

Einfluss von Östrogen und Östrogenrezeptoragonisten/-modulatoren auf
kardiale Umbauprozesse bei drucklastinduzierter Hypertrophie

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

CHRISTINA WESTPHAL

aus Leipzig

2011

Die Arbeit wurde unter Leitung von Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek im Zeitraum vom August 2006 bis September 2010 am Institut für Geschlechterforschung in der Medizin, Charité Universitätsklinikum Berlin angefertigt.

- 1: Gutachter: Prof. Dr. M. Melzig
- 2: Gutachter: Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek

Disputation am: 09. Mai 2011

Danksagung

Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek möchte ich für die Überlassung des Themas danken. In der Zeit meiner Doktorarbeit hatte ich die Möglichkeit, mich fachlich weiter zu entwickeln und auf zahlreichen nationalen und internationalen Kongressen Erfahrungen zu sammeln.

Dr. Carola Schubert danke ich ganz herzlich für die Betreuung und die konstruktiven Diskussionen und Anregungen. Danke, dass ich bei Dir einfach mal laut denken und damit meine Gedanken sortieren konnte.

Dr. Katja Prella und der Bayer Schering Pharma AG danke ich für die Bereitstellung der *Release-Pellets*.

Ein herzlicher Dank an Georgi Petrov, der mir in allen statistischen Fragen zur Seite stand und meinen statistischen Horizont erweitert hat.

Dani, Karina, Eva und George (und eigentlich auch nochmal Carola) möchte ich für die wissenschaftlich anregende und manchmal lustige, aber immer angenehme Zeit in unserem Büro danken.

Ein großer Dank geht an Anja, die ich in der letzten Zeit beinahe täglich mit Formatierungsfragen gequält habe, die sie mir mit einer Engelsgeduld beantwortet hat.

Ich möchte mich bei den TA's und bei allen Mitarbeitern der AG Regitz-Zagrosek für die Unterstützung und kollegiale Zusammenarbeit danken.

Einen großen Anteil an dieser Arbeit haben meine Eltern und meine Brüder, die mich immer unterstützt haben und mir auch so manches Mal die Motivation wiedergegeben haben.

Philipp danke ich für das Ertragen meiner Launen und einfach für alles!

Abkürzungen

AK	Antikörper
AngII	Angiotensin II
ANOVA	univariate Varianzanalyse (<i>analysis of variance</i>)
ANP	Atriales natriuretisches Peptid
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aortenstenose
BCA	<i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure)
BNP	<i>Brain Natriuretic Peptide</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure (<i>complementary Desoxyribonukleinacid</i>)
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
DAB	3, 3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-Phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPN	Diaryl-propionitril
E2	17 β -Östradiol
Echo	Echokardiografie
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EF	Ejektionsfraktion
ER	Östrogenrezeptor (<i>Estrogen Receptor</i>)
ER α A	Östrogenrezeptor α -Agonist
ER α KO	Östrogenrezeptor-alpha Knockout
ER β A	Östrogenrezeptor β -Agonist
ER β KO	Östrogenrezeptor-beta Knockout
ET-1	Endothelin 1
EZM	extrazelluläre Matrix
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FS	Faserverkürzung (<i>Fractional Shortening</i>)
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HBD	Hormon-bindende Domäne
HCl	Chlorwasserstoffsäure (Salzsäure)
HERS	<i>Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study</i>
HF	Herzinsuffizienz (<i>Heart Failure</i>)
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRT	Hormonersatztherapie (<i>Hormone Replacement Therapy</i>)
HW	Herzgewicht (<i>Heart Weight</i>)

HW/TL	Herzgewicht-zu-Tibiallänge-Quotient
IP	intraperitoneal
IVS	interventrikuläres Septum
kDa	Kilodalton
KGW	Körpergewicht
KO	<i>Knock-out</i>
Kol	Kollagen
Konz.	Konzentration
LAGeSo	Landesamt für Gesundheit und Soziales
LV	linksventrikulär
LVID	linksventrikulär innerer Durchmesser
LVM	linksventrikuläre Masse
LVM/TL	linksventrikuläre-Masse-zu-Tibiallänge-Quotient
LVPW	Linksventrikuläre Hinterwand (<i>Left Ventricular Posterior Wall</i>)
MH	Myokardhypertrophie
MHC	<i>Myosin Heavy Chain</i>
MI	Myokardinfarkt
MMP	Matrixmetalloproteinasen
MORE	<i>Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation</i>
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
OP	Operation
OVX	Ovariectomie
PAA	Polyacrylamid
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (phosphatgepufferte Salzlösung)
Primer FW	Vorwärtsprimer (<i>Primer forward</i>)
Primer RV	Rückwärtsprimer (<i>Primer reverse</i>)
qRT-PCR	quantitative real time polymerase Kettenreaktion (<i>quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Natriumdodecylsulfat)
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator
SHHF Ratten	spontan hypertensive und herzinsuffiziente Ratten (<i>Spontaneous Hypertensive and Heart Failure</i>)
SHR	Spontan hypertensive Ratten(<i>Spontaneous Hypertensive Rats</i>)
TAC	Transversale Aortenkonstriktion
TBS	<i>TRIS Buffered Saline</i> (TRIS-gepufferte Salzlösung)
TBS-T	<i>TRIS Buffered Saline + Tween20</i> (TRIS-gepufferte Salzlösung + Tween20)
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor beta</i>

Th/r	Relative Wandverdickung
TIMP	Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase
TL	Tibiallänge
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UpM	Umdrehungen pro Minute
Vol	Volumen
WGA	<i>Wheat Germ Agglutinin</i>
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>
WT	Wildtyp

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1	Entwicklung der Myokardhypertrophie	1
1.2	Die Extrazelluläre Matrix	2
1.3	Geschlechterunterschiede bei Myokardhypertrophie	3
1.4	Östrogen und Östrogenrezeptoren im Myokard	3
1.5	Hormonbehandlung während Myokardhypertrophie	5
1.5.1	Einfluss von Ovariectomie und Behandlung mit 17 β -Östradiol auf die Myokardhypertrophie	6
1.5.2	Behandlung mit ER-spezifischen Agonisten	8
1.5.3	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs)	9
1.6	Hypothesen	10
2.	MATERIAL UND METHODEN	11
2.1	Versuchsdesign	11
2.1.1	Tiere	11
2.1.2	Versuchsdurchführung	11
2.2	Tierexperimentelle Arbeiten	12
2.2.1	Ovariectomie	12
2.2.2	Implantation der Releasepellets	12
2.2.3	Transversale Aortenkonstriktion	13
2.2.4	Echokardiographie	13
2.2.5	Organentnahme	15
2.2.6	Verbrauchsmaterialien für die tierexperimentellen Eingriffe	17
2.3	Puffer und Lösungen	18
2.3.1	Chemikalien und Puffer	18
2.4	Geräte und Verbrauchsmaterialien	19
2.5	Genexpressionsanalysen	20
2.5.1	Isolation der RNA	20
2.5.2	Messung der isolierten RNA	20
2.5.3	Reverse-Transkription (RT)	20
2.5.4	Quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion (quantitative real time polymerase chain reaction; qRT-PCR)	21
2.5.5	Verbrauchsmaterialien für die Genexpressionsanalysen	22
2.6	Proteinanalysen	23
2.6.1	Isolation der Proteine	23
2.6.2	Gelelektrophorese	23
2.6.3	Western Blot (Halbtrockenverfahren, engl. Semi-Dry-System)	25
2.6.4	Antikörperhybridisierung und Proteindetektion	26
2.6.5	Stripping Prozedur	27
2.6.6	Auswertung der Western Blots	27
2.7	Histologie	28
2.7.1	WGA (Wheat germ agglutinin) Färbung	28
2.7.2	Auswertung der Bilder der WGA Färbung	29

2.7.3	Sirius Rot Färbung	30
2.7.4	Auswertung der Bilder der Sirius Rot Färbung.....	31
2.7.5	Färbung der Kollagene 1 und 3 und der MMPs 2 und 9	32
2.7.6	Auswertung der Färbung der Kollagene 1 und 3 und der MMPs 2 und 9...33	
2.8	Statistische Auswertung	34
2.9	Software	35
3.	ERGEBNISSE	36
3.1	Validierung der Wirksamkeit von Ovariectomie und Behandlung.....	36
3.2	LVM-Berechnung und Validierung anhand des Herzgewichtes	37
3.3	Verifizierung der Drucklastinduktion	37
3.4	Die Behandlung mit E2 und dem ER α reduziert die Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant	39
3.5	Hypertrophie und Funktion	40
3.5.1	Die Behandlung mit E2 und ER α verhindert signifikante Veränderungen in der LV Funktion während des Versuchszeitraumes	40
3.5.2	Parameter der Morphologie – Die Behandlung mit E2 und dem ER α verzögert den Verlust der kardialen Funktion nach TAC.....	44
3.5.3	Die Ovariectomie induziert die Expression der Hypertrophiemarker nach TAC.....	51
3.5.4	Die Behandlung mit Raloxifen führt zu einer signifikanten Myozytenhypertrophie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppe.....	54
3.6	Fibrose	55
3.6.1	Ovariectomie erhöht den Kollagengehalt nach TAC	55
3.6.2	Behandlung mit Raloxifen induziert col1 Genexpression neun Wochen nach TAC	57
3.6.3	Ovariectomie und TAC erhöhten Col1-Proteingehalt, während Behandlung die Effekte der Ovariectomie neutralisierten	58
3.6.4	Ovariectomie induzierte die Expression der Matrixgene TGF β 1, TGF β 2 und CTGF; Behandlung mit E2, dem ER α und dem ER β reduzierte die CTGF-Genexpression	59
3.6.5	Ovariectomie und Behandlungen hatten keinen Einfluss auf die MMP- und TIMP-Genexpression oder den MMP- und TIMP-Proteingehalt neun Wochen nach TAC	62
4.	DISKUSSION	64
4.1	Die Behandlung mit E2 oder 16 α LE2 führt zu einer signifikanten Vergrößerung der Uteri	64
4.2	LVM-Berechnung und Validierung anhand des Herzgewichtes	65
4.3	Verifizierung der Drucklastinduktion	65
4.4	Die Behandlung mit E2 oder 16 α LE2 reduziert die Überlebenswahrscheinlichkeit nach TAC	65
4.5	Entwicklung der Myokardhypertrophie.....	66
4.6	Umbauprozesse der EZM.....	68
4.7	Schlussfolgerungen.....	70
4.8	Limitationen der Arbeit	71
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	73
6.	SUMMARY	75

LITERATURVERZEICHNIS	77
ANHANG	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	VI
PUBLIKATIONEN	VII

1. Einleitung

1.1 Entwicklung der Myokardhypertrophie

Die Herzinsuffizienz (*heart failure*, HF) ist eine der häufigsten Ursachen für Altersmorbidity weltweit. Ein wichtiger Vorläufer der HF ist die Myokardhypertrophie (MH). Sie entsteht als adaptive Stressantwort, zum Beispiel bei Aortenstenose (AS)¹. Zunächst kommt es zu einer kompensatorischen Anpassung des Herzens an die veränderte Situation. Hierbei verdicken sich die Wände ohne eine Einschränkung der Funktionalität. Dieses Stadium wird als konzentrische (adaptive) Hypertrophie bezeichnet (Abbildung 1B). Im weiteren Verlauf der Erkrankung kann es zu einer Abnahme der Wanddicken sowie zu einer Dilatation des linken Ventrikels kommen. Bei anhaltender Belastung kann sich eine exzentrische (maladaptive) Hypertrophie entwickeln, die mit einem Verlust der systolischen Funktion und damit mit der Verminderung der Ejektionsfraktion (EF) einhergeht^{2,3} (Abbildung 1C).

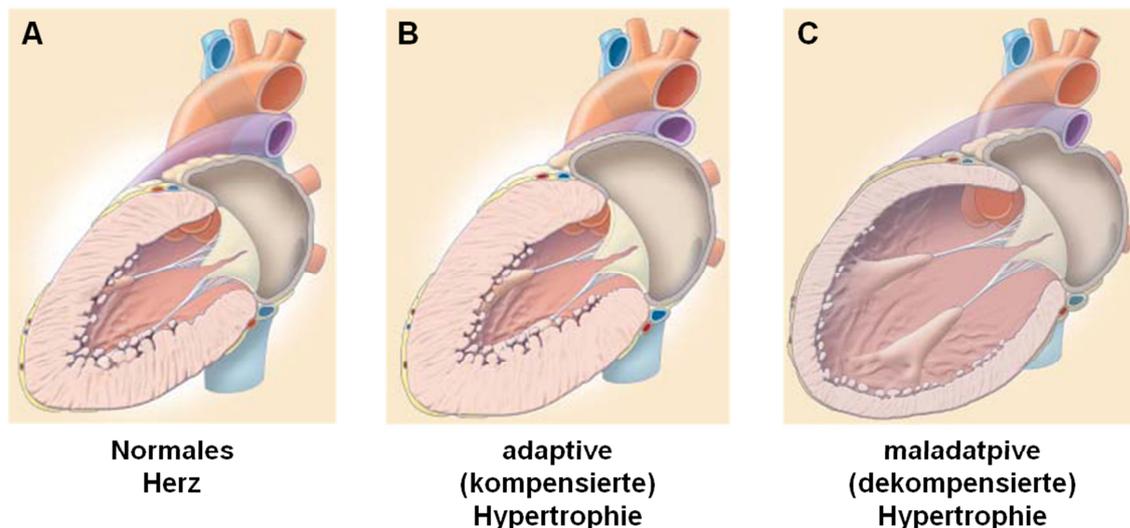


Abbildung 1: Pathologische Hypertrophie nach Jessup⁴.

A: Darstellung des linken Ventrikels eines gesunden Herzens. Aufgrund eines pathologischen Reizes kommt es zunächst zu einer Verdickung der Wände und einer Verringerung des linksventrikulären Diameters. Es entwickelt sich eine adaptive Hypertrophie (B). Im weiteren Verlauf nehmen die Wanddicken ab und der Ventrikel dilatiert. Es entsteht eine maladaptive Hypertrophie (C).

Sowohl in Patienten sowie in verschiedenen pathologischen Tiermodellen konnte eine Hochregulation des arteriellen natriuretischen Peptides (ANP) und des β -Myosin heavy chain (β MHC) im hypertrophierten Myokard beobachtet werden⁵⁻⁹. Es handelt sich dabei um Proteine, die während der embryonalen Entwicklung eine wichtige Rolle spielen, im adulten Ventrikel normalerweise aber gering exprimiert sind¹⁰⁻¹². Bei der pathologischen Hypertrophie kommt es zu einer Verschiebung zum fötalen Genprogramm. Diese Hypertrophiemarker korrelieren mit der Ausprägung der Hypertrophie^{13,14}. Daher dienen sie im klinischen Bereich als Marker zur Diagnose von Herzinsuffizienz.

1.2 Die Extrazelluläre Matrix

Die extrazelluläre Matrix (EZM) ist eine dreidimensionale Struktur, die einzelne Myozyten oder Faszien von Myozyten umgibt^{15, 16}. Zum einen stellt die EZM ein Reservoir an bioaktiven Makromolekülen, wie zum Beispiel Angiotensin II (AngII) und Endothelin (ET)-1 dar¹⁷, zum anderen speichert sie Wachstumsfaktoren und Signalmoleküle, die die Synthese und Degradation der EZM beeinflussen¹⁸. Bei krankhaften Veränderungen des Herzens, beispielsweise einer Myokardhypertrophie, kommt es zur Fibroblastenproliferation, zu einer erhöhten Kollagensynthese und damit zum Umbau der EZM (*Remodeling*)¹⁹. Diese Veränderungen führen zur Fibrosierung des Myokards und zu einer Einschränkung der linksventrikulären Funktionalität²⁰. Diese wird durch Störungen der Erregungsleitung²¹ und eine Unterversorgung der Myozyten²² aufgrund der Kollagenakkumulation hervorgerufen. Eine geringere Kollagensynthese oder eine erhöhte Kollagendegradation führen hingegen zu einer Dilatation des linken Ventrikels²³. Die Synthese der kollagenen Fasern wird auf zellulärer Ebene reguliert, während die Degradation durch die Matrixmetalloproteinasen (MMP) und deren Inhibitoren, die *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase* (TIMPs), beeinflusst wird. MMPs sind zinkhaltige Enzyme, von denen zurzeit über 20 verschiedene bekannt sind. Sie werden entsprechend ihrer Substratspezifität in Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membrangebundene und andere MMPs eingeteilt. Zumeist werden sie als Proenzyme sezerniert. Wichtige MMPs für kardiale Umbauprozesse stellen die Gelatinasen MMP2 und MMP9 dar. Sie werden vor allem durch TIMP1 und TIMP2 inhibiert. Voloshenyuk et al.²⁴ zeigten einen signifikanten Anstieg des TIMP2-zu-MMP2- sowie der TIMP1-zu-MMP9-Quotienten in einem Modell von chronischer Volumenbelastung in Ratten. Hingegen zeigten sich in Patienten mit AS im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Induktion von MMP2 und eine Inhibierung vom MMP9 auf RNA- und Proteinebene. Die Aktivität der MMPs korrelierte invers mit der Größe des linken Ventrikels²⁵. Die Expression der MMPs kann durch den *transforming growth factor* β (TGF β) gehemmt werden^{26, 27}. TGF β gehört zu den Zytokinen und spielt eine wichtige Rolle in verschiedenen biologischen Prozessen. Hierzu zählen vor allem die Zellproliferation und -differenzierung²⁸. Es sind fünf Isoformen von TGF β bekannt, wobei nur die Isoformen eins bis drei in Säugetieren nachgewiesen sind^{29, 30}. TGF β induziert die Kollagen-Synthese sowie Regulatoren der Myofibroblastendifferenzierung wie zum Beispiel *connective tissue growth factor* (CTGF)^{31, 32}. Die Induktion von CTGF durch TGF β , aber auch durch Endothelin-1 (ET-1), während des *Remodeling*³³ bewirkt eine beschleunigte Herunterregulation seiner Induktoren^{31, 34}. Des Weiteren konnte nach erhöhter CTGF-Expression eine Kardiomyozytenhypertrophie *in vitro*³⁵ nachgewiesen werden. *In vivo* wurde in CTGF-überexprimierenden Mäusen und Ratten eine Hypertrophie im Alter von 7 Monaten im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Die Tiere

entwickelten außerdem einen Verlust der kardialen Funktion. In diesen transgenen Tieren konnte jedoch keine Fibrosierung festgestellt werden³⁶. Auch andere Autoren beschreiben CTGF für die Entwicklung einer Fibrose als wenig bedeutsam, aber es stellt eine wichtige Schlüsselkomponente für TGF β in der Fibronectin- und Kollagen 1-Synthese dar³⁷⁻³⁹.

1.3 Geschlechterunterschiede bei Myokardhypertrophie

Die Entwicklung und klinische Manifestation der HF verlaufen bei Männern und Frauen unterschiedlich⁴⁰. Gründe dafür sind die Sexualhormone, die einen wichtigen Anteil an der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen haben⁴¹. In männlichen Patienten mit AS wurde eine schlechtere kardiale Funktion, als bei Frauen festgestellt. Sie entwickelten zumeist eine linksventrikuläre (LV) Dilatation mit Verlust der systolischen Funktion und somit eine exzentrische Hypertrophie. Frauen hingegen zeigten einen Anstieg der Wanddicke und damit eher eine konzentrische Form der Hypertrophie⁴². Darüber hinaus sind bei Frauen häufig eine erhaltene Ejektionsfraktion (EF) und ein Verlust der diastolischen Funktion charakteristisch⁴³. Weiterhin wurde beschrieben, dass die Fähigkeit zur Entwicklung einer Myozytenhypertrophie bei weiblichen Individuen häufiger zu beobachten ist als bei männlichen^{44, 45}. In weiblichen Ratten konnte beispielsweise eine 4-fach größere Myozytenhypertrophie mit pathologischer Hypertrophie im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnet werden, während die Myozyten der männlichen Tiere nur um das 2.5-fache an Größe zunahmten⁴⁴.

In tierexperimentellen Versuchen wurde gezeigt, dass männliche Ratten bei gleicher Drucklast früher eine linksventrikuläre Dysfunktion entwickelten als die weiblichen Tiere⁴⁶. Männliche Ratten zeigten im Vergleich zu den weiblichen Tieren nach transversaler Aortenkonstriktion eine stärkere Hochregulation der Hypertrophiemarker ANP und β MHC¹².

Des Weiteren zeigten sich Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung. So konnten die Autoren der *Framingham heart study* bei prämenopausalen Frauen eine geringere Inzidenz für kardiale Erkrankungen im Vergleich zu gleichaltrigen Männern beobachtet werden. In den über 60jährigen zeigte sich eine erhöhte Rate an Neuerkrankungen (69% pro Lebensdekade bei Frauen vs. 15% pro Lebensdekade bei Männern)⁴⁷.

1.4 Östrogen und Östrogenrezeptoren im Myokard

Die oben beschriebenen Untersuchungen lassen auf einen Einfluss der Sexualhormone, insbesondere der Östrogene schließen. Diese gehören zur Gruppe der Steroidhormone und werden in den Ovarien synthetisiert. In männlichen Tieren, bzw. bei Männern wird Testosteron durch die Aromatase in Östradiol umgewandelt. Die Serumkonzentrationen sind hier aber deutlich geringer als in prämenopausalen, weiblichen Individuen. Postmenopausal

sinken die Östrogenlevel von Frauen auf ein den Männern vergleichbares Niveau. Es ist eine Vielzahl von Effekten des Östrogens auf das Herz-Kreislaufsystem beschrieben. Dazu zählen unter anderem die Wirkung auf die Kollagen-⁴⁸, sowie auf die MMP2-Expression⁴⁹.

Die Effekte der Östrogene, aber auch von Phytoöstrogenen⁵⁰, synthetischen Substanzen, wie selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs)⁵¹ oder Wachstumsfaktoren⁵², werden vor allem über die Östrogenrezeptoren alpha (ER α) und beta (ER β) vermittelt. Die ER (Abbildung 2) gehören zur Gruppe der Steroidhormonrezeptoren⁵³. Sie sind in sechs Domänen (A bis F) unterteilt, wobei die N-terminale Domäne A-B die Liganden-unabhängige transkriptionelle Aktivierungsfunktion erfüllt. Sie unterscheidet sich zwischen den beiden ER-Isoformen stark. Die hochkonservierte C-Domäne entspricht der DNA-bindenden Domäne (DBD) und ist in beiden Isoformen zu 96% homolog. Die *Hinge*-Region des Östrogenrezeptors ist die D-Domäne. Die Hormon-abhängige transkriptionelle Aktivierungsfunktion (Hormonbindende Domäne, HBD) übernimmt die E-Domäne. Sie ist zwischen beiden Isoformen zu 53% homolog. Die F-Domäne stellt eine variable Region dar, die durch ihren Aufbau vermutlich für die unterschiedlichen Antworten auf 17 β -Östradiol (E2) und SERMs verantwortlich ist⁵⁴.

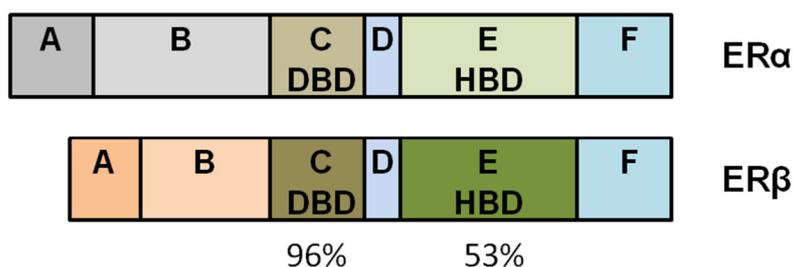


Abbildung 2: Aufbau der Östrogenrezeptoren nach Mendelsohn⁵⁵.

ER α und ER β sind aus jeweils sechs Domänen (A-F) aufgebaut. Die Domänen A-B unterscheiden sich in beiden Isoformen stark voneinander. In der DBD (C) sind beide Rezeptoren zu 96% homolog zueinander. Die D-Domäne enthält die *Hinge*-Region des Östrogenrezeptors. Die HBD (E) weist eine 53% Homologie zwischen beiden Rezeptoren auf. Die F-Domäne zeichnet sich durch ihre Variabilität aus und ist vermutlich für die unterschiedlichen Effekte nach Stimulation mit E2 oder einem SERM verantwortlich.⁵⁴

Beide Isoformen unterscheiden sich nicht nur strukturell, sondern auch in ihrer Lokalisation. ER α ist vor allem in Uterus und Niere zu finden, während ER β in Prostata, Ovarien, Blase, Lunge und im Zentralnervensystem stark exprimiert wird^{53, 56, 57}. Eine geringe Expression von ER β ist auch im Uterus zu finden, allerdings dominiert hier ER α ⁵⁸. Im Myokard wurden beide ER nachgewiesen⁵⁹⁻⁶² und sind sowohl in den Myozyten als auch in den Fibroblasten lokalisiert⁵⁹. Die Östrogenrezeptoren sind in der Lage Homo- und Heterodimere zu bilden⁶³.

Eine Stimulation der Östrogenrezeptoren kann die Expression der Zielgene modulieren ("genomische" Reaktion). Die Wirkung setzt dann nach Stunden oder Tagen ein und kann zum Beispiel eine Reduktion des Wachstums der glatten Muskelzellen (*smooth muscle cell*) oder eine Induktion des Wachstums endothelialer Zellen bewirken. Eine Stimulation der ER kann auch eine "nichtgenomische" Reaktion hervorrufen, also ohne Änderung der

Genexpression, Die Effekte zeigen sich innerhalb weniger Minuten und können zum Beispiel eine Vasodilatation oder eine Stickstoffmonoxid (NO)-Ausschüttung sein⁵⁵.

Der Einfluss der Östrogenrezeptoren auf die Entwicklung einer MH wurde in verschiedenen Knockout-(KO) Modellen untersucht. Skavdahl et al.⁶⁴ beobachteten zwei Wochen nach transversaler Aortenkonstriktion (TAC) eine signifikant stärker ausgebildete Hypertrophie in männlichen Wildtyp-Mäusen (WT) im Vergleich zu den weiblichen Tieren. In ER α KO Mäusen war dieser signifikante Geschlechterunterschied ebenfalls nachweisbar, jedoch nicht in den ER β KO Tieren. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass der ER β einen Einfluss auf die kardialen Umbauprozesse und somit auf die Ausbildung einer Myokardhypertrophie hat. In einer weiteren Studie konnten in WT Tieren neun Wochen nach TAC signifikante Geschlechterunterschiede im linksventrikulären-Masse-zu-Tibiallänge-Quotienten (LVM/TL) nachgewiesen werden. Dieser Unterschied verschwand in den ER β KO Tieren. Des Weiteren konnte in diesen Tieren ein Verlust der kardialen Funktion in den männlichen scheinoperierten Tieren beobachtet werden. ER β hat damit auch einen Einfluss auf die kardiale Funktion und deren Erhalt⁶⁵.

Weiterhin wurden im Gesamtkollagengehalt des Herzens Geschlechterunterschiede beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass das Basisniveau an kardialem Gesamtkollagen in WT Männchen signifikant geringer ist als in weiblichen Tieren. Nach der TAC-Operation, als pathologischen Stimulus, erhöhte sich der Kollagengehalt im Herzen der Männchen signifikant, während bei den Weibchen keine Veränderung zu beobachten war. Allerdings änderte sich das Bild in den ER β KO-Tieren. Hier zeigten die weiblichen Tiere einen signifikanten Anstieg an Kollagen im Herzen. Die Entstehung von Fibrose wird geschlechtsspezifisch durch ER β reguliert⁶⁵.

1.5 Hormonbehandlung während Myokardhypertrophie

Die Behandlung mit Hormonen während einer Hormonersatztherapie (*Hormone Replacement Therapy*, HRT) und deren protektive Wirkung auf das Herz-Kreislaufsystem werden kontrovers diskutiert^{7-9, 66-68}. Die *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) zeigte ein erhöhtes Risiko für Thrombosen und kardiovaskuläre Erkrankungen, aber keinen Einfluss auf bestehende Herzerkrankungen nach Applikation von E2 und Progesterin⁶⁷. Die Studie *Women's Health Initiative* (WHI) wurde vorzeitig abgebrochen, da die Inzidenz für Erkrankungen wie Brustkrebs nach Applikation von E2 und Progesterin zunahm⁶⁸. Andererseits hatten postmenopausale, gesunde Frauen nach HRT eine geringere Herzmasse als nicht behandelte Frauen^{69, 70}.

In tierexperimentellen Studien führte eine Behandlung mit E2 oder ER α -spezifischen Agonisten zu einer Vergrößerung der Uteri^{7-9, 71-75}. In Modellen für Myokardinfarkt (MI) und

Aortenstenose durch TAC wurde eine erhöhte Mortalität nach E2-Behandlung beobachtet^{8, 73, 76}.

1.5.1 Einfluss von Ovariectomie und Behandlung mit 17 β -Östradiol auf die Myokardhypertrophie

Neben Östron und Östriol ist 17 β -Östradiol (E2) das wichtigste natürliche Östrogen im Organismus. Es besitzt die typische Steroidstruktur von drei 6-C-Kohlenstoffringen und einem 5-C-Kohlenstoffring (Abbildung 3).

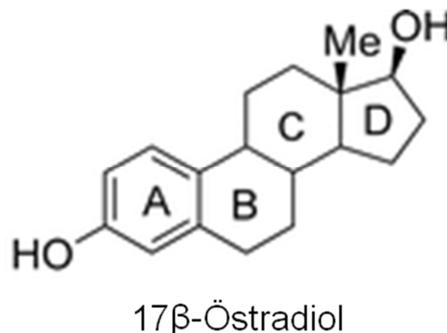


Abbildung 3: Chemische Strukturformel von 17 β -Östradiol⁷⁷.

Bisherige Studien zeigten, dass der Entzug von E2 durch Ovariectomie bei jungen weiblichen Tieren die Entwicklung von MH und Arteriosklerose fördert^{8, 9, 73}. So beobachteten Lee et al.⁷⁸ 8 Wochen nach der Ovariectomie weiblicher Ratten eine Zunahme des Herzgewichtes und der Fibrosierung des Myokards im Vergleich zu den nicht ovariectomierten Tieren. Des Weiteren führte eine Ovariectomie von Sprague-Dawley Ratten zu einem erhöhten LV-Gewicht, zu einer signifikanten Expression von β MHC sowie zu einer erhöhten Akkumulation von Kollagen I und einer reduzierten MMP2-Aktivität im Myokard. Nach Applikation von E2 konnte eine Reduktion der MH und ein Erhalt der MMP2-Aktivität beobachtet werden⁷⁴. Iwakura et al.⁷⁹ konnten eine signifikante Reduktion der Fibrose nach MI im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle nachweisen. Des Weiteren verhinderte die E2-Applikation eine Dilatation des linken Ventrikels und verbesserte die Funktion nach MI. Auch schützende Effekte vor Inflammation^{80, 81}, Arteriosklerose⁸² sowie für die endotheliale und vaskuläre Funktion⁸³ durch E2-Behandlung wurden nachgewiesen.

Weiterhin scheint die protektive Wirkung von E2 vom pathologischen Stimulus abhängig zu sein. Nach Behandlung mit E2 zeigten Tiere mit TAC eine signifikante Reduktion der β -MHC und des ANP auf Proteinebene, jedoch nicht in Tieren mit MI. Unabhängig von der Induktion eines pathologischen Stimulus wurde sowohl in den schein-operierten Tieren als auch in den TAC- und MI- operierten Tieren eine Reduktion in der Überlebensrate nach E2-Applikation im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren beobachtet⁸.

Zhan et al.⁷⁶ konnten nach MI in ovariectomierten C57Bl6-Mäusen eine Dosisabhängigkeit der E2-Wirkung nachweisen. Die Überlebensrate sank von 82% in den Placebo-behandelten MI-Tieren auf 20% in der mit E2 (4.2µg/d) behandelten Gruppe. Die Gruppe mit einer geringeren Dosis (0.42µg/d) zeigte hingegen keine Änderung in der Mortalitätsrate im Vergleich zu den Placebo-behandelten MI-Tieren. Weiterhin wies die Gruppe, die eine hohe Dosis E2 appliziert bekam, einen schlechteren Funktionserhalt, eine stärkere Dilatation des linken Ventrikels, sowie eine stärkere Myozytenhypertrophie, im Vergleich zu den niedrig-Dosis-Tieren auf.

Donaldson et al.⁸⁴ wiesen eine signifikante Reduktion der Myozytenhypertrophie zwei Wochen nach TAC mit E2-Behandlung im Vergleich zu Placebo-behandelten TAC-Tieren nach. Des Weiteren konnten eine Verbesserung der Funktion und eine signifikant geringere Vergrößerung des linksventrikulären inneren Diameters (LVID) in Systole und Diastole, sowie der Masse des linken Ventrikels gezeigt werden.

In vitro konnten Effekte von E2-Behandlung in humanen und in tierischen Zelllinien nachgewiesen werden. Dabei wurde die MMP2-mRNA-Expression in Rattenfibroblasten im Vergleich zu Vehikel-behandelten Zellen signifikant reduziert⁸⁵. Die Behandlung mit E2 verringerte auch die Phenylephrin-induzierte Kardiomyozytenhypertrophie und die ANP-Genexpression *in vitro*⁸⁶.

1.5.2 Behandlung mit ER-spezifischen Agonisten

Für eine ER-spezifische Behandlung im Tierversuch sind der ER α Agonist (ER α A) 16 α -LE2, bzw. der ER β Agonist (ER β A) 8 β -VE2 häufig verwendete Substanzen. Beide Agonisten haben eine mit E2 vergleichbare Wirksamkeit. Des Weiteren sind beide Agonisten 17 β -Östradiol im Aufbau ähnlich (Abbildung 4) und das Auftreten von unterschiedlichen biologischen Effekten wird somit reduziert⁷⁵.

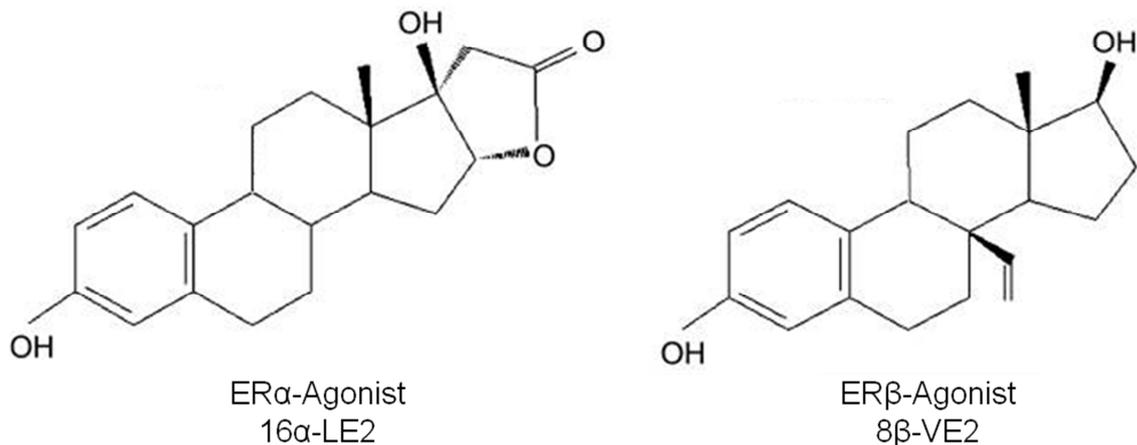


Abbildung 4: Chemische Strukturformel des ER α -Agonisten 16 α -LE2 und des ER β -Agonisten 8 β -VE2⁸⁷.

Im Tierversuch führte eine Aldosteron-induzierte Hypertrophie in ovariectomierten Ratten zu einer signifikanten Zunahme der perivaskulären Fibrose des Herzens im Vergleich zu gesunden Tieren. Weiterhin wurden eine Myozytenhypertrophie und eine Zunahme des systolischen Blutdrucks für dieses Modell beschrieben. Die Behandlung mit E2, 16 α -LE2 oder 8 β -VE2 verringerte die Myozytenhypertrophie sowie den Blutdruck im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren^{71, 88}. Weiterhin wurde die perivaskuläre Fibrose deutlich reduziert⁷¹. Auch in spontan-hypertensiven Ratten (SHR) konnte eine Abnahme der Hypertrophie und eine Verbesserung der kardialen Funktion nach Behandlung mit E2 oder 16 α -LE2 beobachtet werden⁷².

1.5.3 Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs)

Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) bezeichnen eine Gruppe von Substanzen, die gewebeabhängig sowohl als Agonisten, als auch als Antagonisten auf die ER wirken. Ein SERM ist das zu den Benzothiophenderivaten gehörende Raloxifen. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen ER-spezifischen Agonisten ist die Steroidstruktur von E2 bei Raloxifen nicht erhalten (Abbildung 5).

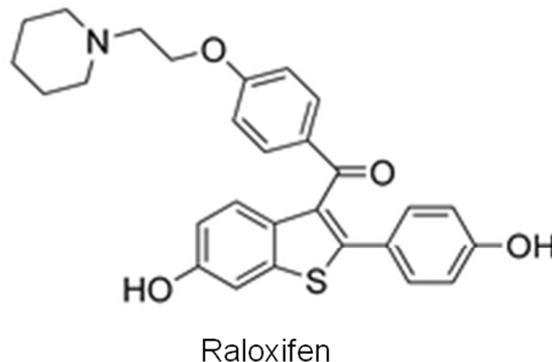


Abbildung 5: Chemische Strukturformel der SERMs Raloxifen⁷⁷.

Raloxifen hat eine etwa vierfach höhere Bindungsaffinität zu ER α , als zu ER β ⁸⁹, wobei die genauen Wirkungsmechanismen auf ER α und ER β nicht bekannt sind⁹⁰. Raloxifen wirkt als Antagonist in Brust und Uterus und als Agonist in Knochen und Herz. Die kardioprotektive Wirkung von Raloxifen wurde bereits beschrieben⁹¹. Im Maus-Modell konnte 4 Wochen nach TAC eine signifikante Zunahme der Hinterwanddicke sowie eine Zunahme der linken Ventrikelmasse nachgewiesen werden. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich die Ejektionsfraktion nach Druckbelastung signifikant verschlechterte. Durch die Behandlung mit Raloxifen konnten diese Effekte reduziert werden⁹¹. Allerdings gibt es auch für die Wirkung von Raloxifen kontroverse Studien. So wurde in der **Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation-** (MORE-) Studie eine signifikante Reduktion des Risikos für kardiovaskuläre Ereignisse nach der Behandlung mit Raloxifen bei Frauen beobachtet⁹². Die gleichen Autoren konnten in der später durchgeführten **Raloxifene Use for The Heart-** (RUTH-) Untersuchung keine Unterschiede im kardiovaskulären Risiko mehr feststellen, beobachteten aber eine Erhöhung der Mortalitätsrate aufgrund von Schlaganfällen und Embolien⁹³.

1.6 Hypothesen

Vergleichende Studien zur Wirkung von ER α , ER β und Raloxifen auf das Herz im Mausmodell sind bisher nicht gezeigt worden. Deshalb soll in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von Ovariectomie und Behandlung mit E2, einem spezifischen ER α Agonisten (16 α -LE2), einem spezifischen ER β Agonisten (8 β -VE2) und einem SERM (Raloxifen) auf die drucklastinduzierte Myokardhypertrophie vergleichend untersucht werden. Für die weiterführenden molekularbiologischen Untersuchungen sollen die Umbauprozesse der extrazellulären Matrix im Mittelpunkt stehen.

Aufgrund der vorliegenden Literatur wurden die folgenden Hypothesen entwickelt:

- I. Die transversale Aortenkonstriktion induziert die Entwicklung einer linksventrikulären Hypertrophie, in deren Verlauf sich die kardiale Funktion verschlechtert. Weiterhin kommt es zu einer erhöhten Kollagensynthese und Kollagenakkumulation.
- II. Der Entzug von endogenem E2 durch Ovariectomie beschleunigt die Progression der Myokardhypertrophie und den Verlust der kardialen Funktion und fördert die Entstehung von Fibrose im Vergleich zu den nicht-ovariectomierten Tieren.
- III. Die Behandlung mit E2, ER-spezifischen Agonisten oder Raloxifen reduziert die Effekte der Ovariectomie (Vgl. II.), vermindert die Entwicklung der Myokardhypertrophie und verbessert die kardiale Funktion nach TAC.
- IV. Die Behandlung mit E2, dem ER α -Agonisten oder dem ER β -Agonisten reduziert sowohl die Myozytenhypertrophie als auch die Entstehung von Fibrose.

2. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Tierversuche erfolgten gemäß § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes unter Genehmigung zur Vornahme von Versuchen an lebenden Wirbeltieren für das Versuchsvorhaben G0149/06, die am 13.09.2006 vom Landesamt vom Gesundheit und Soziales Berlin (LAGeSo) erteilt wurde.

Die Tiere hatten freien Zugang zu Wasser und Futter (*ad libitum*). Die Haltung der Tiere erfolgte in Gruppen unter spezifiziert pathogenfreiem Status (SPF) in IVC-Standardkäfigen in klimatisierten Räumen. Die Belichtung erfolgte in einem 12-Stunden-Tag-/ Nacht- Rhythmus. Der Gesundheitszustand wurde täglich durch die Experimentatoren, das Pflegepersonal sowie durch monatliche veterinärmedizinische Kontrollen überwacht. Die Tierhaltung und die Tierexperimente wurden durch das Komitee für den Tierschutz an der Charité Universitätsmedizin Berlin geprüft und gemäß den Vorgaben durchgeführt.

2.1 Versuchsdesign

2.1.1 Tiere

Mausstamm: C57Bl/6J (weiblich)

Lieferant: Harlan Winkelmann GmbH Deutschland, Borcheln Deutschland

2.1.2 Versuchsdurchführung

Um den Einfluss von Phytoöstrogenen in dem durchgeführten Tierexperiment zu minimieren wurden alle Tiere auf einer sojafreien Spezialdiät gehalten.

Zur Durchführung des Projektes wurden sieben Wochen alte C57Bl/6J Mäuse zunächst ovariectomiert (OVX), bzw. schein-ovariectomiert. Eine Woche später wurden den Tieren *Release*-Pellets entsprechend des Versuchsdesigns (Tabelle 1) implantiert (PI). Im Alter von neun Wochen wurde die Drucklast mittels transversaler Aortenkonstriktion (TAC) induziert. In den Kontrollgruppen wurde eine schein-TAC durchgeführt. Einen Tag vor sowie zwei und neun Wochen nach TAC wurde eine echokardiografische Untersuchung (Echo) durchgeführt. Neun Wochen nach Drucklastinduktion wurden die Tiere getötet und die Organe entnommen (OE) (Abbildung 6).

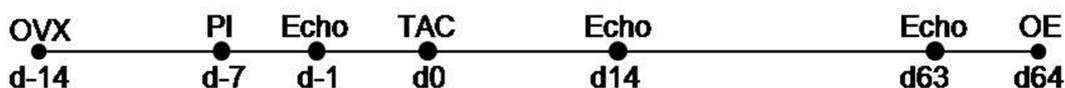


Abbildung 6: Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Tierexperimentes.

Tabelle 1: Übersicht über die Gruppenverteilung.

Ovariectomie	Behandlung	TAC	Tierzahl
Schein	Placebo	Schein	15
OVX	Placebo	Schein	14
Schein	Placebo	TAC	14
OVX	Placebo	TAC	13
OVX	Östradiol	TAC	12
OVX	ER α Agonist	TAC	14
OVX	ER β Agonist	TAC	14
OVX	Raloxifen	TAC	13

2.2 Tierexperimentelle Arbeiten

2.2.1 Ovariectomie

Für die Ovariectomie (OVX) wurden die Tiere mit Ketaminhydrochlorid/Xylazinhydrochlorid (Sigma Aldrich; Cat-No.: K-113; 1ml/kg KG intraperitoneal [IP]) betäubt und anschließend auf dem Bauch liegend fixiert. Auf jeder Seite wurde im Flankenbereich ein ca. 0.75cm langer Schnitt gesetzt. Nach Lokalisation des ovariellen Fettgewebes konnten die Ovarien frei präpariert werden. Am Übergang zu den Uteri wurden die Ovarien abgebunden und anschließend abgetrennt. Die Uteri wurden wieder in seine ursprüngliche Lage gebracht und die Hautschnitte geklammert (MikRon® Autoclip). Die nicht ovariectomierten Tiere (SOVX) durchliefen die gleiche Prozedur ohne die Ligation der Eileiter und die Entfernung der Ovarien.

Im Anschluss an die Operation erhielten die Tiere eine Analgesie mit Rimadyl® (Pfizer; 4.0mg/kg KGW; IP) und wurden bis zum Erwachen aus der Narkose unter eine Rotlichtlampe gelegt.

2.2.2 Implantation der Releasepellets

Die verschiedenen Behandlungen wurden über permanent eingebrachte *Release*-Pellets durchgeführt. Für die Implantation der Pellets wurden die Tiere im Alter von acht Wochen zunächst mit Ketaminhydrochlorid/Xylazinhydrochlorid (Sigma Aldrich; Cat-No.: K-113; 1 ml/kg KG intraperitoneal [IP]) betäubt. Im Nacken wurde ein kleiner Hautschnitt gesetzt, das Pellet unter die Haut appliziert und der Schnitt anschließend geklammert. Eine Übersicht über die Dosierung der verschiedenen Wirkstoffe ist in Tabelle 2 zu finden.

Tabelle 2: Übersicht über die verwendeten Releasepellets.

Pellet	Konzentration	Name	Firma
E2	390µg/90d		Innovative Research of America
Placebo E2			
ERαA	70µg/90d	16α-LE2	
Placebo ERαA			
ERβA	70µg/90d	8β-VE2	
Placebo ERβA			
SERM	22.5mg/90d	Raloxifen	
Placebo SERM			

2.2.3 Transversale Aortenkonstriktion

Die Narkose erfolgte durch Ketaminhydrochlorid/Xylazinhydrochlorid (Sigma Aldrich; Cat-No.: K-113; 1 ml/kg KG, IP). Die neun Wochen alten Tiere wurden auf dem Rücken liegend fixiert und mit einem 22 Gauge Venenverweilkanüle (BD Venflon™ Pro) intubiert. Die Beatmung wurde mit einem Hubvolumen von 8µl/g Körpergewicht durch den Mouse Minivent (Mouse Minivent, Hugo Sachs, Deutschland) durchgeführt.

Entlang des Sternums wurde ein vertikaler Hautschnitt gesetzt und der Brustkorb anschließend eröffnet. Anschließend wurde zunächst die Aorta frei präpariert. Die Ligation der Aorta erfolgte zwischen der Carotis communis sinistra und dem Truncus brachiocephalicus mit einer 6-0 Seidennaht und mit Hilfe einer 26-Gauge-Nadel. Die Konstriktion hatte damit einen standardisierten Durchmesser von 0.46 mm. Die scheinoperierten Tiere durchliefen die Operation bis zur Konstriktion, ohne dass diese gesetzt wurde. Anschließend wurden Brustkorb und Haut wieder verschlossen.

Im Anschluss an die Operation wurden die Tiere analgetisch versorgt (Rimadyl®; Pfizer; 4.0 mg/kg KGW; IP) und bis zum Erwachen aus der Narkose unter eine Rotlichtlampe gelegt.

2.2.4 Echokardiographie

Die echokardiographischen Untersuchungen fanden unter 1.5% Isofluran-Inhalationsnarkose statt. Die Messungen wurden mit dem Echogerät Vevo 770 (VisualSonics Inc., Toronto, ONT, Canada) durchgeführt und fanden nach denen von der *American Society of Echocardiography* festgelegten Standards statt⁹⁴. Die Tiere wurden in Rückenlage fixiert und der Thorax enthaart (Veet Enthaarungscreme). Die Darstellung des Herzens erfolgte in der kurzen Achse (*short axis*). Des Weiteren wurden zur Kalkulation der linksventrikulären (LV)

enddiastolischen und endsystolischen Kammerdimension auf Höhe der Papillarmuskeln Messungen im M-Mode (Short axis view) durchgeführt (Abbildung 7).

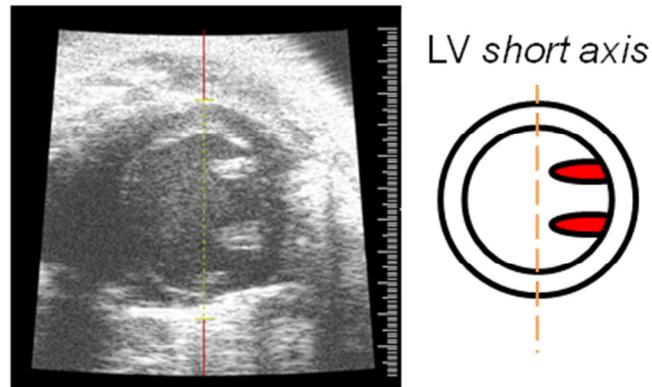


Abbildung 7: Echokardiographisches Bild der linksventrikulären kurze Achse (*short axis*) (links) und stilistische Zeichnung der LV *short axis* (rechts).

Die gelb gestrichelte Linie markiert die Messebene für den M-Mode. Die Papillarmuskeln (rote Markierung in der stilistischen Zeichnung) dienen der Orientierung im Ventrikel und zur Bestimmung der korrekten Messebene.

Vermessen wurden LV Diameter (LVID), die linksventrikuläre Hinterwand (LVPW) und das interventrikuläre Septum (IVS) während der Endsystole (s) und Enddiastole (d). Die Masse des linken Ventrikels (LVM), die linksventrikulären Volumina (LV Vol) in Systole und Diastole, die Ejektionsfraktion (EF) und die fraktionelle Faserverkürzung (FS) wurden berechnet.

Die Berechnung der einzelnen Werte erfolgte mit folgenden Formeln:

$$LVM [mg] = 1,05 * [(MW LVIDd + MW LVPWd + MW IVSd)^3 - MW LVIDd^3]$$

Formel 1: Linke Ventrikelmasse (LVM) in mg.

LVM = linksventrikuläre Masse, MW = Mittelwert. d = diastolisch, LVID = linksventrikulärer innerer Diameter, LVPW = linksventrikuläre posteriore Wand, IVS = intraventrikuläres Septum

$$LV Vol s [\mu l] = \left[\frac{7,0}{2,4 + MW LVIDs} \right] * MW LVIDs^3$$

Formel 2: Linksventrikuläres systolisches Volumen (LV Vol s) in μ l.

LV Vol = linksventrikuläres Volumen, s = systolisch, MW = Mittelwert, LVID = linksventrikulärer innerer Diameter

$$LV Vol d [\mu l] = \left[\frac{7,0}{2,4 + MW LVIDd} \right] * MW LVIDd^3$$

Formel 3: Linksventrikuläres diastolisches Volumen (LV Vol d) in μ l.

LV Vol = linksventrikuläres Volumen, d = diastolisch, MW = Mittelwert, LVID = linksventrikulärer innerer Diameter

Die Ejektionsfraktion (EF, %), ist ein Parameter für die systolische Funktionsfähigkeit des Herzens.

$$EF [\%] = \left[\frac{LV\ Vol\ d - LV\ Vol\ s}{LV\ Vol\ d} \right] * 100$$

Formel 4: Ejektionsfraktion (EF) in %.

EF = Ejektionsfraktion, d = diastolisch, s = systolisch, LV Vol = linksventrikuläres Volumen

Die Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels wird durch die prozentuale Faserverkürzung (FS) angegeben. Die FS ist, wie die EF, ein Parameter für die Funktionsfähigkeit des Herzens.

$$FS = \left[\frac{MW\ LVIDd - MW\ LVIDs}{MW\ LVIDd} \right] * 100$$

Formel 5: Faserverkürzung (FS) in %.

FS = Faserverkürzung, MW = Mittelwert, LVID = linksventrikulärer innerer Durchmesser, d = diastolisch, s = systolisch

Die relative Wanddicke (Th/r) beschreibt die Form der kardialen Hypertrophie. Ein Th/r von 0.33 gilt als physiologisch. Ein höherer Wert ist ein Parameter für eine adaptive Hypertrophie. Charakteristisch dafür sind verdickte Wände und ein unveränderter oder geringerer Durchmesser im Vergleich zum gesunden Herzen. Eine maladaptive Hypertrophie zeichnet sich durch einen niedrigen Th/r-Quotienten, durch abnehmende Wanddicken und einen dilatierten Durchmesser aus.

$$\frac{Th}{r} = 2 * \left[\frac{LVPWd}{LVIDd} \right]$$

Formel 6: Relative Wanddicke (Th/r).

Th/r = Relative Wanddicke, d = diastolisch, LVPW = linksventrikuläre posteriore Wand, LVID = linksventrikulärer innerer Durchmesser

Außerdem wurde eine Doppler-Messung in der aufsteigenden Aorta, sowie über der Stenose in der absteigenden Aorta durchgeführt und hier die Herzrate und die Flussgeschwindigkeit des Blutes bestimmt. Bei den scheinoperierten Tieren wurde die Doppler-Messung in der absteigenden Aorta distal des Abganges der Arteria carotis communis sinistra durchgeführt.

Aus den Doppler-Messungen konnte der Druckgradient (Gradient p) ermittelt werden, welcher einen Kontrollparameter für die TAC darstellt.

$$Gradient\ p = 4 * (A_oV_{max}poststen^2 - A_oV_{max}prästen^2)$$

Formel 7: Druckgradient p über der Stenose in mm/s.

$A_oV_{max}poststen$ = Flussgeschwindigkeit des Blutes über der Stenose, $A_oV_{max}prästen$ = Flussgeschwindigkeit des Blutes vor der Stenose

2.2.5 Organentnahme

Zur Tötung wurden die Tiere nochmals mit Isofluran-Inhalationsnarkose betäubt und durch einen Kehlschnitt getötet. Die Leber, die Lunge, das Herz, der Uterus und die Tibia wurden entnommen. Die Lunge wurde gewogen und anschließend verworfen. Die Tibia wurde vermessen, um sie später mit dem Herzgewicht ins Verhältnis setzen zu können. Der Uterus wurde ebenfalls entnommen und gewogen.

Das Herz wurde von Fett, Aurikeln und Atrien befreit, das Gewicht ermittelt und anschließend linker und rechter Ventrikel und Septum voneinander getrennt. Außerdem wurde für histologische Untersuchungen ein Querschnitt des Herzens angefertigt.

Das Uterusgewicht ist ein anerkannter Parameter zur Überprüfung der Effektivität der Ovariectomie und der Behandlung^{7, 9}. Die erfolgreiche Ovariectomie reduziert das Uterusgewicht signifikant im Vergleich zu nicht ovariectomierten Tieren. Eine Behandlung mit E2 oder einem ER α führt hingegen zu einer Vergrößerung der Uteri^{7-9, 72, 73}.

2.2.6 Verbrauchsmaterialien für die tierexperimentellen Eingriffe

Tabelle 3: Übersicht über die für die tierexperimentellen Eingriffe benötigten Materialien.

OP-Materialien	
ToughCut™ Iris Schere	F.S.T., Foster City, USA
Eye dressing forceps	F.S.T., Foster City, USA
6/0 Seidenfaden	F.S.T., Foster City, USA
MikRon® Autoclip 9mm	BD, Franklin Lakes, USA
Anlegepinzette	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
MikRon® AUTOCLIP® Remover	BD, Franklin Lakes, USA
22 Gauche Venenverweilkatheter, BD Venflon ProTM	BD, Franklin Lakes, USA
Mouse Mini Vent	Hugo Sachs, March-Hugstetten, Deutschland
Spinal cord hook (Sonderanfertigung)	F.S.T., Foster City, USA
Suture tying forceps	F.S.T., Foster City, USA
Castroviejo Nadelhalter	F.S.T., Foster City, USA
Perma Hand Seide	Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL, Norderstedt, Deutschland
Mersilene resorbierbarer Seidenfaden	Ethicon, Johnson & Johnson MEDICAL, Norderstedt, Deutschland
Echokardiographie	
Vevo 770 (Schallkopf 707B)	VisualSonics Inc., Toronto, Kanada
Veet Entthaarungscreme	Reckitt Benckiser, Mannheim, Deutschland
Elektrodengel Spectra 360	Servoprax, Wesel, Deutschland
Aquasonic Clear®	Parker Laboratories Inc., Fairfield, USA
Organentnahme	
Standard chirurgische Schere	F.S.T., Foster City, USA
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Eppendorf Reaktionsgefäße (1.5, 2.0ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schieblehre	
Flüssiger Stickstoff	
Eis	
Anästhesie	
Ketamin-Xylazin	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Forene (Wirkstoff Isofluran)	Abbot, Wiesbaden, Deutschland
Analgesie	
Rimaldyl	Pfizer, NY, USA
sonstige Lösungen	
0.9% isotonische Kochsalzlösung	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
sonstiges	
Rotlichtlampe	Philips, Hamburg, Deutschland
Durapore™ 1.25cm x 9.14m	3M, St. Paul, USA
26 Gauche Einmal-Insulin-Kanüle, Sterican®	B. Braun Melsungen, Melsungen, Deutschland
Binokular	Leica, Solms, Deutschland

2.3 Puffer und Lösungen

2.3.1 Chemikalien und Puffer

Tabelle 4: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	
37% HCL (rauchend)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aceton	Mallinckroth Baker, Phillipsburg, USA
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Chloroform	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Glyzerin	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Neo-Clear®	Merck, Darmstadt, Deutschland
phosphatgepufferte Salzlösung- (PBS-) Tabletten	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Pikrinsäure	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
PonceauS-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Roti®-Load1 (4x)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
<i>sodium dodecylsulfate</i> (Natriumdodecylsulfat, SDS)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Base	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Tabelle 5: Übersicht über verwendete Puffer.

Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>phosphate buffered saline</i> , PBS)	
PBS Tablette	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
in Wasser	
Trisgepufferte Salzlösung (<i>Tris buffered saline</i> , TBS) (x)	
TRIS Base	50mM
NaCl	150mM
Trisgepufferte Salzlösung -Tween 20 (TBS-T)	
TBS	1x
Tween 20	0.1% (v/v)

2.4 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Tabelle 6: Geräte und Verbrauchsmaterialien.

Geräte	
Abzug	Köttermann, Uetze/Hänigsen, Deutschland
GFL Schüttelinkubator 3033	GFL, Burgwedel, Deutschland
Homogenisator FastPrep FP 120	Thermo Scientific, Rockford, USA
pH-Meter	Mettler-Toledo, Giessen, Deutschland
Präzisionswaage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Thermomixer Comfort/Compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer	IKA®-Werke, Staufen, Deutschland
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gebrauchsmaterialien	
Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Falconröhrchen	BD Biosciences, NJ, USA
Kunststoffpipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Lysis Matrix D	MP Biomedicals, Solon, USA
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Quarzküvetten	Hellma, Müllheim, Deutschland

2.5 Genexpressionsanalysen

2.5.1 Isolation der RNA

Die Gewebestücke wurden in *Lysis Matrix D* Gefäße gegeben und mit 600µl RNazol versetzt. Anschließend wurden die Proben bei Stufe 4 des Fast Prep Gerätes für 20 Sekunden homogenisiert und weitere 400µl RNazol zugegeben. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis wurden die Proben für weitere 30 Minuten bei 4°C geschüttelt und im Anschluss das Homogenat in ein 1.5ml Reaktionsgefäß überführt. Nach einer weiteren Inkubation auf Eis (5 Minuten) und einem Zentrifugationsschritt bei 14000 Umdrehungen pro Minute (UpM) bei 4°C wurde der klare Überstand in ein neues 1,5ml Reaktionsgefäß überführt, mit der gleichen Menge Isopropanol versetzt und über Nacht bei -20°C gefällt. Die Probe wurde 30 Minuten bei 14000 UpM pelletiert, der Überstand dekantiert und das entstandene RNA-Pellet zweimal mit 80%igen Ethanol gewaschen. Der Überstand wurde abgenommen und das RNA-Pellet ca. 30min luftgetrocknet. Anschließend wurde die Probe mit DEPC-H₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.5.2 Messung der isolierten RNA

Die Bestimmung der Qualität und Konzentration der isolierten RNA wurde mit dem *2100 Bioanalyzer* (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) durchgeführt. Durch diese Technologie ist zum einen die Bestimmung des Verhältnisses 28S/18S-RNA möglich. Zum anderen kann degradierte RNA identifiziert werden und stellt damit eine Qualitätskontrolle dar.

2.5.3 Reverse-Transkription (RT)

Nach der Bestimmung der RNA-Konzentration wurden die Proben auf 125ng/µl verdünnt. Zur Umschreibung der RNA in cDNA wurden 500ng der Probe eingesetzt und mit dem *Mastermix (High Capacity cDNA Reverse Transcription KIT; ABI Applied Bioscience, Carlsbad, USA)* vermengt. Die Proben wurden zunächst bei 42°C inkubiert und die Enzymreaktion anschließend für 5 Minuten bei 95°C inaktiviert.

Zur Kontrolle der RT wurde eine Negativprobe ohne RNA mitgeführt. Nach Abschluss des Umschreibevorganges wurden die Proben aliquotiert und bis zur weiteren Nutzung bei -20°C gelagert.

2.5.4 Quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion (quantitative real time polymerase chain reaction; qRT-PCR)

Die relative Genexpression ausgewählter Gene wurde mittels qRT-PCR bestimmt. Es wurde folgender Reaktionsansatz verwendet (Angaben entsprechen einem Ansatz):

SYBR Green:	12.5µl
Aqua bidest.:	5.5µl
Primer FW:	1.0µl
Primer RV:	1.0µl
cDNA-Probe (2ng/µl):	5.0µl

Dieser Reaktionsansatz wurde im Doppelansatz in eine 96-Lochplatte pipettiert, bei 4°C zentrifugiert und anschließend die qRT-PCR, mittels 7300 Real Time PCR System, ABI, durchgeführt.

Die mRNA-Konzentration wurde mittels Standardkurve errechnet und auf die mRNA Menge des Referenzgenes Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) normalisiert.

2.5.5 Verbrauchsmaterialien für die Genexpressionsanalysen

Tabelle 7: Übersicht über die Oligonukleotide (Primer) der in dieser Arbeit untersuchten Gene.

Gen	Primersequenz (5'→3')	Amplifikatlänge (bp)	Primer-verhältnis
ANP	FW: CCT GTG TAC AGT GCG GTG TC	79	1:1
	RV: CCT CAT CTT CTA CCG GCA TC		
BNP	FW: GCA CAA GAT AGA CCG GAT CG	81	1:1
	RV: CAG GCA GAG TCA GAA ACT GGA		
CTGF	FW: TTC CCG AGA AGG GTC AAG CT	130	1:1
	RV: TTG GGT CTG GGC CAA ATG T		
HPRT	FW: GCT TTC CCT GGT TAA GCA GTA CA	76	1:1
	RV: ACA CTT CGA GAG GTC CTT TTC AC		
col1a2	FW: TGT AAA CAC CCC AGC GAA GAA	136	3:1
	RV: CTG AGT TGC CAT TTC CTT GGA		
col3a1	FW: CTC ACC CTT CTT CAT CCC ACT CTT A	117	1:1
	RV: ACA TGG TTC TGG CTT CCA GAC AT		
MMP2	FW: TAC GAT GAT GAC CGG AAG TG	154	1:1
	RV: GGA AGT TCT TGG TGT AGG TG		
βMHC	FW: CAA AGG CAA GGC AAA GAA AG	80	1:1
	RV: TCA CCC CTG GAG ACT TTG TC		
TGFβ1	FW: CCA AGG AGA CGG AAT ACA GG	135	1:1
	RV: GTT CAT GTC ATG GAT GGT GC		
TGFβ2	FW: TAC TGC AGG AGA AGG CAA GC	139	1:1
	RV: TAG AAA GTG GGC GGG ATG		
TIMP1	FW: GCA AAG AGC TTT CTC AAA GAC C	75	1:3
	RV: AGG GAT AGA TAA ACA GGG AAA CAC T		
TIMP2	FW: CCT CTG TGA CTT CAT TGT GC	175	1:1
	RV: TGA TGC TCT TCT CTG TGA CC		

Tabelle 8: Verwendete Chemikalien und Geräte für die RNA-Aufarbeitung und cDNA-Synthese.

RNA-Aufarbeitung und cDNA-Synthese	
RNAzol B	Biozol, Eching, Deutschland
2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, USA
DNA Ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
Master Cycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	ABI Applied Bioscience, Carlsbad, USA
POWER SYBR®Green, PCR Master Mix	ABI Applied Bioscience, Carlsbad, USA
MicroAmp™ Optical 96-well Reaction Plate	ABI Applied Bioscience, Carlsbad, USA
MicroAmp™ Optical Adhesive Film	ABI Applied Bioscience, Carlsbad, USA
7300 Real Time PCR System	ABI Applied Bioscience, Carlsbad, USA

2.6 Proteinanalysen

2.6.1 Isolation der Proteine

Zur Isolierung der Proteine wurde das Gewebe zunächst in *Lysis Matrix D* Gefäße überführt und mit eiskaltem Proteinlysispuffer (Tabelle 9) versetzt. Im Anschluss an die Zerkleinerung im Homogenisator (FastRrep FP120, Thermo Scientific), wurde den Proben 10% SDS zugesetzt. Einer 20 minütigen Lyse auf Eis folgte eine Zentrifugation von 10 Minuten. Der Proteinüberstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Mittels *BCA Protein Assay Kit* wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Dafür wurden 20µl der Probe mit dem Reaktionsgemisch des Kits vermengt (300µl, Reagenz A: Reagenz B 50:1) und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 550nm gemessen.

Tabelle 9: Verwendete Chemikalien und Geräte zur Proteinaufarbeitung und Proteinkonzentrationsbestimmung.

Proteinlysispuffer	
Tris, pH 7.5	10mM
NaCl	140mM
EDTA	1mM
Glycerin	25%
SDS	0.50%
Nonident P-40	0.50%
Protein Inhibitor Cocktail	100ng/µl
Proteinaufarbeitung	
Nonidet P40	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Protein Inhibitor Cocktail	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Bestimmung der Proteinkonzentration	
BCA Protein Assay Kit	Thermo Schientific, Rockford, USA

2.6.2 Gelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine entsprechend ihrem Molekulargewicht wurden sowohl 8%-ige, als auch 10%-ige SDS-Trenngele gegossen (Tabelle 10). Nachdem diese auspolymerisiert waren, wurden diese mit einer 5%-igen Sammelgellösung (Tabelle 11) überschichtet. Die für fünf Minuten bei 95°C denaturierten Proben wurden, zusammen mit einer Standardkurve und dem Marker, unter Elektrophoresepuffer (Tabelle 12) aufgetragen.

Die Gelelektrophorese wurde bei 4°C zunächst bei 80V gestartet und nach 30 Minuten für 1,5 Stunden auf 100V erhöht.

Tabelle 10: Gelvolumen für die eingesetzten Trenngele.

Lösung	für 15ml Gelvolumen (ml)	
H ₂ O	6.9	8%
30% PAA	4.0	
1.5M Tris (pH8.8)	3.8	
10%SDS	0.15	
10% APS	0.15	
TEMED	0.009	
H ₂ O	5.9	10%
30% PAA	5.0	
1.5M Tris (pH8.8)	3.8	
10%SDS	0.15	
10% APS	0.15	
TEMED	0.006	

Tabelle 11: Gelvolumen für das 5%ige Sammelgel.

Lösung	für 6ml Gelvolumen (ml)	
H ₂ O	4.100	5%
30% PAA	1.000	
1.5M Tris (pH8.8)	0.750	
10%SDS	0.060	
Pyronin Y	0.012	
10% APS	0.060	
TEMED	0.006	

Tabelle 12 Puffer für Elektrophorese und Western Blot (Semi-Dry-System).

5l Elektrophoresepuffer (5x)	
Glyzin	250mM
TRIS Base	25mM
10% SDS	3.5mM
Transferpuffer	
Glyzin	193.7mM
TRIS Base	25mM
Methanol	20%

2.6.3 Western Blot (Halbtrockenverfahren, engl. Semi-Dry-System)

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine mit Hilfe des *Semi-Dry-Systems* auf eine Nitrozellulosemembran (*Hybond ECL*, GE Healthcare, Fairfield, USA) übertragen. Dafür wurde die Membran zunächst fünf Minuten in Wasser aktiviert. Anschließend wurde diese zusammen mit dem SDS-Trenngel in Transferpuffer äquilibriert (Tabelle 12). Membran und Gel wurden zwischen, mit Transferpuffer angefeuchtetes *Whatman*-Papier gelegt. Der für den Transfer angelegte Strom betrug $1\text{mA}/1\text{cm}^2$. Bei einer Gelgröße von etwa $16\text{cm} \times 6\text{cm} = 96\text{cm}^2$ wurde der Transfer bei 100mA pro Gel durchgeführt.

Im Folgenden wurden die Membranen mit Ponceau-Rot (Tabelle 14) gefärbt, welches unspezifisch und reversibel an die Proteine bindet. Die Gele wurden mit Coomassie Blau (Tabelle 14) gefärbt. Beide Methoden dienen zur Überprüfung des Transfers.

Tabelle 13: Geräte für den Western Blot (Semi-Dry-System).

Geräte Western Blot	
Gießstände	Bio-Rad, Hercules, USA
Kämme	Bio-Rad, Hercules, USA
Nitrozellulosemembran <i>Hybond ECL</i>	GE Healthcare, Fairfield, USA

Tabelle 14: Färbelösungen für Nitrozellulosemembran und SDS-Gele.

Ponceau-Rot	
Ponceau S	0.1% (w/v)
Essigsäure	5% (v/v)
Coomassie-Lösung (1l)	
Coomassie Brilliant Blue	0.25g
Methanol	40%
Eisessig	10%
in Wasser	
Coomassie-Entfärber (1l)	
Eisessig	10%
Methanol	40%
in Wasser	

2.6.4 Antikörperhybridisierung und Proteindetektion

Die Nitrozellulosemembranen wurden zunächst eine Stunde mit Blocking Lösung (Tabelle 15) inkubiert. Entsprechend des zu detektierenden Proteins folgte der Primärantikörper (Tabelle 16). Nach dreimaligem Waschen für je 10 Minuten in TBS-T wurden die Membranen eine Stunde mit dem Sekundärantikörper inkubiert und die Waschschritte wiederholt.

Tabelle 15: Zusammensetzung der Blocking Lösung.

Blocking Lösung	
Milchpulver	5%
in TBS-T (1x)	

Tabelle 16: Übersicht über die eingesetzten Antikörper (AK) für Western blot.

AK = Antikörper, Konz. = Konzentration, kDA = Kilo Dalton, RT = Raumtemperatur, üN = über Nacht

Protein	Firma 1. AK	Konz. 1. AK	2. AK	Firma 2.AK	Konz. 2. AK	Protein- größe (kDa)
β-Actin	Santa Cruz	1:2500 (1h RT)	Donkey anti rabbit	Dianova	1:15000 (1h RT)	43
TIMP1 (H-150)	Santa Cruz	1:200 (üN)	Donkey anti rabbit	Dianova	1:10000 (1h RT)	22
TIMP2 (H-140)	Santa Cruz	1:200 (üN)	Donkey anti rabbit	Dianova	1:10000 (1h RT)	21

Die Detektion erfolgte mit *ECL Western Blotting Detection Reagents* (GE Healthcare, Fairfield, USA). Die Detektionsdauer des Chemoluminiszenzsignales betrug zwischen 10 und 45 Minuten.

Tabelle 17: Übersicht über die für Gelelektrophorese, Western Blot und Proteindetektion benötigten Chemikalien.

Gele	
ECL Western Blotting Detection Reagents	GE Healthcare, Fairfield, USA
Autoradiographiefilm	Kodak, Stuttgart, Deutschland
Chemoluminiszenzscanner Cubix 60	Agfa, Köln, Deutschland

2.6.5 Stripping Prozedur

Nach der Detektion wurden die Membranen für die weitere Benutzung vorbereitet. Dafür wurden sie zunächst mit Stripping Puffer (Tabelle 18) für 30 Minuten bei 50°C im Schüttelinkubator aufbewahrt. Im Folgenden wurden die Membranen bei 4°C über Nacht mit Blocking Lösung (Tabelle 15) inkubiert, um die unspezifischen Bindungen zu blocken.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Stripping Puffers.

Stripping Puffer	
Glycin	25mM
SDS	3.5mM
pH 2 mit 37%iger Schwefelsäure einstellen	
in millipore Wasser	

2.6.6 Auswertung der Western Blots

Die Auswertung der Western Blots wurde mit dem Programm *Alpha EaseFC™* durchgeführt. Dafür wurden die entwickelten Filme zunächst eingescannt und die Proteinbanden markiert. Die Kalkulation der Intensität der jeweiligen Bande erfolgt durch das Programm. Die

ermittelten Intensitäten des zu untersuchenden Proteins wurden dann ins Verhältnis zum Referenzprotein β -Actin gesetzt.

2.7 Histologie

Die für die Histologie vorgesehenen Gewebestücke wurden in *Frozen Section Medium* eingebettet und 5 μ m dicke Gefrierschnitte angefertigt. Diese wurden auf einen Objektträger überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Tabelle 19: Übersicht über die für Histologie verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Verbrauchsmaterialien	
Deckgläser f. Mikroskopie (24x50mm)	R. Langenbrinck Labor-& Medizintechnik, Emmendingen, Deutschland
Jung Frigocut 2800E	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica CTR MIC	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Leica DM IRE2	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
Q Imaging Retiga 1300	Q Imaging, Surrey, Kanada
SUPER PAP PEN	Invitrogen Corporation, Camarillo, USA
Thermo Scientific, Superfrost® Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig, Deutschland

2.7.1 WGA (Wheat germ agglutinin) Färbung

Die Gefrierschnitte wurden vor der Färbung 20 Minuten bei Raumtemperatur gelagert und anschließend mit einem Fettstift umrandet. Zunächst wurde eine Stunde mit *Donkey* Serum geblockt. Eine zweistündige Inkubation mit dem Fluoresceinisothiocyanat- (FITC-) markierten Antikörper in der Dunkelkammer schloss sich daran an. Anschließend wurden die Schnitte für 3 Minuten mit 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) behandelt. Nach drei Waschschrinen für je fünf Minuten mit PBS Puffer wurden die Schnitte mit VectaShield® Mounting Medium für Fluoreszenzmikroskopie eingedeckt. Bis zum weiteren Gebrauch am Fluoreszenzmikroskop wurden die Schnitte im Dunkeln bei -20°C gelagert.

Tabelle 20: Übersicht über die für die WGA Färbung benötigten Materialien.

WGA Färbung	
Donkey Serum	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
<i>Fluorescein wheat germ agglutinin</i> Antikörper	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
VectaShield® Mounting Medium for Fluorescence, H-1000	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
DAPI (1:50 000)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.7.2 Auswertung der Bilder der WGA Färbung

Zur Bestimmung der Myozytengröße wurden zehn Bilder pro Schnitt mit einem Fluoreszenz Mikroskop (Leica) in 20-facher Vergrößerung aufgenommen. Jeder Ausschnitt wurde zweimal entsprechend des Anregungsspektrums der Färbungen fotografiert. Die Aufnahmen erfolgten für das FITC-markierte Areal bei einer Wellenlänge von 530nm, für den DAPI-markierten Bereich bei 460nm. Anschließend wurden die Aufnahmen übereinandergelegt. Die Zellwände wiesen, der FITC-Färbung entsprechend, eine grüne Farbe auf, während die Zellkerne aufgrund von DAPI-Färbung blau eingefärbt wurden.

Die Vermessung der Myozyten erfolgte mit dem Programm *Axio Vision Rel. 4.7*. Es wurden nur Zellen mit einem annähernd runden Umfang und einem sichtbaren Zellkern vermessen.

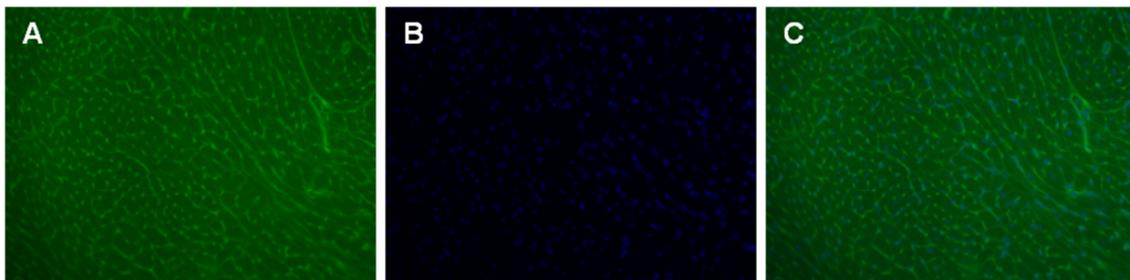


Abbildung 8: Beispiel einer WGA-Färbung.

A: FITC-Färbung der Zellmembranen, B: DAPI-Färbung der Zellkerne, C: Overlay. SOVX = Scheinovariektomie, OVX = Ovariectomie, Plac = Placebo, E2 = Östradiol, ER α = Östrogenrezeptor α Agonist, ER β = Östrogenrezeptor β Agonist, Ralox = Raloxifen, STAC = Schein-TAC, TAC = transversale Aortenkonstriktion

2.7.3 Sirius Rot Färbung

Zur Bestimmung des Gesamtkollagengehaltes wurde die Sirius Rot Färbung angefertigt. Bei dieser Färbemethode stellen sich die kollagenen Fasern rot, das übrige Gewebe gelb dar. Die Schnitte wurden zunächst für zehn Minuten in Aceton fixiert und anschließend für je 10 Minuten einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 70%) behandelt. Die Färbung erfolgt eine Stunde unter Schütteln bei Raumtemperatur in Sirius Rot Lösung. Im Anschluss wurden die Schnitte für fünf Minuten in 0,1%iger Essigsäure gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80%, 96% für je drei Minuten und 100% für zweimal drei Minuten) und zehn Minuten in Xylol entwässert. Abschließend wurden die Schnitte mit *VectaMount™ permanent mounting medium* eingedeckt.

Tabelle 21: Chemikalien für die Sirius Rot Färbung.

Sirius Rot Färbung	
Aceton	
70%, 80%, 96%, 100% Ethanol	
0.1% Essigsäure	
Sirius Rot Lösung	
Xylol	
Sirius Rot Lösung	
1,2% gesättigte, wässrige Pikrinsäure	8g Pikrin in 250ml heißen Aqua bidest.
0.1% Sirius Red Lösung	0.2g Sirius Red (Pulver) in 200ml Pikrinsäure

2.7.4 Auswertung der Bilder der Sirius Rot Färbung

Die Auswertung der histologischen Bilder erfolgte mit Hilfe des Programms *ImageJ* und mittels eines für die Auswertung geeigneten Makros. Es wurden zunächst zwei identische Bilder geöffnet, wovon eines in 8-bit (schwarz-weiß Aufnahme) konvertiert wurde (Abbildung 9A und B). Mit Hilfe der Option für das Festlegen des *Thresholdes* (Schwellenwert) werden die dunklen Bereiche (kollagene Fasern) rot eingefärbt. Der Schwellenwert wurde so eingestellt, dass die roten Bereiche des 8-bit Bildes mit denen des Originalbildes übereinstimmen (Abbildung 9C). Der angegebene Wert entspricht der Teilfläche und wurde notiert. Anschließend wurde diese Vorgehensweise für die Gesamtfläche wiederholt. In diesem Fall wurde der Schwellenwert so weit festgelegt, dass das Bild, mit Ausnahme des durch Geweberisse sichtbaren Hintergrundes, komplett rot eingefärbt war (Abbildung 9D). Auch dieser Schwellenwert wurde notiert. Die Methodik wurde für 30% aller angefertigten Bilder wiederholt. Der Gesamtkollagengehalt wurde mit folgender Formel berechnet:

$$\text{Gesamtkollagen [\%]} = \left[\frac{\text{Teilfläche}}{\text{Gesamtfläche}} \right] * 100$$

Formel 8: Gesamtkollagengehalt in %.

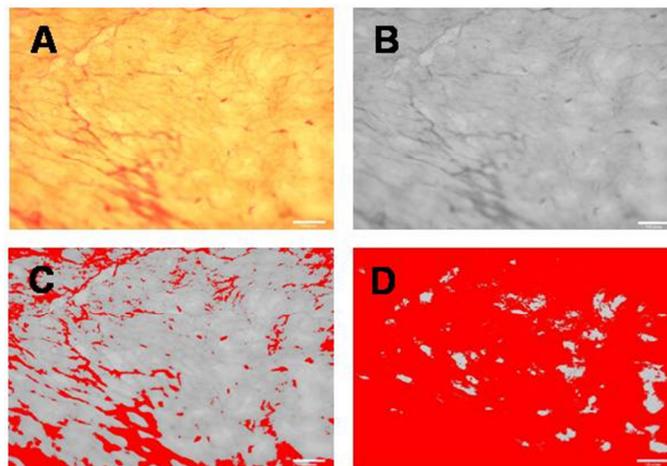


Abbildung 9: Auswertung der Sirius Rot Färbung mit Hilfe des Programms ImageJ.

A: Beispiel einer Sirius Rot Färbung. Die kollagenen Fasern stellen sich rot, das übrige Gewebe gelb dar. B: Für die Auswertung mit *ImageJ* wird das Bild in 8bit konvertiert. C: Der untere Schwellenwert wird so gesetzt, dass sich die kollagenen Fasern in dem 8bit Bild rot darstellen. D: Der obere Schwellenwert färbt das vollständige Gewebe, mit Ausnahme des Hintergrundes, rot ein.

2.7.5 Färbung der Kollagene 1 und 3 und der MMPs 2 und 9

Um die histologischen Präparate zu fixieren, wurden diese zunächst zweimal 10 Minuten in Neoclear® gegeben. Anschließend folgten eine Inkubation von 5 Minuten in Millipore Wasser, von 30 Minuten in 0.3%igen Wasserstoffperoxid (H₂O₂) und von 5 Minuten in 1x PBS. Unspezifische Bindungen wurden dann in einer Stunde Inkubation mit Blocking Lösung (Tabelle 22) geblockt. Im Anschluss wurden die histologischen Schnitte eine Stunde mit dem ersten Antikörper (Tabelle 22) inkubiert und im Folgenden für 5 Minuten mit PBS gewaschen. Während dessen wurde die ABC-Lösung (Tabelle 22) vorbereitet, da diese 30 Minuten bei Raumtemperatur gelagert werden muss. Dem Waschen folgten jeweils 30 Minuten Inkubation mit dem 2. Antikörper und mit ABC-Lösung. Nach einem weiteren Waschschrift inkubierten die Schnitte 3 Minuten mit DAB-Lösung (Tabelle 22). Der nächste Waschschrift erfolgte für 5 Minuten in Millipore Wasser, bevor die Gegenfärbung mit Hämalaun und das bläuen mit Leitungswasser erfolgte.

Abschließend wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mit *VectaMount™ permanent mounting medium* eingedeckt.

Tabelle 22: Übersicht über die für die Färbung der Kollagene 1 und 3 und für die MMP2 und 9 verwendeten Reagenzien.

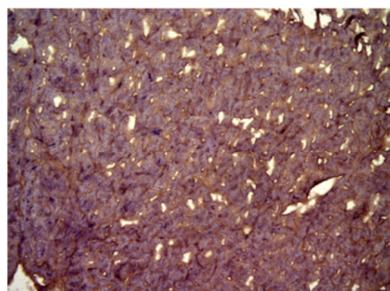
Blocking Lösung	
10mM PBS, pH 7.4	9400µl
goat Serum	300µl
Bovines Serumalbumin (BSA)	300µl
1. Antikörper	
Col1A2 1:250 in PBS	
Col3A1 1:250 in PBS	
MMP2 1:50 in PBS	
MMP9 1:50 in PBS	
2. Antikörper	
10mM PBS, pH 7.4	10 000µl
goat Serum	150µl
biotynlierter Antikörper (1:200)	
Vectastain Reagent (ABC-Lösung)	
Reagent A	100µl (2 Tropfen)
PBS	5000µl
Reagent B	100µl (2 Tropfen)
DAB-Lösung	
Millipore H ₂ O	5000µl
Buffer Stock Solution	2 Tropfen
DAB Stock Solution	4 Tropfen
H ₂ O ₂ Solution	2 Tropfen

Tabelle 23: Übersicht über die für die Färbung der Kollagene 1 und 3 und der MMPs 2 und 9 verwendeten Materialien.

Kollagen- /MMP- Färbung	
<i>Peroxidase Substrate Kit</i> , DAB	Vector Laboratories, Inc. Burlingame, USA
<i>Vectastain ABC Kit</i>	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
<i>VectaMount™ permanent mounting medium</i>	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA
<i>Albumin Solution from bovine serum</i> , 35%	Sigma Aldrich
<i>Normal goat serum</i>	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
Col1A2 Antikörper (sc28654)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
Col3A1 Antikörper (sc28888)	Santa Cruz, Santa Cruz, USA
MMP2 Antikörper (ab7032)	Abcam plc, Cambridge, UK
MMP9 Antikörper (ab38898)	Abcam plc, Cambridge, UK
anti-rabbit biotynilierter Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA
anti-mouse biotynilierter Antikörper	Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, USA

2.7.6 Auswertung der Färbung der Kollagene 1 und 3 und der MMPs 2 und 9

Für die Auswertung der Kollagen- und MMP-Färbungen wurden zunächst mindestens zehn Aufnahmen in 20-facher Vergrößerung pro Schnitt angefertigt. Die Bestimmung der Kollagen- bzw. MMP-Akkumulation wurde mit Hilfe von *Photoshop CS4* durchgeführt. Dafür wurde für jedes Bild der Farbbereich zunächst so gewählt, dass die braungefärbten Proteine durch das Programm markiert wurden. Die Pixel wurden automatisch gezählt und in einer Excel-Tabelle vermerkt (Teilfläche). Anschließend wurde die Prozedur wiederholt. In diesem Fall war der Farbbereich der Hintergrund, der dann von der Gesamtfläche abgezogen wurde. Die Teilfläche wurde ins Verhältnis zur Gesamtfläche gesetzt und so der Anteil der zu untersuchenden Proteine kalkuliert.

**Abbildung 10: Immunhistochemische Färbung, beispielhaft für Col1a2.**

Braune Bereiche: Col1a2, violette Bereiche: Gegenfärbung mit Hämalaun (Cytosol und Kerne)

2.8 Statistische Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikpakets PASW 18.0. Die Graphen wurden mit Sigma Plot 11.0 oder PASW 18.0 angefertigt (Tabelle 24).

Um die aus den echokardiographischen Daten berechnete LVM anhand der gewogenen Herzmuskelmasse zu validieren, wurde der Korrelationskoeffizient nach Bravais-Pearson herangezogen. Ein signifikanter Zusammenhang wurde bei p-Werten kleiner als 0.05 angenommen und damit die Qualität der echokardiographischen Aufnahmen überprüft.

In einem ersten Schritt wurden globale Determinanten für Hypertrophie und Funktion, sowie deren funktionale und temporale Abhängigkeit von Ovariectomie-/Östrogen-Behandlung untersucht. Dafür wurden zunächst die wichtigsten Echokardiographievariablen in eine Faktorenanalyse⁹⁵ eingeschlossen. Die Faktorenanalyse ermöglicht als statistisches Modell eine Vereinfachung komplexer Zusammenhänge, indem aus mehreren Variablen eine neue Variable, welche als Faktor bezeichnet wird, generiert wird. Hierbei handelt es sich daher um ein dimensionsreduzierendes Verfahren. Bei der Faktorenanalyse werden die korrelative Struktur der Daten untersucht und hoch korrelierende Variablen zu Faktoren zusammengefasst. Die Korrelation zwischen den Variablen wird als Faktorladung bezeichnet und gibt nicht nur Auskunft über das Ausmaß der Korrelation, sondern lässt sich auch inhaltlich auf die Art der Veränderung interpretieren. Im zweiten Schritt wurde eine Rangvarianzanalyse nach Friedman⁹⁶ für jede der zu untersuchenden Gruppen durchgeführt. Dieser Test ermöglicht die Untersuchung zeitlicher Veränderungen der ermittelten Faktoren innerhalb einer Gruppe. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte mit Hilfe von Liniendiagrammen.

Im Folgenden wurde der Einfluss von Ovariectomie bzw. Östrogenbehandlung auf verschiedene echokardiographische, morphometrische und molekulare Marker für MH mit einer einfaktorischen Varianzanalyse (*analysis of variance*, ANOVA) untersucht⁹⁶. Im Fall, dass der F-Test für das Gesamtmodell ein signifikantes Ergebnis erbracht hat, wurden Post Hoc multiple Vergleiche nach Scheffé (Behandlung vs. Behandlung) oder Dunnett (Behandlung vs. Placebo) vorgenommen. Die graphische Darstellung erfolgte in Säulendiagrammen. Alle Werte im Text, den Abbildungen und Tabellen sind als Mittelwert \pm Standardfehler (*standard error of the mean*, SEM) angegeben.

2.9 Software

Tabelle 24: Übersicht über die, für die Anfertigung der Arbeit, benötigte Software.

Software	
ABI7300 System Software	ABI
AlphaEaseFC™ 3.1.2	Alpha Innotech Corporation (CA, USA)
AxioVision Rel 4.7.2	Carl Zeiss Imaging Solutions GmbH
EndNote X3	Thomson ISI research
ImageJ 1.40g	Wayne Rasband, National Institute of Health (USA)
Microsoft Office 2007	Microsoft (USA)
Photoshop 7.0	Adobe Systems Incorporated (CA, USA)
Sigma Plot 11.0	Systat Software Inc. (Richmont, CA, USA)
PASW 18.0	SPSS Inc. (Chicago, IL, USA)
Vevo 770 V2.3.0/3.0.1	VisualSonics (Toronto, Canada)

3. Ergebnisse

3.1 Validierung der Wirksamkeit von Ovariectomie und Behandlung

Die Ovariectomie (OVX) reduzierte das Uterusgewicht signifikant. Die Applikation des ER β -Agonisten oder von Raloxifen nach OVX hatte keinen Einfluss auf das Uterusgewicht. Eine Behandlung mit E2 oder dem ER α -Agonisten führte zu einer signifikanten Gewichtszunahme der Uteri (Abbildung 11).

Tiere, in denen nicht die erwarteten Veränderungen in Bezug auf das Uterusgewicht beobachtet werden konnten (MW \pm 2-fache Standardabweichung), wurden von den weiterführenden Untersuchungen ausgeschlossen.

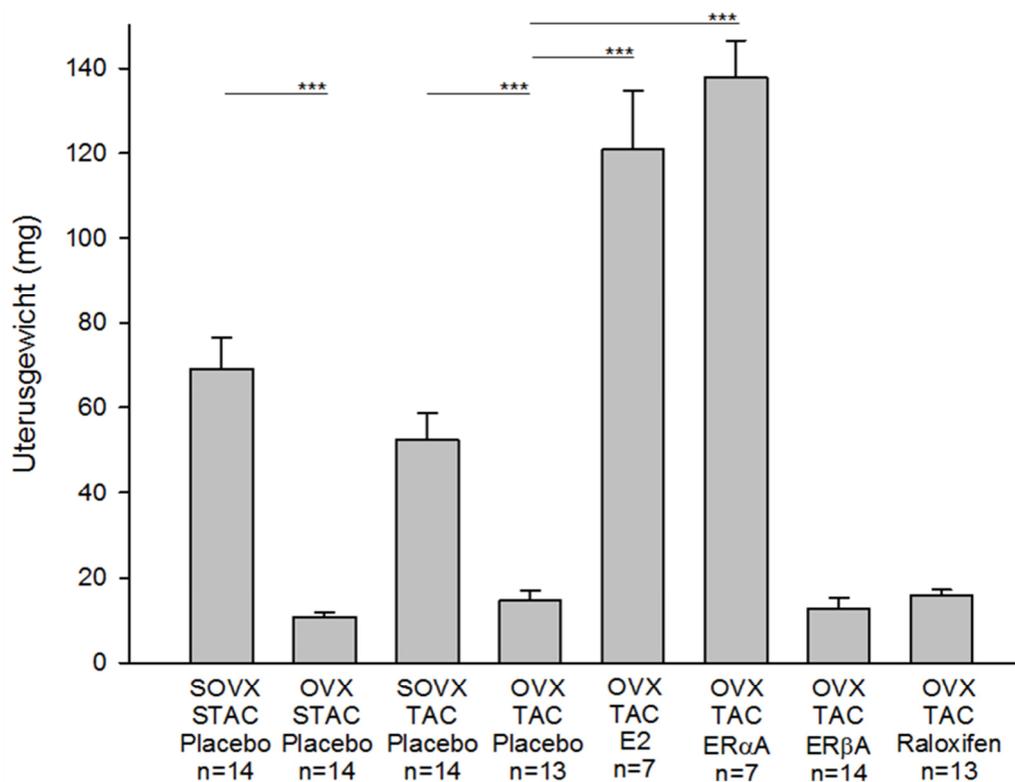


Abbildung 11: Uterusgewicht in mg elf Wochen nach Ovariectomie.

Das Uterusgewicht verringerte sich signifikant in ovariectomierten Placebo-behandelten sowie in ER β A- und Raloxifen-behandelten Tieren. Nach E2- und ER α A-Behandlung erhöhte es sich signifikant. ANOVA, Scheffé: *** p <0.001.

Für die weiterführenden Analysen wurden zwei Versuchsgruppen getrennt betrachtet. Die Placebo-behandelten Gruppen wurden zur Charakterisierung der Hypertrophie nach TAC, sowie für den Einfluss der Ovariectomie auf die Entwicklung dieser herangezogen. Die Effekte der Behandlungen wurden durch Analyse der behandelten Gruppen in Bezug auf die Placebo-behandelte ovariectomierte TAC-Gruppe untersucht.

3.2 LVM-Berechnung und Validierung anhand des Herzgewichtes

Zur Validierung der echokardiographisch ermittelten linksventrikulären Masse, und damit zur Überprüfung der Qualität der echokardiographischen Aufnahmen, wurde das Herzgewicht mit der kalkulierten Masse des linken Ventrikels korreliert. Um einen Einfluss der Ovariectomie oder der Behandlungen auszuschließen, wurden die Korrelationen mit der SOVX+Placebo+STAC-Gruppe, bzw. mit der SOVX+Placebo+TAC-Gruppe durchgeführt. In beiden Fällen zeigte sich eine signifikante Korrelation nach Pearson ($r=0.847$, $p<0.01$ für SOVX+Plac+STAC; $r=0.799$, $p<0.01$ für SOVX+Plac+TAC) (Abbildung 12A, B).

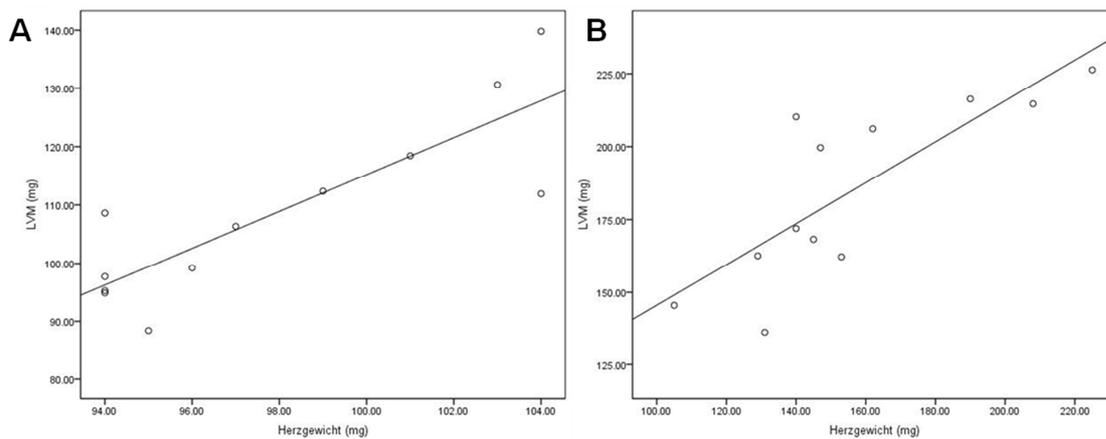


Abbildung 12: A: Korrelation HW zu LVM in der Gruppe SOVX+Plac+STAC; B: Korrelation HW zu LVM in der Gruppe SOVX+Plac+TAC.

Die LVM korrelierte sowohl in den schein-TAC operierten Tieren, als auch in den TAC- operierten Tieren signifikant mit dem Herzgewicht. Bivariate Korrelation nach Pearson, SOVX+Plac+STAC $p=0.001$; SOVX+Plac+TAC $p=0.002$.

3.3 Verifizierung der Drucklastinduktion

Die Verifikation der Drucklastinduktion erfolgte während der Echokardiographie. Die Flussgeschwindigkeit des Blutes betrug prä-TAC weniger als 100cm/s. Nach einer erfolgreichen Stenose wurden Werte von mehr als 3m/s gemessen (Abbildung 13A, B).

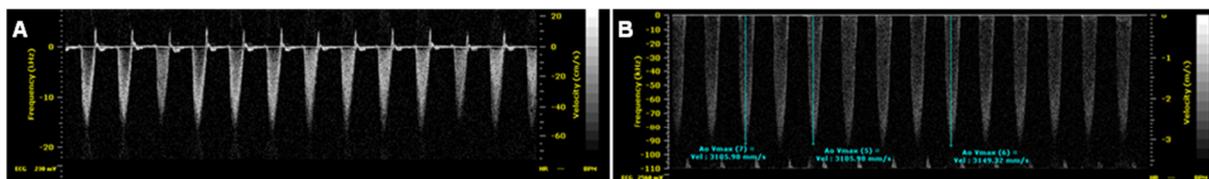


Abbildung 13: Doppleraufnahme in der deszendierenden Aorta des gleichen Tieres Prä-TAC (A) und neun Wochen Post-TAC (B).

Neun Wochen nach TAC zeigte sich eine deutliche Zunahme der Flussgeschwindigkeit im Bereich der Stenose.

Der Druckgradient p stellt einen wichtigen Parameter zur Überprüfung des Erfolges der TAC-Operation dar.

Nach Aortenkonstriktion kam es zu einem signifikanten Anstieg des Druckgradienten im Vergleich zu den STAC-Gruppen. Es konnte weder ein Effekt der Ovariectomie (Abbildung 14A), noch der medikamentösen Behandlung (Abbildung 14B) beobachtet werden.

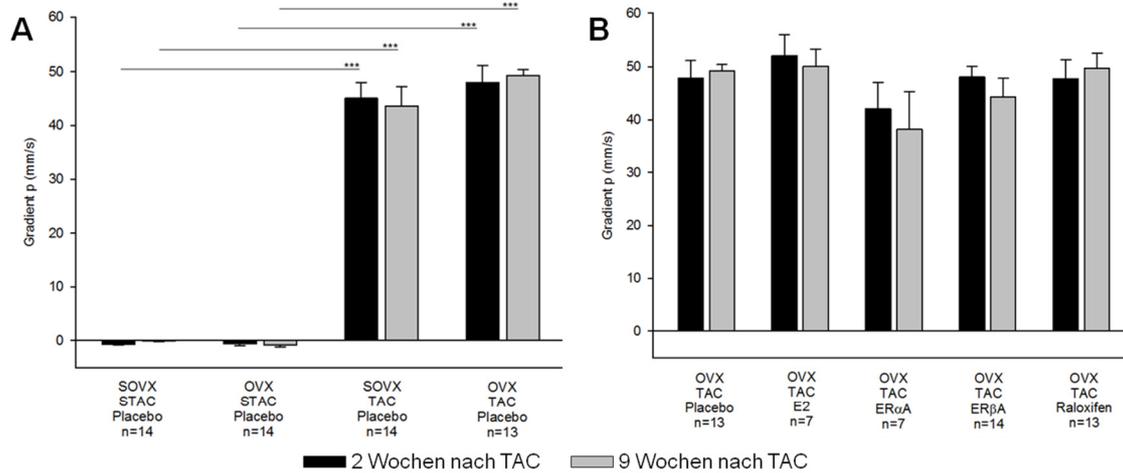


Abbildung 14: A: Druckgradient p in mm/s der Placebo-behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation; B: Druckgradient p in mm/s der behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation.

Der Druckgradient p erhöhte sich in allen TAC-operierten Gruppen, unabhängig von Ovariectomie und Behandlung. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: ***p<0.001.

3.4 Die Behandlung mit E2 und dem ER α reduziert die Überlebenswahrscheinlichkeit signifikant

Die Überlebensanalyse nach Kaplan Meier zeigte ein 100%-iges Überleben in den STAC operierten Tieren (Daten nicht gezeigt). In den TAC-operierten Gruppen war ein reduziertes Überleben nach der Operation zu verzeichnen. Die beste Überlebensrate zeigten hier die Placebo-behandelten, ovariectomierten Tiere (92.3%). Die nicht ovariectomierten TAC-operierten Tiere wiesen eine Überlebensrate von 78.9% auf. Die Unterschiede im postoperativen Überleben waren nicht signifikant (Abbildung 15).

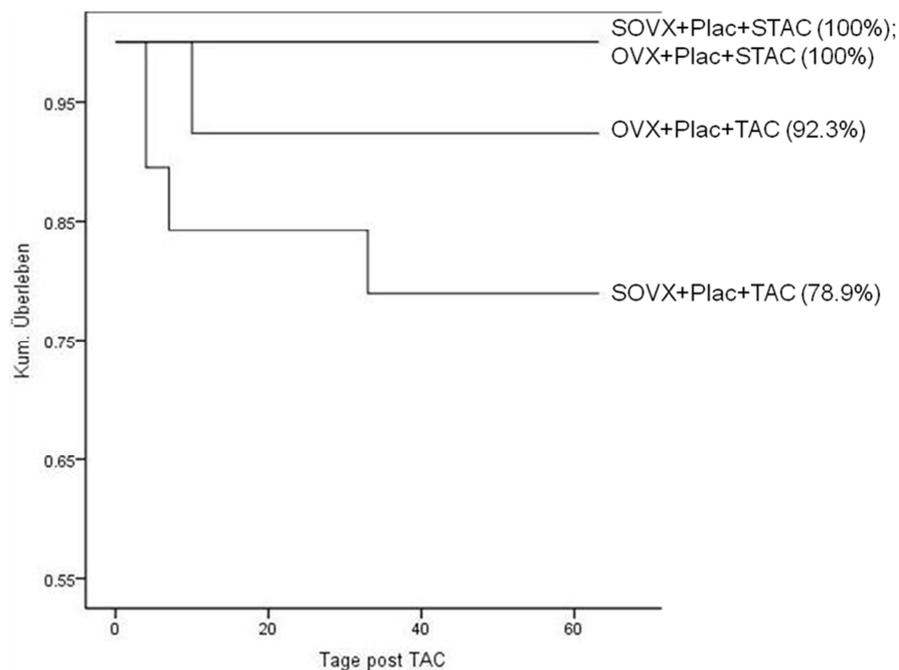


Abbildung 15: Überlebensanalyse nach Kaplan Meier.

Die TAC erhöhte die Mortalitätsrate verglichen mit den schein-TAC Tieren. Die Angaben in den Klammern entsprechen der Überlebensrate in %. Log-Rank Test: \$ $p < 0.05$ vs. OVX+Plac+TAC.

Die Behandlung mit Raloxifen (81.3%) und dem ER β A (77.8%) reduzierte das postoperative Überleben im Vergleich zu den nichtbehandelten Tieren (92.3%). Dieser Unterschied war nicht signifikant. Eine signifikant verminderte Überlebensrate wiesen die mit E2 (58.3%) und dem ER α A (53.8%) behandelten Tiere auf ($p < 0.05$, Log-Rank Test) (Abbildung 16).

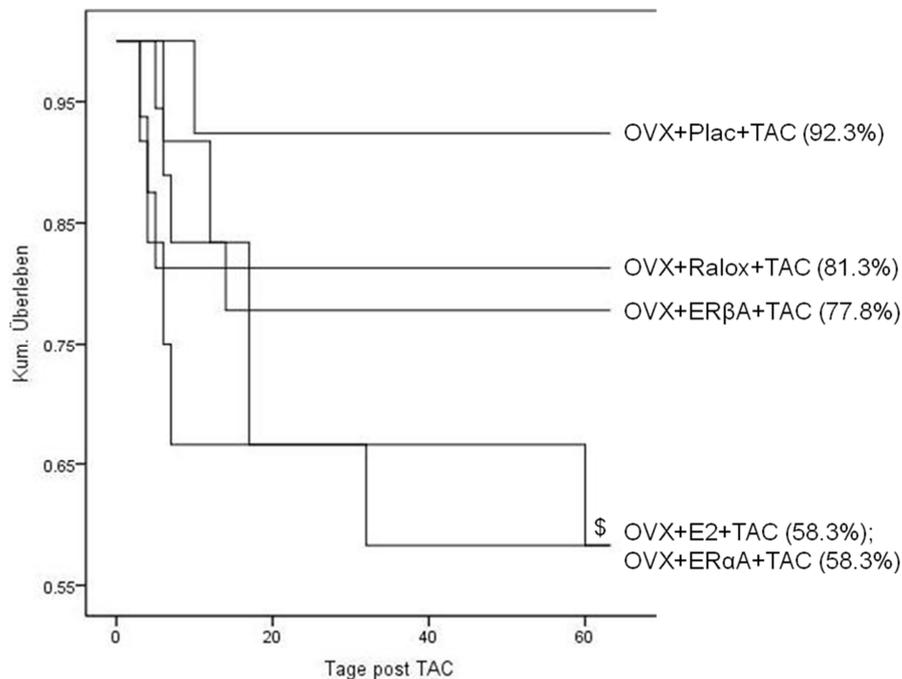


Abbildung 16: Überlebensanalyse nach Kaplan Meier.

Die Behandlung mit E2 oder ER α A reduzierte das Überleben signifikant verglichen mit den Placebo-behandelten Tieren. Die Angaben in den Klammern entsprechen der Überlebensrate in %. Log-Rank Test: \$ $p < 0.05$ vs. OVX+Plac+TAC.

3.5 Hypertrophie und Funktion

3.5.1 Die Behandlung mit E2 und ER α A verhindert signifikante Veränderungen in der LV Funktion während des Versuchszeitraumes

Die Faktorenanalyse stellt ein statistisches Modell zur Analyse der zeitlichen Veränderungen, in diesem Fall während der Entwicklung einer MH, dar.

Die Faktorenanalyse ergab zwei neue Faktoren. Die Variablen LVIDs (Faktorladung 0.974), EF (Faktorladung -0.911) und FS (Faktorladung -0.905) laden für Faktor 1. Die Faktorladung war für die Variable LVIDs positiv und für die Variablen EF und FS negativ. Inhaltlich kann damit eine LV-Dilatation und eine Verschlechterung von Pumpfunktion (EF) und Kontraktilität (FS) vorausgesagt werden. Daher wurden die beschriebenen Veränderungen im Faktor 1 im Folgenden als Zeichen der linksventrikulären Funktion inhaltlich interpretiert.

Analog fasst Faktor 2 die Variablen IVSs (Faktorladung 0.917), LVPWd (Faktorladung, 0.904), LVPWs (Faktorladung 0.891) und LVM/TL (Faktorladung 0.851) zusammen. Die

Faktorladungen waren in allen Fällen positiv, was mit einer Zunahme der Wanddicken und der Muskelmasse gleichzusetzen ist. Faktor 2 wurde im Folgenden als LV Morphologie interpretiert.

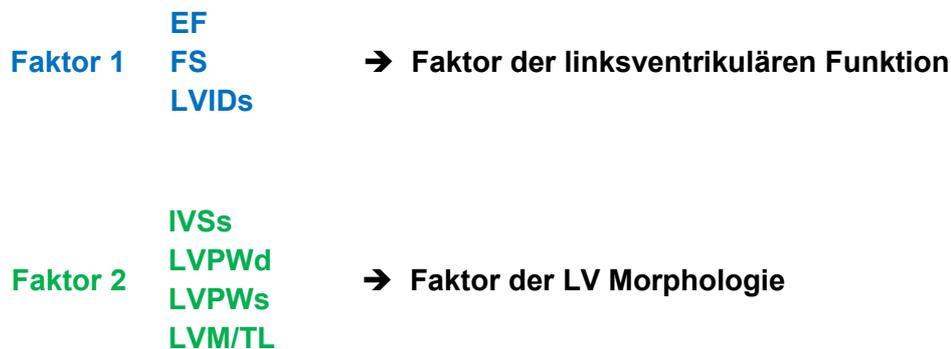


Abbildung 17: Darstellung der im Folgenden interpretierten Faktoren, ermittelt mit Hilfe der Faktoranalyse.

Im nicht-hypertrophierten Herzen (STAC-Modell) konnten im Verlauf, sowohl bei den nicht ovariektomierten als auch bei den ovariektomierten Tieren keine Änderungen der myokardialen Funktion festgestellt werden. Auch der linke Ventrikel zeigte im Verlauf keine Anzeichen für eine Veränderung in diesen beiden Gruppen (Abbildung 18A, B).

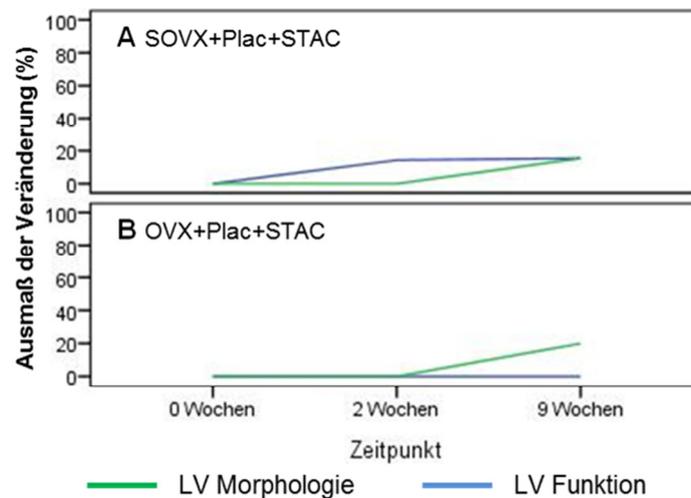


Abbildung 18: A: Faktoranalyse der Gruppe SOVX+Plac+STAC vor, zwei und neun Wochen nach TAC. B: Faktoranalyse der Gruppe OVX+Plac+STAC vor, zwei und neun Wochen nach TAC.

Grüne Linie entspricht der linksventrikulären Morphologie, blaue Linie entspricht der linksventrikulären Funktion. Angegeben ist die Ausprägung von Hypertrophie und Dysfunktion in %. Der Friedman-Test ergab keine signifikanten Veränderungen.

Im TAC-Modell dagegen kam es innerhalb des Versuchszeitraums zu einer signifikanten Zunahme der Wanddicken sowie der Muskelmasse in allen Subgruppen. Diese Änderungen fanden in den ersten zwei Wochen nach Drucklastinduktion statt. Im Zeitraum zwischen zwei und neun Wochen wurde dann eine „Plateau“-Phase erreicht, in welcher keine nennenswerten Veränderungen mehr stattfanden. Signifikante Veränderungen im Faktor LV Funktion zeigten die Entwicklung einer linksventrikulären Dekompensation während des Versuchszeitraumes (Abbildung 19A, B).

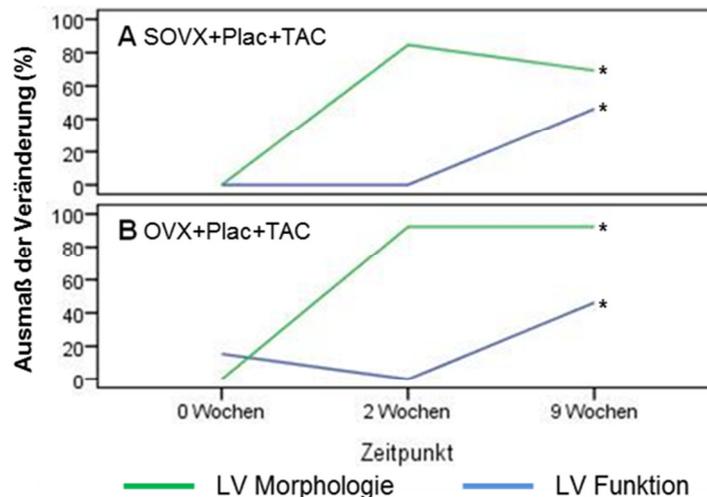


Abbildung 19: A: Faktoranalyse der Gruppe SOVX+Plac+TAC vor, zwei und neun Wochen nach TAC. B: Faktoranalyse der Gruppe OVX+Plac+TAC vor, zwei und neun Wochen nach TAC.

Grüne Linie entspricht der linksventrikulären Morphologie, blaue Linie entspricht der linksventrikulären Funktion. Angegeben ist die Ausprägung von Hypertrophie und Dysfunktion in %. Friedman-Test: * $p < 0.05$ signifikante Veränderung in der Entwicklung über den Versuchszeitraum der untersuchten Parameter.

Die Behandlung mit E2 führte zu einer signifikanten Veränderung im Faktor der linksventrikulären Hypertrophie über den gesamten Versuchszeitraum. Gleichzeitig wurden keine signifikanten Veränderungen in der LV Funktion über den Versuchszeitraum gefunden (Abbildung 20).

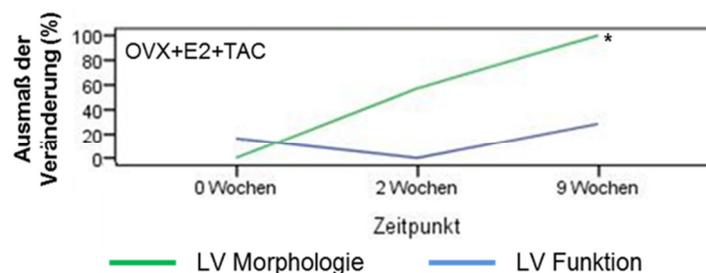


Abbildung 20: Faktoranalyse der Gruppe OVX+E2+TAC vor, zwei und neun Wochen nach TAC.

Grüne Linie entspricht der linksventrikulären Morphologie, blaue Linie entspricht der linksventrikulären Funktion. Angegeben ist die Ausprägung von Hypertrophie und Dysfunktion in %. Friedman-Test: * $p < 0.05$ signifikante Veränderung in der Entwicklung über den Versuchszeitraum der untersuchten Parameter.

Vergleichbar mit der E2-Behandlung konnte auch bei der Behandlung mit dem ER α eine signifikante Veränderung der LV Morphologie, jedoch keine signifikanten Änderungen in der LV Funktion über den gesamten Versuchszeitraum festgestellt werden (Abbildung 21).

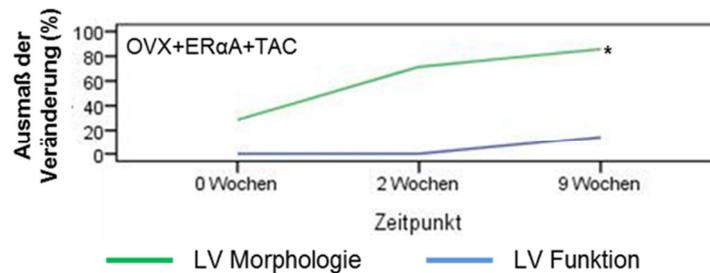


Abbildung 21: Faktoranalyse der Gruppe OVX+ER α +TAC vor, zwei und neun Wochen nach TAC.

Grüne Linie entspricht der linksventrikulären Morphologie, blaue Linie entspricht der linksventrikulären Funktion. Angegeben ist die Ausprägung von Hypertrophie und Dysfunktion in %. Friedman-Test: * $p < 0.05$ signifikante Veränderung in der Entwicklung über den Versuchszeitraum der untersuchten Parameter.

Die Behandlung mit dem ER β oder dem SERM Raloxifen verhinderte die signifikante Veränderung der LV Morphologie, sowie der LV Funktion im untersuchten Zeitraum nicht (Abbildung 22).

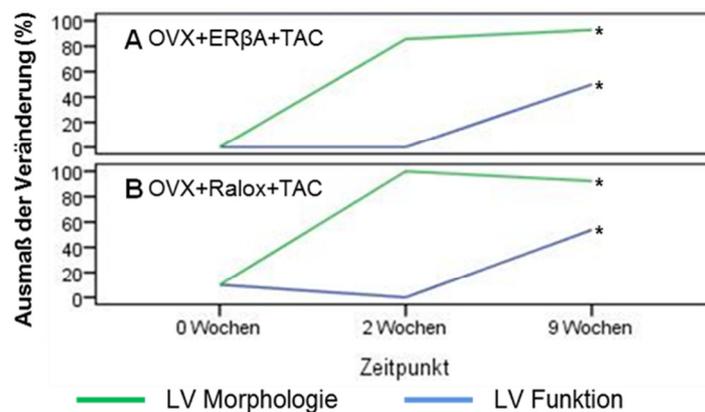


Abbildung 22: A: Faktoranalyse der Gruppe OVX+ER β +TAC vor, zwei und neun Wochen nach TAC. B: Faktoranalyse der Gruppe OVX+Ralox+TAC vor, zwei und neun Wochen nach TAC.

Grüne Linie entspricht der linksventrikulären Morphologie, blaue Linie entspricht der linksventrikulären Funktion. Angegeben ist die Ausprägung von Hypertrophie und Dysfunktion in %. Friedman-Test: * $p < 0.05$ signifikante Veränderung in der Entwicklung über den Versuchszeitraum der untersuchten Parameter.

3.5.2 Parameter der Morphologie – Die Behandlung mit E2 und dem ER α verzögert den Verlust der kardialen Funktion nach TAC

Um die aus der Faktoranalyse gewonnen Erkenntnisse zu spezifizieren und die Veränderungen, die innerhalb des Versuchszeitraumes aufgetreten sind zu charakterisieren, wurden wichtige Parameter in der Manifestation einer MH im Folgenden genauer betrachtet.

Die Masse des linken Ventrikels (LVM) wurde aus den echokardiographischen Messungen kalkuliert und zur Tibialänge (TL) normalisiert (LVM/TL).

Im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren konnte ein signifikanter Anstieg des LVM/TL-Quotienten in den Placebo-behandelten, TAC-operierten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation verzeichnet werden. Es konnte kein Effekt der Ovariectomie in Bezug auf LVM/TL festgestellt werden.

Die Behandlung mit E2 oder dem ER α reduzierte tendenziell die Hypertrophie zwei Wochen nach TAC um 19.2% bzw. 10.3% im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren. Die Behandlung mit dem ER β A oder Raloxifen hingegen verstärkte die Hypertrophie um 12.9% bzw. 10% zwei Wochen nach TAC-Operation. Alle Veränderungen erreichten jedoch keine statistische Signifikanz (Abbildung 23A).

Neun Wochen nach TAC konnten keine Effekte der Behandlung mit E2 oder dem ER α in Bezug auf das Ausmaß der Hypertrophie mehr festgestellt werden. Die Behandlung mit ER β A hatte keinen Einfluss auf das Ausmaß der Hypertrophie. Die Behandlung mit Raloxifen erhöhte die Hypertrophie neun Wochen nach TAC um 21.2%. Zu diesem Zeitpunkt konnten keine signifikanten Unterschiede durch die Behandlung festgestellt werden (Abbildung 23B).

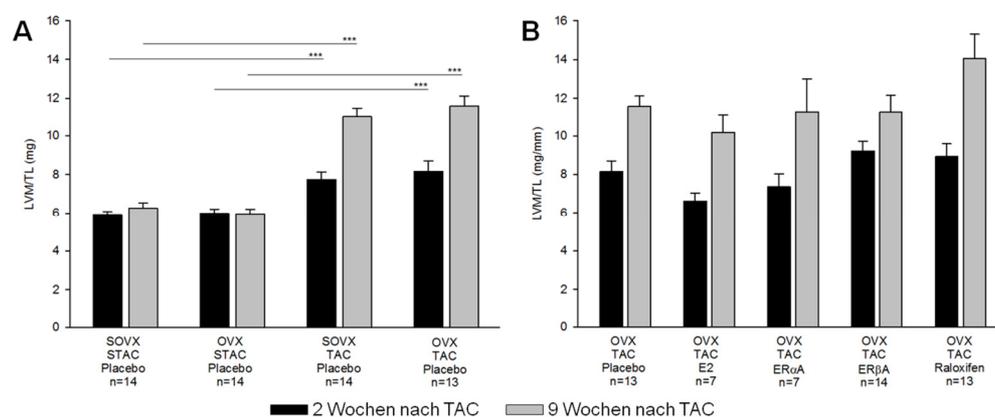


Abbildung 23: A: LV-Masse zu Tibialänge Quotient in mg/mm der Placebo-behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation; B: Verhältnis LV-Masse zu Tibialänge Quotienten in mg/mm der behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation.

TAC hatte eine signifikante Zunahme von LVM/TL zwei und neun Wochen nach OP im Vergleich zu den Kontrollgruppen zur Folge. Die Behandlung mit E2 oder ER α reduzierte tendenziell LVM/TL zwei Wochen, aber nicht neun Wochen nach TAC. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: ***p<0.001.

Die diastolische Vorderwanddicke (IVSd) nahm zwei und neun Wochen nach TAC im Vergleich zu den STAC-Tieren signifikant zu (Abbildung 24A).

Zwei Wochen nach TAC führte die Applikation von E2 oder dem ER α A zu einer Verminderung der IVSd im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle. Diese Veränderungen erreichten allerdings nicht das Signifikanzniveau von $p < 0.05$. Die Behandlung mit dem ER β A hatte keinen Effekt auf die IVSd im Vergleich zur Placebo-behandelten Gruppe. Raloxifen führte zu der größten Dickenzunahme der Vorderwand. Zwei Wochen nach TAC zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Wanddicken von E2- zur Raloxifen-Behandlung. Neun Wochen nach TAC konnten keine Unterschiede in der IVSd mehr detektiert werden (Abbildung 24B).

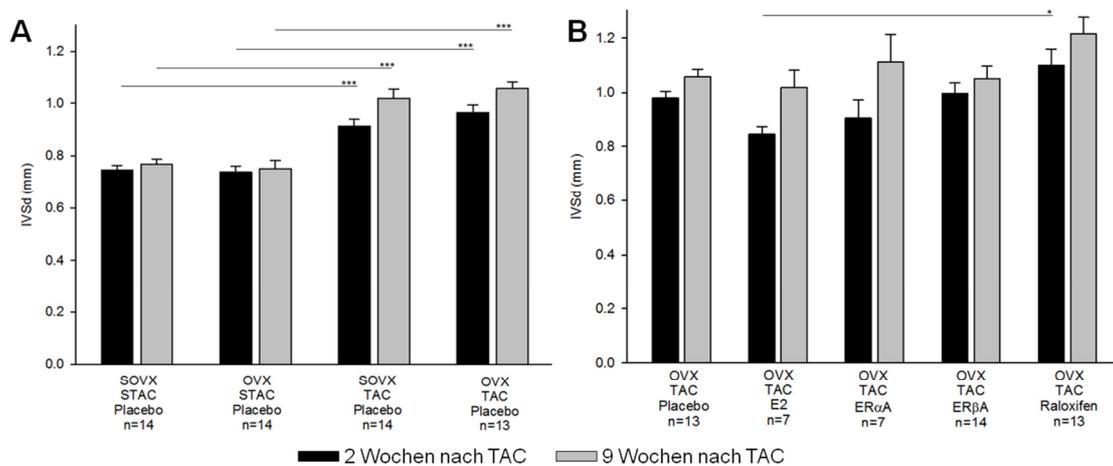


Abbildung 24: A: Linksventrikuläre enddiastolische Vorderwand in mm der Placebo-behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation; B: Linksventrikuläre enddiastolische Vorderwand in mm der behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation.

TAC hatte eine signifikante Zunahme von IVSd zwei und neun Wochen nach OP im Vergleich zu den Kontrollgruppen zur Folge. Die Behandlung mit E2 reduzierte tendenziell IVSd zwei Wochen, aber nicht neun Wochen nach TAC. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Nach TAC-Operation konnte eine signifikante Zunahme der diastolischen Hinterwanddicke (LVPWd) in TAC-operierten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden. Ein Unterschied zwischen zwei und neun Wochen konnte in den Placebo-behandelten Tieren jedoch nicht festgestellt werden (Abbildung 25A).

Die Behandlung mit E2 führte zwei Wochen nach TAC zu einer signifikant geringeren LVPWd im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren. Die Behandlung mit dem ER α , dem ER β A oder Raloxifen reduzierte die Wanddicke ebenfalls, jedoch wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht. Neun Wochen nach TAC nahm LVPWd nach E2-, ER α - oder Raloxifen-Applikation zu. Die Placebo- und ER β A-behandelten Tiere zeigten keine Änderung der Wanddicken (Abbildung 25B).

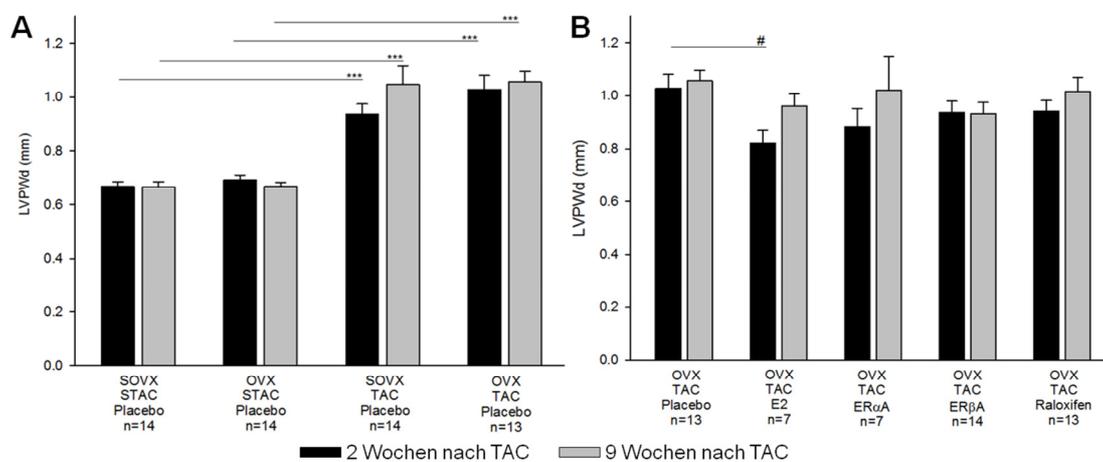


Abbildung 25: A: Linksventrikuläre enddiastolische Hinterwand in mm der Placebo-behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation; B: Linksventrikuläre enddiastolische Hinterwand in mm der behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation.

TAC hatte eine signifikante Zunahme von LVPWd zwei und neun Wochen nach OP im Vergleich zu den Kontrollgruppen zur Folge. Die Behandlung mit E2 reduzierte LVPWd signifikant zwei Wochen, aber nicht neun Wochen nach TAC. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: *** $p < 0.001$ Dunnett-Test: # $p < 0.05$.

Der linksventrikuläre enddiastolische Durchmesser (LVIDd) gibt das Ausmaß der Dilatation des linken Ventrikels an.

Zwei Wochen nach TAC kam es zunächst zu einer Abnahme des LVIDd in den Placebo-behandelten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Verringerung des Diameters war in den ovariectomierten Tieren signifikant im Vergleich zur ovariectomierten Kontrolle. Neun Wochen nach TAC nahm LVIDd in den TAC Tieren zu, ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Abbildung 26A).

Die Behandlung mit E2, dem ER α A oder Raloxifen führte zu keinen Unterschieden der enddiastolischen Kammerdimension im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle. Die Behandlung mit dem ER β A führte zwei Wochen nach TAC zu einem signifikant größeren Durchmesser versus Placebo-behandelte und ER α A-Behandlung. Neun Wochen nach Aortenkonstriktion zeigten alle Gruppen eine Zunahme des LVIDd. Die Raloxifen-behandelten Tiere wiesen hier die größte Zunahme der Kammerdimension auf (Abbildung 26B).

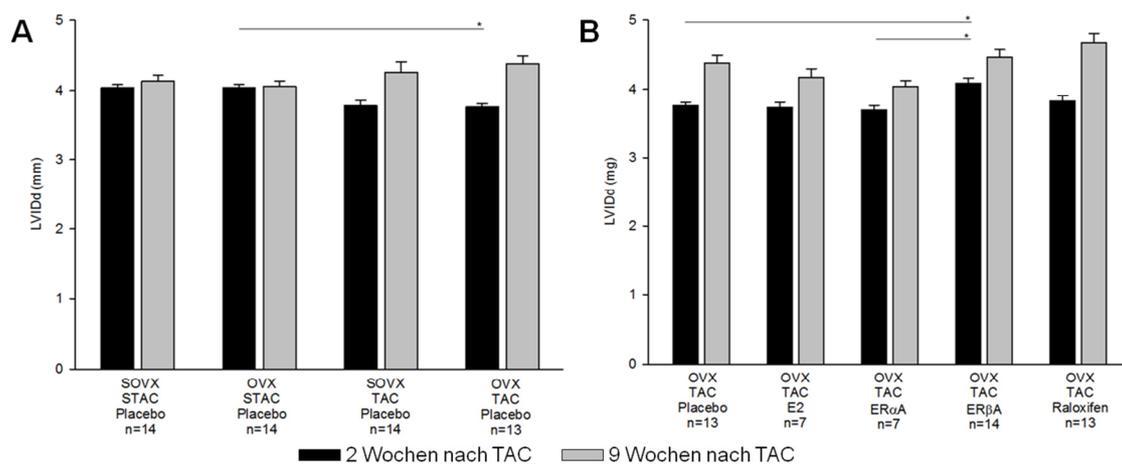


Abbildung 26: A: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser in mm der Placebo-behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation; B: Linksventrikulärer enddiastolischer Durchmesser in mm der behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation.

LVIDd war zwei Wochen nach TAC in den ovariectomierten Placebo-behandelten Tieren, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant vermindert. Die ER β A-Behandlung führte zwei Wochen nach TAC zu einem signifikant größeren enddiastolischen Durchmesser. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p < 0.05$.

Die Faserverkürzung (FS) gibt Auskunft über die Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels.

Zwei Wochen nach TAC waren in den nichtbehandelten TAC-Tieren keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Neun Wochen nach TAC nahm die FS in den nicht ovariektomierten Tieren ab. Die ovariektomierten Tiere zeigten eine signifikante Reduktion der FS in Bezug auf die Kontrollgruppe (Abbildung 27A).

Die Behandlung mit E2, dem ER α A und Raloxifen bewirkte zwei Wochen nach TAC eine bessere der Kontraktionsfähigkeit verglichen mit den nichtbehandelten Tieren. Neun Wochen nach TAC-Operation nahm die FS in diesen Gruppen ab, und es waren keine Unterschiede zwischen den behandelten und den nichtbehandelten Tieren mehr zu beobachten. Die Behandlung mit dem ER β A hatte keinen Einfluss auf die FS (Abbildung 27B).

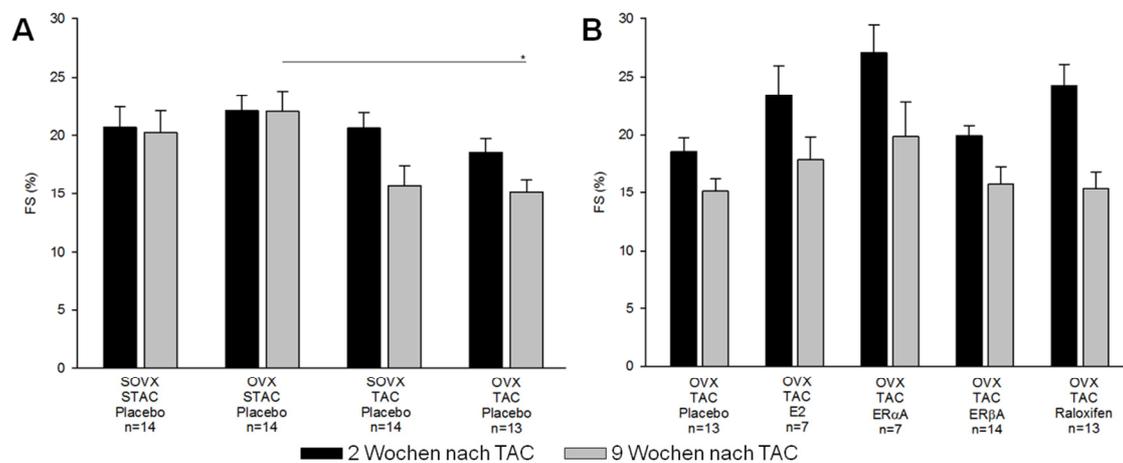


Abbildung 27: A: Faserverkürzung in % der Placebo-behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation; B: Faserverkürzung in % der behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation.

Die Ovariektomie bewirkte zum Zeitpunkt zwei Wochen nach TAC eine tendenzielle Reduktion FS. In der nicht-ovariektomierten Gruppe sowie nach E2, ER α A und Raloxifen-Behandlung war FS zu diesem Zeitpunkt nicht reduziert. Neun Wochen nach TAC konnten keine signifikanten Unterschiede in den TAC-operierten Tieren mehr festgestellt werden. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p < 0.05$.

Die Folge einer verminderten FS und damit der Kontraktionsfähigkeit des Herzens ist eine Reduktion der Ejektionsfraktion (EF). Diese beschreibt die systolische Funktion des Herzens und wird bei maladaptiver Myokardhypertrophie stark vermindert.

Im Vergleich zu den STAC-Gruppen war zwei Wochen nach TAC-Operation in den Tieren mit intakten Ovarien keine Veränderung der EF zu verzeichnen. In der Gruppe der ovariectomierten Tiere wurde die EF um 22% vermindert. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Neun Wochen nach Drucklastinduktion konnte auch eine verminderte Funktion in den nicht ovariectomierten TAC-Tieren nachgewiesen werden (statistisch nicht signifikant; Dunnett-Test $p=0.101$). Die EF der ovariectomierten Tiere verschlechterte sich signifikant im Vergleich zur ovariectomierten Kontrolle (Abbildung 28A).

Die Behandlung mit E2, dem ER α A oder Raloxifen bewirkte eine signifikante Verbesserung der systolischen Funktion zwei Wochen nach TAC-Operation. Die Behandlung mit dem ER β A dagegen konnte die Funktion nach TAC-Operation nicht erhalten. Neun Wochen nach TAC-OP konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen in der EF beobachtet werden (Abbildung 28B).

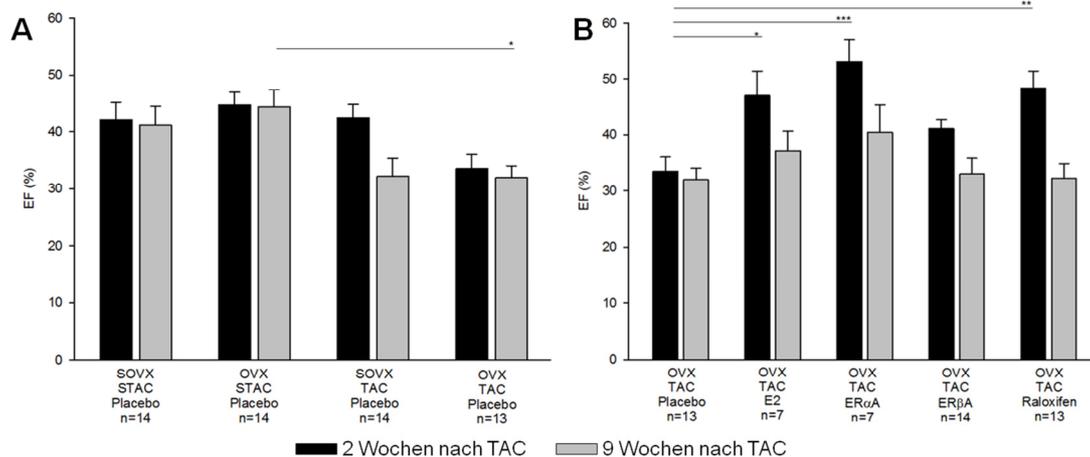


Abbildung 28: A: Ejektionsfraktion in % der Placebo-behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation; B: Ejektionsfraktion in % der behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation.

Die Ovariectomie bewirkte zum Zeitpunkt zwei Wochen nach TAC eine tendenzielle Reduktion EF. In der nicht-ovariectomierten Gruppe sowie nach E2, ER α A und Raloxifen-Behandlung war EF zu diesem Zeitpunkt nicht reduziert. Neun Wochen nach TAC konnten keine signifikanten Unterschiede in den TAC-operierten Tieren mehr festgestellt werden. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Neun Wochen nach TAC war eine Verminderung der Kontraktionsfähigkeit des linken Ventrikels auch auf den echokardiographischen Aufnahmen erkennbar. Die Vorder- und Hinterwand waren verdickt und die Wandbewegung deutlich eingeschränkt (Abbildung 29A, B).

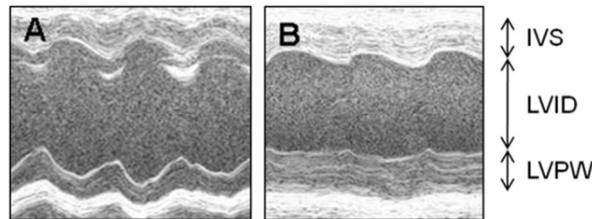


Abbildung 29: M-Mode Aufnahmen des LV des gleichen Tieres Prä-TAC (A) und 9 Wochen Post-TAC (B).

Die relative Wanddicke (Th/r) ist ein Parameter zur Charakterisierung der Hypertrophie. Ein Th/r-Wert von 0.33 gilt als physiologisch, während ein höherer Wert auf eine adaptive Hypertrophie schließen lässt. Ein geringerer Wert beschreibt eine maladaptive Hypertrophie.

In den nichtbehandelten Tieren zeigte sich eine signifikante Zunahme von Th/r zwei Wochen nach TAC im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Ein Unterschied zwischen SOVX+TAC versus OVX+TAC konnte nicht beobachtet werden. Neun Wochen nach TAC zeigte sich eine Verringerung des Th/r-Quotienten, die jedoch statistisch nicht signifikant war (Abbildung 30A).

Die Behandlung mit E2 ($p=0.073$, ANOVA, Post Hoc, Dunnett) oder dem ER β A ($p=0.075$, ANOVA, Post Hoc, Dunnett) führte zu einem geringeren Th/r zwei Wochen nach TAC. Nach ER β A- und Raloxifen-Behandlung zeigte sich neun Wochen nach TAC eine nicht signifikante Abnahme des Th/r. Die Behandlung mit E2 oder dem ER α A hatte zu diesem Zeitpunkt keinen Effekt auf Th/r (Abbildung 30B).

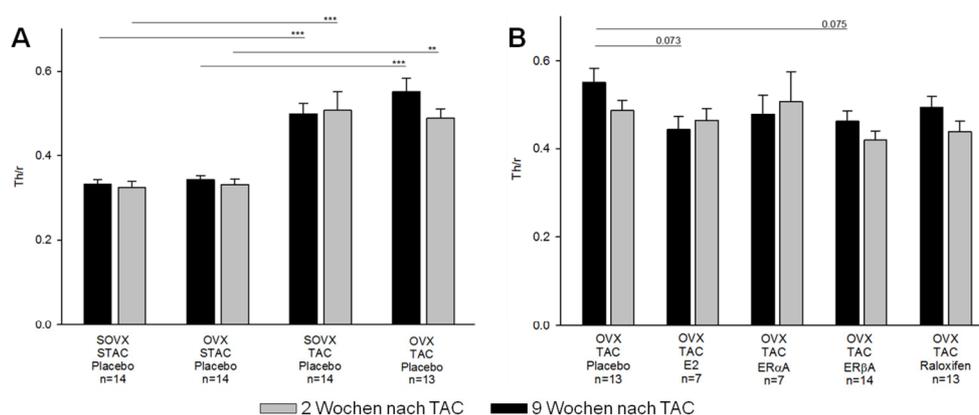


Abbildung 30: A: Relative Wanddicke (Th/r) in % der Placebo-behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation; B: Relative Wanddicke (Th/r) in % der behandelten Gruppen zwei und neun Wochen nach TAC-Operation.

Die TAC-Operation bewirkte eine signifikante Zunahme von Th/r zwei und neun Wochen nach TAC im Vergleich zu den Kontrollgruppen. Die Behandlung mit E2 und dem ER β A hatte zwei Wochen nach TAC einen tendenziell geringeren Th/r vergleichen mit den Placebo-behandelten Tieren zur Folge. Schwarze Balken: zwei Wochen nach TAC, graue Balken: neun Wochen nach TAC. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

3.5.3 Die Ovariectomie induziert die Expression der Hypertrophiemarker nach TAC

Zunächst wurden die Hypertrophiemarker ANP, BNP und β MHC mittels quantitativer Real Time-PCR untersucht und für die Auswertung auf das Referenzgen HPRT normalisiert.

Es konnten keine Unterschiede zwischen den nicht ovariectomierten und ovariectomierten STAC Tieren in der Genexpression von ANP festgestellt werden. In den TAC-operierten Placebo-behandelten Tieren wurde eine signifikant höhere ANP-Quantität im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet (Abbildung 31A).

Im Vergleich zur nichtbehandelten Gruppe war die ANP-Expression nach Behandlung mit E2, ER α A oder ER β A vermindert. Diese Änderungen erreichten das Signifikanzniveau von $p < 0.05$ nicht. Die Raloxifen-Behandlung zeigte keinen Einfluss auf die ANP-Genexpression (Abbildung 31B).

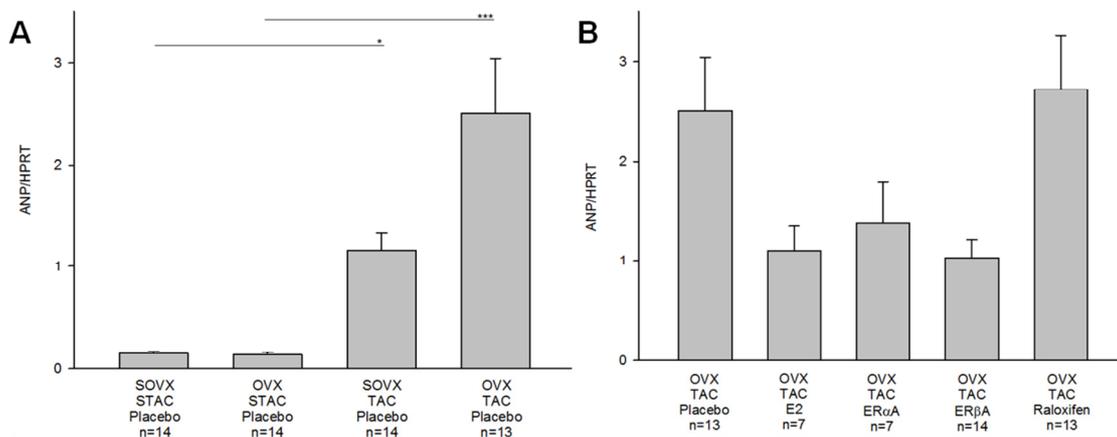


Abbildung 31: A: ANP-zu-HPRT-Quotient der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: ANP-zu-HPRT-Quotient der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die TAC-Operation führte zu einer signifikanten Induktion der ANP-Genexpression im Vergleich zu scheinoperierten Kontrolle. Die Behandlung mit E2, ER α A und ER β A reduzierten die Genexpression von ANP (ns.). ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p < 0.05$.

Es konnte kein Effekt der Ovariectomie in den STAC-Gruppen in Bezug auf die BNP-Expression festgestellt werden. Auch war sie in der SOVX+TAC-Gruppe im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert. Die Ovariectomie mit dem zusätzlichen pathologischen Stimulus führte dagegen zu einer signifikanten Induktion der BNP-Expression, sowohl im Vergleich zur ovariectomierten Kontrolle, als auch zur SOVX+TAC-Gruppe (Abbildung 32A).

Die Behandlung mit E2 verminderte die BNP-Expression mit einem p-Wert von 0.065 (ANOVA, Post Hoc, Dunnett), während die Behandlung mit dem ER α A oder dem ER β A zu einer signifikant geringeren BNP-Expression führte (Abbildung 32B).

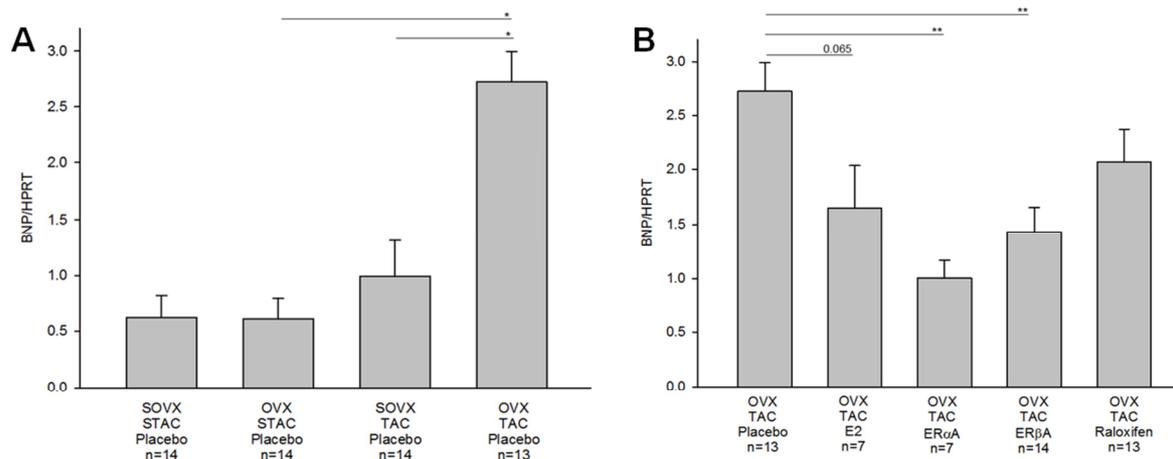


Abbildung 32: A: BNP-zu-HPRT-Quotient der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: BNP-zu-HPRT-Quotient der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die TAC-Operation führte in ovariectomierten Tieren zu einer signifikanten Induktion der BNP-Genexpression im Vergleich zu schein-operierten Kontrolle. Nicht-ovariectomierte Tiere wiesen eine signifikant geringere BNP-Expression verglichen mit der ovariectomierten Gruppe auf. Die Behandlung mit E2, ER α A und ER β A reduzierten die Genexpression von BNP. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Es konnten keine Unterschiede zwischen den nicht ovariectomierten und ovariectomierten STAC-Tieren von β MHC auf mRNA-Ebene festgestellt werden, während in den TAC operierten Tieren eine höhere relative Genexpression verzeichnet wurde. Diese war in allen ovariectomierten, TAC-operierten signifikant zur jeweiligen Kontrolle erhöht. Des Weiteren wurde ein signifikanter Anstieg der ovariectomierten, Placebo-behandelten TAC-Tiere im Vergleich zu den nicht ovariectomierten TAC-Tieren beobachtet (Abbildung 33A).

Die Behandlung mit E2 reduzierte die β MHC-Expression, erreichte jedoch mit $p = 0.055$ nicht das Signifikanzniveau (ANOVA, Post Hoc, Dunnett). Die Behandlung mit ER α A oder dem ER β A zeigte ebenfalls eine statistisch ebenfalls nicht signifikant, geringere Expression von β MHC. Die Behandlung mit Raloxifen hatte keinen Einfluss auf die β MHC-Expression (Abbildung 33B).

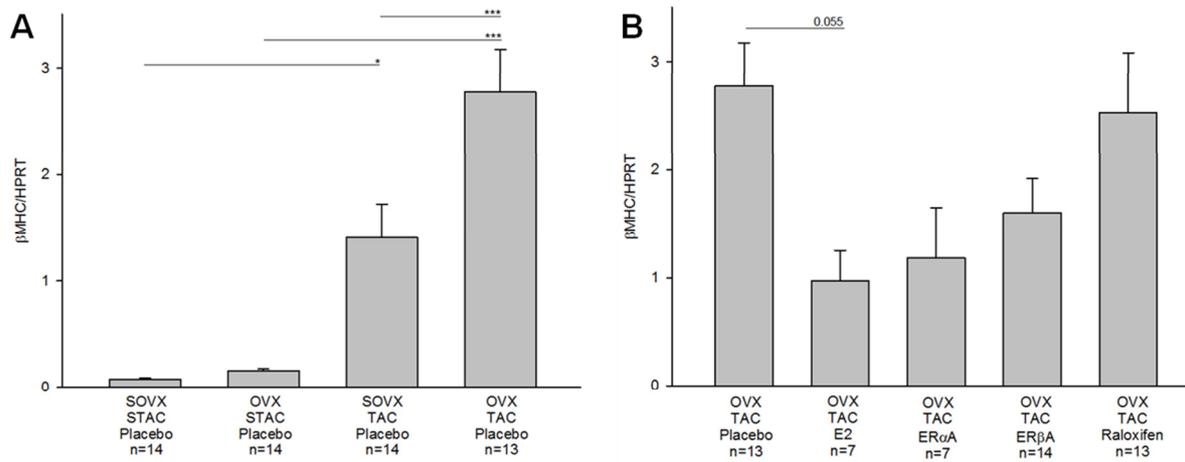


Abbildung 33: A: β MHC-zu-HPRT-Quotient der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: β MHC-zu-HPRT-Quotient der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die TAC-Operation führte zu einer signifikanten Induktion der β MHC-Genexpression im Vergleich zu scheinoperierten Tieren. Nicht-ovariektomierte Tiere wiesen eine signifikant geringere β MHC-Expression verglichen mit der ovariektomierten Gruppe auf. Die Behandlung mit E2, ER α A und ER β A reduzierten die Genexpression von β MHC (ns.). ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

Die LVM/TL korrelierte sowohl in den Placebo-behandelten Gruppen, als auch in den behandelten Tieren signifikant zum Hypertrophiemarker β MHC/HPRT. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson betrug in den Placebo-Gruppen 0.718 und in den behandelten Mäusen 0.786 und war mit $p < 0.001$ in beiden Fällen signifikant (Abbildung 34A, B).

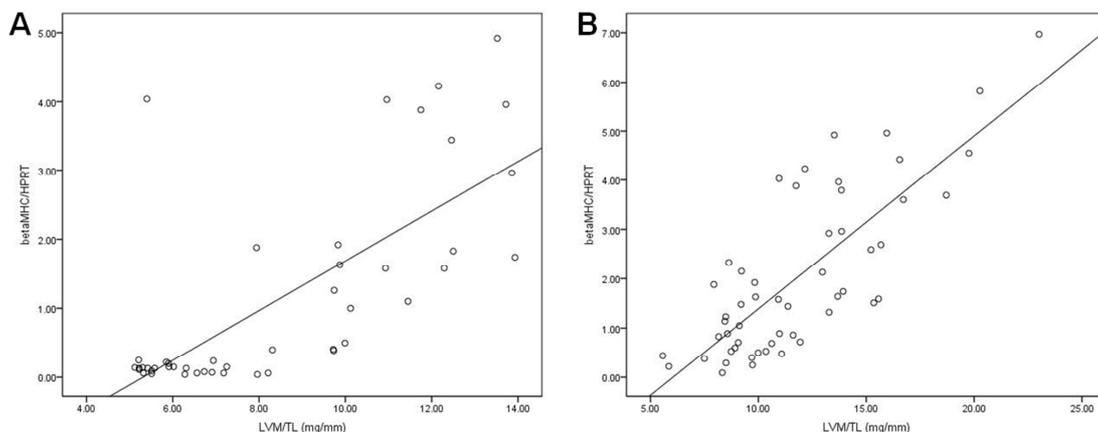


Abbildung 34: A: Korrelation LVM/TL zu β MHC/HPRT in den Placebo-behandelten Gruppen; B: Korrelation LVM/TL zu β MHC/HPRT in den behandelten Gruppen.

Der Hypertrophiemarker MHC korrelierte signifikant mit LVM/TL in Placebo-behandelten und behandelten Tieren. Bivariate Korrelation nach Pearson, A: $p < 0.001$; B: $p < 0.001$

Die Hypertrophiemarker zeigten des Weiteren eine negative Korrelation zu den Funktionsparametern EF und FS (Tabelle 25).

Tabelle 25: Korrelation der Hypertrophiemarker ANP, BNP und β MHC mit den Funktionsparameter EF und FS.

		EF		FS	
		Korr.-koeff. r	p-Wert	Korr.-koeff. r	p-Wert
ANP	unbeh. Gr.	-0.345	0.025	-0.338	0.029
	beh. Gr.	-0.456	0.001	-0.441	0.002
BNP	unbeh. Gr.	-0.328	0.026	-0.330	0.025
	beh. Gr.	-0.530	0.000	-0.518	0.000
β MHC	unbeh. Gr.	-0.396	0.007	-0.389	0.008
	beh. Gr.	-0.465	0.000	-0.450	0.001

3.5.4 Die Behandlung mit Raloxifen führt zu einer signifikanten Myozytenhypertrophie im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppe

Es konnte kein Effekt der Ovariectomie auf die Myozytenfläche, weder in den STAC-, noch in den TAC-Gruppen verzeichnet werden. Diese war neun Wochen nach TAC-Operation vergrößert. Der Unterschied zwischen der nicht ovariectomierten STAC-Gruppe und der TAC Gruppe zeigte hier einen statistischen Trend ($p=0.06$; ANOVA, Post Hoc, Dunnett), war aber nicht signifikant (Abbildung 35A).

In den E2-, ER α - oder ER β -behandelten Gruppen konnten keine Unterschiede in der Myozytenfläche beobachtet werden. Die Behandlung mit Raloxifen führte zu einer signifikant größeren Myozytenfläche im Vergleich zu den Placebo-behandelten Tieren. Der Unterschied zwischen der Raloxifen-Gruppe und der mit dem ER α behandelten Tiere wies mit $p=0.094$ (ANOVA, Post Hoc, Dunnett) einen starken statistischen Trend auf (Abbildung 35B).

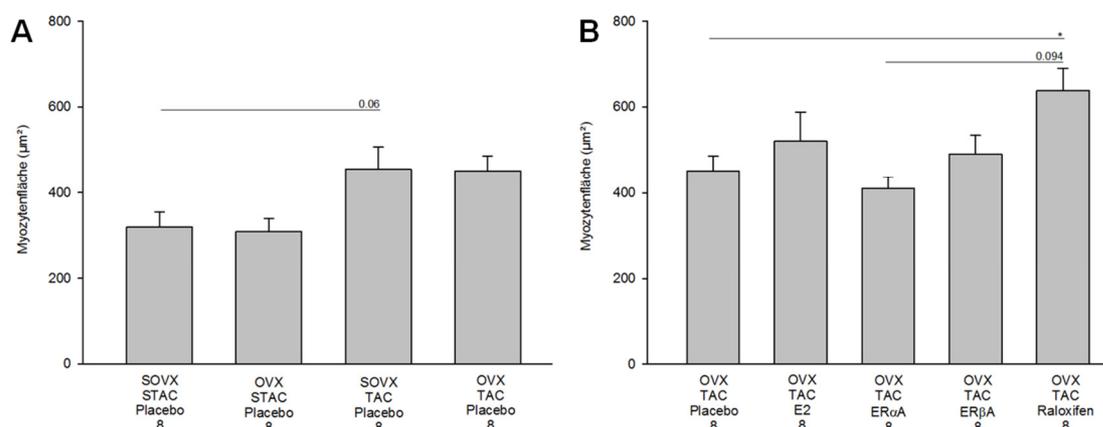


Abbildung 35: A: Myozytenfläche (μm^2) der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: Myozytenfläche (μm^2) der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die TAC-Operation vergrößerte die Myozytenfläche tendenziell. Die Behandlung mit Raloxifen hatte signifikant größere Myozyten verglichen mit der Placebo-behandelten Kontrolle zur Folge. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p<0.05$.

Zur Evaluierung der Messung der Myozytenfläche wurde eine Korrelation von LVM/TL mit der Myozytenfläche durchgeführt. Diese ergab sowohl in den Placebo-behandelten Gruppen ($p=0.000$), als auch in den behandelten Gruppen ($p=0.01$) eine signifikante Korrelation nach Pearson (Abbildung 36A, B).

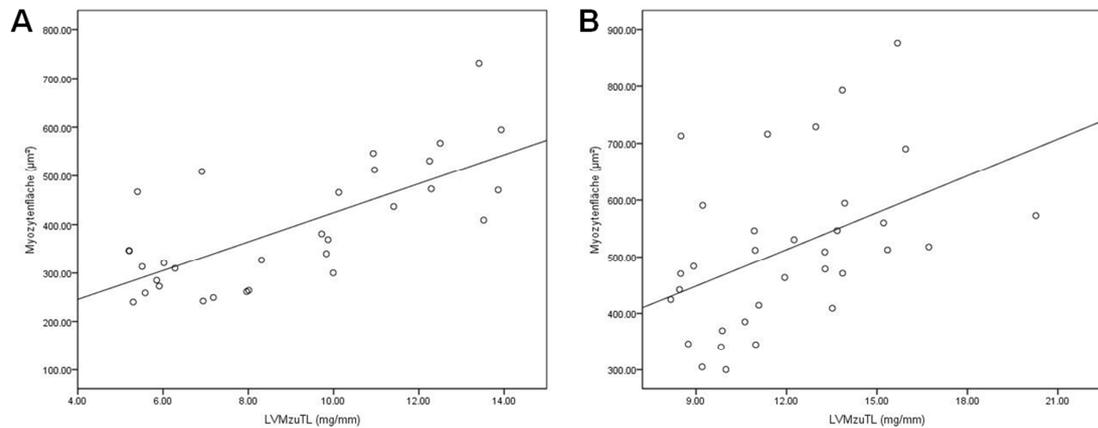


Abbildung 36: A: Korrelation LVM/TL (mg/mm) zu Myozytenfläche (μm^2) der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: Korrelation LVM/TL (mg/mm) zu Myozytenfläche (μm^2) der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die Myozytenfläche korrelierte signifikant mit LVM/TL in Placebo-behandelten und behandelten Tieren. Bivariate Korrelation nach Pearson, Placebo-behandelte Gruppen $p=0.000$; OVX+Plac+TAC und behandelte Gruppen $p=0.01$.

3.6 Fibrose

3.6.1 Ovariektomie erhöht den Kollagengehalt nach TAC

Es konnte kein Effekt der Ovariektomie in Bezug auf den Kollagengehalt in den STAC-Gruppen festgestellt werden. Bei nicht ovariektomierten Tieren mit TAC konnte nur ein geringer Anstieg beobachtet werden, der jedoch nicht signifikant war. In den ovariektomierten Tieren wurde nach TAC eine erhöhte Fibrose verzeichnet. Der Unterschied im Fibrose-Score war nicht signifikant, ist jedoch mit einem statistischen Trend von $p=0.062$ hervorzuheben (ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test) (Abbildung 37A).

Die Behandlung mit 17β -Östradiol, aber auch dem ER α A oder dem ER β A führte zu einer Reduktion der Fibrose nach TAC. Auch hier konnte kein Signifikanzniveau erreicht werden. Die Behandlung von Raloxifen hatte keinen Einfluss auf die Kollagenablagerungen im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle (Abbildung 37B).

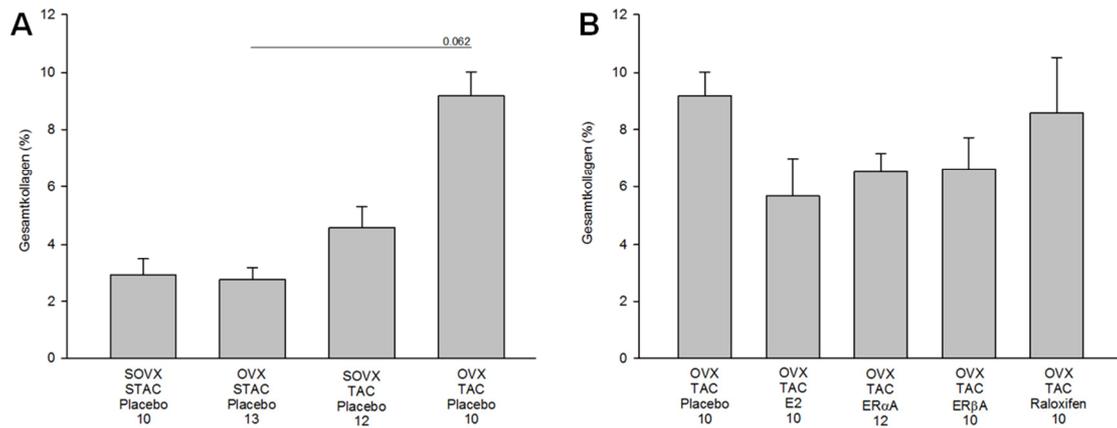


Abbildung 37: Gesamtkollagengehalt in %, neun Wochen nach TAC-Operation.

Die Sirius Rot Färbung zeigt einen höheren Gesamtkollagengehalt in ovariectomierten, Placebo-behandelten TAC-Tieren. Die E2-, ER α - und ER β -Behandlung reduzierte den Gesamtkollagengehalt im Gewebe (ns.). ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test

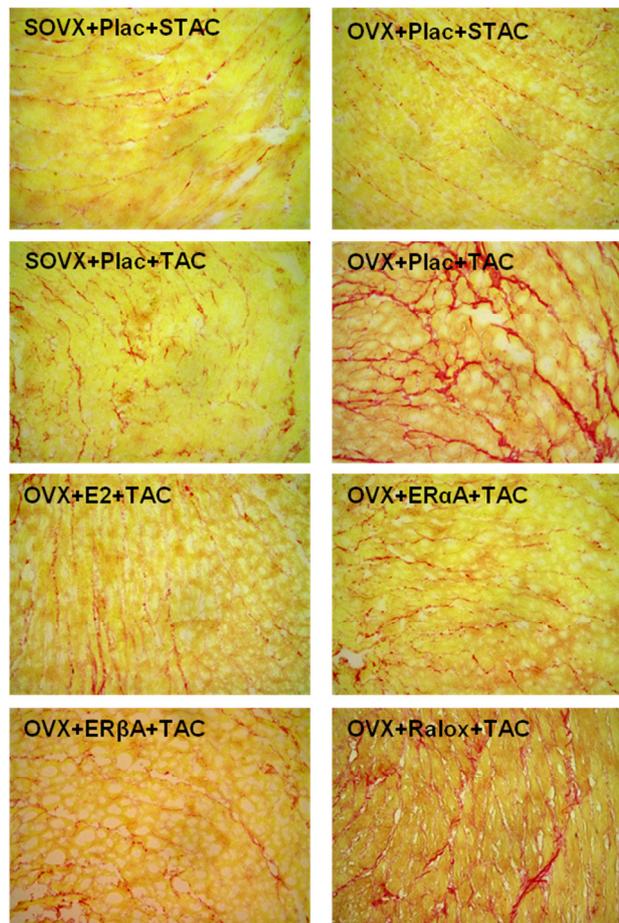


Abbildung 38: Sirius-Rot-Färbung, je ein typisches Bild pro Gruppe.

Rote Färbung: Kollagene Fasern.

In Ergänzung zur Sirius Rot Färbung wurde die Genexpression und der Proteingehalt der Kollagene-I und III analysiert.

3.6.2 Behandlung mit Raloxifen induziert col1 Genexpression neun Wochen nach TAC

Es konnte weder in den STAC-, noch in den TAC-Gruppen ein Effekt der Ovariectomie auf col1a2-Genexpressionsebene beobachtet werden. Die TAC-Operation hatte einen nicht signifikanten Anstieg der col1a2-Genexpression neun Wochen nach TAC zur Folge (Abbildung 39A).

Die Behandlung mit E2 oder dem ER β A hatte keinen Effekt auf die col1a2-Expression im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle. Der ER α A verringerte die col1a2-Expression mit $p=0.075$ (ANOVA; Post Hoc, Dunnett) mit statistischem Trend. Raloxifen steigerte die Expression von col1a2 signifikant zur ER α A-Behandlung (ANOVA, Post Hoc, Scheffé). Im Übrigen konnte eine höhere col1a2-Genexpression in der Raloxifen-Gruppe verzeichnet werden, die allerdings nicht das Signifikanzniveau von $p<0.05$ erreichte (Abbildung 39B).

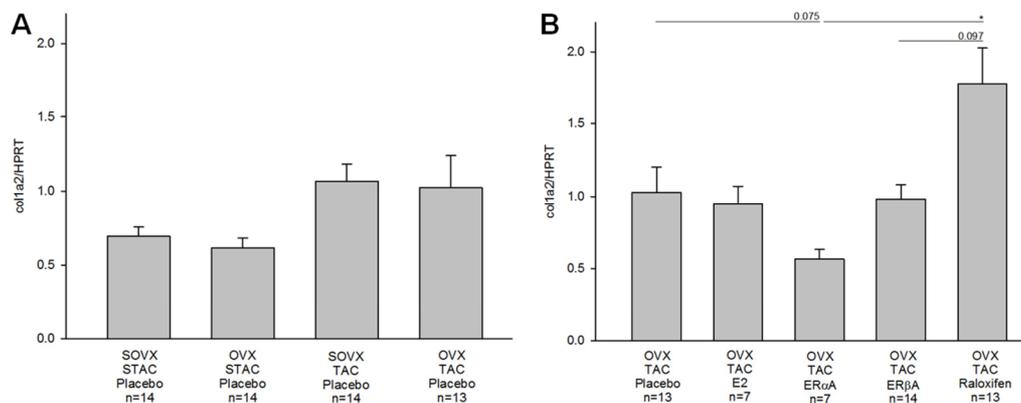


Abbildung 39: A: col1a2-zu-HPRT-Quotient der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: col1a2-zu-HPRT-Quotient der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die col1-Genexpression erhöhte sich nicht signifikant nach TAC-Operation. Die Behandlung mit ER α A reduzierte die col1-Genexpression (ns.), während die Behandlung diese erhöhte (ns.). ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p<0.05$.

Vergleichbar der col1a2-Genexpression war die col3a1-Expression. Es konnte kein Effekt der Ovariectomie in den STAC- oder in den TAC-Tieren festgestellt werden. Neun Wochen nach TAC konnte ein Anstieg in den Placebo-behandelten Gruppen beobachtet werden ($p=0.083$, ANOVA, Post Hoc, Scheffé) (Abbildung 40A).

Die Behandlung mit E2 oder ER β A führte zu einer geringeren, aber nicht signifikanten, col3a1-Expression im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle. Eine Behandlung mit dem ER α A bewirkte eine signifikant geringere col3a1-Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Raloxifen hatte keinen Effekt auf die col3a1-Quantität (Abbildung 40B).

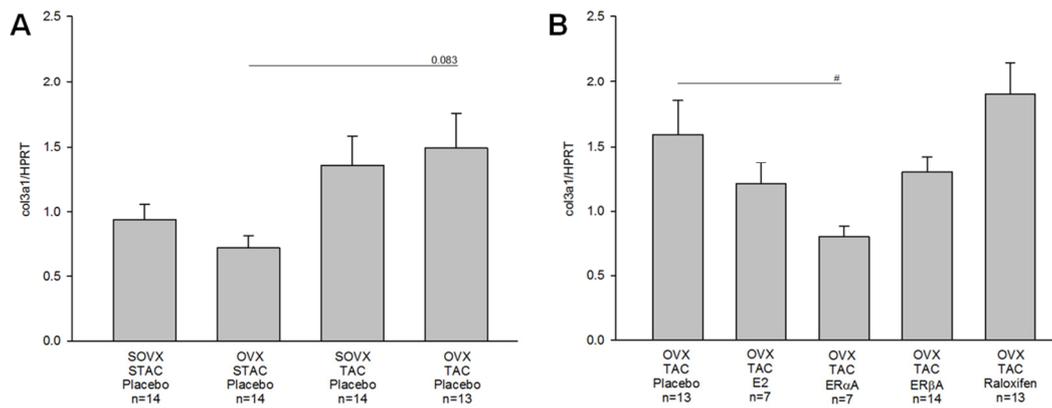


Abbildung 40: A: col3a1-zu-HPRT-Quotient der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: col3a1-zu-HPRT-Quotient der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die TAC erhöhte die col3-Genexpression in Placebo-behandelten Tieren (ns.). Die Behandlung mit ER α A reduzierte die col3-Genexpression signifikant. ANOVA, Post Hoc, Dunnett-Test: # $p < 0.05$.

3.6.3 Ovariectomie und TAC erhöhten Col1-Proteingehalt, während Behandlung die Effekte der Ovariectomie neutralisierten

Es konnte in den STAC-Gruppen kein Effekt der Ovariectomie auf den Proteingehalt von Col1a2 festgestellt werden. In den nicht ovariectomierten konnte nach TAC-Operation ein höheres Col1a2-Proteinlevel im Vergleich zur nicht ovariectomierten Kontrolle nachgewiesen werden ($p = 0.052$, ANOVA, Post Hoc, Dunnett). Die ovariectomierten Tiere wiesen einen signifikant höheren Col1a2-Gehalt auf (Abbildung 41A).

Die Behandlung mit E2, dem ER α A, dem ER β A oder Raloxifen reduzierte den Col1a2-Proteingehalt im Vergleich zur Kontrolle im Trend. Allerdings waren diese Änderungen nicht signifikant (Abbildung 41B).

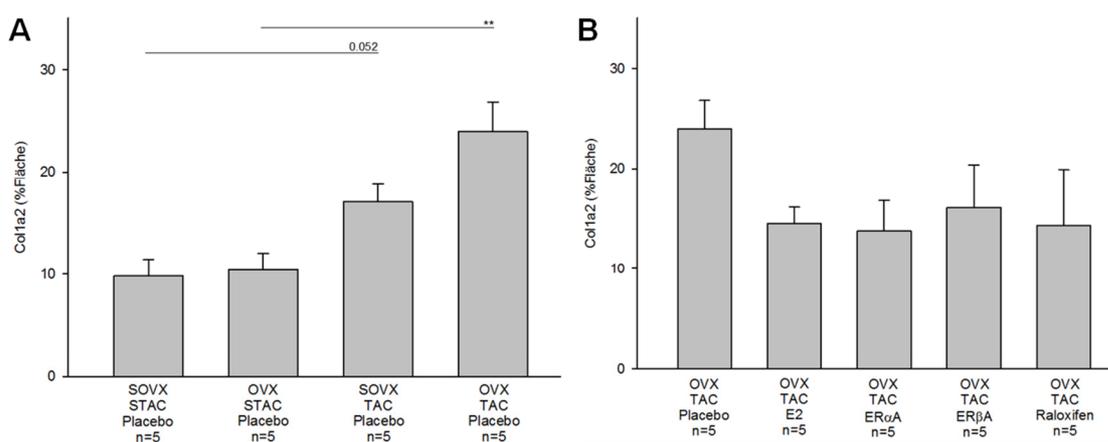


Abbildung 41: A: col1a2-Proteingehalt der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: col1a2-Proteingehalt der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die Ovariectomie erhöhte den Col1a2-Gehalt in TAC-operierten Tieren. Die Behandlung mit E2, ER α A, ER β A und Raloxifen reduzierte Col1 auf Proteinebene. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: ** $p < 0.01$.

Die TAC hatte auf den Kollagen3-Proteinspiegel weder in ovariectomierten, noch in den nicht ovariectomierten Tieren einen Einfluss (Abbildung 42A).

Die Behandlung mit E2 oder dem ER β A reduzierte den Kollagen 3 Proteingehalt nicht signifikant. Die ER α A-Behandlung bewirkte eine Reduktion an Col3a1-Protein im Vergleich zur Placebo-behandelten Kontrolle. Eine Behandlung mit Raloxifen zeigte keine Unterschiede im Vergleich zur Placebo-Behandlung (Abbildung 42B).

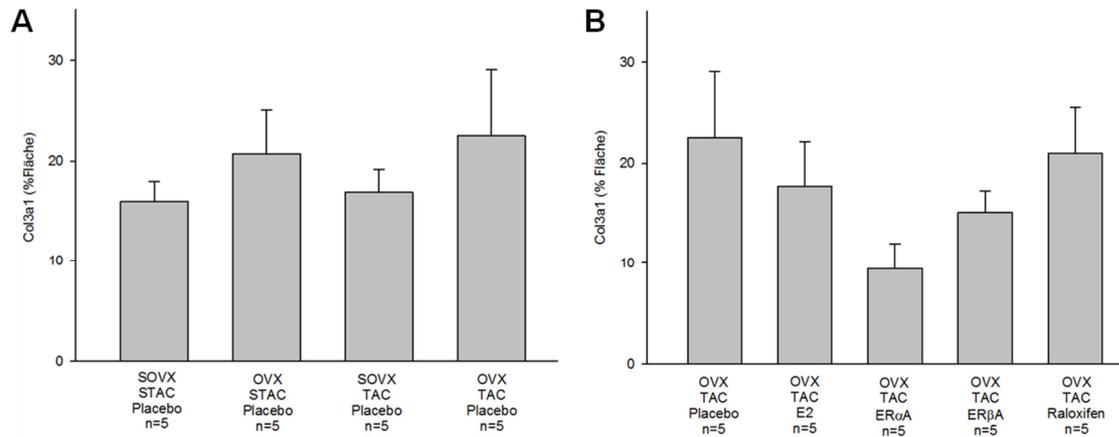


Abbildung 42: A: Col3a1-Proteingehalt der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: Col3a1- Proteingehalt der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die Behandlung mit ER α A reduzierte den Col3a1 Proteingehalt im Vergleich zu Placebo-behandelten Kontrolle (ns.). ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: #p<0.05.

3.6.4 Ovariectomie induzierte die Expression der Matrixgene TGF β 1, TGF β 2 und CTGF; Behandlung mit E2, dem ER α A und dem ER β A reduzierte die CTGF-Genexpression

Die Ovariectomie ohne TAC-Operation, sowie die Induktion von Drucklast in SOVX-Tieren hatte keinen Einfluss auf die TGF β 1- und TGF β 2-Expression. In ovariectomierten TAC-Tieren konnte aber ein signifikanter Anstieg im Vergleich zur ovariectomierten Kontrollgruppe beobachtet werden. Im Vergleich der TGF β 2-Genexpression von der ovariectomierten zu der nicht ovariectomierten TAC-Gruppe konnte mit p=0.053 ein starker statistischer Trend verzeichnet werden (Abbildung 43A, Abbildung 44A).

Die Behandlung mit ER β A oder Raloxifen reduzierte im Trend die TGF β 1-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die stärkste Reduktion war in der Raloxifen-behandelten Gruppe zu verzeichnen (ANOVA, Post Hoc, Dunnett; p=0.067) (Abbildung 43B).

Eine Veränderung der TGF β 2-Genexpression in den behandelten Gruppen im Vergleich zu den nichtbehandelten Tieren konnte nicht beobachtet werden (Abbildung 44B).

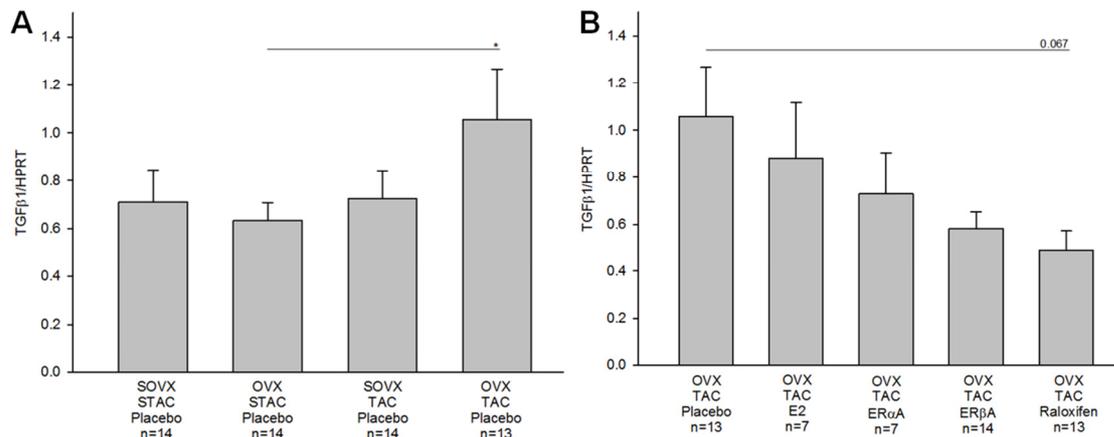


Abbildung 43: A: TGFβ1-zu-HPRT-Quotient der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: TGFβ1-zu-HPRT-Quotient der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

In ovariectomierten Tieren wurde ein signifikanter Anstieg der TGFβ1-Genexpression verzeichnet. Raloxifen vermindert diese (ns.). ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: *p<0.05.

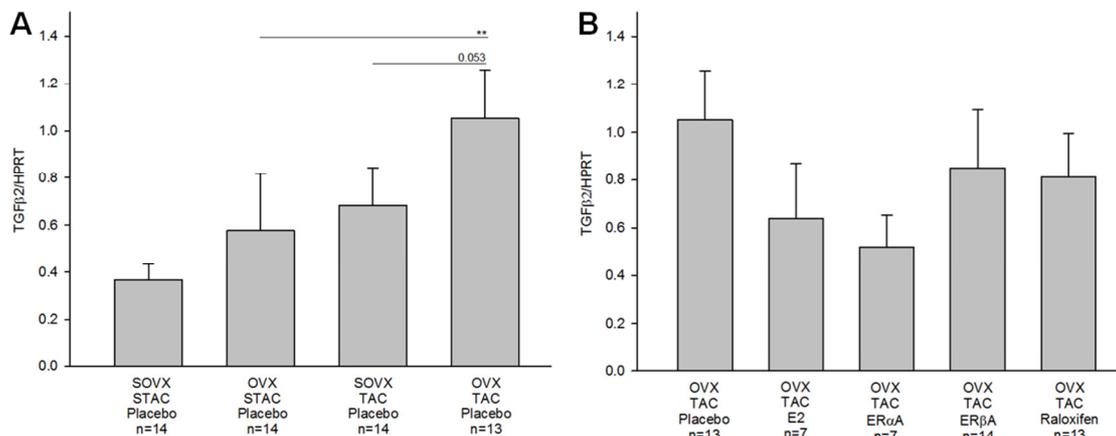


Abbildung 44: A: TGFβ2-zu-HPRT-Quotient der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: TGFβ2-zu-HPRT-Quotient der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Der Entzug von endogenem Östrogen induziert eine signifikante TGFβ2-Genexpression nach TAC. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: **p<0.01.

Die Ovariectomie hatte in STAC-Gruppen keinen Einfluss auf die Expression von CTGF. Auch in den nicht ovariectomierten TAC-Tieren konnte keine Änderung im Genexpressionslevel von CTGF im Vergleich zu STAC-Kontrolle beobachtet werden. Die ovariectomierten TAC-Tiere zeigten eine signifikante Induktion von CTGF im Vergleich sowohl zur ovariectomierten STAC-Gruppe, als auch zur nicht ovariectomierten TAC-Gruppe (Abbildung 45A). Die TGFβ1-Genexpression korrelierte ebenso signifikant mit der CTGF-Expression in den nichtbehandelten Tieren ($r=0.595$; $p=0.000$), wie die TGFβ2-Expression ($r=0.924$; $p=0.000$) (Graphen nicht gezeigt).

Die Behandlung mit E2, dem ERαA oder dem ERβA reduzierte die CTGF-Genexpression, allerdings ohne das statistische Signifikanzniveau von $p<0,05$ zu erreichen. Die Behandlung mit Raloxifen hatte keinen Einfluss auf die CTGF-Expression (Abbildung 45B). Auch hier

zeigte sich eine signifikante Korrelation mit der TGFβ1-Genexpression ($r=0.278$, $p=0.049$) und der TGFβ2-Expression ($r=0.885$; $p=0.000$) (Graphen nicht gezeigt).

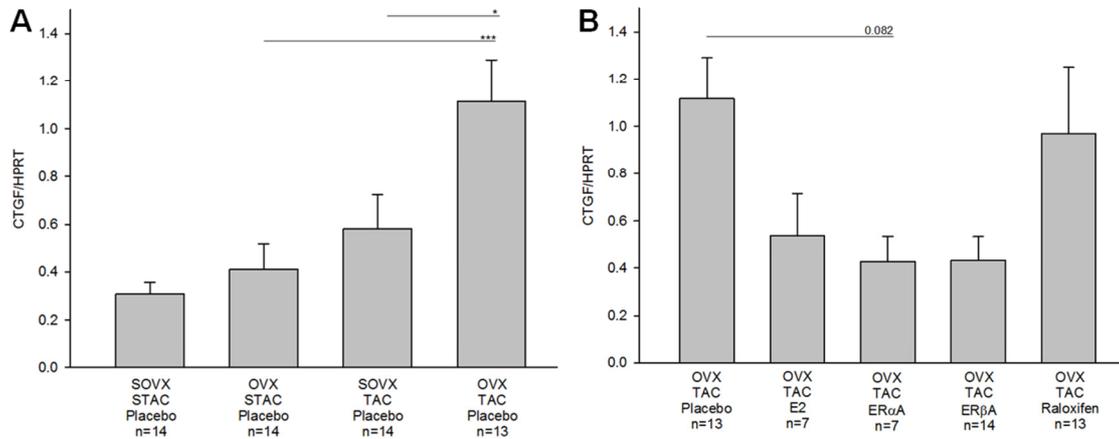


Abbildung 45: A: CTGF-zu-HPRT-Quotient der Placebo-behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation; B: CTGF-zu-HPRT-Quotient der behandelten Gruppen neun Wochen nach TAC-Operation.

Die CTGF-Genexpression erhöhte sich signifikant in Placebo-behandelten, TAC-operierten Tieren. Die Behandlung mit E2, ERαA oder ERβA reduzierte CTGF-Genexpression. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: * $p<0.05$, *** $p<0.001$.

3.6.5 Ovariectomie und Behandlungen hatten keinen Einfluss auf die MMP- und TIMP-Genexpression oder den MMP- und TIMP-Proteingehalt neun Wochen nach TAC

Des Weiteren wurde die Expression der Matrixgene Matrixmetalloproteinase 2 (MMP2) und *Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinase 1* und 2 (TIMP1 und TIMP2) untersucht.

Sowohl in den Placebo-behandelten, als auch in den mit E2-, den ER-Agonisten oder den mit Raloxifen behandelten Gruppen konnten keine Unterschiede in der MMP2-Genexpression festgestellt werden (Tabelle 26).

In den Placebo-behandelten Gruppen konnten keine Unterschiede in der TIMP1-Genexpression festgestellt werden. Die Expression von TIMP2 war sowohl in der ovariectomierten STAC-, als auch in der TAC-Gruppe verringert. Allerdings waren diese Veränderungen nicht signifikant. Auch in den behandelten Gruppen konnten weder in der TIMP1-, noch in der TIMP2-Genexpression Unterschiede detektiert werden (Tabelle 26).

Tabelle 26: Übersicht über relative MMP2, TIMP1 und TIMP2 Genexpression normalisiert auf HPRT.

Gruppe	MMP2/HPRT	TIMP1/HPRT	TIMP2/HPRT
SOVX+Placebo+STAC	0.74±0.14	0.31±0.10	1.66±0.29
OVX+Placebo+STAC	0.62±0.05	0.21±0.04	1.02±0.15
SOVX+Placebo+TAC	0.70±0.13	0.70±0.25	0.99±0.18
OVX+Placebo+TAC	0.81±0.10	0.84±0.20	0.97±0.10
Gruppe	MMP2/HPRT	TIMP1/HPRT	TIMP2/HPRT
OVX+Placebo+TAC	0.81±0.10	0.84±0.20	0.97±0.10
OVX+E2+TAC	0.67±0.18	0.62±0.16	1.09±0.14
OVX+ER α +TAC	0.48±0.12	0.55±0.18	1.16±0.15
OVX+ER β +TAC	0.61±0.10	0.45±0.09	1.14±0.11
OVX+Raloxifen+TAC	0.58±0.08	1.16±0.35	1.35±0.18

Der MMP2-Proteingehalt nahm sowohl in den nicht ovariectomierten Tieren, als auch in den ovariectomierten Tieren ab. Signifikante Veränderungen konnten aber auch hier nicht verzeichnet werden. Ein Effekt der Ovariectomie konnte weder in den STAC-, noch in den TAC-Gruppen beobachtet werden. Auch in den behandelten Gruppen konnten keine Unterschiede in der MMP2 Akkumulation im Gewebe beobachtet werden (Tabelle 27).

Es konnten keine Einflüsse der Ovariectomie, der TAC oder der Behandlung auf den MMP9-Proteingehalt neun Wochen nach TAC-Operation festgestellt werden (Tabelle 27).

Die Daten der TIMP1-Genexpression konnten auch auf Proteinebene bestätigt werden. Es wurden keine signifikanten Änderungen, weder in den Placebo-behandelten, noch in den behandelten Gruppen festgestellt (Tabelle 27).

Tabelle 27: Übersicht über TIMP1 Proteingehalt normalisiert auf β -Actin, sowie MMP2- und MMP9-Gehalt im Verhältnis zur Gesamtfläche.

Gruppe	MMP2 (%Fläche)	MMP9 (%Fläche)	TIMP1/ β -Actin
SOVX+Placebo+STAC	23.92 \pm 5.32	20.67 \pm 1.79	0.77 \pm 0.14
OVX+Placebo+STAC	26.01 \pm 8.47	28.11 \pm 4.01	0.87 \pm 0.20
SOVX+Placebo+TAC	23.04 \pm 4.57	29.39 \pm 5.05	0.70 \pm 0.16
OVX+Placebo+TAC	22.92 \pm 2.10	25.12 \pm 2.30	0.58 \pm 0.04
Gruppe	MMP2 (%Fläche)	MMP9 (%Fläche)	TIMP1/ β -Actin
OVX+Placebo+TAC	22.92 \pm 2.10	25.12 \pm 2.30	0.58 \pm 0.04
OVX+E2+TAC	24.51 \pm 7.82	28.72 \pm 4.18	0.58 \pm 0.07
OVX+ER α +TAC	19.46 \pm 5.04	25.91 \pm 5.35	0.72 \pm 0.20
OVX+ER β +TAC	31.12 \pm 5.76	25.64 \pm 3.06	0.70 \pm 0.19
OVX+Raloxifen+TAC	24.50 \pm 1.84	22.83 \pm 3.61	0.61 \pm 0.07

4. Diskussion

In klinischen Studien wurde eine geringere Inzidenz für das Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen in prämenopausalen Frauen im Vergleich zu gleichalten Männern beobachtet. Männer entwickelten zu einem früheren Zeitpunkt eine HF, als Frauen. Diese Entwicklung konnte auch in verschiedenen Tiermodellen nachgewiesen werden^{12, 45, 97, 98}. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden die Sexualhormone und deren Rezeptoren, insbesondere E2 und die ER, als wichtige Regulatoren von Genen, die in die Entwicklung einer Myokardhypertrophie involviert sind, identifiziert^{64, 65, 99-102}.

Die Untersuchungen zur Behandlung mit E2 oder ER-Agonisten führten sowohl in klinischen Studien, als auch im Tierversuch zu kontroversen Ergebnissen. Einige Autoren konnten protektive Effekte einer Behandlung mit E2 oder ER-Agonisten nachweisen^{9, 86, 90}. In anderen Studien konnten hingegen keine oder sogar negative Auswirkungen der Behandlung nachgewiesen werden^{67, 68, 93}.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Effekte von einer Behandlung mit E2, einem ER α A (16 α -LE2), einem ER β A (8 β -VE2) und einem SERM (Raloxifen) auf die Entstehung von Myokardhypertrophie nach pathologischem Stimulus durch Druckbelastung vergleichend untersucht.

Aus der vorliegenden Literatur ist bekannt, dass Phytoöstrogene, wie zum Beispiel das Isoflavon Genistein eine große strukturelle Ähnlichkeit mit Östrogenen haben und daher auch als deren Agonisten wirken können. Da Isoflavone im Standardfutter für Versuchstiere enthalten sind¹⁰³ und der Einfluss dieser Phytoöstrogene ausgeschlossen werden sollte, wurden die Tiere auf einer Genistein-freien Diät gehalten.

4.1 Die Behandlung mit E2 oder 16 α -LE2 führt zu einer signifikanten Vergrößerung der Uteri

In Übereinstimmung mit der vorliegenden Literatur^{8, 9, 71} führte der Entzug des endogenen Östrogens zu einer signifikanten Reduktion des Uterusgewichtes. Da der ER β im Uterus nicht lokalisiert ist^{104, 105}, hatte die Behandlung mit 8 β -VE2 keinen Einfluss auf das Uterusgewicht. Auch Raloxifen zeigte, seinen antagonistischen Eigenschaften auf den Uterus entsprechend, keine Wirkung auf das Uterusgewicht. Die Behandlung mit E2 und 16 α -LE2 bewirkte eine signifikante Vergrößerung der Uteri im Vergleich sowohl zu den Placebo-behandelten, als auch zu den nicht ovariectomierten Tieren. Diese Entwicklung ist auf die agonistische Wirkung beider Substanzen auf den ER α , nicht nur im Herzen, sondern auch in anderen Organen, zurückzuführen. Die verabreichte Dosis an E2 wurde in

Anlehnung an die Literatur gewählt^{8, 73, 76}, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten.

Das Uterusgewicht wurde in der vorliegenden Arbeit als Indikator für die Wirksamkeit von Ovariectomie und Behandlung gewählt, was ein aus der Literatur bekanntes Vorgehen darstellt^{7, 9}. Tiere, die nicht die erwarteten Veränderungen in Bezug auf das Uterusgewicht zeigten, wurden aus dem Versuch ausgeschlossen.

4.2 LVM-Berechnung und Validierung anhand des Herzgewichtes

Zur Überprüfung der Qualität der echokardiographischen Messungen und den daraus resultierenden Ergebnissen, wurde die mittels Echokardiographie errechnete LVM mit dem durch Wiegen bestimmten Herzgewicht (HW) korreliert. Um einen Einfluss von Ovariectomie oder Behandlung auszuschließen, wurde die Korrelation mit den nicht-ovariectomierten schein-TAC- und TAC operierten Tieren durchgeführt. In beiden Fällen korrelierten LVM und HW signifikant miteinander (Vgl. Abbildung 12).

4.3 Verifizierung der Drucklastinduktion

Zur Validierung der Drucklastinduktion wurde der Druckgradient p herangezogen. Nach Induktion einer Drucklast sollte dieser auf 60 bis 100 mmHG signifikant erhöht sein¹⁰⁶. In der vorliegenden Arbeit erhöhte sich der Gradient in allen TAC-operierten Tieren unabhängig von Ovariectomie oder Behandlung (Vgl. Abbildung 14A, B). Es kann daher von einer erfolgreichen Drucklastinduktion ausgegangen werden.

4.4 Die Behandlung mit E2 oder 16 α LE2 reduziert die Überlebenswahrscheinlichkeit nach TAC

Eine pathologische Hypertrophie und die daraus resultierende HF erhöht das Mortalitätsrisiko. Klinische Studien zeigten eine geringere Überlebenszeit der Männer mit Diagnose HF, im Vergleich zu den Frauen mit vergleichbarer Diagnose¹⁰⁷. Diese Befunde werden in verschiedenen Tiermodellen kontrovers diskutiert. Übereinstimmend mit der hier vorliegenden Studie zeigten Patten et al.⁸ und van Eickels et al.⁹, dass E2 bei MI und TAC das Überleben reduziert. Weiterhin wurde in klinischen Studien ein erhöhtes Risiko für Thrombosen⁶⁷, Brustkrebs⁶⁸ und Gallenblasenerkrankungen⁶⁷ festgestellt. Im Gegensatz dazu stellten Thireau et al.¹⁰⁸ eine Korrelation des endogenen E2-Spiegels im Blut fest. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Beobachtung nicht bestätigt werden, da das höchste post-operative Überleben in ovariectomierten Tieren beobachtet wurde. Die nicht ovariectomierten Tiere, sowie die mit dem ER β A- oder die mit Raloxifen-behandelten Gruppen zeigten eine

geringere Überlebensrate. Die Applikation von E2, aber auch dem ER α , führten zu einer signifikant verschlechterten Überlebensrate nach TAC. Nachträgliche postmortale Untersuchungen konnten keine offensichtlichen kardialen Ursachen zeigen. Allerdings zeigten die Tiere eine starke Vergrößerung der Uteri nach Stimulation mit E2 oder dem ER α . Da beide Gruppen eine gute kardiale Funktion zeigten, sind die Ursachen für die reduzierte Überlebenswahrscheinlichkeit wahrscheinlich nichtkardialen Ursprungs.

4.5 Entwicklung der Myokardhypertrophie

Die Myokardhypertrophie ist eine Stressantwort des Herzens auf Stimuli, wie zum Beispiel Bluthochdruck oder Aortenstenose¹. Dabei entwickelt sich zunächst eine adaptive Hypertrophie, die durch eine Verdickung der Wände und einer Verkleinerung des linksventrikulären Diameters charakterisiert ist. Die kardiale Funktion wird in diesem Stadium noch nicht vermindert. Dieser Befund konnte in der vorliegenden Arbeit zwei Wochen nach TAC in nicht ovariektomierten Tieren bestätigt werden. In Übereinstimmung mit der Literatur^{64, 65} entwickelte sich eine Myokardhypertrophie ohne Verlust der systolischen Funktion. Weibliche Patienten entwickeln im weiteren Verlauf häufig eine HF mit erhaltener systolischer und reduzierter diastolischer Funktion^{109, 110}. Im Unterschied dazu nimmt bei Männern die linksventrikuläre Wanddicke ab, der linke Ventrikel dilatiert und die systolische Funktion verschlechtert sich¹¹¹. Es entwickelt sich eine maladaptive Hypertrophie und im Folgenden eine HF. Weiterhin zeigen Männer im Vergleich zu Frauen eine beschleunigte Progression zur HF. Auch im Tiermodell konnte ein Funktionserhalt in weiblichen WT-Mäusen verglichen mit den männlichen Tieren in SH-Ratten⁴⁵ beobachtet werden. In Übereinstimmung mit der Literatur¹¹² waren auch in der vorliegenden Studie die ovariektomierten Tiere nicht in der Lage, die Hypertrophie langfristig zu kompensieren und, wie die Faktorenanalyse belegt, die LV Funktion zu erhalten.

Bisherige Daten^{81, 110} sowie die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigten eine Induktion der Hypertrophiemarker ANP, BNP und β MHC, was auf eine Induktion des fötalen Genprogrammes schließen lässt^{84, 113}. Dabei konnte eine signifikant höhere Genexpression von BNP und β MHC der ovariektomierten Tiere gegenüber den nicht ovariektomierten Tieren beobachtet werden. Dementsprechend kann geschlossen werden, dass E2 die Expression der Hypertrophiemarker reduziert¹². Weiterhin korreliert die Expression der Hypertrophiemarker mit der Ausprägung der Hypertrophie^{113, 114} und dem Erhalt der kontraktiven Reserven¹². Auch diese Befunde können mit den vorliegenden Daten bestätigt werden, da die Genexpression der Hypertrophiemarker positiv mit der linksventrikulären Masse und negativ mit EF und FS korrelierte.

In der Entwicklung der Myokardhypertrophie kann sich auf Zellebene in Form einer Myozytenhypertrophie widerspiegeln. Die Myozyten weiblicher Individuen sind dabei zu einer stärkeren Vergrößerung in der Lage als Myozyten männlicher Individuen^{44, 45}. So zeigten Tamura et al⁴⁵ eine maximale Myozytenhypertrophie von 40% bei weiblichen spontan hypertensiven und herzinsuffizienten Ratten (*spontaneous hypertensive and heart failure*, SHHF) im Vergleich zum nicht-hypertrophierten Herzen. Die Myozyten der männlichen Herzen vergrößerten sich hingegen nur um 12%. Auch in der vorliegenden Arbeit wiesen die TAC-operierten Tiere eine Myozytenhypertrophie auf. Allerdings konnte keine Unterschiede in der Myozytengröße zwischen nicht ovariektomierten und ovariektomierten Tieren festgestellt werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass die Applikation von E2 oder dem ER α vor maladaptiven Remodeling schützt¹¹⁵ und den Verlust der systolischen Funktion reduziert⁷⁹. Die Faktorenanalyse zeigte für diese beiden Gruppen keine signifikante Veränderung der LV Funktion während des Versuchszeitraumes. Nach Auswertung der echokardiographischen Daten wurde zwei Wochen nach TAC eine signifikante Verbesserung der EF im Vergleich zu Placebo-behandelten Tieren beobachtet. Neun Wochen nach TAC war die EF nach E2- oder ER α -Behandlung im Vergleich zum zwei Wochen Zeitpunkt reduziert, allerdings weniger stark, als bei den Placebo-behandelten Kontrolltieren. In der vorliegenden Studie führte die Applikation von E2 oder dem ER α ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Genexpression der Hypertrophiemarker ANP, BNP und β MHC⁸⁴. Die Behandlung mit E2 oder dem ER α konnte somit die Entwicklung der maladaptiven Hypertrophie nicht verhindern oder hemmen. Allerdings verlangsamte die Behandlung die Progression der Hypertrophie und verzögerte den Funktionsverlust.

Die Behandlung mit dem ER β zeigte weder zwei Wochen noch neun Wochen nach TAC Unterschiede in LV Masse oder LV Funktion. Des Weiteren unterschied sich die Myozytengröße nicht von den Tieren mit Placebo-Behandlung. Diese Daten stehen im Widerspruch zur Literatur^{71, 88}, in welcher eine Reduktion der LV Masse sowie ein Erhalt der LV Funktion gezeigt wurde. Allerdings handelt es sich hier um Rattenmodelle mit SHR, bzw. Aldosteron- induzierter Hypertrophie. Die Applikation des ER β führte aber zu einer geringeren Expression der Hypertrophiemarker ANP und β MHC sowie zu einer signifikant geringeren Expression von BNP.

Raloxifen wird in tierexperimentellen Studien^{90, 91} sowie in einer klinischen Studie (Versuchszeitraum 4 Jahre)⁹² als kardioprotektiv beschrieben. In der hier vorliegenden Arbeit bewirkte die Behandlung mit Raloxifen zwei Wochen nach TAC eine signifikant verbesserte EF im Vergleich zur Placebo-behandelte Kontrolle. Im Gegensatz dazu konnten Barrett-Connor et al⁹³ in einer klinischen Studie zur Wirksamkeit zum Einfluss von Raloxifen auf die

Inzidenz kardiovaskulärer Erkrankungen keine signifikanten Effekte des Raloxifens über den Behandlungszeitraum, von durchschnittlich 5.6 Jahren, nachweisen. In der vorliegenden Studie konnte neun Wochen nach TAC eine vergleichbar schlechte systolische Funktion und eine stärker ausgeprägte Myokardhypertrophie, ähnlich der Placebo-behandelten Gruppe nachgewiesen werden. Diese Daten werden von der Genexpression der Hypertrophiemarker gestützt. Die Applikation von Raloxifen hatte, verglichen mit der Placebo-Gruppe, keine Effekte auf die Expression von ANP, BNP und β MHC neun Wochen nach TAC.

Die Raloxifen-Behandlung hat im Stadium der adaptiven Hypertrophie funktionserhaltende Effekte, kann aber die Progression der Hypertrophie und den damit einhergehenden Funktionsverlust nicht im gleichen Maß beeinflussen, wie die Behandlung mit E2 oder dem ER α .

4.6 Umbauprozesse der EZM

Fibrose ist die Akkumulation von kollagenen Fasern, ausgelöst durch einen pathologischen Stimulus und häufig einhergehend mit einem Ungleichgewicht der Matrixproteine und deren Regulatoren. Die Folgen sind Änderungen im Metabolismus der Myozyten und der kardialen Funktion¹¹⁶. Des Weiteren kann es zu Störungen der Erregungsleitung der Myozyten²¹ und langfristig zur Unterversorgung aufgrund von einer gestörten Kapillarisation²² kommen. Durch diese Effekte hat die Fibrose einen maßgeblichen Anteil an der Entstehung der HF. Ein Entzug des endogenen E2 fördert die Entstehung der Fibrose einhergehend mit der Kollagenakkumulation⁷⁴. Die Daten der vorliegenden Arbeit stützen diesen Befund. Nach pathologischem Stimulus nahm der Fibrosegehalt des linken Ventrikels in der ovariektomierten TAC-Gruppe, im Vergleich zur ovariektomierten Kontrolle, signifikant zu (Abbildung 37). Die stärkere Fibrosierung des linken Ventrikels der ovariektomierten Tiere erklärt auch die Funktionseinschränkungen dieser Gruppe. Pedram et al¹¹⁷ zeigten eine signifikante Reduktion der Fibrose in WT- und ER α KO-, jedoch nicht bei ER β KO-Tieren nach Behandlung von E2 in einem Modell der AngII-induzierten Hypertrophie. Die Autoren schließen daraus, dass die Fibrose-reduzierenden Prozesse über den ER β vermittelt werden. Des Weiteren wurde eine Erhöhung des Fibrosegehaltes neun Wochen nach TAC in ER β KO-Tieren beschrieben⁶⁵. In Übereinstimmung mit der Literatur konnte ein geringerer Gesamtkollagengehalt der mit dem ER β A, aber auch der mit E2 behandelten Tiere festgestellt werden. In Widerspruch dazu wurde eine Reduktion der Fibrose auch nach der Behandlung mit dem ER α -Agonisten beobachtet werden. Die Behandlung mit Raloxifen-Behandlung zeigte in Bezug auf die Kollagenakkumulation keinen Unterschied zur Kontrolle. Folglich ist die spezifische Aktivierung beider ER für das Gleichgewicht der EZM notwendig.

Es bleibt jedoch ungeklärt, ob verschiedene Mechanismen durch die unterschiedlichen Agonisten induziert werden.

Der Abbau der Kollagene erfolgt über die MMPs. Eine verminderte MMP-Aktivität fördert die Kollagen-Akkumulation während der Hypertrophieentwicklung¹¹⁸⁻¹²⁰. Die MMPs und die TIMPs spielen somit eine wichtige Rolle in der Entwicklung der Myokardhypertrophie. Eine Hemmung der MMPs kann nicht nur über die TIMPs, sondern auch über TGF β erfolgen³¹. Die TGF β -Isoformen zählen zu den Wachstumsfaktoren und werden in der ersten Stressantwort induziert. Beispielsweise induziert TGF β unter anderem CTGF. Während der Entwicklung einer Myokardhypertrophie kommt es sowohl zu einer Induktion der TGF β -Isoformen, als auch von CTGF¹²¹⁻¹²³. In dieser Arbeit zeigten die ovariectomierten TAC-operierten Tiere eine signifikante Induktion der TGF β 1-, TGF β 2- und CTGF-Genexpression im Vergleich zur ovariectomierten Kontrolle. In den nicht ovariectomierten Tieren hingegen konnte keine Induktion der TGF β -Isoformen oder des CTGF nachgewiesen werden. Daneben zeigten die ER β A-behandelten Tiere eine nicht signifikant geringere Expression der TGF β -Isoformen und eine Inhibierung von CTGF. Die Raloxifen-Applikation führte zu einer geringeren Expression von TGF β 1 und TGF β 2. Im Gegensatz dazu wurde eine, zu den Placebo-behandelten Tieren vergleichbar hohe, CTGF-Genexpression verzeichnet. Eine mögliche Erklärung wäre, dass TGF β nicht nur CTGF induziert, sondern auch durch CTGF gehemmt werden kann^{31, 34}.

Sowohl die Ergebnisse der Placebo-behandelten Tiere, als auch die Behandlungen mit E2 oder den spezifischen ER-Agonisten lassen auf eine hemmende Wirkung von Östrogen auf die Expression von TGF β und CTGF schließen. Ein möglicher zugrundeliegender Mechanismus stellt die Aktivierung der Rho-Kinase durch RhoA dar^{124, 125}. Die Rho-Kinase stimuliert sowohl TGF β als auch CTGF^{124, 126} und kann sowohl durch eine E2-Behandlung, als auch durch Applikation des spezifischen ER β -Agonisten Diarylpropionitril (DPN) inhibiert werden¹²².

In der vorliegenden Studie zeigten sich weder in den Placebo-behandelten, noch in den behandelten Tieren signifikante Unterschiede in der MMP2-Genexpression oder auf MMP2- und MMP9-Proteinebene. Die Genexpression von TIMP1 und TIMP2 war nicht verändert. Die MMPs könnten durch eine Aktivierung der TGF β -Isoformen gehemmt werden^{26, 27, 127}. Wie bereits beschrieben wurde TGF β neun Wochen nach TAC induziert.

In der vorliegenden Studie konnten nur geringe Effekte auf den MMP2 und MMP9 Proteingehalt gezeigt werden. Auch TIMP1 und TIMP2 zeigten keine Effekte zum Zeitpunkt neun Wochen nach TAC. Eine Hemmung der MMPs durch TGF β ist aus der Literatur bekannt^{26, 27}. Weiterhin zeigte sich eine Übereinstimmung der Daten mit den von Nagatomo et al¹²⁸ gewonnen Erkenntnissen. Die Autoren verzeichneten hier durch zymographische

Untersuchungen in einem PO-Modell einen Anstieg der MMP- und TIMP-Aktivität in einem akuten Stadium der pathologischen Stimulation. Die Aktivitäten waren in der chronischen Phase jedoch wieder auf das Niveau der Kontrollgruppe reduziert¹²⁸. In Patienten mit AS wurde eine signifikante Genexpression der Kollagene 1 und 3 sowie von MMP2 und MMP9 in Männern beobachtet. In Frauen konnten diese Effekte nicht verzeichnet werden. Die Autoren schließen daher auf unterschiedliche regulatorische Mechanismen in der Matrix Synthese¹²⁹. Bezugnehmend auf die Daten der vorliegenden Arbeit stellt der TGF β -Signaltransduktionsweg einen Anhaltspunkt für das geschlechtsspezifische *Remodeling* dar.

Weiterhin wurden in SHR-Modellen eine Induktion der MMP2-Aktivität im Stadium der dekompensierten Hypertrophie verzeichnet^{119, 130}. Auch in einem Modell von chronischer Volumenbelastung zeigte sich ein signifikant höherer TIMP2-zu-MMP2- und TIMP1-zu-MMP9-Quotient in ovariektomierten Ratten. Diese Veränderungen konnten durch eine Behandlung mit E2 aufgehoben werden²⁴. Die unterschiedlichen Beobachtungen in der Regulation der MMPs und TIMPs in der chronischen Myokardhypertrophie lassen auf eine Abhängigkeit vom pathologischen Stimulus und dem Modell schließen. Somit sind Effekte zu einem früheren Zeitpunkt nicht ausgeschlossen. Der Mechanismus bleibt zunächst ungeklärt.

4.7 Schlussfolgerungen

In dieser Arbeit wurden der Einfluss von E2, einem ER α (16 α -LE2), einem ER β (8 β -VE2) und einem SERM (Raloxifen) auf die drucklastinduzierte Hypertrophie im Tiermodell untersucht.

Basierend auf den Beobachtungen der Faktoranalyse kann davon ausgegangen werden, dass eine myokardiale Dekompensation durch eine kontinuierliche Hypertrophie innerhalb der ersten zwei Wochen vollständig kompensiert werden kann. Bei anhaltendem pathologischem Stimulus, kommt es zu einer zunehmenden Dekompensation, wie sie neun Wochen nach TAC zu beobachten ist.

Die transversale Aortenkonstriktion induzierte in allen Tieren eine LV Hypertrophie. Der Entzug des endogenen Östrogens bewirkte dabei bereits zwei Wochen nach TAC eine Reduktion der LV Funktion, während die Tiere mit intakter ovarieller Funktion erst neun Wochen nach TAC eine Verminderung der EF zeigten. Weiterhin bewirkte der Entzug des endogenen Östrogens neun Wochen nach TAC die Entstehung einer Fibrose.

Die Daten dieser Arbeit lassen auf einen protektiven Einfluss des ER α in der Entwicklung der Myokardhypertrophie und in der Progression zur Dysfunktion schließen. Die protektive Wirkung von E2, bzw. ER α -Agonisten ist in der adaptiven Phase der Hypertrophie gegeben. Die Behandlung mit E2 und 16 α -LE2 verzögert die Entwicklung von der adaptiven zur

maladaptiven Hypertrophie. Raloxifen ist ebenso in der Lage die Entstehung einer Dysfunktion zu verzögern, jedoch in einem geringeren Ausmaß als E2 und 16 α -LE2. Allerdings kann die Behandlung mit E2, dem ER α A oder Raloxifen die Entwicklung einer maladaptiven Hypertrophie lediglich verzögern und die Daten lassen auf eine weitere Reduktion der Behandlungseffekte mit fortschreitender pathologischer Entwicklung schließen.

Ferner begünstigen die E2- und die ER α A-Behandlung die Krebsentstehung in Brust und Uterus⁶⁸ und erhöhten die Mortalitätsrate in der vorliegenden Arbeit und in der Literatur^{8, 76}. Beide Substanzen waren daher im durchgeführten Tiermodell zur Behandlung nicht geeignet. Die Applikation des ER β -Agonisten führte neun Wochen nach TAC lediglich zu einer geringen Verminderung der Kollagenakkumulation. Eine schützende Wirkung vor Hypertrophie oder Dysfunktion konnte weder zwei noch neun Wochen nach TAC nachgewiesen werden.

Die histologischen und molekularbiologischen Untersuchungen wurden zum Zeitpunkt neun Wochen nach TAC-Operation durchgeführt. Eine Vervollständigung dieser Daten zu einem Zeitpunkt der adaptiven Hypertrophie würde diese Studie sinnvoll ergänzen.

4.8 Limitationen der Arbeit

Es wurden C57Bl/6J Inzuchtmäuse der Firma Harlan Winkelmann verwendet. Trotz der Inzucht gab es individuelle Reaktionen der Tiere auf die Interventionen und Behandlungen, die sich in der Standardabweichung bemerkbar machen können und die statistische Power beeinflussen.

Der Versuchszeitraum wurde auf neun Wochen festgelegt, da in vorangegangenen Studien zu diesem Zeitpunkt eine manifestierte myokardiale Hypertrophie beobachtet werden konnte⁶⁵. Weiterhin wurden in verschiedenen Publikationen der Einfluss der Behandlungen mit E2 oder ER-spezifischen Agonisten zu früheren Zeitpunkten gewählt^{7, 8, 90}, als in der vorliegenden Studie. Fokus dieser Studie war es, den Einfluss der Behandlungen auf die chronische Druckbelastung zu untersuchen.

Die eingesetzten *Release*-Pellets, sowie die applizierten Konzentrationen wurden aus der vorhandenen Literatur entnommen, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten^{8, 71, 73, 76, 88, 90}. Der ER β A 8 β -VE2 wurde bisher in Rattenmodellen eingesetzt^{71, 88} und in diesen per subkutane Injektion verabreicht. Für die Substanz ist die Applikation mit *Release*-Pellets möglicherweise weniger gut geeignet, da sie als metabolisch weniger stabil beschrieben wurde⁷⁵. Eine Alternative zum Einsatz von 8 β -VE2 stellt der neuere ER β -spezifische Agonist DPN dar.

Männliche Individuen entwickeln häufig eine HF mit einer systolischen Dysfunktion. Im Gegensatz dazu ist die HF bei weiblichen Individuen oftmals durch einen Erhalt der systolischen und einen Verlust der diastolischen Funktion charakterisiert. Die diastolische Funktion kann mit den in dieser Arbeit durchgeführten Methoden nicht bestimmt werden. Daher war die Feststellung einer HF in dieser Arbeit nicht möglich, es konnten lediglich Hinweise, die für eine HF mit diastolischer Dysfunktion sprechen, festgestellt werden.

Bei der Faktoranalyse werden die untersuchten Faktoren aufgrund des Modelldesigns als unabhängig voneinander betrachtet (nicht korreliert). Ein Zusammenhang zwischen Hypertrophie und Funktion ist biologisch gesehen aber unumstritten. Die Faktorenanalyse stößt hier als statistisches Modell an seine Grenzen. Dennoch eignet sie sich für die Untersuchung des Einflusses von E2, den ER α - und ER β -Agonisten und Raloxifen auf die Adaptation des Herzens und die Progression der Myokardhypertrophie nach Druckbelastung sehr gut.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit sollten der Einfluss der Ovariectomie und die Behandlung mit E2, einem selektiven ER α -Agonisten (16 α -LE2), einem selektiven ER β -Agonisten (8 β -VE2) und einem SERM (Raloxifen) auf die Umbauprozesse bei der Entstehung einer Myokardhypertrophie untersucht werden. Die Hypertrophie in weiblichen C57Bl/6J Mäusen wurde durch eine transversale Aortenkonstriktion (TAC) induziert. Hierbei handelt es sich um eine anerkannte Methode für das Modell der drucklastinduzierten Hypertrophie.

Die Drucklastinduktion verringerte das postoperative Überleben im Vergleich zu den Kontrolltieren. Das beste Überleben nach TAC war in den ovariectomierten Placebo-behandelten Tieren zu verzeichnen. Die Behandlung mit 8 β -VE2 oder Raloxifen führte zu keinen signifikanten Unterschieden in der Überlebensrate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Behandlung mit E2 und 16 α LE2 reduzierte die Überlebensrate signifikant im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe.

Die Ausprägung einer kompensatorischen Hypertrophie sowie die Progression zur myokardialen Dekompensation wurden durch Ovariectomie und unterschiedliche Östrogenbehandlungen in spezifischer Art und Weise modifiziert. Sowohl nicht ovariectomierte, als auch die ovariectomierten Tiere entwickelten im Versuchszeitraum eine signifikante linksventrikuläre Hypertrophie sowie eine signifikante linksventrikuläre Dysfunktion. Die Entwicklung der linksventrikulären Hypertrophie wurde vor allem bis zum Zeitpunkt zwei Wochen post-TAC beobachtet. Die nichtovariectomierten Tiere sowie die Gruppen mit E2-, 16 α -LE2- und Raloxifen-Behandlung konnten die LV Funktion zu diesem Zeitpunkt gegenüber den ovariectomierten Placebo-behandelten TAC-Tieren erhalten. Die Reduktion der LV Funktion nach Behandlung mit dem 8 β -VE2 war vergleichbar mit der Placebo-Behandlung in den ovariectomierten TAC-Tieren. Neun Wochen nach TAC reduzierte sich die LV Funktion in den ovariectomierten Tieren weiter. Auch die nicht-ovariectomierte Gruppe sowie die Raloxifen-behandelten Tiere zeigten hier eine Verminderung der LV Funktion. Die E2- und 16 α -LE2-Behandlung reduzierte die Funktion neun Wochen nach TAC ebenfalls, allerdings weniger stark. Die Genexpressionsanalysen der Hypertrophiemarker ANP, BNP und β MHC korrelierten negativ mit der reduzierten Funktion. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das endogene Östrogen und die Behandlung mit E2, 16 α LE2 und 8 β -VE2 eine Verminderung der Fibrose sowie eine Reduktion der TGF β - und CTGF-Genexpression bewirkten.

Die Daten der vorliegenden Studie zeigen eine beschleunigte Progression der ovariectomierten Tiere zur maladaptiven Hypertrophie. Das endogene Östrogen, aber auch die Raloxifen-Behandlung zeigten protektive Effekte im Funktionserhalt zum Zeitpunkt zwei

Wochen nach TAC, konnten aber mit fortschreitendem Krankheitsverlauf die Progression der Hypertrophieentwicklung und dem damit einhergehenden Funktionsverlust nicht mehr kompensieren. Die Behandlung mit E2 oder 16 α -LE2 verzögerte den Verlust der linksventrikulären Funktion. Beide Substanzen führten aufgrund von agonistischen Effekten auf den ER α im Uterus zu einer Veränderung des Uterusgewebes und erhöhten die Mortalitätsrate signifikant. Die Effekte der Behandlung mit 8 β -VE2 waren, im Vergleich zu den anderen Interventionen, deutlich geringer ausgeprägt.

6. Summary

The aim of this study was to investigate the influence of ovariectomy (OVX) and the treatment with 17 β -estradiol (E2), a selective ER α agonist (16 α -LE2), a selective ER β agonist (8 β -VE2) and the selective estrogen receptor modulator (SERM) Raloxifene on the remodeling process during the development of MH. Hypertrophy was induced in female C57Bl/6J mice by transverse aortic constriction (TAC), an accepted model for pressure overload-induced hypertrophy.

Pressure overload decreased postoperative survival rate compared with control animals. The best survival was observed in the Placebo-treated group. Treatment with 8 β -VE2 or Raloxifen did not significantly affect survival rate compared to the control group. The treatment with E2 or 16 α -LE2 reduced survival rate significantly versus Placebo-treated animals.

The development of compensatory hypertrophy and the progression to myocardial decompensation was modified by ovariectomy and hormone treatment in a different manner. Both ovariectomized and sham-ovariectomized animals developed a significant left ventricular hypertrophy and a leftventricular dysfunction during the experiment. The progression to left ventricular hypertrophy was particularly observed till the time point two weeks after TAC. The sham-OVX (SOVX) animals, as well as the E2-, 16 α -LE2- and Raloxifene-treated animals' maintained cardiac function compared to the Placebo-treated OVX-group. The treatment with 8 β -VE2 reduced the ejection fraction (EF) similarly to the ovariectomized Placebo-treated group. Nine weeks after TAC there was a further reduction in the EF of the OVX+Placebo-treated mice. Additionally, the EF decreased in the SOVX+Placebo- and Raloxifene-treated animals. The treatment with E2 or 16 α -LE2 reduced the EF nine weeks after TAC as well; however, in a smaller degree than the treatments with Placebo, 8 β -VE2 and Raloxifene. Analyzing the gene expression of the hypertrophic markers ANP, BNP und β MHC showed negative correlation to cardiac function. Furthermore, the treatment with E2, 16 α -LE2, and 8 β -VE2 diminished the development of fibrosis and reduced the TGF β and CTGF gene expression.

The data of the current study show an accelerated progression to maladaptive hypertrophy in the OVX+Placebo-animals. Endogenous estrogen and Raloxifene treatment had protective effects on cardiac function two weeks after TAC, but they did not compensate for the development of MH and the loss of cardiac function after nine weeks of TAC. The treatment with E2 and 16 α -LE2 was able to maintain cardiac function for a longer period. However both of these substances induced changes in the uterus through to agonistic effects on ER α and

significantly increased the mortality rate after TAC. The effects of 8 β -VE2 treatment were less comparable to the other pharmacologic interventions.

Literaturverzeichnis

1. Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol.* 1997;59:551-571
2. Carroll JD, Carroll EP, Feldman T, Ward DM, Lang RM, McGaughey D, Karp RB. Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation.* 1992;86:1099-1107
3. Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: The good, the bad, and the ugly. *Annu Rev Physiol.* 2003;65:45-79
4. Jessup M, Brozena S. Heart failure. *N Engl J Med.* 2003;348:2007-2018
5. Calderone A, Takahashi N, Izzo NJ, Jr., Thaik CM, Colucci WS. Pressure- and volume-induced left ventricular hypertrophies are associated with distinct myocyte phenotypes and differential induction of peptide growth factor mRNAs. *Circulation.* 1995;92:2385-2390
6. Vikstrom KL, Bohlmeyer T, Factor SM, Leinwand LA. Hypertrophy, pathology, and molecular markers of cardiac pathogenesis. *Circ Res.* 1998;82:773-778
7. Babiker FA, Lips D, Meyer R, Delvaux E, Zandberg P, Janssen B, van Eys G, Grohe C, Doevendans PA. Estrogen receptor beta protects the murine heart against left ventricular hypertrophy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2006;26:1524-1530
8. Patten RD, Pourati I, Aronovitz MJ, Alsheikh-Ali A, Eder S, Force T, Mendelsohn ME, Karas RH. 17 beta-estradiol differentially affects left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy following myocardial infarction and pressure overload. *J Card Fail.* 2008;14:245-253
9. van Eickels M, Grohe C, Cleutjens JP, Janssen BJ, Wellens HJ, Doevendans PA. 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation.* 2001;104:1419-1423
10. Izumo S, Lompre AM, Matsuoka R, Koren G, Schwartz K, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. Myosin heavy chain messenger RNA and protein isoform transitions during cardiac hypertrophy. Interaction between hemodynamic and thyroid hormone-induced signals. *J Clin Invest.* 1987;79:970-977
11. Mercadier JJ, Lompre AM, Wisnewsky C, Samuel JL, Bercovici J, Swynghedauw B, Schwartz K. Myosin isoenzyme changes in several models of rat cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 1981;49:525-532
12. Weinberg EO, Thienelt CD, Katz SE, Bartunek J, Tajima M, Rohrbach S, Douglas PS, Lorell BH. Gender differences in molecular remodeling in pressure overload hypertrophy. *J Am Coll Cardiol.* 1999;34:264-273
13. Tsutamoto T, Wada A, Maeda K, Hisanaga T, Maeda Y, Fukai D, Ohnishi M, Sugimoto Y, Kinoshita M. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure: Prognostic role of plasma brain natriuretic peptide concentration in patients with chronic symptomatic left ventricular dysfunction. *Circulation.* 1997;96:509-516
14. Wei CM, Heublein DM, Perrella MA, Lerman A, Rodeheffer RJ, McGregor CG, Edwards WD, Schaff HV, Burnett JC, Jr. Natriuretic peptide system in human heart failure. *Circulation.* 1993;88:1004-1009
15. Borg TK, Caulfield JB. The collagen matrix of the heart. *Fed Proc.* 1981;40:2037-2041
16. Abrahams C, Janicki JS, Weber KT. Myocardial hypertrophy in macaca fascicularis. Structural remodeling of the collagen matrix. *Lab Invest.* 1987;56:676-683

17. Ergul A, Walker CA, Goldberg A, Baicu SC, Hendrick JW, King MK, Spinale FG. Et-1 in the myocardial interstitium: Relation to myocyte ece activity and expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000;278:H2050-2056
18. Bakir S, Mori T, Durand J, Chen YF, Thompson JA, Oparil S. Estrogen-induced vasoprotection is estrogen receptor dependent: Evidence from the balloon-injured rat carotid artery model. *Circulation*. 2000;101:2342-2344
19. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. Collagen network of the myocardium: Function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:279-292
20. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev*. 1999;79:215-262
21. Baker AJ, Redfern CH, Harwood MD, Simpson PC, Conklin BR. Abnormal contraction caused by expression of g(i)-coupled receptor in transgenic model of dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280:H1653-1659
22. Kolattukudy PE, Quach T, Bergese S, Breckenridge S, Hensley J, Altschuld R, Gordillo G, Klenotic S, Orosz C, Parker-Thornburg J. Myocarditis induced by targeted expression of the mcp-1 gene in murine cardiac muscle. *Am J Pathol*. 1998;152:101-111
23. Cleutjens JP. The role of matrix metalloproteinases in heart disease. *Cardiovasc Res*. 1996;32:816-821
24. Voloshenyuk TG, Gardner JD. Estrogen improves timp-mmp balance and collagen distribution in volume-overloaded hearts of ovariectomized females. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;299:R683-693
25. Fielitz J, Leuschner M, Zurbrugg HR, Hannack B, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors in the left ventricular myocardium of patients with aortic stenosis. *J Mol Med*. 2004;82:809-820
26. Feinberg MW, Jain MK, Werner F, Sibinga NE, Wiesel P, Wang H, Topper JN, Perrella MA, Lee ME. Transforming growth factor-beta 1 inhibits cytokine-mediated induction of human metalloelastase in macrophages. *J Biol Chem*. 2000;275:25766-25773
27. Vaday GG, Schor H, Rahat MA, Lahat N, Lider O. Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes. *J Leukoc Biol*. 2001;69:613-621
28. Li P, Wang D, Lucas J, Oparil S, Xing D, Cao X, Novak L, Renfrow MB, Chen YF. Atrial natriuretic peptide inhibits transforming growth factor beta-induced smad signaling and myofibroblast transformation in mouse cardiac fibroblasts. *Circ Res*. 2008;102:185-192
29. Cheifetz S, Hernandez H, Laiho M, ten Dijke P, Iwata KK, Massague J. Distinct transforming growth factor-beta (tgf-beta) receptor subsets as determinants of cellular responsiveness to three tgf-beta isoforms. *J Biol Chem*. 1990;265:20533-20538
30. Massague J. The transforming growth factor-beta family. *Annu Rev Cell Biol*. 1990;6:597-641
31. Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem*. 2003;278:13008-13015
32. Xie S, Sukkar MB, Issa R, Oltmanns U, Nicholson AG, Chung KF. Regulation of tgf-beta 1-induced connective tissue growth factor expression in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2005;288:L68-76

33. Daniels A, van Bilsen M, Goldschmeding R, van der Vusse GJ, van Nieuwenhoven FA. Connective tissue growth factor and cardiac fibrosis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2009;195:321-338
34. Bujak M, Ren G, Kweon HJ, Dobaczewski M, Reddy A, Taffet G, Wang XF, Frangogiannis NG. Essential role of smad3 in infarct healing and in the pathogenesis of cardiac remodeling. *Circulation*. 2007;116:2127-2138
35. Hayata N, Fujio Y, Yamamoto Y, Iwakura T, Obana M, Takai M, Mohri T, Nonen S, Maeda M, Azuma J. Connective tissue growth factor induces cardiac hypertrophy through akt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;370:274-278
36. Panek AN, Posch MG, Alenina N, Ghadge SK, Erdmann B, Popova E, Perrot A, Geier C, Morano RD, Bader M, Ozcelik C. Connective tissue growth factor overexpression in cardiomyocytes promotes cardiac hypertrophy and protection against pressure overload. *PLoS One*. 2009;4:e6743
37. Bonniaud P, Margetts PJ, Kolb M, Haberberger T, Kelly M, Robertson J, Gauldie J. Adenoviral gene transfer of connective tissue growth factor in the lung induces transient fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;168:770-778
38. Bonniaud P, Martin G, Margetts PJ, Ask K, Robertson J, Gauldie J, Kolb M. Connective tissue growth factor is crucial to inducing a profibrotic environment in "fibrosis-resistant" balb/c mouse lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2004;31:510-516
39. Shi-wen X, Stanton LA, Kennedy L, Pala D, Chen Y, Howat SL, Renzoni EA, Carter DE, Bou-Gharios G, Stratton RJ, Pearson JD, Beier F, Lyons KM, Black CM, Abraham DJ, Leask A. Ccn2 is necessary for adhesive responses to transforming growth factor-beta1 in embryonic fibroblasts. *J Biol Chem*. 2006;281:10715-10726
40. Cleland JG, Freemantle N, Ball SG, Bonser RS, Camici P, Chattopadhyay S, Dutka D, Eastaugh J, Hampton J, Large S, Norell MS, Pennell DJ, Pepper J, Sanda S, Senior R, Smith D. The heart failure revascularisation trial (heart): Rationale, design and methodology. *Eur J Heart Fail*. 2003;5:295-303
41. Regitz-Zagrosek V, Brokat S, Tschope C. Role of gender in heart failure with normal left ventricular ejection fraction. *Prog Cardiovasc Dis*. 2007;49:241-251
42. Krumholz HM, Larson M, Levy D. Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am J Cardiol*. 1993;72:310-313
43. Aurigemma GP, Gaasch WH. Gender differences in older patients with pressure-overload hypertrophy of the left ventricle. *Cardiology*. 1995;86:310-317
44. Campbell SE, Rakusan K, Gerdes AM. Change in cardiac myocyte size distribution in aortic-constricted neonatal rats. *Basic Res Cardiol*. 1989;84:247-258
45. Tamura T, Said S, Gerdes AM. Gender-related differences in myocyte remodeling in progression to heart failure. *Hypertension*. 1999;33:676-680
46. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fletcher P, Fishbein MC, Braunwald E. Favorable effects of therapy on cardiac performance in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1982;242:H776-784
47. Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP. Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: Prevalence and risk factors. The framingham heart study. *Ann Intern Med*. 1988;108:7-13
48. Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Curr Opin Cardiol*. 1994;9:619-626

49. Wingrove CS, Garr E, Godsland IF, Stevenson JC. 17beta-oestradiol enhances release of matrix metalloproteinase-2 from human vascular smooth muscle cells. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1406:169-174
50. Knight DC, Eden JA. Phytoestrogens--a short review. *Maturitas*. 1995;22:167-175
51. McDonnell DP. Definition of the molecular mechanism of action of tissue-selective oestrogen-receptor modulators. *Biochem Soc Trans*. 1998;26:54-60
52. Power RF, Mani SK, Codina J, Conneely OM, O'Malley BW. Dopaminergic and ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Science*. 1991;254:1636-1639
53. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5925-5930
54. Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*. 1997;389:753-758
55. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*. 1999;340:1801-1811
56. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 1997;138:863-870
57. Matthews J, Gustafsson JA. Estrogen signaling: A subtle balance between er alpha and er beta. *Mol Interv*. 2003;3:281-292
58. Frasor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS. Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (er) alpha activity by erbeta in the uterus. *Endocrinology*. 2003;144:3159-3166
59. Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Stimpel M, Karas RH, Vetter H, Neyses L. Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett*. 1997;416:107-112
60. Mahmoodzadeh S, Eder S, Nordmeyer J, Ehler E, Huber O, Martus P, Weiske J, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J*. 2006;20:926-934
61. Nordmeyer J, Eder S, Mahmoodzadeh S, Martus P, Fielitz J, Bass J, Bethke N, Zurbrugg HR, Pregla R, Hetzer R, Regitz-Zagrosek V. Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation*. 2004;110:3270-3275
62. Dubey RK, Jackson EK. Cardiovascular protective effects of 17beta-estradiol metabolites. *J Appl Physiol*. 2001;91:1868-1883
63. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem*. 1997;272:19858-19862
64. Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Demianenko T, Mao L, Rockman HA, Korach KS, Murphy E. Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;288:H469-476
65. Fliegner D, Schubert C, Penkalla A, Witt H, Kararigas G, Dworatzek E, Staub E, Martus P, Ruiz Noppinger P, Kintscher U, Gustafsson JA, Regitz-Zagrosek V. Female sex and estrogen receptor-beta attenuate cardiac remodeling and apoptosis in pressure overload. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010;298:R1597-1606
66. Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N. Cardiovascular

- disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and estrogen/progestin replacement study follow-up (hers ii). *Jama*. 2002;288:49-57
67. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and estrogen/progestin replacement study (hers) research group. *Jama*. 1998;280:605-613
 68. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *Jama*. 2002;288:321-333
 69. Lim WK, Wren B, Jepson N, Roy S, Caplan G. Effect of hormone replacement therapy on left ventricular hypertrophy. *Am J Cardiol*. 1999;83:1132-1134, A1139
 70. Pines A, Fisman EZ, Levo Y, Drory Y, Ben-Ari E, Motro M, Ayalon D. Menopause-induced changes in left ventricular wall thickness. *Am J Cardiol*. 1993;72:240-241
 71. Arias-Loza PA, Hu K, Dienesch C, Mehlich AM, Konig S, Jazbutyte V, Neyses L, Hegele-Hartung C, Heinrich Fritzemeier K, Pelzer T. Both estrogen receptor subtypes, alpha and beta, attenuate cardiovascular remodeling in aldosterone salt-treated rats. *Hypertension*. 2007;50:432-438
 72. Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, Bonz AW, Muck J, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Ertl G, Neyses L. The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-le2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2005;67:604-612
 73. van Eickels M, Patten RD, Aronovitz MJ, Alsheikh-Ali A, Gostyla K, Celestin F, Grohe C, Mendelsohn ME, Karas RH. 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;41:2084-2092
 74. Xu Y, Arenas IA, Armstrong SJ, Davidge ST. Estrogen modulation of left ventricular remodeling in the aged heart. *Cardiovasc Res*. 2003;57:388-394
 75. Hillisch A, Peters O, Kosemund D, Muller G, Walter A, Schneider B, Reddersen G, Elger W, Fritzemeier KH. Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. *Mol Endocrinol*. 2004;18:1599-1609
 76. Zhan E, Keimig T, Xu J, Peterson E, Ding J, Wang F, Yang XP. Dose-dependent cardiac effect of oestrogen replacement in mice post-myocardial infarction. *Exp Physiol*. 2008;93:982-993
 77. Jain N, Xu J, Kanojia RM, Du F, Jian-Zhong G, Pacia E, Lai MT, Musto A, Allan G, Reuman M, Li X, Hahn D, Cousineau M, Peng S, Ritchie D, Russell R, Lundeen S, Sui Z. Identification and structure-activity relationships of chromene-derived selective estrogen receptor modulators for treatment of postmenopausal symptoms. *J Med Chem*. 2009;52:7544-7569
 78. Lee SD, Kuo WW, Ho YJ, Lin AC, Tsai CH, Wang HF, Kuo CH, Yang AL, Huang CY, Hwang JM. Cardiac fas-dependent and mitochondria-dependent apoptosis in ovariectomized rats. *Maturitas*. 2008
 79. Iwakura A, Shastry S, Luedemann C, Hamada H, Kawamoto A, Kishore R, Zhu Y, Qin G, Silver M, Thorne T, Eaton L, Masuda H, Asahara T, Losordo DW. 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*. 2006;113:1605-1614
80. Koh KK. Effects of estrogen on the vascular wall: Vasomotor function and inflammation. *Cardiovasc Res*. 2002;55:714-726
 81. Koh KK, Bui MN, Mincemoyer R, Cannon RO, 3rd. Effects of hormone therapy on inflammatory cell adhesion molecules in postmenopausal healthy women. *Am J Cardiol*. 1997;80:1505-1507
 82. Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits: Implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89:11259-11263
 83. Gorodeski GI, Yang T, Levy MN, Goldfarb J, Utian WH. Effects of estrogen in vivo on coronary vascular resistance in perfused rabbit hearts. *Am J Physiol*. 1995;269:R1333-1338
 84. Donaldson C, Eder S, Baker C, Aronovitz MJ, Weiss AD, Hall-Porter M, Wang F, Ackerman A, Karas RH, Molkentin JD, Patten RD. Estrogen attenuates left ventricular and cardiomyocyte hypertrophy by an estrogen receptor-dependent pathway that increases calcineurin degradation. *Circ Res*. 2009;104:265-275, 211p following 275
 85. Mahmoodzadeh S, Dworatzek E, Fritschka S, Pham TH, Regitz-Zagrosek V. 17beta-estradiol inhibits matrix metalloproteinase-2 transcription via map kinase in fibroblasts. *Cardiovasc Res*. 2010;85:719-728
 86. Babiker FA, De Windt LJ, van Eickels M, Thijssen V, Bronsaer RJ, Grohe C, van Bilsen M, Doevendans PA. 17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase a receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation*. 2004;109:269-276
 87. Hertrampf T, Seibel J, Laudénbach U, Fritzemeier KH, Diel P. Analysis of the effects of oestrogen receptor alpha (eralpha)- and erbeta-selective ligands given in combination to ovariectomized rats. *Br J Pharmacol*. 2008;153:1432-1437
 88. Jazbutyte V, Arias-Loza PA, Hu K, Widder J, Govindaraj V, von Poser-Klein C, Bauersachs J, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Ertl G, Pelzer T. Ligand-dependent activation of er{beta} lowers blood pressure and attenuates cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res*. 2008;77:774-781
 89. Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*. 1998;139:4252-4263
 90. Ogita H, Node K, Liao Y, Ishikura F, Beppu S, Asanuma H, Sanada S, Takashima S, Minamino T, Hori M, Kitakaze M. Raloxifene prevents cardiac hypertrophy and dysfunction in pressure-overloaded mice. *Hypertension*. 2004;43:237-242
 91. Ogita H, Node K, Asanuma H, Sanada S, Kim J, Takashima S, Minamino T, Hori M, Kitakaze M. Raloxifene improves coronary perfusion, cardiac contractility, and myocardial metabolism in the ischemic heart: Role of phosphatidylinositol 3-kinase/akt pathway. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2004;43:821-829
 92. Barrett-Connor E, Grady D, Sashegyi A, Anderson PW, Cox DA, Hozowski K, Rautaharju P, Harper KD. Raloxifene and cardiovascular events in osteoporotic postmenopausal women: Four-year results from the more (multiple outcomes of raloxifene evaluation) randomized trial. *Jama*. 2002;287:847-857

93. Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2006;355:125-137
94. Quinones MA, Otto CM, Stoddard M, Waggoner A, Zoghbi WA. Recommendations for quantification of doppler echocardiography: A report from the doppler quantification task force of the nomenclature and standards committee of the american society of echocardiography. *J Am Soc Echocardiogr*. 2002;15:167-184
95. Backhaus K, Erichson B, Plinke W, Weiber R. Multivariate analysemethoden. *Springer Verlag*. 2008;12:323-386
96. Bender R, Lange S, Ziegler A. [common significance tests]. *Dtsch Med Wochenschr*. 2007;132 Suppl 1:e24-25
97. Douglas PS, Katz SE, Weinberg EO, Chen MH, Bishop SP, Lorell BH. Hypertrophic remodeling: Gender differences in the early response to left ventricular pressure overload. *J Am Coll Cardiol*. 1998;32:1118-1125
98. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frohlich ED. Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol*. 1979;237:H461-468
99. Morano I, Gagelmann M, Arner A, Ganten U, Ruegg JC. Myosin isoenzymes of vascular smooth and cardiac muscle in the spontaneously hypertensive and normotensive male and female rat: A comparative study. *Circ Res*. 1986;59:456-462
100. Pelzer T, Shamim A, Neyses L. Estrogen effects in the heart. *Mol Cell Biochem*. 1996;160-161:307-313
101. Rosenkranz-Weiss P, Tomek RJ, Mathew J, Eghbali M. Gender-specific differences in expression of mrnas for functional and structural proteins in rat ventricular myocardium. *J Mol Cell Cardiol*. 1994;26:261-270
102. Schaible TF, Malhotra A, Ciambone G, Scheuer J. The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. *Circ Res*. 1984;54:38-49
103. Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS. Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2003;17:253-271
104. Pelletier G, Labrie C, Labrie F. Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol*. 2000;165:359-370
105. Sar M, Welsch F. Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary. *Endocrinology*. 1999;140:963-971
106. Ichinose F, Bloch KD, Wu JC, Hataishi R, Aretz HT, Picard MH, Scherrer-Crosbie M. Pressure overload-induced lv hypertrophy and dysfunction in mice are exacerbated by congenital nos3 deficiency. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004;286:H1070-1075
107. Ho KK, Pinsky JL, Kannel WB, Levy D. The epidemiology of heart failure: The framingham study. *J Am Coll Cardiol*. 1993;22:6A-13A
108. Thireau J, Aimond F, Poisson D, Zhang B, Bruneval P, Eder V, Richard S, Babuty D. New insights into sexual dimorphism during progression of heart failure and rhythm disorders. *Endocrinology*. 2010;151:1837-1845
109. Cleland JG, Swedberg K, Follath F, Komajda M, Cohen-Solal A, Aguilar JC, Dietz R, Gavazzi A, Hobbs R, Korewicki J, Madeira HC, Moiseyev VS, Preda I, van Gilst WH, Widimsky J, Freemantle N, Eastaugh J, Mason J. The euroheart failure survey

- programme-- a survey on the quality of care among patients with heart failure in europe. Part 1: Patient characteristics and diagnosis. *Eur Heart J*. 2003;24:442-463
110. Regitz-Zagrosek V. Therapeutic implications of the gender-specific aspects of cardiovascular disease. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5:425-438
 111. Levy D, Larson MG, Vasan RS, Kannel WB, Ho KK. The progression from hypertension to congestive heart failure. *Jama*. 1996;275:1557-1562
 112. Bhuiyan MS, Shioda N, Fukunaga K. Ovariectomy augments pressure overload-induced hypertrophy associated with changes in akt and nitric oxide synthase signaling pathways in female rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007;293:E1606-1614
 113. Yasue H, Yoshimura M, Sumida H, Kikuta K, Kugiyama K, Jougasaki M, Ogawa H, Okumura K, Mukoyama M, Nakao K. Localization and mechanism of secretion of b-type natriuretic peptide in comparison with those of a-type natriuretic peptide in normal subjects and patients with heart failure. *Circulation*. 1994;90:195-203
 114. Tuttolomondo A, Pinto A, Di Raimondo D, Corrao S, Di Sciacca R, Scaglione R, Caruso C, Licata G. Changes in natriuretic peptide and cytokine plasma levels in patients with heart failure, after treatment with high dose of furosemide plus hypertonic saline solution (hss) and after a saline loading. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010
 115. Cavaasin MA, Sankey SS, Yu AL, Menon S, Yang XP. Estrogen and testosterone have opposing effects on chronic cardiac remodeling and function in mice with myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;284:H1560-1569
 116. Kubota T, McTiernan CF, Frye CS, Slawson SE, Lemster BH, Koretsky AP, Demetris AJ, Feldman AM. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-alpha. *Circ Res*. 1997;81:627-635
 117. Pedram A, Razandi M, Lubahn D, Liu J, Vannan M, Levin ER. Estrogen inhibits cardiac hypertrophy: Role of estrogen receptor-beta to inhibit calcineurin. *Endocrinology*. 2008;149:3361-3369
 118. Li YY, McTiernan CF, Feldman AM. Interplay of matrix metalloproteinases, tissue inhibitors of metalloproteinases and their regulators in cardiac matrix remodeling. *Cardiovasc Res*. 2000;46:214-224
 119. Mujumdar VS, Tyagi SC. Temporal regulation of extracellular matrix components in transition from compensatory hypertrophy to decompensatory heart failure. *J Hypertens*. 1999;17:261-270
 120. Seccia TM, Bettini E, Vulpis V, Quartaroli M, Trist DG, Gaviraghi G, Pirrelli A. Extracellular matrix gene expression in the left ventricular tissue of spontaneously hypertensive rats. *Blood Press*. 1999;8:57-64
 121. Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: Involvement in cardiac hypertrophy. *Circ Res*. 2002;91:1103-1113
 122. Pedram A, Razandi M, O'Mahony F, Lubahn D, Levin ER. Estrogen receptor-beta prevents cardiac fibrosis. *Mol Endocrinol*. 2010;24
 123. Ruiz-Ortega M, Rodriguez-Vita J, Sanchez-Lopez E, Carvajal G, Egido J. Tgf-beta signaling in vascular fibrosis. *Cardiovasc Res*. 2007;74:196-206
 124. Aoki H, Izumo S, Sadoshima J. Angiotensin ii activates rhoa in cardiac myocytes: A critical role of rhoa in angiotensin ii-induced premyofibril formation. *Circ Res*. 1998;82:666-676

125. Torsoni AS, Fonseca PM, Crosara-Alberto DP, Franchini KG. Early activation of p160rock by pressure overload in rat heart. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2003;284:C1411-1419
126. Noma K, Oyama N, Liao JK. Physiological role of rocks in the cardiovascular system. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006;290:C661-668
127. Chen H, Li D, Saldeen T, Mehta JL. Tgf-beta 1 attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via inhibition of upregulation of mmp-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003;284:H1612-1617
128. Nagatomo Y, Carabello BA, Coker ML, McDermott PJ, Nemoto S, Hamawaki M, Spinale FG. Differential effects of pressure or volume overload on myocardial mmp levels and inhibitory control. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H151-161
129. Petrov G, Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Krabatsch T, Dunkel A, Dandel M, Dworatzek E, Mahmoodzadeh S, Schubert C, Becher E, Hampl H, Hetzer R. Regression of myocardial hypertrophy after aortic valve replacement: Faster in women? *Circulation.* 2010;122:S23-S28
130. Li H, Simon H, Bocan TM, Peterson JT. Mmp/timp expression in spontaneously hypertensive heart failure rats: The effect of ace- and mmp-inhibition. *Cardiovasc Res.* 2000;46:298-306

Anhang

Tabelle 28: A: Echokardiographische Daten der Placebo-behandelten Gruppen. B: Echokardiographische Daten der behandelten Gruppen (siehe folgende Seite).

SOVX = Scheinovariektomie, OVX = Ovariektomie, Plac = Placebo, E2 = Östradiol, ERαA = Östrogenrezeptor α Agonist, ERβA = Östrogenrezeptor β Agonist, Ralox = Raloxifen, STAC = Schein-TAC, TAC = transversale Aortenkonstriktion, ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: *p<0.05 vs. SOVX+Plac+STAC; #p<0.05 vs. OVX+Plac+STAC; \$p<0.05 vs. SOVX+Plac+TAC; †p<0.05 vs. OVX+Plac+TAC; ‡p<0.05 vs. OVX+ERαA+TAC; §p<0.05 vs. OVX+ERβA+TAC; ¶p<0.05 vs. OVX+Ralox+TAC.

A

Gruppe	IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)
2 Wochen nach TAC-Operation						
SOVX+Plac+STAC	0.75±0.07 ^{\$}	4.03±0.17 ^{\$}	0.67±0.07 ^{\$}	0.93±0.09 ^{\$}	3.2±0.36	0.82±0.11 ^{\$}
OVX+Plac+ STAC	0.74±0.09 [†]	4.04±0.20 [†]	0.69±0.07 [†]	0.94±0.10 [†]	3.15±0.28	0.87±0.10 [†]
SOVX+Plac+TAC	0.91±0.09 [*]	3.77±0.29 [*]	0.94±0.14 [*]	1.08±0.14 [*]	3.00±0.32	1.08±0.09 [*]
OVX+Plac+ TAC	1.00±0.10 [#]	3.80±0.20 [#]	1.00±0.20 [#]	1.20±0.14 [#]	3.10±0.20	1.20±0.20 [#]
Gruppe	LVM (mg)	LV Vol d (ml)	LV Vol s (ml)	FS (%)	A ₀ V _{max} Prästen	A ₀ V _{max} Poststen
2 Wochen nach TAC-Operation						
SOVX+Plac+STAC	100.79±9.02 ^{\$}	71.44±7.52	41.81±11.42	20.69±6.53	713.33±120.06	577.78±81.59 ^{\$}
OVX+Plac+ STAC	103.09±13.34 [†]	71.94±7.97 [†]	39.88±8.28	22.08±5.20	736.74±152.90 [†]	597.59±252.63 [†]
SOVX+Plac+TAC	132.63±23.01 [*]	61.44±10.60	35.57±8.77	20.61±4.71	606.79±77.21	3381.74±438.17 [*]
OVX+Plac+ TAC	141.50±34.10 [#]	60.50±7.60 [#]	36.90±6.00	18.6±4.30	605.80±76.80 [#]	3485.70±459.60 [#]
Gruppe	IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)
9 Wochen nach TAC-Operation						
SOVX+Plac+STAC	0.77±0.07 ^{\$}	4.13±0.31	0.67±0.07 ^{\$}	0.98±0.11 ^{\$}	3.31±0.46	0.83±0.14 ^{\$}
OVX+Plac+ STAC	0.75±0.12 [†]	4.06±0.29	0.67±0.06 [†]	0.94±0.16 [†]	3.18±0.45 [†]	0.86±0.14 [†]
SOVX+Plac+TAC	1.02±0.15 [*]	4.25±0.51	1.05±0.26 [*]	1.17±0.18 [*]	3.59±0.58	1.13±0.25 [*]
OVX+Plac+ TAC	1.10±0.10 [#]	4.40±0.40	1.10±0.10 [#]	1.20±0.10 [#]	3.70±0.50 [#]	1.10±0.10 [#]
Gruppe	LVM (mg)	LV Vol d (ml)	LV Vol s (ml)	FS (%)	A ₀ V _{max} Prästen	A ₀ V _{max} Poststen
9 Wochen nach TAC-Operation						
SOVX+Plac+STAC	107.45±15.23 ^{\$}	76.28±13.85	45.66±15.27	20.22±6.83	631.70±144.69	606.43±119.73 ^{\$}
OVX+Plac+ STAC	102.55±13.80 [†]	73.12±11.91	41.51±13.02 [†]	22.03±6.89	739.24±241.07	609.23±129.64 [†]
SOVX+Plac+TAC	183.70±33.80 [*]	82.30±24.57	56.04±22.06	15.73±6.28	715.22±92.92	3325.41±614.18 [*]
OVX+Plac+ TAC	200.90±34.60 [#]	87.9±19.10	60.50±17.00 [#]	15.10±4.00	701.00±91.00	3577.00±142.40 [#]

B

Gruppe	IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)
2 Wochen nach TAC-Operation						
OVX+Plac+ TAC	1.00±0.10	3.80±0.20 ^{&}	1.00±0.20	1.2±0.10	3.10±0.20	1.20±0.20
OVX+E2+ TAC	0.84±0.08 [§]	3.73±0.21	0.82±0.13	1.05±0.12	2.86±0.33	1.01±0.11
OVX+ERαA+ TAC	0.90±0.18	3.69±0.20 ^{&}	0.88±0.19	1.17±0.21	2.69±0.25 ^{&}	1.09±0.13
OVX+ERβA+ TAC	1.00±0.14	4.09±0.27 [†]	0.94±0.16	1.20±0.16	3.28±0.32 [†]	1.07±0.19
OVX+Ralox+ TAC	1.10±0.21 [%]	3.82±0.31	0.94±0.15	1.31±0.25	2.91±0.43	1.19±0.15
Gruppe	LVM (mg)	LV Vol d (ml)	LV Vol s (ml)	FS (%)	A₀V_{max} Prästen	A₀V_{max} Poststen
2 Wochen nach TAC-Operation						
OVX+Plac+ TAC	141.5±34.1	60.50±7.6 ^{&}	36.90±6.00 [†]	18.60±4.30	605.80±76.80	3485.70±459.60
OVX+E2+ TAC	110.69±17.79	59.41±7.88	31.69±8.76	23.39±6.77	564.56±137.80	3637.98±383.46
OVX+ERαA+ TAC	121.14±30.37	57.91±7.35	27.04±6.50 [†]	27.10±6.28	554.65±105.77	3255.24±523.39
OVX+ERβA+ TAC	158.75±32.84	74.20±11.33 [†]	44.10±9.92	19.91±3.26	617.98±116.84	3516.98±260.76
OVX+Ralox+ TAC	155.54±41.83	63.46±12.47	33.49±11.52	24.24±6.68	576.47±195.80	3477.68±485.91
Gruppe	IVSd (mm)	LVIDd (mm)	LVPWd (mm)	IVSs (mm)	LVIDs (mm)	LVPWs (mm)
OVX+Plac+ TAC	1.10±0.10	4.40±0.40	1.10±0.10	1.20±0.10	3.70±0.50	1.10±0.10
OVX+E2+ TAC	1.02±0.16	4.17±0.33	0.96±0.12	1.22±0.16	3.44±0.45	1.11±0.16
OVX+ERαA+ TAC	1.11±0.27	4.04±0.23 [§]	1.02±0.34	1.34±0.30	3.25±0.45	1.15±0.30
OVX+ERβA+ TAC	1.05±0.17	4.47±0.40	0.93±0.16	1.28±0.18	3.77±0.51	1.04±0.16
OVX+Ralox+ TAC	1.21±0.22	4.67±0.50 [†]	1.02±0.19	1.42±0.24	3.97±0.62	1.14±0.23
Gruppe	LVM (mg)	LV Vol d (ml)	LV Vol s (ml)	FS (%)	A₀V_{max} Prästen	A₀V_{max} Poststen
9 Wochen nach TAC-Operation						
OVX+Plac+ TAC	200.90±34.60	87.9±19.10	60.50±17.00	15.10±4.00	701.00±91.00	3577.00±142.40
OVX+E2+ TAC	170.28±40.69	78.07±14.80	49.94±15.34	17.85±5.15	569.54±92.44	3579.09±270.38
OVX+ERαA+ TAC	184.51±78.08	72.04±9.68 [§]	43.65±13.24	19.85±7.77	699.63±96.35	3074.65±861.89
OVX+ERβA+ TAC	192.99±60.49	91.90±20.321	62.45±20.96	15.78±5.53	643.92±108.72	3142.85±904.94
OVX+Ralox+ TAC	244.92±81.09	102.39±25.50 [†]	71.03±25.51	15.39±5.17	661.75±157.02	3576±358.97

Tabelle 29: A: morphologische Parameter der Placebo-behandelten Gruppen. B: morphologische Parameter der behandelten Gruppen.

SOVX = Scheinovariektomie, OVX = Ovariektomie, Plac = Placebo, E2 = Östradiol, ER α A = Östrogenrezeptor α Agonist, ER β A = Östrogenrezeptor β Agonist, Ralox = Raloxifen, STAC = Schein-TAC, TAC = transversale Aortenkonstriktion, KG = Körpergewicht, HG = Herzgewicht, TL = Tibialänge. ANOVA, Post Hoc, Scheffé-Test: : *p<0.05 vs. SOVX+Plac+STAC; #p<0.05 vs. OVX+Plac+STAC; \$p<0.05 vs. SOVX+Plac+TAC; †p<0.05 vs. OVX+Plac+TAC; %p<0.05 vs. OVX+E2+TAC; ‡p<0.05 vs. OVX+ER α A+TAC; &p<0.05 vs. OVX+ER β A+TAC; §p<0.05 vs. OVX+Ralox+TAC.

A						
Gruppe	KGW (g)	HW (mg)	TL (mm)	HW/TL (mg/mm)	Uterusgewicht (mg)	Lungen-gewicht (mg)
SOVX+Plac+STAC	22.10± 1.15 [#]	99.21± 5.54 ^{\$}	17.09± 0.61	5.81± 0.39 ^{\$}	69.27± 27.84 [#]	169.93± 49.05
OVX+Plac+STAC	23.55± 1.64 [*]	98.43± 7.71 [†]	17.21± 1.01	5.73± 0.48 [†]	10.72± 3.84 [*]	187.50± 43.23
SOVX+Plac+TAC	22.02± 1.59	160.00± 35.97 [*]	17.15± 0.54	9.39± 2.24 [*]	52.62± 21.68 [†]	208.71± 107.06
OVX+Plac+TAC	23.28± 1.39	176.54± 36.01 [#]	17.32± 0.64	10.19± 2.02 [#]	14.54± 8.04 ^{\$}	206.46± 48.81
B						
Gruppe	KGW (g)	HW (mg)	TL (mm)	HW/TL (mg/mm)	Uterusgewicht (mg)	Lungen-gewicht (mg)
OVX+Plac+TAC	23.28± 1.39	176.54± 36.01	17.32± 0.64	10.19± 2.02	14.54± 8.04 ^{‡%}	206.46± 48.81
OVX+E2+ TAC	23.04± 1.40	139.63± 16.30	16.92± 0.53	8.24± 0.75	102.89± 48.08 ^{†\$\$}	159.55± 41042
OVX+ER α A+TAC	21.04± 1.53 ^{&}	156.33± 65.60	16.41± 0.40	9.50± 3.99	137.91± 22.76 ^{†\$\$}	192.57± 85.41
OVX+ER β A+TAC	23.75± 2.39 [‡]	151.93± 33.11	17.24± 0.57	8.82± 1.92	12.71± 9.04 ^{‡%}	205.43± 92.39
OVX+Ralox+TAC	23.26± 1.17	180.00± 38.31	17.45± 0.76	10.34± 2.29	15.77± 4.69 ^{‡%}	233.00± 111.77

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PATHOLOGISCHE HYPERTROPHIE NACH JESSUP ⁴	1
ABBILDUNG 2: AUFBAU DER ÖSTROGENREZEPTOREN NACH MENDELSON ⁵⁵	4
ABBILDUNG 3: CHEMISCHE STRUKTURFORMEL VON 17 β -ÖSTRADIOL ⁷⁷	6
ABBILDUNG 4: CHEMISCHE STRUKTURFORMEL DES ERA-AGONISTEN 16A-LE2 UND DES ER β -AGONISTEN 8B-VE2 ⁸⁷	8
ABBILDUNG 5: CHEMISCHE STRUKTURFORMEL DER SERMs RALOXIFEN ⁷⁷	9
ABBILDUNG 6: ÜBERSICHT ÜBER DEN ZEITLICHEN ABLAUF DES TIEREXPERIMENTES	11
ABBILDUNG 7: ECHOKARDIOGRAPHISCHES BILD DER LINKSVENTRIKULÄREN KURZE ACHSE (<i>SHORT AXIS</i>) (LINKS) UND STILISTISCHE ZEICHNUNG DER LV <i>SHORT AXIS</i> (RECHTS)	14
ABBILDUNG 8: BEISPIEL EINER WGA-FÄRBUNG	29
ABBILDUNG 9: AUSWERTUNG DER SIRIUS ROT FÄRBUNG MIT HILFE DES PROGRAMMS IMAGEJ	31
ABBILDUNG 10: IMMUNHISTOCHEMISCHE FÄRBUNG, BEISPIELHAFT FÜR COL1A2	33
ABBILDUNG 11: UTERUSGEWICHT IN MG ELF WOCHEN NACH OVARIKOTOMIE.	36
ABBILDUNG 12: A: KORRELATION HW ZU LVM IN DER GRUPPE SOVX+PLAC+STAC; B: KORRELATION HW ZU LVM IN DER GRUPPE SOVX+PLAC+TAC	37
ABBILDUNG 13: DOPPLERAUFNAHME IN DER DESZENDIERENDEN AORTA DES GLEICHEN TIERES PRÄ-TAC (A) UND NEUN WOCHEN POST-TAC (B)	37
ABBILDUNG 14: A: DRUCKGRADIENT P IN MM/S DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC- OPERATION; B: DRUCKGRADIENT P IN MM/S DER BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC- OPERATION.	38
ABBILDUNG 15: ÜBERLEBENSANALYSE NACH KAPLAN MEIER.	39
ABBILDUNG 16: ÜBERLEBENSANALYSE NACH KAPLAN MEIER.	40
ABBILDUNG 17: DARSTELLUNG DER IM FOLGENDEN INTERPRETIERTEN FAKTOREN, ERMITTELT MIT HILFE DER FAKTORANALYSE	41
ABBILDUNG 18: A: FAKTORANALYSE DER GRUPPE SOVX+PLAC+STAC VOR, ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC. B: FAKTORANALYSE DER GRUPPE OVX+PLAC+STAC VOR, ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC.	41
ABBILDUNG 19: A: FAKTORANALYSE DER GRUPPE SOVX+PLAC+TAC VOR, ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC. B: FAKTORANALYSE DER GRUPPE OVX+PLAC+TAC VOR, ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC.	42
ABBILDUNG 20: FAKTORANALYSE DER GRUPPE OVX+E2+TAC VOR, ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC.	42
ABBILDUNG 21: FAKTORANALYSE DER GRUPPE OVX+ERAA+TAC VOR, ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC.....	43
ABBILDUNG 22: A: FAKTORANALYSE DER GRUPPE OVX+ERBA+TAC VOR, ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC. B: FAKTORANALYSE DER GRUPPE OVX+RALOX+TAC VOR, ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC.	43
ABBILDUNG 23: A: LV-MASS ZU TIBIALÄNGE QUOTIENT IN MG/MM DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: VERHÄLTNISS LV-MASS ZU TIBIALÄNGE QUOTIENTEN IN MG/MM DER BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	44
ABBILDUNG 24: A: LINKSVENTRIKULÄRE ENDDIASTOLISCHE VORDERWAND IN MM DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: LINKSVENTRIKULÄRE ENDDIASTOLISCHE VORDERWAND IN MM DER BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	45
ABBILDUNG 25: A: LINKSVENTRIKULÄRE ENDDIASTOLISCHE HINTERWAND IN MM DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: LINKSVENTRIKULÄRE ENDDIASTOLISCHE HINTERWAND IN MM DER BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	46

ABBILDUNG 26: A: LINKSVENTRIKULÄRER ENDDIASTOLISCHER DIAMETER IN MM DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: LINKSVENTRIKULÄRER ENDDIASTOLISCHER DIAMETER IN MM DER BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	47
ABBILDUNG 27: A: FASERVERKÜRZUNG IN % DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: FASERVERKÜRZUNG IN % DER BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	48
ABBILDUNG 28: A: EJEKTIONSFRAKTION IN % DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: EJEKTIONSFRAKTION IN % DER BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	49
ABBILDUNG 29: M-MODE AUFNAHMEN DES LV DES GLEICHEN TIERES PRÄ-TAC (A) UND 9 WOCHEN POST-TAC (B).....	50
ABBILDUNG 30: A: RELATIVE WANDDICKE (Th/r) IN % DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: RELATIVE WANDDICKE (Th/r) IN % DER BEHANDELTEN GRUPPEN ZWEI UND NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	50
ABBILDUNG 31: A: ANP-ZU-HPRT-QUOTIENT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: ANP-ZU-HPRT-QUOTIENT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	51
ABBILDUNG 32: A: BNP-ZU-HPRT-QUOTIENT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: BNP-ZU-HPRT-QUOTIENT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	52
ABBILDUNG 33: A: bMHC-ZU-HPRT-QUOTIENT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: bMHC-ZU-HPRT-QUOTIENT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	53
ABBILDUNG 34: A: KORRELATION LVM/TL ZU bMHC/HPRT IN DEN PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN; B: KORRELATION LVM/TL ZU bMHC/HPRT IN DEN BEHANDELTEN GRUPPEN.....	53
ABBILDUNG 35: A: MYOZYTENFLÄCHE (μm^2) DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: MYOZYTENFLÄCHE (μm^2) DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.....	54
ABBILDUNG 36: A: KORRELATION LVM/TL (MG/MM) ZU MYOZYTENFLÄCHE (μm^2) DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: KORRELATION LVM/TL (MG/MM) ZU MYOZYTENFLÄCHE (μm^2) DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.....	55
ABBILDUNG 37: GESAMTKOLLAGENGEHALT IN %, NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	56
ABBILDUNG 38: SIRIUS-ROT-FÄRBUNG, JE EIN TYPISCHES BILD PRO GRUPPE.	56
ABBILDUNG 39: A: COL1A2-ZU-HPRT-QUOTIENT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: COL1A2-ZU-HPRT-QUOTIENT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	57
ABBILDUNG 40: A: COL3A1-ZU-HPRT-QUOTIENT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: COL3A1-ZU-HPRT-QUOTIENT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	58
ABBILDUNG 41: A: COL1A2-PROTEINGEHALT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: COL1A2-PROTEINGEHALT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.....	58
ABBILDUNG 42: A: COL3A1-PROTEINGEHALT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: COL3A1-PROTEINGEHALT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.	59
ABBILDUNG 43: A: TGF β 1-ZU-HPRT-QUOTIENT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: TGF β 1-ZU-HPRT-QUOTIENT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.....	60
ABBILDUNG 44: A: TGF β 2-ZU-HPRT-QUOTIENT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: TGF β 2-ZU-HPRT-QUOTIENT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.....	60
ABBILDUNG 45: A: CTGF-ZU-HPRT-QUOTIENT DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION; B: CTGF-ZU-HPRT-QUOTIENT DER BEHANDELTEN GRUPPEN NEUN WOCHEN NACH TAC-OPERATION.....	61

Tabellenverzeichnis

TABELLE 1: ÜBERSICHT ÜBER DIE GRUPPENVERTEILUNG	12
TABELLE 2: ÜBERSICHT ÜBER DIE VERWENDETEN RELEASEPELLETS.	13
TABELLE 3: ÜBERSICHT ÜBER DIE FÜR DIE TIEREXPERIMENTELLEN EINGRIFFE BENÖTIGTEN MATERIALIEN.	17
TABELLE 4: VERWENDETE CHEMIKALIEN	18
TABELLE 5: ÜBERSICHT ÜBER VERWENDETE PUFFER.	19
TABELLE 6: GERÄTE UND GEBRAUCHSMATERIALIEN.	19
TABELLE 7: ÜBERSICHT ÜBER DIE OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER) DER IN DIESER ARBEIT UNTERSUCHTEN GENE.	22
TABELLE 8: VERWENDETE CHEMIKALIEN UND GERÄTE FÜR DIE RNA-AUFARBEITUNG UND cDNA-SYNTHESE.	22
TABELLE 9: VERWENDETE CHEMIKALIEN UND GERÄTE ZUR PROTEINAUFARBEITUNG UND PROTEIN- KONZENTRATIONSBESTIMMUNG.	23
TABELLE 10: GELVOLUMEN FÜR DIE EINGESETZTEN TRENNGELE.	24
TABELLE 11: GELVOLUMEN FÜR DAS 5%IGE SAMMELGEL.	24
TABELLE 12 PUFFER FÜR ELEKTROPHORESE UND WESTERN BLOT (SEMI-DRY-SYSTEM).	25
TABELLE 13: GERÄTE FÜR DEN WESTERN BLOT (SEMI-DRY-SYSTEM).	26
TABELLE 14: FÄRBE LÖSUNGEN FÜR NITROZELLULOSEMAMBRAN UND SDS-GELE.	26
TABELLE 15: ZUSAMMENSETZUNG DER BLOCKING LÖSUNG.	26
TABELLE 16: ÜBERSICHT ÜBER DIE EINGESETZTEN ANTIKÖRPER (AK) FÜR WESTERN BLOT.	27
TABELLE 17: ÜBERSICHT ÜBER DIE FÜR GELELEKTROPHORESE, WESTERN BLOT UND PROTEINDETEKTION BENÖTIGTEN CHEMIKALIEN.	27
TABELLE 18: ZUSAMMENSETZUNG DES STRIPPING PUFFERS.	27
TABELLE 19: ÜBERSICHT ÜBER DIE FÜR HISTOLOGIE VERWENDETEN VERBRAUCHSMATERIALIEN.	28
TABELLE 20: ÜBERSICHT ÜBER DIE FÜR DIE WGA FÄRBUNG BENÖTIGTEN MATERIALIEN.	29
TABELLE 21: CHEMIKALIEN FÜR DIE SIRIUS ROT FÄRBUNG.	30
TABELLE 22: ÜBERSICHT ÜBER DIE FÜR DIE FÄRBUNG DER KOLLAGENE 1 UND 3 UND FÜR DIE MMP2 UND 9 VERWENDETEN REAGENZEN.	32
TABELLE 23: ÜBERSICHT ÜBER DIE FÜR DIE FÄRBUNG DER KOLLAGENE 1 UND 3 UND DER MMPs 2 UND 9 VERWENDETEN MATERIALIEN.	33
TABELLE 24: ÜBERSICHT ÜBER DIE, FÜR DIE ANFERTIGUNG DER ARBEIT, BENÖTIGTE SOFTWARE.	35
TABELLE 25: KORRELATION DER HYPERTROPHIEMARKER ANP, BNP UND bMHC MIT DEN FUNKTIONSPARAMETER EF UND FS.	54
TABELLE 26: ÜBERSICHT ÜBER RELATIVE MMP2, TIMP1 UND TIMP2 GENEXPRESSION NORMALISIERT AUF HPRT.	62
TABELLE 27: ÜBERSICHT ÜBER TIMP1 PROTEINGEHALT NORMALISIERT AUF B-ACTIN, SOWIE MMP2- UND MMP9-GEHALT IM VERHÄLTNISS ZUR GESAMTFLÄCHE.	63
TABELLE 28: A: ECHOKARDIOGRAPHISCHE DATEN DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN. B: ECHOKARDIOGRAPHISCHE DATEN DER BEHANDELTEN GRUPPEN (SIEHE FOLGENDE SEITE).	I
TABELLE 29: A: MORPHOLOGISCHE PARAMETER DER PLACEBO-BEHANDELTEN GRUPPEN. B: MORPHOLOGISCHE PARAMETER DER BEHANDELTEN GRUPPEN.	III

Publikationen

C. Westphal, C. Schubert, K. Prella, D. Fliegner, A. Penkalla, V. Regitz-Zagrosek. *Influence of estrogen and estrogen receptor modulators on cardiac remodeling in pressure overload induced hypertrophy*. in prep.

C. Westphal, L. Marko, A. Konkol, C. Schubert, R. Fischer, F.C. Luft, V. Regitz-Zagrosek, D.C. Zeldin, W-H. Schunck, D.N. Müller. *Transgenic CYP2J2 overexpression improves cardiac hypertrophy and electric remodeling*. in prep.

B. Spallek, A. Konkol, C. Westphal, L. Marko, L.M. DeGraf, C. Schubert, A. Bradbury, R. Dechend, F.C. Luft, V. Regitz-Zagrosek, D.C. Zeldin, D.N. Müller, W-H. Schunck, R. Fischer. *Transgenic CYP2J2 overexpression protects against atrial fibrillation inducibility after chronic β -adrenergic stimulation*. in prep.

Kongressbeiträge – Poster und Vorträge

C. Westphal, C. Schubert, K. Prella, D. Fliegner, A. Penkalla, V. Regitz-Zagrosek. *17 β -estradiol and estrogen receptor α and β agonists maintain cardiac function in chronic pressure overload in female mice*, Posterbeitrag, Keystone Symposia, Keystone, CO, USA; März 2010

C. Westphal, C. Schubert, K. Prella, D. Fliegner, A. Penkalla, V. Regitz-Zagrosek. *17 β -estradiol and estrogen receptor α and β agonists maintain cardiac function in chronic pressure overload in female mice*, Posterbeitrag, 4th EUGeneHeart General Assembly, Utrecht, Niederlande; November 2009

C. Westphal, C. Schubert, K. Prella, D. Fliegner, A. Penkalla, V. Regitz-Zagrosek. *17 β -estradiol and estrogen receptor α and β agonists maintain cardiac function in chronic pressure overload in female mice*, Posterbeitrag, 4th Congress, International Society of Gender in Medicine (IGM)

C. Westphal, C. Schmidt, L. Marko, A. Konkol, F. Qadri, C. Schubert, R. Fischer, R. Dechend, F.C. Luft, V. Regitz-Zagrosek, D.C. Zeldin, W-H. Schunck, D.N. Müller. *CYP2J2 overexpression improves cardiac hypertrophy in male, but not in female mice*, Posterbeitrag, 4th Congress, International Society of Gender in Medicine (IGM)

C. Westphal, C. Schmidt, L. Marko, A. Konkol, F. Qadri, C. Schubert, R. Fischer, R. Dechend, F.C. Luft, V. Regitz-Zagrosek, D.C. Zeldin, W-H. Schunck, D.N. Müller. *CYP2J2 overexpression improves cardiac hypertrophy in male, but not in female mice*, Posterbeitrag, 63rd High Blood Pressure Research Conference 2009, Chicago, USA; September 2009

C. Westphal, C. Schubert, K. Prella, D. Fliegner, A. Penkalla, V. Regitz-Zagrosek. *Influence of estrogen and different estrogen receptor modulators on cardiac hypertrophy and function in pressure overload*, 3rd Annual Meeting of the International Society of Gender Medicine, Stockholm, Schweden; September 2008

C. Westphal, C. Schubert, K. Prella, D. Fliegner, A. Penkalla, V. Regitz-Zagrosek. *Soy Diet Attenuates Cardiac Hypertrophy*, Posterbeitrag 12th Annual Meeting of the ECCR, La Colle sur Loup, Nizza, Frankreich; Oktober 2007