An dem Department für Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Der Effekt von Östradiol-17β und von Agonisten der Östrogenrezeptoren alpha und beta im Uterus und in der Vagina der ovarektomierten Ratte

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

vorgelegt von
Jasmin Charlotte Mahlouji
aus
Göttingen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. E. Fuchs

Tag der mündlichen Prüfung: 02. November 2010

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Klimakterium 1

1.2 Klassische Hormonersatztherapie 2

1.3 Uterus: Funktion und Klimakterium 2

1.4 Vagina: Funktion und Klimakterium 3

1.5 Hormone: Regelkreis und Klimakterium 5

1.5.1 Östradiol und luteinisierendes Hormon (LH) 5

1.5.2 Östradiol, Thyreoidea-stimulierendes Hormon und die Schilddrüsenhormone 5

1.6 Körpergewicht: Regulation und Klimakterium 6

1.7 Östrogene 6

1.8 Östrogenrezeptoren 7

1.8.1 Aufbau und Wirkung 7

1.8.2 Östrogenrezeptor-Subtypen 7

1.8.3 Gewebeverteilung und Funktion der ER-Subtypen 8

1.8.4 Die Knockout-Maus und die „Yin-Yang“-Theorie 9

1.9 Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) 10

1.10 Das verwendete Tiermodell 11

1.11 Die untersuchten Substanzen 11

1.11.1 Entwicklung und Struktur 11

1.11.2 Bis jetzt untersuchte Wirkungen der verwendeten Substanzen 14

1.12 Ziel der Arbeit 15

2 Material und Methoden 17

2.1 Tierversuch 17

2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen 17

2.1.2 Versuchsablauf 18

2.1.3 Ovarektomie 18

2.1.4 Applikation der Testsubstanzen 19

2.1.5 Obduktion 20

2.2 Serumdiagnostik 21

2.3 Histologische Aufarbeitung von Uterus und Vagina 22

2.3.1 Vorbereitung 22

2.3.2 Färbung mittels Hämatoxylin und Eosin 23

2.3.3 Mikroskopie 24

2.4 Statistische Auswertung ... 27

3 Ergebnisse ... 28

3.1 Futteraufnahme ... 28

3.2 Körpergewicht ... 29

3.3 Ergebnisse im Uterus ... 30
3.3.1 Uterusgewichte ... 30
3.3.2 Uterushistologie ... 31

3.4 Ergebnisse in der Vagina ... 41

3.5 Hormonwerte im Serum ... 47
3.5.1 Östradiol ... 47
3.5.2 Luteinisierendes Hormon (LH) ... 48
3.5.3 Thyreoidea-Stimulierendes Hormon (TSH) ... 49
3.5.4 Freies Trijodthyronin (fT3) ... 50
3.5.5 Freies Thyroxin (fT4) ... 51

4 Diskussion ... 53

4.1 Zielsetzung ... 53

4.2 Wirkungen auf die Futteraufnahme und das Körpergewicht ... 54

4.3 Wirkungen auf den Uterus ... 57
4.3.1 Uterusgewicht ... 58
4.3.2 Uterushistologie ... 59
4.3.2.1 Uterine Schichtdicken ... 59
4.3.2.2 Histomorphologie des Uterus ... 60

4.4 Wirkungen auf die Vagina ... 62
4.4.1 Vaginale Epitheldicke ... 63
4.4.2 Histomorphologie der Vagina ... 63

4.5 Wirkungen auf den Hormonhaushalt ... 64
4.5.1 Östradiol ... 64
4.5.2 Luteinisierendes Hormon (LH) ... 65
4.5.3 Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH) und die Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 ... 67

5 Zusammenfassung ... 69

6 Literaturverzeichnis ... 71

7 Abbildungsverzeichnis ... 84

8 Tabellenverzeichnis ... 86

Abkürzungsverzeichnis

8β-VE2	8-vinylestra-1,3,5(10)-triene-3,17β-diol
16α-LE2	3,17-dihydroxy-19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-triene-21,16α-lacton
AS	Aminosäure
BERKO	Östrogenrezeptor-beta-Knockout-Maus
CO_2	Kohlendioxid
CT	Computertomographie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DPN	Diarylpropionitril
E1	Östron
E2	17β-Östradiol
E3	Östriol
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Estrogen Response Element
ERKO	Östrogenrezeptor-alpha-Knockout-Maus
ERα	Östrogenrezeptor alpha
ERβ	Östrogenrezeptor beta
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
fT3	freies Trijodthyronin
fT4	freies Thyroxin
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormone
HDL	High-Densitiy-Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HERS	Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study
HRT	Hormone Replacement Therapy
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
LBD	Ligadenbindungsdomäne
LH	Luteinisierendes Hormon
LPL	Lipoproteinlipase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
ovx	Ovarektomiert
PPT	Propyl-Pyrazol-Triol

RIA	Radioimmunoassay
s.c.	Subkutan
SD	Sprague-Dawley-Ratten
SEM	Standard Error of the Mean
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator
Sf	Sojafrei
TGB	Thyreotropinbindungsglobulin
TRH	Thyreoidea-Releasing-Hormone
TSH	Thyreoidea-Stimulierendes Hormon
WHI	Women's Health Initiative

1 Einleitung

1.1 Klimakterium

Unter dem meist zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr einsetzenden Klimakterium versteht man die mehrere Jahre dauernde Übergangsphase von der Zeit der vollen Geschlechtsreife in die Zeit der hormonellen Ruhe der Ovarien (Stauber et Weyerstahl 2005).

Es lässt sich grob in 3 Phasen unterteilen:

1. In der Prämenopause treten erste Zyklusanomalien auf, die sich als unregelmäßige Blutungen bemerkbar machen. Diese Phase tritt ca. 4-5 Jahre vor der Menopause auf.
2. Als Menopause bezeichnet man die letzte Regelblutung der Frau. Klinisch wird sie retrospektiv nach 12 monatiger Amenorrhoe diagnostiziert. Das durchschnittliche Alter liegt hier bei ca. 51,4 Jahren.
3. Nach der Menopause setzt die Postmenopause ein. Sie ist u. a. gekennzeichnet durch genitale Involution, dauerhafte und absolute Sterilität.

Den Zeitraum ein Jahr vor und nach der Menopause bezeichnet man als Perimenopause. Den Lebensabschnitt, der auf die Postmenopause folgt, bezeichnet man als Senium (Haag et al. 2007/2008; Greendale et al. 1999).

Mit zunehmendem Fortschreiten des Klimakteriums kommt es durch die Atrophie der Ovarien zu einer verminderten Inhibinproduktion, bei anfänglich noch erhaltener, jedoch geringerer Östrogenproduktion, wobei die negative Rückkopplung auf den Hypothalamus und die Hypophyse entfällt und folglich vermehrt FSH ausgeschüttet wird. Mit der kontinuierlich abfallenden Östrogenproduktion kommt es zu einer starken Zunahme der Gonadotropinausschüttung, bei vermindertem ovariellen Ansprechen auf diese Hormone. Somit folgt das Erlöschen der zyklischen Ovarialfunktion bis hin zur letzten Regelblutung (Menopause) (Stauber et Weyerstahl 2005; Haag et al. 2007/2008).

1.2 Klassische Hormonersatztherapie

Aufgrund der mit dem Klimakterium einsetzenden teilweise schweren Beschwerden haben in der Altersgruppe der 50- bis 60-jährigen in den vergangenen Jahren in Deutschland bis zu 40% der Frauen ein Hormonersatzpräparat eingenommen (Stauber et Weyerstahl 2005; Haag et al. 2007/2008). Jedoch ist man nach dem Abbruch der *Women's-Health-Initiative* (WHI)-Studie im Jahre 2002 und durch die zum Teil negativen Resultate der *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) verunsichert, was zu einem Rückgang der Einnahme von Hormonersatzpräparaten führte. Zurzeit wird vermehrt nach Alternativen zur klassischen Hormonersatztherapie (HRT) gesucht.

Obwohl in mehreren vorangegangenen Beobachtungsstudien schützende Effekte der HRT auf das kardiovaskuläre System gezeigt wurden, demonstrierten die Ergebnisse des Östrogen-Gestagen-Arms der WHI-Studie eine kleine Risikoerhöhung für koronare Herzerkrankungen im Vergleich zur Placebogruppe (Akhrass et al. 2003; Garbe et Suissa 2004) und die der HERS keinen schützenden Effekt (Hulley et al. 1998). Zum Abbruch der groß angelegten WHI-Studie kam es hauptsächlich wegen des vermehrten Auftretens von invasiven Mammakarzinomen im Östrogen-Progesteron-Arm. Zudem zeigten sich Risikoerhöhungen für Schlaganfälle und Thromboembolien (Rossouw et al. 2002). In der HERS zeigte sich ebenfalls eine Risikoerhöhung für Thromboembolien (Grady et al. 2000).

1.3 Uterus: Funktion und Klimakterium

Die Gebärmutter der Frau (*lat. uterus, uter=Schlauch*; *griech. hystera oder metra*) entwickelt sich aus den paarig angelegten Müller-Gängen, welche im kaudalen Bereich zum Canalis uterovaginalis verschmelzen, der wiederum den Uterus und die oberen 2/3 der Vagina bildet. Die Verschmelzung breitet sich nach kranial fort. Zunächst befindet sich in der Mittellinie ein verbliebenes Septum, welches jedoch resorbiert wird. Bei einer fehlenden oder unvollständigen Resorption können sich entspechende Fehlbildungen ergeben (z. B. Uterus subseptus, Uterus bicornis, Uterus duplex, etc.) (Stauber et Weyerstahl 2005).

Der Uterus ist ein hoch sensitives Organ für östrogene Wirkungen. Östrogene wirken

hier sowohl auf das Endometrium als auch auf das Myometrium. Dort führen sie zur Proliferation und zur Vorbereitung des Endometriums auf die durch Progesteron gesteuerte Sekretionsphase. Am Myometrium bewirken sie eine vermehrte Kontraktilität und Ansprechbarkeit auf Oxytocin. Im Stratum basale des Endometriums bindet Östrogen an Östrogenrezeptoren und steuert die Synthese einer Reihe von Proteinen, u. a. von Complement C3, Progesteronrezeptoren und *insulin-like growth factor-1* (Purdie 2000; Seidlová-Wuttke et al. 2003).

Aufgrund der im Klimakterium vermehrt auftretenden Östrogenexposition kommt es gehäuft zu Endometriumhyperplasien. Deshalb steigt das Risiko, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken (Pathirage et al. 2006).

Im Laufe der Postmenopause kommt es jedoch, bedingt durch den sinkenden Östrogenspiegel, zu einer Atrophie des gesamten Uterus.

Der Uterus der Ratte ist ein Uterus duplex (subseptus), vergleichbar mit der anfänglichen embryonalen Uterusbeschaffenheit des Menschen. Er besitzt eine gemeinsame oder zwei separate vaginale Öffnungen und einen dem Menschen vergleichbaren Schichtaufbau. Unter östrogenem Einfluss kommt es im Laufe des Zyklus ebenfalls zu einer Stimulation der uterinen Schichten. Entsprechend führt die Ovarektomie zu einer Atrophie des Rattenuterus, wie sie auch beim menschlichen im Rahmen der Menopause zu finden ist (s. Abb. 3.3 auf S. 30, Abb. 3.13-3.15 auf S. 38-40 und Tab. 3.1 auf S. 37) (Haschek et Rousseaux 1991; Maeda et al. 2000).

1.4 Vagina: Funktion und Klimakterium

Die Vagina der Frau (*lat.: Scheide*; *griech. kólpos=Wölbung, Bausch*) entwickelt sich in den oberen 2/3 aus dem Canalis uterovaginalis (hervorgegangen aus der Fusion der paarigen Müller-Gänge) und im unteren Drittel aus dem Sinus urogenitalis.

Östrogen fördert am menschlichen vaginalen Epithel die Proliferation, die Zelldifferenzierung und die vermehrte Einlagerung von Glykogen. Das Glykogen trägt zur Aufrechterhaltung des aziden Milieus bei, indem es durch die bakterielle Normalflora der Vagina zu Milchsäure vergärt wird. Das saure Milieu bietet einen wichtigen Schutz vor pathogenen Erregern (Purdie 2000; Gruber et al. 2002).

In der Menopause beklagen weit über 40% der Frauen Symptome der vaginalen Atrophie (Bachmann et al. 2000). Zu diesen gehören vaginale Trockenheit,

verstärktes Schmerzempfinden und Dyspareunie. Der Mangel an Östrogenen führt zu einer Alkalisierung des vaginalen Lumens. Der pH-Wert hebt sich von anfänglich 4,5 bis maximal 6,5 präovulatorisch auf 6,5 bis 7,5. Dies hat vermehrte vaginale Infekte zur Folge und steht im Verdacht das Risiko für pathologische Zervixveränderungen zu erhöhen (Gorodeski et al. 2005). Ting et al. (2004) zeigten, dass es an ovarektomierten Ratten zu einer Zunahme der Nervendichte in der Vagina kam. Unter diesen Nerven fanden sich sympathische, parasympathische und nozizeptorische Nerven. Die Substitution von Östradiol verringerte die Nervendichte. Anhand dieser Erkenntnisse kann man davon ausgehen, dass einige Aspekte der vaginalen Dysfunktion auf die Veränderungen in der vaginalen Innervation zurückzuführen sind. So könnte die vermehrte sympathische Innervation zu Vasokonstriktionen führen und somit Grund für die vaginale Trockenheit sein. Zum anderen könnte die Zunahme an nozizeptorischen Nerven die vermehrte Schmerzempfindlichkeit, das Brennen und Jucken der Vagina erklären.

Zusätzlich findet sich während der Menopause eine Hyalinisation des Kollagens, eine Fragmentierung und damit Abnahme des Elastins und eine Proliferation des Bindegewebes in der Vagina. All diese Faktoren erklären die erhöhte vaginale Rigidität mit konsekutiver Dyspareunie (Grady 2006).

Wie schon beim Uterus beschrieben, ziehen sich zwischen der menschlichen und der Rattenvagina morphologische Parallelen. So findet sich ein vergleichbarer histologischer Schichtaufbau. Einziger nennenswerter Unterschied ist die Epithelschicht in der Rattenvagina, die sich als mehrschichtig verhornt darstellt, während sie beim Menschen unverhornt ist (Haschek et Rousseaux 1991; Maeda et al. 2000).

Der normale Zyklus der Ratte dauert 4-5 Tage und unterteilt sich in eine proöstrische, östrische und diöstrische Phase. Durch den östrogenen Einfluss kommt es, wie in der menschlichen Vagina, zur Proliferation des Vaginalepithels.

In der ovarektomierten Ratte zeigt sich ein atrophiertes Vaginalepithel, welches unter Zufuhr von Östrogenen wieder proliferiert (s. Abb. 3.20 auf S. 46 und Tab. 3.2 auf S. 45) (Haschek et Rousseaux 1991; Maeda et al. 2000).

1.5 Hormone: Regelkreis und Klimakterium

1.5.1 Östradiol und luteinisierendes Hormon (LH)

Im Laufe des Klimakteriums kommt es, bedingt durch die ovarielle Atrophie, zu einem Absinken des Östradiol- und Inhibinspiegels. Das hat einen fehlenden negativen Feedbackmechanismus auf die LH-Sekretion zur Folge. Der Körper befindet sich also im hypergonadotropen Hypogonadismus. Diese Überaktivierung führt zu einer Co-Aktivierung anderer hypothalamischer Neurone, die für die Regulierung der Körpertemperatur zuständig sind, so dass nach der Menopause in über 50% Hitzewallungen auftreten (Seidlová-Wuttke et al. 2003; Nelson et al. 2006).

1.5.2 Östradiol, Thyreoidea-stimulierendes Hormon und die Schilddrüsenhormone

Mit zunehmendem Alter steigt für Frauen das Risiko eine Schilddrüsenfunktionsstörung zu entwickeln. Im Klimakterium steigt die Prävalenz, an einer Hypothyreose zu erkranken, von 4-10% auf 7-26%. Folglich finden sich vermehrt erhöhte TSH-Werte im Serum. Jedoch steigt auch die Prävalenz an einer Hyperthyreose zu erkranken mit dem Alter, und zwar auf ca. 10%. Die subklinischen Schilddrüsenerkrankungen unterteilen sich zu 73,8% in hypothyreote und zu 26,2% in hyperthyreote Veränderungen (Schindler 2003).

Östrogensubstitution kann durch eine Erhöhung des Thyreotropinbindungsglobulinspiegels (TGB) zu Veränderungen des Serumlevels von Thyroxin und TSH führen. Durch die erhöhte Bindung von Thyroxin an TGB kommt es über den Feedbackmechanismus zu einer TSH-Erhöhung. Dies bedeutet für Frauen, die neben der L-Thyroxinbehandlung eine HRT erhalten, engmaschigere Dosiskontrollen (Schindler 2003).

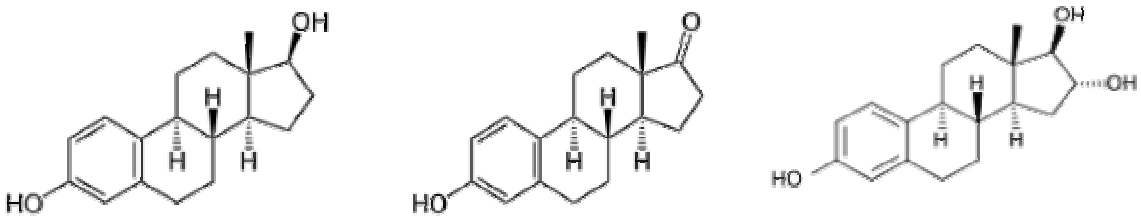
Die Literaturangaben über den Effekt von Östrogenen auf TSH und die Schilddrüsenhormone sind uneinheitlich. Grund dafür sind die unterschiedlichen Tiermodelle, Applikationsarten und die Behandlungsdauer (Klammer et al. 2007).

1.6 Körpergewicht: Regulation und Klimakterium

Der systemische Östrogenentzug während des Klimakteriums ist mit einer vermehrten Gewichtszunahme vergesellschaftet und birgt somit das erhöhte Risiko, an einem metabolischen Syndrom (Diabetes mellitus Typ II, Hypertonus, Hyperlipidämie) zu erkranken (Carr 2003). So konnte im Rahmen der *Women's Health Initiative* gezeigt werden, dass Frauen, die sowohl Östrogen allein als auch in Kombination mit Progesteron verabreicht bekamen, schlanker und insulinsensitiver waren und weniger häufig einen Diabetes mellitus Typ II entwickelten als Frauen der Plazebogruppe (Margolis et al. 2004).

1.7 Östrogene

Östrogene leiten sich chemisch vom Cholesterin ab und gehören somit zu den Steroidhormonen. Durch Demethylierung von Testosteron (C19-Steroid) an der C10-Position des Steroidmolekülgerüstes und durch Aromatisierung des A-Ringes mittels des Enzyms Aromatase entsteht 17β-Östradiol (E2), das wichtigste Östrogen im Körper. Zudem entsteht aus Andostendion, ebenfalls mithilfe des Enzyms Aromatase, Östron (E1), welches weiter reagieren kann zu Östriol (E3). Jedoch zeigen die beiden letztgenannten nur noch ein Drittel (E1) bzw. ein Zehntel (E3) der biologischen Aktivität des Östradiols (Löffler et al. 2007).



Östradiol (E2) Östron (E1) Östriol (E3)

Abb 1.1 Strukturformeln von Östradiol (E2), Östron (E1) und Östriol (E3)

Hauptproduktionsort des Östrogens sind die Granulosazellen des Ovars. Jedoch findet sich auch Aromataseaktivität in Nebenniere, Muskelzellen, Fettzellen, Nervenzellen, Leydigzellen des Hodens und im Synzytiotrophoblasten der Plazenta

(Gruber et al. 2002).

1.8 Östrogenrezeptoren

1.8.1 Aufbau und Wirkung

Östrogenrezeptoren (ER) gehören wie alle Steroidrezeptoren zur großen Familie der nukleären Hormonrezeptoren (Muramatsu et Inoue 2000).

Klassischerweise befindet sich der Östrogenrezeptor in inaktiver Form im Zellkern oder im Zytoplasma. Nach Bindung des Liganden dimerisieren zwei Moleküle zu einem Homodimer, der nun in den Zellkern diffundiert und an eine spezifische DNA-Sequenz bindet (*estrogen-response-element* (ERE)). Auf diese Weise wird der ER zu einem Transkriptionsfaktor (Gruber et al. 2002).

Der ER kann jedoch auch ligandunabhängig, z. B. durch Wachstumsfaktoren, aktiviert werden. Diese sind befähigt extrazelluläre Signale über Membranrezeptoren nach intrazellulär zu transduzieren (*„cross-talk“*-Mechanismus) (Smith et al. 1993; Ignar-Trowbridge et al. 1993 et 1995; Brosens et al. 2004). Zusätzlich kann die Aktivität der ER durch Phosphorylierung reguliert werden (Brosens et al. 2004).

Der genomische Weg der Östrogenwirkung kann Minuten bis Tage dauern. Schnelle Wirkungen entstehen durch direkte östrogene Effekte an Zellmembranen, hervorgerufen durch noch unbekannte membranständige Östrogenrezeptoren, durch direkten Einfluss auf intrazelluläre Ionenflüsse oder durch Phosphorylierung der Rezeptoren (Purdie 2000; Gruber et al. 2002).

1.8.2 Östrogenrezeptor-Subtypen

Bis heute sind zwei Östrogenrezeptor-Subtypen bekannt. Der klassische ER alpha (ERα) wurde 1986 das erste Mal kloniert, der ER beta (ERβ) wurde jedoch erst 1996 im Rattenovar und der Rattenprostata entdeckt (Green et al. 1986; Kuiper et al. 1996). Obwohl auch noch Rezeptorisoformen und Splicevarianten bekannt sind, handelt es sich bei den beiden ER jedoch um zwei verschiedene Genprodukte. Wurde das ERα-Gen auf dem Chromosom 6 entdeckt, fand man das ERβ-Gen auf dem Chromosom 14 (Enmark et al. 1997). Die DNA-Bindungsdomäne der beiden Rezeptoren zeigt eine 96%ige Übereinstimmung in der Aminosäurensequenz,

woraus sich schließen lässt, dass ERβ auf die gleiche Weise an das *estrogen-response-element* (ERE) bindet wie ERα. Die Ligandenbindungsdomäne zeigt eine geringere Homologie von nur 55%, woraus sich unterschiedliche Affinitäten für Liganden ergeben. Die Affinität für das körpereigene 17β-Östradiol ist bei beiden Rezeptoren gleich stark ausgeprägt (Kuiper et al. 1997).

1.8.3 Gewebeverteilung und Funktion der ER-Subtypen

Die Entdeckung des ERβ führte dazu, dass bisherige Kenntnisse über die Wirkung von Östrogenen über den klassischen ERα teilweise in Frage gestellt und ein großer Klärungsbedarf über die Verteilung und Funktion der Rezeptoren entfacht wurde.
Die Gewebeverteilung der Rezeptoren ist in den verschiedenen Organen und Individuen unterschiedlich. Zudem ist sie abhängig von Entwicklungsstufen und dem Zyklusstand.

	MÄNNLICH	WEIBLICH
ERα	Nebenhoden	Uterus
	Hoden	Vagina
		Mamma
		Eileiter
		Theka-Zellen (Ovar)
ERβ	Prostata	Granulosa-Zellen
	Nebenhoden	(Ovar)

Tab. 1.1 Prädominierende Östrogenrezeptorverteilung in den geschlechtsspezifischen Organen

(Quellen für Tab. 1.1: Kuiper et al. 1996 et 1997; Enmark et al. 1997; Saunders et al.1997; Gustafsson 1999; Pelletier 2000; Weihua et al. 2000; Harris et al. 2002 et 2003).

In den für diese Arbeit wichtigen Organen Uterus und Vagina ist der dominante Rezeptor ERα, wobei ERβ ebenso anzutreffen ist. Durch erstgenannten werden die stimulierenden Effekte durch Östrogene hervorgerufen (Kuiper et al. 1997; Weihua et al. 2000; Harris et al. 2002 et 2003). Die Stimulation des uterinen Epithels wird wahrscheinlich parakrin durch Aktivierung stromaler ERα vorangetrieben (Buchanan et al. 1998; Cunha et al. 2004).

Östrogen fördert am vaginalen Epithel die Proliferation und die Zelldifferenzierung. Es konnte gezeigt werden, dass die Epithelproliferation in der Vagina indirekt über stromale ERα erfolgt, jedoch die vermehrte Schichtung und die Verhornung direkt über epitheliale ERα vermittelt werden (Buchanan et al. 1998; Cunha et al. 2004). Durch östrogenen Einfluss kommt es zur Expression von Proteinen, die mit der Verhornung des Epithels assoziiert sind (Cornifin, Keratin, etc.) (Jetten et al. 1996; Cunha et al. 2004).

Obwohl sowohl der ERα als auch der ERβ in reifen Adipozyten exprimiert werden, ist der prädominierende Rezeptor hier ERα (Dieudonné et al. 2004). Mittels eines selektiven ERα-Antagonisten konnten die günstigen Wirkungen von E2 abgeschwächt werden. Es zeigte sich, dass ERα eine entscheidende Rolle in der Erhaltung der insulinstimulierten Glukoseaufnahme unter niedrig dosierter Östradiolbehandlung spielt (Muraki et al. 2006). Die während der Menopause vorkommende Fettgewebsumverteilung von subkutan nach viszeral wird durch Östrogensubstitution verhindert. Dieser Mechanismus wird auch über den Östrogenrezeptor α veranlasst (Pedersen et al. 2004).

1.8.4 Die Knockout-Maus und die „Yin-Yang“-Theorie

Das Tiermodell der Knockout-Mäuse ermöglichte es, einen der Östrogenrezeptoren genetisch auszuschalten und die physiologische Rolle des jeweils anderen für den Organismus getrennt zu explorieren. Damit wurde das Problem der selektiven Liganden, die bis zu dem Zeitpunkt nicht zur Verfügung standen, umgangen.

Die weibliche ERα-Knockout-Maus (ERKO) ist infertil. Der Reproduktionstrakt ist nicht östrogensensitiv. Der Uterus und die Vagina sind hypotroph und zeigen eine fehlende Proliferation und Differenzierung. Die Ovarien sind anovulatorisch und präsentieren multiple hämorrhagische Zysten und keine Corpora lutea (Lubahn et al. 1993). Das Sexualverhalten der ERKO-Mäuse ist vermindert und es tritt eine vermehrte Aggressivität auf. Das Knochenwachstum und die Knochendichte sind vermindert und es kommt zu einem Anstieg der Serumkonzentration von E2 und LH, bei normalen FHS-Konzentrationen (Couse et Korach 1999). Zusätzlich wurde eine vermehrte Gewichtszunahme beobachtet (Muraki et al. 2006).

Die weibliche ERβ-Knockout-Maus (BERKO) ist subfertil, was sich in einer verminderten Wurfhäufigkeit und Wurfgröße auszeichnet. Im Ovar sind Zeichen für

follikulären Arrest und Anovulationen zu finden. Der Uterus ist sehr östrogensensibel und zeigt in der unreifen BERKO-Maus eine übertriebene Antwort auf E2-Substitution (Weihua et al. 2000). Das Sexualverhalten dieser Tiere ist normal, doch zeigen sich im Epithel der Blase, der Urethra und der Prostata Hyperproliferationen mit Mehrschichtigkeit und eine große Variation an Kerngrößen (Gustafsson 1999). Das Körpergewicht und die Körperfettmasse befinden sich im Gegensatz zu den ERKO-Mäusen im Normalbereich (Muraki et al. 2006).

Die vermehrte Zellproliferation und die übertriebene Antwort auf Östradiol (E2) in bestimmten Geweben lassen vermuten, dass ERβ einen modulierenden oder auch antiproliferativen Effekt ausübt (Gustafsson 1999; Weihua et al. 2000). Lindberg et al. (2003) zeigten am Knochenmetabolismus von Knockout-Mäusen, dass ERβ in Anwesenheit von ERα, die durch letztgenannten Rezeptor hervorgerufene Gentranskription hemmen kann. Doch zeigten sie auch, dass ERβ in Abwesenheit von ERα dessen Funktion zum Teil ersetzen kann. So schlossen sie daraus, dass ERβ die Wirkung von ERα modulieren kann und die beiden Rezeptoren in einem „Yin-Yang“-Verhältnis zueinander stehen.

1.9 Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs)

Unter dem Terminus SERM (=selektive Östrogenrezeptormodulatoren) versteht man nicht-steroidale Liganden, die an bestimmten Organen agonistische und an wiederum anderen Organen antagonistische Wirkungen ausüben (Touraine 2003).
Der Mechanismus der Gewebeselektivität der eingesetzten Substanzen ist komplex. Bei beiden bekannten ER ändert sich die Konformität der Ligandenbindungsdomäne abhängig von der Art des Liganden. Folglich können sich die Transkriptionseffekte unterscheiden. Zusätzlich spielen zelluläre Unterschiede in der Verteilung von Co-Aktivatoren und Anschlussproteinen eine Rolle bei der Rezeptorbindung und Transkriptionsaktivität (Klinge 2001; Gruber et al. 2002, Diez-Perez 2006). Anhand dieser Mechanismen und der regionalen Verteilungsunterschiede der ER-Subtypen, lassen sich die unterschiedlichen Wirkungen der SERM erklären.
Der ideale Wirkmechanismus eines SERM beinhaltet positive Effekte am Knochen, im ZNS, in der Vagina und dem Gefäßsystem sowie negative Effekte an der Brust

und dem Uterus.

1.10 Das verwendete Tiermodell

In dieser Arbeit soll untersucht werden, wie sich Kombinationen von selektiven Agonisten der Östrogenrezeptoren α und β auf das Körpergewicht, die Futteraufnahme, den Uterus, die Vagina und den Hormonhaushalt der ovarektomierten Ratte auswirken. Dafür werden die Ergebnisse mit der Östradiolwirkung und dem physiologischen Modell der sham-ovx Ratte verglichen.

Die ovarektomierte Sprague-Dawley-Ratte gilt u. a. durch die gegebenene organische Vergleichbarkeit zum Menschen (s. 1.3 und 1.4 auf S. 2 und 3) als etabliertes Modell in der postmenopausalen Forschung. Durch den Entzug der Östrogene stellen sich die typischen Symptome des Klimakteriums ein. Hier sind besonders die Atrophie des Uterus und der Vagina sowie der Anstieg des Körpergewichtes und der hypophysären Gonadotropine im Serum wichtig.

1.11 Die untersuchten Substanzen

1.11.1 Entwicklung und Struktur

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Substanzen der Firma Schering handelt es sich um hoch selektive ERα- und ERβ-Agonisten. Im Gegensatz zu den Knockout-Tiermodellen, bei denen ein Rezeptor komplett inaktiviert ist und somit nicht zur weiteren Untersuchung zur Verfügung steht, kann mit Hilfe dieser Liganden die ligandenabhängige Funktion beider Östrogenrezeptoren und ihre Interaktion untereinander untersucht werden.

Die beiden entwickelten Liganden gehören zu den potentesten und isotypselektivsten steroidalen ER-Agonisten, die bis dato identifiziert wurden. Im Gegensatz zu den bisher entwickelten nicht-steroidalen isotypselektiven ER-Liganden, wie der ERα-Agonist Propyl-Pyrazol-Triol (PPT) und der ERβ-Agonist Diarylpropionitril (DPN), sind diese Verbindungen auf der Basis der vorhandenen Information über die Proteinstruktur des Östradiols entwickelt worden und somit enge Derivate des

natürlichen Hormons Östradiol. Man geht davon aus, dass man auf diese Weise die physiologische Östrogenwirkung nachahmt und zusätzlich Einsicht in die Funktion der einzelnen ER erhält.

Im ersten Schritt der Entwicklung wurde, basierend auf der kristallinen Struktur der Ligandenbindungsdomäne (LBD) von ERα im Komplex mit E2, ein homologes Modell der ERβ-LBD hergestellt. Die Sequenzabfolge der LBD der beiden Rezeptoren gleicht sich zu 59% und zeigt im Falle von ERβ nur zwei einzelne Aminosäuredeletionen (in der Loop-Region). Indem diese nichtidentischen AS am ERα gegen die in der Sequenz des ERβ gefundenen AS ausgetauscht wurden, konnte das homologe Modell errichtet werden. Angeleitet durch das strukturelle Modell wurden an den entsprechenden Positionen des Östradiols chemische Modifikationen durchgeführt.

Um die ERα-selektive Verbindung zu erhalten, wurde an den Positionen 16α (Verbindung 1) und 17α (Verbindung 2) mittels eines fünfgliedrigen Rings eine Verbindung geschaffen. Auf diese Weise entstand der selektive ERα-Agonist (Verbindung 1) **16α-LE2** (3,17-dihydroxy-19-nor-17α-pregna-1,3,5(10)-triene-21,16α-lacton).

Den ERβ-selektiven Liganden **8β-VE2** (8-vinylestra-1,3,5(10)-triene-3,17β-diol) erhielt man, indem an der Position 8β ein Substituent angebracht wurde. Dieser Substituent bietet zusätzlichen lipophilen Platz, um die geringen Unterschiede der ERα- und ERβ-Bindungstaschen zu erkennen.

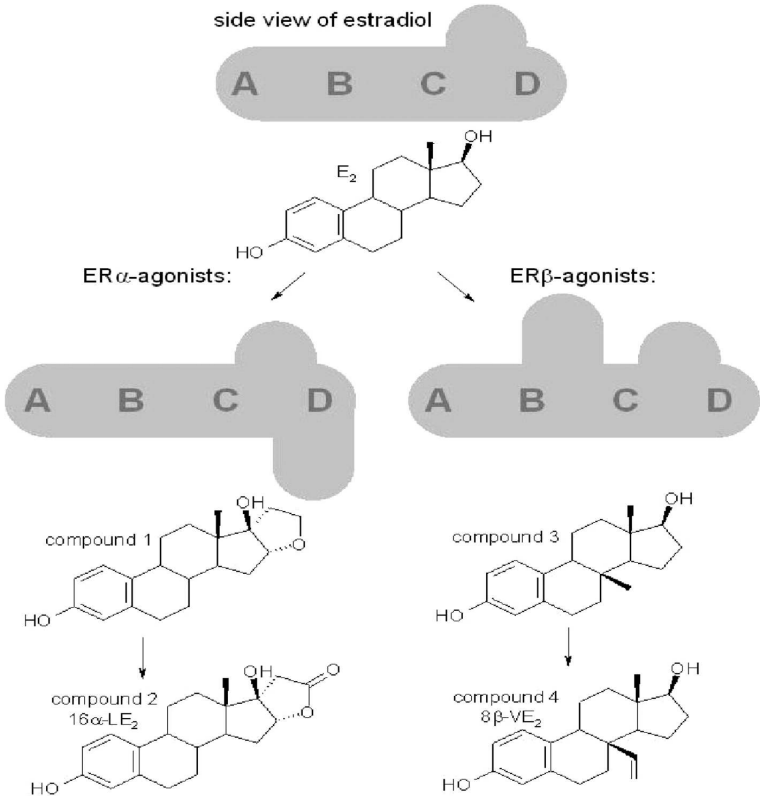


Abb. 1.2 Synthesestrategie der selektiven ER-Agonisten

Strukturformeln und schematische Seitenansicht der Steroide, inklusive Benennung der steroidalen Ringe (A-D). Der Halbkreis über dem C- und D-Ring repräsentiert die 18-Methylgruppe des E2. Der große Substituent am D-Ring liefert den ERα-Agonisten 16α-LE2 und der lipophile Substituent über dem B- und C-Ring liefert den ERβ-Agonisten 8β-VE2.

(Quelle: Hillisch et al. 2004 S.4)

Anhand von in-vitro-Studien wurden die Affinität der Liganden zu den beiden ER und die Induktion der Gentranskription durch die genannten Rezeptoren untersucht. Es zeigte sich, dass Verbindungen mit längeren Substituenten an den Positionen 16α und 17α eine hohe Affinität zum ERα aufwiesen. Die Affinität zum ERβ war hingegen zwei Zehnerpotenzen geringer. Zusätzlich zeigte sich, dass die Affinität zum ERα mit zunehmender Polarität und Länge des Substituenten anstieg. Anhand von Transaktivierungsassays zeigte sich eine 250fache ERα-Selektivität für den Liganden 16α-LE2.

Entsprechend steigern längere Substituenten an der Position 8β die ERβ-Selektivität. 8β-VE2 hat die gleiche Affinität zum ERβ wie E2, jedoch findet eine Bindung bereits in wesentlich geringeren Konzentrationen statt (zwei Zehnerpotenzen weniger). Genannter Ligand besitzt eine 183fache Selektivität für den ERβ.

Weder der ERα- noch der ERβ-Agonist besitzt, auf die durch E2 hervorgerufene Genaktivierung bezogen, antagonisierende Fähigkeiten. Trotz ihrer Selektivität besitzen beide Agonisten die gleiche Potenz wie E2.

Anders als die bereits bekannten ER-Liganden, können diese Substanzen mit ihren kleinen Substituenten und ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit E2 effektiv die wenigen Unterschiede der Bindungstaschen ausschöpfen. Aus diesem Grund wird angenommen, dass es zu keinen Konformitätsänderungen innerhalb der Bindungstaschen kommt und, dass die Selektivität der Liganden nicht von Interaktionen zwischen langen Strukturbereichen abhängt. Zudem wird so vorausgesetzt, dass die Möglichkeit eine komplett andere biologische Aktivität an anderen Rezeptoren oder Enzymen zu entwickeln, reduziert wird (Hegele-Hartung et al. 2004; Hillisch et al. 2004).

1.11.2 Bis jetzt untersuchte Wirkungen der verwendeten Substanzen

Die Ergebnisse der bereits durchgeführten in-vivo-Untersuchungen stimmten mit den Erwartungen, die sich aus dem Wissen über die Gewebeverteilung der ERα und ERβ und über den Phänotypen der Knockout-Mäuse ergaben, überein.

Am Ovar zeigte der ERβ-Agonist einen stimulierenden, der ERα-Agonist nur einen geringen bis keinen Effekt. In intakten Ratten bewirkte letztgenannter ebenso wie E2 einen ovulationshemmenden Effekt. Dieser wird jedoch aufgrund des vermehrten Vorkommens von ERα in der Hypophyse als in den Theka-Zellen des Ovars, und deshalb auf Wirkungen in der Hypothalamus-Hypophysen-Achse, zurückgeführt. Anders sah es am Uterus aus. Dort bewirkte nur der ERα-Agonist eine Stimulation. Doch zeigte sich in unreifen Ratten, dass hohe Dosen vom ERβ-Agonisten (≥0,1 mg/Tier/Tag) auch einen stimulierenden Effekt auf das Uteruswachstum haben können. Dies lässt sich anhand einer niedrigen, aber vorhandenen, Affinität zu ERα erklären. Interessanterweise zeigte sich, dass der ERα-Agonist einen stärkeren Effekt auf Leberparameter wie Angiotensin I, IGF-I, HDL und Total-Cholesterol hatte als E2. Der ERβ-Agonist hingegen zeigte auch in Dosen von über 100µg/Tier keinen Effekt auf diese Parameter.

LH und FSH im Serum wurden dosisabhängig von E2 und dem ERα-Agonisten gesenkt. Der ERβ-Agonist hatte hingegen nur in Dosen von bis zu 100µg/Tier/Tag einen Effekt auf den Serum LH-Spiegel und auf den FSH-Spiegel keinen Effekt.

Am Knochen zeigte sich der ERα-Agonist als primärer Mediator der östrogenen antiresorptiven Effekte. Knochenprotektive Wirkungen des ERβ-Agonisten in sehr hohen Dosen scheinen, wie weiter oben beschrieben, über den ERα zu fungieren (Hegele-Hartung et al. 2004; Hillisch et al. 2004). Die simultane Verabreichung der beiden Rezeptoragonisten führte zu keiner Hemmung der durch ERα hervorgerufenen Effekte auf das Uterusgewicht, die Hypophysenhormone und die Leberparameter (Hillisch et al. 2004).

Hertrampf et al. (2008) zeigten jedoch, dass der ERβ-Agonist ERα-bedingte physiologische Effekte, wie den Bewegungsdrang, modulieren kann.

1.12 Ziel der Arbeit

Da die klassische Hormonersatztherapie für postmenopausale Frauen mit gewissen Risiken behaftet ist, spielt die Suche nach selektiveren Therapeutika eine immer größere Rolle. Mit der Entdeckung des zweiten ER-Subtypen β wurde die Frage nach seiner Funktion und Wirkung auf verschiedene Gewebe und den erstbekannten Rezeptor α groß gestellt. Bis heute ist nicht abschießend geklärt, welche genaue Rolle er spielt.

Es ist von allgemeinem Interesse Wirkstoffe zu finden, die selektiv das „Positive“ der östogenen Wirkung verstärken und wiederum selektiv das „Negative“ ausschalten. Hierfür eignen sich besonders die selektiven Agonisten der Östrogenrezeptoren α und β. Wünschenswert ist ein fehlender stimulierender Effekt am Uterus und der Mamma, bei bestehendem Effekt auf den Knochen und die Vagina.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wirkungen der Kombination aus den selektiven Agonisten der Östrogenrezeptoren α (16α-LE2) und β (8β-VE2) *(im weiteren Verlauf als ERα- und ERβ-Agonist bezeichnet)* sowie der Kombination aus Östradiol und dem ERβ-Agonist an ovarektomierten Ratten untersucht. Die Kombination erfolgte hierbei für insgesamt vier Wochen in kontinuierlich simultaner und zeitversetzt simultaner Kombination. Die zeitversetzt simultane Kombination diente dazu herauszufinden, ob eine alleinige Vorbehandlung durch E2 bzw. den ERα-Agonisten einen anderen Effekt hervorbringt oder gar notwendig ist, um eine Beeinflussung durch den ERβ-Agonisten hervorzurufen. Eine Östradiolgruppe diente als Positivkontrolle. Als physiologischer Vergleichsparameter galt eine intakte sham-ovx

Gruppe.

Daraus ergibt sich folgende Fragestellung:

1. Haben durchgängig kombinierte Verabreichungen von E2 bzw. dem ERα-Agonisten mit dem ERβ-Agonisten eine andere Wirkung auf den Uterus, die Vagina, die Futteraufnahme, das Körpergewicht und den Hormonhaushalt der ovarektomierten Ratte als Östradiol? Und wenn ja, welche?
2. Wie präsentieren sich die Ergebnisse der zeitversetzten Ligandenkombination im Vergleich zu den Ergebnissen der durchgängigen Kombination?
3. Wie stellen sich die untersuchten Effekte im Vergleich zu der intakten sham-ovx Gruppe dar?
4. Entsprechen die Resultate den Erwartungen, die man laut der „Gustafsson'schen Yin-Yang-Theorie“ hat?
5. Bei welchen Indikationen wären die oben genannten Substanzen einsetzbar?

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Zur Untersuchung der Wirkung von ERα- und ERβ-Agonisten der Firma Schering wurden 78 drei Monate alte weibliche *Sprague-Dawley* (SD)-Ratten (Winkelmann, Borchen) über einen Zeitraum von 4 Wochen von mir und drei weiteren Doktoranden der Abteilung mit genannten Substanzen behandelt. Bei ihrer Ankunft in der tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen wurden sie von uns in 6 Gruppen à 12 Tiere und einer Gruppe à 6 Tiere aufgeteilt und in Käfigen (Makrolon®-Käfige Typ IV) à 6 Tieren gehalten.

Die Raumtemperatur des Tierstalles betrug 23℃, bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50-55 %. Die Beleuchtung des Raumes erfolgte von 6.00-18.00 Uhr (12h *dark-light-cyclus*).

Sojafreie, phytoöstrogenarme Pellets (ssniff Spezialdiäten, GmBH, Soest, V 1354-000 ssniff R-Z, 10 mm phytoöstrogenarm, Maus/Ratte) als Futter und Wasser standen den Tieren zur freien Verfügung. Der Anteil der Rohproteine (21,7 %) im Futter wurde aus der Kartoffel gewonnen. Zu Versuchsbeginn erhielt jeder Käfig 1500g Futter, welches wöchentlich von uns gewogen wurde. Bei Bedarf wurde wieder aufgefüllt und der Verbrauch kontrolliert. Anhand der gewonnenen Daten konnten wir die tägliche Futteraufnahme pro Käfig ermitteln. Da die Tiere einer Gruppe im Durchschnitt gleich viel an Gewicht zunahmen, konnten wir die ungefähre, durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier und Tag berechnen (s. Abb 3.1 auf S. 28).

Für den Tierversuch lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig vor (Az: 509.42502/01-36.03 vom 13.10.2003 – 31.10.2006). Die Tierversuche wurden unter der Anleitung und Aufsicht von Frau Dr. D. Seidlová-Wuttke durchgeführt.

2.1.2 Versuchsablauf

Nach einer Eingewöhnungsphase von einer Woche führten die anderen Doktoranden meines Teams und ich die erste quantitative Computertomographiemessung (qXCT Research SA+, Stratec Medizintechnik, Pforzheim) unter Isofluran (Forene® Abbott GmbH, Wiesbaden)-Inhalationsnarkose (Inhalationsnarkosegerät Penlon Sigma Delta, Penlon Ltd. Abingdon, Oxon, UK) durch. Das mittlere Körpergewicht lag zu diesem Zeitpunkt bei 239 ± 0,99g.

Unter der Narkose setzten wir den Ratten zur Kennzeichnung einen 2,12 x 13 mm großen Transponder (UNO ROESVASTSTAAL BV Zerenaar) subkutan im Nackenbereich ein. Die zweite CT-Messung fand nach der Sektion statt. Da CT-Messungen nicht Bestandteil dieser Arbeit sind, wurden sie nur der Vollständigkeit halber erwähnt.

2.1.3 Ovarektomie

In der darauf folgenden Woche fand die Ovarektomie (ovx) von 6 der 7 Gruppen statt. Die siebte Gruppe wurde nicht ovarektomiert, jedoch auch einer Operation unterzogen, um die gleichen Stressbedingungen zu schaffen. Das mittlere Körpergewicht betrug 246,8 ± 4,14g.

Unter Inhalationsnarkose mit Isofluran wurden zunächst die Flankenregionen beidseits rasiert. Zur Eröffnung der Bauchhöhle wurden Haut und Muskulatur schichtweise durchtrennt. Das Ovar wurde anschließend vorgelagert und vom umliegenden Fettgewebe befreit. Das Ovidukt bzw. der distale Anteil der Uterushornspitze wurden abgeklemmt und mit Catgut (3 metric; Ethicon, Norderstedt) ligiert, bevor das Ovar nach Absetzen mittels Skalpell entfernt werden konnte. Nach Reposition des Uterus in die Bauchhöhle und Kontrolle der Blutung wurde die Muskulatur mit Catgut (3 metric; s.o.) genäht. Die Haut wurde anschließend mit Michel-Klammern (Martin, Tuttlingen) verschlossen. Die Ovarektomie wurde von Frau Dr. D. Seidlová-Wuttke und weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung durchgeführt.

2.1.4 Applikation der Testsubstanzen

Unmittelbar nach der ovx erhielten die Ratten von mir und den drei weiteren Doktoranden des Teams über einen Zeitraum von 4 Wochen täglich eine s.c. Injektion der Testsubstanzen E2, ERα-Agonist (ZK 281471) und ERβ-Agonist (ZK 281738). Zwei der vier Gruppen, die eine Kombination an Testsubstanzen erhielten, wurden für 4 Wochen kontinuierlich mit E2 und dem ERβ-Agonisten bzw. dem ERα-Agonisten und dem ERβ-Agonisten behandelt. Die anderen zwei Gruppen erhielten zunächst für zwei Wochen eine Monosubstitution von E2 bzw. dem ERα-Agonisten. In den darauffolgenden zwei Wochen wurde zusätzlich der ERβ-Agonist kombiniert. Die Substanzen wurden vor der Applikation gemischt.

Um Tieren eine Substanz zu verabreichen, gibt es viele verschiedene Möglichkeiten.

Das Verfahren der s.c. Injektion ist geeignet, um über einen langen Zeitraum eine konstante Substratkonzentration im Blut zu erzielen. Dies wird durch das entstehende Depot im subkutanen Fettgewebe, welches von zahlreichen Kapillaren durchzogen ist, erreicht. Um sich zu vergewissern, dass die Substanz nicht direkt in ein Kapillargefäß gelangt, wurde vor jeder Injektion aspiriert. Bevorzugte Injektionsstellen sind die seitliche Halsregion und der Oberschenkelbereich. Um eine bei jedem Tier möglichst gleich schnelle Substratresorbtion zu erzielen, injizierten wir immer am Oberschenkel. Um Vernarbungen zu vermeiden, wurde täglich die Injektionsseite gewechselt. Die Substanzmenge betrug 0,2 ml täglich pro Ratte. Die Applikation erfolgte mit einer Insulinspritze (Becton Dickinson S.A. S. Augustin del Guadalix Madrid, Spain 1ml) und einer Kanüle (Becton Dickinson S.A. Fraga (Huesca) E-Spain Microlance 3). Die zu applizierenden Substanzen dieser Studie wurden in einer öligen Lösung aufgelöst.

Gruppe	n=	Dosis	Zeit
Kontrolle,ovx,sf	12	0,2ml/Tier Rizinusöl	Täglich
E2 (17β),ovx,sf	12	1µg/Tier in 0,2ml Benzylbenzoat/Rizinusöl (1:4)	Täglich
E2 + ERβ,ovx,sf	12	1µg/Tier + 50µg/Tier in 0,2ml Benzylbenzoat/Rizinusöl (1:4)	Täglich
ERα + ERβ,ovx,sf	12	10µg/Tier + 50µg/Tier in 0,2ml Benzylbenzoat/Rizinusöl (1:4)	Täglich
E2 + ERβ stufig,ovx,sf	12	1µg/Tier in 0,2ml Benzylbenzoat/Rizinusöl (1:4) für 14 Tage, dann 1µg/Tier + 50µg/Tier in 0,2ml Benzylbenzoat/Rizinusöl (1:4) für 14 Tage	Täglich
ERα + ERβ stufig,ovx,sf	12	10µg/Tier in 0,2ml Benzylbenzoat/Rizinusöl (1:4) für 14 Tage, dann 10µg/Tier + 50µg/Tier in 0,2ml Benzylbenzoat/Rizinusöl (1:4) für 14 Tage	Täglich
sham,ovx,sf	6	0,2ml/Tier Rizinusöl	Täglich

n=Tierzahl

Tab. 2.1 Substanzdosierungen

Unmittelbar eine Woche vor der Obduktion wurden die Tiere einer urodynamischen Blasendruckmessung unter Isofluran-Inhalationsnarkose unterzogen. Das mittlere Körpergewicht lag zu diesem Zeitpunkt bei 260 ± 22,06g.

Da die urodynamischen Messungen nicht Teil dieser Arbeit sind, werden sie hier nur erwähnt. An diesen Messungen war ich nicht persönlich beteiligt.

2.1.5 Obduktion

Nach einer Applikationszeit von 4 Wochen wurden die Tiere unter CO_2-Betäubung dekapitiert. Das mittlere Körpergewicht lag hier bei 249,9 ± 21,24g (s. Abb. 3.1 auf S. 28).

Das Blut wurde zur Serumdiagnostik über einem Trichter aufgefangen, auf Eis gebracht, anschließend zentrifugiert und eingefroren (3000 g, 20 min).

Für die vorliegende Arbeit wurden die Organe Uterus und Vagina entnommen und in 10% Formaldehyd für die nächste Aufarbeitung aufbewahrt. Die Obduktion wurde von Dr. D. Seidlová-Wuttke, weiteren wissenschaftlichen Mitarbeitern der Abteilung sowie von mir und meiner Arbeitsgruppe durchgeführt.

2.2 Serumdiagnostik

In den Rattenseren wurden das luteinisierende Hormon (LH), das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH) und die freien Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (fT3) und Thyroxin (fT4) nach dem Prinzip des Radioimmunoassays (RIA) bestimmt. Hierbei konkurrieren radioaktive und nicht radioaktive Antigene um eine begrenzte Anzahl von Antikörperbindungsstellen. Die Menge der radioaktiv markierten Antigene, welche an die Antikörper gebunden sind, ist umgekehrt proportional zur Konzentration der Probe. Die Trennung von freiem Antigen und vom Antigen-1.Antikörper-Komplex erfolgt durch Fällung mit einem 2. Antikörper. Die Radioaktivität wurde mit dem *Gamma Counter Wizard* 1470 (WALLAC, Schweden) gemessen und mit dem RIA-CALC-Programm ausgewertet.

Östradiol (E2) ist mit Hilfe des RIA DSL Kits-43 100 (Sinsheim, Germany) untersucht worden.

Für die LH-Messung wurden laboreigene RIA-Assays verwendet, welche mit den Standartkurven, Hormonen und Antikörpern des *National Hormone and Pituitary Program* (NIH) arbeiten.

TSH wurde mittels eines selbst entwickelten RIA-Assays (NIAMD, Dr. Parlow, Torrance Harbour General Hospital CA) diagnostiziert.

Die Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 wurden mit Hilfe des RIA, Kit DSL-3100, DLS-3200, bestimmt.

Durchgeführt wurden diese Messungen von den technischen Assistentinnen der Abteilung.

2.3 Histologische Aufarbeitung von Uterus und Vagina

2.3.1 Vorbereitung

Sofort nach der Obduktion wurden die Organe (Uterus und Vagina) der Tiere für 24-72 Stunden in 10%igem Formalin konserviert. Anschließend wurden sie für ca. 30 Minuten unter fließendem Wasser gesäubert. Für den weiteren Gebrauch mussten die histologischen Präparate entwässert und fixiert werden. Dazu wurden die in Einbettkästen aufbewahrten Schnitte mit Hilfe einer Zitadelle (Leica TP 1020, V 2,0) nacheinander in verschiedene Alkohol-, Xylol- und Paraffinlösungen getaucht und aufbewahrt. Die aufsteigende Alkoholreihe diente zur Entwässerung, das Paraffin zur Stabilisierung der Organe.

Substanz	**Einwirkzeit**
50%iger Alkohol	1 Std.
75%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
75%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
96%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
96%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
100%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
100%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
100%iger Alkohol	1 Std. 20 min.
Xylol	1 Std. 20 min.
Xylol	1 Std. 20 min.
Paraffin	1 Std.
Paraffin	1 Std.

Tabelle 2.2 Schema der Organentwässerung

Die Einbettkästen wurden, nachdem sie aus der Zitadelle kamen, bis zur endgültigen Fixierung in einem Wärmeschrank bei 56-62 ℃ (Fa: S chütt Labortechnik, GFL 7601)

aufbewahrt. Nacheinander wurden die vorbehandelten Organteile in einen Paraffinblock gegossen (EG 1140 A, Leica). Auf der Kühlplatte (EG 1140 C, Leica) wurden sie so lange gekühlt, bis die getrockneten Paraffinblöcke aus den Metallschablonen gelöst werden konnten.

Die fertigen Blöcke konnten jetzt bei -20℃ für 24 Stunden tiefgekühlt werden.

Später wurden die paraffinfixierten noch eingefrorenen Schnitte der Organe mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica Model RM 2135) in Schichten von 3µm Dicke geschnitten und auf einen Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel GmbH, Braunschweig) gebracht. Pro Organ fertigte ich 10 Schnitte an. Zum Trocknen kamen die Schnitte über Nacht bei 37℃ in den Brutschrank.

Die beschriebenen vorbereitenden Schritte wurden von mir unter der Anleitung einer erfahrenen technischen Assistentin (Fr. H. Brüggemann-Meyer) durchgeführt.

2.3.2 Färbung mittels Hämatoxylin und Eosin

Im Anschluss daran führte ich selbstständig eine HE-Färbung (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt; Eosin gelblich, Merck, Darmstadt) der Schnitte durch. Diese bestand aus einer absteigenden Alkoholreihe, der eigentlichen Färbung und einer aufsteigenden Alkoholreihe. Es wurden jeweils der 4. und 5. Schnitt eines Organs gefärbt.

Substanz	**Einwirkdauer**
Xylol	10 min.
Xylol	10 min.
Xylol	10 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 100%	2 min.
Ethanol 96%	2 min.
Ethanol 96%	2 min.
Ethanol 75%	2 min.

Aqua dest.	2 min.
Hämatoxylin	50 sec.
Leitungswasser	10 min.
Eosin	40 sec.
Aqua bidest.	5 – 10 sec.
Ethanol 75%	30 sec.
Ethanol 96%	30 sec.
Ethanol 96%	30 sec.
Ethanol 100%	1 min.
Ethanol 100%	1 min.
Ethanol 100%	2 min.
Xylol	5 min.
Xylol	5 min.
Xylol	5 min.

Tabelle 2.3 Schema der HE-Färbung

Die fertig gefärbten Schnitte wurden nun mit DePeX eingedeckt und für 24 Stunden getrocknet.

2.3.3 Mikroskopie

Die angefärbten Präparate (Schnitt 4 und 5 der 10 angefertigten Schnitte pro Organ, d.h. bei 78 Ratten insgesamt 312 Präparate) wurden von mir mit dem Axiophot Mikroskop (Zeiss) mit integrierter digitaler Kamera, welches mit dem Computersystem AnalySIS 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Olympus, Münster) verbunden ist, ausgemessen und fotografiert. Hierbei fertigte ich pro Bild und auszumessender histologischer Schicht (sprich Myometrium, Endometrium oder Epithel) jeweils 15 Messungen an. In Abb. 2.1 (s. unten) ist jeweils eine der 15 Messungen beispielhaft dargestellt. Auf diese Weise konnte die Myometrium-,

Endometrium- und Epitheldicke des Uterus und die Epitheldicke der Vagina quantifiziert werden (Vergrößerung Myometrium und Endometrium 3,125fach bzw. Epithel des Uterus und der Vagina 25fach). Die Größe der quantifizierten Areale entsprach einem Bildausschnitt in der beschriebenen Vergößerung. Es erfolgte keine Aufteilung in Quadranten.

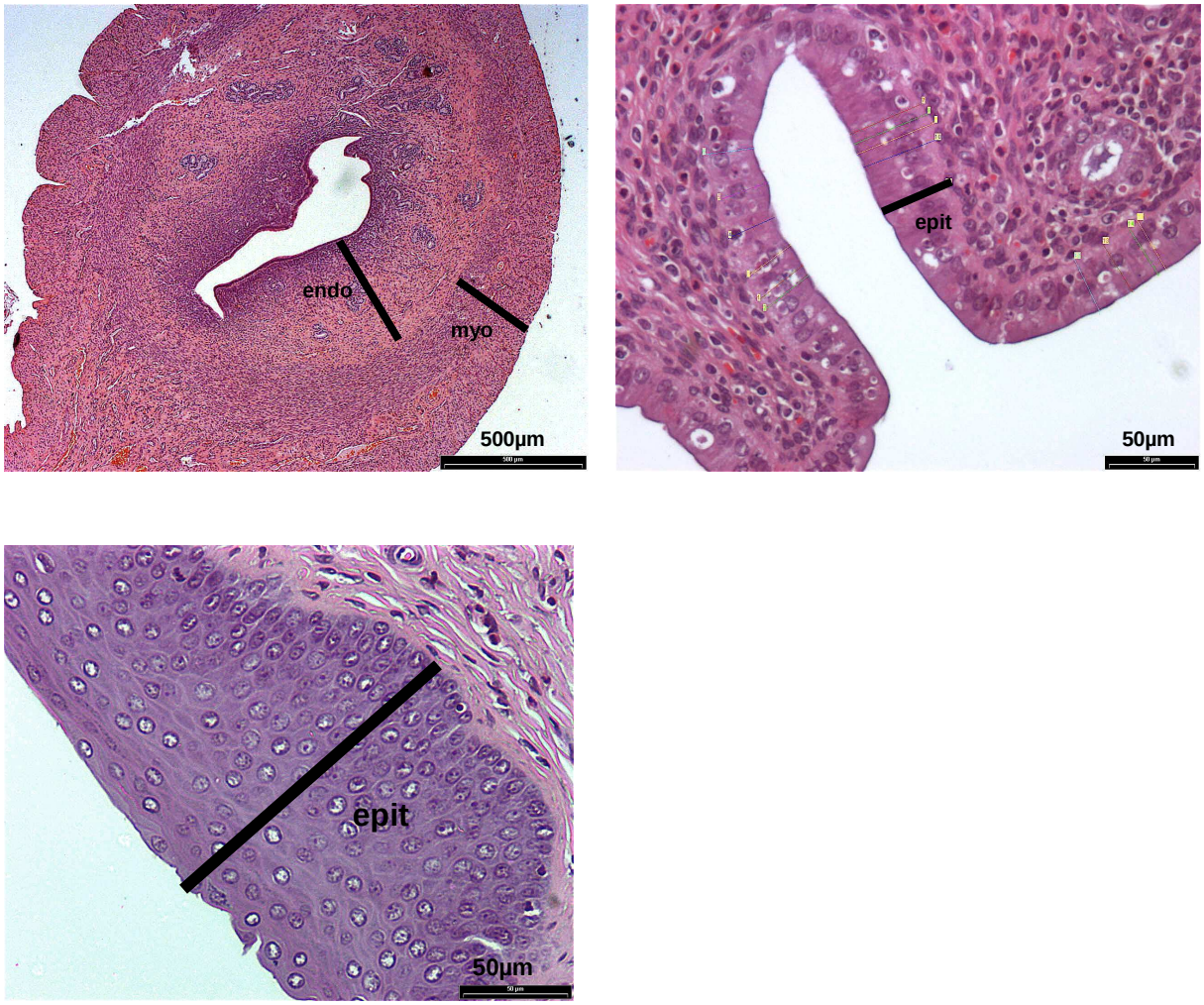


Abb. 2.1.: Beispiel der Dickemessungen

(**oben links Uterus:** myo=Myometriumdicke, endo=Endometriumdicke; **oben rechts Uterus:** epit=Epitheldicke; **unten links Vagina:** epit=Epitheldicke)

Zusätzlich wurden histomorphologisch am Uterus untersucht (s. Ergebnisteil Abb. 3.5-3.12 auf S. 31-34):

- Myometriumdicke (Hypertrophie und Hyperplasie)
- Endometriumdicke (Hypertrophie und Hyperplasie)
- Uterine und glanduläre Epitheldicke (Hypertrophie und Hyperplasie, evtl. Metaplasie)
- Epithelmorphologie: Vakuolisierung, Nekrosen, Kernbeschaffenheit
- Zellen in der Lamina propria
- Basalmembrandurchgängigkeit
- Drüsenvorkommnis und Drüsengröße
- Mitosen der Epithelschicht (jedes Präparat in einem konstant großen Bildausschnitt in der gegebenen Vergrößerung).

Zur Beurteilung der Histomorphologie wurden folgende Quellen genutzt: Haschek et Rousseaux (1991); Löning et al. (1999a/b); Fazleabas et Strakova (2002); Riede et al. (2004).

Histomorphologisch wurden an der Vagina untersucht (s. Ergebnisteil Abb. 3.16-3.19 auf S. 41-42):

- Epitheldicke (Hypertrophie und Hyperplasie) mit Anzahl der Epithelschichten
- epitheliale Vakuolenbildung
- Anzahl der epithelialen Mitosen (jedes Präparat in einem konstant großen Bildausschnitt in der gegebenen Vergrößerung)
- Verhornung der luminalen Schichten
- Zellkernanordnung und Kernbeschaffenheit
- interzelluläre Flüssigkeitsansammlung
- Basalmembrandurchgängigkeit.

Zur Beurteilung der Histomorphologie wurden folgende Quellen benutzt: Haschek et Rousseaux (1991); Maeda et al. (2000).

Für die histomorphologische Beurteilung verwendete ich pro Organ nur einen der zwei angefärbten Schnitte, d.h. ich beurteilte außer bei der sham-Gruppe jeweils 12 Uterus- und 12 Vagina-Präparate pro Gruppe. Bei der sham-Gruppe wertete ich 6 Uterus- und 6 Vagina-Präparate aus (s. Tab. 3.1 auf Seite 37 und Tab. 3.2 auf S. 45).

2.4 Statistische Auswertung

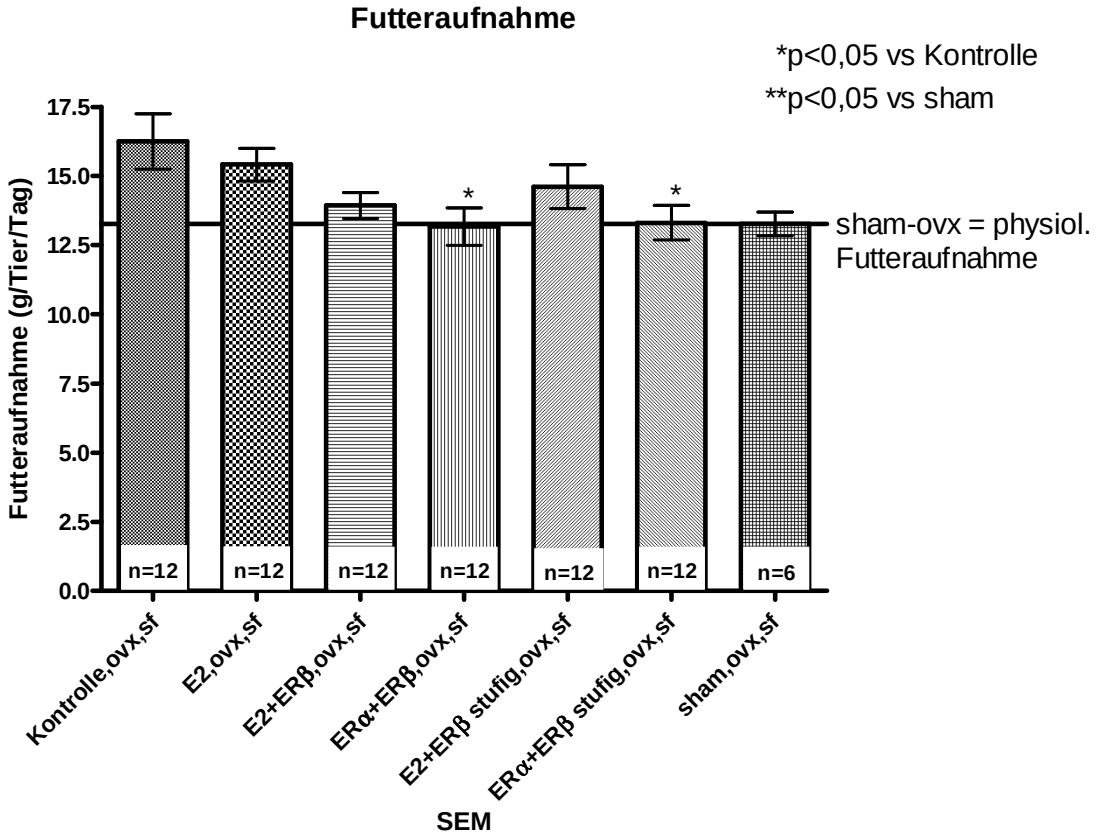
Für die statistische Auswertung verwendete ich das Computerprogramm PRISM® (GraphPad, San Diego, USA).

Aus den Werten der jeweiligen Schnitte ermittelte ich die Mittelwerte in Excel und übertrug diese anschließend in PRISM®. Auch die ermittelten Werte aus den histomorphologischen Untersuchungen wurden in PRISM® übertragen. Aus diesen Werten bestimmte ich den Mittelwert und den Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) der einzelnen Gruppen und stellte sie graphisch in Säulendiagrammen dar.

Die Signifikanz ermittelte ich mit einer einfachen Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) und anschließendem *Dunnett's Comparison Test*. Das Signifikanzniveau wurde auf $p<0,05$ festgelegt. Hierbei wurde zum einen die Kontrollgruppe (bei Signifikanz mit * im Graphen gekennzeichnet) und zum anderen die sham-ovx Gruppe (bei Signifikanz mit ** im Graphen gekennzeichnet) mit den anderen Gruppen verglichen.

3 Ergebnisse

3.1 Futteraufnahme

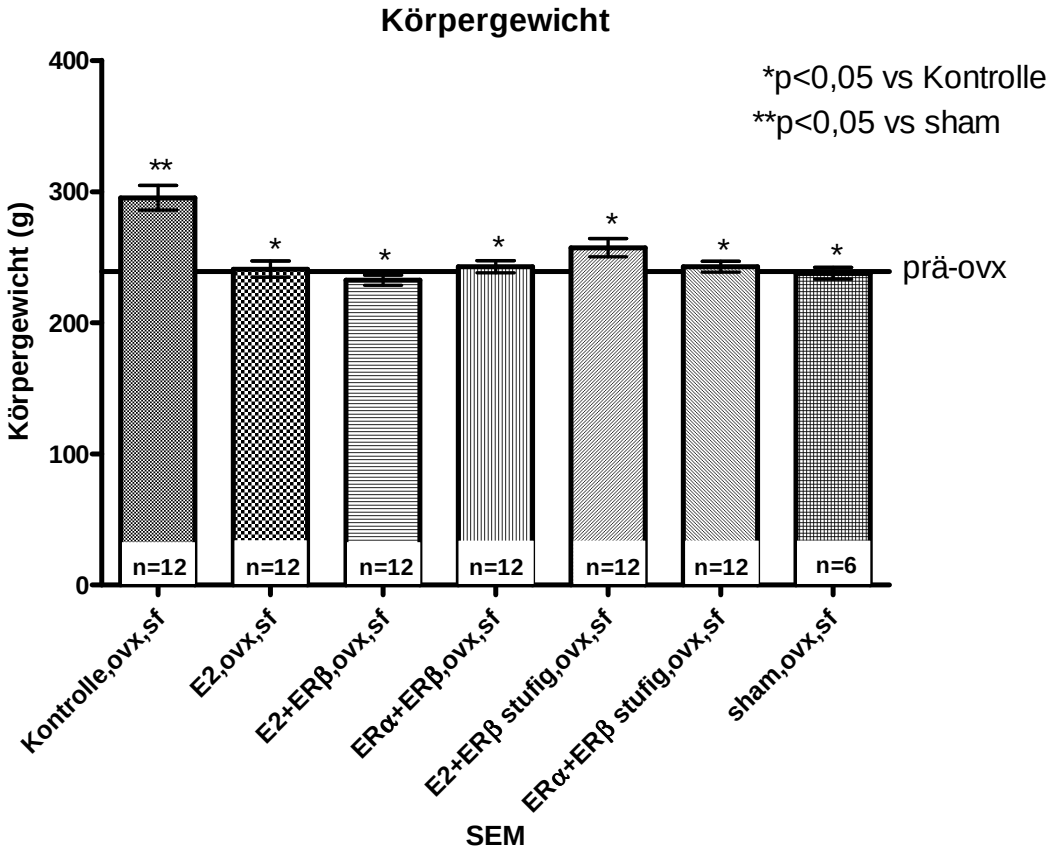


n = Tieranzahl

Abb. 3.1 Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag innerhalb von 4 Wochen

Die höchste durchschnittliche Futteraufnahme fand sich in der Kontrollgruppe mit 16,25±3,16g/Tier/Tag, gefolgt von der Östradiolgruppe mit Futtermengen von 15,42±1,86g/Tier/Tag. In allen übrigen Gruppen waren die Werte niedriger, doch waren sie nur in den mit ERα- und ERβ-Agonisten in Kombination (sowohl kontinuierlich, als auch zeitversetzt) behandelten Gruppen signifikant zur Kontrollgruppe erniedrigt und entsprachen ungefähr der physiologischen Futteraufnahme durch die sham-ovx Gruppe.

3.2 Körpergewicht



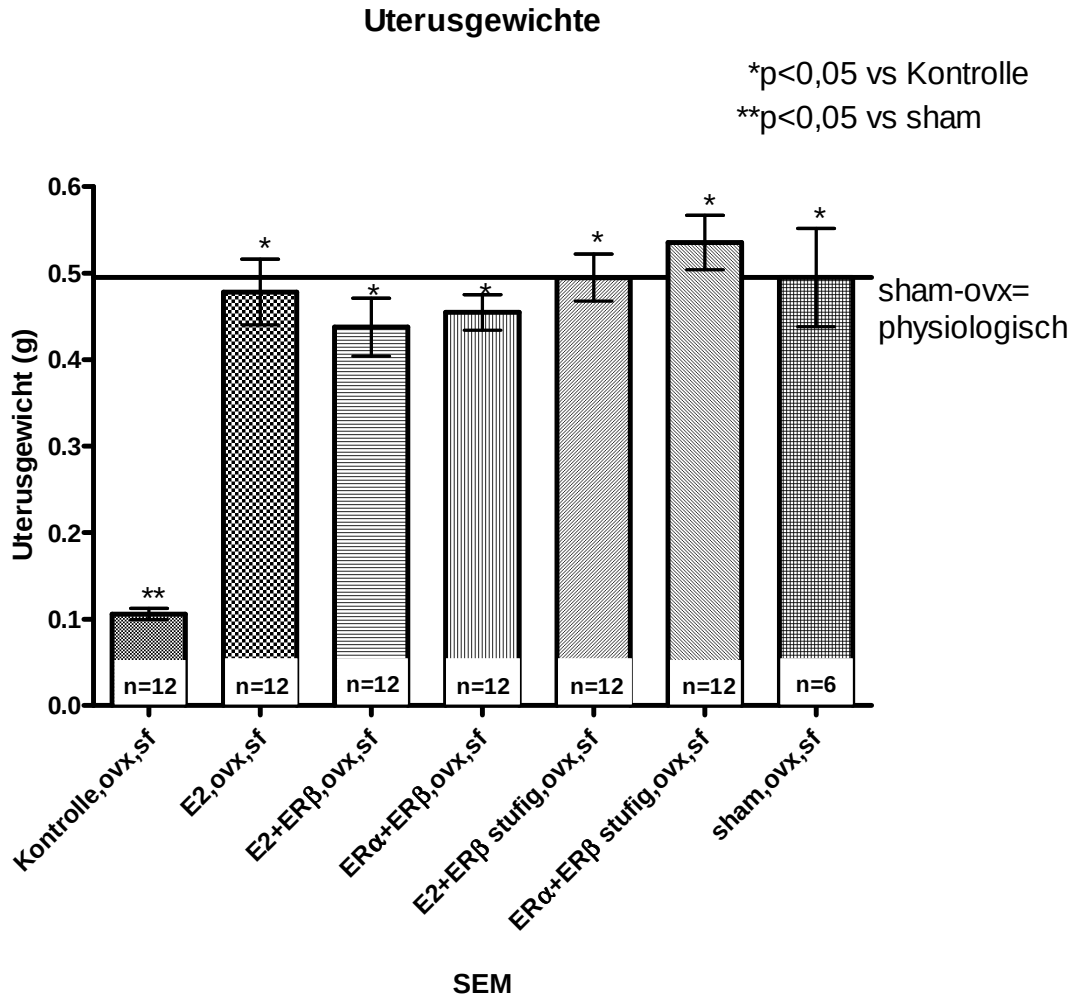
n = Tieranzahl

Abb. 3.2 Finales Körpergewicht nach 4-wöchiger s.c. Applikation der Substanzen

Die Körpergewichte aller substanzbehandelten Tiere sowie die der sham-ovx Gruppe waren signifikant erniedrigt zu den Körpergewichten der ovarektomierten Kontrollgruppe. Die Körpergewichte der Kontrollgruppe waren mit 295,3±30,76g signifikant erhöht zu denen der sham-ovx Gruppe mit 237,7±10,71g. Alle Körpergewichte der substanzbehandelten Gruppen bewegten sich in dem Bereich der physiologischen sham-ovx Gruppe. Diese Gruppe zeigte einen Wert, der dem präovarektomiert gemessenen mittleren Körpergewicht aller Tiere vergleichbar war (239±0,99g).

3.3 Ergebnisse im Uterus

3.3.1 Uterusgewichte



n = Uterusanzahl

Abb. 3.3 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen nach 4-wöchiger Applikation auf das Uterusfeuchtgewicht der Ratten

Direkt nach der Tötung wurden die Uteri entnommen und gewogen. Es zeigten sich sowohl in der E2-Gruppe (0,48±0,12 g) als auch in den Kombinationsgruppen E2 und ERβ-Agonist bzw. ERα- und ERβ-Agonist und in der sham-ovx Gruppe (0,5±0,14g) eine signifikante Erhöhung des Uterusfeuchtgewichtes im Vergleich zur Kontrollgruppe (0,11±0,02g).

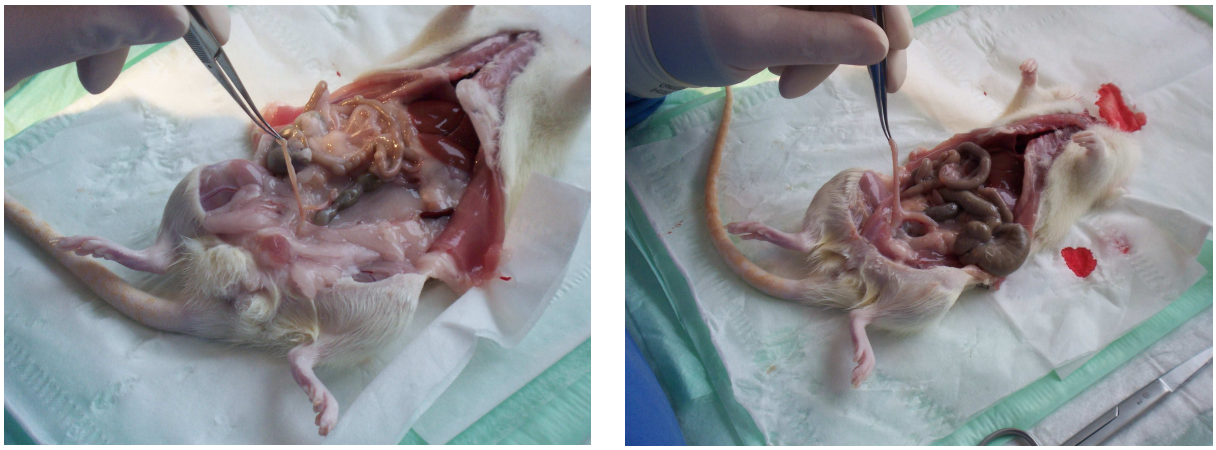


Abb. 3.4 **Fotos der Uteri: links Kontrollgruppe, rechts E2-Gruppe**

3.3.2 Uterushistologie

Folgende Befunde wurden in den einzelnen Versuchsgruppen gefunden:

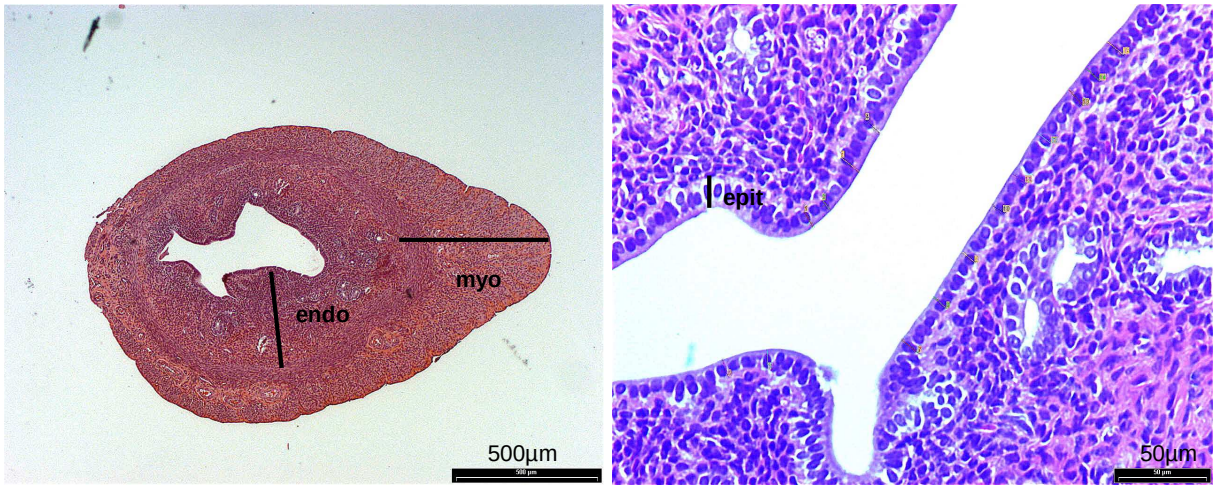


Abb. 3.5 **Uterusquerschnitt und Epithel; Kontrolle,ovx,sf**

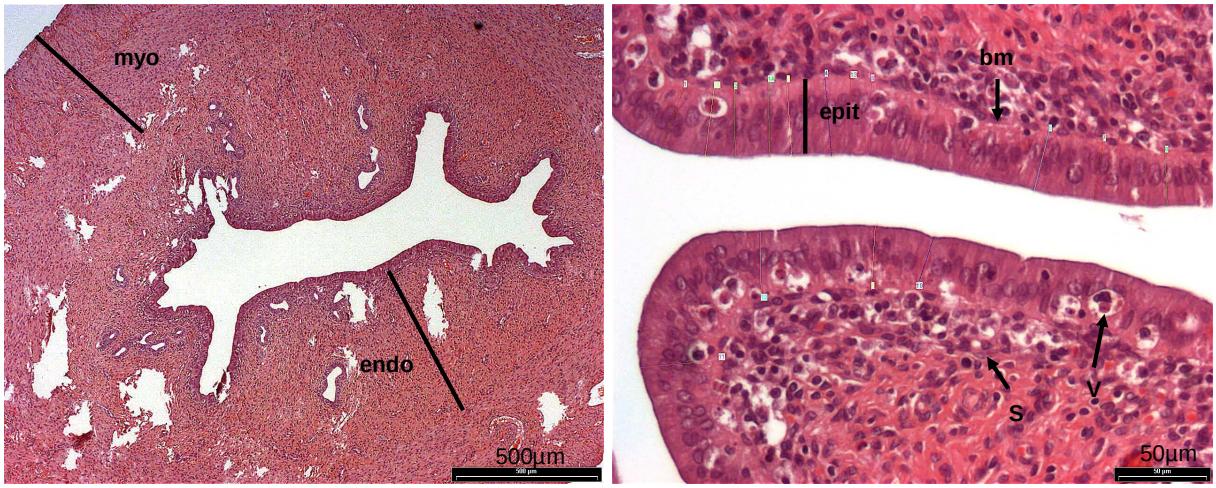


Abb. 3.6 **Uterusquerschnitt und Epithel; E2,ovx,sf**

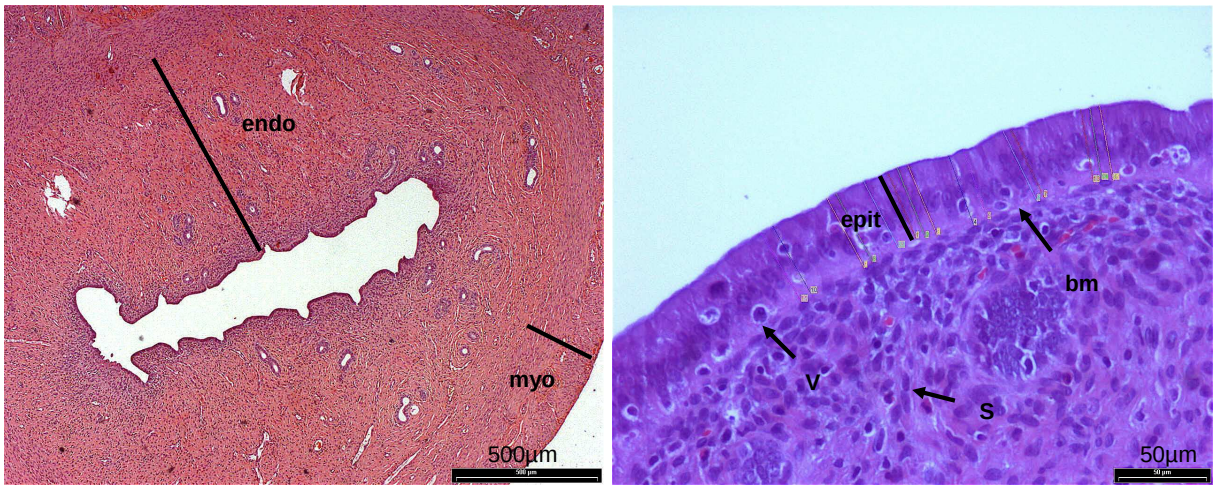


Abb. 3.7 **Uterusquerschnitt und Epithel; E2+ERβ,ovx,sf**

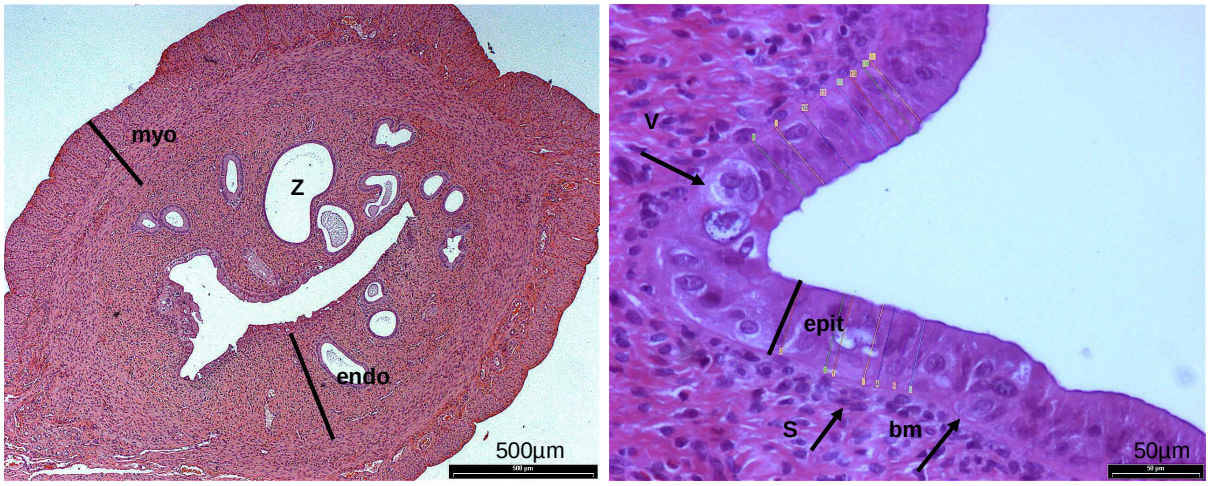


Abb. 3.8 **Uterusquerschnitt und Epithel; ERα+ERβ,ovx,sf**

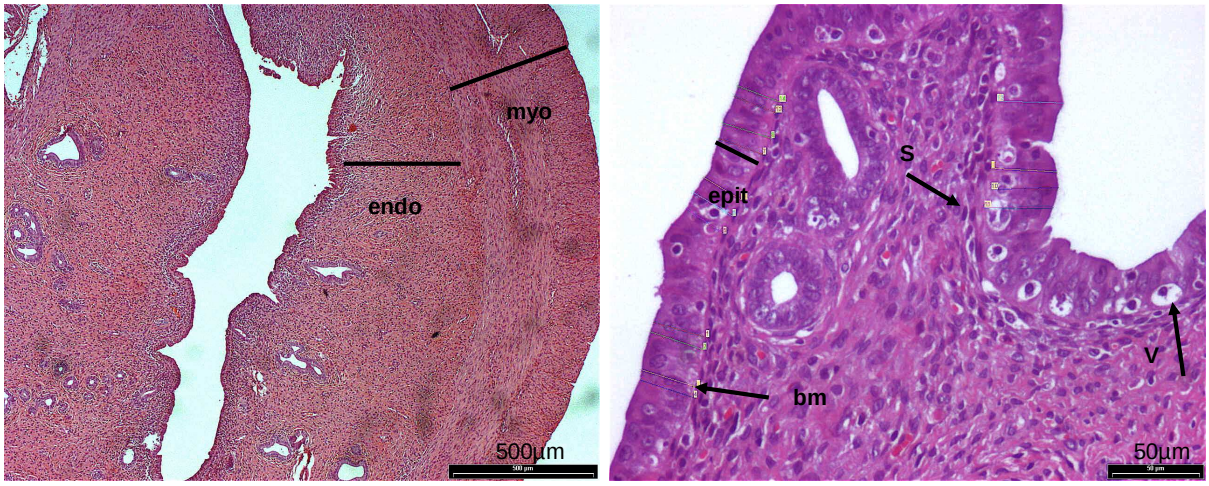


Abb. 3.9 **Uterusquerschnitt und Epithel; E2+ERβ stufig,ovx,sf**

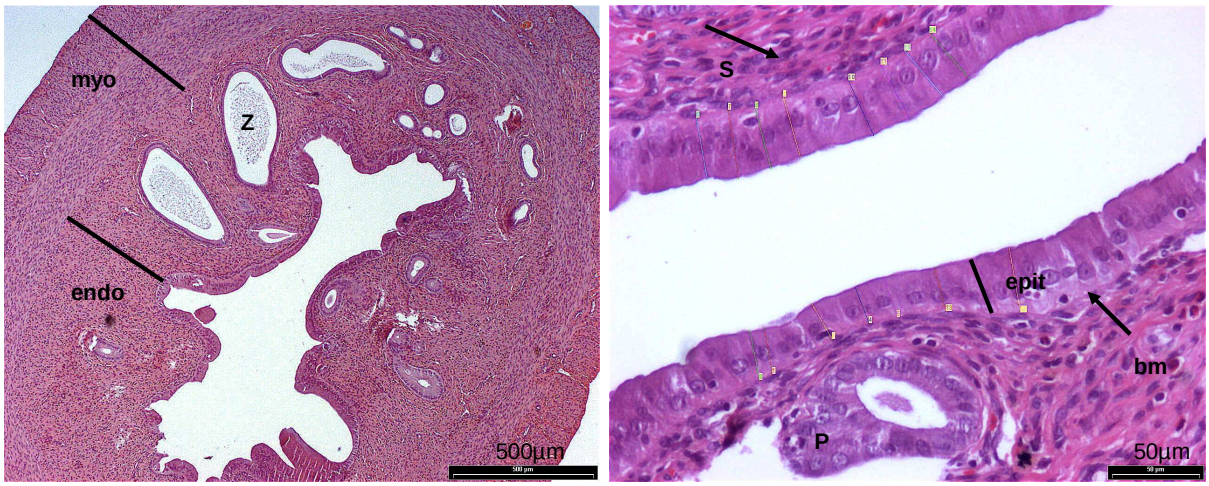


Abb. 3.10 Uterusquerschnitt und Epithel; ERα+ERβ stufig,ovx,sf

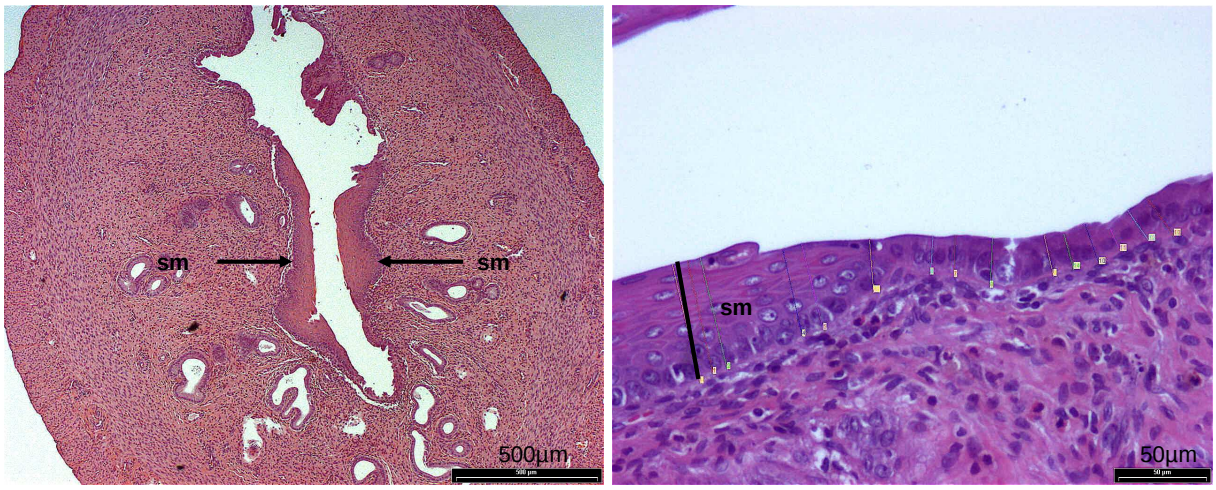


Abb. 3.11 Squamöse Metaplasie Uterus; ERα+ERβ stufig,ovx,sf

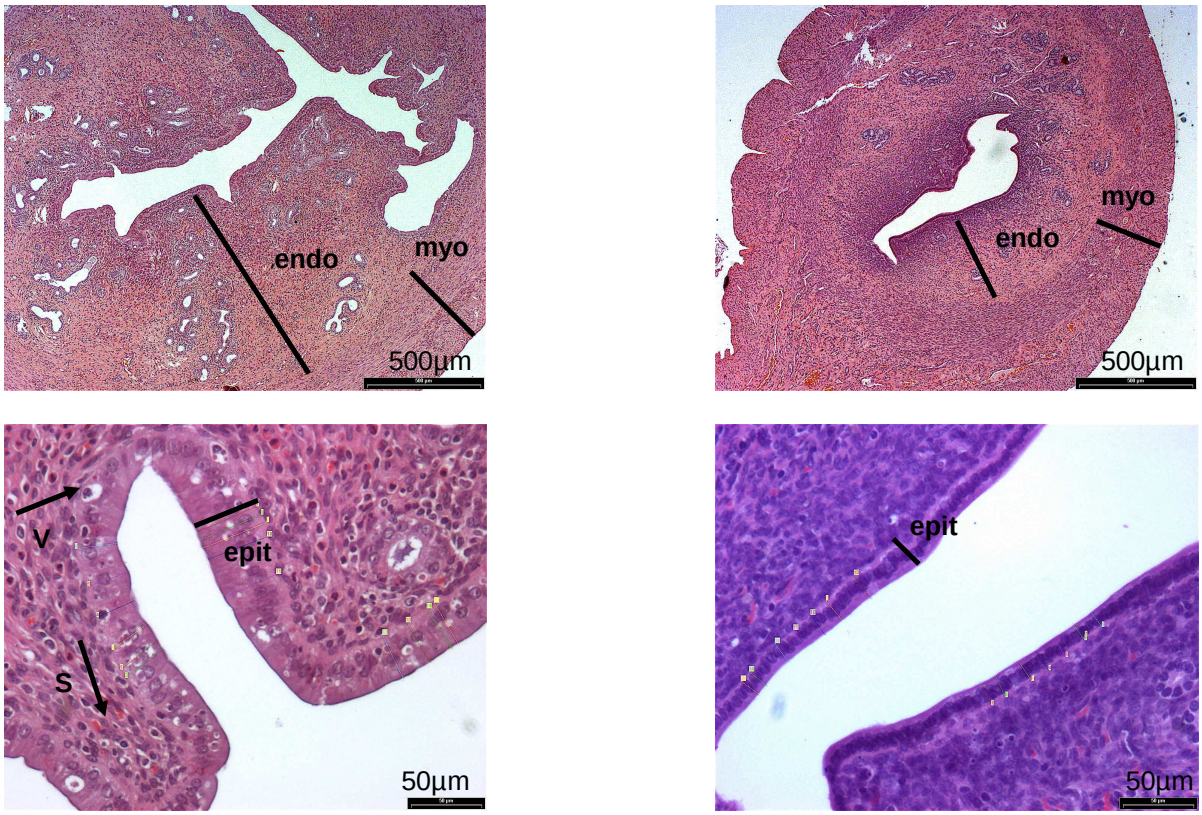


Abb. 3.12 Uterusquerschnitt und Epithel; sham,ovx,sf

n (Anzahl der untersuchten Uruspräparate bezüglich Dickemessungen) = 156 gesamt (78 Uteri; Auswertung Schnitt 4 und 5)

Kontrolle,ovx,sf: n = 24 ; E2,ovx,sf: n = 24 ; E2+ERβ,ovx,sf: n = 24 ; ERα+ERβ,ovx,sf: n = 24 ;

E2+ERβ stufig,ovx,sf: n = 24 ; ERα+ERβ stufig,ovx,sf: n = 24 ; sham,ovx,sf: n = 12

Erklärungen der Abkürzungen:

myo: Myometrium, **endo:** Endometrium, **epit:** Epithel, **bm:** Basalmembran, **v:** Vakuolen, **s:** spindelförmige Zellen, **z:** zystische Drüsen, **p:** pseudopapilläre Proliferationen, **sm:** squamöse Metaplasie

Kontrolle (s. Abb. 3.5):

Histologisch zeigte sich in allen Schichten eine Atrophie. Das Epithel war einschichtig isoprismatisch mit kleinen runden, dicht gepackten Zellkernen. Mitosen waren nicht zu sehen.

Östradiol (s. Abb.3.6):

Es fanden sich eine starke Hypertrophie und Hyperplasie in allen Schichten. Vereinzelt waren zystische Drüsen zu finden. In der Lamina propria reihten sich spindelförmige Zellen an. Das Epithel erschien mehrreihig hochprismatisch (1-3 Reihen) mit längsovalen bis runden Kernen und deutlich erkennbaren Nucleoli.

Degenerative Veränderungen, wie zytoplasmatische Vakuolenbildung mit Nekrosen, waren ebenfalls zu beobachten. Zusätzlich wurden vermehrt squamöse Metaplasien gesichtet (7/12). Die Basalmembran war durchgehend intakt und deutlich erkennbar. Die Mitoserate war sehr gering (1/12).

Östradiol und der ERβ-Agonist 4 Wochen in Kombination (s. Abb. 3.7):

In allen Schichten waren eine starke Hypertrophie und Hyperplasie zu finden. Die Drüsen erschienen größtenteils klein, mit nur wenigen zystischen Veränderungen. In 1 von 12 Fällen war eine pseudopapilläre Proliferation des Drüsenepithels zu beobachten. Entlang der Lamina propria reihten sich spindelförmige Zellen auf. Das Epithel war unregelmäßig hoch aufgebaut und reichte von isoprismatisch einreihig bis hochprismatisch mehrreihig mit einer Vielzahl an squamösen Metaplasien (7/12). Das Zytoplasma war vakuolisiert und teilweise schollig aufgelockert. Die Kerne zeigten sich längsoval bis rund mit teilweise prominenten Nucleoli. Die Basalmembran war durchgehend intakt. Die Mitoserate lag bei 2/12.

ERα- und der ERβ-Agonist 4 Wochen in Kombination (s. Abb. 3.8):

In allen Schichten gab es eine Hypertrophie und Hyperplasie. Entlang der Lamina propria reihten sich spindelförmige Zellen an. Besonders auffällig waren die in allen Präparaten zu findenden sehr großen, zystischen, aber einzeln stehenden Drüsen mit gelegentlichem Sekretinhalt und abgeflachtem Epithel. Im Drüsenepithel stellten sich viele pseudopapillären Proliferationen dar. Zudem fand sich eine scharfe Begrenzung zwischen Myometrium und Endometrium und eine deutliche Schichtung des Myometriums. Das Lumenepithel war unregelmäßig hoch und reichte von isoprismatisch einreihig bis hochprismatisch mehrreihig mit vielen squamösen Metaplasien (11/12). Es zeigten sich stark degenerative Veränderungen und große Vakuolen mit nekrotischen Anteilen. Die übrigen Zellkerne waren deutlich voneinander abgrenzbar und zeigten teilweise prominente Nucleoli. In einem von 12 Präparaten fanden sich Mitosen. Die Basalmembran war durchgehend intakt.

Östradiol und der ERβ-Agonist stufig kombiniert (s. Abb. 3.9):

Auch hier fanden sich in allen Schichten eine Hypertrophie und Hyperplasie. Die Drüsen waren klein und vereinzelt. In der Lamina propria fanden sich auch

spindelförmige Zellen. Das Epithel zeigte sich einreihig isoprismatisch bis mehrreihig hochprismatisch mit zytoplasmatischer Vakuolisierung. In 9 von 12 Präparaten waren squamöse Metaplasien zu sehen. Die Zellkerne waren rund mit einigen prominenten Nucleoli, wobei sich die Kernstruktur sehr dicht zeigte. Die Basalmembran war durchgehend intakt. Die Mitoserate war gering (1/12).

ERα- und der ERβ-Agonist stufig kombiniert (s. Abb. 3.10):

Hier fanden sich ebenso eine Hypertrophie und Hyperplasie in allen Schichten und eine spindelförmige Zellansammlung entlang der Lamina propria. Wie auch in der kontinuierlichen Applikation der beiden Testsubstanzen fanden sich hier viele sehr große, zystische, einzeln stehende Drüsen (10/12) mit Sekretanhäufungen. Das Drüsenepithel war sowohl abgeflacht als auch mit pseudopapillären Proliferationen (5/12) besetzt. Das Lumenepithel reichte von isoprismatisch bis hochprismatisch mehrreihig oder mehrschichtig mit in fast allen Präparaten anzutreffenden squamösen Metaplasien (10/12). Die übrigen Zellkerne standen sehr weit auseinander, waren rund und unterschiedlich groß. Eine Vakuolenbildung war nur sehr gering vorhanden. Auch hier zeigte sich eine sehr scharfe Begrenzung zwischen Myometrium und Endometrium und auch die Schichtung des Myomtriums war sehr deutlich zu erkennen. Ebenso war die Basalmembran außerordentlich deutlich sichtbar und durchgehend intakt. Mitosen fanden sich in 5 von 12 Präparaten.

Sham-ovx Gruppe (s. Abb. 3.12):

In der sham-ovx Gruppe fanden sich bei allen Tieren eine Hypertrophie und Hyperplasie des Myometriums und Endometriums. Das Epithel war je nach zyklischem Zustand unterschiedlich hoch aufgebaut. Es reichte von isoprismatisch bis hochprismatisch, mit runden bis ovalen Kernen. Die Kernstruktur zeigte sich sowohl aufgelockert mit deutlichen Nucleoli als auch dicht gepackt. Ebenso war die Kernanordnung sowohl dicht als auch aufgelockert. Bei einigen Tieren zeigte sich eine starke Vakuolisierung. Die Basalmembran war durchgehend intakt.

Gruppe	Gewicht (g)	n =	epitheliale Mitosen	spindelförmige Zellen der Lamina propria	zystische Drüsen	squamöse Metaplasie	pseudopapilläre Drüsenepithel-proliferation
Kontrolle,ovx, sf	0,11±0,02	12	0/12	0/12 **	0/12	0/12	0/12
E2,ovx,sf	0,48±0,12	12	1/12	12/12 */**	3/12	7/12 */**	0/12
E2+Erβ,ovx,sf	0,44±0,11	12	2/12	12/12 */**	2/12	7/12 */**	1/12
Erα-+Erβ,ovx, sf	0,45±0,1	12	1/12	12/12 */**	12/12 */**	11/12 */**	8/12 */**
E2+ Erβ stufig, ovx,sf	0,49±0,1	12	1/12	12/12 */**	0/12	9/12 */**	0/12
Erα-+Erβ stufig,ovx,sf	0,54±0,11	12	5/12 *	12/12 */**	10/12 */**	10/12 */**	5/12 */**
sham,ovx,sf	0,5±0,14	6	1/6	2/6 *	0/6	0/6	0/6

n = Anzahl der Präparate

Tab. 3.1 **Zusammenfassung der histomorphologischen Ergebnisse im Uterus der ovx und substanzbehandelten Ratten**

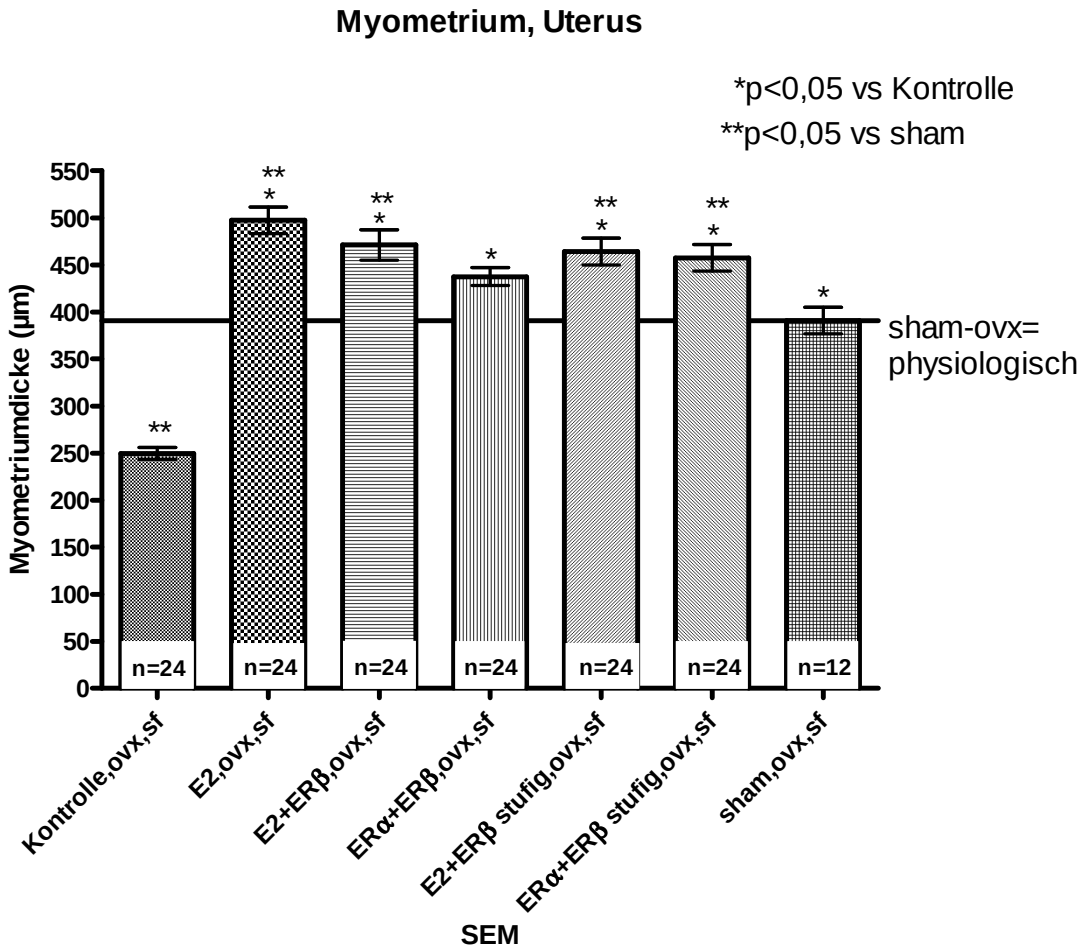
*p<0,05 vs Kontrolle; **p<0,05 vs sham

Erklärungen:

- spindelförmige Zellen der Lamin propria: als Zeichen der östrogenen Wirkung
- zystische Drüsen: als Reaktion auf östrogene Wirkungen
- squamöse Metaplasie: als Zeichen hyperöstrogener Wirkungen
- pseudopapilläre Drüsenepithelproliferation: als Zeichen einer einfachen Hyperplasie.

(Quellen: Haschek et Rousseaux (1991); Löning et al. (1999a/b); Fazleabas et Strakova (2002); Riede et al. (2004))

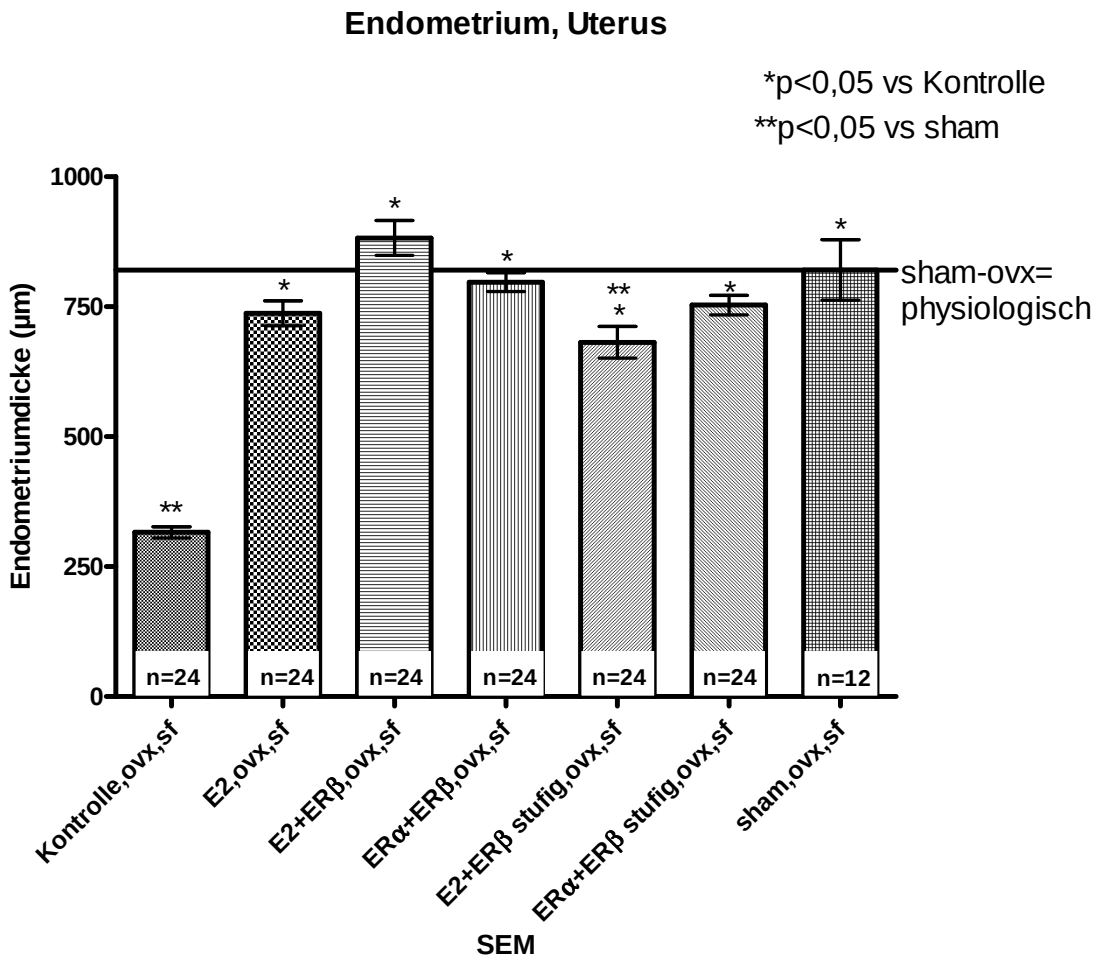
Zur Übersicht die statistische Auswertung der einzelnen Uterusschichten:



n = Anzahl der untersuchten Uruspräparate

Abb. 3.13 Durchschnittliche Myometriumdicke in den einzelnen Gruppen

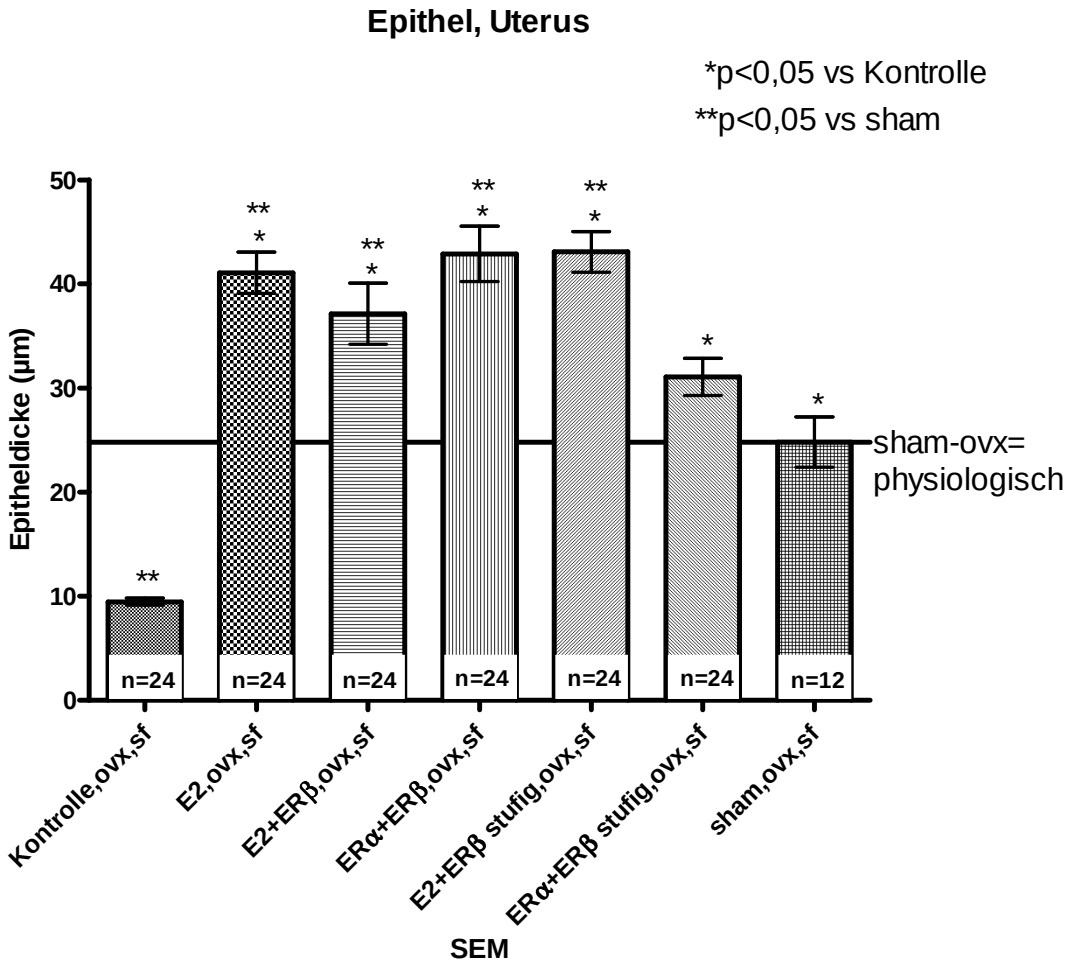
Es fand sich in allen Tiergruppen eine signifikante Erhöhung der Myometriumdicke im Vergleich zur Kontrollgruppe (249,7±30,31µm). In der Kontrollgruppe wiederum war die Myometriumdicke signifikant erniedrigt zur sham-ovx Gruppe (390,9±49,53µm). Bis auf die Gruppe, die eine kontinuierliche Kombination aus den ERα- und ERβ-Agonisten erhielt, zeigten alle substanzbehandelten Gruppen eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur sham-ovx Gruppe. Die stärkste Erhöhung fand sich in der E2-Gruppe (497,3±63,35µm).



n = Anzahl der untersuchten Uruspräparate

Abb. 3.14 Durchschnittliche Endometriumdicke in den einzelnen Gruppen

Auch in der Endometriumdicke fand sich in allen Tiergruppen eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe (316±49,99µm). Hier zeigte sich die stärkste Erhöhung in der Kombinationsgruppe E2 und ERβ-Agonist in 4-wöchiger Kombination (881,9±149,6µm). Die Kontrollgruppe und auch die Gruppe, die eine stufige Applikation von E2 und dem ERβ-Agonisten (681,1±136,4µm) erhielt, zeigten eine signifikante Erniedrigung zur sham-ovx Gruppe (820,3±202,1µm).



n = Anzahl der untersuchten Uruspräparate

Abb. 3.15 Durchschnittliche Epitheldicke in den einzelnen Gruppen

Wie auch schon bei der Myometriumdicke und der Endometriumdicke deutlich wurde, kam es auch in den Epitheldicken zu einer signifikanten Erhöhung in allen Tiergruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (9,48±1,5µm). Die niedrigste Stimulation unter den Testsubstanzen fand sich in der Gruppe, die die stufige Applikation des ERα- und ERβ-Agonisten erhielt (31,07±8,35µm). Zudem kam es zu einer signifikanten Epithelverdickung im Vergleich zur sham-ovx Gruppe (24,8±8,43µm) bei den Tiergruppen E2 (41,07±8,86µm), E2 + ERβ-Agonist 4 Wochen (37,13±13,07µm), ERα- + ERβ-Agonist 4 Wochen (42,88±12,48µm) und E2 + ERβ-Agonist stufig kombiniert (43,07±8,75µm).

3.4 Ergebnisse in der Vagina

Im physiologischen Zyklus beeinflusst Östrogen in der Vagina hauptsächlich die Anzahl der Epithelschichten und die luminale Verhornung.

Folgende Befunde wurden in den einzelnen Versuchsgruppen gefunden:

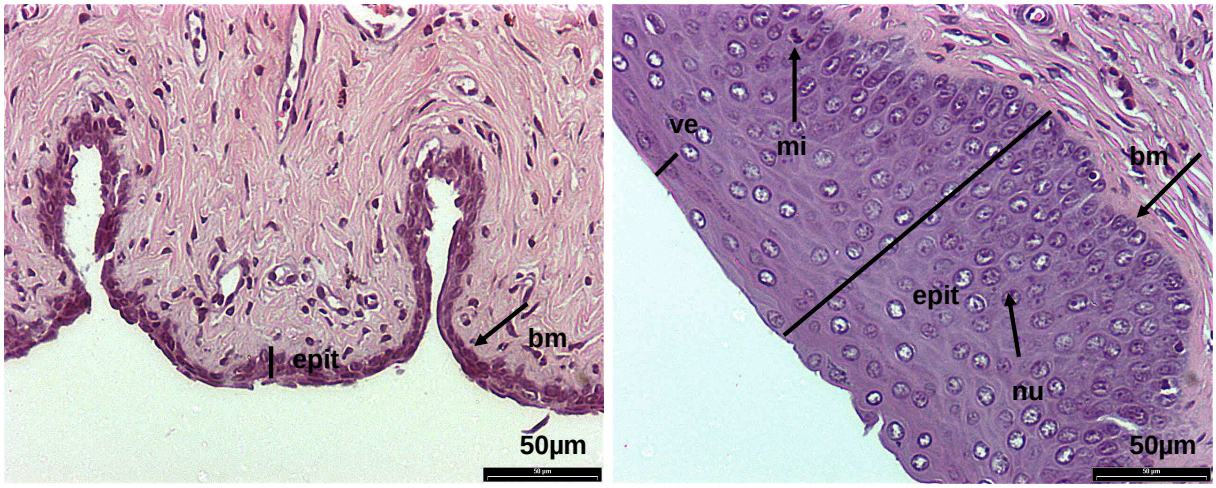


Abb. 3.16 Vaginalepithel; links: Kontrolle,ovx,sf, rechts: E2,ovx,sf

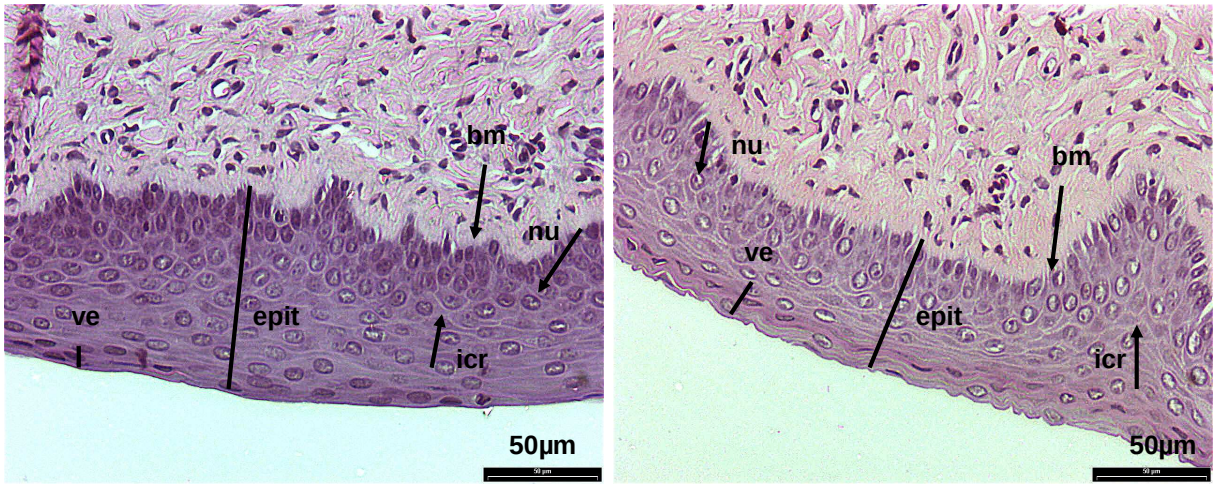


Abb. 3.17 Vaginalepithel; links: E2+ERβ,ovx,sf, rechts: ERα+ERβ,ovx,sf

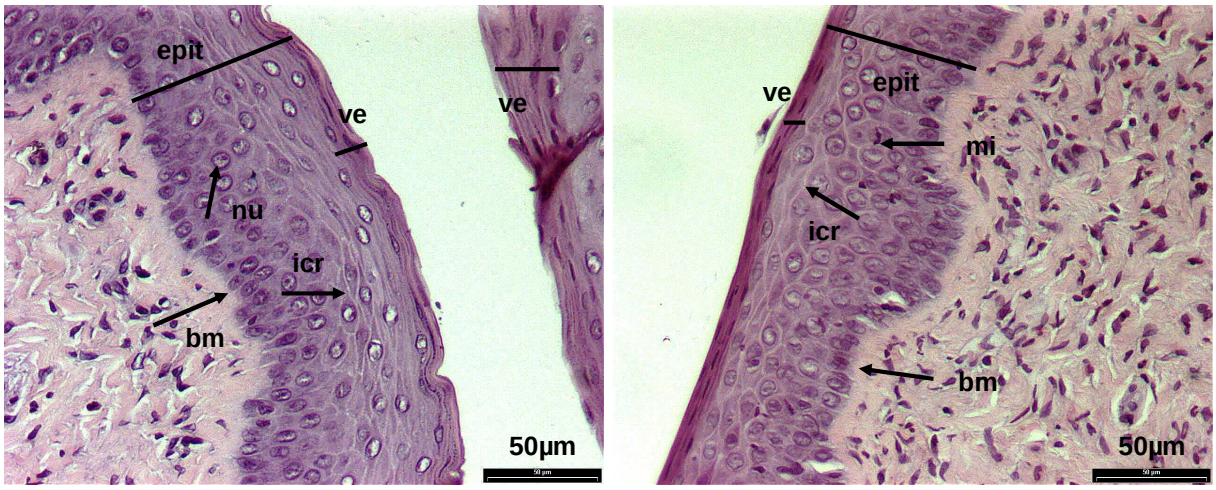


Abb. 3.18 Vaginalepithel; links: E2+ERβ stufig,ovx,sf, rechts: ERα+ERβ stufig,ovx,sf

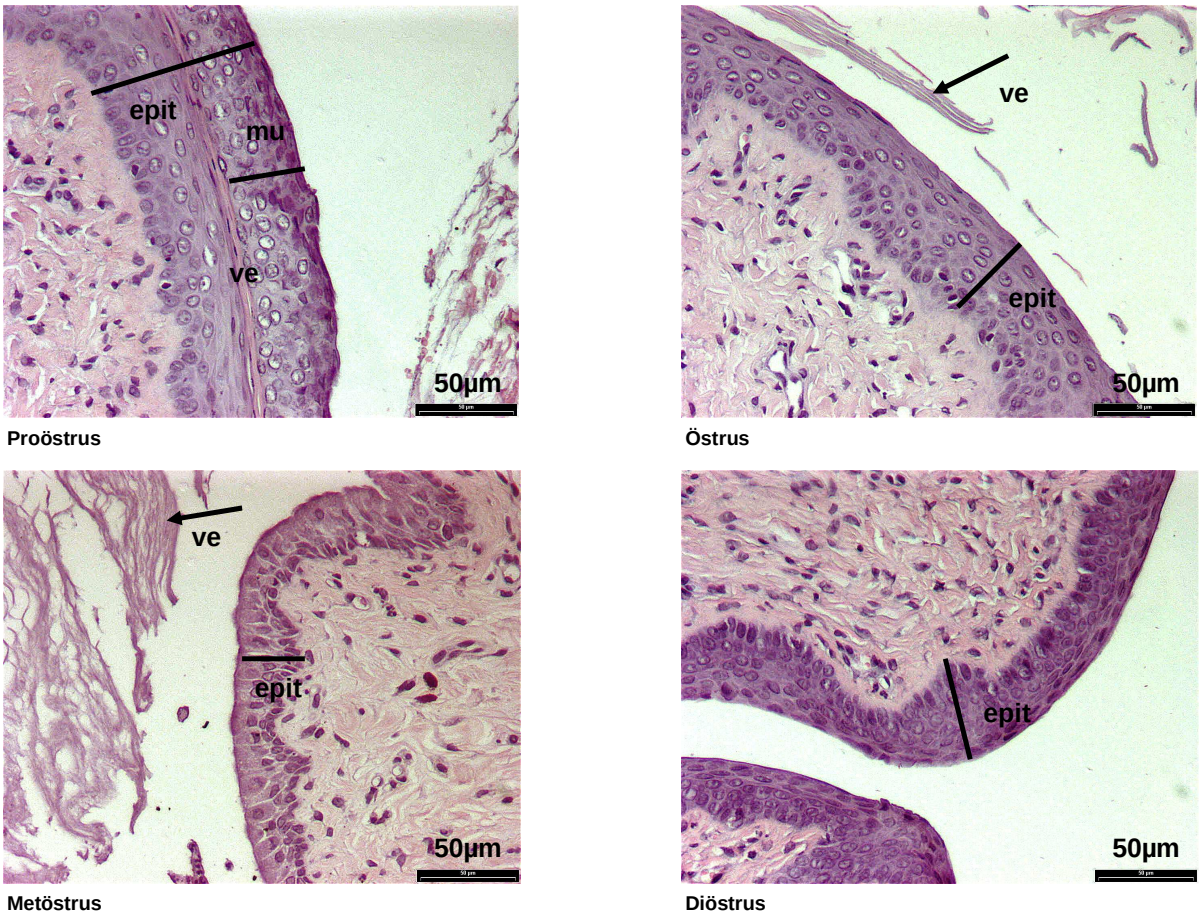


Abb. 3.19 Vaginalepithel; sham,ovx,sf

n (Anzahl der untersuchten Vaginapräparate bezüglich Dickemessungen) = 156 gesamt

Kontrolle,ovx,sf: n = 24 ; E2,ovx,sf: n = 24 ; E2+ERβ,ovx,sf: n = 24 ; ERα+ERβ,ovx,sf: n = 24 ; E2+ERβ stufig,ovx,sf: n = 24 ; ERα+ERβ stufig,ovx,sf: n = 24 ; sham,ovx,sf: n = 12

Erklärungen der Abkürzungen:

epit: Epithel, **bm:** Basalmembran, **mi:** Mitose, **ve:** verhorntes Epithel, **icr:** Interzellularraum, **nu:** balloniertes Epithel mit prominentem Nucleolus, **mu:** muzinöse oberflächliche Schicht

Kontrolle (s. Abb. 3.16 links):

Das Vaginalepithel war atrophisch mit 1-3 Zellschichten. Die Zellen erschienen klein. Luminal gab es keine Verhornung. Die Basalmembran war durchgehend intakt. Mitosen fanden sich keine.

Östradiol (s. Abb. 3.16 rechts):

Unter Östradiol kam es zu einer starken Hypertrophie und Hyperplasie des Vaginalepithels. Es fanden sich 10-15 Zellschichten und eine Verhornung der luminalen Epithelschichten. Die Kerne waren in den basalen Schichten dicht angeordnet und zeigten dort Mitosen (7/12). In den folgenden Schichten erschienen die Zellkerne ballonartig aufgelockert und gelichtet mit prominenten Nucleoli. Die Basalmembran war durchgehend intakt.

Östradiol und der ERβ-Agonist 4 Wochen in Kombination (s. Abb. 3.17 links):

Auch hier kam es zu einer Hypertrophie und Hyperplasie im Epithel mit 10-12 Zellschichten. Luminal war eine Verhornung des Epithels zu finden. Die Kerne lagen basal nicht sehr dicht gepackt und gut voneinander abgrenzbar. Die Interzellularräume waren bei einigen Tieren ödematös geweitet. Vereinzelt zeigten sich vakuolisierte Zellkerne mit deutlich erkennbarem Nucleolus. Die Basalmembran war durchgehend intakt. Mitosen waren nicht zu beobachten.

ERα- und der ERβ-Agonist 4 Wochen in Kombination (s. Abb. 3.17 rechts):

Hier fanden sich ebenso eine Hypertrophie und Hyperplasie im Vaginalepithel mit 8-10 Schichten. In den luminalen Schichten kam es zu einer Verhornung. Bereits in den basalen Schichten erschienen die Zellkerne balloniert und waren deutlich voneinander abgrenzbar. Auch in den folgenden Schichten zeigten sich die Kerne balloniert, unregelmäßig groß und mit prominenten Nucleoli. In allen Präparaten erschienen die Interzellularräume ödematös geweitet. Die Basalmembran war durchgehend intakt. Mitosen waren in 3 von 12 Präparaten vorhanden.

Östradiol und der ERβ-Agonist stufig kombiniert (s. Abb. 3.18 links):

Ebenfalls in der Stufenapplikation der beiden Substanzen kam es zu einer Hypertrophie und Hyperplasie des Epithels in der Vagina mit 10-13 Zellschichten. Auch hier war das luminale Epithel verhornt. Die Interzellularräume zeigten sich ödematös geweitet und die Kerne balloniert mit prominenten Nucleoli. In den basalen Schichten lagen die Kerne dicht und vereinzelt fanden sich Mitosen (5/12). Die Basalmembran war durchgehend intakt.

ERα- und der ERβ-Agonist stufig kombiniert (s. Abb. 3.18 rechts):

Es fanden sich eine Hypertrophie und Hyperplasie des Vaginalepithels mit 6-10 Schichten. Die luminalen Schichten waren stark verhornt. Das Epithel und die Interzellularräume erschienen in allen Präparaten ödematös gequollen. Die Zellkerne in den luminalen Schichten waren stark balloniert mit prominenten Nucleoli zu beobachten. Die basalen Zellkerne lagen nicht sehr dicht und zeigten vereinzelte Mitosen (4/12). Die Basalmambran war durchgehend intakt.

Sham-ovx Gruppe (s. Abb. 3.19):

Durchschnittlich zeigte sich eine Verdickung des Vaginalepithels, jedoch befanden sich die einzelnen Tiere in unterschiedlichen Zyklen. In der *proöstrischen Phase* war das Epithel dick und bestand aus 8-13 Schichten. Das oberflächliche Schicht zeigte muzinöse Umwandlungen. Die Tiere, die sich im *Östrus* befanden, zeigten 6-10 Epithelschichten und eine oberflächlich verhornte Schicht, die zum Teil ins Lumen abgestoßen wurde. Im *Metöstrus* zeigte sich ein dünnes Epithel mit ins Lumen abgestoßenen verhornten Schichten. In der *diöstrischen Phase* bestand das Epithel aus 8-9 Schichten und die Zellen präsentierten sich in den oberen Schichten polygonal bis rund.

		Zelllagen					
Gruppe	**n=**	**1-5**	**>5 bis <10**	**≥10**	**Verhornung**	**Mitosen**	**interzelluläres Ödem**
Kontrolle,ovx, sf	12	12/12	0/12	0/12	0/12	0/12	-
E2,ovx,sf	12	0/12	0/12	12/12	12/12	7/12 *	+
E2+Erβ,ovx,sf	12	0/12	0/12	12/12	12/12	0/12	+
Erα+Erβ,ovx,sf	12	0/12	12/12	0/12	12/12	3/12	++
E2+Erβ stufig,ovx,sf	12	0/12	0/12	12/12	12/12	5/12	++
ERα+Erβ stufig,ovx,sf	12	0/12	12/12	0/12	12/12	4/12	++
sham,ovx,sf	6	Abhängig vom jeweiligen Zyklusstand: Proöstrus 1/6 - Östrus 1/6 - Metöstrus 2/6 - Diöstrus 2/6			6/6	2/6	+

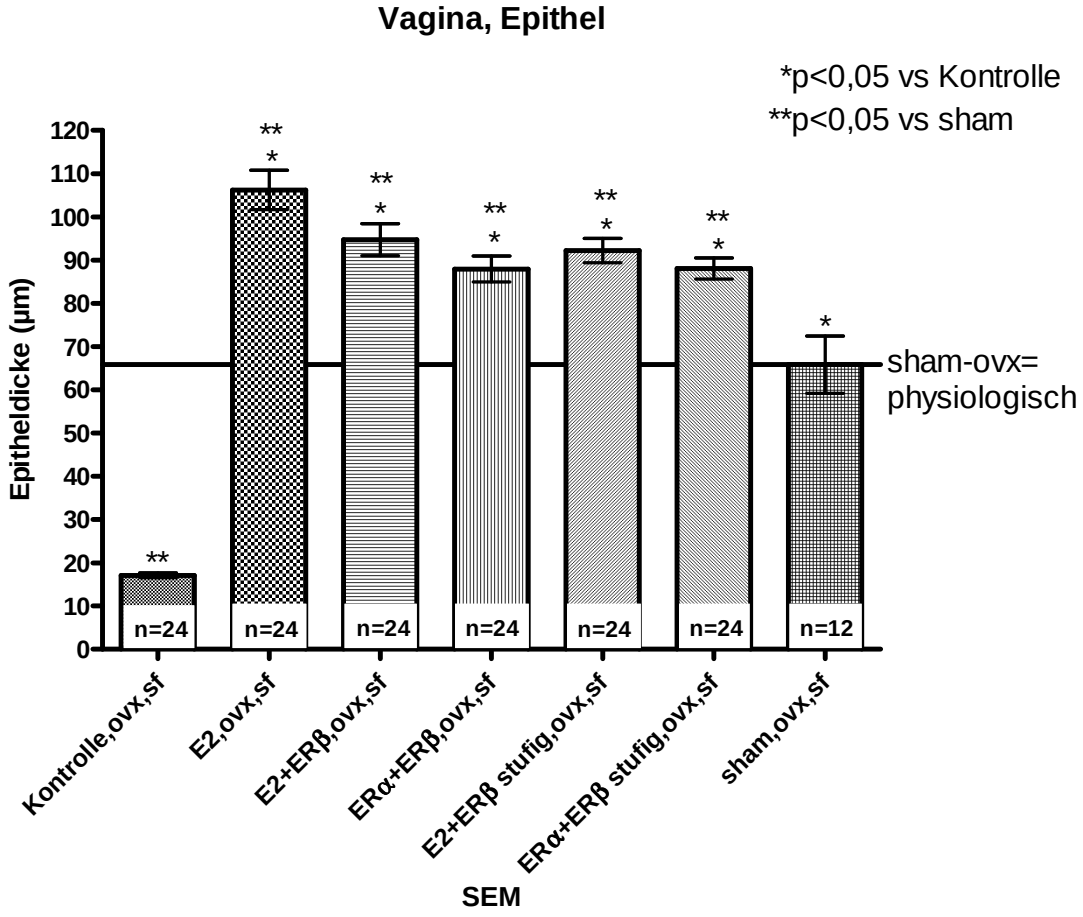
n = Anzahl der Präparate

Tab. 3.2 **Zusammenfassung der histomorphologischen Ergebnisse in der Vagina der ovx und substanzbehandelten Ratten** (Erklärung: - kein Effekt, + Effekt, ++ starker Effekt)

*p<0,05 vs Kontolle; **p<0,05 vs sham

Quellen zur Beurteilung: Haschek et Rousseaux (1991); Maeda et al. (2000)

Zur Übersicht die statistische Auswertung der Epitheldicken der verschiedenen Gruppen:



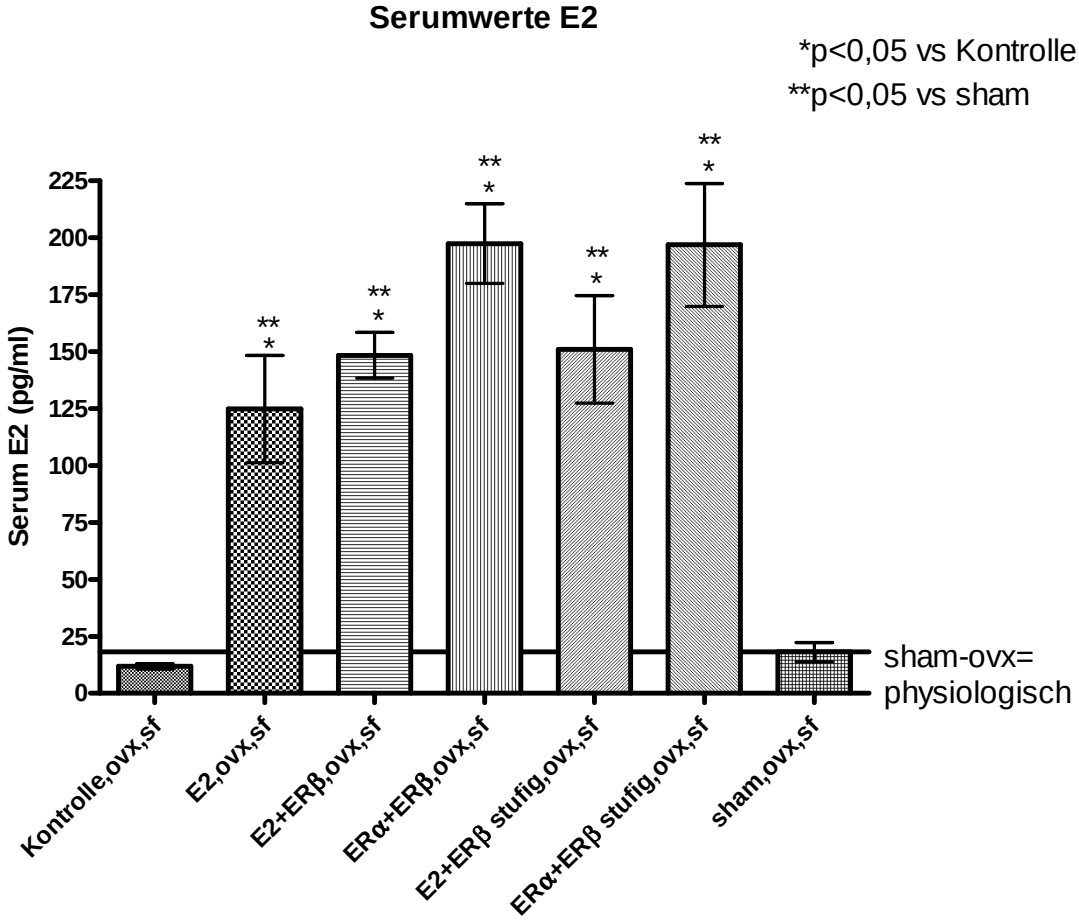
n = Anzahl der untersuchten Vaginapräparate

Abb. 3.20 Durchschnittliche Epitheldicke der Vaginae

Es zeigte sich deutlich ein signifikanter Stimulationseffekt auf das vaginale Epithel durch die verabreichten Testsubstanzen bzw. in der sham-ovx Gruppe (65,82±22,92µm) im Vergleich zur Kontrollgruppe (17,08±2,51µm). Diese zeigte eine signifikant niedrigere Epitheldicke als die sham-ovx Gruppe. Die Testsubstanzgruppen wiederum zeigten eine signifikante Erhöhung der Epitheldicken im Vergleich zu sham-ovx Gruppe. Hierbei war die Stimulation durch E2 am stärksten (106,3±20,47µm). Der Vergleich der Stimulationseffekte durch die Kombinationen der Testsubstanzen untereinander präsentierte keine nennenswerten Unterschiede.

3.5 Hormonwerte im Serum

3.5.1 Östradiol



SEM

n = Anzahl der Tiere

Kontrolle,ovx,sf: n = 12 ; E2,ovx,sf: n = 12 ; E2+ERβ,ovx,sf: n = 12 ; ERα+ERβ,ovx,sf: n = 12 ;

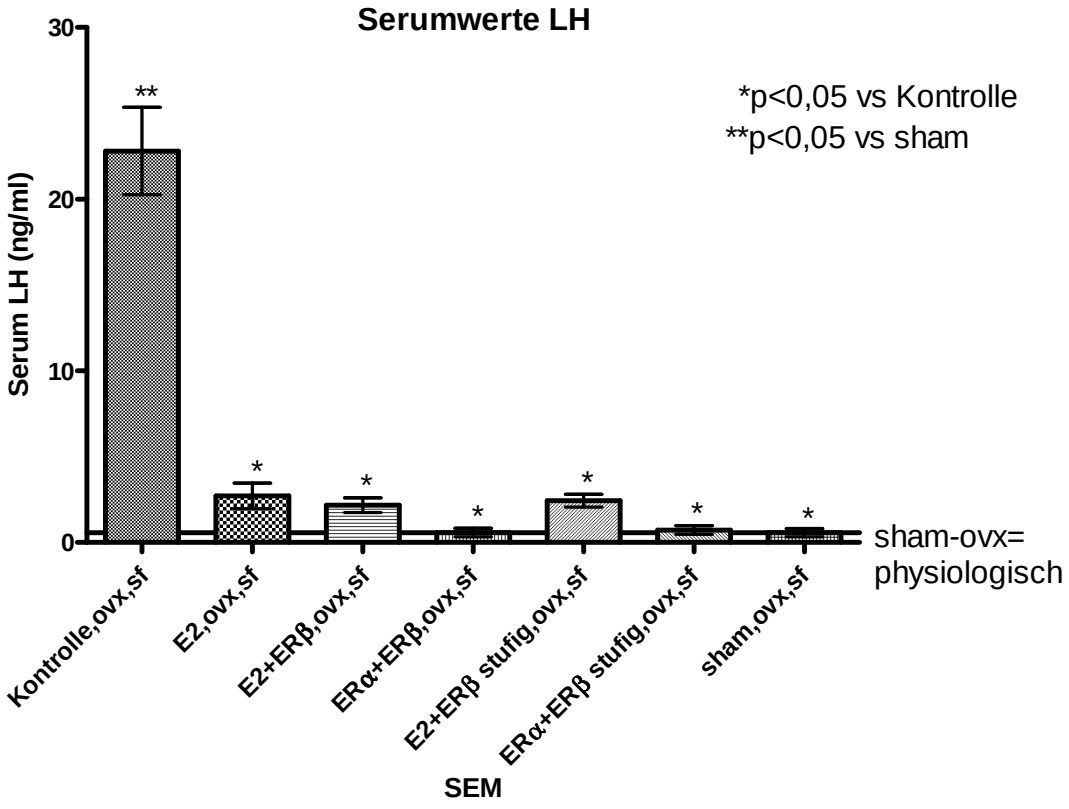
E2+ERβ stufig,ovx,sf: n = 12 ; ERα+ERβ stufig,ovx,sf: n = 12 ; sham,ovx,sf: n = 6

Abb. 3.21 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den Östradiolspiegel im Serum der Ratten

Mit der radioimmunologischen Messung im Serum wurde untersucht, in welcher Höhe sich die subkutan resorbierten Testsubstanzen nach 4-wöchiger Applikation im Serum der Ratten widerspiegeln.

Sowohl die mit E2 behandelte Gruppe als auch die in Kombination mit E2 und dem ERβ-Agonisten bzw. dem ERα- und ERβ-Agonisten behandelten Gruppen zeigten eine signifikante Erhöhung des Serumöstradiolspiegels verglichen mit der Kontroll- und sham-ovx Gruppe (11,82±3,99pg/ml bzw. 18,16±9,45pg/ml). Die mit den ERα- und ERβ-Agonisten behandelten Gruppen wiesen einen höheren Östradiolspiegel (197,3±57,97pg/ml kontinuierlich; 196,8±89,53pg/ml stufig) auf als die Kombinationsgruppen mit E2 und dem ERβ-Agonisten (148,4±31,60pg/ml kontinuierlich; 151,0±74,52pg/ml stufig). Auch die sham-ovx Gruppe präsentierte höhere Werte als die Kontrollgruppe, doch waren diese nicht signifikant.

3.5.2 Luteinisierendes Hormon (LH)



n = Anzahl der Tiere

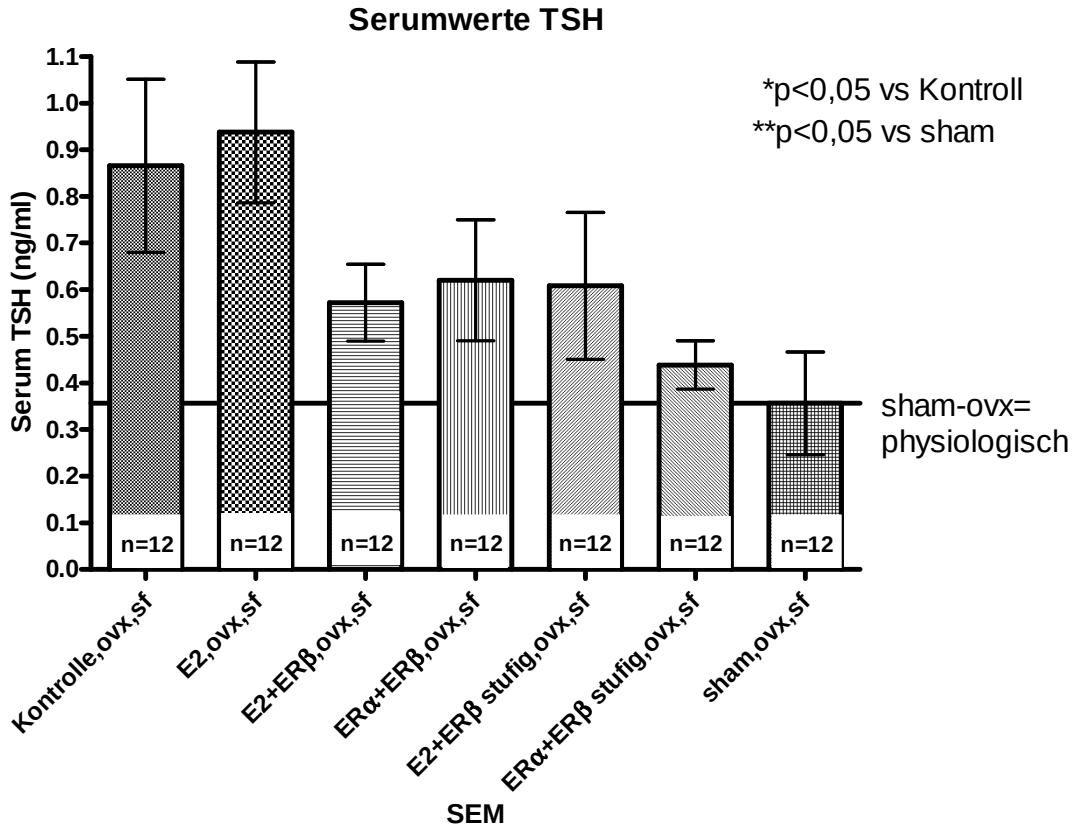
Kontrolle,ovx,sf: n = 12 ; E2,ovx,sf: n = 12 ; E2+ERβ,ovx,sf: n = 12 ; ERα+ERβ,ovx,sf: n = 12 ;

E2+ERβ stufig,ovx,sf: n = 12 ; ERα+ERβ stufig,ovx,sf: n = 12 ; sham,ovx,sf: n = 6

Abb. 3.22 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den LH-Spiegel im Serum der Ratten

Sowohl die mit E2 (2,72±2,21ng/ml) als auch die mit den Kombinationen E2 und dem ERβ-Agonisten (2,18±1,33ng/ml kontinuierlich; 2,44±1,14ng/ml stufig) bzw. dem ERα- und ERβ-Agonisten (0,58±0,84ng/ml kontinuierlich; 0,73±0,70ng/ml stufig) behandelten Tiere und die sham-ovx Gruppe (0,57±0,60ng/ml) zeigten signifikant niedrigere LH-Spiegel im Serum als die Kontrollgruppe (22,79±8,42ng/ml).

3.5.3 Thyreoidea-Stimulierendes Hormon (TSH)



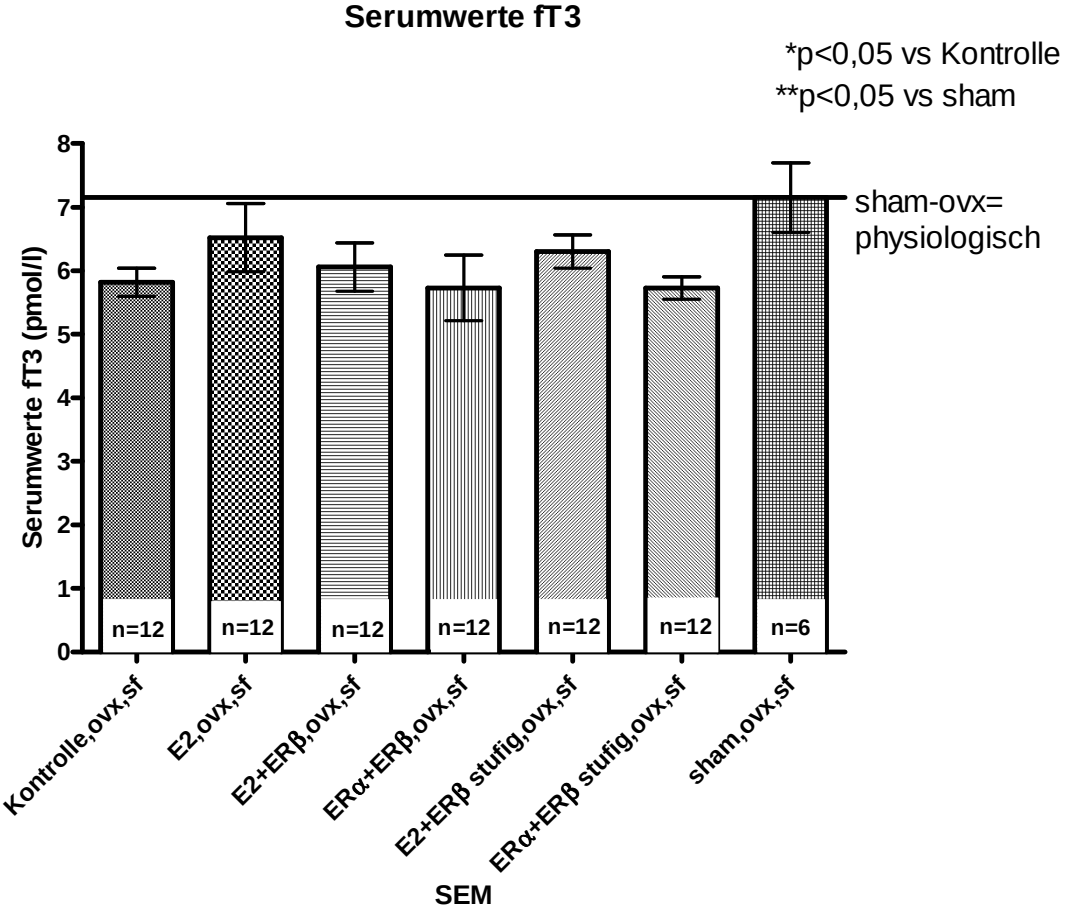
n = Anzahl der Tiere

Abb. 3.23 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den TSH-Spiegel im Serum der Ratten

Die TSH-Spiegel im Serum wurden durch keine der Testsubstanzen signifikant beeinflusst, doch kam es zur stärksten Erhöhung unter E2 (0,94±0,45ng/ml) und zu einer Erniedrigung unter den Kombinationen von E2 und dem ERβ-Agonisten bzw. dem ERα- und ERβ-Agonisten. Der physiologische Serumspiegel der sham-ovx

Gruppe war mit 0,36±0,25ng/ml der niedrigste aller Gruppen. Der Spiegel der Kontrollgruppe lag bei 0,87±0,62ng/ml.

3.5.4 Freies Trijodthyronin (fT3)

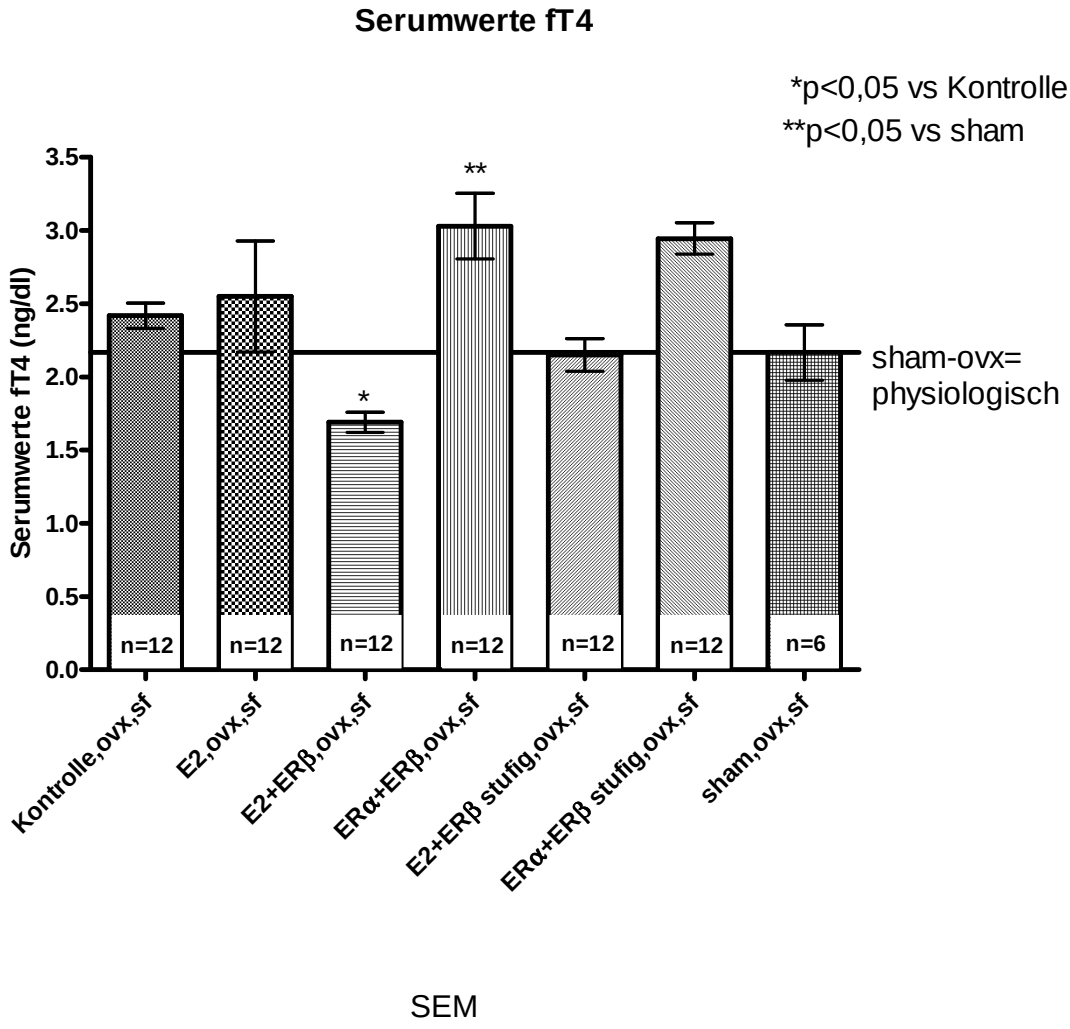


n = Anzahl der Tiere

Abb. 3.24 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den fT3-Spiegel im Serum der Ratten

Der Serumspiegel an freiem T3 war in keiner der Gruppen signifikant verändert. Doch wiesen alle Gruppen einen niedrigeren Spiegel als die sham-ovx Gruppe (7,15±1,34pmol/l) auf.

3.5.5 Freies Thyroxin (fT4)



n = Anzahl der Tiere

Abb. 3.25 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den fT4-Spiegel im Serum der Ratten

Der Serumspiegel von freiem T4 zeigte in der Gruppe, die kontinuierlich mit E2 und dem ERβ-Agonisten (1,69±0,22ng/dl) behandelt wurde, eine signifikante Erniedrigung verglichen zur Kontrollgruppe und die Gruppe, die kontinuierlich mit dem ERα- und ERβ-Agonisten (3,03±0,71ng/dl) behandelt wurde, eine signifikante Erhöhung der Serumwerte im Vergleich zur sham-ovx Gruppe (2,17±0,46ng/dl). In den zeitlich versetzt mit den Testsubstanzen behandelten Gruppen, sah die Tendenz ähnlich aus, jedoch waren hier die Veränderungen nicht signifikant. Die zeitlich

versetzte Kombination von E2 und dem ERβ-Agonisten (2,15±0,35ng/dl) präsentierte der sham-ovx Gruppe vergleichbare Werte.

4 Diskussion

4.1 Zielsetzung

Aufgrund der durch die *Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study* (HERS) und der durch die *Women's-Health-Initiative* (WHI)-Studie beschriebenen Risikoerhöhungen für u. a. Mammakarzinome und kardiovaskuläre Erkrankungen durch die klassische HRT wird die Suche nach immer selektiveren Therapeutika groß geschrieben. Durch die Entdeckung der selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) mit gewebespezifischen östrogenen und anti-östrogenen Wirkungen war man diesem Ziel schon näher gekommen. Jedoch besitzen die bis heute pharmakologisch einsetzbaren SERMs sowohl positive, erwünschte als auch unerwünschte Effekte der Hormontherapie mit Östrogenen.

Mit der Entdeckung des zweiten Östrogenrezeptors β im Jahre 1996 stellte sich fortan die Frage, welche genaue Wirkung er besitzt bzw. inwiefern man sich die neu gewonnenen Erkenntnisse im Hinblick auf selektive pharmakologische Wirkungen zu Nutze machen kann.

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob die langzeitliche, kontinuierliche Substitution eines selektiven ERβ-Agonisten zu jeweils Östradiol und einem selektiven ERα-Agonisten einen modulierenden Effekt auf die durch Östradiol bzw. den ERα-Agonisten hervorgerufenen Effekte hat. In dieser Studie haben wir anhand des Modells der ovx Ratte die Effekte auf das Körpergewicht, die Futteraufnahme, den Uterus, die Vagina und den Hormonstatus studiert.

Zusätzlich galt es herauszufinden, ob sich eine zeitversetzte Substitution des ERβ-Agonisten zu jeweils Östradiol und dem ERα-Agonisten in einer anderen Weise an bereits oben genannten Organ- und Hormonsystemen niederschlägt oder sich gar eine Notwendigkeit der Vorbehandlung mit E2 oder dem ERα-Agonisten zur Wirkfähigkeit des ERβ-Agonisten zeigt.

Des Weiteren wurden die Effekte mit den physiologischen Verhältnissen einer intakten Gruppe verglichen.

Hierbei ist es u. a. von Interesse, ob sich die gewonnenen Resultate mit den Erwartungen, die man nach der „Gustafsson'schen Yin-Yang-Theorie“ hat (s. 1.8.4 auf S. 9), decken.

Zur Testung dieser Wirkungen wurden die Messungen der Uterusgewichte, die histologische Aufarbeitung des Uterus und der Vagina sowie die radioimmunologisch gemessenen Serumwerte an Östradiol, LH, TSH, fT3 und fT4 verwendet.

Östradiol diente als positive Kontrolle für die Ergebnisse der Versuchsreihen.

Eine intakte, nicht ovarektomierte Gruppe von Ratten galt als physiologische Referenz.

Am Uterus wäre eine antagonisierende oder modulierende Wirkung des substituierten ERβ-Agonisten auf die von Östradiol und dem ERα-Agonisten hervorgerufenen Effekte wünschenswert, um den in der Menopause auftretenden Endometriumhyperplasien und der daraus resultierenden Gefahr der Entwicklung eines Endometriumkarzinoms entgegenzuwirken.

An der Vagina hingegen wäre eine antagonisierende Wirkung weniger wünschenswert, da dies keine Linderung der durch die Menopause hervorgerufenen Beschwerden erbringen würde.

Ebenso wäre für die Futteraufnahme, das Körpergewicht und das Hormonsystem ein hemmender Effekt weniger wünschenswert.

Die Ergebnisse liefern weitere Daten über die in-vivo-Wirkung des erst später entdeckten und in seiner Bedeutung noch nicht vollständig verstandenen Östrogenrezeptors β und geben damit einen Ausblick auf die eventuelle therapeutische Verwendbarkeit von selektiven Östrogerezeptoragonisten.

4.2 Wirkungen auf die Futteraufnahme und das Körpergewicht

Ovarektomierte Nagetiere nehmen innerhalb kürzester Zeit stark an Gewicht zu, präsentieren eine abnehmende motorische Aktivität und eine einsetzende Hyperphagie (Shimomura et al. 2002). Direkte Effekte von Östrogen auf die Hypothalamus-Hypophysen-Achse und somit auf die Expression von Neuropeptiden,

die für die Nahrungsaufnahme regulierend wirken (wie z. B. Neuropeptid Y, *Corticotropin-releasing-hormone*), können diese Effekte teilweise erklären.

Da im weiblichen Fettgewebe auch der ERβ anzufinden ist und diesem östrogenvermittelte, antiproliferative und prodifferenzierende Effekte zugeschrieben werden (Dieudonné et al. 2004), ist diese Aussage für die vorliegende Studie relevant.

Die Tiere wurden mit sojafreiem Futter versorgt, um jeden östrogenen Umwelteinfluss zu minimalisieren. Bu et al. (2005) zeigten, dass die üblicherweise verwendeten Rattenfutter Soja enthalten und einen Einfluss auf den Rattenmetabolismus haben. Sie führen u. a. zu einer Gewichtsabnahme und zu einer sinkenden Fetteinlagerung.

Im Rahmen dieser Arbeit war die ungefähre, durchschnittliche Futteraufnahme (s. Abb. 3.1 auf S. 28) der mit E2 und den Östrogenrezeptoragonisten behandelten Tiere niedriger als die der Kontrolltiere. Jedoch war nur die Futteraufnahme der mit ERα und ERβ in Kombination behandelten Tiere signifikant erniedrigt zur Kontrollgruppe und entsprach ungefähr der physiologischen Futteraufnahme durch die sham-ovx Gruppe.

Roesch (2006) zeigte, dass die Futteraufnahme durch Östradiol und den selektiven ERα-Agonisten PPT (4,4',4"-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl)trisphenol) signifikant reduziert wird. Der selektive ERβ-Agonist DPN (2,3-bis(4-hydorxyphenyl)-propionitrile) hatte hingegen keinen Effekt. Asarian et Geary (2006) schrieben neuronalen ERα appetitsenkende Eigenschaften zu.

Die Ergebnisse dieser Arbeit widersprechen der Annahme, dass die gleichzeitige Aktivierung des ERβ einen hemmenden Einfluss auf die vom ERα hervorgerufenen Wirkungen auf die Futteraufnahme hat, sei es in der durchgängig gleichzeitigen Aktivierung oder in der zeitversetzt zusätzlichen Aktivierung des ERβ.

Ebenso waren die Körpergewichte (s. Abb. 3.2 auf S. 29) der mit E2 und den Östrogenrezeptoragonisten behandelten Tiere sowie die der sham-ovx Gruppe signifikant erniedrigt zu den Körpergewichten der Kontrollgruppe. Die Körpergewichte der Kontrollgruppe waren signifikant höher als in der sham-ovx Gruppe. Alle Körpergewichte der substanzbehandelten Gruppen bewegten sich in dem Bereich der physiologischen sham-ovx Gruppe. Diese Gruppe hatte einen Wert, der

vergleichbar ist mit dem präovarektomiert gemessenen mittleren Körpergewicht aller Tiere. Wie weiter oben bei der Futteraufnahme geschildert, beschreibt Roesch (2006) den gleichen Effekt von Östradiol und dem ERα-Agonisten auf das Körpergewicht. Unter beiden Substanzen kommt es zu keiner ovx-induzierten Gewichtszunahme. Der ERβ-Agonist hat hier ebenso keinen hemmenden Effekt ausgelöst. Seidlová-Wuttke et al. (2008) zeigten an Untersuchungen mit den gleichen selektiven Östrogenrezeptoragonisten, die in der vorliegenden Studie verwendet wurden, sprich 16alpha-LE2 und 8beta-VE2, dass die alleinige Verabreichung des ERα-Agonisten zu keiner Gewichtszunahme führte. Die alleinige Verabreichung des ERβ-Agonisten führte jedoch nur in sehr hohen Dosen (100µg/Tier/Tag) zu einer verminderten Gewichtszunahme. Dieser Effekt kann mit der in hohen Dosen auftretenden geringen Wirkung auf den ERα erklärt werden.

Auch bei der Betrachtung des Körpergewichts widersprechen die Ergebnisse dieser Studie der Annahme, dass die Aktivierung des ERβ einen hemmenden Effekt auf die vom ERα hervorgerufenen Wirkungen hat. Auch hier spielt die Zeit der Kombination keine Rolle.

Warum es nicht unter allen substanzbehandelten Gruppen, insbesondere der Östradiolgruppe, zu einer signifikanten Abnahme der Futteraufnahme, verglichen mit der ovarektomierten Kontrollgruppe, kam, kann durch andere Wirkungen erklärt werden. Unter östogenem Einfluss kommt es zu einer gesteigerten motorischen Aktivität und daraus lässt sich folglich ein erhöhter Kalorienbedarf ableiten (Shimomura et al. 2002; Gorzek et al. 2007). Zusätzlich sind die inhibitorischen Wirkungen auf die Aktivität der Lipoprotein-Lipase (LPL), die für die Fettaufnahme in die Adipozyten zuständig ist, die katabolen Wirkungen auf die Fettoxidation im Muskelgewebe und die verstärkte Lipolyse in Adipozyten zu nennen (Pedersen et al. 2004; D'Eon et al. 2005). Diese Aussage wird durch das Ergebnis der Körpergewichte unterstützt. Hier stellte sich in allen Gruppen, außer der Kontrollgruppe, ein signifikant niedrigeres Gewicht ein. So scheint es zu einer von der Futteraufnahme unabhängigen verminderten Gewichtszunahme zu kommen. Ergänzend lässt sich noch hinzufügen, dass die Futteraufnahme der Östradiolgruppe optimal reguliert war und sich im Rahmen der physiologischen Futteraufnahme von 13-18g/Tier/Tag befand.

Die Verabreichung des ERα-Agonisten in Kombination mit dem ERβ-Agonisten hatte die stärksten reduzierenden Effekte auf die Futteraufnahme. Die Wirkungen von

Östradiol, isoliert oder in Kombination mit dem ERβ-Agonisten, waren geringer und können sich durch eine niedrigere Dosierung (1µg/Tier/Tag) als die des ERα-Agonisten (50µg/Tier/Tag) erklären lassen. Dass die zusätzliche Wirkung von Östradiol auf den ERβ Grund für die minimal geringere Wirkung auf die Futteraufnahme verantwortlich ist, ist unwahrscheinlich, da die Kombination mit dem selektiven ERβ-Agonisten eine stärkere Wirkung erzielte, als Östradiol allein. Die hier verwendete Dosis des ERβ-Agonisten von 50 µg/Tier/Tag liegt jedoch zwischen den bisher untersuchten Dosierungen von 10 und 100µg/Tier/Tag und könnte somit schon geringe zusätzliche Wirkungen auf den ERα hervorrufen und folglich die Effekte verstärken.

Zusammenfassend lässt sich für die Futteraufnahme und das Körpergewicht sagen, dass es unter der zusätzlichen Stimulation des ERβ zu keiner modulierenden oder hemmenden Antwort kommt. Die „Yin-Yang“-Theorie wird hiermit also nicht bestätigt. Dieses Ergebnis macht auch deutlich, dass im Falle einer therapeutischen Verwendung des ERβ-Agonisten in Kombination mit E2 oder dem ERα-Agonisten mit keiner unerwünschten Gewichtszunahme zu rechnen ist. Die alleinige Verabreichung führt hingegen zu einer Zunahme der Futteraufnahme und des Körpergewichtes.

4.3 Wirkungen auf den Uterus

Östrogene wirken auf den Uterus wachstumsfördernd. Die im Zuge des Klimakteriums vermehrt auftretenden Endometriumhyperplasien, bedingt durch das Fehlen der progesteronabhängigen Transformation, bergen ein erhöhtes Risiko, an einem Endometriumkarzinom zu erkranken.

Die gleichzeitige Exprimierung des ERα und ERβ im Uterus bietet gute Voraussetzungen zur Untersuchung der in dieser Studie untersuchten selektiven ER-Agonisten.

Das primär gemessene Uterusgewicht lieferte erste Aussagen über eventuelle proliferative Wirkungen der verabreichten Substanzen. Anschließend wurden die Schichten der Uteri, sprich Myometrium, Endometrium und Epithel, histologisch untersucht und die einzelnen Schichtdicken statistisch ausgewertet.

4.3.1 Uterusgewicht

Wie zu erwarten, lagen die Uterusfeuchtgewichte der Kontrollgruppe signifikant unter denen der Östradiol- und sham-ovx Gruppe (s. Abb. 3.3 auf S. 30).

Hegele-Hartung et al. (2004) zeigten an hypophysektomierten, juvenilen und GnRH-antagonisierten Ratten, dass sowohl Östradiol als auch der selektive ERα-Agonist 16α-LE2 in allen untersuchten Dosen (0,01, 0,1 und 1 µg/Tier) einen stimulierenden Effekt auf das Uterusfeuchtgewicht haben. Die Effekte unterschieden sich nicht zwischen den beiden Gruppen. Der selektive ERβ-Agonist 8β-VE2 hatte wiederum in diesen Gruppen erst ab einer Dosierung von 0,1 mg/Tier einen stimulierenden Effekt. An intakten, adulten Ratten zeigten sie, dass Östradiol und 16α-LE2 eine dosisabhängige Erhöhung des Uterustrockengewichtes erbrachten (E2 ab 1 µg und 16α-LE2 ab 10 µg/Tier). 8β-VE2 hatte hier hingegen in keiner Dosierung einen stimulierenden Effekt.

Hillisch et al. (2004) beschrieben mit den gleichen Substanzen ähnliche Ergebnisse.

E2 und der ERα-Agonist hatten in allen Dosierungen einen vergleichbaren stimulierenden Effekt auf das Uterusfeuchtgewicht. Der ERβ-Agonist zeigte erst ab 100 µg/Tier/Tag stimulatorische Wirkungen. Als Grund für letztgenannten Effekt werden Residualeffekte auf den ERα genannt.

Interessanterweise wurde im Rahmen dieser Studie beobachtet, dass die gleichzeitige Verabreichung des ERβ-Agonisten zu E2 bzw. dem ERα-Agonisten, eine dem Östradiol vergleichbare Wirkung auf das Uterusfeuchtgewicht hervorruft. Die Argumentation, dass der ERβ einen hemmenden oder modulierenden Effekt auf die Wirkungen des ERα hat (Gustafsson'sche Yin-Yang-Theorie), kann in diesem Falle nicht unterstützt werden. Ähnliche Ergebnisse stellten Hillisch et al. (2004) fest. Auch dort zeigte die gleichzeitige Verabreichung des ERβ-Agonisten zum ERα-Agonisten keinen antagonisierenden Effekt auf das Uterusgewicht. Die hier untersuchte zeitversetzt kurzzeitige Kombination führte ebenso zu keinem hemmenden oder modulierenden Effekt durch den ERβ-Agonisten auf das Uterusgewicht.

4.3.2 Uterushistologie

4.3.2.1 Uterine Schichtdicken

Entsprechend den Ergebnissen der Uterusfeuchtgewichte fand sich in allen drei Schichten der substanzbehandelten Gruppen und der sham-ovx Gruppe eine signifikante Dickenerhöhung im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Im Myometrium (s. Abb. 3.13 auf S. 38) zeigte sich mit Ausnahme der Gruppe, die eine kontinuierliche Kombination aus dem ERα- und ERβ-Agonisten erhielt, in allen substanzbehandelten Gruppen eine zusätzlich signifikante Dickeerhöhung im Vergleich zur sham-ovx Gruppe. Diese Werte liegen somit über der physiologischen Grenze. Doch lag auch die Myometriumdicke dieser Ausnahmegruppe über der physiologischen Grenze.

Die Dicke des Endometriums (s. Abb. 3.14 auf S. 39) zeigte sich in der Gruppe, die eine zeitversetzte Kombination aus E2 und dem ERβ-Agonisten erhielt, signifikant erniedrigt zur sham-ovx Gruppe. Alle übrigen substanzbehandelten Gruppen wiesen keine signifikanten Unterschiede zur sham-ovx Gruppe auf.

Die Untersuchungen am uterinen Epithel (s. Abb. 3.15 auf S. 40) ergaben in der Gruppe, die eine zeitversetzte Kombination aus dem ERα- und ERβ-Agonisten erhielt, eine Dickenerhöhung im Vergleich zur sham-ovx Gruppe, die sich aber als nicht signifikant darstellte. Alle übrigen substanzbehandelten Gruppen präsentierten signifikant erhöhte Epitheldicken, verglichen mit der physiologischen sham-ovx Gruppe.

Trotz einiger Ergebnisse, die teils signifikant unter der physiologischen Grenze lagen, wird anhand dieser Untersuchungen deutlich, dass die hier verabreichten selektiven Östrogenrezeptoragonisten sowohl in kontinuierlich langzeitlicher als auch in kurzfristiger Kombination zu einem dem Östradiol vergleichbaren Effekt auf die uterinen Schichtdicken wirken. Das bedeutet, dass der selektive ERβ-Agonist keinen antagonisierenden Effekt auf die durch E2 und den ERα-Agonisten hervorgerufenen Wirkungen ausübt.

Diese Ergebnisse korrelieren nicht mit den Erwartungen, die man nach Aussagen anderer Autoren hat. So besagt die „Gustafsson'sche Yin-Yang-Theorie", dass ERβ die durch ERα hervorgerufenen Wirkungen in ERα-dominierten Geweben modulieren und hemmen kann, indem es entweder als ein transdominanter Repressor fungiert oder als Konkurrent auftritt (Lindberg et al. 2003). Auch Morani et

al. (2008) schreiben dem ERβ dem ERα entgegenwirkende Wirkungen zu. Er soll eher proapoptotische und prodifferenzierende Funktionen aufweisen, während der ERα für die Zellproliferation zuständig ist. Anhand des Knockout-Maus-Modells zeigten sich ähnliche Ergebnisse. BERKO-Mäuse präsentierten eine übertriebene Antwort auf E2, indem sich sowohl das uterine Lumen und Volumen vergrößerte als auch der Proteingehalt und die Sekretion anstieg (Weihua et al. 2000). Zusätzlich soll der ERβ eine Rolle in der Dezidualisierung des Rattenuterus und im für die Geburt essentiellen Reifeprozess des menschlichen Gebärmutterhalses spielen (Wada-Hiraike et al. 2006).

Wie unter 4.3.1 am Uterusgewicht beschrieben, haben die in dieser Studie verwendeten selektiven ER-Agonisten in alleiniger Verabreichung die zu erwartenden Ergebnisse geliefert (Hegele-Hartung et al. 2004; Hillisch et al. 2004).

Ähnlich wie in dieser Studie untersucht, kam es auch bei Hillisch et al. (2004) in der Kombinationsgruppe der beiden ER-Agonisten zu keinem hemmenden Effekt auf das Uterusgewicht und folglich auf die proliferativen Wirkungen.

Da Östradiol als natürlicher Ligand sowohl auf den ERα als auch auf den ERβ wirkt, wäre die logische Schlussfolgerung daraus gewesen, dass die zusätzliche Substitution eines ERβ-Agonisten zu Östradiol einen stärkeren hemmenden Effekt ausübt, als es die Kombination aus den selektiven ERα- und ERβ-Agonisten tut. Diese Erwartung konnte am Uterus anhand dieser in-vivo-Studie jedoch nicht nachvollzogen werden.

Auch die zeitversetzte Kombination mit dem ERβ-Agonisten führte zu keiner nennenswerten Hemmung der Stimulation.

Die Kombination des ERβ-Agonisten zu Östradiol und dem ERα-Agonisten hat somit den gewünschten Effekt, regulierend auf das Endometrium zu wirken und damit eine geeignete Hilfe sowohl in der Behandlung von Endometriumhyperplasien während des Klimakteriums als auch im Rahmen der HRT zu sein, nicht erfüllt.

4.3.2.2 Histomorphologie des Uterus

Neben der statistischen Auswertung der Schichtdicken wurde auch die histologische Morphologie der Uteri lichtmikroskopisch untersucht (s. Abb. 3.5–3.12 auf S. 31-34). Beurteilt wurden neben der Myometrium-, Endometrium- und Epitheldicke (Hypertrophie und Hyperplasie, evtl. Metaplasie), die Epithelmorphologie

(Vakuolisierung, Nekrosen, Kernbeschaffenheit), die Basalmembrandurchgängigkeit, das Drüsenvorkommnis, die Drüsengröße und das Mitosevorkommen (s. Zusammenfassung Tab. 3.1 auf S. 37).

Wie erwartet präsentierten sich in der Kontrollgruppe alle Schichten als atrophiert. In der Östradiolgruppe zeigten sich zu erwartende Ergebnisse (Haschek et Rousseaux 1991; Fazleabas et Strakova 2002). In allen Schichten fand sich eine starke Hypertrophie und Hyperplasie, mit einer zur Kontroll- und sham-ovx Gruppe signifikant vermehrten Anzahl an in der Lamina propria angereihten spindelförmigen Zellen. Vereinzelt waren zystische Drüsen zu finden. Neben degenerative Veränderungen waren zusätzlich signifikant (zur Kontroll- und sham-ovx-Gruppe) vermehrte squamöse Metaplasien vorhanden. Da die Basalmembran durchgehend intakt war, kam es zu keiner über die natürlichen Grenzen hinausgehenden oder unkontrollierbaren Zellvermehrung. Die Mitoserate war sehr gering.

Die Kombinationsgruppen stellten sich histomorphologisch grundsätzlich ähnlich dar wie die Östradiolgruppe. Doch fanden sich auch zu erwähnende Unterschiede.

Sowohl die kontinuierliche als auch die zeitversetzte Kombination aus E2 und dem ERβ-Agonisten lieferte der Östradiolgruppe vergleichbare Ergebnisse.

Daraus lässt sich schließen, dass weder die kontinuierliche noch die zeitversetzt zusätzliche Substitution des ERβ-Agonisten zu E2 modulierend auf die weiter oben beschriebenen östrogenen Effekte an der Uterushistomorphologie wirkt.

Die Kombinationen aus dem ERα- und ERβ-Agonisten zeigten wiederum einige Unterschiede. Im Vergleich zur Östradiolgruppe ansonsten ähnlicher Ergebnisse, fanden sich zur Kontroll- und sham-ovx Gruppe signifikant vermehrte zystische Drüsen und pseudopapillären Epithelproliferationen der Drüsen. Die stufige Kombination hatte zudem eine zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Mitoserate. Die beschriebenen zystisch aufgetriebenen Drüsen mit Sekretinhalten entsprechen den Beobachtungen, welche im Rahmen mit Tamoxifen-Behandlungen gemacht wurden. Auch hier kam es zu einer zystischen Dilatation der Drüsen und einer endometrialen Hyperplasie (Wang et al. 2002; Touraine 2003). Wang et al. (2002) schrieben diesen Zustand dem erhöhten Level der ERα-Proteinexpression zu. Der in dieser Studie hinzugefügte ERβ-Agonist konnte diesen Effekt somit nicht unterdrücken.

In der sham-ovx Gruppe fanden sich bei allen Tieren eine Hypertrophie und Hyperplasie des Myometriums und Endometriums. Sie unterschied sich somit nicht

von der Morphologie der Östradiolgruppe und der mit E2 kombiniert behandelten Gruppen. Das Epithel präsentierte sich jedoch dem Zyklusstand entsprechend unterschiedlich.

Obwohl sich in den substanzbehandelten Gruppen im Myometrium supraphysiologische Schichtdicken zeigten, fand sich in der histomorphologischen Beurteilung kein Anhalt für atypische Veränderungen. An der Schichtdicke des Epithels fand sich, wie weiter oben beschrieben, ein histomorphologisches Korrelat für die supraphysiologischen Werte. Die in den mit dem ERα-Agonisten behandelten Gruppen zu findenden großen Drüsen standen zwar in keinem Präparat in dos-à-dos Stellung, wiesen jedoch vermehrt pseudopapilläre Wucherungen auf.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es sich bei den in den substanzbehandelten Gruppen zu findenden histologischen Ergebnissen des Uterus sowohl um quantitative Zellproliferationen als auch um qualitative Veränderungen handelt. Der ERβ-Agonist konnte weder in der kontinuierlichen noch in der zeitversetzten Kombination zu E2 bzw. dem ERα-Agonisten, die laut der „Yin-Yang“-Theorie zu erwartenden, hemmenden Funktionen erfüllen.

4.4 Wirkungen auf die Vagina

Wie auch am Uterus wirken Östrogene wachstumsfördernd auf die Vagina. Durch den klimakterischen Östrogenmangel kommt es zur vaginalen Schleimhautatrophie, die für die Frau unangenehme klinische Symptome wie vaginale Trockenheit, Dyspareunie und rezidivierende Infektionen mit sich bringt. Ähnlich wie am Uterus ist der prädominierende Östrogenrezeptor der ERα, jedoch ist auch hier der ERβ vertreten. Ihm werden, wie am Uterus, antiproliferative Wirkungen nachgesagt („Yin-Yang“-Theorie).

Zur Beurteilung der Effekte der Testsubstanzen wurden die vaginale Epitheldicke und die histologische Morphologie lichtmikroskopisch untersucht.

4.4.1 Vaginale Epitheldicke

Die statistische Auswertung der vaginalen Epitheldicke (s. Abb. 3.20 auf S. 46) erbrachte dem Uterus tendenziell vergleichbare Ergebnisse. In allen substanzbehandelten Gruppen kam es zu einer signifikanten Schichtdickenerhöhung im Vergleich zur Kontroll- und sham-ovx Gruppe. Die stärkste Proliferation erbrachte die Östradiolsubstitution. Die zusätzliche Substitution des ERβ-Agonisten führte zwar zu einer niedrigeren Epitheldicke als man sie unter der alleinigen Östradiolsubstitution fand, dennoch präsentierten sich die Ergebnisse im signifikant supraphysiologischen Bereich. Die „Yin-Yang“-Theorie bestätigte sich hier dementsprechend nicht. Zusätzlich hätte man, wie beim Uterus zuvor, davon ausgehen können, dass die Kombinationsgruppen die E2 erhielten, weniger stark proliferieren, als es die Gruppen mit dem ERα-Agonisten in Kombination tun. Als Begründung für die Annahme gilt wieder die Tatsache, dass E2 als natürlicher Ligand auch am ERβ fungiert. Die zeitverzögerte Kombination mit dem ERβ-Agonisten erbrachte auch hier keinen Unterschied zur kontinuierlichen Substitution. Die Annahme, einen anderen Effekt durch eine Vorbehandlung mit E2 bzw. den ERα-Agonisten zu erzielen, konnte auch an der vaginalen Epitheldicke nicht nachvollzogen werden.

4.4.2 Histomorphologie der Vagina

Wie auch am Uterus geschehen, wurden die Vaginae histomorphologisch unter dem Lichtmikroskop untersucht (s. Abb. 3.16-3.19 auf S. 41-42). Hier wurden die Epitheldicke (Hypertrophie und Hyperplasie) mit Anzahl der Epithelschichten, die Verhornung der luminalen Schichten, das Mitosevorkommen und die interzelluläre Ödembildung beurteilt (s. Tab. 3.2 auf S. 45).

Erwartungsgemäß zeigte sich in der Kontrollgruppe eine Atrophie des vaginalen Epithels. Die Östradiolgruppe hingegen präsentierte zu erwartende Hypertrophien und Hyperplasien des Epithels mit Verhornungen der luminalen Schichten. Zusätzlich fanden sich zur Kontrollgruppe signifikant vermehrte epitheliale Mitosen. Die zusätzliche Verabreichung des ERβ-Agonisten zu E2 führte zu keiner Minderung der Hypertrophie, der Hyperplasie und der Verhornung, doch zu einer geringeren Mitoserate. Zudem führte sie in der kontinuierlichen zu einer leichten und in der stufigen Kombination zu einer vermehrten interzellulären Ödembildung. Auf die

proliferativen Effekte (in Zelllagen gemessen) hat die zusätzliche Applikation des ERβ-Agonisten zu E2 keine hemmenden Wirkungen gehabt.

In den Kombinationsgruppen aus dem ERα- und ERβ-Agonisten konnte anhand der statischen Epitheldickenmessung gezeigt werden, dass es keinen nennenswerten Unterschied zu den mit E2 behandelten Kombinationsgruppen gibt. In der Histomorphologie hingegen zeigte sich, dass die Anzahl der Zelllagen in allen Präparaten unter 10 und damit unter der der anderen substanzbehandelten Gruppen lag. Bei vergleichbarer Schichtdicke muss somit eine stärkere Hypertrophie als Hyperplasie stattgefunden haben. Zusätzlich fand sich in diesen Präparaten eine starke interzelluläre Ödembildung als Zeichen einer inflammatorischen Antwort (Haschek et Rousseaux 1991).

Zusammenfassend lässt sich für die Vagina sagen, dass die zusätzliche Verabreichung des selektiven ERβ-Agonisten zu keinem antagonisierenden Effekt auf die Hypertrophie und Hyperplasie des vaginalen Epithels führt.

Die „Yin-Yang“-Theorie konnte in diesem Fall wieder nicht bestätigt werden.

4.5 Wirkungen auf den Hormonhaushalt

4.5.1 Östradiol

Erwartungsgemäß zeigte die ovarektomierte Kontrollgruppe die niedrigsten Serumöstradiolspiegel (s. Abb. 3.21 auf S. 47). Der durchschnittliche Serumöstradiolwert von 18,16±9,45pg/ml der sham-ovx Gruppe entsprach dem Östradiolspiegel des Diöstrus, welcher sich zw. 10 bis 20pg/ml bewegt. Die anhand der Vaginalhistologie ermittelten Zyklusphasen der einzelnen Tiere ergaben, dass sich 4 der 6 intakten Tiere im Diöstrus befanden (definitionsgemäß wird der erste Tag des Diöstrus als Metöstrus bezeichnet). Ein Tier befand sich im Östrus (Werte unter 10pg/ml) und wiederum ein Tier im Proöstus (Werte zw. 40-50pg/ml). Anhand dieser Beobachtungen verhält sich der Östradiolspiegel entsprechend. In allen Kombinationsgruppen und der E2-Gruppe zeigte sich ein signifikant zur Kontroll- und sham-ovx Gruppe erhöhter Spiegel an Östradiol. Unter den Kombinationsbehandlungen waren die Östradiolwerte in den Gruppen, die E2 und den ERβ-Agonisten erhielten niedriger als in denen, die den ERα- und ERβ-

Agonisten erhielten. Hierbei spielte die Zeit der zusätzlichen Applikation des ERβ-Agonisten keine Rolle. Als Grund für die unterschiedlich hohen Spiegel kann die höhere Dosis des ERα-Agonisten im Vergleich zur Dosis des Östradiols genannt werden.

Quelle für die physiologischen Serumwerte: (Maeda et al. 2000).

4.5.2 Luteinisierendes Hormon (LH)

Durch die im Rahmen des Klimakteriums sinkenden Östradiolspiegel kommt es durch den fehlenden negativen Feedbackmechanismus zu einer gesteigerten LH-Sekretion. Dieser Zustand ist ursächlich für die häufig beschriebenen Hitzewallungen (s. 1.5.1 auf S. 5). Korrelierend mit den gemessenen niedrigen Östradiolwerten im Serum kam es in der ovarektomierten Gruppe zu einer signifikanten Erhöhung des Serum-LH-Spiegels (s. Abb. 3.22 auf S. 48) und damit zu einem, dem Klimakterium vergleichbaren Zustand. Erwartungsgemäß kam es unter der Substitution von Östradiol zu einer signifikanten Erniedrigung des LH-Spiegels. Denn das hypothalamisch-hypophysäre-System bleibt trotz der während der Menopause eintretenden ovariellen Insuffizienz intakt und reagiert auf exogen substituiertes Östrogen mit Feedbackmechanismen (Messinis 2006). Durch Ovarektomie kommt es bedingt durch die vermehrte Gonadotropinproduktion zu einer Hypertrophie der gonadotrophen Zellen und zu einer Unordnung der intrazellulären Organellen. Östrogenzufuhr kehrt diese Veränderungen wieder um (Sánchez-Criado et al. 2006).

Die sham-ovx Gruppe präsentierte einen durchschnittlichen LH-Spiegel von 0,57±0,60ng/ml und lag so mit einem Wert von <1ng/ml im durchschnittlichen Bereich des Diöstrus. Diese Werte entsprechen dem, aufgrund der gewonnenen Östradiolwerte, erwarteten Ergebnis.

Obwohl sich in der Hypophyse sowohl der ERα als auch der ERβ befinden, scheint erstgenannter entscheidend für den LH-Spiegel im Serum zu sein. So zeigte nur die ERα- und nicht die ERβ-Knockout-Maus erhöhte LH-Level (Couse et Korach 1999).

Vergleichbare Ergebnisse wurden auch mit den hier verwendeten Substanzen erzielt. Die alleinige Gabe des selektiven ERα-Agonisten 16α-LE2 führte zu einer Senkung des LH-Spiegels. Der selektive ERβ-Agonist 8β-VE2 hatte hierauf jedoch nur in der höchsten Dosierung von 100µg/Tier/Tag einen Einfluss. Diese Beobachtung lässt

sich wiederum mit der vermuteten Residualaktivität am ERα erklären (Hillisch et al. 2004; Seidlová-Wuttke et al. 2008).

Ausgehend von der Annahme, dass der ERβ einen hemmenden Effekt auf die durch den ERα hervorgerufenen Wirkungen hat, wurde in dieser Studie auch untersucht, inwiefern sich die Kombination der selektiven ER-Agonisten auf den LH-Spiegel auswirkt. In allen Kombinationsgruppen kam es zu einer signifikanten LH-Erniedrigung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Kombination aus dem ERα- und ERβ-Agonisten zeigte sowohl in der kontinuierlichen als auch in der stufigen Verabreichung LH-Werte, die unter 1ng/ml lagen. Die Kombination aus E2 und dem ERβ-Agonisten führte ebenfalls zu einer signifikanten LH-Erniedrigung im Vergleich zur Kontrollgruppe, doch lagen die Werte mit über 2ng/ml über denen der erstgenannten Kombinationen. Auch Hillisch et al. (2004) beschrieben dies, doch wurde in der dortigen Kombination eine niedrigere Dosierung des ERα-Agonisten verwendet. Es wird deutlich, dass in der hier verwendeten Dosierung keine signifikant hemmenden Einflüsse durch den ERβ-Agonisten auf die durch den ERα-Agonisten und E2 hervorgerufenen Effekte zu beobachten sind.

Die Theorie des „Yin-Yang-Verhältnisses“ zwischen den beiden Rezeptorisoformen kann anhand dieser Daten nicht unterstützt werden. Sánchez-Criado et al. (2006) relativieren diese Aussage jedoch, indem sie anhand des ERβ-Agonisten DPN nachwiesen, dass bei einer fehlenden Aktivierung des ERα der ERβ in der Lage war, die Funktionen des erstgenannten zum Teil zu ersetzen. Sie beobachteten ein normalerweise durch den ERα hervorgerufenes Schrumpfen der gonadotrophen Zellen, die Reorganisation der Zellorganellen und eine Progesteronexpression. In der Präsenz von durch PPT aktiviertem ERα reduzierte der ERβ den Effekt auf die Zellmorphologie, die Progesteronexpression und den hypophysären LH-Spiegel. Im Gegensatz dazu führte die Aktivierung des ERβ, allein oder in Kombination mit ERα, zu keiner Hemmung des Serum-LH-Spiegels. Erklärt wurde dies damit, dass der finale Schritt im Sekretionsprozess, die östrogenabhängige Exozytose von LH, ERα-abhängig ist.

Diese Tatsache erklärt u. a. die hier beobachtete fehlende Hemmung des ERβ auf den LH-Spiegel.

4.5.3 Thyreoidea-stimulierendes Hormon (TSH) und die Schilddrüsenhormone fT3 und fT4

Der TSH-Serumspiegel (s. Abb. 3.23 auf S. 49) zeigte in keiner der untersuchten Gruppen eine signifikante Veränderung. Den höchsten Wert wies jedoch die E2-Gruppe auf, gefolgt von der Kontrollgruppe. Der niedrigste Wert fand sich in der intakten sham-ovx Gruppe. Auch Lima et al. (2006) zeigten an ovarektomierten Ratten, dass weder der Verlust der Ovarien noch die anschließende Östradiolsubstitution zu einer signifikanten Veränderung des Serum-TSH-Spiegels führen. Jedoch stellten sich entsprechende Heterogenitäten dar. So kam es auch dort zu einer leichten Erhöhung des TSH-Spiegels unter E2. Böttner et Wuttke (2005) zeigten ebenso an ovx mittelalten Ratten, dass es unter E2-Substitution zu keiner Veränderung des TSH-Spiegels kam. Die in dieser Arbeit in Kombination behandelten Gruppen wiesen untereinander keine markanten Unterschiede auf. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es zu keinem Einfluss auf den TSH-Wert gekommen ist und sich daraus keine Risiken für eine Hyper- bzw. Hypothyreose ergeben. Um zusätzliche Aussagen über den Einfluss auf den TSH-Spiegel machen zu können, sind weitere Studien erforderlich, in denen die Substanzen über einen längeren Zeitpunkt und in anderen Dosierungen verabreicht werden.

Der Serumgehalt an den Schilddrüsenhormonen Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) korreliert im gesunden Organismus mit dem TSH-Wert. Als prädominierender ER in der Schilddrüse wird der ERβ angegeben (Pelletier 2000; Kawabata et al. 2003). Nach Ovarektomie beobachteten Lima et al. (2006) an Ratten ein Sinken des fT3-Spiegels, ohne Veränderungen des TSH- und fT4-Spiegels. Verantwortlich dafür machten sie die geringere periphere Konversion des metabolisch aktiveren T3 aus T4, bedingt durch sinkende Dejodaseaktivität. Auch in dieser Studie war der Serumgehalt an fT3 in der Kontrollgruppe geringer als in der intakten Gruppe (s. Abb. 3.24 auf S. 50). Jedoch waren diese Ergebnisse nicht signifikant. Die Östradiolsubstitution und die Verabreichung der Kombinationen aus E2 und dem ERβ-Agonisten bzw. aus dem ERα- und ERβ-Agonisten führten zu keiner signifikanten Veränderung des fT3-Spiegels. Die sham-ovx Gruppe wies die höchsten Werte auf, doch stand sie zu keiner Gruppe in einem signifikant veränderten Verhältnis. Somit hatte die zusätzliche Aktivierung (sowohl ganzzeitlich als auch kurzzeitig) des ERβ auch auf diesen Parameter keinen hemmenden Effekt.

Wie von Lima et al. (2006) beschrieben wurde, kommt es im Rahmen der Ovarektomie zu keiner Veränderung des fT4-Spiegels. Vergleichbare Ergebnisse wurden hier erhoben (s. Abb. 3.25 auf S. 51). Östradiolsubstitution und die zeitversetzte Kombination aus E2 bzw. dem ERα-Agonisten mit dem ERβ-Agonisten führten ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung, verglichen mit der Kontroll- und sham-ovx Gruppe. Šošić-Jurjević et al. (2005) beobachteten jedoch an intakten Ratten und Böttner et Wuttke (2005) an ovx mittelalten Ratten ein Sinken des T4-Spiegels unter chronischer Östradiolsubstitution. In der Gruppe, die eine kontinuierliche Kombination aus E2 und dem ERβ-Agonisten erhielt, kam es jedoch zu einer zur Kontrollgruppe signifikanten Erniedrigung und in der Gruppe, die eine kontinuierliche Kombination aus dem ERα- und dem ERβ-Agonisten erhielt zu einer zur Kontroll- und sham-ovx Gruppe signifikanten Erhöhung des fT4-Spiegels. Bekannt ist, dass Östradiol direkte stimulierende Effekt auf die Schilddrüse ausüben kann, ohne dabei den TSH-Wert zu verändern (Lima et al. 2006). Wie weiter oben beschrieben, ist der vorherrschende ER in der Schilddrüse der ERβ. Ausgehend davon, dass E2 als physiologisches Substrat sowohl am ERα als auch am ERβ wirkt, und von der Hypothese, dass der ERβ einen hemmenden Effekt auf den ERα ausübt, würde sich der signifikant zur Kontrollgruppe erniedrigte fT4-Spiegel in der Gruppe erklären, die kontinuierlich E2 und den ERβ-Agonisten erhielt. Auch die zeitversetzte Kombination der beiden Substanzen führte zu einer, wenn auch nicht signifikanten, Erniedrigung des Spiegels. Die überschießende Reaktion durch die Kombinierung des ERα- und ERβ-Agonisten (in der kontinuierlichen Verabreichung signifikant) lässt sich nicht vollends erklären. Vermutet werden kann die geringere Aktivierung des ERβ in diesen Gruppen. Hier sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich, um eine schlüssige Erklärung zu finden.

5 Zusammenfassung

Da die HRT für postmenopausale Frauen mit gewissen Risiken behaftet ist, spielt die Suche nach selektiveren Therapeutika eine immer größere Rolle. Mit der Entdeckung des zweiten ER-Subtypen β wurde die Frage nach seiner Funktion und Wirkung auf verschiedene Gewebe und den erstbekannten Rezeptor α groß gestellt. Bis heute ist nicht abschießend geklärt, welche genaue Rolle er spielt.
Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Wirkungen der Kombination aus dem selektiven Östrogenrezeptoragonisten α (16α-LE2) und β (8β-VE2) sowie der Kombination aus Östradiol und dem ERβ-Agonist an ovarektomierten Ratten untersucht. Die Kombination erfolgte hierbei für insgesamt vier Wochen in kontinuierlich simultaner und zeitversetzt zweiwöchig simultaner Kombination. Eine Östradiolgruppe diente als Positivkontrolle. Als physiologischer Vergleichsparameter galt eine intakte sham-ovx Gruppe. Untersucht wurden der Uterus, die Vagina, die Futteraufnahme, das Körpergewicht und der Hormonhaushalt (Östradiol, LH, TSH, fT3 und fT4).

1. Die kontinuierlich verabreichten Kombinationen aus E2 bzw. dem ERα-Agonisten und dem ERβ-Agonisten präsentierten in keinem der genannten Organ- bzw. Hormonsysteme nennenswerte Unterschiede zur Wirkung von Östradiol.
2. Die kontinuierliche Verabreichung zeigte keine bedeutenden Unterschiede zur zeitversetzten Kombination.
3. Verglichen mit der sham-ovx Referenzgruppe präsentierten sich die Futteraufnahme, das Körpergewicht und das Hormonsystem (außer Östradiol) im physiologischen Bereich. Der Serumöstradiolwert, die uterine Schichtdicke des Myometriums und Epithels sowie die vaginale Epitheldicke wiesen supraphysiologische Werte auf.
4. Die gewonnenen Resultate widersprechen der Gustafsson'schen „Yin-Yang-Theorie", nach welcher es durch die Stimulation des Östrogenrezeptors β zu einer hemmenden oder modulierenden Antwort kommen sollte.
5. Die in dieser Studie gewonnenen Erkenntnisse über die Wirkung der selektiven Agonisten an den Östrogenrezeptoren α und β zeigen, dass sich

die Substanzen in gegebener Dosis und Verabreichungsform noch nicht als pharmakotherapeutisch einsetzbar erweisen.

Resümierend sei zu erwähnen, dass weitere Studien erforderlich sind, um herauszufinden, inwieweit die untersuchten Substanzen in anderen Organen positive Wirkungen entfalten.

6 Literaturverzeichnis

AKHRASS F, EVANS AT, WANG Y, RICH S, KANNAN CR, FOGELFELD L, MAZZONE T (2003):

Hormone replacement therapie is associated with less coronary atherosclerosis in postmenopausal women.

J Clin Endocrinol Metab, 88:5611-5614.

ASARIAN L, GEARY N (2006):

Modulation of appetite by gonadal steroid hormones.

Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 361:1251-1263.

BACHMANN GA, NEVADUNSKY NS (2000):

Diagnosis and treatment of atrophic vaginitis.

Am Fam Physician, 61:3090-3096.

BÖTTNER M, WUTTKE W (2005):

Chronic treatment with low doses of estradiol affects pituitary and thyroid function in young and middle-aged ovariectomized rats.

Biogerontology, 6:261-269.

BROSENS JJ, TULLET J, VARSHOCHI R, LAM EW-F (2004):

Steroid receptor action.

Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol, 18:265-283.

BU L, SETCHELL KD, LEPHART ED (2005):

Influences of dietary soy isoflavones on metabolism but not nociception and stress hormone responses in ovariectomized female rats.

Reprod Biol Endocrinol, 3:58.

BUCHANAN DL, KURITA T, TAYLOR JA, LUBAHN DB, CUNHA GR u. COOKE PS (1998):

Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification.

Endocrinology, 139:4345-4352.

CARR M (2003):

The emergence of the metabolic syndrome with menopause.

J Clin Endocrinol Metab, 88:2404-2411.

COUSE JF,KORACH KS (1999):

Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us?

Endocr Rev, 20:358-417.

CUNHA GR, COOKE PS, KURITA T (2004):

Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses.

Arch Histol Cytol, 67:417-434.

D'EON TM, SOUZA SC, ARONOVITZ M, OBIN MS, FRIED SK, GREENBERG AS (2005):

Estrogen regulation of adiposity and fuel partitioning. Evidence of genomic and non-genomic regulation of lipogenic and oxidative pathways.

J Biol Chem, 280:35983-35991.

DIEUDONNÉ MN, LENEVEU MC, GIUDICELLI Y, PECQUERY R (2004):

Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens.

Am J Physiol Cell Physiol, 286:655-661.

DIEZ-PEREZ A (2006):

Selective estrogen receptor modulators (SERMS).

Arq Bras Endocrinol Metabol, 4:720-734.

ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, GRANDIEN K, LAGERCRANTZ S, LAGERCRANTZ J, FRIED G, NORDENSKJÖLD M, GUSTAFSSON J-A (1997):

Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression patter.

J Clin Endocrinol Metab, 82:4258-4265.

FAZLEABAS AT, STRAKOVA Z (2002):

Endometrial function: cell specific changes in the uterine environment.

Mol Cell Endocrinol, 186:143-147.

GARBE E, SUISSA S (2004):

Hormone replacement therapy and acute coronary outcomes: methodological issues between randomized and observational studies.

Hum Reprod, 19:8-13.

GORODESKI GI, HOPFER U, LIU CC, MARGLES E (2005):

Estrogen acidifies vaginal pH by up-regulation of proton secretion via the apical membrane of vaginal-ectocervical epithelial cells.

Endocrinology, 146:816-824.

GORZEK JF, HENDRICKSON KC, FORSTNER JP, RIXEN JL, MORAN AL, LOWE DA (2007):

Estradiol and Tamoxifen reverse ovarectomy- induced physical inactivity in mice.

Med Sci Sports Exerc, 39:248-256.

GRADY D (2006):

Clinical practice. Management of menopausal symptoms.

N Engl J Med, 355:2338-2347.

GRADY D, WENGER NK, HERRINGTON D, KHAN S, FURBERG C, HUNNINGHAKE D, VITTINGHOFF E, HULLEY S (2000):

Postmenopausal hormone therapy increases risk for venous thromboembolic disease. The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study.

Ann Intern Med, 132:689-696.

GREEN S, WALTER P, GREENE G, KRUST A, GOFFIN C, JENSEN E, SCRACE G, WATERFIELD M, CHAMBON P (1986):

Cloning of the human oestrogen receptor cDNA.

J Steroid Biochem, 24:77-83.

GREENDALE GA, LEE NP, ARRIOLA ER (1999):

The Menopause.

Lancet, 353:571-580.

GRUBER CJ, TSCHUGGUEL W, SCHNEEBERGER C, HUBER JC (2002):

Production and actions of estrogens.

N Engl J Med, 346:340-352.

GUSTAFSSON J-A (1999):

Estrogen receptor β- a new dimension in estrogen mechanism of action.

J Endocrinol, 163:379-383.

HAAG, P., N. HANHART, M. MÜLLER:

Gynäkologie und Urologie.

Medizinische Verlags- und Informationsdienste, Breisach 2007/2008, S.25-29.

HARRIS HA, ALBERT LM, LEATHURBY Y, MALAMAS MS, MEWSHAW RE, MILLER CP, KHARODE YP, MARZOLF J, KOMM BS, WINNEKER RC, FRAIL DE, HENDERSON RA, ZHU Y, KEITH JC (2003):

Evaluation of an estrogen receptor-β agonist in animal models of human disease.

Endocrinology, 144:4241-4249.

HARRIS HA, KATZENELLENBOGEN JA, KATZENELLENBOGEN BS (2002):
Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ERα and ERβ, in estrogen target tissues in vivo through the use of an ERα-selective ligand.
Endocrinology, 143:4172-4177.

HASCHEK WM u. ROUSSEAUX G:
Handbook of Toxicologic Pathology.
Verlag Academic Press, Inc., San Diego 1991, S.891-933.

HEGELE-HARTUNG C, SIEBEL P, PETERS O, KOSEMUND D, MÜLLER G, HILLISCH A, WALTER A, KRAETZSCHMAR J, FRITZEMEIER K-H (2004):
Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function.
Proc Natl Acad Sci USA, 101:5129-5134.

HERTRAMPF T, SEIBEL J, LAUDENBACH U, FRITZEMEIER KH, DIEL P (2008):
Analysis of the effects of oestrogen receptor alpha (ERalpha)- and ERbeta-selective ligands given in combination to ovariectomized rats.
Br J Pharmacol, 153:1432-1437.

HILLISCH A, PETERS O, KOSEMUND D, MÜLLER G, WALTER A, SCHNEIDER B, REDDERSEN G, ELGER W, FRITZEMEIER K-H (2004):
Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design.
Mol Endocrinol, 18:1599-1609.

HULLEY S, GRADY D, BUSH T, FURBERG C, HERRINGTON D, RIGGS B, VITTINGHO E (1998):

Randomized trial of estrogen plus progestin for secundary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group.

JAMA, 280:605-613.

IGNAR-TROWBRIDGE DM, TENG CT, ROSS KA, PARKER MG, KORACH KS, MCLACHLAN JA (1993):

Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional actication of an estrogen-responsive element.

Mol Endocrinol, 7:992-998.

IGNAR-TROWBRIDGE DM, PIMENTEL M, TENG CT, KORACH KS, MCLACHLAN JA (1995):

Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems.

Environ Health Perspect, 103:35-38.

JETTEN AM, DELUCA LM, NELSON K, SCHROEDER W, BURLINGAME S, FUJIMOTO W (1996):

Regulation of cornifin alpha expression in the vaginal and uterine epithelium by estrogen and retinoic acid.

Moll Cell Endocrinol, 123:7-15.

KAWABATA W, SUZUKI T, MORIVA T, FUJIMORI K, NAGANUMA H, INOUE S, KINOUCHI Y, KAMEYAMA K, TAKAMI H, SHIMOSEGAWA T, SASANO H (2003):

Estrogen receptors (alpha and beta) and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and 2 in thyroid disorders: possible in situ estrogen synthesis and actions.

Mod Pathol, 16:437-444.

KLAMMER H, SCHLECHT C, WUTTKE W, SCHMUTZLER C, GOTTHARDT I, KÖHRLE J, JARRY H (2007):

Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats.

Toxicology, 238:192-199.

KLINGE CM (2001):

Estrogen receptor interaction with estrogen response elements.

Nucleic Acids Res, 29:2905-2919.

KUIPER GGJM, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON J-A (1996):

Cloning a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary.

Proc Natl Acad Sci USA, 93:5925-5930.

KUIPER GG, CARLSSON B, GRANDIEN K, ENMARK E, HAGGBLAD J, NILSSON S, GUSTAFSSON JA (1997):

Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.

Endocrinology, 138:863-870.

LIMA LP, BARROS IA, LISBOA PC, ARAÚJO RL, SILVA AC, ROSENTHAL D, FERREIRA AC, CARVALHO DP (2006):

Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats.

Steroids, 71:653-659.

LINDBERG MK, MOVERARE S, SKRTIC S, GAO H, DAHLMAN-WRIGHT K, GUSTAFSSON J-A u. OHLSSON C (2003):

Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice.

Mol Endocrinol, 17:203-208.

LÖFFLER G, PETRIDES PE, HEINRICH PC:

Biochemie und Pathobiochemie.

8. Auflage Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2007, S. 842-844.

LÖHNING T, REUSCH U, THOMSSEN C (1999a):

Algorithmus der endometrialen Meta- und Hyperplasien.

Pathologe, 20:56-62.

LÖHNING T, REUSCH U, THOMSSEN C (1999b):

Algorithmus der Klinik und Pathologie der Endometriumkarzinoms.

Pathologe, 20:63-71.

LUBAHN DB, MOYER JS, GOLDING TS, COUSE JF, KORACH KS, SMITHIES O (1993):

Alteration of reproductiv function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene.

Proc Natl Acad Sci USA, 90:11162-11166.

MAEDA K, OHKURA S, TSUKAMURA H (2000):

Physiology of Reproduction; in: The Laboratory Rat.

hrsg. v. Krinke GJ; Academic Press, San Diego 2000, S. 145 – 163, 315-316.

MARGOLIS KL, BONDS DE, RODABOUGH RJ, TINKER L, PHILLIPS LS, ALLEN C, BASSFORD T, BURKE G, TORRENS J, HOWARD BV; WOMEN'S HEALTH INITIATIVE INVESTIGATORS (2004):

Effect of oestrogen plus progestin on the incidence of diabetes in postmenopausal women: results from the Women's Health Initiative Hormone Trial.

Diabetologia, 47:1175-1187.

MESSINIS IE (2006):

Ovarian feedback, mechanism of action and possible clinical implications.

Hum Reprod Update, 12:557-571.

MORANI A, WARNER M, GUSTAFSSON J-A (2008):

Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues.

J Intern Med, 264:128-142.

MURAKI K, OKUYA S, TANIZAWA Y (2006):

Estrogen receptor alpha regulates insulin sensitivity through IRS-1 tyrosine phosphorylation in mature 3T3-L1 adipocytes.

Endocr J, 53:841-851.

MURAMATSU M, INOUE S (2000):

Estrogen receptors:How do they control reproductive and nonreproductive functions?

Biochem Biophys Res Commun, 270:1-10.

NELSON HD, VESCO KK, HANEY E, FU R, NEDROW A, MILLER J, NICOLAIDIS C, WALKER M, HUMPHREY L (2006):

Nonhormonal therapies for menopausal hot flashes: systematic review and meta-analysis.

JAMA, 295:2057-2071.

PATHIRAGE N, DI NEZZA LA, SALMONSEN LA, JOBLING T, SIMPSON ER, CLYNE CD (2006):

Expression of aromatase, estrogen receptors, and their coactivators in patients with endometrial cancer.

Fertil Steril, 86:469-472.

PEDERSEN SB, KRISTENSEN K, HERMANN PA, KATZENELLENBOGEN JA, RICHELSEN B (2004):

Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution.

J Clin Endocrinol Metab, 89:1869-1878.

PELLETIER G (2000):

Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues.

Histol Histopathol, 15:1261-1270.

PURDIE DW (2000):

Consequences of long-term hormone replacent therapy.

Br Med Bull, 56:809-823.

RIEDE UN, WERNER M, SCHAEFER H-E:

Allgemeine und spezielle Pathologie.

5. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2004, S. 876-896.

ROESCH DM (2006):

Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats.

Physiol Behav, 87:39-44.

ROSSOUW JE, ANDERSON GL, PRENTICE RL, LACROIX AZ, KOOPERBERG C, STEFANICK ML, JACKSON RD, BERESFORD SA, HOWARD BV, JOHNSON KC, KOTCHEN JM u. OCKENE J (2002):

Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial.

JAMA, 288:321-333.

SÁNCHEZ-CRIADO JE, MARTIN DE LAS MULAS J, BELLIDO C, NAVARRO VM, AGUILAR R, GARRIDO-GARCIA JC, MALAGON MM, TENA-SEMPERE M, BLANCO A (2006):

Gonadotropin-secreting cells in ovariectomized rats treated with different oestrogen receptor ligands: a modulatory role for Erβ in the gonadotrope?

J Endocrinol, 188:167-177.

SAUNDERS PTK, MAGUIRE SM, GAUGHAN J, MILLAR MR (1997):

Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry.

J Endocrinol, 154:13-16.

SCHINDLER AE (2003):

Schilddrüse, Klimakterium und Hormontherapie.

J Menopause, 10:28-31.

SEIDLOVÁ-WUTTKE D, HESSE O, JARRY H, CHRISTOFFEL V, SPENGLER B, BECKER T u. WUTTKE W (2003):

Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (Cimicifuga racemosa) extract: comparison with estradiol-17beta.

Eur J Endocrinol, 149:351-362.

SEIDLOVÁ-WUTTKE D, PRELLE K, FRITZEMEIER K-H, WUTTKE W (2008):

Effects of estrogen receptor alpha- and beta-selective substances in the metaphysis of the tibia and on serum parameters of bone and fat tissue metabolism of ovariectomized rats.

Bone, 43:849-855.

SHIMOMURA K, SHIMIZU H, TSUCHIYA T, ABE Y, UEHARA Y, MORI M (2002):

Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy?

Endocr J, 49:417-423.

SMITH CL, CONNEELY OM, O'MALLEY W (1993):

Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone.

Proc Natl Acad Sci USA, 90:6120-6124.

ŠOŠIĆ-JURJEVIĆ B, FILIPOVIĆ B, MILOSEVIĆ V, NESTOROVIĆ N, MANOJLOVIĆ-STOJANOSKI M, BRKIĆ B, SEKULIĆ M (2005):

Chronic estradiol exposure modulates thyroid structure and decreases T4 and T3 serum levels in middle-aged female rats.

Horm Res, 63:48-54.

STAUBER M, WEYERSTAHL T:

Duale Reihe: Gynäkologie und Geburtshilfe.

2. Auflage, Thieme Verlag, Stuttgart 2005, S. 11-14, 23-24, 78-95, 133-136.

TING AY, BLACKLOCK AD, SMITH PG (2004):

Estrogen regulates vaginal sensory and autonomic nerve density in the rat.

Biol Reprod, 71:1397-1404.

TOURAINE P (2003):

SERMs et utérus.

Ann Med Interne, 2:103-108.

WADA-HIRAIKE O, HIRAIKE H, OKINAGA H, IMAMOV O, BARROS RP, MORANI A, OMOTO Y, WARNER M, GUSTAFSSON JA (2006):

Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta-/-mice.

Proc Natl Acad Sci USA, 103:18350-18355.

WANG H, ISAKSSON E, VON SCHOULTZ B, CLINE JM, SAHLIN L (2002):

The effect of long-term treatment with steroid hormones or tamoxifen on oestrogen receptors (alpha and beta) in the endometrium of ovariectomized cynomolgus macaques.

J Endocrinol, 175:673-681.

WEIHUA Z, SAJI S, MÄKINEN S, CHENG G, JENSEN EV, WARNER M, GUSTAFSSON J-A (2000):

Estrogen receptor (ER) β, a modulator of ERα in the uterus.

Proc Natl Acad Sci USA, 97:5936-5941.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Strukturformeln Östradiol (E2), Östron (E1) und Östriol (E3)	6
Abb. 1.2	Synthesestrategie der selektiven ER-Agonisten	13
Abb. 2.1	Beispiel der Dickemessungen	25
Abb. 3.1	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag innerhalb von 4 Wochen	28
Abb. 3.2	Finales Körpergewicht nach 4-wöchiger s.c. Applikation der Substanzen	29
Abb. 3.3	Wirkungen der verschiedenen Testsubstanzen nach 4-wöchiger Applikation auf das Uterusfeuchtgewicht der Ratten	30
Abb. 3.4	Fotos der Uteri:links Kontrollgruppe, rechts Östradiolgruppe	31
Abb. 3.5	Uterusquerschnitt und Epithel; Kontrolle,ovx,sf	31
Abb. 3.6	Uterusquerschnitt und Epithel; E2,ovx,sf	31
Abb. 3.7	Uterusquerschnitt und Epithel; E2+ERβ,ovx,sf	32
Abb. 3.8	Uterusquerschnitt und Epithel; ERα+ERβ,ovx,sf	32
Abb. 3.9	Uterusquerschnitt und Epithel; E2+ERβ stufig,ovx,sf	32
Abb. 3.10	Uterusquerschnitt und Epithel; ERα+ERβ stufig,ovx,sf	33
Abb. 3.11	Squamöse Metaplasie Uterus; ERα+ERβ stufig,ovx,sf	33
Abb. 3.12	Uterusquerschnitt und Epithel; sham,ovx,sf	34
Abb. 3.13	Durchschnittliche Myometriumdicke in den einzelnen Gruppen	38
Abb. 3.14	Durchschnittliche Endometriumdicke in den einzelnen Gruppen	39
Abb. 3.15	Durchschnittliche Epitheldicke in den einzelnen Gruppen	40
Abb. 3.16	Vaginalepithel; links: Kontrolle,ovx,sf, rechts: E2,ovx,sf	41
Abb. 3.17	Vaginalepithel; links: E2+ERβ,ovx,sf, rechts: ERα+ERβ,ovx,sf	41
Abb. 3.18	Vaginalepithel; links: E2+ERβ stufig,ovx,sf, rechts: ERα+ERβ stufig,ovx,sf	42
Abb. 3.19	Vaginalepithel; sham,ovx,sf	42
Abb. 3.20	Durchschnittliche Epitheldicke der Vaginae	46

Abb. 3.21 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den Östradiolspiegel im Serum der Ratten 47
Abb. 3.22 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den LH-Spiegel im Serum der Ratten 48
Abb. 3.23 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den TSH-Spiegel im Serum der Ratten 49
Abb. 3.24 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den fT3-Spiegel im Serum der Ratten 50
Abb. 3.25 Wirkung der verschiedenen Testsubstanzen auf den fT4-Spiegel im Serum der Ratten 51

8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1	Prädisponierende Östrogenrezeptorverteilung in den geschlechtsspezifischen Organen	8
Tab. 2.1	Substanzdosierungen	20
Tab. 2.2	Schema der Organentwässerung	22
Tab. 2.3	Schema der HE-Färbung	23-24
Tab. 3.1	Zusammenfassung der histomorphologischen Ergebnisse im Uterus der ovx und substanzbehandelten Ratten	37
Tab. 3.2	Zusammenfassung der histomorphologischen Ergebnisse in der Vagina der ovx und substanzbehandelten Ratten	45

Danksagung:

Primär danke ich Herrn Professor Dr. W. Wuttke für die Überlassung des Themas und die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner fachlichen und wissenschaftlichen Supervision zu schreiben.

Ich danke Dr. Dana Seidlovà-Wuttke für ihre stetige Unterstützung und ihre Offenheit.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen, hier besonders Heidi und Martina, danke ich für die gute Einarbeitung, die Hilfe und die freundliche Zusammenarbeit. Dem restlichen Team der Abteilung für Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Frauenklinik danke ich ebenfalls für die Hilfe und die Kollegialität in guter Atmosphäre.