

Aus dem Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin
Der Deutschen Sporthochschule Köln
Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin
Geschäftsführender Leiter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

**Der Einfluss von Testosteron und den
Designersteroiden Tetrahydrogestrinon und Norbolethon
auf die Gefäßentwicklung und kardiale Differenzierung am
Modell embryonaler Stammzellen der Maus**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Nadja Welker
aus Heidelberg

Promoviert am: 25. März 2009

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Bloch

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. W. Krone

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistungen von folgenden Personen erhalten:

Dr. Annette Schmidt

und

Prof. Dr. W. Bloch

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, den 21.10.2008

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden an der Deutschen Sporthochschule Köln im Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Abteilung für Molekulare und Zelluläre Sportmedizin, nach entsprechender Anleitung durch Frau Dr. Schmidt von mir selbst ausgeführt.

Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Wilhelm Bloch, der mir das Thema für meine Doktorarbeit zur Verfügung gestellt hat und der mir das Durchführen der Experimente an seinem Institut ermöglichte.

Ganz besonders danken möchte ich auch der Betreuerin meiner Arbeit Frau Dr. Annette Schmidt, die mich in allen Belangen meiner Doktorarbeit hervorragend unterstützte. Sie war jederzeit offen für Fragen aller Art und nahm sich stets Zeit, mir Antworten zu geben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau Anika Voss, die mich mit viel Engagement in die Technik der Zellkultur einwies und mit der mir stets eine nette Ansprechpartnerin zur Verfügung stand.

Ferner gilt mein Dank auch Prof. Dr. Mario Thevis und Dr. Hans Geyer aus dem Institut für Biochemie der Deutschen Sporthochschule Köln dafür, dass sie mir die Designersteroid Tetrahydrogestrinon und Norbolethon sowie das Steroid Testosteron zur Verfügung stellten.

Zu guter Letzt möchte ich mich noch bei meiner Familie und bei meinem Freund bedanken, die mich während des gesamten Studiums unterstützt haben.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	I
1. Einleitung	1
1.1. Entwicklung von Blutgefäßen	1
1.1.1. Vaskulogenese	2
1.1.2. Angiogenese	3
1.1.3. Molekulare Determinanten der Angiogenese	5
1.2. Apoptose	7
1.3. Kardiale Differenzierung	9
1.3.1 Grundlegendes	9
1.3.2 Gesamtverlauf der Kardiogenese – ein Überblick	9
1.4. Embryonale Stammzellen	12
1.5. Doping	14
1.5.1. Überblick über die Geschichte des Dopings	14
1.5.2. Anabole Steroide im Sport	15
1.5.3. Untersuchte Steroide	18
1.5.3.1 Tetrahydrogestrinon (THG)	18
1.5.3.2 Norbolethon	20
1.5.3.3 Testosteron	22
1.6. Fragestellung	24
2. Material und Methoden	27
2.1. Material	27
2.1.1. Zellkulturmedien und Zusätze	27
2.1.2. Immunhistochemie	28
2.1.3. Verwendete Antikörper	28
2.1.4. Geräte	29
2.2. Methoden	30
2.2.1. Zellkultur	30
2.2.2. Stammzellhaltung und Herkunft der D3-Zelllinie	30

2.2.3. Ansatz der Embryoid Bodies	31
2.2.4. Behandlung der Zellen mit Steroiden	35
2.2.5. Feederzellen	35
2.2.6. Immunhistochemie	37
2.2.7. Mikroskopische Beurteilung	38
3. Ergebnisse	44
3.1. Vaskularisation	45
3.1.1. Anzahl der Gefäßanlagen	45
3.1.2. Qualität der Gefäßanlagen	47
3.2. Proliferation und Apoptose	52
3.2.2. Proliferation	52
3.2.3. Apoptose	55
3.3. Kardiomyozytogenese	58
4. Diskussion	66
4.1. Zusammenfassung	66
4.2. Einfluss von AAS auf Vaskularisation, Proliferation und Apoptose von Endothelzellen	67
4.3. Einfluss von AAS auf die Kardiomyozytogenese	73
4.4. Ausblick	74
5. Ausblick	79
6. Zusammenfassung	82
7. Literaturverzeichnis	84
8. Vorabveröffentlichungen	101
9. Lebenslauf	102

Abkürzungsverzeichnis

AAS	Anabole androgene Steroidhormone
AR	Androgen-Rezeptor
BALCO	Bay Area Laboratory Cooperative
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Cluster of differentiation
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EB	Embryoid Body
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ES	Embryonale Stammzellen
FCS	Fetales Kälberserum
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GR	Glucokortikoid-Rezeptor
IOC	Internationales olympisches Komitee
LH	Luteinisierendes Hormon
LIF	Leucemia inhibitory factor
MEM	Minimal essential medium
MR	Mineralokortikoid-Rezeptor
MS	Massenspektrometrie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
P.C.	Post conceptionem
PDGF	Platelet derived growth factor
PFA	Paraformaldehyd
PR	Progesteron-Rezeptor
TAT	Tyrosin-Aminotransferase-Gen
THG	Tetrahydrogestrinon
UCLA	University of California, Los Angeles
USADA	US-Anti-Doping-Agency
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WADA	World-Anti-Doping-Agentur

1. Einleitung

1.1. Entwicklung von Blutgefäßen

Vitales Gewebe ist in seinem Metabolismus von der Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen sowie dem Abtransport von Metaboliten abhängig. Da Sauerstoff jedoch nur geringe Diffusionsstrecken in Geweben aufweist, befinden sich fast alle Zellen des Körpers, mit Ausnahme sehr bradytrophen Gewebes wie z. B. Knorpel, in maximaler Entfernung von 100 µm bis 150 µm zum nächsten Blutgefäß (Augustin, 2003).

Das Herzkreislaufsystem ist das erste funktionelle Organsystem, das während der Embryonalentwicklung angelegt wird. So wird während der Ontogenese ein primitives Gefäßnetz bereits angelegt, wenn der Embryo selbst noch per Diffusion ernährt wird (Flamme et al., 1997). Erkenntnisse über die embryonale Gefäßentwicklung haben entscheidend zum Verständnis der physiologischen und pathologischen Angiogenese beim Erwachsenen beigetragen. So wurde die Entwicklung der Blutgefäße in den letzten 30 Jahren sehr intensiv beforscht. Dies ging vor allem von der Onkologie aus, da Tumorwachstum sehr stark von der Angiogenese beeinflusst wird. Somit hat dieses Thema in den letzten zehn Jahren große Bedeutung erlangt, was sich in der immens gestiegenen Zahl der wissenschaftlichen Veröffentlichungen widerspiegelt. Inzwischen sind die meisten grundlegenden Mechanismen der Blutgefäßbildung bekannt, dies ist jedoch ein Feld, in dem es auch in Zukunft noch viel zu forschen geben wird.

Die klassischen Mechanismen, die an der Bildung von Blutgefäßen beteiligt sind, sind Vaskulo- und Angiogenese.

Bei der Vaskulogenese handelt es sich um die Bildung eines primären Gefäßnetzwerkes in der Frühphase der Embryonalentwicklung durch Differenzierung und Formierung von Angioblasten (Risau und Flamme, 1995).

Angiogenese beschreibt die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden Gefäßen. Hierbei wird zwischen sprossender und nichtsprossender Angiogenese unterschieden. Sprossung ist ein Vorgang, der bei normalem Wachstum sowie bei protektiven Prozessen wie Wundheilung und Inflammation von großer Bedeutung ist. Hierbei werden unter Abbau der Basalmembran neue Blutgefäße gebildet.

Die zweite Form der Angiogenese stellt die Intussuszeption (nichtsprossende Angiogenese) dar. Bei intussuszeptivem Gefäßwachstum entstehen Gefäßnetze durch

Längsspaltung bereits bestehender Gefäße. Im Gegensatz zur aussprossenden Angiogenese bleibt hier die Basalmembran erhalten (Augustin, 2001). Pathologische Auswirkungen der Angiogenese werden v. a. in der Onkologie bei Tumorwachstum und Tumormetastasierung beobachtet.

Bisher galten die Mechanismen der Vaskulo- und Angiogenese als auf die Embryonalentwicklung beschränkt (Risau, 1997). Ausnahmen bezogen sich lediglich auf den weiblichen Reproduktionstrakt, auf pathologische Prozesse, wie z. B. Tumorangiogenese, diabetische Retinopathie, inflammatorische Prozesse sowie auf die Wundheilung (Risau, 1997). Die bisherige Denkweise wurde jedoch durch neuere Arbeiten revolutioniert, die zeigten, dass beide Mechanismen der Gefäßbildung im adulten Organismus auftreten und dies nicht nur auf die Angiogenese begrenzt ist (Asahara et al., 1997; Asahara et al., 1999; Lin et al., 2000; Luttun et al., 2002; Ribatti et al., 2001; Shi et al., 1998). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Angiogenese beim Erwachsenen als Anpassungsreaktion auf veränderte Versorgungsbedürfnisse des Gewebes auftritt. Beispielhaft hierfür ist die Angiogenese als Reaktion auf Anämie (Metivier et al., 2000) und bei Muskeltraining (Hudlicka et al., 1992).

1.1.1. Vaskulogenese

Vaskulogenese, die Bildung von Blutgefäßen durch in-situ-Differenzierung von Endothelzellen aus deren angioblastischen Vorläuferzellen (Risau, 1995), ist einer der grundlegenden Prozesse, die zur Entwicklung einer ersten Gefäßstruktur im Embryo führen.

Zu Beginn des 20. Jahrhunderts konnte bereits gezeigt werden, dass aus Embryonen gewonnene und isolierte Zellen zur Bildung eines Blutgefäßnetzwerkes befähigt waren. Die Vorläuferzelle, aus der sich die Endothelzellen differenzierten, wurde als Angioblast bezeichnet (His, 1900). Einen gemeinsamen Vorläufer von hämatopoetischen Zellen und Endothelzellen nannte man Hämangioblast. Dessen Existenz konnte jedoch erst etwa 100 Jahre später experimentell bestätigt werden (Choi, 1998).

Heute weiß man, dass die Angioblasten sich durch Differenzierung aus dem Mesoderm des Dottersacks entwickeln. Die Formierung primitiver Blutgefäße aus Angioblasten sowie die Differenzierung der Angioblasten aus dem Mesoderm müssen jedoch als

unterschiedliche Schritte während der embryonalen Gefäßbildung angesehen werden (Risau und Flamme, 1995).

Zum Zeitpunkt der Gastrulation wandern Zellen vom pluripotenten, intraembryonal lokalisierten Epiblasten zum lateralen extraembryonalen Mesoderm ab. In der Phase des Ein-Somitenstadiums, nachdem die Zellen das laterale Mesoderm erreicht haben, formieren sie sich zu Zellaggregaten aus epitheloiden Zellen, welche als Blutinseln bezeichnet werden. Während die äußeren Zellen dieser Cluster abflachen und sich zu Vorläuferzellen der Endothelzellen, den Angioblasten, differenzieren, runden die inneren Zellen ab und werden zu hämatopoetischen Zellen, den Vorläufern der Blutzellen (Gonzalez-Crussi, 1971; Risau und Flamme, 1995; Wilting und Christ, 1996). Im weiteren Prozess der Ontogenese verschmelzen die benachbarten Blutinseln miteinander und verzweigen sich zum primären Gefäßgeflecht des Dottersacks (Rüsse und Sinowatz, 1998). Bei der Organisation der endothelialen Vorläuferzellen zu einem primitiven vaskulären Gefäßgeflecht spricht man auch von einer de-novo-Formierung (Flamme et al., 1997). Durch Vaskulogenese entstehen zunächst die extraembryonale Dottersackzirkulation, das primitive Herz sowie das primäre Gefäßgeflecht innerhalb des Embryos. Außerdem werden alle Organe, die sich aus Mesoderm und Endoderm entwickeln, wie z. B. Lunge, Leber, Milz und Myokard, primär durch Vaskulogenese versorgt (deMello et al., 1997; Robert et al., 1998; Gebb und Shannon, 2000; Lammert et al., 2001; Matsumoto et al., 2001; Vokes und Krieg, 2002; Patan, 2004).

1.1.2. Angiogenese

Der Begriff Angiogenese beschreibt das Entstehen neuer Kapillaren aus bereits bestehenden Blutgefäßen durch Expansion und Verzweigung (Carmeliet, 2000; Patan, 2000). Sie ist bei der Gefäßneubildung bereits bestehender Gefäße im adulten Organismus der dominierende Mechanismus (Folkman und Shing, 1992). Es wird zwischen der sprossenden und der intussuszeptiven, nichtsprossenden Angiogenese unterschieden (Kalka et al., 2000).

Die aussprossende Angiogenese ist ein hochkomplizierter Vorgang, der sich schrittweise vollzieht. Sie ist bis heute nicht vollständig entschlüsselt. Es handelt sich um einen invasiven Prozess, der die konzentrierte Aktivität vieler Moleküle wie Wachstumsfaktoren, proteolytische Enzyme, Proteine der Extrazellulärmatrix und Adhäsionsrezeptoren erforderlich macht (Ingber und Folkman, 1989; Blood und Zetter,

1990). Die physiologische Kontrolle dieses Vorgangs ist außerdem vom adäquaten zeitlichen und räumlichen Zusammenspiel von Aktivatoren und Inhibitoren der Angiogenese sowie von der mikrovaskulären Umgebung abhängig (Auerbach und Auerbach, 1994; Hanahan und Folkman, 1996). Es kommt zuerst zum Abbau der Basalmembran und der angrenzenden interstitiellen Matrix der Endothelzellen (Folkman, 1984). Im Folgenden kommt es zur Migration und Proliferation der Endothelzellen und somit zur Verlängerung des soliden, endothelialen Stranges (Furcht, 1986). Schließlich wird ein Lumen gebildet, und es kommt zur funktionellen Reifung des Endothels (Risau, 1997). Im Embryo ist die sprossende Angiogenese der charakteristische Vaskularisationsprozess für Organe, die nicht primär durch Angioblasten besiedelt werden. Typisch hierfür sind Gehirn und Rückenmark (Baldwin, 1996; Kurz et al., 2001). Des Weiteren beinhaltet die Angiogenese auch den Vorgang der Intussuszeption. Sie wurde ursprünglich für die embryonale Entwicklung der Lunge beschrieben (Burri und Djonov, 2002). Heute weiß man allerdings, dass Intussuszeption bei einer Vielzahl von Geweben eine Rolle spielt. Am wichtigsten scheint sie für die Entwicklung der Lunge (Djonov et al., 2000) sowie bei zyklusbedingten Veränderungen der Gefäßversorgung des Endometriums beim Erwachsenen zu sein (Rogers und Gargett, 1998). Des Weiteren wurde beschrieben, dass das intussuszeptive Wachstum auch beim trainierten Muskel einen wichtigen Mechanismus des Gefäßwachstums darstellt (Egginton et al., 2001; Prior et al., 2004). Es handelt sich hierbei um eine sogenannte „unorthodoxe Angiogenese“ (Egginton et al., 2001). Während bei der aussprossenden Angiogenese die Basalmembran teilweise aufgelöst wird, bleibt sie bei der Intussuszeption vollständig erhalten (Augustin, 2001). Es kommt zur Längsspaltung bereits bestehender Gefäße durch die Insertion von mehreren transkapillären Endothelzell-Pfeilern (Bartel und Lametschwandtner, 2000; Djonov et al., 2000; Patan, 2000; Patan, 2004; Burri et al., 2004). Beide Mechanismen, sprossende und nichtsprossende Angiogenese, können gleichermaßen vorkommen (Risau, 1997). In manchen Regionen vollziehen sich auch Angiogenese und Vaskulogenese parallel. So wurde dies für die Entwicklung der Lunge und der Niere beschrieben (Baldwin, 1996; deMello und Reid, 2000; Sequeira Lopez et al., 2001).

1.1.3. Molekulare Determinanten der Angiogenese

Die meisten Zellen des adulten Organismus stellen determinierte Zellen mit verschiedenen phänotypischen Merkmalen dar, während unterschiedlich differenzierte Stamm- oder Vorläuferzellen in den verschiedenen Geweben ruhen. Diese Vorläuferzellen können unter Stimulation durch bestimmte umgebungsbedingte Faktoren oder bei pathologischen Prozessen mobilisiert werden. Durch intensive Forschung auf diesem Gebiet wurden im letzten Jahrzehnt in verschiedenen Organen und Geweben vorkommende Stamm- und Progenitorzellen identifiziert, wie z. B. im Knochenmark, im peripheren Blut, im Gehirn, in der Leber, in reproduktiven Organen sowie in Tumoren (Asahara et al., 1999a; Asahara et al., 2000; Carmeliet und Luttun, 2001; Asahara und Kawamoto, 2004).

Der Begriff endotheliale Progenitorzelle wird derzeit kontrovers diskutiert. Die alte Definition beschrieb eine Gruppe von Zellen, die sowohl den Hämangioblasten als auch die ausdifferenzierte Endothelzelle beinhaltet, und deren Zellen in verschiedenen Stadien existieren.

Dem stehen neuere Definitionen gegenüber, sodass dieser Begriff durchaus kritisch gebraucht werden muss.

So beschreiben Wahl et al. endotheliale Progenitorzellen ihrer Herkunft nach als aus dem Knochenmark abstammende Vorläuferzellen, die, wenn erforderlich, in den peripheren Blutkreislauf ausgeschwemmt werden (Wahl et al., 2007).

Kovacic und seine Mitarbeiter beschreiben die endotheliale Progenitorzelle hingegen ihrer Funktion nach als eine auf eine bestimmte Zelllinie beschränkte Vorläuferzelle, die zu endothelialer Nachkommenschaft führt und zur Kapillognese und zur Reparatur von präexistierendem Endothel befähigt ist (Kovacic et al., 2008).

Die ersten Marker, die sowohl von hämatopoetischen als auch von endothelialen Vorläuferzellen exprimiert werden, sind CD31 (auch PECAM-1 genannt), CD34 und der Tyrosin-Kinase-Rezeptor Typ 2 (VEGF-R2 oder KDR/Flk-1) des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF) (Yamaguchi et al., 1993). CD ist hierbei die Abkürzung für den Begriff Cluster of Differentiation und beschreibt Gruppen immunophänotypischer Oberflächenmerkmale von Zellen, die sich nach biochemischen oder funktionellen Kriterien ordnen lassen. Die CD-Moleküle sind meistens

membrangebundene Glycoproteine, die zellspezifisch exprimiert werden und verschiedenste Funktionen ausüben können (Erber, 1990; Sopp und Howard, 1997).

Eine Unterscheidung zwischen hämatopoetischen Stammzellen und endothelialen Progenitorzellen ist möglich, da sich die endotheliale Determination der Stammzellen in weiteren Entwicklungsstadien durch die Expression endothelspezifischer Oberflächenantigene auszeichnet. Zu diesen Oberflächenantigenen gehören der von-Willebrandt-Faktor (vWF), das platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) und Vascular Endothelial Cadherin (VE-Cadherin). Desweiteren zeigen Stammzellen mit endothelialer Determination die Fähigkeit zur Aufnahme von acetyliertem Low-Density Lipoprotein (acLDL), zur Bindung von bestimmten Lektinen und zur Ausbildung endothelzelltypischer morphologischer Merkmale (tubuläre Strukturen) (Kalka et al., 2000). Die Trennung zwischen endothelialen Vorläuferzellen und ausdifferenzierten Endothelzellen ist hingegen schwierig, da hier kein spezifisches Epitop bekannt ist (Kalka et al., 2000; Rafii, 2000). So findet man die Antigene CD34, flk-1, CD117 sowie Tie-2 sowohl in embryonalen Blutinseln, auf embryonalen Endothelzellen als auch auf aktivierten Endothelzellen mikrovaskulärer Gefäße im adulten Organismus (Krause et al., 1996; Choi et al., 1998; Ziegler et al., 1999).

Bei dem Stammzellmarker CD133 (AC133, Prominin) handelt es sich um ein transmembranäres Glykoprotein mit noch unbekannter Funktion, mit dessen Entdeckung erstmals die Differenzierung endothelialer Progenitorzellen zu ausgereiften Endothelzellen nachgewiesen werden konnte (Miraglia et al., 1997; Yin et al., 1997; Gehling et al., 2000). Da CD133-positive Zellen sowohl als Vorläuferzellen für Blut- als auch für Endothelzellen dienen, schien der Beweis erbracht, dass es sich bei diesen Zellen um adulte Hämangioblasten handelt (Bailey und Fleming, 2003; Asahara und Kawamoto, 2004; Schatteman und Awad, 2004; Yoder, 2004).

Als wichtigster angiogener Wachstumsfaktor hat der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF in den letzten Jahren großes Interesse erfahren. Er ist der entscheidende Stimulator für Gefäßneubildung, da er für die Einleitung von Vaskulogenese oder angiogenem Sprossen während der Entwicklung sowie im adulten Organismus notwendig ist. VEGF ist ein Glycoprotein mit einer Molekülgröße von etwa 46 kDa. Er wird als Homodimer sezerniert und weist strukturelle Verwandtschaft zu PDGF (Platelet derived growth factor) auf (Conn et al., 1990). VEGF existiert in verschiedenen Homologen, VEGF-A bis-E, die von verschiedenen Genen des menschlichen Genoms kodiert werden. Das Entfernen bereits eines VEGF-Allels zeigt

gleiche Auswirkungen wie das Ausschalten seines Rezeptors VEGFR-2, was sich durch fast komplettes Fehlen von Blutgefäßen in Mäusen äußert (Carmeliet et al., 1996). Somit ist der Verlust nur eines VEGF-Allels nicht mit dem Leben vereinbar und führt zu frühembryonaler Letalität. Bei dem vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor handelt es sich um einen extrazellulären Mediator, der an hochaffine membrangebundene Rezeptoren mit Tyrosinkinase-Aktivität bindet (Jakeman et al., 1992; Thieme et al., 1995). Es sind bisher vier VEGF-Rezeptoren bekannt, VEGFR-1 (flt-1), VEGFR-2 (flk-1/KDR), VEGFR-3 (flt-4), sowie Neuropilin 1 (NRP-1). Die Rezeptoren VEGFR-1 und -2 sind fast ausschließlich auf Blutgefäßendothelzellen zu finden, während VEGFR-3 eine große Rolle bei der Lymphangiogenese spielt. VEGF wirkt allerdings nicht nur auf die Proliferation von Endothelzellen. So wirkt er auch nach Bindung an VEGFR-2 hemmend auf die Apoptose, aktiviert Migration oder beeinflusst die Transkription anderer Proteine, die an Gefäßwachstum beteiligt sind, wie z. B. VEGFR-1, Matrixmetalloproteasen (MMP) sowie der endothelspezifischen NO-Synthetase (eNOS).

VEGF wirkt zudem über die Reorganisation von Adhäsionsmolekülen wie VE-Cadherin als ein die Gefäßpermeabilität steigernder Faktor, weshalb er auch als vascular permeability factor (VPF) bezeichnet wird (Collins et al., 1993).

VEGF muß jedoch trotz seiner großen Bedeutung für die Abläufe bei der Angiogenese zusammen mit anderen Faktoren wirken, um die Ausbildung eines funktionsfähigen und ausgereiften Gefäßbettes zu ermöglichen (Augustin, 2003).

1.2. Apoptose

Apoptose (der programmierte Zelltod) gilt als physiologische, natürliche Form des Zelltodes mit charakteristischen morphologischen und biochemischen Merkmalen. Im Gegensatz zur Nekrose versteht man unter Apoptose einen aktiven, biochemisch regulierten Prozess, welcher keinen Zelltod von Nachbarzellen und keine Entzündungsreaktionen auslöst (Stefanec, 2000). Sie ist ein biologisches Schlüsselphänomen, das z. B. für die normale Embryonalentwicklung und für Immunfunktionen sowie für die Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase in multizellulären Organismen entscheidend ist (Wyllie, 1997; Dibbert und Simon, 1997). Verschiedene Stimuli aktivieren über eine Vielzahl von Rezeptoren und

Signaltransduktionswegen eine Kaskade von Proteasen (Caspasen), welche das Programm der zellulären Selbstzerstörung einleiten (Stefanec, 2000). Durch Freisetzung von Caspase-Aktivatoren (z. B. Cytochrom C), Veränderungen im Elektronentransport, Verlust des mitochondrialen Membranpotentials, Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran sowie durch veränderte zelluläre Redox-Reaktionen spielen Mitochondrien bei der Apoptose eine Schlüsselrolle (Green und Reed, 1998; Green 2006). Eine Fehlregulierung der Apoptose kann sowohl zu Tumoren und Autoimmunerkrankungen als auch zu Gewebeerkrankungen führen (Dibbert und Simon, 1997; Nagata et al., 2003). So sind z. B. AIDS, neurodegenerative Erkrankungen, myelodysplastische Syndrome und andere hämatopoetische Erkrankungen durch eine gesteigerte Apoptoserate bestimmter Zellpopulationen charakterisiert (Dibbert und Simon, 1997). Hingegen kann eine verminderte Apoptoserate zu einer Anhäufung von abnormalen Zellen führen, wodurch es zu Krebs- und Autoimmunerkrankungen kommen kann (Nagata et al., 2003). Während der Apoptose laufen koordinierte Vorgänge im Zellkern, im Zytoplasma sowie an der Zelloberfläche ab: Nachdem die Zellen ein Todessignal erhalten haben, verlieren sie zunächst den Kontakt zu ihren Nachbarzellen und runden sich ab. Im weiteren Verlauf schrumpft die Zelle und im Zellkern kommt es zur Kondensation des Chromatins in der Nähe der inneren Kernmembran (Kernwandhyperchromatose). Es kommt zur Bläschenbildung an der Zelloberfläche, und etwa zur gleichen Zeit zerfällt der Zellkern in mehrere Membrangebundene Fragmente. Nun zerfällt auch die Zelle selbst in mehrere membranumschlossene, organellenreiche Teile, die so genannten apoptotischen Körperchen, von denen manche noch Kernbestandteile enthalten. Diese apoptotischen Körperchen werden daraufhin unmittelbar von Nachbarzellen oder Makrophagen phagozytiert, ohne jedoch dabei, im Gegensatz zur Nekrose, eine Entzündungsreaktion zu verursachen (Bellamy et al., 1995; Duke et al., 1996).

In einem gesunden Organismus ist eine Balance zwischen Zellproliferation und Apoptose unentbehrlich. Bei einer Störung dieses fein regulierten Systems können sich schwerwiegende Folgen für den Gesamtorganismus ergeben (Dimmeler und Zeiher, 2000).

Pro-angiogene Faktoren wie beispielsweise der Vaskular Endothelial Growth Faktor (VEGF) und der Fibroblast Growth Faktor (FGF) verhindern eine endotheliale Apoptose (Araki et al., 1990; Gerber et al., 1998). Apoptotische Endothelzellen setzen Interleukin-1 (IL-1) frei (Hébert et al., 1998; Lemaire et al., 1998), welches einerseits

die Apoptose von Endothelzellen induzieren (López-Collazo et al., 1997), andererseits aber beispielsweise die Endozytose von apoptotischen Körperchen durch benachbarte Endothelzellen steigern kann (Dini et al., 1995).

Von der Beteiligung der Apoptose bei der angiogenen Kaskade in vivo und in vitro wurde in mehreren Studien berichtet (Meyer et al., 1997; Peters et al., 2002; Segura et al., 2002). So zeigten Meyer et al. 1997 bei einer Studie zur Lumenformation bei der Angiogenese, dass es durch die Bildung von Vakuolen und durch den programmierten Zelltod zu einer extensiven Umstrukturierung der Kapillaren kommt, wodurch eine Expansion der Interzellularräume bewirkt wird. Die Erweiterung der interzellulären Räume führt schließlich zur Lumenbildung. Sie zeigten somit, dass der Mechanismus der Apoptose für den Ablauf der Angiogenese notwendig ist. Auch Segura et al. beschrieben 2002, dass die Bildung von Blutgefäßen den Mechanismus der Apoptose beinhaltet und dass dies durch die Aktivierung eines Caspase-abhängigen Mechanismus und durch die Freisetzung von mitochondrialem Cytochrom C geschieht.

1.3. Kardiale Differenzierung

1.3.1. Grundlegendes

Die Entstehung des Herzens ist ein komplexer Prozess aus Migration, Differenzierung und einer komplizierten Interaktion zwischen verschiedenen embryonalen Zelltypen. Die Komplexität dieses Prozesses lässt sich zum Beispiel an der Anfälligkeit des Herzens für angeborene Fehlbildungen erkennen.

Für die Forschung sind die frühen embryonalen Stadien von besonderem Interesse, da die pathologisch veränderten Zellen häufig das embryonale Phänotypmuster wiedergeben (Townsend et al., 1995; Sack et al., 1996). Somit kann die Untersuchung der embryonalen Kardiomyozyten zum Verständnis der kardialen Funktion des gesunden adulten Herzens sowie der Dysfunktionen am erkrankten Herzen beitragen.

1.3.2. Gesamtverlauf der Kardiogenese - ein Überblick

Das Herz ist das erste Organ, das sich in der Embryonalentwicklung ausbildet (Zaffran und Frasch, 2002). Dabei folgt die Kardiogenese bei allen Wirbeltieren und dem

Menschen dem gleichen Schema, wobei sie in der endgültigen Form bei Warmblütern durch Septierung von Vorhof und Ventrikel eine Trennung in Körper- und Lungenkreislauf hervorbringt, die bei Kaltblütern fehlt (Kirby, 2002).

Nach der Gastrulation werden Vorläuferzellen des anterolateralen Mesoderms durch induzierende Signale des benachbarten Endoderms bereits auf ihre kardiogene Differenzierung festgelegt (Olson und Srivastava, 1996). Die kardialen Vorläuferzellen formieren sich nun zu zwei bilateral angelegten Mulden, aus denen sich die parallel verlaufenden Endokardschläuche entwickeln. Diese myokardgenerierten Endokardschläuche verschmelzen dann in der Mittellinie zum primitiven Herzschlauch. Bereits während dieses Prozesses produziert das Myokard eine dicke extrazelluläre Matrix, „cardiac jelly“ genannt, die Myokard und Endokard voneinander trennt (Kirby, 2002).

In Versuchen mit Mäusen konnte die Bildung des primitiven Herzschlauchs ab sieben einhalb bis acht Tagen post conceptionem (p.c.) und die ersten Herzschläge konnten acht einhalb bis neun Tage p.c. beobachtet werden (Fishman et al., 1997).

Zu diesem Zeitpunkt sind die essentiellen Komponenten der kontraktile Aktivität wie das kardiale und skeletale α -Actin sowie das Myosin bereits etabliert (Akhurst et al., 1990; Lyons et al., 1990; Kolossov et al., 1998). Am 21. Tag p.c. ist die embryonale Kardiogenese mit der Bildung des nodalen und atrioventrikulären Leitungssystems und der Etablierung des „adulten“ kontraktile Musters weitestgehend abgeschlossen (Davies et al., 1996).

Nach Bildung des primären Herzschlauches verschmälert und verlängert sich dieser und führt eine Rechtsdrehung aus (kardiales „looping“, Abb.1). Zur gleichen Zeit werden die hierbei entstehenden noch nicht septierten Vorhöfe und Kammern trabekelförmig von Myokard ausgekleidet, welches wiederum mit Endokard bedeckt ist.

Anschließend kommt es zur Septierung und somit zur Unterteilung des Herzschlauches. Zentrale und periphere Anteile dieses Leitungssystems entstammen spezialisierten Myokardregionen, die keine eigentliche Herzarbeit leisten. Das Epikard hingegen bildet sich entweder aus Mesenchym des Septum transversum oder aus Lebergewebe am venösen Ende des Herzschlauches. Endothel- und glatte Gefäßmuskelzellen der koronaren Gefäße entstehen wiederum durch Transformation von epikardialen Zellen, das Reizleitungssystem hingegen entsteht aus parasymphathischen intrinsischen Ganglien und aus symphathischen Paravertebralganglien.

Der letzte Schritt der Herzentwicklung besteht aus der Formierung von Endokardkissen an den atrioventrikulären und ventrikuloarteriellen Übergangszonen, woraus sich dann die Herzklappen bilden (Kirby, 2002).

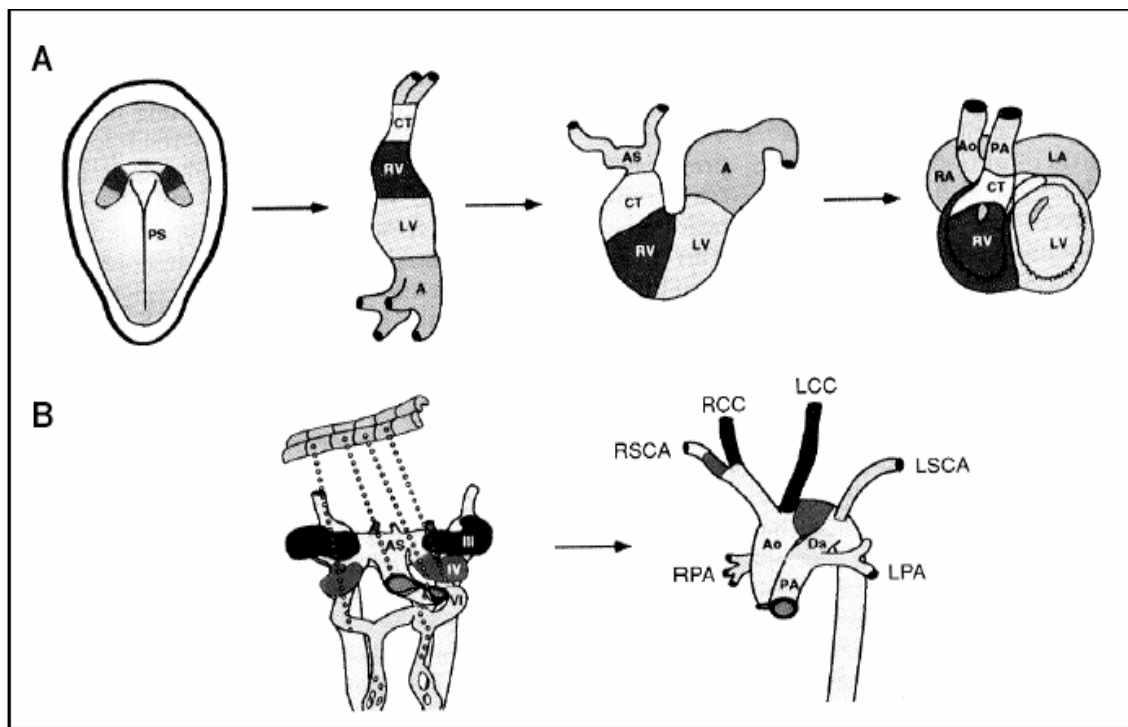


Abb.1: Anatomische Abläufe in der Morphogenese des Herzens

A: Kardiales Looping und Kammerentwicklung

B: Entwicklung der Aorta (Aortenbögen III, IV, VI) und der Pulmonalarterien

PS: Primitivstreifen, CT: Conotruncus, AS: Saccus aorticus

RA/LA: rechtes/linkes Atrium, RV/LV: rechter/linker Ventrikel

Ao: Aorta, RCC/LCC: rechte/linke A. carotis communis

RPA/LPA: rechte/linke Pulmonalarterie

RSCA/LSCA: rechte/linke A. Subclavia

Aus: Olson und Srivastava, Science 1996.

1.4. Embryonale Stammzellen

Embryonale Stammzellen besitzen in der Entwicklungsbiologie einen großen Stellenwert als Zellmodell. Sie ermöglichen die in vitro-Untersuchungen von Embryogenese und Differenzierung verschiedener Gewebearten.

Zu Beginn der Embryogenese steht eine einzige totipotente Stammzelle, die die Eigenschaft besitzt, sich zu einem ganzen Individuum zu entwickeln. Sie stellt den Ursprung für mehrere pluripotente Stammzellen dar (Wobus et al., 2001). Das „mammalian embryo“ existiert sechs einhalb Tage lang bis zum Beginn der Gastrulation als eine Ansammlung pluripotenter Zellen, aus denen schließlich differenzierte Zellen hervorgehen, die einen adulten Organismus ausmachen (Rathjen et al., 1998).

Embryonale Stammzellen als in-vitro-System eignen sich somit sehr gut, um die molekularen Mechanismen zu untersuchen, die an Vaskulogenese und Kardiomyozytenentwicklung beteiligt sind. Da sie pluripotent sind und daher das Potential besitzen bei der Differenzierung alle embryonalen Zelllinien auszubilden (Smith, 1992), verfügen sie auch über einen Großteil des endothelialen Differenzierungsprogramms (Vittet et al., 1996).

Der Embryo wird aus dem pluripotenten Epiblasten gebildet, der kurz nach der Nidation aus der inneren Zellmasse hervorgegangen ist (neben dem Hypoblasten). Aus diesem Epiblasten werden die embryonalen Stammzellen auf direktem Weg gewonnen (Brook et al., 1997; Evans und Kaufman, 1981; Martin, 1981). Aus vier Tage alten Blastozysten werden sie mechanisch aus der inneren Zellmasse entfernt und kultiviert. Diese pluripotenten Stammzellen werden so behandelt, dass man ihre Differenzierung hemmt, ohne dabei jedoch die Proliferation zu beeinträchtigen. Wird die Differenzierung nicht gehemmt, gruppieren sie sich zu Zellaggragaten, Embryoid Bodies (EBs) genannt, und differenzieren sich entsprechend der drei Keimblätter Endo-, Meso- und Ektoderm (Smith 1992). Aus den Stammzellen wurden in der Zellkultur EBs angezüchtet. Hierbei handelte es sich um Zellaggregate von gleicher Größe, die somit gut vergleichbar sind. Sie wurden aus einer definierten Anzahl embryonaler Stammzellen in Form "hängender Tropfen" (2.2.3.) erzeugt. Die EBs wachsen vom Anheftungspunkt aus in „Spiegeleiform“. Um die Anheftungsstelle herum bildet sich der zentrale Zellhaufen, der viele stark proliferierende, jedoch wenig differenzierte

Zellen enthält. Durch das zentrifugal ausgerichtete Wachstum ist die Zellschicht in der Peripherie zwar dünner, hier ist jedoch auch die größte Differenzierung zu finden.

Die Differenzierung der Stammzellen ruft die Bildung diverser Zelltypen hervor, wie zum Beispiel Endothelzellen (Wang et al., 1992; Keller, 1995), Muskelzellen (Drab et al., 1997; Keller, 1995), neuronale Zellen (Bain et al., 1995; Okabe et al., 1996; Fraichard et al., 1995; Strübing et al., 1995), Adipozyten (Dani et al., 1997), Herzmuskelzellen (Wobus et al., 1991; Maltsev et al., 1994; Hescheler et al., 1997), hämatopoetische Zellen (Keller, 1995), uvm. Der differenzierte Embryoid Body ist also eine Mischkultur. Bei frühestens neun Tage alten EBs kann das Phänomen der „Beating Areas“ beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um spontan und synchron schlagende Herzmuskelzellen, die als frühes Differenzierungsereignis in den Kulturschalen zu beobachten sind (Kaufman, 1992).

Es wird angenommen, dass Embryoid Bodies alle Faktoren, die für die Vaskulogenese notwendig sind, selbst produzieren können. Diese Annahme wird dadurch gestützt, dass auf der Oberfläche von Embryoid Bodies blutinselartige Strukturen gefunden wurden, die aus unreifen hämatopoetischen Zellen gebildet werden und von Endothelzellen umgeben sind. Zusätzlich konnte auch die Bildung gefäßähnlicher Anlagen nachgewiesen werden (Doetschmann et al., 1985; Wang et al., 1992; Risau et al., 1988; Doetschmann et al., 1993; DeLisser et al., 1994; Young et al., 1995). Es gibt verschiedene endothelspezifische Marker, die während der Bildung vaskulärer Strukturen im EB zu finden sind. Hierunter fallen zum Beispiel PECAM-1 (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule-1) (De Lisser et al., 1994), VE- (Vascular Endothelial) Cadherin (Lampugnani et al., 1992) und Rezeptoren von Wachstumsfaktoren wie Flk-1 (Yamaguchi et al., 1993; Oelrichs et al., 1993) und tie-1/tie-2 (Sato et al., 1993; Schnurch und Risau, 1993). Hierbei gibt es zeitliche Abstufungen. So kann z. B. der Marker Flk-1 ab dem dritten Tag nach Beginn der Ausdifferenzierung nachgewiesen werden. Ab dem vierten Tag kann PECAM-1 gefunden werden, VE-Cadherin und tie-1 hingegen erst ab dem fünften Differenzierungstag (Vittet et al., 1996). Es scheint so, dass das Expressionsmuster, welches in den EBs gefunden wurde, dem Expressionsmuster der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese sehr ähnlich ist. Hierbei zeigte sich auch, dass sich embryonale Stammzellen spontan zu endothelialen Zelllinien differenzieren können und somit auch vaskuläre Strukturen ausbilden können (Yamaguchi et al., 1993; Sato et al., 1993; Baldwin et al., 1994; Breier et al., 1996; Dumont et al., 1995). Eine

hämatopoetische Differenzierung der embryonalen Stammzellen ist ebenso möglich. Diese läuft auf eine ähnliche Weise ab wie im Dottersack und in der fetalen Leber (Dzierzak und Medvinsky, 1995).

1.5. Doping

1.5.1. Überblick über die Geschichte des Dopings

Seit dem 01.01.2004 ist der Begriff „Doping“ von der World-Anti-Doping Agentur (WADA) definiert als: „das Vorhandensein einer verbotenen Substanz, deren Metaboliten oder eines Markers in Körperbestandteilen eines Athleten. Doping ist die Verwendung von Substanzen aus den verbotenen Wirkstoffgruppen und die Anwendung verbotener Methoden usw.“ (siehe World Anti-Doping Code, Artikel 1 und 2).

Der Wunsch, die körperliche Leistungsfähigkeit zu verbessern und schneller oder stärker zu sein als andere, ist jedoch sicherlich so alt wie die Menschheit selbst. Somit ist auch die Verwendung leistungsfördernder Substanzen bereits seit den ersten Olympischen Spielen 776 v. Chr. bekannt. Es ist überliefert, dass griechische Athleten spezielle Diäten einhielten und stimulierende Trünke zu sich nahmen, um sich zu stärken (Fraser, 2004). Aus dem 19. Jahrhundert weiß man, dass Radfahrer und andere Ausdauerathleten häufig Substanzen wie Strychnin, Koffein, Kokain und Alkohol einnahmen. Im frühen 20. Jahrhundert wurde von dem Gebrauch von Stimulantien wie Amphetaminen, Kokain und Ephedrin berichtet, die dazu dienten, die Leistungsfähigkeit zu verbessern und Ermüdungserscheinungen zu verhindern (Bowers, 2002). Allerdings wurde der Begriff des „Dopings“ im 20. Jahrhundert auch häufig mit der Gabe illegaler Substanzen an Rennpferde in Verbindung gebracht (Fraser, 2004).

Nach dem Tod eines dänischen Radfahrers bei den Olympischen Spielen in Rom 1960 wurde verstärkt Druck auf die Sportbehörden ausgeübt, zumal bei der Autopsie des Athleten Amphetamine im Körper nachgewiesen worden waren. 1967 gründete das Internationale Olympische Komitee (IOC) eine medizinische Kommission, die dafür zuständig war, eine Liste mit verbotenen Substanzen und Methoden aufzustellen. Somit wurden erste Dopingtests bei den Olympischen Spielen 1968 in Grenoble

(Winterspiele) und Mexiko (Sommerspiele) eingeführt. Im Jahr zuvor hatte der Tod eines britischen Radfahrers bei der Tour de France erneut für Aufregung gesorgt. Seitdem etablierten viele europäische Sportorganisationen, wie z. B. die FIFA, Vorschriften zur Handhabung von Doping im Sport (Fraser, 2004).

Auch der Missbrauch von Steroidhormonen war bereits seit den 1960er Jahren bekannt, wurde jedoch erst 1974 vom Olympischen Komitee verboten. Als Grund für das späte Verbot wurde angegeben, dass es bis zu diesem Zeitpunkt keine sicheren Nachweisverfahren gab, um Steroidhormone im Urin von Sportlern nachzuweisen. Dieses Verbot umfasste lediglich anabol androgene Steroidhormone (AAS), welche nicht vom menschlichen Körper gebildet werden. Das körpereigene Testosteron wurde erst 1984 verboten, nachdem sein Missbrauch bekannt geworden war (Schänzer und Thevis, 2004).

Doch selbst in den vergangenen Jahren hat das Ansehen des Hochleistungssports durch unzählige Dopingskandale großen Schaden erlitten. So sei an Enthüllungen der Praktiken in der ehemaligen DDR, die finnischen Dopingsünder der Langlauf-WM 2001, die Tour de France 1998 sowie an die Tour de France 2006 erinnert.

Durch das inzwischen hohe Leistungsniveau des Spitzensports ist es vielen Sportlern heute kaum mehr möglich, ohne verbotene Substanzen Höchstleistungen zu erbringen, und dem sportbegeisterten Zuschauer ist es kaum mehr möglich, zwischen ehrlich erbrachter Leistung und pharmakologischer Einflussnahme zu unterscheiden.

1.5.2. Anabole Steroide im Sport

Anabol androgene Steroide (AAS) sind synthetische Derivate des männlichen Geschlechtshormons Testosteron. Seit seiner Entdeckung 1935 wurden viele Derivate von Testosteron synthetisiert und erforscht, mit dem Ziel, die metabolische Halbwertszeit zu verlängern und die Effizienz des Ursprungsmoleküls zu erhöhen (Kuhn, 2002).

Anabole Steroide werden im Sport bereits seit langem zur Leistungssteigerung sowie zu ästhetischen Zwecken eingenommen. Die ersten dokumentierten Berichte zum Missbrauch von anabolen Steroiden stammen aus den 1950er Jahren. Damals sollen russische Sportler bei der Weltmeisterschaft im Gewichtheben in Wien zur Leistungssteigerung Anabolika genommen haben. Daraufhin soll auch der US-amerikanische Teamarzt diese Steroide bei den amerikanischen Athleten eingeführt

haben. Da in diesen Jahren mehrere AAS-einnehmende Sportler Wettbewerbe und Meisterschaften gewannen, breitete sich der Missbrauch dieser Substanzen aus (Wade, 1973; Todd, 1987).

Als besonders anabolikabelastete Sportarten gelten sämtliche Kraftsportarten, American Football, die Wurf-, Sprung, Sprint-, und Mehrkampfdisziplinen der Leichtathletik, Rudern, Radfahren, Eishockey und der Eisschnellauf (Yesalis et al., 1992; Hoberman und Yesalis, 1995; Ritsch und Mußhoff, 2000).

Die androgenen Effekte von Testosteron sind für das Wachstum des männlichen Reproduktionssystems sowie für die Entwicklung der sekundären männlichen Geschlechtsmerkmale verantwortlich, während die anabolen Effekte die Fixierung von Stickstoff fördern und eine erhöhte Proteinsynthese bewirken (Kuhn, 2002). Dieses Erkenntnis führte zu der Herstellung von Derivaten, die weniger androgene Eigenschaften, aber eine stärkere anabole Wirkung besitzen (Shahidi, 2001). Die Veränderungen der Substanzen bewirkten eine Erhöhung der Muskelmasse und -kraft. Zusammen mit den stimulierenden Effekten, die anabole Steroide auf das Gehirn haben, führten diese Eigenschaften zu einem weit verbreiteten Gebrauch von Steroiden bei Sportlern aller Niveaus, nicht nur im Hochleistungssport (Maravelias et al., 2005).

Somit lassen sich die Hauptwirkungen der anabolen Steroide wie folgt zusammenfassen:

1. Sie konvertieren eine negative Stickstoff-Bilanz in eine positive Bilanz, indem sie die Verwertung von aufgenommenen Proteinen verbessern und die Stickstoff-Retention erhöhen. Außerdem können sie die Proteinsynthese im Skelettmuskel induzieren.

Es wird angenommen, dass sie ihre Wirkungen entfalten, indem sie auf Zellebene an Androgenrezeptoren binden, welche dann zu Bindungsstellen am Chromatin translozieren. Somit wird die Gentranskription gefördert, es kommt zur Stimulierung der mRNA-Produktion, was zu einer geförderten Proteinsynthese führt (Bahrke und Yesalis, 2004).

2. Steroide zeigen einen anti-katabolen Effekt, da sie an Glucocorticoid-Rezeptoren konkurrieren und somit die Proteinsynthese hemmenden Effekte der Glucocorticoide während eines anstrengenden Trainings blockieren (Haupt und Rovere, 1984).

3. Nach Steroideinnahme werden häufig euphorische Zustände, Zunahme von aggressivem Verhalten und verminderte Müdigkeit festgestellt (Wilson und Griffin, 1980). Außerdem geben die Sportler an, dass sie sich nach Trainingseinheiten schneller

erholen und häufiger sowie intensiver trainieren können, wenn sie Steroide einnehmen (Haupt und Rovere, 1984).

Die Nebenwirkungen anabol androgener Steroide sind dosisabhängig und variieren von Steroid zu Steroid. Zu den bekannten Nebenwirkungen gehören: erhöhte Spiegel von Leberenzymen, cholestatitscher Ikterus, Peliosis hepatis, Verminderung des HDL-Cholesterols, Hypertention, dilatative Kardiomyopathie, toxische Myokarditis und andere kardiovaskuläre Veränderungen, Fertilitätsstörungen, endokrine Störungen, verschiedene neoplastische Läsionen, wie z. B. ein erhöhtes Risiko, an einem Leberzell-Karzinom zu erkranken, sowie Verhaltensalterationen (Laroche, 1990; Landry und Primos, 1990; Ritsch und Mußhoff, 2000; Maravelias et al., 2005). Es wurden außerdem Fälle von dilatativer Kardiomyopathie, toxischer Myokarditis, Herzmuskelhypertrophie und anderen kardiovaskulären Erkrankungen beschrieben (Schollert und Bendixen, 1993; Vogt et al., 2002; Liu et al., 2003; Tischer et al., 2003; Maravelias et al., 2005; Clark und Schofield, 2005; Dhar et al., 2005).

Ein weiteres Problem stellt der Missbrauch von Schwarzmarktanabolika dar. Nach der Öffnung der Grenzen Osteuropas ist es zu einer Explosion des Schwarzmarkthandels in Deutschland gekommen. Neben den bekannten Nebenwirkungen sind hierdurch weitere Gefahren und Risiken hinzugekommen. Viele dieser gefälschten Produkte sind nämlich falsch deklariert, verunreinigt und nicht unter ausreichend hygienischen Bedingungen hergestellt (Ritsch und Mußhoff, 2000).

Selbst unter jugendlichen Sportlern und Nicht-Sportlern konnte die Einnahme von AAS beobachtet werden (Wagner 1989; Windsor und Dumitru, 1989; Scott et al., 1996).

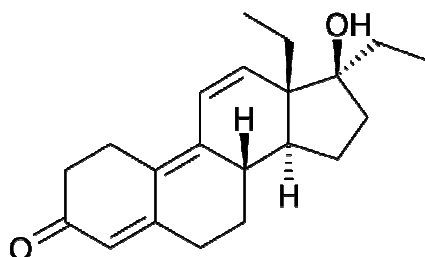
Fatalerweise werden häufig mehrere Steroide gleichzeitig eingenommen. Oft wird mindestens ein Steroid oral eingenommen und ein zusätzliches Steroid injiziert.

Es bleibt auf jeden Fall unbestritten, dass der Missbrauch von anabol androgenen Steroiden ein großes Problem bei kompetitiven sowie bei nicht-kompetitiven Sportarten darstellt (Maravelias et al., 2005).

1.5.3. Untersuchte Steroide

1.5.3.1. Tetrahydrogestrinon (THG)

Strukturformel:



Bei THG handelt es sich um das weltweit erste wahre Designersteroid, das bis zum Jahre 2003 jedoch gänzlich unbekannt war. Zum ersten Mal wurde somit ein Steroid gefunden, das nicht von Pharmafirmen zum therapeutischen Einsatz hergestellt worden war, sondern gezielt für Sportler als anaboles Steroid zu Dopingzwecken entwickelt wurde, mit dem Ziel ein wirksames Steroid zu erhalten, das bei Dopingkontrollen nicht nachgewiesen werden kann (Schänzer und Thevis, 2004; Malvey et al., 2005).

Im Juni 2003 erhielt die US Anti-Doping Agency (USADA) einen anonymen Hinweis eines Leichtathletiktrainers, der Namen von US-amerikanischen und internationalen Sportlern bekannt gab, die seiner Meinung nach ein unbekanntes und somit nicht nachweisbares Steroid einnahmen. Desweiteren versorgte der anonyme Coach, inzwischen als Trevor Graham identifiziert, die USADA mit einer benutzten Spritze, die dieses anabole Steroid enthalten sollte. Daraufhin wurde der Inhalt der Spritze nach einer Methanolspülung zur Auswertung an das „Olympical Analytical Laboratory at the University of California, Los Angeles“ (UCLA) weitergegeben. Die Forscher setzten sich sofort daran, die Molekülstruktur dieses unbekannten Steroids herauszufinden, indem sie ihre Routine-Nachweisverfahren für Dopingkontrollen anwandten. Sie bemerkten jedoch rasch, dass sie hier mit ihren Standardverfahren nicht weiterkommen konnten, da es sich um ein komplett neues Designersteroid handelte, für das es noch keine Nachweismöglichkeiten gab (Catlin et al., 2004; Malvey et al., 2005).

Alle Steroide besitzen die gleiche chemische Grundstruktur, bestehend aus einem zentralen Komplex von vier hexagonalen Karbonringen. Sie unterscheiden sich nur durch unterschiedliche Molekülgruppen, die dem zentralen Kohlenstoffkomplex angelagert sind (Malvey et al., 2005). Dadurch ist es relativ einfach, neue Steroide

herzustellen. Es werden lediglich die randständigen Molekülgruppen verändert, der zentrale Ring bleibt erhalten. In dem Fall von THG handelte es sich um eine Modifikation des Steroidhormons Gestrinon, welches namentlich auf der Dopingverbotsliste aufgeführt ist. Gestrinon und THG unterscheiden sich nur durch vier Wasserstoffatome. THG war jedoch unentdeckt geblieben, da es unter den Bedingungen der Routinetests zerfiel. Aufgrund seiner Struktur wurde das unbekannte Steroid im Juli 2003, nachdem man seine Molekülstruktur herausgefunden hatte, vom UCLA Team Tetrahydrogestrinon (18a-homo-pregna-4,9,11-trien-17 β -ol-3-on) genannt (Ritter und Washington, 2003; Catlin et al., 2004; Malvey et al., 2005).

Im August 2003 hatten die Forscher des UCLA Labors effiziente Nachweisverfahren für THG entwickelt. Das Steroid konnte nun zuverlässig mittels Gaschromatographie/Massenspektrometrie (GC/MS) nachgewiesen werden, so dass man nun mit Routinetests an Urinproben beginnen konnte. Auf Anfrage der Welt-Anti-Doping-Agentur (WADA) testete das UCLA-Labor erneut 550 A-Proben, die bei den U.S. Outdoor Track & Field Championships und auch außerhalb der Wettbewerbe im Sommer 2003 entnommen worden waren. Es wurden vier US-Athleten sowie ein Athlet aus Großbritannien in beiden Proben, A- und B-Probe, positiv auf THG getestet. Bei dem britischen Sportler handelte es sich um den Sprinter Dwain Chambers, der in diesem Zusammenhang offiziell benannt wurde. Im Herbst 2003 führte auch die NFL (National Football League) Urintests durch, wobei auch hier mehrere Sportler positiv auf THG getestet wurden.

Der US-Anti-Doping-Agentur (USADA) zufolge war es Victor Conte, Gründer und Eigentümer der Bay Area Laboratory Cooperative (BALCO), der viele Sportler und Trainer mit THG und anderen Steroiden versorgt hatte. Zur Klientel von BALCO gehörten einige Hochleistungssportler, darunter auch olympische Spitzensportler (Ritter, 2003; Malvey et al., 2005).

Victor Conte argumentierte, THG besäße keine anabolen Eigenschaften und sei wissenschaftlichen Definitionen nach kein echtes Steroid (Ritter, 2003; Kondro, 2003). Es wurde jedoch inzwischen in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass THG ein potentes Androgen ist. Bei einer in-vitro-Studie zeigte es sogar eine höhere anabole Potenz als die Vergleichssubstanzen Nandrolon und das sehr potente Trenbolon (Death et al., 2004). In einer Studie an männlichen orchiektomierten Ratten stellte sich heraus, dass THG an den Androgen-Rezeptor (AR) bindet und AR-vermittelte Signalwege aktiviert. Desweiteren konnte in der Studie gezeigt werden, dass THG

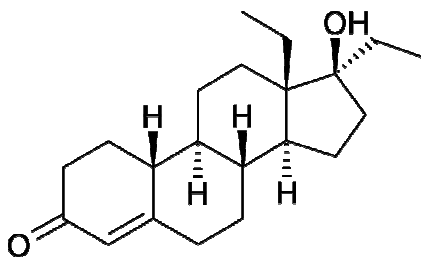
Muskelwachstum in mesenchymalen multipotenten Zellen stimuliert und in vivo sowohl anabole als auch androgene Aktivität besitzt (Jasuja et al., 2005).

Eine weitere Studie zeigte, dass THG unselektiv, jedoch mit hoher Affinität an den Androgen-, den Progesteron- (PR) und an den Mineralokortikoid-Rezeptor (MR) bindet. Es ist also nicht ein spezifischer AR-Agonist, sondern es zeigte eine hohe Bindungsaffinität zu allen getesteten Steroidhormon-Rezeptoren und ist somit sowohl anabol als auch androgen wirksam. Desweiteren band THG in den Versuchen an den Glucokortikoid-Rezeptor (GR). In der Leber bewirkte es eine Down-Regulation des GR-abhängigen Tyrosin-Aminotransferase-Gens (TAT). Die Hemmung des TAT durch THG zeigt, dass THG auch Interaktionen mit dem Glucokortikoid-Hormonsystem hervorruft. Somit sind verschiedene Nebenwirkungen, wie z.B. hepatotoxische und karzinogene Auswirkungen denkbar (Friedel et al., 2006).

Der THG-Skandal hat auch das professionelle Verhalten der Sporttrainer und derjenigen, die den Sportlern zu Leistungssteigerungen verhelfen, in Frage gestellt. Hätte aber nicht auf der anderen Seite ein verdachtschöpfender Coach die Aufmerksamkeit auf THG gelenkt, so würde THG möglicherweise immer noch unnachweisbar in Sportlerkreisen zirkulieren (Schnirring, 2003; Malvey et al., 2005).

1.5.3.2. Norbolethon

Strukturformel:



Norbolethon (13-ethyl-17-hydroxy-18,19-dinor-17 α -pregn-4-en-3-on), auch Wy 3475 genannt, ist ein 19-nor anaboles Steroid, das im Jahre 2002 von DH Catlin und seinen Mitarbeitern im Urin einer Sportlerin nachgewiesen wurde. Die Urinprobe zeigte ungewöhnlich niedrige Werte der endogenen Steroide, ein Hinweis auf die mögliche Einnahme exogener Steroide (Catlin et al., 2002). Wie bereits für THG beschrieben gab es auch für Norbolethon keine Nachweisverfahren. Aber nachdem man wusste, dass ein exogenes Steroid in der Probe vorhanden sein musste, gelang es auch hier Catlins Labor

einen MS-Test zu entwickeln, womit Norbolethon fortan sicher nachgewiesen werden konnte (Catlin et al., 2002).

Bei Norbolethon handelte es sich jedoch keinesfalls um ein komplett neues, vorher noch nie gesehenes Steroid. Vielmehr war es in Vergessenheit geraten, nachdem es 1963 zum ersten Mal hergestellt worden war. Wyeth Laboratories hatte die oral wirksame Substanz zu pharmazeutischen Zwecken synthetisiert, woraufhin sich herausstellte, dass ein Steroid geschaffen worden war, dessen anabole Aktivität die androgene Aktivität mit dem Faktor 20 überstieg (Edgren, 1963; Tomarelli und Bernhart, 1964; Buzby et al., 1966). In einer Studie an kastrierten männlichen Ratten zeigte sich außerdem, dass Norbolethon eine erhöhte Stickstoff-Retention bewirkt, was zur Verstärkung seiner anabolen Aktivität führt (Tomarelli und Bernhart, 1964). Desweiteren wurden in den Jahren von 1964 bis 1972 mehrere Studien an Kindern mit Wachstumsretardierung und an Kindern mit idiopathischem Untergewicht durchgeführt. In allen drei Studien zeigten die Kinder signifikante Wachstums- und Gewichtszunahmen, die bei Einnahme von Norbolethon erheblich größer ausfielen als in den Kontrollgruppen. An unerwünschten Nebeneffekten kam es bei einigen weiblichen Patienten zu Störungen des Menstruationszyklus. Seltener beobachtet wurden androgene Effekte wie eine Wachstumszunahme der Genitalorgane bei Jungen oder Akne, Hirsutismus sowie eine tiefere Stimmlage bei Mädchen (Greenblatt et al., 1964; Gogate, 1969; LeVann und Cohn, 1972). In einer weiteren 1968 durchgeführten Studie an Erwachsenen in der Erholungsphase nach zerebrovaskulären Ereignissen mit resultierender Hemiplegie, wurde bestätigt, dass Norbolethon eine erhöhte Stickstoff-Retention bewirkt. Desweiteren wurde beschrieben, dass das Steroid die auf die Proteinsynthese katabol wirkenden Effekte der Kortikosteroide, die arthritische Patienten häufig einnehmen müssen, vermindern kann. Die Studie zeigte außerdem, dass es unter Norbolethoneinnahme zu einer signifikanten Reduktion der Lipide und der freien Fettsäuren im Blutbild kam. Auf die Blut-Cholesterol-Werte schien es jedoch keinen oder kaum Einfluss zu haben. Ebenso wenig Auswirkungen zeigten sich bei den Blutglucose-Werten sowie bei der Glucosetoleranz (Albanese et al., 1968).

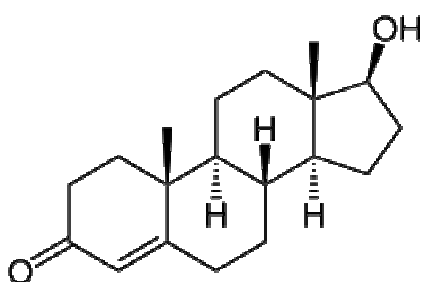
Es kam jedoch nie zur Vermarktung von Norbolethon. Die Gründe hierfür sind nicht bekannt, es ist allerdings möglich, dass dies auf die Nebenwirkungen, die durch seine androgenen Eigenschaften hervorgerufen werden, zurückgeht.

Somit wurde diese Substanz vergessen, es gab keine bekannten Missbrauchfälle und daher stand Norbolethon auch auf keiner der Dopingverbotslisten. Umso geschockter

reagierte die Sportwelt, als das Steroid 2002 auf einmal wieder auftauchte. Doch verwundert der Missbrauch eigentlich nicht, wenn man bedenkt, wie stark seine anabole Wirkung ist. Da es unwahrscheinlich ist, dass es noch Überreste von Norbolethon aus den Studien von 1964 bis 1972 gibt, liegt die Vermutung nahe, dass Norbolethon illegal von Personen oder einer Organisation mit entsprechender chemisch-synthetisierender Expertise und dem nötigen Fachwissen, hergestellt wird oder wurde.

1.5.3.3. Testosteron

Strukturformel:



Das männliche Geschlechtshormon Testosteron wird in den Leydig-Zellen der Hoden, aber in geringeren Mengen auch in den Nebennieren und in den Eierstöcken der Frau gebildet. Seine Sekretion wird durch einen negativen Feedback-Mechanismus kontrolliert. Beteiligt hieran sind das luteinisierende Hormon (LH) und das Follikelstimulierende Hormon (FSH), die beide von der Hypophyse gebildet und sezerniert werden. Die Testosteronproduktion beginnt schon früh in der Embryonalentwicklung und bestimmt die sexuelle Ausdifferenzierung in einer frühen „sensitiven Periode“ im dritten oder vierten Schwangerschaftsmonat. Wie alle Steroidhormone stimuliert Testosteron die Synthese spezifischer Proteine, indem es die Zellmembran passiert, an den spezifischen Rezeptor im Zellkern bindet und somit bestimmte Gene aktiviert (Freeman et al., 2001).

Man weiß heute, dass es durch anhaltende Testosteroneinnahme zu Veränderungen in der Expression bestimmter muskulärer Wachstumsfaktoren (Bhasin et al., 2001) kommt. Dies führt wiederum zu einem Zuwachs an Muskelmasse (Brodsky et al., 1996; Bhasin et al., 2001; Sinha-Hikim et al., 2002) und beeinflusst den Proteinumsatz (Ferrando et al., 1998; Ferrando et al., 2002). Außerdem zeigte sich in Studien der letzten Jahre, dass Testosteron die Gluconeogenese im Muskel stimuliert und zugleich die Glycolyse im Muskel hemmt (Ramamani et al., 1999; van Breda et al., 2003).

Zusätzlich wurde nachgewiesen, dass die langfristige Einnahme (8-12 Wochen) von Testosteron die skelettale Glucose-Aufnahme um ca. 50% reduziert (Holmang et al., 1990; Rincon et al., 1996). Es scheint also, dass Testosteron sowohl den Kohlenhydrate-Umsatz als auch den Protein-Metabolismus im Skelettmuskel zu verändern vermag (Enoki et al., 2006).

Allerdings wurde auch von unterschiedlich schweren Nebenwirkungen wie Virilisierungserscheinungen bei Frauen, Beeinträchtigung der Leberfunktion und Problemen des reproduktiven Systems berichtet (Hoberman und Yesalis, 1995).

Dass die Einnahme von Testosteron zur Verbesserung der eigenen Vitalität führen kann, ist seit dem Ende des 19. Jahrhunderts belegt. Charles Edouard Brown-Séquard hatte im Juni 1889 die Wirksamkeit einer hormonellen Komponente aus dem Hoden beschrieben. Er berichtete von der Steigerung seiner physischen Kraft, seines Appetits und seiner mentalen Fähigkeiten durch seinen berühmten Selbstversuch, im Rahmen dessen er sich ein testikuläres Extrakt aus Hoden von Hunden und Meerschweinchen injiziert hatte. Nun begannen Forscher weltweit testikuläre Substanzen zu untersuchen und auf dem Gebiet der Organotherapie Fortschritte zu machen. Auch der medizinische Gebrauch dieser Brown-Séquard'schen Flüssigkeit begann nur kurze Zeit später. Man versuchte auf diese Weise verschiedenste Krankheiten wie Epilepsie, Tuberkulose, Diabetes, Anämie, Arteriosklerose, etc. zu behandeln (Freeman et al., 2001; Kuhn, 2002). Ende 1889 verabreichten 12000 Ärzte die Brown-Séquard'sche Flüssigkeit und herstellende Apotheker machten ein Vermögen mit dem Verkauf dieses neuen „Lebenselixirs“ (Tattersall, 1994; Hansen, 1999).

Heutzutage wird Testosteron häufig zur Behandlung erektiler Dysfunktion verwendet, da es sich herausgestellt hat, dass bei Patienten mit extrem niedrigen Testosteronspiegeln durch die Behandlung mit dem Hormon eine Verstärkung der Libido, verbesserte erektile Funktion und der Erhalt sekundärer Geschlechtsmerkmale herbeigeführt werden konnten.

In der Bodybuilder-Szene wurde v.a. an der US-Westküste in den 1940er und 1950er Jahren viel mit Testosteron experimentiert, was zur Entstehung des Testosteron-Schwarzmarktes beitrug (Hoberman und Yesalis, 1995). In den 1960er Jahren verbreitete sich dann die Nachricht von der Wirksamkeit von Testosteron und seinen Derivaten, sodass diese nun auch in anderen Sportarten, wie der Leichtathletik und dem American Football, eingesetzt wurden. In den letzten 30 Jahren hat sich der Missbrauch dieser Substanzen auch auf andere olympische Sportarten ausgeweitet. Dazu zählen

Hockey, Schwimmen, Radfahren, Volleyball, Wrestling, Skifahren, Handball und Fussball. Von den geschätzt eine Millionen Menschen in den USA, die missbräuchlich Steroide einnehmen, verwenden aber nach wie vor viele diese Substanzen für nicht-kompetitives Bodybuilding (Freeman et al., 1995).

1.6. Fragestellung

Doping ist ein weit verbreitetes Problem, das nicht nur im Hochleistungssport, sondern auch im Kraft- und Freizeitsport zu tragen kommt. Doping mit Anabolika ist seit Mitte der 1950er Jahre bekannt, wurde jedoch erst 1974 verboten und kann seit den Olympischen Sommerspielen 1976 in Montreal sicher nachgewiesen werden.

Oft reicht die Veränderung eines einzelnen Moleküls einer bereits bekannten Substanz aus, um somit auf sehr einfache Weise ein Derivat herzustellen. Von diesen Derivaten werden dann häufig ähnliche Wirkungen erwartet wie man sie von der Muttersubstanz bereits kennt. Diese durch Umwandlung erzeugten Dopingsubstanzen sind jedoch meistens nicht, oder nicht hinreichend bezüglich ihrer Wirkungen und Nebenwirkungen untersucht.

In dieser Arbeit wurden zwei Designersteroide untersucht, die missbräuchlich zu Dopingzwecken verwendet wurden.

Hierbei handelt es sich um Norbolethon und Tetrahydrogestrinon (THG), zwei synthetisch hergestellte anabole Steroide.

Norbolethon wurde erstmals 1963 synthetisiert (Smith et al., 1963). Es zeigte sich, dass ein Steroid mit einem sehr günstigen Verhältnis zwischen anaboler und androgener Wirkungsstärke hergestellt worden war. Seine anabole Aktivität übersteigt die androgene Aktivität mit dem Faktor 20 (Edgren, 1963; Tomarelli et Bernhart, 1964; Buzby et al., 1966), wodurch es wohl auch für Athleten attraktiv erscheint. Es wurde in mehreren pharmazeutischen Studien getestet (Greenblatt et al., 1964; Albanese et al., 1968; Gogate, 1969; LeVann et Cohn, 1972;) aber niemals vermarktet. Somit war die Sportwelt erschüttert, als Norbolethon 2002 im Urin einer Athletin nachgewiesen wurde (Catlin et al., 2002), nachdem es schon fast in Vergessenheit geraten war.

Bei THG handelt es sich um ein Designersteroid, das bis zu seiner Entdeckung im Jahre 2003 noch gänzlich unbekannt war. Im Juni 2003 erhielt die US-Anti-Doping Agency (USADA) von einem Leichtathletik-Trainer eine benutzte Spritze, in der sich ein noch unbekanntes Steroid befinden sollte. Einem Forscherteam des UCLA Olympic Analytical Laboratory gelang es, seine Molekülstruktur herauszufinden und im August 2003 waren Methoden entwickelt worden, das Steroid, THG genannt, sicher nachzuweisen. Es wurden sofort Urinkontrollen durchgeführt, bei denen mehrere Athleten positiv getestet wurden (Ritter, 2003; Catlin et al., 2004).

Konkret sollten folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

- 1.) Welchen Einfluss haben Testosteron, Norbolethon und Tetrahydrogestrinon auf die Anzahl der Gefäße, die endotheliale Proliferation und die endotheliale Apoptose am Stammzellmodell?
- 2.) Kommt es durch die Einwirkung von Testosteron, Norbolethon und THG zu Veränderungen der Gefäßmorphologie oder der Gefäßqualität?
- 3.) Wie wirken Testosteron, Norbolethon und Tetrahydrogestrinon auf die Ausbildung von Kardiomyozytenclustern am Modell embryonaler Stammzellen der Maus?

Zur Klärung dieser Fragen wurden Untersuchungen am Modell des Embryoid Bodies (EB) mit pluripotenten Stammzellen der Mäuselinie D3 durchgeführt. Zur Kontrolle diente ein Versuchsansatz mit Stammzellen, die nicht mit einem Steroid behandelt worden waren, sowie ein Versuchsansatz mit Testosteron. Der Einfluss der Steroide auf die Gefäßbildung wurde nach 5+3, 5+6, 5+9 und 5+12 Tagen untersucht. Hierfür wurde jeweils eine immunhistochemische Doppelmarkierung durchgeführt, um sowohl die Gefäßanlagen als auch proliferierende Endothelzellen zu markieren. Verwendet wurden Antikörper gegen PECAM sowie gegen das Proliferationsantigen Ki-67. Es war von großer Bedeutung zu sehen, ob die EBs von unterschiedlicher Größe sind und wie sich die Gefäße der verschiedenen EBs in Quantität und Qualität voneinander unterschieden. Hierzu wurden alle Gefäße in einem EB ausgezählt und qualitative Merkmale wie Reife, Länge und Durchmesser der Gefäße sowie Anzahl der Abzweigungen erfasst.

Desweiteren wurden Anzahl und Formierung der in jedem Embryoid Body vorkommenden Angioblasten untersucht.

Um zusätzlich Erkenntnisse über die Entwicklung der Endothelzellen zu erlangen, wurden proliferierende sowie apoptotische Endothelzellen gezählt und überprüft, in welchem Verhältnis sie zueinander stehen. Um apoptotische Endothelzellen zu markieren, wurde ein Antikörper gegen PARP verwendet.

Ein weiterer Teil der Untersuchungen bezog sich auf die Herzmuskelzellen. Auch diese wurden nach 5+3, 5+6, 5+9 und 5+12 Tagen untersucht. Hierfür wurde die Anzahl und Größe aller Kardiomyozytencluster pro EB erfasst. Die Markierung erfolgte mit einem Anti-Alpha-Actinin Antikörper.

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Zellkulturmedien und Zusätze:

-DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Karlsruhe
-Für 500 ml DMEM (15%):	- 409 ml DMEM (400 g Glucose) - 75 ml FCS (15%) - 5 ml Glutamin - 5 ml Penicillin / Streptomycin (1%) - 5 ml MEM - 1 ml 2-Mercaptoethanol
-MEM:	= Non-Essential Amino Acids, Gibco, Karlsruhe
-2-Mercaptoethanol:	50 mM, Gibco, Karlsruhe
-FCS:	= Fetales Kälberserum, Gibco, Karlsruhe
-Glutamin, Penicillin/Streptomycin:	Gibco, Karlsruhe
-ESGRO (LIF):	Chemicon International, Temecula, CA, USA
-Accutase:	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
-Gelatine:	vom Schwein, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
-PBS:	Gibco, Karlsruhe
-PFA:	= Paraformaldehyd, VWR International, Langenfeld

Rezept für 4% PFA in 0,1 mol PBS (pH 7,4):

Zuerst wurden 4 g PFA in 40 ml destilliertem Wasser unter Erwärmen (60°C) gelöst. Danach wurde die Lösung mit 1N NaOH geklärt. Nach Erkalten wurde sie filtriert und anschließend mit 50 ml 0,2 M PBS gemischt. Nach Einstellen des pH-Wertes auf 7,4 wurde das Gefäß mit destilliertem Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Am Ende wurde nochmals der pH-Wert kontrolliert.

2.1.2. Immunhistochemie:

-NaCl:	Natrium-Chlorid, Merck, Darmstadt
-NH ₄ Cl:	Ammoniumchlorid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
-HCL:	1mol/l, Carl Roth GmbH+ Co., Karlsruhe
-BSA:	Bovine Serum Albumin: pH:7,0 PAA Laboratories GmbH, Cölbe
-Tris:	=Tris[hydroxymethyl]aminomethane: C ₄ H ₁₁ NO ₃ Carl Roth GmbH+Co., Karlsruhe
-Triton X-100:	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg

2.1.3. Verwendete Antikörper:

Primäre Ak:

-Anti-Pecam (monoclonal):	rat-anti-mouse,1:800, BD Biosciences, Pharmingen, Deutschland
-Anti-Ki67 (polyclonal):	rabbit-anti-mouse, 1:150, Abcam Ltd., Cambridge, Großbritannien
-Anti-PARP (polyclonal):	from rabbit, 1:250, Promega, Mannheim, Deutschland
- Anti- α -Actinin (monoclonal):	from mouse, 1:500, Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Sekundäre Ak:

- Goat Anti rat/ biotin: 1:200,
DAKO, Hamburg, Deutschland
- Cy2-konjugierter
Goat anti rabbit IgG: 1:200,
Jackson Immuno Research Laboratories,
Dianova, Hamburg, Deutschland
- Cy2-konjugierter
Goat-anti-mouse-Antikörper: 1:200,
Amersham Biosciences, Freiburg,
Deutschland

Fluorochrom:

- Cy3-Streptavidin, 1:1500
Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland

2.1.4. Geräte:

- Laborzentrifuge: Kendro, Osterode, Deutschland
- Flow: Kendro, Osterode, Deutschland
- Brutschrank: Kendro, Osterode, Deutschland , 37 °C; 5% CO₂; >95% rH
- Pipetten: VWR International, Langenfeld, Deutschland
- Pipetboy: H. Faust, Meckenheim, Deutschland
- Pipettenspitzen: H. Faust, Meckenheim, Deutschland
- Pipettierhilfen: H. Faust, Meckenheim, Deutschland
- Bakteriologische Gewebekulturschalen (10 ml): H. Faust, Meckenheim, Deutschland
- Zellkultur-Schalen: 5ml, H.Faust, Meckenheim, Deutschland
- 4-well-Schalen: NUNC, Wiesbaden, Deutschland
- Deckgläschen: für die 4-Well-Platten, Menzel GmbH& Co. KG, Braunschweig,
Deutschland
- Glas-Pasteur-Pipetten :H. Faust, Meckenheim, Deutschland
- Neubauer - Zählkammer: VWR International, Langenfeld

2.2. Methoden

2.2.1. Zellkultur

Die Betreuung der Stammzellen sowie der Feederzellen erfolgte durch die Medizinisch-technische Assistentin der Abteilung für Zelluläre und Molekulare Sportmedizin. Es wurde ausschließlich mit sterilen Materialien gearbeitet. Alle Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen in der Zellkultur statt, bei der es sich um ein S1-Labor handelte. Es wurde unter einer Raumwerkbank gearbeitet, die durch laminare Luftströmungen ein nahezu steriles Umfeld gewährleistete. Die Zellen wurden in einem CO₂-Inkubator (5% CO₂) bei einer Temperatur von 37°C und einer Luftfeuchtigkeit von >95 % kultiviert.

2.2.2. Stammzellhaltung und Herkunft der D3-Zelllinie

Es handelt sich bei den für die Versuche verwendeten Stammzellen um embryonale Stammzellen der Maus. Die Bezeichnung D3 entspricht dabei der Wildtyp-Zelllinie, die 1985 von C. Doetschmann etabliert wurde (Doetschmann et al., 1985). Es wurde der Mausstamm 129/Sv verwendet, der sich zur Verwendung für Forschungszwecke bewährt hat (Smith, 1992).

Die zu den Experimenten benötigten, von Mäusen abstammenden embryonalen Stammzellen wurden von der Medizintechnischen Assistentin im Abstand von 2-3 Tagen zur Verhinderung einer zu hohen Zelldichte passagiert. Eine zu hohe Zelldichte hätte eine ungewollte Differenzierung der Stammzellen sowie eine Veränderung ihrer Morphologie auslösen können.

Zur Passage wurde das Medium abgesaugt und die auf dem Boden der Gewebekulturschalen durch eine Feeder-Schicht adhärent gewachsenen Stammzellen mit 5 ml PBS gewaschen. Um anschließend ein Ablösen zu ermöglichen, wurden 2 ml Accutase auf den Zellrasen gegeben. Nach einer Einwirkzeit von drei Minuten im CO₂-Inkubator wurden die Zellen vom Boden der Schalen abgespült. Mit Hilfe einer Pipette wurde hierzu zunächst mit der in der Schale vorhandenen Accutase resuspendiert. Das Accutase-Zell-Gemisch wurde dann in ein mit 9 ml Medium befülltes Röhrchen gegeben und resuspendiert. Nun wurde mit 2 ml Medium aus dem Röhrchen ein

weiteres Mal gespült um sicherzugehen, dass auch alle Zellen aus der Kulturschale aufgenommen und in das Röhrchen gegeben wurden.

Bei 800 U/min und einer Temperatur von 20°C wurde nun 5 Minuten lang zentrifugiert, so dass sich die Stammzellen in Form eines so genannten Pellets auf den Grund des Zentrifugenröhrchens absetzten und das überstehende Medium, welches nun keine Stammzellen mehr enthielt, verworfen werden konnte. Daraufhin wurde das Pellet mit 1 ml Medium kräftig resuspendiert. Ziel war es hierbei eine Einzelzellsuspension zu erhalten, worin Zellen und Medium möglichst homogen verteilt sind. Von diesem Zell-Medium-Gemisch wurden nun 10 µl abpipettiert, in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Zellzahl pro ml Medium unter dem Mikroskop bestimmt.

Nun wurden die Zellen in neue Gewebkulturschalen gegeben, welche zuvor mit einer Feeder-Layer beschichtet worden waren. Hierzu wurden 100.000 Zellen des in 1 ml Medium suspendierten Pellets in die Schale pipettiert und diese mit Medium bis zu einem Gesamtvolumen von 5 ml aufgefüllt. Anschließend wurde das Gemisch mit 5 µl LIF (Leucemia inhibitor factor) versetzt. Durch die Zugabe von LIF bleiben die Stammzellen pluripotent, da LIF eine vorzeitige Zelldifferenzierung verhindert (Vittet et al., 1996). Ein Mediumswechsel mit DMEM-Medium, welches mit 15% FCS versetzt war, erfolgte täglich.

2.2.3. Ansatz der Embryoid Bodies

Herstellung hängender Tropfen

Die Differenzierung der embryonalen Stammzellen erfolgte, wie in Abb.2.1. schematisch dargestellt, über die Ausbildung von Embryo-ähnlichen Stammzellaggregaten, sogenannter „embryoid bodies“ (EBs). Dazu wurden die ES-Zellen zunächst in „hängenden Tropfen“ kultiviert, deren Herstellung es ermöglichte, eine immer gleiche Anzahl an ES-Zellen pro EB (1000 Zellen) zu definieren. Somit konnten die EBs später besser mit einander verglichen werden.

Die hängenden Tropfen zur Herstellung der EBs umfassten ein Volumen von 20 µl und enthielten jeweils 1000 Zellen.

Zunächst wurden die Zellen, wie bei der Passage beschrieben, vom Boden gelöst und pelletiert. Das Zellpellet wurde dann mit 1 ml DMEM-Medium, welches 15% FCS enthielt, resuspendiert, um eine möglichst homogene Einzelzellsuspension zu erhalten. Daraufhin wurden 10 µl der Suspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und

alle Quadrate der zwei Diagonalen sowie ein weiteres beliebiges Kästchen ausgezählt. Optisch nicht mehr dichte ES sowie Feederzellen wurden hierbei nicht mitgezählt. Durch die nun bekannte Anzahl von Stammzellen in 10 µl des resuspendierten Pellets konnte mit Hilfe des Umrechnungsfaktors der Zählkammer (10^4) errechnet werden, wie viel ml des Zellgemischs für eine bestimmte Menge hängender Tropfen benötigt wurde. Hierbei umfasste jeder hängende Tropfen ein Volumen von 20 µl und enthielt 1000 Stammzellen. Wurden zum Beispiel 200 Embryoid Bodies benötigt, erzeugte man 200 hängende Tropfen aus 4 ml Medium, welches 200000 D3-Stammzellen enthielt. Mit einer Multipipette wurden 20 bis 25 Tropfen auf die Innenseite des Deckels einer bakteriologischen Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm pipettiert und der Boden dieser Schale mit 10 ml 0,1 M PBS befüllt um ein Austrocknen der hängenden Tropfen zu verhindern.

Um den Stammzellen zu ermöglichen sich zu Aggregaten zusammenzufinden, wurden sie 2 Tage lang inkubiert.

Abspülen der hängenden Tropfen

Die entstandenen EBs wurden nach der zweitägigen Inkubationszeit mit 10 ml 15%igem DMEM abgespült und in eine neue bakteriologische Gewebekulturschale von 10 cm Durchmesser überführt. Um die Embryoid Bodies gleichmäßig in den 10 ml Medium zu verteilen, wurden die Schalen 8-förmig geschwenkt. Nun konnten die EBs drei weitere Tage lang im Brutschrank bei 37°C wachsen.

Gelatinebeschichtung der 4-Well-Platten

In jedes Well einer 4-Well-Platte wurde ein Glasplättchen von 12 mm Durchmesser gelegt, um den Embryoid Bodies eine Anheftungsmöglichkeit zu bieten. Dieses Glasplättchen wurde nun mit 0,5 ml einer 0,1%igen Gelatinelösung bedeckt. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37°C im Brutschrank.

Plattieren der Embryoid Bodies

Nach drei Tagen in Suspension, also am 6. Tag seit Herstellen der hängenden Tropfen, wurden die EBs plattiert. Hierfür wurde zunächst die Gelatine auf den Glasplättchen abgesaugt. Dann wurde jedes Well der 4-Well-Platten mit 0,5 ml 15%igem DMEM befüllt. Hierbei enthielt das Medium das jeweilige Designersteroid, bzw. Testosteron in entsprechender Konzentration. Nur die Negativ-Kontrolle erhielt Medium ohne

zugewetztem Steroid. Anschließend wurde jeweils ein EB mit Hilfe einer Pipette aus der Suspension gesaugt und in die Mitte eines mit Gelatine beschichteten Glasplättchen pipettiert. Nach 2-3 Tagen waren die EBs adhärennd gewachsen. Der Mediumswechsel erfolgte alle 3-4 Tage.

Fixierung der Embryoid Bodies

Die Fixierung der EBs fand jeweils nach 3, 6, 9 und 12 Tagen statt. Hierzu wurde zunächst das Medium abgesaugt und jedes Well mit 0,5 ml 4%igem Paraformaldehyd (PFA) befüllt. PFA diente hier als Fixierlösung. Nach 25-minütigem Einwirken wurde jedes Well einmal mit 0,5 ml PBS gewaschen und ein weiteres Mal mit PBS gefüllt. So konnten die EBs maximal sieben Tage lang im Kühlschrank aufbewahrt werden, bis eine Immunhistochemie durchgeführt wurde.

Preparing of Embryoid Bodies

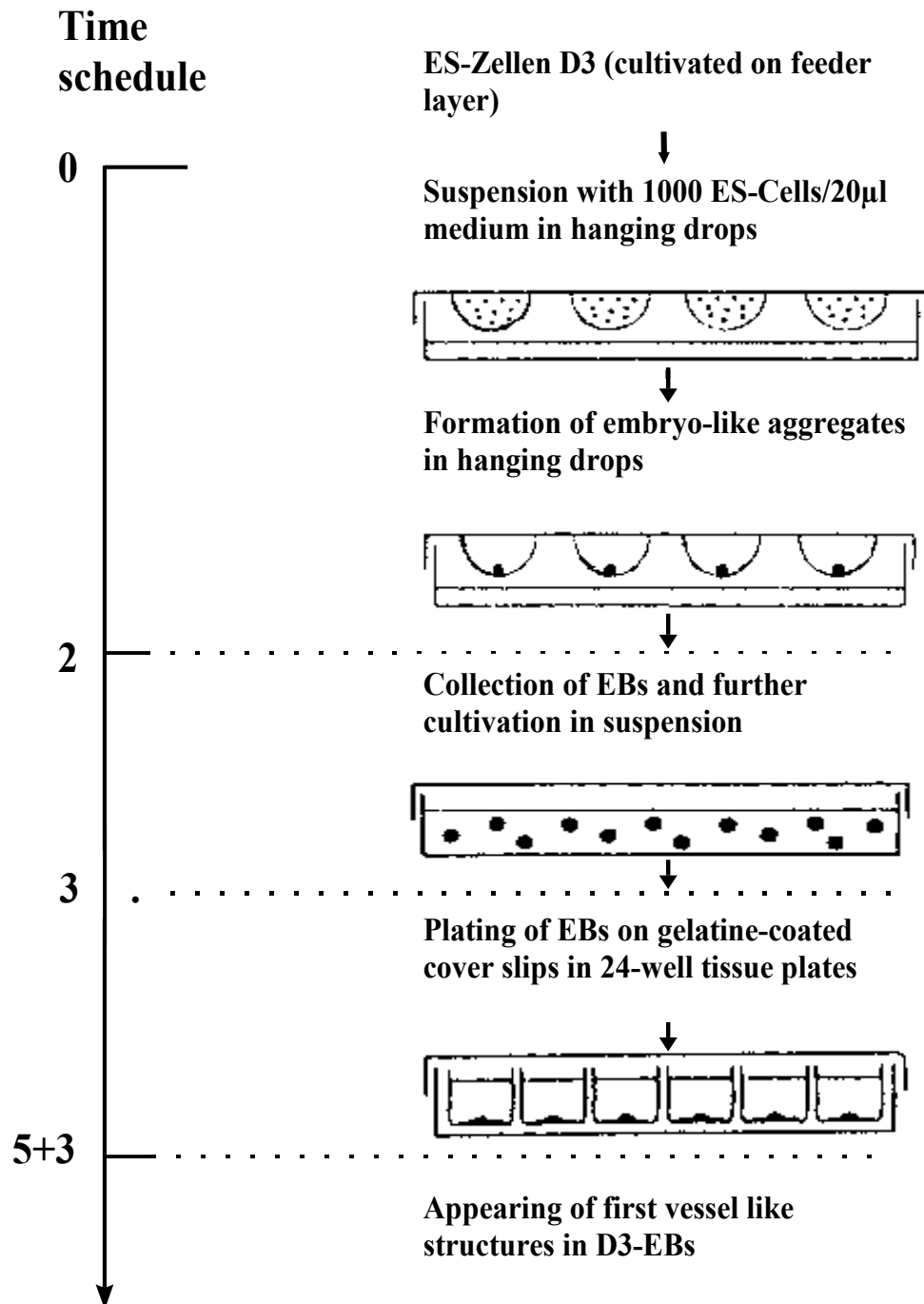


Abb.2: Herstellung von Embryoid Bodies

2.2.4. Behandlung der Zellen mit Steroiden

Für die Behandlung mit den Steroiden, sowie zur Kontrolle, wurden embryonale Stammzellen verwendet, die in einem CO₂-Inkubator in Suspension aufbewahrt und alle zwei bis drei Tage passagiert wurden. Ab dem Zeitpunkt des Plattierens wurden sie mit Steroiden behandelt. Um zu erreichen, dass die Steroide auf die EBs wirken konnten, wurden sie dem DMEM-Medium (mit 15% FCS) zugefügt. Hierbei wurden die Steroide in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt:

Norbolethon: 3,16 ng/ml; Molarität: 316 g/mol

Tetrahydrogestrinon: 3,12 ng/ml; Molarität: 312 g/mol

Zur Kontrolle wurden zwei weitere Ansätze durchgeführt. Hierfür gab eine Versuchsreihe mit Testosteron als endogenem Steroid, welches in einer Konzentration von 3 ng/ml verwendet wurde.

Des Weiteren wurde eine Kontrollreihe angesetzt, der reines Medium ohne Steroidzusätze zugegeben wurde.

Zwei Tage nach dem Ansatz der hängenden Tropfen wurden die Zellaggregate in eine Suspension überführt, in der sie weitere drei Tage lang wuchsen. Danach wurden sie plattiert und alle drei Tage erfolgte ein Mediumswechsel. Auch hierbei enthielt das Medium immer den entsprechenden Gehalt an Steroiden.

Um zu verhindern, dass sich die EBs weiter differenzierten, wurden sie nach 3, 6, 9 und 12 Tagen mit 4-%iger PFA-Lösung fixiert. Anschließend wurde eine Immunhistochemie durchgeführt.

2.2.5. Feederzellen

Kultivierung der Feederzellen

Um den embryonalen Stammzellen eine Anheftung zu ermöglichen, wurde der Boden der Gewebekulturschalen mit einer inaktivierten Feederlayer bedeckt. Dies ist eine Zellschicht aus Fibroblasten, die eine Anheftungsgrundlage für embryonale Stammzellen darstellt. Des Weiteren produzieren die Feederzellen LIF (Leucemia inhibitor factor), der eine Ausdifferenzierung der pluripotenten Stammzellen verhindert.

Die Feederzellen wurden regelmäßig passagiert. Da ihre Teilungsrate geringer ist als die der Stammzellen, wurden sie nur ein Mal pro Woche passagiert. Ebenso wurde ein Mal pro Woche das Medium gewechselt. Hierfür wurde DMEM-Medium mit 10% FCS benutzt.

Medium für Feederzellen:

Das Feederzellmedium unterschied sich vom Stammzellmedium dadurch, dass dem Feederzellmedium lediglich 10% FCS beigemischt wurde.

Das FCS wurde bereits hitzeinaktiviert gekauft.

Gewinnung von Feederzellen durch Präparation von Mäuseembryonen:

Um Feederzellen zu gewinnen, wurden Mäuse benötigt, die seit 14-16 Tagen trächtig waren. Ihnen wurde, nachdem sie getötet worden waren, der Uterus entfernt und dieser anschließend in eine Petrischale mit 0.1 M PBS gegeben. Anschließend wurden die Embryonen aus Uterus und Fruchtblase der Mäuse präpariert, woraufhin sie in eine saubere, mit PBS gefüllte Petrischale gegeben wurden. Den Embryonen wurde nun der Thorax eröffnet und die Organe entfernt. Um Blutgerinnsel aus ihren Rümpfen zu entfernen wurden sie, nach Entfernen ihres Kopfes, in eine Petrischale mit 0.1% Trypsin und 0.02% EDTA überführt. Daraufhin wurden sie in einer weiteren mit Trypsin und EDTA gefüllten Petrischale mit Skalpellen zerkleinert. Nach einer Homogenisierung wurde die erhaltene Zellsuspension durch ein Sieb filtriert. Nun wurde diese auf Gewebekulturschalen mit einem Durchmesser von 10 cm verteilt. Die Schalen waren mit DMEM-Medium (mit 10% FCS) gefüllt worden.

Feederzell-Inaktivierung

Um eine Schicht aus Feederzellen als Adhäsionsgrundlage für embryonale Stammzellen zu erhalten, wurden ungefähr 1-1.5 Millionen dieser Feederzellen in eine Gewebekulturschale (6 cm) gegeben. Die Zellen wurden, nachdem sie adhärent gewachsen waren, für zwei Stunden bei 37°C mit Mitomycin C inkubiert. Mitomycin C ist ein Zellgift, welches die Mitoseaktivität hemmt. Es wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml verwendet. Nachdem die Feederzellen inaktiviert worden waren, wurden sie drei Mal mit 0.1 M PBS gewaschen und mit Medium (mit 10% FCS) bis zu ihrer Verwendung zum Passagieren der embryonalen Stammzellen inkubiert.

2.2.5. Immunhistochemie

Die Immunhistochemie ist eine Methode zur Darstellung von zell- und gewebespezifischen Antigenen, wie Proteine und Enzyme, indem diese mit Hilfe von Antikörpern markiert und über Farbstoffe sichtbar gemacht werden.

Prinzip der Immunhistochemie:

Zu Beginn der Immunhistochemie wurden die Embryoid Bodies zunächst dreimal für jeweils 10 Minuten mit TBS gewaschen. Anschließend wurden sie für 10 Minuten in einem Gemisch aus 0,5 M Ammoniumchlorid, 0,25%igem Triton-X-100 und TBS inkubiert. Das Ammoniumchlorid diente der Demaskierung der Aldehydvernetzungen und verhinderte somit die unspezifische Anlagerung des Antikörpers. Durch Triton-X-100 wurde die Zellmembran permeabilisiert, wodurch den Antikörpern ermöglicht wurde, Antigene im Inneren der Zelle zu binden. Die EBs wurden erneut zweimal für 10 Minuten mit TBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurde 5%iges BSA verwendet, welches auf dem Schüttler mit TBS vermischt wurde. BSA diente als Blockierungslösung, um unspezifische Bindungen aufgrund von Ladungsunterschieden abzusättigen. In einem Ansatz aus 0,8%igem BSA und dem primären Antikörper wurden die EBs bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach dreimaligem Auswaschen des primären Antikörpers erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Ausschluss von Lichteinstrahlung. Die Embryoid Bodies wurden erneut gewaschen (dreimal 10 Minuten). Als Fluorochrom diente Streptavidin Cy3, mit welchem nun noch eine weitere Stunde inkubiert wurde. Danach wurde als letzter Schritt wiederum dreimal mit TBS gewaschen.

Verwendete Antikörper in der Immunhistochemie:

- 1.) Immunhistochemie zur Darstellung der Gefäße und proliferativer Endothelzellen:

Primäre Antikörper:	Anti-PECAM (rat)	in der Verdünnung 1:800
	Anti-Ki67 (rabbit)	in der Verdünnung 1:150
Sekundäre Antikörper:	Goat-anti-rabbit Cy2	in der Verdünnung 1:200
	Goat-anti-rat/biotin	in der Verdünnung 1:400
Fluoreszenzmarker:	Streptavidin Cy3	in der Verdünnung 1:1500

2.) Immunhistochemie zur Darstellung apoptotischer Endothelzellen:

Primäre Antikörper:	PECAM (rat)	in der Verdünnung 1:800
	Anti-PARP (rabbit)	in der Verdünnung 1:250
Sekundäre Antikörper:	Goat anti rat/biotin	in der Verdünnung 1:400
	Goat anti rabbit Cy2	in der Verdünnung 1:200

3.) Immunhistochemie zur Darstellung der Kardiomyozyten:

Primärer Antikörper:	Anti-Alpha-Actinin (mouse)	in der Verdünnung 1:500
Sekundärer Antikörper:	Goat anti mouse Cy2	in der Verdünnung 1:200

Verwendeter Fluoreszenzmarker in der Immunhistochemie:

Streptavidin Cy3	in der Verdünnung 1:1500
------------------	--------------------------

2.2.6. Mikroskopische Beurteilung

Die mikroskopischen Betrachtungen der auf Objektträger gebrachten Embryoid Bodies erfolgten an einem Zeiss Fluoreszenzmikroskop. Für die Bewertung von Anzahl und Morphologie der Gefäßanlagen, sowie für die Bewertung von Anzahl und Größe der Kardiomyozytencluster wurde ein 20-er Objektiv der Firma Zeiss verwendet. Zur Auswertung von Proliferation und Apoptose der Endothelzellen hingegen wurde das 40-er Objektiv der Firma Zeiss benutzt.

Von allen quantitativ ermittelten Ergebnissen wurden Mittelwerte und Standardabweichungen errechnet, welche zum Vergleich in tabellarischer Form und als Diagramm dargestellt wurden.

Anzahl und Morphologie der Gefäßanlagen:

Die Embryoid Bodies wurden mit 200-facher Vergrößerung sowohl quantitativ als auch qualitativ beurteilt. Es wurden alle Gefäße gezählt, die in einem EB gebildet worden

waren. Hierbei wurden alle durch PECAM markierten Endothelzellstränge, die aus mindestens zwei differenzierten Endothelzellen bestanden, als Gefäß gewertet und somit gezählt. Jede Abzweigung eines Gefäßastes wurde hierbei als einzelne Gefäßanlage gewertet.

Aber nicht nur die Anzahl der Gefäße, sondern auch deren Morphologie wurde in die Auswertung miteinbezogen. Hierfür erfolgte eine Beurteilung nach Breite und Länge, morphologischer Beschaffenheit und Reife der Gefäßanlagen (s. Abb.3).

Scoring-Bogen zur Erfassung von EB-Entwicklungsstufen

Bearbeiter

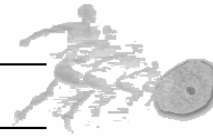
Zelllinien

Projekt

☐ D3 ☐ sonstige:
EB Alter (Tage)

Datum

Behandlung d. Zellen



Angioblasten

Keine	Wenig	Viele

Anzahl

Gefäßquantität

	vorwiegend kurz	kurze und lange	vorwiegend lange	Werte
Länge				
	1	2	3	

	vorwiegend dünn	dünne und dicke	vorwiegend dicke	Werte
Dicke				
	4	8	16	

	wenig	viele	Summe=
Anzahl			/51
	16	32	$S_{qn} =$ %

Gefäßqualität

	Keine	Wenig	Viele	Werte
Zerfetzt				
	0	1	2	
Pflastersteinartig				
	0	3	6	Summe= /80
Netzwerkartig				
	0	9	18	$S_{ql} =$ %
Reife Gefäße				
	0	27	54	Score= %($S_{qn} * S_{ql}$)

EB

	klein	groß
Allgemein		

Anmerkung:

Dr. Annette Schmidt
Abt. f. Zelluläre und Molekulare Sportmedizin
DSHS Köln

Abb.3: Scoring-Bogen zur Erfassung qualitativer Merkmale der EBs

Zur besseren Übersicht der Punktevergabe für qualitative Merkmale dient nachfolgende Tabelle:

Eigenschaft		Beschreibung	Bewertung	Score
Gefäßquantität	Länge	Vorwiegend kurze	1	1
		Kurze und lange	2	2
		Vorwiegend lang	3	3
	Dicke	Vorwiegend dünne	1	4
		Dünne und dicke	2	8
		Vorwiegend dicke	3	12
	Anzahl	Wenig	1	16
		Viel	2	32
Gefäßqualität	Zerfetzt	Nein	0	0
		Wenig	1	1
		Viel	2	2
	Pflaster	Nein	0	0
		Wenig	1	3
		Viel	2	6
	Netzwerk	Nein	0	0
		Wenig	1	9
		Viel	2	18
	Reife	Nein	0	0
		Wenig	1	27
		Viel	2	54

Tab. 1: Statistische Erfassung von Gefäßqualität und -quantität

Die Berechnung des Reifegrades der Gefäßanlagen erfolgte mit folgender Formel:

$$Y = \ln(\text{Score}/(1-\text{Score}))$$

Wie es Abb. 3 zu entnehmen ist, wurden für jeden einzelnen Eb die Qualitätsmerkmale ausgewertet. Dabei teilte man jedem EB jeweils ein Qualitätsmerkmal pro Zeile (siehe Abb. 3) zu. Es musste also entschieden werden, ob eher dünne oder dicke Gefäßtuben vorhanden waren, ob viele oder wenige Angioblasten zu sehen waren, wie die Gefäßstruktur war, ob man viele zerfetzte Gefäße sehen konnte, usw.

Für jede Angabe, und somit für jedes angekreuzte Kästchen wurde dann der in der rechten unteren Ecke des Kästchens angegebene Zahlenwert vergeben. Daraufhin wurden die eingetragenen Werte jeweils für Gefäßquantität und Gefäßqualität summiert und in die in Abb. 3 abgebildeten Formeln eingesetzt. Die Summe der Zahlenwerte für

die Gefäßquantität musste durch 51 (Ergebnis = Sqn), die für Gefäßqualität durch 80 (Ergebnis = Sql) dividiert werden. Durch Einfügen dieser beiden Werte in die Formel:

$$\text{Score} = \% (\text{Sqn} * \text{Sql})$$

wurde der sogenannte Score berechnet, der dann in die oben genannte Formel zur Bestimmung des Y-Wertes ($Y = \ln(\text{Score}/(1-\text{Score}))$) eingesetzt wurde.

Wie es in Abbildung 5 dargestellt ist, wurden auf diesem Weg die Y-Werte der EBs berechnet, die X-Werte stellten das Alter der jeweiligen Embryoid Bodies dar.

Somit ist der Schnittpunkt einer Kurve mit der X-Achse gleichbedeutend mit dem Zeitpunkt, an dem die EBs ihre halbmaximale Reife erlangt haben.

Die Bewertung der qualitativen Merkmale und deren Zurodnung zu einem entsprechenden Zahlenwert ist übersichtlich in Tab. 1 zusammengestellt.

Proliferation der Endothelzellen:

Zur Beurteilung der Proliferation wurde die Anzahl der Ki67-positiven Kerne, welche in 100 Gefäßanlagen eines EBs sichtbar waren, mit 400-facher Vergrößerung bestimmt. Um nur diejenigen Zellkerne zu erfassen, welche sich auch tatsächlich in den Gefäßen befanden, wurde das Prinzip der Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung angewandt. Der PECAM-Antikörper diente zur Markierung der Gefäßanlagen, während mit dem Ki67-Antikörper Zellkerne dargestellt wurden, die sich in Mitose oder noch in der G₁-, S-, oder G₂-Phase, also in Vorbereitung auf eine Zellteilung befanden. Somit konnten einzelne Gefäße unter dem Mikroskop betrachtet werden und die Anzahl der markierten Zellkerne pro Gefäß erfasst werden. Es wurden die proliferativ aktiven Zellkerne in 100 Gefäßen je EB gezählt.

Apoptose der Endothelzellen:

Analog der Bewertung proliferierender Endothelzellen wurde die Anzahl apoptotischer Endothelzellen pro 100 Gefäßanlagen eines EBs bei 400-facher Vergrößerung erfasst. Die Immunfluoreszenz-Doppelmarkierung erfolgte in diesem Fall wiederum mit dem PECAM-Antikörper zur Visualisierung der Gefäßanlagen während die Markierung apoptotischer Endothelzellen durch den Antikörper PARP erfolgte.

Anzahl der Kardiomyozytencluster:

Die EBs zur Auswertung der Kardiomyozytenentwicklung wurden mit einer 200-fachen Vergrößerung betrachtet. Um Cluster von Herzmuskelzellen im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen wurde in der Immunohistochemie ein Anti-Alpha-Actinin als primärer Antikörper und ein Goat-anti-mouse-Cy2 als sekundärer Antikörper verwendet. Da die Kardiomyozytencluster in ihrer Größe sehr variieren, wurden sie in vier Gruppen unterteilt. Entsprechend ihrer längsten Seite wurden sie den Größen 0-500 µm, 500-2000 µm, 2000-3000 µm bzw. > 3000 µm zugeordnet.

Die Einteilung in die vier Gruppen erfolgte mit Hilfe einer Skala. Bei Anlegen der Skala betrug das gesamte Gesichtsfeld einen Durchmesser von 6000 µm.

3. Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob die verwendeten Designersteroidoide Tetrahydrogestrinon (THG) und Norbolethon Veränderungen in der Gefäßbildung, bei Proliferation und Apoptose von Endothelzellen und in der Ausdifferenzierung von Kardiomyozyten hervorrufen. Hierzu wurden sowohl quantitative als auch qualitative Merkmale untersucht. Zum Vergleich dienten zwei Gruppen: zum einen gab es eine Kontrollgruppe, die reines Medium ohne den Zusatz von Steroiden erhielt und zum anderen eine Gruppe von Embryoid Bodies (EBs), die mit Testosteron als körpereigenem Steroid behandelt wurden.

Alle in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden am Modell des Embryoid Body durchgeführt. Es wurden pluripotente embryonale Stammzellen der Zelllinie D3 verwendet. Um die verschiedenen Entwicklungsstufen beurteilen und mit einander vergleichen zu können, wurden die EBs zu unterschiedlichen Zeitpunkten in ihrer Differenzierung gestoppt. Die erste Gruppe wurde nach 5+3, die zweite nach 5+6, die dritte nach 5+9 und die letzte Gruppe nach 5+12 Tagen fixiert.

Alle EBs wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, sodass die Embryoid Bodies im Folgenden unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden konnten. Es wurden von jeder Gruppe vier repräsentative Embryoid Bodies ausgesucht und ausgewertet. Bei den beschriebenen Werten für jede Gruppe handelt es sich immer um den Mittelwert aus den jeweils vier untersuchten EBs.

Die statistische Testung wurde in dem Programm Excel mit Hilfe des Student's t-Tests für ungepaarte Proben durchgeführt. Es galten alle Werte als statistisch signifikant, die einen p-Wert $< 0,05$ hatten.

3.1. Vaskularisation

Dieser Versuchsansatz diente dazu, Aussagen über die Auswirkungen von Tetrahydrogestrinon und Norbolethon auf die Ausbildung von Gefäßanlagen im Embryoid Body zu ermöglichen.

3.1.1. Anzahl der Gefäßanlagen

Kontrollgruppe:

Bei der Kontrollgruppe konnte mit zunehmendem Alter der EBs ein stetiger Zuwachs an Gefäßen vermerkt werden. Während im Alter von 5+3 Tagen durchschnittlich $129 \pm 67,69$ Gefäße in jedem Embryoid Body vorhanden waren, so waren es im Alter von 5+6 Tagen bereits 173,5 Gefäße. Nach 5+6 Tagen war auch die Standardabweichung mit 14,66 Gefäßen geringer als in der Altersgruppe 5+3. Nach 5+9 Tagen lag die Anzahl der Gefäße bei $205,3 \pm 45,93$ und im Alter von 5+12 Tagen waren es schließlich $241 \pm 37,55$ Gefäße pro EB. In der Altersgruppe 5+3 waren somit die größten Schwankungen in der Gefäßanzahl zu beobachten. Dies zeigte sich in der hohen Standardabweichung von 52% (Abb. 4).

Testosteron:

Unter der Behandlung der Zellen mit Testosteron konnte in den ersten beiden Entwicklungsstufen ein größerer Gefäßzuwachs als bei der Kontrollgruppe beobachtet werden. Bei den letzten beiden Altersklassen, 5+9 und 5+12, nahm die Gefäßmenge jedoch wieder stetig ab, sodass sie im Alter von 5+12 Tagen unterhalb der Anzahl der Gefäße der Kontrollgruppe lag.

Am Tag 5+3 wurden im Mittel $141,8 \pm 109,2$ Gefäße gezählt, in der nächsten Entwicklungsstufe 5+6 waren es schon 270,8 Gefäße, und somit mehr als bei der Kontrollgruppe in dem ganzen Zeitraum von 12 Tagen gefunden wurde. Allerdings lag hier auch die Standardabweichung mit 133,4 sehr hoch. Aufgrund der hohen Standardabweichungen konnten die Werte der Altersklassen 5+3 und 5+6 somit nicht als signifikant gewertet werden. Zu dem Zeitpunkt 5+9 Tage kam es zu einem signifikanten Rückgang auf $107,5 \pm 60,64$ Gefäße pro EB. Hier ist also eine deutliche Abnahme zwischen dem Zeitpunkt 5+6 und 5+9 Tage zu verzeichnen. Nach 5+12

Tagen war die Gefäßmenge auf $160,5 \pm 107,4$ Gefäße angestiegen und lag somit unterhalb des Niveaus der Kontrollgruppe zum gleichen Zeitpunkt (Abb. 4).

Tetrahydrogestrinon (THG):

Wie es in Abb. 4 zu sehen ist konnten unter dem Einfluss von THG bei der frühesten Entwicklungsstufe vergleichsweise wenige Gefäße verzeichnet werden. So waren es nach 5+3 Tagen nur 36 Gefäße pro EB. Mit einer Standardabweichung von 60,17 lag dieser Wert im statistisch signifikanten Bereich. In den darauf folgenden Tagen kam es jedoch zu einer enormen Zunahme an Gefäßen. Im Alter von 5+6 Tagen war es zu einem signifikanten Anstieg auf $519,25 \pm 33,45$ Gefäße gekommen. Nach drei weiteren Tagen konnten $1067,25 \pm 371,7$ Gefäße und nach 5+12 Tagen $1143 \pm 292,5$ Gefäße pro EB gezählt werden. Die letzten beiden Altersgruppen waren somit ebenfalls als statistisch signifikant zu werten.

Norbolethon:

Das Designersteroid Norbolethon zeigte vor allem in den frühen Entwicklungsphasen sehr starke Auswirkungen auf das Gefäßwachstum. Die Anzahl der Gefäße in den mit Norbolethon behandelten EBs lag in den ersten drei Stadien über der Gefäßanzahl in den Kontroll- und Testosteron-Ansätzen, sank jedoch nach 5+9 Tagen wieder merklich ab (Abb. 4).

Nach 5+3 Tagen wurde eine signifikante Anzahl von $348 \pm 39,27$ Gefäße gezählt und nach 5+6 Tagen war der Mittelwert bereits auf $872,25 \pm 264,7$ Gefäße gesteigert. In den folgenden Tagen fiel die Gefäßanzahl jedoch wieder signifikant ab, so dass im Alter von 5+9 Tagen $629,5 \pm 170,6$ Gefäße ermittelt wurden. Nach 5+12 Tagen kam es zu einer weiteren Reduktion auf $186,5 \pm 67,93$ Gefäße, die jedoch nicht statistisch signifikant ist. Des Weiteren ist es interessant nicht nur das jeweilige Steroid mit der Kontroll- und Testosterongruppe zu vergleichen, sondern zusätzlich auch die beiden Designersteroiden in ihren Auswirkungen auf die Gefäßbildung in vitro zu vergleichen. Dies ist in Abb. 4 veranschaulicht.

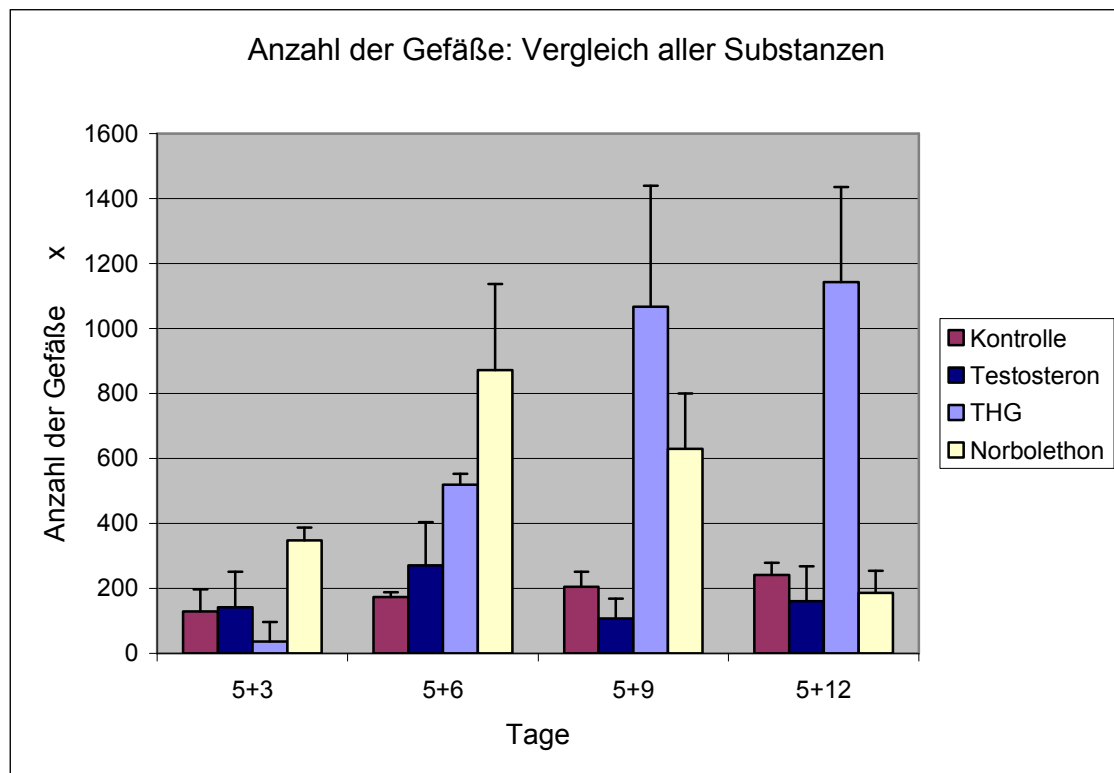


Abb. 4: Anzahl der Gefäße: Kontrolle, Testosteron, THG, Norbolethon

3.1.2. Qualität der Gefäßanlagen

Ziel dieser Untersuchung war es herauszufinden, ob die Steroide neben ihren Auswirkungen auf die Gefäßquantität auch Effekte auf die Qualität der Gefäßanlagen haben. Um darüber Aussagen treffen zu können wurde jeder EB, bei dem auch die Gefäßanzahl ausgezählt worden war, folgendermaßen beurteilt: es wurde notiert, ob es sich bei den Gefäßen um eher lange oder kurze, dicke oder dünne handelte. Des Weiteren wurde untersucht, ob es sich um vorwiegend pflastersteinartig angelegte oder ob es sich um eher reife Gefäßanlagen handelte, ob sich netzwerkartige Gefäßstrukturen ausgebildet hatten oder ob die Gefäße versprengt im EB verteilt waren. Außerdem wurde vermerkt, ob viele Angioblasten im EB zu sehen waren, und wenn ja, ob diese clusterförmig oder in größeren Flächen angeordnet waren, oder ob diese einzeln verteilt zu sehen waren.

In den Abbildungen 6-8 sind beispielhaft Gefäße mit verschiedenen Qualitätsmerkmalen gezeigt.

Die Berechnung des Reifegrades der Gefäßanlagen erfolgte mit folgender Formel:

$$Y = \ln(\text{Score}/(1-\text{Score}))$$

Wie bereits im Kapitel Material und Methoden beschrieben und wie es außerdem Abb. 3 zu entnehmen ist, wurde für jedes angekreuzte Kästchen der in der rechten unteren Ecke des Kästchens angegebene Zahlenwert vergeben. Dann wurden die Zahlen nach den in Abb. 3 genannten Formeln summiert und daraus ein Zahlenwert, der so genannte Score, berechnet, der dann in die oben genannte Formel eingesetzt wurde.

Die Zahlen wurden statistisch getestet und in folgender Graphik wiedergegeben:

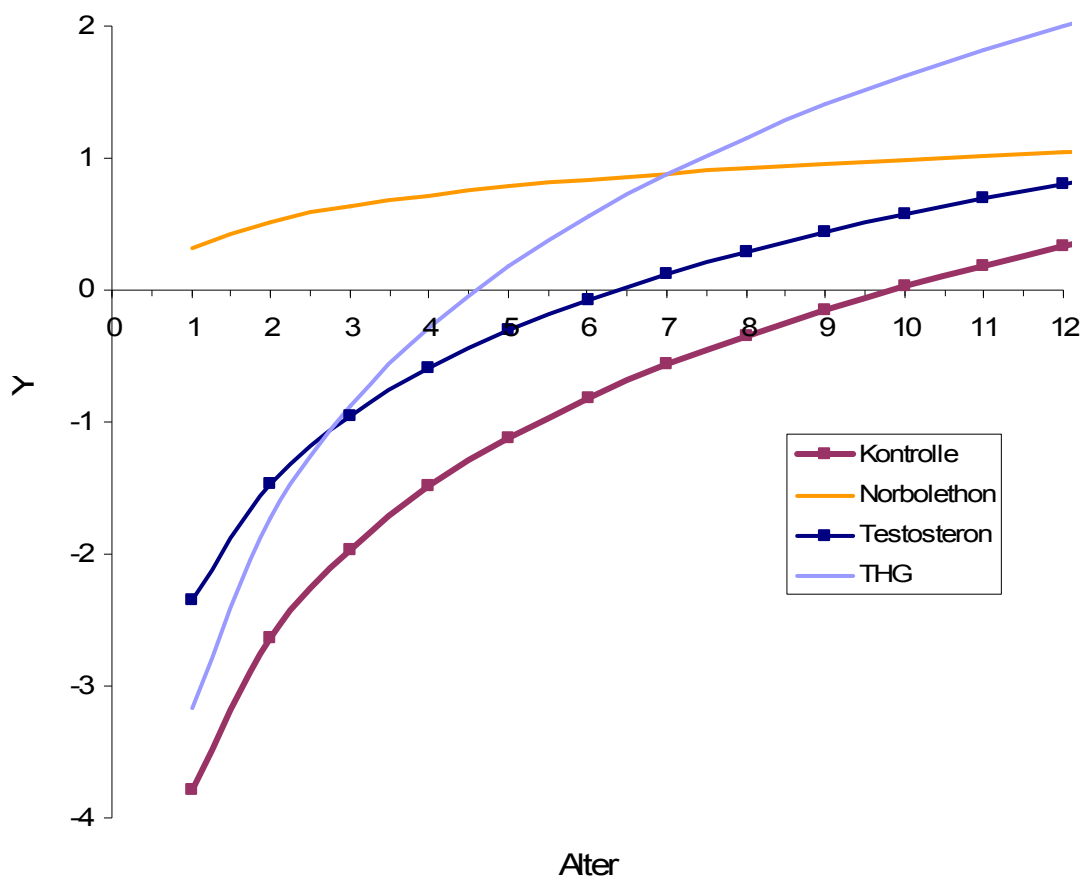


Abb. 5: Darstellung der Reife der Gefäßanlagen

Dabei entspricht die x-Achse dem Alter der EBs und die y-Achse dem Reifungsgrad der Gefäßanlagen. Von Bedeutung ist hierbei der Schnittpunkt der Kurve mit der x-Achse: an diesem Punkt hat der EB seine halbmaximale Reifung erreicht. Somit ist es gut möglich die Entwicklung in der Reife der einzelnen EBs direkt mit einander zu vergleichen.

Kontrolle:

Bei der Kontrollgruppe waren in allen Altersstufen nur wenige Angioblasten zu finden. Es gab auch kaum flächen- oder clusterförmige Anordnungen der Angioblasten. Die Gefäße waren anfangs (5+3 Tage) noch dünn und vorwiegend kurz, in den weiteren Altersklassen waren dann jedoch zusätzlich noch dicke und lange Gefäße zu finden. Auffällig war, dass sich von Beginn an netzwerkartige Strukturen formierten und selbst zu dem Zeitpunkt 5+3 Tage schon große Netzwerke zu erkennen waren. Dementsprechend gab es auch nur sehr wenige „zerfetzte“ Gefäße. Wie aus der Graphik abzulesen ist, hatten die EBs der Kontrollgruppe ihre halbmaximale Reife nach durchschnittlich 9,8 Tagen erreicht.

Testosteron:

Bei dem endogenen Steroid Testosteron waren in den Altersklassen 5+3 bis 5+9 viele Angioblasten zu sehen, nach 5+12 Tagen waren es jedoch nur noch wenige Angioblasten. Die vorhandenen Angioblasten waren bei allen Embryoid Bodies in Flächen und Clustern angeordnet. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren somit mehr Angioblasten vorhanden und diese im Gegensatz zur Kontrollgruppe auch zu Clustern formiert.

Die Gefäße waren bei allen vier Altersstufen in allen Ausprägungen zu finden (dick, dünn, lang, kurz). Insgesamt waren viele zerfetzte Gefäße, allerdings – anders als bei der unbehandelten Gruppe- nur wenige netzwerkartig aufgebaute Gefäße sichtbar. Interessant ist auch, dass die EBs ihre halbmaximale Entwicklung unter der Einwirkung von Testosteron bereits nach 6,3 Tagen erreicht hatten.

THG:

Unter der Zugabe von Tetrahydrogestrinon zeigten sich in den aufeinander folgenden Altersklassen wechselnd viele und wenige Angioblasten (5+3 und 5+12: wenige, 5+6

und 5+9: viele Angioblasten). Bei den EBs mit vielen Angioblasten waren diese auch flächen- und clusterförmig angeordnet, bei den EBs mit nur wenigen Angioblasten waren demnach auch nur wenige Flächen- und Clusterformen zu sehen.

Zu den ersten drei Zeitpunkten waren mehr dünne als dicke Gefäße vorhanden, was sich zum Zeitpunkt 5+12 Tage aber ausgeglichen hatte. Es hatten sich insgesamt sowohl lange als auch kurze Gefäße mit Netzwerkstrukturen, aber auch viele zerfetzte Gefäße gebildet.

Die EBs dieser Untersuchungsgruppe erreichten ihre halbmaximale Reifung schon nach durchschnittlich 4,6 Tagen.

Norbolethon:

In dieser Gruppe waren anfangs viele Angioblasten zu finden, nach 5+9 Tagen waren es nur noch wenige und nach 5+12 Tagen waren keine Angioblasten mehr zu sehen. Insgesamt hatten sich nur wenige Flächen und Cluster ausgebildet. Anfangs waren die Gefäße noch dünn, ab dem Zeitpunkt 5+6 waren aber dicke und dünne Gefäße zu verzeichnen. Diese waren auch sowohl lang als auch kurz. Durch alle Altersklassen hindurch waren große Gefäßnetzwerke zu sehen. Zu den Zeiten 5+3 und 5+12 gab es nur wenige zerfetzte Gefäße zu vermerken, bei den mittleren Altersklassen waren es allerdings viele zerfetzte Gefäße.

Wie es Abb. 5 zu entnehmen ist, war die Reifung der Gefäße unter dem Einfluss von Norbolethon deutlich gestört.

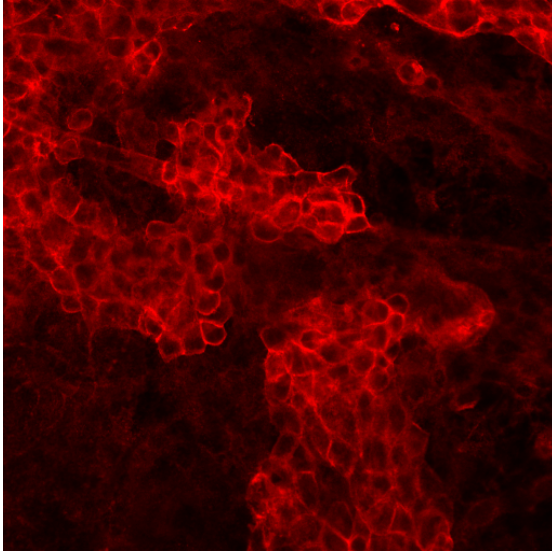


Abb. 6: Clusterförmige Anordnung von Angioblasten

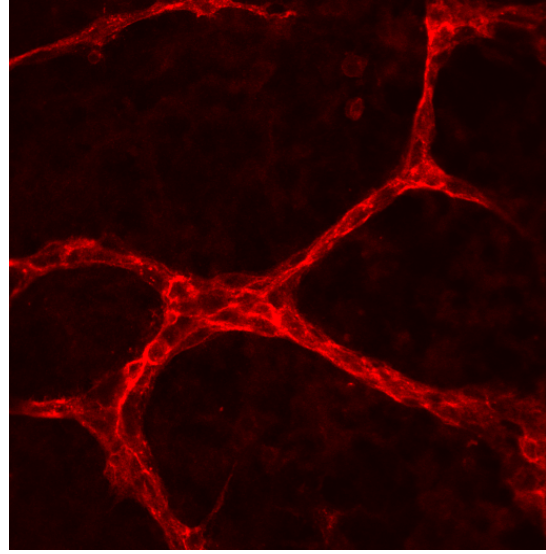


Abb.7: Ausbildung eines noch pflastersteinartig angelegten Gefäßnetzwerkes

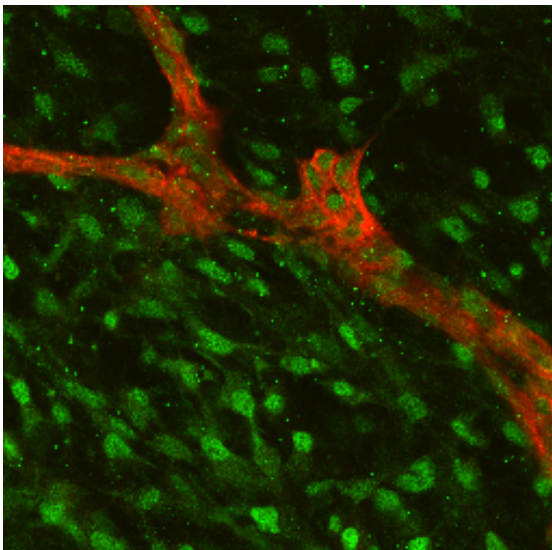


Abb. 8: Reifere Gefäßanlage mit ersten Aufzweigungen

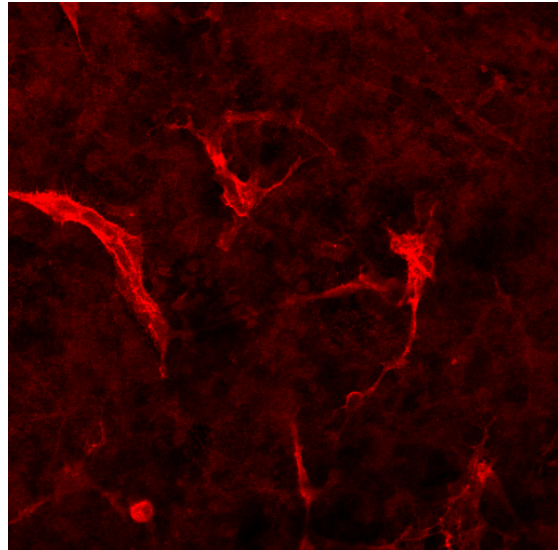


Abb. 9: „Zerfetzte“ Gefäße ohne Ausbildung eines Gefäßnetzwerkes

3.2. Proliferation und Apoptose

Proliferation und Apoptose in ausdifferenzierten Zellen und das Proliferationspotential von Vorläuferzellen bestimmen die Zellhomöostase und Regenerationsfähigkeit des Gefäßsystems. In dieser Versuchreihe wurden Proliferation und Apoptose von Endothelzellen direkt untersucht und mit einander verglichen, um Aussagen darüber treffen zu können in wiefern die Designersteroidoide auch hier Einfluss nehmen. Es sollte gezeigt werden ob THG und Norbolethon die Fähigkeiten des Gewebes, sich zu erneuern und in den programmierten Zelltod zu gehen, im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur Testosterongruppe verändern.

3.2.1. Proliferation:

Bei dieser Versuchsreihe ging es darum herauszufinden, ob die verwendeten Designersteroidoide THG und Norbolethon Einfluss auf die Endothelzellproliferation, d. h. auf das schnelle Wachstum der am Gefäßaufbau beteiligten Endothelzellen, nehmen. Hierbei diente der PECAM-Antikörper dazu die Gefäßanlagen darzustellen, während der Antikörper Ki67 die Anfärbung derjenigen Zellkerne ermöglichte, die sich gerade in Mitose oder in Vorbereitung auf eine Zellteilung befanden. Hierzu wurde pro Embryoid Body die Anzahl der Ki67-positiven Endothelzellen bestimmt, die in 100 Gefäßanlagen vorhanden waren. Zum Vergleich dienten auch hier eine Kontrollgruppe und eine mit Testosteron behandelte Gruppe.

Kontrolle:

In der Kontrollgruppe kam es zu einer mit zunehmender Zeit abfallenden Anzahl an proliferierenden Endothelzellen, die jedoch zum späten Zeitpunkt 5+12 wieder leicht anstieg. Zum Zeitpunkt 5+3 waren es $8,5 \pm 7,55$ gezählte Endothelzellen in 100 Gefäßen. Diese Zahl sank nach weiteren drei Tagen auf $6,5 \pm 5,26$. Neun Tage nach Ausplattieren der EBs waren es nur noch $3 \pm 2,58$ proliferierende Endothelzellen, 12 Tage nach Ausplattieren stieg die Zahl jedoch wieder auf $7 \pm 3,46$ markierte Zellen pro 100 Gefäße. Einen Überblick verschaffen hierbei Abb. 10 und Abb. 11.

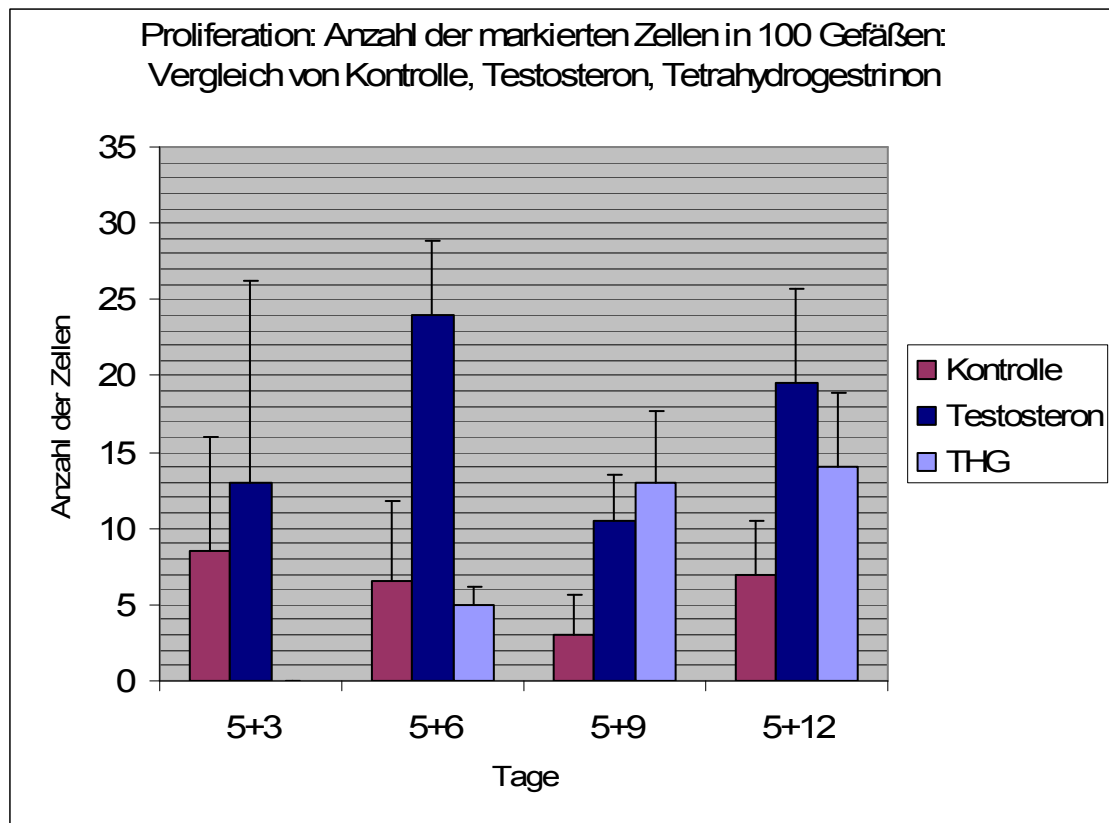


Abb. 10: Proliferation: Vergleich von Kontrolle, Testosteron und THG

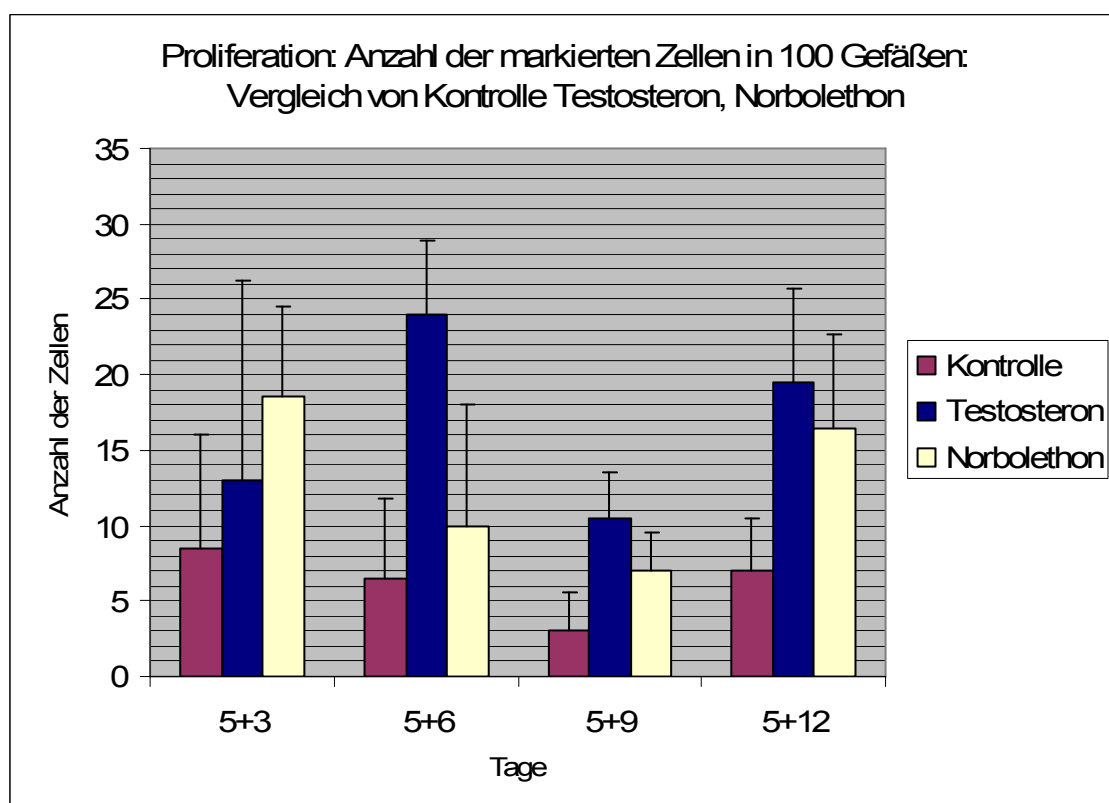


Abb. 11: Proliferation: Kontrolle, Testosteron und Norbolethon

Testosteron:

Unter Einfluss von Testosteron waren zu jedem Zeitpunkt mehr proliferierende Endothelzellen zu vermerken als in der Kontrollgruppe.

Drei Tage nach Ausplattieren der EBs lag hierbei die Anzahl der gezählten Endothelzellen mit einem Mittelwert von 13 und einer Standardabweichung von 13,22 nicht im statistisch signifikanten Bereich. Zu dem Zeitpunkt 5+6 lag der Mittelwert bei 24 und ist mit einer Standardabweichung von 4,9 als statistisch signifikant zu werten. Statistisch signifikant sind auch die gezählten Zellzahlen zu den folgenden Zeitpunkten: nach 5+9 Tagen waren es $10,5 \pm 3$ und nach 5+12 Tagen $19,5 \pm 6,19$ proliferierende Endothelzellen in 100 Gefäßen (siehe auch Abb. 10 und Abb. 11).

Tetrahydrogestrinon:

Unter der Zugabe von THG kam es zu einer konstant steigenden Anzahl an proliferativen Endothelzellen. Bei den ersten beiden untersuchten Zeitpunkten waren es noch weniger proliferierende Endothelzellen als in der Kontrollgruppe, dies änderte sich danach jedoch zugunsten von THG. Im Vergleich mit der Testosterongruppe lagen die Zahlen von THG jedoch mit Ausnahme des Zeitpunktes 5+9 immer unterhalb der Zahlen der Testosterongruppe. Bezogen auf die Kontrollgruppe liegen in der THG-Gruppe jedoch nur die letzten beiden Werte (5+9 und 5+12) im statistisch signifikanten Bereich.

Nach 5+3 Tagen waren noch keine markierten Endothelzellen zu finden. Nach 5+6 Tagen waren es $5 \pm 1,16$ proliferierende Endothelzellen, drei Tage später war die Anzahl auf $13 \pm 4,76$ angestiegen. Zum spätesten Zeitpunkt 5+12 wurden $14 \pm 4,9$ markierte Endothelzellen gezählt. Zur Übersicht dient Abbildung 10.

Norbolethon:

Das Steroid Norbolethon bewirkte in den EBs eine zu Beginn und Ende hohe, zwischendurch allerdings abfallende Proliferationsrate. Die Werte liegen mit Ausnahme des zu dem Zeitpunkt 5+6 ermittelten Wertes im Vergleich zur Kontrollgruppe im statistisch signifikanten Bereich.

Verglichen mit den Werten der Kontrollgruppe kam es unter der Gabe von Norbolethon zu einer erhöhten Anzahl an proliferativ aktiven Endothelzellen. Verglichen mit Testosteron lagen die Werte unter Norbolethon-Einfluss jedoch nur zum Zeitpunkt 5+3

über denen der Testosteron-Gruppe. An drei von vier Zeitpunkten lagen die Norbolethon-Werte jedoch deutlich über den Werten der Tetrahydrogestrinon-Gruppe. Drei Tage nach Ausplattieren der Embryoid Bodies konnten bereits $18,5 \pm 5,97$ proliferative Endothelzellen detektiert werden. Zum Zeitpunkt 5+6 war die Anzahl der markierten Endothelzellen jedoch auf 10 ± 8 , nach weiteren drei Tagen auf $7 \pm 2,58$ gefallen. Daraufhin kam es wieder zu einem Anstieg, sodass die Zahl der in der Proliferationsphase befindlichen Endothelzellen zum Zeitpunkt 5+12 bei $16,5 \pm 6,19$ lag.

Die Werte sind in Abbildung 11 zusammengefasst.

3.2.2. Apoptose:

Analog dem Proliferationsversuch sollte hier ermittelt werden, inwiefern die Designersteroidoide den programmierten Zelltod (Apoptose) beeinflussen. Dafür wurden die Endothelzellen mit dem Antikörper anti-PARP markiert und wie bei dem Proliferationsversuch wurde auch hier die Anzahl der PARP-positiven Endothelzellen in hundert Gefäßen in jedem EB ausgezählt. Wenn die Daten von Apoptose und Proliferation vergleichend betrachtet werden, so können daraus Informationen darüber gewonnen werden, welcher Mechanismus zum entsprechenden Zeitpunkt überwiegt.

Kontrolle:

Unter Kontrollbedingungen konnte im Mittel nur eine apoptotische Endothelzelle zu dem Zeitpunkt 5+3 nachgewiesen werden. Die Standardabweichung lag hierbei bei 1,16. Zu allen anderen Zeitpunkten waren in dieser Gruppe keine apoptotisch aktiven Endothelzellen zu sehen. Da die Anzahl der Gefäße in dieser Gruppe auch stetig gestiegen war ist hier von einem starken Überwiegen der Proliferationstendenz auszugehen (siehe Abb. 12 und Abb. 13).

Testosteron:

Unter der Wirkung von Testosteron zeigten sich hier in den verschiedenen Altersstufen unterschiedlich viele apoptotische Endothelzellen. Zu den Untersuchungszeitpunkten 5+3 und 5+9 waren es jeweils $4 \pm 3,651$ apoptotische Zellen, wobei beide Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht im statistisch signifikanten Bereich liegen. Im Alter von 5+6 Tagen konnten im Durchschnitt $7,5 \pm 1,92$, im Alter von 5+12 Tagen konnten

$6,5 \pm 1$ apoptotische Endothelzellen gezählt werden. Diese beiden Werte lagen mit p-Werten von 0,002 (5+6) und 0,000 (5+12) im statistisch signifikanten Bereich. Auch hier lag die Anzahl der apoptotischen Endothelzellen zu jedem Zeitpunkt unter der der proliferierenden Endothelzellen. Einen Überblick verschaffen Abb. 12 und Abb. 13.

Tetrahydrogestrinon:

In dieser Gruppe kam es mit zunehmender Zeit zu einem Zuwachs an apoptotischen Endothelzellen, obgleich nur maximal 4,5 markierte Endothelzellen in 100 Gefäßen zu verzeichnen waren.

Zum Zeitpunkt 5+3 wurden $2 \pm 2,83$ apoptotisch aktive Endothelzellen gezählt. Im Alter von 5+6 Tagen waren es $3 \pm 3,83$, im Alter von 5+9 Tagen waren es $4,5 \pm 1$ apoptotische Endothelzellen. Die Anzahl blieb im Mittel mit $4,5 \pm 3,79$ markierten Endothelzellen konstant.

Die Werte liegen somit höher als die der Kontrollgruppe. Wie es in Abb. 11 zu erkennen ist, war es unter der Einwirkung von THG jedoch auch zu einer um das Vielfache gesteigerten Gefäßanzahl im Vergleich zur Kontrolle gekommen. Insgesamt überwiegt auch hier die proliferative Tendenz. Die zu den Zeitpunkten 5+9 und 5+12 ermittelten Werte liegen hierbei im Vergleich mit der Kontrollgruppe im Signifikanzbereich (Abb. 12).

Norbolethon:

Unter Einwirkung von Norbolethon kam es zu abwechselnd zunehmenden und abfallenden Anzahlen an apoptotischen Endothelzellen. Diese bewegten sich im Rahmen von 4,5 bis 7,5, also oberhalb der Werte der Kontrollgruppe, jedoch insgesamt auch hier unterhalb der Werte der proliferativen Endothelzellen. Zum frühen Zeitpunkt 5+3 konnten $5 \pm 4,163$, zum Zeitpunkt 5+6 nur $4,5 \pm 3,416$ apoptotische Endothelzellen gezählt werden. Bei den beiden späteren Zeitpunkten 5+9, bzw. 5+12 lagen die Werte bei $7,5 \pm 7,188$, bzw. bei $6 \pm 2,309$ apoptotisch aktiven Endothelzellen pro 100 Gefäßanlagen.

Die Werte der Zeitpunkte 5+6 und 5+12 lagen hierbei mit p-Werten von 0,039 und 0,007 im statistisch signifikanten Bereich.

In Abbildung 13 können die Ergebnisse der Norbolethon-Gruppe im Vergleich zur Kontroll- und Testosteron-Gruppe etwas anschaulicher betrachtet werden.

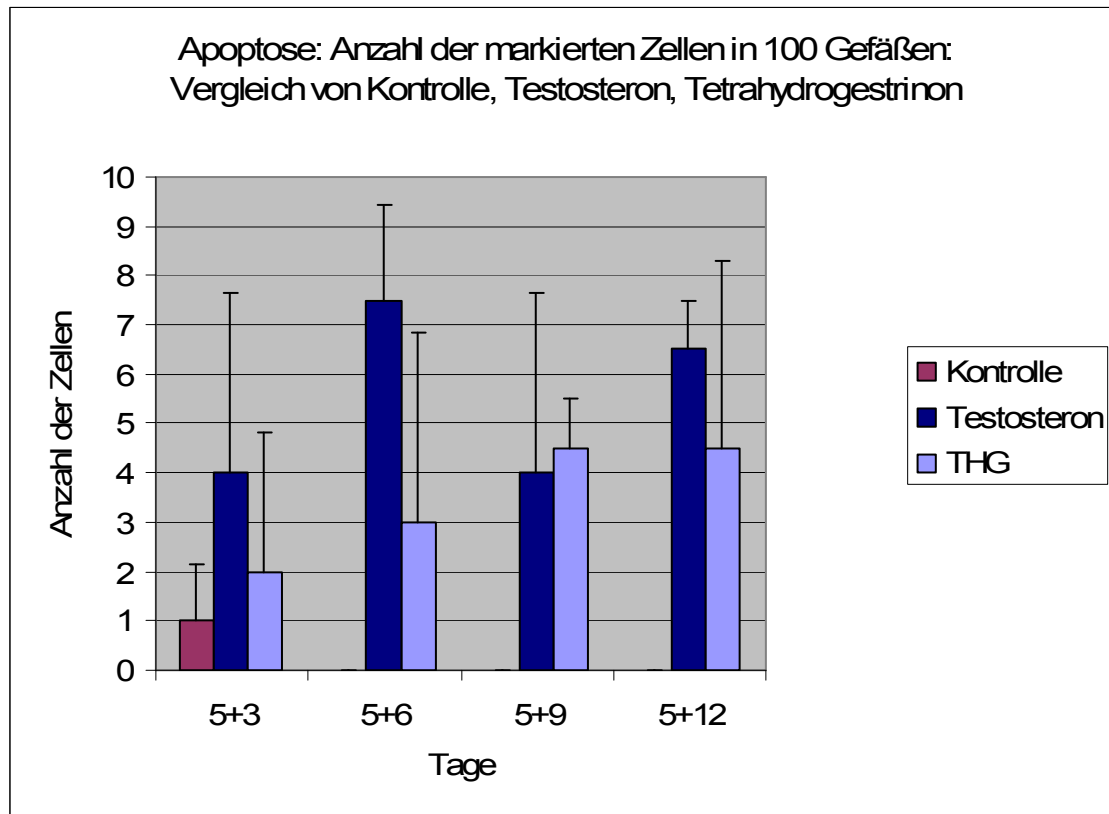


Abb. 12: Anzahl apoptotisch aktiver Endothelzellen: Kontrolle, Testosteron, THG

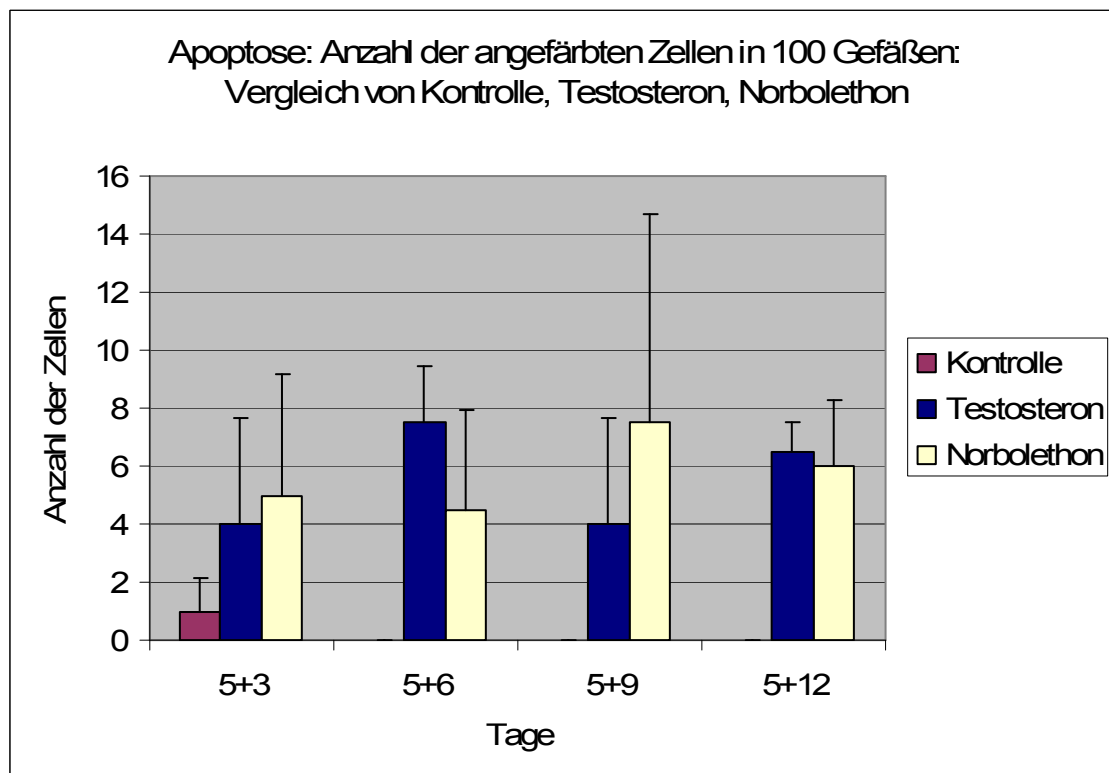


Abb. 13: Anzahl apoptotisch aktiver Endothelzellen: Kontrolle, Testosteron, Norbolethon

3.3. Kardiomyozytogenese

Zusätzlich zu den Veränderungen im Gefäßsystem galt es herauszufinden, inwiefern die Designersterioide THG und Norbolethon sich auf die Entwicklung der Herzmuskelzellen auswirken. Hierbei wurde nicht nur Wert auf die Anzahl der Kardiomyozytencluster gelegt, sondern sie wurden auch der Größe nach in verschiedene Gruppen eingeteilt. Entsprechend ihrer längsten Seite wurden sie den Größen 0-500 µm, 500-2000 µm, 2000-3000 µm bzw. >3000 µm zugeordnet (siehe Abbildungen 18-21). Somit kann die Anzahl der Kardiomyozytencluster noch nach Größe differenziert betrachtet werden. Auch bei diesem Versuch wurde die Differenzierung der EBs nach 5+3, 5+6, 5+9 und 5+12 Tagen gestoppt, so dass auch hier Größe und Quantität der Kardiomyozytencluster in den verschiedenen Alters- und Entwicklungsstufen betrachtet und ausgewertet werden konnten. Zur Visualisierung der Herzmuskelzellcluster für die mikroskopische Betrachtung wurde Anti-Alpha-Actinin als primärer und Goat-anti-mouse-Cy2 als sekundärer Antikörper in der Immunohistochemie verwendet.

Da bei der Betrachtung der Kardiomyozytencluster nicht nur die unterschiedlichen Altersklassen sondern auch die verschiedenen Größenzugehörigkeiten berücksichtigt werden müssen, sind die Ergebnisse im Folgenden nach Steroid und Altersgruppe aufgeteilt beschrieben, um weiterhin einen guten Überblick zu ermöglichen.

Die Ergebnisse des Kardiomyozytogenese-Assays sind in den Abbildungen 14-17 graphisch dargestellt.

Kontrolle 5+3:

Bei der Kontrollgruppe konnten zum frühesten Zeitpunkt (5+3) vor allem Herzmuskelzellcluster der kleinsten Kategorie nachgewiesen werden. So waren es im Mittel 26,25 Kardiomyozytencluster mit einem Längsdurchmesser von 0-500 µm. Außerdem konnten durchschnittlich 5 Kardiomyozytencluster der nächst größeren Gruppe von 500-2000 µm zugeteilt werden. In der Gruppe der 2000-3000 µm messenden Kardiomyozytencluster fanden sich nur noch 0,25 markierte Zellen. Cluster mit einem Durchmesser von über 3000 µm waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht vorhanden.

Kontrolle 5+6:

5+6 Tage nach Ausplattieren der EBs konnte eine große Zunahme an kleinen Kardiomyozytenclustern verzeichnet werden. Es waren im Durchschnitt 70,75 Herzmuskelzellcluster der Größe 0-500 µm in jedem EB vorhanden. Allerdings existierten auch in diesem Alter nur wenige größere Kardiomyozytencluster. Zu der Gruppe der 500-2000 µm messenden Cluster konnten 4 und zur Gruppe der 2000-3000 µm messenden Herzmuskelzellcluster nur noch 0,75 Kardiomyozytencluster gezählt werden. Kardiomyozytencluster mit einer Größe > 3000 µm gab es auch zu diesem Zeitpunkt noch keine.

Kontrolle 5+9:

Nach 5+9 Tagen war die Anzahl der kleinen Kardiomyozytencluster weiter stark angestiegen. Es wurden in der kleinsten Kategorie von 0-500 µm 118,25 markierte Kardiomyozytencluster und in der nächsten Kategorie von 500-2000 µm 9,5 markierte Kardiomyozytencluster gezählt. Die Gruppe der Zellen mit der Größe von 2000-3000 µm umfasste durchschnittlich 1,75 Herzmuskelzellcluster und die Gruppe der größten Kardiomyozytencluster (> 3000 µm) beinhaltete lediglich 0,25 markierte Kardiomyozytencluster pro EB.

Kontrolle 5+12:

Zu diesem Zeitpunkt war die Anzahl der kleinsten Herzmuskelzellcluster auf im Mittel 102,5 pro EB gesunken, die Anzahl der Kardiomyozytenclustern mit der Größe von 500-2000 µm jedoch auf 15,5 gestiegen. Die Gruppe der 2000-3000 µm messenden Kardiomyozytencluster umfasste nun durchschnittlich 2 Cluster pro EB und die Gruppe > 3000 µm beinhaltete jetzt 0,5 Cluster pro Embryoid Body.

Testosteron 5+3:

Unter dem Einfluss des endogenen Steroids Testosteron waren bis zum Zeitpunkt 5+3 durchschnittlich 16,75 Kardiomyozytencluster der Größe 0-500 µm herangewachsen. Kardiomyozytencluster der Größe 500-2000 µm waren in einer Anzahl von 0,5 pro EB vertreten und Kardiomyozytencluster mit einer Größe von mehr als 2000 µm konnten zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht gezählt werden.

Testosteron 5+6:

Nach 5+6 Tagen hatten die unter Beigabe von Testosteron gewachsenen Kardiomyozytencluster diejenigen der Kontrollgruppe in quantitativer Hinsicht überholt. Die Gruppe mit der Größe von 0-500 µm beinhaltete im Mittel 119 Kardiomyozytencluster, der Größe 500-2000 µm wurden 7,75 Herzmuskelzellcluster zugeteilt. Allerdings lag die Anzahl der Kardiomyozytencluster mit einer Größe von 2000-3000 µm bei einer Anzahl von 0,5 Kardiomyozytenclustern pro EB leicht unter dem Wert der Kontrollgruppe. Herzmuskelzellcluster mit einem Durchmesser von über 3000 µm waren auch in dieser Gruppe zum Zeitpunkt 5+6 noch nicht vorhanden.

Testosteron 5+9:

Zum Zeitpunkt 5+9 hatten sich in der Testosterongruppe sehr viele kleine Kardiomyozytencluster gebildet. In den zwei kleinsten Größenklassen hatten sie damit die Anzahl der Herzmuskelzellcluster der Kontrollgruppe überstiegen.

Zu der Klasse der 0-500 µm großen Zellcluster zählten im Durchschnitt 170,5 Kardiomyozytencluster pro EB. Zu der Gruppe der 500-2000 µm messenden Herzmuskelzellcluster zählten 12,75 Kardiomyozytencluster pro EB. Es gab zu diesem Zeitpunkt allerdings – genau wie in der Kontrollgruppe - nur 1,75 Herzmuskelzellcluster mit einer Größe von 2000-3000 µm und keine Kardiomyozytencluster, die an ihrer längsten Seite mehr als 3000 µm maßen.

Testosteron 5+12:

Auch nach 5+12 Tagen beeindruckte die Testosterongruppe mit durchschnittlich 341,75 Kardiomyozytenclustern der Größenordnung 0-500 µm. Auch in der Gruppe der 500-2000 µm großen Kardiomyozytencluster überstieg die Anzahl der Kardiomyozytencluster der Testosterongruppe mit 26,6 markierten Zellen pro EB die Anzahl der Zellcluster der Kontrollgruppe. Des Weiteren konnten 4,25 Herzmuskelzellcluster mit einer Größe von 2000-3000 µm gewertet werden. Der Gruppe der Kardiomyozytencluster mit einem Durchmesser von > 3000 µm konnten allerdings auch hier keine Herzmuskelzellcluster zugeordnet werden.

THG 5+3:

Unter dem Einfluss des Designersteroids Tetrahydrogestrinon waren zum Zeitpunkt 5+3 keine Kardiomyozytencluster in den Embryoid Bodies nachweisbar.

THG 5+6:

Nach 5+6 Tagen konnten in dieser Gruppe durchschnittlich 40,5 Kardiomyozytencluster der Größe 0-500 µm und 2 Kardiomyozytencluster der Größe 500-2000 µm gezählt werden. Außerdem gab es im Mittel 0,5 Herzmuskelzellcluster der Gruppe 2000-3000 µm und keine Herzmuskelzellcluster mit einer Größe > 3000 µm.

THG 5+9:

Hier betrug der Mittelwert der Kardiomyozytencluster, die 0-500 µm groß waren, 51,11 pro EB. In der nächst größeren Gruppe von 500-2000 µm wurden 6 Kardiomyozytencluster zusammengefasst und mit einer Größe von 2000-3000 µm waren es nur noch durchschnittlich 0,25 Kardiomyozytencluster pro Embryoid Body. Der größten Kategorie von mehr als 3000 µm konnten keine Kardiomyozytenclustern zugeteilt werden.

THG 5+12:

Auch beim letzten untersuchten Zeitpunkt 5+12 blieben die Werte dieser Gruppe stets unter den Werten der Kontroll- und Testosteron-Gruppe. 60 Kardiomyozytencluster hatten eine Größe von 0-500 µm und weitere 8,75 Cluster wurden zu der Gruppe der 500-2000 µm messenden Kardiomyozytencluster zugeteilt. Eine Größe von 2000-3000 µm erreichte im Durchschnitt nur ein Kardiomyozytencluster pro EB und analog zu den früher untersuchten Zeitpunkten erreichte auch hier kein Kardiomyozytencluster eine Größe von mehr als 3000 µm.

Norbolethon 5+3:

Auch unter Einwirkung des Designersteroids Norbolethon waren bis zu dem Zeitpunkt 5+3 keine Kardiomyozytencluster herangewachsen.

Norbolethon 5+6:

In dieser Altersklasse konnten nur Kardiomyozytencluster der kleinsten Größe nachgewiesen werden. Durchschnittlich enthielt jeder EB 23,25 Kardiomyozytencluster mit einem Durchmesser von 500-2000 µm. Dieser Wert liegt unter den Werten der Kontroll-, Testosteron-, und Tetrahydrogestrinon- Gruppen.

Norbolethon 5+9:

Selbst nach 5+9 Tagen waren in den untersuchten EBs keine Kardiomyozytencluster mit einem Durchmesser von mehr als 2000 µm zu finden. Es waren nur durchschnittlich 15,25 Cluster der kleinsten Kategorie (0-500 µm) pro Embryoid Body vorhanden.

Norbolethon 5+12:

Auch die Werte des Zeitpunktes 5+12 lagen in allen Größenbereichen unter denen der anderen Substanzgruppen.

Die Gruppe der 0-500 µm großen Kardiomyozytencluster umfasste 55,25 solcher markierten Herzmuskelzellcluster pro EB. In der Gruppe der 500-2000 µm messenden Cluster lag der Mittelwert bei 1,75 Kardiomyozytencluster pro EB. Es existierten in dieser Gruppe allerdings keine Kardiomyozytencluster, die einen Durchmesser von mehr als 2000 µm erreichten.

Insgesamt erreichten die unter Norbolethon-Einwirkung gewachsenen EBs zu keinem Zeitpunkt die Kontroll- oder Testosteron-Werte.

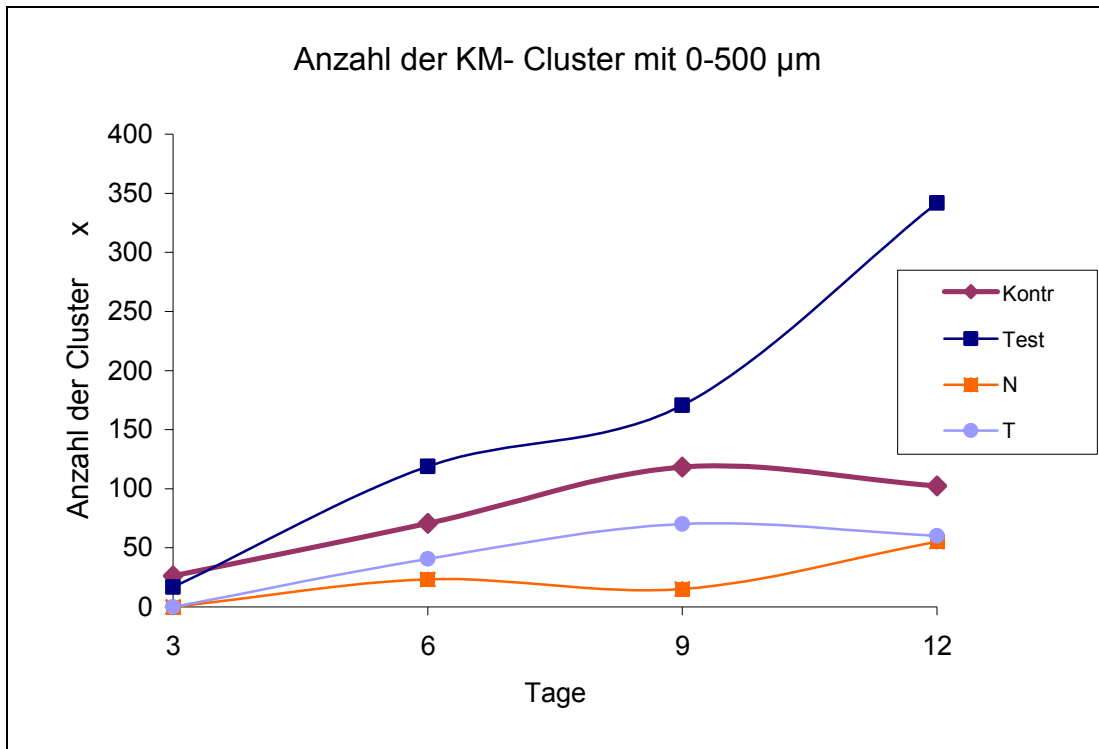


Abb. 14: Kardiomyozytencluster der Größe 0-500 μm

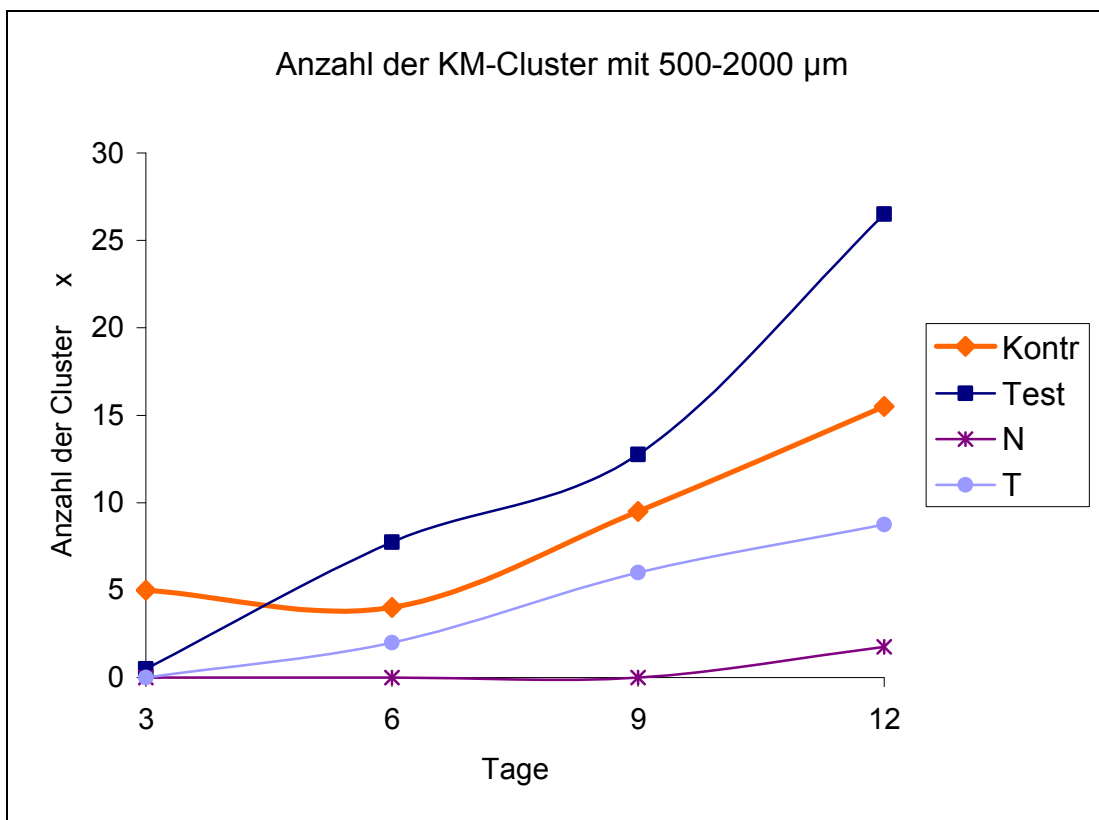


Abb. 15: Kardiomyozytencluster der Größe 500-2000 μm

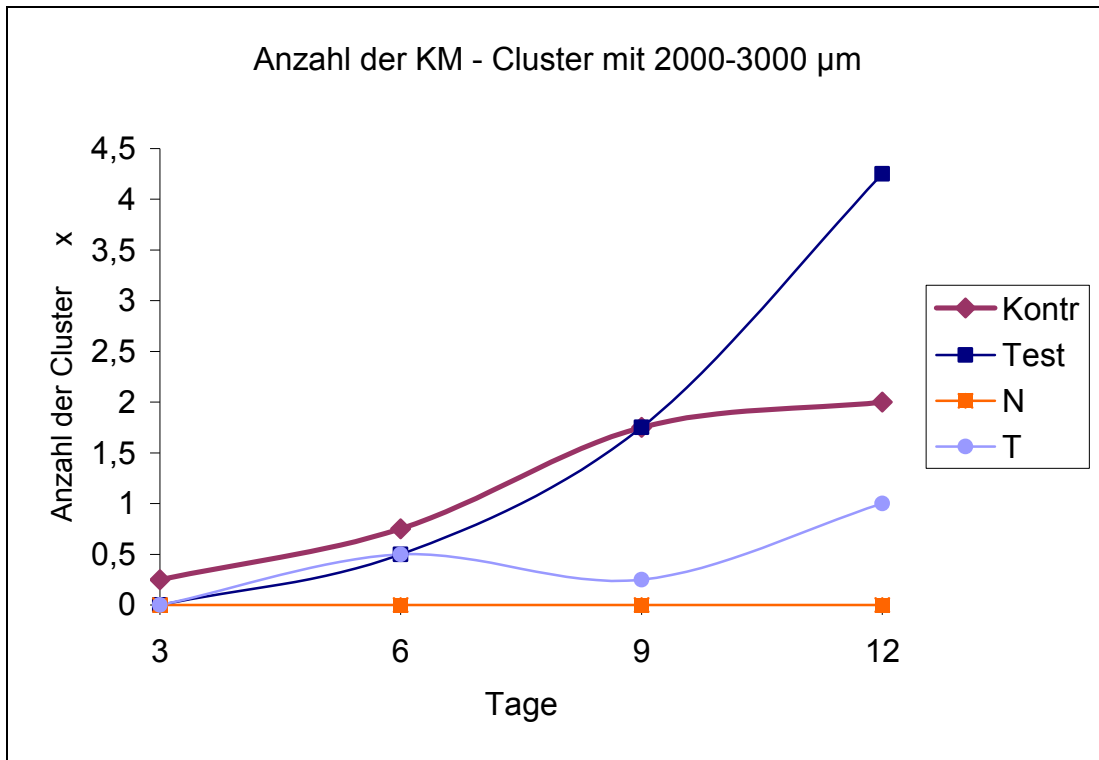


Abb. 16: Kardiomyozytencluster der Größe 2000-3000 μm

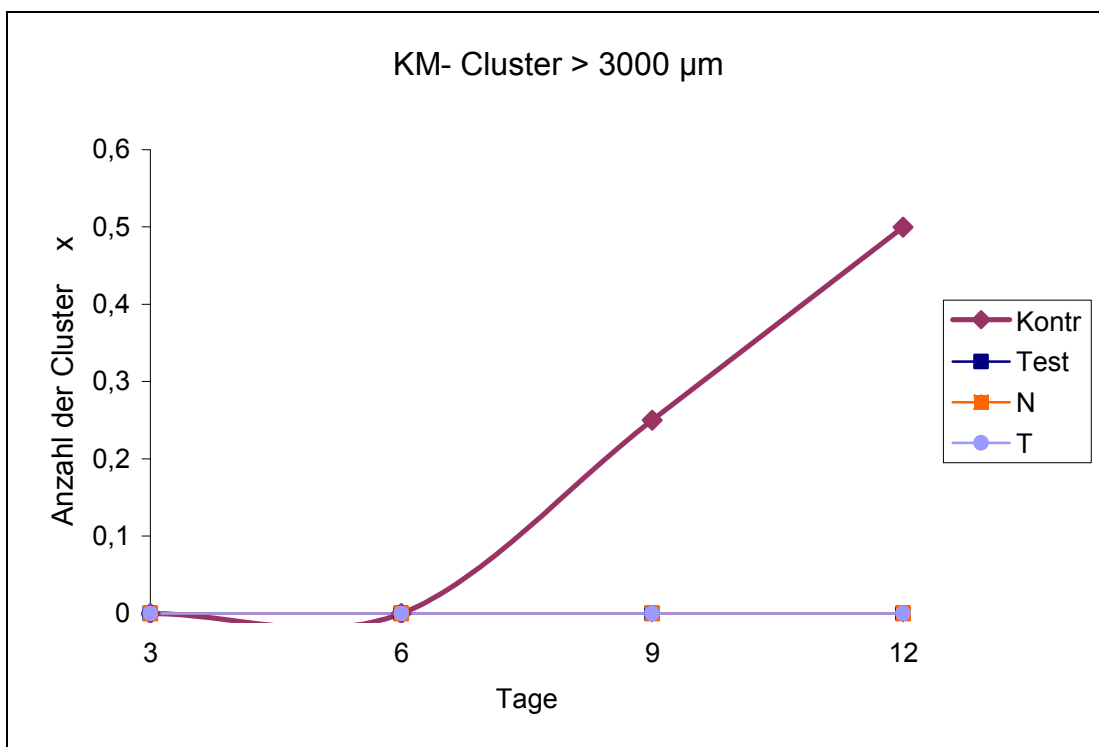


Abb. 17: Kardiomyozytencluster mit der Größe > 3000 μm

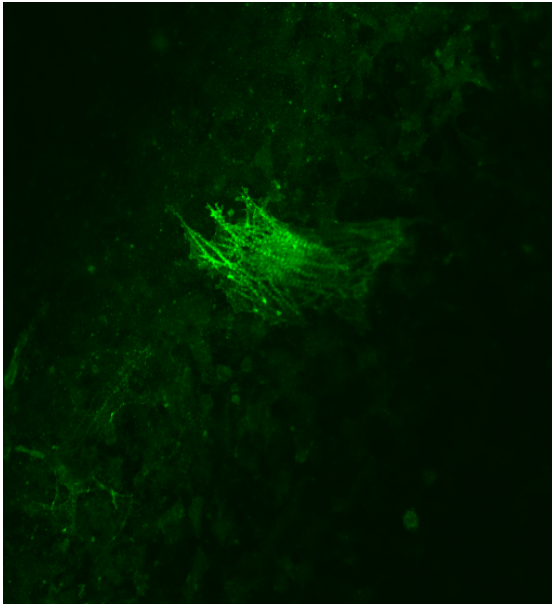


Abb. 18: Kardiomyozytencluster der Kategorie 0-500 μm

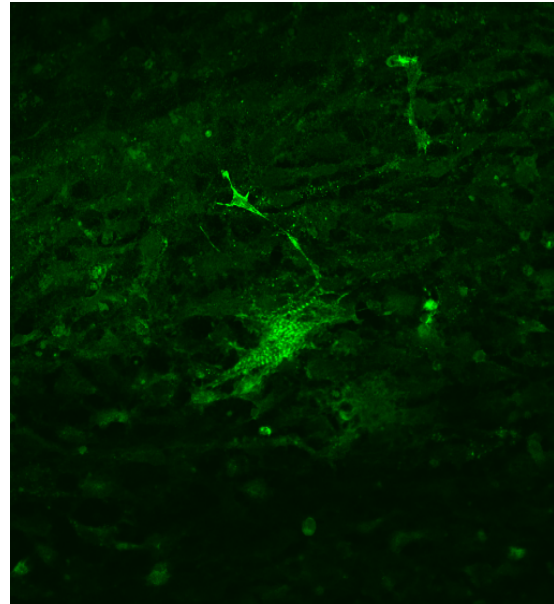


Abb. 19: Kardiomyozytencluster der Kategorie 500-2000 μm

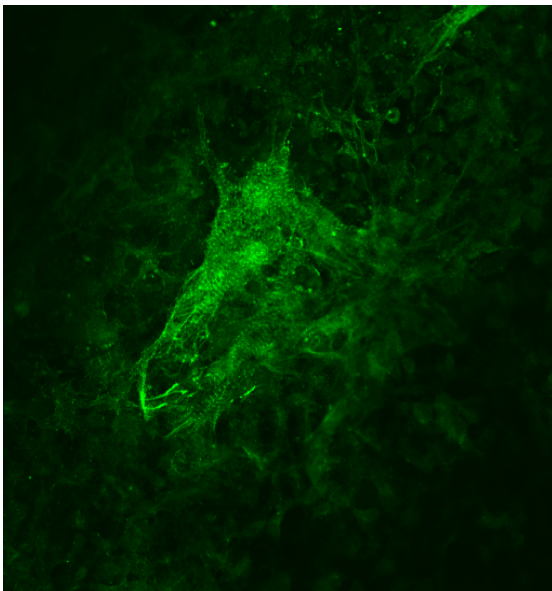


Abb. 20: Kardiomyozytencluster der Kategorie 2000-3000 μm

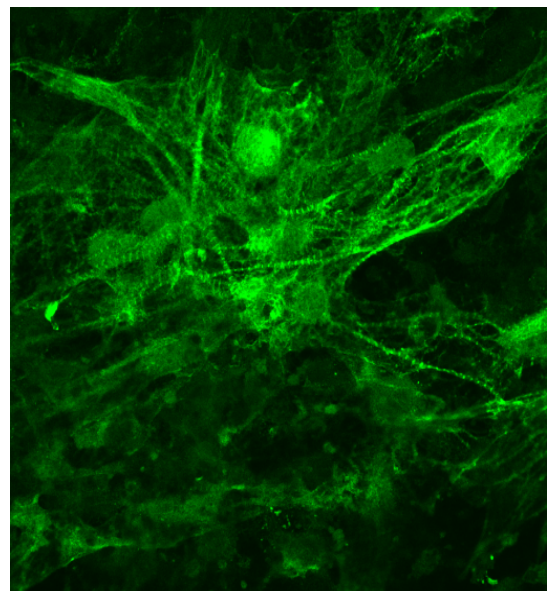


Abb. 21: Kardiomyozytencluster der Kategorie $> 3000 \mu\text{m}$

4. Diskussion

4.1. Zusammenfassung

Die Designer-Steroide Tetrahydrogestrinon (THG) und Norbolethon wurden am Modell des Embryoid Bodies untersucht und jeweils zu Testosteron als endogenem Steroid und zu der Kontrollgruppe in Bezug gesetzt.

Im Vaskularisationsversuch zeigte sich, dass es unter dem Einfluss von THG und Norbolethon zu einer deutlich erhöhten Gefäßanzahl im EB kam. Die Proliferationsrate war im Vergleich zur Kontrolle, nicht jedoch im Vergleich zu Testosteron, gesteigert. Die Gefäße, die unter Einwirkung von THG und Testosteron standen, reiften schneller heran als diejenigen der Kontrollgruppe, waren jedoch strukturell (Ausbildung von Gefäßvernetzungen, Anzahl fetzenartiger Gefäße) denen der Kontrollgruppe unterlegen. Die unter Einfluss von Norbolethon entstandenen Gefäße zeigten eine deutlich gestörte Reifung und ebenso wie unter dem Einfluss von THG eine verminderte Gefäßqualität.

Mit Hilfe des Apoptose-Assays konnten deutlich erhöhte Apoptose-Raten der Endothelzellen bei den Versuchsansätzen mit THG, Norbolethon und Testosteron im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Bei der Untersuchung der Kardiomyozyten wurden diese nicht einzeln betrachtet, sondern es wurden immer Cluster von Herzmuskelzellen verschiedenen Größenklassen zugeordnet. Hierbei fiel auf, dass sich bei der Behandlung mit THG und Norbolethon fast ausschließlich Kardiomyozytencluster der kleinsten Größenklassen ausbildeten, hier jedoch zu keinem Zeitpunkt so viele Cluster wie in der Kontrollgruppe heranwuchsen. Auch begann die Ausbildung der ersten Kardiomyozytencluster unter THG und Norbolethon erst zu einem späteren Zeitpunkt als bei der Kontrolle. Anders verhielt es sich bei Testosteron, unter dessen Einfluss sich zwar auch nur wenige große Kardiomyozytencluster bildeten, jedoch weitaus mehr kleine Kardiomyozytencluster als unter Kontrollbedingungen. Auch hier begann die Kardiomyozytogenese zwar leicht verzögert, stieg ab dem zweiten Untersuchungszeitpunkt jedoch steil an, sodass zum letzten Beobachtungszeitpunkt in der Testosterongruppe mehr als doppelt so viele der kleinsten Kardiomyozytencluster zu verzeichnen waren als in der Kontrollgruppe.

4.2. Einfluss von AAS auf Vaskularisation, Proliferation und Apoptose von Endothelzellen

Wie bereits in Kapitel 3.1. beschrieben, kam es unter dem Einfluss von Tetrahydrogestrinon und Norbolethon zu einer beträchtlichen Zunahme der Vaskularisierung im Embryoid Body. Hierbei fiel besonders das Steroid THG auf, unter dessen Einwirkung sich zu dem Zeitpunkt 5+12 Tage ca. fünf Mal so viele Gefäße ausgebildet hatten wie in der Kontrollgruppe. Interessant ist hierbei auch der Vergleich mit dem natürlichen Steroid Testosteron: in der THG-Gruppe waren mehr als sieben Mal so viele Gefäßstrukturen zu verzeichnen als in der Testosteron-Gruppe.

Im Versuch mit Norbolethon hingegen zeigte sich nicht wie unter Zugabe von THG eine stetig ansteigende Anzahl an Gefäßen, sondern der Einfluss von Norbolethon führte zu einem parabelartigen Verlauf der Gefäßanzahl mit einem Maximum der Gefäßanzahl am Tag 5+6. Daraufhin sank die Anzahl der unter Norbolethon gebildeten Gefäße wieder, so dass zum Zeitpunkt 5+12 Tage die Anzahl der ausgebildeten Gefäße unter Norbolethoneinwirkung unterhalb der Anzahl der Gefäße in der Kontrollgruppe lag, jedoch vergleichbar war mit dem Ergebnis der unter Testosteron-Einfluss gewachsenen EBs.

Diese Ergebnisse decken sich größtenteils mit den Ergebnissen aus dem Proliferationsversuch: sowohl bei Norbolethon als auch bei THG kam es im Vergleich mit der Kontrollgruppe zu einer verstärkten Proliferation der Endothelzellen.

Allerdings fällt auf, dass die Zugabe von Testosteron im Proliferations-Assay zu einer sehr stark erhöhten Anzahl proliferativ aktiver Endothelzellen, im Vaskularisationsversuch jedoch nicht zu einer stark erhöhten Anzahl an Gefäßstrukturen führte. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass es bei Testosteron zusätzlich zu einer gesteigerten Rate apoptotisch aktiver Endothelzellen kam. Diese stehen im Gleichgewicht mit den proliferativ aktiven Endothelzellen, sodass es durch die gesteigerte Apoptose nicht zu einer gesteigerten Anzahl an Gefäßen kommt.

Dies ist stimmig mit den Ergebnissen von D'Ascenzo et al., denn sie beschrieben in ihrer Arbeit ebenfalls, dass es unter der Wirkung von anabolen Steroiden (zu den untersuchten Substanzen zählten Testosteron, Nandrolon und Norandrostendion, allerdings nicht THG und Norbolethon) auf humane Nabelvenen-Endothelzellen zu einer erhöhten Apoptoserate und somit zu einem antiproliferativen Effekt kam (D'Ascenzo et al., 2007).

Allerdings herrscht auf diesem Gebiet Uneinigkeit in der Forschungsliteratur. So berichten Chang und seine Mitarbeiter von einem starken proliferationsfördernden Effekt des nicht-steroidalen Antiandrogens Nilutamid auf Grund einer Zunahme der Akt Protein Expression und einer Abnahme des Cell-Zyklus-Inhibitors p27 (Kip1). Akt ist eine Proteinkinase, die eine Vielzahl von biologischen Mechanismen vermittelt. Unter anderem wirkt Akt inhibierend auf Apoptose und stimuliert zelluläres Wachstum (Chang et al., 2006).

Diese Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Chang deuten auf einen proliferationsinhibierenden Effekt durch Androgene hin, der durch die vorliegende Arbeit nur für Testosteron und partiell für Norbolethon, nicht allerdings für THG bestätigt werden kann.

Hingegen beschrieben Hoetzer und seine Forschungsgruppe, dass es bei Frauen im Vergleich zu Männern zu einer erhöhten migratorischen Aktivität von endothelialen Vorläuferzellen kam (Hoetzer et al., 2007). Des Weiteren besaßen Frauen eine höhere Kapazität, Kolonien von endothelialen Vorläuferzellen zu formieren. Zusätzlich zeigten Frauen mit einer höheren Östrogen-Konzentration im Plasma eine signifikant höhere Anzahl an zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen als Männer. Diese Erhöhung der Zellzahl ist durch eine verminderte Apoptoserate zu erklären (Strehlow et al., 2003). Der Forschungsgruppe von Chang widersprechen die Aussagen von Ray et al.. Sie beschrieben, dass neuere klinische Studien Hinweise darauf geben, dass Androgene die Anzahl der zirkulierenden endothelialen Vorläuferzellen erhöhen. Dies geschieht möglicherweise durch Auswirkungen auf das Knochenmark (Ray et al., 2008). Außerdem konnte gezeigt werden, dass hypogonadale Männer eine verminderte Anzahl an endothelialen Vorläuferzellen besitzen, die jedoch nach der Behandlung mit Androgenen signifikant anstieg (Foresta et al., 2006). Dies lässt sich sehr gut mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen vereinbaren, da es unter den Designersteroiden und unter Testosteron zu einem deutlichen Zuwachs an Endothelzellen kam.

Dies bedeutet jedoch noch nicht, dass es somit auch zu einer Zunahme an funktionsfähigen Gefäßen im EB kommt, da Proliferation und Apoptose der Endothelzellen miteinander im Gleichgewicht stehen (Dimmeler und Zeiher, 2000; Araki et al., 1990; Gerber et al., 1998; Segura et al., 2002). Wie bei Norbolethon und Testosteron zu sehen ist, kann es trotz einer hohen Proliferationsrate zu einer verminderten Anzahl an Gefäßen kommen, wenn die Rate der apoptotisch aktiven Endothelzellen dementsprechend gesteigert ist (Gilbert SF, 2003).

Auch im Versuch mit THG kam es zu einer erhöhten apoptotischen Aktivität der Endothelzellen, diese lag jedoch weit unter den Apoptoseraten der unter Zugabe von Testosteron gewachsenen EBs. Somit überwogen bei THG die proliferativen Effekte, wodurch es zu einer massiv gesteigerten Anzahl an reifen Gefäßen kam.

Sowohl Tetrahydrogestrinon als auch Norboelthon sind in dieser Hinsicht bisher jedoch kaum untersucht worden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beziehen sich auf einen Beobachtungszeitraum von 12 Tagen. Dabei ist es durchaus denkbar, dass es auf längere Sicht und unter längerem Steroideinfluss zu noch stärkeren Auswirkungen der anabolen Steroide kommen könnte (Friedel et al., 2005). Hier besteht in der Zukunft sicherlich noch großer Forschungsbedarf. Außerdem sind die für diese Arbeit durchgeführten Experimente im in-vitro-Modell an Mäusenzellen gelaufen, das auch nicht ohne weitere Überprüfungen direkt auf den Menschen und auf die in-vivo-Situation übertragbar ist.

In der Forschungsliteratur finden sich zahlreiche Hinweise auf Gefäßveränderungen, die durch anabole androgene Steroide hervorgerufen werden (D'Ascenzo et al., 2007; Lane et al., 2006; Cunha et al., 2005; Ebenbichler et al., 2001; Kam und Yarrow, 2005). So veröffentlichten Tagarakis und sein Team bereits im Jahre 2000 zwei ebenfalls an Mäusen durchgeführte Studien mit zwei anabolen Steroiden (Dianabol und orales Turinabol) und mit Testosteron-Propionat. Es gab zwei Gruppen von Mäusen, von denen die eine Dianabol, die andere Testosteron-Propionat ohne körperliches Training erhielten. Des Weiteren erhielten drei Gruppen je ein Steroid (Dianabol, Testosteron-Propionat sowie Oral-Turinabol) zusammen mit körperlichem Training. Zur Kontrolle dienten unbehandelte Gruppen, je eine mit körperlichem Training und eine ohne körperliches Training. In dieser Studie wurde gezeigt, dass es unter dem Einfluss der Steroide sowohl nach drei als auch nach sechs Wochen zu milder Hypertrophie bei den Herzmuskelzellen kam. Darüber hinaus nahm die kapilläre Dichte ab und die interkapilläre Distanz nahm unter Steroideinfluss zu. Bei der Kontrollgruppe, die keine Steroide enthielt, aber körperlichem Training ausgesetzt war kam es zu einer Anpassung der Mikrovaskularisation durch eine Erhöhung der Kapillardichte und eine Verringerung der interkapillären Distanz. Somit wurde gezeigt, dass die Behandlung mit den anabolen Steroiden und Testosteron-Propionat zu hypertrophischen Effekten auf die Kardiomyozyten führte und dass die mikrovaskuläre Adaptation auf körperliches Training deutlich gestört war (Tagarakis et al., Aug. 2000; Tagarakis et al., Mai 2000). Durch diese Veränderungen unter Steroideinnahme steigt die Gefahr, dass

die Versorgung des Herzens mit Sauerstoff, vor allem bei körperlicher Belastung, nicht mehr ausreichend gewährleistet werden kann.

Auch dies lässt sich in Einklang mit den hier erhobenen Daten bringen, denn unter der Einwirkung von Testosteron kam es zu einer im Vergleich zur Kontrolle stark verringerten Anzahl an Gefäßen. Dass diese wenigen Gefäße für eine ausreichende Durchblutung und Versorgung mit Sauerstoff sorgen können, ist daher sehr fraglich. Andererseits kam es unter dem Einfluss von THG und in den ersten Tagen auch unter Norbolethon zu einer erhöhten Gefäßanzahl im Vergleich zur Kontrolle. Auch hier stellt sich die Frage, inwiefern Gefäße, die so schnell in einer so überschießenden Anzahl heranwachsen, den Belastungen und Anforderungen des Organismus standhalten können.

Zudem weiß man, dass Gefäßnetzwerke, die nur aus Endothel bestehen unreif und instabil sind und zu rückläufiger Entwicklung neigen (Benjamin et al., 1999). Daher müssen diese unreifen Gefäßstrukturen von Perizyten und glatten Muskelzellen umgeben werden, um die Gefäßreifung und –stabilität zu gewährleisten (Campbell und Campbell 1986; Benjamin et al., 1998).

Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe von A. Schmidt (Institut für zelluläre und molekulare Sportmedizin der Sporthochschule Köln) zeigten, dass es unter der Einwirkung von Ethyltestosteron, einem weiteren Designersteroid, zu einer im Vergleich zur Kontrolle nur unwesentlich erhöhten Zahl an Gefäßen im EB kam. Das Steroid Propyltrenbolon führte zu einer im Vergleich zu Kontrolle und Testosteron erhöhten Anzahl von Gefäßen, dies war jedoch nicht vergleichbar mit der enorm gestiegenen Gefäßanzahl bei THG und Norbolethon (Schmidt et al., 2006). Auch hier wurde mit dem Modell embryonaler Stammzellen von Mäusen und vergleichbaren Steroidkonzentrationen wie den in dieser Arbeit verwendeten, gearbeitet. Ein Vergleich der Ergebnisse der Arbeitsgruppe von A. Schmidt und der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse ist in Abb. 22 dargestellt.

Anzahl der Gefäße: Vergleich aller Substanzen

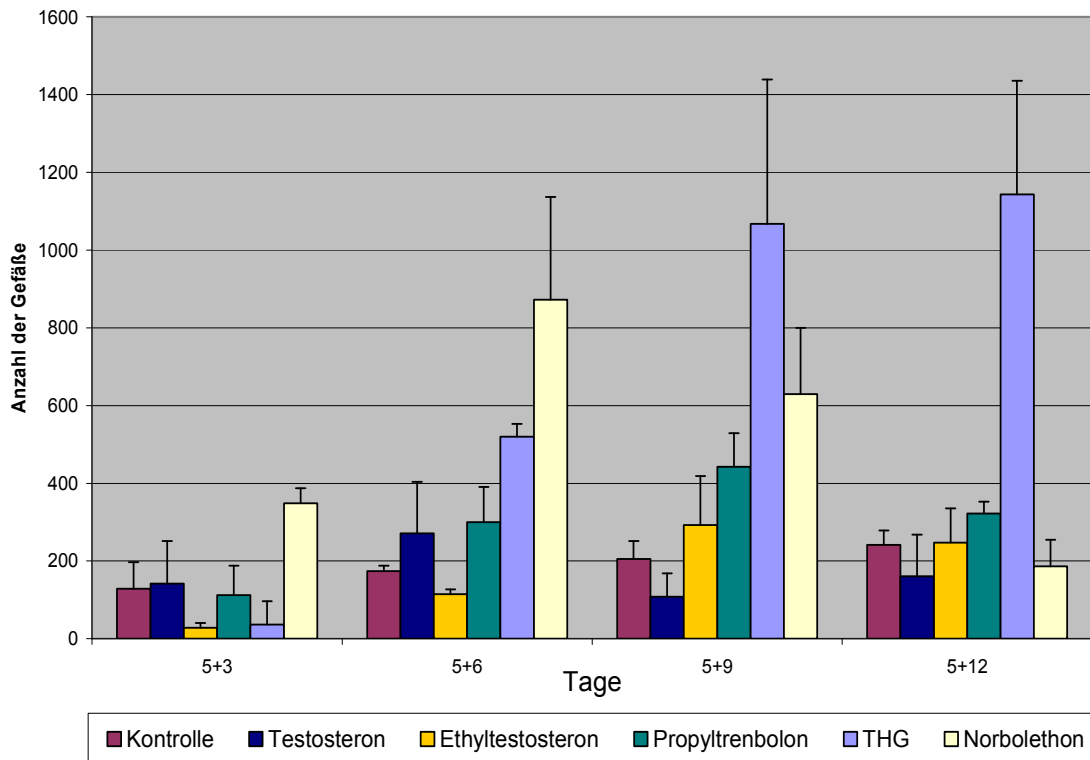


Abb. 22: Anzahl der Gefäße: Vergleich von Kontrolle, Testosteron, Ethyltestosteron, Propyltrenbolon, THG und Norbolethon.

Der Vergleich dieser in-vitro-Ergebnisse von A. Schmidt et al. mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnissen zeigt, dass es bei den anabolen Steroiden trotz ähnlichem Aufbau zu großen Unterschieden in der Wirkungsweise kommen kann. Dies erstaunt, da sie sich strukturell nur geringfügig unterscheiden. Bislang wurde meistens verallgemeinernd von Eigenschaften der anabolen Steroide gesprochen. Die hier gewonnenen Daten zeigen jedoch, dass die Designersteroidsehr unterschiedlich wirken und somit auch einzeln besprochen und untersucht werden sollten.

Es ist bekannt, dass anabole Steroide zu einer Zunahme an skelettaler und linksventrikulärer Muskelmasse führen (Pearson et al., 1986; Urhausen et al., 1989; De Piccoli et al., 1991; Sachtleben et al., 1993; Yeater et al., 1996; Dickerman et al., 1997; Marsh et al., 1998; Di Bello et al., 1999; Karila et al., 2003; Hall und Hall, 2005). Um

den erhöhten Sauerstoffbedarf decken zu können muss allerdings auch die Kapillarisation der gestiegenen Muskelmasse angepasst werden.

Daher ist es auch wichtig nicht nur die Quantität der entstandenen endothelialen Tuben zu beurteilen, sondern auch besonderes Augenmerk auf die Qualität der Gefäßtuben zu legen.

Dabei fiel auf, dass es bei der mit Norbolethon behandelten Gruppe zu einer deutlich gestörten Reifung kam.

Unter dem Einfluss von Testosteron erreichten die Gefäßtuben ihre halbmaximale Reifung deutlich früher als bei der Kontrollgruppe, jedoch war hier die Ausbildung von Gefäßnetzwerken sichtbar gestört. Statt gut verzweigter endothelialer Tuben bildeten sich viele fetzenartig versprengte Gefäßstrukturen. Hier muss sicherlich die Frage gestellt werden, inwiefern diese aus den endothelialen Tuben hervorgehenden Gefäße funktionell einwandfrei sind. Außerdem muss bedacht werden, dass die Gefäßtuben im Embryoid Body nicht vollständig ausreifen können, sodass auch hier eine Übertragung der in-vitro gewonnenen Ergebnisse auf die in-vivo-Situation schwierig ist.

Ebenso kam es bei der unter THG gewachsenen Gruppe zu einer verfrühten Reifung und zur Entstehung von Gefäßstrukturen sehr unterschiedlicher Qualität. Es waren sowohl gut verzweigte Netzwerke als auch viele versprengte Gefäßteile zu sehen.

Es ist daher fraglich, ob die aus diesen Gefäßtuben entstehenden Gefäße den steigenden Sauerstoffbedarf der Skelettmuskulatur und des Myokards ausreichend decken können.

Tagarakis et al. zeigten im Jahre 2000, dass sowohl anabole Steroide als auch Testosteron-Propionat die durch körperliches Training angekurbelte kardiale Kapillarisation schwer beschädigen (Tagarakis et al., Mai 2000; Tagarakis et al., Aug. 2000).

Dies würde auch erklären, warum bei Autopsien von Konsumenten anaboler Steroide häufig fibrotische Bereiche im Myokard gefunden werden (Luke et al., 1990; Lyngberg 1991; Kennedy und Lawrence, 1993; Nieminen et al., 1996). Es wird angenommen, dass diese fokalen myokardialen Fibrosen dadurch verursacht werden, dass die Blutversorgung des Myokards durch das unter Steroid-Einfluss beschleunigte Wachstum myokardialer Fasern nicht ausreicht, bzw. sich nicht schnell genug anpassen kann. Dadurch, so wird vermutet, kommt es zu nekrotischen Bereichen im Myokard mit nachfolgender Fibrose (Luke et al., 1990). Diese fibrotischen Bereiche können Fokus

für maligne Arrhythmien und sogar für die Entstehung einer Kardiomyopathie sein (D'Ascenzo et al., 2005).

4.3. Einfluss von AAS auf die Kardiomyozytogenese

Die Auswirkungen der anabolen Steroide auf die Entwicklung stammzellabgeleiteter Herzmuskelzellen waren sehr unterschiedlich.

Auffallend war, dass es unter dem Einfluss von Testosteron zur Ausbildung vieler kleiner Kardiomyozytencluster kam. Die Kardiomyozytogenese begann zwar - verglichen mit der Kontrollgruppe - verzögert, allerdings bildeten sich daraufhin weitaus mehr Herzmuskelzellcluster der kleinen Größenklassen aus als bei den unbehandelten Zellen. Kardiomyozytencluster der größten Gruppe waren unter der Einwirkung von Testosteron zu keinem Zeitpunkt entstanden.

Anders stellen sich die Ergebnisse für Norbolethon und Tetrahydrogestrinon dar. Beide Designersteroiden führten zu einer deutlich inhibierten Kardiomyozytogenese. Zu jedem Zeitpunkt lagen die Zahlen der gezählten Zellcluster deutlich unterhalb der Werte der Kontrollgruppe, wobei Norbolethon noch stärker wachstumshemmend auf die Kardiomyozyten wirkte als THG.

Dass sich anabole Steroide auf das kardiovaskuläre System negativ auswirken, wird in der wissenschaftlichen Literatur häufig beschrieben. Es werden schon seit vielen Jahren immer wieder Kasuistiken von Sportlern, v. a. von Bodybuildern, veröffentlicht, bei denen unter der Einnahme von AAS kardiovaskuläre Ereignisse bis hin zum plötzlichen Herztod auftraten (Luke et al., 1990; Laroche 1990; Ferrera et al., 1997; Tischer et al., 2003). Eine Studie von Pärssinen et al. zeigte zudem, dass Anabolika einnehmende Kraftsportler ein deutlich erhöhtes Risiko haben, frühzeitig zu versterben. Sie konnten in einer 12-jährigen Follow-up-Studie zeigen, dass die Mortalität in der Gruppe der Kraftsportler, die hochverdächtig auf die Einnahme von AAS waren, bei 12,9 % lag, während die Mortalität in der Kontrollgruppe in diesem Zeitraum bei 3,1% lag. Somit war das Risiko für AAS-konsumierende Kraftsportler im Vergleich zu der Kontrollpopulation um den Faktor 4,6 erhöht (Pärssinen et al., 2000).

Dies verwundert nicht wenn man die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse betrachtet. Bedenkt man, dass sich Kardiomyozyten in gewissem Umfang erneuern können (Maximilian und Vela, 2008), müsste, wenn man die Ergebnisse vom Modell der Stammzellen der Maus auf den Menschen überträgt, angenommen werden, dass es auch beim Menschen unter der Einnahme von Testosteron auf Grund der starken Zunahme der Anzahl an Kardiomyozytenclustern zur Ausbildung einer Herzhypertrophie kommen könnte. Hierbei wird generell die exzentrische von der konzentrischen Herzhypertrophie unterschieden. Bei der exzentrischen Hypertrophie kommt es aufgrund von Lumenerweiterung zu einer Dilatation des Ventrikels während es bei der konzentrischen Hypertrophie zu einer Herzwandverdickung ohne Dilatation kommt. Ab einem kritischen Herzgewicht jenseits von 500 g entwickelt sich eine relative Koronarinsuffizienz mit Abnahme der Leistungsfähigkeit des Herzens und es besteht die Gefahr einer Gefügedilatation. Durch die ventrikuläre Dilatation kann es zu dehnungsinduzierter Apoptose und somit zu weiterer Dilatation kommen (Herold, 2005). Auch hier stellt sich die Frage, ob die Gefäße das dilatierte Herz ausreichend versorgen könnten oder ob es nicht etwa zu einer Insuffizienz infolge Mangelversorgung durch die Gefäße käme. Allerdings handelt es sich in der vorliegenden Arbeit um in-vitro-Versuche an Stammzellen der Maus, sodass man diese Ergebnisse sicherlich nicht direkt übertragen kann.

Die Designersterioide THG und Norbolethon hingegen führten in den in dieser Arbeit vorgestellten Versuchen eher zu hypoplastischen Effekten, da sich nur wenige Kardiomyozytencluster formierten und diese von geringer Größe waren. Im EB war somit der Wachstumsprozess der Kardiomyozyten betroffen. Im adulten Herzen handelt es sich jedoch um postmitotische Kardiomyozyten und es gibt nur wenige proliferierende Zellen, die als Nachschub für Kardiomyozyten dienen können. Somit sind diese Ergebnisse nur bedingt auf den adulten Organismus übertragbar, da es sich nur um wenige im Wachstumsprozess befindliche Zellen handelt.

Auch hier gibt es Widersprüche in der Forschungsliteratur. Es gibt mehrere Berichte darüber, dass AAS schädlich auf Kardiomyozyten von Ratten wirken. So berichten Welder und seine Mitarbeiter von direkt toxischen Auswirkungen von Testosteron und einigen AAS auf Kardiomyozyten-Kulturen (Welder et al., 1995). Auch Zaugg und seine Arbeitsgruppe brachten Ergebnisse hervor, die zeigen, dass AAS in einer dosisabhängigen Art und Weise apoptotischen Zelltod in ventrikulären Myozyten von Rattenherzen, bewirken (Zaugg et al., 2001).

Diese Ergebnisse sind übereinstimmend mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen für die synthetischen Steroide THG und Norbolethon, nicht jedoch für Testosteron. Es wurde in dieser Arbeit zwar nicht direkt die Apoptose bei Kardiomyozyten untersucht, eine Verstärkung der apoptotischen Aktivität könnte jedoch eine plausible Erklärung dafür bieten, warum es zu einer so stark verminderten Anzahl an Kardiomyozytenclustern kam. Diese Erklärung greift jedoch nicht für Testosteron, das zu einer starken Zunahme an kleinen Kardiomyozytenclustern führte.

Des Weiteren wurde von zahlreichen Fällen von dilatativer Kardiomyopathie nach langjährigem Missbrauch anaboler Steroide berichtet (Ferenchick, 1991; Schollert und Bendixen, 1993; Nieminen et al., 1996; Ferrera et al., 1997; Clark und Schofield, 2005). Auch ein Anstieg der linksventrikulären Muskelmasse unter Steroid-Einnahme ist gut dokumentiert (Urhausen et al., 1989; De Piccoli et al., 1991; Pearson et al., 1993; Sachtleben et al., 1993; Yeater et al., 1996; Dickermann et al., 1997; di Bello et al., 1999; Karila et al., 2003).

Zudem existieren einige Studien, die darüber hinaus auf einen deutlichen, überproportionalen Hypertrophieeffekt des Myokards hinweisen (De Piccoli et al., 1991; Marsh et al., 1998; di Bello et al., 1999; Karila et al., 2003; Urhausen et al., 2004; Di Paolo et al., 2007). In einer großen Querschnittsstudie zeigte sich, dass anabolikafreie Gewichtheber eine signifikant geringere linksventrikuläre Muskelmasse hatten (sowohl absolut als auch bezogen auf die Körperdimensionen) als Anabolika konsumierende Kraftsportler und Kraftsportler, deren letzte Anabolikaeinnahme länger als ein Jahr zurücklag. Aktuelle und frühere Anabolikakonsumenten unterschieden sich hierbei jedoch nicht (Kindermann, 2006). Demnach scheinen anabol-androgene Steroide einen auch über längere Zeit anhaltenden Hypertrophieeffekt auf das Myokard ausüben zu können.

Im Gegensatz dazu zeigte sich im Rahmen der hier erhobenen Daten für AAS zwar, dass es zu einer Abnahme der Anzahl an Myozytenclustern kam, es sollte jedoch daran erinnert werden, dass es sich hierbei nicht um adulte Zellen handelt, sondern um embryonale Stammzellen. Ob und in welchem Maße diese Stammzellen Nachschub für zugrundegegangene Kardiomyozyten bieten können ist noch Gegenstand intensiver Forschung. Zudem muss berücksichtigt werden, dass es sich hier um einen sehr kurzen Beobachtungszeitraum von maximal zwölf Tagen handelte.

So kamen auch Goldman-Johnson und seine Mitarbeiter zu dem Schluss, dass - um die Auswirkungen von Testosteron auf die Differenzierung von Kardiomyozyten zu

beurteilen - eine Behandlung mit Testosteron während der kompletten Phase der Differenzierung stattfinden muss (Goldman-Johnson et al., 2008). Dies ist bei den hier aufgeführten Daten weder für Testosteron, noch für Norbolethon oder THG der Fall. Goldman-Johnson et al. konnten auch am Modell von embryonalen Stammzellen von Mäusen zeigen, dass Androgene eine Steigerung der Differenzierung zu Kardiomyozyten bewirken. Dies ist gut in Einklang zu bringen mit den in dieser Arbeit für Testosteron gewonnenen Daten. Auch die Aussage, dass der Einfluss von Testosteron erst nach fünf bis zehn Tagen sichtbar ist (Goldman-Johnson et al., 2008), kann hier bestätigt werden. Die Zahlen der gezählten Kardiomyozytencluster lagen auch hier erst ab dem sechsten Tag nach Plattierung der Embryoid Bodies über der Anzahl der Kontrollgruppe und überstieg diese bis zum letzten Beobachtungszeitpunkt auf sehr eindruckliche Art und Weise.

Auch mögliche Unterschiede der Auswirkung von Testosteron auf männliche und weibliche Stammzellen wurden untersucht. In einer Arbeit von Goldman-Johnson und seinen Mitarbeitern wurden drei männliche sowie eine weibliche Stammzelllinie mit Testosteron behandelt. Interessanterweise wurden in der weiblichen Stammzelllinie die gleichen Effekte von Testosteron, nämlich eine steigende Anzahl an schlagenden Kardiomyozyten, wie bei den männlichen Stammzellen beobachtet. Alle vier Zelllinien zeigten einen statistisch signifikanten Zuwachs an sich formierenden Kardiomyozyten (Goldman-Johnson et al., 2008).

Es ist durchaus denkbar, dass dies (eine Zunahme der Zellzahl) auch für die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse für Testosteron zutrifft. Allerdings wurden in dieser Arbeit Cluster von Herzmuskelzellen untersucht und nicht die Anzahl einzelner Kardiomyozyten erfasst. Daher kann man nicht sicher sagen ob es bei dem hier für Testosteron festgestellten Zuwachs an Myozytenclustern auch zu einer erhöhten Anzahl an einzelnen Kardiomyozyten kam oder ob es sich um Cluster mit wenigen großen Myozyten handelte.

Um dies zu differenzieren und um sagen zu können, ob es – wie bei Goldman-Johnson und Mitarbeitern für Testosteron – unter dem Einfluss von anabolen Steroiden zu einem Zuwachs an einzelnen Kardiomyozyten kommt werden noch weitere Untersuchungen mit anabolen Steroiden bei genauer Bestimmung der Myozytenzellzahl nötig sein.

Goldman- Johnson et al. gingen jedoch nicht genauer auf die Größe der entstandenen Kardiomyozyten ein. So ist es zwar möglich, dass sich viele kleine Kardiomyozyten formieren, wenn sich jedoch nur kleine Herzmuskelzellen bilden, bleibt die Frage nach

der Funktionalität der Zellen und ob diese kleinen Zellen im Zellverband den gerade bei Hochleistungssportlern sehr hohen Belastungen standhalten können.

Somit wird deutlich, dass sich die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse nur zum Teil mit denen der bisherigen Forschungsliteratur decken. Testosteron und die Designersteroiden verhielten sich sehr unterschiedlich. Aufgrund dieser großen Unterschiede bezüglich Wirkung und Nebenwirkungen der Steroide, wie auch aufgrund großer Differenzen innerhalb der Forschung, werden hier weitere Untersuchungen von Nöten sein.

Ergebnisse der Arbeitsgruppe von A. Schmidt zeigten in Experimenten mit Ethyltestosteron und Propyltrenbolon, zwei weiteren synthetisch hergestellten Steroiden, ebenfalls deren Auswirkung auf die Entwicklung von Kardiomyozyten (Schmidt et al., 2006; Schmidt et al., 2007). Auch hier wurde am Stammzellmodell der Maus gearbeitet und Embryoid Bodies wurden als Untersuchungsobjekte herangezogen. Es zeigte sich hierbei, dass sich die Designersteroiden Ethyltestosteron und Propyltrenbolon wiederum komplett anders als THG und Norbolethon verhielten. Sie bewirkten, wie man es auch für THG und Norbolethon erwartet hatte, einen im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlichen Zuwachs an sehr großen Kardiomyozytenclustern ($>3000\text{ }\mu\text{m}$ Länge). Dabei war die Anzahl der Kardiomyozytencluster der kleinsten Kategorie ($0\text{-}500\text{ }\mu\text{m}$ Länge) geringer als die der Kontrollgruppe. Somit stimmen die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von A. Schmidt mit den Aussagen überein, dass es unter der Einnahme von AAS zu einer deutlichen Neigung zu kardialer Hypertrophie kommen kann.

Vergleicht man die Ergebnisse der Arbeitsgruppe von A. Schmidt mit den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen, fällt jedoch auch wieder auf, dass die Designersteroiden nicht alle das gleiche Wirkungsverhalten zeigen. Das macht sie natürlich auch hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen unberechenbar.

Bedenkt man, wie leicht es ist, ein Derivat eines bereits bekannten Steroids zu synthetisieren, wie es im Falle von THG bereits geschehen ist, muss davor gewarnt werden, diese Substanzen ohne vorherige Testungen und wissenschaftliche Untersuchungen einzunehmen, da bereits geringfügige strukturelle Veränderungen zu großen Auswirkungen auf das Wirkungs- und Nebenwirkungsspektrum führen können.

Aufgrund der unterschiedlichen Nebenwirkungen der anabolen Steroide bei Männern und Frauen erstaunt, dass sie sich anscheinend hinsichtlich der Beeinflussung der Kardiomyozytogenese kaum unterscheiden (Goldman-Johnson et al., 2008). Trotzdem muss betont werden, dass Frauen einem großen Risiko für irreversible Virilisierungserscheinungen wie Brustatrophie, Hirsutismus, Veränderung der Stimmlage, Amenorrhö, Klitorishypertrophie, u.v.m. ausgesetzt sind (Kicman, 2008). Außerdem besteht für beide Geschlechter die Gefahr von kardiovaskulären Zwischenfällen, wie auch für lebensbedrohliche Leberschäden (Kicman, 2008).

Friedel et al. führten zudem an der Deutschen Sporthochschule Köln Untersuchungen an Hefezellmodellen durch. Diese werden häufig dazu genutzt, molekulare Mechanismen der Steroidhormonwirkung zu studieren. Dabei fanden sie heraus, dass THG zwar mit hoher Affinität, allerdings unselektiv an den Androgenrezeptor bindet. THG bindet auch an den Progestin-, Glucocorticoid- und Mineralocorticoidrezeptor. Dabei zeigte es die höchste Affinität zum Glucocorticoidrezeptor (Friedel et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigen, dass THG dementsprechend auch als funktionelles Progestin, Glucocorticoid oder Mineralocorticoid wirken kann. Somit steigt das Risiko für weitere, ernste Nebenwirkungen.

Daraus wird deutlich, wie wichtig strenge Dopingkontrollen und gute Aufklärung bezüglich möglicher Wirkungen und Nebenwirkungen von Designersteroiden sind.

5. Ausblick

Die Menschen haben schon seit langer Zeit den Traum, ihre körperliche Leistungsfähigkeit durch die Einnahme pharmakologischer Wirkstoffe zu verbessern. Es ist bekannt, dass Sportler bereits bei Wettkämpfen in der Antike stimulierende Substanzen einnahmen um leistungstärker als ihre Gegner zu sein (Fraser, 2004).

Doch erst in den 1960er Jahren wurden erste Dopingverbote eingeführt, nachdem es zu plötzlichen Todesfällen, vor allem im Radsport, gekommen war.

Wir leben heute in einer leistungsorientierten Gesellschaft, in der es für Spitzensportler sehr schwierig ist ohne pharmakologische Unterstützung konkurrenzfähig zu sein. Der Hochleistungssport ist ein Milliardengeschäft, in welches ganze Industriezweige involviert sind. Es geht schon lange nicht mehr nur um „Ruhm und Ehre“, sondern auch um viel Geld in diesem Geschäft.

Allerdings hat in den letzten Jahren auch der Anteil an Freizeit- und Fitnesssportlern zugenommen, die anabole Steroide oder andere pharmakologische Substanzen einnehmen, um „Investitionen ins körperliche Kapital“ zur Steigerung der „sozialen Anerkennung und Selbstgewissheit“ (Gugutzer, 2007) vorzunehmen – dies wird besonders bei der Betrachtung der Bodybuilder-Szene deutlich. Bei dieser Sportlergruppe finden sich jedoch sicherlich andere Motive als im Hochleistungssport. Hier geht es häufig nicht um den funktionalen, sondern um den optischen Aspekt des (ästhetischen) Körpers. Die so genannte Muskeldysmorphie, das zwanghafte Streben nach einem muskulösen Körper, ist besonders in Bodybuilder-Kreisen weit verbreitet (Mosley, 2008; Cafri et al., 2008).

Es muss auch daran erinnert werden, dass die meisten Doping-Substanzen ursprünglich zur Therapie von Krankheiten hergestellt wurden und zum größten Teil ein nicht unbeträchtliches Spektrum an Nebenwirkungen besitzen. Somit ist die Gefahr, dem Körper schwere und auch dauerhafte Schäden zuzufügen, groß. Vielen Sportlern scheint nicht bewusst zu sein, welch großem Risiko sie ihren Körper damit aussetzen.

Es ist inzwischen bekannt, dass bei Sportarten im heutigen Spitzensport, bei denen die motorischen Grundeigenschaften Kraft, Schnelligkeit und Ausdauer im Vordergrund stehen, flächendeckend gedopt wird.

Am 19. Juli 2007 titelte die Süddeutsche Zeitung: „Doping ruiniert den deutschen Radsport“, nachdem nach vielen anderen Radsportlern auch noch Radprofi Patrik Sinkewitz positiv auf Testosteron getestet wurde. Und nun wundert man sich bei den

olympischen Sommerspielen 2008, dass ein Weltrekord nach dem anderen aufgestellt wird. Man fragt sich, ob es möglich ist, dass alleinig andere Trainingsmethoden und bessere Ausrüstung zu solch klaren Siegen und Weltrekorden führen können. Oder haben wir es tatsächlich mit einer ungewöhnlichen Anzahl an Jahrhunderttalenten zu tun?

Noch nie wurde das Thema öffentlich so viel diskutiert wie in den letzten Jahren. Zuerst hat das Image des Radsports beträchtlich gelitten, nun aber betrifft die Dopingthematik fast alle Sportarten.

Soll das Dopingkontrollsystem erfolgreich arbeiten, ist es wichtig einen weltweit einheitlichen Strafenkatalog einzurichten, nach dem sich alle Sportarten in jedem Land zu richten haben.

Ein großes Problem stellt hierbei der Nachweis verbotener Substanzen dar. Trotz des Einsatzes modernster Nachweismethoden ist es nicht möglich, die Einnahme sämtlicher verbotener Substanzen nachzuweisen. Es werden immer wieder neue Substanzen entwickelt, die mit den bisher verwendeten Detektionsverfahren noch nicht erfasst werden. Zum Teil bewirken bereits kleinste Veränderungen an der molekularen Struktur bestimmter Substanzen (z. B. anaboler Steroide), dass diese mit den gängigen Methoden nicht mehr nachweisbar sind. Ein negativer Dopingtest bestätigt somit nicht, dass ein Sportler keine verbotenen Substanzen eingenommen hat.

Außerdem besteht, wie auch aus dieser Arbeit deutlich wird, noch großer Forschungsbedarf. Es gibt noch einige Gebiete, in denen Uneinigkeit herrscht. Dazu zählen auch z. B. die in dieser Arbeit untersuchten Auswirkungen der Designersteroide und von Testosteron auf die Gefäße und das Herz. Zusätzlich sollte gut zwischen den einzelnen Designersteroiden differenziert werden. Wie die hier erhobenen Daten zeigen konnten, gibt es sehr große Unterschiede trotz fast identischer Struktur. Eine kleine strukturelle Veränderung reicht aus, um ein Steroid vollkommen unberechenbar zu machen. Deshalb sollten die einzelnen Steroide genauer bezüglich ihrer potentiellen Nebenwirkungen untersucht werden. Denn nur wenn man Wirkung und Nebenwirkungen der Substanzen kennt kann man auch glaubhaft vor der Einnahme warnen. Viel zu viele Freizeit- und Profisportler nehmen diese Substanzen ein, ohne auch nur geringste Kenntnisse über die möglichen Nebenwirkungen zu haben.

Wie hier dargestellt sind Stammzellen ein gutes System um die Wirkungen von Steroidhormonen zu untersuchen, da sie pluripotent sind und somit die Fähigkeit besitzen, sich zu jedem Zelltyp zu entwickeln. Allerdings werden in Zukunft auch weitere in-vivo-Versuche nötig sein, um die in vitro-gewonnenen Daten zu bestätigen.

Es sind also sowohl die Ausdehnung der Forschung auf diesem Feld als auch Aufklärung, strikte, randomisierte Dopingkontrollen und konsequente und längere Disqualifikationen dopender Sportler nötig, um die Gefahren durch Einnahme dieser Substanzen zu verringern und Sport auch wieder für Sportler, die sich weigern, Dopingsubstanzen zu sich zu nehmen und auch für Zuschauer attraktiv werden zu lassen.

6. Zusammenfassung

Doping ist ein weit verbreitetes Problem, das nicht nur im Wettkampfsport, sondern auch im Freizeitsport und beim Krafttraining von Bedeutung ist.

Der Missbrauch von anabolen Steroiden wurde bereits seit 1950 beobachtet, ist jedoch erst seit dem Jahre 1974 verboten.

Um die gängigen Dopinganalysen zu umgehen wurde die Molekülstruktur einzelner Steroidhormone geringfügig verändert, sodass die Produkte - die so genannten Designersteroiden - mit den üblichen Nachweisverfahren nicht mehr erfasst wurden. Die Einnahme von anabolen androgenen Steroiden ist zwar weit verbreitet, diese sind allerdings nur ungenügend hinsichtlich möglicher Nebenwirkungen untersucht.

In der hier vorgestellten Arbeit wurden zwei dieser Designersteroiden - Norbolethon und Tetrahydrogestrinon - bezüglich ihrer Auswirkungen auf das Gefäßsystem und auf die Entwicklung von Kardiomyozyten untersucht und jeweils zu Testosteron als endogenem Steroid und zu einer unbehandelten Kontrollgruppe in Bezug gesetzt.

Hierzu wurden embryonale Stammzellen aus Mäusen während unterschiedlicher Zeitspannen mit Tetrahydrogestrinon und Norbolethon behandelt. Anschließend wurden sie einer Immunhistochemie unterzogen, um einerseits Endothelzellen, Angioblasten und Gefäßanlagen, andererseits Kardiomyozyten sichtbar zu machen. Daraufhin wurden die fixierten Embryoid Bodies mikroskopisch untersucht.

Bei der mikroskopischen Analyse der Gefäßanlagen und der Endothelzellen wurden die Anzahl der vorhandenen Gefäßanlagen, deren Qualität und Morphologie, die endotheliale Proliferation und die endotheliale Apoptose untersucht.

Hierbei konnten starke Effekte der Designersteroiden auf die Gefäße während unterschiedlicher Entwicklungsstadien beobachtet werden. Nicht nur kam es zu einer beträchtlich gesteigerten Anzahl an Gefäßanlagen, es konnten auch deutliche Auswirkungen auf die Gefäßqualität und Gefäßmorphologie dokumentiert werden.

Zusätzlich konnten deutliche Auswirkungen auf die Proliferations- und Apoptoseraten der Endothelzellen beobachtet werden. Die Proliferationsraten unter dem Einfluss der Designersteroiden und unter der Einwirkung von Testosteron waren im Vergleich zur Kontrolle gesteigert. Außerdem kam es zu erhöhten Raten an endothelialer Apoptose unter dem Einfluss von Testosteron, Norbolethon und Tetrahydrogestrinon.

Somit wird deutlich, dass die Designersteroidoide Norbolethon und Tetrahydrogestrinon das Gefäßsystem in den verschiedenen Entwicklungsstadien beeinflussen und zu Veränderungen in der Qualität und Morphologie der Gefäße führen.

Bei der mikroskopischen Untersuchung der Kardiomyozytencluster wurde die Anzahl der vorhandenen Kardiomyozytencluster pro Embryoid Body und deren Größe analysiert. Auch hier konnten deutliche Effekte der Designersteroidoide auf die Zellen vermerkt werden. Es kam zu negativen Auswirkungen von Tetrahydrogestrinon und Norbolethon auf die Menge und Größe der vorhandenen Kardiomyozytencluster.

Anders verhielt es sich mit dem natürlichen Steroidhormon Testosteron. Unter der Einwirkung von Testosteron konnte eine Zunahme der Anzahl an Kardiomyozytenclustern festgestellt werden, diese waren jedoch von geringerer Größe als in der Kontrollgruppe.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Designersteroidoide Tetrahydrogestrinon und Norbolethon sowohl das Gefäßsystem als auch die Entwicklung von Kardiomyozytenclustern deutlich beeinflussen und somit große Risiken hinsichtlich möglicher Nebenwirkung bergen.

7. Literaturverzeichnis

1. Akhurst R J, Lehnert S A, Faissner A, Duffie E. TGF beta in murine morphogenetic processes: the early embryo and cardiogenesis. *Development* 1990; (108): 645-656.
2. Araki S, Shimada Y, Kaji K, Hayashi H. Apoptosis of vascular endothelial cells by fibroblast growth factor deprivation. *Biochem Biophys Res Commun* 1990a; (168): 1194-1200.
3. Araki S, Simada Y, Kaji K, Hayashi H. Role of protein kinase C in the inhibition by fibroblast growth factor of apoptosis in serum-depleted endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1990b; (172): 1081-1085.
4. Asahara T, Kalka C, Isner J M. Stem cell therapy and gene transfer for regeneration. *Gene Ther* 2000; (7): 451-457.
5. Asahara T, Kawamoto A. Endothelial progenitor cells for postnatal vasculogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol* 2004; (287): C572-C579.
6. Asahara T, Masuda H, Takahashi T, Kalka C, Pastore C, Silver M, Kearne M, Wagner M, Isner J M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization. *Circ Res* 1999a; (85): 221-228.
7. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, Silver M, van der Z R, Li T, Witzenbichler B, Schatteman G, Isner J M. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science* 1997; (275): 964-967.
8. Asahara T, Takahashi T, Masuda H, Kalka C, Chen D, Iwaguro H, Inai Y, Silver M, Isner J M. VEGF contributes to postnatal neovascularization by mobilizing bone marrow-derived endothelial progenitor cells. *EMBO J* 1999b; (18): 3964-3972.
9. Auerbach W, Auerbach R. Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmacol Ther* 1994; (63): 265-311.
10. Augustin H G. Tubes, branches, and pillars: the many ways of forming a new vasculature. *Circ Res* 2001; (89): 645-647.
11. Augustin H G. [Angiogenesis research--quo vadis?]. *Ophthalmologe* 2003; (100): 104-110.
12. Bahrke M S, Yesalis C E. Abuse of anabolic androgenic steroids and related substances in sport and exercise. *Curr Opin Pharmacol* 2004; (4): 614-620.
13. Bailey A S, Fleming W H. Converging roads: evidence for an adult hemangioblast. *Exp Hematol* 2003; (31): 987-993.
14. Bain G, Kitchens D, Yao M, Huettner J E, Gottlieb D I. Embryonic stem cells express neuronal properties in vitro. *Dev Biol* 1995; (168): 342-357.

15. Baldwin H S. Early embryonic vascular development. *Cardiovasc Res* 1996; (31 Spec No): E34-E45.
16. Baldwin H S, Shen H M, Yan H C, DeLisser H M, Chung A, Mickanin C, Trask T, Kirschbaum N E, Newman P J, Albelda S M, . Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1/CD31): alternatively spliced, functionally distinct isoforms expressed during mammalian cardiovascular development. *Development* 1994; (120): 2539-2553.
17. Bartel H, Lametschwandtner A. Intussusceptive microvascular growth in the lung of larval *Xenopus laevis* Daudin: a light microscope, transmission electron microscope and SEM study of microvascular corrosion casts. *Anat Embryol (Berl)* 2000; (202): 55-65.
18. Bellamy C O, Malcomson R D, Harrison D J, Wyllie A H. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol* 1995; (6): 3-16.
19. Benjamin LE, Hemo I, Keshet E. A plasticity window for blood vessel remodelling is defined by pericyte coverage of the preformed endothelial network and is regulated by PDGF-B and VEGF. *Development*. 1998 May;125(9):1591-8.
20. Benjamin LE, Golijanin D, Itin A, Pode D, Keshet E. Selective ablation of immature blood vessels in established human tumors follows vascular endothelial growth factor withdrawal. *J Clin Invest*. 1999 Jan;103(2):159-65.
21. Bhasin S, Woodhouse L, Storer T W. Proof of the effect of testosterone on skeletal muscle. *J Endocrinol* 2001; (170): 27-38.
22. Blood C H, Zetter B R. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1990; (1032): 89-118.
23. Bowers L D. Abuse of performance-enhancing drugs in sport. *Ther Drug Monit* 2002; (24): 178-181.
24. Breier G, Breviario F, Caveda L, Berthier R, Schnurch H, Gotsch U, Vestweber D, Risau W, Dejana E. Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial-cadherin in early stage development of cardiovascular system. *Blood* 1996; (87): 630-641.
25. Brodsky I G, Balagopal P, Nair K S. Effects of testosterone replacement on muscle mass and muscle protein synthesis in hypogonadal men--a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; (81): 3469-3475.
26. Brook F A, Gardner R L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; (94): 5709-5712
27. Burri P H, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis--the alternative to capillary sprouting. *Mol Aspects Med* 2002; (23): S1-27.

28. Burri P H, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance. *Dev Dyn* 2004; (231): 474-488.
29. Buzby G C, Jr., Walk C R, Smith H. Totally synthetic steroid hormones. X. Some (plus or minus)-13beta-ethyl-7alpha-methylgonane derivatives. *J Med Chem* 1966; (9): 782-784.
30. Campbell JH, Campbell GR. Endothelial cell influences on vascular smooth muscle phenotype. *Annu Rev Physiol.* 1986;48:295-306.
31. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 2000; (6): 389-395.
32. Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoek A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A. Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature* 1996; (380): 435-439.
33. Carmeliet P, Luttun A. The emerging role of the bone marrow-derived stem cells in (therapeutic) angiogenesis. *Thromb Haemost* 2001; (86): 289-297.
34. Catlin D H, Ahrens B D, Kucherova Y. Detection of norbolethone, an anabolic steroid never marketed, in athletes' urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2002; (16): 1273-1275.
35. Catlin D H, Sekera M H, Ahrens B D, Starcevic B, Chang Y C, Hatton C K. Tetrahydrogestrinone: discovery, synthesis, and detection in urine. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2004; (18): 1245-049.
36. Chang,C.Y.; Hsuuw,Y.D.; Huang,F.J.; Shyr,C.R.; Chang,S.Y.; Huang,C.K.; Kang,H.Y.; Huang,K.E. Androgenic and antiandrogenic effects and expression of androgen receptor in mouse embryonic stem cells. *Fertil Steril.* 2006 Apr; 85 Suppl 1:1195-203.
37. Choi K, Kennedy M, Kazarov A, Papadimitriou J C, Keller G. A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* 1998; (125): 725-732.
38. Clark B M, Schofield R S. Dilated cardiomyopathy and acute liver injury associated with combined use of ephedra, gamma-hydroxybutyrate, and anabolic steroids. *Pharmacotherapy* 2005; (25): 756-761.
39. Collins P D, Connolly D T, Williams T J. Characterization of the increase in vascular permeability induced by vascular permeability factor in vivo. *Br J Pharmacol* 1993; (109): 195-199.
40. Conn G, Bayne M L, Soderman D D, Kwok P W, Sullivan K A, Palisi T M, Hope D A, Thomas K A. Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; (87): 2628-2632.

41. Cunha TS, Moura MJ, Bernardes CF, Tanno AP, Marcondes FK. Vascular sensitivity to phenylephrine in rats submitted to anaerobic training and nandrolone treatment. *Hypertension*. 2005 Oct;46(4):1010-5.
42. Dani C, Smith A G, Dessolin S, Leroy P, Staccini L, Villageois P, Darimont C, Ailhaud G. Differentiation of embryonic stem cells into adipocytes in vitro. *J Cell Sci* 1997; (110 (Pt 11)): 1279-1285.
43. D'Ascenzo S, Millimaggi D, Di Massimo C, Saccani-Jotti G, Botrè F, Carta G, Tozzi-Ciancarelli MG, Pavan A, Dolo V. Detrimental effects of anabolic steroids on human endothelial cells. *Toxicol Lett*. 2007 Mar 8;169(2):129-36.
44. Davies M P, An R H, Doevendans P, Kubalak S, Chien K R, Kass R S. Developmental changes in ionic channel activity in the embryonic murine heart. *Circ Res* 1996; (78): 15-25.
45. Death A K, McGrath K C, Kazlauskas R, Handelsman D J. Tetrahydrogestrinone is a potent androgen and progestin. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; (89): 2498-2500.
46. DeLisser H M, Newman P J, Albelda S M. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. *Immunol Today* 1994; (15): 490-495.
47. De Mello D E, Reid L M. Embryonic and early fetal development of human lung vasculature and its functional implications. *Pediatr Dev Pathol* 2000; (3): 439-449.
48. De Mello D E, Sawyer D, Galvin N, Reid L M. Early fetal development of lung vasculature. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1997; (16): 568-581.
49. De Piccoli B, Giada F, Benettin A, Sartori F, Piccolo E. Anabolic steroid use in body builders: an echocardiographic study of left ventricle morphology and function. *Int J Sports Med*. 1991 Aug;12(4):408-12.
50. Dhar R, Stout C W, Link M S, Homoud M K, Weinstock J, Estes N A, III. Cardiovascular toxicities of performance-enhancing substances in sports. *Mayo Clin Proc* 2005; (80): 1307-1315.
51. Dibbert B, Simon H U. [The molecular mechanism of apoptosis. Report of the 4th European Conference on Apoptosis]. *Dtsch Med Wochenschr* 1997; (122): 523-526.
52. Di Bello V, Giorgi D, Bianchi M, Bertini A, Caputo MT, Valenti G, Furioso O, Alessandri L, Paterni M, Giusti C. Effects of anabolic-androgenic steroids on weight-lifters' myocardium: an ultrasonic videodensitometric study. *Med Sci Sports Exerc*. 1999 Apr;31(4):514-21.
53. Dickerman RD, Schaller F, Zachariah NY, McConathy WJ. Left ventricular size and function in elite bodybuilders using anabolic steroids. *Clin J Sport Med*. 1997 Apr;7(2):90-3.

54. Dimmeler S, Zeiher A M. Endothelial cell apoptosis in angiogenesis and vessel regression. *Circ Res* 2000; (87): 434-439.
55. Dini L, Lentini A, Diez G D, Rocha M, Falasca L, Serafino L, Vidal-Vanaclocha F. Phagocytosis of apoptotic bodies by liver endothelial cells. *J Cell Sci* 1995; (108 (Pt 3)): 967-973.
56. Di Paolo M, Agozzino M, Toni C, Luciani AB, Molendini L, Scaglione M, Inzani F, Pasotti M, Buzzi F, Arbustini E. Sudden anabolic steroid abuse-related death in athletes. *Int J Cardiol.* 2007 Jan 2;114(1):114-7.
57. Djonov V, Schmid M, Tschanz S A, Burri P H. Intussusceptive angiogenesis: its role in embryonic vascular network formation. *Circ Res* 2000; (86): 286-292.
58. Doetschman T C, Eistetter H, Katz M, Schmidt W, Kemler R. The in vitro development of blastocyst-derived embryonic stem cell lines: formation of visceral yolk sac, blood islands and myocardium. *J Embryol Exp Morphol* 1985; (87): 27-45.
59. Doetschman T, Shull M, Kier A, Coffin J D. Embryonic stem cell model systems for vascular morphogenesis and cardiac disorders. *Hypertension* 1993a; (22): 618-629.
60. Drab M, Haller H, Bychkov R, Erdmann B, Lindschau C, Haase H, Morano I, Luft F C, Wobus A M. From totipotent embryonic stem cells to spontaneously contracting smooth muscle cells: a retinoic acid and db-cAMP in vitro differentiation model. *FASEB J* 1997; (11): 905-915.
61. Duke R C, Ojcius D M, Young J D. Cell suicide in health and disease. *Sci Am* 1996; (275): 80-87.
62. Dumont D J, Fong G H, Puri M C, Gradwohl G, Alitalo K, Breitman M L. Vascularization of the mouse embryo: a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* 1995; (203): 80-92.
63. Dzierzak E, Medvinsky A. Mouse embryonic hematopoiesis. *Trends Genet* 1995; (11): 359-366.
64. Ebenbichler CF, Sturm W, Gänzer H, Bodner J, Mangweth B, Ritsch A, Sandhofer A, Lechleitner M, Föger B, Patsch JR. Flow-mediated, endothelium-dependent vasodilatation is impaired in male body builders taking anabolic-androgenic steroids. *Atherosclerosis.* 2001 Oct;158(2):483-90.
65. Edgren R A. A Comparative study of the anabolic and androgenic effects of various steroids. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1963; (44): Suppl 87-21.
66. Egginton S, Zhou A L, Brown M D, Hudlicka O. Unorthodox angiogenesis in skeletal muscle. *Cardiovasc Res* 2001; (49): 634-646.

67. Enoki T, Yoshida Y, Lally J, Hatta H, Bonen A. Testosterone increases lactate transport, monocarboxylate transporter (MCT) 1 and MCT4 in rat skeletal muscle. *J Physiol* 2006; (577): 433-443.
68. Erber W N. Human leucocyte differentiation antigens: review of the CD nomenclature. *Pathology* 1990; (22): 61-69.
69. Evans M J, Kaufman M H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 1981; (292): 154-156.
70. Ferencick GS. Association of steroid abuse with cardiomyopathy in athletes. *Am J Med.* 1991 Nov;91(5):562.
71. Ferrando A A, Sheffield-Moore M, Yeckel C W, Gilkison C, Jiang J, Achacosa A, Lieberman S A, Tipton K, Wolfe R R, Urban R J. Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; (282): E601-E607.
72. Ferrando A A, Tipton K D, Doyle D, Phillips S M, Cortiella J, Wolfe R R. Testosterone injection stimulates net protein synthesis but not tissue amino acid transport. *Am J Physiol* 1998; (275): E864-E871.
73. Ferrera PC, Putnam DL, Verdile VP. Anabolic steroid use as the possible precipitant of dilated cardiomyopathy. *Cardiology.* 1997 Mar-Apr;88(2):218-20.
74. Fishman M C, Chien K R. Fashioning the vertebrate heart: earliest embryonic decisions. *Development* 1997; (124): 2099-2117.
75. Flamme I, Frolich T, Risau W. Molecular mechanisms of vasculogenesis and embryonic angiogenesis. *J Cell Physiol* 1997; (173): 206-210.
76. Folkman J. What is the role of endothelial cells in angiogenesis? *Lab Invest* 1984; (51): 601-604.
77. Folkman J, Shing Y. Angiogenesis. *J Biol Chem* 1992; (267): 10931-10934.
78. Foresta C, Caretta N, Lana A, De Toni L, Biagioli A, Ferlin A, Garolla A. Reduced number of circulating endothelial progenitor cells in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Nov; 91(11):4599-602.
79. Fraichard A, Chassande O, Bilbaut G, Dehay C, Savatier P, Samarut J. In vitro differentiation of embryonic stem cells into glial cells and functional neurons. *J Cell Sci* 1995; (108 (Pt 10)): 3181-3188.
80. Fraser A D. Doping control from a global and national perspective. *Ther Drug Monit* 2004; (26): 171-174.
81. Freeman B J, Rooker G D. Spontaneous rupture of the anterior cruciate ligament after anabolic steroids. *Br J Sports Med* 1995; (29): 274-275.
82. Freeman E R, Bloom D A, McGuire E J. A brief history of testosterone. *J Urol* 2001; (165): 371-373.

83. Friedel A, Geyer H, Kamber M, Laudénbach-Leschowsky U, Schanzer W, Thevis M, Vollmer G, Zierau O, Diel P. Tetrahydrogestrinone is a potent but unselective binding steroid and affects glucocorticoid signalling in the liver. *Toxicol Lett* 2006; (164): 16-23.
84. Furcht L T. Critical factors controlling angiogenesis: cell products, cell matrix, and growth factors. *Lab Invest* 1986; (55): 505-509.
85. Gebb S A, Shannon J M. Tissue interactions mediate early events in pulmonary vasculogenesis. *Dev Dyn* 2000; (217): 159-169.
86. Gehling U M, Ergun S, Schumacher U, Wagener C, Pantel K, Otte M, Schuch G, Schafhausen P, Mende T, Kilic N, Kluge K, Schafer B, Hossfeld D K, Fiedler W. In vitro differentiation of endothelial cells from AC133-positive progenitor cells. *Blood* 2000; (95): 3106-3112.
87. Gerber H P, Dixit V, Ferrara N. Vascular endothelial growth factor induces expression of the antiapoptotic proteins Bcl-2 and A1 in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* 1998; (273): 13313-13316.
88. Gilbert SF. Opening Darwin's black box: teaching evolution through developmental genetics. *Nat Rev Genet.* 2003 Sep;4(9):735-41.
89. Gogate A N. Evaluation of clinical efficacy and safety of norbolethone in the treatment of idiopathic underweight. *Indian J Med Sci* 1969; (23): 648-653.
90. Goldman-Johnson DR, de Kretser DM, Morrison JR. Evidence that androgens regulate early developmental events, prior to sexual differentiation. *Endocrinology.* 2008 Jan; 149(1):5-14.
91. Gonzalez-Crussi F. Vasculogenesis in the chick embryo. An ultrastructural study. *Am J Anat* 1971; (130): 441-460.
92. Greenblatt R B, Jungck E C, King G C. Clinical evaluation of a new anabolic steroid. *Am J Med Sci* 1964; (248): 317-328.
93. Green D R. At the gates of death. *Cancer Cell* 2006; (9): 328-330.
94. Green D R, Reed J C. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998; (281): 1309-1312.
95. Gugutzer, R. Körperkult und Schönheitswahn – Wider den Zeitgeist. *Aus Politik und Zeitgeschichte.* 18: 3-6, 2007.
96. Hall RC, Hall RC. Abuse of supraphysiologic doses of anabolic steroids. *South Med J.* 2005 May;98(5):550-5. Review.
97. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* 1996; (86): 353-364.
98. Hansen B. New images of a new medicine: visual evidence for the widespread popularity of therapeutic discoveries in America after 1885. *Bull Hist Med* 1999; (73): 629-678.

99. Haupt H A, Rovere G D. Anabolic steroids: a review of the literature. *Am J Sports Med* 1984; (12): 469-484.
100. Hebert M J, Gullans S R, Mackenzie H S, Brady H R. Apoptosis of endothelial cells is associated with paracrine induction of adhesion molecules: evidence for an interleukin-1 β -dependent paracrine loop. *Am J Pathol* 1998; (152): 523-532.
101. Herold G. *Innere Medizin*. Köln, 2005.
102. Hescheler J, Fleischmann B K, Lentini S, Maltsev V A, Rohwedel J, Wobus A M, Addicks K. Embryonic stem cells: a model to study structural and functional properties in cardiomyogenesis. *Cardiovasc Res* 1997; (36): 149-162.
103. His W.: *Lecithoblast und Angioblast der Wirbelthiere*. Abhandl K S Ges Wiss Math Phys. 1900; (22): 171–328.
104. Hoberman J M, Yesalis C E. The history of synthetic testosterone. *Sci Am* 1995; (272): 76-81.
105. Hoetzer GL, MacEneaney OJ, Irmiger HM, Keith R, Van Guilder GP, Stauffer BL, DeSouza CA. Gender differences in circulating endothelial progenitor cell colony-forming capacity and migratory activity in middle-aged adults. *Am J Cardiol*. 2007 Jan 1; 99(1):46-8.
106. Holmang A, Svedberg J, Jennische E, Bjorntorp P. Effects of testosterone on muscle insulin sensitivity and morphology in female rats. *Am J Physiol* 1990; (259): E555-E560.
107. Hudlicka O, Brown M, Egginton S. Angiogenesis in skeletal and cardiac muscle. *Physiol Rev* 1992; (72): 369-417.
108. Ingber D E, Folkman J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell* 1989; (58): 803-805.
109. Jakeman L B, Winer J, Bennett G L, Altar C A, Ferrara N. Binding sites for vascular endothelial growth factor are localized on endothelial cells in adult rat tissues. *J Clin Invest* 1992; (89): 244-253.
110. Jasuja R, Catlin D H, Miller A, Chang Y C, Herbst K L, Starcevic B, Artaza J N, Singh R, Datta G, Sarkissian A, Chandsawangbhuwana C, Baker M, Bhasin S. Tetrahydrogestrinone is an androgenic steroid that stimulates androgen receptor-mediated, myogenic differentiation in C3H10T1/2 multipotent mesenchymal cells and promotes muscle accretion in orchidectomized male rats. *Endocrinology* 2005; (146): 4472-4478.
111. Kalka C, Asahara T, Krone W, Isner J M. [Angiogenesis and vasculogenesis. Therapeutic strategies for stimulation of postnatal neovascularization]. *Herz* 2000; (25): 611-622.
112. Kam PC, Yarrow M. Anabolic steroid abuse: physiological and anaesthetic considerations. *Anaesthesia*. 2005 Jul;60(7):685-92. Review.

113. Karila TA, Karjalainen JE, Mäntysaari MJ, Viitasalo MT, Seppälä TA. Anabolic androgenic steroids produce dose-dependant increase in left ventricular mass in power athletes, and this effect is potentiated by concomitant use of growth hormone. *Int J Sports Med.* 2003 Jul;24(5):337-43.
114. Kaufman MH: *The Atlas of Mouse Development.* Academic Press, London, 1992
115. Keller G M. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol* 1995; (7): 862-869.
116. Kennedy MC, Lawrence C. Anabolic steroid abuse and cardiac death. *Med J Aust.* 1993 Mar 1;158(5):346-8.
117. Kicman AT. Pharmacology of anabolic steroids. *Br J Pharmacol.* 2008 Jun; 154(3):502-21.
118. Kindermann W. [Cardiovascular side effects of anabolic-androgenic steroids]. *Herz.* 2006 Sep;31(6):566-73.
119. Kirby M L. Molecular embryogenesis of the heart. *Pediatr Dev Pathol* 2002; (5): 516-543.
120. Kolossov E, Fleischmann B K, Liu Q, Bloch W, Viatchenko-Karpinski S, Manzke O, Ji G J, Bohlen H, Addicks K, Hescheler J. Functional characteristics of ES cell-derived cardiac precursor cells identified by tissue-specific expression of the green fluorescent protein. *J Cell Biol* 1998; (143): 2045-2056.
121. Kondro W. Athletes' "designer steroid" leads to widening scandal. *Lancet* 2003; (362): 1466.
122. Kovacic JC, Moore J, Herbert A, Ma D, Boehm M, Graham RM. Endothelial progenitor cells, angioblasts, and angiogenesis--old terms reconsidered from a current perspective. *Trends Cardiovasc Med.* 2008 Feb;18(2):45-51.
123. Krause D S, Fackler M J, Civin C I, May W S. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood* 1996; (87): 1-13.
124. Kuhn C M. Anabolic steroids. *Recent Prog Horm Res* 2002; (57): 411-434.
125. Kurz H, Korn J, Eggli P S, Huang R, Christ B. Embryonic central nervous system angiogenesis does not involve blood-borne endothelial progenitors. *J Comp Neurol* 2001; (436): 263-274.
126. Lammert E, Cleaver O, Melton D. Induction of pancreatic differentiation by signals from blood vessels. *Science* 2001; (294): 564-567.
127. Lampugnani M G, Resnati M, Raiteri M, Pigott R, Pisacane A, Houen G, Ruco L P, Dejana E. A novel endothelial-specific membrane protein is a marker of cell-cell contacts. *J Cell Biol* 1992; (118): 1511-1522.
128. Landry G L, Primos W A, Jr. Anabolic steroid abuse. *Adv Pediatr* 1990; (37): 185-205.

129. Lane HA, Grace F, Smith JC, Morris K, Cockcroft J, Scanlon MF, Davies JS. Impaired vasoreactivity in bodybuilders using androgenic anabolic steroids. *Eur J Clin Invest*. 2006 Jul;36(7):483-8.
130. Laroche G P. Steroid anabolic drugs and arterial complications in an athlete--a case history. *Angiology* 1990; (41): 964-969.
131. Lemaire C, Andreau K, Souvannavong V, Adam A. Inhibition of caspase activity induces a switch from apoptosis to necrosis. *FEBS Lett* 1998; (425): 266-270.
132. LeVann L J, Cohn R E. Clinical evaluation of norbolethone therapy in stunted growth and poorly thriving children. *Int J Clin Pharmacol* 1972; (6): 54-59.
133. Lin Y, Weisdorf D J, Solovey A, Hebbel R P. Origins of circulating endothelial cells and endothelial outgrowth from blood. *J Clin Invest* 2000; (105): 71-77.
134. Liu P Y, Death A K, Handelsman D J. Androgens and cardiovascular disease. *Endocr Rev* 2003; (24): 313-340.
135. Lopez-Collazo E, Mateo J, Miras-Portugal M T, Bosca L. Requirement of nitric oxide and calcium mobilization for the induction of apoptosis in adrenal vascular endothelial cells. *FEBS Lett* 1997; (413): 124-128.
136. Luke JL, Farb A, Virmani R, Sample RH. Sudden cardiac death during exercise in a weight lifter using anabolic androgenic steroids: pathological and toxicological findings. *J Forensic Sci*. 1990 Nov;35(6):1441-7
137. Luttun A, Carmeliet G, Carmeliet P. Vascular progenitors: from biology to treatment. *Trends Cardiovasc Med* 2002; (12): 88-96.
138. Lyngberg KK. [Myocardial infarction and death of a body builder after using anabolic steroids] *Ugeskr Laeger*. 1991 Feb 18;153(8):587-8. Danish.
139. Lyons G E, Schiaffino S, Sassoon D, Barton P, Buckingham M. Developmental regulation of myosin gene expression in mouse cardiac muscle. *J Cell Biol* 1990; (111): 2427-2436.
140. Maltsev V A, Wobus A M, Rohwedel J, Bader M, Hescheler J. Cardiomyocytes differentiated in vitro from embryonic stem cells developmentally express cardiac-specific genes and ionic currents. *Circ Res* 1994; (75): 233-244.
141. Malvey T C, Armsey T D. Tetrahydrogestrinone: the discovery of a designer steroid. *Curr Sports Med Rep* 2005; (4): 227-230.
142. Maravelias C, Dona A, Stefanidou M, Spiliopoulou C. Adverse effects of anabolic steroids in athletes. A constant threat. *Toxicol Lett* 2005; (158): 167-175.
143. Marsh JD, Lehmann MH, Ritchie RH, Gwathmey JK, Green GE, Schiebinger RJ. Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation*. 1998 Jul 21;98(3):256-61.

144. Martin G R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1981; (78): 7634-7638.
145. Matsumoto K, Yoshitomi H, Rossant J, Zaret K S. Liver organogenesis promoted by endothelial cells prior to vascular function. *Science* 2001; (294): 559-563.
146. Maximilian Buja L, Vela D. Cardiomyocyte death and renewal in the normal and diseased heart. *Cardiovasc Pathol.* 2008 Mar 31.
147. Metivier F, Marchais S J, Guerin A P, Pannier B, London G M. Pathophysiology of anaemia: focus on the heart and blood vessels. *Nephrol Dial Transplant* 2000; (15 Suppl 3): 14-18.
148. Meyer G T, Matthias L J, Noack L, Vadas M A, Gamble J R. Lumen formation during angiogenesis in vitro involves phagocytic activity, formation and secretion of vacuoles, cell death, and capillary tube remodelling by different populations of endothelial cells. *Anat Rec* 1997; (249): 327-340.
149. Miraglia S, Godfrey W, Yin A H, Atkins K, Warnke R, Holden J T, Bray R A, Waller E K, Buck D W. A novel five-transmembrane hematopoietic stem cell antigen: isolation, characterization, and molecular cloning. *Blood* 1997; (90): 5013-5021.
150. Nagata S, Nagase H, Kawane K, Mukae N, Fukuyama H. Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003; (10): 108-116.
151. Nieminen MS, Rämö MP, Viitasalo M, Heikkilä P, Karjalainen J, Mäntysaari M, Heikkilä J. Serious cardiovascular side effects of large doses of anabolic steroids in weight lifters. *Eur Heart J.* 1996 Oct;17(10):1576-83.
152. Oelrichs R B, Reid H H, Bernard O, Ziemiecki A, Wilks A F. NYK/FLK-1: a putative receptor protein tyrosine kinase isolated from E10 embryonic neuroepithelium is expressed in endothelial cells of the developing embryo. *Oncogene* 1993; (8): 11-18.
153. Okabe S, Forsberg-Nilsson K, Spiro A C, Segal M, McKay R D. Development of neuronal precursor cells and functional postmitotic neurons from embryonic stem cells in vitro. *Mech Dev* 1996; (59): 89-102.
154. Olson E N, Srivastava D. Molecular pathways controlling heart development. *Science* 1996; (272): 671-676.
155. Pärssinen M, Kujala U, Vartiainen E, Sarna S, Seppälä T. Increased premature mortality of competitive powerlifters suspected to have used anabolic agents. *Int J Sports Med.* 2000 Apr;21(3):225-7.
156. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis as mechanisms of vascular network formation, growth and remodeling. *J Neurooncol* 2000; (50): 1-15.
157. Patan S. Vasculogenesis and angiogenesis. *Cancer Treat Res* 2004; (117): 3-32.

158. Pearson AC, Schiff M, Mrosek D, Labovitz AJ, Williams GA. Left ventricular diastolic function in weight lifters. *Am J Cardiol.* 1986 Dec 1;58(13):1254-9.
159. Pelliccia A, Spataro A, Caselli G, Maron BJ. Absence of left ventricular wall thickening in athletes engaged in intense power training. *Am J Cardiol.* 1993 Nov 1;72(14):1048-54.
160. Peters K, Troyer D, Kummer S, Kirkpatrick C J, Rauterberg J. Apoptosis causes lumen formation during angiogenesis in vitro. *Microvasc Res* 2002; (64): 334-338.
161. Prior BM, Yang HT, Terjung RL. What makes vessels grow with exercise training? *J Appl Physiol.* 2004 Sep;97(3):1119-28.
162. Rafii S. Circulating endothelial precursors: mystery, reality, and promise. *J Clin Invest* 2000; (105): 17-19.
163. Ramamani A, Aruldas M M, Govindarajulu P. Differential response of rat skeletal muscle glycogen metabolism to testosterone and estradiol. *Can J Physiol Pharmacol* 1999; (77): 300-304.
164. Rathjen P D, Lake J, Whyatt L M, Bettess M D, Rathjen J. Properties and uses of embryonic stem cells: prospects for application to human biology and gene therapy. *Reprod Fertil Dev* 1998; (10): 31-47.
165. Ribatti D, Vacca A, Nico B, Roncali L, Dammacco F. Postnatal vasculogenesis. *Mech Dev* 2001; (100): 157-163.
166. Rincon J, Holmang A, Wahlstrom E O, Lonnroth P, Bjorntorp P, Zierath J R, Wallberg-Henriksson H. Mechanisms behind insulin resistance in rat skeletal muscle after oophorectomy and additional testosterone treatment. *Diabetes* 1996; (45): 615-621.
167. Risau W. Differentiation of endothelium. *FASEB J* 1995; (9): 926-933.
168. Risau W. Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 1997; (386): 671-674.
169. Risau W, Flamme I. Vasculogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; (11): 73-91.
170. Risau W, Sariola H, Zerwes H G, Sasse J, Ekblom P, Kemler R, Doetschman T. Vasculogenesis and angiogenesis in embryonic-stem-cell-derived embryoid bodies. *Development* 1988; (102): 471-478.
171. Ritsch M, Musshoff F. [Dangers and risks of black market anabolic steroid abuse in sports --gas chromatography-mass spectrometry analyses]. *Sportverletz Sportschaden* 2000; (14): 1-11.
172. Ritter SK, Washington C, Washington EN: Designer Steroid rocks Sports Worlds. *Science & Technology* 2003; 81 (46): 66-69.

173. Robert B, St John P L, Abrahamson D R. Direct visualization of renal vascular morphogenesis in Flk1 heterozygous mutant mice. *Am J Physiol* 1998; (275): F164-F172.
174. Rogers P A, Gargett C E. Endometrial angiogenesis. *Angiogenesis* 1998; (2): 287-294.
175. Rüsse I., Sinowatz F. (1998). Gametogenese. In: *Lehrbuch der Embryologie der Haustiere* (Rüsse I., Sinowatz F, Hrsg.), 42-98. Paul Parey, Berlin, Hamburg.
176. Sachtleben TR, Berg KE, Elias BA, Cheatham JP, Felix GL, Hofschire PJ. The effects of anabolic steroids on myocardial structure and cardiovascular fitness. *Med Sci Sports Exerc.* 1993 Nov;25(11):1240-5.
177. Sack M N, Rader T A, Park S, Bastin J, McCune S A, Kelly D P. Fatty acid oxidation enzyme gene expression is downregulated in the failing heart. *Circulation* 1996; (94): 2837-2842.
178. Sato T N, Qin Y, Kozak C A, Audus K L. Tie-1 and tie-2 define another class of putative receptor tyrosine kinase genes expressed in early embryonic vascular system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; (90): 9355-9358.
179. Schänzer W, Thevis M.: *Analytik von Steroidhormonen und Designer-Steroiden*. GIT Labor-Fachzeitschrift 2004. (5): 440-443.
180. Schatteman G C. Adult bone marrow-derived hemangioblasts, endothelial cell progenitors, and EPCs. *Curr Top Dev Biol* 2004; (64): 141-180.
181. Schmidt A, Müller K, Welker N, Thevis M, Geyer H, Schänzer W, Bloch W. The development of cardiomyocytes influence of designer steroids. *Ann Anat.* 188 (6): A203. 101. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Freiburg, 07.-10.04.2006
182. Schmidt A, Müller K, Welker N, Thevis M, Geyer H, Schänzer W, Bloch W. Designer steroids can influence the development of ES-cells derived cardiomyocytes. *EJCB* 86S1 (Suppl. 57): 56. 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Frankfurt, 14.-17.03.2007.
183. Schmidt A, Welker N, Müller K, Thevis M, Geyer H, Schänzer W, Bloch W. Designer steroids influence the development of the vascular system. *Ann Anat.* 188(6):A100. 101. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Freiburg, 07.-10.04.2006.
184. Schnirring L: Experts see Silver Lining in THG Scandal. *Phys Sportsmed* 2003; 31 (12): 16-17.
185. Schnurch H, Risau W. Expression of tie-2, a member of a novel family of receptor tyrosine kinases, in the endothelial cell lineage. *Development* 1993; (119): 957-968.
186. Schollert P V, Bendixen P M. [Dilated cardiomyopathy in a user of anabolic steroids]. *Ugeskr Laeger* 1993; (155): 1217-1218.

187. Scott D M, Wagner J C, Barlow T W. Anabolic steroid use among adolescents in Nebraska schools. *Am J Health Syst Pharm* 1996; (53): 2068-2072.
188. Segura I, Serrano A, De Buitrago G G, Gonzalez M A, Abad J L, Claveria C, Gomez L, Bernad A, Martinez A, Riese H H. Inhibition of programmed cell death impairs in vitro vascular-like structure formation and reduces in vivo angiogenesis. *FASEB J* 2002; (16): 833-841.
189. Sequeira Lopez M L, Gomez R A. [Development of the renal vasculature]. *Medicina (B Aires)* 2000; (60): 694-698.
190. Shahidi N T. A review of the chemistry, biological action, and clinical applications of anabolic-androgenic steroids. *Clin Ther* 2001; (23): 1355-1390.
191. Shi Q, Rafii S, Wu M H, Wijelath E S, Yu C, Ishida A, Fujita Y, Kothari S, Mohle R, Sauvage L R, Moore M A, Storb R F, Hammond W P. Evidence for circulating bone marrow-derived endothelial cells. *Blood* 1998; (92): 362-367.
192. Sinha-Hikim I, Artaza J, Woodhouse L, Gonzalez-Cadavid N, Singh A B, Lee M I, Storer T W, Casaburi R, Shen R, Bhasin S. Testosterone-induced increase in muscle size in healthy young men is associated with muscle fiber hypertrophy. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2002; (283): E154-E164.
193. Smith A G. Mouse embryo stem cells: their identification, propagation and manipulation. *Semin Cell Biol* 1992; (3): 385-399.
194. Smith H, Hughes GA, Douglas GH, Hartley D, McLoughlin BJ: Totally synthetic (+-) 13-alkyl-3-hydroxy and methoxy -gon-1,3,5 (10)-trien-17-ones and related compounds. *Experientia* 1963, 9:394-396.
195. Sopp P, Howard C J. Cross-reactivity of monoclonal antibodies to defined human leucocyte differentiation antigens with bovine cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1997; (56): 11-25.
196. Stefanec T. Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest* 2000; (117): 841-854.
197. Strehlow K, Werner N, Berweiler J, Link A, Dirnagl U, Priller J, Laufs K, Ghaeni L, Milosevic M, Böhm M, Nickenig G. Estrogen increases bone marrow-derived endothelial progenitor cell production and diminishes neointima formation. *Circulation*. 2003 Jun 24; 107(24):3059-65.
198. Strubing C, Ahnert-Hilger G, Shan J, Wiedenmann B, Hescheler J, Wobus A M. Differentiation of pluripotent embryonic stem cells into the neuronal lineage in vitro gives rise to mature inhibitory and excitatory neurons. *Mech Dev* 1995a; (53): 275-287.
199. Strubing C, Wobus A M, Hescheler J. [Establishment of an in vitro model system for the differentiation of synaptically coupled neurons from mouse embryonic stem cells]. *ALTEX* 1995b; (12): 129-137.

200. Tagarakis CV, Bloch W, Hartmann G, Hollmann W, Addicks K. Anabolic steroids impair the exercise-induced growth of the cardiac capillary bed. *Int J Sports Med*. 2000 Aug;21(6):412-8.
201. Tagarakis CV, Bloch W, Hartmann G, Hollmann W, Addicks K. Testosterone-propionate impairs the response of the cardiac capillary bed to exercise. *Med Sci Sports Exerc*. 2000 May;32(5):946-53.
202. Tattersall R B. Charles-Edouard Brown-Sequard: double-hyphenated neurologist and forgotten father of endocrinology. *Diabet Med* 1994; (11): 728-731.
203. Thieme H, Aiello L P, Takagi H, Ferrara N, King G L. Comparative analysis of vascular endothelial growth factor receptors on retinal and aortic vascular endothelial cells. *Diabetes* 1995; (44): 98-103.
204. Tischer K H, Heyny-von Haussen R, Mall G, Doenecke P. [Coronary thrombosis and ectasia of coronary arteries after long-term use of anabolic steroids]. *Z Kardiol* 2003; (92): 326-331.
205. Todd T. Anabolic steroids: the gremlins of sport. *J Sport Hist* 1987; (14): 87-107.
206. Tomarelli RM, Bernhart FW. *Steroids* 1964; 4: 451.
207. Townsend P J, Barton P J, Yacoub M H, Farza H. Molecular cloning of human cardiac troponin T isoforms: expression in developing and failing heart. *J Mol Cell Cardiol* 1995; (27): 2223-2236.
208. Urhausen A, Hölpes R, Kindermann W. One- and two-dimensional echocardiography in bodybuilders using anabolic steroids. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol*. 1989;58(6):633-40.
209. Van Breda E, Keizer H, Kuipers H, Kranenburg G. Effect of testosterone and endurance training on glycogen metabolism in skeletal muscle of chronic hyperglycaemic female rats. *Br J Sports Med* 2003; (37): 345-350.
210. Vittet D, Prandini M H, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, Uzan G, Dejana E. Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 1996; (88): 3424-3431.
211. Vogt A M, Geyer H, Jahn L, Schanzer W, Kubler W. [Cardiomyopathy associated with uncontrolled self medication of anabolic steroids]. *Z Kardiol* 2002; (91): 357-362.
212. Vokes S A, Krieg P A. Endoderm is required for vascular endothelial tube formation, but not for angioblast specification. *Development* 2002; (129): 775-785.
213. Wade N: Anabolic steroids: doctors denounce them, but athletes aren't listening. *Science*. 1973; 176:1399-1401.
214. Wagner J C. Abuse of drugs used to enhance athletic performance. *Am J Hosp Pharm* 1989; (46): 2059-2067.

215. Wahl P, Bloch W, Schmidt A. Exercise has a positive effect on endothelial progenitor cells, which could be necessary for vascular adaptation processes. *Int J Sports Med.* 2007 May;28(5):374-80.
216. Wang R, Clark R, Bautch V L. Embryonic stem cell-derived cystic embryoid bodies form vascular channels: an in vitro model of blood vessel development. *Development* 1992; (114): 303-316.
217. Welder AA, Robertson JW, Fugate RD, Melchert RB. Anabolic-androgenic steroid-induced toxicity in primary neonatal rat myocardial cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1995 Aug; 133(2):328-42.
218. Wilson J D, Griffin J E. The use and misuse of androgens. *Metabolism* 1980; (29): 1278-1295.
219. Wilting J, Christ B. Embryonic angiogenesis: a review. *Naturwissenschaften* 1996; (83): 153-164.
220. Windsor R, Dumitru D. Prevalence of anabolic steroid use by male and female adolescents. *Med Sci Sports Exerc* 1989; (21): 494-497.
221. Wobus A M, Guan K, Pich U. In vitro differentiation of embryonic stem cells and analysis of cellular phenotypes. *Methods Mol Biol* 2001; (158): 263-286.
222. Wobus A M, Wallukat G, Hescheler J. Pluripotent mouse embryonic stem cells are able to differentiate into cardiomyocytes expressing chronotropic responses to adrenergic and cholinergic agents and Ca²⁺ channel blockers. *Differentiation* 1991; (48): 173-182.
223. Wyllie A H. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull* 1997; (53): 451-465.
224. Yamaguchi Y, Gunji Y, Nakamura M, Hayakawa K, Maeda M, Osawa H, Nagayoshi K, Kasahara T, Suda T. Expression of c-kit mRNA and protein during the differentiation of human hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol* 1993; (21): 1233-1238.
225. Yeater R, Reed C, Ullrich I, Morise A, Borsch M. Resistance trained athletes using or not using anabolic steroids compared to runners: effects on cardiorespiratory variables, body composition, and plasma lipids. *Br J Sports Med.* 1996 Mar;30(1):11-4.
226. Yesalis C E, Wright J E, Lombardo J A. [Anabolic steroids in athletes]. *Wien Med Wochenschr* 1992; (142): 298-308.
227. Yin A H, Miraglia S, Zanjani E D, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary A G, Olweus J, Kearney J, Buck D W. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; (90): 5002-5012.
228. Yoder M C. Generation of HSCs in the embryo and assays to detect them. *Oncogene* 2004; (23): 7161-7163.

- 229. Young P E, Baumhueter S, Lasky L A. The sialomucin CD34 is expressed on hematopoietic cells and blood vessels during murine development. *Blood* 1995; (85): 96-105.
- 230. Zaffran S, Frasch M. Early signals in cardiac development. *Circ Res* 2002; (91): 457-469.
- 231. Ziegler B L, Valtieri M, Porada G A, De Maria R, Muller R, Masella B, Gabbianelli M, Casella I, Pelosi E, Bock T, Zanjani E D, Peschle C. KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 1999; (285): 1553-1558.

8. Vorabveröffentlichungen

Ein Teil der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse wurden vorgestellt in:

Schmidt A, Müller K, Welker N, Thevis M, Geyer H, Schänzer W, Bloch W. Designer steroids can influence the development of ES-cells derived cardiomyocytes. EJCB 86S1 (Suppl. 57): 56. 30. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Frankfurt, 14.-17.03.2007.

Schmidt A, Welker N, Müller K, Thevis M, Geyer H, Schänzer W, Bloch W. Designer steroids influence the development of the vascular system. Ann Anat. 188 (6): A100. 101. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Freiburg, 07.-10.04.2006.

Schmidt A, Müller K, Welker N, Thevis M, Geyer H, Schänzer W, Bloch W. The development of cardiomyocytes influence of designer steroids. Ann Anat. 188 (6): A203. 101. Jahrestagung der Anatomischen Gesellschaft, Freiburg, 07.-10.04.2006.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Nadja Welker
Geboren: 03.09.1981 in Heidelberg

Schulausbildung:

1988-1992: Linden-Grundschule, Nussloch
1992-1998: Kurfürst-Friedrich-Gymnasium, Heidelberg
1998-1999: Howard-High-School, Baltimore, USA mit High-School-Abschluss
1999-2001: Kurfürst-Friedrich-Gymnasium, Heidelberg
Juni 2001: Abitur

Studium:

10/2001 – 05/2008: Humanmedizinstudium, Universität zu Köln
04/2004: 1. Ärztliche Prüfung
02/2007 – 01/2008: Praktisches Jahr: Chirurgie, Innere Medizin, Pädiatrie
05/ 2008: 2. Ärztliche Prüfung
2004-2008: Arbeit an der Dissertation unter der Leitung von Herrn Professor Dr. W. Bloch