

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

**Der Einfluss von 20-Hydroxyecdysen und 17 β -Östradiol auf das
Colonepithel und die Serumfette der ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratte
als Therapiemodell der postmenopausalen Frau**

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

vorgelegt von

Manuela Bein

aus Köthen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. Raddatz

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2011

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Inhaltsverzeichnis	4
Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	9
1.1. Klimakterium	9
1.2. Hormonersatztherapie	9
1.3. 17β-Östradiol	10
1.3.1. Östrogenrezeptor und Unterteilung in ERα und ERβ	10
1.3.2. Wirkung von Östrogenen auf das Colonepithel und Bedeutung von ERβ	11
1.4. Untersuchtes Organ: Colon (Dickdarm)	12
1.4.1. Entstehung von malignen Prozessen im Colon	12
1.4.2. Anatomie, Histologie und Physiologie	12
1.5. Serumlipide	15
1.5.1. Cholesterin	15
1.5.2. LDL	16
1.5.3. HDL	16
1.5.4. Triglyceride	16
1.5.5. Wirkung von Fetten auf das Colonepithel und die Entstehung von neoproliferativen Läsionen	17
1.5.6. Leptin	18
1.5.7. Wirkung von Leptin auf das Colonepithel	18
1.5.8. Wirkung von Östrogenen auf die Serumlipide	19
1.6. Ratte als Modell	20
1.7. 20-Hydroxyecdysen	21

1.7.1.	Struktur und Metabolisierung von 20-Hydroxyecdysen	21
1.7.2.	Ecdysenrezeptor	22
1.7.3.	Ecdysenwirkungen	22
1.7.4.	Wirkung von Ecdysteroiden auf das Colon	23
1.7.5.	Wirkung von Ecdysteroiden auf Serumlipide und Leptin	23
1.8.	Ziel dieser Arbeit	24
2. Material und Methoden		Seite 25
<hr/>		
2.1.	Versuchsdurchföhrung	25
2.2.	Hämatoxylin- Eosin- Färbung (HE-Färbung)	27
2.3.	Immunhistochemische Färbung (PCNA- Färbung)	28
2.4.	Auswertung der histologischen Colonschnitte	29
2.5.	Bestimmung der Serumlipide	31
2.6.	Auswertung mit dem Computer	31
3. Ergebnisse		Seite 32
<hr/>		
3.1.	Körpergewicht	32
3.2.	Futtermaufnahme	33
3.3.	Ergebnisse der Messungen im Colonepithel	34
3.3.1.	Mukosaschichtdicke des Colons	34
3.3.2.	Zellproliferation	35
3.4.	Bestimmung der Serumlipide	37
3.4.1.	Serumcholesterin	37
3.4.2.	Low-Density-Lipoprotein (LDL)	38
3.4.3.	High-Density- Lipoprotein (HDL)	39
3.4.4.	Triglyceride	40
3.4.5.	Leptin	41
3.4.6.	Korrelationsanalyse: Abhängigkeit von PCNA-positiven Zellen	42

und den einzelnen Serumfettparametern

4. Diskussion	Seite	43
4.1. Studienziel		43
4.2. Körpergewicht und Futtermittelaufnahme		43
4.3. Einfluss von Östradiol und Ecdyson auf die Mukosa des Colons		45
4.3.1. Mukosaschichtdicke		45
4.3.2. Zellproliferation		47
4.4. Einfluss von Östradiol und Ecdyson auf die Serumlipide		50
4.4.1. Serumcholesterin		50
4.4.2. LDL		51
4.4.3. HDL		52
4.4.4. Triglyceride		53
4.4.5. Leptin		55
4.5. Bezug der Serumlipide auf die Proliferation im Dickdarmepithel		56
5. Zusammenfassung	Seite	57
5.1. Mukosaschichtdicke		57
5.2. Proliferation im Colonepithel		57
5.3. Serumcholesterin		58
5.4. LDL		58
5.5. HDL		58
5.6. Triglyceride		58
5.7. Leptin		59
5.8. Fazit		59
6. Methodischer Anhang	Seite	61
7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	Seite	65
8. Literaturverzeichnis	Seite	67

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonucleinacid
20E	20-Hydroxyecdyson
E ₂	17β-Östradiol
Ecd	(β-)Ecdyson/ 20-Hydroxyecdyson
ER	Östrogenrezeptor
Fa.	Firma
g	Gramm
HDL	High Density Lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRT	Hormonersatztherapie
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
KO	Kontrollgruppe
LDL	Low Density Lipoprotein(s)
m	Meter
Min/min	Minute
µm	Mikrometer

ovx	ovariectomiert
Ovx	Ovariectomie
p	p-Wert (=Signifikanzwert)
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
p.o.	per os
S.-D.-Ratte	Sprague-Dawley-Ratte
sec	Sekunde
sf	sojafrei
S-Phase	Synthese-Phase
Std	Stunde
VLDL	Very Low Density Protein(s)
x	mal

1. Einleitung

Als wesentlicher Bestandteil des Verdauungstraktes nimmt der Dickdarm eine bedeutende Position ein. Umso problematischer ist es, wenn er seine Aufgaben durch Entstehung von Tumoren und damit verbundenen therapeutischen Vorgehensweisen nicht mehr wahrnehmen kann. Doch warum kommen Tumore des Colons weltweit in unterschiedlicher Häufigkeit vor? Warum ist die Prävalenz in der westlichen Welt größer als in Asien? Es scheint unterschiedliche Gründe dafür zu geben. So könnten die unterschiedlichen Ernährungsweisen von Bedeutung sein. Während in Asien insbesondere Fisch oder Algen sowie Sojaprodukte die Hauptnahrungsquelle darstellen, so sind es in den westlichen Ländern andere Nahrungsmittel, wie Fast-Food und Fleisch, die auf dem Speiseplan stehen. Doch Ernährungsweisen könnten nicht die einzige Ursache für proliferative Prozesse im Dickdarmepithel darstellen. Ist es nicht verwunderlich, dass in Studien an postmenopausalen Frauen, welche keine medikamentöse Hormontherapie erfahren, die Rate an Neoplasien im Dickdarmepithel höher ist, als bei denjenigen, welche Hormonersatzpräparate zu sich nehmen (*Hoffmeister et al. 2007*) Östrogene als Modulatoren diverser Prozesse im weiblichen Organismus könnten also auch bedeutende Wirkungen auf den Dickdarm besitzen. Diese unterschiedlichen, anscheinend protektiven, Einflüsse durch orale Substitution von Östradiol und β -Ecdyson sollen in dieser Arbeit am Modell der ovariectomierten Ratte evaluiert werden unter zusätzlicher Betrachtung der Serumfettparameter.

1.1. Klimakterium

Das Klimakterium entspricht der Übergangsphase vom reproduktiven Alter der Frau in die Phase der Erschöpfung der generativen Funktion und der damit verbundenen Abnahme der Östrogensekretion des Ovars. Die Menge der postmenopausal gebildeten Östrogene ist deshalb durchschnittlich viel geringer im Vergleich zum reproduktiven Alter (*Kuller et al. 1990*).

1.2. Hormonersatztherapie

Ziel der Hormonersatztherapie (HRT) ist es, die durch den Mangel an Östrogenen hervorgerufenen klimakterischen Beschwerden zu minimieren oder ganz aufzuheben. Dafür

stehen verschiedene Präparate zur Verfügung. Seit längerer Zeit werden Östrogene, Östrogen- Gestagen-Kombinationspräparate und Gestagene eingesetzt. Da diese Substanzen teilweise mit Nebenwirkungen verbunden sind, wird ihre Anwendung stark diskutiert. Somit besteht die Notwendigkeit für neue Präparate, welche geringere negative Nebeneffekte besitzen. Beispielsweise gewinnt die Anwendung der Phytotherapie an Bedeutung. So sollen die in Pflanzen vorhandenen Phytoöstrogene wie Genistein oder Daidzen ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen als die synthetisch hergestellten, herkömmlichen, Präparate (*Brzezinski und Debi 1999*). Auch bei anderen, in Pflanzen vorhandenen, Substanzen wie den Phytoecdysteroiden mit ihrem Hauptvertreter β -Ecdyson wurden schon positive Effekte im Menschen aufgezeigt. Ob sie eventuell als Alternative zur herkömmlichen HRT mit vergleichbaren protektiven Eigenschaften für den Darm geeignet sind, muss noch erwiesen werden. Ein Ansatz soll diesbezüglich in der hiermit vorgelegten Arbeit erfolgen.

1.3. 17 β -Östradiol

1.3.1. Östrogenrezeptor und Unterteilung in ER α und ER β

Östrogene besitzen diverse Funktionen im menschlichen Organismus, welche die Bindung an einen spezifischen Rezeptor voraussetzen. Dieser Östrogenrezeptor (ER) gehört zu der Gruppe der Steroidhormonrezeptoren und befindet sich intrazellulär (*Evans 1988*). Nach entsprechender Ligandenbindung erfolgt die Bindung an bestimmte DNA-Abschnitte, was zur Aktivierung oder Inhibition der Transkription führt (*Klinge 2000*). Somit besitzen Östrogene die Funktion, Gene durch Aktivierung oder Inaktivierung zu regulieren. Bei dem verwendeten Östrogen in meiner Arbeit handelt es sich um 17 β -Östradiol, für welches ich die Abkürzung E₂ verwende.

Für die Regulation von Genen sind bisher zwei verschiedene Östrogenrezeptoren bekannt, welche mit ER α (*Green et al. 1986*) und ER β (*Kuiper et al. 1996; Mosselman et al. 1996*) bezeichnet werden. Beide Rezeptortypen binden E₂ mit annähernd gleicher Affinität (*Kuiper et al. 1997*). Funktionell wurde ER β bisher eine proliferationshemmende Funktion nachgesagt sowie eine regulierende Funktion für ER α (*Hall und McDonnell 1999*).

Nicht nur der funktionelle Unterschied zwischen ER α und ER β steht im Interesse der Forscher, sondern auch deren unterschiedliche Verteilung in den Organen. ER α ist vor allem im Endometrium des Uterus (*Enmark et al. 1997*), in den Thekazellen des Ovars (*Sar und*

Welsch 1999), im Knochen (Arts et al. 1997), im Brustgewebe (Saji et al. 2000) und im weißen Fettgewebe vorhanden. ER β dagegen ist zu einem großen Anteil im Epithel der Prostata, im Colon, im Lungenparenchym (Enmark et al. 1997) und in den glatten Muskelzellen des Gefäßendothels lokalisiert (Hodges et al. 2000). Aufgrund der unterschiedlichen Östrogenrezeptorverteilung im Körper und deren strukturellen Unterschiede erfolgt die Schlussfolgerung, dass beide Rezeptoren spezifische Funktionen besitzen.

1.3.2. Wirkung von Östrogenen auf das Colonepithel und Bedeutung von ER β

Wie bereits erwähnt, befinden sich auch im Dickdarm Östrogenrezeptoren. Der vorherrschende Östrogenrezeptor ist ER β , der zum größten Anteil im Zellkern der Enterozyten des luminalen Epithels und im Bereich des oberen Kryptendrittels lokalisiert ist (Konstantinopoulos et al. 2003). Zu einem geringen Prozentsatz befindet sich ER α in der Colonmukosa im Bereich der Kryptenbasis (Foley et al. 2000). Insbesondere ER β ist für das Dickdarmepithel von Bedeutung. So erfolgt über diesen Rezeptor die Regulation der Proliferation, Apoptose und Differenzierung der Zellen (Wada-Hiraike et al. 2006a; Martineti et al. 2005). Ein Gleichgewicht zwischen Produktion von neuen Zellen und Abstoßung von alten Zellen wird somit gewährleistet. In Studien an postmenopausalen Frauen, deren Östrogenspiegel bekanntlich auf einem niedrigen Niveau liegen, wurde herausgefunden, dass in diesem Lebensabschnitt der Frau die Wahrscheinlichkeit für Malignome des Dickdarmes erhöht ist. Im Gegensatz dazu senken Östrogene, im Rahmen einer HRT eingesetzt, das Risiko von Dickdarmkrebs und wirken protektiv (Hoffmeister et al. 2007). Wie diese Wirkung vermittelt wird, ist bisher noch nicht hinreichend geklärt (Campbell-Thompson et al. 2001). Zusätzlich konnte für E₂ eine direkte, zellproliferationssenkende Wirkung aufgezeigt werden (Altunbas et al. 2007). Weiterhin erfolgte die Erkenntnis, dass ER β in Colonkarzinomen und -adenomen im Vergleich zu dem normalen Colonepithel in einem geringeren Ausmaß exprimiert wird, während die Expression von ER α konstant bleibt (Foley et al. 2000; Konstantinopoulos et al. 2003). Der Verlust von ER β könnte deshalb die Ursache für die neoproliferativen Prozesse darstellen. So wurde in Studien an ER β ^{-/-} knockout-Mäusen entdeckt, dass die Zellproliferation im Colonepithel in diesen Tieren im Vergleich zu Wildtypmäusen, mit einer normalen Expression von ER β , um das 1,6 fache gesteigert ist. Weiterhin waren in diesen Knockout-Mäusen nur sehr wenige apoptotische Zellen, aber zusätzlich undifferenzierte Zellen vorhanden. Bei den Wildtyp-Mäusen konzentrierten sich

die apoptotischen Zellen auf den Bereich des Lumens. Hinzufügend bestand bei diesen genetisch nicht manipulierten Tieren eine höhere Differenzierung der Zellen im Vergleich zu den ERβ^{-/-}-knockout-Mäusen (*Wada-Hiraike et al. 2006a; Wada-Hiraike et al. 2006b*). Da Neoplasien im Allgemeinen durch eine erhöhte Proliferation sowie einen geringeren Differenzierungsgrad von Zellen und eine geringere Apoptoserate gekennzeichnet sind (*Bedi et al. 1995*), kann die Ursache von Dickdarmmalignomen somit in dem Verlust von ERβ begründet sein.

1.4. Untersuchtes Organ: Colon (Dickdarm)

1.4.1. Entstehung von malignen Prozessen im Colon

In Deutschland steht Dickdarmkrebs sowohl bei den Frauen als auch bei den Männern an zweiter Position tödlicher Krebserkrankungen. Nur Brusttumoren bei den Frauen und Lungentumoren bei den Männern sind mit einer höheren Letalität verbunden (*Robert-Koch-Institut 2008*). Somit nehmen Colonkarzinome einen großen Stellenwert in der Medizin ein und bedürfen näherer Betrachtung. Insbesondere die Tatsache, dass die Rate an Dickdarmkrebs bei postmenopausalen Frauen zunimmt, ist von Relevanz (*Robert-Koch-Institut 2008*).

Pathogenetisch entsteht Dickdarmkrebs aus intraepithelialen Neoplasien, wobei diese zu über 90% als Adenome auftreten und vom Epithelgewebe der Dickdarmschleimhaut ausgehen (*Herold 2008*). Über Dysplasien entstehen aus diesen Neoplasien Karzinome, welche die Tunica mucosa überschreiten und in ihrem Verlauf benachbarte Strukturen infiltrieren können (*Hill et al. 1978*).

1.4.2. Anatomie, Histologie und Physiologie

Als Teil des Magen-Darmtraktes stellt der Dickdarm die Verbindung zwischen Dünndarm und Anus dar. Der Dickdarm des Menschen, welcher eine Länge von circa 1,5 m besitzt, weist den gleichen anatomischen Aufbau sowie Funktionen der Wasser- und Elektrolytresorption wie jener der Ratte auf, sodass im Folgenden eine gemeinsame Abhandlung mit Hinweis auf bestehende Unterschiede erfolgt.

Anatomisch untergliedert sich dieses bei der Ratte 15 cm lange Organ in verschiedene Segmente: Caecum mit Appendix vermiformis, Colon ascendens, Colon transversum, Colon descendens, Colon sigmoideum und Rectum (*Krinke 2000*).

Histologisch besteht der Dickdarm, von luminal betrachtet, aus mehreren Schichten: der Tunica mucosa, der Tela submucosa und der Tunica muscularis. In der Mukosa befindet sich luminal die Lamina epithelialis, eine hochprismatische Epithelschicht, welche dichte, unverzweigte Krypten mit einer Länge von circa 250µm aufweist (*Vieira de Sousa et al. 2008*). Die Epithelzellen werden als Enterozyten oder Saumzellen bezeichnet und tragen Mikrovilli. Letztere bilden den Bürstensaum und ermöglichen eine optimale Wasser- und Elektrolytresorption. Die Resorption anderer Nahrungsbestandteile, wie Kohlenhydrate und Fette, erfolgt insbesondere durch die Dünndarmschleimhaut (*Benninghoff und Drenckhahn 2003*). In Studien konnte gezeigt werden, dass vor allem die luminalen Epithelzellen und die Enterozyten im oberen Drittel der Krypte ERβ im Zellkern, sowie im Zytoplasma, aufweisen. Im Gegensatz dazu befindet sich ERα in Zellen im Bereich der Kryptenbasis, insbesondere in den Progenitorzellen (*Konstantinopoulos et al. 2003; Foley et al. 2000*). Neben den Saumzellen befinden sich hauptsächlich Becherzellen in der Epithelschicht, deren Funktion in der Schleimproduktion besteht (*Sakata und Engelhardt 1981*). Die Schleimschicht auf dem Epithel dient der Protektion des darunter befindlichen Gewebes und macht den Darminhalt gleitfähiger (*Forstner 1978*). Weiterhin existieren in den Krypten Stammzellen und enterochromaffine Zellen (*Benninghoff und Drenckhahn 2003*).

Aus den basal gelegenen Zellen der Krypten, die auch als Glandulae intestinales bezeichnet werden, erfolgt die Zellproliferation. So sorgen Stammzellen, welche am Kryptengrund lokalisiert sind, für einen ständigen Nachschub intestinaler Zellen durch Stimulation von Progenitorzellen. Jene Vorläuferzellen differenzieren sich zu den im Dickdarmepithel vorkommenden Zelltypen und wandern dabei in Richtung Lumen, sodass eine Regeneration des intestinalen Epithels gesichert ist (*Benninghoff und Drenckhahn 2003*). Dieser Differenzierungsprozess endet luminal mit Apoptose und Abschilferung und dauert, je nach Colonabschnitt, 25-58 Stunden. Diese Zeitspanne wird auch als Zell-Zyklus-Rate bezeichnet (*Sunter et al. 1979*). Diese Zellabstoßung dient der Regulation überschießender Proliferation.

Zur Bestimmung von proliferierenden Zellen stehen heutzutage verschiedene Methoden zur Verfügung. Insbesondere die PCNA-Färbung, welche proliferierende Zellen in der Synthesephase (S-Phase) fixiert, ermöglicht es, entsprechende Zellen am Grund der Krypte im Dickdarmepithel zu detektieren (*Kubben et al. 1994*). PCNA entspricht hierbei der Abkürzung für „Proliferating Cell Nuclear Antigen“, einem Protein im Zellkern, das die DNA-Replikation, DNA-Reparatur und Zellzyklusregulation unterstützt (*Essers et al. 2005*). PCNA korreliert

direkt mit der DNA-Syntheserate. Mithilfe eines Antikörpers, der an dieses Protein bindet, kann die immunhistochemische Darstellung von Zellen, welche sich im Zellteilungsprozess befinden, erfolgen.

An die Mukosa angrenzend, befindet sich die Submukosa. Auch in dieser histologischen Schicht des Colons konnte ER β in den glatten Muskelzellen sowie in den Endothelzellen größerer Arteriolen nachgewiesen werden (*Campbell-Thompson et al. 2001*). Abschließend folgt die Tunica muscularis, welche durch eine innere zirkulär und eine äußere longitudinal verlaufende Muskelschicht die Darmwand des Dickdarms stabilisiert und die Peristaltik des Darmes beeinflusst. Dem schließt sich die Serosa der äußeren Darmwand an und bildet die Grenze zu benachbarten Geweben und Organen (*Krinke 2000*).

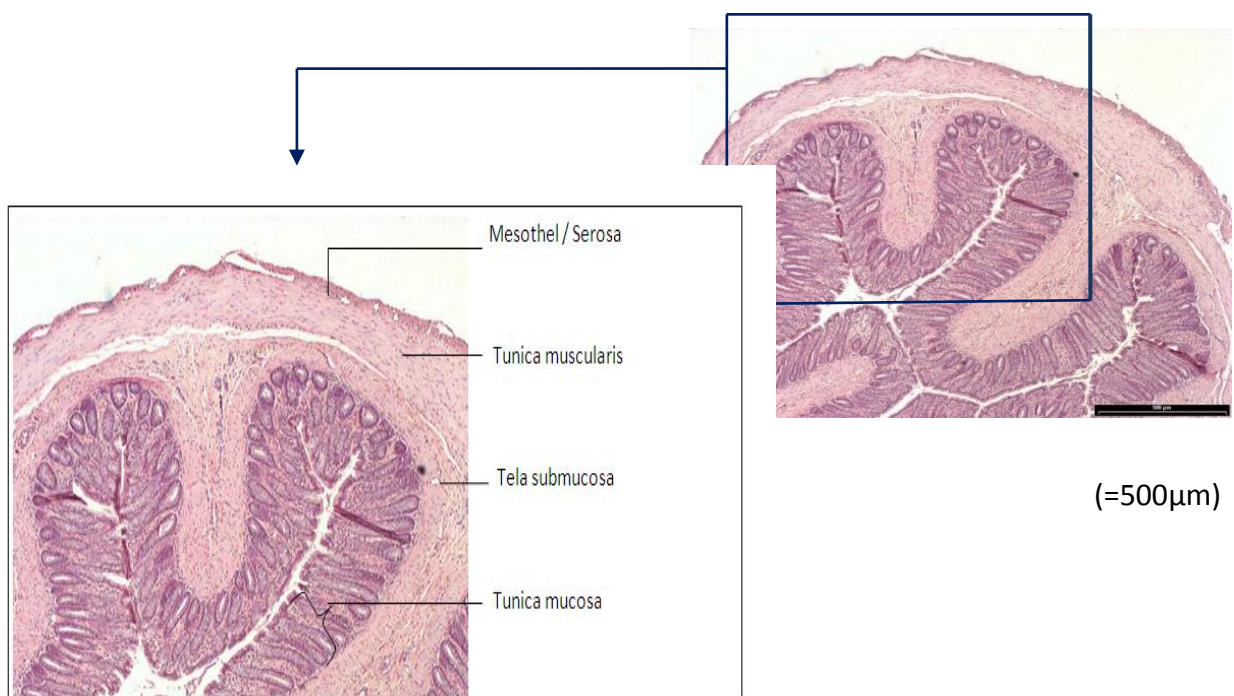


Abb. 1: Wandaufbau des Colons der Ratte in der Übersicht (Vergrößerung 3,125x; HE)

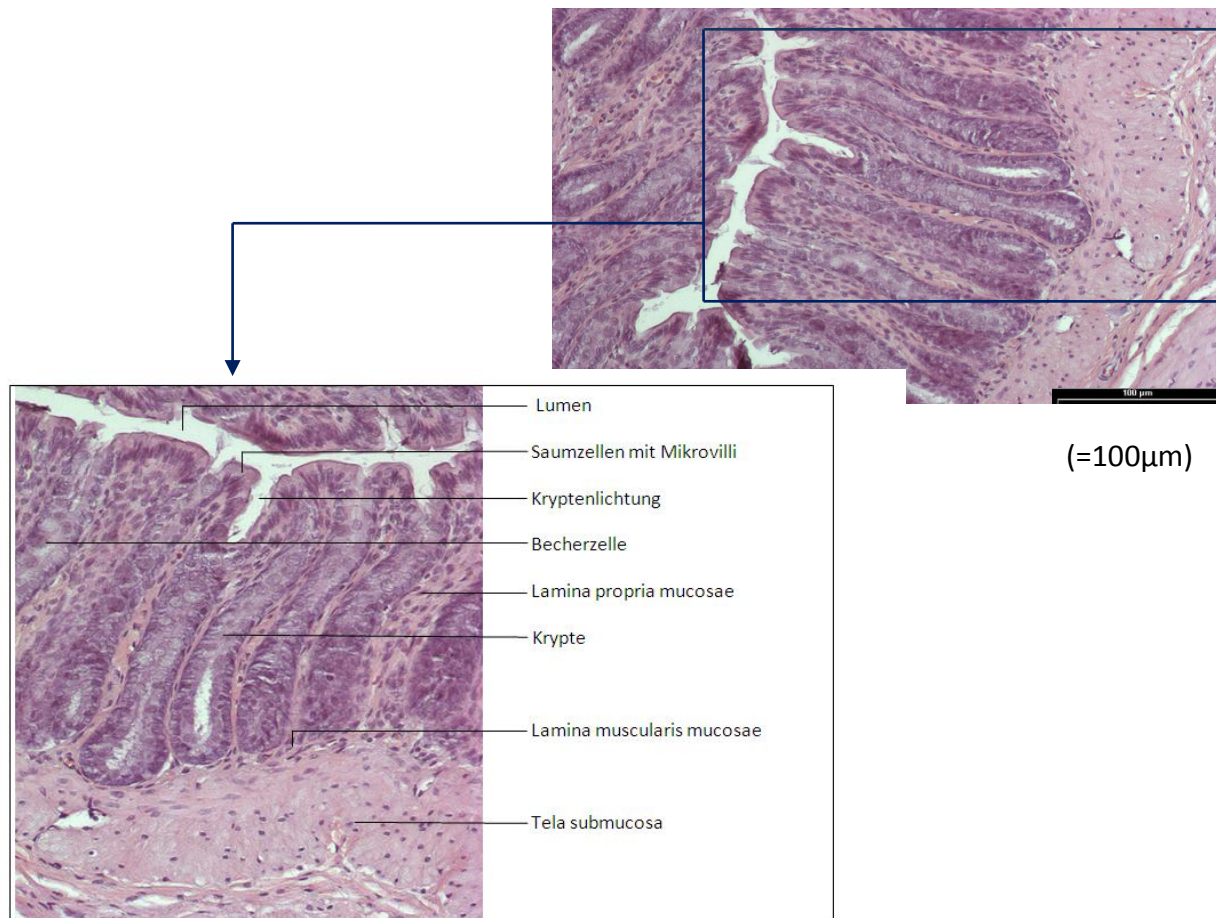


Abb. 2: histologischer Aufbau der Tunica mucosa (Vergrößerung 12,5x; HE)

1.5. Serumlipide

1.5.1. Cholesterin

Cholesterin besitzt mehrere Funktionen im Organismus. Es ist Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen (*Singer und Nicolson 1972; Kuchinskiene und Carlson 1982*), sowie Ausgangsstoff für die Biosynthese von Steroidhormonen und Gallensäuren (*Stone und Evans 1992*). Per Resorption durch die Enterozyten des Dünndarms gelangt Cholesterin in den Organismus und wird nach dem Einbau in Chylomikronen zur Leber transportiert (*Iqbal et al. 2003*). Dort erfolgt die Freisetzung von Cholesterin, welches daraufhin für den Einbau in Lipoproteine zur Verfügung steht. Diese Lipoproteine transportieren Cholesterin zu entsprechenden Zielorganen.

1.5.2. LDL

Low density lipoproteins, LDL, sind Lipoproteine mit einer geringen Dichte. Sie entstehen aus VLDL (Very Low Density Proteins) nach der Abgabe von Triglyceriden und bestehen vor allem aus Cholesterinestern und dem Apolipoprotein ApoB-100. LDL dienen dem Transport von Cholesterin zu den peripheren Zellen (*Nelson und Cox 2005*). Diese Zielzellen exprimieren LDL-Rezeptoren. LDL-Partikel binden, ApoB-100 und Apo-E vermittelt, an diese Rezeptoren und werden endozytiert. Die Zielzellen lagern Cholesterin in die Zellmembran ein oder speichern es als Cholesterinester in Lipidtröpfchen. Durch das aufgenommene Cholesterin wird die endogene Cholesterinproduktion der Zelle gesenkt. LDL, die nicht an Rezeptoren in der Peripherie gebunden haben, werden mit dem Blutfluss zur Leber transportiert und dort von den Hepatozyten aufgenommen (*Brown und Goldstein 1976*). Aufgrund des hohen Triglycerid- und Cholesterinanteils sind VLDL als die schädlichsten Lipoproteine, mit dem höchsten Atheroskleroserisiko, anzusehen (*Hodis 1999*).

1.5.3. HDL

Als HDL werden High Density Lipoproteins, also Lipoproteine mit einer sehr hohen Dichte bezeichnet. Funktionell besteht ihre Aufgabe in dem Cholesterintransport aus der Peripherie zur Leber (*Arbeeny et al. 1987*). In der Leber erfolgt die Abgabe überschüssigen Cholesterins an die Gallenflüssigkeit (*Mackinnon et al. 1987*). Dadurch wird verhindert, dass Makrophagen zu viel dieser Fette akkumulieren. Das Arteriosklerose-Risiko sinkt somit (*Tall 2008; Libby et al. 1996*). Deshalb werden HDL auch als „gute“ Fette angesehen.

Bei der Ratte stellen HDL die bedeutende Lipidfraktion dar, da sie etwa 60-70% des Cholesterinpools einnehmen (*Lundeen et al. 1997*). Bei menschlichen Individuen nehmen LDL diese Position ein.

1.5.4. Triglyceride

Triglyceride sind Ester aus einem Molekül Glycerin und drei Fettsäuren. Sie werden von den Darmzellen resorbiert und in Chylomikronen eingebaut, welche per Lymphpassage in den Kreislauf eingespeist werden (*Iqbal et al. 2003; Lee 1986*). In der Peripherie geben diese Partikel freie Fettsäuren an die Zellen ab, unter vorheriger Beteiligung der Lipoproteinlipase (*Blanchette-Mackie et al. 1989*). Der Transport der dann als Remnants bezeichneten, übriggebliebenen, Partikel zur Leber erfolgt anschließend mit dem Blutstrom. Dort werden sie von

den Hepatozyten endozytiert (*Faria et al. 1996*). Weiterhin werden Triglyceride auch endogen synthetisiert. Die Produktion jener Fette findet insbesondere in der Leber statt. Die Leber-Triglyceride verlassen als VLDL den Syntheseort und gelangen mit dem Blutkreislauf zur Peripherie (*Kay und Entenman 1961*). Funktionell stellen Triglyceride einen Energielieferanten dar und können in Form von Depotfett in den Adipozyten des weißen Fettgewebes gespeichert werden. Bei Energiebedarf erfolgt die Lipolyse im Fettgewebe durch Lipasen (*Langin et al. 2005*), sodass die Triglyceride daraufhin zur Energiegewinnung vor allem für die Herz- und Skelettmuskulatur zur Verfügung stehen (*Schoiswohl et al. 2010*).

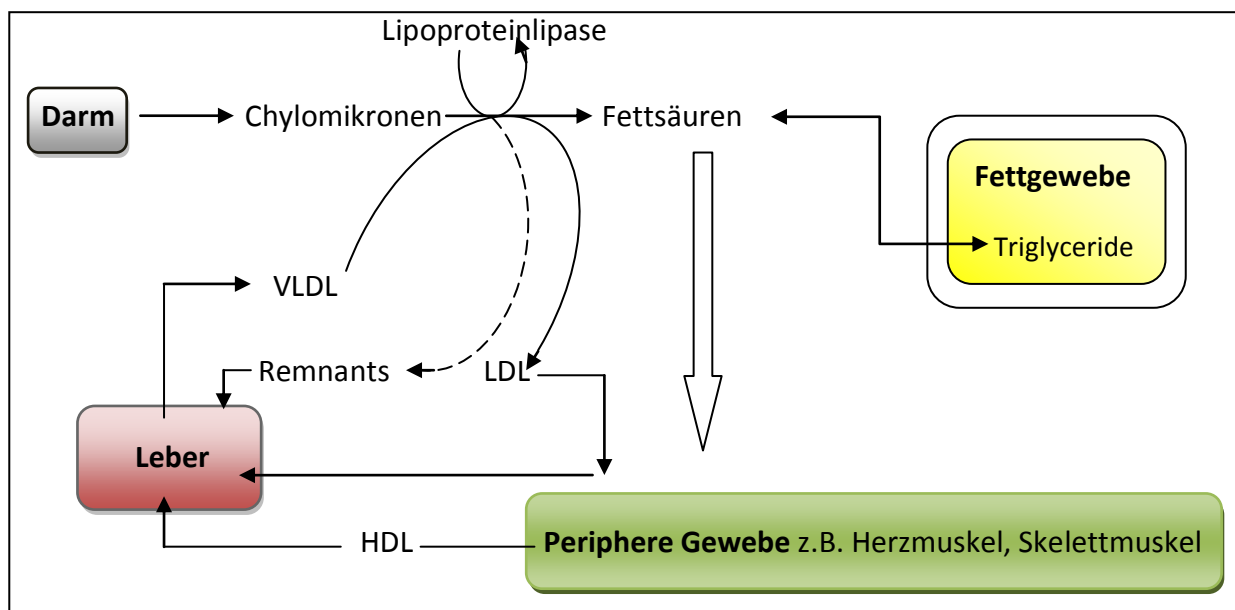


Abb. 3: Überblick über den Lipoprotein-Stoffwechsel

1.5.5. Wirkung von Fetten auf das Colonepithel und die Entstehung von neoproliferativen Läsionen

Wie seit längerem bekannt, haben hohe Fettwerte negative Auswirkungen auf den Organismus, indem sie zu arteriosklerotischen Veränderungen führen (*Robinson et al. 2009*). Doch nicht nur auf die Gefäße, sondern auch auf den Dickdarm kann der Einfluss der Serumfette gravierende Bedeutung besitzen. Obwohl einige Studien eine umgekehrt proportionale Beziehung zwischen Cholesterinwerten und Dickdarmkrebsinzidenz aufzeigen, deuten die meisten Resultate innerhalb klinischer Untersuchungen auf eine direkte Proportionalität zwischen hohen Cholesterinwerten und der Rate an Colonkarzinomen hin (*Fiorenza et al. 2000*). So wurde in Studien an Frauen eine positive Korrelation zwischen

Adenomen des Dickdarms und erhöhten LDL- und Cholesterinwerten entdeckt. Die HDL-Werte waren bei jenen Versuchspersonen verringert (*Bayerdörffer et al. 1993*). Gleiche Ergebnisse konnten auch unter der Therapie mit Statinen abgeleitet werden. So verringerten sich die LDL-Serumwerte unter Statintherapie bei Patienten mit bereits bekannten Dickdarmadenomen. Verbunden damit war auch eine Inzidenzminderung der adenomatösen Polypen (*Siddiqui et al. 2009*).

1.5.6. Leptin

Bei der Substanz Leptin handelt es sich um ein aus Aminosäuren bestehendes Hormon, welches von Adipozyten gebildet wird. Die Freisetzung erfolgt bei ausreichender Nahrungs- bzw. Energiezufuhr. Leptin nimmt eine Appetit- und Gewichts-regulierende Position ein. Derzeit sind 6 Rezeptorisoformen für Leptin bekannt, wobei der Ob-Rb-Rezeptor, welcher im Hypothalamus lokalisiert ist, die größte Bedeutung besitzt (*Tartaglia et al. 1995*). Über eine Kopplung von Leptin an diesen Rezeptor erfolgt die Hemmung der Nahrungsaufnahme. Gleichzeitig hemmt Leptin das Neuropeptid Y im Hypothalamus, dessen Funktion in der Steigerung von Appetit besteht (*Yokosuka et al. 1998; Niimi et al. 2001*). Bei ungenügender Energiezufuhr mit der Nahrung sinken die Leptinspiegel und die gegensätzlichen Prozesse werden aktiviert. Im Allgemeinen korrelieren die Leptin-Serumwerte direkt mit der Masse des Fettgewebes beziehungsweise dem Body-Mass-Index (*Tamakoshi et al. 2005; Meli et al. 2004*). Postmenopausal, durch die verminderte Östrogensynthese und der daraus resultierenden Hyperlipoproteinämie bedingt, steigt die Fettmasse häufig und somit die Leptinserumwerte. In Experimenten an ovariectomierten Ratten konnte gezeigt werden, dass unter E₂-Substitution diese Effekte umgekehrt werden können. Eine Normalisierung der Leptinwerte auf ein physiologisches Niveau ist die Folge (*Seidlová-Wuttke et al. 2010; Meli et al. 2004*). Da weitere Studien allerdings gegenteilige Ergebnisse, das heißt eine Steigerung der Leptinspiegel im Serum unter Östrogen substitution, erzielt haben, bedarf es weiterer Untersuchungen von Leptin und dessen Interaktion mit Östrogenen (*Alonso et al. 2007; Machinal et al. 1999*).

1.5.7. Wirkung von Leptin auf das Colonepithel

Nicht nur Leptin, sondern auch Karzinome wie das Colon-Karzinom korrelieren mit einer erhöhten Körperfettmasse (*Tamakoshi et al. 2005*). So wurde entdeckt, dass gesteigerte Serumleptinwerte mit einem dreifach erhöhten Risiko, an Dickdarmkrebs zu erkranken,

einhergehen (*Stattin et al. 2004*). Da für Leptin entsprechende Rezeptoren im normalen und adenomatös veränderten Colonepithel sowie eine proliferationssteigernde Wirkung auf jene Epithelschicht nachgewiesen wurden, kann ein Zusammenhang zwischen erhöhten Leptinwerten und einem gesteigerten Risiko für Dickdarmkrebs gesehen werden (*Hardwick et al. 2001*).

1.5.8. Wirkung von Östrogenen auf die Serumlipide

Wie schon länger bekannt, besitzt E₂ nicht nur Aufgaben bezüglich der Reproduktion, sondern auch im Lipidmetabolismus. So wurde in Studien an intakten Ratten eine fetttsenkende Wirkung dieses Steroidhormones aufgezeigt. Neben der Senkung des Serum-Cholesterins findet durch E₂ auch eine Verminderung von LDL und Triglyceriden im Blut statt. Hinzufügend sorgt E₂ für eine Erhöhung des protektiven HDL (*Parini et al. 2000*). Postmenopausal erfolgt eine Steigerung des LDL-Cholesterins sowie die Abnahme von HDL (*Jensen et al. 1990*). In Studien an ovariectomierten Ratten konnte dargestellt werden, dass unter E₂-Substitution eine Reduktion von HDL, LDL und Cholesterin resultiert (*Kuller et al. 1990; Liu D und Bachmann 1998*). Die Verminderung von LDL ist durch eine gesteigerte Synthese des LDL-Rezeptors der Leber, stimuliert durch E₂, zu begründen (*Parini et al. 1997; Cooper et al. 1987*). Jener Rezeptor führt zu einer vermehrten Aufnahme von LDL aus dem Blut (*Parini et al. 2000*). Das gleiche Prinzip dieser hypocholesterämischen Östrogenwirkung erfolgt auch prämenopausal. Einige Studien demonstrierten eine Erhöhung der Triglyceride nach der Ovariectomie durch Östrogene (*Seidlová-Wuttke et al. 2010; Hamosh und Hamosh 1975*), andere zeigen keinen Einfluss auf die Triglyceride (*Suda et al. 1998*). Ähnliche Effekte konnten auch bei weiblichen, menschlichen Individuen aufgezeigt werden. Beispielweise führte die E₂-Substitution bei postmenopausalen Frauen zu einer Erhöhung der Triglyceride und einer Reduktion der LDL-Fraktion im Serum (*Walsh et al. 1991*).

Aufgrund der Tatsache, dass HDL in Ratten die Rolle des dominanten Lipoproteins einnimmt und der LDL- Rezeptor hauptsächlich an Apo-E bindet, welches in diesen Tieren in HDL und LDL vorkommt, sinken nicht nur die LDL-Serumspiegel, sondern auch die HDL-Werte unter Östrogensubstitution. Im Gegensatz dazu besitzt der LDL-Rezeptor des Menschen eine geringere Affinität zu Apo-E. So sinkt bei diesen primär LDL (*Lundeen et al. 1997; Windler et al. 1980*). Ein weiterer Effekt der Östrogenwirkung ist die Steigerung des Katabolismus von LDL in der Leber.

	Ratte	Mensch
Dominanter Lipoproteintyp	HDL	LDL
Östrogenwirkung auf die Serumfettparameter	LDL↓	LDL↓
	HDL↓	HDL↑
	Triglyceride ↔	Triglyceride ↑

Tabelle 1: Vergleich der Lipoproteine von Ratte und Mensch unter Östrogeneinfluss

1.6. Ratte als Modell

Schon seit längerer Zeit ist die Sprague-Dawley-Ratte (S.-D.-Ratte) ein beliebtes Tiermodell in Experimenten. Zum einen benötigt sie wenig Platz und Nahrungszufuhr, was die Haltung der Tiere in Käfigen erleichtert. Zum anderen hat die Ratte, wie seit längerem erforscht, dem Menschen ähnliche endokrine Regulationskreise. Durch eine kürzere Lebensspanne wird die Durchführung von Studien mit überschaubarem Zeitraum ermöglicht. So stellt die Ovariectomie (Ovx) weiblicher Ratten eine Möglichkeit dar, diese Tiere in einen postmenopausalen Zustand zu versetzen, ähnlich dem weiblicher menschlicher Individuen, was die Durchführung vergleichender Experimente zulässt (Liu D und Bachmann 1998). Aufgrund ähnlicher anatomischer und histologischer Verhältnisse der Ratte und des Menschen bestehen weiterhin Voraussetzungen für Untersuchungen entsprechender histologischer Gewebsveränderungen durch die jeweiligen eingesetzten Substanzen. Die bei Ratten erzielten Ergebnisse stellen somit eine Grundlage für die Übertragung möglicher Effekte auf den Menschen dar.

1.7. 20-Hydroxyecdysen

Ecdysen ist ursprünglich als Häutungshormon von Insekten in den 1960er Jahren bekannt geworden (Karlson 1966). Aufgrund des Interesses, diese Vorgänge in Arthropoden zu untersuchen und entsprechende Insektizide zu entwickeln (Soriano et al. 2004), erfolgten weitere Nachforschungen, welche zur Identifizierung der chemischen Struktur von 20-Hydroxyecdysen und weiteren Ecdysteroiden, vor allem in Pflanzen, führte (Dinan et al. 2001).

1.7.1. Struktur und Metabolisierung von 20-Hydroxyecdysen

Da Ecdysteroiden nicht nur in wirbellosen Tieren vorkommen, werden diejenigen Substanzen, welche in pflanzlichen Spezies nachgewiesen und extrahiert worden sind, als Phytoecdysteroiden bezeichnet (Dinan et al. 2001). Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Ecdysteroid handelt es sich um 20-Hydroxyecdysen, welches auch als β -Ecdysen bezeichnet und häufig als 20E abgekürzt wird. In dieser Doktorarbeit wird für die getestete Substanz die Bezeichnung Ecd verwendet. Chemisch besteht Ecd aus einem Cholesteringrundgerüst mit insgesamt 27 Kohlenstoffatomen. An dem Kohlenstoffatom in Position 17 ist eine Seitenkette angelagert. Hydroxylgruppen befinden sich sowohl am Grundgerüst sowie an den Seitenketten, was zu einer hohen Polarität von Ecd führt. Im Vergleich zu den sehr lipophilen Androgenen des Menschen resultiert daraus auch eine höhere Wasserlöslichkeit von Ecd, welche zusätzlich in einem schnelleren Metabolismus der Substanz resultiert (Dinan 2009).

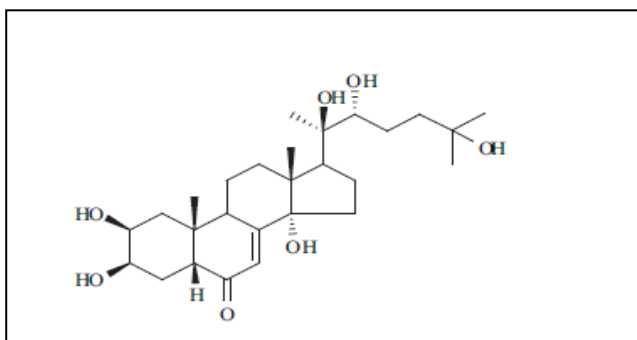


Abb. 4: Strukturformel von 20-Hydroxyecdysen (Báthori und Pongrácz 2005, S.155)

Ecd wird nicht im Körper von Säugetieren synthetisiert und ist somit nicht endogen vorhanden. β -Ecdysen bedarf deshalb einer Zufuhr mit der Nahrung (Dinan und Lafont 2006). Vor allem Pflanzen, wie Spinat und Quinoa, enthalten einen hohen

Phytoecdysteroidanteil (*Findeisen 2005; Zhu et al. 2001*). Bei oraler Substitution von Ecd findet die Aufnahme in den Körper durch eine langsame Resorption im Darm statt. Maximale Blutkonzentrationen von Ecd sind 30 Minuten bis 2 Stunden nach Ingestion vorhanden (*Slama und Lafont 1995*). In Studien an Mäusen konnte gezeigt werden, dass Ecd auf dem Blutweg über die Vena portae zur Leber gelangt, wo dessen Metabolisierung zu etwa 55% stattfindet. Per Sekretion in die Galle und somit in den Darm erfolgt dann die Ausscheidung von Ecd mit den Faeces zu etwa 90% (*Lafont et al. 1988; Hikino et al. 1972*).

1.7.2. Ecdysonrezeptor

Insbesondere das Interesse an dem Häutungsprozess von Insekten, welcher unter dem Einfluss von Ecd steht, sowie die Tatsache, dass Jahrhunderte lang verwendete Kräuter der chinesischen Medizin und Futterpflanzen der Nutztierhaltung wie Luzerne einen hohen Ecdysteroidanteil besitzen (*Hikino und Takemoto 1972; Slama und Lafont 1995*), weckten das Interesse der Forscher, was in der Detektion des entsprechenden Ecdysteroidrezeptors in Arthropoden resultierte. Obwohl für Ecdyson diverse Effekte bei Säugern beobachtet werden konnten, wurde bei diesen bisher kein entsprechender Rezeptor detektiert (*Dinan und Lafont 2006*).

1.7.3. Ecdysonwirkungen

Bisher wurden verschiedene Effekte von Ecdysteroiden in Säugetieren und auch im Menschen beschrieben. Sie wirken hypoglykämisch und damit antidiabetisch (*Kizelsztejn et al. 2009; Yoshida et al. 1971*), steigern die Proteinsynthese und haben eine anabole Wirkung durch Steigerung der Muskelmasse (*Gorelick-Feldman et al. 2008; Syrov 2000*). Die zunehmende Muskelmasse führt zu einer Erhöhung des Körpergewichtes (*Seidlová-Wuttke et al. 2010*). Hinzufügend resultieren eine stärkere Ausdauer sowie eine gesteigerte Myofibrillengröße im Muskel (*Tóth et al. 2008*). Im Gegensatz dazu erfolgt eine Reduktion des Fettgewebes (*Seidlová-Wuttke et al. 2010*). Weiterhin wurden, Ecdysteroid-vermittelt, antiarrhythmische und antiinflammatorische Effekte wie beispielsweise eine verstärkte Abwehr bronchopulmonaler Infekte detektiert (*Kurmukov und Ermishina 1991; Najmutdinova und Saatov 1999*). Der Mechanismus, durch den die positiven Ecdysonwirkungen erzielt werden, ist zurzeit noch nicht ausreichend erforscht. Aufgrund der Tatsache, dass Ecdysteroiden sowohl schnelle Effekte innerhalb einer Stunde als auch verzögerte Effekte, welche mit einer Latenz von 42-72 Stunden auftreten können,

verursachen, muss sowohl ein nicht genomischer als auch ein genomischer Signalweg der Ecdysteroidwirkungen in Betracht gezogen werden (*Todorov et al. 2000*). Weitere Recherchen über den Wirkungsmechanismus in Säugetieren müssen deshalb erfolgen.

1.7.4. Wirkung von Ecdysteroiden auf das Colon

Der Einfluss von Ecdysteroiden auf den Dickdarm ist bisher nur in wenigen Studien untersucht worden. Im Allgemeinen sollen diese Substanzen jedoch einen antiapoptotischen Effekt in jenem Organ besitzen. Damit verbunden sind eine geringere Abstoßung des Dickdarmepithels sowie eine geringere Eliminierungsrate proliferierender Zellen (*Oehme et al. 2006*). In Untersuchungen an Keratinozyten erfolgte die Feststellung, dass Ecdysteroide deren Proliferation steigern (*Dinan und Lafont 2006*). Ähnliche Effekte könnten auch im Dickdarm durch eine vergleichbare Epithelauskleidung möglicherweise eine Rolle spielen. Da der Einfluss von Ecdysteroiden auf die Colonschleimhaut und deren Proliferationsaktivität bisher keinen großen Stellenwert in wissenschaftlichen Abfassungen fand, beschäftigt sich diese Arbeit mit dem Effekt von 20-Hydroxyecdysol auf die Proliferationsaktivität der Colonmukosa am Modell der Sprague-Dawley-Ratte.

1.7.5. Wirkung von Ecdysteroiden auf Serumlipide und Leptin

In Experimenten an Ratten konnte gezeigt werden, dass Ecd Einfluss auf den Lipidmetabolismus nimmt. So sinken der Cholesteringehalt in der Leber und im Blutserum unter wiederholter Ecd-Zufuhr sowie die Anzahl der freien Fettsäuren (*Mironova et al. 1982; Catalan et al. 1985*). Die Wirkung auf die Triglyceride im Serum kann nicht eindeutig aufgezeigt werden, da in einigen Studien eine Erhöhung der Serumtriglyceride durch Ecdysteroide erfolgt (*Catalan et al. 1985*), in anderen das Gegenteil (*Hamden et al. 2008*). Zusätzlich existieren Forschungsarbeiten, welche keinen Effekt durch Ecd auf die Triglyceride nachgewiesen haben (*Seidlová-Wuttke et al. 2010*). Weiterhin findet unter Ecd eine Reduktion sowohl des abdominalen als auch des prätibialen Fettdepots statt (*Seidlová-Wuttke et al. 2010*). In Studien an Mäusen konnte weiterhin gezeigt werden, dass unter Substitution von Ecd eine Reduktion des Körpergewichtes resultiert. Dementsprechend könnte eventuell ein Zusammenhang zwischen reduziertem Körpergewicht und erniedrigtem Leptinspiegel bestehen, auf welchen allerdings in jenen Untersuchungen nicht eingegangen wurde (*Kizelsztejn et al. 2009*).

Da bisher wenig über den Zusammenhang zwischen Ecd-Zufuhr und Leptinserumwerten bekannt ist, soll jener Aspekt in meiner Arbeit zusätzlich betrachtet werden.

1.8. Ziel dieser Arbeit

Wie schon in einigen Forschungsarbeiten belegt, haben Östrogene in der postmenopausalen Therapie nicht nur erwünschte Effekte, sondern auch Nebenwirkungen. Somit besteht der Bedarf, eine Östrogen-wirkungsimitierende Substanz zu finden, welche diverse Organe, insbesondere den Dickdarm, positiv beeinflusst und negative Effekte reduziert. Dementsprechend war für die Studie bedeutend, den Einfluss von Ecd auf die Schleimhaut des Colons zu beurteilen. Da keine definitiven Aussagen über die optimale Substanzmenge von Ecdysteroiden vorliegen, fanden verschiedene Dosierungen von Ecd Anwendung. Das somit gesetzte Ziel besteht darin, nach dreimonatiger per os (p.o.) Substitution über das Futter, die Wirkungen von 20-Hydroxyecdysol auf histologische Aspekte des Colons ovariectomierter S.D.-Ratten mit denen von Östradiol zu vergleichen. Ferner sollte die Beeinflussung der Serumfettparameter durch die entsprechenden Testsubstanzen aufgezeigt werden. Sollte Ecd einen östrogenartigen Einfluss auf die Colonmukosa sowie auf die Serumlipide besitzen, könnte dieser Wirkstoff eventuell eine neue Therapiemöglichkeit in der Behandlung klimakterischer Beschwerden und der Prävention proliferativer Prozesse des Dickdarms darstellen.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsdurchführung

Für die Versuchsdurchführung lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig vor (Az 33.42502-082/06). Es wurden hierfür 82 weibliche Sprague–Dawley–Ratten (S.-D.-Ratten) verwendet, welche von der Firma Winkelmann, Borchon, stammten. Jene erhielten eine Zuteilung in Gruppen, wobei sich jeweils 6 Tiere einen Käfig (Makrolonkäfig Typ IV) teilten. Die Raumbelichtung erfolgte von 6 bis 18 Uhr bei einer ständigen Raumtemperatur von 23°C sowie einer relativen Luftfeuchtigkeit von 55 %. Für die Nahrungsaufnahme standen sojafreies-Pellet-Futter der Firma SNIFF und Wasser zur Verfügung. Eine Unterteilung der Ratten in die diversen, für die Durchführung des Versuches notwendigen Futtergruppen, erfolgte im Alter von drei Monaten.

Zu diesem Zeitpunkt war es, im Sinn des geplanten Versuches, nötig, einige der S.-D.-Ratten zu ovariectomieren und alle Tiere zu Transpondern. Hierfür wurden diese unter Isoflurannarkose narkotisiert. Bei dem Transponder handelte es sich um ein Transponder-MICRO-UNO-ID-System, welches subkutan implantiert wurde um eine spätere Identifizierung zu ermöglichen. Das durchschnittliche Gewicht eines Tieres betrug $255,8 \pm 6,4$ g.

Anschließend wurden die Tiere in 7 Gruppen zu jeweils 12 bzw. 10 Tieren gleicher Gewichtsverteilung zugewiesen und in Käfigen zu je 6 Tieren gehalten. Dabei standen den einzelnen Gruppen unterschiedliche Futter der Firma SSNIFF zur Verfügung:

- Sojafreies Futter
- Östradiol-haltiges Futter (10 g/ kg Futter)
- Ecd -haltiges Futter (1 g/ kg Futter)
- Ecd -haltiges Futter (3 g/ kg Futter)
- Ecd -haltiges Futter (6 g/kg Futter).

Im Verlauf wurde wöchentlich die Menge an gefressenem Futter sowie das Gewicht der Ratten bestimmt und die Wassermenge kontrolliert.

Die Aufzeichnung der Futteraufnahme ermöglichte später einen Vergleich zwischen einzelnen Versuchsgruppen. Die folgende Tabelle bezieht sich auf die mittlere Futteraufnahme pro Tier über den gesamten Versuch. Dabei wurden diese Daten zusätzlich zur Berechnung der durchschnittlichen Substanzaufnahme eines jeden Tieres pro Tag herangezogen.

Substanz und Tiergruppe	Futteraufnahme (g/Tier/Tag)	Substanzaufnahme (mg/Tier/Tag)
Sojafreies Futter, ovx	17,32	_____
Sojafreies Futter, intakt	15,09	_____
Östradiol (10 g/kg Futter), ovx	15,92	_____
Ecd (1 g/ kg Futter), ovx	18,02	18
Ecd (3 g/kg Futter), ovx	18,86	57
Ecd (6 g/kg Futter), ovx	19,30	116
Ecd (3 g/kg Futter), intakt	16,16	48

Tabelle 2: tägliche Futter- und Substanzaufnahme

Aus der Messung der wöchentlich festgehaltenen Tiergewichte konnten die Durchschnittsgewichte der Ratten pro Futtergruppe sowie der Gewichtsverlauf der einzelnen Gruppen bestimmt werden.

Im Alter von 6 Monaten erfolgte unter CO₂-Inhalationsnarkose die Dekapitation. Das Blut jedes Tieres wurde über einen Trichter aufgefangen und anschließend auf Eis gekühlt. Für die spätere Serumbestimmung erfolgte zusätzlich dessen Zentrifugierung. Anschließend wurden die benötigten Organe entnommen. So fand für diese Arbeit der rektosigmoidale Anteil des Colons jeder Ratte Verwendung. Diese Organe wurden sofort nach der Obduktion in 10 %igem Formalin für 72 Stunden aufbewahrt. 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) nacheinander in verschiedene Alkohol-, Xylol- und Paraffinlösungen getaucht und aufbewahrt. Die aufsteigende Alkoholreihe diente zur Entwässerung, das Paraffin zur Stabilisierung der Organe (siehe Schema der Organentwässerung Tabelle 3 Seite 27).

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 3: Schema der Organentwässerung

Die Einbettkästen wurden, nachdem sie aus der Zitadelle kamen, bis zur endgültigen Fixierung in einem Wärmeschrank bei 56-62°C (Fa: Schütt Labortechnik, GFL 7601) aufbewahrt. Nacheinander wurden die vorbehandelten Organteile in einen Paraffinblock gegossen (EG 1160, Leica). Später wurden die paraffinfixierten noch eingefrorenen Schnitte der Organe mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica Model RM 2135) in Schichten von 3-5 µm Dicke geschnitten und auf einen Objektträger (Menzel+Superfrost Plus) aufgebracht. Für jedes Tier wurden 10 Objektträger angefertigt.

2.2. Hämatoxylin- Eosin- Färbung (HE-Färbung)

Im Anschluss daran wurden jeweils 2 dieser 10 Objektträger einer HE-Färbung unterzogen. Diese bestand aus einer absteigenden Alkoholreihe, der eigentlichen Färbung und einer aufsteigenden Alkoholreihe. Zu Beginn wurde durch eine Probefärbung die optimale Färbungszeit ermittelt. Für Hämatoxylin betrug sie 25 Sekunden und für Eosin 30 Sekunden.

Der detaillierte Färbevorgang wird unter 6.4.1. auf Seite 62 dargestellt.

2.3. Immunhistochemische Färbung (PCNA- Färbung)

Des Weiteren wurde eine PCNA- Färbung durchgeführt. Dafür wählte man 4 Tiere einer Gruppe aus, von denen jeweils 2 Objektträger (nach der Dekapitation wurden von jedem Tier 10 Objektträger angefertigt) angefärbt wurden. Jene Färbung beinhaltete zwei Schritte, wobei das anfängliche Vorgehen der Fixierung, Deparaffinierung sowie der besseren Präsentation der Antigene diente. In dem zweiten Schritt erfolgte die eigentliche Färbung, welche mit einer absteigenden Alkoholreihe begann, auf die der Färbevorgang mit Hilfe von Antikörpern (mouse monoclonal IgG2a, clone PC10, Fa. Santa Cruz Biotechnology, CA, USA; rabbit/mouse, Fa. Dako) folgte und mit einer aufsteigenden Alkoholreihe endete (detaillierter Färbevorgang siehe 6.4.2. Seite 63).

Die Präparate der PCNA- Färbung wurden mir zur Verfügung gestellt.

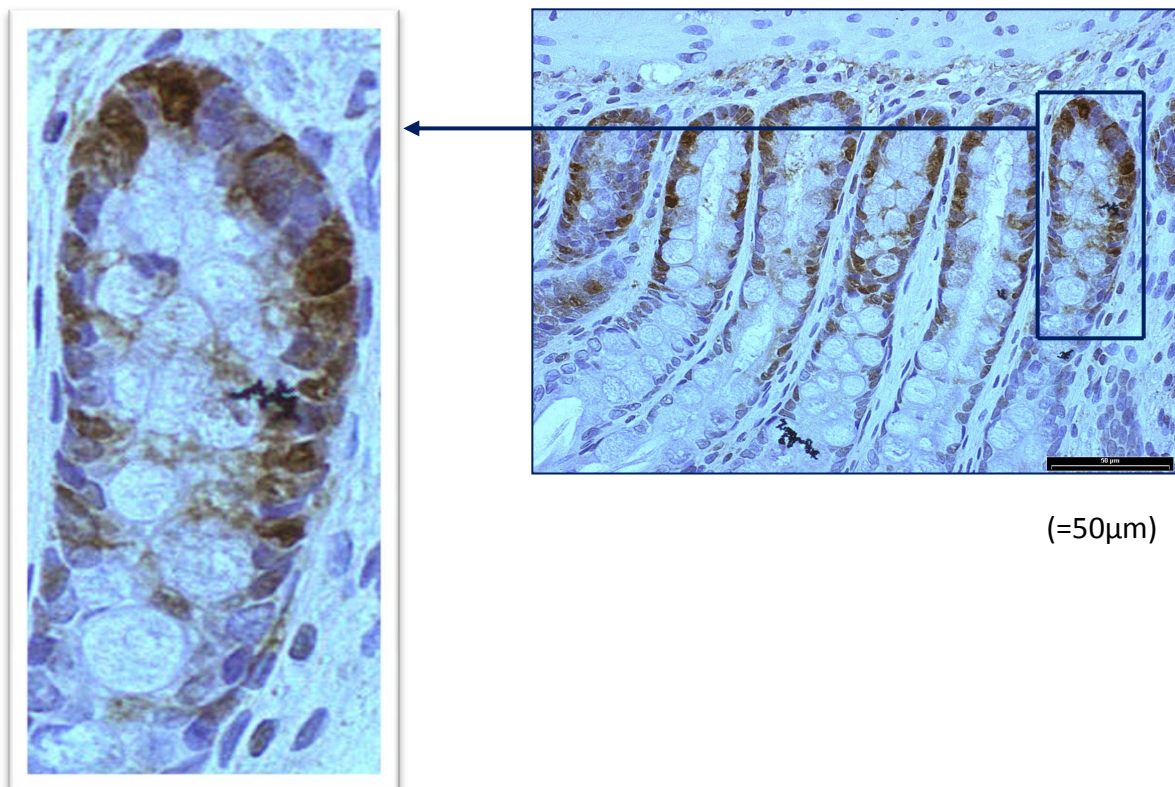


Abb. 5: Vergrößerte Darstellung der Kryptenbasis zur Demonstration der PCNA-positiv angefärbten Zellen (dunkelbraun) (Vergrößerung 20x; PCNA)

2.4. Auswertung der histologischen Colonschnitte

Die gefärbten Präparate konnten nun mit Hilfe eines Zeiss Axiophot-Mikroskops, welches über eine digitale Fotokamera an ein Rechnersystem angeschlossen war, beurteilt und ausgemessen werden. Das Softwareprogramm der Fa. Olympus, Münster (Softwer Imaging System= SIS) wurde zur Messung und Evaluierung verwendet.

Als Erstes wurden die Objektträger der HE-Färbung bezüglich der Mukosaschichtdicke ausgewertet, welche über die Messung der Kryptenlänge ermittelt wurde. Da pro Tier zwei Objektträger angefertigt wurden, war es möglich, beide Präparate vor der Messung optisch unter dem Mikroskop zu vergleichen um das Bessere auszuwählen. Für die Wahl des später gemessenen Präparates waren mehrere Kriterien von Bedeutung. So war es wichtig, dass die Colonquerschnitte vollständig, d.h. wenn möglich nicht zerrissen waren. Ein weiteres Entscheidungskriterium für eines der zwei Präparate war die Art der angeschnittenen Mukosakrypten. Da in der späteren Messung die Mukosadiecke bestimmt werden sollte, war es von Wichtigkeit, die Krypten im Längsschnitt zu messen. Deshalb stellten zu viele Kryptenquerschnitte ein Negativkriterium dar. Da auch Luftblasen unter dem Deckglas des Objektträgers Messungen nicht ermöglichen, beziehungsweise erschweren, wurden diese Objektträger der Messung ausgeschlossen oder neu gedeckelt. Schließlich stand für jedes Tier ein Objektträger zur Messung der Mukosaschichtdicke zur Verfügung. Jedes Präparat, d.h. Colonquerschnitt, wurde imaginär in vier Quadranten aufgeteilt.

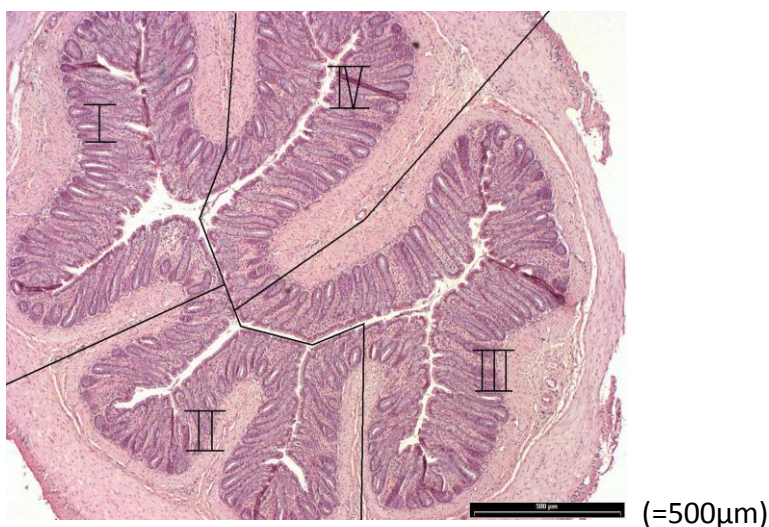


Abb. 6: Aufteilung eines Colonquerschnittes in 4 Quadranten (Vergrößerung 3,125 x;
HE- Färbung)

Pro Quadrant wurden 10 Längenmessungen durchgeführt, sodass für jeden Objektträger 40 Messungen zur Verfügung standen. Aus diesen Werten sind die jeweiligen Mittelwerte pro Quadrant sowie der Gesamtmittelwert der Mukosaschichtdicke aus den vier Quadrantenmittelwerten bestimmt worden.

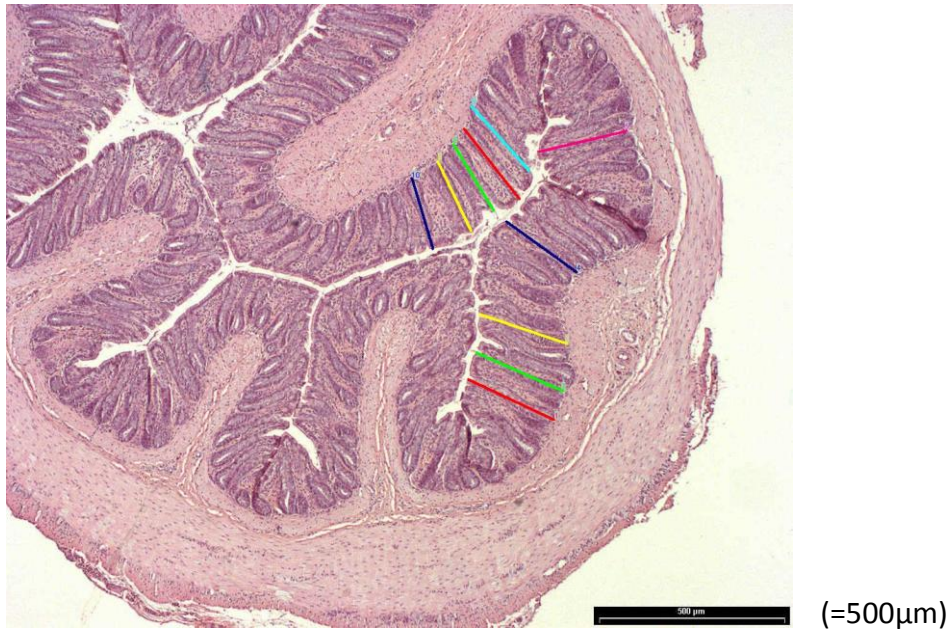


Abb. 7: 10 Messungen in einem Quadranten (Vergrößerung 3,125 x; HE-Färbung)

Daran anschließend erfolgte die Auswertung der Objektträger der PCNA-Färbung. Diese Färbung ermöglicht die Detektierung proliferierender Zellen, da diese durch die Färbung in der S-Phase konserviert werden. Bei den Colonschnitten wurde die Anzahl der PCNA-positiven Zellen bestimmt. Hierbei wurden die angefärbten Zellen unter dem Axiophot-Mikroskop aufgesucht und deren Anzahl mit dem Handzähler Assistent bei 20-facher Vergrößerung bestimmt. Das Ziel war es, aus 500 gezählten Zellen die Anzahl der PCNA-Positiven zu ermitteln. Hierfür wurden die Präparate erneut imaginär in vier Quadranten aufgeteilt. Dem entsprach eine Zellzählung von 125 Zellen pro Quadrant. Dieses Vorgehen war nötig, da in einigen Quadranten sehr viele Zellen positiv gefärbt waren und in anderen waren keine angefärbten Zellkerne vorhanden. Daraus resultierend ist das Vergleichen der Präparate im Sinn der statistischen Aspekte möglich. Aus den gewonnenen Werten konnte folglich die Anzahl der positiven Zellen von 500 Zellen in % bestimmt werden. Für diese Auswertung standen pro Futtergruppe 4 Tiere mit je 2 gefärbten Objektträgern zur Verfügung.

2.5. Bestimmung der Serumlipide

Weiterhin wurden einige Serumparameter bestimmt. Dafür separierte man das Serum aus dem Blut, welches man bei der Dekapitation der Ratten gewonnen hatte. Da kein Serum zu Beginn des Versuches entnommen wurde, stehen nur die Daten der Kontrolltiere für die vergleichende Auswertung am Ende des Versuches zur Verfügung. Als Parameter wurden Cholesterin, Triglyceride, High-Density-Lipoprotein (HDL), Low-Density-Lipoprotein (LDL) und Leptin bestimmt. Die Bestimmung dieser Werte erfolgte enzymatisch fluorometrisch mit dem Gerät HITACHI 9/02 der Firma Hoffmann - La Roche, Mannheim.

2.6. Auswertung mit dem Computer

Die statistischen Werte wurden unter Anwendung des Computerprogramms PRISM errechnet und das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe einer Varianzanalyse durch multiplen T-Test nach Dunnett.

Zusätzlich erfolgten Korrelationsuntersuchungen bezüglich der Anzahl der PCNA-positiven Zellen und den Gesamt- Serumfettparameter mithilfe des Programmes GraphPad Prism4.

3. Ergebnisse

Für den Vergleich der Versuchsgruppen werden alle Ergebnisse den Werten der Kontrollgruppe (KO), welche der Versuchsgruppe ovx,sf entspricht, gegenübergestellt.

3.1. Körpergewicht

Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: Körpergewichte

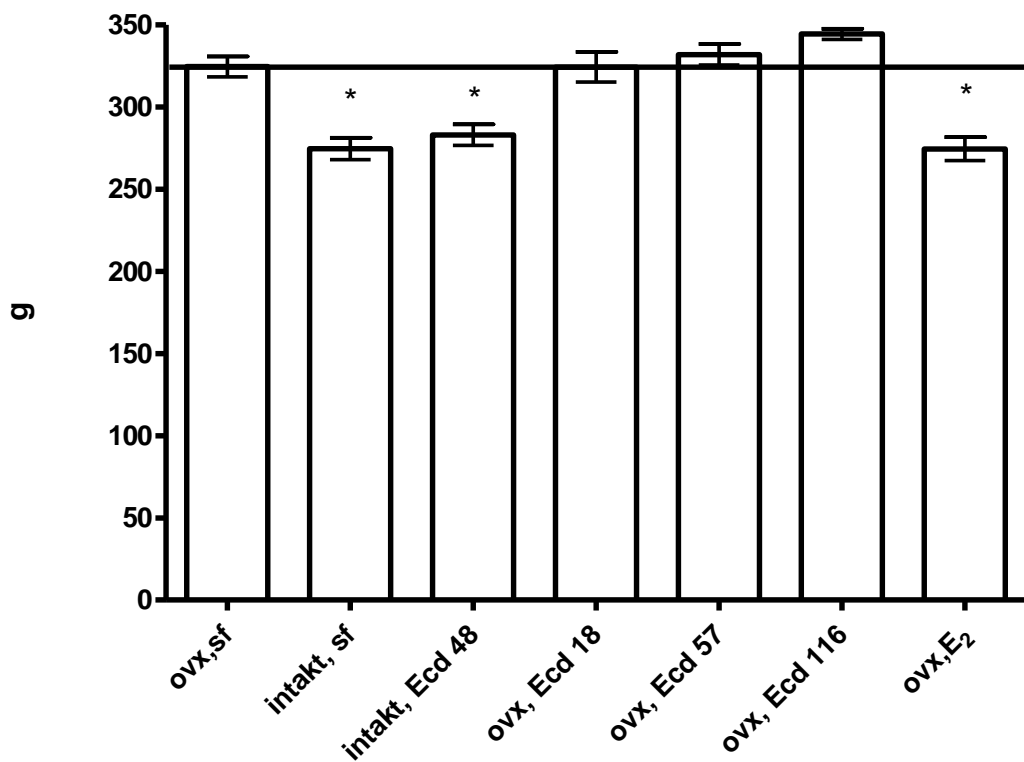


Abb. 8: Die Körpergewichte der ovx Kontrolltiere waren signifikant höher als die, der intakten Tiere. Auch die Gabe von E_2 -haltigem Futter reduzierte das Körpergewicht im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die geringfügige Gewichtsteigerung unter Ecd-Gabe war statistisch nicht signifikant. * $p < 0.05$ versus ovx,sf

Die mit E_2 behandelten ovx Tiere, sowie die intakten Tiere, welche sojafreies Futter oder Ecd48 bekamen, waren signifikant leichter als die Kontrolltiere. Die Behandlung der ovx Tiere mit Ecd ergab stattdessen keinen signifikanten Effekt auf das Körpergewicht.

3.2. Futteraufnahme

Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 -haltigem Futter (3 Monate bei S.-D.-Ratten) auf: Futteraufnahme im Verlauf

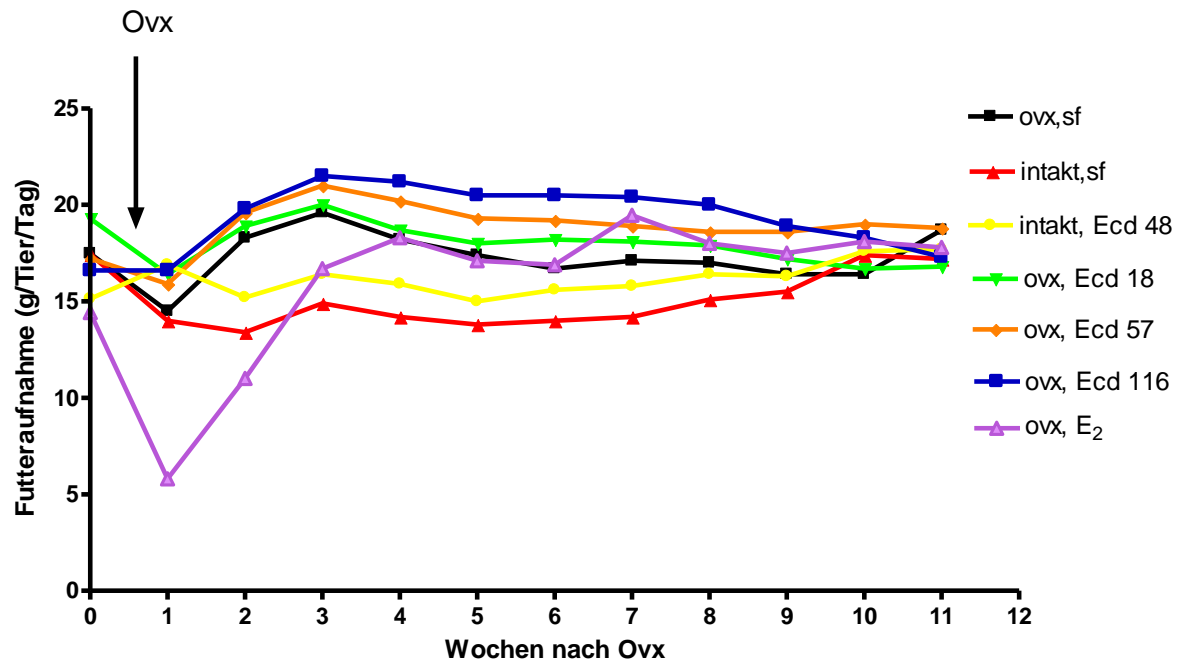


Abb. 9: Die mit Ecd behandelten Tiere nahmen im Verlauf annähernd die gleiche Menge an Futter zu sich, während die Futteraufnahme bei den E_2 -Tieren nach der Ovariectomie deutlich geringer war. Nach einem Zeitraum von 3 Wochen nach der Ovariectomie nahm die Gruppe ovx, E_2 wieder annähernd so viel Futter zu sich wie die Tiere, denen Ecd zur Verfügung stand, sodass die unterschiedlichen Versuchsgruppen bezüglich der Futteraufnahme zum Ende des Versuchs ausgeglichen waren. Im Vergleich zu den ovx-Tieren fraßen die intakten Tiere durchschnittlich weniger Futter. Gegen Ende des Versuches entsprach die Futteraufnahme dieser Tiere der der anderen Versuchsgruppen.

3.3. Ergebnisse der Messungen im Colonepithel

3.3.1 Mukosaschichtdicke des Colons

Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.- Ratten) auf:
Mukosaschichtdicke

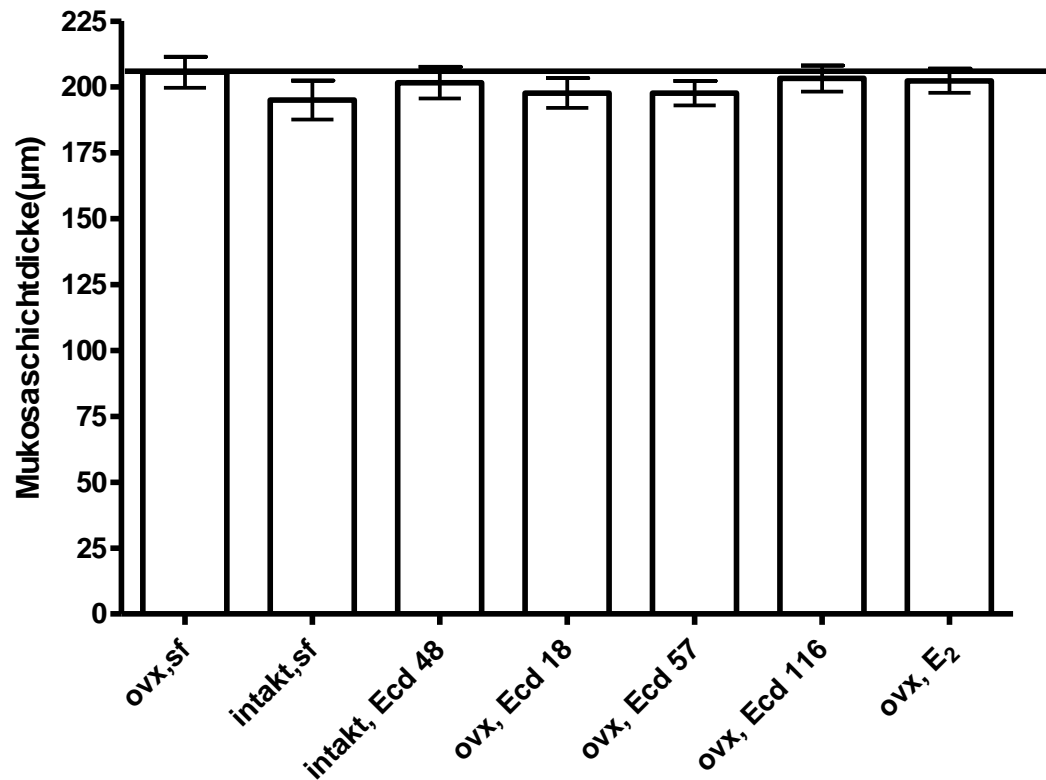


Abb. 10: Keine der angewendeten Substanzen hat einen signifikanten Einfluss auf die Dicke der Mukosa. * $p < 0,05$ vs. ovx, sf

Bezüglich der Wirkung auf die Schichtdicke der Mukosa im Colon ist keine signifikante Wirkung eines bestimmten Futterzusatzes vorhanden.

Die Präparate der einzelnen Versuchsgruppen zeigten keine histologischen Auffälligkeiten.

3.3.2. Zellproliferation

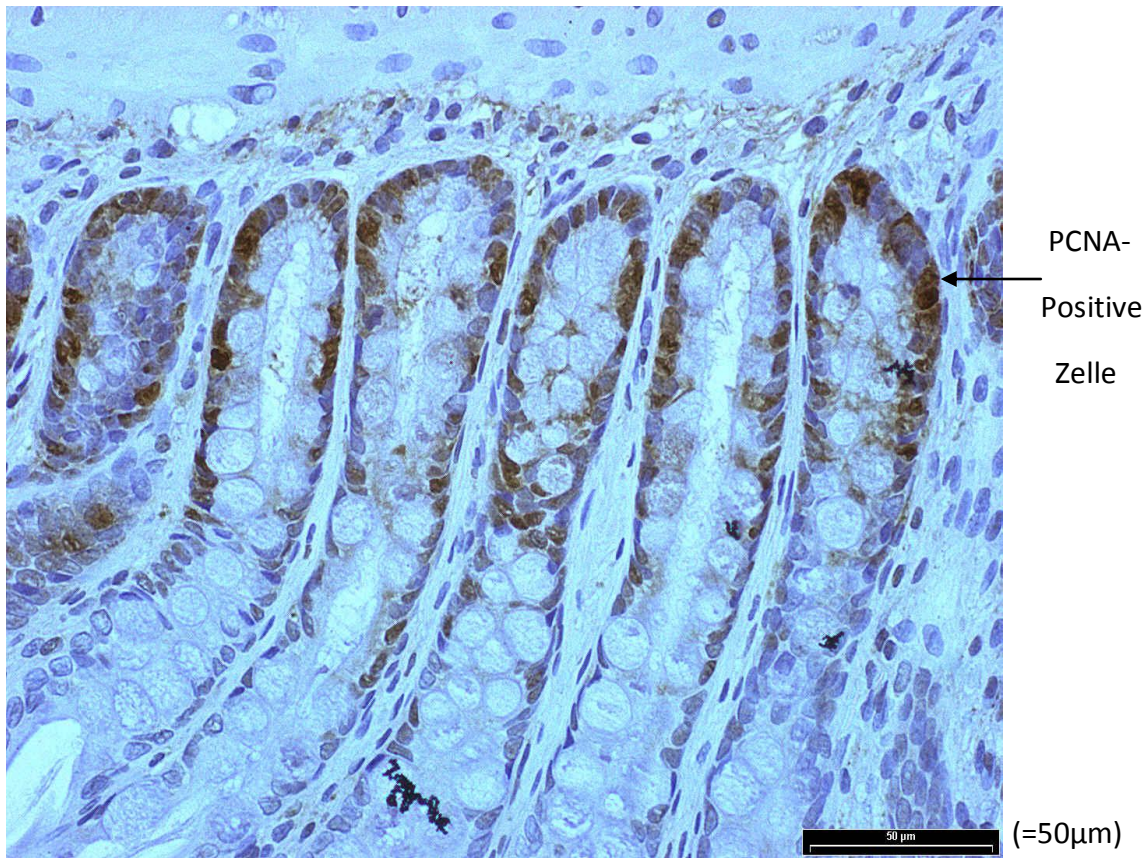


Abb. 11: Colon-Zellproliferation; ovx, Ecd 116; Vergrößerung 20 x; PCNA

In Abbildung 11, einem histologischen Präparat der Gruppe ovx, Ecd 116, welches der PCNA-Färbung unterzogen wurde, sind die PCNA-positiven Zellen in dem für diese Färbung typischen, dunklen Brauntönen angefärbt. In dieser Versuchsgruppe war im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen die größte Anzahl PCNA-positiv angefärbter Zellen vorhanden (vergleiche Abb.12). In der dargestellten 20-fachen Vergrößerung erfolgte bei jedem Präparat, welches mittels PCNA-Färbung bearbeitet wurde, die Zellzählung.

**Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.- D.-Ratten) auf:
proliferierende Zellen in der Mukosa des Colons**

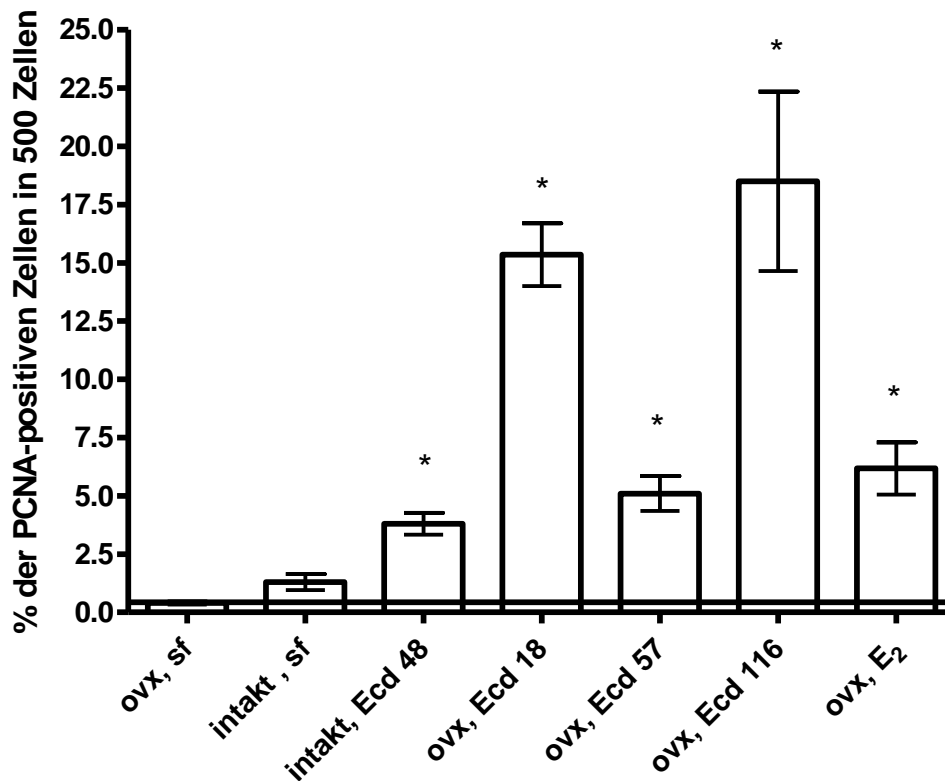


Abb. 12: β -Ecdyson stimulierte dosisunabhängig die Proliferation der Zellen. Die Steigerung der Zellproliferation aller Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe war bis auf die Gruppe intakt,sf signifikant. * $p < 0,05$ versus ovx,sf

Im Vergleich zur Kontrollgruppe erbrachten alle Substanzgruppen mit Ausnahme der Gruppe intakt,sf eine signifikante Steigerung der Zellproliferation. Die größte Proliferation fand bei der Gruppe ovx,Ecd 116 sowie der Gruppe ovx, Ecd 18 statt. Ecd 48 bei den intakten Tieren, Ecd57 bei den ovx Tieren und E_2 bei den ovx Tieren substituiert, entsprachen ungefähr gleichen Werten bezüglich der PCNA-positiven Zellen und waren zusätzlich signifikant erhöht im Vergleich zur KO. Bei den ovx Tieren, bei welchen Ecd dem Futter zugesetzt war, zeigte sich mit steigender Ecd-Konzentration ein U-förmiger Verlauf der PCNA-positiven Zellen in %.

3.4. Bestimmung der Serumlipide

3.4.1. Serumcholesterin

Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-
Ratten) auf: Serumcholesterin

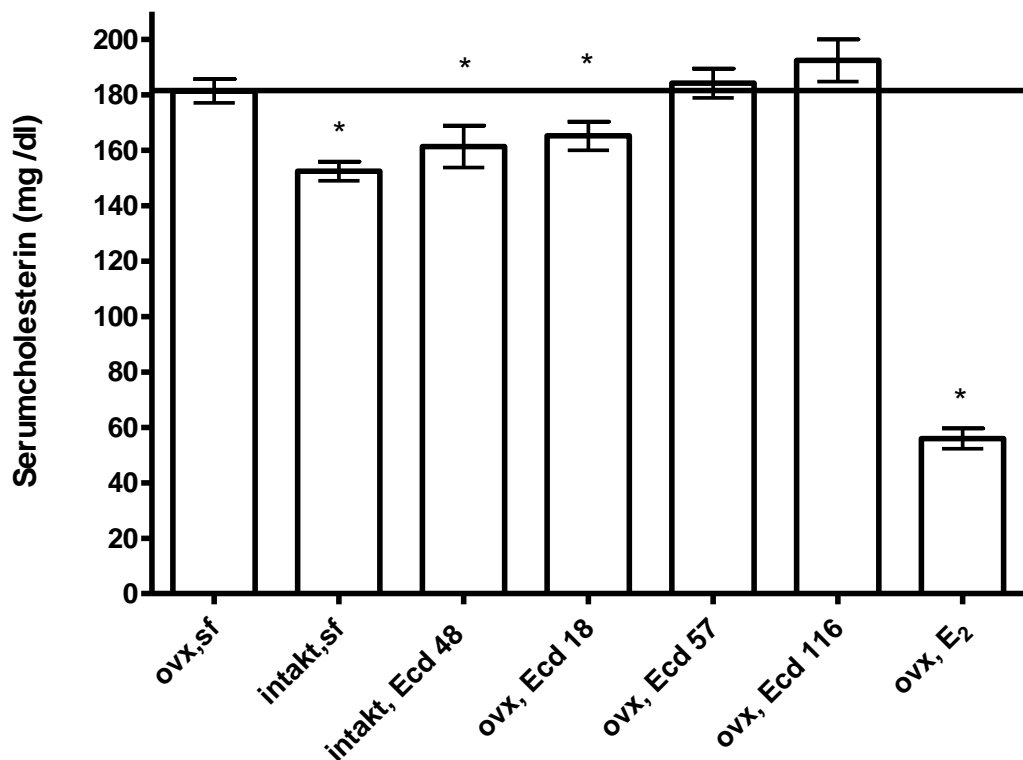


Abb. 13: Die mit E_2 - behandelten Tiere zeigten eine deutliche, signifikante Abnahme des Serumcholesterins. Eine signifikante Senkung des Cholesterinspiegels fand weiterhin bei beiden intakten Versuchsgruppen, sowie bei der Gruppe ovx, Ecd 18 statt. * $p > 0,05$ versus ovx,sf

Bei den beiden anderen ovx Gruppen, denen Ecd zur Verfügung stand, zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Vergleich zur KO. E_2 senkte den Serumcholesterinspiegel auf ein Drittel im Vergleich zu der KO.

3.4.2. Low-Density-Lipoprotein (LDL)

Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D-Ratten) auf:
LDL

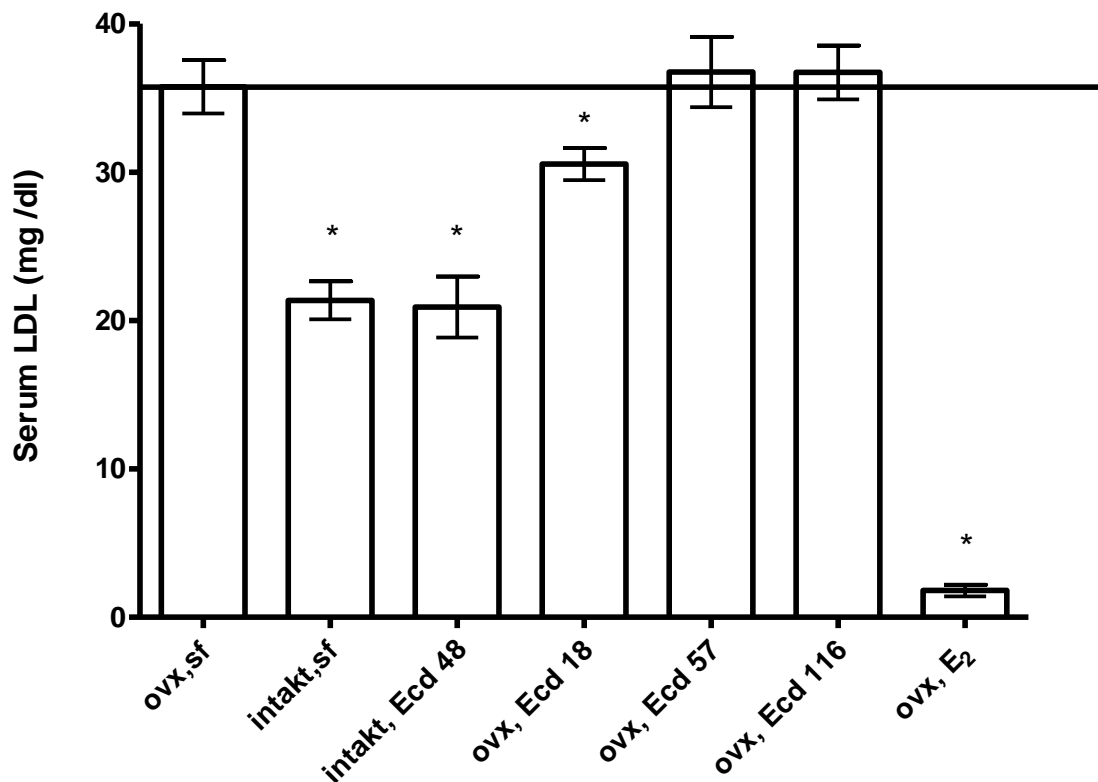


Abb. 14: Bis auf die Gruppen Ecd 57 und Ecd 116 senkten die getesteten Substanzen in allen anderen Versuchsgruppen die LDL-Serumspiegel signifikant. * $p < 0,05$ versus ovx, sf

Eine sehr starke Senkung des LDL- Spiegels auf 5%, im Vergleich zu den Werten der KO, fand durch E_2 statt. Bei den intakten Tieren erfolgte eine signifikante Reduktion der LDL-Werte auf ca. zwei Drittel im Vergleich zu den Serumwerten der KO. Bei der Betrachtung der LDL-Werte der KO und der Gruppe ovx, Ecd 18 waren auf 80% reduzierte LDL-Serumwerte durch Ecd festzustellen. Diese Verringerung der LDL-Serumwerte entsprach dem Signifikanzniveau. Die mittlere und höchste Ecdysonkonzentration erbrachten bei den ovx Tieren keinen signifikanten Effekt auf die LDL im Vergleich zu KO.

3.4.3. High-Density- Lipoprotein (HDL)

Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D-Ratten) auf:
HDL

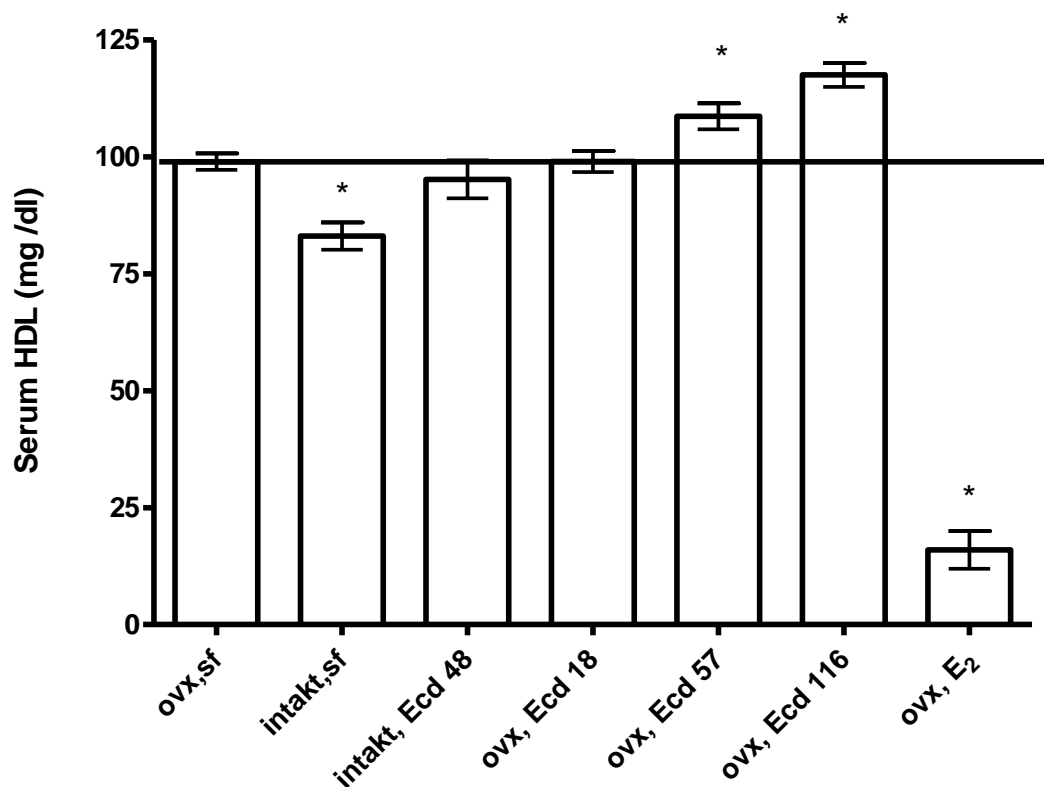


Abb. 15: Eine signifikante Senkung von HDL wird bei der Gruppe ovx, E_2 und den intakten Tieren mit sojafreiem Futter deutlich. Ecd 57 und Ecd 116 bei den ovx Tieren führten zu einer signifikanten Steigerung der HDL- Werte. * $p < 0,05$ versus ovx, sf

Die beiden anderen Versuchsgruppen wiesen keinen signifikanten Einfluss auf HDL auf. Die Senkung des HDL-Spiegels durch E_2 entsprach einer Verringerung des HDL-Wertes auf 16% im Vergleich zur KO.

3.4.4. Triglyceride

Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf:
Serum-Triglyceride

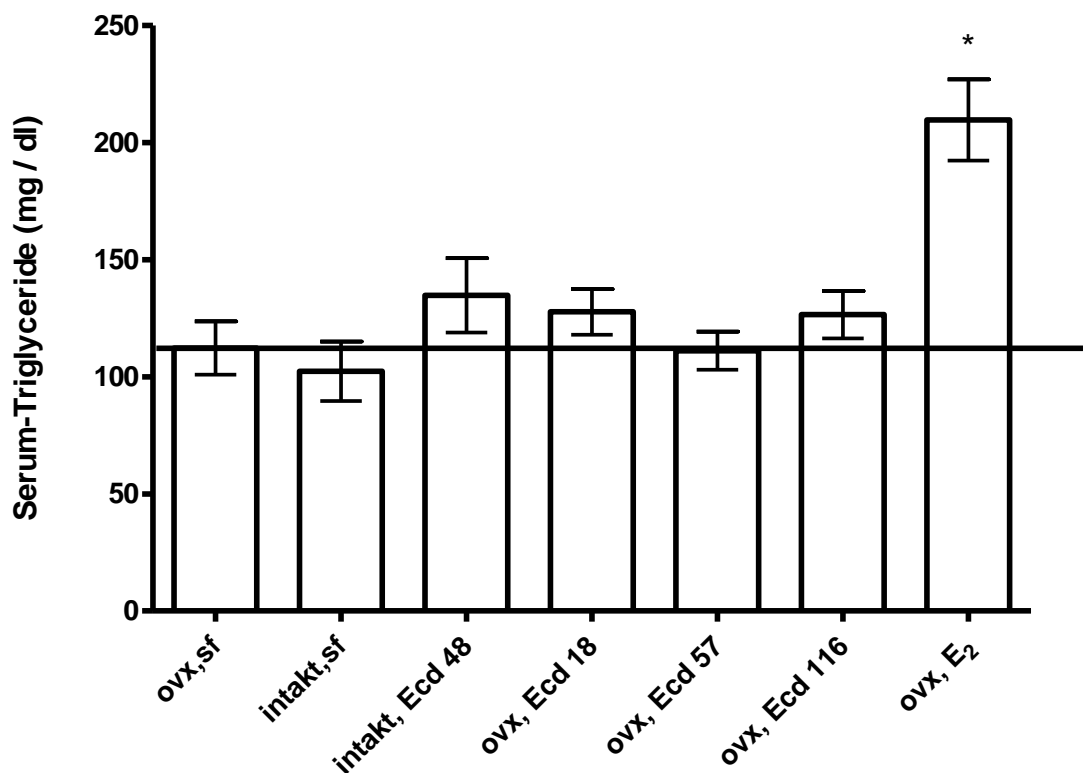


Abb. 16: E_2 führte zu einer signifikanten Steigerung der Triglyceride. * $p < 0,05$ versus ovx, sf

E_2 steigerte die Triglyceridkonzentration im Serum auf annähernd die doppelte Menge im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle anderen Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Veränderungen der Serumtriglyceride.

3.4.5. Leptin

Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.- Ratten) auf:
Leptin

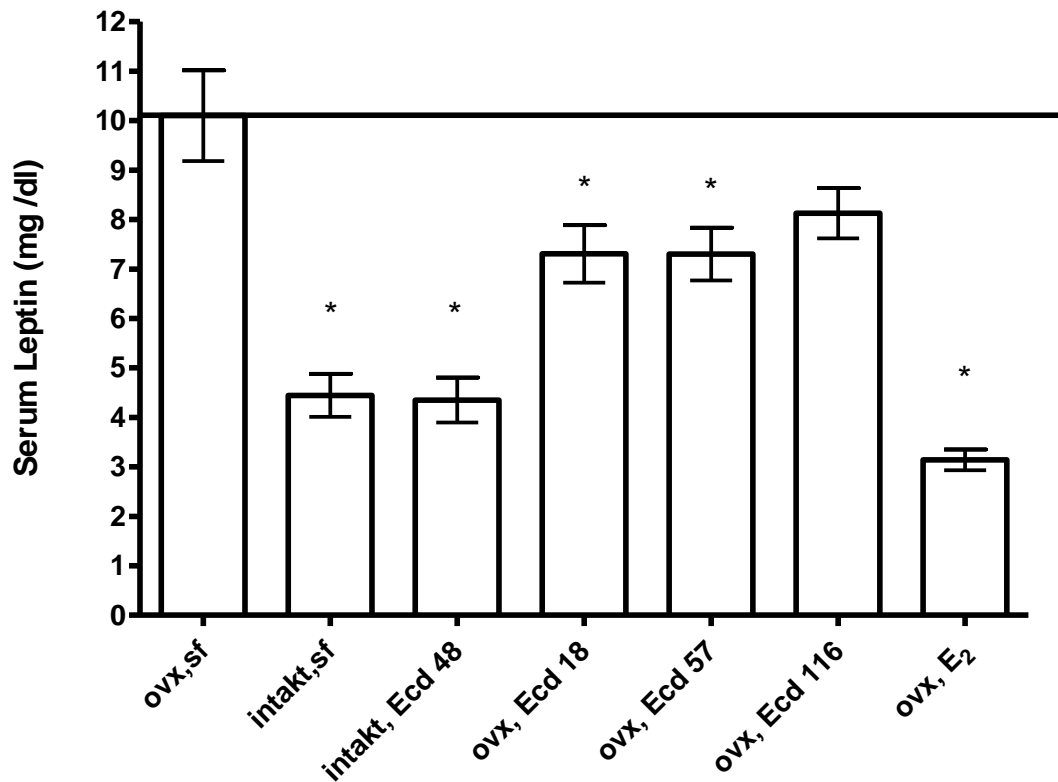


Abb. 17: Bis auf Ecd 116 senkten alle Substanzen den Leptinspiegel signifikant. * $p < 0,05$ versus ovx, sf

Zu einer starken Verringerung des Leptinsspiegels im Serum um über 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe führte besonders das sojafreie Futter und Ecd 48 bei den intakten Tieren sowie E_2 bei den ovx Tieren. Bei den ovx Tieren mit Ecd 18 und Ecd 57 verringerte sich der Serumleptinspiegel auf etwa zwei Drittel der Kontrollgruppe. Bei der Gruppe ovx, Ecd 116 stellte sich keine signifikante Reduktion der Leptinwerte dar.

3.4.6. Korrelationsanalyse: Abhängigkeit von PCNA-positiven Zellen und den einzelnen Serumfettparametern

Für die Korrelationsuntersuchungen wurde der Zusammenhang zwischen PCNA-positiven Zellen und den einzelnen Gesamt-Serumfettparametern untersucht. Hierbei zeigte sich in keiner Analyse eine signifikante Abhängigkeit der PCNA-positiv angefärbten Colon-Epithelzellen von den unterschiedlichen Serumfettparametern. Aus diesem Grund verzichte ich in meiner Arbeit auf die Darstellung der einzelnen Graphen.

4. Diskussion

4.1. Studienziel

Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der Wirkung von 20-Hydroxyecdysen (Ecd), einem Phytoecdysteroid, und 17β -Östradiol (E_2) auf das Dickdarmepithel der ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratte (S.-D.-Ratte). Die Wirkung auf die Mukosa des Colons während der weiblichen Menopause kann somit verglichen werden. So findet in dieser Lebensphase der Frau aufgrund des Östrogendefizites eine Zunahme neoproliferativer Läsionen im Dickdarmepithel statt. Aufgrund der unterschiedlichen Dosierungen der Testsubstanzen in den Versuchsgruppen, können vergleichende Untersuchungen bezüglich der epithelialen Zellschicht des Dickdarms durchgeführt werden. Das hierbei gesetzte Ziel bestand in der Ermittlung der optimalen Substanzmenge von Ecd um protektive Wirkungen im Dickdarmepithel zu erzielen, wie sie schon für E_2 , innerhalb einer Hormonersatztherapie (HRT) während der Menopause substituiert, aufgezeigt wurden (*Hoffmeister et al. 2007*). Sollten die Versuchsergebnisse ähnliche Wirkungen von Ecd und E_2 ergeben, so könnte Ecd in der Konsequenz zur Vorbeugung von neoproliferativen Prozessen im Colon Verwendung finden. Weiterhin sollten die Effekte von Ecd und E_2 auf die Serumlipide der S.-D.-Ratte dargestellt werden. Für beide Substanzen sind bisher fettsenkende Effekte auf diese Werte bewiesen (*Parini et al. 2000; Catalan et al. 1985*). Inwiefern die Ergebnisse mit denen, bisher durchgeführter Untersuchungen, übereinstimmen, sollte in dieser Arbeit eruiert werden.

4.2. Körpergewicht und Futteraufnahme

Während der gesamten Versuchsdurchführung stand den Tieren Futter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Bis zur Ovariectomie (Ovx) bekamen alle Tiere sojafreies Futter. Da Soja üblicherweise Bestandteil von Pelletfutter für Ratten ist und jenes Phytoöstrogene wie Genistein und Daidzen enthält, war diese Prozedur nötig. Wie der Name schon beinhaltet, erzielen Phytoöstrogene Wirkungen wie Östrogene und koppeln auch an entsprechende Rezeptoren (*Wuttke et al. 2009*). Da E_2 als Futterzusatz in einer Versuchsgruppe eingesetzt werden sollte, verwendeten wir sojafreies Futter, um diesen Wirkungen bzw. verfälschenden Effekten von Genistein und Daidzen entgegenzuwirken. Vom Zeitpunkt der Ovx bekamen alle Versuchsgruppen Futter p.o. über einen Zeitraum von drei Monaten. Als Kontrollgruppe (KO) wurden fortan die ovariectomierten (ovx) Tiere mit sojafreiem Futter angesehen. Im

Allgemein reduzierte sich die Futteraufnahme in allen Versuchsgruppen in der ersten Woche nach der Entfernung der Ovarien, was mit dem postoperativen Stress nach diesem Eingriff begründet werden kann. Wie schon in einigen Studien erwiesen, nehmen die ovx Tiere ab der ersten Woche nach Ovx im Vergleich zu den intakten Tieren mehr Futter zu sich (*Landau und Zucker 1976*). Physiologisch wird die gesteigerte Futteraufnahme durch eine vermehrte Synthese des appetitanregenden Neuropeptid Y verursacht (*Meli et al. 2004*). Während bei den mit Ecd behandelten Tieren die Aufnahme des Futters nur geringfügig rückläufig war, reduzierte sich die Nahrungsaufnahme bei den mit E₂ behandelten Tieren in der ersten Woche nach der Ovariectomie drastisch auf etwa 5g pro Tier/Tag. Im Vergleich dazu fraßen die Tiere, bei welchen Ecd im Futter enthalten war, mit ca. 16g/Tier/Tag etwa das Dreifache. Die Reduktion der Futteraufnahme unter E₂ stimmt mit Beobachtungen anderer wissenschaftlicher Forschungsergebnisse überein (*Ferreri und Naito 1978*). Ecd scheint somit zur Bewältigung des postoperativen Stresses in größerem Maße beizutragen als E₂. Gegen Ende des Versuchsaufbaus zeigte sich eine Annäherung der Futteraufnahme in den einzelnen Versuchsgruppen, wie sie bereits in einigen Forschungsarbeiten belegt wurde (*Landau und Zucker 1976*). So betrug die durchschnittliche Pellettfuttermenge ca. 18 g/Tier/Tag.

Inwiefern sich die Futteraufnahme auf das Körpergewicht (KG) auswirkt, war ein weiterer Betrachtungspunkt meiner Arbeit. In vielen Studien konnte eine Steigerung des KG durch Ovx dargestellt werden (*Chu et al. 1999; McElroy und Wade 1987*). Vergleicht man die Gewichte der intakten Tiere im jetzigen Versuch mit denen der ovx Tiere, so zeigt sich ein signifikanter Unterschied mit einem erhöhten Gewicht der ovx Tiere. Wogen die intakten, sf Tiere am Ende des Versuches durchschnittlich 274,7g, so betrug das KG der KO 324,7g. Diesbezüglich stimmen die Resultate mit denen bisher erzielter Studienergebnisse überein (*Meli et al. 2004; McElroy und Wade 1987*). Substituiert man E₂, wie es auch als HRT in der Menopause stattfindet, zeigen wissenschaftliche Ergebnisse eine Reduktion des KG, welches sogar dem prämenopausalen Niveau entsprechen kann (*Meli et al. 2004*). Ursächlich wird eine Steigerung der körperlichen Aktivität durch E₂ gesehen sowie eine reduzierte Futteraufnahme durch jene Substanz (*Stern und Murphy 1972; Landau und Zucker 1976*). In der Menopause sowie postmenopausal reduziert sich die körperliche Aktivität durch das Östrogenmangel. Jene physiologische Aktivitätsminderung kann anscheinend durch E₂-

Substitution kompensiert werden. Vergleicht man die KO mit E₂, so wies die zuletzt genannte Gruppe mit 274,5g im Mittel ein signifikant niedrigeres KG auf. Im Vergleich mit den intakten, sf Ratten war das KG der E₂-Tiere sogar gleich. Somit sind die Versuchsergebnisse mit denen vorheriger Studien kongruent. Der Vergleich der KO mit den Tieren, denen Ecd zur Verfügung stand, zeigte keinen großen Unterschied bzw. eine Tendenz zu höheren KG mit steigender Ecd-Konzentration. Obwohl das KG mit 344,5g bei Ecd116 im Vergleich zur KO deutlich erhöht ist, entsprach es nicht dem Signifikanzniveau. Bis zum jetzigen Zeitpunkt besteht ein Defizit in der Dokumentation bezüglich des Zusammenhanges von Ecd-Gabe und KG. Lediglich ein anaboler Effekt von Ecd konnte bisher aufgezeigt werden, welcher bis zum jetzigen Zeitpunkt im Detail nicht identifiziert ist. So besteht die Möglichkeit, über den Anteil der Fett- und Muskelmasse des Individuums Rückschlüsse auf das Körpergewicht zu gewinnen. Diesbezüglich erfolgte in einer Studie der Nachweis, dass Ecd den Anteil der Muskelmasse erhöht sowie das paratibiale und intraabdominale Fettdepot reduziert (*Seidlová-Wuttke et al. 2010*). Dementsprechend wird das erhöhte Gewicht der KO durch eine erhöhte Fettmasse hervorgerufen. Im Gegensatz dazu führt die Substitution von Ecd zu einer gesteigerten Muskelmasse, was bedeuten würde, dass unter Ecd116 der Muskelanteil unter allen Versuchsgruppen am höchsten ist. Dieser Nachweis konnte schon in einer Doktorarbeit an Ratten erbracht werden (*Ehrhardt 2009*). Inwiefern Ecd Einfluss auf den Anteil der Muskel- und Fettmasse in postmenopausalen Frauen nimmt, ist bisher in Studien nicht eruiert worden.

4.3. Einfluss von Östradiol und Ecdyson auf die Mukosa des Colons

4.3.1. Mukosaschichtdicke

Physiologisch ist die Mukosa des Colons verantwortlich für die Wasser- und Elektrolytresorption. Die Anwesenheit von Becherzellen und deren Muzinproduktion führt dazu, dass der Darminhalt gleitfähiger wird. Da der Dickdarm ein E₂-sensitives Organ ist, kann das postmenopausale Östrogendefizit dessen Funktion stören. Ebenso führen neoproliferative Prozesse, wie Adenome, welche eine steigende Inzidenz in der Menopause und danach erfahren, zu Veränderungen innerhalb des Colonepithels, welche mit einer Dysfunktion des betreffenden Dickdarmabschnittes einhergehen. Ausgangspunkt für die in dieser Arbeit durchgeführte Mukosadickenmessung war die Annahme, dass neoproliferative

Vorgänge zu Beginn mit einer Hyperproliferation einhergehen, welche sich in einer gesteigerten Mukosadicke des Dickdarmes widerspiegeln (*Wong und Wright 1999*).

Im Allgemeinen konnten in bisherigen Forschungsergebnissen eine altersbedingte Proliferationssteigerung sowie eine verminderte Apoptoserate im Colonepithel detektiert werden (*Xiao et al. 2001*). Schlussfolgernd stellen diese physiologischen Prozesse einen wichtigen Ausgangspunkt dar, welcher durch das postmenopausale E₂- Defizit und das damit zusätzlich vorhandene Risiko für Dickdarmkrebs an Bedeutung gewinnt. Da nur wenig Einfluss auf die altersbedingten Vorgänge genommen werden kann, müssen die durch Östrogenmangel erzeugten Effekte reduziert werden. Dies kann durch eine HRT erfolgen, welche in dieser wissenschaftlichen Arbeit durch E₂- und Ecd- Substitution nachvollzogen werden sollte.

Bei der Betrachtung der Messwerte, welche bezüglich der Mukosaschichtdicke ermittelt wurden, fällt auf, dass die KO im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen die stärkste Dicke mit durchschnittlich 205,6µm aufwies. Die Gruppe intakt, sf zeigte mit 195,0µm im Mittel die geringste Dicke der Mukosa. Insgesamt waren die Unterschiede innerhalb der diversen Versuchsgruppen nicht signifikant.

Da bezüglich der Dicke der Colonmukosa nach Entfernung der Ovarien derzeit wenig klinische Untersuchungen erfolgt sind, ist die Betrachtung der Versuchsergebnisse erschwert. In Studien an Mäusen fand der Nachweis statt, dass sich die Kryptenlänge durch Ovx im Vergleich zu den intakten Tieren reduziert (*Hoff und Chang 1979*). In einer anderen wissenschaftlichen Arbeit hatte die Ovx keinen Einfluss auf die Kryptenlänge (*Tutton und Barkla 1982*). In meiner Versuchsdurchführung konnte ebenfalls kein signifikanter Effekt auf die Mukosaschichtdicke durch Ovx nachgewiesen werden.

Der Vergleich der Ecd- Wirkung auf den Colon ist aufgrund der geringen Anzahl an Forschungsergebnissen, welche sich mit dem Dickdarm beschäftigen, nur bedingt möglich. Da in bisherigen Studien ein antiapoptotischer Effekt von Ecd beschrieben wurde und damit verbunden auch eine geringere Abstoßungsrate der Epithelzellen besteht, wäre mit steigender Ecd-Konzentration eine größere Mukosaschichtdicke durch erhöhte Zellzahl innerhalb der Krypte zu erwarten (*Oehme et al. 2006*). Da die diversen Ecd-Gruppen keine signifikanten Unterschiede in der Mukosaschichtdicke aufwiesen, kann die erwartete

Mukosaschichtdickenzunahme unter Ecd weder für die intakten noch für die ovariectomierten Tiere bestätigt werden.

In einigen Studien an Ratten bzw. Mäusen, welche die Kryptenlänge anhand der Anzahl der Zellen pro Krypte bestimmten, zeigte sich eine Abnahme der Kryptenlänge unter E₂ (*Altunbas et al. 2007; Hoff und Chang 1979*). In dieser Arbeit hatte E₂ keinen signifikanten Effekt auf die Mukosaschichtdicke im Vergleich zur KO. Dementsprechend stimmt die E₂-Wirkung nicht mit den vorherigen Studien überein.

Die in meiner Arbeit dokumentierte Mukosaschichtdicke wurde anhand der Kryptenlängenmessung ermittelt. Diesbezüglich bestand die Voraussetzung zur Messung in dem Vorhandensein einer Vielzahl von Kryptenlängsschnitten in allen Quadranten und den diversen Versuchsgruppen, was die Längenbestimmung für einen Vergleich zum Teil erschwerte. Andere Forschungsarbeiten fanden die Länge der Dickdarmmukosa durch Zählung der Anzahl der Zellen vom Kryptengrund bis zum Lumen heraus. Da diverse Futterzusätze Einfluss auf die Zellbeschaffenheit nehmen, beispielsweise durch Hypertrophie oder Hyperplasie von Zellen, erfolgt indirekt eine Längenzunahme der Krypte. Eine Änderung der Mukosadicke korreliert folglich nicht immer mit einer gesteigerten Anzahl an Zellen. Bei dem Vergleich der verschiedenen Ergebnisse wissenschaftlicher Arbeiten resultieren deshalb Schwierigkeiten.

4.3.2. Zellproliferation

Der Nachweis der Zellproliferation im Colonepithel erfolgte unter Anwendung der PCNA-Färbung. Wie schon in einigen Studien bestätigt, kann anhand dieser Färbung die Proliferationsaktivität der Zellen in der Epithelschicht des Dickdarms bestimmt werden, durch Fixierung aller Zellen, welche sich in der S-Phase befinden (*Kubben et al. 1994*). Forschungsergebnisse zeigen den Hauptproliferationsbereich am Grund der Krypte, weshalb die Zellzählung in dieser Region stattfand (*Hall et al. 1994*). Auch wenn eine übermäßige Proliferation der epithelialen Zellen mit einem erhöhten Risiko an neoproliferativen Prozessen im Dickdarmepithel einhergeht (*Welberg et al. 1990; Preston-Martin et al. 1990*), bedarf es trotzdem einer gewissen Proliferationsrate, um ein physiologisches Gleichgewicht zwischen Apoptose und der Erneuerung von Zellen zu erhalten. Vor allem in der Menopause, unter dem anhaltenden Östrogendefizit, ist jene Dysregulation vorherrschend. Da unter HRT

von E₂ neoplastische Veränderungen in der luminal gelegenen Zellschicht des Colons rückläufig sind, sowie proliferationsenkende Einflüsse dieses Hormones beschrieben wurden, sollen jene Erkenntnisse in dieser Arbeit diskutiert werden im Vergleich mit der Wirkung von Ecd (*Altunbas et al. 2007; Hoffmeister et al. 2007*).

Bei der Betrachtung der Zellproliferation der KO fällt im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen eine sehr starke Verringerung der proliferierenden Zellen auf, welche tatsächlich einer Stagnation der Proliferation gleichzusetzen ist, da jene unter 1% entsprach. Diese Erkenntnis entspricht den Ergebnissen stattgefundener Forschungen, welche diesbezüglich eine erniedrigte Zellsynthese und eine Kryptenhypoplasie detektierten (*Hoff und Chang 1979*). Zusätzlich korreliert eine längere Dauer der S-Phase mit neoproliferativen Vorgängen im Dickdarmepithel (*Bleiberg et al. 1985*).

Ein direkter Zusammenhang zwischen Ecd und der Proliferation im Dickdarmepithel fand bis zu diesem Zeitpunkt keine Bedeutung in wissenschaftliche Untersuchungen. Lediglich eine verringerte Apoptoserate im Dickdarmepithel ist für Ecd beschrieben worden (*Oehme et al. 2006*). Schlussfolgerungen bezüglich der Zellsyntheserate können daraus nicht getroffen werden. Da für Ecd eine Proliferation von Keratinozyten in der Haut nachgewiesen wurde (*Ehrhardt 2009*), könnte Ecd ebenso im Dickdarmepithel zu einer gesteigerten Proliferation führen. Eine konzentrationsabhängige Proliferationssteigerung konnte jedoch in meiner Arbeit nicht beobachtet werden. Im Vergleich zur KO waren die PCNA-positiv angefärbten Zellen in allen ovx Gruppen unter Ecd signifikant erhöht. Bei der Betrachtung der PCNA-positiven Zellen fällt ein U-förmiger Verlauf dieser Zellen bezüglich ihrer Menge mit steigender Ecdkonzentration bei den ovx Tieren auf. Während die Gruppen ovx, Ecd 18 und ovx, Ecd 116 ca. 17% PCNA-positiv angefärbte Zellen pro 500 Zellen aufwiesen, zeigte die Gruppe ovx, Ecd 57 nur 5% entsprechender Zellen. Die Werte der zuletzt genannten Gruppe betrug somit nur ein Drittel der Werte der beiden anderen ovx Gruppen unter Ecd-Zufuhr. Im Vergleich zu E₂ war die Anzahl der PCNA-positiven Zellen der Gruppe ovx, Ecd 57 ungefähr gleich. Aus bisherigen Untersuchungen einer HRT unter E₂ und dem dadurch nachgewiesenen protektiven Einfluss auf das Dickdarmepithel (*Qiu et al. 2004*) kann ein positiver Effekt dieser Ecd-Konzentration durch die Erhöhung der Proliferation im Vergleich zur KO spekuliert werden. Obwohl die beiden anderen Substanzmengen von Ecd bei den ovx Tieren eine mehr als doppelt so hohe Proliferation hervorbrachten, kann dennoch nicht

direkt von einem negativen Effekt auf das Colonepithel gesprochen werden, da bisher nicht eindeutig geklärt ist, bis zu welchem Punkt eine Proliferation günstig für das Epithel ist und ab welchem Zeitpunkt die gesteigerte Zellteilung Karzinome verursacht. Aufgrund der gesteigerten Zellsynthese und der für Ecd bereits beschriebenen verringerten Apoptoserate, müsste zusätzlich auch die Kryptenlänge größer werden. Jene Beobachtung konnte in meiner Doktorarbeit aber nicht erfolgen. Die Substitution von Ecd bei den intakten Tieren zeigte signifikant erhöhte Werte im Vergleich zur KO. Bei der Gegenüberstellung der Gruppe intakt,sf und den intakten Tieren, denen Ecd zugeführt wurde, stellte sich eine höhere Anzahl PCNA-positiv angefärbter Zellen der Ecd-Gruppe dar. Daraus schlussfolgernd erhöht Ecd die Proliferation auch in intakten Tieren.

Die im Allgemeinen unter HRT mit E₂ existierenden Ergebnisse bezüglich der Proliferation im Dickdarmepithel zeigen Differenzen. Während einige Studien eine Proliferationssteigerung darstellen (*Cho et al. 2007*), weisen andere wissenschaftliche Arbeiten Gegenteiliges auf (*Altunbas et al. 2007; Hoff und Chang 1979*). Im Vergleich zur KO bestand in meiner Arbeit unter E₂ eine signifikante Erhöhung der proliferierenden Zellen, welche sogar das prä-Ovx-Niveau übertraf, aufgezeigt anhand der Gruppe intakt,sf. Diese Beobachtung stimmt mit wissenschaftlichen Resultaten überein, welche eine Proliferationszunahme aufzeigen (*Cho et al. 2007*).

Da neoproliferative Prozesse durch gesteigerte Proliferation und verminderte Apoptose gekennzeichnet sind, fällt es schwer, Aussagen über die Effektivität der getesteten Substanzen nur anhand der Proliferationsrate zu treffen. In diesem Zusammenhang wäre die Bestimmung der Apoptoserate von zusätzlicher Relevanz gewesen. Da eine gesteigerte Zellanzahl sowie eine verstärkte Syntheserate mit einem erhöhten Risiko für Zellschäden einhergehen, ist eine zu starke Proliferation von Mukosazellen als negativ anzusehen. Aber auch eine stark verringerte Zellsynthese ist als prognostisch ungünstig zu betrachten, da das Risiko für DNA-Schäden steigt und entsprechende Zellen nicht erneuert werden.

Um die Ergebnisse meiner Doktorarbeit detaillierter einschätzen zu können, wäre es deshalb von großer Bedeutung, wenn sich zukünftige Forschungsarbeiten intensiver mit der Grenze zwischen protektiver Proliferation und schädlicher Zellteilung innerhalb des Dickdarmepithels auseinandersetzen würden.

4.4. Einfluss von Östradiol und Ecdyson auf die Serumlipide

4.4.1. Serumcholesterin

Für Cholesterin konnte in Studien im Allgemeinen eine positive Korrelation zwischen steigenden Serumspiegeln und der Rate an neoproliferativen Läsionen im Colon nachgewiesen werden (*Fiorenza et al. 2000*).

Bei Betrachtung der Cholesterinwerte der KO stellte sich eine signifikante Zunahme dieser Serumfette nach der Entfernung der Eierstöcke dar. Eine Übereinstimmung mit Studien an ovx Ratten, welche diese Serumcholesterinsteigerung nach Ovx beobachtet haben, ist somit gegeben (*Meli et al. 2004; Liu D und Bachmann 1998*). Die Hintergründe für die nach Ovx vorhandene Hypercholesterinämie aufgrund des E₂-Mangels sind noch nicht vollständig verstanden. Eventuell erklären die verminderte Cholesterin-Ausschleusung in der Peripherie oder die herabgesetzte Umwandlung von Cholesterin in Gallensäuren durch die verminderte Aktivität des Enzymes 7 α -Hydroxylase diese Beobachtung (*Lucas et al. 2000*).

Im Vergleich zur KO erzielten die niedrigste Ecd-Dosierung bei den ovx Tieren sowie die Substitution von Ecd bei den intakten Tieren signifikant erniedrigte Serumcholesterinwerte. Die beiden anderen Ecd-Dosierungen zeigten keinen signifikanten Unterschied zur KO. Im Allgemeinen konnte unter Ecd-Substitution bei den ovx Tieren eine geringere Abnahme der Cholesterinwerte mit zunehmender Dosis der Testsubstanz festgehalten werden. Die gewonnenen Resultate können nicht mit bereits vorhandenen Beobachtungen verglichen werden, da diese an anderen Rattenmodellen mit anderen Dosierungen der Testsubstanz durchgeführt wurden (*Mironova et al. 1982; Catalan et al. 1985*). Pathophysiologisch wird eine Ecd-bedingte Reduktion von Cholesterin im Serum durch dessen verminderte Synthese sowie durch einen gesteigerten Katabolismus verursacht (*Dinan 2009*).

Für E₂, welches seit längerer Zeit im Rahmen der HRT eingesetzt wird, sind Cholesterin-senkende Effekte in einer Vielzahl von Studien an ovx Ratten und postmenopausalen Frauen beschrieben (*Liu D und Bachmann 1998; Lundeen et al. 1997; Jensen et al. 1990*). Diese Cholesterin-senkende Wirkung kann in dieser Arbeit bestätigt werden. So senkte E₂ die Cholesterinserumspiegel signifikant auf ein Drittel im Vergleich zur KO. Da Cholesterin ein Hauptbestandteil von LDL und HDL in der Ratte ist, und jene Partikel eine vermehrte

Aufnahme über den LDL-Rezeptor der Leber und der peripheren Gewebe, stimuliert durch E_2 , erfahren, sinkt der Wert des sich im Serum befindenden Cholesterins (*Parini et al. 1997; Cooper et al. 1987*). In diesem Zusammenhang erfolgen eine Speicherung des Cholesterins in den entsprechenden Zellen sowie eine Senkung der endogenen Cholesterinproduktion aufgrund fehlender Nachfrage.

In Untersuchungen erfolgte die Feststellung, dass bei erhöhten Serumcholesterinwerten häufiger epitheliale Prozesse in der Colonmukosa auftreten (*Fiorenza et al. 2000*). Inwiefern die Serumfettwerte selbst einen Ausgangspunkt in der Entstehung von Dickdarmkrebs darstellen, konnte bisher nicht detailliert nachgewiesen werden. Da dennoch ein Zusammenhang zwischen Cholesterin und Dickdarmkrebs besteht, sind Cholesterinvermindernde Effekte als günstig für das Dickdarmepithel anzusehen. Die fettsenkenden Wirkungen von Ecd und E_2 fanden in meiner Arbeit zum Teil Bestätigung.

4.4.2. LDL

Die Zunahme von LDL bei ovx Ratten wurde schon in einigen Forschungsarbeiten beschrieben (*Van Lenten et al. 1983*) und kann auch für diese Arbeit bestätigt werden. Jene LDL-Zunahme besteht auch bei ovariectomierten Frauen (*Suda et al. 1998*) bzw. postmenopausalen Frauen. Die Ursache liegt in einer verminderten Expression der LDL-Rezeptoren mit steigendem Lebensalter, was zusätzlich durch den verringerten E_2 -Spiegel verstärkt wird (*Pickar et al. 1998*). Schlussfolgernd gelangt weniger LDL in die Zellen. Das Resultat ist eine Zunahme des zirkulierenden LDL.

Der in diesem Versuch untersuchte Einfluss von Ecd auf LDL fand in vorhandenen Studien bisher keine Beachtung. Diesbezüglich stellen die in meiner Arbeit beobachteten Veränderungen der LDL-Werte im Serum unter unterschiedlichen Ecd-Dosierungen eine primäre Erkenntnis dar. So wies die Gruppe Ecd18 im Vergleich zur KO signifikant erniedrigte LDL-Werte auf. Die unter der mittleren und höchsten Ecd-Konzentration beobachteten LDL-Werte bei den ovx Tieren waren nicht signifikant verändert gegenüber der KO. Eine Ecd-Substitution bei den intakten Tieren wies keine Unterschiede im Vergleich zu den Tieren intakt, sf auf. Die LDL finden somit in dieser Gruppe unter Ecd keine Beeinflussung. Im Vergleich zur KO waren unter Ecd die LDL-Werte der intakten Tiere signifikant erniedrigt.

Die in anderen Arbeiten dargestellte Senkung von LDL durch E₂ ist kongruent mit den in dieser Arbeit erzielten Resultaten (*Liu D und Bachmann 1998; Kuller et al. 1990*). So verringerten sich die LDL-Serumwerte auf 5% im Vergleich zur KO. Pathophysiologisch wird diese sehr starke Abnahme von LDL in der gesteigerten Synthese der LDL-Rezeptoren in der Leber gesehen (*Parini et al. 1997; Cooper et al. 1987*). Somit resultiert eine vermehrte Aufnahme von LDL aus dem Blut in die Leber (*Parini et al. 2000*). Dieser Mechanismus ist von großer Bedeutung für die fettsenkende Wirkung von E₂ und findet auch prämenopausal statt. Im Vergleich zur Gruppe intakt,sf war eine viel stärkere Reduktion der LDL-Werte in der mit E₂ behandelten Versuchsgruppe zu beobachten. Die Ursache für diese Beobachtung ist unklar. Die E₂-Spiegel im Serum nach Dekapitation der Tiere wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt. In anderen Untersuchungen, in welcher dieses Östrogen gemessen wurde, entsprachen die Werte einem physiologischen Level (*Meli et al. 2004*). Da Ratten ebenso wie Menschen Östrogenzyklen aufweisen (*Shaikh 1971*), und im Versuchsaufbau die Phase innerhalb jener Zyklen nicht nachvollzogen wurde, könnten die Unterschiede zwischen den intakten,sf Tieren und der ovx Gruppe, welcher E₂ zur Verfügung stand, durch die diversen Zyklusphasen hervorgerufen werden, in denen Östrogene Schwankungen unterliegen und die Fettwerte dementsprechend beeinflussen (*Kuller et al. 1990*). Eine so deutliche Differenz der LDL-Serumspiegel in den Gruppen intakt, sf und ovx, E₂ scheint dadurch dennoch unwahrscheinlich. Hinzufügend kann ein hoher Östrogenspiegel der Gruppe ovx, E₂ nicht durch das peroral aufgenommene Östradiol verursacht sein, aufgrund starker intestinaler und hepatischer Metabolisierung dieser Substanz (*Nahoul et al. 1993*). Schlussfolgernd können die starken Unterschiede der beiden betrachteten Versuchsgruppen nicht geklärt werden.

4.4.3. HDL

Ihre Funktion als „gute“ Fette verwirklichen HDL durch den Rücktransport überschüssigen Cholesterins zur Leber, weshalb ein hoher Anteil dieser Serumbestandteile als günstig angesehen wird. Im Gegensatz zum Menschen erfolgt die Speicherung des Cholesterins bei der Ratte zu einem großen Anteil vor allem in HDL. Aus diesem Grund haben Ratten im Allgemeinen ein sehr niedriges kardiovaskuläres Risiko. Im Vergleich zum Menschen, bei welchem LDL das dominante Lipoprotein ist, entsprechen LDL in Ratten nur einer kleinen Fraktion. Trotz alledem kann die Ratte in diesem Zusammenhang als Modell zur Darstellung

entsprechender Effekte auf die Lipidparameter genutzt werden, da in Studien schon gleiche Veränderungen von Cholesterin oder Triglyceriden im Vergleich zum Menschen z.B. durch E₂ aufgezeigt werden konnten.

Die jetzigen Resultate zeigten erhöhte HDL-Werte der KO im Vergleich zu den intakten Tieren, denen sojafreies Futter zur Verfügung stand. Jene gesteigerten Serum-HDL führen zu einer Zunahme des Cholesterins im Serum.

Wie bereits für LDL geschildert, fand auch der Einfluss von Ecd auf HDL bisher keine Betrachtung in wissenschaftlichen Forschungsarbeiten. In meiner Arbeit zeigte Ecd 18 keinen Unterschied der HDL-Serumspiegel im Vergleich zur KO, während die Gruppen Ecd 57 und Ecd 116 signifikant erhöhte HDL-Werte aufwiesen. Die konzentrationsbedingte HDL-Erhöhung unter Ecd erklärt die bereits beschriebene Erhöhung des Serumcholesterins. Auch bei den intakten Tieren führte die Ecd-Substitution zu einer Erhöhung der HDL im Vergleich zu der Gruppe intakt,sf. Aus diesen Beobachtungen kann aufgrund der indirekt proportionalen Beziehung zwischen einem hohen HDL im Serum und dem kardiovaskulären Risiko zusätzlich auf eine Protektion der Gefäße durch Ecd geschlossen werden.

Bei Ratten befindet sich Apo-E an LDL und HDL gebunden, weshalb durch E₂ eine Wirkung auf beide Fette stattfindet. So koppelt nicht nur LDL, sondern auch HDL, Apo-E vermittelt, an den LDL-Rezeptor, welcher, stimuliert durch E₂, eine vermehrte Synthese erfahren hat (*Parini et al. 1997*). Eine Reduktion beider Serumfettparameter resultiert (*Chao et al. 1979*). Diese E₂-vermittelte Verminderung von HDL fand in dieser Arbeit Bestätigung. So sanken die HDL-Werte signifikant auf 16% im Vergleich zu dem Wert der KO.

4.4.4. Triglyceride

Als Depotfette in Adipozyten dienen Triglyceride vor allem als Energielieferant für „schlechte Zeiten“. Insbesondere postmenopausal ist dieser Aspekt von Bedeutung. So findet ab diesem Zeitpunkt eine Zunahme der Fettspeicher statt, vor allem durch die gesteigerte Aktivität der Lipoproteinlipase und der daraus resultierenden Zunahme der Triglyceride im Blut und deren Transport in das Fettgewebe (*Hamosh und Hamosh 1975*).

Diese Steigerung der Serum-Triglyceride, wie sie bereits für ovx Tiere beschrieben wurde (*Van Lenten und Roheim 1980*), konnten wir in unserer Arbeit für die KO nicht bestätigen.

Da die Intensivierung der Fettmasse aufgrund einer Korrelation mit neoproliferativen Läsionen im Dickdarmepithel als negativ anzusehen ist (*Tamakoshi et al. 2005*), wäre eine HRT, welche gegenteilige Effekte auf das Fettgewebe besitzt, zu bevorzugen.

Eine bereits in Forschungsergebnissen beobachtete Erhöhung der Serum-Triglyceride unter Ecd kann in meiner Arbeit nicht bestätigt werden (*Catalan et al. 1985; Slama und Lafont 1995*). So veränderte die Ecd-Gabe sowohl bei den ovx Tieren als auch bei den intakten Tieren im Vergleich zur KO in keiner Versuchsgruppe die Triglycerid-Werte im Serum signifikant. Aufgrund einer Erhöhung der Muskelmasse und Reduktion der Fettmasse durch Ecd (*Seidlová-Wuttke et al. 2010*), besteht die Möglichkeit, dass die Triglyceride insbesondere durch das Muskelgewebe Nutzung erfahren, für welches eine gesteigerte metabolische Aktivität unter Ecd beschrieben ist (*Syrov et al. 2008*).

Allein E₂ steigerte die Triglycerid-Werte signifikant um ein Vielfaches im Vergleich zur KO. Diese Beobachtung ist kongruent mit Forschungsergebnissen, welche signifikant höhere Triglycerid-Werte bei ovx Ratten und postmenopausalen Frauen unter E₂ beschreiben (*Seidlová-Wuttke et al. 2005; Meli et al. 2004; Walsh et al. 1991*). Die in meiner Arbeit ermittelten Ergebnisse können somit mit jenen Aufzeichnungen in Übereinstimmung gebracht werden. Weiterhin existieren Untersuchungen, die keinen Einfluss durch E₂ beschreiben, auch bei postmenopausalen Frauen (*Kim et al. 1994; Suda et al. 1998*). Die unter E₂ erzielte Triglycerid-Zunahme findet in diesem Zusammenhang durch eine vermehrte Synthese von Triglyceriden in der Leber und deren Freisetzung in VLDL sowie deren anschließende Umwandlung in LDL statt (*Weinstein et al. 1986*). Zusätzlich erfolgt durch E₂ eine Hemmung der Lipoproteinlipase, weshalb weniger Triglyceride in das Fettgewebe eingeschleust werden und als Depotfette zur Verfügung stehen. Stattdessen werden die im Fettgewebe gespeicherten Fettsäuren freigesetzt (*Pedersen et al. 1992*). Eine unter HRT bestehende geringere Körperfettmasse ist somit erklärbar.

4.4.5. Leptin

Dem postmenopausalen Östrogendefizit entsprechend, und den daraus resultierendem gesteigerten Körperfett, findet eine Erhöhung der Leptinserumspiegel statt (*Chu et al. 1999*). In dieser Arbeit konnte diese Gegebenheit bestätigt werden, da die KO signifikant höhere Leptinspiegel besaß als alle anderen Versuchsgruppen.

Die in meiner Arbeit bei den Ecd-Gruppen beobachteten niedrigeren Leptinspiegel können aufgrund fehlender wissenschaftlicher Ergebnisse nicht mit anderen Studien verglichen werden. Da für Ecd allerdings Resultate bezüglich einer Senkung der Körperfettmasse vorhanden sind, kann daraus ein Bezug zu Leptin erfolgen. So besteht ein proportionales Verhältnis zwischen Körperfett und Leptinserumspiegeln. Eine Verringerung des Körperfettanteils geht dementsprechend mit erniedrigten Leptinwerten einher (*Tamakashi et al. 2005; Meli et al. 2004*). Diese Beobachtung kann unter Ecd-Zufuhr bei allen Versuchsgruppen bestätigt werden, wobei die Senkung von Leptin bis auf die Gruppe Ecd116 signifikant war. Obwohl die Leptinspiegel unter Ecd-Substitution auf einem erniedrigten Niveau lagen, erreichten sie nicht das physiologische prä-Ovx-Level, aufgezeigt anhand der Gruppe intakt,sf. Unter Ecd-Substitution bei den intakten Tieren fand keine Änderung der Leptinserumwerte im Vergleich zur Gruppe intakt,sf statt. Diese Tatsache kann durch den geringen Effekt von Ecd auf den physiologischen prämenopausalen Fettstoffwechsel verursacht sein, welcher unter den dominierenden Wirkungen von E₂ steht.

Für E₂, im Rahmen einer HRT in der Menopause eingesetzt, besteht ein Pool diverser Studienergebnisse, welche differente Ergebnisse aufweisen. So zeigen einige Forschungsergebnisse eine Senkung der Leptinspiegel (*Meli et al. 2004*), andere das Gegenteil (*Alonso et al. 2007*). In dieser Doktorarbeit stellte sich eine signifikante und, im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen, die stärkste Minimierung der Leptinserumwerte dar. Daraus schlussfolgernd sind die Ergebnisse mit denen, welche unter E₂-Substitution verringerte Leptinwerte im Serum aufgezeigt haben (*Meli et al. 2004*), kongruent. In der Menge entspricht der Leptinspiegel annähernd dem prä-Ovx-Niveau der Gruppe intakt, sf.

Resultierend aus den aufgezeigten Ergebnissen dieser Arbeit, können sowohl Ecd als auch E₂ einen Einfluss auf die Leptinspiegel ausüben und diese senken. Die Ursache der

herabgesetzten Serumleptinwerte liegt in der fettsenkenden Wirkung allgemein sowie in der geringeren Körperfettmasse durch die verwendeten Substanzen.

4.5. Bezug der Serumlipide auf die Proliferation im Dickdarmepithel

Die von uns durchgeführten Korrelationsanalysen zwischen den Parametern der Serumfettwerte und der Anzahl PCNA-positiver Zellen zeigten keinen signifikanten oder proportionalen Zusammenhang der beiden Parameter, weshalb auf die Darstellung der einzelnen Korrelationsgraphen in dieser wissenschaftlichen Arbeit verzichtet wurde. Deshalb kann weder für die Substitution von E₂ noch für Ecd ein Bezug zwischen Serumfetten und der Zellproliferation im Dickdarmepithel genommen werden. Daraus schlussfolgernd ist eine Aussage über das Risiko für neoproliferative Läsionen in diesem Organ durch die getesteten Substanzen nicht möglich.

5. Zusammenfassung

Bisher erfolgten nur wenige Studien über das Phytoecdysteroid Ecd. Ovariectomierte S.-D.-Ratten dienten dabei schon häufiger als Modell postmenopausaler Frauen, um protektive Wirkungen dieses Phytoecdysteroides aufzuzeigen, wie beispielsweise die Senkung des abdominalen Fettanteils. In dieser Arbeit wurde der Effekt von Ecd und E₂ auf die Colonmukosa sowie auf die Serumlipide untersucht. Das hierbei gesetzte Ziel bestand darin, die Wirkungen der beiden Testsubstanzen auf diesen Bestandteil des Dickdarmes gegenüberzustellen. Die grundlegende Überlegung war, dass E₂ seit langer Zeit das Standardpräparat in der HRT ist, welches allerdings diverse Nebenwirkungen aufweist. Ecd könnte dementsprechend eventuell eine nebenwirkungsärmere Alternative darstellen. Während des Versuches standen den ovx Ratten Ecd und E₂ oral über einen Zeitraum von 3 Monaten zur Verfügung. Die Wirkungen auf die Colonmukosa wurden histomorphologisch sowie immunhistochemisch quantifiziert. Die Bestimmung der Serumlipide erfolgte enzymatisch-fluorometrisch.

5.1. Mukosaschichtdicke

Eine Zunahme der Mukosaschichtdicke durch Hyperproliferation bedingt eine höhere Rate an Neoplasien. Aufgrund fehlender signifikanter Unterschiede in allen Versuchsgruppen kann keine Wirkung von Ecd und E₂ auf die Mukosaschichtdicke beschrieben werden.

5.2. Proliferation im Colonepithel

Die für E₂ bereits beschriebenen positiven Effekte auf das Dickdarmepithel im Rahmen einer HRT finden in dieser Arbeit Bestätigung. Gleiches trifft auch für Ecd57 zu, bei welchem die Zellproliferation prä-Ovx-Verhältnissen entsprach. Die starke Zunahme der Zellsynthese von Ecd18 und Ecd116 ist zunächst auch als positiv einzuschätzen. Zusätzlich führte Ecd bei den intakten Tieren zu einer Zunahme der PCNA-positiven Zellen, sodass ein proliferationssteigernder Effekt im Colonepithel unter Ecd angenommen werden kann. Im Vergleich zur KO zeigte sich kein signifikanter Unterschied der intakten Tiere, welche sojafreies Futter bekamen.

5.3. Serumcholesterin

Eine signifikante Reduktion der erhöhten Serumcholesterinmenge der KO fand insbesondere durch E₂ statt. Während sich durch Ecd18 eine signifikante Reduktion dieses Serumlipides im Vergleich zur KO darstellte, resultierte durch die Substitution von Ecd57 und Ecd116 kein signifikanter Effekt auf die Serumcholesterinwerte dieser Vergleichsgruppe.

5.4. LDL

Die postmenopausale Zunahme der LDL konnte in dieser Arbeit bei der KO nachgewiesen werden. Im Vergleich zu dieser Gruppe, senkte E₂ die LDL-Werte signifikant um ein Vielfaches und im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen auch am stärksten. Unter den Ecd-Gruppen senkte nur Ecd18 die LDL signifikant. Schlussfolgernd besteht insbesondere für E₂ eine fettsenkende Wirkung, welche durch den östrogenbedingten Einfluss auf die LDL-Rezeptoren verursacht wird.

5.5. HDL

In dieser Arbeit konnte unter steigender Ecd-Konzentration eine Zunahme der Serum-HDL beobachtet werden. So zeigte die Gruppe Ecd18 ähnliche Werte wie die KO. Die mittlere und höchste Konzentration führten zu gesteigerten HDL-Werten im Vergleich zur KO. Im Gegensatz dazu erfolgte durch E₂ eine sehr starke, signifikante Reduktion der HDL im Vergleich zur KO. Somit erzielte E₂ einen fettreduzierenden Effekt, verursacht durch eine vermehrte Expression der LDL-Rezeptoren und die anschließende Aufnahme von HDL in die Zellen. Schlussfolgernd besitzt Ecd keine Wirkung auf die LDL-Rezeptoren.

5.6. Triglyceride

Im Vergleich zur KO führte nur E₂ zu einem signifikanten Effekt auf die Triglyceride im Serum, welche eine starke Steigerung erfuhren. Bei den anderen Versuchsgruppen war kein signifikanter Effekt auf dieses Serumlipid vorhanden.

5.7. Leptin

Im Vergleich zur KO erzielte Ecd niedrigere Leptinspiegel bei den ovx Tieren mit Ausnahme der Gruppe ovx, Ecd 116, welche keine signifikante Differenz aufwies. E₂ reduzierte Leptin im Serum um ein Vielfaches im Vergleich zur KO, sowie zu Ecd, und entsprach circa den Werten der intakten, sf Tiere. Da sowohl Ecd als auch E₂ zu einer signifikanten Reduktion der Leptinserumwerte im Vergleich zur KO führten, könnte ein protektiver Effekt auf das Colonepithel spekuliert werden, welcher in meinen Korrelationsuntersuchungen jedoch nicht aufgezeigt werden konnte.

5.8. Fazit

Für Phytoecdysteroide konnten schon häufiger positive Effekte auf die durch das postmenopausale Östrogendefizit entstandenen Beschwerden aufgezeigt werden, weshalb Ecd eine Alternative zu der herkömmlichen Östrogen-HRT darstellen kann. Zusammenfassend kann diesbezüglich auf die in dieser Arbeit durch Ecd demonstrierte Wirkung auf die Proliferation im Dickdarmepithel hingewiesen werden, welche in allen Ecd-Dosierungen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe war. Insbesondere die mittlere Ecd-Konzentration führte zu einer günstigen Anzahl proliferierender Zellen, welche annähernd dem Niveau der intakten Gruppe ohne Futterzusatz sowie der Gruppe ovx, E₂ entsprach. Folglich zeigte sich eine günstigere Proliferationsaktivität der Gruppe ovx, Ecd57 und somit die beste Ausgangssituation zur Prävention von neoproliferativen Prozessen des Dickdarms, welche allerdings in den Korrelationsuntersuchungen nicht bestätigt wurde. Inwiefern sich die Ecd-Wirkung im Detail auf die Dickdarmmukosa entfaltet, sollte deshalb in weiteren Forschungen an Dickdarmepithelzellen, welche unter karzinogenem Einfluss stehen, erfolgen. Eine mit einer Hyperproliferation verbundene, signifikante, Mukosaschichtdickenzunahme konnte für keine Versuchsgruppe aufgezeigt werden. Zusätzlich zeigten sich fettsenkende Wirkungen der verschiedenen Ecd-Konzentrationen, welche jedoch nicht in allen Versuchsgruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe oder der Gruppe E₂ waren. Die für E₂ bereits aufgezeigte, fettreduzierende Wirkung konnte für alle Serumlipide belegt werden.

Die Wirkungen von Ecd auf den Dickdarm sind weitestgehend unerforscht. Umso bedeutender ist es, noch fehlende Wissenslücken aufzufüllen. Auch wenn der

Wirkungsmechanismus von Ecdysteroiden in Säugetieren bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht detektiert wurde und eine Kopplung an Steroidrezeptoren verneint wird, scheinen sie doch Einfluss auf den Organismus zu nehmen. Der Pathomechanismus dieser Wirkungen bedarf also noch weiterer, intensiver Nachforschungen. Abschließend kann dennoch festgehalten werden, dass Phytoecdysterioide wie Ecd ebenso wie Phytoöstrogene, welche in Soja enthalten sind und eine der Hauptnahrungsquellen in Asien darstellen, eventuell zur Prävention neoproliferativer Läsionen im Dickdarmepithel eingesetzt werden können. Der Bedarf zusätzlicher Forschungen besteht somit. Da Ecd zusätzlich protektive Wirkungen auf die Serumlipide besitzt, könnte es zukünftig eine Alternative zur herkömmlichen HRT mit E₂ darstellen.

6. Methodischer Anhang

6.1. Futtertabelle (Futterzusammensetzung)

Rohnährstoffe	%	Mineralstoffe	%	Fettsäuren	%
Trockensubstanz	88,2	Calcium	1	C 12:0	
Rohprotein	21,7	Phosphor	0,7	C 14:0	0,01
Rohfett	4,3	Natrium	0,19	C 16:0	0,56
Rohfaser	4,2	Magnesium	0,2	C 16:1	0,01
N frei Extraktstoffe	52,2	Aminosäuren		C 18:0	0,08
Stärke	43	Lysin	1,22	C 18:2	2,26
Zucker	3	Methionin	0,44	C 18:3	0,22
Vitamine	pro kg	Met+Cys	0,83	C 20:0	0,01
Vitamin A	15.000 IE	Threonin	0,97	C 20:1	0,02
Vitamin D ₃	1.000 IE	Tryptophan	0,28	C 20:5	
Vitamin E	115 mg	Arginin	1,13	C 22:6	
Vitamin K	5 mg	Histidin	0,51	Spurenelemente	per kg
Vitamin B ₁ (Thiamin)	18 mg	Valin	1,25	Eisen	169 mg
Vitamin B ₂ (Riboflavin)	22mg	Isoleucin	1,03	Mangan	78 mg
Vitamin B ₁₂ (Cobalmin)	20 mg	Leucin	1,95	Zink	101 mg
Vitamin B (Pyridoxin)	100µg	Phenylalanin	1,21	Kupfer	14 mg
Nicotinsäure	120 mg	Phe+Tyr	2,2	Iod	2,2 mg
Folsäure	7 mg	Glycin	1,05	Selen	0,4 mg
Biotin	460 µg	Glutaminsäure	3,96	Cobalt	2,2 mg
Cholin-Cl	2.380 mg	Asparaginsäure	2,18	Energie	MJ/kg
Inositol	100 mg	Prolin	1,53	Bruttoenergie	16,8
		Alanin	1,26	Umsetzbare Energie	13,3
		Serin	1,17		

Tabelle 4: Futtertabelle. Sniff®R-Z, phytoöstrogenarm (sojafrei)

6.2. Analyseergebnisse von β -Ecdyson

Items	Specifications	Results
Appearance	White Powder	Complies
Loss on Drying	≤ 5.0%	0,49%
Residue on Ignition	≤ 2.0%	0.21%
20-Hydroxyecdysone	≥ 95.0%	95.23%
Germ Count	≤ 1000/g	< 1000/g
Coliform bacillus	Negative	Negative
Mold	≤ 100/g	< 100/g
Yeast	≤ 100/g	< 100/g
Staphylococcus aureus	Negative	Negative

Tabelle 5: Untersuchungsergebnisse der Testsubstanz β -Ecdyson

Schlussfolgernd stimmten die Analyseergebnisse mit den gesetzten Standards überein. Ecdyson konnte dementsprechend dem Futter zugesetzt werden.

6.3. Futterzusammensetzung des Pelletfutters mit Testsubstanz

In den entsprechenden Versuchsgruppen wurde die Testsubstanz in ihrer spezifischen Dosis dem sojafreien Pelletfutter durch die Firma Sniff® zugesetzt. In diesem Zusammenhang wurden:

- E₂ in einer Dosis von 10 g/kg Futter
- Ecd in einer Dosis von 1 g/kg Futter
- Ecd in einer Dosis von 3 g/kg Futter
- Ecd in einer Dosis von 6 g/kg Futter

hinzugefügt. Die diversen Präparate standen folglich als Pelletfutter zu oralen Aufnahme mit der Nahrung zur Verfügung.

6.4. Histologische Methoden

6.4.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)

Tabelle 6: Schema der HE-Färbung

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	25 sec
Leitungswasser	10 min
Eosin	30 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

6.4.2. PCNA-Färbung/Immunhistochemische Färbung

- 1) Entwässerung der Hautschnitte siehe Material und Methoden Tab. 3
- 2) Destilliertes Wasser für 5 Min
- 3) Objektträger mit 0,01 M Citratpuffer, pH 6 bedecken
- 4) In der Mikrowelle bei 750 Watt für 5 Min. kochen
- 5) Verloren gegangenes Volumen auffüllen. 1 Min. bei Raumtemperatur stehen lassen.
- 6) Schritt 4 wiederholen
- 7) Verloren gegangenes Volumen auffüllen. 20 Min. bei Raumtemperatur stehen lassen.
- 8) Objektträger für 3 Min in destilliertes Wasser stellen.
- 9) Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: 75% 1x, 96% 2x, 100% 3x jeweils 2 Min., kein Xylol.
- 10) Überschüssigen Puffer von Objektträger abtrocknen, Gewebe darf hierbei nicht austrocknen.
- 11) Abblocken der Peroxidaseaktivität mit 3% H₂O₂ in Methanol für 30 Min. (10 ml 30 Vol. H₂O₂, 90 ml Methanol)
- 12) Wässern in absteigender Alkoholreihe: 100% 2x, 96% 2x, 75% 2x, jeweils 2 Min.. Hierbei Objektträger in extra Ethanol Küvette.
- 13) Destilliertes Wasser 3 Min.
- 14) PBS 5 Min. 2x, leicht schütteln, dabei PBS zwischen beiden Schritten wechseln
- 15) Blocken der unspezifischen Bindung: 1% Ziegenserum in PBS (+1% Rinderserum). 500µl pro Objektträger für 30 Min..
- 16) Waschen mit PBS (Spritzenflasche) 5 Min. 2x, leicht schütteln, PBS jeweils erneuern, O-Kontrolle in extra Küvette (nur 2. Antikörper).
- 17) 1. Arbeitsantikörper in Arbeitsverdünnung zugeben (1:800 PCNA), 30 Min. 20µl/Schnitt.
- 18) Mit PBS waschen und in PBS geben, 5 Min., 2x, leicht schütteln.
- 19) 2. Antikörper (Rabbit-Mouse) für 30 Min., keine Verdünnung notwendig. Mit Alu-Folie abdecken.
- 20) Mit PBS waschen und in PBS geben, 5 Min, 2x, leicht schütteln
- 21) DAB-Reagenz für 10-15 Min., in Abhängigkeit für Farbentwicklung (200µl/Schnitt)
- 22) In destilliertem Wasser waschen und darin für 3 Min. stehen lassen
- 23) Hämatoxylin für ca. 17-20 sec., anschließend Objektträger in Leitungswasser-Küvette geben, diese über 10 Min. unter fließendem Leitungswasser wässern.
- 24) Destilliertes Wasser für 10 Min.
- 25) Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, 75%1x, 96% 2x, 100% 3x, jeweils 2 Min.
- 26) Xylol 5 Min. 3x
- 27) Objektträger eindecken in DePeX (Klebstoff)

6.5. Werte für Serumfette und PCNA-positive Zellen für die Korrelationsanalysen

Tier	PCNA	Cholesterin	Triglyceride	HDL	LDL	Leptin	Gruppe
1	2	162	107	92,8	31	10,26	ovx,sf
5	2,5	186	87	99	39	7,32	ovx,sf
10	1	199	91	107,6	48	4,1	ovx,sf
11	2	179	127	99,9	33	5,25	ovx,sf
15	4,5	150	48	83,2	27	1,14	intakt,sf
17	5	158	66	91,1	26	4,39	intakt,sf
20	4,5	156	111	88,7	20	3,42	intakt,sf
22	12	178	179	60,1	18	6,25	intakt,sf
26	3	177	107	104,8	31	9,68	ovx, Ecd 18
28	164	175	136	100,8	29	9,32	ovx, Ecd 18
33	68,5	keine Werte					ovx, Ecd 18
36	71	144	105	91,5	26	6,53	ovx, Ecd 18
40	9,5	186	168	104,4	30	9,48	ovx, Ecd 57
42	49	195	96	123,8	44	6,06	ovx, Ecd 57
44	28,5	177	75	109,4	37	5,73	ovx, Ecd 57
46	15	201	100	121,8	44	9,68	ovx, Ecd 57
51	126	157	102	100,9	28	8,05	ovx, Ecd 116
54	97,5	203	147	115,8	37	12,39	ovx, Ecd 116
74	72,5	202	104	124,8	41	6,01	ovx, Ecd 116
76	73	234	158	133,7	45	8,93	ovx, Ecd 116
58	20	61	107	7,1	5	4,22	ovx,E2
60	30,5	66	235	4,4	1	3,16	ovx,E2
63	41	49	233	3,8	1	2,27	ovx,E2
65	32	42	223	11,2	1	3	ovx,E2
69	3,5	164	160	83,4	18	4,97	intakt,Ecd48
70	49,5	172	108	101,4	22	3,03	intakt,Ecd48
80	4	128	225	79,3	11	7,76	intakt,Ecd48

Tabelle 7: Serumfettwerte und PCNA-Werte der Korrelationsanalysen

7. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

7.1. Abbildungsverzeichnis

		Seite
Abbildung 1	Wandaufbau des Colons der Ratte in der Übersicht (Vergrößerung 3,125x; HE)	14
Abbildung 2	histologischer Aufbau der Tunica mucosa (Vergrößerung 12,5x; HE)	15
Abbildung 3	Überblick über den Lipoproteinstoffwechsel	17
Abbildung 4	Strukturformel von 20-Hydroxyecdysen	21
Abbildung 5	Vergrößerte Darstellung der Kryptenbasis zur Demonstration der PCNA-positiv angefärbten Zellen (dunkelbraun) (Vergrößerung 20x; PCNA)	28
Abbildung 6	Aufteilung eines Colonquerschnittes in 4 Quadranten (Vergrößerung 3,125x; HE-Färbung)	29
Abbildung 7	10 Messungen in einem Quadranten (Vergrößerung 3,125x; HE-Färbung)	30
Abbildung 8	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdysen und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: Körpergewichte	32
Abbildung 9	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdysen und E_2 -haltigem Futter (3 Monate bei S.-D.-Ratten) auf: Futteraufnahme im Verlauf	33
Abbildung 10	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdysen und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: Mucosaschichtdicke	34
Abbildung 11	Colon-Zellproliferation; ovx, Ecd 116; Vergrößerung 20x; PCNA	35
Abbildung 12	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdysen und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: proliferierende Zellen in der	36

	Mucosa des Colons	
Abbildung 13	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: Serumcholesterin	37
Abbildung 14	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: LDL	38
Abbildung 15	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: HDL	39
Abbildung 16	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: Serum-Triglyceride	40
Abbildung 17	Effekt von sojafreiem Futter, β -Ecdyson und E_2 (3 Monate im Futter bei S.-D.-Ratten) auf: Leptin	41

7.2. Tabellenverzeichnis

		Seite
Tabelle 1	Vergleich der Lipoproteine von Ratte und Mensch unter Östrogeneinfluss	20
Tabelle 2	tägliche Futter- und Substanzaufnahme	26
Tabelle 3	Schema der Organentwässerung	27
Tabelle 4	Futtertabelle: Sniff®R-Z, phytoöstrogenarm (sojafrei)	61
Tabelle 5	Untersuchungsergebnisse der Testsubstanz β -Ecdyson	61
Tabelle 6	Schema der HE-Färbung	62
Tabelle 7	Serumfettwerte und PCNA- Werte der Korrelationsanalysen	64

8. Literaturverzeichnis

- Alonso A, Fernández R, Moreno M, Ordóñez P, Diaz F, González C (2007): Leptin And Its Receptor are Controlled by 17β -Estradiol in Peripheral Tissues of Ovariectomized Rats. *Exp Biol Med* 232 (4), 242-249
- Altunbas K, Yagci A, Bulbul A, Sevimli A, Ozdemir V (2007): The Effect of Ovarian Steroids on Colonic Epithelial Cell Proliferation and Apoptosis in Rats. *Acta Vet BRNO* 76, 605-612
- Arbeeny CM, Rifici VA, Eder HA (1987): The uptake of apoprotein and cholesteryl ester of high density lipoproteins by the perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 917 (1), 9-17
- Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, Gustafsson J, Löwik CW, Pols HA, Van Leeuwen JP (1997): Differential Expression of Estrogen Receptors α and β mRNA During Differentiation of Human Osteoblast SV-HVO Cells. *Endocrinology* 138 (11), 5067-5070
- Báthori M, Pongrácz Z (2005): Phytoecdysteroids- From Isolation to Their Effects on Humans. *Curr Med Chem* 12 (2), 153-172
- Bayerdörffer E, Mannes GA, Richter WO, Ochsenkühn T, Seeholzer G, Köpcke W, Wiebecke B, Paumgartner G (1993): Decreased High-Density Lipoprotein Cholesterol and Increased Low-Density Cholesterol Levels in Patients with Colorectal Adenomas. *Ann Intern Med* 118 (7), 481-487
- Bedi A, Pasricha PJ, Akhtar AJ, Barber JP, Bedi GC, Giardiello FM, Zehnbauer BA, Hamilton SR, Jones RJ (1995): Inhibition of Apoptosis during Development of Colorectal Cancer. *Cancer Res* 55 (9), 1811-1816
- Benninghoff A, Drenckhahn D: Anatomie; in: Verdauungsorgane - Dickdarm, Band 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie; in : Dünndarm, Dickdarm, hrsg. v. Elsevier; Urban & Fischer Verlag; München 2003; 674 - 691
- Blanchette-Mackie EJ, Masuno H, Dwyer NK, Olivecrona T, Scow RO (1989): Lipoprotein lipase in myocytes and capillary endothelium of the heart: immunocytochemical study. *Am J Physiol* 256 (6 Pt 1), E818-828
- Bleiberg H, Buyse M, Galand P (1985): Cell Kinetic Indicators of Premalignant Stages of Colorectal Cancer. *Cancer* 56 (1), 124-129

- Brown MS, Goldstein JL (1976): A Receptor-Mediated Pathway for Cholesterol Homeostasis. *Science* 232 (4746), 34-47
- Brzezinski A, Debi A (1999): Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 85 (1), 47-51
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B (2001): Expression of Estrogen Receptor (ER) Subtypes and ER β Isoforms in Colon Cancer. *Cancer Res* 61 (2), 632-640
- Catalan RE, Martinez AM, Aragonoz MD, Miguel BG, Robles A, Godoy JE (1985): Alterations in rat lipid metabolism following ecdysterone treatment. *Comp Biochem Physiol B* 81 (3), 771-775
- Chao Y, Windler EE, Chen GC, Havel RJ (1979): Hepatic Catabolism of Rat and Human Lipoproteins in Rats Treated with 17 α -Ethinyl-Estradiol. *J Biol Chem* 254 (22), 11360-11366
- Cho NL, Javid SH, Carothers AM, Redston M, Bartagnolli MM (2007): Estrogen Receptors α and β Are Inhibitory Modifiers of Apc-Dependent Tumorigenesis in the Proximal Colon of Min/+ Mice. *Cancer Res* 67 (5), 2366-2372
- Chu S, Chou Y, Liu J, Chen C, Shyu J, Chou F (1999): Fluctuation of serum leptin level in rats after ovariectomy and the influence of estrogen supplement. *Life Sci* 64 (24), 2299-2306
- Cooper AD, Nutik R, Chen J (1987): Characterization of the estrogen-induced lipoprotein receptor of rat liver. *J Lipid Res* 28 (1), 59-68
- Dinan L (2009): The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: What use are they? *Arch Insect Biochem Physiol* 72 (3), 126-141
- Dinan L, Lafont R (2006): Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals. *J Endocrinol* 191 (1), 1-8
- Dinan L, Savchenko T, Whiting P (2001): On the distribution of phytoecdysteroids in plants. *Cell Mol Life Sci* 58 (8), 1121-1132

- Ehrhardt C: Der Einfluss von 20-Hydroxyecdysen und 17- β -Östradiol auf die Haut und das Fettgewebe der ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratte. Med. Diss. Göttingen 2009
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson J-A (1997): Human Estrogen Receptor β -Gene Structure, Chromosomal Localization, and Expression Pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (12), 4258-4265
- Essers J, Theil AF, Baldeyron C, van Capellen WA, Houtsmuller AB, Kanaar R, Vermeulen W (2005): Nuclear Dynamics of PCNA in DNA Replication and Repair. *Mol Cell Biol* 25 (21), 9350-9359
- Evans, RM (1988): The Steroid and Thyroid Hormone Receptor Superfamily. *Science* 240 (4854), 889-895
- Faria E, Fong LG, Komaromy M, Cooper AD (1996): Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and the hepatic lipase in remnant removal by the liver. *J Lipid Res* 37 (1), 197-209
- Ferreri LF, Naito HK (1978): Effects of Estrogens on Rat Serum Cholesterol Concentrations: Consideration of Dose, Type of Estrogen, and Treatment Duration. *Endocrinology* 102 (5), 1621-1627
- Findeisen, E: Ecdysterioide in der menschlichen Nahrung. Med. Diss. Marburg 2005
- Fiorenza AM, Branchi A, Sommariva D (2000): Serum lipoprotein profile in patients with cancer. A comparison with non-cancer subjects. *Int J Clin Lab Res* 30 (3), 141-145
- Foley EF, Jazaeri AA, Shupnik MA, Jazaeri O, Rice LW (2000): Selective Loss of Estrogen Receptor β in Malignant Human Colon. *Cancer Res* 60 (2), 245-248
- Forstner JF (1978): Intestinal Mucins in Health and Disease. *Digestion* 17 (3), 234-263
- Gorelick-Feldman J, MacLean D, Ilic N, Poulev A, Lila MA, Cheng D, Raskin I (2008): Phytoecdysteroids Increase Protein Synthesis in Skeletal Muscle Cells. *J Agric Food Chem* 56 (10), 3532-3537

- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J, Argos P, Chambon P (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320 (6058), 134-139
- Hall JM, McDonnell DP (1999): The Estrogen Receptor β -Isoform (ER β) of the Human Estrogen Receptor Modulates ER α Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology* 140 (12), 5566-5578
- Hall PA, Coates PJ, Ansari B, Hopwood D (1994): Regulation of cell number in the mammalian gastrointestinal tract: the importance of apoptosis. *J Cell Sci* 107 (Pt 12), 3569-3577
- Hamden K, Ayadi F, Jamoussi K, Masmoudi H, Elfeki A (2008): Therapeutic effect of phytoecdysteroids rich extract from *Ajuga iva* on alloxan induced diabetic rats liver, kidney and pancreas. *Biofactors* 33 (3), 165-175
- Hamosh M, Hamosh P (1975): The Effect of Estrogen on the Lipoprotein Lipase Activity of Rat Adipose Tissue. *J Clin Invest* 55 (5), 1132-1135
- Hardwick JC, Van Den Brink GR, Offerhaus GJ, Van Deventer SJ, Peppelenbosch MP (2001): Leptin Is a Growth Factor for Colonic Epithelial Cells. *Gastroenterology* 121 (1), 79-90
- Herold G: Herold Innere Medizin; in: *Kolorektales Karzinom*, hrsg. v. Gerd Herold unter Mitarbeit namenhafter Autoren; Herold-Verlag, Köln 2008, Seite 455
- Hikino H, Takemoto T (1972): Arthropod Moulting Hormones from Plants, *Achyranthes* and *Cyathula*. *Naturwissenschaften* 59 (3), 91-98
- Hikino H, Ohizumi Y, Takemoto T (1972): Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion of Insect-Metamorphosing Hormone Ecdysterone in Mice II. *Chem Pharm Bull* 20 (11), 2454-2458
- Hill MJ, Morson BC, Bussey HJ (1978): Aetiology of adenoma-carcinoma sequenz in large bowel. *The Lancet* 311, 245-247
- Hodges YK, Tung L, Yan X, Graham D, Horwitz KB, Horwitz LD (2000): Estrogen Receptors α and β Prevalence of Estrogen Receptor β mRNA in Human Vascular Smooth Muscle and Transcriptional Effects. *Circulation* 101 (15), 1792-1798

- Hodis HN (1999): Triglyceride-Rich Remnant Particles and Risk of Atherosclerosis. *Circulation* 99 (22), 2852-2854
- Hoff MB, Chang WW (1979): The Effect of Estrogen on Epithelial Cell Proliferation and Differentiation in the Crypts of the Descending Colon of the Mouse: A Radioautographic Study. *Am J Anat* 155 (4), 507-516
- Hoffmeister M, Raum E, Winter J, Chang-Claude J, Brenner H (2007): Hormone replacement therapy, bodymass, and the risk of colorectal cancer among postmenopausal women from Germany. *Br J Cancer* 97 (11), 1486-1492
- Iqbal J, Anwar K, Hussain MM (2003): Multiple, Independently Regulated Pathways of Cholesterol Transport across the Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem* 278 (34), 31610-31620
- Jensen J, Nilas L, Christiansen C (1990): Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas* 12 (4), 312-331
- Karlson P (1966): Ecdyson, das Häutungshormon der Insekten. *Naturwissenschaften* 53 (18), 445-453
- Kay RE, Entenman C (1961): The Synthesis of "Chylomikron-like" Bodies and Maintenance of Normal Blood Sugar Levels by the Isolated, Perfused Rat Liver. *J Biol Chem* 236, 1006-1012
- Kim CJ, Jang HC, Cho DH, Min YK (1994): Effects of Hormone Replacement Therapy on Lipoprotein(a) and Lipids in Postmenopausal Women. *Arterioscler Thromb* 14 (2), 275-281
- Kizelsztejn P, Govorko D, Komarnytsky S, Evans A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I (2009): 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296 (3), E433-E439
- Klinge CM (2000): Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 65, 227-251

- Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandoros G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG (2003): Oestrogen receptor beta (ER β) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 39 (9), 1251-1258
- Krinke GJ: The Laboratory Rat: The handbook of laboratory animals. in: Synopsis of the organ anatomy- Large intestine (intestinum crassum), hrsg. v. Krinke GJ; Academic Press; London, San Diego 2000; 293
- Kubben FJ, Peeters-Haesevoets A, Engels LG, Baeten CG, Schutte B, Arends JW, Stockbrügger RW, Blijham GH (1994): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a new marker to study human colonic cell proliferation. *Gut* 35 (4), 530-535
- Kuchinskiene Z, Carlson LA (1982): Composition, concentration, and size of low density lipoproteins and of subfractions of very low density lipoproteins from serum of normal men and women. *J Lipid Res* 23 (5), 762-769
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (12), 5925-5930
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson J (1997): Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β . *Endocrinology* 138 (3), 863-870
- Kuller LH, Gutai JP, Meilahn E, Matthews KA, Plantinga P (1990): Relationship of Endogenous Sex Steroid Hormones to Lipids and Apoproteins in Postmenopausal Women. *Arteriosclerosis* 10 (6), 1058-1066
- Kurmukov AG, Ermishina OA (1991): The effect of ecdysterone on experimental arrhythmias and changes in the hemodynamics and myocardial contractility induced by coronary artery occlusion. *Farmakol Toksikol* 54 (1), 27-29
- Lafont R, Girault JP, Kerb U (1988): Excretion and metabolism of injected ecdysone in the white mouse. *Biochem Pharmacol* 37 (6), 1174-1177

- Landau IT, Zucker I (1976): Estrogenic Regulation of Body Weight in the Female Rat. *Horm Behav* 7 (1), 29-39
- Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N (2005): Adipocyte Lipases and Defect of Lipolysis in Human Obesity. *Diabetes* 54 (11), 3190-3197
- Lee JS (1986): Tissue Fluid Pressure, Lymph Pressure, and Fluid Transport in Rat Intestinal Villi. *Microvasc Res* 31 (2), 170-183
- Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT (1996): Macrophages and atherosclerotic plaque stability. *Curr Opin Lipidol* 7 (5), 330-335
- Liu D, Bachmann KA (1998): An Investigation of the Relationship Between Estrogen, Estrogen Metabolites and Blood Cholesterol Levels in Ovariectomized Rats. *J Pharmacol Exp Ther* 286 (1), 561-568
- Liu M, Xu X, Rang WQ, Li YJ, Song HP (2004): Influence of ovariectomy and 17 β -estradiol treatment on insulin sensitivity, lipid metabolism and post-ischemic cardiac function. *Int J Cardiol* 97 (3), 485-493
- Lucas EA, Juma S, Stoecker BJ, Arjmandi BH (2000): Prune suppresses ovariectomy-induced hypercholesterinemia in rats. *J Nutr Biochem* 11 (5), 255-259
- Lundeen SG, Carver JM, McKean M, Winneker RC (1997): Characterization of the Ovariectomized Rat Model for the Evaluation of Estrogen Effects on Plasma Cholesterol Levels. *Endocrinology* 138 (4), 1552-1558
- Machinal F, Dieudonne M, Leneuve M, Pecquery R, Giudelli Y (1999): In Vivo and in Vitro ob Gene Expression and Leptin Secretion in Rat Adipocytes: Evidence for a Regional Specific Regulation by Sex Steroid Hormones. *Endocrinology* 140 (4), 1567-1574
- Mackinnon AM, Drevon CA, Sand TM, Davis RA (1987): Regulation of bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes: stimulation by apoE-rich high density lipoproteins. *J Lipid Res* 28 (7), 847-855

- Martineti V, Picariello L, Tognarini I, Sala SC, Gozzini A, Azzari C, Mavilia C, Tanini A, Falchetti A, Fiorelli G (2005): ER is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocr Relat Cancer* 12 (2), 455-469
- McElroy JF, Wade GN (1987): Short- and Long- Term Effects of Ovariectomy on Food Intake Body Weight, Carcass Composition, and Brown Adipose Tissue in Rats. *Physiol Behav* 39 (3), 361-365
- Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, Di Carlo C, Nappi C, Di Carlo R (2004): Estrogen and Raloxifene Modulate Leptin and Its Receptor in Hypothalamus and Adipose Tissue from Ovariectomized Rats. *Endocrinology* 145 (7), 3115-3121
- Mironova VN, Kholodova ID, Skachkova TF, Bondar OP, Datsenko ZM (1982): Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats. *Vopr Med Khim* 28, 101-105
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R (1996): ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392 (2), 49-53
- Nahoul K, Dehennin L, Jondet M, Roger M (1993): Profiles of plasma estrogens, progesterone and their metabolites after oral or vaginal administration of estradiol or progesterone. *Maturitas* 16 (3), 185-202
- Najmutdinova DK, Saatov Z (1999): Lung local defense in experimental diabetes mellitus and the effect of 11,20-dihydroxyecdysone in combination with maninal. *Arch Insect Biochem Physiol* 41 (3), 144-147
- Nelson DL, Cox MM: *Lehninger Biochemie*, in: Biosynthese von Lipiden; hrsg. v. Nelson DL, Cox MM unter Mitarbeit anderer Autoren; Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 2005, 871-878
- Niimi M, Sato M, Taminato T (2001): Neuropeptide Y in central control of feeding and interactions with orexin and leptin. *Endocrine* 14 (2), 269-273

- Oehme I, Bösser S, Zörnig M (2006): Agonists of an ecdysone-inducible mammalian expression system inhibit Fas Ligand- and TRAIL-induced apoptosis in the human colon carcinoma cell line RKO. *Cell Death Differ* 13 (2), 189-201
- Parini P, Angelin B, Rudling M (1997): Importance of Estrogen Receptors in Hepatic LDL Receptor Regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17 (9), 1800-1805
- Parini P, Angelin B, Stavréus-Evers A, Freyschuss B, Eriksson H, Rudling M (2000): Biphasic Effects of the Natural Estrogen 17 β -Estradiol on Hepatic Cholesterol Metabolism in Intact Female Rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20 (7), 1817-1823
- Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B (1992): Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 85 (1-2), 13-19
- Pickar JH, Thorneycroft I, Whitehead M (1998): Effect of hormone replacement therapy on the endometrium and lipid parameters: A review of randomized clinical trials 1985 to 1995. *Am J Obstet Gynecol* 178 (5), 1087-1099
- Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE (1990): Increased Cell Division as a Cause of Human Cancer. *Cancer Res* 50 (23), 7415-7421
- Qiu Y, Langman MJ, Eggo MC (2004): Targets of 17 β -oestradiol-induced apoptosis in colon cancer cells: a mechanism for the protective effects of hormone replacement therapy?. *J Endocrinol* 181 (2), 327-337
- Robert-Koch-Institut, Berlin: Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends; in: Zur Schätzung und Ergebnisse für Deutschland 2004; Darm; hrsg. v. Robert-Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.; Berlin 2008, 11-14, 34-37
- Robinson JG, Fox KM, Bullano MF, Grandy S (2009): Atherosclerosis profile and incidence of cardiovascular events:a population-based survey. *BMC Cardiovasc Disord* 9:46
- Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson J (2000): Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (1), 337-342

- Sakata T, Engelhardt W (1981): Luminal mucin in the large intestine of mice, rats and guinea pigs. *Cell Tissue Res* 219 (3), 629-635
- Sar M, Welsch F (1999): Differential Expression of Estrogen Receptor- β and Estrogen Receptor- α in the Rat Ovary. *Endocrinology* 140 (2), 963-971
- Schoiswohl G, Schweiger M, Schreiber R, Gorkiewicz G, Preiss-Landl K, Taschler U, Zierler KA, Radner FP, Eichmann TO, Kienesberger PC (2010): Adipose triglyceride lipase plays a key role in the supply of the working muscle with fattyacids. *J Lipid Res* 51 (3), 490-499
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2005): Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphtalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: A 3 months comparison with effects of estradiol E2 in ovariectomized (ovx) rats. *Toxicology* 213 (1-2), 13-24
- Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010): Metabolic effects of 20-OH-Ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119 (3-5), 121-126
- Shaikh AA (1971): Estrone and Estradiol Levels in the Ovarian Venous Blood from Rats During the Estrous Cycle and Pregnancy. *Biol Reprod* 5 (3), 297-307
- Siddiqui A, Nazario HE, Patel M, Mahgoub A, Spechler SJ (2009): Reduction in Low-Density Lipoprotein Cholesterol Levels During Statin Therapy Is Associated With a Reduced Incidence of Advanced Colon Polyps. *Am J Med Sci* 338 (5), 378-381
- Singer SJ, Nicolson GL (1972): The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175 (23), 720-731
- Sláma K, Lafont R (1995): Insect hormones- ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* 92, 355-377
- Soriano IR, Riley IT, Potter MJ, Bowers WS (2004): Phytoecdysteroids: A novel defense against plant-parasitic nematodes. *J Chem Ecol* 30 (10), 1885-1899
- Stattin P, Lukanova A, Biessy C, Söderberg S, Palmqvist R, Kaaks R, Olsson T, Jellum E (2004): Obesity and colon cancer: does leptin provide a link? *Int J Cancer* 109 (1), 149-152

- Stern JJ, Murphy M (1972): The Effects of Thyroxine and Estradiol Benzoate on Wheel Running Activity in Female Rats. *Physiol Behav* 9 (1), 79-82
- Stone BG, Evans CD (1992): Evidence for a common biliary cholesterol and VLDL cholesterol precursor pool in rat liver. *J Lipid Res* 33 (11), 1665-1675
- Suda Y, Ohta H, Makita K, Takamatsu K, Horiguchi F, Nozawa S (1998): Influence of bilateral oophorectomy upon lipid metabolism. *Maturitas* 29 (2), 147-154
- Sunter JP, Watson AJ, Wright NA, Appleton DR (1979): Cell Proliferation at Different Sites Along the Length of the Rat Colon. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol* 32 (1), 75-87
- Syrov VN (2000): Comparative experimental investigation of the anabolic activity of phytoecdysteroids and steranabols. *Pharm Chem J* 34, 193-197
- Syrov VN, Shakhmurova GA, Khushbaktova ZA (2008): Effects of phytoecdysteroids and bemithyl on functional, metabolic, and immunobiological parameters of working capacity in experimental animals. *Eksp Klin Farmakol* 71 (5), 40-43
- Tall AR (2008): Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the atheroprotective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* 263 (3), 256-273
- Tamakoshi K, Toyoshima H, Wakai K, Kojima M, Suzuki K, Watanabe Y, Hayakawa N, Yatsuya H, Kondo T, Tokudome S (2005): Leptin Is Associated with an Increased Female Colorectal Cancer Risk: A Nested Case-Control Study in Japan. *Oncology* 68 (4-6), 454-461
- Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J (1995): Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. *Cell* 83 (7), 1263-1271
- Todorov IN, Mitrokhin YI, Efremova OI, Sidorenko LI (2000): The effect of ecdysterone on the biosynthesis of proteins and nucleic acids in mice. *Pharm Chem J* 34, 455-458
- Tóth N, Szabo A, Kacsala P, Héger J, Zádor E (2008): 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine* 15 (9), 691-698

- Tutton PJ, Barkla DH (1982): Differential effects of oestrogenic hormones on cell proliferation in the colonic crypt epithelium and in colonic carcinomata of rats. *Anticancer Res* 2 (4), 199-201
- Van Lenten BJ, Roheim PS (1980): The Apolipoprotein Profile of the Ovariectomized Rat. Implications of Estrogen in Receptor-Mediated Uptake of Lipoproteins. *Life Sci* 28 (3), 273-278
- Van Lenten BJ, Melchior GW, Roheim PS (1983): Lipoprotein metabolism in the ovariectomized rat. *J Lipid Res* 24 (11), 1475-1484
- Vieira de Sousa M, Priolli DG, Portes AV, Cardinali IA, Pereira JA, Martinez CA (2008): Evaluation by computerized morphometry of histopathological alterations of the colon wall in segments with and without intestinal transit in rats. *Acta Chir Bras* 23 (5), 417-424
- Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M, Gustafsson J (2006a): Role of estrogen receptor β in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (8), 2959-2965
- Wada-Hiraike O, Warner M, Gustafsson J (2006b): New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. *Biochem Soc Trans* 34 (Pt6), 1114-1115
- Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Raynikar V, Sacks FM (1991): Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 325 (17), 1196-1204
- Weinstein I, Wilcox HG, Heimberg M (1986): Effects of high-dose ethinyl estradiol on serum concentrations and hepatic secretion of the very-low-density lipoprotein, triacylglycerol, cholesterol, and apolipoprotein A-I in the rat. *Biochim Biophys Acta* 876 (3), 450-459
- Welberg JW, Vries de EG, Hardonk MJ, Mulder NH, Harms G, Grond J, Zwart N, Koudstaal J, Ley de L, Kleibeuker JH (1990): Proliferation rate of colonic mucosa in normal subjects and patients with colonic neoplasms: a refined immunohistochemical method. *J Clin Pathol* 43 (6), 453-456

- Windler EE, Kovanen PT, Chao Y, Brown MS, Havel RJ, Goldstein JL (1980): The Estradiol-stimulated Lipoprotein Receptor of Rat Liver. A Binding Site that Membrane mediates the Uptake of Rat Lipoprotein containing Apoproteins B and E. *J Biol Chem* 255 (21), 10464-10471
- Wong WM, Wright NA (1999): Cell proliferation in gastrointestinal mucosa. *J Clin Pathol* 52 (5), 321-333
- Wuttke W, Kapur P, Seidlová-Wuttke D (2009): A plant-derived non-estrogenic and non-androgenic alternative to estrogen or androgen replacement therapy. *Z Phytother* 30, V42-
- Xiao Z, Moragoda L, Jaszewski R, Hatfield JA, Fligel SE, Majumdar AP (2001): Aging is associated with increased proliferation and decreased apoptosis in the colonic mucosa. *Mech Ageing Dev* 122 (15), 1849-1864
- Yokosuka M, Xu B, Pu S, Kalra PS, Kalra SP (1998): Neural Substrates for Leptin and Neuropeptide Y (NPY) Interaction: Hypothalamic Sites Associated with Inhibition of NPY-induced Food Intake. *Physiol Behav* 64 (3), 331-338
- Yoshida T, Otaka T, Uchiyama M, Ogawa S (1971): Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem Pharmacol* 20 (12), 3263-3268
- Zhu N, Kikuzaki A, Vastano BC, Nakatani N, Karwe MV, Rosen RT, Ho C (2001): Ecdysteroids of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J Agric Food Chem* 49 (5), 2576-2578

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Wuttke für die Anregung und Bereitstellung des Themas, durch welches ich diese experimentelle Arbeit in der Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie in der Universitätsmedizin Göttingen anfertigen konnte. Insbesondere seine produktive Kritik hat einen großen Beitrag zur Fertigstellung dieser Doktorarbeit geleistet.

Ich bedanke mich bei Frau Dr. D. Seidlová-Wuttke für die Unterstützung in der ersten Phase der Arbeit. Ihre Erfahrung in wissenschaftlichen und vor allem experimentellen Arbeiten war unerlässlich für mich, insbesondere bei dem Auswerten der histologischen Präparate.

Zusätzlich gilt mein besonderer Dank der chemisch-technischen Assistentin Heidi Brüggemann-Meyer, welche mir beim Anfertigen und Färben der histologischen Präparate hilfreich zur Seite stand sowie Sabine Lüdemann, die für alle organisatorischen und sonstigen Fragen eine wichtige Ansprechpartnerin war.

Vielen Dank der gesamten Abteilung in der Endokrinologie der Frauenklinik in der Universitätsmedizin Göttingen, welche durch die Kollegialität und freundliche Atmosphäre eine positive Ausstrahlung auf mein Wirken über den gesamten Zeitraum hatte.