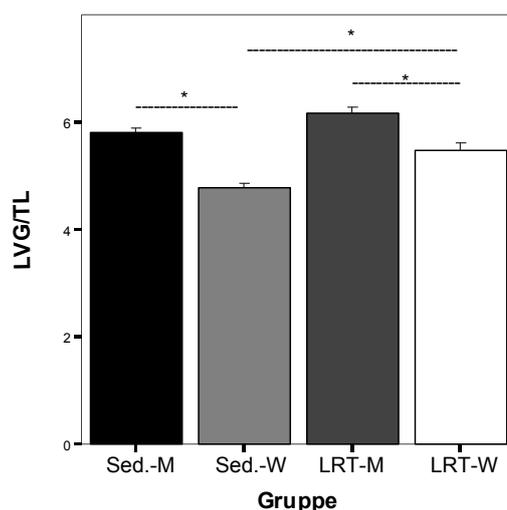


Abbildung 16: Darstellung LVG/TL nach LRT/Sed. Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M, n=15), Sedentary-Weibchen (Sed.-W, n=15), Lauftraining-Männchen (LRT-M, n=13) und Lauftraining-Weibchen (LRT-W, n=14). Dargestellt ist das Verhältnis linksventrikuläres Gewicht zu Tibialänge (LVG/TL). * bedeutet einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.1.5 Relative Genexpression ausgewählter Hypertrophiemarker

Um zu untersuchen, ob es durch LRT zu einer Veränderung der Genexpression aus der Literatur bekannter Hypertrophiemarker kommt, wurden die mRNA-Expressionen von ANP, BNP, α -skA, α -MHC und β -MHC in den linken Ventrikeln gemessen (Siehe 2.2.7). Dabei wurde die ermittelte Genexpression auf die Expression von GAPDH bezogen und als relative Genexpression dargestellt (Tab. 15).

Tabelle 15: Darstellung der relativen Genexpression ausgewählter Hypertrophiemarker nach LRT/Sed. Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M), Sedentary-Weibchen (Sed.-W), Laufradtraining-Männchen (LRT-M) und Laufradtraining-Weibchen (LRT-W). Dargestellt sind die mRNA-Expressionen von ANP, BNP, α -skA, α -MHC und β -MHC jeweils im Verhältnis zu GAPDH sowie das Verhältnis β -MHC zu α -MHC. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen LRT und Sed. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	ANP/GAPDH	BNP/GAPDH	α -skA/GAPDH	α -MHC/GAPDH	β -MHC/GAPDH	β -MHC/ α -MHC
Sed-M n=15	0,87 \pm 0,07	0,78 \pm 0,05	1,56 \pm 0,17	0,90 \pm 0,03	0,77 \pm 0,09	0,89 \pm 0,13
Sed-W n=15	1,13 \pm 0,11	0,93 \pm 0,09	0,96 \pm 0,18	1,00 \pm 0,06	1,19 \pm 0,17*	1,13 \pm 0,16
LRT-M n=13	0,81 \pm 0,06	0,74 \pm 0,10	1,22 \pm 0,21	0,88 \pm 0,05	0,79 \pm 0,08	0,89 \pm 0,06
LRT-W n=14	0,79 \pm 0,07\$	0,88 \pm 0,08	1,37 \pm 0,21	0,99 \pm 0,04	0,67 \pm 0,08\$	0,67 \pm 0,07\$

Die relative Expression von ANP bei den LRT-W war 30% geringer als die der Sed.-W ($p=0,018$; Abb. 17a). Bei den Männchen gab es keinen Unterschied. BNP, α -skA und α -MHC zeigten keine Unterschiede zwischen den Gruppen. β -MHC wurde bei den LRT-W signifikante 44% niedriger exprimiert als bei den Sed.-W ($p=0,008$). Signifikante Geschlechterunterschiede gab es in der relativen Expression von β -MHC zwischen den Sed.-M und Sed.-W ($p=0,044$; Abb. 17b). So wurde β -MHC bei den Sed.-W 35% höher exprimiert als bei den Sed.-M. Das Verhältnis β -MHC/ α -MHC war bei den LRT-W 41% geringer als bei den Sed.-W ($p=0,034$; Abb. 17c).

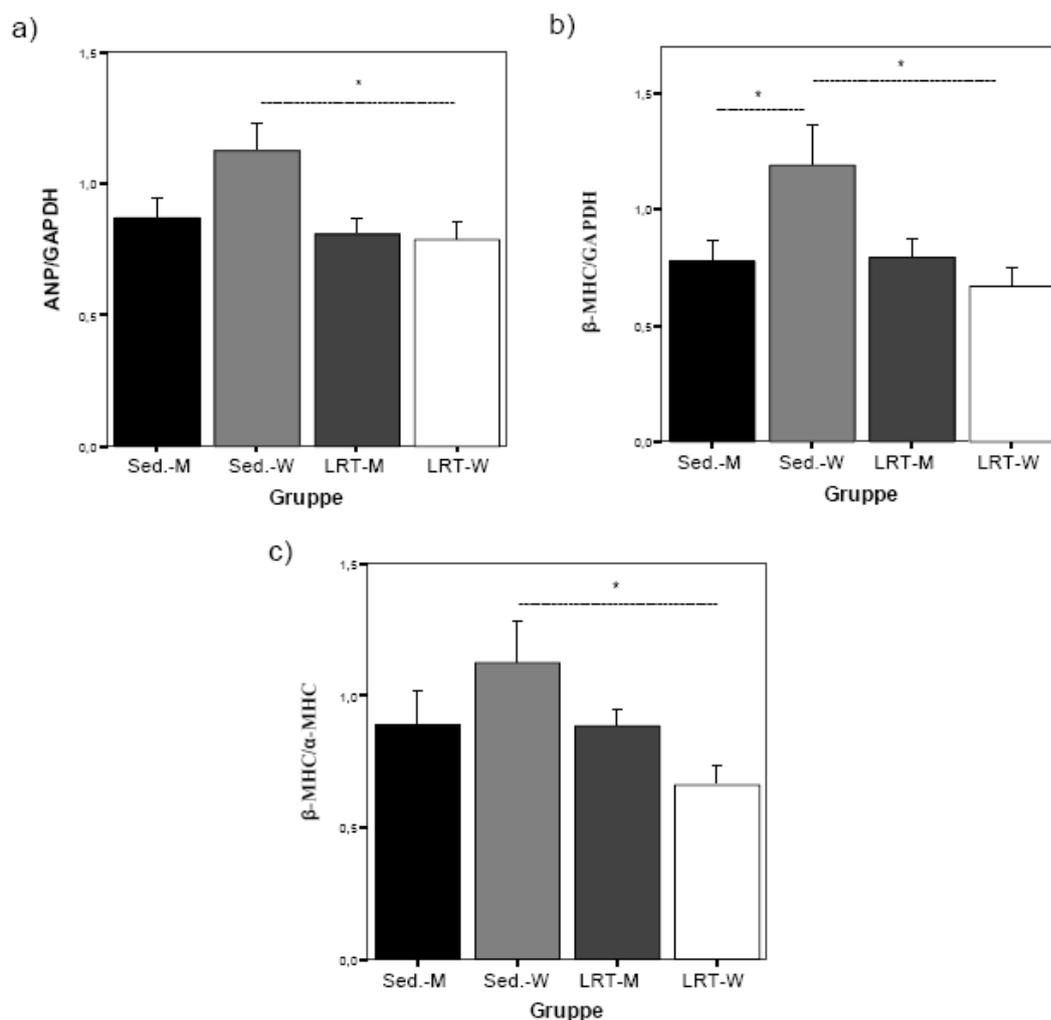


Abbildung 17a-c: Darstellung der relativen Genexpressionen von a) ANP/GAPDH und b) β -MHC/GAPDH sowie c) des Verhältnisses β -MHC/ α -MHC nach LRT/Sed. Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M, n=15), Sedentary-Weibchen (Sed.-W, n=15), Lauftradtraining-Männchen (LRT-M, n=13) und Lauftradtraining-Weibchen (LRT-W, n=14). Dargestellt sind die mRNA-Expressionen von a) ANP/GAPDH, b) β -MHC/GAPDH und c) β -MHC/ α -MHC. * bedeutet einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

3.1.6 Kapillarisation

Um festzustellen, ob sich die Kapillardichte durch LRT erhöht, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurden die Kapillaren angefärbt und ausgezählt (Siehe 2.2.8, Abb. 18). Dabei wurden aus jeder Gruppe willkürlich sechs Tiere ausgewählt.

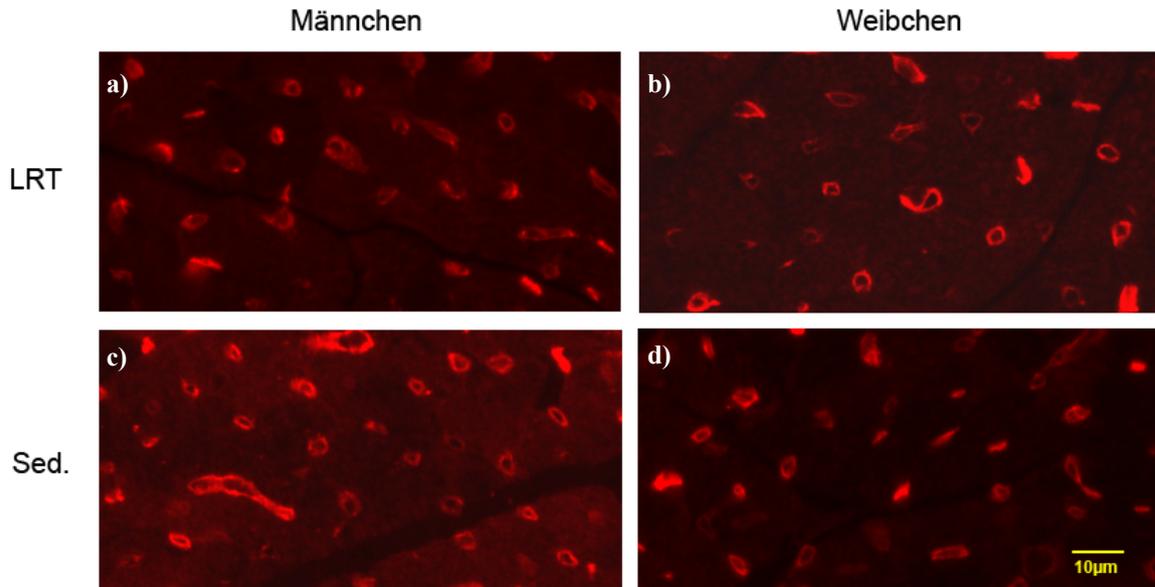


Abbildung 18: Histologische Darstellung der Kapillardichte mit Isolektinfärbung nach LRT/Sed. Dargestellt ist die Kapillardichte für a) ein Lauftraining-Männchen, b) ein Lauftraining-Weibchen, c) ein Sedentary-Männchen d) ein Sedentary-Weibchen.

Die Ergebnisse der Kapillarzählung sind Tabelle 16 zu entnehmen.

Tabelle 16: Darstellung der Kapillardichte nach LRT/Sed. Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M), Sedentary-Weibchen (Sed.-W), Lauftraining-Männchen (LRT-M) und Lauftraining-Weibchen (LRT-W). Dargestellt ist die Kapillaranzahl/mm². n = Anzahl der Tiere pro Gruppe.

Gruppe	n	Kapillaren/mm ²
Sed.-M	6	4924 ± 136
Sed.-W	6	5304 ± 201
LRT-M	6	5008 ± 176
LRT-W	6	4649 ± 246

Im Vergleich der Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Kapillardichte festgestellt werden. Die LRT-W zeigten eine Tendenz zur Abnahme der Kapillardichte durch LRT (Abb. 19).

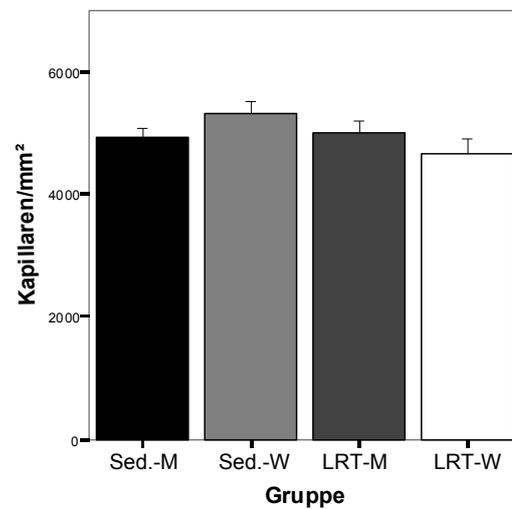


Abbildung 19: Darstellung der Kapillaren/mm². Die Gruppen wurden unterteilt in Sedentary-Männchen (Sed.-M, n=6), Sedentary-Weibchen (Sed.-W, n=6), Laufradtraining-Männchen (LRT-M, n=6) und Laufradtraining-Weibchen (LRT-W, n=6). Dargestellt ist die Anzahl der Kapillaren pro mm².

3.2 MYOKARDINFARKT

Zur Erzeugung einer pathologischen Hypertrophie wurde bei den Mäusen anhand einer permanenten Ligatur der *Left Anterior Descending Coronary Artery* (LAD) ein Myokardinfarkt (MI) induziert (Siehe 2.2.3). Insgesamt wurden 73 Mäuse operiert, von denen 48 einen MI erhielten und 25 scheinoperiert (Sham) wurden. Um zu untersuchen, ob bei der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie Geschlechterunterschiede zu beobachten sind, wurden 22 männliche und 26 weibliche Tiere MI-operiert. Als Kontrolle dazu dienten 13 Männchen sowie 12 Weibchen, die nur scheinoperiert wurden.

3.2.1 Mortalität

Ein wichtiger Parameter bei MI-Operationen ist die Erhebung der Mortalitätsrate. Tabelle 17 gibt an, wie viele von den insgesamt operierten Tieren innerhalb der ersten 14d post-OP verstorben sind bzw. überlebt haben.

Tabelle 17: Darstellung der Anzahl operierter Tiere und wie viele bis zwei Wochen post-OP verstorben sind bzw. überlebt haben. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M), Sham-Weibchen (Sham-W), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W). Dargestellt ist die Anzahl der Tiere, die operiert wurden, wie viele davon verstorben sind und wie viele zwei Wochen post-OP überlebt haben.

Gruppe	operiert	verstorben	überlebt
Sham-M	13	2	11
Sham-W	13	1	12
MI-M	25	19	6
MI-W	27	16	11

Bei den MI-M betrug die Mortalität 76%, bei den MI-W 59%, bei den Sham-M 15% und bei den Sham-W 8% (Abb. 22).

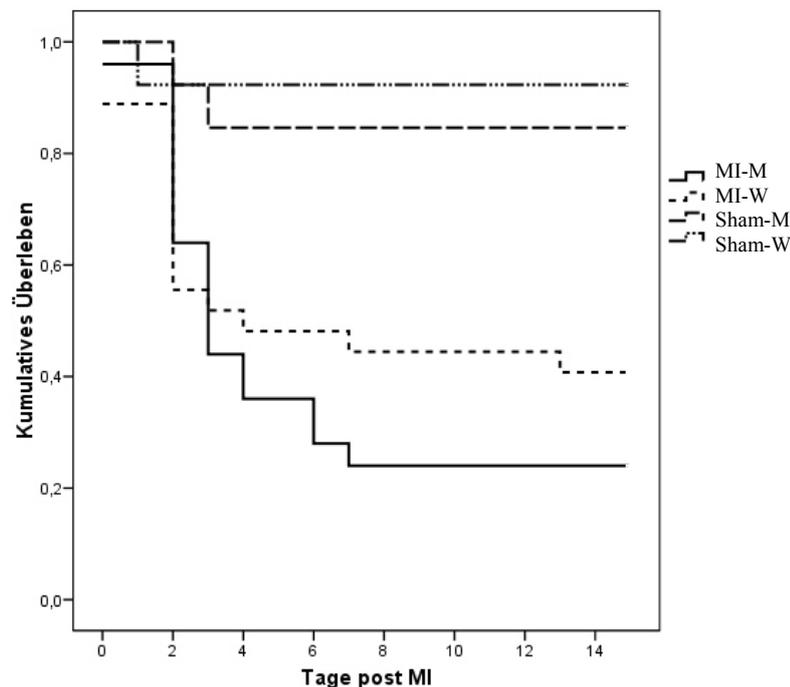


Abbildung 20: Darstellung der Überlebensrate nach MI/Sham. Dargestellt ist das kumulative Überleben (1,0 bedeutet 100% der Tiere haben überlebt) bis zur Organentnahme zwei Wochen post-OP.

Nach der Infarktsetzung wurden die Tiere täglich in Augenschein genommen und ihr äußeres Erscheinungsbild sowie das Spontanverhalten beurteilt. Dabei wurde nach den Empfehlungen des „Arbeitskreises Berliner Tierschutzbeauftragter“ vorgegangen. Diejenigen Mäuse, die den definierten Abbruchkriterien entsprachen, wurden umgehend euthanasiert.

Vor der Organentnahme verendete Tiere wurden auf die mögliche Todesursache untersucht. Hierzu wurde der Thorax eröffnet und Veränderungen der Brusthöhle und des Herzens makroskopisch beurteilt. Bei einer Ruptur des Herzens befanden sich Blutkoagula in der Brusthöhle, und eine Rupturstelle war am LV sichtbar. Wenn keine makroskopisch sichtbaren Befunde vorlagen, wurden als Todesursachen Arrhythmie bzw. Kammerflimmern oder *Acute Low Cardiac Output Syndrome* (ALCOS) durch Linksherzinsuffizienz mit nachfolgendem kardiogenen Schock angenommen.

3.2.2 Infarktgröße

Um zu untersuchen, ob sich die mittlere Infarktgröße zwischen beiden Geschlechtern unterscheidet, wurde der Infarktbereich des linken Ventrikels fotografisch festgehalten, ausgemessen und berechnet (Siehe 2.2.6). Bei sechs MI-M und elf MI-W konnte die Infarktgröße bestimmt werden (Tab. 18).

Tabelle 18: Darstellung der Infarktgröße. Die Gruppen wurden unterteilt in Myokardinfarkt-Männchen (MI-M) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W). Dargestellt ist die Infarktgröße in %. n = Anzahl der Tiere

Gruppe	n	Infarktgröße [%]
MI-M	6	37,17 ± 5,38
MI-W	11	41,82 ± 3,36

Die mittlere Infarktgröße war bei beiden Geschlechtern ähnlich und betrug ca. 40%.

3.2.3 Fraktionelle Flächenänderung, Ejektionsfraktion und Herzminutenvolumen

Um zu untersuchen, ob MI zu einer Verschlechterung der LV-Funktion führt, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurden die FAC, die EF und das HMV vor und nach der OP bestimmt (Siehe 2.2.4; Tab. 19).

Tabelle 19: Darstellung von FAC, EF und HMV vor und nach MI/Sham. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M), Sham-Weibchen (Sham-W), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W). Dargestellt sind die fraktionelle Flächenänderung (FAC) in %, die Ejektionsfraktion (EF) in % und das Herzminutenvolumen (HMV) in $\mu\text{l}/\text{min}$. E0 steht für den Zeitpunkt vor der OP und E11 elf Tage post-OP. # bedeutet signifikante Unterschiede vor und nach OP. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen MI und Sham. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	FAC.E0 [%]	FAC.E11 [%]	EF.E0 [%]	EF.E11 [%]	HMV.E0 [$\mu\text{l}/\text{min}$]	HMV.E11 [$\mu\text{l}/\text{min}$]
Sham-M n=11	25,2 \pm 2,03	28,9 \pm 1,37	37,2 \pm 3,33	43,8 \pm 1,88	8.262 \pm 568	10.746 \pm 725#
Sham-W n=12	23,3 \pm 1,89	23,7 \pm 2,08	36,2 \pm 2,49	35,9 \pm 3,43	6.940 \pm 451	7.111 \pm 545*
MI-M n=6	29,6 \pm 3,62	12,0 \pm 2,26#	44,8 \pm 5,19	19,5 \pm 3,56#	8.793 \pm 1.125	6.576 \pm 1.199\$
MI-W n=11	26,2 \pm 1,96	17,7 \pm 1,38#	39,9 \pm 2,64	29,1 \pm 2,37#	8.643 \pm 645	9.557 \pm 799

Die FAC verringerte sich nach MI, bei den MI-W um 32% ($p=0,005$) und bei den MI-M sogar um 60% ($p=0,002$). Die MI-M zeigten eine um 59% geringere FAC im Vergleich zu den Sham-M ($p<0,001$).

Die EF war bei den MI-Gruppen elf Tage nach der Operation niedriger als vor dem Eingriff (MI-M $p=0,005$; MI-W $p=0,017$). Bei den MI-M sank die EF um 56%. Dieses Ergebnis spiegelte sich auch durch den Vergleich zur Kontrollgruppe wieder ($p<0,001$). Bei den MI-W hingegen sank die EF um 27% und es ergaben sich keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe (Abb. 23).

Die MI-M hatten post-MI ein um 39% geringeres HMV als die Sham-M ($p=0,014$). Das HMV der MI-W unterschied sich nicht von dem der Sham-W. Signifikante Geschlechterunterschiede gab es unter den Sham-Gruppen. Das HMV war post-OP bei den Sham-W geringer als das der Sham-M ($p=0,006$).

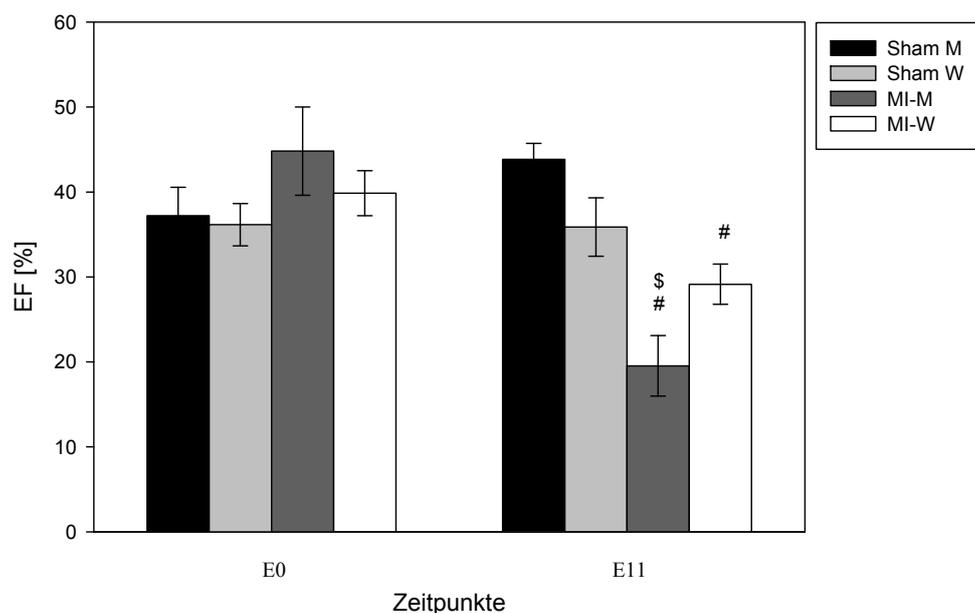


Abbildung 21: Darstellung der Ejektionsfraktion (EF) vor und nach MI/Sham. E0 steht für den Zeitpunkt vor MI/Sham, E11 für elf Tage nach MI/Sham. Dargestellt ist die Ejektionsfraktion (EF) in %. # bedeutet signifikante Unterschiede zwischen vor (E0) und nach (E11) MI/Sham. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen MI und Sham.

3.2.4 Linksventrikuläre Masse

Um nachzuvollziehen, ob MI bei männlichen und weiblichen Mäusen zu einer Hypertrophie des LV führt, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurde die LV-Masse vor und nach der OP bestimmt (Siehe 2.2.4). Zu Versuchsende wurde die LV-Masse ins Verhältnis zur Tibialänge gesetzt. Die Ergebnisse sind Tabelle 19 zu entnehmen.

Tabelle 19: Darstellung der linksventrikulären Masse (LV-Masse) vor und nach MI/Sham. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M), Sham-Weibchen (Sham-W), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W). Dargestellt sind die linksventrikuläre Masse (LV-Masse) in mg zum Zeitpunkt vor OP (E0) und elf Tage nach OP (E11) sowie das Verhältnis LV-Masse zu Tibialänge (TL). # bedeutet signifikante Unterschiede vor und nach OP. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen MI und Sham. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	n	LV-Masse.E0 [mg]	LV-Masse.E11 [mg]	LV-Masse.E11/TL
Sham-M	11	118,59 ± 5,16	114,15 ± 5,58	7,83 ± 0,76
Sham-W	12	96,89 ± 4,12*	100,14 ± 4,44	6,77 ± 0,43
MI-M	6	115,53 ± 10,03	169,00 ± 20,10\$	7,09 ± 0,67
MI-W	11	103,85 ± 4,39	139,34 ± 12,10#\$	7,96 ± 0,80

MI führte zu einer Erhöhung der LV-Masse bei beiden Geschlechtern, bei den MI-M um 48% ($p=0,008$) und bei den MI-W um 39% ($p=0,009$) im Vergleich zu der jeweiligen Kontrollgruppe (Abb.24). Bei den Sham-Gruppen hatte die OP keinen Einfluss auf die LV-Masse. Vor der OP gab es einen signifikanten Geschlechterunterschied zwischen den Sham-Gruppen. So war die LV-Masse der Sham-W niedriger als die der Sham-M ($p=0,02$).

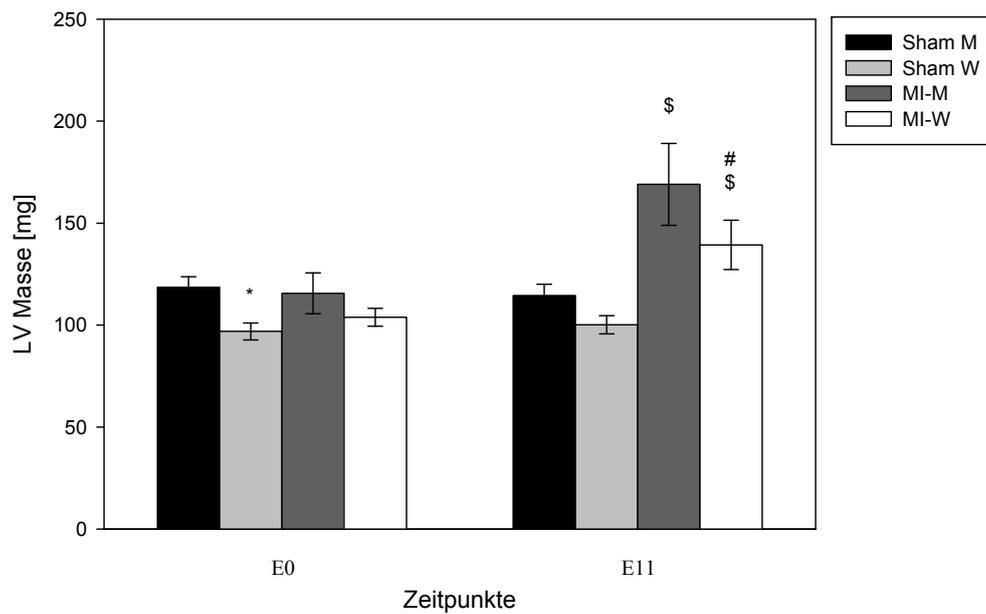


Abbildung 22: Darstellung der LV-Masse vor und nach MI/Sham. E0 steht für den Zeitpunkt vor OP, E11 elf Tage post-OP. Dargestellt ist die linksventrikuläre Masse (LV-Masse) in mg. # bedeutet signifikante Unterschiede vor und nach OP. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen MI und Sham. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Setzte man die LV-Masse zu Versuchsende ins Verhältnis zur Tibiallänge (LV-Masse.E11/TL), wurden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt (Abb. 25).

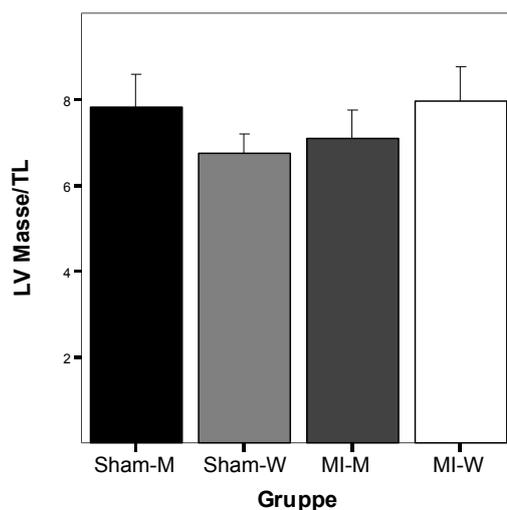


Abbildung 23: Darstellung der LV-Masse/TL nach MI/Sham. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M, n=11), Sham-Weibchen (Sham-W, n=12), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M, n=6) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W, n=11). Dargestellt ist das Verhältnis der linksventrikulären Masse zur Tibiallänge.

3.2.5 Linksventrikuläres Gewicht

Um zu untersuchen, ob MI zu einer Zunahme des LVG führt, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurden 14d post-OP die LV der Mäuse entnommen und gewogen (Siehe 2.2.5). Die Ergebnisse sind Tabelle 20 zu entnehmen.

Tabelle 20: Darstellung von LVG, TL und LVG/TL nach MI/Sham. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M), Sham-Weibchen (Sham-W), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W). Dargestellt sind das linksventrikuläre Gewicht (LVG) in mg, die Tibiallänge (TL) in mm sowie das Verhältnis LVG zu Tibiallänge (LVG/TL). \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen MI und Sham. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	n	LVG [mg]	TL [mm]	LVG/TL
Sham-M	11	103,09 ± 2,11	17,05 ± 0,23	6,05 ± 0,13
Sham-W	12	75,75 ± 1,86*	16,15 ± 0,15*	4,69 ± 0,11*
MI-M	6	138,80 ± 10,55\$	16,92 ± 0,23	8,24 ± 0,72\$
MI-W	11	125,82 ± 5,01\$	16,20 ± 0,17	7,78 ± 0,33\$

Das LVG war bei beiden MI-Gruppen signifikant höher als bei den Kontrollgruppen, bei den MI-M um 35% ($p < 0,001$) und bei den MI-W um 66% ($p < 0,001$). Ein Geschlechterunterschied stellte sich zwischen Sham-M und Sham-W dar. Das LVG der Sham-M war signifikant höher als das der Sham-W ($p < 0,001$).

Bei der TL gab es einen signifikanten Geschlechterunterschied zwischen den Sham-Gruppen. Die Tibia war bei den Sham-M länger als bei den Sham-W ($p = 0,005$).

Das LVG/TL war bei den MI-Gruppen signifikant höher im Vergleich zu den Sham-Gruppen (M: $p < 0,001$; W: $p < 0,001$). Es ergab sich ein signifikanter Geschlechterunterschied zwischen den Sham-Gruppen, wobei die Sham-M ein signifikant höheres LVG/TL zeigten als die Sham-W ($p = 0,003$; Abb. 26).

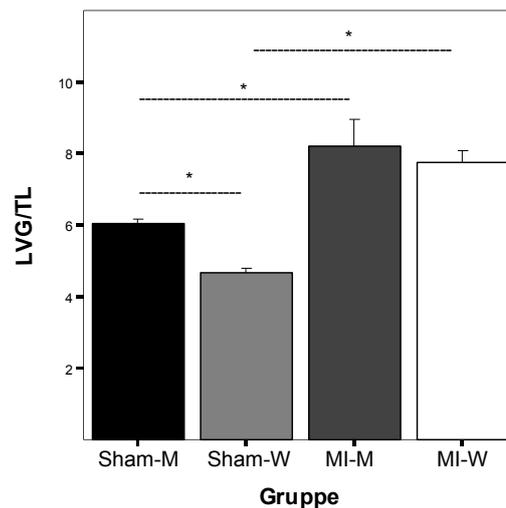


Abbildung 24: Darstellung von LVG/TL nach MI/Sham. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M, $n=11$), Sham-Weibchen (Sham-W, $n=12$), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M, $n=6$) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W, $n=11$). * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.2.6 Relative Genexpression ausgewählter Hypertrophiemarker

Um festzustellen, ob MI zu einer erhöhten mRNA-Expression ausgewählter Hypertrophiemarker (ANP, BNP, α -skA, α -MHC und β -MHC) in den linken Ventrikeln führt, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurden die Expressionen bestimmt (Siehe 2.2.7). Dabei wurde die ermittelte Genexpression auf die mRNA-Expression des Referenzgens GAPDH bezogen und als relative Genexpression dargestellt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 21 dargestellt.

Tabelle 21: Darstellung der relativen Genexpression ausgewählter Hypertrophiemarker nach MI/Sham. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M), Sham-Weibchen (Sham-W), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W). Dargestellt sind ANP, BNP, α -skA, α -MHC und β -MHC jeweils im Verhältnis zu GAPDH sowie das Verhältnis β -MHC zu α -MHC. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen MI und Sham. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	ANP/GAPDH	BNP/GAPDH	α -skA/ GAPDH	α -MHC/ GAPDH	β -MHC/ GAPDH	β -MHC/ α -MHC
Sham-M n=11	0,14 ± 0,01	0,50 ± 0,04	0,80 ± 0,10	1,10 ± 0,03	0,32 ± 0,04	0,28 ± 0,03
Sham-W n=12	0,16 ± 0,02	0,54 ± 0,03	0,63 ± 0,09	1,20 ± 0,05	0,23 ± 0,03	0,19 ± 0,03
MI-M n=6	2,19 ± 0,37\$	1,50 ± 0,17\$	1,67 ± 0,19\$	0,62 ± 0,06\$	1,04 ± 0,20\$	1,63 ± 0,26
MI-W n=11	1,62 ± 0,26\$	1,17 ± 0,13\$	1,61 ± 0,17\$	0,81 ± 0,10\$	0,88 ± 0,06\$	1,99 ± 0,99\$

ANP, BNP, α -skA und β -MHC wurden post-MI signifikant höher exprimiert im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollgruppen. Die stärkste Erhöhung der Expression wurde bei ANP festgestellt. Die Expression war bei den MI-M 16mal höher als bei den Sham-M ($p < 0,001$) und bei den MI-W zehnmal höher als bei den Sham-W ($p < 0,001$, Abb. 27a). BNP wurde bei den MI-M dreimal höher exprimiert als bei den Sham-M ($p < 0,001$) und bei den MI-W doppelt so hoch als bei den Sham-W ($p < 0,001$). α -skA wurde bei den MI-M doppelt so hoch exprimiert als bei den Sham-M ($p = 0,002$) und bei den MI-W 2,5-fach so hoch als bei den Sham-W ($p < 0,001$). Bei α -MHC verringerte sich die Expression post-MI bei beiden Geschlechtern signifikant. Es wurde bei den MI-M 44% ($p < 0,001$) und bei den MI-W 33% ($p < 0,001$) weniger exprimiert im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 27b). β -MHC wurde bei den MI-M dreimal höher exprimiert im Vergleich zu den Sham-M ($p < 0,001$), bei den MI-W fast viermal mehr als bei den Sham-W ($p < 0,001$). Signifikante Geschlechterunterschiede konnten nicht festgestellt werden.

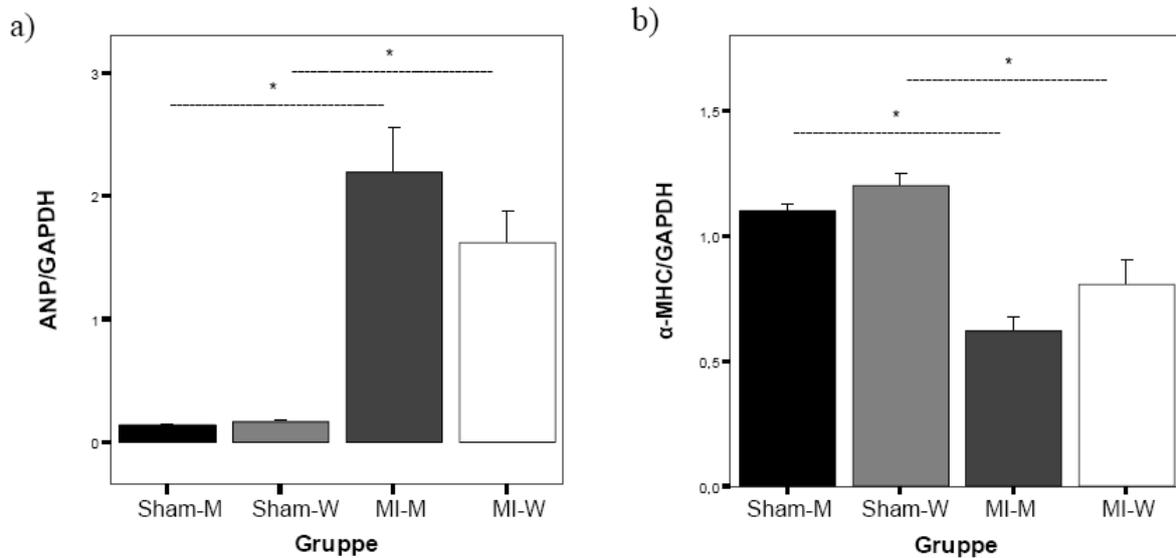


Abbildung 25 a-b: Darstellung der relativen Genexpressionen von a) ANP/GAPDH und b) α-MHC/GAPDH. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M, n=11), Sham-Weibchen (Sham-W, n=12), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M, n=6) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W, n=11). Dargestellt sind a) ANP/GAPDH und b) α-MHC/GAPDH. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Das Verhältnis β-MHC/α-MHC war bei den MI-W zehnmal höher im Vergleich zu den Sham-W ($p=0,046$) und bei den MI-M sechsmal höher als bei den Sham-M (Abb. 28).

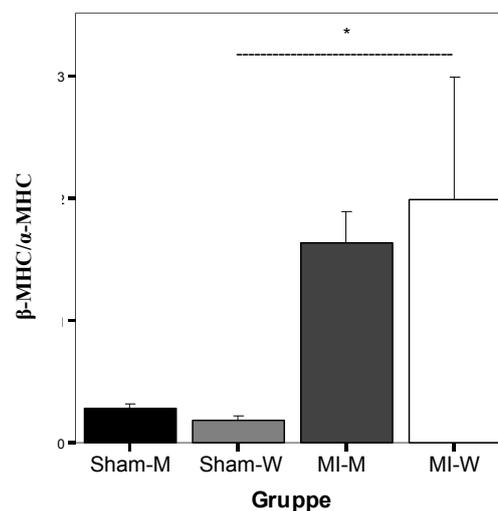


Abbildung 26: Darstellung des Verhältnisses von β-MHC/α-MHC. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M, n=11), Sham-Weibchen (Sham-W, n=12), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M, n=6) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W, n=11). Dargestellt ist das Verhältnis von β-MHC zu α-MHC (β-MHC/α-MHC). * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

3.2.7 Kapillarisation

Um zu untersuchen, ob es post-MI zu einer Abnahme der Kapillardichte in Hypertrophie- bzw. Borderzone (Übergang zwischen Infarktzone und Hypertrophiezone) kommt, und ob es hierbei Geschlechterunterschiede gibt, wurden die Kapillaren angefärbt und ausgezählt (Siehe 2.2.8). Hier wurden wie im LRT-Modell willkürlich sechs Tiere aus jeder Gruppe gewählt.

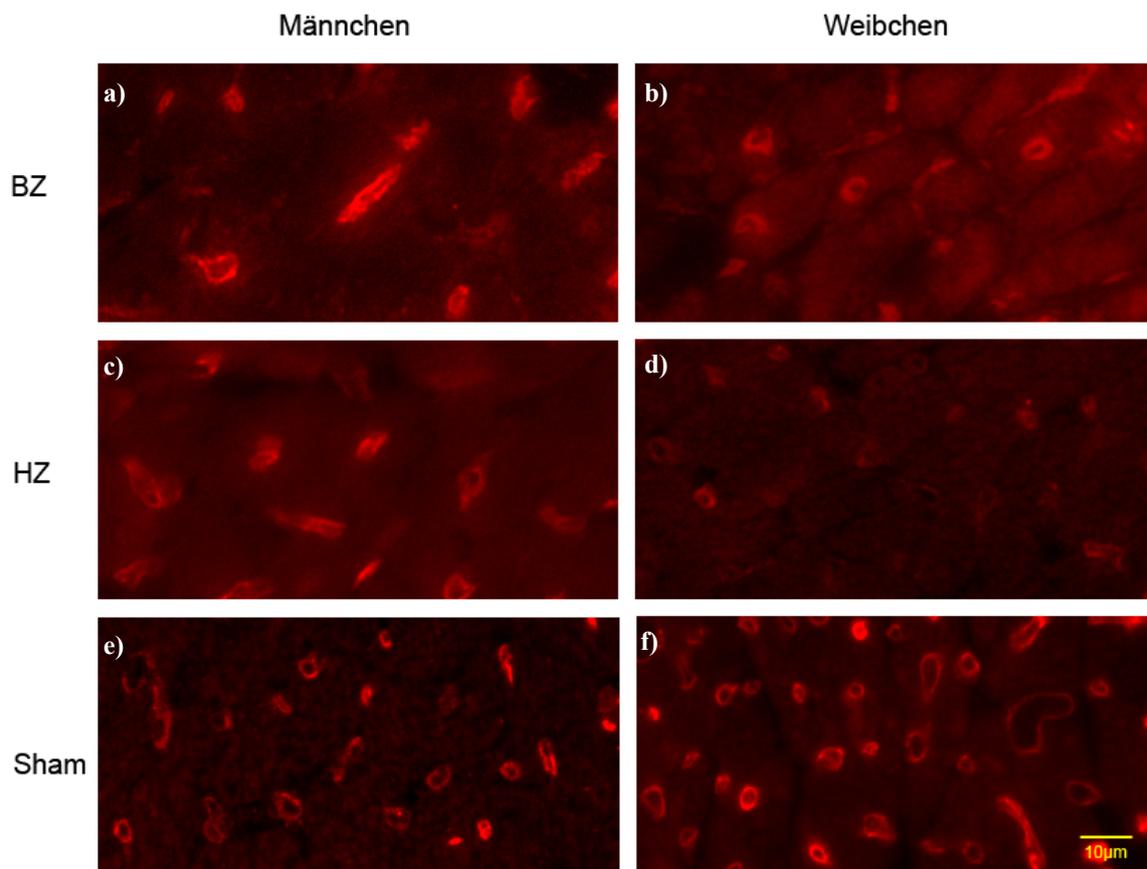


Abbildung 27: Exemplarische Darstellung der Kapillardichte nach MI/Sham. Dargestellt ist die Kapillardichte für a) ein Myokardinfarkt-Männchen in der Borderzone, b) ein Myokardinfarkt-Weibchen in der Borderzone, c) ein Myokardinfarkt-Männchen in der Hypertrophiezone, d) ein Myokardinfarkt-Weibchen in der Hypertrophiezone, e) ein Sham-Männchen und f) ein Sham-Weibchen.

Die Ergebnisse der Kapillarzählung sind in Tabelle 22 dargestellt.

Tabelle 22: Darstellung der Kapillardichte nach MI/Sham. Die Gruppen wurden unterteilt in Sham-Männchen (Sham-M), Sham-Weibchen (Sham-W), Myokardinfarkt-Männchen (MI-M) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W). Dargestellt sind die Anzahl der Kapillaren in der Hypertrophiezone (HZ) bzw. Borderzone (BZ) in mm^2 . n = Anzahl der Tiere. \$ bedeutet signifikante Unterschiede zwischen MI und Sham. * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen Männchen und Weibchen.

Gruppe	n	Kapillaren HZ/ mm^2	Kapillaren BZ/ mm^2
Sham-M	6	4781 \pm 283	-
Sham-W	6	6129 \pm 269*	-
MI-M	6	3553 \pm 174\$	2330 \pm 151
MI-W	6	3627 \pm 340\$	1568 \pm 108*

Bei beiden MI-Gruppen war die Anzahl der Kapillaren pro mm^2 in der Hypertrophiezone signifikant geringer als bei den Sham-Gruppen. Bei den MI-M nahm die Kapillardichte um 26% ab im Vergleich zu den Sham-M ($p=0,023$). Bei den MI-W nahm die Kapillardichte um 41% ab im Vergleich zu den Sham-W ($p<0,001$). Ein signifikanter Geschlechterunterschied konnte in der Hypertrophiezone zwischen den Kontrollgruppen festgestellt werden. Die Kapillardichte bei den Sham-W war signifikant höher als bei den Sham-M ($p=0,011$; Abb. 30).

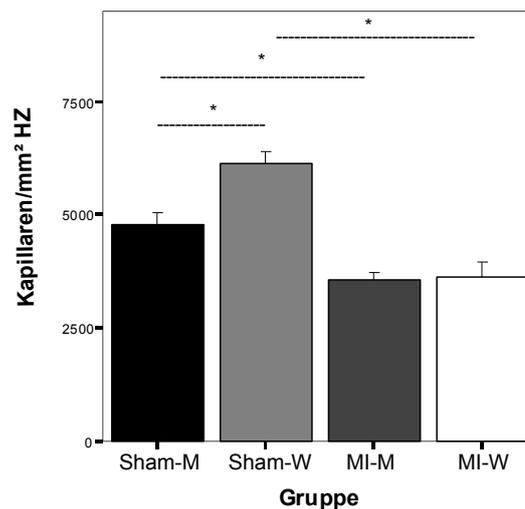


Abbildung 28: Darstellung der Kapillardichte in der Hypertrophiezone. Die Gruppen wurden unterteilt in Myokardinfarkt-Männchen (MI-M, n=6), Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W, n=6), Sham-Männchen (Sham-M, n=6) und Sham-Weibchen (Sham-W, n=6). Dargestellt ist die Anzahl der Kapillaren pro mm^2 in der Hypertrophiezone (Kapillaren/ mm^2 HZ). * bedeutet einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

In der Borderzone gab es einen signifikanten Geschlechterunterschied zwischen den MI-Gruppen. Bei den MI-W war die Kapillardichte in der BZ um ein Drittel geringer als bei den MI-M ($p=0,003$; Abb. 31).

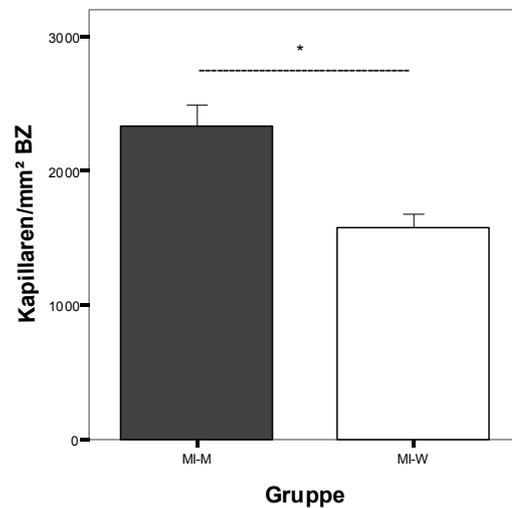


Abbildung 29: Darstellung der Kapillardichte in der Borderzone. Die Gruppen wurden unterteilt in Myokardinfarkt-Männchen (MI-M, $n=6$) und Myokardinfarkt-Weibchen (MI-W, $n=6$). Dargestellt ist die Anzahl der Kapillaren pro mm^2 in der Borderzone (Kapillaren/ mm^2 BZ). * bedeutet signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

4. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit konnten Geschlechterunterschiede bei der Entwicklung einer physiologischen und pathologischen Hypertrophie nachgewiesen werden.

Im LRT-Modell wurde gezeigt, dass die weiblichen Mäuse eine höhere Trainingsperformance erzielten als die männlichen. Die Weibchen entwickelten eine größere Hypertrophie, was zu einer Abnahme einiger Hypertrophiemarker und einem tendenziellen Abfall der Kapillardichte führte. Bei den Männchen zeigten sich keine Veränderungen diesbezüglich. Die Herzfunktion veränderte sich bei den weiblichen Tieren nicht, dagegen nahm bei den männlichen die Auswurffraktion ab.

Nach MI war die Mortalität bei den Männchen höher als bei den Weibchen, trotz gleicher Infarktgröße. Beide Geschlechter entwickelten eine Hypertrophie, wobei die der weiblichen Mäuse deutlich größer war als die der männlichen. Eine Verschlechterung der Herzfunktion war ausschließlich bei männlichen Mäusen zu verzeichnen. Die Expressionen sämtlicher Hypertrophiemarker erhöhten sich bei beiden Geschlechtern. Die Kapillardichte in der Hypertrophiezone nahm bei beiden Geschlechtern gleichermaßen ab. In der Borderzone zeigten die Weibchen eine geringere Kapillardichte als die Männchen.

4.1 GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE NACH PHYSIOLOGISCHEM AUSDAUERTRAINING

4.1.1 Die Auswahl des Trainingsmodells

Das freiwillige LRT wurde gewählt, da es sich als Modell zur Erzeugung einer physiologischen Myokardhypertrophie etabliert hat⁵⁰ und keinen Stress für die Tiere bedeutet.⁸⁴ Laufband- oder auch Schwimmtraining werden durch aversive Stimuli (Elektroschock, Furcht vor dem Ertrinken) vorangetrieben, sind mit erhöhtem Stress für die Tiere verbunden und demnach unphysiologisch.⁸⁵⁻⁸⁷ Außerdem sind Mäuse nachtaktive Tiere und die Versuche finden am Tage statt, was ihr Wohlbefinden zusätzlich beeinträchtigt. Es wurde vielfach demonstriert, dass Mäuse das Laufrad annehmen und sich freiwillig hinein begeben.^{50, 88} Freiwilliges LRT findet in stressfreier Umgebung statt ohne Unterbrechung des Aktivitätsrhythmus der Maus. Die Tiere trainieren wann und solange sie wollen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass die verschiedenen Trainingsmodelle unterschiedliche Effekte auf die physiologische Antwort von Ausdauersport erzeugen.

4.1.2 Geschlechterunterschiede im Trainingsverhalten

In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die weiblichen Mäuse den männlichen in sämtlichen Trainingsparametern überlegen waren (Tab.11). Die Weibchen liefen eine weitere Strecke (Abb.12) mit einer höheren Durchschnittsgeschwindigkeit und waren über einen längeren Zeitraum im Laufrad tätig. Ähnliche Unterschiede in der Aktivität aufgrund des Geschlechts wurden in vorhergehenden Studien, die das Modell des freiwilligen LRT genutzt haben, mehrfach gezeigt. Dabei wurde festgestellt, dass weibliche Mäuse aktiver sind als männliche.^{81, 89-91} Während es Aktivitätsunterschiede zwischen den einzelnen Mäusestämmen gibt,^{81, 88, 89} scheint das Alter keinen Einfluss auf das geschlechterabhängige Trainingsverhalten zu haben.^{81, 89} Allerdings wurde bei den Weibchen eine höhere Trainingsleistung zu Versuchsbeginn festgestellt.⁸⁹ De Bono et al. stellten eine im Unterschied zu den Männchen länger im Laufrad verbrachte Zeit während der zweiten Nachthälfte fest. Außerdem zeigten die Weibchen eine größere Varianz in der Trainingsaktivität von Tag zu Tag und Tier zu Tier.⁹¹ Es ist demzufolge möglich, dass die hormonellen Unterschiede zwischen den Geschlechtern verantwortlich sind für die Unterschiede in der täglichen Laufaktivität. Die sportliche Leistung der Weibchen scheint zyklusabhängig zu sein, insbesondere von der Anwesenheit von Östrogen, wie ein Versuch mit ovariectomierten Mäusen und deren verminderter Laufleistung zeigte.⁸⁹ Gleiches wurde in einem Versuch mit ovariectomierten Ratten festgestellt.⁹² In einem Versuch mit weiblichen Ratten zeigten Anantharaman-Barr et al., dass diese während des Proöstrus (frühe Follikelphase) aktiver waren als während des Metöstrus (Gelbkörperphase).⁹³ Die erhöhte Trainingsperformance der Weibchen lässt auf unterschiedliche, physiologische Kapazitäten oder auf einen ungleichen Bewegungsdrang zwischen den Geschlechtern schließen.

4.1.3 Geschlechterunterschiede in der Entwicklung der physiologischen Hypertrophie und deren Einfluss auf die Herzfunktion

Durch LRT erzielten die Weibchen ein um 14% und die Männchen ein um 4% höheres LVG im Vergleich zu den untrainierten Kontrollgruppen (Abb.16). Dieser Geschlechterunterschied ließ sich anhand der Untersuchungen der LV-Masse bestätigen (Abb.15). De Bono und Konhilas verzeichneten ähnliche Ergebnisse in Bezug auf das Herzgewicht (HG).^{89, 91} Interessanterweise zeigten Konhilas auch, dass die Weibchen einen signifikant höheren Anstieg des HGs für jede gelaufene Stunde und jeden zurückgelegten Kilometer im Vergleich

zu den Männchen erzielten,⁸⁹ was wiederum beweist, dass die Weibchen ein stärkeres hypertrophes Ansprechen auf LRT zeigen als die Männchen.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich zum ersten Mal mit der echokardiographischen Darstellung der Herzfunktion von Mäusen nach freiwilligem LRT. Dabei zeigte sich, dass das LRT die linksventrikuläre Funktion der Weibchen nicht beeinflusste. Bei den Männchen verschlechterte sich die EF (Abb.13), was bedeutet, dass diese durch LRT stärker belastet wurden als die Weibchen. In vorangegangenen, tierexperimentellen Studien wurden bislang ausschließlich echokardiographische Daten nach unfreiwilligem Ausdauertraining, induziert durch Schwimm- oder Laufbandtraining, publiziert. In ihrem Versuch an weiblichen Mäusen konnten Kemi et al. eine moderate Zunahme der posterioren Wanddicke nach Laufbandtraining verzeichnen.⁹⁴ Auch Nguyen et al. zeigten in ihrem Schwimmversuch eine Zunahme der LV-Wanddicke ebenso wie eine Erhöhung der Kontraktilität.⁹⁵ In der vorliegenden Arbeit nahmen die Wanddicken in beiden Herzphasen bei den LRT-W im Gegensatz zu den LRT-M deutlich zu. Der Intraventrikulardiameter veränderte sich hingegen bei beiden Geschlechtern nicht.⁹⁶

Die Effekte von regelmäßigem Ausdauersport sollen eine Verbesserung der linksventrikulären Funktion erzielen.⁴⁵ In einer groß angelegten, humanmedizinischen Studie konnten diese Effekte jedoch nicht erzielt werden. Hier zeigten Athleten im Vergleich zu Untrainierten keine Veränderung der ventrikulären Funktion.⁹⁷

Die in der vorliegenden Arbeit allgemein sehr niedrigen Werte für FAC, EF und HMV sind Ursache des Einflusses der Narkose. Die normale Ruheherzfrequenz der Maus liegt zwischen 450-600 Schlägen pro Minute, wird jedoch durch die Narkose erheblich reduziert.⁹⁸ Dieser Effekt war in allen Gruppen ähnlich und stellt demzufolge kein gruppenspezifisches Ereignis dar. Die allgemeine Abnahme der Funktionsparameter im Vergleich zum Zeitpunkt vor Trainingsbeginn ist auf die sich noch im Wachstum befindenden Tiere zurückzuführen.

4.1.4 Geschlechterunterschiede in der relativen Genexpression ausgewählter Hypertrophiemarker

In der vorliegenden Arbeit erfolgte durch LRT bei den weiblichen Mäusen eine signifikante Reduktion der relativen mRNA-Expressionen von ANP (Abb. 17a) und β -MHC (Abb. 17b). Dies spricht für ein erhöhtes Remodeling und eine starke physiologische Hypertrophieentwicklung bei den Weibchen induziert durch LRT und wird durch ein

herabgesetztes β/α -MHC-Verhältnis verdeutlicht (Abb.17c).

Eine physiologische Hypertrophie, ausgelöst durch LRT, erfordert demnach keine, durch Ischämie des Myokards verursachte Umschaltung zum fetalen Genprogramm und zu einer weniger Energie verbrauchenden Isoform. Auch die herabgesetzten Expressionen von ANP und β -MHC bei den LRT-W, die eine höhere Laufleistung und eine größere Hypertrophie zeigten als die Männchen, weist darauf hin, dass das fetale Genprogramm nicht aktiviert wird.

Über die relative Genexpression von Hypertrophiemarkern nach LRT bei Mäusen gibt es in der Literatur unterschiedliche Aussagen und Vergleiche unter den Geschlechtern fehlen gänzlich. So verzeichneten Allen et al. nach vierwöchigem LRT bei männlichen Mäusen eine erhöhte Expression von ANP und BNP in den Ventrikeln.⁵⁰ Konhilas et al. hingegen zeigten nach siebenwöchigem LRT bei männlichen Mäusen eine verringerte Expression von ANP, α -skA und β -MHC, dabei waren die Laufräder zum Teil mit Widerständen bestückt.⁵¹ Ein Versuch mit weiblichen Mäusen, die ein vierwöchiges Schwimmtraining absolvierten, ergab keine Veränderungen in der Expression von α -MHC.⁹⁹ Lermann et al. erkannten, dass es im Vergleich verschiedener Mausstämme und Trainingsmodelle Unterschiede in Bezug auf die Expression ausgewählter Hypertrophiemarker gibt.⁸⁸

4.1.5 Geschlechterunterschiede in der Kapillarisation

Die vorliegende Arbeit zeigt keine Unterschiede in der Kapillardichte nach fünfwöchigem LRT (Abb.19). Das gleiche Ergebnis erzielten auch Gigante et al. in einem Versuch mit männlichen Mäusen nach sechswöchigem LRT.⁵⁷ In Versuchen mit Ratten und unfreiwilligem Ausdauertraining wurden unterschiedliche Resultate aufgezeigt. Männliche Ratten zeigten im linksventrikulären Subendokard nach sechswöchigem Laufbandtraining eine Zunahme der Kapillardichte und des Kapillaren/Myozyten-Verhältnisses. Dabei kam es zu einer Zunahme und Verlängerung des arteriolen Anteils an Kapillaren sowie zu einer Abnahme und Verkürzung des venularen Anteils. Weiterhin zeigte sich eine erhöhte Verzweigung bei beiden Anteilen.¹⁰⁰ Auch Anversa et al. präsentierten in ihrem Versuch mit männlichen Ratten nach siebenwöchigem Laufbandtraining eine Erhöhung der Kapillardichte und eine demzufolge verkürzte Sauerstoffdiffusionsdistanz, allerdings im rechten Ventrikel.⁵⁵ Hingegen wiesen Jacobs et al. in einem Laufbandversuch, ebenfalls mit männlichen Ratten, weder nach drei noch nach sechs Trainingswochen eine Zunahme der Kapillardichte nach.¹⁰¹ Eine weitere Studie mit sechswöchigem Laufbandtraining bei männlichen Ratten zeigte sogar eine Reduktion der Kapillardichte mit steigendem Herzgewicht. Hierbei blieben die totale

Kapillarlänge und das Kapillaren/Myozyten-Verhältnis konstant.¹⁰² Trotz der Übereinstimmung der drei letztgenannten Versuche in Tierart, Geschlecht, Trainingsmodell und Versuchsdauer ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse.

Wir erwarteten eine Zunahme der Kapillardichte, denn die erhöhte kardiale Aktivität, die durch Ausdauersport verursacht wird, erfordert eine erhöhte Sauerstoffversorgung des ventrikulären Gewebes. Um diese zu gewährleisten, sollte eine Adaptation des Gefäßsystems stattfinden. Das Herz ist im Gegensatz zur Skelettmuskulatur durch eine hohe metabolische Aktivität gekennzeichnet, und schon im Skelettmuskel bringt Ausdauersport nach kurzer Zeit eine Erhöhung der Kapillardichte mit sich.¹⁰³ Die Sauerstoffversorgung des linken Ventrikels scheint jedoch bei freiwilligem LRT durch die Anzahl der Kapillaren pro Fläche gewährleistet zu werden. Offensichtlich besteht keine Ischämie, die zu einer Erhöhung der Kapillardichte führt. Ein erhöhter Sauerstoffbedarf könnte durch eine Zunahme des Kapillardurchmessers gewährleistet werden. Dies zeigte ein Schwimmversuch mit weiblichen Ratten, bei denen der Kapillardiameter um 27% größer war im Vergleich zur untrainierten Kontrollgruppe.¹⁰⁴ Der Kapillardurchmesser wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt. Eine weitere Erklärung für die gleich bleibende Kapillardichte könnte der Umbau von Kapillaren in Arteriolen sein.

Interessanterweise zeigte sich bei den LRT-W eine Tendenz zum Abfall der Kapillardichte und mit zunehmender Laufstrecke eine Verringerung der Anzahl an Kapillaren (Abb.20). Das ist möglicherweise auf die Hypertrophie und die damit verbundene Volumenzunahme der Myozyten zurückzuführen.

Bei den LRT-M korrelierte die Kapillardichte mit LVG/TL, so nahm mit steigendem LVG/TL die Kapillaranzahl zu (Abb.21). Dieses Ergebnis spricht dafür, dass es bei den Männchen durch LRT zu einer relativen Sauerstoffunterversorgung im Myokard kam und dadurch neue Kapillaren gebildet wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kapillaranzahl auf die Fläche bezogen. Möglicherweise bringt eine Relation zur Herzmuskelzelle ein abweichendes Ergebnis.

4.2 GESCHLECHTERUNTERSCHIEDE NACH MYOKARDINFARKT

4.2.1 MI-Modell zur Erzeugung einer pathologischen Hypertrophie

Das Mäuseherz wird von zwei Koronararterien versorgt, die als erste Gefäße der Aorta entspringen. Die linke Koronararterie der Maus läuft entlang der linken Herzseite bis zur Herzspitze. Sie kann in ihrem Verlauf bis zu vier Äste abgeben. Die rechte Koronararterie teilt sich nach ihrem Ursprung in zwei Äste. Der eine Ast folgt der rechten Seite des Herzens, um den rechten Ventrikel zu versorgen. Der zweite Ast ist eine kräftige Septumarterie, die das Kammerseptum vaskularisiert.¹⁰⁵ Bei den meisten Mäusen wird die Herzspitze von der linken Koronararterie versorgt, bei einem kleinen Anteil übernimmt die rechte Koronararterie diese Aufgabe oder unterstützt die linke.^{106, 107} Im Gegensatz zur Maus existiert beim Menschen kein gesonderter Seitenast, der aus dem rechten Koronarsystem entspringt. Die Versorgung des Septums wird von der linken Koronararterie übernommen. Auch laufen die Gefäße der Maus intramyokardial und die des Menschen subepicardial.^{106, 108} Aus dieser divergenten Koronaranatomie zwischen Maus und Mensch ergeben sich auch funktionelle Unterschiede für die Versorgungsgebiete. Durch die Ligatur der linken Koronararterie der Maus ca. 2-3mm apikal des linken Herzhohls werden Infarkte in solchen Gebieten induziert, wie sie auch beim Menschen häufig vorkommen. Die zeitlichen Abläufe sind bei der Maus naturgemäß schneller als beim Menschen, laufen aber in vergleichbarer Art und Weise ab. Hierdurch sind die Auswirkungen der Okklusion und der nachfolgenden Ischämie zwischen Mensch und Maus vergleichbar.^{109, 110} MI-Operationen an Mäusen inklusive Operationshergang wurden vielfach beschrieben.¹¹⁰⁻¹¹³ Der intramyokardiale Verlauf der LAD bei Mäusen erfordert eine „blinde“ Ligatur. Eine Okklusion des Gefäßes bewirkt große, transmurale Infarkte in den anterolateralen, posterioren und apikalen Bereichen des linken Ventrikels.^{105, 114} Dabei hält die Septumarterie das Septum frei von Infarkt,¹⁰⁵ selbst in Herzen mit großen Infarkten.¹¹⁰

4.2.2 Geschlechterunterschiede in der Mortalität nach MI

In der vorliegenden Arbeit betrug die Mortalität bei den MI-M 73% und bei den MI-W 58% (Abb.22). Auch Bayat et al. verzeichneten in ihrem Versuch mit männlichen Mäusen eine ausgesprochen hohe Mortalität. Hier überlebten nur 28% der Tiere zwei Wochen nach Infarkt.¹¹¹ Andere Studien zeigten eine geringere Mortalität bei den Weibchen (10%) im Vergleich zu den Männchen (30%) eine Woche post-MI.⁷⁸ Auch Gao et al. verzeichneten eine Woche nach Infarkt eine höhere Mortalität bei den Männchen mit 49% als bei den Weibchen

mit 22%.¹¹⁴ Das zeigt, dass weibliche Tiere in der Lage sind, einen MI besser zu kompensieren als männliche.

Interessanterweise konnten Cavasin et al. bei Testosteron-behandelten Weibchen eine signifikant höhere Mortalität innerhalb der ersten Woche nach MI feststellen im Vergleich zu ovariectomierten Weibchen und auch bei nicht-kastrierten Männchen war die Mortalität größer als bei kastrierten.^{79, 115} Dabei behaupten die Autoren, dass Testosteron (endogen oder supplementiert) eine exzessive Entzündung nach MI durch Neutrophilen-Infiltration und eine signifikante, myokardiale Expansion infolge erhöhter EZM-Degradation begünstige. Dies verzögert und/oder schwächt die Myokardheilung, verursacht eine signifikante Erhöhung der Rupturgefahr und mindert die Herzfunktion in Mäusen nach MI. Östrogen schien hier keinen signifikant protektiven Effekt in der akuten Phase post-MI in Bezug auf Herzruptur, IEI und Neutrophilen-Infiltration zu erzielen.¹¹⁵ Der Geschlechterunterschied im Überleben nach MI basiert dementsprechend auf den protektiven Eigenschaften von Östrogen bzw. auf die negativen Eigenschaften von Testosteron.

In humanmedizinische Studien weichen die Aussagen über die Überlebensrate beider Geschlechter nach MI voneinander ab. Einige Autoren behaupten eine bessere Überlebensrate post-MI bei Frauen im Vergleich zu Männern,^{116, 117} andere berichten über eine höhere Mortalität infolge schwerwiegender Infarkte.¹¹⁸ Studien an postmenopausalen Frauen zeigten eine verbesserte Morbidität und Mortalität unter Östrogensupplementierung.^{119, 120}

Die Mortalität war in der vorliegenden Arbeit außergewöhnlich hoch. Eine erhöhte Rupturrate konnte dabei durch die pathologisch makroskopische Untersuchung ausgeschlossen werden. Der Tod infolge eines Volumenmangels aufgrund von Blutungen kam durch eine Volumensubstitution peri sowie 24, 48 und 72h post-MI ebenso wenig in Frage. Die Ursachen lagen vermutlich vielmehr in einem Herzversagen infolge von Arrhythmien oder einer akuten HI als Folge eines geringen Herzminutenvolumens mit Rückstau in die Lunge. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass während der Operation iatrogen Keime in die Wunde hineingetragen wurden, die eine septikämische Entzündungsreaktion hervorgerufen haben.

4.2.3 Geschlechterunterschiede in der Infarktgröße

Die mittlere Infarktgröße war bei beiden Geschlechtern ähnlich und betrug ca. 40% zwei Wochen post-MI (Tab.18). Die gleiche mittlere Infarktgröße verzeichneten auch Cavasin et al. in einem Versuch mit männlichen und weiblichen Mäusen 1, 2, 4, 7 und 14d post-MI.⁷⁸

Ebenfalls eine etwa 40%ige Infarktgröße des LV zeigten Eberli et al. bei einem anderen Mausstamm (CD-1, Auszuchtstamm) zwei Wochen post-MI.¹¹² Und auch Ahn et al. beschrieben, dass ein MI bei Mäusen normalerweise in großen Infarkten (44,5%) mit Einbeziehung der anterioren bis posterioren Wand und immer der Herzspitze resultierte.¹⁰⁸ In jedem Fall gehen die Umbauprozesse des LV mit der Infarktgröße einher,¹¹¹ deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit die LV mit einer Infarktgröße <25% von weiteren Untersuchungen ausgeschlossen. In einem weiteren Versuch von Cavasin et al. mit/ohne Hormonsupplementierung und/oder Kastration/Ovariectomie betrug die Infarktgröße in allen Gruppen 30-40% zu jedem Zeitpunkt (1, 2, 4, 7 und 14d post-MI).¹¹⁵ Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, die mit denen der Literatur weitgehend übereinstimmen, ist anzunehmen, dass das Geschlecht keinen Einfluss auf die Infarktgröße hat. Lediglich ein Versuch mit ovariectomierten Mäusen, die entweder mit 17 β -Östradiol oder Placebo behandelt wurden, sprach dafür, dass sich die Infarktgröße nach Östradiolzufuhr um 15% reduzierte.¹²¹

4.2.4 Geschlechterunterschiede in der Entwicklung einer pathologischen Hypertrophie und deren Einfluss auf die kardiale Funktion

Nach MI entwickelten die Weibchen eine größere Hypertrophie im Vergleich zu den Männchen. Das zeigte die Erhöhung des LVGs bei den MI-W um 66% und bei den MI-M um 35% (Abb.26). Auch Cavasin et al. stellten in ihrer Untersuchung bei beiden Geschlechtern zwölf Wochen post-MI höhere HW/BW und LV/BW fest.⁷⁸ Eberli et al. verzeichneten zwei Wochen post-MI bei CD1-Mäusen eine kompensatorische Hypertrophie des nichtinfarzierten Myokards anhand des erhöhten HGs.¹¹² Ein Versuch an männlichen Mäusen zeigte, dass bei einer Infarktgröße von mehr als 30% das HG, HG/TL, LVG/TL erhöht waren. Bei einer Infarktgröße von weniger als 30% blieb dieser Unterschied jedoch aus.¹¹¹

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich des LVG stimmten nicht mit denen der LV-Masse überein. Bei den MI-M erhöhte sich die LV-Masse um 48% und bei den MI-W um 39% (Abb.25). Die Berechnung der LV-Masse über den M-Mode der kurzen Achse des LV ist insofern eingeschränkt, als dass die zur Berechnung erforderlichen Wanddicken nur auf einer Ebene, nämlich auf der der Papillarmuskeln, bestimmt werden. Da der LV post-MI jedoch unterschiedliche Wanddicken aufweist, zum einen durch die ausgedehnte Infarktnarbe und zum anderen durch die hypertrophierte Wand, ist eine Berechnung der LV-Masse im Längsschnitt, über die 3-D-Echokardiographie oder über die Magnetresonanztomographie

sensitiver.¹²²

Kumar et al. erzielten eine 70%ige Zunahme der LV-Masse zwei Wochen post-MI. In ihrer Studie wurden männliche und weibliche Mäuse untersucht, jedoch nicht geschlechterabhängig.¹⁰⁵ Bayat et al. bestätigten ihre Ergebnisse aus der Untersuchung zum LVG durch eine Zunahme der LV-Masse bei einer Infarktgröße von mehr als 30%.¹¹¹ Kanno et al. wiesen auf eine steigende LV-Masse mit zunehmender Infarktgröße hin.¹¹⁰

Die Herzfunktion verschlechterte sich nur bei den Männchen 11d post-MI. Die FAC war um 59%, die EF um 56% (Abb.23) und das HMV um 39% niedriger als die der Kontrollgruppe. Ein Versuch von Bayat et al. an männlichen Mäusen zeigte ebenso, dass bei einer Infarktgröße von mehr als 30% die FAC bei den MI-M geringer war im Vergleich zu den Sham-M.¹¹¹ Ahn et al. erzeugten durch MI bei männlichen Mäusen einen Abfall der EF von mehr als 70%.¹⁰⁸ Mit zunehmender Infarktgröße nimmt die EF ab.^{110, 123} Ein sinkendes Herzminutenvolumen nach MI konnte ebenfalls festgestellt werden.¹²³ Allerdings scheint es in der chronischen Phase post-MI eine schlechtere LV-Funktion bei beiden Geschlechtern zu geben, wobei diese bei den Männchen ausgeprägter ist als bei den Weibchen.⁷⁸ Das Absinken der EF zur Aufrechterhaltung des SV nach MI ist Folge der kompensatorischen Effekte des Frank-Starling-Mechanismus und der Entwicklung einer Hypertrophie des nichtinfarzierten Myokards zur Aufrechterhaltung der Herzfunktion infolge abnormer Wandbewegungen.

In Bezug auf die schlechtere Herzfunktion bei den Männchen nach MI fanden Cavasin et al. in ihrem Versuch mit Fokus auf die Geschlechtshormone heraus, dass Testosteron durch seine nachteiligen Effekte auf die Myokardheilung und das frühe Remodeling während der akuten Phase post-MI (zwei Wochen) eine Verschlechterung der Herzfunktion bewirkt.¹¹⁵ In Bezug auf Östrogen wiesen sie erst in der chronischen Phase post-MI (>2 Wochen) einen protektiven Schutz auf die Herzfunktion und das kardiale Remodeling nach.⁷⁹ Dementsprechend erzielten Iwakura et al. in einem Versuch mit Östradiol-behandelten Mäusen eine ab der dritten Woche post-MI sichtbar verbesserte LV-Funktion im Vergleich zu den mit Placebo-behandelten Kontrolltieren.³⁸

Die in der vorliegenden Arbeit größere Entwicklung einer Hypertrophie bei den Weibchen im Vergleich zu den Männchen trotz gleicher Infarktgrößen vermag während der akuten Phase post-MI, den Wandstress besser zu kompensieren und dadurch die Herzfunktion aufrechtzuerhalten. Diese Befunde weisen ebenfalls auf eine protektive Rolle von Östrogen wie auch eine negative Rolle von Testosteron in der geschlechtsspezifischen Reaktion des

Myokards auf einen Infarkt hin.

4.2.5 Geschlechterunterschiede in der relativen Genexpression ausgewählter Hypertrophiemarker

Die signifikant erhöhten mRNA-Expressionen für ANP, BNP, α -skA und β -MHC (Abb.27) bei den MI-Gruppen sind charakteristisch für pathologisch hypertrophierte Herzen.^{68, 69}

Die verringerte Expression der adulten Isoform α -MHC (Abb. 27b) geht entsprechend mit dem Wechsel zum fetalen Genprogramm und dem Verlust von Kardiomyozyten in der akuten Infarktphase einher.

Signifikante Geschlechterunterschiede konnten bei den Hypertrophiemarkern nicht festgestellt werden. Vermutet wurde eine höhere Expression bei den Männchen, da diese eine signifikant höhere Myozytenquerschnittsfläche zeigen als die Weibchen,⁹⁶ jedoch scheint der Stimulus des MI stärker zu sein als der Einfluss des Geschlechts.

4.2.6 Geschlechterunterschiede in der Kapillarisation

Bei beiden MI-Gruppen war die Kapillardichte pro Flächeneinheit in der Hypertrophiezone signifikant geringer im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrollgruppen (Abb.30). Bei den MI-M nahm die Kapillardichte um 26% und bei den MI-W sogar um 41% ab. Von einer solchen inadäquaten Adaptation der Kapillaren post-MI berichten auch Anversa et al. in ihren Versuchen mit männlichen Ratten.⁶⁴ Größere Infarkte bewirkten einen stärkeren Abfall der Kapillardichte als kleinere.⁶⁵ Weiterhin stellten die Autoren fest, dass sich der Myozytendurchmesser vergrößerte, Myozytendichte, Kapillardichte, Kapillarlumen sowie Kapillarlumen/Myozyt verringerten und demzufolge die Diffusionsstrecke für Sauerstoff anstieg.¹²⁴ Diese Verschiebung der Energiebalance führt zu einer Veränderung des Kardiomyozyten-Phänotyps und einen Wechsel zum fetalen Programm.⁵⁹ Auch Karam et al. sprechen von einer Zunahme der Myozytenquerschnittsfläche von durchschnittlich 30% im überlebenden Myokard.¹²⁵ Kalkman et al. berichten über einen Anstieg der Kapazität des Kapillarbetts der nichtinfarzierten Region durch Vasodilatation.¹²⁶ Die bei beiden Geschlechtern post-MI herabgesetzte Kapillardichte ist das Ergebnis der Hypertrophie der Myozyten und damit einer Verdrängung der Kapillaren pro Flächeneinheit durch die Volumenzunahme der Myozyten.⁷⁹ Außerdem findet post-MI eine deutliche Vermehrung von interstitiellem Kollagen statt, welches ein Auseinanderweichen der Kapillaren zusätzlich nach

sich zieht.⁷⁹ Die vermutete, bessere Kapillarisation bei den MI-W im Vergleich zu den MI-M trat zwei Wochen post-MI nicht ein. Dabei zeigten ovariectomierte und E2-behandelte Mäuse in der chronischen Phase post-MI (vier Wochen) eine höhere Kapillardichte im Vergleich zu Placebo-behandelten.³⁸

In der Borderzone zeigten die MI-W eine signifikante, um ein Drittel geringere Kapillardichte als die MI-M (Abb.31). Als Ursache käme eine größere Hypertrophie der Myozyten bei den Weibchen infrage. Es wurde jedoch gezeigt, dass die MCSA post-MI bei Männchen signifikant höher war im Vergleich zu den Weibchen und das traf auch tendenziell für den Kollagengehalt zu.⁷⁹

Ein signifikanter Geschlechterunterschied fand sich innerhalb der scheinoperierten Kontrollgruppen. Hier war die Kapillardichte der Weibchen signifikant höher als die der Männchen (Abb.30). Dieser Effekt war tendenziell auch in den Sed.-Gruppen zu beobachten. Verschiedene experimentelle Studien haben gezeigt, dass Östrogen und Progesteron die Angiogenese durch Effekte auf die Endothelzellen modulieren. E2 induziert eine Endothelzellproliferation und -migration³⁴ vermittelt durch den klassischen Östrogenrezeptor, der von Endothelzellen exprimiert wird.³⁵⁻³⁷

4.3 WEITERFÜHRENDE UNTERSUCHUNGEN

Bislang wurden Untersuchungen mit Ausdauersport nach MI an Ratten^{127, 128} und Mäusen¹¹¹ unternommen. Zur Erweiterung der vorliegenden Arbeit wären jedoch Untersuchungen von MI nach vorangegangenem Training interessant. So haben Brown et al. in ihrem Versuch mit männlichen und weiblichen Ratten und anschließendem I/R(Ischämie-Reperfusionen)-Modell gezeigt, dass bereits Kurzzeittraining die Infarktgröße bei beiden Geschlechtern senkt.¹²⁹

5. ZUSAMMENFASSUNG

Prämenopausale Frauen erleiden gegenüber gleichaltrigen Männern seltener einen Herzinfarkt und versterben weniger häufig an seinen Folgen. Dabei weisen klinische Studien auf einen protektiven Einfluss des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen bei der Entwicklung der pathologischen Hypertrophie hin. Darüber hinaus ist bekannt, dass sich Ausdauersport auf eine Vielzahl kardiovaskulärer Krankheiten positiv auswirkt und diese protektiven Eigenschaften dem weiblichen Geschlecht mehr zugute kommen als dem männlichen.

Um die beobachteten Geschlechterunterschiede und deren zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen, wurden in der vorliegenden Arbeit bei weiblichen und männlichen Mäusen mittels freiwilligem Laufradtraining (LRT) eine physiologische Hypertrophie und mittels Myokardinfarkt (MI) eine pathologische Hypertrophie induziert. Die morphologischen und funktionellen Veränderungen des linken Ventrikels (LV) wurden mit Hilfe der Echokardiographie beurteilt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob LRT bei den Weibchen zu einer höheren Kapillardichte führt als bei den Männchen und ob die Kapillardichte post-MI bei den Weibchen besser erhalten bleibt im Vergleich zu den Männchen. Darüber hinaus sollte analysiert werden, ob LRT und MI zu einer geschlechterabhängigen Erhöhung der Expression von Hypertrophie markern führen.

Gezeigt werden konnte, dass die weiblichen Mäuse im physiologischen Hypertrophie modell eine signifikant höhere Trainingsleistung erzielten und eine stärkere Hypertrophie entwickelten als die männlichen Mäuse. Die LV-Funktion blieb bei den Weibchen unverändert, dagegen zeigten die Männchen eine signifikant verringerte Ejektionsfraktion (EF), was für eine stärkere Belastung des LV durch Ausdauertraining bei den Männchen spricht. LRT führte zu keiner erhöhten Expression der pathologischen Hypertrophie marker, sondern zu einer signifikant geringeren Expression von ANP und β -MHC in den LV der Weibchen. Die Kapillardichte blieb bei beiden Geschlechtern gleich.

Im pathologischen Hypertrophie modell war die Mortalität post-MI bei den Männchen höher als bei den Weibchen. Die Weibchen entwickelten, trotz gleicher Infarktgröße, eine größere Hypertrophie im Vergleich zu den Männchen und konnten die LV-Funktion aufrechterhalten. Bei den Männchen hingegen zeigte sich eine deutliche Verschlechterung der LV-Funktion durch signifikant geringere fraktionelle Flächenänderungen, EFs und Herzminutenvolumina. Die Expressionen von ANP, BNP, α -skeletal Aktin und β -MHC waren bei beiden

Geschlechtern signifikant erhöht und kennzeichnen damit das Vorliegen einer pathologischen Hypertrophie. Bei beiden Geschlechtern nahm die Kapillardichte ab.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass weibliche Mäuse verstärkt die physiologische Form der LV-Hypertrophie entwickelten und kardialen Stress besser kompensierten als männliche Tiere. Durch die Induktion eines MI wurde bei beiden Geschlechtern die Kapillardichte im überlebenden Myokard reduziert, wobei nur die männlichen Tiere einen Funktionsverlust erlitten. Die zugrunde liegenden Mechanismen müssen in weiterführenden Studien detailliert untersucht werden.

6. SUMMARY

“Sex differences in physiological and pathological myocardial hypertrophy in mice”

Premenopausal women appear to have a lower incidence of myocardial infarction (MI) and reduced mortality compared with age-matched men. Clinical studies suggest a protective effect of the female sex hormone Estradiol during the development of pathological hypertrophy. Furthermore it is known that exercise positively influences the outcome of cardiovascular disease, which is more pronounced in females than males.

To better understand the shown sex differences and underlying mechanisms, this study analysed the development of physiological and pathological hypertrophy in male and female mice, induced by voluntary cage wheel running (VCWR) and myocardial infarction (MI). Morphological and functional changes of the left ventricle (LV) were estimate using echocardiography. We attempted to determine whether VCWR increases capillary density more in females than in males and whether capillary density post-MI remains higher in females compared to males. Furthermore, we obtained whether VCWR and MI led to an increase in the expression of hypertrophy markers in a sex-dependent manner.

VCWR showed a significantly higher running performance and more pronounced hypertrophy in female mice compared to male mice. LV function was unchanged in females, but significantly decreased Ejection Fraction (EF) in males. Gene expression of pathological hypertrophy markers was not increased, but females showed a decreased expression of ANP and β -MHC. Capillary density did not change in both sexes.

MI induced a higher mortality in males compared to female mice. Despite the same infarct size females developed more hypertrophy and were able to sustain LV function. In contrast males had a poorer LV function, because of significantly decreased Fractional Area Change, EF and Cardiac Output. In both sexes ANP, BNP, α -skeletal Actin and β -MHC gene expression was significantly increased, indicating the development of pathological hypertrophy. Capillary density was decreased in both sexes.

In conclusion, female mice developed a more pronounced physiological hypertrophy after VCWR and were able to compensate wall stress in a better way compared to male mice. After MI capillary density was reduced in both sexes, but only males sustained poorer LV function. To better understand the underlying mechanisms, further studies have to be carried out.

LITERATURVERZEICHNIS

1. Leinwand LA. Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J Clin Invest.* Aug 2003;112(3):302-307.
2. Manson JE, Hu FB, Rich-Edwards JW, et al. A prospective study of walking as compared with vigorous exercise in the prevention of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* Aug 26 1999;341(9):650-658.
3. Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, et al. Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study. *Lancet.* Sep 11-17 2004;364(9438):937-952.
4. Wakatsuki T, Schlessinger J, Elson EL. The biochemical response of the heart to hypertension and exercise. *Trends Biochem Sci.* Nov 2004;29(11):609-617.
5. Carabello BA. Ten frequently asked questions about cardiac hypertrophy. *Cardiol Rev.* Sep-Oct 2003;11(5):249-251.
6. Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation.* Jul 25 2000;102(4):470-479.
7. Schluter KD, Wollert KC. Synchronization and integration of multiple hypertrophic pathways in the heart. *Cardiovasc Res.* Aug 15 2004;63(3):367-372.
8. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., et al. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation.* Nov 1 1995;92(9):2385-2390.
9. Ross RS. Molecular and mechanical synergy: cross-talk between integrins and growth factor receptors. *Cardiovasc Res.* Aug 15 2004;63(3):381-390.
10. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:45-79.
11. Hanford DS, Thuerauf DJ, Murray SF, et al. Brain natriuretic peptide is induced by alpha 1-adrenergic agonists as a primary response gene in cultured rat cardiac myocytes. *J Biol Chem.* Oct 21 1994;269(42):26227-26233.
12. Drexler H, Hanze J, Finckh M, et al. Atrial natriuretic peptide in a rat model of cardiac failure. Atrial and ventricular mRNA, atrial content, plasma levels, and effect of volume loading. *Circulation.* Mar 1989;79(3):620-633.
13. Franch HA, Dixon RA, Blaine EH, et al. Ventricular atrial natriuretic factor in the cardiomyopathic hamster model of congestive heart failure. *Circ Res.* Jan 1988;62(1):31-36.
14. Mukoyama M, Nakao K, Hosoda K, et al. Brain natriuretic peptide as a novel cardiac hormone in humans. Evidence for an exquisite dual natriuretic peptide system, atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide. *J Clin Invest.* Apr 1991;87(4):1402-1412.
15. Su X, Brower G, Janicki JS, et al. Differential expression of natriuretic peptides and their receptors in volume overload cardiac hypertrophy in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* Oct 1999;31(10):1927-1936.
16. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F, et al. Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes. *Hypertension.* Jan 2000;35(1 Pt 1):19-24.
17. Rosenkranz AC, Woods RL, Dusting GJ, et al. Antihypertrophic actions of the natriuretic peptides in adult rat cardiomyocytes: importance of cyclic GMP. *Cardiovasc Res.* Feb 2003;57(2):515-522.

18. Silberbach M, Gorenc T, Hershberger RE, et al. Extracellular signal-regulated protein kinase activation is required for the anti-hypertrophic effect of atrial natriuretic factor in neonatal rat ventricular myocytes. *J Biol Chem.* Aug 27 1999;274(35):24858-24864.
19. Holtwick R, van Eickels M, Skryabin BV, et al. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A. *J Clin Invest.* May 2003;111(9):1399-1407.
20. Molkentin JD. A friend within the heart: natriuretic peptide receptor signaling. *J Clin Invest.* May 2003;111(9):1275-1277.
21. Cao L, Gardner DG. Natriuretic peptides inhibit DNA synthesis in cardiac fibroblasts. *Hypertension.* Feb 1995;25(2):227-234.
22. Redondo J, Bishop JE, Wilkins MR. Effect of atrial natriuretic peptide and cyclic GMP phosphodiesterase inhibition on collagen synthesis by adult cardiac fibroblasts. *Br J Pharmacol.* Aug 1998;124(7):1455-1462.
23. Burnett JC, Jr., Olson TM. Natriuretic peptides and myocardial structure: insights from population genetics. *Hypertension.* Apr 2007;49(4):765-766.
24. London B. Natriuretic peptides and cardiac hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* Aug 1 2006;48(3):506-507.
25. de Bold AJ. Atrial natriuretic factor: a hormone produced by the heart. *Science.* Nov 15 1985;230(4727):767-770.
26. Rosenzweig A, Seidman CE. Atrial natriuretic factor and related peptide hormones. *Annu Rev Biochem.* 1991;60:229-255.
27. Ito T, Yoshimura M, Nakamura S, et al. Inhibitory effect of natriuretic peptides on aldosterone synthase gene expression in cultured neonatal rat cardiocytes. *Circulation.* Feb 18 2003;107(6):807-810.
28. Razeghi P, Essop MF, Huss JM, et al. Hypoxia-induced switches of myosin heavy chain isogene expression in rat heart. *Biochem Biophys Res Commun.* Apr 18 2003;303(4):1024-1027.
29. Schoenfeld JR, Vasser M, Jhurani P, et al. Distinct molecular phenotypes in murine cardiac muscle development, growth, and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol.* Nov 1998;30(11):2269-2280.
30. Mercadier JJ, Bouveret P, Gorza L, et al. Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human ventricular myocardium. *Circ Res.* Jul 1983;53(1):52-62.
31. Clement S, Chaponnier C, Gabbiani G. A subpopulation of cardiomyocytes expressing alpha-skeletal actin is identified by a specific polyclonal antibody. *Circ Res.* Nov 12 1999;85(10):e51-58.
32. Depre C, Young ME, Ying J, et al. Streptozotocin-induced changes in cardiac gene expression in the absence of severe contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol.* Jun 2000;32(6):985-996.
33. Young ME, Laws FA, Goodwin GW, et al. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J Biol Chem.* Nov 30 2001;276(48):44390-44395.
34. Morales DE, McGowan KA, Grant DS, et al. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells in vitro and in a murine model. *Circulation.* Feb 1 1995;91(3):755-763.
35. Johns A, Freay AD, Fraser W, et al. Disruption of estrogen receptor gene prevents 17 beta estradiol-induced angiogenesis in transgenic mice. *Endocrinology.* Oct 1996;137(10):4511-4513.

36. Kim-Schulze S, McGowan KA, Hubchak SC, et al. Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation*. Sep 15 1996;94(6):1402-1407.
37. Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation*. Aug 15 1996;94(4):727-733.
38. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, et al. Estradiol enhances recovery after myocardial infarction by augmenting incorporation of bone marrow-derived endothelial progenitor cells into sites of ischemia-induced neovascularization via endothelial nitric oxide synthase-mediated activation of matrix metalloproteinase-9. *Circulation*. Mar 28 2006;113(12):1605-1614.
39. Carmeliet P, Ng YS, Nuyens D, et al. Impaired myocardial angiogenesis and ischemic cardiomyopathy in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Nat Med*. May 1999;5(5):495-502.
40. Dickhuth HH, Rocker K, Mayer F, et al. [Endurance training and cardiac adaptation (athlete's heart)]. *Herz*. Jun 2004;29(4):373-380.
41. Pelliccia A, Maron BJ, De Luca R, et al. Remodeling of left ventricular hypertrophy in elite athletes after long-term deconditioning. *Circulation*. Feb 26 2002;105(8):944-949.
42. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. Jan 1999;79(1):215-262.
43. Weber KT, Brilla CG. Structural basis for pathologic left ventricular hypertrophy. *Clin Cardiol*. May 1993;16(5 Suppl 2):II10-14.
44. Frey N, Katus HA, Olson EN, et al. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. Apr 6 2004;109(13):1580-1589.
45. Shephard RJ, Balady GJ. Exercise as cardiovascular therapy. *Circulation*. Feb 23 1999;99(7):963-972.
46. Fenning A, Harrison G, Dwyer D, et al. Cardiac adaptation to endurance exercise in rats. *Mol Cell Biochem*. Sep 2003;251(1-2):51-59.
47. Dickhuth H-H, Hipp A, Niess A, et al. Differenzialdiagnostik der physiologischen Herzhypertrophie (Sportherz). *DEUTSCHE ZEITSCHRIFT FÜR SPORTMEDIZIN*. 2001;52(6):205-210.
48. Evangelista FS, Brum PC, Krieger JE. Duration-controlled swimming exercise training induces cardiac hypertrophy in mice. *Braz J Med Biol Res*. Dec 2003;36(12):1751-1759.
49. Engelhardt S, Merkle S. Physiologisches und pathologisches Myokardwachstum? *Schlaglicht BIOSpektrum*. 2006;12(2):165-167.
50. Allen DL, Harrison BC, Maass A, et al. Cardiac and skeletal muscle adaptations to voluntary wheel running in the mouse. *J Appl Physiol*. May 2001;90(5):1900-1908.
51. Konhilas JP, Widegren U, Allen DL, et al. Loaded wheel running and muscle adaptation in the mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. Jul 2005;289(1):H455-465.
52. Iemitsu M, Miyauchi T, Maeda S, et al. Physiological and pathological cardiac hypertrophy induce different molecular phenotypes in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. Dec 2001;281(6):R2029-2036.
53. Scheuer J. Effects of physical training on myocardial vascularity and perfusion. *Circulation*. Sep 1982;66(3):491-495.
54. Anversa P, Ricci R, Olivetti G. Effects of exercise on the capillary vasculature of the rat heart. *Circulation*. Jan 1987;75(1 Pt 2):I12-18.

55. Anversa P, Levicky V, Beghi C, et al. Morphometry of exercise-induced right ventricular hypertrophy in the rat. *Circ Res*. Jan 1983;52(1):57-64.
56. Leon AS, Bloor CM. The effect of complete and partial deconditioning on exercise-induced cardiovascular changes in the rat. *Adv Cardiol*. 1976;18(0):81-92.
57. Gigante B, Tarsitano M, Cimini V, et al. Placenta growth factor is not required for exercise-induced angiogenesis. *Angiogenesis*. 2004;7(3):277-284.
58. Jugdutt BI. Ventricular remodeling after infarction and the extracellular collagen matrix: when is enough enough? *Circulation*. Sep 16 2003;108(11):1395-1403.
59. Cleutjens JP, Blankesteyn WM, Daemen MJ, et al. The infarcted myocardium: simply dead tissue, or a lively target for therapeutic interventions. *Cardiovasc Res*. Nov 1999;44(2):232-241.
60. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation*. Apr 1990;81(4):1161-1172.
61. BRAUNWALD E, D. P. ZIPES, P. LIBBY *Heart Disease: A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Vol Bd. 2: W.B. Saunders HVMpany, Philadelphia, London, ; 2001.
62. Cohn JN, Ferrari R, Sharpe N. Cardiac remodeling--concepts and clinical implications: a consensus paper from an international forum on cardiac remodeling. Behalf of an International Forum on Cardiac Remodeling. *J Am Coll Cardiol*. Mar 1 2000;35(3):569-582.
63. Anversa P, Loud AV, Levicky V, et al. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. I. Myocyte hypertrophy. *Am J Physiol*. Jun 1985;248(6 Pt 2):H876-882.
64. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, et al. Myocardial infarction in rats. Infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. *Circ Res*. Jan 1986;58(1):26-37.
65. Anversa P, Capasso JM, Sonnenblick EH, et al. Mechanisms of myocyte and capillary growth in the infarcted heart. *Eur Heart J*. Apr 1990;11 Suppl B:123-132.
66. Anversa P, Olivetti G, Li P, et al. Myocardial infarction, cardiac anatomy and ventricular loading. *Cardioscience*. Jun 1993;4(2):55-62.
67. Sabbah HN, Sharov VG, Lesch M, et al. Progression of heart failure: a role for interstitial fibrosis. *Mol Cell Biochem*. Jun 7-21 1995;147(1-2):29-34.
68. Mercadier JJ, Lompre AM, Wisnewsky C, et al. Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res*. Aug 1981;49(2):525-532.
69. Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Molecular basis of cardiac performance. Plasticity of the myocardium generated through protein isoform switches. *J Clin Invest*. Dec 1989;84(6):1693-1700.
70. Cameron VA, Ellmers LJ. Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology*. Jun 2003;144(6):2191-2194.
71. Takahashi T, Allen PD, Izumo S. Expression of A-, B-, and C-type natriuretic peptide genes in failing and developing human ventricles. Correlation with expression of the Ca(2+)-ATPase gene. *Circ Res*. Jul 1992;71(1):9-17.
72. Lompre AM, Schwartz K, d'Albis A, et al. Myosin isoenzyme redistribution in chronic heart overload. *Nature*. Nov 1 1979;282(5734):105-107.
73. Luchner A, Brockel U, Muscholl M, et al. Gender-specific differences of cardiac remodeling in subjects with left ventricular dysfunction: a population-based study. *Cardiovasc Res*. Feb 15 2002;53(3):720-727.
74. Kuizinga MC, Smits JF, Arends JW, et al. AT2 receptor blockade reduces cardiac interstitial cell DNA synthesis and cardiac function after rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. Feb 1998;30(2):425-434.

75. Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, et al. Myocardial response to infarction in the rat. Morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. *Am J Pathol.* Mar 1985;118(3):484-492.
76. Breisch EA, White FC, Bloor CM. Myocardial characteristics of pressure overload hypertrophy. A structural and functional study. *Lab Invest.* Sep 1984;51(3):333-342.
77. ERDMANN E. *Klinische Kardiologie.* Vol 6. Aufl.; 2006.
78. Cavasin MA, Tao Z, Menon S, et al. Gender differences in cardiac function during early remodeling after acute myocardial infarction in mice. *Life Sci.* Sep 17 2004;75(18):2181-2192.
79. Cavasin MA, Sankey SS, Yu AL, et al. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* May 2003;284(5):H1560-1569.
80. Dietrich WF, Miller J, Steen R, et al. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature.* Mar 14 1996;380(6570):149-152.
81. Lightfoot JT, Turner MJ, Daves M, et al. Genetic influence on daily wheel running activity level. *Physiol Genomics.* Nov 17 2004;19(3):270-276.
82. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* Apr-Jun 2006;27(2-3):126-139.
83. Olivetti G, Lagrasta C, Quaini F, et al. Capillary growth in anemia-induced ventricular wall remodeling in the rat heart. *Circ Res.* Nov 1989;65(5):1182-1192.
84. Noble EG, Moraska A, Mazzeo RS, et al. Differential expression of stress proteins in rat myocardium after free wheel or treadmill run training. *J Appl Physiol.* May 1999;86(5):1696-1701.
85. Ferry A, Weill BL, Rieu M. Immunomodulations induced in rats by exercise on a treadmill. *J Appl Physiol.* Nov 1990;69(5):1912-1915.
86. Moraska A, Deak T, Spencer RL, et al. Treadmill running produces both positive and negative physiological adaptations in Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Oct 2000;279(4):R1321-1329.
87. Tharp GD, Preuss TL. Mitogenic response of T-lymphocytes to exercise training and stress. *J Appl Physiol.* Jun 1991;70(6):2535-2538.
88. Lerman I, Harrison BC, Freeman K, et al. Genetic variability in forced and voluntary endurance exercise performance in seven inbred mouse strains. *J Appl Physiol.* Jun 2002;92(6):2245-2255.
89. Konhilas JP, Maass AH, Luckey SW, et al. Sex modifies exercise and cardiac adaptation in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Dec 2004;287(6):H2768-2776.
90. Koteja P, Swallow JG, Carter PA, et al. Energy cost of wheel running in house mice: implications for coadaptation of locomotion and energy budgets. *Physiol Biochem Zool.* Mar-Apr 1999;72(2):238-249.
91. De Bono JP, Adlam D, Paterson DJ, et al. Novel quantitative phenotypes of exercise training in mouse models. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* Apr 2006;290(4):R926-934.
92. Kadi F, Karlsson C, Larsson B, et al. The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. *J Muscle Res Cell Motil.* 2002;23(4):335-339.
93. Anantharaman-Barr HG, Decombaz J. The effect of wheel running and the estrous cycle on energy expenditure in female rats. *Physiol Behav.* Aug 1989;46(2):259-263.
94. Kemi OJ, Loennechen JP, Wisloff U, et al. Intensity-controlled treadmill running in mice: cardiac and skeletal muscle hypertrophy. *J Appl Physiol.* Oct 2002;93(4):1301-1309.

-
95. Nguyen L, Chung J, Lam L, et al. Abnormal cardiac response to exercise in a murine model of familial hypertrophic cardiomyopathy. *Int J Cardiol.* Jul 10 2007;119(2):245-248.
 96. Ehrenberg N. *Geschlechterunterschiede beim kardialen Remodeling der extrazellulären Matrix durch Lauftraining und Myokardinfarkt im Mausmodell* [Dissertation]; 2008.
 97. Pluim BM, Zwinderman AH, van der Laarse A, et al. The athlete's heart. A meta-analysis of cardiac structure and function. *Circulation.* Jan 25 2000;101(3):336-344.
 98. Tanaka N, Dalton N, Mao L, et al. Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation.* Sep 1 1996;94(5):1109-1117.
 99. Kaplan ML, Cheslow Y, Vikstrom K, et al. Cardiac adaptations to chronic exercise in mice. *Am J Physiol.* Sep 1994;267(3 Pt 2):H1167-1173.
 100. Gao M. [Arterialization of the capillary network in the left ventricular subendocardium in young rats subjected to exercise training]. *Hokkaido Igaku Zasshi.* Mar 1997;72(2):225-234.
 101. Jacobs TB, Bell RD, McClements JD. Exercise, age and the development of the myocardial vasculature. *Growth.* Summer 1984;48(2):148-157.
 102. Kayar SR, Conley KE, Claassen H, et al. Capillarity and mitochondrial distribution in rat myocardium following exercise training. *J Exp Biol.* Jan 1986;120:189-199.
 103. Gu JW, Shparago M, Tan W, et al. Tissue endostatin correlates inversely with capillary network in rat heart and skeletal muscles. *Angiogenesis.* 2006;9(2):93-99.
 104. Frenzel H, Schwartzkopff B, Holtermann W, et al. Regression of cardiac hypertrophy: morphometric and biochemical studies in rat heart after swimming training. *J Mol Cell Cardiol.* Aug 1988;20(8):737-751.
 105. Kumar D, Hacker TA, Buck J, et al. Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis.* Feb 2005;16(1):41-44.
 106. Icardo JM, Colvee E. Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice. *J Anat.* Oct 2001;199(Pt 4):473-482.
 107. Salto-Tellez M, Yung Lim S, El-Oakley RM, et al. Myocardial infarction in the C57BL/6J mouse: a quantifiable and highly reproducible experimental model. *Cardiovasc Pathol.* Mar-Apr 2004;13(2):91-97.
 108. Ahn D, Cheng L, Moon C, et al. Induction of myocardial infarcts of a predictable size and location by branch pattern probability-assisted coronary ligation in C57BL/6 mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Mar 2004;286(3):H1201-1207.
 109. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol.* Dec 1995;269(6 Pt 2):H2147-2154.
 110. Kanno S, Lerner DL, Schuessler RB, et al. Echocardiographic evaluation of ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr.* Jun 2002;15(6):601-609.
 111. Bayat H, Swaney JS, Ander AN, et al. Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res Cardiol.* May 2002;97(3):206-213.
 112. Eberli FR, Sam F, Ngoy S, et al. Left-ventricular structural and functional remodeling in the mouse after myocardial infarction: assessment with the isovolumetrically-contracting Langendorff heart. *J Mol Cell Cardiol.* Jul 1998;30(7):1443-1447.
 113. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, et al. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics.* Feb 13 2004;16(3):349-360.

114. Gao XM, Xu Q, Kiriazis H, et al. Mouse model of post-infarct ventricular rupture: time course, strain- and gender-dependency, tensile strength, and histopathology. *Cardiovasc Res.* Feb 1 2005;65(2):469-477.
115. Cavasin MA, Tao ZY, Yu AL, et al. Testosterone enhances early cardiac remodeling after myocardial infarction, causing rupture and degrading cardiac function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* May 2006;290(5):H2043-2050.
116. Brett KM, Madans JH. Long-term survival after coronary heart disease. Comparisons between men and women in a national sample. *Ann Epidemiol.* Jan 1995;5(1):25-32.
117. Heer T, Schiele R, Schneider S, et al. Gender differences in acute myocardial infarction in the era of reperfusion (the MITRA registry). *Am J Cardiol.* Mar 1 2002;89(5):511-517.
118. Marrugat J, Sala J, Masia R, et al. Mortality differences between men and women following first myocardial infarction. RESCATE Investigators. Recursos Empleados en el Síndrome Coronario Agudo y Tiempo de Espera. *Jama.* Oct 28 1998;280(16):1405-1409.
119. Newton KM, LaCroix AZ, McKnight B, et al. Estrogen replacement therapy and prognosis after first myocardial infarction. *Am J Epidemiol.* Feb 1 1997;145(3):269-277.
120. Shlipak MG, Angeja BG, Go AS, et al. Hormone therapy and in-hospital survival after myocardial infarction in postmenopausal women. *Circulation.* Nov 6 2001;104(19):2300-2304.
121. Patten RD, Aronovitz MJ, Deras-Mejia L, et al. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol.* May 1998;274(5 Pt 2):H1812-1820.
122. Hildick-Smith DJ, Shapiro LM. Echocardiographic differentiation of pathological and physiological left ventricular hypertrophy. *Heart.* Jun 2001;85(6):615-619.
123. Scherrer-Crosbie M, Steudel W, Hunziker PR, et al. Three-dimensional echocardiographic assessment of left ventricular wall motion abnormalities in mouse myocardial infarction. *J Am Soc Echocardiogr.* Oct 1999;12(10):834-840.
124. Anversa P, Loud AV, Levicky V, et al. Left ventricular failure induced by myocardial infarction. II. Tissue morphometry. *Am J Physiol.* Jun 1985;248(6 Pt 2):H883-889.
125. Karam R, Healy BP, Wicker P. Coronary reserve is depressed in postmyocardial infarction reactive cardiac hypertrophy. *Circulation.* Jan 1990;81(1):238-246.
126. Kalkman EA, Bilgin YM, van Haren P, et al. Determinants of coronary reserve in rats subjected to coronary artery ligation or aortic banding. *Cardiovasc Res.* Dec 1996;32(6):1088-1095.
127. Geenen DL, White TP, Lampman RM. Papillary mechanics and cardiac morphology of infarcted rat hearts after training. *J Appl Physiol.* Jul 1987;63(1):92-96.
128. Hashimoto T, Kambara N, Nohara R, et al. Expression of MHC-beta and MCT1 in cardiac muscle after exercise training in myocardial-infarcted rats. *J Appl Physiol.* Sep 2004;97(3):843-851.
129. Brown DA, Lynch JM, Armstrong CJ, et al. Susceptibility of the heart to ischaemia-reperfusion injury and exercise-induced cardioprotection are sex-dependent in the rat. *J Physiol.* Apr 15 2005;564(Pt 2):619-630.

DANKSAGUNG

Frau Prof. Dr. Vera Regitz-Zagrosek möchte ich für die freundliche Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes herzlich danken. Jede Phase dieser Studie wurde von ihr intensiv begleitet. Ihr kompetenter Rat und ihre konstruktive Hilfe kamen mir in zahlreichen Arbeitsabschnitten sehr zugute.

Frau Prof. Dr. Anja Sterner-Kock danke ich für die freundliche Übernahme der Betreuung am Fachbereich Veterinärmedizin.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Sebastian Brokat für die direkte Betreuung des Projektes und das entgegengebrachte Vertrauen. Jederzeit gewährte er mir bei der Planung, Durchführung und Auswertung der vorliegenden Arbeit sachkundige Unterstützung.

Dankbar anerkennen will ich auch die Übernahme der Betreuung durch Frau Dr. Carola Schubert und ihre Begleitung während des Erstellens der schriftlichen Arbeit. Dabei stand sie mir stets mit nützlichen Anregungen zur Seite.

Großer Dank gebührt Frau Dr. Nadine Ehrenberg für die freundschaftliche und unkomplizierte Zusammenarbeit am gemeinsamen Projekt.

Für die Einführung in die histologischen und molekularbiologischen Laborarbeiten danke ich den Technischen Angestellten der Arbeitsgruppe. Sie waren stets bereit, mit sachkundigen Hilfestellungen spezielle Probleme zu lösen.

Der gesamten Arbeitsgruppe, insbesondere Elke Dworatzek, Arne Kühne, Hang Pham und Shokoufeh Mahmoodzadeh, sei gedankt für die freundschaftliche Aufnahme in ihr Team und die jederzeit tatkräftige und herzliche Unterstützung bei jeglichen Problemen im Laboralltag.

Herrn Dr. Alexander Riad aus dem FEM in Steglitz danke ich für die Einführung in das mikrochirurgische Arbeiten und die Hilfestellungen während des Erlernens der MI-Operation.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Christian Klein vom Max-Delbrück-Centrum für die Bereitstellung des Kapillarfärbeprotokolls und die freundliche Einarbeitung.

Frau Bettina Röder danke ich für das Anfertigen und Warten der Laufradsysteme.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit bestätige ich, Kathleen Cantow, dass die vorliegende Dissertationsarbeit selbständig von mir angefertigt wurde. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Berlin, den 30.03.2009

Kathleen Cantow