

Aus der Arbeitsgruppe für Endokrinologie  
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Auswirkungen von  $\beta$ -Ecdyson  
auf die Histomorphologie des Myokards  
der orchiektomierten Sprague-Dawley-Ratte  
als Modell des androgendefizienten älteren Mannes**

INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Julia Eismann

aus  
Hamm

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Wolfgang Wuttke

2. Berichterstatter: PD Dr. Jörg Männer

3. Berichterstatter: Prof. Dr. Michael Hufner

Tag der mündlichen Prüfung: 04.03.2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>7</b>
1.1 PADAM – Partielles Androgendefizit des alternden Mannes .....	8
1.2 Das Herz.....	9
1.2.1 Das Myokard .....	10
1.2.2 Androgene und myokardiale Effekte .....	11
1.2.3 Das altersbedingte Androgendefizit und myokardiale Effekte .....	11
1.3 Die Koronararterien.....	12
1.3.1 Androgene und vaskuläre Effekte .....	14
1.3.2 Das altersbedingte Androgendefizit und vaskuläre Effekte .....	15
1.4 Das altersbedingte Androgendefizit und kardiovaskuläre Erkrankungen .....	15
1.5 Die Testosteronersatztherapie .....	16
1.6 Die orchietomierte Sprague-Dawley-Ratte als Modell.....	17
1.7 Die Testsubstanz $\beta$ -Ecdyson .....	19
1.7.1 Allgemeines zu den Ecdysteroiden .....	19
1.7.2 $\beta$ -Ecdyson und sein Vorkommen .....	20
1.7.3 Struktur und Metabolismus von $\beta$ -Ecdyson.....	20
1.7.4 Der $\beta$ -Ecdysonrezeptor.....	21
1.7.5 Die Wirkung von $\beta$ -Ecdyson .....	22
1.7.6 Die Wirkung von $\beta$ -Ecdyson auf die Skelettmuskulatur.....	22
1.7.7 Die Wirkung von $\beta$ -Ecdyson auf das kardiovaskuläre System .....	23
1.8 Zielsetzung .....	24
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>25</b>
2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	25
2.2 Versuchsablauf .....	25
2.3 Histologische Aufarbeitung der Herzen .....	27
2.3.1 Gewinnung des Probenmaterials .....	27
2.3.2 Anfertigung der Organschnitte .....	27
2.3.3 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) .....	28
2.3.4 Elastika-van-Gieson-Färbung .....	28

2.4	Histologische Auswertung.....	29
2.4.1	Messung der Kardiomyozytenfläche .....	29
2.4.2	Bestimmung des prozentualen myokardialen Kollagenanteils.....	31
2.4.3	Bestimmung des prozentualen Kollagen-Elastinanteils der Koronararterie ....	32
2.4.4	Bestimmung der Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld.....	34
2.4.5	Statistische Auswertung .....	34
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>35</b>
3.1	Körpergewicht.....	35
3.1.1	Körpergewichtsverlauf .....	35
3.1.2	Körpergewicht nach Versuchsende .....	36
3.2	Futteraufnahme.....	37
3.2.1	Futteraufnahme im Verlauf .....	37
3.2.2	Futteraufnahme und Aufnahme der Testsubstanz .....	38
3.3	Herzgewicht .....	39
3.4	Prozentualer Anteil des Herzgewichts am Gesamtkörpergewicht.....	40
3.5	Kardiomyozytenfläche.....	41
3.6	Index: Kardiomyozytenfläche / Herzgewicht.....	42
3.7	Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld.....	43
3.8	Prozentualer myokardialer Kollagenanteil .....	44
3.9	Prozentualer Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand.....	45
3.10	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	46
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>47</b>
4.1	Studienziel .....	47
4.2	Dosierungen der Testsubstanz .....	48
4.3	Analysen der Untersuchungsergebnisse .....	49
4.3.1	Futteraufnahme und Körpergewicht.....	49
4.3.2	Herzgewicht.....	49
4.3.3	Prozentualer Anteil des Herzgewichts am Körpergewicht .....	50
4.3.4	Kardiomyozytenfläche .....	51
4.3.5	Index aus Kardiomyozytenfläche und Herzgewicht.....	52
4.3.6	Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld .....	53
4.3.7	Prozentualer myokardialer Kollagenanteil.....	54

4.3.8	Prozentualer Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand.....	55
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
<b>6</b>	<b>Methodischer Anhang.....</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>63</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>78</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>80</b>

# Abkürzungsverzeichnis

Akt	Proteinkinase B
AR	Androgenrezeptor
Bad	Pro-apoptotisches Protein
d	Tag
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DHP	Dihydropyridin-Rezeptor
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ecd	$\beta$ -Ecdyson, 20-Hydroxyecdyson
EcR	$\beta$ -Ecdyson-Rezeptor
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
f.w.	fresh weight
HDL	high density lipoprotein
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KHK	koronare Herzkrankheit
LD	letale Dosis
LDL	low density lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
orx	orchiektomiert
PADAM	Partielles Androgendefizit des alternden Mannes
PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3-Kinase
p.o.	per os
PPAR- $\gamma$	Peroxisom-Proliferator aktivierter Rezeptor
RAR	Retinsäure-Rezeptor
RXR	Retinoid-Rezeptor
SD	Sprague-Dawley-Ratte
Sf	sojafrei
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
TAG	Triacylglyceride
TD	Thyroid-Rezeptor
TRT	Testosteronersatztherapie
USP	Ultraspiracle Protein

# 1 Einleitung

„Angesichts demografischer Veränderungen in Deutschland mit einem prognostischen Zuwachs des Anteils der Personen über 64 Jahre um etwa die Hälfte bis Ende 2030“ [Aman et al 2012, S.26] gewinnen altersassoziierte Veränderungen und Krankheitsbilder in unserer Gesellschaft immer mehr an Bedeutung und das Interesse an deren Erforschung rückt zunehmend in den Blickpunkt. Das Krankheitsspektrum im Alter ist sehr vielfältig und betrifft beispielsweise die Knochen-, Muskel-, und Fettmasse sowie das kardiovaskuläre System. Allen voran führen Veränderungen des Herz-Kreislaufsystems zu Beeinträchtigungen der Lebensqualität der Betroffenen. Besonders Männer leiden unter diesen gesundheitlichen Einbußen. Studien zufolge versterben durchschnittlich mehr Männer an kardiovaskulären Erkrankungen als Frauen [British Heart Foundation Statistics Database 2010]. Vermutlich ist die altersassoziierte Abnahme des Testosteronspiegels für die morphologischen Veränderungen mitverantwortlich. Einige Patienten profitieren von der Wiederherstellung des physiologischen Testosteronspiegels mittels Hormonersatztherapie. Die Behandlung führt zu einer Verbesserung der testosterondefizitassoziierten Symptome wie beispielsweise der Muskelkraft, der Knochendichte und der kardiovaskulären Risikofaktoren [Bassil et al. 2009]. Diese Nutzen erklären die zunehmende Nachfrage nach einer Testosteronersatztherapie (TRT) in den USA innerhalb der vergangenen Jahre [Bassil et al. 2009]. Bei der Indikation dieser Therapie muss aufgrund einiger unerwünschter Nebenwirkungen das Nutzen-Risiko-Profil genau abgewogen werden. Die bedeutendste Kontraindikation einer Testosteronersatztherapie stellt das Prostatakarzinom dar [Bassil et al. 2009].

Aus diesen Gründen wird nach alternativen Therapieansätzen zur Linderung altersbedingter Beschwerden und Erkrankungen beim androgendefizienten Mann geforscht.

Als potentielle Therapiealternative rückt  $\beta$ -Ecdyson in das Interesse der Forschung. Bisherige Studien belegen einen protektiven Effekt von  $\beta$ -Ecdyson auf das Knochengewebe [Kapur et al. 2010] und eine anabole Wirkung auf die Skelettmuskulatur [Lafont & Dinan 2003]. Somit stellt  $\beta$ -Ecdyson eine Therapieoption zur Behandlung der altersbedingten und androgendefizitassoziierten Osteoporose und Sarkopenie dar.

In der vorliegenden Dissertation werden Effekte von  $\beta$ -Ecdyson auf das Myokard und das kardiovaskuläre System an orchiectomierten SD-Ratten untersucht. Auf der Suche nach einem Tiermodell, mit dem PADAM erforscht werden soll, boten sich aus verschiedenen Gründen, die weiter ausgeführt werden, SD-Ratten an, die orchiectomiert und für Versuchsreihen eingesetzt wurden.

## 1.1 PADAM – Partielles Androgendefizit des alternden Mannes

Im Zuge des demographischen Wandels nimmt der Anteil der älteren Bevölkerung an der Gesamtbevölkerung kontinuierlich zu. Statistiken zufolge ist der Anteil der über 60-Jährigen von 1990 mit 20,4% auf 25,9% im Jahr 2009 angestiegen und wird auch in Zukunft weiter zunehmen. Vermutlich werden im Jahre 2060 39,2% der Gesamtbevölkerung über 60 Jahre alt sein [Bundeszentrale für politische Bildung 2011].

Mit zunehmendem Alter des Mannes reduziert sich der Testosteronspiegel stetig. Zwischen dem 40. und dem 70. Lebensjahr sinkt das freie Serumtestosteron um ca. 1,2% pro Jahr [Jockenhövel und Schubert 2003].

In der longitudinalen Baltimorestudie wiesen 20% aller Männer im Alter über 60 Jahre und 50% der Männer über 80 Jahre ein erniedrigtes Gesamt-Testosteron auf [Jockenhövel und Schubert 2003]. Liegen neben dem Testosteronmangel gleichzeitig klinische Symptome vor, werden die Begriffe „Androgendefizit“ oder „Hypogonadismus“ verwendet [Cunningham 2006; Bhasin et al. 2006; Nieschlag et al. 2005]. Dies trifft auf ca. 5,6% aller 30- bis 79-jährigen Männer zu [Araujo et al. 2007]. Vermutlich ist ihre Anzahl deutlich höher, da nur wenige betroffene Männer diagnostiziert und behandelt werden [Bassil et al. 2009].

Im Gegensatz zur weiblichen Menopause mit einer abrupten Abnahme der Östrogene verläuft der hormonelle Alterungsprozess beim Mann schleichend. Die assoziierten Symptome treten meist erst im höheren Lebensalter auf und weisen starke interindividuelle Ausprägungen auf [Christ-Crain et al. 2001]. Während es bei der Frau in der Menopause zum beinahe vollständigen Verlust der Östrogene kommt, ist beim Mann eine Restfunktion der Gonaden bis ins hohe Alter erhalten. Demzufolge liegt beim alternden Mann nur ein partieller Androgenmangel vor. In der Literatur werden die Bezeichnungen PADAM (partielles Androgendefizit des alternden Mannes) oder ADAM (Androgendefizit des Alternden Mannes) für diesen Zustand verwendet. Weitere Synonyme sind „late-onset hypogonadism“ und „Altershypogonadismus“. Benennungen wie „Andropause“ oder „Klimakterium virile“ sind aufgrund ihrer fehlenden Parallelität zur weiblichen Menopause biologisch falsch und klinisch unzutreffend.

Bedingt durch den Untergang von Leydig-Zellen im Hoden und einer zusätzlich verminderten pulsatilen Aktivität der Hypothalamus-Hypophysen-Achse mit einer resultierenden verminderten Sekretion von GnRH- und Gonadotropin (LH, FSH) trotz erniedrigten Testosteronspiegels nimmt die Testosteronproduktion ab. Des Weiteren führt ein Anstieg des Sexualhormon-bindenden-Globulins (SHBG) zu einer verminderten Konzentration an freiem und somit biologisch-aktivem Testosteron im Blut [Neaves et al 1984].

Testosteron und seine Metaboliten nehmen nicht nur eine wichtige Funktion bei der Entwicklung der Geschlechtsorgane und Geschlechtsmerkmale sowie bei der Erhaltung der Sexualfunktion beim Mann ein, sondern sind auch für die Erhaltung der Knochen- und



Muskelmasse, der Regulation des Lipidmetabolismus und der Protektion der Haut bedeutungsvoll [Howell und Shalet 2001]. Aufgrund der vielseitigen Wirkungen von Testosteron kommt es durch das altersbedingte Androgendefizit zu einer komplexen Symptomatik, die die Lebensqualität der Betroffenen im Alter stark beeinträchtigen kann [Jockenhövel und Schubert 2003]. Typische Symptome, die interindividuell große Unterschiede in Ausmaß und zeitlichem Auftreten aufweisen [Christ-Crain et al. 2001], können unter anderem Libidoverlust, erektile Dysfunktion, Osteoporose, Reduktion der Muskelmasse sowie der Muskelkraft, Erhöhung des viszeralen Fettgewebes, Beeinträchtigung der kognitiven Fähigkeiten und Depressionen darstellen [Bhasin et al. 2006; Nieschlag et al. 2005].

Da das klinische Bild des altersbedingten Androgendefizits dem des Hypogonadismus junger Männer ähnelt [Jockenhövel und Schubert 2003], wird ein Zusammenhang zwischen dem Androgenmangel und den Symptomen des alternden Mannes vermutet. Diese Annahme wird durch die zeitliche Korrelation verstärkt.

In der vorliegenden Studie wurde durch die Orchiektomie der Versuchstiere artifiziell ein Androgendefizit induziert. Die männlichen gonadektomierten Sprague-Dawley-Ratten stellen somit ein Modell des altersbedingt androgendefizienten Mannes dar.

## 1.2 Das Herz

Das Herz ist ein muskuläres Hohlorgan, bestehend aus zwei Vorhöfen und zwei Ventrikeln, das als Druck- und Saugpumpe für die Zirkulation des Blutes innerhalb des Herz-Kreislaufsystems verantwortlich ist. Das menschliche Herz nimmt 0,4% (bei Frauen) bis 0,45% (bei Männern) des Körpergewichtes [Drenckhahn 2003] ein. Dabei ist das Herzgewicht stark vom Trainingszustand abhängig und kann bei Leistungssportlern auf bis zu 500g ansteigen. 500g werden als kritisches Herzgewicht definiert, weil darüber hinaus der Gefäßquerschnitt der Koronararterien zu gering ist, um die Herzmuskulatur ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen zu versorgen [Drenckhahn 2003].

Die Struktur der Herzwand besteht wie die der Gefäßwände aus drei Schichten. Von innen nach außen werden Endokard, Myokard und Epikard unterschieden. Das Endokard besteht aus einem einschichtigem Endothel und einer elastischen Lamina propria [Schmitz 2007]. Durch die Tela subendokardialis, die Blutgefäße und Nervenfasern enthält, werden Endokard und Myokard miteinander verbunden [Schmitz 2007]. Das Myokard stellt die stärkste Schicht dar und besteht größtenteils aus typischer Herzmuskulatur [Lüllmann-Rauch 2003]. Die stärkere physikalische Belastung der Ventrikel führt zu einer größeren Dicke des Ventrikelmyokards im Vergleich zu dem Myokard der Vorhöfe [Schmitz 2007]. Innerhalb des Myokards werden zwei verschiedene Typen von Herzmuskelfasern beschrieben: die Arbeitsmuskulatur und die Muskulatur des Reizleitungssystems [Schmitz 2007]. Bei den Zellen des Reizleitungssystems handelt es sich um modifizierte Herzmuskelzellen, die

eigenständig Aktionspotentiale auslösen und fortleiten können [Lüllmann-Rauch 2003]. Das Epikard entspricht dem viszeralen Blatt des Perikards und stellt somit die innere Begrenzung der Perikardhöhle (Cavitas pericardii) dar. Es ermöglicht eine reibungsarme Volumenänderung während der Herzaktion.

### 1.2.1 Das Myokard

Das Myokard wird aus Herzmuskulatur und gefäß- und nervenführendem Bindegewebe gebildet. Dabei stellt die Herzmuskulatur eine Sonderform der quergestreiften Muskulatur dar. Die Fasern der Ventrikelmuskulatur verlaufen schraubenförmig und bilden in der Wand des linken Ventrikels drei Schichten. Die äußerste Schicht, die subepikardiale Schicht, bildet longitudinale Touren, die im Bereich der Herzspitze zu einem Wirbel (Vortex Cordis) zusammenlaufen [Drenckhahn 2003]. Die Fasern der mittleren Schicht, die nur im linken Ventrikel und im Septum interventriculare ausgebildet ist, sind zirkulär ausgerichtet. Die subendokardiale Schicht verläuft überwiegend longitudinal und bildet die innere Schicht beider Ventrikel [Drenckhahn 2003]. Aufgrund dieser komplizierten räumlichen Anordnung sind die Kardiomyozyten innerhalb eines Präparates des Ventrikelmyokards in unterschiedlichen Schnittrichtungen anzutreffen [Lüllmann-Rauch 2003].

Obwohl die Kardiomyozyten nur ca. 1/3 bis 1/4 aller Myokardzellen darstellen, nehmen sie volumenmäßig mit ca. 70 bis 75% den größten Anteil des Myokards ein [Astorri et al. 1977; Jantunen et al. 1989]. Die Kardiomyozyten des Menschen sind durchschnittlich 50-100µm lang, 10-20µm dick und besitzen größtenteils einen zentralständigen Kern [Welsch 2006]. Bei chronischer Mehrbelastung nimmt die Muskelmasse zu, was auf einer Vergrößerung der Kardiomyozyten beruht und nicht auf einer Vermehrung der Zellzahl [Lüllmann-Rauch 2003]. Da es sich bei diesen um terminal differenzierte postmitotische Zellen handelt und in der Herzmuskulatur keine zur Reparatur und Regeneration befähigten Satellitenzellen vorhanden sind, werden eine Vermehrung und Regeneration für unmöglich gehalten [Lüllmann-Rauch 2003]. Untersuchungen zeigen, dass das abgestorbene Myokard durch bindegewebige Narben ersetzt wird [Lüllmann-Rauch 2003].

Die Kardiomyozyten sind von einer Basallamina umhüllt, die aus dem nicht-fibrillären Kollagen-Typ-IV besteht und ein zweidimensionales Netzwerk aufbaut [Welsch 2006]. Zwischen den kardialen Myozyten befindet sich aufgrund des hohen oxidativen Stoffwechsels ein dichtes Netzwerk aus Kapillaren [Schmitz 2007]. So beträgt in einem Querschnitt das Verhältnis von Kardiomyozyt zu Kapillare 1:1 [Lüllmann-Rauch 2003].

Die myokardiale Extrazelluläre Matrix wird hauptsächlich von Kollagenfibrillen und elastischen Fasern gebildet. Sie geben dem Gewebe Stabilität und Elastizität. Die einzelnen Kardiomyozyten und Kapillaren werden durch das Endomysium miteinander verbunden [Weber et al. 1988], das aus dem Perimysium hervorgeht. Dieses wiederum fasst die Muskelfasern zu Bündeln zusammen und entspringt aus dem Epimysium. Das Epimysium

verläuft entlang der endo- und epikardialen Myokard-Oberfläche [Ehrenberg 2008]. Alle drei Untereinheiten sind aus einem fibrillären Kollagennetzwerk aufgebaut. Die vorherrschenden Kollagentypen sind Kollagen-Typ-I und -III [Weber et al. 1988; Chapman et al. 1990]. Die dicken Kollagen-Typ-I-Fasern gewährleisten hauptsächlich die mechanische Belastbarkeit des Gewebes und das Kollagen-Typ-III ermöglicht durch seine dünnen Fasern die Gewebeelastizität [Lamparter und Maisch 2000]. Zusätzlich ist Kollagen-Typ-VI im Endomysium, Perimysium und in den Gefäßwänden entdeckt worden [Mollnau et al. 1995]. Während der Systole gewährleistet die myokardiale Extrazelluläre Matrix die Kraftübertragung der einzelnen Kardiomyozyten und verhindert während der Diastole die Überdehnung der Muskelfasern [Weber et al. 1994]. Somit spielt die Extrazelluläre Matrix eine bedeutende Rolle für die Funktion der physiologischen Herzaktion.

### **1.2.2 Androgene und myokardiale Effekte**

Androgene besitzen eine anabole Wirkung auf die Skelettmuskulatur, die auch auf die Herzmuskulatur übertragen werden kann. Sowohl Testosteron als auch Dihydrotestosteron steigern die myokardiale Proteinbiosynthese [Libby 1984, Marsh et al. 1998]. Die Steroidhormone wirken direkt über einen Androgenrezeptor, der von den Kardiomyozyten selbst exprimiert wird und können in supraphysiologischen Dosierungen zu einer Hypertrophie dieser Zellen führen [Marsh et al. 1998]. Der Androgenrezeptor gehört zu der Großfamilie der Steroidhormonrezeptoren. Nach der Bindung des Hormons an den spezifischen zytosolischen Rezeptor transloziert der ligandenbesetzte Rezeptor in den Zellkern, wo er die Genexpression reguliert [Köhrle und Petrides 2007]. Durch die Applikation von Cyproteronacetat, einem kompetitiven Androgenrezeptorantagonisten, kann dieser Effekt aufgehoben werden [Marsh et al. 1998]. Der Nachweis einer mRNA, die für den Androgenrezeptor kodiert, bestätigt zusätzlich das Vorhandensein von Androgenrezeptoren in Kardiomyozyten verschiedener Species einschließlich Männer und Frauen [Marsh et al. 1998].

Die Expression des Androgenrezeptors im Myokard hängt von der dort vorherrschenden Testosteronkonzentration ab. So zeichnet sich die kardiale Hypertrophie, die mit einem erhöhten Metabolismus einhergeht [Thum und Borlak 2002], durch einen lokal erniedrigten Testosteronspiegel aus. Die niedrige Hormonkonzentration im hypertrophierten Herzgewebe führt zu einer adaptiven Hochregulation der Androgenrezeptoren [Thum und Borlak 2002].

### **1.2.3 Das altersbedingte Androgendefizit und myokardiale Effekte**

Die Orchiektomie führt bei Ratten zu einer Reduktion der Proteinbiosynthese [Kinson et al. 1991] und führt zu niedrigeren Herz- und Körpergewichten [Schaible et al. 1984]. Der Quotient aus Herz- zu Körpergewicht bleibt dabei unverändert [Schaible et al. 1984]. Die

Gonadektomie wirkt sich auf die kardiale Pumpfunktion, die Ejektionsfraktion, den maximalen systolischen Druck und den myokardialen Sauerstoffverbrauch aus [Schaible et al. 1984].

Eine durch das Androgendefizit bedingte Reduktion der kardialen Arbeitsleistung kann durch eine Testosteronersatztherapie (TRT) verhindert werden [Scheuer et al. 1987].

Der Alterungsprozess des Mannes geht sowohl mit einer kontinuierlichen Reduktion des Serum-Testosteronspiegels [Jockenhövel und Schubert 2003] als auch mit einem Kardiomyozytenverlust einher [Olivetti et al. 1995]. Olivetti et al. [1995] verdeutlichten in einer morphometrischen Untersuchung den altersassoziierten Kardiomyozytenverlust des menschlichen männlichen Herzens. Der Verlust von ca. 1g Myokard pro Jahr entspricht ca. 64 Millionen Kardiomyozyten und betrifft sowohl das rechte als auch das linke Herz. Der linke Ventrikel verliert ca. 43 Millionen und der rechte Ventrikel ca. 14 Millionen Nuclei pro Jahr [Olivetti et al. 1995]. Möglicherweise könnte die altersassoziierte Beeinträchtigung der Koronardurchblutung und der Mikrovaskularisation, die oft zu einer ischämiebedingten Nekrose führt, zum Untergang kardialer Myozyten beitragen. Der Kardiomyozytenverlust erhöht die Belastung der übriggebliebenen Zellen und resultiert in einer reaktiven Hypertrophie [Olivetti et al. 1995]. Das Zellvolumen der verbliebenen Kardiomyozyten nimmt pro Nucleus im linken Ventrikel durchschnittlich um  $158\mu\text{m}^2$  pro Jahr und im rechten Ventrikel durchschnittlich um  $167\mu\text{m}^2$  zu. Der Verlust kardialer Myozyten wird durch fibröse Herde ersetzt. Ab dem 40. Lebensjahr lagert sich zusätzlich Kollagen interstitiell ab. Diese beiden Formen der Akkumulation Extrazellulärer Matrix konnten häufiger in subendokardialen Regionen des linken Ventrikels beobachtet werden [Olivetti et al. 1995].

Die oben genannten strukturellen Veränderungen des Myokards im Alter spielen eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung einer Herzinsuffizienz [Anversa et al. 1990; Olivetti et al. 1995], indem sie sich mit anderen altersbedingten kardiovaskulären Risikofaktoren wie arterieller Hypertonie und koronarer Atherosklerose potenzieren [Wei 1992; McKee et al. 1971; Frohlich et al. 1992].

### **1.3 Die Koronararterien**

Die arterielle Blutversorgung des menschlichen Herzens wird durch die Herzkranzarterien Aa. coronariae sinistra und dextra und deren Äste gewährleistet. Zwischen den Versorgungsgebieten der beiden Koronararterien bestehen Anastomosen, die bei einem plötzlichen Verschluss einzelner Arterienäste keine ausreichende Blutversorgung gewährleisten können. Demzufolge stellen die Koronararterien funktionelle Endarterien dar [Drenckhahn 2003]. Sie sind Arterien vom muskulären Typ und versorgen das Myokard während der Diastole mit Sauerstoff [Drenckhahn 2003].

Die Arterienwand besteht aus den drei Hauptkomponenten Kollagen, Elastin und glatte Muskelzellen [Dobrin 1978] und ist generell von innen nach außen aus drei Schichten

aufgebaut, die teilweise noch unterteilt werden: Tunica intima (Intima), Tunica media (Media) und Tunica externa (Adventitia). Die Intima besteht aus dem Endothel, der subendothelialen Schicht und der Lamina elastica interna. Das Endothel ist aus einer dünnen Schicht von Epithelzellen, den Endothelzellen, aufgebaut und trennt den Intravasalraum von den tieferen Gefäßwandschichten [Lüllmann-Rauch 2003]. Die subendotheliale Schicht weist altersabhängige und lokale Unterschiede auf und enthält nur wenige Zellen und Extrazelluläre Matrix (EZM). Langfristig können glatte Muskelzellen einwandern oder Lipidablagerungen auftreten, die beide zu einer Intima-Verdickung mit atherosklerotischen Veränderungen beitragen [Lüllmann-Rauch 2003]. Bei der Lamina elastica interna handelt es sich um ein Geflecht aus miteinander vernetzten elastischen Fasern, die wie ein Flechtzaun von zahlreichen Löchern durchbrochen werden [Drenckhahn 2003].

Die Media nimmt die breiteste Schicht der Arterienwand ein und setzt sich bei muskulären Arterien überwiegend aus glatten Muskelzellen und Extrazellulärer Matrix zusammen. Die glatten Muskelzellen ordnen sich größtenteils konzentrisch an [Welsch 2006]. Bindegewebsfasern wie Kollagenfasern (Typ III) und elastische Fasern sind in dieser Schicht weniger bedeutsam [Drenckhahn 2003]. Die Aufgabe der Media liegt darin, die Gefäßwand gegen die Dehnungskräfte des Blutdrucks zu stabilisieren. Zur Adventitia grenzt sich die Media durch die Lamina elastica externa ab.

Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, die das Gefäß in der Umgebung verankert. Sie enthält Fibroblasten, Proteoglykane, elastische Fasern und Kollagenfasern. Zusätzlich beherbergt sie Nervenfasern, Blut- und Lymphgefäße zur Versorgung der Gefäßwand [Lüllmann-Rauch 2003]. Das Bindegewebe setzt sich aus reichlich Kollagenfasern und elastischen Fasern zusammen. Dabei wurden bisher Kollagen-Typ-I, -III, -IV, -V, -VI, -VIII, -XV, -XVIII, -XIX nachgewiesen [Diez 2007]. Den größten Anteil stellen die fibrillären Kollagen-Typen-I mit 60% und -III mit 30% dar [Diez 2007]. Die Kollagenfasern sind scherengitterartig in die elastischen Fasern eingelagert, wodurch die Adventitia das Gefäß in Längsrichtung stabilisiert (siehe Abb. 1).

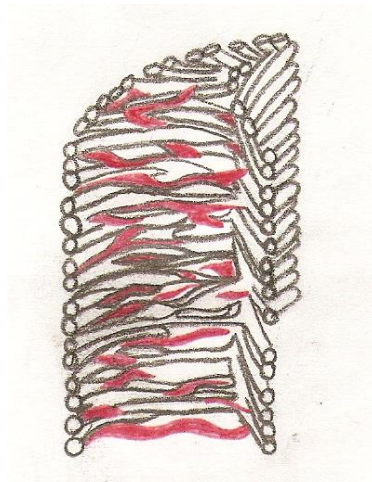


Abb. 1: Organisation elastischer Lamellen und Kollagenfibrillenbündel (rot dargestellt) in der Adventitia

Die Kollagentypen dienen primär dem Schutz vor Überdehnung, indem der dicke Kollagen-Typ-I die Zugkraft und der dünnere Kollagen-Typ-III die Gewebeflexibilität gewährleisten. [Diez 2007]. Die Extrazelluläre Matrix unterliegt einem ständigen Auf- und Abbau [Hauser 2008]. Die Fibroblasten des Myokards und die glatten Muskelzellen der Media sind für die Kollagensynthese verantwortlich [Heenemann et al. 2003]. Der Abbau wird durch extrazelluläre Proteasen, wie Kollagenasen, Serinproteasen und Matrix- Metalloproteasen kontrolliert [Hauser 2008]. Das Hauptprotein elastischer Fasern ist das Elastin, das die Dehnbarkeit der Gefäßwand erhöht. Zwischen den elastischen Fasern lagern sich nichtelastische Kollagenfasern ein, die eine Überdehnung der elastischen Fasern verhindern [Hauser 2008].

In der vorliegenden Dissertation wurden mithilfe der Elastika-van-Gieson-Färbung die elastischen Fasern und die Kollagenfasern histomorphometrisch dargestellt und der prozentuale Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand, der für die Dehnbarkeit und die Stabilität der Gefäße verantwortlich ist, bestimmt. Letztendlich nehmen diese Strukturkomponenten der Adventitia Einfluss auf die myokardiale Sauerstoffversorgung während der Diastole und schlussfolgernd auf die physische und kardiale Belastbarkeit.

### **1.3.1 Androgene und vaskuläre Effekte**

Das Vorhandensein von Androgenrezeptoren in den Koronararterien wurde mehrfach belegt. Die meisten Androgenrezeptoren sind in der Adventitia und den glatten Muskelzellen der Media lokalisiert [Horwitz und Horwitz 1982]. Die Steroidhormone können unter anderem direkt über den Rezeptor an der Gefäßregulation mitwirken und nehmen vermutlich Einfluss auf die Entstehung von Atherosklerose. Die Migration glatter Muskelzellen und deren Proliferation spielen eine bedeutende Rolle bei atherosklerotischen Veränderungen [Horwitz und Horwitz 1982].

Sowohl männliche als auch weibliche Sexualhormone regulieren die Zusammensetzung der Extrazellulären Matrix in der Gefäßwand [Natoli et al. 2005] und führten in einem Versuch an Ratten zu gegensätzlichen Effekten [Fischer und Swain 1977]. Die Wirkung von Testosteron auf die Extrazelluläre Matrix war weniger stark ausgeprägt als die der Östrogene. Die Orchiektomie führte zu einer Reduktion des prozentualen Kollagenanteils, die durch eine Testosteronsubstitution wieder ausgeglichen werden konnte. Der prozentuale Elastingehalt wurde durch die Gonadektomie der männlichen Tiere nicht beeinflusst [Fischer und Swain 1977]. Vermutlich hat Testosteron keinen Einfluss auf den Elastingehalt [Natoli et al. 2005]. Inwieweit diese Untersuchungsergebnisse auf den Menschen übertragbar sind und durch eine Modulation der Proteine der Extrazellulären Matrix und deren Regulatoren bedingt sind, ist bisher noch nicht vollständig geklärt [Natoli et al. 2005].

### **1.3.2 Das altersbedingte Androgendefizit und vaskuläre Effekte**

Der Alterungsprozess beim Mann ist sowohl mit einer stetigen Reduktion des Serum-Testosteronspiegels [Jockenhövel & Schubert 2003] als auch mit einer Zunahme der Gefäßsteifigkeit im Vergleich zu Frauen gleichen Alters [Hayward et al. 2000; London et al. 1995; Sonesson et al. 1993] assoziiert.

Die erhöhte Gefäßsteifigkeit wird durch diverse morphologische Veränderungen verursacht. Eine Verbreiterung der Media führt zu einer Dickenzunahme der Arterienwand und vergrößert insgesamt den Durchmesser der Arterie. Sowohl eine Zunahme des Wassergehaltes als auch eine Ablagerung von Bindegewebe bedingen den Breitenzuwachs der Arterienwand [Dobrin 1978]. Morphologisch zeigen sich eine Reduktion des prozentualen Elastinanteils und eine erhöhte Steifigkeit der elastischen Fasern. Einerseits führen eine Herunterregulation der Elastin-Produktion [Qiu et al. 2007] und andererseits eine Spaltung der elastischen Fasern durch Kollagenfasern sowie eine vermehrte Calciumablagerung [Dobrin 1978] zu einer verminderten Elastizität der Gefäßwand. Die altersbedingten morphologischen und mechanischen Veränderungen der Arterienwand resultieren unter anderem in einer Erhöhung des arteriellen Blutdrucks [Dobrin 1978]. Der Stellenwert des Androgenmangels bei diesen Veränderungen ist noch nicht vollständig geklärt.

Der Alterungsprozess bei männlichen Affen ist ebenfalls durch eine Abnahme des Elastingehalts, die zu einer erhöhten aortalen Steifigkeit führt, gekennzeichnet [Qiu et al. 2007]. Die Synthese von Kollagen-Typ-I ist sowohl bei weiblichen als auch bei männlichen Tieren im Alter herunterreguliert, wohingegen nur die männlichen Tiere eine Beeinträchtigung der Kollagen-Typ-III-Synthese aufweisen. Zusätzlich ist bei diesen der Kollagen-Typ-VIII, der die Migration glatter Gefäßmuskelzellen und die neointimale Formation fördert, erhöht [Qiu et al. 2007].

Der geschlechtsspezifische Unterschied im Alter liegt demzufolge in der veränderten Zusammensetzung der Kollagen-Isoformen, der Glykation von Kollagen [Astrand et al. 2011] und der Abnahme des Elastingehalts, die vermutlich die Hauptursachen für die erhöhte Steifigkeit der Arterienwand beim alternden Mann repräsentieren. Einen Index dafür stellt das steigende Kollagen-Elastin-Verhältnis [Qiu et al. 2007] als unabhängiger Risikofaktor für kardiale Dysfunktionen dar.

### **1.4 Das altersbedingte Androgendefizit und kardiovaskuläre Erkrankungen**

Männer versterben deutlich häufiger an koronaren Herzerkrankungen als Frauen [British Heart Foundation 2010]. Im Jahr 2009 verstarb jeder fünfte Mann und jede achte Frau im Vereinigten Königreich an koronaren Herzerkrankungen [British Heart Foundation 2010]. In den letzten Jahrzehnten wurden vermehrt Studien, hauptsächlich epidemiologischer und klinischer Form, veröffentlicht, die einen Zusammenhang zwischen Androgendefizit und

einem erhöhten Risiko für Kardiovaskuläre Erkrankungen belegten. Das Androgendefizit stellt einen Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen dar und kann als prädiktiver Marker bei Patienten mit erhöhtem kardiovaskulären Risikoprofil für diese genutzt werden [Khaw et al. 2007].

Eine fünfjährige klinische Studie mit Soldaten belegte einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Mortalitätsrate und einem niedrigen Testosteronspiegel [Shores et al. 2006]. Liu et al. [2003] beobachteten eine konstant niedrigere Testosteronkonzentration bei Männern mit kardiovaskulären Erkrankungen. Unabhängig von Alter, BMI, Serumlipiden, Diabetes mellitus, Rauchen und Alkoholkonsum zeigte sich bei androgendefizienten Männern ein erhöhtes Risiko für die Entstehung von Atherosklerose [Hak et al. 2002]. Phillips et al. [1994] beobachteten eine signifikante negative Korrelation zwischen einem globalen Score für koronare Herzkrankheiten und freiem Testosteron im Plasma. Ein niedriger Testosteronspiegel ist mit der Entstehung oder Verschlechterung kardiovaskulärer Erkrankungen assoziiert [Traish et al. 2009].

Niedrige Testosteronspiegel führen zu einem Anstieg von kardiovaskulären Risikofaktoren wie der Zunahme der Körperfettmasse [van den Beld et al. 2000], der arteriellen Hypertonie [Khaw und Barrett-Connor 1988], dem Diabetes mellitus Typ 2 [Stellato et al. 2000], der Zunahme von LDL-Cholesterin und TAG im Plasma sowie einer gleichzeitigen Abnahme des HDL-Cholesterins [Haffner et al. 1993] und der gesteigerten Synthese proinflammatorischer Zytokine [Maggio et al. 2006]. Zytokine wirken bei der Entstehung chronischer Erkrankungen beim alternden Mann mit [Maggio et al. 2006]. Des Weiteren wird eine negative Korrelation zwischen freiem Testosteron und der Intima-Media-Dicke beobachtet [Mäkinen et al. 2005; Muller et al. 2004]. Eine Verbreiterung der Intima-Media resultiert in einer zunehmenden arteriellen Steifigkeit und stellt gemeinsam mit atherosklerotischen Veränderungen einen weiteren Risikofaktor für die Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen dar. Diese aufgeführten Veränderungen, bedingt durch das Androgendefizit, repräsentieren Komponenten des metabolischen Syndroms, das sekundär zu einem erhöhten kardiovaskulären Risikoprofil beiträgt [Traish et al. 2009].

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass ein Testosterondefizit Einfluss auf die Entstehung von kardiovaskulären Risikofaktoren nimmt. Testosteron reguliert über verschiedene Mechanismen den Fettmetabolismus, den Glukosestoffwechsel und die vaskulären Funktionen. Basaria und Dobs [2007] vermuten zusätzlich eine direkte Auswirkung des Androgendefizits auf die Pathogenese von kardiovaskulären Erkrankungen. Der genaue Mechanismus ist bisher noch unbekannt.

## 1.5 Die Testosteronersatztherapie

Aufgrund der unspezifischen Symptome des altersbedingten Androgendefizits und der starken interindividuellen Schwankungen der klinischen Ausprägung ist die Indikation für



eine Testosteronersatztherapie (TRT) schwierig zu stellen. Es müssen sowohl ein niedriger Serum-Testosteronspiegel sowie Symptome eines Hypogonadismus vorhanden und Kontraindikationen ausgeschlossen sein [Christ-Crain et al. 2001]. Mithilfe eines Fragenkatalogs können die klinisch assoziierten Symptome konkret erfragt und dokumentiert werden [Bassil et al. 2009]. Die Testosteronersatztherapie erzielt bei vielen Männern mit Androgendefizit eine signifikante Verbesserung der Lebensqualität, die sich in einer Reduktion der Beschwerden äußert [Jockehövel & Schubert 2003]. Die hormonelle Behandlung führt zu einer Erhöhung der Libido (allerdings nicht zu einer Verbesserung der erektilen Dysfunktion [O`Carroll & Bancroft 1984]), einer Zunahme der Knochendichte [Katznelson et al. 1996; Snyder et al. 1999], einer Verminderung der Körperfettmasse [Bhasin et al. 1996], einer Steigerung der Muskelmasse und der Muskelkraft [Tenover 1992; Morley et al. 1993] und einer Senkung des Gesamt- und des LDL-Cholesterins [Zgliczynski et al. 1996]. Aufgrund der stimulierenden Wirkung von Testosteron auf das Prostatakarzinom wird die Testosteronersatztherapie in Bezug auf mögliche Risiken kontrovers diskutiert [Bassil et al. 2009]. Das Vorhandensein eines Prostatakarzinoms stellt eine absolute Kontraindikation dar und muss vor Beginn einer Hormonersatztherapie ausgeschlossen werden. Lebertoxizität, Verschlechterung einer bereits bestehenden benignen Prostatahyperplasie, Gynäkomastie, testikuläre Atrophie mit Infertilität, Verschlechterung eines unbehandelten Schlafapnoe-Syndroms und Polyglobulie werden als mögliche unerwünschte Nebenwirkungen beschrieben [Bassil et al. 2009].

Schlussfolgernd muss das Nutzen-Risiko-Profil einer TRT bei jedem Patienten individuell abgeklärt werden.

Bisher liegen noch keine Daten zu Auswirkungen einer TRT auf kardiovaskuläre Erkrankungen vor [Bassil et al. 2009].

## **1.6 Die orchiektomierte Sprague-Dawley-Ratte als Modell**

Die Sprague-Dawley-Ratte (SD-Ratte) dient als ein allgemein anerkanntes Modell in der Forschung für Toxikologie, Pharmakologie, Reproduktion und Verhalten, da ihre physiologischen Funktionen denen des Menschen sehr ähnlich sind. Ein schnelles Wachstum, eine hohe Fruchtbarkeit, eine zahme Art sowie günstige Erwerbs- und Haltungskosten zeichnen die SD-Ratte als begehrte Forschungsrasse aus [Keenan et al. 2005]. Aufgrund ihrer kurzen Lebensdauer von zwei bis drei Jahren weist sie eine deutlich schnellere Entwicklung als andere Säugetiere auf und reagiert innerhalb kurzer Zeit auf hormonelle Veränderungen wie Hormonsubstitution oder hormonelle Defizite. Demzufolge eignet sie sich besonders gut für ein Forschungsdesign über einen kurzen Zeitraum [Kalu 1991; Frost & Jee 1992]. Im Hinblick auf die vorliegende Studie entspricht der dreimonatige Applikationszeitraum der Testsubstanz, was ca. zwölf Prozent der Lebenserwartung einer SD-Ratte ausmacht, einem zehnjährigen Lebensabschnitt des Menschen.

Im Gegensatz zum Menschen entwickelt die SD-Ratte im Alter unter physiologischen Bedingungen keinen Hormonmangelzustand.

Aufgrund guter wissenschaftlicher Erfahrungen und Ergebnisse mit der ovariectomierten SD-Ratte als Tiermodell für die postmenopausale Frau wurde die männliche orchietomierte SD-Ratte zu einem vereinfachten und etablierten Modell für die endokrinologischen Verhältnisse des hypogonadalen Mannes [Vanderschueren et al. 1993; Wink & Felts 1980; Erben et al. 2000; Stürmer et al. 2006; Franklina M et al. 2006]

In Osteoporose-Studien gilt die orchietomierte Ratte bereits als anerkanntes Tiermodell für den hypogonadalen Mann. Sowohl bei Männern als auch bei männlichen Ratten ist der Hypogonadismus mit einem erhöhten Knochenumsatz assoziiert, der zu einem Verlust von Knochenmasse führt [Franklina M et al. 2006].

An dieser Stelle sollte darauf hingewiesen werden, dass beim älteren Mann nur ein partielles Androgendefizit vorliegt, während die orchietomierte SD-Ratte einen massiven Hypogonadismus aufweist. Der partielle Hypogonadismus des älteren Mannes zeigt sowohl im Plasmatestosteronspiegel als auch in seinem klinischen Erscheinungsbild große interindividuelle Variabilitäten.

Der männliche Alterungsprozess ist durch eine Abnahme der Leydigzellen im Hoden und damit einhergehend durch eine reduzierte Testosteronproduktion gekennzeichnet. Gleichzeitig fördert die steigende Konzentration des SHBG (Sexualhormon-bindendes Globulin) das Absinken an freiem, biologisch aktivem Testosteron im Plasma [Neaves et al. 1984]. Die Rythmik der adenohipophysären LH-Freisetzung ist abgeflacht, was zu einer Aufhebung der zirkadianen Testosteronfreisetzung mit hohen Spiegeln am Morgen führt. Somit handelt es sich beim älteren Mann um eine Kombination aus primärem und sekundärem (hypogonadotropen) Hypogonadismus, woraus ein partielles Androgendefizit resultiert.

Der komplexe Zustand des älteren Mannes geht zusätzlich mit altersbedingten Veränderungen einher, die schwer von dem klinischen Bild des Hypogonadismus abzugrenzen sind. Welche Symptome durch den Androgenmangel einerseits und durch den Alterungsprozess andererseits verursacht werden, wird weiterhin kontrovers diskutiert.

In der vorliegenden Arbeit wurde durch die Orchietomie der SD-Ratten artifiziell ein primärer Hypogonadismus erzeugt. Aufgrund der kompletten Ausschaltung der endokrinen testikulären Funktion mit lediglich verbleibender adrenokortikalen Sekretion des schwach androgen-wirksamen DHEAS (Dehydroepiandrosteron) [van Weerden et al. 2002, Bélanger et al. 1989] liegt bei dem Tiermodell der Orx-SD-Ratte ein massiver Hypogonadismus vor.

Daher werden in der vorliegenden Studie Auswirkungen des totalen testikulären Androgendefizits untersucht, was nicht exakt dem hormonellen Zustand des partiellen Hypogonadismus des älteren Mannes entspricht. Die Untersuchungsergebnisse sind nicht

exakt auf das partielle Androgendefizit des alternden Mannes übertragbar; sie können jedoch richtungsweisende Informationen erbringen.

Auch in kardialen Studien gilt die Ratte als ein etabliertes Tiermodell [Tucci 2011]. Um Studienergebnisse aus Versuchen mit Rattenherzen auf das menschliche Herz adäquat übertragen zu können, müssen neben den Gemeinsamkeiten auch die Unterschiede zwischen den Herzen dieser beiden Spezies berücksichtigt werden. Im Gegensatz zur arteriellen Blutversorgung des humanen Herzens erfolgt die Versorgung des Myokards der SD-Ratte nicht nur über eine rechte und eine linke Koronararterie, sondern zusätzlich über extrakoronare Äste aus diversen Thorakalarterien (A. mammaria interna und A. subclavia) [Halpern 1957]. Diese sind von besonderer Bedeutung, da sie die Hauptversorgung des Sinusknotens gewährleisten [Sequeira 2005]. Eine weitere anatomische Besonderheit stellt der Verlauf der Koronararterien dar. Diese verlaufen nicht wie beim Menschen auf der Myokardoberfläche, sondern ziehen relativ direkt nach ihrem Ursprung aus der Aorta in die Tiefe des Myokards [Sequeira 2005]. Aufgrund der ansonsten strukturellen, funktionellen und metabolischen Gemeinsamkeiten vom Myokard des Menschen und der Sprague-Dawley-Ratte gilt diese als verbreitetes Versuchstier für myokardiale Studien.

## 1.7 Die Testsubstanz $\beta$ -Ecdyson

### 1.7.1 Allgemeines zu den Ecdysteroiden

Ecdysteroide sind die Steroidhormone der Arthropoden, bei denen sie eine wichtige Rolle in der Regulation der Häutung, der Metamorphose, der Reproduktion und der Diapause einnehmen [Koolman 1989]. Vermutlich handelt es sich sowohl um artenabhängige als auch um entwicklungsabhängige Aktivitäten der verschiedenen Vertreter dieser Gruppe [Dinan 2001]. Biochemisch sind Ecdysteroide polare Moleküle, die strukturell polyhydroxylierte Ketosteroide mit einer langen Carbonseitenkette darstellen und ihre Wirkung meist über einen nukleären Rezeptor entfalten.

1966 wurden die gleichen Moleküle in verschiedenen Pflanzenarten entdeckt. Dort ist ihre Konzentration deutlich höher als in den Arthropoden und ihr Gehalt variiert sowohl innerhalb der Pflanze als auch zwischen den verschiedenen Pflanzenarten [Dinan 2001]. Um diese Moleküle von den Ecdysteroiden der Arthropoden zu unterscheiden, bezeichnete man sie als „Phytoecdysteroide“. Bisher konnten in sechs Prozent aller Pflanzenarten Ecdysteroide nachgewiesen werden [Dinan 1995a]. Ihre genaue Funktion in den Pflanzen ist bisher noch nicht eindeutig erforscht. Eventuell dienen sie als Schutz vor Raupenfraß, indem sie den Hormonhaushalt und den Häutungsprozess der Insekten stören [Lafont und Horn 1989]. Aufgrund ihrer artspezifischen Wirkung gegen pflanzenfressende Insekten könnten sie eine sichere und spezifische Variante der Schädlingsbekämpfung darstellen [Dinan 2001; Dhadialla 1998]. Für Säugetiere sind Ecdysteroide von Bedeutung, da sie Bestandteil ihrer

normalen Ernährung sind. Aufgrund des reichlichen Vorkommen in der Natur ist die leichte Verfügbarkeit ein positiver Aspekt dieser Substanzen. Mittlerweile sind mehr als 300 verschiedene Ecdysteroide sowohl aus tierischen als auch aus pflanzlichen Geweben isoliert worden [Lafont und Dinan 2003] und finden besonders in der Kosmetik- und Fitnessindustrie Gebrauch. Für Bodybuilder und Sportler sind ca. 300 ecdysteroidhaltige Anabolika-Präparate auf dem Markt erhältlich [Dinan und Lafont 2006].

### 1.7.2 $\beta$ -Ecdyson und sein Vorkommen

In der vorliegenden Untersuchung wurde das Ecdysteroid 20-Hydroxyecdyson eingesetzt, welches meist als  $\beta$ -Ecdyson (Ecd) bezeichnet wird. Weitere Synonyme sind „Ecdystron“ oder „Crustecdyson“. Das Vorhandensein mehrerer Bezeichnungen für dieses Molekül resultiert aus seiner zeitgleichen Entdeckung durch verschiedene Arbeitsgruppen. In der vorliegenden Dissertation wird für die Testsubstanz die Abkürzung „Ecd“ verwendet.

Da Ecd sowohl in Arthropoden als auch in Pflanzen vorkommt und biologisch aktiver ist als die meisten anderen bekannten, in der Natur vorkommenden Ecdysteroide [Dinan 2001], gilt Ecd als Hauptvertreter der Ecdysteroide. Sein reichliches Vorkommen trug dazu bei, dass Ecd das erste Ecdysteroid war, das entdeckt wurde [Butenandt und Karlson 1954]. Für den Menschen bedeutsame Pflanzenarten, die Ecd enthalten, sind diejenigen, die Bestandteile der herkömmlichen Ernährung sind. Signifikant hohe Konzentrationen von Ecd konnten in Spinat (*Spinacia oleracea*) und Quinoa (*Chenopodium quinoa*) nachgewiesen werden [Dinan 1995b]. Spinat enthält beispielsweise ca. 50 $\mu$ g Ecd pro g f.w. (fresh weight) [Dinan 1995b].

### 1.7.3 Struktur und Metabolismus von $\beta$ -Ecdyson

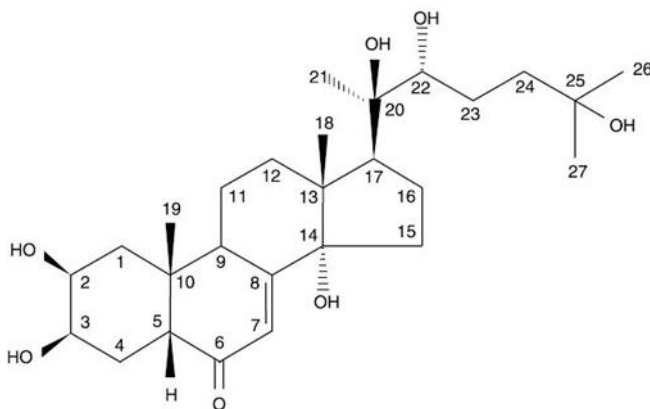


Abb. 2: Strukturformel von 20-Hydroxyecdysone [Dinan und Lafont 2006, S. 2]

Biochemisch leitet sich Ecd von Cholesterol und in den Pflanzen auch von seinen Zwischenmetaboliten ab. Daher weist es ein Steroidgerüst bestehend aus 27 Kohlenstoffatomen mit einer langen Carbonseitenkette am C17-Atom auf [Kleine und Rossmann 2010] und unterscheidet sich sowohl deutlich in der Größe von den

Steroidhormonen der Wirbeltiere als auch aufgrund der vielen Hydroxylgruppen am Grundgerüst. Letztgenannte führen zu einer hohen Polarität und Wasserlöslichkeit dieses Moleküls. Diese strukturellen Merkmale beeinflussen die Aktivität der einzelnen, strukturell unterschiedlichen Ecdysteroide.

Ecd wird aufgrund seiner chemischen Eigenschaften schnell resorbiert und zügig über den Blutkreislauf in die verschiedenen Organe (Leber, Gallenblase, Niere und Darm) transportiert [Hikino et al. 1972 a, b]. Die Ausscheidung erfolgt sowohl über die Faeces als auch über den Urin. Bei Mäusen wird hauptsächlich die biliäre Ausscheidung genutzt [Hikino et al. 1972 a, b]. Für den menschlichen Metabolismus sind noch keine eindeutigen Daten vorhanden. Die Eliminationshalbwertszeit von Ecd im Menschen beträgt neun Stunden [Simon und Koolman 1989]. Die Toxizität von Ecd auf den Organismus von Säugetieren ist sehr gering: Bei Mäusen ist die LD  $>9$  g/kg bei oraler Aufnahme und  $>6,4$  g/kg bei intraperitonealer Applikation [Matsuda et al. 1970; Ogawa et al. 1974].

#### 1.7.4 Der $\beta$ -Ecdysonrezeptor

Obwohl für Ecd diverse Effekte bei Säugetieren belegt sind, wurde bisher noch kein entsprechender Rezeptor bei ihnen detektiert. Vermutlich wirkt Ecd über einen membranständigen Rezeptor, der den PI3-Kinase / Akt-Signalweg stimuliert und darüber Einfluss auf das Zellwachstum und –überleben nimmt. Constantino et al. [2001] beobachteten, dass das potente Ecd-Analogon Muristeron A in Anwesenheit des Zytokin IL-3 die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) und somit die aktivierende Phosphorylierung der Proteinkinase B (Akt) induziert. Diese Proteinkinase wiederum phosphoryliert und inaktiviert das pro-apoptotische Protein Bad. Der spezifische PI3-Kinase-Inhibitor, LY294002, konnte die Wirkung von Muristeron A komplett verhindern. Ob Muristeron A direkt an dem IL-3-Rezeptor wirkt oder in einem späteren Schritt des Signalweges eingreift [Lafont und Dinan 2003], ist bislang noch ungeklärt. Ecd übt vermutlich seine Wirkung zum Teil über den PI3-Kinase / Akt-Signalweg aus. Zusätzlich zu der schnellen Wirkung der Ecdysteroide über einen Membranrezeptor wird eine langfristige nukleäre Wirkung analog zu dem Wirkmechanismus der Steroidhormone angenommen [Kotsyuruba et al. 1992].

In Arthropoden wurde ein funktioneller Rezeptor für Ecd (EcR) detektiert, der zu der Gruppe der nukleären Rezeptoren gehört und über den Ecd Einfluss auf die Genexpression nimmt. Intranukleär dimerisiert EcR mit dem Ultraspiracle-Protein (USP) [Yao et al. 1993], das eine homologe Form des Retinoid-Rezeptors (RXR) der Wirbeltiere darstellt [Oro et al. 1990]. Der RXR-Rezeptor agiert unter anderem als Dimerisierungspartner von mehreren nukleären Rezeptoren wie z.B. dem Retinsäure-Rezeptor (RAR), dem Vitamin-D-Rezeptor (VDR), dem Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor  $\gamma$  (PPAR  $\gamma$ ) und dem Thyroidrezeptor (TD) [Bourguet et al. 1995]. EcR und USP bilden einen instabilen heterodimeren Komplex, der

durch die Bindung des Liganden Ecd stabilisiert wird und als Transkriptionsfaktor an die  $\beta$ -Ecdyson-responsiven Elemente der DNA bindet. Yao et al. [1993] zeigten, dass nur die strukturelle Einheit aus EcR, USP und dem Liganden eine effektive Bindung an die DNA erreichen kann.

### 1.7.5 Die Wirkung von $\beta$ -Ecdyson

Die Effekte von Ecd auf den Menschen sind vielfältig und betreffen fast alle Organe und Gewebe. Als erste beobachtete Wirkung gilt die Stimulation der Proteinbiosynthese der Skelettmuskulatur durch vermehrtes Ablesen der mRNA [Otaka et al. 1968; Syrov & Kurmukov 1978; Khimiko et al. 2000]. Zusammen mit der Reduktion des Proteinkatabolismus resultiert diese in einer Zunahme der Muskelmasse.

Ecd besitzt eine Hyperglykämie-reduzierende, antidiabetische [Yoshida et al. 1971; Takahashi und Nishimoto 1992], immunmodulatorische [Chiang et al. 1992], hepatoprotektive [Syrov et al. 1992; Badal`yants et al. 1996], antiarrhythmische [Kurmukov und Yermishina 1991], antioxidative und antiradikale Wirkung auf den Menschen. Weitere wichtige Effekte sind die Reduktion des Fettgewebes [Seidlovà-Wuttke et al. 2010] und die Osteoprotektion [Kapur et al. 2010].

Trotz der androgen-ähnlichen anabolen und der östrogen-ähnlichen osteoprotektiven Effekte wurden mithilfe von Radioliganden-Bindungs-Assays Wirkungen von Ecd über Steroidrezeptoren negiert [Gorelik-Feldman et al. 2008; Seidlovà-Wuttke et al. 2010].

Obwohl der Wirkmechanismus von Ecd im menschlichen Organismus noch unbekannt ist, kann bis zu diesem Zeitpunkt ein androgenes und östrogenes Nebenwirkungsprofil dieser Substanz ausgeschlossen werden [Syrov 1984].

### 1.7.6 Die Wirkung von $\beta$ -Ecdyson auf die Skelettmuskulatur

Ecdysteroide wirken anabol. Sie fördern das Wachstum der Skelettmuskulatur von Säugetieren [Dinan und Lafont 2006; Seidlovà-Wuttke et al. 2010], indem sie die Proteinbiosynthese stimulieren und somit den Gesamtproteingehalt der Skelettmuskulatur erhöhen [Syrov et al. 1975; Aizikov et al. 1978; Khimiko et al. 2000]. Der zunehmende Proteingehalt ist das Resultat einer vermehrten mRNA-Translation und nicht einer Steigerung der mRNA-Transkription [Otaka et al. 1968; Syrov et al. 1978; Khimiko et al. 2000]. Ecd setzt den Proteinkatabolismus herab und führt so zusätzlich zu einer Zunahme der Muskelmasse. Vermutlich ist eine Reduktion des Glukokortikoidspiegels (z.B. durch Stressreduktion) dafür verantwortlich. Ecdysteroide vergrößern die Skelettmuskelfasern und erhöhen die Anzahl mononukleären Zellen [Tóth 2010]. Somit nehmen sie Einfluss auf den Wachstumsvorgang der quergestreiften Skelettmuskulatur.

Der anabole Effekt von Ecdysteroiden auf die Wirbeltiere konnte durch ein Größenwachstum bei Mäusen [Stopka et al. 1999; Todorov et al. 2000], Ratten [Syrov und Kurmukov 1978],

Schweinen [Kratky et al. 1997] und Meerschweinchen [Koudela et al. 1995] demonstriert werden. Chermnykh et al. [1988] untersuchten in vivo in einem Schwimmtest mit Ratten die Wirkung von Ecdysteroiden auf die Funktion der Skelettmuskulatur. Es zeigte sich, dass durch eine zunehmende Synthese der myofibrillären Proteine im M. soleus und im M. extensor digitorum longus eine verbesserte physiologische Eigenschaft der Skelettmuskulatur und der Ausdauer der Tiere, auch ohne vorheriges Training, erreicht wurde [Chermnykh et al. 1988]. Androgene hingegen setzten ein Training zur Steigerung der Muskelkraft und der Muskelmasse voraus, ohne dabei die Proteinbiosynthese zu beeinflussen [Desler et al. 1996]. Anhand dieser Studie wird die unterschiedliche Wirkweise von Ecdysteroiden und Androgenen deutlich. Gorelik-Feldman et al. [2008] belegten ebenfalls die signifikante Zunahme der Muskelkraft in vivo durch eine Steigerung der Greifkraft behandelter Ratten. Ecdysteroiden wirken sich positiv auf die Muskelmasse und die Muskelkraft aus.

Diese Eigenschaften erklären das besondere Interesse von Sportlern und Bodybuildern an Ecd [Dinan und Lafont 2006]. Ecdysteroid-Komponenten können nicht in herkömmlichen Anti-Doping-Tests erkannt werden, da sie Bestandteile natürlicher Nahrungsmittel darstellen [Sláma und Lafont 1995].

### **1.7.7 Die Wirkung von $\beta$ -Ecdyson auf das kardiovaskuläre System**

Der Einfluss von Ecdysteroiden bzw. von Ecd auf das kardiovaskuläre System ist bislang nur in sehr wenigen Studien untersucht worden. Ecdysteroiden haben einen antiatherosklerotischen Effekt, lindern Symptome des metabolischen Syndroms, besitzen eine antidiabetische Wirkung, indem sie den Plasma-Glucose-Spiegel normalisieren [Korkach et al. 2007] und wirken sich somit protektiv auf das Herz-Kreislauf-System aus [Cahlíková et al. 2011]. Sie senken den Cholesterinspiegel in der Leber und im Blut [Lupien et al. 1969; Mironova et al. 1982; Syrov et al. 1983], indem sie vermutlich die Cholesterinbiosynthese hemmen [Uchiyama und Yoshida 1974] und die Konversion von Cholesterin zu Gallensäuren steigern [Syrov et al. 1986].

Seidlová-Wuttke et al. [2010] belegten eine antiatherosklerotische Wirkung von Ecd. Die Applikation von Ecd führte bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten zu einer Senkung der LDL-Konzentration und gleichzeitig zu einer Erhöhung der HDL-Konzentration ohne die TAGs im Serum zu erhöhen.

Des Weiteren zeigten Tierexperimente antiarrhythmische Effekte der Testsubstanz. Die Applikation von Ecdysteroiden konnte künstlich erzeugte Arrhythmien beenden und somit die Entstehung von Kammerflimmern verhindern. Vermutlich ist dieser Effekt auf eine membranstabilisierende Wirkung zurückzuführen. Zusätzlich verbesserten sich durch eine gesteigerte Anpassungsfähigkeit des Myokards die hämodynamischen Parameter und die myokardiale Kontraktionsfähigkeit [Kurmukov und Yermishina 1991].

Ecd verhinderte durch eine Steigerung der VEGF-Expression myokardiale Ischämien [Wu 2001].

## 1.8 Zielsetzung

Der Alterungsprozess des Mannes, der mit einer kontinuierlichen Reduktion des Testosteronspiegels einhergeht, äußert sich in einer vielseitigen Symptomatik, die mit starken interindividuellen Schwankungen einhergeht. Insbesondere der Verlust kardialer Myozyten, die reaktive kompensatorische Hypertrophie der verbleibenden Zellen sowie der bindegewebige Ersatz des abgestorbenen Myokards führen zu einer Beeinträchtigung der myokardialen Kontraktionsfähigkeit und resultieren in einer reduzierten physischen Belastbarkeit der Betroffenen. Zusätzlich führen die Veränderungen der Strukturkomponenten Kollagen und Elastin der Koronararterienwand zu einer zunehmenden Steifigkeit der Gefäße und können eine adäquate myokardiale Sauerstoffversorgung nur bedingt gewährleisten. Unter physiologischen Verhältnissen bzw. Bedingungen schützt Kollagen-Typ-I die Gefäßwand vor einer Überdehnung und Elastin verantwortet die erforderliche Dehnbarkeit des Gewebes.

Aufgrund einiger unerwünschter Nebenwirkungen und Kontraindikationen der Testosteronersatztherapie wird nach Therapiealternativen zur Behandlung altersbedingter Beschwerden beim Mann gesucht. Einige Studien belegten bereits eine protektive Wirkung von Ecd auf die altersbedingten Veränderungen der Skelettmuskulatur und des Knochens. Allerdings ist eine mögliche Wirkung auf das männliche Myokard und die Koronararterienwand noch nicht untersucht worden.

Ziel der vorliegenden Studie ist es daher, mit Hilfe eines dreimonatigen Futtersuchs einen Effekt von Ecd auf das Myokard und die Koronararterienwand der orchietomierten SD-Ratte zu untersuchen. Dabei dient die männliche gonadektomierte Ratte als Modell des altersbedingt androgendefizienten Mannes. Zur Erfassung möglicher Wirkungen von Ecd auf das Myokard wird die Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld, deren Querschnittsfläche sowie der prozentuale myokardiale Kollagenanteil lichtmikroskopisch bestimmt. Die Messung des prozentualen Kollagen-Elastin-Anteils der Koronararterienwand stellt einen weiteren Teil der vorliegenden Dissertation dar. Grundlage der vorliegenden Studie ist es, einen möglichen protektiven Effekt der Testsubstanz auf den Verlust kardialer Myozyten, der altersbedingt und androgendefizitassoziiert auftritt, einschließlich derer Folgewirkungen als auch auf die strukturellen Veränderungen, zeigen zu können.



## 2 Material und Methoden

### 2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Der Versuch „Ecd in male“ wurde mit insgesamt 60 männlichen Sprague-Dawley-Ratten (Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland) durchgeführt. Bei der Ankunft der Tiere in Göttingen waren diese sieben Wochen alt, was dem Eintritt in die Geschlechtsreife entspricht. Die Ratten wogen durchschnittlich zwischen 355 und 417g. Vor Versuchsbeginn lag eine Tierversuchsgenehmigung durch die Bezirksregierung Braunschweig unter dem Aktenzeichen: 33.42502-082-06 vor. Die Versuchstiere wurden in den Tierställen des Universitätsklinikums Göttingen in Makrolon-Käfigen Typ IV (Firma Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) mit einer Fläche von 1800cm<sup>2</sup> gehalten. Diese waren mit Streu (Lignocel®, Rosenberg) ausgelegt. Abhängig von der Körpergröße wurden vier bis sechs Ratten pro Käfig gehalten. Die Ställe wurden während der dreimonatigen Versuchsdurchführung in einem zwölfstündigen Intervall beleuchtet; entweder von 7-19 Uhr oder von 6-18 Uhr. Die mittlere Raumtemperatur betrug ca. 22-26°C bei einer Luftfeuchtigkeit von 40-55%. Die Bedingungen in den Tierställen waren standardisiert. Zweimal wöchentlich wurden die Tiere in gereinigte Käfige umgesetzt. Für die betreuenden Personen gab es keine besonderen Einschleusungsverfahren. Bei Kontakt mit den Ratten trugen sie lediglich einen Kittel und Schuhüberzieher. Während der gesamten Versuchsdauer hatten die Tiere uneingeschränkten Zugang zu Futter und Wasser.

Die tierexperimentelle Durchführung fand unter der Aufsicht von Privatdozentin Dr. Dana Seidlová-Wuttke statt. Während der Durchführung des tierexperimentellen Teils des Versuches war ich persönlich nicht anwesend. Mein Teil der Versuchsarbeit begann zu einem späteren Zeitpunkt. Relevante Werte und Angaben zu der Futteraufnahme, den Körpergewichten und deren Verlauf sowie die Herzgewichte wurden nicht von mir persönlich erhoben, sondern freundlicherweise von der Abteilung zur Verfügung gestellt.

### 2.2 Versuchsablauf

Der Zeitraum des gesamten Versuches erstreckte sich vom 17.10.2007 bis zum 05.03.2008. Im Rahmen einer Eingewöhnungsphase vom 17.10.2007 bis zum 14.11.2007 wurden alle Tiere, unabhängig von ihrer späteren Futtergruppe, mit soja-freiem Pelletfutter (V1354-000 R-Z, 10mm Pellets, phytoöstrogenarm, Firma ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) (Zusammensetzung Tabelle 4 methodischer Anhang) ernährt.

Vom 28.11.2007 bis zum 07.12.2007 erfolgte unter Vollnarkose das subkutane Einsetzen eines ISO-Transponders (12 mm, UNO MICRO-ID System, Transponder und Lesegerät von der Firma UNO ROEVASTAAL BV, Zereenaar, Holland) in die Nackenregion. Der Transponder dient der Identifizierung und der Zuordnung der Ratten zu einer der

vorgesehenen fünf Versuchsgruppen. Für die Durchführung der Messung und das Einsetzen des Transponders wurden die Tiere mit Isofluran (Forene, Abbott-AG, Baar, Schweiz) narkotisiert.

Die Ratten wurden nach Gewicht randomisiert und zu einer Futtergruppe zugeteilt. In dem Zeitraum vom 10.12.2007 bis zum 14.12.2007 wurden die Tiere orchiektomiert. Die Operation erfolgte unter Vollnarkose mit Isofluran und einer analgetischen Therapie mit dem nichtsteroidalen Antiphlogistikum Rimadyl.

Nach dem operativen Eingriff erhielten die Tiere für knapp drei Monate das Futter mit der entsprechenden Ecd-Konzentration von der Firma sniff® Spezialdiäten GmbH, Soest (Zusammensetzung Tabelle 4 des methodischen Anhangs). Der Versuchszeitraum von drei Monaten entspricht auf den Menschen übertragen einem Zeitraum von zehn Jahren. In der folgenden Tabelle werden die Gruppeneinteilungen erklärt.

Gruppe	Futter	Testsubstanz [g/kg Futter]	Aufnahme Testsubstanz [mg/Tier/d]	an	Anzahl der Tiere pro Gruppe
KO, Orx, sf	Soja-frei	-	-		12
Intakt, sf	Soja-frei	-	-		12
Orx, Ecd 11	β-Ecdyson	0,5	11,11		12
Orx, Ecd 22	β-Ecdyson	1	22,19		12
Orx, Ecd 67	β-Ecdyson	3	66,84		12

Tbl. 1: Gruppeneinteilung (orx=orchiektomiert; sf=soja-frei; Ecd= β-Ecdyson)

Durch den uneingeschränkten Zugang zu Futter und somit auch zu der Testsubstanz ist zu beachten, dass ein individueller Futterverbrauch und demzufolge eine unterschiedliche Aufnahme der Testsubstanz ermöglicht wurde. Um den durchschnittlichen Futterverbrauch bzw. die durchschnittliche Aufnahme von Ecd zu berechnen, wurde einmal wöchentlich zu ähnlichen Uhrzeiten die Restfuttermenge gewogen. Dieses Gewicht wurde von der ursprünglichen Futtermenge von 1500g pro Käfig pro Woche subtrahiert. Auf diese Weise erhielt man die von den Ratten in einem Käfig pro Woche aufgenommene Futtermenge, welche nun durch die Anzahl der Tiere pro Käfig dividiert wurde. Die Werte der Futteraufnahme wurden mir freundlicherweise von der Abteilung zur Verfügung gestellt.

Um bei Studienende den Futterverbrauch bzw. die Aufnahme der Testsubstanz bezogen auf das Körpergewicht berechnen zu können, erfolgte zusätzlich eine Körpergewichtsanalyse durch wiederholtes Wiegen mit einer Waage (basic lite BL3, Firma Sartorius, Göttingen,

Germany). Während der gesamten Versuchsdauer wurden fünf Werte pro Tier protokolliert. Die Abteilung stellte mir diese Werte ebenfalls zur Verfügung.

Vom 03.03.2008 bis zum 05.03.2008 endete der Versuch durch die Dekapitation der Versuchstiere unter einer CO<sub>2</sub>-Inhalationsnarkose.

## **2.3 Histologische Aufarbeitung der Herzen**

### **2.3.1 Gewinnung des Probenmaterials**

Nach der Dekapitation wurden die Ratten im Bereich des Abdomen rasiert und obduziert, um folgende Organe und Gewebe zu entnehmen: Herz, Leber, Prostata, Samenblase, Haut, Musculus gastrocnemius, linke Tibia und Fettgewebe. Die entnommenen Organe wurden zunächst auf makroskopisch sichtbare Auffälligkeiten untersucht und anschließend gewogen. Zur weiteren Verarbeitung wurden sie in Eppendorf Cups (Firma Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) überführt und in flüssigem Stickstoff abgekühlt. Bis zur weiteren Verarbeitung wurden die Organe und Gewebe in einer Kühltruhe bei -70°C zwischengelagert.

### **2.3.2 Anfertigung der Organschnitte**

(Beginn der eigenen experimentellen Arbeit)

Die eingefrorenen Herzen wurden aufgetaut und für 72 Stunden in einer Formalinlösung (10%) konserviert. Im Anschluss erfolgte die Entwässerung der Proben durch eine aufsteigende Alkoholreihe und anschließender Fixierung zu Paraffinblöcken mit Hilfe einer Paraffin-Ausgießstation (EG 1160, Leica, Wetzlar, Deutschland). Die Herzen wurden mit ihrer anatomischen Herzachse quer zur späteren Mikrotomschnittebene in das Paraffin eingebettet.

Die anatomische Herzachse ist eine gedachte Linie, die von der Mitte der Herzbasis durch die Herzspitze (Apex) verläuft. Die angefertigten Paraffinblöcke wurden auf der Höhe des Apex geschnitten. Demzufolge stellen die entstandenen Präparateschnitte des Herzens die Ventrikel im Querschnitt dar (siehe Abbildung 3). Ausführliche Informationen zur Entwässerung und zu der Fixierung der Herzen zu Paraffinblöcken sind der Tabelle 5 des methodischen Anhangs zu entnehmen.

Bevor die Paraffinblöcke zu drei µm dicken Transversalschnitten verarbeitet werden konnten, mussten sie mindestens 24 Stunden in einer Kühltruhe eingefroren werden. Die Anfertigung der lichtmikroskopischen Präparate erfolgte mit einem Mikrotom (Leica Microsystem Model RM 2135, Fabriknummer: 2794/10.2000; Kat.Nr. 050029802, Nussloch, Deutschland). Bei Erhalt eines angemessenen Schnittes wurde dieser auf einen Objektträger (SuperFrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Auf diese Weise wurden zehn Objektträger pro Herzpräparat angefertigt. Die bestückten Objektträger wurden 24 Stunden in einem Trockenschrank mit einer Innentemperatur von 37°C aufbewahrt.

### 2.3.3 Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Zur Analyse des Myokards durch Ausmessen des Umfangs und Berechnung der Fläche einzelner Kardiomyozyten wurden zwei der zehn hergestellten Organschnitte mit der Hämalaun-Eosin-Färbetechnik gefärbt (Tabelle 6 des methodischen Anhangs). Hierzu verwendete man vor allem den vierten und fünften Schnitt, da diese aufgrund ihrer Position in der Mitte aller angefertigten Schnitte am geeignetsten erschienen. Das Prinzip dieser Färbetechnik besteht zunächst darin, mithilfe von Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe das Paraffin von den Objektträgern zu entfernen, um anschließend das Myokard mit Hämalaun und Eosin zu färben und abschließend mit einer aufsteigenden Alkoholreihe zu behandeln. Dabei war die optimale Färbezeit von der Zusammensetzung der Färbelösung abhängig und variierte dementsprechend nach jedem neuen Ansetzen der Färbelösungen.

Die HE-Färbung dient primär der Unterscheidung von Zellkernen und Zytoplasma [Mulisch und Welsch 2010]. Der positiv geladene Farbstoff Hämalaun lagert sich an die negativen Phosphatgruppen der DNA an und bildet mit ihr schwer lösliche Verbindungen. Da Hämalaun durch Zitronensäure in saurer Lösung vorliegt, werden die Carboxylgruppen im Zytoplasma abgesättigt und es kommt zur selektiven Blaufärbung der Kerne. Eosin, der wichtigste Zytoplasmafarbstoff, liegt in saurer Lösung vor. Die meisten Proteine im Zytoplasma sind negativ geladen und nehmen  $H^+$  Ionen auf, um dann positiv geladen zu sein. So kann sich das negativ geladene Eosin gut an die Proteine des Zytoplasmas und der extrazytoplasmatischen Strukturen anlagern und diese rot anfärben.

Abschließend wurden die gefärbten Präparate auf dem Objektträger mit Hilfe eines Tropfens Klebstoff (DePex, Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg) fixiert.

### 2.3.4 Elastika-van-Gieson-Färbung

Zur Darstellung von elastischen Fasern und Kollagenfasern wurde eine Resorcinfuchsinfärbung nach Weigert in Kombination mit der van-Gieson-Färbung durchgeführt. Vorbereitend wurden nochmals zwei der zehn angefertigten Organschnitte, meist der dritte und der siebte Schnitt, entparaffiniert und mit der Elastika-van-Gieson-Färbetechnik gefärbt (Tabelle 7 des methodischen Anhangs).

Bei dieser Färbung binden die feindispersen Farbstoffe der Resorcinfuchsin-Lösung an die strukturdichten elastischen Fasern, bestehend aus Elastin und Fibrillin, und färben diese dunkelviolet. Zur Kernfärbung dient Eisenhämatoxylin nach Weigert, wodurch sich die Kerne schwarzblau bis schwarzbraun darstellen. Das verwendete Pikrofuchsin-Gemisch (van-Gieson-Gemisch) besteht aus zwei Farbstoffen, die sich in ihrer Dispersität, Diffusibilität und Konzentration deutlich unterscheiden [Mulisch und Welsch 2010]. Es wird progressiv gefärbt: die feindisperse, hochkonzentrierte Pikrinsäure diffundiert in der kurzen Färbezeit in alle Strukturen des Gewebes und färbte diese (Zytoplasma, Muskulatur, Epithel) gelb. Während dieser Zeit kann das grobdisperse Säurefuchsin nur in die weiten Strukturücken des

kollagenen Bindegewebes eindringen, wo es die Pikrinsäure überlagert und die Kollagenfasern rot anfärbt.

Wenn die Färbung nicht rechtzeitig unterbrochen wird, erhält das Zytoplasma einen deutlichen Rotton!

## 2.4 Histologische Auswertung

Die Auswertung der angefertigten Herzpräparate erfolgte mit Hilfe eines Lichtmikroskops (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland), welches mit einer integrierten CCD (charge-coupled Device)-Kamera (Color View, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland)) und einem PC-Anschluss ausgestattet war. Mit der CCD-Kamera konnten Fotos von den Präparaten bei gewünschter Vergrößerung aufgenommen und mit Hilfe der Software analySIS 3.0 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Deutschland) analysiert und ausgewertet werden. Durch Eingeben der aktuellen Vergrößerung in das Software-Programm konnte dieses die realen Messergebnisse berechnen. Die Messwerte wurden in einer Excel-Tabelle (Microsoft Office Excel 2010, Microsoft Corporation, USA) protokolliert.

Die Auswertung bestand aus der Bestimmung der Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld, der Messung ihrer Querschnittsfläche, der Messung und der Berechnung des prozentualen Kollagenanteils im Myokard sowie des prozentualen Kollagen-Elastinanteils in der Koronararterienwand.

### 2.4.1 Messung der Kardiomyozytenfläche

Die Messung der Kardiomyozytenfläche erfolgte an Organschnitten (meist der vierte und fünfte Schnitt), die mit der HE-Färbetechnik angefertigt wurden. Bei einer 32fachen Vergrößerung wurden an zwei beliebigen Stellen innerhalb des rechten und des linken Ventrikels (siehe Abbildung 3) jeweils zehn quer angeschnittene Kardiomyozyten ausgewählt und ausgemessen, indem sie mit dem Cursor umkreist wurden (siehe Abbildung 4). Dabei gingen nur querangeschnittene Kardiomyozyten mit einem zentral gelegenen Kern in die Messung mit ein. Die meisten quer angeschnittenen kardialen Myozyten mit mittigem Kern waren am Rand der Präparate zu finden. Nachdem die entsprechende Vergrößerung in das Software-Programm eingegeben wurde, berechnete dieses die reale Fläche der jeweils ausgemessenen Kardiomyozyten. Die in  $\mu\text{m}^2$  gemessenen Flächenwerte wurden in einer Excel-Tabelle protokolliert. Insgesamt wurden pro Tier anhand von zwei Organschnitten jeweils 20 Kardiomyozytenflächen ausgemessen. Pro Tier konnten 40 Flächenwerte und somit 480 Flächenwerte pro Versuchsgruppe dokumentiert werden. Insgesamt wurden 2400 Flächen vermessen.

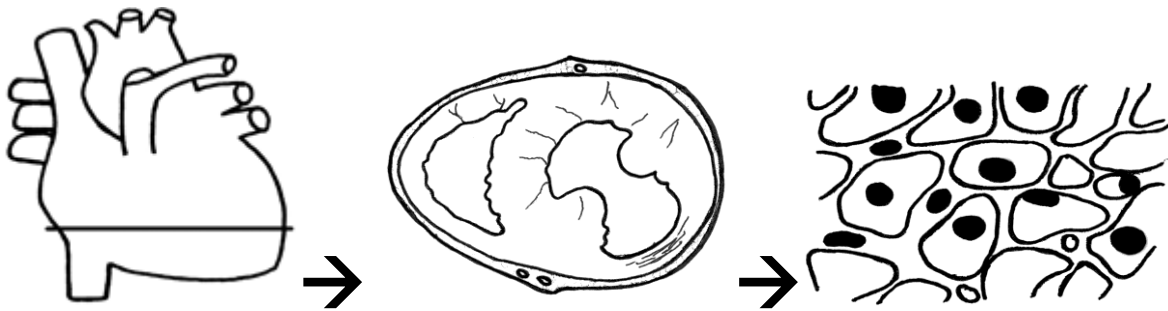


Abb. 3: Schematische Darstellung der Gewinnung des histologischen Probenmaterials und der Organschnitte

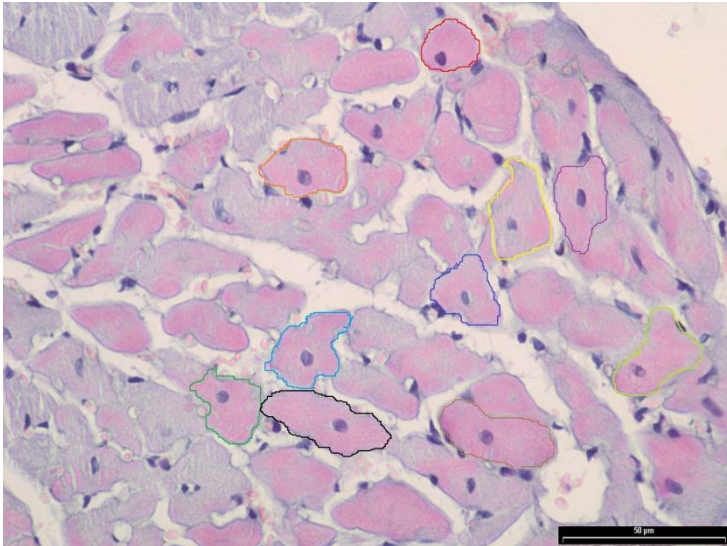


Abb. 4: Beispiel für die Darstellung querangeschnittener Kardiomyozyten mit zentralständigem Kern und dem Messprinzip ihrer Flächen (HE-Färbung, 32fache Vergrößerung, Präparat 28, 5. Schnitt)

### 2.4.2 Bestimmung des prozentualen myokardialen Kollagenanteils

Anhand von Organschnitten, die mit der Elastika-van-Gieson-Färbetechnik gefärbt wurden, fand die quantitative Bestimmung des myokardialen Kollagenanteils statt. Die Messung erfolgte bei einer 50fachen Vergrößerung. Die Präparate wurden jeweils in vier Quadranten eingeteilt. Diese Einteilung wurde auf den Objektträgern markiert (Abbildung 5).

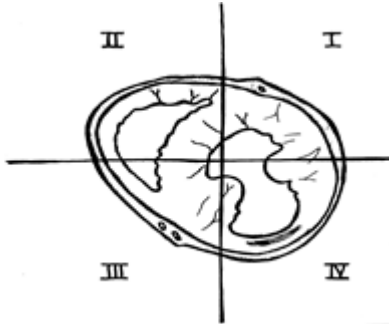


Abb. 5: Schematische Darstellung der Einteilung der histologischen Präparate in Quadranten

Quadrant I: 12-3 Uhr

Quadrant II: 9-12 Uhr

Quadrant III: 6-9 Uhr

Quadrant IV: 3-6 Uhr

Unter dem Lichtmikroskop wurde die Gesamtfläche eines Myokardausschnittes bzw. eines Gesichtsfeldes ermittelt, indem dieses mit dem Cursor einmal komplett umrahmt wurde (siehe linkes Bild der Abbildung 6). Die Software errechnete den Flächeninhalt der markierten Fläche (Gesamtfläche). Danach wurden die einzelnen Kollagenflächen innerhalb dieses Gesichtsfeldes, die sich durch die Elastika-van-Gieson-Färbung rot darstellten, ebenfalls manuell mit dem Cursor umrahmt (siehe rechtes Bild der Abbildung 6). Die Software errechnete den Flächeninhalt jeder einzelnen markierten Fläche. Alle Kollagenflächenwerte, die in einer Excel-Tabelle dokumentiert wurden, wurden anschließend mithilfe eines Taschenrechners zu einem „Gesamt-Kollagen-Flächenwert“ addiert. Die Elastik-van-Gieson-Färbung färbt neben interstitiellem Kollagen auch perivaskuläres Gewebe an. Aufgrund dessen wurde bei der Messung der einzelnen Kollagenflächen darauf geachtet, dass ausschließlich die Kollagenflächen zwischen den Kardiomyozyten in die Auswertung mit eingingen. Voraussetzung war die Auswahl von Bereichen im Myokard, in denen die Myozyten quer angeschnitten waren, um eine Doppelberechnung der Kollagenfasern weitgehend zu vermeiden (siehe Abbildung 6).

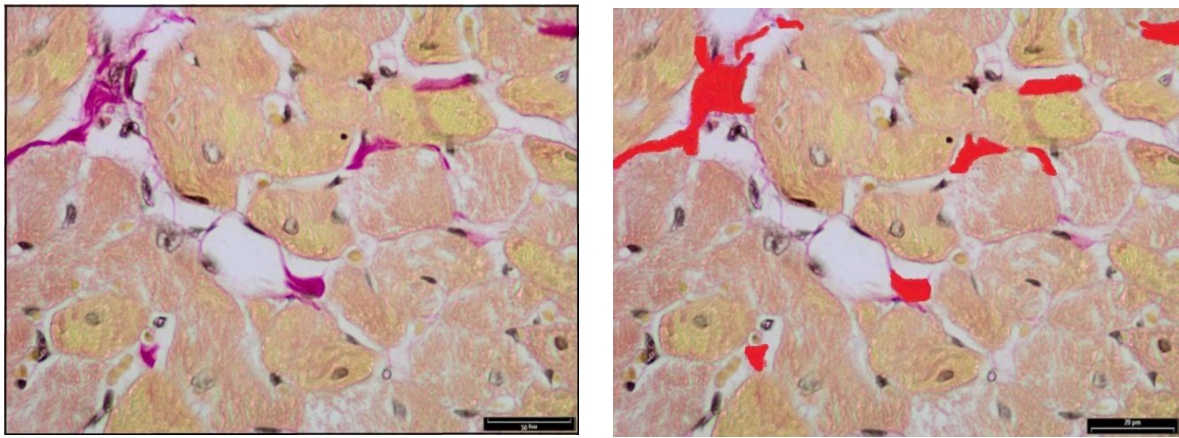


Abb.6: Beispiel für die Darstellung von myokardialem Kollagen durch die Elastika-van-Gieson-Färbung und dem Messprinzip durch Markierung der Kollagenflächen (Elastika-van-Gieson-Färbung, 50 fache Vergrößerung; Präparat 25; 3. Schnitt)

Die Messungen wurden hauptsächlich im ersten und teilweise auch im vierten Quadranten durchgeführt (siehe Abbildung 5), da laut Literatur gehäuft Fibrose in subendokardialen Bereichen des linken Ventrikels entsteht [Olivetti et al. 1995]. Perivaskuläre Kollagenanteile gingen nicht in die Auswertung mit ein. Die „Gesamt-Kollagen-Fläche“ (rechtes Bild der Abbildung 6) dividiert durch die Gesamtfläche des Gesichtsfeldes (linkes Bild der Abbildung 6) multipliziert mit 100 ergab den prozentualen Kollagenanteil pro Gesichtsfeld bzw. pro Myokardausschnitt.

$$\frac{\text{Gesamt-Kollagenfläche}}{\text{Gesamtfläche des Myokardausschnittes}} \times 100 = \text{prozentualer myokardialer Kollagenanteil}$$

Diese Berechnungen wurden mithilfe eines Taschenrechners manuell durchgeführt.

Pro Tier wurde jeweils an zwei Organschnitten je ein Myokardausschnitt ausgemessen.

Somit wurden pro Tier zwei und damit pro Versuchsgruppe 24 Prozentwerte berechnet und dokumentiert. Für jedes Tier wurde aus den beiden Prozentwerten ein Mittelwert gebildet. Alle Gewebeschnitte wurden unter denselben mikroskopischen Einstellungen von mir ausgemessen und berechnet.

#### 2.4.3 Bestimmung des prozentualen Kollagen-Elastinanteils der Koronararterie

Zur Bestimmung des prozentualen Kollagen-Elastinanteils einer Koronararterie wurde in den Organschnitten, die mit der Elastika-van-Gieson-Färbetechnik angefertigt wurden, bei einer 25fachen Vergrößerung nach einer geeigneten Arterie gesucht. Geeignete Koronararterien sollten querangeschnitten sein und einen gut erkennbaren Kollagen-Elastinanteil aufweisen, welcher sich in dieser Färbung rot darstellt. Größtenteils wurde im vierten Quadranten (siehe Abbildung 5) nach einer geeigneten Arterie gesucht. Da in diesem unter



normalen anatomischen Verhältnissen die großen Äste der A. coronaria sinistra, des R. circumflexus und des R. interventricularis anterior und deren Abgangsarterien senkrecht zur Schnittebene verlaufen müssten, war die Wahrscheinlichkeit größer, eine querangeschnittene Arterie für die Messung anzutreffen. Analog zur Bestimmung des prozentualen Kollagenanteils im Myokard wurde zuerst die Gesamtfläche der Arterie bestimmt, indem die quer-angeschnittene Arterie einmal komplett mit dem Cursor umrahmt wurde (siehe mittleres Bild der Abbildung 7) und die Software somit die Gesamtfläche der querangeschnittenen Arterie berechnen konnte. Anschließend wurde der rot angefärbte Kollagen-Elastinanteil in der Arterienwand ebenfalls mithilfe des Cursors umfahren (siehe rechtes Bild der Abbildung 7) und durch die Software der Wert dieser Fläche ermittelt. Um den prozentualen Kollagen-Elastinanteil zu bestimmen, wurde pro Schnitt die Kollagen-Elastinfläche (siehe rechtes Bild der Abbildung 7) durch die Gesamtfläche der querangeschnittenen Arterie (siehe mittleres Bild der Abbildung 7) dividiert. Dieser Wert wurde mit dem Faktor 100 multipliziert.

$$\frac{\text{Kollagen-Elastinfläche}}{\text{Gesamtfläche der Arterie}} \times 100 = \text{prozentualer Kollagen-Elastinanteil}$$

Diese Berechnungen wurden mithilfe eines Taschenrechners manuell durchgeführt.

Pro Tier wurde anhand von zwei Organschnitten jeweils der prozentuale Kollagen-Elastinanteil einer Koronararterienwand ermittelt. Somit wurden pro Tier zwei Prozentwerte und pro Versuchsgruppe insgesamt 24 Werte dokumentiert. Aus den zwei Prozentwerten pro Tier wurde ein Mittelwert gebildet. Alle Gewebeschnitte wurden ebenfalls unter denselben Einstellungen und von mir ausgewertet.

Literaturangaben zufolge färben sich in der Elastika-van-Gieson-Färbung Kollagenfasern rot und reine elastische Fasern schwarzviolett an [Mulisch und Welsch 2010]. Diese sind in der Elastika-Interna der Präparate gut erkennbar (siehe linkes Bild der Abbildung 7). Innerhalb der Adventitia lagern sich die elastischen Fasern netzwerkartig in die Kollagenfasern ein [Hauser 2008] (siehe Abb. 1). Unter einem Fluoreszenz-Mikroskop lassen sich elastische Fasern aufgrund ihrer Autofluoreszenz ebenfalls netzwerkartig innerhalb der rot angefärbten Kollagenanteile der Arterienwand darstellen. Da sich lichtmikroskopisch die einzelnen Bestandteile der rot angefärbten Flächen auch bei sehr hohen Vergrößerungen (630fach) nicht eindeutig differenzieren lassen, werden in der vorliegenden Arbeit die rot angefärbten Areale der Koronararterienwand mit „Kollagen-Elastinanteil“ bezeichnet.

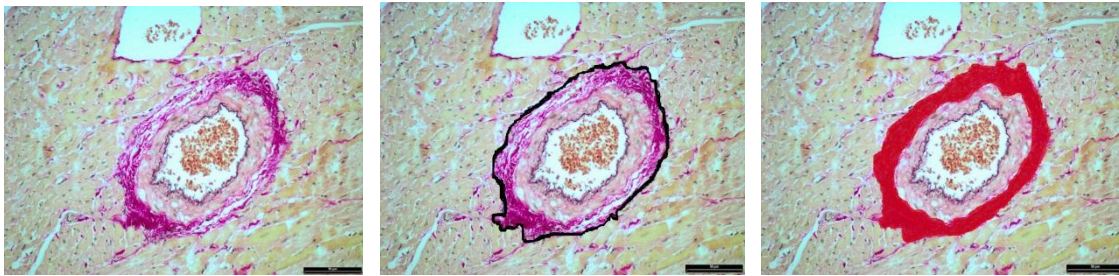


Abb. 7: Beispiel für den Querschnitt einer myokardialen Arterie und für das Messprinzip des Kollagen-Elastinanteils (Elastika-van Gieson Färbung; 25 fache Vergrößerung; Präparat 25, 3. Schnitt)

#### 2.4.4 Bestimmung der Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld

Die Bestimmung der Anzahl kardialer Myozyten pro Myokardausschnitt bzw. pro Gesichtsfeld wurde an Organschnitten durchgeführt, die mit der HE-Färbetechnik gefärbt wurden. Bei einer 50fachen Vergrößerung wurden im I. und IV. Quadranten (siehe Abbildung 5) zwei Gesichtsfelder mit einer Fläche von  $22134,58\mu\text{m}^2$  ( $601,34\mu\text{m}$  Umfang) zufällig ausgewählt. Der I. und IV. Quadrant erschienen für diese Analyse gut geeignet, da sie den linken Ventrikel darstellen, in dem der altersbedingte und androgendefizitassoziierte Kardiomyozytenverlust stärker ausgeprägt ist als im rechten Ventrikel [Olivetti et al. 1995]. Dabei sollten die ausgewählten Gesichtsfelder möglichst nur quer angeschnittene Kardiomyozyten mit zentral ständigem Kern und wenig Interzellulärsubstanz aufweisen. Durch Anklicken mit dem Cursor der Kardiomyozyten mit mittelständigem Kern zählte das Software Programm automatisch die Kardiomyozyten und übertrug die Werte in eine Excel-Tabelle. Pro Tier wurden je zwei Organschnitte mit jeweils zwei Gesichtsfeldern gezählt. Somit wurden vier Werte pro Tier und 48 pro Versuchsgruppe dokumentiert. Aus den vier Werten pro Tier wurde ein Mittelwert gebildet. Alle Gewebeschnitte wurden unter den gleichen mikroskopischen Einstellungen von mir ausgewertet.

#### 2.4.5 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und die grafische Darstellung wurden die durch die histologischen Auswertungen erhaltenen Messwerte zuerst in Excel-Tabellen protokolliert und anschließend in das Programm GraphPad Prism 4 (GraphPad Software, San Diego, USA) überführt. Die Daten wurden als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung mithilfe von Säulendiagrammen (mit Ausnahme von Abbildungen 8 und 10) dargestellt. Werte, die mehr als zwei Standardabweichungen vom Mittelwert entfernt waren, wurden aus der Auswertung genommen. Unterschiede zwischen der Kontroll- und den Behandlungsgruppen wurden mittels einfaktorieller ANOVA ermittelt. Bei vorliegender globaler Signifikanz wurden Paarvergleiche durch post-hoc-Tests nach Dunnett durchgeführt. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf  $\alpha = 0,05$  festgelegt.

## 3 Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Messungen und der histologischen Auswertungen graphisch dargestellt und erläutert werden. Zur Veranschaulichung werden hierfür, abgesehen von Abbildung 8 und 10, Säulendiagramme verwendet. Die Anordnung der Säulen (von links nach rechts) ist stets dieselbe: zuerst das Ergebnis der Kontrollgruppe (KO), die Gruppe der orchiektomierten Tiere mit Soja-freiem Futter. An zweiter Stelle steht die Gruppe der intakten Tiere ebenfalls mit Soja-freier Ernährung. Es folgen dann die Gruppen der orchiektomierten Tiere mit unterschiedlichen Dosierungen von Ecd im Futter (Ecd 11, Ecd 22, Ecd 67). Signifikanzen werden auf die Kontrollgruppe, KO (orx, sf), bezogen und durch ein Sternchen gekennzeichnet. Die Kontrollgruppe besteht aus den orchiektomierten Tiere, denen Soja-freies Futter verabreicht wurde.

### 3.1 Körpergewicht

#### 3.1.1 Körpergewichtsverlauf

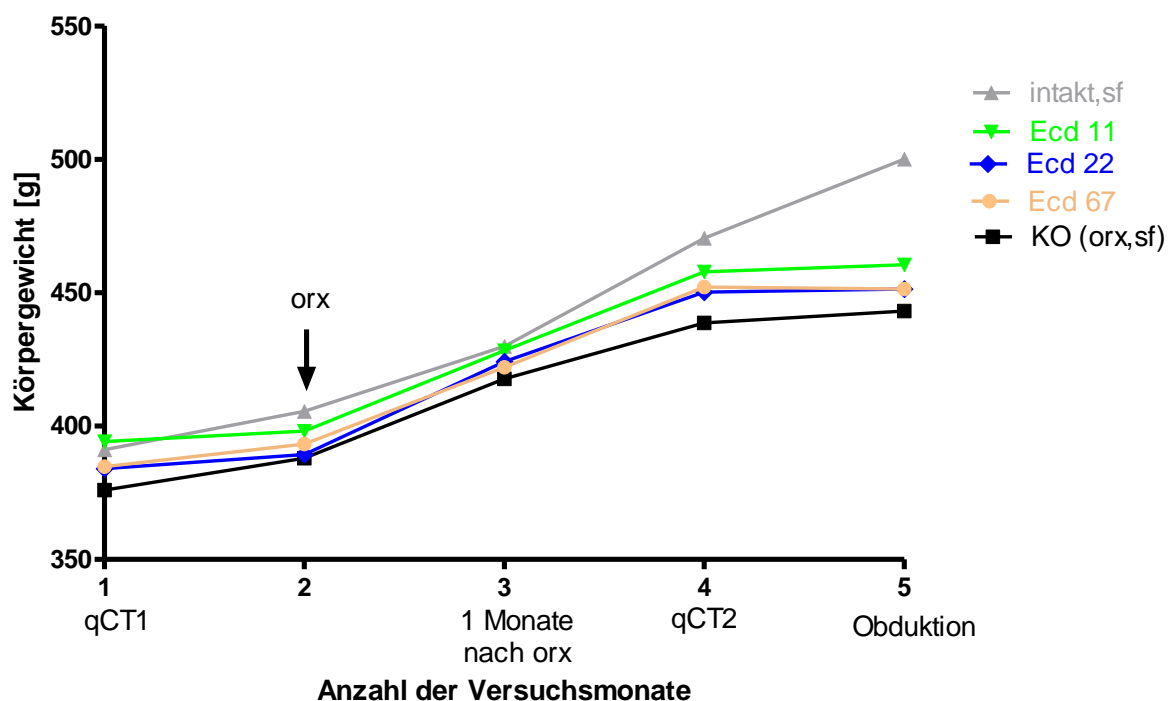


Abb. 8: Der Effekt von Ecd auf den Verlauf des Körpergewichts der jeweiligen Behandlungsgruppen während der dreimonatigen Versuchsdurchführung. Die Werte wurden mit „one-way-Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanzniveau geprüft (Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  vs. Orx ,sf). Dieser Graph wurde von der Abteilung zur Verfügung gestellt.

Die Abbildung 8 zeigt bei allen Gruppen eine kontinuierliche Körpergewichtszunahme über den kompletten Versuchszeitraum. Die Tiere der Kontrollgruppe zeigen während der gesamten Versuchsdurchführung die niedrigsten Körpergewichte. Mit Ausnahme der ersten Gewichtsmessung weisen die intakten Tiere das höchste Körpergewicht auf. Dabei kommt es nur bei diesen in dem Zeitraum von der ersten pQCT-Messung bis Versuchsende zu einer signifikanten Gewichtszunahme von 109 g. Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet liegen die Behandlungstiere mit ihrem Körpergewicht zwischen denen der Kontrolltiere und denen der intakten Tiere.

### 3.1.2 Körpergewicht nach Versuchsende

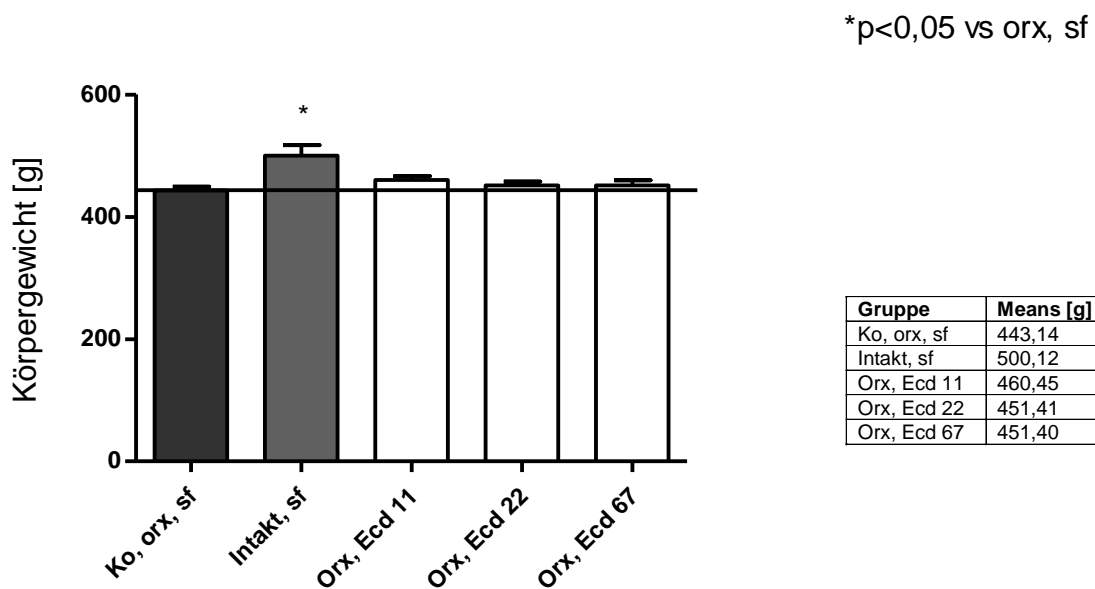


Abb. 9: Der Effekt von Ecd auf die durchschnittlichen Körpergewichte [g] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau \*p<0,05 vs orx, sf).

Zur übersichtlicheren Darstellung zeigt Abbildung 9 die Körpergewichte nur nach Versuchsende. Die intakten Tiere sind mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 500,12 ± 59,01g die schwersten Tiere aller Versuchstiere und sind zusätzlich signifikant schwerer als die Kontrolltiere, die im Durchschnitt 443,14 ± 21,29g wiegen. Die Körpergewichte der Behandlungstiere mit 460,45 ± 21,89g (Ecd 11), 451,41 ± 22,56g (Ecd 22) und 451,40 ± 28,83g (Ecd 67) liegen zwischen den Werten dieser beiden Gruppen und sind im Vergleich zu den intakten Tieren erkennbar geringer. Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den Körpergewichten der Kontrollgruppe und denen der Behandlungsgruppen.

## 3.2 Futteraufnahme

### 3.2.1 Futteraufnahme im Verlauf

Durch die wöchentlich dokumentierte Futteraufnahme pro Käfig konnte für jede Gruppe ein durchschnittlicher Futterkonsum pro Tier pro Tag errechnet werden (siehe Material und Methoden).

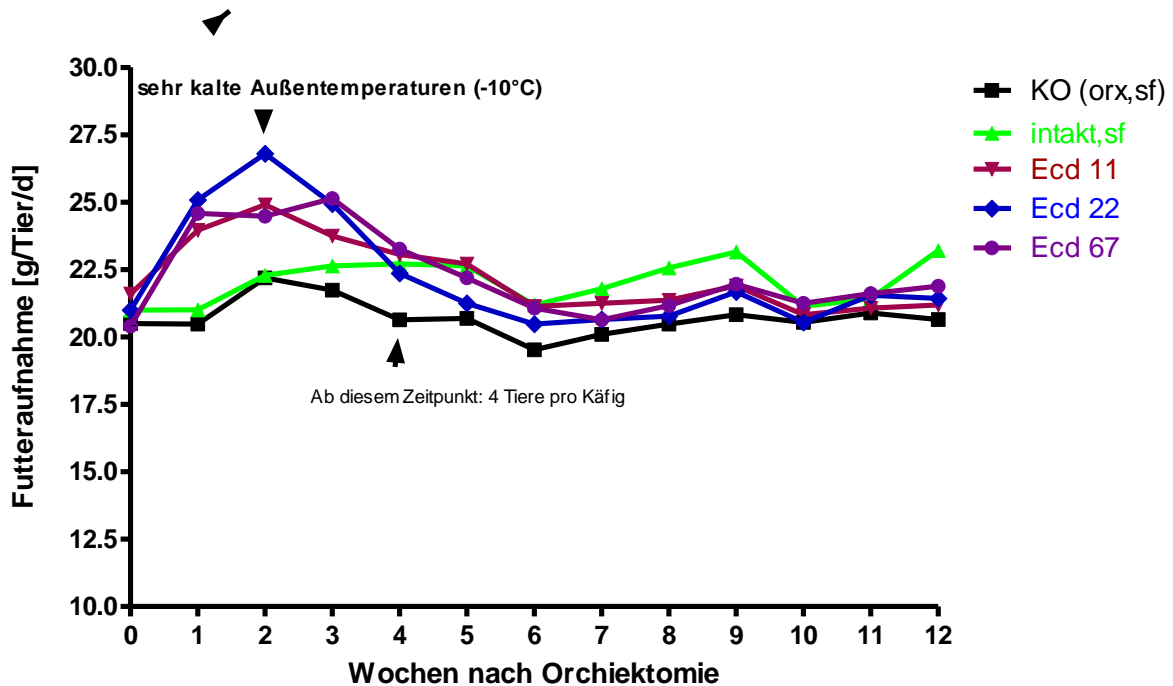


Abb. 10: Der Effekt von Ecd auf den Verlauf der Futteraufnahme der jeweiligen Behandlungsgruppen während der dreimonatigen Versuchsdurchführung. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanzniveau geprüft (Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  vs. Orx, sf). Dieser Graph wurde von der Abteilung zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 10 ist die wochenweise ermittelte durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier am Tag im Verlauf nach der Orchiektomie dargestellt. Nach einem anfänglichen Peak in der zweiten Wochen, der zeitlich mit einem starken Abfall der Außentemperatur auf  $-10^{\circ}\text{C}$  zusammenfällt, bleibt die Futteraufnahme ab der vierten Woche bis zu Versuchsende auf einem relativ konstanten Niveau.

### 3.2.2 Futteraufnahme und Aufnahme der Testsubstanz

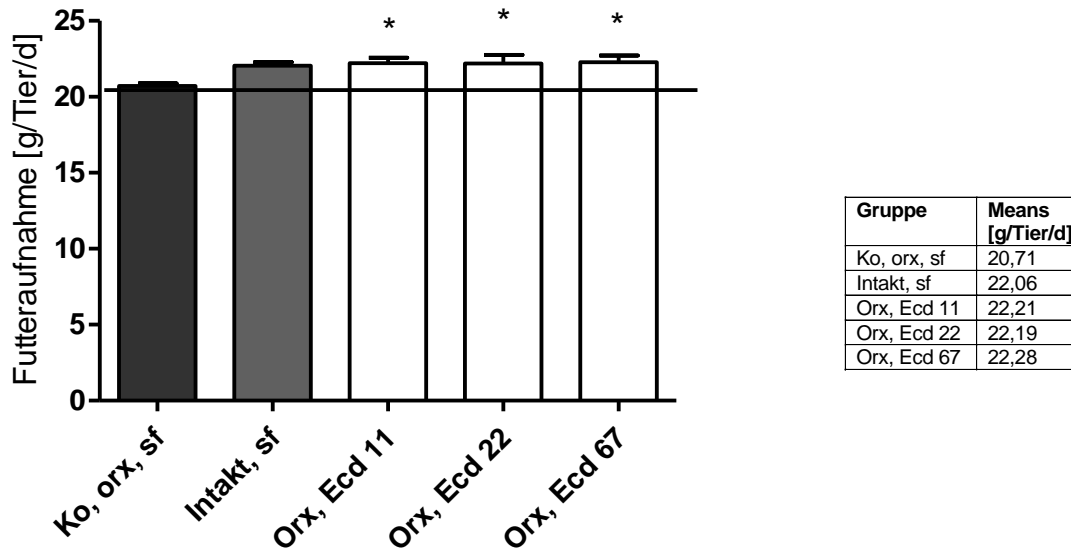
\*  $p < 0,05$  vs orx, sf

Abb. 11: Der Effekt von Ecd auf die durchschnittliche Futteraufnahme [g/Tier/d] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau \* $p < 0,05$  vs orx, sf).

Die durchschnittliche Futteraufnahme der intakten Tiere weist gegenüber der Kontrollgruppe keinen signifikanten Unterschied auf. Die Behandlungstiere nahmen signifikant mehr Futter zu sich als die Kontrolltiere. Am wenigsten fraßen die Tiere der Kontrollgruppe mit ca.  $20,71 \pm 0,66$  g pro Tier pro Tag. Über den gesamten Versuchszeitraum betrachtet nahmen die intakten Tiere durchschnittlich  $22,06 \pm 0,83$  g/Tier/d, die Tiere der Gruppe Ecd 11  $22,21 \pm 1,33$  g/Tier/d, die Tiere der Gruppe 22  $22,19 \pm 2,06$  g/Tier/d und die Tiere der Gruppe Ecd 67  $22,28 \pm 1,59$  g/Tier/d Futter zu sich.

Anhand dieser Werte kann die tägliche Aufnahme von  $\beta$ -Ecdyson berechnet werden, nach der die jeweiligen Versuchsgruppen benannt wurden.

Gruppe	Testsubstanz im Futter [g/kg Futter]	Futteraufnahme [g/Tier/d]	Aufnahme der Testsubstanz [mg/Tier/d]	Testsubstanz [mg/100g KG/d]
Orx, Ecd 11	0,5	$22,21 \pm 1,33$	11,11	2,41
Orx, Ecd 22	1	$22,19 \pm 2,06$	22,19	4,92
Orx, Ecd 67	3	$22,28 \pm 1,59$	66,84	14,81

Tbl 2: Tägliche Aufnahme der Testsubstanz

### 3.3 Herzgewicht

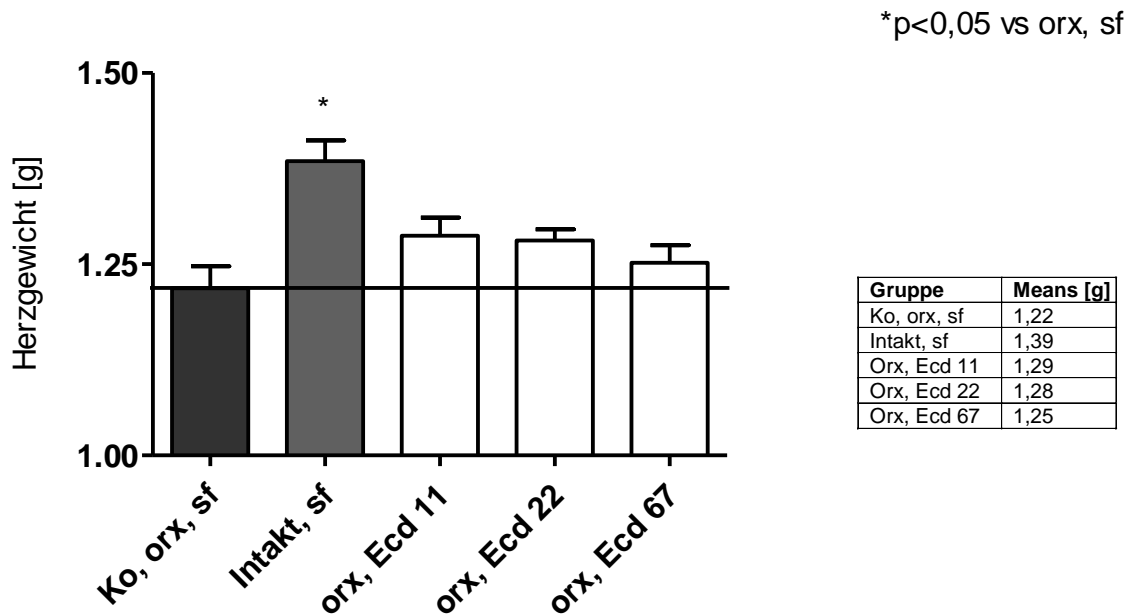


Abb. 12: Der Effekt von Ecd auf das Herzgewicht [g] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe (KO, orx, sf). Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  vs orx, sf;).

Die Abbildung 12 zeigt die durchschnittlichen Herzgewichte nach Versuchsende. Die intakten Tiere haben mit  $1,39 \pm 0,09$ g im Vergleich zu den Tieren der Kontrollgruppe mit  $1,22 \pm 0,10$ g signifikant schwerere Herzen. Die Herzgewichte der Ecd-Behandlungstiere (Ecd 11, Ecd 22, Ecd 67) sind statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber denen der Kontrolltiere.

### 3.4 Prozentualer Anteil des Herzgewichts am Gesamtkörpergewicht

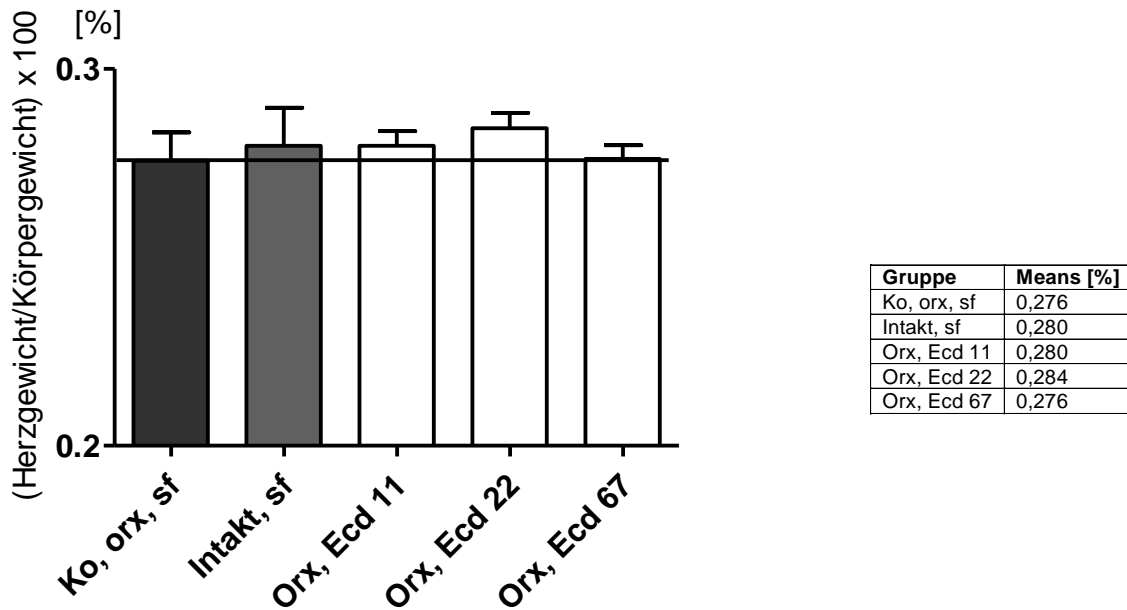


Abb. 13: Der Effekt von Ecd auf den prozentualen Anteil des Herzgewichts am Gesamtkörpergewicht der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  vs orx, sf).

Der prozentuale Anteil des Herzgewichtes bezogen auf 100g Gesamtkörpergewicht zeigt weder bei den intakten Tieren noch bei den Behandlungstieren einen signifikanten Unterschied gegenüber der Kontrollgruppe. Die Tiere der Gruppe Ecd 11 weisen mit  $0,280 \pm 0,01\%$  den gleichen Anteil des Herzgewichtes am Gesamtkörpergewicht auf wie die intakten Tiere mit  $0,280 \pm 0,03\%$ . Zwischen der höchsten Ecd-Dosierung (Ecd 67) mit  $0,276 \pm 0,01\%$  und der Kontrollgruppe mit  $0,276 \pm 0,03\%$  zeigt sich keine signifikante Differenz.



### 3.5 Kardiomyozytenfläche

\* $p < 0,05$  vs orx, sf

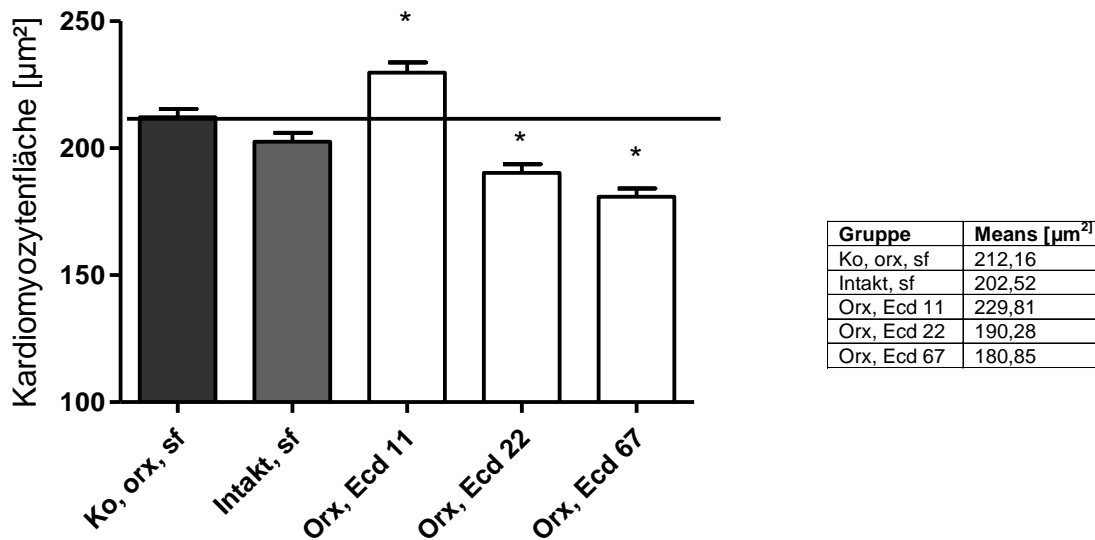


Abb. 14: Der Effekt von Ecd auf die Kardiomyozytenfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau \* $p < 0,05$  vs orx, sf).

Nach dreimonatiger Versuchsdurchführung zeigen die Kontrolltiere eine durchschnittliche Kardiomyozytenfläche von ca.  $212,16 \pm 72,59 \mu\text{m}^2$ . Zwischen diesen und den intakten Tieren ( $202,52 \pm 76,62 \mu\text{m}^2$ ) liegt kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Kardiomyozytenfläche vor. Im Vergleich mit den Kontrolltieren weisen die Tiere der Gruppe Ecd 11 signifikant größere Kardiomyozytenflächen auf und haben mit durchschnittlich  $229,81 \pm 87,49 \mu\text{m}^2$  die größte Kardiomyozytenfläche aller Versuchstiere. Dahingegen zeigen die Tiere der Gruppe Ecd 22 ( $190,28 \pm 74,62 \mu\text{m}^2$ ) und Ecd 67 ( $180,85 \pm 69,42 \mu\text{m}^2$ ) signifikant kleinere Kardiomyozytenflächen gegenüber den Kontrolltieren.

### 3.6 Index: Kardiomyozytenfläche / Herzgewicht

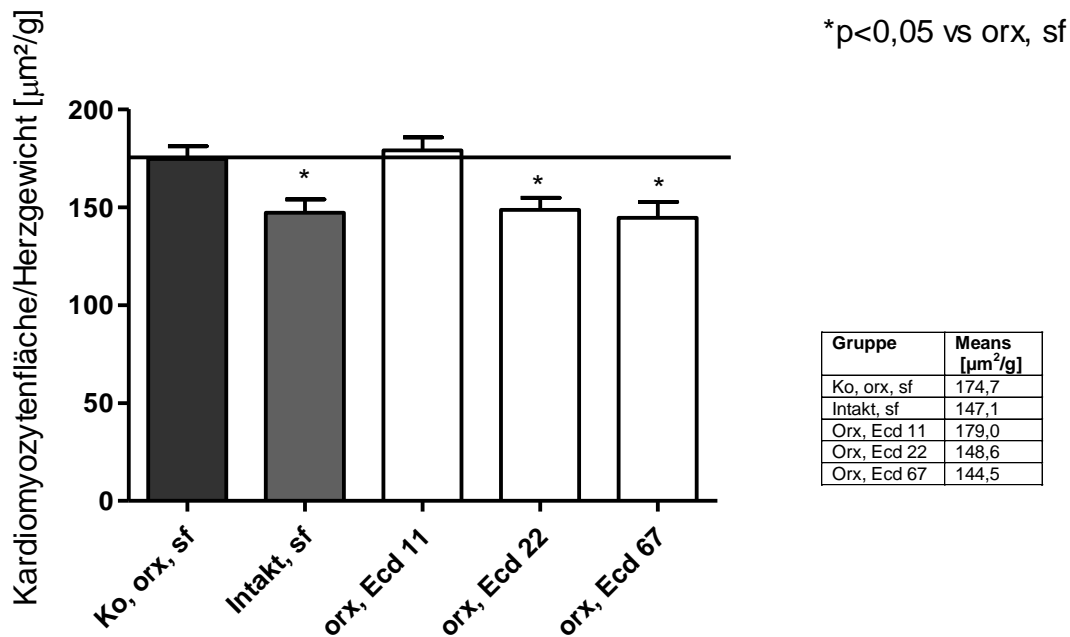


Abb. 16: Der Effekt von Ecd auf das Verhältnis Kardiomyozytenfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] zu dem Herzgewicht [g] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  vs orx, sf).

Der Index aus Kardiomyozytenfläche und Herzgewicht ist bei den intakten Tieren signifikant niedriger im Vergleich zu dem der Kontrolltiere. Die intakten Tiere haben eine kleinere Kardiomyozytenfläche (Abb. 14) bezogen auf ihr signifikant höheres Herzgewicht (Abb.12). Die Tiere der Gruppen Ecd 22 ( $148,6 \pm 30,12 \mu\text{m}^2/\text{g}$ ) und Ecd 67 ( $144,5 \pm 36,33 \mu\text{m}^2/\text{g}$ ) weisen ebenfalls ein signifikant niedrigeres Verhältnis gegenüber der Kontrollgruppe auf. Das Verhältnis von Kardiomyozytenfläche zu Herzgewicht der Gruppe Ecd 11 ( $179,0 \pm 32,20 \mu\text{m}^2/\text{g}$ ) unterscheidet sich nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe ( $174,7 \pm 31,67 \mu\text{m}^2/\text{g}$ ).

### 3.7 Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld

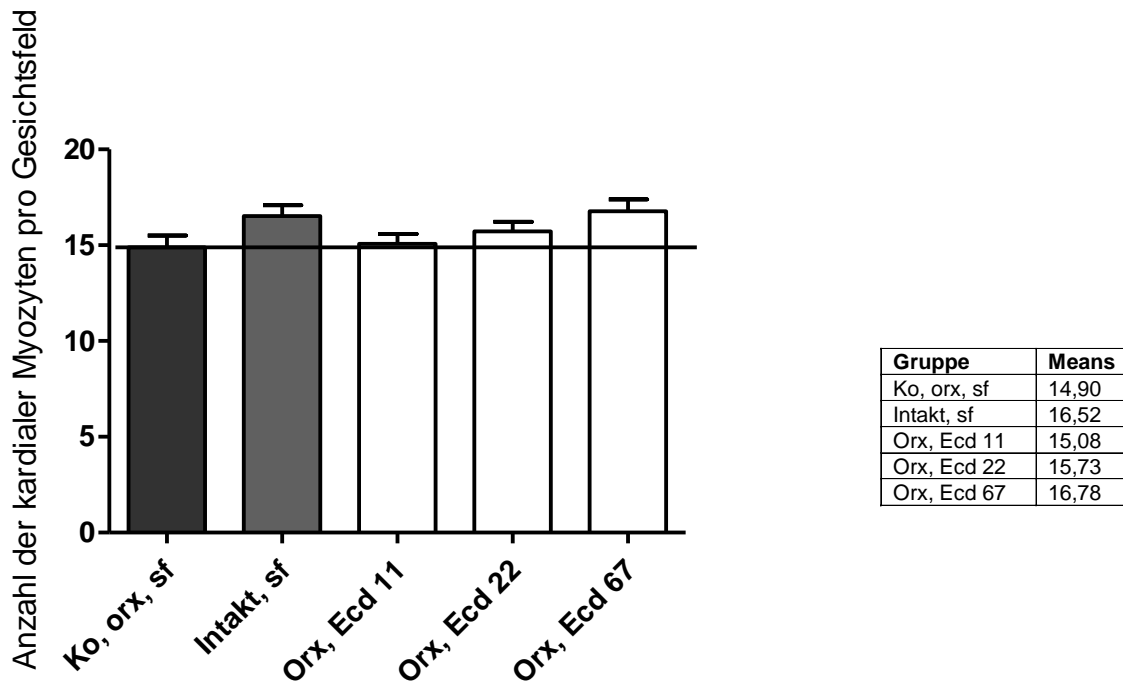


Abb. 15: Der Effekt von Ecd auf die Anzahl der kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld ( $22\,134,58\mu\text{m}^2$ ) der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  vs orx, sf).

Insgesamt besteht zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe ( $14,90 \pm 4,19$ ) kein signifikanter Unterschied in der Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld. Die intakten Tiere zeigen  $16,52 \pm 3,91$  Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld. Die Tiere der Gruppe Ecd 11 haben durchschnittlich  $15,08 \pm 3,52$  Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld und die der Gruppe Ecd 22  $15,73 \pm 3,43$ . Unter der höchsten Ecd-Dosierung, Ecd 67, zeigen sich  $16,78 \pm 3,86$  kardialen Myozyten pro Gesichtsfeld. Insgesamt weisen die Kollektive eine deutliche Streubreite auf.

### 3.8 Prozentualer myokardialer Kollagenanteil

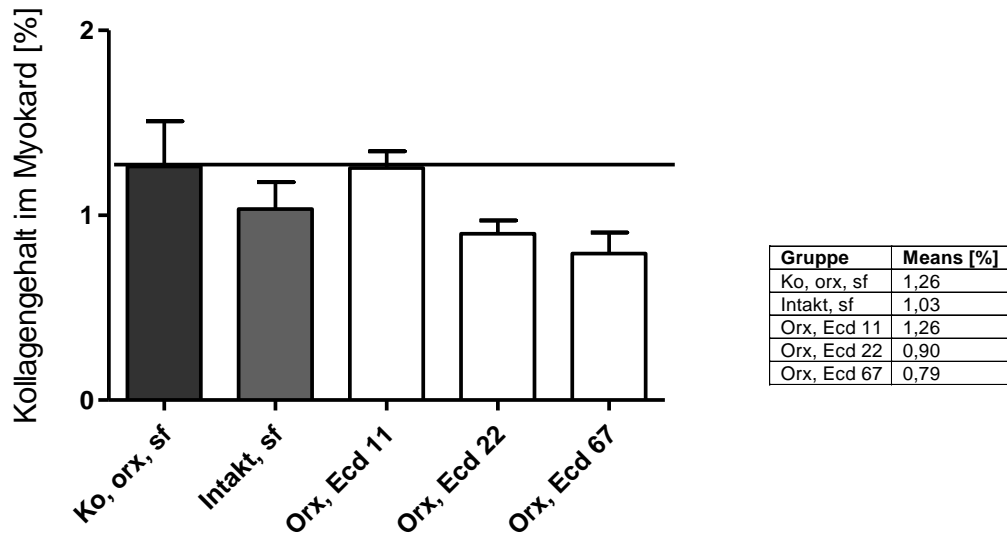


Abb. 17: Der Effekt von Ecd auf den prozentualen Kollagenanteil im Myokard des linken Ventrikels der jeweiligen Behandlungsgruppen nach Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  vs orx, sf).

Der prozentuale myokardiale Kollagenanteil zeigt keinen signifikanten Unterschied zwischen dem der Tiere der Versuchsgruppen und dem der Kontrollgruppe ( $1,26 \pm 0,84\%$ ). Die intakten Tiere weisen einen myokardialen Kollagenanteil von  $1,03 \pm 0,41\%$  auf. Die Tiere der Gruppe Ecd 11 haben einen Kollagenanteil von  $1,26 \pm 0,31\%$  im Myokard, die Tiere der Gruppe Ecd 22 von  $0,90 \pm 0,24\%$  und die Tiere der Gruppe Ecd 67 von  $0,79 \pm 0,32\%$ . Insgesamt weisen die Messungen eine starke Streubreite auf.

### 3.9 Prozentualer Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand

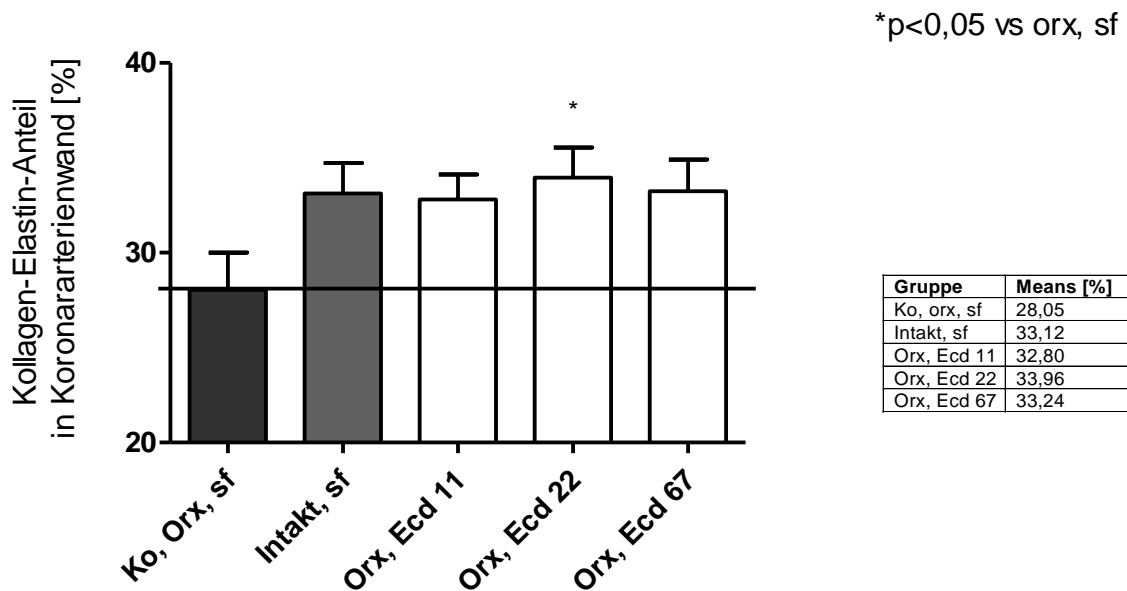


Abb. 18: Der Effekt von Ecd auf den prozentualen Kollagen-Elastinanteil in der Wand einer Koronararterie im linken Ventrikel der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf. Die Werte wurden mit „one-way Anova“ und einem Anschlussstest nach Dunnett auf Signifikanz geprüft (Signifikanzniveau  $*p < 0,05$  vs orx, sf).

Die Abbildung 18 zeigt einen Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand bei den Kontrolltieren von  $28,05 \pm 9,63\%$  und bei den intakten Tieren von  $33,12 \pm 7,71\%$ . Die Tiere der Gruppen Ecd 11 weisen einen koronararteriellen Kollagen-Elastinanteil von  $32,80 \pm 6,18\%$  und die der Gruppe Ecd 67 von  $33,24 \pm 7,48\%$  auf. Die mittlere Ecd-Dosierung (Ecd 22) führt zu einer signifikanten Zunahme des Kollagen-Elastinanteils ( $33,96 \pm 6,84\%$ ) gegenüber der Kontrollgruppe. Somit zeigt sich dosisabhängig ein Maximum der Ecd-Wirkung auf die Veränderung des Kollagen-Elastin-Anteils.

### 3.10 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die folgende Tabelle fasst die Untersuchungsergebnisse zusammen. Sie dient jedoch nicht der statistischen Analyse. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe wurden gleich 100% gesetzt, um die Mittelwerte der Versuchsgruppen darauf zu beziehen und die prozentualen Veränderungen zu beschreiben.

Untersuchter Parameter	Intakt, sf	Orx, Ecd 11	Orx, Ecd 22	Orx, Ecd 67
Körpergewicht	▲▲ +13%	+4%	+2%	+2%
Futteraufnahme	+7%	▲▲ +7%	▲▲ +7%	▲▲ +8%
Herzgewicht	▲▲ +14%	+6%	+5%	+2%
Herzgewicht/Körpergewicht*100	+1%	+1%	+3%	0%
Kardiomyozytenfläche	-5%	▲▲ +8%	▼▼ -10%	▼▼ -15%
Anzahl der Kardiomyozyten	+11%	+1%	+6%	+13%
Kardiomyozytenfläche/Herzgewicht	▼▼ -16%	+2%	▼▼ -15%	▼▼ -17%
Myokardialer Kollagenanteil	-18%	0	-29%	-37%
Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand	+18%	+17%	▲▲ +21%	+19%

Tbl. 3: Die relativen Veränderungen (%) der unterschiedlichen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die prozentualen Werte wurden aus den statistischen Mittelwerten (Means) berechnet. ▲▲: signifikant erhöhte Werte versus Ko, ▼▼: signifikant erniedrigte Werte versus Ko

## 4 Diskussion

### 4.1 Studienziel

Die zugrunde liegende Untersuchung wurde unter der Fragestellung angelegt, welche Auswirkungen die Testsubstanz Ecd auf das Myokard und die Koronararterien der orchiektomierten Sprague-Dawley-Ratten als Modell des altersbedingt androgendefizienten Mannes hat.

Wie einleitend erwähnt, reagiert sowohl das Myokard des alternden Mannes als auch das der männlichen Ratte auf ein Androgendefizit mit einem Kardiomyozytenverlust, einer kompensatorischen Hypertrophie der verbleibenden Zellen und einer bindegewebigen Narbenbildung, um den Verlust des abgestorbenen Myokards zu ersetzen. Hinzukommend verändert sich der Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand. Kollagen (Typ-I und -III), das die Gefäßwand vor Überdehnung schützt, wird vermindert synthetisiert. Der Elastinanteil, der eine erforderliche Dehnbarkeit des Gewebes gewährleistet, ist reduziert und aufgrund von Calcium- und Kollageneinlagerungen weniger elastisch. Diese strukturellen Veränderungen führen unter anderem zu einer Beeinträchtigung der kardialen Kontraktions- und Leistungsfähigkeit sowie der myokardialen Sauerstoffversorgung und der physischen Belastbarkeit.

Ein vollständiges Androgendefizit wurde bei der Sprague-Dawley-Ratte artifiziell durch die Orchiektomie hervorgerufen. Die extragonadale Hormonproduktion der Nebennierenrinde ist sehr gering und kann in dieser Untersuchung vernachlässigt werden. Beim alternden Mann dagegen besteht bis ins hohe Alter aufgrund einer Restfunktion der Gonaden nur ein partielles Androgendefizit.

Ecd zeigte in bisherigen Studien eine protektive Wirkung gegenüber altersbedingten Beschwerden wie beispielsweise der Osteoporose und der Sarkopenie. Somit rückt die Testsubstanz als potentielle Therapiealternative bei altersbedingten und androgendefizitassoziierten Krankheitsbildern zunehmend in den Blickpunkt.

Um die Auswirkungen von Ecd auf das Myokard und die Koronararterien der orchiektomierten Sprague-Dawley-Ratte zu untersuchen, wurden die Herzen von 60 männlichen Ratten nach dreimonatiger peroraler Applikation der Testsubstanz histomorphometrisch untersucht. Um einen Einfluss von Phytoöstrogenen, die in Soja enthalten sind, zu minimieren, wurde den Tieren aller Versuchsgruppen Soja-freies Futter verabreicht. Die Resultate konnten mittels histologischer Aufarbeitung des Myokards und anschließender lichtmikroskopischer Analyse und Auswertung gewonnen werden.

Die Analyse bestand in der Bestimmung der Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld, der Messung ihrer Querschnittsfläche sowie der Bestimmung des prozentualen myokardialen Kollagenanteils. Des Weiteren wurde der prozentuale koronararterielle Kollagen-Elastinanteil bestimmt.

Die Messergebnisse wurden nach einer statistischen Auswertung jeweils mit denen der Kontrollgruppe verglichen.

Die Untersuchung der Wirkung von Ecd auf das Myokard und die Koronararterien ist bislang noch nicht beschrieben worden. Aufgrund dessen ist ein Vergleich mit internationaler Literatur nur bedingt möglich.

## 4.2 Dosierungen der Testsubstanz

Die Toxizität von Ecd auf den Säugetiermetabolismus ist mit einer letalen Dosis bei Mäusen von >6 g/kg KG bei intraperitonealer Injektion und von >9 g/kg KG bei oraler Applikation sehr gering [Lafont und Dinan 2003; Matsuda et al. 1970; Ogawa et al. 1974].

Beim Menschen führt eine täglichen Dosis von 200 mg Ecd pro Person zu einer Zunahme der Muskelmasse [Seidlová-Wuttke et al. 2010]. Die Fitnessindustrie hingegen empfiehlt für Bodybuilder weitaus höhere Mengen von >1 g Ecd täglich [Dinan und Lafont 2006].

Es ist zu beachten, dass Ratten bezogen auf mg/kg KG ca. 10 - 15 Mal höhere Dosierungen einer Substanz benötigen um den gleichen Effekt aufzuweisen wie der Mensch.

Bei der Dosierung der oralen Applikation der Testsubstanz Ecd wurde sich an vorherigen Studien orientiert.

In Untersuchungen mit weiblichen Sprague-Dawley-Ratten wurden täglich 18 mg/Tier, 57 mg/Tier, 116 mg/Tier Ecd per os appliziert. Bereits bei der niedrigsten applizierten Dosis konnte ein anaboler Effekt auf die Skelettmuskulatur beobachtet werden [Seidlová-Wuttke et al. 2010].

Auf der Basis dieser Untersuchungsergebnisse wurden in der vorliegenden Studie Dosierungen von 11 mg/Tier, 22 mg/Tier und 67 mg/Tier pro Tag gewählt. Die Applikation der Testsubstanz von 11 mg/Tier und 22 mg/Tier entsprechen ca. 2 mg/100g Körpergewicht und ca. 5 mg/100g Körpergewicht. Somit liegt die Verabreichung von 22 mg/Tier pro Tag in einem Bereich, der auf den Menschen übertragen, zu einer Zunahme der Muskelmasse führen würde. Die tägliche Aufnahme von 67 mg/Tier, die ca. 15 mg/100g Körpergewicht entsprechen, liegt bezogen auf den Menschen in einem ungefähren Dosisbereich, der für Bodybuilder empfohlen wird (>1 g/kg KG).



## 4.3 Analysen der Untersuchungsergebnisse

### 4.3.1 Futteraufnahme und Körpergewicht

Zwei Wochen post Orchiektomie zeigte die wöchentliche Kontrolle des Futtermittelsverbrauchs einen allgemeinen Anstieg. Dieser Peak war mit einem Abfall der Außentemperatur von  $-10^{\circ}\text{C}$  assoziiert (Abb. 10). Möglicherweise wirkte sich die veränderte Wetterlage auf die Tierstallklimatisierung und den Futterkonsum der Versuchstiere aus. Nach einer vierwöchigen Adaptationsphase post Orchiektomie, pendelte sich die Futteraufnahme allgemein auf ein relativ konstantes Niveau ein (Abb. 10).

Über den gesamten Versuchszeitraum fraßen die intakten Tiere nicht signifikant mehr als die orchiektomierten Kontrolltiere (Abb. 11) und wogen zu Versuchsende dennoch signifikant mehr (Abb. 9). Diese Ergebnisse stimmen mit denen anderer Studien überein [Schaible et al. 1984; Erben et al. 2000, Borst und Conover 2006]. Schaible et al. beschrieben nach Gonadektomie männlicher Wistar-Ratten ein niedrigeres Körpergewicht im Vergleich zu den intakten Tieren. Vermutlich bedingt die ausbleibende anabole Wirkung von Testosteron auf die Skelettmuskulatur die niedrigeren Körpergewichte der Kontrolltiere (Abb.9).

Über den gesamten Versuchszeitraum war der Futterkonsum der Ecd-Behandlungstiere signifikant höher als der der Kontrolltiere (Abb. 11). Interessanterweise zeigt sich nach Versuchsende kein signifikanter Unterschied in den Körpergewichten dieser Versuchsgruppen (Abb. 9). Tóth [2010] zeigte dahingegen in einem anderen Versuchsansatz, bei dem intakte Wistar-Ratten mit Ecd ( $5\text{ mg/kg KG}$ ) behandelt wurden, eine Körpergewichtszunahme durch eine Zunahme der Muskelmasse. Kratky et al. [1997] beobachteten bei Schweinen bei einer tägliche Ecd-Dosierung von  $0,2\text{-}0,4\text{ mg/kg}$  eine geringere Futteraufnahme und gleichzeitig eine Körpergewichtszunahme.

Aufgrund der bekannten anabolen Wirkung von Ecd auf die Skelettmuskulatur und der gleichzeitigen Reduktion des Proteinkatabolismus [Lafont und Dinan 2003] hätte man eine Körpergewichtszunahme der Behandlungstiere erwartet. Insbesondere unter der höchsten Ecd-Dosierung von  $67\text{ mg/Tier pro Tag}$ , die einer Dosis im Bodybuilder-Bereich des Menschen entspricht, wäre eine Körpergewichtszunahme zu erwarten gewesen.

Die Applikation von Ecd führt, wie bereits erwähnt, zu einer Zunahme der Muskelmasse und wirkt somit anabol. Zusätzlich belegten Seidlovà-Wuttke et al. [2010] eine fettreduzierende Wirkung der Testsubstanz Ecd. Dieser Aspekt kann bei der Fütterung ad libitum von Bedeutung sein. Eventuell verantwortet die Kombination aus diesen beiden Effekten das Ausbleiben der erwarteten Körpergewichtszunahme der Ecd-Behandlungstiere.

### 4.3.2 Herzgewicht

Nach Versuchsende zeigen die Kontrolltiere die leichtesten und die intakten Tiere die schwersten Herzen aller Versuchsgruppen (Abb. 12). Analog zu den signifikant höheren

Körpergewichten der intakten Tiere weisen diese auch signifikant schwerere Herzen im Vergleich zu den Kontrolltieren auf. Koenig et al. [1982] zeigten analog zu den vorliegenden Untersuchungsergebnissen eine Reduktion der linksventrikulären Masse nach Gonadektomie männlicher Ratten. Ursächlich dafür scheint eine Inhibition der Proteinbiosynthese als Folge der Orchiektomie zu sein [Kinson et al. 1991]. Beim alternden Mann wird sowohl eine kontinuierliche Abnahme des endogenen Androgenspiegels [Jockenhövel und Schubert 2003] als auch eine Reduktion der Ventrikelmasse beobachtet [Olivetti et al. 1995]. Schaible et al. [1984] dokumentierten nach Gonadektomie männlicher Wistar-Ratten signifikant niedrigere Herz- und Körpergewichte. Diese Ergebnisse finden Übereinstimmung mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen.

Die Tiere aller drei Ecd-Behandlungsgruppen haben nicht signifikant schwerere Herzen als die Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 12).

Syrov und Kurmukov [1976] beobachteten bei intakten Ratten bei einer täglichen oralen Applikation von 0,5 mg/100g KG Ecdysteroiden sowohl eine Körpergewichtszunahme als auch eine Gewichtszunahme der Leber, des Herzens, der Nieren und des M. tibialis anterior. Der Proteingehalt war in diesen Organen erhöht [Syrov und Kurmukov 1976]. Dieser anabole Effekt konnte nicht an gonadektomierten Ratten belegt werden [Syrov und Kurmukov 1976]. In Übereinstimmung mit den Untersuchungsergebnissen von Syrov und Kurmukov [1976] zeigen die orchiektomierten Ecd-Behandlungstiere der vorliegenden Studie keine signifikante Differenz in den Herzgewichten gegenüber den Kontrolltieren. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass Ecd in den applizierten Dosierungen (Ecd 11, Ecd 22, Ecd 67) die Auswirkungen des Testosterondefizits bezogen auf das Herzgewicht nicht kompensieren konnte.

#### **4.3.3 Prozentualer Anteil des Herzgewichts am Körpergewicht**

Angesichts der signifikant höheren Körper- und Herzgewichte der intakten Tiere gegenüber den orchiektomierten Kontrolltieren, stellt sich die Frage ob prozentuale Unterschiede oder gleich starke Veränderungen auf die Herz- und Körpergewichte zu detektieren sind. Aufgrund dessen wurde der prozentuale Anteil des Herzgewichtes am Gesamtkörpergewicht, beziehungsweise das Herzgewicht bezogen auf 100g Körpergewicht, berechnet.

Übereinstimmend mit den Resultaten einer anderen Untersuchung [Schaible et al. 1984] besteht zwischen dem prozentualen Anteil des Herzgewichtes am Gesamtkörpergewicht der intakten Tiere und dem der orchiektomierten Kontrolltiere kein signifikanter Unterschied (Abb. 13). In der Studie von Schaible et al. [1984] führte die Orchiektomie zu einer Abnahme der quergestreiften Muskulatur, was zu einer Reduktion des Körper- und des Herzgewichtes

führte [Schaible et al. 1984]. Der Quotient aus Herz- zu Körpergewicht blieb nach Gonadektomie männlicher Wistar-Ratten unverändert [Schaible et al. 1984].

Somit bedingt der physiologische Testosteronspiegel der intakten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren eine signifikante Zunahme des Herz- und des Körpergewichtes. Diese Signifikanzen heben sich allerdings in der Quotientenbildung (Herzgewicht bezogen auf 100g Körpergewicht) wieder auf. Diese Tatsache bestätigt die Auswirkung von Testosteron in gleichem Ausmaß auf das Myokard und auf das Körpergewicht bzw die Auswirkung der Orchiektomie in gleichem Ausmaß auf das Myokard und das Körpergewicht.

Zwischen den Ecd-Behandlungstieren und den Tieren der orchiektomierten Kontrollgruppe liegt keine signifikante Differenz im prozentualen Anteil des Herzgewichtes am Gesamtkörpergewicht vor. Die Ecd-Applikation in unterschiedlichen Dosierungen hat weder signifikante Auswirkungen auf das Herz- noch auf das Körpergewicht orchiektomierter SD-Ratten. Der Quotient dieser beiden Faktoren repräsentiert die unzureichende Auswirkung der Testsubstanz in gleichem Ausmaß auf das Herz- und auf das Körpergewicht.

#### **4.3.4 Kardiomyozytenfläche**

Das Myokard setzt sich aus der Herzmuskulatur und dem gefäß- und nervenführenden Bindegewebe zusammen. Dabei stellt die Herzmuskulatur eine Sonderform der quergestreiften Muskulatur dar. Mit ca. 70-75% stellen die Kardiomyozyten, die charakteristischerweise einen zentralständigen Kern besitzen, volumenmäßig den größten Anteil des Myokards dar [Astorri et al. 1977; Jantunen et al. 1989]. Bei chronischer Mehrbelastung des Herzens kommt es zu einer reaktiven Hypertrophie der einzelnen Kardiomyozyten und daraus resultierend zu einer Zunahme der Muskelmasse [Lüllmann-Rauch 2003]. Im Gegensatz zur Skelettmuskulatur werden eine Vermehrung und eine Regeneration der kardialen Myozyten aufgrund des Fehlens von Satellitenzellen für unmöglich gehalten [Lüllmann-Rauch 2003].

In der vorliegenden Arbeit wurden die Querschnittsflächen der Kardiomyozyten mit mittelständigem Kern im rechten und linken Ventrikel ausgemessen.

Die orchiektomierten Kontrolltiere zeigen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung eine durchschnittliche Kardiomyozytenfläche von 212,16  $\mu\text{m}^2$ . Die kardialen Myozyten der intakten Tiere weisen keine signifikante Differenz zu denen der Kontrolltiere auf (Abb. 14).

Der Alterungsprozess des Mannes ist sowohl durch eine Abnahme des Androgenspiegels [Jockenhövel und Schubert 2003] als auch durch einen Kardiomyozytenverlust charakterisiert [Olivetti et al. 1995]. Als Reaktion auf den Zellverlust hypertrophieren die verbleibenden kardialen Myozyten [Olivetti et al. 1995]. Dabei kommt es mit zunehmendem Lebensalter des Mannes sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel zu einer kontinuierlichen Volumenzunahme der einzelnen Kardiomyozyten [Olivetti et al. 1995]. Der

Längsdurchmesser der kardialen Myozyten, gemessen auf Höhe des Zellkerns, vergrößert sich sowohl im rechten als auch im linken Ventrikel, wobei im letztgenannten die Veränderung stärker ausgeprägt ist [Olivetti et al. 1995].

Im Gegensatz zu diesen Untersuchungsergebnisse [Olivetti et al. 1995] zeigen die Kardiomyozytenflächen der orchiektomierten Kontrolltiere, die als Modell des älteren hypogonadalen Mannes dienen, keine signifikante Zunahme gegenüber den intakten Tieren (Abb. 14).

Die Wirkung von Ecd auf das Myokard ist bisher unerforscht. Angesichts der fehlenden Wirkung von Ecd auf das Herzgewicht (Abb. 12) sind die Messergebnisse der Kardiomyozytenfläche erstaunlich. Die Ecd-Behandlungstiere zeigen signifikante Veränderungen der Kardiomyozytenfläche (Abb. 14). Die Tiere mit der niedrigsten Ecd-Dosierung (Ecd 11) weisen signifikant größere Kardiomyozytenflächen gegenüber den orchiektomierten Kontrolltieren auf (Abb. 14). Wohingegen die mittlere und die höchste Dosierung der Testsubstanz (Ecd 22 und Ecd 67) zu signifikant kleineren Kardiomyozytenflächen führen (Abb. 14).

In der Pharmakologie ist die Beschreibung einer glockenförmigen Dosis-Wirkungs-Beziehung geläufig. Diese beschreibt eine stimulierende Wirkung bei niedrigen Dosen und unter weiterer Dosissteigerung eine Abnahme des Effektes [Van Aken et al. 2007]. Eine solche glockenförmige Dosis-Wirkungs-Beziehung könnte die Wirkung von Ecd auf die Kardiomyozytenflächen orchiektomierter SD-Ratten beschreiben.

Welche Auswirkungen die Veränderungen der Kardiomyozytenfläche auf die kardiale Funktionsfähigkeit haben, kann anhand der durchgeführten lichtmikroskopischen Messungen nicht geklärt werden. Unter der Berücksichtigung, dass die intakten Tiere für die physiologische Kardiomyozytenfläche repräsentativ sind, ist anzunehmen, dass die Testsubstanz eher unerwünschten Einfluss auf die Kardiomyozytenflächen nimmt. Dies betrifft sowohl eine signifikante Vergrößerung der Fläche kardialer Myozyten unter der niedrigsten Dosierung (Ecd 11) der Testsubstanz als auch die signifikante Reduktion unter der mittleren (Ecd 22) und höchsten Dosierung (Ecd 67) gegenüber den intakten Tieren.

#### **4.3.5 Index aus Kardiomyozytenfläche und Herzgewicht**

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Veränderungen der Kardiomyozytenfläche und dem Herzgewicht zu detektieren, wurden die Quotienten dieser beiden Parameter berechnet. Der Index stellt eine aus der Kardiomyozytenfläche und dem Herzgewicht erstellte Vergleichsgröße dar.

Die intakten Tiere sind repräsentativ für das ideale Verhältnis zwischen der kardialen Myozytenfläche und dem Herzgewicht und demzufolge für eine optimale kardiale Funktionsfähigkeit. Die orchiektomierten Kontrolltiere weisen aufgrund ihrer nicht signifikant

größeren Kardiomyozytenfläche (Abb. 14) und dem signifikant niedrigeren Herzgewicht (Abb. 12) einen größeren Quotienten im Vergleich zu den intakten Tieren auf (Abb. 16). Umgekehrt zeigen die intakten Tiere einen signifikant kleineren Index aus Kardiomyozytenfläche und Herzgewicht gegenüber den orchiektomierten Kontrolltiere (Abb. 16). Eventuell könnte der größere Quotient aus Kardiomyozytenfläche und Herzgewicht der orchiektomierten Kontrolltiere im Vergleich zu den intakten Tieren eine Beeinträchtigung der kardialen Funktionsfähigkeit darstellen und als negatives Zeichen für diese interpretiert werden.

Zwischen der Kontrollgruppe und der Behandlungsgruppe Ecd 11 besteht kein signifikanter Unterschied in dem Quotienten aus Kardiomyozytenfläche und Herzgewicht (Abb. 16). Die Tiere der Behandlungsgruppen Ecd 22 und Ecd 67 weisen eine signifikante Differenz in den Indices gegenüber den Kontrolltieren auf und zeigen Indexwerte, die denen der intakten Tiere ähneln (Abb. 16). Diese Ähnlichkeit ist unter Berücksichtigung der Einzelparameter mit Vorsicht zu deuten. Die Behandlungstiere (Ecd 22 und Ecd 67) zeigen sowohl eine Reduktion der Herzgewichte (Abb. 12) als auch eine Reduktion der Kardiomyozytenfläche (Abb. 14) gegenüber den intakten Tieren, die repräsentativ für das Optimum sind. Somit gelten diese beiden Effekte als weniger wünschenswert. Durch die Quotientenbildung wird vordergründig ein den intakten Tieren ähnlicher Zustand unter den Dosierungen Ecd 22 und Ecd 67 erreicht, die vor dem Hintergrund der Einzeleffekte nicht positiv gewertet werden sollten.

#### **4.3.6 Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld**

Zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen und der orchiektomierten Kontrollgruppe besteht kein signifikanter Unterschied in der Anzahl kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld (Abb. 15).

Entgegen den Ergebnissen anderer Untersuchungen am alternden Mann [Olivetti et al. 1991] zeigt sich keine signifikante Differenz zwischen der Anzahl kardialer Myozyten der intakten Tiere und der orchiektomierten Kontrolltiere (Abb. 15). Olivetti et al. [1991] beschrieben eine inverse Korrelation zwischen dem Lebensalter des Mannes und der Anzahl der ventrikulärer Kardiomyozyten. Der Alterungsprozess des Mannes, der mit einer stetigen Reduktion des Androgenspiegels assoziiert ist [Jockenhövel und Schubert 2003], resultiert sowohl im rechten als auch im linken Ventrikel in einem signifikanten Verlust von kardialen Myozyten [Olivetti et al. 1995]. Dabei verliert das Herz insgesamt 64 Millionen Kardiomyozyten pro Jahr. Im linken Ventrikel kommt es zu einer jährlichen Reduktion von ca. 45 Millionen Myozyten und im rechten Ventrikel von ca. 19 Millionen [Olivetti et al. 1995]. Die verbleibenden Kardiomyozyten hypertrophieren reaktiv, um den altersbedingten Zellverlust zu kompensieren.

Die orale Applikation der Testsubstanz Ecd in unterschiedlichen Dosierungen hat keine signifikanten Auswirkungen auf die Anzahl ventrikulärer Kardiomyozyten orchiektomierten SD-Ratten (Abb. 15).

Als eine in Betracht zu ziehende Ursache für die fehlenden Signifikanzen könnte eventuell auch die große Streuung der Mittelwerte sein. Die große Streuung in den Mittelwerten der Ergebnisse kann sowohl auf die Messmethode als auch auf die interindividuellen Unterschiede von Tier zu Tier zurückgeführt werden. Zur Messmethode ist anzumerken, dass pro Tier jeweils nur vier Gesichtsfelder ausgewertet wurden, die nur eingeschränkt das gesamte Myokard repräsentieren können. Durchschnittlich wurden nur ca. 16 Kardiomyozyten pro Gesichtsfeld detektiert, bei denen teilweise drei nicht eindeutig den Bewertungskriterien (siehe Material und Methoden) entsprochen haben, sodass eine Zählung mit Unsicherheit behaftet war.

#### **4.3.7 Prozentualer myokardialer Kollagenanteil**

Die Extrazelluläre Matrix des Myokards wird größtenteils von Kollagenfibrillen und elastischen Fasern gebildet und gewährleistet die Stabilität und Elastizität des Gewebes. Das Endo-, das Peri- und das Epimysium sind aus einem fibrillären Kollagennetzwerk aufgebaut, das hauptsächlich aus dem Kollagen-Typ-I und -III gebildet wird [Weber et al. 1988; Chapman et al. 1990]. Dabei verantwortet Kollagen-Typ-I die Belastbarkeit und Kollagen-Typ-III die Elastizität des Gewebes [Lamparter und Maisch 2000]. Die Extrazelluläre Matrix ermöglicht die Kraftübertragung der einzelnen Kardiomyozyten während der Systole und verhindert die Überdehnung der Muskelfasern in der Diastole [Weber et al. 1994]. Somit spielt diese eine bedeutende Rolle bei der Herzaktion.

Insgesamt besteht zwischen den Versuchsgruppen und der orchiektomierten Kontrollgruppe keine signifikante Differenz im prozentualen Kollagenanteil des Myokards (Abb. 17).

Olivetti et al. [1995] beobachteten beim Mann einen altersbedingten und somit auch androgendefizitassozierten Kardiomyozytenverlust, der sowohl im linken als auch im rechten Ventrikel durch fibröse Herde ersetzt wurde. Des Weiteren wurden bei Männern ab dem 40. Lebensjahr interstitielle Kollagenablagerungen in der Ventrikelwand beobachtet. Diese beiden Formen der Akkumulation Extrazellulärer Matrix wurden häufiger in subendokardialen Regionen des linken Ventrikels beobachtet [Olivetti et al. 1995]. Generell wird abgestorbenes Myokard durch bindegewebige Narben ersetzt [Lüllmann-Rauch 2003].

Die Messungen im Rahmen der vorliegenden Studie wurden ebenfalls im linken Ventrikel (I und IV Quadrant) vorgenommen (Abb. 5 Material und Methoden).

Im Gegensatz zu den Studienergebnisse von Olivetti et al. [1995] weisen die intakten Tiere keinen signifikant geringeren bzw. die Kontrolltiere keinen signifikant höheren myokardialen Kollagenanteil auf (Abb. 17).

Leider liegt zu der Wirkung von Ecd auf den prozentualen Kollagenanteil im Myokard bisher keine Literatur vor, die einen Vergleich mit anderen Studienergebnissen ermöglichen würde.

Zwischen dem myokardialen Kollagenanteil der Tiere der drei Ecd-Behandlungsgruppen und dem der Kontrolltiere liegt kein signifikanter Unterschied vor (Abb. 17). Die orale Applikation von Ecd in verschiedenen Dosierungen hat keine Auswirkungen auf den myokardialen Kollagenanteil orchiektomierter SD-Ratten.

Als eine Ursache für die fehlenden Signifikanzen bei allen Versuchsgruppen könnte eventuell auch die große Streuung in den Mittelwerten in Betracht gezogen werden. Die große Streuung in den Mittelwerten der Ergebnisse kann sowohl auf die Messmethode und als auch auf die interindividuellen Unterschiede von Tier zu Tier zurückgeführt werden. Zur Messmethode ist anzumerken, dass pro Tier jeweils nur zwei Gesichtsfelder ausgewertet wurden (siehe Material und Methoden), die nur eingeschränkt das gesamte Myokard repräsentieren können. Zusätzlich waren die einzelnen Kollagenanteile sehr inhomogen verteilt und wiesen hinzukommend noch extreme Unterschiede in den Größen auf. Eventuell konnten zu kleine Kollagenanteile aufgrund eines zu geringen Farbkontrastes nicht eindeutig identifiziert werden und entgingen somit der Messung.

Desweiteren ist anzumerken, dass die in dieser Studie durchgeführten Messmethoden keine Auskunft über die einzelnen Kollagensubtypen zulassen, sondern lediglich Information über den prozentualen Anteil von Kollagen bzw. Extrazellulärer Matrix im Myokard liefern. In welchem Ausmaß die Applikation von Ecd zu Veränderungen der Quantität und der Qualität einzelner Kollagensubtypen innerhalb des gemessenen Kollagenanteils geführt und somit Auswirkungen auf die Stabilität und Elastizität dieses Gewebes genommen hat, kann mit der durchgeführten Messmethode nicht beantwortet werden. Um die Kollagensubtypen (Kollagen Typ I und III) zu differenzieren und somit Rückschlüsse auf die Funktionsfähigkeit des Myokards herleiten zu können, müssten weitere Messungen mittels Immunhistochemie durchgeführt werden.

#### **4.3.8 Prozentualer Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand**

Die Koronararterien sind Arterien vom muskulären Typ und gewährleisten gemeinsam mit ihren Ästen während der Diastole eine adäquate Sauerstoffversorgung des menschlichen Herzens [Drenckhahn 2003]. Ihre Wand ist generell aus drei Schichten aufgebaut und besteht hauptsächlich aus den drei Komponenten Kollagen, Elastin und glatten Muskelzellen [Dobrin 1978]. Die Intima setzt sich aus dem Endothel, der subendothelialen Schicht und der Lamina elastica interna zusammen. Die Media, die die dickste Schicht der Arterienwand darstellt, wird überwiegend aus glatten Muskelzellen und Extrazellulärer Matrix gebildet. Bindegewebsfasern wie Kollagenfasern (Typ-III) und elastische Fasern treten in dieser

Schicht in den Hintergrund [Drenckhahn 2003]. Die Adventitia ist eine Bindegewebsschicht, die das Gefäß in der Umgebung verankert. Das Bindegewebe setzt sich aus Kollagenfasern und elastischen Fasern zusammen. Dabei stellen die fibrillären Kollagen Typen-I und -III, mit 60 und 30 %, den Hauptanteil dar [Diez 2007]. Kollagen-Typ-I gewährt die Zugkraft und Kollagen-Typ-III die Gewebeflexibilität der Arterienwand [Diez 2007]. Elastin, das Hauptprotein der Elastischen Fasern, verantwortet ebenfalls die Dehnbarkeit des Gewebes. Zwischen diesen elastischen Fasern lagern sich nichtelastische Kollagenfasern ein, die eine Überdehnung der elastischen Fasern und der Gefäßwand verhindern [Hauser 2008].

In der Elastica-van-Gieson-Färbung stellen sich die Kollagenfasern rot und die elastischen Fasern schwarzviolett dar (siehe Material und Methoden). Innerhalb der Adventitia sind die Kollagenfasern scherengitterartig angeordnet, in die sich elastische Fasern einlagern (siehe Abb. 1). Da bei einer 25fachen Vergrößerung lichtmikroskopisch die einzelnen Bestandteile der rot angefärbten Flächen nicht eindeutig differenziert werden können, werden in der vorliegenden Arbeit die rot angefärbten Komponenten der Arterienwand mit Kollagen-Elastinanteil bezeichnet.

Der Kollagen-Elastinanteil der Koronararterienwand der intakten Tiere ist nicht signifikant höher gegenüber dem der Kontrolltiere (Abb. 18).

In anderen Studien am Menschen [Dobrin 1978] und an Primaten [Qiu et al. 2007] konnten signifikante Veränderungen der Kollagen-Isoformen und des Elastingehalts im Zuge des Alterungsprozesses belegt werden.

Qiu et al. [2007] zeigten eine altersassoziierte signifikante Abnahme von Kollagen-Typ-I und -III in der Aorta männlicher Primaten. Gleichzeitig war der Anteil des Kollagen-Typ-VIII erhöht. Dieser fördert die Migration glatter Gefäßmuskelzellen und die neointimale Formation [Qiu et al. 2007]. Des Weiteren nahmen der Gehalt und die Dichte des Elastins signifikant ab. Diese morphologischen Veränderungen gingen mit einer erhöhten Steifigkeit der Gefäßwand einher [Qiu et al. 2007]. Dobrin [1978] dokumentierte eine zunehmende Steifigkeit der Elastischen Fasern im Zuge des Alterungsprozess, die durch eine Calciumakkumulation, eine Spaltung der elastischen Fasern und eine Einlagerung von Kollagenfasern hervorgerufen wird. Der Quotient aus Kollagen und Elastin, der einen Index für die arterielle Steifigkeit darstellt, stieg mit zunehmendem Alter des Mannes [Qiu et al. 2007; Dobrin 1978].

In der vorliegenden Studie wurde weder der Kollagen- noch der Elastinanteil in der Arterienwand separat identifiziert und ausgemessen. Demzufolge kann lediglich ein Vergleich zwischen den Versuchsgruppen und der intakten Gruppe, die den physiologischen Anteil von Kollagen-Elastin widerspiegelt, eine Bewertung der Messergebnisse zulassen. Inwieweit es zu inter- und intraindividuellen Veränderungen der einzelnen Kollagensubtypen



kommt, kann anhand der in dieser Untersuchung durchgeführten Messung nicht beantwortet werden. Es lässt sich lediglich festhalten, dass die Orchiectomie keine signifikanten Auswirkungen auf den Anteil dieser beiden Gefäßwandkomponenten hat.

Die Behandlungstiere der Gruppen Ecd 11 und Ecd 67 weisen gegenüber den orchiectomierten Kontrolltieren nicht signifikant mehr Kollagen-Elastin in der Koronararterienwand auf (Abb. 18). Die mittlere Dosierung der Testsubstanz (Ecd 22) führt zu einer signifikanten Erhöhung des Kollagen-Elastinanteils in der Koronararterienwand im Vergleich zu den orchiectomierten Kontrolltieren (Abb. 18). Die Differenz zwischen dem Kollagen-Elastinanteil der Ecd-Behandlungsgruppen und dem der intakten Tiere erscheint sehr gering (Abb. 18). Setzt man voraus, dass die intakten Tiere den physiologischen Anteil von Kollagen-Elastin in der Koronararterienwand und demzufolge auch die physiologische koronararterielle Funktionsfähigkeit darstellen, ist eine positive Wirkung der Testsubstanz Ecd auf diese Strukturkomponenten nicht auszuschließen.

Über welchen Mechanismus und auf welche einzelnen Strukturkomponenten Ecd (Ecd 22) zu Veränderungen des Kollagen-Elastinanteils führt, lässt sich mithilfe der durchgeführten Untersuchung nicht herleiten. Ein Vergleich mit internationaler Literatur ist nicht möglich, da diese Untersuchungen bislang nicht beschrieben wurden.

Um genauere Aussagen über die intra- und interindividuellen Veränderungen der einzelnen Kollagen-Isotypen und des Elastingehalts treffen und somit Rückschlüsse auf die kardiale Sauerstoffversorgung und physische Belastbarkeit ziehen zu können, müssten weitere Untersuchungen mittels Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden.

## 5 Zusammenfassung

Altersbedingte Beschwerden wie beispielsweise die Osteoporose, die Sarkopenie und die Veränderungen des kardiovaskulären Systems sind im Zuge des demografischen Wandels unserer Gesellschaft in den letzten Jahrzehnten zu einem zunehmenden Problem geworden. Besonders die morphologischen Veränderungen des Myokards und der Gefäße führen bei Männern in dem Lebenszeitfenster von Mitte 50 bis Mitte 70 zu einer erhöhten Mortalität im Vergleich zu Frauen gleichen Alters. Zusätzlich ist die physische Belastbarkeit älterer Männer beeinträchtigt. Zur Linderung der altersassoziierten Beschwerden existiert derzeit die Option der Testosteronersatztherapie, die allerdings aufgrund des ungünstigen Nebenwirkungsprofils und verschiedener Kontraindikationen kontrovers diskutiert wird. Bei der Suche nach alternativen Therapieansätzen mit möglichst geringen unerwünschten Nebenwirkungen und Kontraindikationen rücken die Ecdysteroide, die Steroidhormone der Arthropoden, näher in Betracht. Bisherige Studien konnten eine protektive Wirkung dieser Substanzen auf die hormonmangelbedingte Osteoporose und einen anabolen Effekt auf die gonadektomieinduzierte Sarkopenie belegen. Hinzukommend weisen Ecdysteroide, mit dem Hauptvertreter  $\beta$ -Ecdyson, eine geringe Toxizität auf den Säugetiermetabolismus auf und könnten somit eine potentielle Alternative zur bisherigen Testosteronersatztherapie darstellen.

Mit diesem Hintergrundwissen setzte sich die vorliegende Studie das Ziel, mögliche Effekte der Testsubstanz gegenüber den orchiektomieinduzierten myokardialen Veränderungen nachzuweisen. Inhalt der zugrunde liegenden Arbeit war, die Auswirkungen der Testsubstanz  $\beta$ -Ecdyson in drei unterschiedlichen Dosierungen auf die kardialen und koronararteriellen Strukturkomponenten der SD-Ratte histomorphometrisch zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden 60 männliche Sprague-Dawley-Ratten orchiektomiert, mit Ausnahme der zwölf Tiere der intakten Gruppe, und es erfolgte anschließend eine dreimonatige perorale Applikation der Testsubstanz in unterschiedlichen Dosierungen. Nach Versuchsende wurden bei der Obduktion die Herzen für die lichtmikroskopische Untersuchung entnommen, in Paraffin eingebettet, geschnitten sowie mittels Hämalaun-Eosin- und Elastica-van-Gieson-Färbung zu histologischen Präparaten verarbeitet. Anhand der histologischen Messungen mittels computergestützter Fotoanalyse des Myokards und der Koronararterien konnten die Auswirkungen der Testsubstanz in verschiedenen Dosierungen ermittelt und mit denen der Kontrollgruppe verglichen werden.

Über den dreimonatigen Versuchszeitraum führte die tägliche orale Applikation der Testsubstanz unter allen drei Dosierungen zu einem signifikant höheren Futterkonsum bei den Ecd-Behandlungstieren im Vergleich zu den Kontrolltieren. Interessanterweise hatte  $\beta$ -

Ecdyson im Gegensatz zu Untersuchungsergebnissen anderer Studien keine Auswirkungen auf die Körper- und Herzgewichte. Vermutlich ist das Ausbleiben der erwarteten Körpergewichtszunahme der Ecd-Behandlungstiere durch die muskelaufbauende und gleichzeitig fettreduzierende Wirkung der Testsubstanz zu erklären. Die vorliegenden Untersuchungsergebnisse belegen, dass  $\beta$ -Ecdyson in den applizierten Dosierungen die Auswirkungen des Testosteronmangels bezogen auf das Herz- und Körpergewicht nicht kompensieren konnte.

Die Messungen der Kardiomyozytenflächen ergaben signifikante Ergebnisse. Die tägliche Applikation von 11 mg  $\beta$ -Ecdyson führte zu signifikant größeren Kardiomyozytenflächen. Unter den Dosierungen 22 mg  $\beta$ -Ecdyson und 67 mg  $\beta$ -Ecdyson kam es zu signifikanten Reduktionen der Kardiomyozytenflächen im Vergleich zu den Kontrolltieren. Um Aussagen über die Auswirkungen dieser histomorphometrischen Veränderungen machen zu können, sind weitere funktionelle Untersuchungen erforderlich. Unter der Berücksichtigung, dass die intakten Tiere für die physiologische Kardiomyozytenfläche repräsentativ sind, ist anzunehmen, dass die Testsubstanz eher unerwünschten Einfluss auf die Kardiomyozytenflächen nimmt.

Weder die Anzahl kardialer Myozyten noch der myokardiale Kollagenanteil wurden durch die die Testsubstanz im Vergleich zu den Soja-frei behandelten orchiektomierten Kontrolltieren signifikant verändert.

Der koronararterielle Kollagen-Elastinanteil der Tiere der Behandlungsgruppe Ecd 22 ist signifikant höher als der der orchiektomierten Kontrolltiere. Basierend auf der Annahme, dass der Kollagen-Elastinanteil in der Koronararterienwand der intakten Tiere physiologisch und somit ideal ist, lässt sich eine positive Auswirkung der Testsubstanz in der Dosierung 22 mg auf die Funktionsfähigkeit der Koronararterienwand nicht ausschließen. Um konkrete Aussagen über die intra- und interindividuellen Veränderungen der einzelnen Kollagen-Isotypen und des Elastingehalts treffen und somit Rückschlüsse auf die kardiale Sauerstoffversorgung und physische Belastbarkeit ziehen zu können, müssen weitere Untersuchungen mittels Immunhistochemie und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt werden.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die Testsubstanz  $\beta$ -Ecdyson nur zu wenigen signifikanten Ergebnissen, nämlich bei der Futteraufnahme, der Kardiomyozytenfläche und des koronararteriellen Kollagen-Elastinanteils führte. Die Veränderungen sind nur mäßig stark ausgeprägt. Die Auswirkungen dieser Veränderungen auf die Funktionsfähigkeit des Myokards und der Koronararterienwand erfordern weitere funktionelle Untersuchungen, um mögliche Therapieansätze zu finden. Diese bleiben anderen Arbeiten vorbehalten.

## 6 Methodischer Anhang

Rohnährstoffe	[%]	Mineralstoffe	[%]	Spurenelemente	pro kg
Trockensubstanz	88,2	Calcium	1,00	Eisen	169 mg
Rohprotein	21,7	Phosphor	0,70	Mangan	78 mg
Rohfett	4,3	Natrium	0,19	Zink	101 mg
Rohfaser	4,2	Magnesium	0,20	Kupfer	14 mg
Rohasche	6,1	Kalium	0,67	Iod	2,2 mg
N freie Extraktstoffe	52,2			Selen	0,4 mg
Stärke	34,0	Aminosäuren	[%]	Cobalt	2,2 mg
Zucker	3,0	Lysin	1,22		
		Methionin	0,44	Vitamine	pro kg
Fettsäuren	[%]	Met+Cys	0,83	Vitamin A	15.000 IE
C 12:0	-	Threonin	0,97	Vitamin D <sub>3</sub>	1.000 IE
C 14:0	0,01	Tryptophan	0,28	Vitamin E	115 mg
C 16:0	0,56	Arginin	1,13	Vitamin K	5 mg
C 16:1	0,01	Histidin	0,51	Thiamin	18 mg
C 18:0	0,08	Valin	1,25	Riboflavin	22 mg
C 18:1	0,82	Isoleucin	1,03	Pyridoxin	20 mg
C 18:2	2,26	Leucin	1,95	Cobalamin	100 µg
C 18:3	0,22	Phenylalanin	1,21	Nicotinsäure	120 mg
C 20:0	0,01	Phe+Tyr	2,20	Pantothensäure	40 mg
C 20:1	0,02	Glycin	1,05	Folsäure	7 mg
C 20:5	-	Glutaminsäure	3,96	Biotin	460 µg
C 22:6	-	Asparaginsäure	2,18	Cholin-Cl	2.380 mg
		Prolin	1,53	Inositol	100 mg
		Alanin	1,26		
		Serin	1,17		

(Zusammensetzung des Futters sniff® R-Z Phytoestrogenarm (soja-frei) der Firma sniff Spezialdiät, Soest; Dieses Mischfutter enthält genetisch veränderte Mais-, Kartoffelprotein- und Zuckerrübenschnitzelprodukte.)

Tbl. 4: Futtertabelle (ssniff R/Z, phytoöstrogenarm (sojafrei))

<b>Substanz</b>	<b>Einwirkdauer</b>
50%iger Alkohol	1h
75%iger Alkohol	1h 20min
75%iger Alkohol	1h 20min
96%iger Alkohol	1h 20min
96%iger Alkohol	1h 20min
100%iger Alkohol	1h 20min
100%iger Alkohol	1h 20min
100%iger Alkohol	1h 20min
Xylol	1h 20min
Xylol	1h 20min
Paraffin	1h
Paraffin	1h

*Tbl. 5: Entwässerung und Fixierung zu Paraffinblöcken*

<b>Substanz</b>	<b>Einwirkdauer</b>
Xylol	5min
Xylol	5min
Xylol	5min
Ethanol 100%	2min
Ethanol 100%	2min
Ethanol 100%	2min
Ethanol 96%	2min
Ethanol 96%	2min
Ethanol 75%	2min
Aqua dest	2min
Hämatoxylin	1min
Leitungswasser	10min
Eosin	20sec
Aqua dest	5-10sec
Ethanol 75%	30sec
Ethanol 96%	30sec
Ethanol 96%	30sec
Ethanol 100%	1min
Ethanol 100%	1min
Ethanol 100%	2min
Xylol	5min
Xylol	5min
Xylol	5min

*Tbl. 6: HE-Färbung*

<b>Substanz</b>	<b>Einwirkdauer</b>
Xylol	5min
Xylol	5min
Xylol	5min
Ethanol 100%	2min
Ethanol 100%	2min
Ethanol 100%	2min
Ethanol 96%	2min
Ethanol 96%	2min
Ethanol 75%	2min
Resorcinfuchsin-Lösung	30-45min
Aqua dest	Abspülen
HCL-Ethanol 96%	Nur kurz
Eisenhämatoxylin nach Weigert	6min
Leitungswasser	12min
Aqua dest	Abspülen
Pikrofuchsin-Gemisch	3min
Mit Filterpapier abtupfen	
Ehtanol 96%	30sec
Ethanol 96%	30sec
Ethanol 100%	1min
Ethanol 100%	1min
Ethanol 100%	2min
Xylol	5min
Xylol	5min
Xylol	5min

Tbl. 7: Elastika van Gieson-Färbung

## 7 Literaturverzeichnis

Aizikov MI, Kurmukov AG, Syrov VN (1978): Physiological activity and correlative changes in protein, carbohydrate, and fat metabolism under the effect of ecdysone and nerobol. *Farmakologiya Prirodnikh Veschestv* 107, 107–125

Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C (1999): Natural androgens inhibit male atherosclerosis: a study in castrated, cholesterol-fed rabbits. *Circ Res* 84, 813–819

Aman U, Schmedt N, Garbe E (2012): Potenziell inadequate Medikamente bei Älteren. *Dtsch Arztebl Studieren.de* 2, 26-28

Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM (1990): Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res* 67, 871–885

Araujo AB, Esche GR, Kupelian V, O'Donnell AB, Travison TG, Williams RE, Clark RV, McKinlay JB (2007): Prevalence of symptomatic androgen deficiency in men. *J Clin Endocrinol Metab* 92, 4241–4247

Astorri E, Bolognesi R, Colla B, Chizzola A, Visioli O (1977): Left ventricular hypertrophy: a cytometric study on 42 human hearts. *J Mol Cell Cardiol* 9, 763–775

Astrand H, Stalhand J, Karlsson J, Karlsson M, Sonesson B, Länne T (2011): In vivo estimation of the contribution of elastin and collagen to the mechanical properties in the human abdominal aorta: effect of age and sex. *J Apply Physiol* 110, 176-187

Badal'yants KL, Nabiev AN, Khushbaktova ZA, Syrov VN (1996): Mechanism of hepatoprotective action of ecdystene in acute heliotrine intoxication. *Doklady Akademii Nauk Respubliki Uzbekistana* 10, 46–48

Barrett-Connor E, Khaw KT (1988): Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. A prospective Population-Based Study. *Circulation* 78, 539–545

Basaria S, Dobs AS (2007): Testosterone Making an Entry Into the Cardiometabolic World. *Circulation* 116, 2658–2661

Bassil N, Alkaade S, Morley JE (2009): The benefits and risks of testosterone replacement therapy: a review. *Ther Clin Risk Manag* 5, 427–448

Bélanger B, Bélanger A, Labrie F, Dupont A, Cusan L, Monfette G (1989): Comparison of residual C-19 steroids in plasma and prostatic tissue of human, rat and guinea pig after castration: unique importance of extratesticular androgens in men. *J Steroid Biochem Mol Biol* 32, 695–698

Bhasin S, Buckwalter JG (2001): Testosterone supplementation in older men: A rational idea whose time has not yet come. *J Androl* 22, 718-731

Bhasin S, Storer TW, Berman N, Callegari C, Clevenger B, Phillips J, Bunnell TJ, Tricker R, Shirazi A, Casaburi R (1996): The effects of supraphysiologic doses of testosterone on muscle size and strength in normal men. *N Engl J Med* 335, 1–7

Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, Matsumoto AM, Snyder PJ, Swerdloff RS, Montori VM (2006): Testosterone therapy in adult men with androgen deficiency syndromes: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 1995–2010

Blackford M, Dinan L (1997): The effects of ingested 20-hydroxyecdysone on the larvae of *Aglais urticae*, *Inachis io*, *Cynthia cardui* (Lepidoptera: Nymphalidae) and *Tyria jacobaeae* (Lepidoptera: Arctiidae). *J Insect Physiol* 43, 315–327

Borst SE, Conover CF (2006): Orchiectomized Fischer 344 male rat models body composition in hypogonadal state. *Life Sci* 79, 411–415

Bourguet W, Ruff M, Chambon P, Gronemeyer H, Moras D (1995): Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR- $\alpha$ . *Nature* 375, 377–382

Brandes R, Busse R: Kreislauf; in: *Physiologie des Menschen: mit Pathophysiologie*; 31. Aufl. hrsg. V. Schmidt RF, Lang F, Heckmann M; Springer Heidelberg 2010, 573-626

British Heart Foundation Statistics Database; Statistics on Mortality; in *Coronary Heart Disease Statistics* Chapitre 4, 2010; <http://www.bhf.org.uk/research/statistics/mortality.aspx>



Bundeszentrale für politische Bildung: Bevölkerungsentwicklung und Altersstruktur; in Zahlen und Fakten: Die soziale Situation in Deutschland; Mai 2011; <http://www.bpb.de/wissen/1KNBKW>

Butenandt A, Karlson P (1954): Über die Isolierung eines Metamorphose-hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Z Naturforsch* 9, 389–391

Cahlíková L, Macáková K, Chlebek J, Host'álová A, Kulhánková A, Opletal L (2011): Ecdysterone and its activity on some degenerative diseases. *Nat Prod Communi* 6, 707–718

Callies F, Strömer H, Schwinger R, Bölc B, Hu K, Frantz S, Leupold A, Beer S, Allolio B, Bonz A (2003) Administration of testosterone is associated with a reduced susceptibility to myocardial ischemia. *Endocrinology* 144, 4478–4483

Chapman D, Weber KT, Eghbali M (1990): Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. *Circ Res* 67, 787–794

Chermnykh NS, Shimanovskii NL, Shutko GV, Syrov VN (1988): The action of methandrostenolone and ecdysterone on the physical endurance of animals and on protein metabolism in the skeletal muscles. *Farmakol Toksikol* 51, 57–60

Chiang HC, Wang JJ, Wu RT (1992): Immunomodulating effects of the hydrolysis products of formosanin C and  $\beta$ -ecdysone from *Paris formosana* Hayata. *Anticancer Res* 12, 1475–1478

Christ-Crain M, Gasser TC, Staub JJ, Meier C (2001): Klimakterium virile—Mythos oder Realität? Pathophysiologische Aspekte und klinische Auswirkungen eines Testosteronmangels. *Schweiz Med Forum* 49, 210–214

Constantino S, Santos R, Gisselbrecht S, Gouilleux F (2001): The ecdysone inducible gene expression system: unexpected effects of muristerone A and ponasterone A on cytokine signaling in mammalian cells. *Eur Cytokine Netw* 12, 365–367

Cunningham GR (2006): Testosterone replacement therapy for late-onset hypogonadism. *Nat Clin Prac Urol* 3, 260–267

Desler M, Jones S, Smith C, Woods T (1996): Effects of dexamethasone and anabolic agents on proliferation and protein synthesis and degradation in C2C12 myogenic cells. *J Anim Sci (JAS)* 74, 1265–1273

Dhadialla TS, Carlson GR, Le DP (1998): New insecticides with ecdysteroidal and juvenile hormone activity. *Annu Rev Entomol* 43, 545–569

Díez J (2007): Arterial stiffness and extracellular matrix. *Adv Cardiol* 44, 76–95

Dinan L (1995a): A strategy for the identification of ecdysteroid receptor agonists and antagonists from plants. *Eur J Entomol* 92, 271–283

Dinan L (1995b): Distribution and levels of phytoecdysteroids within individual plants of species of the Chenopodiaceae. *Eur J Entomol* 92, 295–300

Dinan L (2001): Phytoecdysteroids: biological aspects. *Phytochemistry* 57, 325–339

Dinan L, Lafont R (2006): Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191, 1–8

Dobrin PB (1978): Mechanical properties of arterises. *Physiol Rev* 58, 397–470

Drenckhahn D: Herz; in: *Anatomie Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie*; Band 2; 16. Aufl.; hrsg. v. Benninghoff A, Drenckhahn D; Elsevier GmbH, Urban & Fischer, München 2003; 41-70

Ehrenberg N: Variations gender-differences in cardiac extracellular matrix remodeling through voluntary cage wheel running and after myocardial infarction in mice. *Med. Diss.* Berlin 2008

Erben RG, Eberle J, Stahr K, Goldberg M (2000): Androgen deficiency induces high turnover osteopenia in aged male rats: a sequential histomorphometric study. *J Bone Miner Res* 15, 1085–1098

Esposito D, Komarnytsky S, Shapses S, Raskin I (2011): Anabolic effect of plant brassinosteroid. *FASEB J* 25, 3708–3719

Fischer GM, Swain ML (1977): Effect of Sex Hormones on Blood Pressure and Vascular Connective Tissue in Castrated and Noncastrated Male Rats. *Am J Physiol – Heart Circ Physiol* 232, H617–H621

Franklin M, Bu S, Lerner MR, Lancaster EA, Bellmer D, Marlow D, Lightfoot SA, Arjmandi BH, Brackett DJ, Lucas EA (2006): Dried plum prevents bone loss in a male osteoporosis model via IGF-I and the RANK pathway. *Bone* 39(6), 1331-42

Frohlich ED, Apstein C, Chobanian AV, Devereux RB, Dustan HP, Dzau V, Fauad-Tarazi F (1992): The heart in hypertension. *N Engl J Med* 327, 998–1008

Frost H, Jee W (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Mineral* 18, 227–236

Golden KL, Marsh JD, Jiang Y, Brown T, Moulden J (2003): Gonadectomy of adult male rats reduces contractility of isolated cardiac myocytes. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 285, E449–E453

Gorelick-Feldman J, MacLean D, Ilic N, Poulev A, Lila MA, Cheng D, Raskin I (2008): Phytoecdysteroids increase protein synthesis in skeletal muscle cells. *J Agric Food Chem* 56, 3532–3537

Haffner SM, Mykkänen L, Valdez RA, Katz MS (1993): Relationship of sex hormones to lipids and lipoproteins in nondiabetic men. *J Clin Endocrinol Metab* 77, 1610–1615

Hak A, Witteman J, de Jong F, Geerlings M, Hofman A, Pols H (2002): Low Levels of Endogenous Androgens Increase the Risk of Atherosclerosis in Elderly Men: The Rotterdam Study. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3632–3639

Halpern MH (1957): The dual blood supply of the rat heart. *Am J Anat* 101, 1–16

Hauser J: Extrazelluläre Matrix; in: Biochemie, hrsg. v. Rassow J, Hauser K, Netzker R, Deutzmann R; 2. Aufl. Duale Reihe: Georg Thieme Stuttgart 2008, 396-409

Hayward CS, Kelly RP, Collins P (2000): The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc Res* 46, 28–49

Heeneman S, Cleutjens JP, Faber BC, Creemers EE, van Suylen RJ, Lutgens E, Cleutjens KB, Daemen MJ (2003): The dynamic extracellular matrix: intervention strategies during heart failure and atherosclerosis. *J Pathol* 200, 516–525

Hikino H, Ohizumi Y, Takemoto T (1972a): Absorption, distribution, metabolism, and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice. I. *Yakugakuzasshi: J Pharmaceut Soc Jap* 92, 945–950

Hikino H, Ohizumi Y, Takemoto T (1972b): Absorption, distribution, metabolism, and excretion of insect-metamorphosing hormone ecdysterone in mice. II. *Chem Pharmaceut Bull* 20, 2454–2458

Horwitz KB, Horwitz LD (1982): Canine vascular tissues are targets for androgens, estrogens, progestins, and glucocorticoids. *J Clin Invest* 69, 750–758

Howell S, Shalet S (2001): Testosterone deficiency and replacement. *Horm Res* 56, 86–92

Jantunen E, Kosma VM, Halinen MO, Romppanen T, Collan Y (1989): Morphometric study of human myocardium in acquired valvular diseases. *Ann Med* 21, 435–440

Jockenhövel F, Schubert M (2003): Hormonersatztherapie beim Mann - Sinn oder Unsinn? *Blickpunkt der Mann* 1, 14–19

Kalu DN (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Mineral* 15, 175–191

Kannel WB, Wilson PW (1995): Risk factors that attenuate the female coronary disease advantage. *Arch Intern Med* 155, 57–61

Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D (2010): Beneficial effects of  $\beta$ -Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 350–355

Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A (1996): Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab* 81, 4358–4365

Keenan KP, Hoe CM, Mixson L, Mccoy CL, Coleman JB, Mattson BA, Ballam GA, Gumprecht LA, Soper KA (2005): Diabesity: A Polygenic Model of Dietary-Induced Obesity from Ad Libitum Overfeeding of Sprague–Dawley Rats and Its Modulation by Moderate and Marked Dietary Restriction. *Toxicol Pathol* 33, 650–674

Khaw KT, Barrett-Connor E (1988): Blood pressure and endogenous testosterone in men: an inverse relationship. *J Hypertens* 6, 329–332

Khaw KT, Dowsett M, Folkard E, Bingham S, Wareham N, Luben R, Welch A, Day N (2007): Endogenous Testosterone and Mortality Due to All Causes, Cardiovascular Disease, and Cancer in Men. *Circulation* 116, 2694–2701

Khimiko IN, Yul M, Efremova O, Sidorenko L (2000): The influence of ecdysterone on the biosynthesis of proteins and nucleic acids in mouse organs. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal* 34, 3–5

Khushbaktova ZA, Syrov VN, Batirov EK (1991): Effects of flavonoids on the course of hyperlipidemia and atherosclerosis. *Khimiko-Farnatsevticheskii Zhurnal* 25, 53–57

Kinson GA, Layberry RA, Hébert B (1991): Influences of anabolic androgens on cardiac growth and metabolism in the rat. *Can J Physiol Pharmacol* 69, 1698–1704

Kizelsztejn P, Govorko D, Komarnytsky S, Evans A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I (2009): 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E433–E439

Kleine B, Rossmannith WG: *Biochemie von Hormonen – Ein Ausflug in: Die Grundlagen; in Hormone und Hormonsystem; hrsg. v. Kleine & Rossmannith; 2. erw. Aufl.; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010,*

Koenig H, Goldstone A, Lu CY (1982): Testosterone-mediated sexual dimorphism of the rodent heart. Ventricular lysosomes, mitochondria, and cell growth are modulated by androgens. *Circ Res* 50, 782–787

Köhrle J, Petrides PE: Hypothalamisch-hypophysäres System und Zielgewebe; in: *Biochemie und Pathobiochemie; 8. Aufl.; hrsg. v. G Löffler, Petrides PE, Heinrich P; Springer Heidelberg 2007, 843-892*

Koolman J: Ecdysone: from Chemistry to Mode of Action; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1989, 482

Korkach I, Kotsiuruba AV, Prysiazna OD, Mohyl'nyts'ka LD, Sahach VF (2007): NO-dependent mechanisms of ecdysterone protective action on the heart and vessels in streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats. *Fiziologichnyi Zhurnal* 53, 3–8

Kotsyuruba AV, Akhmed I, Tarakanov SS, Kholodova ID (1992): Effect of ecdysterone on the metabolism of purine and pyrimidine nucleotides in chicken tissues. *Ukrainskiĭ Biokhim* 64, 52–60

Koudela K, Tenora J, Bajer J, Mathova A, Sláma K (1995): Stimulation of growth and development in Japanese quails after oral administration of ecdysteroid-containing diet. *Eur J Entomol* 92, 349–349

Kratky F, Hejhalek J, Kucharova S, Opletal L (1997): Effect of 20-hydroxyecdysone on the protein synthesis in pigs. *Zivocisna Vyroba-UZPI* 42, 445–451

Kurmukov AG, Yermishina OA (1991): Effect of ecdysterone on experimental arrhythmias, changes in hemodynamics and contractility of the myocardium produced by a coronary artery occlusion. *Farmakologiya i Toksikologiya* 54, 27–29

Lafont R, Dinan L. (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3, 1–30

Lafont R, Horn D: Phytoecdysteroids: structures and occurrence; in *Ecdysone: from chemistry to mode of action*. hrsg. v. J Koolmann; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1989, 39-64

Lamparter S, Maisch B (2000): Significance of matrix metalloproteinases in cardiovascular diseases. *Z Kardiol* 89, 949–957

Libby P (1984): Long-term culture of contractile mammalian heart cells in a defined serum-free medium that limits non-muscle cell proliferation. *J Mol Cell Cardiol* 16, 803–811

Linke W, Pfitzer G: Kontraktionsmechanismen; in: Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie; 30. Aufl; hrsg v Schmidt RF, Lang F; Springer Heidelberg 2007, 112-139

Liu PY, Death AK, Handelsman DJ (2003): Androgens and Cardiovascular Disease. *Endocr Rev* 24, 313–340

London GM, Guerin AP, Pannier B, Marchais SJ, Stimpel M (1995): Influence of sex on arterial hemodynamics and blood pressure: role of body height. *Hypertension* 26, 514–519

Lüllmann-Rauch R: Kreislauforgane; in: Histologie; 2. Aufl.; hrsg. v. Lüllmann-Rauch R; Thieme Verlag Stuttgart, New York 2003, 237-259

Lupien PJ, Hinse C, Chaudhary KD (1969): Ecdysone as a hypocholesterolemic agent. *Arch Physiol Biochem* 77, 206–212

Luria MH, Johnson MW, Pego R, Seuc CA, Manubens SJ, Wieland MR, Wieland RG (1982): Relationship between sex hormones, myocardial infarction, and occlusive coronary disease. *Arch Intern Med* 142, 42–44

Maggio M, Basaria S, Ble A, Lauretani F, Bandinelli S, Ceda GP, Valenti G, Ling SM, Ferrucci L (2006): Correlation between Testosterone and the Inflammatory Marker Soluble Interleukin-6 Receptor in Older Men. *J Clin Endocrinol Metab* 91, 345–347

Mäkinen J, Jarvisalo MJ, Pöllänen P, Perheentupa A, Irjala K, Koskenvuo M, Huhtaniemi I, Raitakari OT (2005): Increased Carotid Atherosclerosis in Andropausal Middle-Aged Men. *J Am Coll Cardiol* 45, 1603–1608

Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ (1998): Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98, 256–261

Matsuda H, Kawaba T, Yamamoto Y (1970): Pharmacological studies of insect metamorphosing steroids from *Achyranthis radix*. *Folia Pharmak. Jpn* 66, 551–563

McKee PA, Castelli WP, McNamara PM, Kannel WB (1971): The natural history of congestive heart failure: the Framingham study. *N Engl J Med* 285, 1441–1446

Mironova VN, Kholodova ID, Skachkova TF, Bondar OP, Datsenko ZM (1982): Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats. *Voprosy Meditsinskoj* 28, 101–105

Mollnau H, Munkel B, Schaper J (1995): Collagen VI in the extracellular matrix of normal and failing human myocardium. *Herz* 20, 89–94

Morley JE, Perry HM (2000): Androgen deficiency in aging men: role of testosterone replacement therapy. *J Lab Clin Med* 135, 370–378

Morley JE, Perry HM, Kaiser FE, Kraenzle D, Jensen J, Houston K, Mattammal M, und Perry Jr. HM (1993): Effects of testosterone replacement therapy in old hypogonadal males: a preliminary study. *J Am Geriatr Soc* 41, 149–152

Mulisch M, Welsch U: Färbungen; in: Romeis Mikroskopische Technik; 18. Aufl.; hrsg. v. Mulisch M, Welsch U; Springer Verlag Heidelberg 2010, 181-297

Muller M, Van den Beld AW, Bots ML, Grobbee DE, Lamberts SW, Van der Schouw YT (2004): Endogenous Sex Hormones and Progression of Carotid Atherosclerosis in Elderly Men. *Circulation* 109, 2074–2079

Natoli AK, Medley TL, Ahimastos AA, Drew BG, Thearle DJ, Dilley RJ, Kingwell BA (2005): Sex steroids modulate human aortic smooth muscle cell matrix protein deposition and matrix metalloproteinase expression. *Hypertension* 46, 1129–1134

Neaves WB, Johnson L, Porter JC, Parker Jr CR, Petty CS (1984): Leydig cell numbers, daily sperm production, and serum gonadotropin levels in aging men. *J Clin Endocrinol Metab* 59, 756–763

Nieschlag E, Behre HM, Bouchard P, Corrales JJ, Jones TH, Stalla GK, Webb SM, Wu FCW (2004): Testosterone replacement therapy: current trends and future directions. *Hum Reprod Update* 10, 409–419

Nieschlag E, Swerdloff R, Behre HM, Gooren LJ, Kaufman JM, Legros JJ, Lunenfeld B (2005): Investigation, treatment and monitoring of late-onset hypogonadism in males ISA, ISSAM, and EAU recommendations. *Eur Urol* 48, 1–4



O'Carroll R, Bancroft J (1984): Testosterone therapy for low sexual interest and erectile dysfunction in men: a controlled study. *Br J Psychiatry* 145, 146–151

Ogawa S, Nishimoto N, Matsuda H: Pharmacology of ecdysones in Vertebrates; in: *Invertebrate endocrinology and hormonal heterophyly*, hrsg. V. Burdette WJ, Springer Verlag, New York 1974, 341–344

Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P (1991): Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res* 68, 1560–1568

Olivetti G, Giordano G, Corradi D, Melissari M, Lagrasta C, Gambert SR, Anversa P (1995): Gender differences and aging: effects on the human heart. *J Am Coll Cardiol* 26, 1068–1079

Oro AE, McKeown M, Evans RM (1990): Relationship between the product of the *Drosophila* ultraspiracle locus and the vertebrate retinoid X receptor. *Nature* 347, 298–301

Otaka T, Uchiyama M, Okui S, Takemoto T, Hikino H, Ogawa S, Nishimoto N (1968): Stimulatory effect of insect-metamorphosing steroids from *Achyranthes* and *Cyathula* on protein synthesis in mouse liver. *Chem Pharmaceut Bull* 16, 2426–2429

Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY (1994): The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Throm Vasc Biol* 14, 701–706

Plas E, Riedl CR, Pflüger H (2001): Männergesundheit „Andropause“. *Ärzte Woche*, 15 Jg 12, 1-4

Qiu, H, Depre C, Ghosh K, Resuello RG, Natividad FF, Rossi F, Peppas A, Shen YT, Vatner DE, Vatner SF (2007): Mechanism of gender-specific differences in aortic stiffness with aging in nonhuman primates. *Circulation* 116, 669–676

Schaible TF, Malhotra A, Ciambone G, Scheuer J (1984): The effects of gonadectomy on left ventricular function and cardiac contractile proteins in male and female rats. *Circ Res* 54, 38–49

Scheuer J, Malhotra A, Schaible TF, Capasso J (1987): Effects of gonadectomy and hormonal replacement on rat hearts. *Circ Res* 61, 12–19

Schmitz F: Herz und Herzbeutel; in: Anatomie; hrsg. v. Aumüller G, Aust G, Doll A, Engele J, Kirsch J, Mense S, Riesig D; Duale Reihe: Georg Thieme, Stuttgart 2007, 566-611

Seidlova-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010): Metabolic effects of 20-OH-Ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119, 121–126

Sequeira IM: Quantitative immunohistochemische Untersuchung der Innervation der Koronararterien der Ratte. Med. Diss. Gießen 2005

Shores MM, Matsumoto AM, Sloan KL, Kivlahan DR (2006): Low serum testosterone and mortality in male veterans. *Arch Intern Med* 166, 1660–1665

Simon P, Koolman J: Ecdysteroids in vertebrates: pharmacological aspects; in: Ecdysone—from chemistry to mode of action, hrsg. v. J Koolman; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1989, 254-259

Sláma K, Lafont R (1995): Insect hormones-ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* 92, 355–355

Snyder PJ, Peachey H, Hannoush P, Berlin J, Loh L, Holmes J, Dlewati A (1999): Effect of Testosterone Treatment on Bone Mineral Density in Men Over 65 Years of Age. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1966 –1972

Sonesson B, Hansen F, Stale H, Lanne T (1993): Compliance and diameter in the human abdominal aorta: the influence of age and sex. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 7, 690–697

Stellato RK, Feldman HA, Hamdy O, Horton ES, McKinlay JB (2000): Testosterone, sex hormone-binding globulin, and the development of type 2 diabetes in middle-aged men: prospective results from the Massachusetts male aging study. *Diabetes Care* 23, 490–494

Stopka P, Stancl J, Sláma K (1999): Effect of insect hormone, 20-hydroxyecdysone on growth and reproduction in mice. *Acta Soc Zoo Bohem* 63, 367–378

Stürmer EK, Seidlova-Wuttke D, Sehmisch S, Rack T, Wille J, Frosch KH, Wuttke W, Stürmer KM (2006): Standardized bending and breaking test for the normal and osteoporotic metaphyseal tibias of the rat: effect of estradiol, testosterone and raloxifene. *J Bone Miner Res* 21(1), 89-96

Suckow MA, Weisbroth S, Franklin GL: The laboratory rat: The Handbook of Experimental Animals; Academic Press, San Diego; San Francisco; New York; Boston; London; Sydney; Tokyo: 2000

Syrov VN, Aizikov MI, Kurmukov AG (1975): Effect of ecdysterone on the content of protein, glycogen, and fat in white rat liver, heart and muscle. Doklady Akademii Nauk Uzbekoy SSR 8, 37–38

Syrov VN, Khushbaktova ZA, Abzalova MK, Sultanov MB (1983): On the hypolipidemic and antiatherosclerotic action of phytoecdysteroids. Doklady Akademii Nauk Uzbekoy SSR 9, 44–45

Syrov VN, Khushbaktova ZA, Nabiev AN (1992): An experimental study of the hepatoprotective properties of phytoecdysteroids and nerobol in carbon tetrachloride-induced liver lesion. Eksperimental'naya i Klinicheskaya Farmakologiya 55, 61–65

Syrov VN, Kurmukov AG (1976): Anabolic activity of phytoecdysone-ecdysterone isolated from *Rhaponticum carthamoides* (Willd.) Iljin]. Farmakologiya i toksikologiya 39, 690–693

Syrov VN (1984): Mechanism of the anabolic action of phytoecdysteroids in mammals. Biol. Nauki (Moscow) 11, 16–20

Syrov VN, Nabiev AN, Sultanov MB (1986): The effect of phytoecdysteroids on the bile secretion function of the liver in normal rats and in animals with experimental hepatitis. Farmakologiya i Toksikologiya 49, 100–103

Takahashi H, Nishimoto K (1992): Antidiabetic agents containing ecdysterone or inokosterone“. Jpn Kokai Tokkyo Koho JP 4, 124–135

Tenover JS (1992): Effects of testosterone supplementation in the aging male. J Clin Endocrinol Metab 75, 1092–1098

Thum T, Borlak J (2002): Testosterone, cytochrome P450, and cardiac hypertrophy. FASEB J 16, 1537–1549

Todorov IN, Mitrokhin YI, Efremova OI, Sidorenko LI (2000): The effect of ecdysterone on the biosynthesis of proteins and nucleic acids in mice. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 34, 455–458

Tóth N: Ecdysteroid profile of *Silene viridiflora* and the effect of 20-hydroxyecdysone on rat muscle fibres in vivo. *Med. Diss. Szeged* 2010

Traish AM, Saad F, Feeley RJ, Guay A (2009): The Dark Side of Testosterone Deficiency: III. Cardiovascular Disease. *J Androl* 30, 477–494

Tucci PJF (2011): Pathophysiological Characteristics of the Post-Myocardial Infarction Heart Failure Model in Rats. *Arq Bras Cardiol* 96(5), 420-424

Uchiyama M, Yoshida T: Effect of ecdysterone on carbohydrate and lipid metabolism; in: *Invertebrate endocrinology and hormonal heterophyly*; hrsg. v. Burdette WJ; Springer Berlin 1974, 401-416

Van Aken HK: Therapeutische Grundprinzipien der Intensivmedizin und Grundlagen der Beatmungstherapie, in *Intensivmedizin*; 2. Aufl. hrsg. Van Aken HK, Reinhart K, Zimpfer M, Welte T; Georg Thieme Verlag Stuttgart 2007, 502

Van den Beld A, de Jong F, Grobbee D, Pols H, Lamberts S (2000): Measures of Bioavailable Serum Testosterone and Estradiol and Their Relationships with Muscle Strength, Bone Density, and Body Composition in Elderly Men. *J clin endocrinol metab* 85, 3276–3282

Vanderschueren D, Van Herck E, Schot P, Rush E, Einhorn T, Geusens P, Bouillon R (1993): The aged male rat as a model for human osteoporosis: evaluation by nondestructive measurements and biomechanical testing. *Calcified tissue international* 53, 342–347

Weber KT, Janicki JS, Shroff SG, Pick R, Chen RM, Bashey RI (1988): Collagen remodeling of the pressure-overloaded, hypertrophied nonhuman primate myocardium. *Circ Res* 62, 757–765

Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JPM (1994): Collagen network of the myocardium: function, structural remodeling and regulatory mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 26, 279–292

Van Weerden W, Bierings HG, Van Steenbrugge GJ, De Jong FH, Schroder FH (1992): Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50, 857–861

Wei JY (1992): Age and the cardiovascular system. *N Engl J Med* 327, 1735-1739

Welsch U: Gewebe; in: *Lehrbuch Histologie*; hrsg. v. Sobotta J, Welsch J, 2. Aufl.; Elsevier Urban & Fischer, München, Jena 2006, 85–205

Wink CS, Felts WJ (1980): Effects of castration on the bone structure of male rats: a model of osteoporosis. *Calcified Tissue International* 32, 77–82

Wu X (2001): Use of ecdysteroids in preparing medicine for angiocardiopathy. Application CN 2000-12119/200000731, *Chemical Abstracts* 135: 147422

Yao TP, Forman BM, Jiang Z, Cherbas L, Chen JD, McKeown M, Cherbas P, Evans RM (1993): Functional ecdysone receptor is the product of EcR and Ultraspiracle genes. *Nature* 366, 476–479

Yoshida T, Otaka T, Uchiyama M, Ogawa S (1971): Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem Pharmacol* 20, 3263–3268

Zgliczynski S, Ossowski M, Slowinska-Srzednicka J, Brzezinska A, Zgliczynski W, Soszynski P, Chotkowska E, Srzednicki M, Sadowski Z (1996): Effect of testosterone replacement therapy on lipids and lipoproteins in hypogonadal and elderly men. *Atherosclerosis* 121, 35–43

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Organisation elastischer Lamellen und Kollagenfibrillenbündel (rot dargestellt) in der Adventitia .....	13
Abb. 2: Strukturformel von 20-Hydroxyecdysol.....	20
Abb. 3: Schematische Darstellung der Gewinnung des histologischen Probenmaterials und der Organschnitte.....	30
Abb. 4: Beispiel für die Darstellung querangeschnittener Kardiomyozyten mit zentralständigem Kern und dem Messprinzip ihrer Flächen .....	30
Abb. 5: Schematische Darstellung der Einteilung der histologischen Präparate in Quadranten .....	31
Abb.6: Beispiel für die Darstellung von myokardialem Kollagen durch die Elastika-van-Gieson-Färbung und dem Messprinzip durch Markierung der Kollagenflächen .....	32
Abb. 7: Beispiel für den Querschnitt einer myokardialen Arterie und für das Messprinzip des Kollagen-Elastinanteils .....	34
Abb. 8: Der Effekt von Ecd auf den Verlauf des Körpergewichts der jeweiligen Behandlungsgruppen während der dreimonatigen Versuchsdurchführung .....	35
Abb. 9: Der Effekt von Ecd auf die durchschnittlichen Körpergewichte [g] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf .....	36
Abb. 10: Der Effekt von Ecd auf den Verlauf der Futteraufnahme der jeweiligen Behandlungsgruppen während der dreimonatigen Versuchsdurchführung .....	37
Abb. 11: Der Effekt von Ecd auf die durchschnittliche Futteraufnahme [g/Tier/d] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf .....	38
Abb. 12: Der Effekt von Ecd auf das Herzgewicht [g] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe (KO, orx, sf) .....	39

---

Abb. 13: Der Effekt von Ecd auf den prozentualen Anteil des Herzgewichts am Gesamtkörpergewicht der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf.....	40
Abb. 14: Der Effekt von Ecd auf die Kardiomyozytenfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf .....	41
Abb. 15: Der Effekt von Ecd auf die Anzahl der kardialer Myozyten pro Gesichtsfeld ( $22134,58\mu\text{m}^2$ ) der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf.....	43
Abb. 16: Der Effekt von Ecd auf das Verhältnis Kardiomyozytenfläche [ $\mu\text{m}^2$ ] zu dem Herzgewicht [g] der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf.....	42
Abb. 17: Der Effekt von Ecd auf den prozentualen Kollagenanteil im Myokard des linken Ventrikels der jeweiligen Behandlungsgruppen nach Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf .....	44
Abb. 18: Der Effekt von Ecd auf den prozentualen Kollagen-Elastinanteil in der Wand einer Koronararterie im linken Ventrikel der jeweiligen Behandlungsgruppen nach dreimonatiger Versuchsdurchführung im Vergleich zur Kontrollgruppe orx, sf.....	45

## 9 Tabellenverzeichnis

Tbl. 1: Gruppeneinteilung .....	26
Tbl. 2: Tägliche Aufnahme der Testsubstanz.....	38
Tbl. 3: Die relativen Veränderungen (%) der unterschiedlichen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe .....	46
Tbl. 4: Futtertabelle (ssniff R/Z, phytoöstrogenarm (sojafrei)) .....	60
Tbl. 5: Entwässerung und Fixierung zu Paraffinblöcken .....	61
Tbl. 6: HE-Färbung.....	61
Tbl. 7: Elastika van Gieson-Färbung.....	62



## Danksagung:

Für die Möglichkeit der wissenschaftlichen Arbeit in der Arbeitsgruppe für Endokrinologie möchte ich mich sehr herzlich bei Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke und Frau Privatdozentin Dr. med. D. Seidlová-Wuttke bedanken. Mein besonderer Dank gilt meinem Patenonkel Dr. Peter Ruschke für die stetige Begleitung und Unterstützung. Ebenso möchte ich den medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung Dank aussprechen, die mir bei der praktischen Durchführung der Experimente und deren Auswertung behilflich waren.

## Lebenslauf:

Am 23. 08.1986 wurde ich, Julia Eismann, als erstes von drei Kindern von Dr. Peter Eismann (Internist) und Maria-Elisabeth Eismann (Medizinisch-technische Assistentin) in Hamm in Westfalen geboren.

Zwischen 1993 und 1997 besuchte ich die Grundschule Unterharmersbach und wechselte im Sommer 1997 auf das Gymnasium „Klosterschulen Unserer Lieben Frau“ in Offenburg. Von Februar bis Mai 2004 besuchte ich im Rahmen eines Schüleraustausches die Connally High School in Austin, Texas. 2006 schloss ich meine schulische Ausbildung mit dem Abitur ab.

Zwischen dem Abitur und dem Beginn des Medizinstudiums arbeitete ich auf Sri Lanka in sozialen Einrichtungen und absolvierte mein dreimonatiges Krankenpflegepraktikum im Klinikum Offenburg.

Im April 2007 begann ich mein Medizinstudium an der Georg-August-Universität Göttingen und bestand im September 2009 den ersten Abschnitt der ärztlichen Prüfung.

Im August 2010 nahm ich meine Doktorandentätigkeit in der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen auf. Mein Medizinstudium habe ich im November 2013 erfolgreich abgeschlossen.