

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

---

**Langzeit- und Kurzeiteffekte von 20-Hydroxyecdysen auf das  
Mammagewebe ovariectomierter und nicht ovariectomierter Ratten**

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

vorgelegt von  
Ute Brebeck  
aus Paderborn

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter/in:

III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>7</b>
1.1	Klimakterium . . . . .	8
1.2	Klassische Hormonersatztherapie . . . . .	9
1.3	Mamma . . . . .	9
1.3.1	Morphologische Entwicklung der glandulären Strukturen der Ratte . . . . .	9
1.3.2	Endokrinologische Einflüsse auf die glandulären Strukturen . . . . .	10
1.3.3	Wirkung von Östrogen auf die glandulären Strukturen der Mamma . . . . .	12
1.3.4	Estrus der Ratte . . . . .	13
1.3.5	Neoplasien der weiblichen Brustdrüse . . . . .	13
1.3.6	Neoplasien der Brustdrüse der Ratte . . . . .	14
1.3.7	Unterschiede in der Tumorentstehung zwischen Frau und Ratte . . . . .	14
1.3.8	Veränderung der Mamma in der Postmenopause . . . . .	15
1.4	Ecdysteroide . . . . .	16
1.4.1	Klasse der Ecdysteroide . . . . .	16
1.4.2	Vorkommen der Ecdysteroide in der Pflanzenwelt . . . . .	17
1.4.3	Ecdysteroid-Rezeptor . . . . .	18
1.4.4	Wirkmechanismen von Ecdysteroiden bei Vertebraten . . . . .	18
1.4.5	Metabolismus und Elimination der Ecdysteroide . . . . .	19
1.5	Vitamin D . . . . .	20
1.6	Das tierexperimentelle Modell . . . . .	20
1.6.1	Unterschiede zwischen der Brustdrüse der Frau und der Ratte . . . . .	21
1.7	Fragestellung . . . . .	21
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1	Versuchstiere und Haltungsbedingungen . . . . .	23

2.2	Ovarektomie . . . . .	24
2.3	Identifikation der Tiere . . . . .	24
2.4	Rattengewichte . . . . .	24
2.5	Bezeichnung der Gruppen . . . . .	25
2.6	Kurzzeitversuch . . . . .	25
2.6.1	Gruppen und Substanzmengen im Kurzzeitversuch . . . . .	26
2.7	Langzeitversuch . . . . .	26
2.7.1	Futtermenge im Langzeitversuch . . . . .	27
2.7.2	Aufgenommene Substanzmenge pro Tier im Langzeitversuch . . . . .	27
2.7.3	Gruppen und Substanzmengen im Langzeitversuch . . . . .	27
2.8	Beendigung der beiden Versuchsteile . . . . .	28
2.9	Histologische Aufarbeitung . . . . .	28
2.9.1	Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	29
2.10	Mikroskopische Analyse . . . . .	29
2.10.1	Histologische Kriterien . . . . .	29
2.10.2	Auswertung der Schnitte . . . . .	29
2.11	Statistische Auswertung . . . . .	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
3.1	Histomorphologie im Kurzzeitversuch: 28 Tage subkutane (s.c.) Exposition der ovx Ratte mit E2 und 20E . . . . .	32
3.1.1	Lobuli I / Fläche . . . . .	32
3.1.2	Lobuli II / Fläche . . . . .	33
3.1.3	Duktus / Fläche . . . . .	34
3.1.4	Sekret / Duktus . . . . .	35
3.2	Histomorphologie im Langzeitversuch: 3 Monate orale Exposition mit E2 und 20E . .	36
3.2.1	Lobulus I / Fläche . . . . .	37
3.2.1.1	Ovarektomierte Ratten . . . . .	37
3.2.1.2	Intakte Ratten . . . . .	38
3.2.2	Lobulus II / Fläche . . . . .	39
3.2.2.1	Ovarektomierte Ratten . . . . .	39
3.2.2.2	Intakte Ratten . . . . .	40

3.2.3	Duktus / Fläche . . . . .	41
3.2.3.1	Ovarektomierte Ratten . . . . .	41
3.2.3.2	Intakte Ratten . . . . .	42
3.2.4	Sekret / Duktus . . . . .	43
3.2.4.1	Ovarektomierte Ratten . . . . .	43
3.2.4.2	Intakte Ratten . . . . .	44
3.3	Serumparameter im Kurzzeitversuch: 28 Tage s.c. Exposition der ovx Ratte mit E2 und 20E . . . . .	45
3.3.1	LH . . . . .	45
3.3.2	IGF 1 . . . . .	46
3.4	Serumparameter im Langzeitversuch: 3 Monate orale Exposition mit E2 und 20E . . .	47
3.4.1	LH . . . . .	47
3.4.1.1	Ovarektomierte Ratten . . . . .	47
3.4.1.2	Intakte Ratten . . . . .	48
3.4.2	IGF 1 . . . . .	49
3.4.2.1	Ovarektomierte Ratten . . . . .	49
3.4.2.2	Intakte Ratten . . . . .	50
3.5	Kurzzeitversuch: 28 Tage s.c. Exposition der ovx Ratte mit E2 und 20E . . . . .	51
3.5.1	Gewicht . . . . .	51
3.6	Gewicht und Futterraufnahme im Langzeitversuch: 3 Monate orale Exposition mit E2 und 20E . . . . .	52
3.6.1	Gewicht . . . . .	52
3.6.1.1	Ovarektomierte Ratten . . . . .	52
3.6.1.2	Intakte Ratten . . . . .	53
3.6.2	Futterraufnahme . . . . .	54
3.6.2.1	Ovarektomierte Ratten . . . . .	54
3.6.2.2	Intakte Ratten . . . . .	55
3.7	Histologische Abbildungen . . . . .	56
3.7.1	Lobulus I . . . . .	56
3.7.2	Lobulus II . . . . .	57
3.7.3	Duktus . . . . .	58
3.7.4	Sekretgefüllter Duktus . . . . .	58

<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>59</b>
4.1	Glanduläre epitheliale Strukturen unter 20E bei der ovariectomierten Ratte . . . . .	59
4.1.1	Lobulus I im Kurzzeit- und Langzeitversuch . . . . .	59
4.1.2	Lobulus II im Kurzzeit- und Langzeitversuch . . . . .	61
4.1.3	Duktus im Kurzzeit- und Langzeitversuch . . . . .	63
4.2	Glanduläre epitheliale Strukturen unter 20E bei der intakten Ratte . . . . .	64
4.3	Überlegungen zu rezeptorvermittelten Wirkmechanismen von 20E . . . . .	65
4.4	20E und LH . . . . .	66
4.5	20E und Mammakarzinomrisiko . . . . .	67
4.5.1	IGF 1 . . . . .	68
4.5.2	Sekretproduktion der Duktus . . . . .	68
4.5.3	Futteraufnahme unter 20E . . . . .	69
4.6	Fazit . . . . .	70
4.7	Ausblick . . . . .	72
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>75</b>
6.1	Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung . . . . .	76
6.2	Lösungen . . . . .	77
6.3	Substanzen . . . . .	77
6.4	Material . . . . .	78
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>79</b>
<b>8</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>81</b>
<b>9</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>96</b>

# 1 Einleitung

Schätzungen gehen davon aus, dass ca. 60% aller menopausalen Frauen unter Wechseljahrsbeschwerden leiden. 40 % dieser Frauen nehmen medizinische Hilfe in Anspruch (Nedrow et al. 2006). Nach Untersuchungen in den USA stieg die Anzahl menopausal verschriebener Hormonersatztherapien (HRT) zwischen 1995 und 2000 um das 2.5 fache (Wysowski und Governale 2005). Ergebnisse umfangreicher Studien wie der *Women's Health Initiative* (Rossouw et al. 2002) und der *Million Women Study* (Beral 2003) zeigten, dass es zu einem signifikanten Anstieg des Brustkrebsrisikos unter klassischer HRT kam. Dies führte in Fachkreisen wie in der öffentlichen Diskussion zu einer kritischeren Beurteilung der HRT. So ging 2003, im Jahr nach der Veröffentlichung der *Women's Health Initiative*, die Verschreibung von HRT im Vergleich zum Jahr 2002 um 32% zurück (Wysowski und Governale 2005). Im Gegenzug verstärkte sich die Suche nach unbedenklicheren Alternativen.

Demographische Erhebungen sprechen für eine in den letzten Jahrzehnten progredient steigende Lebenserwartung in den westlichen Industrienationen. Während deutsche Frauen in den Jahren 1949/51 durchschnittlich 68.5 Lebensjahre erreichten, stieg bis 2006 die Lebenserwartung bei Geburt auf 82.6 Lebensjahre (Statistisches Bundesamt 2011). Dies hat zur Folge, dass in Zukunft über ein Drittel des Lebens einer Frau nach der Menopause stattfinden wird. Der sich in dieser Phase einstellende niedrigere Östrogenspiegel bestimmt dementsprechend länger den Hormonstatus des weiblichen Körpers, was unter anderem das Osteoporoserisiko deutlich erhöht. Zudem steigt mit zunehmendem Alter das Risiko, an Brustkrebs zu erkranken. Aus den skizzierten Gründen ist davon auszugehen, dass der Bedarf an Medikation gegen menopausale Symptome und Folgebeschwerden bestehen bzw. sich gegebenenfalls sogar erhöhen wird. Alternativen zur herkömmlichen HRT, die einen knochenprotektiven Effekt aufweisen, das Mammakarzinomrisiko jedoch nicht erhöhen, sind zu erwägen und zu prüfen. In diesem Kontext steht die vorliegende Arbeit.

## 1.1 Klimakterium

Der aus dem Griechischen stammende Begriff Klimakterium bezeichnet den natürlichen Übergang der reproduktiven Phase einer Frau hin zum Senium. Bei Kaukasierinnen findet dies durchschnittlich zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr statt (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2008). In diese Phase fällt die Menopause, die als letzte Regelblutung definiert ist und durchschnittlich mit dem 51. Lebensjahr erreicht wird (Burger et al. 2002). Sie unterteilt das Klimakterium in drei Abschnitte: Prä-, Peri- und Postmenopause. Die Prämenopause beginnt 4 bis 5 Jahre vor der Menopause und ist durch eine Zunahme an anovulatorischen und später unregelmäßigen Zyklen gekennzeichnet. An sie schließt sich, zwei Jahre vor und per Definition ein Jahr nach der Menopause reichend, die Perimenopause an. Ein Jahr nach der Menopause beginnt die Postmenopause, die in das Senium übergeht (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2008, Greendale et al. 1999, Burger et al. 2002). Kennzeichen des Klimakteriums ist das fortschreitende Erliegen der Ovarialfunktion (Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine 2008), bedingt durch die physiologische Abnahme der Follikelanzahl und eine zunehmende Sklerosierung der Ovarien. Folge des physiologischen Rückgangs der ovariellen Funktion ist eine Abnahme der Steroidhormonsynthese durch die Ovarien. Während in der Prä- und frühen Perimenopause zunächst der Rückgang der Progesteronsynthese überwiegt, stellt sich in der späten Peri- und Postmenopause zudem eine progredient abnehmende ovarielle Östrogenproduktion ein (Burger et al. 2002). Schon in der frühen Prämenopause kommt es mit einem Anstieg des follikelstimulierenden Hormons (FSH) zu Effekten auf hypophysärer Ebene. Durch die Abnahme der Ovarialfunktion lässt die negative Rückkopplung auf das Hypothalamus-Hypophysen-System nach, was in der Folge einen schrittweisen Anstieg von FSH und dem luteinisierenden Hormon (LH) bewirkt (Burger et al. 2002). Die aus diesen hormonellen Veränderungen resultierenden Symptome sind vielfältig. Sie umfassen psychische wie somatische Veränderungen und variieren interindividuell stark in ihrer Ausprägung und Anzahl. Eines der führenden Symptome ist das Auftreten von Hitzewallungen, unter welchem 55% bis 80% der Frauen im Zeitraum der Menopause in westlichen Kulturkreisen leiden (Avis et al. 2005, Greendale et al. 1999). Weitere Symptome umfassen mit z.B. einer gesteigerten Schweißneigung, Schlafstörungen, Palpitationen, Dranginkontinenz, Juckreiz und Brennen im Genitalbereich sowohl das Kardiovaskular- und Urogenitalsystem als auch das Vegetativum im Allgemeinen (Greendale et al. 1999). Durch den niedrigen Östrogenspiegel in der Postmenopause steigt längerfristig die Gefahr osteoporotischer Veränderungen bis hin zu einer manifesten Osteoporose, die bei 25-

30% der postmenopausalen Frauen auftritt (Wuttke et al. 2002). Neben den genannten somatischen Beschwerden stellen Depressionen, Konzentrationsstörungen und Abgeschlagenheit weitere mögliche Symptome dar (Avis et al. 2005, Stauber und Weyerstahl 2005).

## **1.2 Klassische Hormonersatztherapie**

Eine HRT im Klimakterium kann in Form einer alleinigen Östrogen-Ersatztherapie (ERT), sowie einer Östrogen-Progesteron-Kombinationstherapie (EPRT) erfolgen. Wegen der endometriumproliferativen Eigenschaft der ERT, die das Risiko einer malignen Entartung birgt, gilt diese Therapieform heute nur bei nicht mehr vorhandenem Uterus als indiziert. Viele Studien sprechen dafür, dass die Kombination aus einem Östrogen- und Progesteronderivat dieses Risiko nicht aufweist (Al-Azzawi et al. 2001, Rossouw et al. 2002, Anderson et al. 2003, Pike und Ross 2000). Mit der Publikation der *Women's Health Initiative* (Rossouw et al. 2002) und der *Million Women Study* (Beral 2003) wurden mit zwei großen plazebokontrollierten Studien die Risiken der HRT deutlich, die neben erhöhten vasomotorischen Risiken auch eine signifikante Risikosteigerung bezüglich des invasiven Mammakarzinomes zeigten. Dies führte zu einer restriktiveren Indikationsstellung der HRT und zu einer verstärkten Suche nach Alternativen. Durch die Entdeckung Selektiver-Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERM) steigt die Hoffnung, Substanzen mit rein positiven Wirkungen bezüglich klimakterischer Beschwerden sowie z.B. auf den Knochenstoffwechsel zu finden, ohne ungewollte Risiken für Uterus und Brustdrüse in Kauf nehmen zu müssen.

## **1.3 Mamma**

### **1.3.1 Morphologische Entwicklung der glandulären Strukturen der Ratte**

Im Gegensatz zu den meisten anderen Organen ist die Brustdrüse bei der Ratte, wie beim Menschen, zum Zeitpunkt der Geburt nicht vollständig entwickelt und unterliegt im Laufe des Lebens starken Veränderungen (Russo J et al. 2001).

Histomorphologisch lässt sich die Mamma in einen stromalen und einen parenchymatösen Anteil unterteilen (Russo IH und Russo J 1996). Fett- und Bindegewebe bilden den stromalen Anteil, epitheliale Strukturen das Parenchym. Ausgehend von der Mamilla wächst zunächst ein Hauptmilchgang (Hauptduktus) in den umgebenden Fettgewebskörper hinein (Silberstein 2001, Russo IH und Russo J 1996). Von ihm sprossen kleinere sekundäre duktales Strukturen aus, die sich ihrerseits wiederum in

weitere Verästelungen aufzweigen, welche in Terminalen End Buds (TEBs) münden. TEBs sind die teilungsaktivsten Strukturen des Mammaparenchyms (Russo IH und Russo J 1996, Russo J et al. 2001, Cabello et al. 2001). Ihre maximale Anzahl erreichen die TEBs bei der Ratte am 21. Lebenstag (Russo IH und Russo J 1996). Aus ihnen entwickeln sich mit zunehmendem Alter der Ratte die Terminal Ducts (TD) sowie alveoläre Strukturen, die Alveolar Buds (AB) (Russo IH und Russo J 1978, 1996). Mit 30-42 Tagen setzt bei der Ratte der Estruszyklus ein, der das Äquivalent zum Menstruationszyklus der Frau darstellt (Russo IH und Russo J 1996). Unter diesem hormonellen Einfluss entstehen aus den ABs mit jedem Estrus größere alveoläre Cluster, die Lobuli (Russo IH und Russo J 1996). Nach der Anzahl der alveolären Strukturen und ihrem Differenzierungsgrad werden die Lobuli in vier Gruppen klassifiziert. Lobulus I stellt hierbei die undifferenzierteste lobuläre Struktur dar (Russo J et al. 2001). Er besteht aus 5 bis 10 Alveoli (Brown und Lamartiniere 1995). Lobulus II ist höher differenziert und weist 11-20 Alveoli auf (Brown und Lamartiniere 1995). Die alveolistärkeren Strukturen des Lobulus III und IV finden sich erst nach einer Schwangerschaft bzw. während der Stillzeit (Russo IH und Russo J 1996) (siehe Tabelle 1.1).

**Tabelle 1.1:** Epitheliale Strukturen des Parenchyms der Glandula Mammaria der Ratte.

Struktur	Charakteristika
Hauptduktus	Eine Epithelschicht, Mikrovillibesatz, Myoepithelschicht, Epithelzellform: niedrig, kuboidal
Alveolar Buds (AB)	3-4 Alveoli, umgebenes Epithel: kuboidal
Lobulus I	5-10 Alveoli
Lobulus II	11-20 Alveoli
Lobulus III	> 80 Alveoli, entsteht primär während der Schwangerschaft
Lobulus IV	nur während der Laktation vorhanden

Die Einteilung der Lobuliklassen gehen auf Lamartiniere et al. 1995 (Brown und Lamartiniere 1995) und Russo et al. 1978 (Russo IH und Russo J 1978) zurück.

### 1.3.2 Endokrinologische Einflüsse auf die glandulären Strukturen

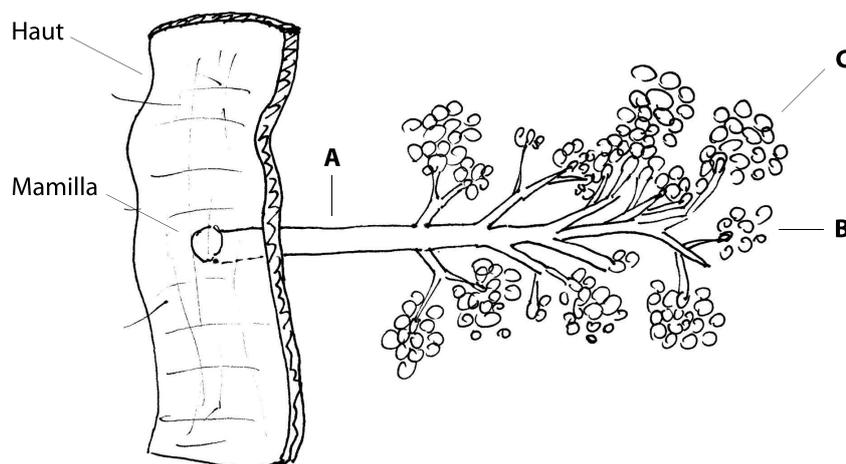
Die Entwicklung der glandulären Strukturen ist der Prozess eines komplexen Zusammenspiels verschiedener Hormone. Östrogene, Progesteron, Growth Hormone (GH) und Prolaktin, sowie verschiedene Wachstumsfaktoren wie z.B. der *insulin-like growth factor I* (IGF I) sind hier von entscheidender Bedeutung. Die Entwicklung duktaler und lobuloalveolärer Strukturen muss in diesem Zusammenhang unterschieden werden.

Für eine physiologische Entwicklung der Brustdrüse ist eine hypophysäre und ovarielle Integrität unerlässlich. Studien von unter anderem Nandi (1958), Sternlicht et al. (2006) und Silberstein (2001)

zeigten, dass GH, als hypophysär gebildetes Hormon, sowie ovariell synthetisierte Östrogene für die Entwicklung duktaler Strukturen von zentraler Wichtigkeit sind.

Östrogene gelten hier als die initiale Antriebskraft, die über GH-induzierte IGF-I-Produktion ihre Wirkung entfaltet (Kleinberg et al. 2009, Sternlicht et al. 2006). Daniel et al. zeigten 1987, dass bei Mäusen lokal appliziertes  $17\beta$ -Estradiol (E2) nach einer Ovariectomie ein erneutes duktales Wachstum hervorzurufen vermochte, was ohne Applikation nicht zu beobachten war. Dass neben ovariellen Einflüssen auch das hypophysär gebildete Hormon GH entscheidend für die duktale Entwicklung ist, wiesen Studien um Nandi bereits 1958 und Kleinberg et al. (2000) nach. Bei hypophys- und ovariectomierten Mäusen bzw. Ratten ließ sich ein duktales Wachstum nur in Kombination mit GH (Nandi 1958, Kleinberg et al. 2000), bzw. IGF I (Kleinberg et al. 2000) und nicht bei alleiniger E2-Gabe nachweisen. Bei IGF-I-Knock-out-Mäusen zeigten Kleinberg et al. 2000 ferner, dass eine IGF-I-Synthese eine weitere Voraussetzung für eine duktale Entwicklung darstellt.

Als zweites ovariell synthetisiertes Hormon ist neben Östrogenen auch Progesteron für die Morphogenese der Brustdrüse wichtig. Während Östrogene für das duktales Wachstum verantwortlich sind, ist Progesteron für die lobuloalveoläre Differenzierung entscheidend (Russo IH und Russo J 1996, Bocchinfuso und Korach 1997, Silberstein 2001, Anderson SM et al. 2007). Des Weiteren wird die Entwicklung der Brustdrüse von LH, FSH und Prolaktin beeinflusst, die die ovarielle Steroidgenese modulieren (Russo IH und Russo J 1996).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Glandula mammaria. Eigene Skizze nach Russo IH und Russo J (1996)**

Dargestellt sind die glandulären Strukturen der Mamma. A bezeichnet den Hauptmilchgang (Duktus), B die Struktur des Lobulus I, C bezeichnet die Struktur des Lobulus II.

### 1.3.3 Wirkung von Östrogen auf die glandulären Strukturen der Mamma

Die vielfältigen Effekte der Östrogene werden über den Östrogen-Rezeptor (ER) vermittelt. Der erste Typ dieser Rezeptorformen wurde im Jahr 1962 primär durch Jensen und Jacobson beschrieben und ist heute als ER  $\alpha$  bekannt. 1996 entdeckten Kuiper et al. (1996) mit dem ER  $\beta$  einen weiteren dieser Rezeptortypen. Nach heutigem Forschungsstand übernehmen die Rezeptortypen unterschiedliche Funktionen. Es wird angenommen, dass ER  $\alpha$  für die proliferative Wirkung des E2 verantwortlich ist, während ER  $\beta$  die Differenzierung der Zielgewebe beeinflusst (Wuttke et al. 2007). Für die Entwicklung und Morphogenese der Brustdrüse sind Östrogene und deren Rezeptoren eine unabdingbare Voraussetzung (Daniel et al. 1987, Bocchinfuso und Korach 1997). Nach heutigem Erkenntnisstand ist es für das duktales Längenwachstum und die erste Aufzweigung in kleinere duktales Strukturen verantwortlich (Bocchinfuso und Korach 1997, Russo IH und Russo J 1996, Silberstein 2001, Sternlicht et al. 2006). Dies ergaben Studien mit ER-Knock-out-Mäusen, deren Brustdrüsen gegenüber der Kontrollgruppe mit intaktem Östrogen-Rezeptor keine duktales Entwicklung und kein duktales Längenwachstum zeigten (Bocchinfuso und Korach 1997). Studien mit ovariectomierten Säugern bestätigten die zentrale Rolle von Östrogenen auf das duktales Wachstum. Daniel et al. (1987) zeigten 1987, dass sich bei Mäusen nach Ovariectomie durch eine Estradiolexposition ein erneutes Wachstum dieser Strukturen initiieren ließ.

Neben zentralen Aufgaben in der Morphogenese wird die kanzerogene Potenz von Östrogenen auf die Brustdrüse diskutiert. Ein mitogener Effekt von Östrogenen, insbesondere des 17 $\beta$ -Estradiols, wurde häufig beschrieben (Bocchinfuso und Korach 1997, Messina und Wood 2008), gilt allerdings als letztlich nicht eindeutig bewiesen (Russo IH und Russo J 1996). Inwiefern Estradiol in der direkten Tumorentstehung als auslösendes Agens wirkt, wird kritisch rezipiert. Wahrscheinlicher ist, dass die proliferative Potenz des Estradiols die Tumorentstehung mittelbar begünstigt (Wuttke et al. 2007, Seidlova-Wuttke et al. 2004). Ovariectomierte Ratten zeigten in Studien unter E2-Exposition eine Zunahme des *proliferating cell nuclear antigen* (PCNA), das in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert wird und einen Proliferationsmarker darstellt (Seidlova-Wuttke et al. 2004, Menche 2008, Rimoldi et al. 2007). Eine Stimulation der Proliferation in der Brustdrüse gilt als Risikofaktor für die Entstehung von Karzinomen (Gadducci et al. 2005). Auch bei Brustkrebszelllinien wurde eine gesteigerte Proliferation durch Östrogene beobachtet (so zitiert in Bocchinfuso und Korach (1997)). Tamoxifen, das in der Brustkrebstherapie zum Einsatz kommt, demonstriert als Östrogenrezeptorantagonist ebenfalls den starken Einfluss auf die Proliferation. Neben Ergebnissen aus in-vitro- und tierexperi-

mentellen Studien legen auch viele der beschriebenen Risikofaktoren einen Zusammenhang zwischen einer längeren Östrogenexposition und einem gesteigerten Brustkrebsrisiko nahe. So gelten eine frühe Menarche, eine späte Menopause und höhere Östrogenspiegel durch Übergewicht als Risikofaktoren (Messina und Wood 2008). Da diese Beobachtungen eine genaue Abgrenzung zu möglichen anderen hormonellen (wie Progesteron) und nichthormonellen Einflüssen nicht zulassen, bleibt eine definitive kausale Zuordnung diesbezüglich schwierig.

Widersprüchlich dazu verhalten sich Studienergebnisse bei exogener Östrogenexposition, wie die der *Women's Health Initiative* (Rossouw et al. 2002). In der umfangreichen placebokontrollierten Doppelblindstudie wurde der Effekt von HRT in Form von EPRT und alleiniger ERT nach Hysterektomie gegenüber Kontrollgruppen untersucht. In der EPRT-Versuchsgruppe kam es zu einem signifikanten Anstieg der Mammakarzinominzidenz, während dies in der ERT-Gruppe nicht zu beobachten war. In der ERT-Versuchsgruppe war gegenüber der Kontrollgruppe eine verminderte Mammakarzinominzidenz zu detektieren.

#### **1.3.4 Estrus der Ratte**

Der Estrus ist das Äquivalent zum Menstruationszyklus der Frau. Er setzt bei der Ratte mit 30 bis 42 Lebenstagen ein (Russo IH und Russo J 1996) und dauert durchschnittlich 4 bis 5 Tage (Schedin et al. 2000). Ein Estrus gliedert sich in fünf Phasen: Proestrus, Estrus, Metestrus, Diestrus 1 und Diestrus 2. Die Ovulation definiert den Beginn des Estrus (Schedin et al. 2000). Während der verschiedenen Estrusphasen kommt es zu Veränderungen der Brustmorphologie der Ratte. In der Phase des Proestrus überwiegt die Struktur des Duktus. Im sich anschließenden Estrus nehmen die lobuloalveolären Strukturen zu, so dass in dieser Phase ein Gleichgewicht zwischen lobuloalveolären und duktalem Strukturen besteht. Im Metestrus und Diestrus 1 kommt es dann zu einem weiteren Anstieg der lobuloalveolären Strukturen die in dieser Phase dominieren. Im Diestrus 2 nehmen die lobuloalveolären Strukturen wieder ab (Schedin et al. 2000).

#### **1.3.5 Neoplasien der weiblichen Brustdrüse**

Bei den Neoplasien der weiblichen Brustdrüse stellt das Mammakarzinom die häufigste Form der Neoplasie dar. Es ist mit einer Inzidenz von 350.000 Erkrankungen jährlich die häufigste Krebserkrankung bei europäischen Frauen (Tyczynski et al. 2002). Die am wenigsten differenzierte Struktur der humanen Brustdrüse ist der Lobulus I. Er weist im Vergleich zu den anderen lobulären Strukturen die höchste Zellteilungsrate auf und birgt die größte kanzerogene Sensitivität sowie das größte ma-

ligne Entartungsrisiko (Russo J et al. 2001). Er gilt als Ausgangsstruktur des duktales Karzinoms, welches das am häufigsten diagnostizierte Karzinom der weiblichen Brustdrüse darstellt (Russo J et al. 2001, 2005). Die reproduktive Vorgeschichte einer Frau scheint einen entscheidenden Einfluss auf ihr späteres Mammakarzinomrisiko auszuüben. Beobachtungen, dass Frauen mit reproduktiver Vorgeschichte ein geringeres Brustkrebsrisiko aufweisen als Frauen ohne eine solche, legen diese Vermutung nahe. Untersuchungen mit humanem Mammagewebe unterstützen diese These und führen dies auf die sich unter einer Vollzeitschwangerschaft verändernde Morphologie der Mamma zurück (Russo J et al. 2001). Unter der hormonellen Veränderung und dem Stimulus einer Schwangerschaft kommt es zu einer Proliferation und Differenzierung der lobulären Strukturen, so dass höher differenzierte Strukturen wie der Lobulus II und III über den bei der Nulligravida vorherrschenden wesentlich teilungsaktiveren Lobulus I dominieren (Russo J et al. 2001).

### **1.3.6 Neoplasien der Brustdrüse der Ratte**

Die Brustdrüse der Ratte neigt zu Neoplasien, die sich prädominant in Form von benignen Tumoren wie Fibroadenomen manifestieren. Mit zunehmendem Alter steigt, wie bei der Frau, die Tumorzinzidenz (Russo IH und Russo J 1996). Unter dem Einfluss von Chemikalien wie z.B. dem polyzyklischen Hydrocarbon DMBA oder MNU sowie Strahlung lassen sich Karzinome, insbesondere hormonabhängige Adenokarzinome, induzieren (Russo IH und Russo J 1996). Dieser Umstand macht Ratten zu einem hilfreichen Modellorganismus in der Brustkrebsforschung. Der Tumortyp sowie die Anzahl der Tumoren pro Tier sind unter anderem vom Alter der Tiere bei Exposition gegenüber der Noxe, ihrer reproduktiven Vergangenheit sowie ihrem endokrinen Milieu abhängig (Russo IH und Russo J 1996). Die bei der Ratte am wenigsten differenzierten Strukturen der Mamma sind die TEBs.

### **1.3.7 Unterschiede in der Tumorentstehung zwischen Frau und Ratte**

Wie im Abschnitt 1.3.6 beschrieben, kann es wie bei der Frau auch bei der Ratte zur spontanen Entwicklung von Tumoren der Brustdrüse kommen. Diese stellen eine häufige Erscheinung in Langzeitstudien mit Ratten dar. Anders als bei der Frau dominieren bei der Ratte benigne Tumoren wie z.B. Fibroadenome und Fibrome (Russo IH und Russo J 1996). Ein weiterer Unterschied findet sich zudem im Risikoprofil. Während bei der Frau eine steigende Anzahl der Gravitäten zu einer Abnahme des Mammakarzinomrisikos führt, erhöht sich mit steigender Geburtenanzahl das Risiko für Tumoren der Brustdrüse bei der Ratte (Russo IH und Russo J 1996).

**Tabelle 1.2:** Unterschiede in der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum zwischen der Brustdrüse der Frau und der Ratte. Die Pfeilrichtung gibt an, ob ein Faktor das Tumorrisiko steigert oder senkt.

<b>Faktor/Einflussgröße</b>	<b>Frau</b>	<b>Ratte</b>
<b>Schwangerschaften</b>	↓ (Russo IH und Russo J 1996)	↑ (Russo IH und Russo J 1996)
<b>Strahlung</b>	↑ (Russo IH und Russo J 1996, Suzuki et al. 2006)	↑ (Russo IH und Russo J 1996)
<b>Erhöhtes Gewicht</b>	↑ (Nagaiah et al. 2010, Morimoto et al. 2002, Suzuki et al. 2006) (Übergewicht postmenopausal)	↑ (Hakkak et al. 2005)
<b>verringerte Nahrungsaufnahme</b>	↓ - ↔ (McTiernan et al. 2010) (nicht eindeutig belegt)	↓ (Klurfeld et al. 1987, Harvell et al. 2001)
<b>Alter</b>	↑ (Suzuki et al. 2006)	↑ (Russo IH und Russo J 1996)
<b>Chemikalien</b>	↑ (Suzuki et al. 2006)	↑ (Welsch 1987, Huggins et al. 1962)
<b>Frühe Menarche</b>	↑ (Suzuki et al. 2006)	↔
<b>Körperliche Aktivität</b>	↓ (Nagaiah et al. 2010, McTiernan et al. 2010)	↓ (Jiang et al. 2009)
<b>Genetische Prädisposition</b>	↑ (Hall et al. 1990, Miki et al. 1994)	↑ (Isaacs 1986)

### 1.3.8 Veränderung der Mamma in der Postmenopause

In der Postmenopause kommt es durch den zunehmenden Rückgang der Ovarialfunktion zum Erliegen der ovariell synthetisierten Steroidhormone. Dies hat neben anderen Effekten auch umfangreiche quantitative und qualitative Veränderungen auf das Stroma wie das Parenchym der Brustdrüse zur Folge, dessen Verhältnis sich verändert. Zugunsten der parenchymatösen Strukturen nimmt der Fettanteil prozentual in dieser Phase zu (Walker und Martin 2007, Russo IH und Russo J 1996). Auf das Parenchym wirkt sich der in der Menopause bestehende niedrigere Östrogenspiegel unterschiedlich aus. Während es bei den lobuloalveolären Strukturen zu einer Atrophie und damit Involution kommt, nehmen die Duktus in ihrem Kaliber, nicht aber in ihrer Anzahl ab. Die in der Postmenopause dominierende lobuläre Struktur ist der Lobulus I, während höher differenzierte Lobuli in ihrer Quantität zurückgehen (Russo J et al. 2005).

## 1.4 Ecdysteroide

### 1.4.1 Klasse der Ecdysteroide

Ecdysteroide, deren Namen sich von dem 1954 erstmals durch Butenandt und Karlson (zitiert in Dinan und Lafont (2006)) aus Larven des Seidenspinners isolierten Ecdysons herleitet, umfassen eine Klasse von polyhydroxylierten Steroiden (Sláma und Lafont 1995, Báthori et al. 2008). Als Grundgerüst fungiert, bis auf wenige Ausnahmen, das Cholesterol (Fujimoto et al. 2000, Dinan 2001). Strukturell weisen sie in der Regel ein C27-, C28-, C29-Gerüst auf (Báthori et al. 2008). Siehe Abbildung 1.2

Die zunächst bei Arthropoden entdeckten Steroidhormone regulieren bei selbigen unter anderem die Häutung, Metamorphose, Reproduktion und Diapause (Lehmann und Koolman 1989, Dinan 2001, Billas et al. 2003). 1966 konnten Ecdysteroide erstmals auch in Pflanzen nachgewiesen werden, wo sie wahrscheinlich dem Fraßschutz vor Insekten dienen. Ihr exakter Syntheseweg, sowie ihr Syntheseort ist bis jetzt nicht eindeutig geklärt (Brandt 2003). Bezüglich der synthetisierten Ecdysteroidmenge zeigen sich große Unterschiede intra- wie interplantar (Lafont und Dinan 2003).

Nach heutigen Erkenntnissen ist 20-Hydroxyecdysone (20E) der häufigste Vertreter der Ecdysteroide in Pflanzen wie in Arthropoden (Dinan 2001, Dinan und Lafont 2006, Sláma und Lafont 1995). Anders als z.B. Estradiol, Progesteron, Aldosteron, Calcitriol und Cortisol zählen Ecdysteroide nicht zu den humanen Steroiden. Sie werden weder vom Menschen synthetisiert, noch ist bis heute ein Ecdysone-Rezeptor bei Säugern bekannt.

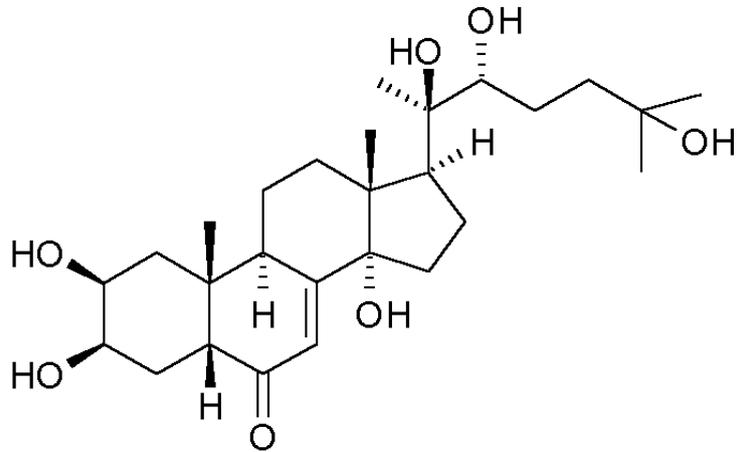


Abbildung 1.2: Struktur des 20-Hydroxyecdysons

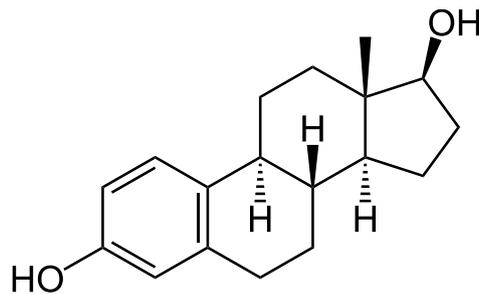


Abbildung 1.3: Struktur des Estradiols

#### 1.4.2 Vorkommen der Ecdysteroide in der Pflanzenwelt

Da bis heute nur ca. 2% der Flora auf ihre Ecdysteroid-produzierende Eigenschaft untersucht wurde, ist eine fundierte Aussage über deren tatsächliche Verteilung in der Pflanzenwelt nur bedingt möglich. Ecdysteroide kommen in 5-6 % der untersuchten Pflanzen vor und sind im Allgemeinen in wesentlich höherer Konzentration als bei vielen Arthropoden vorzufinden (Brandt 2003). Zudem variiert die Konzentration der Phytoecdysteroide in Pflanzen stark, wobei sich Unterschiede von 0,1% - 3,2% der Trockenmasse finden (Dinan 2001). Bis heute sind über 100 Ecdysteroid-produzierende Pflanzen und über 300 Ecdysteroide bekannt (Dinan 2001, Spindler et al. 2009). Spinat als Nutzpflanze und der in der traditionellen chinesischen Medizin als Heilpflanze eingesetzte Korbblütler *Leuzea* seien hier beispielhaft aufgeführt. *Leuzea* wird in der chinesischen Medizin wegen seiner antiphlogistischen

und analgetischen Wirkung geschätzt (Sláma und Lafont 1995). Eine umfangreiche Sammlung der auf ihren Ecdysteroidgehalt untersuchten Pflanzen findet sich unter (Lafont 2002).

### 1.4.3 Ecdysteroid-Rezeptor

Der klassische Ecdysteroid-Rezeptor (EcR) ist, anderen Steroidrezeptoren vergleichbar, ein intranukleär gelegener Rezeptortyp (Lafont und Dinan 2003, Dinan und Lafont 2006). Diese agieren als Transkriptionsfaktoren, die zunächst extrazelluläre Signale wie Hormone umsetzen in eine RNA-basierte transkriptionelle Antwort. Sie weisen konservierte Domänen als DNA-Bindungsstellen sowie Liganden-Bindungsstellen auf (Gronemeyer und Laudet 1995, Billas et al. 2003). Wie andere Steroidrezeptoren ist der EcR nur als Dimer aktiv. Als heterodimerer Partner agiert das *Ultraspiracle Protein* (USP), ein Homolog des Retinoid-X-Rezeptors der Vertebraten (RxR), mit denen der EcR komplexiert (Yao et al. 1992, Lafont und Dinan 2003, Dinan und Lafont 2006, Billas et al. 2003). Nach der Dimerisierung binden Ecdysteroide an das EcR-Protein. Über die Bindung an das Ecdysteroid-response-element auf der DNA wird so die Genexpression beeinflusst (Cherbas et al. 1991). Neben der intranukleären Lokalisation des EcR sprechen einige Studien dafür, dass zudem Membranrezeptoren und extranukleär im Zytosol lokalisierte EcR existieren, über welche nichtgenvermittelte Effekte bewirkt werden (Schlattner et al. 2006).

### 1.4.4 Wirkmechanismen von Ecdysteroiden bei Vertebraten

Wie andere Steroidhormone wirken Phytoecdysteroide über unterschiedliche Mechanismen. Rezeptorvermittelt kommt es über die Transkription spezifischer Gene zur Proteinsynthese. Andere Effekte werden ohne Transkription wahrscheinlich über zytoplasmatische und membranassoziierte Rezeptoren vermittelt (Sláma und Lafont 1995, Schlattner et al. 2006).

Obwohl davon ausgegangen wird, dass der EcR nicht durch Vertebraten synthetisiert werden kann, sind in der Literatur zahlreiche Effekte von Ecdysteroiden auf Vertebraten beschrieben worden (Seidlova-Wuttke et al. 2010b, Lupien et al. 1969, Syrov et al. 2008, Syrov und Kurmukov 1976, Báthori et al. 2008, Dinan und Lafont 2006, Hamden et al. 2008). Die zugrunde liegenden Mechanismen sind weitestgehend unbekannt.

Ecdysteroide weisen geringe Ähnlichkeit mit Sexual- und Adrenalsteroidhormonen der Vertebraten auf, da sie sowohl in der Anzahl der C-Atome und ihrer Polarität als auch ihrer Ringstruktur von diesen nicht unerheblich abweichen. Eine Bindung an diese Rezeptoren galt deshalb früh als unwahrscheinlich (Dinan und Lafont 2006, Lafont und Dinan 2003). Dies wurde nun in Studien mit

Ligandenbindungsassays bestätigt. Für 20E konnte eine Bindung an den ER  $\alpha$  und den ER  $\beta$  durch Kapur et al. (2010) ausgeschlossen werden. Auch eine Studie um Báthori et al. (2008) zeigte keine Bindungsaffinität aller untersuchten Ecdysteroide an die Östrogen-, Androgen- und Glukokortikoidrezeptoren von Vertebraten. Inwieweit eine solche Bindung in gewissem Umfang doch möglich ist oder andere Rezeptortypen und Wirkmechanismus zum Tragen kommen, ist bis heute nicht gesichert und Gegenstand der aktuellen Diskussion und Forschung. Ein möglicher Vitamin-D3-analoger oder synergistischer Effekt der Ecdysteroide ist in diesem Zusammenhang beschrieben worden (Kuzmenko et al. 1997). In einigen Studien konnte ferner beobachtet werden, dass es bereits kurz nach Ecdysteroidgabe zu Veränderungen im Plasma von Mäusen und Ratten kam (Lafont und Dinan 2003, Kotsiuruba et al. 1995). In diesem Zusammenhang werden nicht transkriptionsvermittelte, membranassoziierte Effekte als mögliche Ursache diskutiert.

#### **1.4.5 Metabolismus und Elimination der Ecdysteroide**

Obwohl Ecdysteroide, wie in Abschnitt 1.4.1 ausgeführt, nicht von Vertebraten selbst synthetisiert werden können, können sie durch die Aufnahme ecdysteroidhaltiger Pflanzen sowie nach parasitären Infektionen bei Vertebraten nachgewiesen werden (Seidlova-Wuttke et al. 2010b, Dinan und Lafont 2006, Brandt 2003). Die Metabolisierung von Ecdysteroiden ist nicht vollständig geklärt. Ähnlich anderen Phytohormonen konnte in Studien mit Mäusen gezeigt werden, dass eine Dehydroxylierung, wahrscheinlich vermittelt durch Darmbakterien, stattfindet. Inwiefern dies auch bei Menschen zum Tragen kommt, ist umstritten (Brandt 2003). Weitere Schritte scheinen eine Reduktion des B-Ringes sowie eine Epimerisierung am C3-Atom zu sein (Dinan und Lafont 2006).

Die Elimination erfolgt fäkal und renal, wobei die Dominanz des einzelnen Eliminationsweges noch nicht abschließend geklärt werden konnte (Dinan und Lafont 2006, Brandt 2003). Obwohl 20E eine gute Gewebegängigkeit aufweist, ist die Resorption bei oraler Gabe gering (Brandt 2003). Oral verabreichte wie injizierte Ecdysteroide erfahren eine sehr schnelle Elimination aus dem Blut. Verschiedene Studien mit Mäusen, Schafen und Menschen geben Anhaltspunkte für Halbwertszeiten, wobei die Art der Applikation sowie der Typ der Ecdysteroide von Bedeutung zu sein scheinen. So geben Simon und Koolman 1989 (zitiert durch Lafont und Dinan (2003)) in einer Studie mit Schafen Halbwertszeiten (HWZ) von 0.4; 0.2 sowie 2 Stunden für orale, intravenöse und intramuskuläre Applikationen an. Nach intraperitonealer Injektion von dem Ecdysteroid Ponasteron A ergab sich eine Plasma-HWZ bei Mäusen von nur 48 min. (Albanese et al. 2000). Die Datenlage über HWZ beim Menschen ist begrenzt. In einer Studie mit einem männlichen Probanden wurde die Pharmakokinetik

von 20E mittels eines Radioimmunoassays untersucht (Simon und Koolman 1989). Hier zeigten sich HWZ von 6 Stunden. Zu ähnlichen Resultaten kommt auch Brandt (Brandt 2003). Bei kleineren Säugern ist die HWZ zudem kürzer als bei größeren.

## 1.5 Vitamin D

Das fettlösliche Vitamin D mit seinem aktiven Metaboliten  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub>, zählt zu den Seco-Steroidhormonen. Es entfaltet seine Wirkung über Bindung an den intranukleär lokalisierten Vitamin-D-Rezeptor (VDR), der zur Klasse der Steroidrezeptoren gehört. Durch Heterodimerisierung des VDRs mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) wird die Transkription von verschiedenen Genen reguliert (Tocchini-Valentini et al. 2001, Karami et al. 2010). Vitamin D ist entscheidend für den Knochenstoffwechsel und den Kalziumhaushalt. Ergebnisse neuerer Studien sprechen zudem für einen positiven Effekt auf den Glukose- und Lipidstoffwechsel. Dies konnten Kotsa et al. (Kotsa et al. 2009) bei Frauen nachweisen, die an dem Polyzystischen Ovarialsyndrom leiden. Des Weiteren zeigte Vitamin D und dessen Analoga in Studien einen antiproliferativen und differenzierungsfördernden Effekt (Banerjee und Chatterjee 2003, Artaza et al. 2010). Für  $1\alpha, 25$ -dihydroxyvitamin-D<sub>3</sub> konnte dies auch bei Brustkrebszellen der Zelllinie MCF-7 nachgewiesen werden (Narvaez et al. 2001). Auch umfangreiche epidemiologische Studien sprechen für einen Zusammenhang zwischen niedrigen Serumkonzentrationen von Vitamin D und einem erhöhten Risiko für die Entwicklung von Krebserkrankungen wie Brustkrebs, Eierstockkrebs sowie kolorektalen Karzinomen (Edlich et al. 2009, Holick 2003, Kulie et al. 2009).

## 1.6 Das tierexperimentelle Modell

In der vorliegenden Arbeit soll die Wirkung von 20E auf die Glandula Mammaria untersucht werden. Dies dient der Risikoeinschätzung bezüglich der Verwendung von 20E bei der postmenopausalen Frau. Mögliche Risiken in Form einer Proliferation des Brustdrüsengewebes sollen detektiert werden. Zur Klärung dieser Frage muss das hierfür verwendete Modell dem der postmenopausalen Frau vergleichbar sein. Folgende Kriterien müssen hierfür erfüllt sein:

- 1) Anatomisch strukturelle Vergleichbarkeit von Modell- und Zielorganismus.
- 2) Hormonelle Vergleichbarkeit von Modell- und Zielorganismus.
- 3) Prinzipielle Vergleichbarkeit der Reaktionen auf verabreichte Substanz von Modell- und Zielorganismus.

Die drei Monate alte ovariectomierte Ratte als Modellorganismus erfüllt diese Kriterien.

Anatomisch vergleichbar aufgebaut, vollzieht sich die Entwicklung der glandulären Strukturen bei der Ratte äquivalent zu denen der humanen Mamma. Wie bei der humanen Brustdrüse finden sich die histomorphologischen Strukturen der Duktus und Lobuli (Russo J et al. 2001, Russo IH und Russo J 1996). In der vorliegenden Studie sollen die Veränderungen der glandulären Strukturen unter Exposition verschiedener Substanzen bei der ausgebildeten Mamma untersucht werden. Bei der drei Monate alten Ratte sind die glandulären Strukturen entwickelt und die Reifephase ist abgeschlossen (Maeda 2000).

Durch die Ovariectomie wird chirurgisch eine hormonell der Postmenopause vergleichbare Situation erzielt. Wie bei der postmenopausalen Frau kommt es bei der Mamma der Ratte zu einer Involution der lobulären Strukturen (Russo J et al. 2005, Russo IH und Russo J 1996).

Unter Östrogenexposition ist, vergleichbar der humanen Brust, eine Stimulation des Brustgewebes zu beobachten (Rimoldi et al. 2007, Wuttke et al. 2003, Russo J et al. 2001). Wie die Frau entwickelt die Ratte maligne Tumoren der Mamma. Dies ermöglicht den Vergleich bezüglich kanzerogener Wirkungen von Substanzen. Neben der morphologischen Eignung der Ratte als Modell ist die prinzipielle Bedingung der Verfügbarkeit ebenfalls gewährleistet.

### **1.6.1 Unterschiede zwischen der Brustdrüse der Frau und der Ratte**

Im Gegensatz zu der Frau besitzt die Ratte sechs Brustdrüsenpaare, die sich ventrolateral am Rumpf befinden. Sie ziehen entlang der Milchleisten von zervikal nach inguinal. Während bei der Ratte ein Milchgang von der Mamilla ausgeht, finden sich bei der Frau 10-15 Milchgänge (Anderson SM et al. 2007). In ihrem Aufbau ist die Rattenbrust dem der menschlichen Brustdrüse vergleichbar.

## **1.7 Fragestellung**

Neben den bekannten Effekten der Ecdysteroide auf Vertebraten (Dinan und Lafont 2006) sprechen neuere Studien auch für einen osteoprotektiven Effekt (Seidlova-Wuttke et al. 2010a, Kapur et al. 2010). Die sehr geringe Toxizität und das natürliche Vorkommen der Ecdysteroide in vielen Nutzpflanzen (Lafont und Dinan 2003) lässt die Ecdysteroide in diesem Kontext als eine mögliche Alternative zu der klassischen HRT erscheinen. Während Östrogene auf den Knochenstoffwechsel einen gewünschten osteoprotektiven Effekt ausüben (Anderson et al. 2004), kann es in anderen Organen

wie der Mamma zu einer gesteigerten Proliferation führen (Russo J et al. 2001, Wuttke et al. 2007). Dies birgt potenziell die Gefahr einer malignen Entartung. Die Entwicklung der synthetisch erzeugten SERMs Tamoxifen und Raloxifen weckte die Hoffnung, Substanzen zu finden, die die positiven, nicht aber die unerwünschten Eigenschaften der Östrogene vereinigen.

Für einige Phytosubstanzen wie z.B. *Cimicifuga racemosa* ist mittlerweile bekannt, dass sie knochenprotektive Eigenschaften aufweisen (Seidlová-Wuttke et al. 2003, Wuttke et al. 2006a, Sehmisch et al. 2009b,a), ohne eine Östrogenen vergleichbare Wirkung auf Uterus und Brustdrüse auszuüben. Bei der Untersuchung der Brustdrüse zeigte sich jedoch bei anderen Phytosubstanzen, wie z.B. Genistein, eine Östrogenen vergleichbare Stimulation der Brustdrüse (Rimoldi et al. 2007). Des Weiteren scheint die Dauer einer Substanzapplikation eine entscheidende Einflussgröße darzustellen (Wuttke et al. 2006b). Aus dem skizzierten Kontext ergeben sich deshalb folgende Fragen für die vorliegende Arbeit:

- 1) Zeigt 20E einen Effekt auf die Brustdrüse?
- 2) Gibt es einen Unterschied zwischen einer Kurzzeit- und einer Langzeitapplikation von 20E während der Postmenopause?
- 3) Wirkt 20E in der reproduktiven Phase anders als in der Postmenopause?
- 4) Gibt es Hinweise auf ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko oder einen schützenden Effekt von 20E?

## 2 Material und Methoden

Die dieser Arbeit zugrunde liegende Studie untergliedert sich in einen Kurzzeitversuch und einen Langzeitversuch. Als Modellorganismus für die postmenopausale Frau dienten in beiden Versuchsteilen weibliche ovariectomierte (ovx) Ratten der Art Sprague Dawley (SD). Die Tiere wurden vor der Ovariectomie (Ovx) in Gruppen eingeteilt. Eine zweiwöchige Akklimatisierungsphase schloss sich der Ovx und Gruppeneinteilung vor Substanzapplikation an. Art der Versuchstiere, Haltungsbedingungen, Gruppengröße, Einteilung nach Gewicht, sowie die Ovx waren in beiden Versuchen gleich gewählt bzw. durchgeführt, so dass diese in den folgenden Abschnitten für beide Versuchsteile zusammen erläutert werden. Die den jeweiligen Versuchsteil definierenden standardisierten Verabreichungsprotokolle werden für den Kurzzeit- wie Langzeitversuch im Anschluss getrennt aufgeführt. Im Anhang der Arbeit finden sich genaue Angaben zu Färbeprotokollen, Material und Lösungen.

### 2.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Versuchstiere waren im Kurzzeit- wie im Langzeitversuch weibliche SD-Ratten aus der Zucht der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen. Vor Beginn der Studie wurden alle Tiere mit phytoöstrogenarmem, sojafreiem Futter gefüttert.

Die im Alter von drei Monaten in die Studie eingeschlossenen Ratten wurden in Käfiggruppen, bestehend aus jeweils sechs Tieren, eingeteilt. Die Einteilung erfolgte nach dem zu diesem Zeitpunkt bestimmten Gewicht, so dass alle Versuchsgruppen des jeweiligen Versuchsabschnitts ein vergleichbares Durchschnittsgewicht aufwiesen. Das Durchschnittsgewicht der Tiere pro Käfig lag zu diesem Zeitpunkt bei allen Gruppen des Kurzzeitversuches bei 243 Gramm (g) und 256 g im Langzeitversuch. Die Raumtemperatur der Stallungen lag während der gesamten Versuchsdauer bei 22-24 Grad, die relative Luftfeuchtigkeit bei 50-55 %. Beide Parameter wurden durch ein Thermo-Hydrometer kontrolliert und aufgezeichnet. Die Beleuchtung des Raumes erfolgte in einem Zwölf-Stunden-Rhythmus, wobei ein Beleuchtungszyklus von 6:00 bis 18:00 Uhr dauerte. Eine räumliche Trennung der Käfige sollte einen akzidentellen Übertritt der eingesetzten Substanzen vermeiden. Wasser und Futter stan-

den den Tieren über den gesamten Zeitraum ad libitum zur Verfügung.

Die hier beschriebenen Tierversuche wurden durch die Bezirksregierung Braunschweig genehmigt (Az.Nr. G82.06).

## **2.2 Ovarektomie**

Nach der Gruppeneinteilung wurde im Alter von drei Monaten eine Ovx der Versuchstiere vorgenommen, wobei im Kurzzeitversuch alle Ratten ovarektomiert wurden, während im Langzeitversuch zwei Versuchsgruppen die Ovarien behielten und intakt blieben.

Der Eingriff wurde unter Isoflurannarkose durchgeführt. Nach Rasur wurden Bauchdecke und Muskulatur etwa 2 cm kaudal der Rippenbögen eröffnet und die Ovarien frei präpariert. Die Tuben wurden abgebunden und die Ovarien ektomiert. Die Muskulatur sowie die Bauchhaut wurden mit sterilem Nahtmaterial versorgt und zusätzlich die Bauchdecke durch Klammerung sicher verschlossen. Im Zuge der Operation erfolgte neben der Ovx die subkutane Implantation eines Transponders.

## **2.3 Identifikation der Tiere**

Um eine eindeutige Identifikation jeden Tieres gewährleisten zu können, wurde jedem ein spezifischer Transponder subkutan unter die Nackenhaut implantiert. Jeder Transponder speicherte einen vierstelligen Zahlencode. Dieser konnte mittels eines mobilen Transponder-Lesegerätes abgerufen werden, so dass jede Ratte jederzeit identifiziert werden konnte.

## **2.4 Rattengewichte**

Sowohl beim Kurzzeitversuch, als auch beim Langzeitversuch wurde wöchentlich das Gewicht jeder Ratte mittels einer Waage bestimmt und notiert. Jedes Tier wurde dabei durch den implantierten Transponder identifiziert. Für jeden Käfig wurde wöchentlich ein durchschnittliches Tiergewicht ermittelt.

## 2.5 Bezeichnung der Gruppen

Im Kurzzeit- wie im Langzeitversuch sind die einzelnen Gruppen durch einen dreistelligen Gruppenbezeichner definiert. Als Beispiele seien K-ovx-1 und L-int-0 aufgeführt. Der erste Buchstabe K bzw. L definiert den Versuch, wobei K für den Kurzzeitversuch und L für den Langzeitversuch steht. Die in zweiter Position folgende Abkürzung ovx, bzw. int gibt den hormonellen Status der Versuchsgruppe an. Ovx kennzeichnet die ovariectomierte Versuchsgruppe, während int für eine nicht ovariectomierte, intakte Versuchsgruppe steht. Die letzte Position des Gruppenbezeichners gibt Aufschluss über die verwandten Substanzen. E2 steht für 17 $\beta$ -Estradiol als Versuchssubstanz, 0 repräsentiert jeweils die Kontrollgruppe. Die Ziffern 1 bis 3 kennzeichnen die Versuchsgruppen, die das Ecdysteroid 20-Hydroxyecdysone (20E) bekamen, wobei eine höhere Ziffer einer höheren Substanzmenge entspricht.

## 2.6 Kurzzeitversuch

Der Kurzzeitversuch war über 28 Tage angelegt und umschloss 61 Versuchstiere. Alle Versuchstiere wurden nach dem in Abschnitt 2.1 beschriebenen Prozedere in vergleichbare Käfiggruppen eingeteilt und 14 Tage vor dem Beginn der Substanzapplikation ovariectomiert. 12 bzw. 13 Tiere bildeten eine Versuchsgruppe, so dass insgesamt 5 Versuchsgruppen entstanden. Während der gesamten Versuchsdauer wurde phytoöstrogenarmes Futter gefüttert. Die Applikation der jeweiligen Substanz (siehe Tabelle 2.1) erfolgte für alle Gruppen nach standardisiertem Protokoll. Über die 28-tägige Versuchsdauer wurden drei der Versuchsgruppen täglich 20E subkutan (s.c.) appliziert. Die gewählten 20E-Konzentration lag für die erste Versuchsgruppe (K-ovx-1) bei 2 mg/Tier/Tag, für die zweite Versuchsgruppe (K-ovx-2) bei 10 mg/Tier/Tag und für die dritte Versuchsgruppe (K-ovx-3) bei 25 mg/Tier/Tag. Eine weitere Versuchsgruppe (K-ovx-E2) erhielt täglich 1  $\mu$ g 17 $\beta$ -Estradiol. Als Kontrollgruppe (K-ovx-0) wurden 6 Tieren der fünften Gruppe NaCl verabreicht, während weiteren 6 Versuchstieren Benzylbenzoat als Kontrollsubstanz appliziert wurde. Die exakte Einteilung der Versuchsgruppen ist in Tabelle 2.1 dargestellt. Allen Tieren wurde zwischen 8 und 10 Uhr morgens die jeweilige Substanz subkutan appliziert. Zur Applikation wurden Einmalkanülen und -spritzen verwendet.

Anhand des durchschnittlichen Körpergewichtes (KG) wurde für jede Versuchsgruppe das pro Gramm KG aufgenommene Substanzgewicht errechnet.

## 2.6.1 Gruppen und Substanzmengen im Kurzzeitversuch

**Tabelle 2.1:** Gruppeneinteilung und Verabreichungsprotokoll im Kurzzeitversuch

Gruppenbezeichner	K-ovx-0	K-ovx-E2	K-ovx-1	K-ovx-2	K-ovx-3
Substanz	NaCl, Benzyl- benzoat	E2	20E	20E	20E
Substanzgewicht/Tier/Tag	0 mg	0.001 mg	2 mg	10 mg	25 mg
Durchschnittliches Körpergewicht (g)	258	233	257	256	257
Substanzgewicht/Körpergewicht ( $\mu\text{g/g KG}$ )	0	0.0043	7.7	39	97.2

E2: 17 $\beta$ -Estradiol

20E: 20-Hydroxyecdysen

KG: Körpergewicht

## 2.7 Langzeitversuch

Der Kurzzeit- und der Langzeitversuch unterschieden sich neben der Versuchsdauer in der Zahl der Versuchstiere sowie in der Art der Substanzgabe. Zudem wurden zwei der sieben Versuchsgruppen die Ovarien nicht entnommen. Diese Gruppen werden im Folgenden als „intakt“ bezeichnet.

Der Langzeitversuch umfasste 81 Tiere und war über einen Zeitraum von drei Monaten angelegt. Die Einteilung der Tiere erfolgte in sieben Gruppen mit jeweils 10 bis 12 Tieren. Fünf der insgesamt sieben Gruppen wurden nach beschriebenem Prozedere ovariectomiert. Alle Gruppen wurden mit sojafreiem Grundfutter gefüttert, dem je nach Versuchsgruppe die jeweilige Testsubstanz zugegeben war. Als ovx Kontrollgruppe diente die Gruppe L-ovx-0, deren Futter neben sojafreiem Grundfutter keine weitere Substanz enthielt.

Die Tiere der Versuchsgruppen L-ovx-1, L-ovx-2 und L-ovx-3 wurden mit sojafreiem Futter gefüttert, dem in aufsteigender Menge das Ecdysteroid 20E beigelegt war. Die Tiere der Gruppe L-ovx-1 erhielten 1g, L-ovx-2 3g und L-ovx-3 6g 20E/Kg Futter.

Einer weiteren Versuchsgruppe mit dem Bezeichner L-ovx-E2 wurde Futter mit einem Zusatz von 0.001g Estradiolbenzoat/Kg Futter gefüttert.

Neben den ovx Tieren blieben zwei der sieben Versuchsgruppen intakt. Dem Futter der Gruppe L-int-1 waren 3g 20E/Kg Futter zugegeben, während die Gruppe L-int-0 als intakte Kontrollgruppe nur sojafreies Futter bekam. Genaue Daten sind den Tabellen 2.2 und 2.3 zu entnehmen.

### 2.7.1 Futteraufnahme im Langzeitversuch

Um die durch die Tiere aufgenommene Menge an Substanz errechnen zu können, wurde der Futterverbrauch pro Käfig ermittelt. Wöchentlich wurde eine definierte, über dem zu erwartenden Futterverbrauch liegende Menge von 1500g Futter abgewogen und den Tieren käfigweise zur Verfügung gestellt. Vor jeder neuen Fütterung wurde die noch vorhandene Futtermasse durch Wiegen bestimmt. Durch Subtraktion des gemessenen Wertes von dem zu Beginn ermittelten Futtergewichtes ergab sich die aufgenommene Futtermenge pro Käfig. Zudem konnte der wöchentliche und tägliche Futterverbrauch für das einzelne Tier der jeweiligen Käfiggruppe errechnet werden.

### 2.7.2 Aufgenommene Substanzmenge pro Tier im Langzeitversuch

Aus der durchschnittlichen täglichen Futteraufnahme und der pro Versuchsgruppe definierten Menge an 20E bzw. E2 pro 1500 g Futter ließ sich das aufgenommene tägliche Substanzgewicht/Tier bestimmen. Ferner konnte aus den wie unter Abschnitt 2.4 ermittelten durchschnittlichen Körpergewichten der Tiere das aufgenommene Substanzgewicht pro Gramm Körpergewicht errechnet werden.

### 2.7.3 Gruppen und Substanzmengen im Langzeitversuch

**Tabelle 2.2:** Gruppeneinteilung und Verabreichungsprotokoll der ovariectomierten Tiere im Langzeitversuch

Gruppenbezeichner	L-ovx-0	L-ovx-E2	L-ovx-1	L-ovx-2	L-ovx-3
Substanz	sojafrei	E2	20E	20E	20E
Substanzgewicht/Futtergewicht (g/Kg)	0	0.001	1	3	6
Futteraufnahme/Tier/Tag (g)	17.32	15.92	18.02	18.86	19.3
Aufgenommenes Substanzgewicht (mg/Tier/Tag)	0	0.015	18.02	56.58	115.8
Durchschnittliches Körpergewicht (g)	279	254	281	286	290
Substanzgewicht/Körpergewicht ( $\mu\text{g/g KG}$ )	0	0.62	60	195	390

**Tabelle 2.3:** Gruppeneinteilung und Verabreichungsprotokoll der intakten Tiere im Langzeitversuch

<b>Gruppenbezeichner</b>	<b>L-int-0</b>	<b>L-int-1</b>
Substanz	sojafrei	20E
Substanzgewicht/Futtergewicht (g/Kg)	0	3
Futtermittelaufnahme/Tier/Tag (g)	16.77	18.86
Aufgenommenes Substanzgewicht (mg/Tier/Tag)	0	50.32
Durchschnittliches Körpergewicht (g)	257	261
Substanzgewicht/Körpergewicht ( $\mu\text{g/g KG}$ )	0	191.5

## 2.8 Beendigung der beiden Versuchsteile

Nach Ende eines jeweiligen Versuches wurden die Tiere unter einer Kohlenstoffdioxid-Narkose dekapitiert. Das dadurch gewonnene Blut wurde für die serologischen Untersuchungen aufgefangen. Im Anschluss wurde jeweils die oberste Mamma der linken, wie der rechten Milchleiste eines jeden Tieres mit einem Skalpell entnommen. Die so gewonnenen Gewebe wurden in Gewebegittern über 48 Stunden in 10% Formalin fixiert. Anschließend wurde für die histologische Auswertung die Entwässerung und Einbettung in Paraffin vorgenommen.

## 2.9 Histologische Aufarbeitung

Die für die Histologie vorgesehenen Präparate wurden zunächst über 15 Stunden im Entwässerungsautomaten dehydriert. Dies geschah mittels Ethanoltauchungen, wobei aufsteigende Alkoholkonzentrationen von 50%, 75%, 96% und 100% verwendet wurden. Anschließend wurden eine Xylolbehandlung durchgeführt und die Präparate in Paraffin mittels einer Einbettmaschine eingebettet. Dabei wurden pro Paraffinblock zwei Brustdrüsen eines Versuchstieres eingebettet. Die Positionierung der Gewebe erfolgte in Frontalebene, wobei die Mamilla apikal ausgerichtet war. Zur Herstellung der histologischen Schnitte wurde ein Rotationsmikrotom verwendet. Für den Schnitt diente eine Einmalklinge. Nach Abtragung des die Mammae überdeckenden Paraffinanteils in 30  $\mu\text{m}$  Schnittstärke erfolgte die Herstellung der Schnitte in 3  $\mu\text{m}$  Stärke. Pro Versuchstier wurden zwei Schnittlinien, bestehend aus 10 Serienschnitten, erstellt. Zur Glättung der einzelnen Schnitte wurden diese zunächst in kalkfreies Wasser eingebracht. Anschließend wurden die einzelnen Schnitte auf Objektträger aufgezogen. Dies geschah nach einer weiteren Glättung im Paraffinstreckbad. Die Trocknung der aufgezogenen Schnitte erfolgte zunächst auf einer Wärmeplatte bei 37 Grad. Zur vollständigen Fixierung wurden die vorgetrockneten Schnitte über 12 Stunden im Trockenschrank bei 38 Grad gelagert.

Genauere Präparaten- und Herstellerangaben finden sich im Anhang.

### **2.9.1 Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung erfolgte nach einem Standardprotokoll in 23 Schritten (Siehe Anhang). Pro Versuchstier wurden zwei Schnitte gefärbt. Es handelte sich hier jeweils um Schnitt 5 und 7 der 10 Serienschnitte.

Nach dem Färbevorgang wurden die Präparate mit DePex Mounting Medium fixiert und mittels Eindeckgläschen für die Analyse am Mikroskop vorbereitet.

## **2.10 Mikroskopische Analyse**

### **2.10.1 Histologische Kriterien**

Für die histologische Auswertung wurde jeder Schnitt in einer Übersichtsvergrößerung auf folgende Kriterien evaluiert:

- 1) Schnitttiefe
- 2) Qualität des Schnittes in Bezug auf:
  - Vollständigkeit der jeweiligen Mamma
  - Schäden des Präparates.

Bei Mängeln im Punkt 1 und/oder 2 wurde ein neuer Schnitt der vorhandenen Serienschnitte des Versuchstieres nach dem Standardprotokoll gefärbt oder durch Nachschneiden erneut ein Schnitt gewonnen. Dies diente der prinzipiellen Vergleichbarkeit der einzelnen Schnitte.

Nachdem die Schnitte auf deren Auswertbarkeit evaluiert waren, wurden sie randomisiert, so dass bei der mikroskopischen Auswertung eine direkte Zuordnung zu den jeweiligen Substanzklassen nicht möglich war.

### **2.10.2 Auswertung der Schnitte**

Jeder Schnitt wurde auf seine Quantität bezüglich der im Folgenden aufgeführten Strukturen analysiert.

Unterschieden wurde zwischen lobuloalveolären und dukталen Strukturen. Bei den erstgenannten wurde zwischen Lobulus I, Lobulus II und Alveolar Buds differenziert. Lobulus I war definiert als

Einheit von 5 bis 10 Alveoli, Lobulus II als Einheit von über 10 Alveoli. Als Alveolar Buds wurden Einheiten von 3 bis 4 Alveoli mit zentralem Lumen und kuboidalem Epithel klassifiziert. Als Duktus wurden tubuläre Strukturen, bestehend aus einer inneren Epithelzellschicht und einer oder mehreren äußeren Myoepithelzellschichten, definiert. Siehe hierzu auch Tabelle 2.4.

Die Analyse jeden Schnittes erfolgte nach einem standardisierten Schema. Vertikal wurde dabei von links oben nach rechts unten vorgegangen. Zur Diskriminierung der Strukturen von einander wurden verschiedene Vergrößerungsstärken verwendet. Das Aufsuchen der Strukturen erfolgte zunächst bei fünffacher Vergrößerung (2.5 x 2). Zur genaueren Analyse des Duktus wurde eine fünfzigfache (20 X 2.5) Vergrößerung, zur Quantifizierung der Alveoli, und damit der Klassifizierung in AB, Lobulus I und Lobulus II eine hundertfache Vergrößerung (40 x 2.5) gewählt.

Die Ergebnisse der Auszählung wurden für jeden Schnitt in einer Exceltabelle notiert. Nach Auswertung des Schnittes bezüglich der genannten Strukturen wurde das untersuchte Gebiet umrandet und die Fläche errechnet. Dies ermöglichte es, die Anzahl der gezählten Strukturen auf die Größe der untersuchten Fläche zu beziehen und damit eine Vergleichbarkeit herzustellen.

**Tabelle 2.4:** Untersuchte Strukturen der Mamma

Struktur	Kriterien, Charakteristika
Lobulus I	5 - 10 Alveoli
Lobulus II	> 10 Alveoli
Alveolar buds (AB)	3 - 4 Alveoli, kuboidales Epithel
Duktus	Epithelschicht, Myoepithelschicht

**Tabelle 2.5:** Vergrößerung bei der mikroskopischen Auswertung

Struktur	Objektiv	Optavar Zwischentubus	Gesamtvergrößerung
Duktus	20	2.5	50
Lobulus I	40	2.5	100
Lobulus II	40	2.5	100

## 2.11 Statistische Auswertung

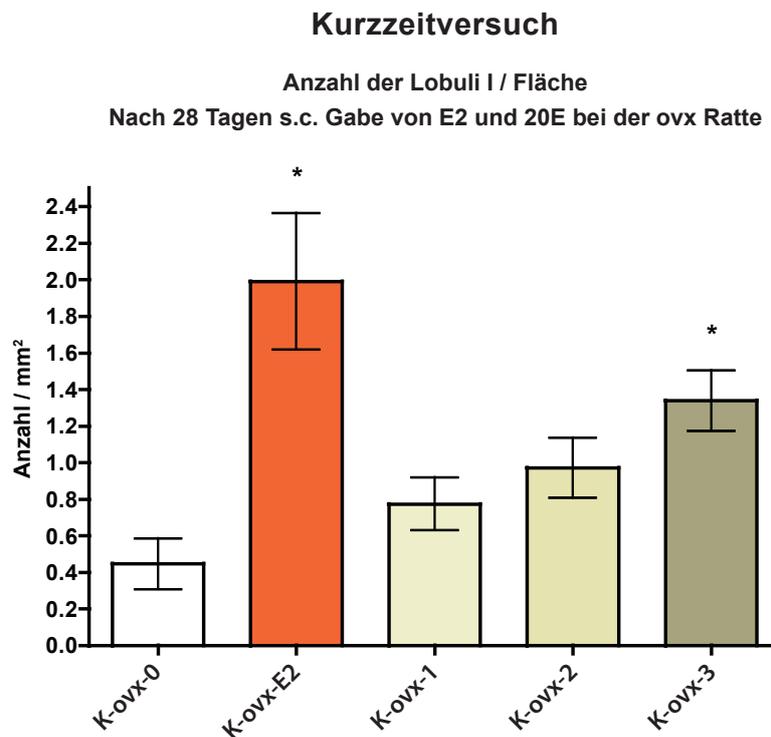
Um die Streuung zu minimieren, wurde in der statistischen Auswertung mit prozentrelativierten Werten gearbeitet. Die Mittelwerte der Kontrollgruppe wurden hierbei gleich 100% gesetzt und in Relation zu den errechneten Mittelwerten der einzelnen Versuchsgruppen gesetzt. Dies diente der Berechnung prozentrelativierter Mittelwerte und deren Standardfehlern. Eine Vergleichbarkeit der

untersuchten Merkmale untereinander war so möglich. Mit einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (Anova) des Statistikprogrammes GraphPad Prism und multiplen T-Test nach Dunnett erfolgte die Auswertung. Das minimale Signifikanzniveau wurde auf  $P < 0.05$  festgelegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Histomorphologie im Kurzzeitversuch: 28 Tage subkutane (s.c.) Exposition der ovx Ratte mit E2 und 20E

#### 3.1.1 Lobuli I / Fläche



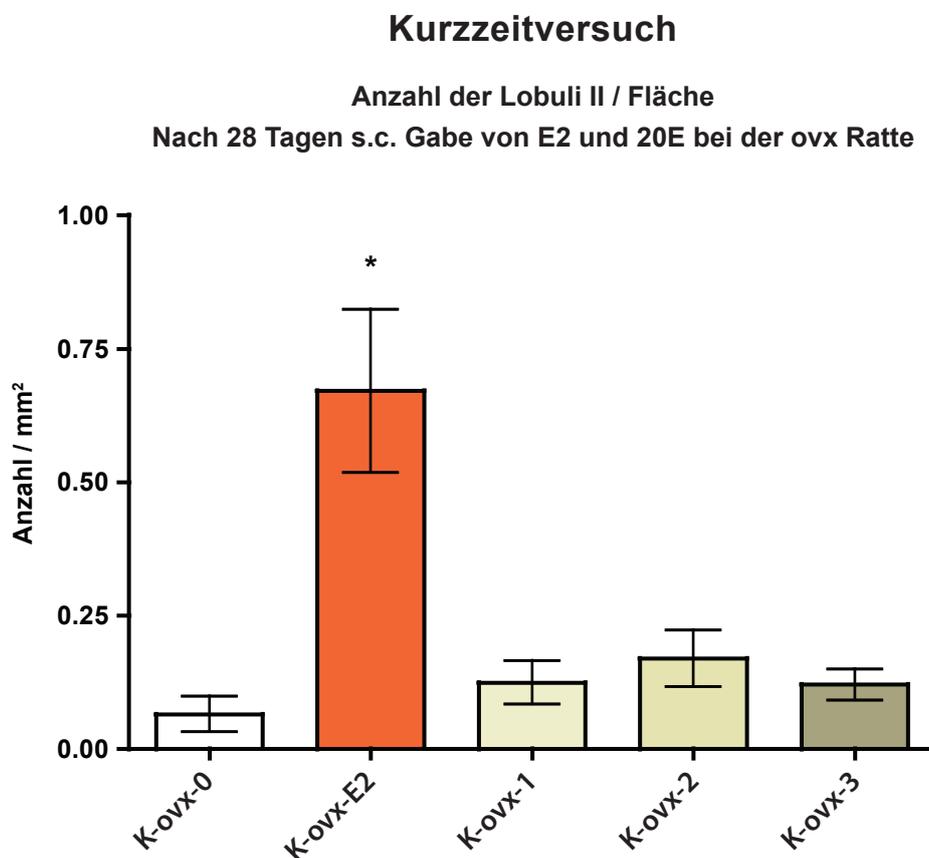
**Abbildung 3.1: Lobulus I der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Lobulus I der Mamma ovx SD-Ratten nach 28-tägiger s.c. Gabe von Kontrollsubstanzen (K-ovx-0), E2 (K-ovx-E2), sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (K-ovx-1, K-ovx-2, K-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Nach 28-tägiger Substanzapplikation lag die durchschnittliche Anzahl der Lobuli I in den Gruppen K-ovx-E2 und K-ovx-3 signifikant über denen der Kontrollgruppe (K-ovx-0). K-ovx-E2 wies durch-

schnittlich 2 Lobuli I pro  $mm^2$  auf, was einem p-Wert von  $< 0.01$  entsprach. Mit einem p-Wert von  $< 0.05$  lag die durchschnittliche Anzahl der Lobuli I der Versuchsgruppe K-ovx-3 ebenfalls signifikant über denen der Kontrollgruppe. Sie zeigte jedoch mit durchschnittlich 1.3 Strukturen pro  $mm^2$  ein geringeres Vorkommen dieser Struktur als die Versuchstiere der Gruppe K-ovx-E2. In den niedrigeren Substanzmengen übte 20E keinen signifikanten Effekt auf die Anzahl der Lobuli I aus. Mit 0.8 und einem Lobulus I pro  $mm^2$  lag die durchschnittliche Anzahl dieser Struktur bei den Versuchsgruppen K-ovx-1 und K-ovx-2 über denen der Kontrollgruppe, erreichte jedoch keine Signifikanz.

### 3.1.2 Lobuli II / Fläche



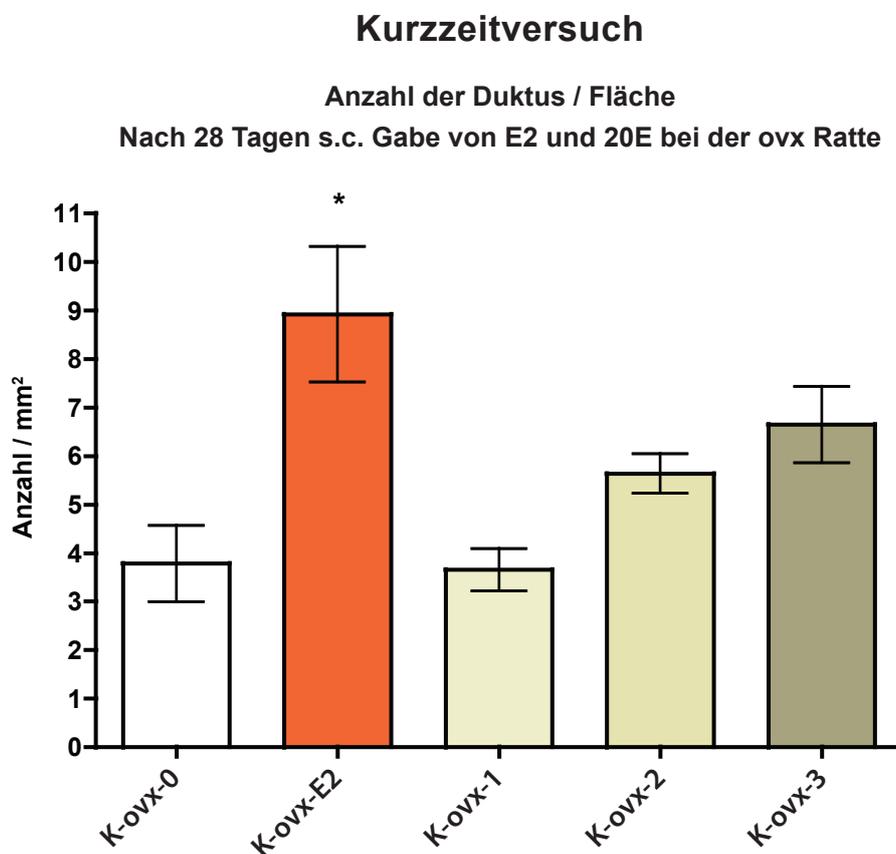
**Abbildung 3.2: Lobulus II der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Lobulus II der Mamma ovx SD-Ratten nach 28-tägiger s.c. Gabe von Kontrollsubstanzen (K-ovx-0), E2 (K-ovx-E2), sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (K-ovx-1, K-ovx-2, K-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Gegenüber der Kontrollgruppe K-ovx-0 mit durchschnittlich 0.06 Lobuli II pro  $mm^2$  wies nach 28-tägiger s.c. Substanzapplikation allein die Gruppe K-ovx-E2 eine signifikant höhere Strukturanzahl auf. In dieser Gruppe betrug die durchschnittliche Anzahl 0.7 Lobuli II pro  $mm^2$ , was einem p-Wert von  $< 0.01$  entsprach.

20E zeigt - verglichen mit der Kontrollgruppe - in keiner der untersuchten Substanzmengen einen signifikanten Effekt auf diese Struktur. Die durchschnittlich gezählte Strukturanzahl lag für die Versuchsgruppen K-ovx-1 und K-ovx-3 bei 0.12 Lobuli II und für K-ovx-2 bei 0.17 Lobuli II pro  $mm^2$ .

### 3.1.3 Duktus / Fläche



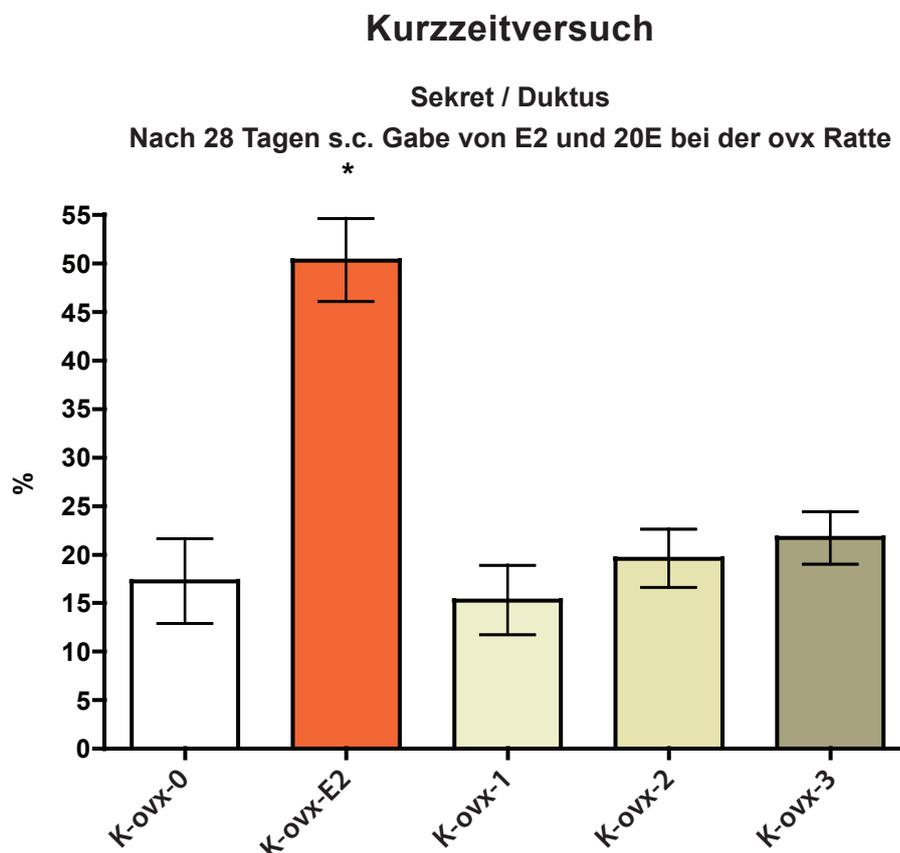
**Abbildung 3.3: Duktus der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Duktus der Mamma ovx SD-Ratten nach 28-tägiger s.c. Gabe von Kontrollsubstanzen (K-ovx-0), E2 (K-ovx-E2), sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (K-ovx-1, K-ovx-2, K-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Die Struktur des Duktus erwies sich nach 28-tägiger s.c. Substanzgabe nur unter E2-Exposition signifikant erhöht. Hier lag die Duktusanzahl bei einem p-Wert von  $< 0.01$  bei durchschnittlich 8.9 Strukturen pro  $mm^2$ . Unter 20E war in keiner der Versuchsgruppen eine signifikant höheren Duktusanzahl nachweisbar.

K-ovx-1 zeigte 3.65 Duktus. Die Versuchsgruppen K-ovx-2 und K-ovx-3 wiesen mit steigender 20E-Menge eine Zunahme der Duktusanzahl auf. Für K-ovx-2 lag die durchschnittlich gezählte Duktusanzahl bei 5.6 pro  $mm^2$ , für die Gruppe K-ovx-3 bei durchschnittlich 6.6 Strukturen pro  $mm^2$ . Die Versuchstiere der Kontrollgruppe K-ovx-0 hatten zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 3.7 Duktus entwickelt.

### 3.1.4 Sekret / Duktus



**Abbildung 3.4: Sekret/Duktus der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch.**

Lichtmikroskopische prozentuale Bestimmung der mit Sekret gefüllten Duktus der Mamma ovx SD-Ratten nach 28-tägiger s.c. Gabe von Kontrollsubstanzen (K-ovx-0), E2 (K-ovx-E2), sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (K-ovx-1, K-ovx-2, K-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

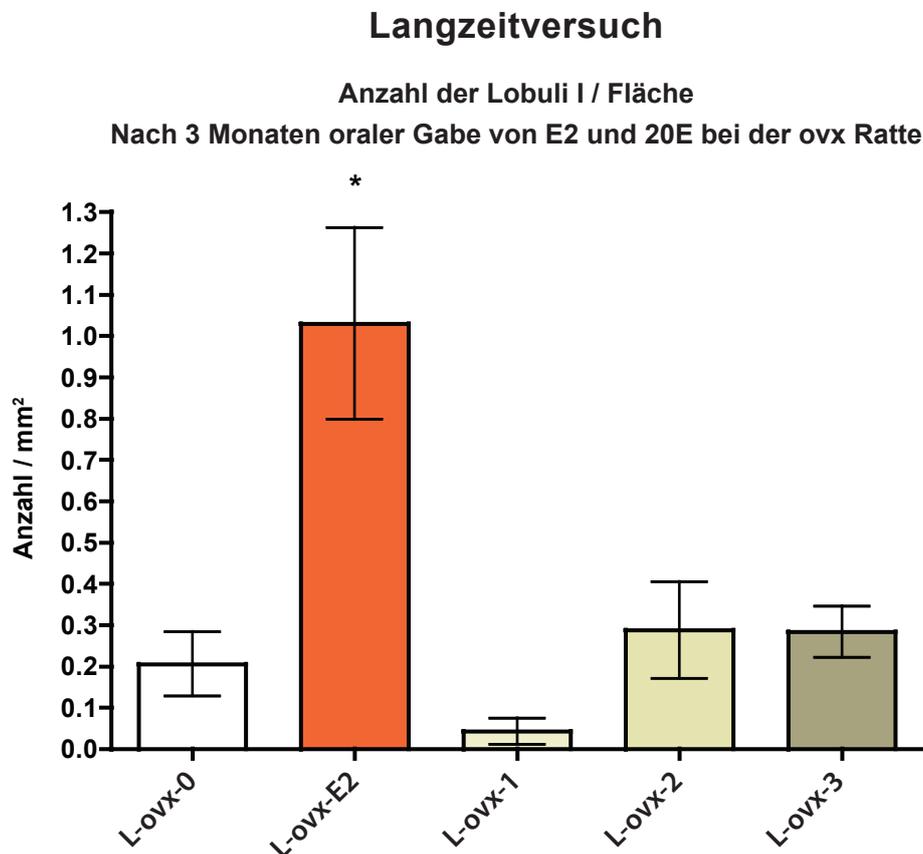
Bei der E2-exponierten Versuchsgruppe K-ovx-E2 stellten sich durchschnittlich 50% der Duktus sekretgefüllt dar. Dies lag mit einem p-Wert von  $< 0.01$  signifikant über den Werten der Kontrollgruppe, bei welcher durchschnittlich 17% der Duktus Sekret aufwiesen. 20E zeigte mit durchschnittlich 15% (K-ovx-1), 19% (K-ovx-2) und 21% (K-ovx-3) sekretgefüllten Duktus der Kontrollgruppe K-ovx-0 vergleichbare Ergebnisse, die von dieser nicht signifikant abwichen.

### **3.2 Histomorphologie im Langzeitversuch: 3 Monate orale Exposition mit E2 und 20E**

Die im Weiteren aufgeführten Ergebnisse zeigen Resultate der histomorphologischen Auswertung der Brustdrüse nach dreimonatiger oraler Substanzapplikation. Zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme waren alle Tiere 6.5 Monate alt.

### 3.2.1 Lobulus I / Fläche

#### 3.2.1.1 Ovariectomierte Ratten



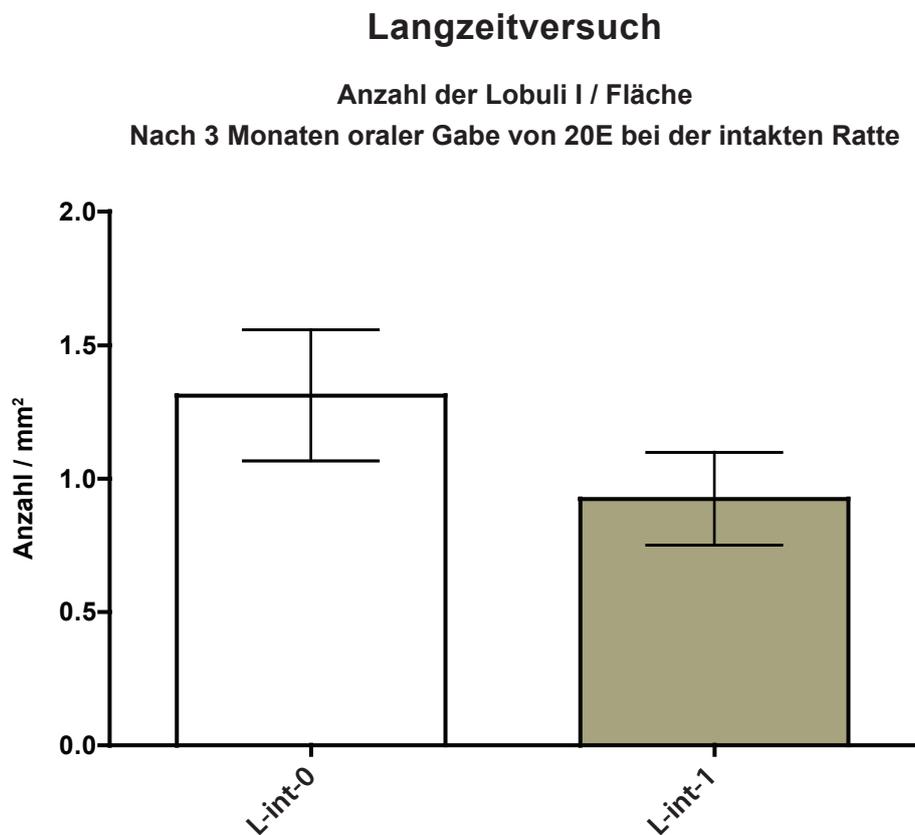
**Abbildung 3.5: Lobulus I der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Lobulus I der Mamma ovx SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von sojafreiem Futter (L-ovx-0), E2 (L-ovx-E2) sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (L-ovx-1, L-ovx-2, L-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Nach dreimonatiger Substanzexposition zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe L-ovx-0 mit durchschnittlich 0.2 Strukturen pro  $mm^2$  in keiner der 20E-exponierten Versuchsgruppen ein signifikanter Effekt auf die Anzahl der Lobuli I. Mit durchschnittlich 0.28 Lobuli I entwickelten die Versuchsgruppen L-ovx-2 und L-ovx-3 der Kontrollgruppe vergleichbare Strukturstärken. Die Versuchsgruppe L-ovx-1 lag mit durchschnittlich 0.04 Lobuli I unter der durchschnittlichen Lobuluszahl der Kontrollgruppe, was keine signifikant niedrigere Strukturanzahl bedeutete.

Eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höhere Anzahl an Lobuli I wies die Versuchsgruppe L-ovx-E2 auf. Hier lag die durchschnittliche Anzahl bei einem Lobulus pro  $mm^2$ .

### 3.2.1.2 Intakte Ratten



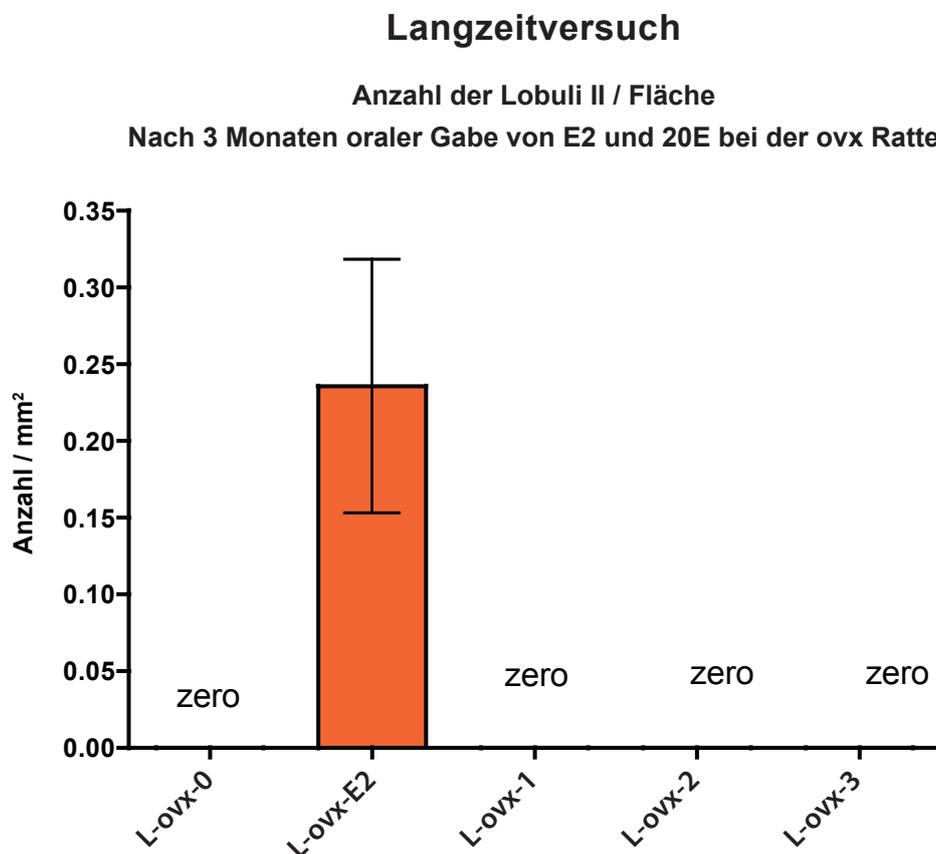
**Abbildung 3.6: Lobulus I der intakten SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Lobulus I der Mamma intakter SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von 20E (L-int-1) und sojafreiem Kontrollfutter (L-int-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus intakte Kontrollgruppe).

Die 20E-exponierte Versuchsgruppe L-int-1 unterschied sich in der Anzahl der Lobuli I nicht signifikant von der intakten Kontrollgruppe L-int-0. Mit durchschnittlich 0.9 Lobuli pro  $mm^2$  lag die durchschnittliche Strukturanzahl der 20E-exponierten Gruppe L-int-1 unter der der Kontrollgruppe, die durchschnittlich 1.3 aufwies.

### 3.2.2 Lobulus II / Fläche

#### 3.2.2.1 Ovariectomierte Ratten

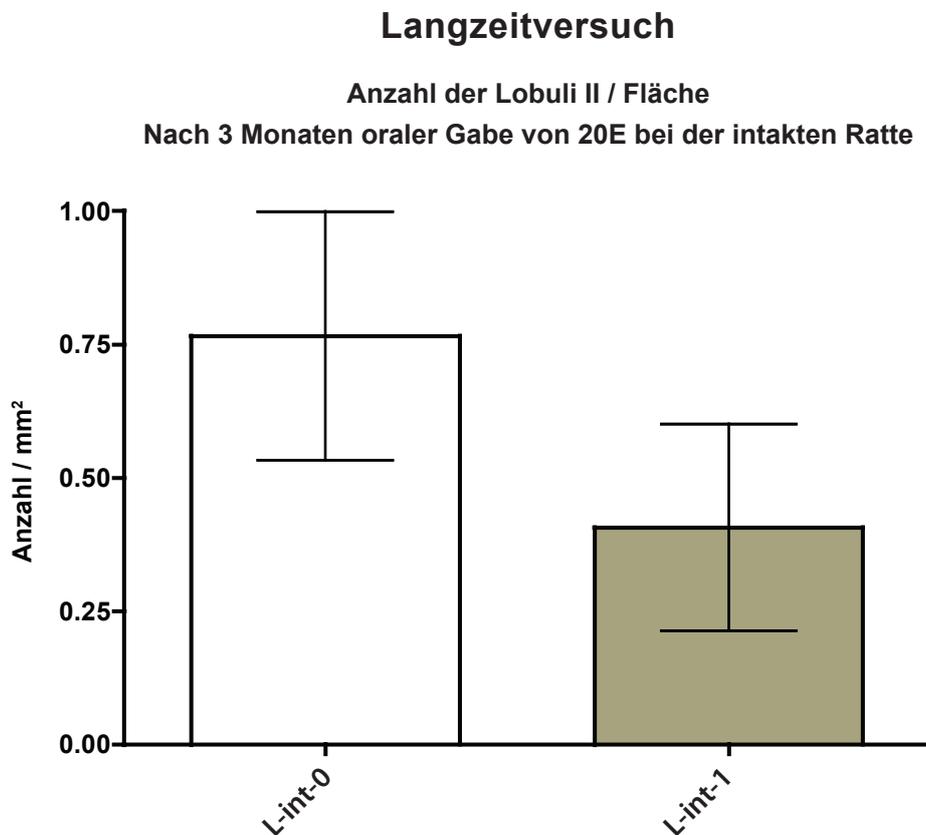


**Abbildung 3.7: Lobulus II der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Lobulus II der Mamma ovx SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von sojafreiem Futter (L-ovx-0), E2 (L-ovx-E2) sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (L-ovx-1, L-ovx-2, L-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Keine der Versuchsgruppen zeigte gegenüber der Kontrollgruppe L-ovx-0 eine signifikant höhere Anzahl an Lobuli II. Wie die Kontrollgruppe wiesen alle 20E-exponierten Versuchsgruppen keinen Lobulus II auf, was in der Graphik mit „zero“ gekennzeichnet ist. Mit durchschnittlich 0.2 Lobuli II pro  $mm^2$  lag die durchschnittliche Anzahl der Lobuli II bei der Versuchsgruppe L-ovx-E2 über denen der Kontrollgruppe. Dies entsprach keiner signifikant höheren Strukturanzahl.

### 3.2.2.2 Intakte Ratten



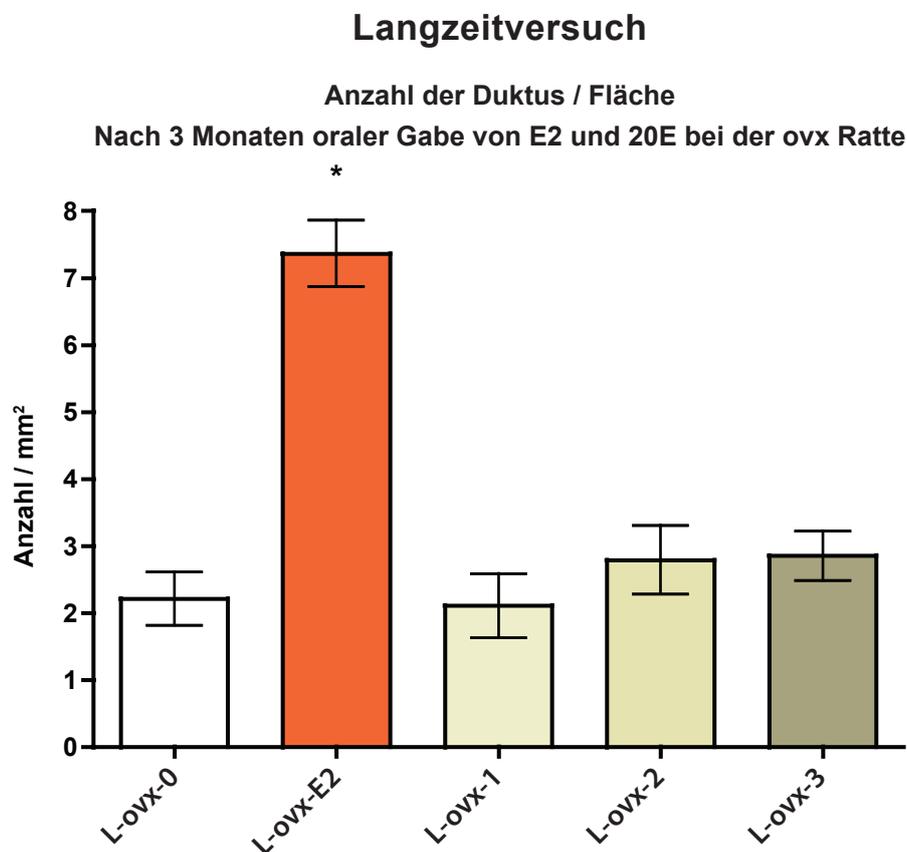
**Abbildung 3.8: Lobulus II der intakten SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Lobulus II der Mamma intakter SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von 20E (L-int-1) und sojafreiem Futter als Kontrolle (L-int-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus intakte Kontrollgruppe).

Verglichen mit der Kontrollgruppe L-int-0 zeigte sich nach dreimonatiger Exposition von 20E kein signifikanter Effekt auf die Anzahl des Lobulus II. L-int-0 wies durchschnittlich 0.78 Lobuli II pro  $mm^2$  auf. Bei L-int-1 lag die durchschnittliche Strukturanzahl bei 0.42 Lobuli II pro  $mm^2$ .

### 3.2.3 Duktus / Fläche

#### 3.2.3.1 Ovariectomierte Ratten

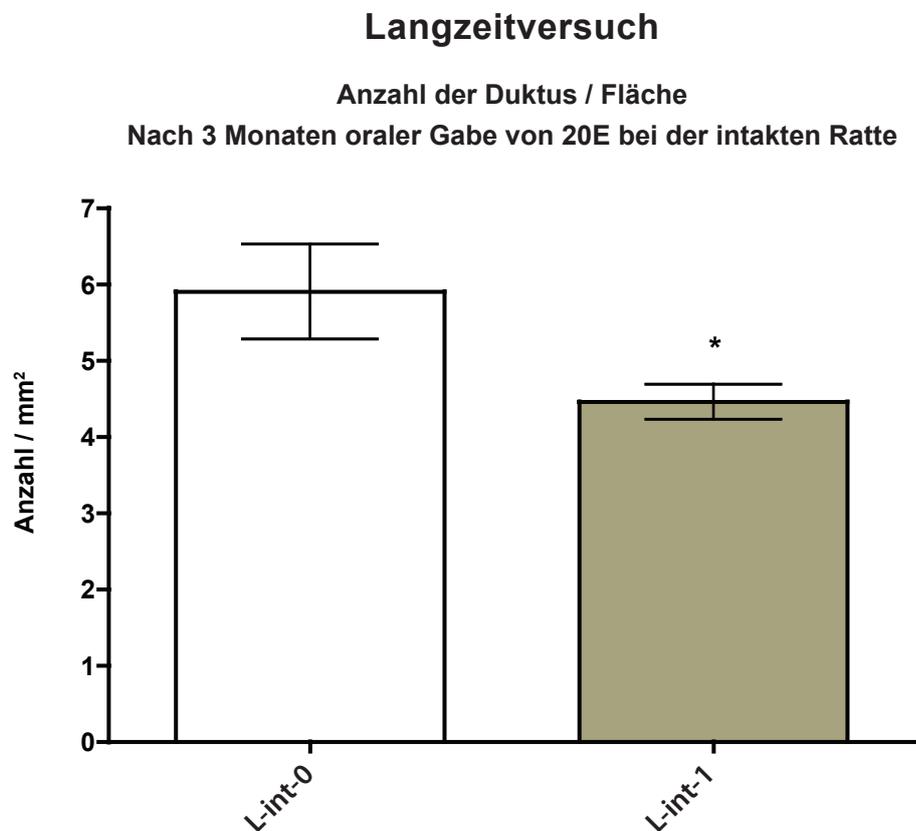


**Abbildung 3.9: Duktus der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Duktus der Mamma ovx SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von sojafreiem Futter (L-ovx-0), E2 (L-ovx-E2), sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (L-ovx-1, L-ovx-2, L-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Nach dreimonatiger Substanzgabe war ein, gegenüber der Kontrollgruppe, signifikanter Effekt auf die Anzahl der Duktus nur bei der Versuchsgruppe L-ovx-E2 festzustellen, der mit einer durchschnittlichen Duktusanzahl von 7.36 Strukturen pro  $mm^2$  einen Signifikanzwert von  $p < 0.01$  erreichte. 20E führte in keiner der verabreichten Mengen zu einem signifikanten Effekt auf diese Struktur. Für die 20E-exponierten Gruppen zeigten sich Werte von 2.1 (L-ovx-1), 2.79 (L-ovx-2) und 2.85 (L-ovx-3) pro  $mm^2$ . Die Kontrollgruppe L-ovx-0 wies 2.21 Duktus auf.

### 3.2.3.2 Intakte Ratten



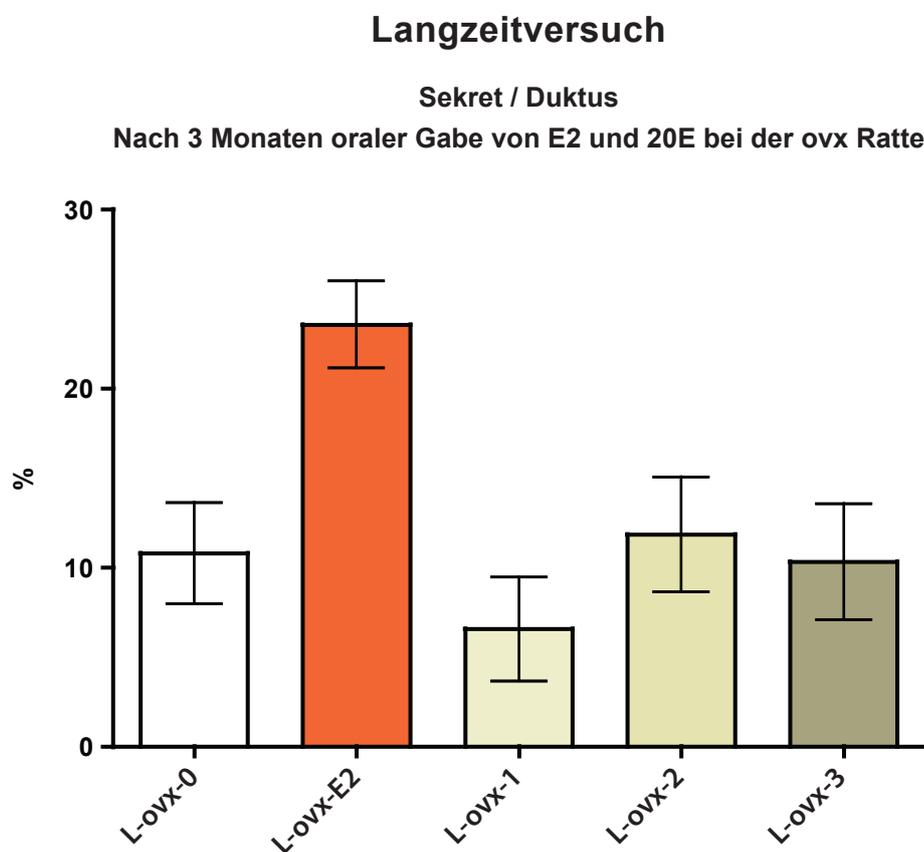
**Abbildung 3.10: Duktus der intakten SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Lichtmikroskopische quantitative Bestimmung der glandulären Struktur des Duktus der Mamma intakter SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von 20E (L-int-1) und sojafreiem Futter als Kontrolle (L-int-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus intakte Kontrollgruppe).

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe L-int-0 zeigte sich bei der 20E-Versuchsgruppe L-int-1 eine niedrigere Anzahl an Duktus pro  $mm^2$ . Mit durchschnittlich 4.5 Strukturen pro  $mm^2$  lag die Duktusanzahl der Gruppe L-int-1 signifikant unter der der Kontrollgruppe, die 5.9 Duktus pro  $mm^2$  aufwies.

### 3.2.4 Sekret / Duktus

#### 3.2.4.1 Ovariectomized Rats

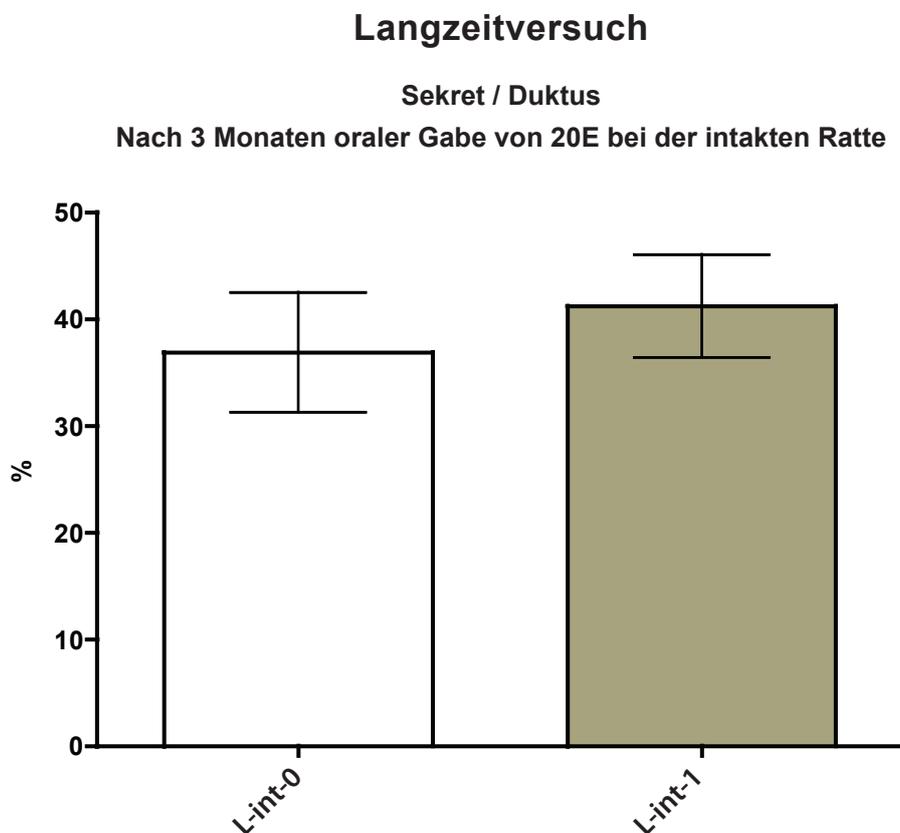


**Abbildung 3.11: Prozentuale Sekretfüllung der Duktus der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Lichtmikroskopische prozentuale Bestimmung der mit Sekret gefüllten Duktus der Mamma ovx SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von sojafreiem Futter (L-ovx-0), E2 (L-ovx-E2), sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (L-ovx-1, L-ovx-2, L-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Gegenüber der Kontrollgruppe L-ovx-0 mit durchschnittlich 10.8 % sekretgefüllten Duktus stellte sich keine der Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich dar. L-ovx-E2 wies mit durchschnittlich 23.5 % Sekretfüllung die höchsten Prozentwerte auf, erreichte aber keine Signifikanz. Für die 20E-exponierten Gruppen zeigten sich Prozentwerte von durchschnittlich 6.8 (L-ovx-1), 11.8 (L-ovx-2) und 10.3 (L-ovx-3) Prozent sekretgefüllter Duktus.

### 3.2.4.2 Intakte Ratten

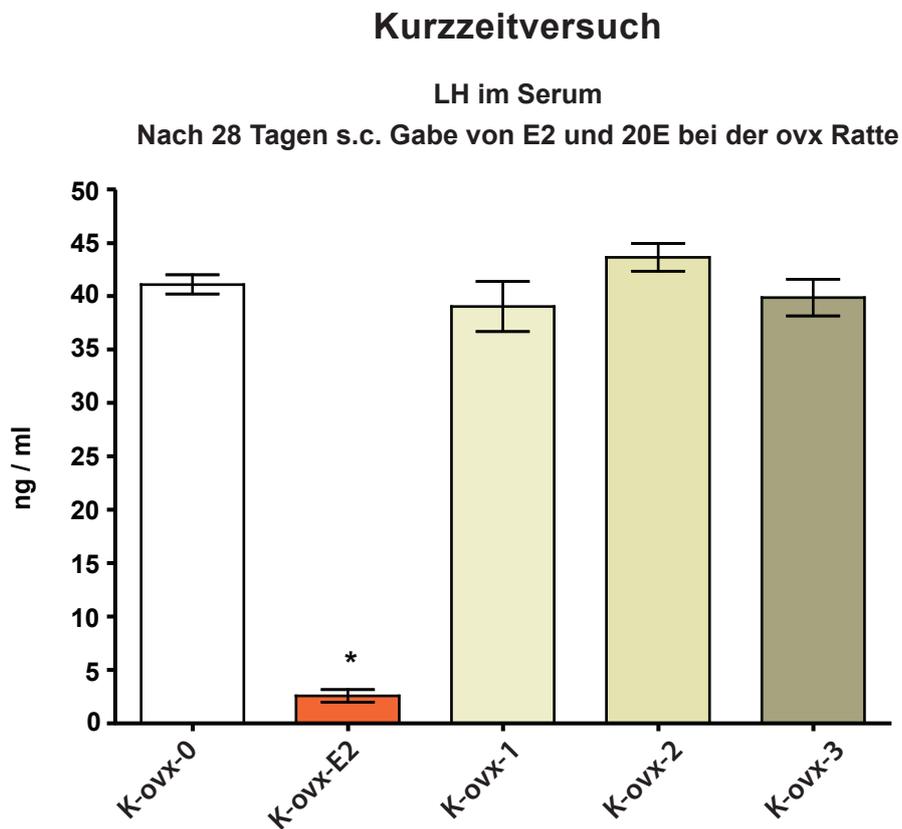


**Abbildung 3.12: Prozentuale Sekretfüllung der Duktus der intakten SD-Ratte im Langzeitversuch.** Lichtmikroskopische prozentuale Bestimmung der mit Sekret gefüllten Duktus der Mamma intakter SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von 20E (L-int-1) und sojafreiem Futter als Kontrolle (L-int-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus intakte Kontrollgruppe).

Der Vergleich der beiden intakten Versuchsgruppen zeigte keinen signifikanten Unterschied in der prozentualen Sekretfüllung ihrer Duktus. Mit 4.2% sekretgefüllter Duktus lag die 20E-exponierte Gruppe L-int-1 geringfügig über der intakten sojafreien Kontrollgruppe L-int-0. Diese wies durchschnittlich 3.7 % sekretproduzierende Duktus auf.

### 3.3 Serumparameter im Kurzzeitversuch: 28 Tage s.c. Exposition der ovx Ratte mit E2 und 20E

#### 3.3.1 LH

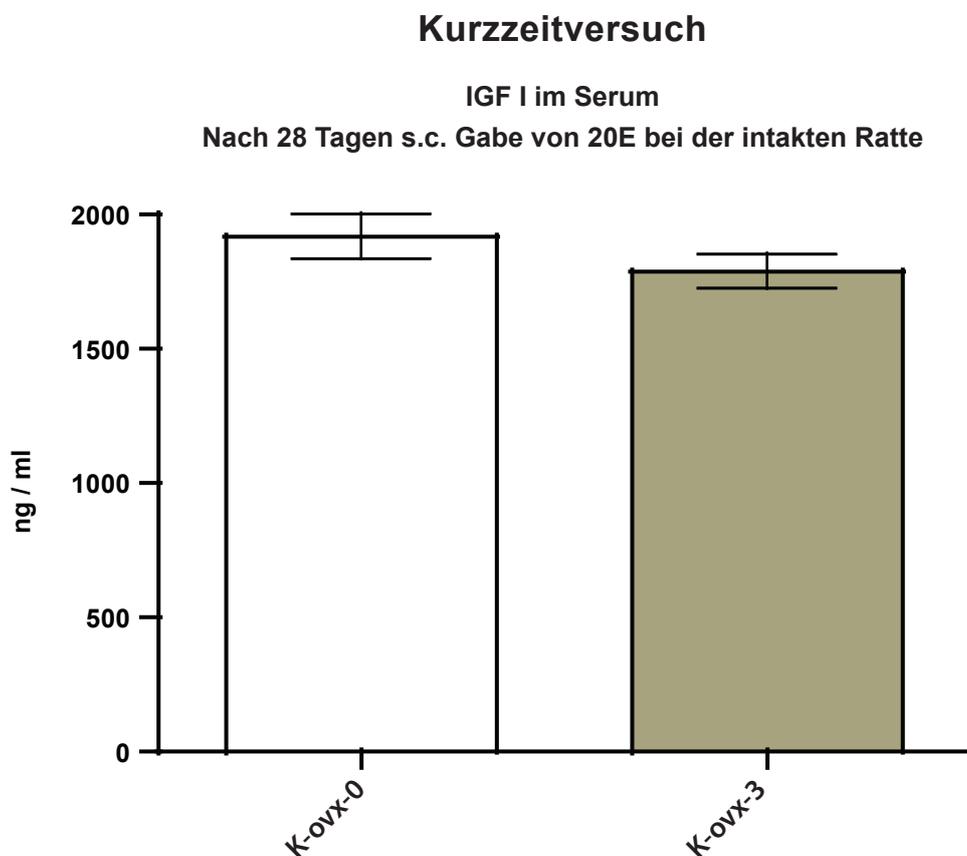


**Abbildung 3.13: LH im Serum der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch.**

Bestimmung des LH-Spiegels im Serum ovx SD-Ratten nach 28-tägiger s.c. Gabe von Kontrollsubstanzen (K-ovx-0), E2 (K-ovx-E2) sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (K-ovx-1, K-ovx-2, K-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Während E2 das Serum-LH auf 2.4 ng/ml supprimierte und damit einen Signifikanzwert von  $p < 0.01$  erreichte, zeigte 20E in keiner der Versuchsgruppen einen signifikanten Effekt auf den LH-Serumspiegel. In diesen Gruppen lag der durchschnittliche Serumspiegel bei 40 ng/ml.

### 3.3.2 IGF 1



**Abbildung 3.14: IGF1 im Serum der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch.**

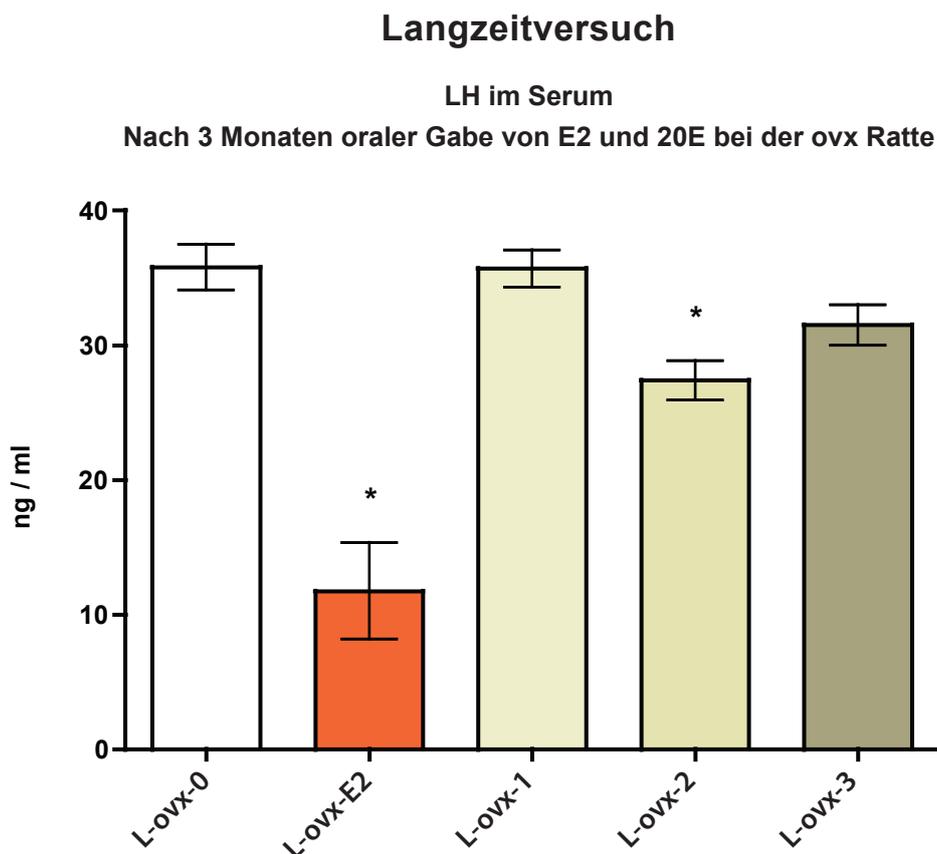
Bestimmung des IGF1-Spiegels im Serum ovx SD-Ratten nach 28-tägiger s.c. Gabe von täglich 25 mg 20E (K-ovx-3) und Kontrollsubstanzen (K-ovx-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Nach 28-tägiger s.c. Substanzapplikation war gegenüber der Kontrollgruppe kein signifikanter Effekt unter 20E zu beobachten. Die durchschnittliche IGF 1-Serumkonzentration war bei der Kontrollgruppe mit 1900 ng/ml geringfügig niedriger als die bei K-ovx-3 gemessene IGF 1-Konzentration. Diese lag bei durchschnittlich 1800 ng/ml.

### 3.4 Serumparameter im Langzeitversuch: 3 Monate orale Exposition mit E2 und 20E

#### 3.4.1 LH

##### 3.4.1.1 Ovariectomierte Ratten



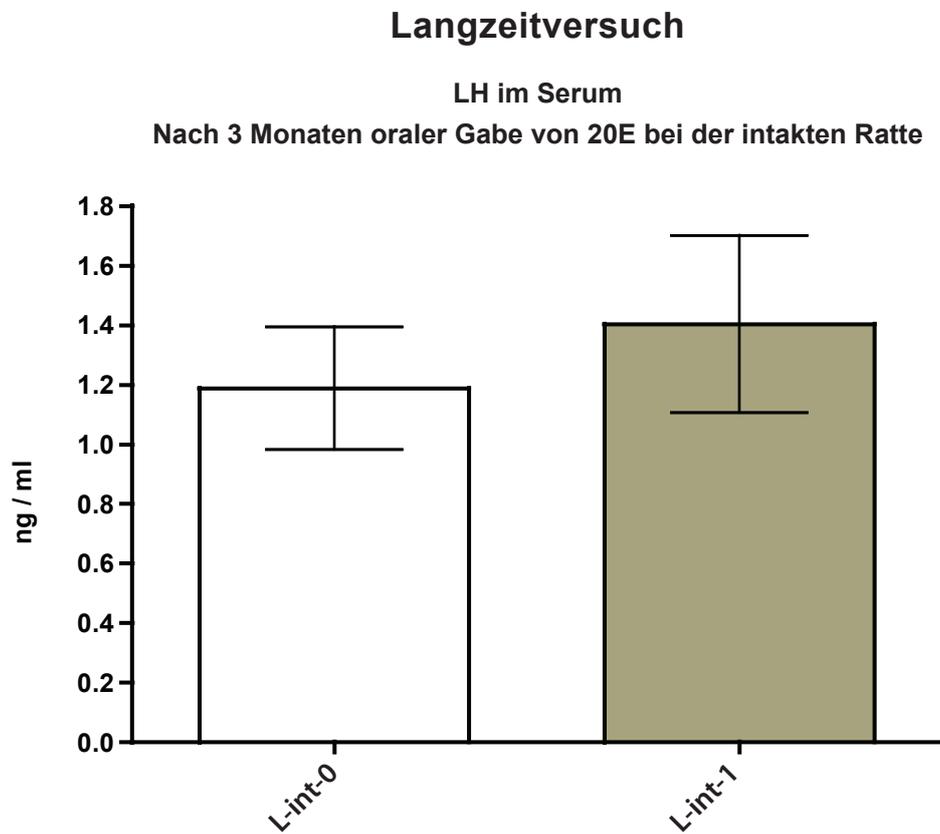
**Abbildung 3.15: LH im Serum der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Bestimmung des LH-Spiegels im Serum ovx SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von sojafreiem Futter (L-ovx-0), E2 (L-ovx-E2) sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (L-ovx-1, L-ovx-2, L-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Die LH-Serumkonzentration stellte sich nach dreimonatiger Substanzapplikation bei L-ovx-E2 und L-ovx-2 gegenüber der Kontrollgruppe L-ovx-0 signifikant supprimiert dar. L-ovx-E2 wies ein Serum-LH von durchschnittlich 12 ng/ml auf. In der Gruppe L-ovx-2 ergaben sich Durchschnittswerte von 27 ng/ml. Dies entsprach für beide Gruppen einem Signifikanzwert von  $p < 0.01$ . In den anderen 20E-Versuchsgruppen zeigten sich Werte, die von den durchschnittlich bei der Kontrollgruppe gemessenen 36 ng/ml nicht signifikant abwichen. Bei L-ovx-1 wurde ein Serumspiegel von 36, bei L-ovx-3 ein

Serumspiegel von 31.5 ng/ml gemessen.

### 3.4.1.2 Intakte Ratten



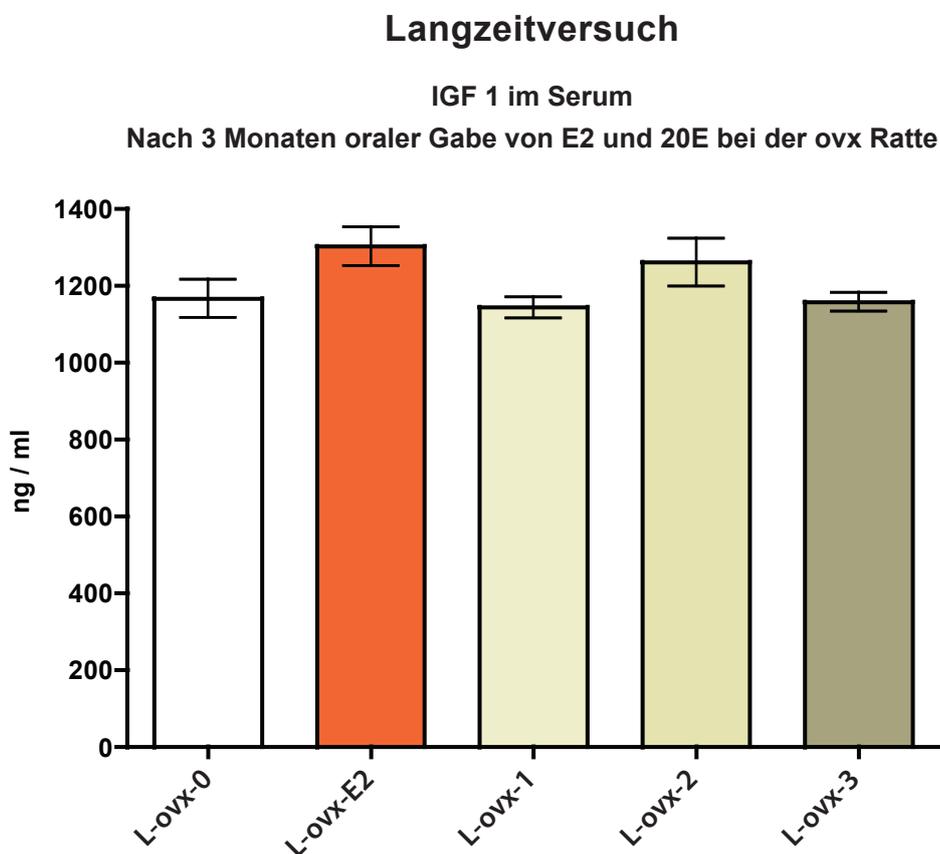
**Abbildung 3.16: LH im Serum der intakten SD-Ratten im Langzeitversuch.**

Serum-LH intakter SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von 20E (L-int-1) und sojafreiem Futter als Kontrolle (L-int-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus intakte Kontrollgruppe).

Gegenüber der Kontrollgruppe L-ovx-0, die eine durchschnittliche LH-Serumkonzentration von 1.2 ng/ml aufwies, lag das Serum-LH der Versuchsgruppe L-int-1 mit 1.4 ng/ml nicht signifikant über dem der Kontrollgruppe.

## 3.4.2 IGF 1

### 3.4.2.1 Ovariectomierte Ratten

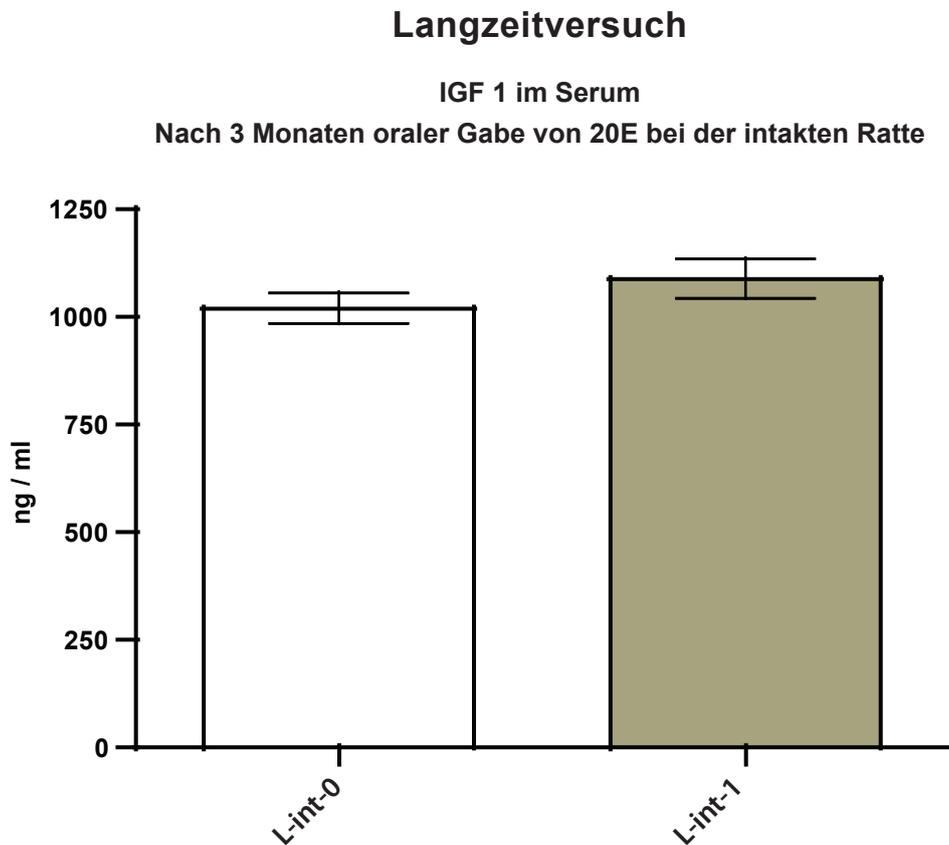


**Abbildung 3.17: IGF1 im Serum der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch.**

Bestimmung des IGF1-Spiegels im Serum ovx SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von sojafreiem Futter (L-ovx-0), E2 (L-ovx-E2) sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (L-ovx-1, L-ovx-2, L-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Die in Abbildung 3.17 dargestellte IGF 1-Serumkonzentration der ovx Ratten unterschied sich nach dreimonatiger oraler Substanzapplikation in keiner der Versuchsgruppen von der Kontrollgruppe. Die Gruppen L-ovx-1 und L-ovx-3 zeigten mit durchschnittlich 116 ng/ml Serum-IGF 1 der Kontrollgruppe ähnelnde Durchschnittswerte, während L-ovx-E2 und L-ovx-2 tendenziell höhere IGF 1-Serumspiegel aufwiesen. L-ovx-E2 zeigte hier 1300 ng/ml, L-ovx-2 1260 ng/ml Serum IGF 1.

### 3.4.2.2 Intakte Ratten



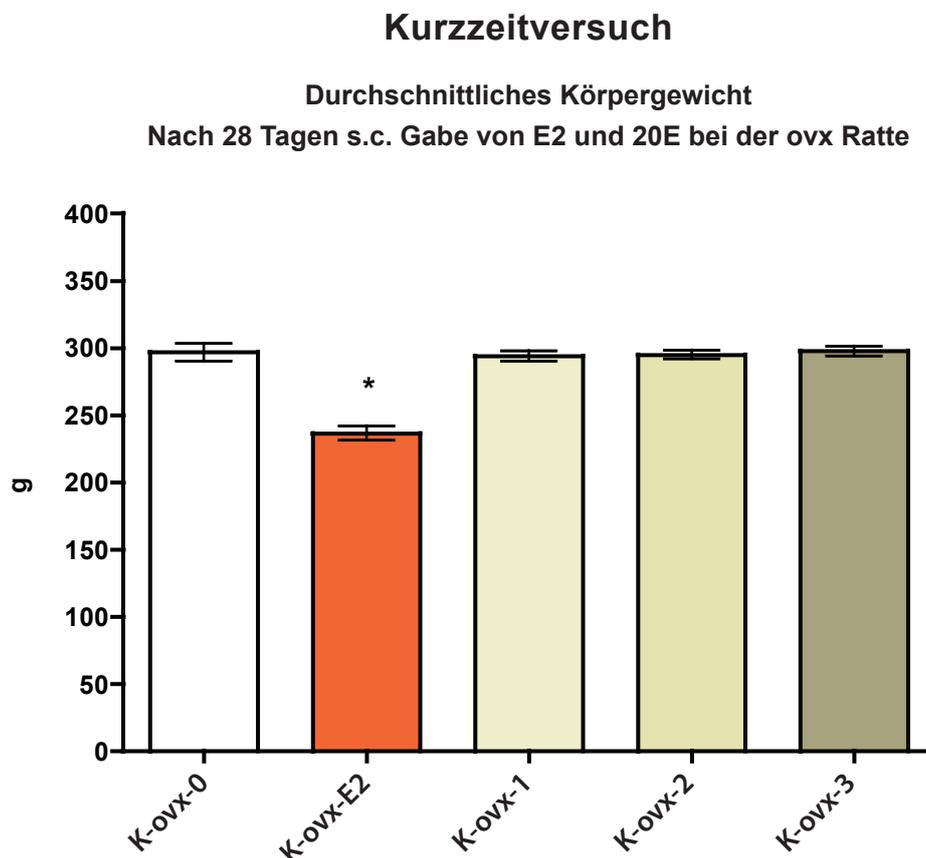
**Abbildung 3.18: IGF1 im Serum der intakten SD-Ratten im Langzeitversuch.**

Serum-IGF 1 intakter SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von 20E (L-int-1) und sojafreiem Futter als Kontrolle (L-int-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus intakte Kontrollgruppe).

Verglichen mit der Kontrollgruppe war unter 20E-Exposition bei den Versuchstieren der Gruppe L-int-1 kein signifikanter Unterschied bezüglich des IGF 1-Spiegels im Serum zu erkennen. Das bei der Kontrollgruppe L-int-0 gemessene IGF 1 lag bei durchschnittlich 1020 ng/ml, das der Gruppe L-int-1 bei 1080 ng/ml.

## 3.5 Kurzzeitversuch: 28 Tage s.c. Exposition der ovx Ratte mit E2 und 20E

### 3.5.1 Gewicht



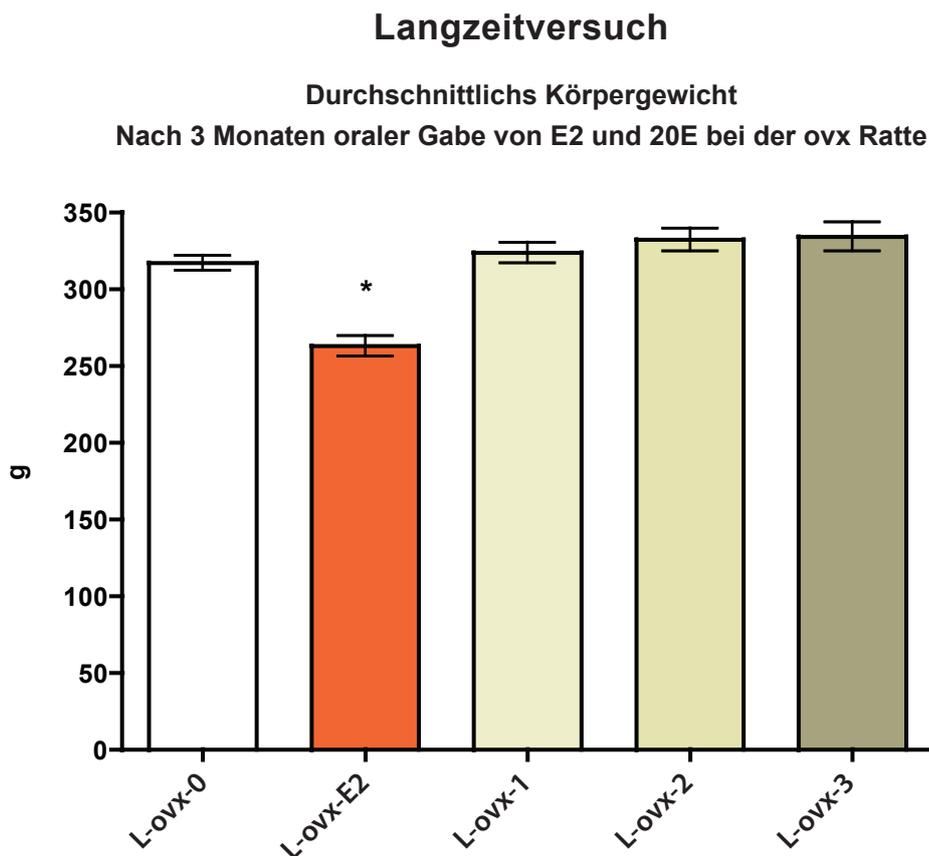
**Abbildung 3.19: Durchschnittliches Körpergewicht der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch.** Durchschnittliches Körpergewicht in Gramm ovx SD-Ratten nach 28-tägiger s.c. Gabe von Kontrollsubstanzen (K-ovx-0), E2 (K-ovx-E2) und 20E in aufsteigenden Substanzmengen (K-ovx-1, K-ovx-2, K-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Gegenüber der Kontrollgruppe K-ovx-0 zeigte 20E in keiner der Versuchsgruppen nach 28-tägiger Gabe einen signifikanten Effekt auf das Körpergewicht der Versuchstiere. Das durchschnittliche Gewicht lag in diesen Gruppen sowie bei K-ovx-0 bei 297 g. Mit 236 g wog die Estradiol-exponierte Versuchsgruppe K-ovx-E2 durchschnittlich 61 g weniger als die Kontrollgruppe, was einem mit  $p < 0.01$  signifikant niedrigerem Körpergewicht entsprach.

## 3.6 Gewicht und Futteraufnahme im Langzeitversuch: 3 Monate orale Exposition mit E2 und 20E

### 3.6.1 Gewicht

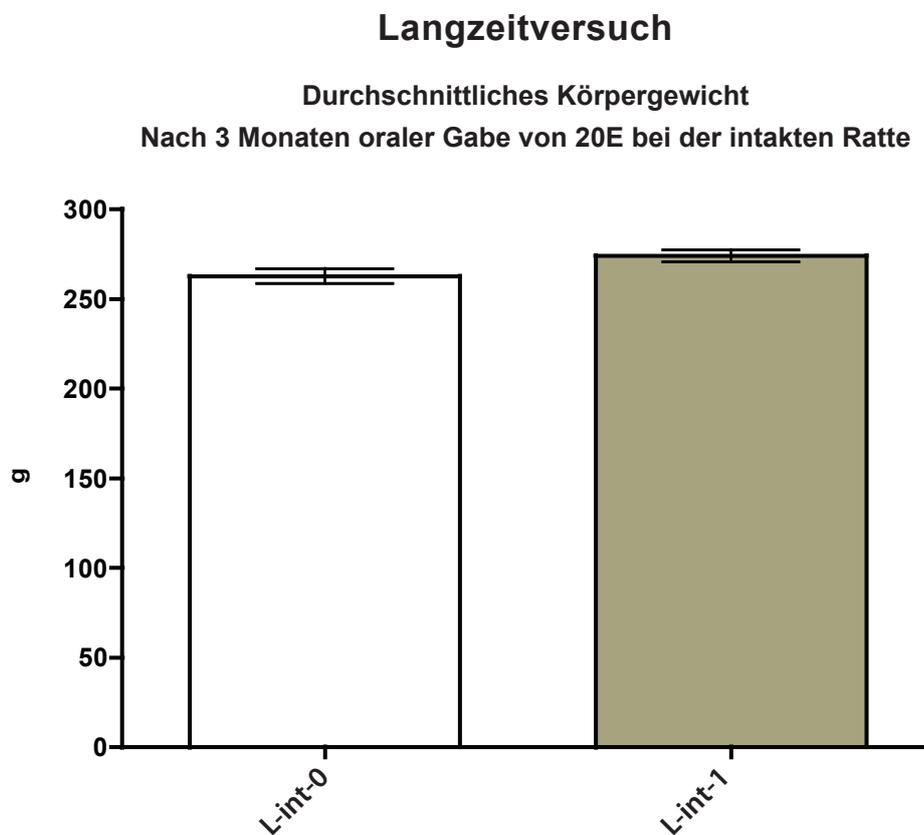
#### 3.6.1.1 Ovariectomierte Ratten



**Abbildung 3.20: Durchschnittliches Körpergewicht der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch.** Durchschnittliches Körpergewicht in Gramm ovx SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von sojafreiem Futter (L-ovx-0), E2 (L-ovx-E2), sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (L-ovx-1, L-ovx-2, L-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Unter 20E war mit steigender Substanzkonzentration eine nicht signifikante Zunahme des Körpergewichtes festzustellen. Für die Versuchsgruppe L-ovx-1 entsprach dies einem durchschnittlichen Gewicht von 324 g, für L-ovx-2 333 g und für L-ovx-3 334 g gegenüber der Kontrollgruppe L-ovx-0 mit 317 g. Mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 263 g wiesen die Versuchstiere der Gruppe L-ovx-E2 ein mit  $p < 0.01$  signifikant niedrigeres Gewicht auf als die Kontrollgruppe.

### 3.6.1.2 Intakte Ratten



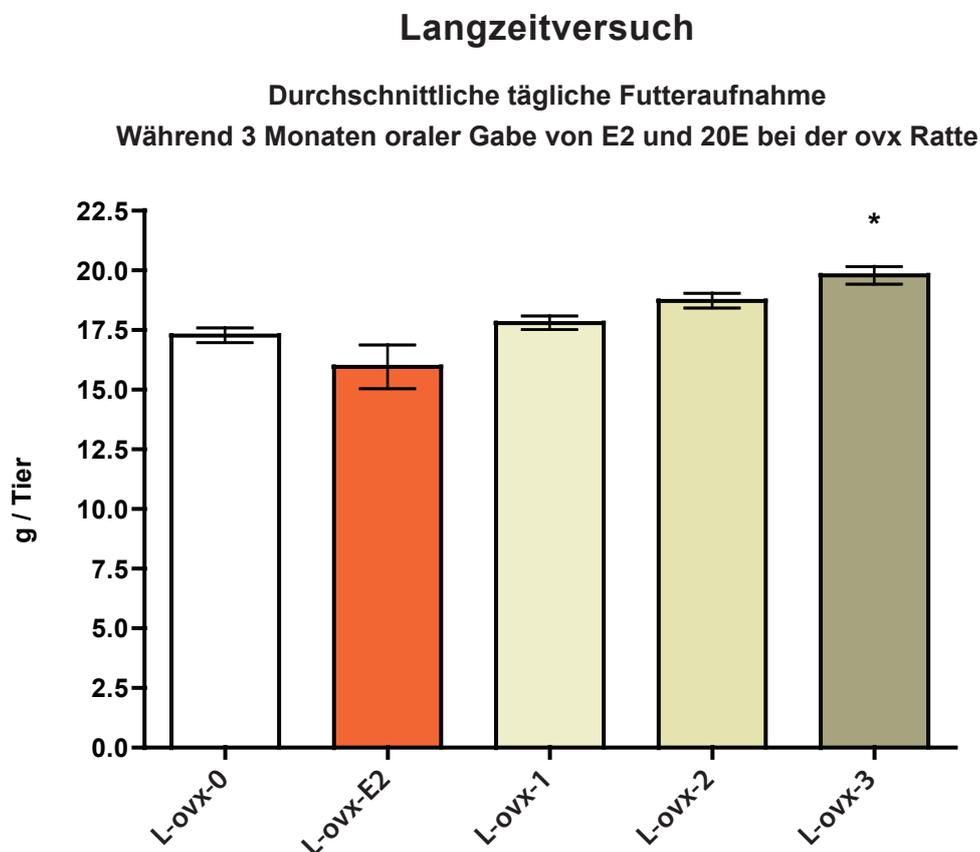
**Abbildung 3.21: Durchschnittliches Körpergewicht der intakten SD-Ratten im Langzeitversuch.**

Durchschnittliches Körpergewicht intakter SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von 20E (L-int-1) und sojafreiem Futter als Kontrolle (L-int-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus intakte Kontrollgruppe).

Das durchschnittliche Körpergewicht der 20E-exponierten Versuchsgruppe L-int-1 unterschied sich nicht signifikant von dem der Kontrollgruppe L-int-0. Während die Versuchstiere der Kontrollgruppe 263 g Körpergewicht aufwiesen, lag das durchschnittliche Körpergewicht der Versuchsgruppe L-int-1 bei 274 g.

## 3.6.2 Futteraufnahme

### 3.6.2.1 Ovariectomierte Ratten

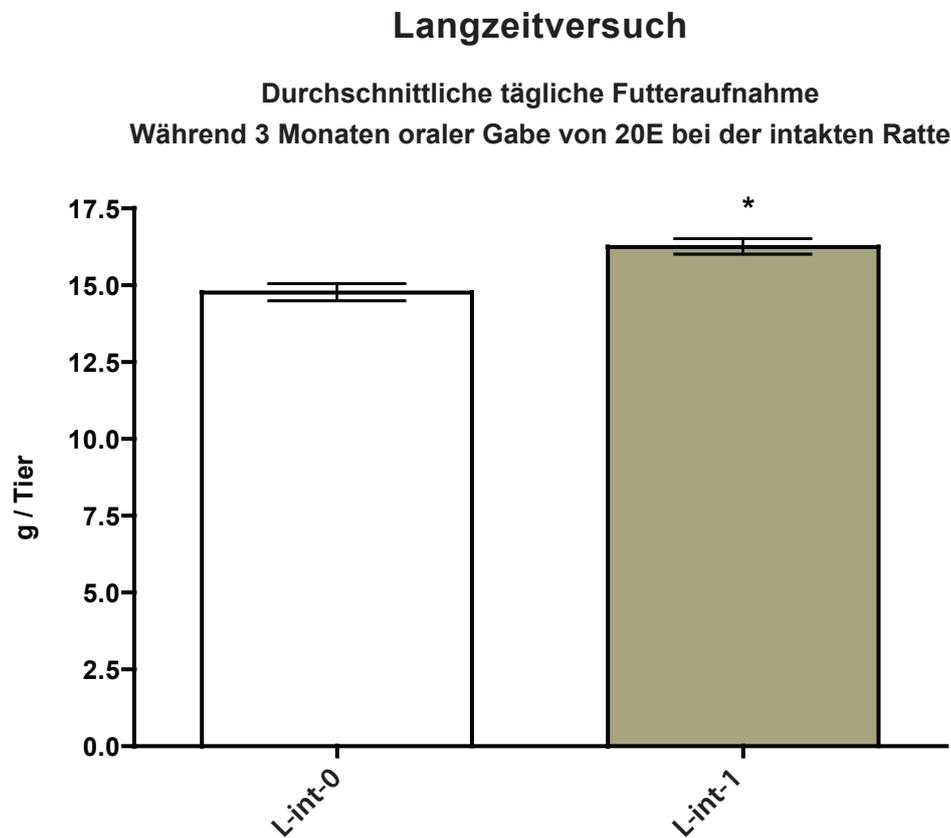


**Abbildung 3.22: Durchschnittliche Futteraufnahme der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch.** Durchschnittliche Futteraufnahme ovx SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von sojafreiem Futter (L-ovx-0), E2 (L-ovx-E2) sowie 20E in aufsteigenden Substanzmengen (L-ovx-1, L-ovx-2, L-ovx-3). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus ovx Kontrollgruppe).

Die in der Graphik dargestellten Durchschnittswerte errechnen sich aus der Summe der täglich pro Tier aufgenommenen Futtermenge in Gramm, die wöchentlich bestimmt wurde. Unter 20E-Exposition war mit steigender Substanzkonzentration eine zunehmende Futteraufnahme zu verzeichnen, die sich bei L-ovx-3 unter der höchsten 20E-Konzentration mit einem p-Wert von  $p < 0.01$  signifikant gegenüber der ovx Kontrollgruppe (L-ovx-0) darstellte. Das einzelne Tier der Kontrollgruppe nahm durchschnittlich 17.27 g Futter/Tag auf. Unter 20E lag die durchschnittliche Futteraufnahme für L-ovx-1 bei 17.80 g/Tag, für L-ovx-2 bei 18.73 g/Tag und für L-ovx-3 bei 19.79 g/Tag. Die Versuchstiere der Gruppe L-ovx-E2 fraßen mit durchschnittlich 15.95 g/Tag weniger als die Kontroll-

gruppe, was keine Signifikanz erreichte.

### 3.6.2.2 Intakte Ratten



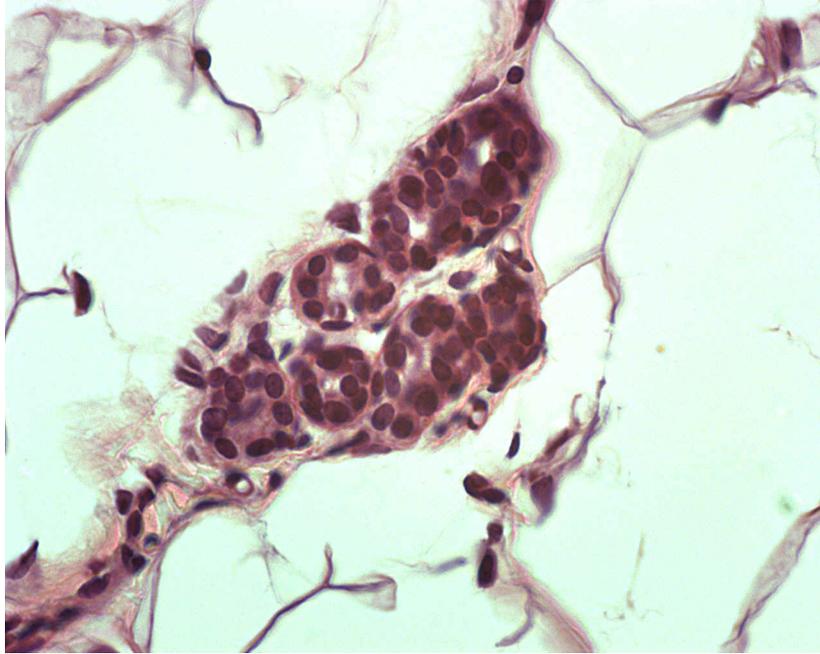
**Abbildung 3.23: Durchschnittliche Futtermittelaufnahme der intakten SD-Ratten im Langzeitversuch.**

Durchschnittliche Futtermittelaufnahme intakter SD-Ratten nach dreimonatiger oraler Gabe von 20E (L-int-1) und sojafreiem Futter als Kontrolle (L-int-0). Aufgetragen sind die Mittelwerte sowie die Standardfehler (\*  $p < 0.05$  versus intakte Kontrollgruppe).

Während pro Tier in der intakten Kontrollgruppe täglich durchschnittlich 14.7 g Futter aufgenommen wurde, fraß ein Tier der 20E-exponierten Versuchsgruppe L-ovx-1 täglich 17.2 g. Dies entsprach einer signifikant höheren Futtermittelaufnahme.

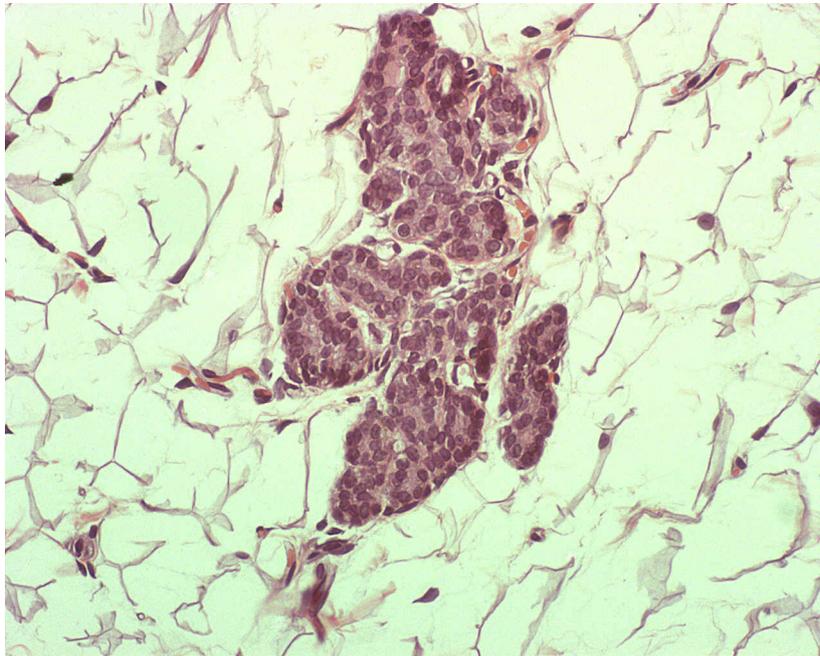
## 3.7 Histologische Abbildungen

### 3.7.1 Lobulus I

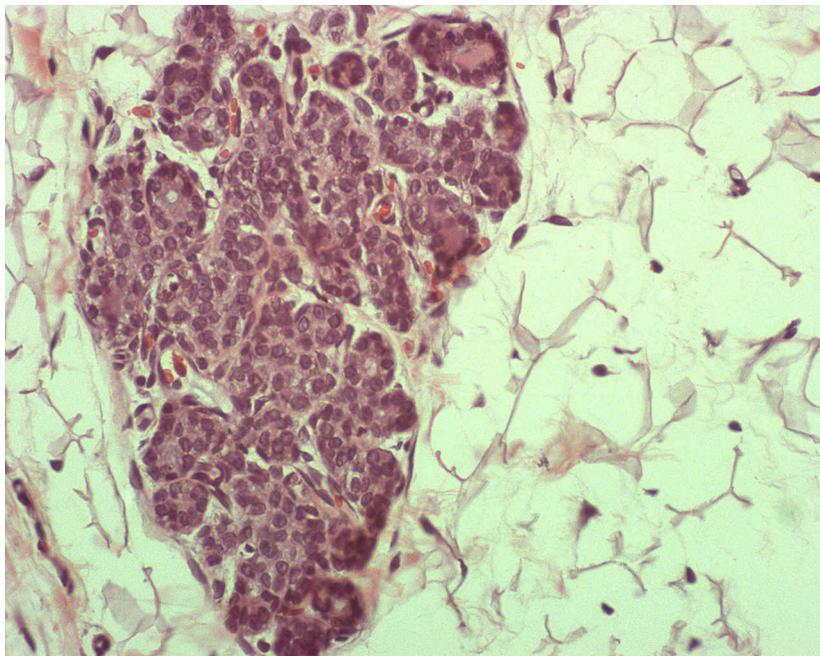


**Abbildung 3.24: Lobulus I**  
Beispielhafte Darstellung eines Lobulus I

### 3.7.2 Lobulus II

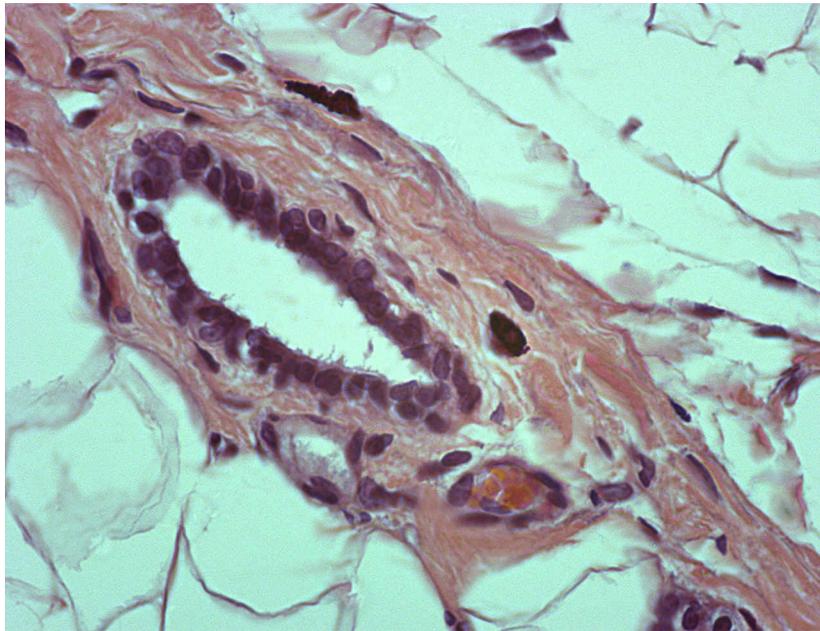


**Abbildung 3.25: Lobulus II**  
Beispielhafte Darstellung eines Lobulus II



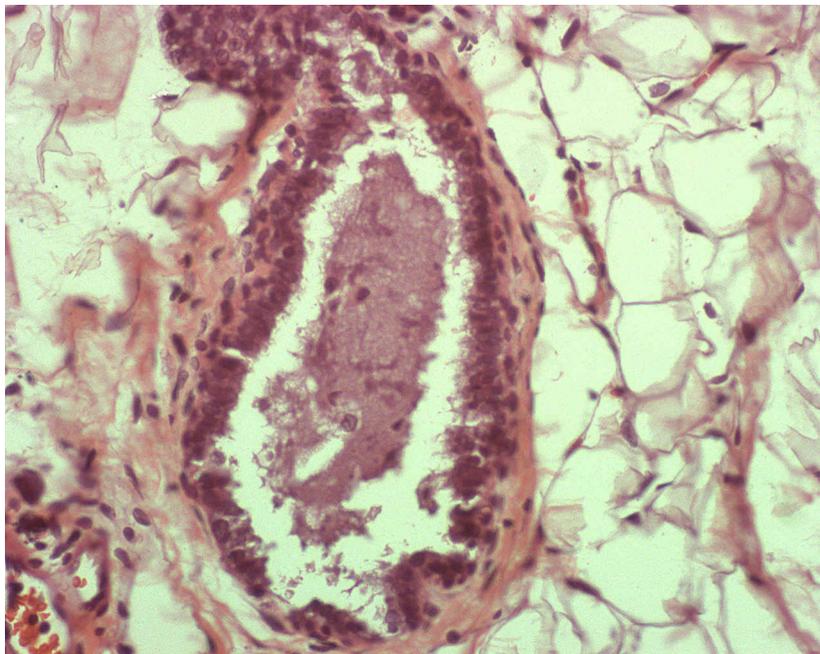
**Abbildung 3.26: Lobulus II**  
Beispielhafte Darstellung eines Lobulus II

### 3.7.3 Duktus



**Abbildung 3.27: Duktus**  
Beispielhafte Darstellung eines Duktus

### 3.7.4 Sekretgefüllter Duktus



**Abbildung 3.28: Sekretgefüllter Duktus**  
Beispielhafte Darstellung eines sekretgefüllten Duktus

## 4 Diskussion

### 4.1 Glanduläre epitheliale Strukturen unter 20E bei der ovariectomierten Ratte

Aufgrund der hohen Vergleichbarkeit der morphologischen Strukturen und ihrer Entwicklung gilt die Mamma der SD-Ratte als gutes Modell für die Brust der Frau. Es ist bewährt und geeignet, den Effekt von Substanzen und externen Einflüssen auf das Gewebe zu untersuchen (Gallo et al. 2006, Cardy 1991, Rimoldi et al. 2007). In der vorliegenden Studie diente die ovx Ratte als Modell für die postmenopausale Frau. Erstmals wurde hier die Wirkung von 20-Hydroxyecdysol auf die Morphologie der Brustdrüse der ovx Ratte sowohl unter Kurzzeit- als auch unter Langzeitapplikation untersucht. Zudem konnte die Langzeitwirkung von 20E auf die intakte Ratte untersucht werden.

Sowohl im Kurzzeit- wie im Langzeitversuch war die quantitativ dominierende Struktur bei allen ovx Versuchstieren der Duktus. Zudem ließen sich bei allen Versuchstieren in beiden Versuchsteilen weniger Lobulus II als Lobulus I nachweisen. Die in dieser Studie gegenüber den lobulären Strukturen beobachtete duktale Dominanz ist für ausgewachsene weibliche jungfräuliche Ratten in der Literatur beschrieben worden (Lucas et al. 2007, Cardy 1991).

#### 4.1.1 Lobulus I im Kurzzeit- und Langzeitversuch

Der Lobulus I zeigte sich im Kurzzeitversuch bei zwei der Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant stimuliert. Sowohl die E2-exponierte Versuchsgruppe K-ovx-E2 als auch die mit der höchsten Menge von 20E behandelte Versuchsgruppe K-ovx-3 wiesen signifikant mehr Lobuli I als die Kontrollgruppe auf.

Unter den niedriger applizierten 20E-Konzentrationen zeigte sich kein signifikanter Effekt auf den Lobulus I. Quantitativ ergaben sich die in Graphik 3.1 abgebildeten Resultate.

In der Literatur ist eine signifikant höhere Strukturquantität des Lobulus I nach E2-Exposition ein häufig beschriebener Effekt (Rimoldi et al. 2007, Menche 2008, Wuttke et al. 2006b).

Neben den Estradiol-exponierten Versuchstieren der Gruppe K-ovx-E2 wies auch die Gruppe K-ovx-3 mit durchschnittlich 1.3 Strukturen pro  $mm^2$  2.6 mal mehr Lobuli I auf als die Kontrollgruppe. Humane (Russo J et al. 2005) wie tierexperimentelle Studien mit Mäusen (Daniel et al. 1987) und Ratten (Russo IH und Russo J 1996) zeigen, dass in der Postmenopause ein Mengenverlust der lobuloalveolären Strukturen einsetzt, der sich in tierexperimentellen Studien mit Mäusen bereits zwei Wochen nach einer Ovx signifikant darstellt (Daniel et al. 1987). Ergebnissen umfangreicher Studien und Reviews folgend, beschränkt sich der differenzierungsfördernde Effekt von Estradiol allein auf die duktales epitheliale Strukturen, während es auf die pubertäre und postpubertäre lobuloalveoläre Entwicklung keinen derartigen Einfluss ausübt, für dessen Differenzierung Progesteron und Prolaktin von zentraler Bedeutung sind (Sternlicht et al. 2006, Russo IH und Russo J 1996, Atwood et al. 2000, Mustafa und Bland 1998, Silberstein 2001, Daniel et al. 1987). Die höhere Anzahl an Lobuli I unter E2 ist in der Konsequenz Ausdruck einer Proliferation der vorhandenen Strukturen im Sinne einer Involutionshemmung oder -verlangsamung und nicht auf eine Differenzierung neuer Lobuli zurückzuführen.

Eine signifikant höhere Quantität von Lobuli I zeigte sich ferner unter der höchsten verabreichten Menge von  $9.7\mu g/g$  KG 20-Hydroxyecdysone bei der Versuchsgruppe K-ovx-3, die ebenfalls eine strukturerhaltende Potenz aufwies. Verglichen mit den Estradiol-exponierten Tieren der Gruppe K-ovx-E2 war dieser Effekt mit einer um 35 % niedrigeren Anzahl an Lobuli I geringer ausgeprägt.

Durch Ligandenbindungsassays konnte eine Bindung für Beta-Ecdysone sowohl an den ER  $\alpha$  als auch an den ER  $\beta$  ausgeschlossen werden (Kapur et al. 2010), so dass andere Wirkmechanismen erwogen werden müssen. Verschiedene Thesen sind in diesem Zusammenhang diskutiert worden. Anderen Steroidhormonen vergleichbar werden neben direkt rezeptor- und transkriptionsvermittelten Mechanismen auch bei 20E nicht transkriptionsvermittelte Effekte vermutet (Schlattner et al. 2006). Oehme et al. (Oehme et al. 2006) erkannte 2006 die apoptosehemmende Wirkung der Ecdysterone Muristerone A und Ponasterone A. Der über den Fas Liganden- und TRAIL-induzierte Zelltod wurde dosisabhängig durch Muristerone A und Ponasterone A bei humanen Kolonkarzinomzellen gehemmt. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Constantino et al. 2001 (Constantino et al. 2001) bei anderen Zelltypen.

Der genaue Involutionmechanismus der lobuloalveolären Strukturen nach Ovx ist nicht bekannt. Dass Fas Liganden- und TRAIL-induzierte Apoptosemechanismen für die Involution der glandulären Strukturen grundsätzlich eine entscheidende Rolle spielen, zeigte Sohn et al. 2001 bei Mäusen (Sohn et al. 2001).

Neben apoptosehemmenden Wirkmechanismen wurden in der Literatur proliferationsfördernde Effekte der Ecdysteroide beschrieben, wobei die Studienlage diesbezüglich widersprüchlich ist (siehe hierzu das umfangreiche Review (Lafont und Dinan 2003)).

Unter Langzeitexposition zeigte 20E keine stimulierende Potenz. Die unter Kurzzeitapplikation erhöhte Strukturquantität des Lobulus I war nach dreimonatiger Applikationsdauer von 20E unter keiner der verabreichten Konzentrationen nachweisbar (Siehe Abbildung 3.5). Mit 0.2 Strukturen pro  $mm^2$  gleich die durchschnittliche Anzahl der Lobuli I denen der Kontrollgruppe. Wie unter Kurzzeitexposition zeigte sich mit durchschnittlich einer Struktur pro  $mm^2$  auch unter Langzeitexposition ein signifikant höheres Strukturvorkommen unter E2. Unter Berücksichtigung der eingeschränkten Vergleichbarkeit bedeutet dies unter Langzeitexposition für die E2-exponierte Versuchsgruppe einen Substanzverlust von 50 %, was mit der postulierten These eines atrophieverlangsamenden, nicht entwicklungsfördernden Effektes des Estradiols konform geht (siehe Abbildung 3.5). Mit progredientem zeitlichen Abstand zur Ovx gewinnt dieser an Deutlichkeit.

#### **4.1.2 Lobulus II im Kurzzeit- und Langzeitversuch**

Nach 28-tägiger s.c. Substanzapplikation war eine signifikant höhere Anzahl an Lobuli II nur unter E2-Exposition zu beobachten, während unter keiner der 20E-Konzentrationen eine größere Strukturquantität verglichen mit der ovx Kontrollgruppe zu verzeichnen war (siehe Abbildung 3.2). Die bei K-ovx-3 unter  $9.7 \mu\text{g/g}$  KG beobachtete signifikant höhere Anzahl des Lobulus I zeigte sich bezüglich der höher differenzierten Struktur des Lobulus II nicht.

Da wie dargelegt in der hier vorgelegten Untersuchung der stimulierende Effekt von 20E als Involutionsverlangsamung verstanden wird, kann hier die niedrigere Anzahl der Lobuli II als Ausdruck einer, der Kontrollgruppe analog verlaufenden Atrophie dieser Struktur interpretiert werden. Dass sich ein solcher Effekt 28 Tage nach Ovx bei der geringer differenzierten Struktur des Lobulus I manifestiert, spiegelt Resultate tierexperimenteller (Russo IH und Russo J 1996) und humaner Studien um Russo et al. (Russo J et al. 2005, 2001) wider. Hier wurde beschrieben, dass es im Vergleich zu jungen jungfräulichen Ratten bei älteren jungfräulichen Ratten zu einem Rückgang der lobulären Strukturen kommt (Russo IH und Russo J 1996). Auch in humanen Studien zeigte sich, dass der in der Postmenopause einsetzende lobuloalveoläre Mengenverlust zunächst bei den höher differenzierten Strukturen der Lobuli II und III einsetzt, was mit zeitlicher Progredienz zu einer letztendlichen Dominanz des Lobulus I führt.

In der vorliegenden Studie ist dies sowohl für die 20E-exponierten Gruppen als auch für K-ovx-0 und K-ovx-E2 zu verzeichnen (siehe Abbildung 3.1 und 3.2). Da die histomorphologische Einteilung der Lobuliklassen nach der Anzahl der Alveoli quantitativer Natur ist, kann die im Kurzzeitversuch bei K-ovx-3 detektierte höhere Strukturquantität des Lobulus I - den Resultaten um Russo et al. Rechnung tragend - hypothetisch als Folge bereits involvierter Lobuli II interpretiert werden. Wichtige Voraussetzung der angestellten Interpretation stellt die Existenz von Lobuli II zum Zeitpunkt der Ovulation dar. Hier sei erinnert, dass sich unter dem im Alter von 30-40 Tagen einsetzenden Estrus der Ratte mit jedem durchlaufenen Zyklus eine Differenzierung von Lobuli I zu Lobuli II vollzieht (Russo IH und Russo J 1996). Bei einer angenommenen Estruslänge von 4-5 Tagen (Butcher et al. 1974) und einem Alter von 3 Monaten bei Ovulation kann somit davon ausgegangen werden, dass zum Zeitpunkt der Ovulation alle Versuchstiere 10-15 Zyklen durchlebt hatten und eine ausreichende Differenzierung von Lobuli I zu Lobuli II stattgefunden hatte.

Die bereits unter Kurzzeitexposition gezählte kleinere Strukturquantität des Lobulus II gegenüber dem Lobulus I bestätigte sich auch unter Langzeitapplikation bei allen Versuchsgruppen deutlich. Während nach 28-tägiger s.c. Substanzexposition Lobuli II noch in allen Versuchsgruppen nachweisbar waren, hatte unter Langzeitapplikation bezüglich dieser Struktur bei der Kontrollgruppe sowie unter allen 20E-exponierten Versuchsgruppen eine vollständige Involution stattgefunden (siehe Abbildung 3.7). 20E wies unter Langzeitexposition in keiner der verabreichten Konzentrationen eine stimulierende Potenz auf die Struktur des Lobulus II auf. Der in der Postmenopause natürlich einsetzende Involutionvorgang, vollzog sich unter 20E der Kontrollgruppe vergleichbar. Die hier unter E2 gegenüber der Kontrollgruppe ermittelte höhere Strukturquantität lag mit durchschnittlich 0.23 Strukturen pro  $mm^2$  über denen der Kontrollgruppe, wick statistisch aber nicht signifikant von dieser ab. Dies lässt sich in einem vollständigen Strukturrückgang begründen, der auch unter E2 bei über der Hälfte der Versuchstiere beobachtet werden konnte. Im Vergleich der E2-exponierten Versuchsgruppen K-ovx-E2 versus L-ovx-E2 bedeutete dies, mit Berücksichtigung einer eingeschränkten Vergleichbarkeit bei unterschiedlichen Applikationswegen, für E2 einen signifikanten Strukturverlust des Lobulus II im Langzeitversuch. Diese Resultate stützen die formulierte Ausgangshypothese, dass eine Estradiol-Exposition in der postmenopausalen Hormonsituation lediglich die Atrophie zu verlangsamen vermag, nicht aber zu einem Strukturzuwachs führt.

### 4.1.3 Duktus im Kurzzeit- und Langzeitversuch

Nach 28-tägiger Applikationsdauer war eine höhere Anzahl der Duktus gegenüber der ovx Kontrollgruppe K-ovx-0 nur unter E2-Exposition signifikant nachweisbar. Bei den 20E-exponierten Versuchstieren zeigte sich mit zunehmender Substanzkonzentration eine geringe Zunahme der Duktusanzahl, die aber in keiner dieser Gruppen signifikant über der der Kontrollgruppe lag.

Die Struktur des Duktus stellt einen guten Parameter für die Östrogenizität einer Substanz dar, da sie direkt durch Östrogene stimuliert wird (Russo IH und Russo J 1996, Daniel et al. 1987, Atwood et al. 2000). Auch nach Ovx kommt es unter Estradiol-Applikation zu einem erneuten Wachstum der duktaalen Strukturen. Studien mit Mäusen, denen nach Ovx Estradiol lokal in die Mamma appliziert wurde, zeigten gegenüber der ovx Kontrollgruppe eine deutliche Proliferation und Zunahme der Duktusanzahl, sowie der TEBs (Daniel et al. 1987). Anders als bei den lobulären Strukturen nimmt die Anzahl der Duktus nach Ovx nicht ab. Daniel et al. (Daniel et al. 1987) wiesen nach, dass es nach einer Ovx zu einer Regression nur eines Teiles der duktaalen Strukturen kam. In der zitierten Studie zeigte sich unter Abwesenheit von Estradiol ein Rückgang der Anzahl sowie des Durchmessers der TEBs als teilungsaktivste Struktur, während sich die Duktus nur in ihrem Kaliber, nicht aber in ihrer Anzahl reduzierten. Zu vergleichbaren Resultaten kamen Russo et al. (Russo IH und Russo J 1996).

Damit stellt eine gegenüber der Kontrollgruppe höhere Anzahl an Duktus eine direkte Proliferation dieser Struktur dar. 20E zeigte gegenüber der Kontrollgruppe unter keiner der applizierten Konzentrationen im Kurzzeitversuch eine signifikante Zunahme und damit Proliferation der Duktus. Aufgrund der skizzierten Zusammenhänge lässt sich damit für 20E eine signifikante Östrogenizität ausschließen.

Dies spiegelt sich in Resultaten wider, die unter 20E keinen Effekt auf die Vagina und das Endometrium als östrogenrezeptive Organe zeigten (unveröffentlichte Resultate Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Wuttke).

Die im Kurzzeitversuch beobachteten Resultate bestätigten sich auch im Langzeitversuch. Hier zeigte sich, dem Kurzzeitversuch vergleichbar, eine signifikante Stimulation und Proliferation der Duktus nur unter E2, während es unter 20E in allen untersuchten Konzentrationen zu der Kontrollgruppe vergleichbaren Quantitäten kam. Dass die Struktur des Duktus besonders sensitiv auf eine Östrogenizität in Form einer Proliferation reagiert und damit einen sehr guten Parameter diesbezüglich darstellt, ist im Vergleich der E2-behandelten Versuchsgruppe zu den intakten Versuchsgruppen erkennbar

(siehe Abbildung 3.9 und 3.10). Die E2-exponierten Tiere wiesen eine deutlich höhere Duktusanzahl als beide intakte Versuchsgruppen auf. Spekulativ bleibt, inwiefern eine mögliche Ursache in einer fehlenden Differenzierung der TEBs zu Alveoli und Lobuli und in einem, dem starken Stimulus des E2 folgenden Wachstum der Duktus liegt.

Neben Östrogenen stellt IGF 1 einen Stimulus für das duktales Wachstum dar. Im Abschnitt 4.5.1 werde ich auf dessen Bedeutung genauer eingehen.

## 4.2 Glanduläre epitheliale Strukturen unter 20E bei der intakten Ratte

Bei den glandulären Strukturen der intakten Versuchstiere ergaben sich überraschende Resultate. Während 20E bei den ovx Versuchstieren einen strukturerhaltenden Effekt ausübte, zeigten sich lobuläre wie duktales Strukturen bei den intakten 20E-exponierten Tieren zum Teil signifikant vermindert. Bei den intakten Kontrolltieren (L-int-0) waren durchschnittlich 1.3 Lobuli I vorhanden. Dies entsprach einer 1.4 fach höheren Strukturichte als dies bei den intakten 20E-exponierten Versuchstieren (L-int-1) zu beobachten war. In dieser Versuchsgruppe waren durchschnittlich nur 0.9 Strukturen zu verzeichnen. Ebenfalls zu beobachten war diese Tendenz bei der höher differenzierten Struktur des Lobulus II. Während L-int-1 0.4 Lobuli II pro  $mm^2$  aufwies, zeigte die Kontrollgruppe L-int-0 mit durchschnittlich 0.7 dieser Strukturen eine um 43 % höhere Lobulianzahl. Dies erreichte allerdings keine Signifikanz. Während die geringere Anzahl der lobulären Strukturen in der Tendenz erkennbar war, wurde ein signifikanter Unterschied bezüglich des Duktus deutlich. Gegenüber L-int-1 waren bei L-int-0 signifikant mehr Duktus nachweisbar. Die erhobenen Daten könnten daraufhin deuten, dass 20E bei Präsenz ovarieller Hormone eine antagonisierende Wirkung auszuüben vermag. Die Beobachtung, dass es unter bestimmten Phytosubstanzen in östrogenarmer Umgebung wie in der Postmenopause oder nach Ovx zu einem östrogensynergistischen Effekt kommt, während bei gleichzeitiger Präsenz von Östrogenen bzw. ovariellen Steroiden ein antagonisierender Effekt der Phytosubstanzen zum Tragen kommt, wird unterschiedlich erklärt. Neben der These einer kompetitiven Hemmung an Östrogenrezeptoren durch Phytosubstanzen (Anderson et al. 1999, Oseni et al. 2008, Wuttke et al. 2002), die hier aufgrund der fehlenden Bindung an den ER ausgeschlossen werden kann, gilt eine Hochregulierung des Sexualhormon bindenden Globulins (SHBG) durch einige Phytosubstanzen als wahrscheinlich (Cos et al. 2003). Dies führt in der Folge zu einem effektiv erniedrigten Östrogenspiegel (Oseni et al. 2008) was einen Erklärungsansatz für die in dieser Arbeit bei den intakten Versuchstieren unter 20E beobachtete signifikant niedrigere Duktusanzahl darstellen könnte.

Bei der Interpretation der Daten ist zu berücksichtigen, dass die Phase des Estrus einen Einfluss auf die Morphologie der Mamma der Ratte ausübt (Schedin et al. 2000). In der hier vorliegenden Arbeit lag zum Zeitpunkt der Gewebegewinnung eventuell keine Estrussynchronität der intakten Versuchstiere vor, da die Estrusphase der einzelnen Tiere zum Todeszeitpunkt nicht untersucht wurde.

### **4.3 Überlegungen zu rezeptorvermittelten Wirkmechanismen von 20E**

Durch die unterschiedliche molekulare Struktur der Phytoecdysteroide und des Estradiols galt eine Bindung der Ecdysteroide an die ER der Vertebraten als unwahrscheinlich (Dinan und Lafont 2006) und wurde für 20-Hydroxyecdysone nun widerlegt (Kapur et al. 2010). Neben beobachteten, möglicherweise durch zytosolische Mechanismen vermittelte Wirkungen der Ecdysteroide sind in einigen Studien zudem transkriptionsvermittelte Effekte bei Vertebraten beschrieben worden. So wurde eine mögliche Bindung der Ecdysteroide an den zellulären Pregnane-X-Rezeptor (PXR), den konstitutiven Androgen-Rezeptor (CAR), wie an den Leber-X-Rezeptor (LXR) diskutiert (Dinan und Lafont 2006, Lafont und Dinan 2003). Xie et al. (Xie et al. 2003) zeigten 2003, dass es unter der Bindung von Metaboliten an den CAR und den PXR verstärkt zur Transkription des UGT1A, einem Phase II-UDP-glucuronosyltransferase-1A-Gens, kam. Die Hochregulierung von UGT1A führt, vermittelt durch dessen Proteinprodukte, zu einer schnelleren Metabolisierung körpereigener Hormone wie Östrogenen. Dies bewirkt, dass sich der Spiegel dieser Hormone reduziert.

Dieser Mechanismus wäre als denkbarer Erklärungsansatz für die signifikant niedrigere Strukturquantität der Duktus der 20E-exponierten intakten Versuchsgruppe L-int-1 denkbar. Insbesondere da die Struktur des Duktus im Vergleich zu den anderen epithelialen Strukturen der Mamma der sensitivste Parameter für eine Östrogenpräsenz ist. Bei den ovx Tieren des Kurzzeit- wie Langzeitversuchs kommt dieser Effekt nicht zum Tragen, da eine ovarielle Hormonproduktion durch die Ovx unterbunden wurde.

Des Weiteren gilt der RxR als Homolog zum USP, dem heterodimeren Partner des EcR. Der RxR ist partiell ebenfalls in der Lage die Funktion des USP zu übernehmen (Azoitei und Spindler-Barth 2009). Als heterodimerer Partner des RxR sind z.B. der Retinoid acid receptor (RAR), der Thyroid hormone receptor (TR) und der VDR bekannt. Inwiefern es über die Aktivierung dieser Rezeptorkomplexe zu einer Wirkung bei Vertebraten kommt ist bis heute noch unklar.

Neben Interaktionen mit den genannten Rezeptoren ist ein Vitamin D-agonistischer Effekt des 20E beschrieben worden (Lafont und Dinan 2003, Brandt 2003, Sláma und Lafont 1995). Studien zeig-

ten eine große strukturelle Ähnlichkeit des VDRs und des EcRs (Bertrand et al. 2004) sowie ihrer dreidimensionalen Liganden-bindenden-Domänen (Billas et al. 2003). Der VDR gehört zu der Steroid-Thyroid-Retinoid-Rezeptor-Superfamilie. Die antiproliferative Wirkung des Vitamin-D-Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und weiteren Analoga auf drei bekannte Brustkrebszelllinien konnte 1996 gezeigt werden (Love-Schimenti und Bikle 1996). Swami et al. (Swami et al. 2000) kamen in ihrer Studie mit MCF-7 Mammakarzinomzellen ebenfalls zu dem Ergebnis, dass die Vitamin D-Metaboliten 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> und dessen Analoge einen antiproliferativen Effekt ausüben. Nach Bindung der Vitamin D-Analoga kam es hier zudem zu einer signifikant niedrigeren ER-Gen-Transkription. Als Folge ließ sich eine supprimierte ER-Konzentration nachweisen, welche zu einer geringeren Proliferation der Zellen nach Östrogengabe führte (Swami et al. 2000).

Eine Bindung von 20E an den VDR würde mit den signifikant geringer stimulierten duktalem Strukturen der intakten Ratten der Gruppe L-int-1 konform gehen und eine geringere Östrogenwirkung unter 20E im östrogenreichen Milieu der intakten Ratte erklären. Inwiefern dieser Mechanismus hier zum Tragen kommt, bleibt jedoch unklar und durch weitere Studien zu klären. Bei den ovx Versuchstieren beider Versuchsteile wäre bedingt durch ihre OvX diesbezüglich kein Effekt zu erwarten.

#### **4.4 20E und LH**

Während 20E nach 28-tägiger s.c. Gabe in keiner der untersuchten Substanzmengen einen Effekt auf die LH-Serumspiegel ausübte, kam es nach dreimonatiger oraler 20E-Aufnahme bei der Versuchsgruppe L-ovx-2 zu einer signifikanten Suppression des LH-Serumspiegels (Siehe Abbildung 3.13 und 3.15). L-ovx-1 und L-ovx-3 unterschieden sich diesbezüglich nicht von der ovx Kontrollgruppe. 1979 wiesen Casper et al. (Casper et al. 1979) zum ersten Mal den Zusammenhang zwischen menopausal auftretenden LH-Peaks durch dessen pulsatile hypophysäre Ausschüttung und dem Auftreten von Hitzewallungen nach. Der Suppression des LH-Serumspiegels als Parameter für die Gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-Aktivität wird eine positive Wirkung auf das Auftreten von Hitzewallungen zugesprochen (Wuttke et al. 2007). Vermutet wird, dass es durch den sich in der Postmenopause einstellenden niedrigeren Östrogenspiegel zu einer fehlenden negativen Rückkopplung auf die pulsatile hypothalamische GnRH-Ausschüttung und damit zu einer gesteigerten hypophysären LH-Sekretion kommt (Seidlova-Wuttke et al. 2004, Wuttke et al. 2007). Resultat ist ein vermehrtes Auftreten von Hitzewallungen. Bei der Versuchsgruppe L-ovx-2 mit der durchschnittlichen Aufnahme von 19.5 µg/g KG 20E scheidet eine durch Östrogene bedingte LH-Suppression aus, da eine Bindung von Ecdys-

teroiden an den ER ausgeschlossen werden konnte (Kapur et al. 2010). Des Weiteren zeigten sich weder auf die glandulären Strukturen der Mamma (siehe Abbildung 3.5, 3.7, 3.9) noch auf den Uterus als östrogensensitive Organe (unveröffentlichte Resultate Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Wuttke) dem Östrogen analoge Effekte. Andere die LH-Sekretion beeinflussende Faktoren scheinen hier ursächlich. Die Aktivität des GnRH-Pulsgenerators wird durch Neurotransmitter wie GABA, Serotonin und Dopamin beeinflusst (Wuttke et al. 2007). Für 20E zeigen Studien, dass es im Rattengehirn die GABA-Synthese über die Induktion des Enzyms Glutamyl Decarboxylase beeinflusst (Chaudhary et al. 1969, Lafont und Dinan 2003). Dass 20E in einer Konzentration von 19.5  $\mu\text{g/g}$  Körpergewicht über diesen Mechanismus zu einer signifikanten LH-Suppression führen, und damit einen positiven Effekt auf das Auftreten von Hitzewallungen ausüben könnte, ist denkbar, bleibt aber spekulativ. In der Literatur finden sich ähnliche Ergebnisse für andere Phytosubstanzen. In einer 2006 publizierten Studie (Wuttke et al. 2006b) zeigte sich für das Extrakt der Traubensilberkerzen (CR) ein nur die LH-Sekretion supprimierender Effekt, während CR weder auf die glandulären Strukturen der Mamma noch auf den Uterus einen Einfluss ausübte. Hier wurden ebenfalls durch Neurotransmitter vermittelte Effekte vermutet. Zu vergleichbaren Resultaten kamen auch Rachon et al. (Rachon et al. 2008). Dass sich eine LH-supprimierende Wirkung nur in der mittleren Substanzkonzentration findet, könnte auf eine, für Ecdysterioide bereits in anderen Studien beobachtete, nicht lineare Dosis-Wirkungsbeziehung zurückzuführen sein (so zitiert in (Dinan und Lafont 2006)). Neben den Versuchstieren der Gruppe L-ovx-2 war, den Erkenntnissen und diesbezüglichen Studien entsprechend (Goldzieher et al. 1975, Yen et al. 1975, Seidlova-Wuttke et al. 2004, Rachon et al. 2008, Rimoldi et al. 2007), ferner sowohl unter Kurzzeit- wie unter Langzeitapplikation eine signifikante LH-Suppression bei allen E2-exponierten Versuchsgruppen (K-ovx-E2 und L-ovx-E2) zu beobachten. Die intakten Versuchsgruppen L-int-0 und L-int-1 zeigten ebenfalls einander vergleichbar suppressierte LH-Serumspiegel.

## 4.5 20E und Mammakarzinomrisiko

Neben Veränderungen der Histomorphologie werden als Hinweis auf die stimulierende und mitogene Potenz einer Substanz auf das Mammagewebe in der Literatur weitere Parameter beschrieben. In der vorliegenden Arbeit sind deshalb zudem die sekretorische Aktivität der Duktus, die Futteraufnahme, sowie der laborchemische Parameter IGF1 untersucht worden.

### 4.5.1 IGF 1

Der Wachstumsfaktor IGF 1 hat diverse Effekte. Neben Estradiol stellt IGF 1 einen wichtigen Stimulus für das duktales Wachstum der Mamma dar (Sternlicht et al. 2006, Silberstein 2001, Russo IH und Russo J 1996). Tierexperimentelle Studien zeigen, dass dessen Synthese wahrscheinlich durch E2 stimuliert wird, weshalb es in vielen Studien als Parameter für die Östrogenizität einer Substanz Verwendung findet (Wuttke et al. 2006b). Des Weiteren gilt es als Mitogen der Brust (Marshman und Streuli 2002) und hohe Serumspiegel stehen im Verdacht, das Brustkrebsrisiko zu erhöhen bzw. Marker eines erhöhten Risikos zu sein (Conner et al. 2003, Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group et al. 2010). Unter Kurzzeit-, wie unter Langzeitapplikation zeigte 20E bei den ovx Versuchstieren in keiner der getesteten Substanzmengen einen signifikant stimulierenden Effekt auf die IGF 1-Serumkonzentration (siehe Abbildung 3.14 und 3.17). Bei den intakten Versuchsgruppen bestätigte sich diese Beobachtung (siehe Abbildung 3.18). Bezüglich des Serum-IGF 1 findet sich kein Anhalt, dass eine 20E-Exposition das Mammakarzinomrisiko erhöht. Dies gilt sowohl für die reproduktive Phase (intakt), als auch für die Postmenopause (ovx). Anders als in anderen Studien beschrieben (Wuttke et al. 2006b), fand sich in dieser Studie unter E2 keine Erhöhung des Serum-IGF 1.

Festzuhalten ist ferner, dass die im Rahmen dieser Arbeit bestimmte IGF 1-Serumkonzentration keinen Rückschluss auf die lokal in der Mamma synthetisierte IGF 1-Konzentration zulässt, die für die epithelialen Strukturen der Brust von großer Bedeutung ist (Kleinberg et al. 2000). Diese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt.

### 4.5.2 Sekretproduktion der Duktus

Unter Kurzzeitapplikation zeigten sich gegenüber der ovx Kontrollgruppe (K-ovx-0), signifikant mehr sekretproduzierende Duktus bei den E2-behandelten Versuchstieren der Gruppe K-ovx-E2. Im Vergleich zur Kontrollgruppe mit durchschnittlich 17% sekretproduzierenden Duktus, wiesen die Versuchstiere der Gruppe K-ovx-E2 eine dreimal höhere Sekretbildung auf. Bei ihnen lag der Durchschnitt diesbezüglich bei 50%. Dies findet sich auch in publizierten Resultaten anderer Studien wieder, die unter E2-Exposition ebenfalls eine signifikant gesteigerte Sekretbildung nachwiesen (Wuttke et al. 2006b). In einer weiteren Studie konnte unter anderem ein vermindertes Vorkommen von sekretproduzierenden Epithelzellen bei ER  $\beta$ -Knock out Mäusen gezeigt werden (Förster et al. 2002), was eine Beteiligung von Östrogenen bei der Sekretbildung nahe legt. Dass die sekretorische Potenz

einer Testsubstanz einen sensitiven Parameter für dessen Östrogenizität darstellt, ist allerdings zweifelhaft, da in anderen Studien unter niedrigen Östrogengaben keine Sekretproduktion auftrat. Dies war auch bei hohen wie niedrigen Dosen von Genistein zu beobachten, welche in der selben Studie einen proliferativen Effekt auf die Mamma ausübten (Rimoldi et al. 2007).

Eine gesteigerte Sekretproduktion korreliert zudem mit einem erhöhten Mammakarzinomrisiko und stellt damit einen Parameter für die Entstehung maligner Entartung der Brustdrüse dar. Dies zeigte unter anderem eine prospektive Studie mit 2701 kaukasischen Frauen. Die Versuchsgruppe mit Sekretproduktion der Mamma wies gegenüber der Vergleichsgruppe ohne Sekretion eine höhere Brustkrebsinzidenz auf (Wrensch et al. 1992).

In der Konsequenz der zitierten Literatur ist die in der hier vorgelegten Studie gemessene niedrige Sekretion unter allen untersuchten 20E-Gaben ein Hinweis auf ein diesbezüglich nicht gesteigertes Mammakarzinomrisiko unter 20E.

Im Langzeitversuch bestätigte sich dies. Keine der ovx Versuchsgruppen zeigte eine signifikant gesteigerte Sekretion verglichen mit der Kontrollgruppe. Die bei K-ovx-E2 unter Kurzzeitapplikation signifikant stärkere Sekretproduktion war unter Langzeitapplikation nicht mehr signifikant nachweisbar, was die niedrige Sensitivität der Sekretproduktion für eine Östrogenpräsenz unterstreicht (siehe Abbildung 3.4 und 3.11). Auch bei den intakten Versuchstieren zeigte sich kein Unterschied zwischen der Kontroll- und der 20E-exponierten Gruppe (siehe Abbildung 3.12), so dass auch für die reproduktive Phase bezüglich dieses Parameters kein Hinweis auf ein gesteigertes Mammakarzinomrisiko besteht.

#### **4.5.3 Futteraufnahme unter 20E**

Die Kalorienaufnahme der 20E-exponierten ovx Versuchstiere lag bei Langzeitapplikation unter Aufnahme der höchsten Substanzmenge von 39  $\mu\text{g/g}$  KG signifikant über der der Kontrollgruppe (Abbildung 3.22). Diese Beobachtung bestätigte sich auch für die intakte 20E-exponierte Versuchsgruppe L-int-1, die ebenfalls eine signifikant höhere Futteraufnahme als ihre Kontrollgruppe zeigte (siehe Abbildung 3.23). In Studien ist nachgewiesen worden, dass es unter Ecdysteroiden zu einer Zunahme des Körpergewichtes (Syrov und Kurmukov 1976) kommt. Über die Kalorien- b.z.w. Futteraufnahme dieser Versuchstiere findet sich keine explizite Aussage. Es ist allerdings anzunehmen, dass eine Zunahme des Körpergewichtes in der zitierten Literatur mit einer gesteigerten Kalorienzufuhr einhergeht.

Eine erhöhte Kalorienaufnahme ist in der Literatur als Risikofaktor für die Entstehung eines Mamm-

akarzinoms beschrieben worden (Russo IH und Russo J 1996, Klurfeld et al. 1987). In Versuchen mit Ratten zeigte sich dieser Effekt unabhängig von der Nahrungszusammensetzung sowie dem Fettgehalt und unabhängig davon, ob Normalgewicht oder Übergewicht bestand. Auch epidemiologische Untersuchungen legen einen Zusammenhang zwischen einer erhöhten Nahrungszufuhr bzw. erhöhtem Körpergewicht und einem gesteigerten Karzinomrisiko bei der Frau nahe (Messina und Wood 2008). Dass sich ein erhöhtes Risiko, ein Malignom zu entwickeln, auch für nicht direkt östrogenregulierte Organe zeigte, macht die These einer alleinigen Erhöhung des Östrogens als Ursache wenig plausibel. Die hier beobachtete signifikant gesteigerte Futterraufnahme unter 20E muss als potentiell adverser Effekt auf das Brustkrebsrisiko gewertet werden. Anders als zu erwarten, spiegelt sich die gesteigerte Kalorienzufuhr in der hier vorgelegten Studie nicht in einem gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höheren Körpergewicht wider (Abbildung 3.19, 3.20, 3.21). Neben diesen Ergebnissen wurde in einer Studie der Arbeitsgruppe (unveröffentlichte Resultate Universität Göttingen, Arbeitsgruppe Wuttke) unter 20E eine signifikante Zunahme der Muskulatur beobachtet, was Ergebnisse anderer Studien bestätigt (Toth et al. 2008). Dies legt die Vermutung nahe, die höhere Kalorienaufnahme auf einen erhöhten Grundumsatz durch Bewegung und Muskelaufbau zugunsten des Fettgewebes zurückzuführen. Studien zeigen eine Risikosenkung des Mammakarzinoms durch körperliche Aktivität (Angeles-Llerenas et al. 2010, Gao et al. 2009, Lahmann et al. 2007). Dies stellt in diesem Zusammenhang eine wichtige Einflussgröße bezüglich der Risikobewertung von 20E dar.

## 4.6 Fazit

Als Fazit der diskutierten Ergebnisse sei auf die formulierten Fragestellungen der hier vorgelegten Arbeit eingegangen:

1) Zeigt 20E einen Effekt auf die Brustdrüse?

20E hat einen Effekt auf die Brustdrüse, der sich unter Kurzzeitexposition in der Postmenopause signifikant bei den lobulären und in der reproduktiven Phase bei den duktaalen Strukturen darstellte.

2) Gibt es einen Unterschied zwischen einer Kurzzeit- und einer Langzeitapplikation von 20E während der Postmenopause?

Während sich unter Kurzzeitexposition eine signifikant höhere Anzahl der Lobuli I nachweisen ließ, zeigte sich nach dreimonatiger Langzeitexposition ein derartiger Effekt für keine der untersuchten

Strukturen.

3) Wirkt 20E in der reproduktiven Phase anders als in der Postmenopause?

Eine wichtige Erkenntnis dieser Arbeit ist es, dass das hormonelle Milieu für den Effekt von 20E von entscheidender Bedeutung zu sein scheint. Anders als der beobachtete zunächst strukturerhaltende Effekt in der Postmenopause zeigt sich in der reproduktiven Phase in einem östrogen- und progesteronreichen Milieu ein die Entwicklung der glandulären Strukturen der Mamma verlangsamer Effekt.

4) Gibt es Hinweise auf ein erhöhtes Mammakarzinomrisiko oder einen schützenden Effekt von 20E?

Diesbezüglich zeigen sich Unterschiede zwischen der Postmenopause und der reproduktiven Phase. Unter Kurzzeitapplikation war bei der ovx Ratte eine größere Quantität des Lobulus I zu verzeichnen. Bei der Frau gilt diese Struktur aufgrund ihrer starken Teilungsaktivität als Ausgang des häufigsten Mammakarzinomtypes, des duktales Karzinoms. Bei der Ratte sind die TEBs die teilungsaktivsten Strukturen. Inwiefern die in dieser Studie gemessene signifikant höhere Anzahl an Lobuli I im Kurzzeitversuch eine Risikosteigerung des Mammakarzinoms reflektiert, bleibt unklar und spekulativ. Unter Langzeitapplikation bestätigte sich ein stimulativer Effekt auf diese Struktur nicht, was ein Hinweis auf eine transiente, zeitlich limitierte Risikosteigerung der 20E-Exposition in der Postmenopause sein könnte. Der struktursupprimierende Effekt in der reproduktiven Phase wurde in der vorliegenden Arbeit im Sinne einer herabgesetzten hormonellen Stimulation interpretiert, was bezüglich des Mammakarzinomrisikos für einen potentiell protektiven Effekt von 20E spricht. Da bis jetzt der Wirkmechanismus von 20E weder für die Postmenopause noch für die reproduktive Phase bekannt ist, haben diese Einschätzungen nur hypothetischen Charakter. Neben den dargestellten histomorphologischen Hinweisen zeigten die untersuchten brustkrebsassoziierten Faktoren keinen eindeutigen Hinweis auf ein erhöhtes Brustkrebsrisiko. Sowohl das Serum-IGF 1, als auch die Sekretproduktion glichen unter 20E denen der Kontrollgruppe. Inwiefern die unter 20E signifikant höhere Kalorienzufuhr in der Postmenopause wie in der reproduktiven Phase als Risikofaktor zu werten ist, bleibt gegenüber der erhöhten Muskelmasse und dem nicht gesteigerten Körpergewicht abzuwägen.

## 4.7 Ausblick

Die dargestellten Ergebnisse zeigen für 20E zum Teil widersprüchliche Resultate. Erstmals konnte in dieser Studie beschrieben werden, dass sich die Wirkung von 20E bezüglich dessen Effektes in der Postmenopause versus reproduktiver Phase unterscheidet. Um dessen Stellenwert in der Therapie bzw. in der Prophylaxe klimakterischer Beschwerden besser einschätzen zu können, wäre die Erforschung der Wirkmechanismen, über welche 20E die in der vorliegenden Studie beobachteten Effekte hervorruft, von zentraler Bedeutung. Einige Fragestellungen wären hier:

- a) Führt 20E in der reproduktiven Phase zu einer Suppression des Serumspiegels von Östrogen und Progesteron?
- b) Ändert sich unter 20E die Quantität der Östrogen- und Progesteron-Rezeptoren in der reproduktiven Phase?
- c) Lässt sich eine reduzierte Proliferation der glandulären epithelialen Strukturen auf zellulärer Ebene in der reproduktiven Phase unter 20E beobachten?
- d) Lässt sich unter postmenopausalen Bedingungen unter einer 20E-Kurzzeitapplikation eine erhöhte Proliferation der glandulären Strukturen, insbesondere des Lobulus I, detektieren?

## 5 Zusammenfassung

Ecdysteroide sind von Arthropoden und Pflanzen synthetisierte Steroidhormone. Sie sind, wie ihr Rezeptor, keine Syntheseprodukte des menschlichen Stoffwechsels. Über die Nahrung können sie in relevanten Konzentrationen von Menschen und anderen Vertebraten aufgenommen werden. Neben zahlreichen anderen in der Literatur beschriebenen Effekten auf Vertebraten deuten neuere Studien auch auf eine osteoprotektive Wirkung der Ecdysteroide hin. In der Postmenopause kommt es, bedingt durch den sinkenden Östrogenspiegel, zu einem Substanzverlust am Knochen. Da eine Anwendung der klassischen HRT mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko verbunden sein kann und keine bedenkenlose Therapieoption darstellt, ist die Suche nach SERMs ohne stimulierende Potenz auf die Mamma von Bedeutung. In diesem skizzierten Zusammenhang stand die vorliegende Arbeit mit der Fragestellung, ob Ecdysteroide einen Effekt auf die Brustdrüse insbesondere in der Postmenopause ausüben. Zur Beurteilung dieser Fragestellung wurde die Histomorphologie der Mamma sowie die brustkrebsassoziierten Faktoren des Serum-IGF 1, der Sekretion und der Kalorienaufnahme unter Kurzzeit- und Langzeitapplikation untersucht. Als Modellorganismus diente die ovx Ratte, sowie im Langzeitversuch zudem eine nicht ovariectomierte intakte Versuchsgruppe. Das bei Arthropoden wie in der Pflanzenwelt am häufigsten auftretende Ecdysteroidderivat 20E fungierte als Testsubstanz. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen erstmals, dass 20E einen signifikanten Effekt auf die Brustdrüse sowohl in der Postmenopause als auch in der reproduktiven Phase eines Säugers auszuüben vermag. In der postmenopausalen Situation der ovx Ratte zeigte sich histomorphologisch unter täglicher 9,7  $\mu\text{g}/\text{g}$  KG 20E-Kurzzeitapplikation eine signifikant höhere Anzahl der Lobuli I, die sich nach dreimonatiger Langzeitexposition in keiner der untersuchten Substanzmengen mehr nachweisen ließ. Auf die anderen epithelialen Strukturen der Brustdrüse war weder unter Kurzzeit- noch unter Langzeitexposition ein signifikant stimulierender oder supprimierender Effekt durch 20E nachweisbar. Die sich unter Kurzzeitexposition darstellende höhere Anzahl der Lobuli I wurde in der vorliegenden Studie als Effekt einer verzögerten Involution dieser Strukturen interpretiert. Als Ausgangsstruktur des duktales Karzinoms geht eine größere Quantität des Lobulus I potentiell mit einem gesteigerten Entartungs-

risiko einher. Da der zugrunde liegende Mechanismus, über den 20E zu einer Involutionsverzögerung führt, bis jetzt nicht beschrieben ist, lässt sich über die Bedeutung für das Mammakarzinomrisiko nur eine eingeschränkt Aussage treffen. Hier sind weitere Studien von Nöten. Da nach Langzeitapplikation in der postmenopausalen Situation kein Hinweis auf eine stimulierende Potenz von 20E und damit kein Hinweis auf ein erhöhtes Risiko einer malignen Entartung der Brustdrüse bestand, ist die unter Kurzzeitexposition detektierte höhere Strukturquantität des Lobulus I hier wahrscheinlich als transienter Effekt auch bezüglich einer potentiellen Risikoerhöhung zu werten.

Divergent zu der detektierten höheren Strukturquantität der ovx Tiere verhielten sich die untersuchten Strukturen der intakten Versuchstiere. Diese ließen nach 20E eine geringere Strukturquantität beobachten. Die lobulären Strukturen waren tendenziell, die duktaalen Strukturen in signifikant niedriger Anzahl nachweisbar, was mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Suppression der Entwicklung dieser Strukturen reflektiert. Dies kann als Ausdruck einer reduzierten hormonellen Stimulation und damit einer reduzierten Proliferation interpretiert werden. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bis jetzt unbekannt, weshalb sich Interpretationsansätze auf einer hypothetischen Ebene bewegen und nach weiteren Studien verlangen.

Bezüglich der untersuchten brustkrebsassoziierten Faktoren Serum-IGF 1 und Sekretproduktion zeigte 20E weder unter Kurzzeit- noch unter Langzeitexposition in keiner der getesteten Substanzmengen eine risikosteigernde Potenz. Inwiefern die signifikant höhere Nahrungsaufnahme unter 20E, die in der postmenopausalen wie in der reproduktiven Situation zu beobachten war, einem gesteigerten Mammakarzinomrisiko entspricht, erfordert weitere Untersuchungen, da eine Abwägung gegenüber dem potentiellen Schutzfaktor einer gesteigerten körperlichen Aktivität unter 20E anzustellen ist.

Abschließend lässt sich festhalten, dass für die Bewertung des Nutzens einer Substanz als SERM neben der zentralen Bedingung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit die durch diese Substanz hervorgerufenen favorisierten Effekte von Bedeutung sind. Im Fall der klimakterischen Veränderungen ist hier z.B. neben dem knochenprotektiven Effekt eine Reduktion des Auftretens von Hitzewellen zu nennen. Eine mögliche Suppression des Serum-LH-Spiegels gilt als Parameter eines solchen Effektes. Unter der Dosis von täglich 19.5  $\mu\text{g/g}$  KG kam es bei ovx Ratten im Langzeitversuch zu einer signifikanten Suppression des Serum-LHs, weshalb ein potenzieller Stellenwert von 20E in der Hitzewellenprophylaxe bzw.-reduktion denkbar erscheint.



## 6 Anhang

### 6.1 Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1. Xylene	10 min
2. Xylene	10 min
3. Xylene	10 min
4. 100% EtOH	2 min
5. 100% EtOH	2 min
6. 100% EtOH	2 min
7. 96% EtOH	2 min
8. 96% EtOH	2 min
9. 75% EtOH	2 min
10. Aqua bidest.	2 min
11. Hämatoxylin	45 sec
12. Wässerung unter fließendem H <sub>2</sub> O	10 min
13. Aqua bidest	2 min
14. Eosin	35 sec
15. Aqua bidest.	15 x eintauchen
16. 75% EtOH	30 sec
17. 96% EtOH	30 sec
18. 96% EtOH	30 sec
19. 100% EtOH	1 min
20. 100% EtOH	1 min
21. 100% EtOH	2 min
22. Xylene	5 min
23. Xylene	5 min
24. Xylene	5 min

## 6.2 Lösungen

Hämatoxylin	Mayers Hämalalaunlösung für die Mikroskopie, Artikel-Nr.: 109249, Merck KGaA. Verdünnung 1:2 mit Aqua bidest.
Eosin	Eosin G, Merck KGaA, Artikel-Nr.: 115935, Herstellung der Stocklösung: 1% Eosin (1g/100ml 80% ETOH): 1g Eosin G, 80ml 96% ETOH, 20ml Aqua bidest. Herstellung der Arbeitslösung: Verdünnung mit Aqua bidest. auf 1:5
Xylol	Jtbaker, Mallinckrodt Baker, Griesheim, Bestell-Nr.: 8118
Alkohole	75%, 96%, 100% ETOH vergällt abgefüllt durch das Universitätsklinikum Göttingen (UKG)
Aqua bidest.	Abgefüllt durch das UKG

## 6.3 Substanzen

Anästhesie	Isofluran: Florene, Abott; Co2-Gemisch aus Xylazin und Ketamin. Xylazin: (Rompun R 2%), Fa. Bayer AG, Leverkusen. Ketamin: (Ketavent R), Fa. Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe
Phytoöstrogenarmes Grundfutter	V 1354-000, Ssniff R-Z, 10mm phytoöstrogenarm, Maus/Ratte, Spezialdiäten GmbH, Soest
20E	Changzhou Dahua Import and Export Group Corp. Ltd. Changzhou, Jiangsu, China, 97.2% purity
Estradiol Futterzusatz	$\beta$ -Estradiol-3-benzoat, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München.

## 6.4 Material

Automatische Gewebeeinfiltration	Leica TP 1020, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Einbettautomat	Leica EG 1140 H, Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Rotationsmikrotom	RM 2135, Fabriknr.: 2794/10.2000, Kat.Nr.:050029802, Fa. Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar
Mikrotomklingen	Mikrotomeinwegklingen FEATHER, Safety Razor Co. Ltd.
Paraffinstreckbad	Paraffinstreckbad 400 Watt, MEDAX GmbH & Co. KG, Rendsburg
Wärmeplatte	HI 1220, Fa. Leica
Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Lichtmikroskop	Zeiss Axiophot R Fotomikroskop, Fa. Zeiss, Carl Zeiss AG, Oberkochen
Kamera	ColorView, Soft Imaging System, Olympus Soft Imaging Solution GmbH, Münster
Transpondersystem	UNO MICRO-ID System, ISO-Transponder (12 mm)
Transponderlesegerät	ISO kompatibler Taschenleser, Gesreader II Ge S008
Waage	Basic lite BL3, Sartorius
Software der digitalen Bildanalyse	analySIS R, Soft Imaging Solution GmbH, Münster
Statistische Software	GraphPad Prism 4R Software, fa. GraphPad Software,inc., San Diego, USA
Objektträger	SuperFrost R Plus 26 x 76 x 1 mm, Fa. Menzel-Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig
Deckgläser	Deckgläser 24 x 40 mm, Fa. Menzel-Gläser GmbH & Co. KG, Braunschweig

## 7 Abkürzungsverzeichnis

20E	20-Hydroxyecdysone
AB	Alveolar Bud
CAR	Konstitutiver Androgen-Rezeptor
CR	Traubensilberkerzen
E2	17 $\beta$ -Estradiol
EcR	Ecdysteroid-Rezeptor
EGF	Epidermal growth factor
EPRT	Östrogen-Progesteron-Kombinationstherapie
ER	Östrogen-Rezeptor
ERT	Östrogen-Ersatztherapie
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
g	Gramm
GH	Growth hormone
GnRH	Gonadotropin-releasing hormone
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRT	Hormonersatztherapie
HWZ	Halbwertszeit
IGF	Insulin-like growth factor
KG	Körpergewicht
Kg	Kilogramm
LH	Luteinisierendes Hormon
LXR	Leber-X-Rezeptor
ovx	ovarektomiert
Ovx	Ovarektomie
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PXR	Pregnane-X-Rezeptor
RAR	Retinoid acid receptor

RXR	Retinoid-X-Rezeptor
s.c.	Subkutan
SD	Sprague Dawley
SERM	Selektiver-Östrogen-Rezeptor-Modulator
SHBG	Sexhormon bindendes Globulin
TD	Terminal Duct
TEBs	Terminale End Buds
TR	Thyroid hormone receptor
UKG	Universitätsklinikum Göttingen
USP	Ultraspiracle Protein
VDR	Vitamin-D-Rezeptor

## 8 Abbildungsverzeichnis

1.1	Schematische Darstellung der Glandula Mammaria. . . . .	11
1.2	Struktur des 20-Hydroxyecdysons . . . . .	17
1.3	Struktur des Estradiols . . . . .	17
3.1	Lobulus I der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch. . . . .	32
3.2	Lobulus II der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch. . . . .	33
3.3	Duktus der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch. . . . .	34
3.4	Sekret/Duktus der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch. . . . .	35
3.5	Lobulus I der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	37
3.6	Lobulus I der intakten SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	38
3.7	Lobulus II der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	39
3.8	Lobulus II der intakten SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	40
3.9	Duktus der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	41
3.10	Duktus der intakten SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	42
3.11	Prozentuale Sekretfüllung der Duktus der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	43
3.12	Prozentuale Sekretfüllung der Duktus der intakten SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	44
3.13	LH im Serum der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch. . . . .	45
3.14	IGF1 im Serum der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch. . . . .	46
3.15	LH im Serum der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	47
3.16	LH im Serum der intakten SD-Ratten im Langzeitversuch. . . . .	48
3.17	IGF1 im Serum der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	49
3.18	IGF1 im Serum der intakten SD-Ratten im Langzeitversuch. . . . .	50
3.19	Durchschnittliches Körpergewicht der ovx SD-Ratte im Kurzzeitversuch. . . . .	51
3.20	Durchschnittliches Körpergewicht der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	52
3.21	Durchschnittliches Körpergewicht der intakten SD-Ratten im Langzeitversuch. . . . .	53

3.22	Durchschnittliche Futteraufnahme der ovx SD-Ratte im Langzeitversuch. . . . .	54
3.23	Durchschnittliche Futteraufnahme der intakten SD-Ratten im Langzeitversuch. . . . .	55
3.24	Lobulus I . . . . .	56
3.25	Lobulus II . . . . .	57
3.26	Lobulus II . . . . .	57
3.27	Duktus . . . . .	58
3.28	Sekret/Duktus . . . . .	58

## 9 Tabellenverzeichnis

1.1	Epitheliale Strukturen des Parenchyms der Glandula Mammaria der Ratte. . . . .	10
1.2	Unterschiede in der Tumorentstehung und dem Tumorwachstum zwischen der Brustdrüse der Frau und der Ratte. Die Pfeilrichtung gibt an, ob ein Faktor das Tumorrisiko steigert oder senkt. . . . .	15
2.1	Gruppeneinteilung und Verabreichungsprotokoll im Kurzzeitversuch . . . . .	26
2.2	Gruppeneinteilung und Verabreichungsprotokoll der ovariectomierten Tiere im Langzeitversuch . . . . .	27
2.3	Gruppeneinteilung und Verabreichungsprotokoll der intakten Tiere im Langzeitversuch	28
2.4	Untersuchte Strukturen der Mamma . . . . .	30
2.5	Vergrößerung bei der mikroskopischen Auswertung . . . . .	30

## 10 Literaturverzeichnis

- Al-Azzawi F, Hamilton A, Pasqualini J, Alt J, Aso T, Bast R, Bevilacqua G, Junkermann H, Radinsky R, Bonanni B (2001): *Hormone replacement therapy and cancer*. *Gynecol Endocrinol* 15, Nr. 6, 453–465
- Albanese C, Reutens AT, Bouzahzah B, Fu M, D’Amico M, Link T, Nicholson R, Depinho RA, Pestell RG (2000): *Sustained mammary gland-directed, ponasterone A-inducible expression in transgenic mice*. *FASEB J* 14, Nr. 7, 877–884
- Anderson GL, Judd HL, Kaunitz AM, Barad DH, Beresford SAA, Pettinger M, Liu J, McNeeley SG, Women’s Health Initiative Investigators (2003): *Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women’s Health Initiative randomized trial*. *JAMA* 290, Nr. 13, 1739–1748
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SAA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan BW (2004): *Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women’s Health Initiative randomized controlled trial*. *JAMA* 291, Nr. 14, 1701–1712
- Anderson JJ, Anthony M, Messina M, Garne SC (1999): *Effects of phyto-oestrogens on tissues*. *Nutr Res Rev* 12, Nr. 1, 75–116
- Anderson SM, Rudolph MC, McManaman JL, Neville MC (2007): *Key stages in mammary gland development. Secretory activation in the mammary gland: it’s not just about milk protein synthesis!* *Breast Cancer Res* 9, Nr. 1, 204–218
- Angeles-Llerenas A, Ortega-Olvera C, Pérez-Rodríguez E, Esparza-Cano JP, Lazcano-Ponce E, Romieu I, Torres-Mejía G (2010): *Moderate physical activity and breast cancer risk: the effect of menopausal status*. *Cancer Causes Control* 21, Nr. 4, 577–586

- Artaza JN, Sirad F, Ferrini MG, Norris KC (2010):** *1,25(OH)(2)vitamin D(3) inhibits cell proliferation by promoting cell cycle arrest without inducing apoptosis and modifies cell morphology of mesenchymal multipotent cells.* J Steroid Biochem Mol Biol 119, 73–83
- Atwood CS, Hovey RC, Glover JP, Chepko G, Ginsburg E, Robison WG, Vonderhaar BK (2000):** *Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice.* J Endocrinol 167, Nr. 1, 39–52
- Avis NE, Brockwell S, Colvin A (2005):** *A universal menopausal syndrome?* Am J Med 118Suppl12B, 37–46
- Azoitei A, Spindler-Barth M (2009):** *DNA affects ligand binding of the ecdysone receptor of Drosophila melanogaster.* Mol Cell Endocrinol 303, Nr. 1-2, 91–99
- Banerjee P, Chatterjee M (2003):** *Antiproliferative role of vitamin D and its analogs—a brief overview.* Mol Cell Biochem 253, Nr. 1-2, 247–254
- Báthori M, Tóth N, Hunyadi A, Márki A, Zádor E (2008):** *Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids—structure and effects on humans.* Curr Med Chem 15, Nr. 1, 75–91
- Beral V (2003):** *Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study.* Lancet 362, Nr. 9382, 419–427
- Bertrand S, Brunet FG, Escriva H, Parmentier G, Laudet V, Robinson-Rechavi M (2004):** *Evolutionary genomics of nuclear receptors: from twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems.* Mol Biol Evol 21, Nr. 10, 1923–1937
- Billas IML, Iwema T, Garnier JM, Mitschler A, Rochel N, Moras D (2003):** *Structural adaptability in the ligand-binding pocket of the ecdysone hormone receptor.* Nature 426, Nr. 6962, 91–96
- Bocchinfuso WP, Korach KS (1997):** *Mammary gland development and tumorigenesis in estrogen receptor knockout mice.* J Mammary Gland Biol Neoplasia 2, Nr. 4, 323–334
- Brandt FW** *Pharmakokinetik und Metabolismus des 20-Hydroxyecdysons im Menschen.* Med. Diss. Marburg 2003
- Brown NM, Lamartiniere CA (1995):** *Xenoestrogens alter mammary gland differentiation and cell proliferation in the rat.* Environ Health Perspect 103, Nr. 7-8, 708–713

- Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L (2002):** *Hormonal changes in the menopause transition.* Recent Prog Horm Res 57, 257–275
- Butcher RL, Collins WE, Fugo NW (1974):** *Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat.* Endocrinology 94, Nr. 6, 1704–1708
- Cabello G, Valenzuela M, Vilaxa A, Duran V, Rudolph I, Hrepic N, Calaf G (2001):** *A rat mammary tumor model induced by the organophosphorous pesticides parathion and malathion, possibly through acetylcholinesterase inhibition.* Environ Health Perspect 109, Nr. 5, 471–479
- Cardy RH (1991):** *Sexual dimorphism of the normal rat mammary gland.* Vet Pathol 28, Nr. 2, 139–145
- Casper RF, Yen SS, Wilkes MM (1979):** *Menopausal flushes: a neuroendocrine link with pulsatile luteninizing hormone secretion.* Science 205, Nr. 4408, 823–825
- Chaudhary KD, Lupien PJ, Hinse C (1969):** *Effect of ecdysone on glutamic decarboxylase in rat brain.* Experientia 25, Nr. 3, 250–251
- Cherbas L, Lee K, Cherbas P (1991):** *Identification of ecdysone response elements by analysis of the Drosophila Eip28/29 gene.* Genes Dev 5, Nr. 1, 120–131
- Conner P, Soderqvist G, Skoog L, Graser T, Walter F, Tani E, Carlstrom K, von Schoultz B (2003):** *Breast cell proliferation in postmenopausal women during HRT evaluated through fine needle aspiration cytology.* Breast Cancer Res Treat 78, Nr. 2, 159–165
- Constantino S, Santos R, Gisselbrecht S, Gouilleux F (2001):** *The ecdysone inducible gene expression system: unexpected effects of muristerone A and ponasterone A on cytokine signaling in mammalian cells.* Eur Cytokine Netw 12, Nr. 2, 365–367
- Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ (2003):** *Phytoestrogens: recent developments.* Planta Med 69, Nr. 7, 589–599
- Daniel CW, Silberstein GB, Strickland P (1987):** *Direct action of 17 beta-estradiol on mouse mammary ducts analyzed by sustained release implants and steroid autoradiography.* Cancer Res 47, Nr. 22, 6052–6057

- Dinan L (2001):** *Phytoecdysteroids: biological aspects*. *Phytochemistry* 57, Nr. 3, 325–339
- Dinan L, Lafont R (2006):** *Effects and applications of arthropod steroid hormones (ecdysteroids) in mammals*. *J Endocrinol* 191, Nr. 1, 1–8
- Edlich R, Mason SS, Chase ME, Fisher AL, Gubler K, Long WB, Giesy JD, Foley ML (2009):** *Scientific documentation of the relationship of vitamin D deficiency and the development of cancer*. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 28, Nr. 2, 133–141
- Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group, Key TJ, Appleby PN, Reeves GK, Roddam AW (2010):** *Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies*. *Lancet Oncol* 11, Nr. 6, 530–542
- Förster C, Mäkela S, Wärrri A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JÅ (2002):** *Involvement of estrogen receptor  $\beta$  in terminal differentiation of mammary gland epithelium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, Nr. 24, 15578–15583
- Fujimoto Y, Ohyama K, Nomura K, Hyodo R, Takahashi K, Yamada J, Morisaki M (2000):** *Biosynthesis of sterols and ecdysteroids in Ajuga hairy roots*. *Lipids* 35, Nr. 3, 279–288
- Gadducci A, Biglia N, Sismondi P, Genazzani AR (2005):** *Breast cancer and sex steroids: critical review of epidemiological, experimental and clinical investigations on etiopathogenesis, chemoprevention and endocrine treatment of breast cancer*. *Gynecol Endocrinol* 20, Nr. 6, 343–360
- Gallo D, Zannoni GF, Martinelli E, Ferlini C, Fabrizi M, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Scambia G (2006):** *Estradiol and phytoestrogens differently influence the rodent postmenopausal mammary gland*. *Menopause* 13, Nr. 1, 72–79
- Gao CM, Tajima K, Ding JH, Tang JH, Wu JZ, Li SP, Cao HX, Liu YT, Su P, Qian Y (2009):** *Body size, physical activity and risk of breast cancer - a case control study in Jiangsu Province of China*. *Asian Pac J Cancer Prev* 10, Nr. 5, 877–881
- Goldzieher JW, de la Peña A, Chenault CB, Cervantes A (1975):** *Comparative studies of the ethynyl estrogens used in oral contraceptives. III. Effect on plasma gonadotropins*. *Am J Obstet Gynecol* 122, Nr. 5, 625–636
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER (1999):** *The menopause*. *Lancet* 353, Nr. 9152, 571–580

- Gronemeyer H, Laudet V (1995):** *Transcription factors 3: nuclear receptors*. Protein Profile 2, Nr. 11, 1173–1308
- Hakkak R, Holley AW, Macleod SL, Simpson PM, Fuchs GJ, Jo CH, Kieber-Emmons T, Korourian S (2005):** *Obesity promotes 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumor development in female zucker rats*. Breast Cancer Res 7, Nr. 5, R627–633
- Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC (1990):** *Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21*. Science 250, Nr. 4988, 1684–1689
- 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, Nr. 3, 165–175
- Harvell DM, Strecker TE, Xie B, Buckles LK, Tochacek M, McComb RD, Shull JD (2001):** *Diet-gene interactions in estrogen-induced mammary carcinogenesis in the ACI rat*. J Nutr 131, Nr. 11 Suppl, 3087S–3091S
- Holick MF (2003):** *Vitamin D: A millenium perspective*. J Cell Biochem 88, Nr. 2, 296–307
- Huggins C, Moon RC, Morii S (1962):** *Extinction of experimental mammary cancer. I. Estradiol-17beta and progesterone*. Proc Natl Acad Sci U S A 48, 379–386
- Isaacs JT (1986):** *Genetic control of resistance to chemically induced mammary adenocarcinogenesis in the rat*. Cancer Res 46, Nr. 8, 3958–3963
- Jiang W, Zhu Z, Thompson HJ (2009):** *Effects of physical activity and restricted energy intake on chemically induced mammary carcinogenesis*. Cancer Prev Res Phila 2, Nr. 4, 338–344
- Kapur P, Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D (2010):** *Beneficial effects of beta-Ecdysone on the joint, epiphyseal cartilage tissue and trabecular bone in ovariectomized rats*. Phytomedicine 17, Nr. 5, 350–355
- Karami S, Brennan P, Navratilova M, Mates D, Zaridze D, Janout V, Kollarova H, Bencko V, Matveev V, Szesznia-Dabrowska N (2010):** *Vitamin d pathway genes, diet, and risk of renal cell carcinoma*. Int J Endocrinol 2010, 1–11

- Kleinberg DL, Feldman M, Ruan W (2000):** *IGF-I: an essential factor in terminal end bud formation and ductal morphogenesis.* J Mammary Gland Biol Neoplasia 5, Nr. 1, 7–17
- Kleinberg DL, Wood TL, Furth PA, Lee AV (2009):** *Growth hormone and insulin-like growth factor-I in the transition from normal mammary development to preneoplastic mammary lesions.* Endocr Rev 30, Nr. 1, 51–74
- Klurfeld DM, Weber MM, Kritchevsky D (1987):** *Inhibition of chemically induced mammary and colon tumor promotion by caloric restriction in rats fed increased dietary fat.* Cancer Res 47, Nr. 11, 2759–2762
- Kotsa K, Yavropoulou MP, Anastasiou O, Yovos JG (2009):** *Role of vitamin D treatment in glucose metabolism in polycystic ovary syndrome.* Fertil Steril 92, Nr. 3, 1053–1058
- Kotsiuruba AB, Tuhanova AV, Bukhanevich OM, Tarakanov SS (1995):** *[Mechanisms of the early effect of biologically active hydroxysterols: calcitriol and ecdysterone. Identification of sphingomyelin as the effector mechanism of the early effect]* Ukr Biokhim Zh 67, Nr. 2, 53–58
- Kulie T, Groff A, Redmer J, Hounshell J, Schragger S (2009):** *Vitamin D: an evidence-based review.* J Am Board Fam Med 22, Nr. 6, 698–706
- Kuzmenko AI, Morozova RP, Nikolenko IA, Korniets GV, YuD K (1997):** *Effects of vitamin D<sub>3</sub> and ecdysterone on free-radical lipid peroxidation.* Biochemistry Mosc 62, Nr. 6, 609–612
- Lafont R (2002):** *Ecdybase, a free ecdysteroid database.* <http://ecdybase.org>
- Lafont R, Dinan L (2003):** *Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update.* J Insect Sci 3, 7
- Lahmann PH, Friedenreich C, Schuit AJ, Salvini S, Allen NE, Key TJ, Khaw KT, Bingham S, Peeters PHM, Monninkhof E (2007):** *Physical activity and breast cancer risk: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16, Nr. 1, 36–42
- Lehmann M, Koolman J (1989):** *Ecdysteroid receptors of the blowfly Calliphora vicina. Characterization of binding to nonspecific DNA.* Eur J Biochem 181, Nr. 3, 577–582
- Love-Schimenti CD, Bikle DD (1996):** *Antiestrogen Potentiation of Antiproliferative Effects of Vitamin D<sub>3</sub> Analogues in Breast Cancer Cells.* Cancer Res 65, 2789–2794.

- Lucas JN, Rudmann DG, Credille KM, Irizarry AR, Peter A, Snyder PW (2007):** *The rat mammary gland: morphologic changes as an indicator of systemic hormonal perturbations induced by xenobiotics.* Toxicol Pathol 35, Nr. 2, 199–207
- Lupien PJ, Hinse C, Chaudhary KD (1969):** *Ecdysone as a hypocholesterolemic agent.* Arch Int Physiol Biochim 77, Nr. 2, 206–212
- Maeda KOS** *Physiology of Reproduction ; in: The Laboratory Rat. Academic Press, 2000, 145-171*
- Marshman E, Streuli CH (2002):** *Insulin-like growth factors and insulin-like growth factor binding proteins in mammary gland function.* Breast Cancer Res 4, Nr. 6, 231–239
- McTiernan A, Irwin M, Vongruenigen V (2010):** *Weight, physical activity, diet, and prognosis in breast and gynecologic cancers.* J Clin Oncol 28, Nr. 26, 4074–4080
- Menche A** *Effekte von Östradiolbenzoat und verschiedenen Phytoöstrogenen auf das Mamma und Uterusgewebe der ovariectomierten Ratte.* Med. Diss. Göttingen 2008
- Messina MJ, Wood CE (2008):** *Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary.* Nutr J 7, 17
- Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, Futreal PA, Harshman K, Tavtigian S, Liu Q, Cochran C, Bennett LM, Ding W (1994):** *A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1.* Science 266, Nr. 5182, 66–71
- Morimoto LM, White E, Chen Z, Chlebowski RT, Hays J, Kuller L, Lopez AM, Manson J, Margolis KL, Muti PC (2002):** *Obesity, body size, and risk of postmenopausal breast cancer: the Women's Health Initiative (United States).* Cancer Causes Control 13, Nr. 8, 741–751
- Mustafa IA, Bland KI (1998):** *Physiologic effects of steroid hormones and postmenopausal hormone replacement on the female breast and breast cancer risk.* Ann Surg 228, Nr. 5, 638–651
- Nagaiah G, Hazard HW, Abraham J (2010):** *Role of obesity and exercise in breast cancer survivors.* Oncology Williston Park 24, Nr. 4, 342–346
- Nandi S (1958):** *Endocrine control of mammarygland development and function in the C3H/ He Crgl mouse.* J Natl Cancer Inst 21, Nr. 6, 1039–1063

- Narvaez CJ, Zinser G, Welsh J (2001):** *Functions of 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3) in mammary gland: from normal development to breast cancer.* Steroids 66, Nr. 3-5, 301–308
- Nedrow A, Miller J, Walker M, Nygren P, Huffman LH, Nelson HD (2006):** *Complementary and alternative therapies for the management of menopause-related symptoms: a systematic evidence review.* Arch Intern Med 166, Nr. 14, 1453–1465
- Oehme I, Bosser S, Zornig 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, Nr. 2, 189–201
- Oseni T, Patel R, Pyle J, Jordan VC (2008):** *Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens.* Planta Med 74, Nr. 13, 1656–1665
- Pike MC, Ross RK (2000):** *Progestins and menopause: epidemiological studies of risks of endometrial and breast cancer.* Steroids 65, Nr. 10-11, 659–664
- Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2008):** *The menopausal transition.* Fertil Steril 90, Nr. 5 Suppl, 61–65
- Rachon D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W (2008):** *Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats.* Maturitas 60, Nr. 3-4, 209–215
- Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W (2007):** *Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina.* Environ Health Perspect 115Suppl1, 62–68
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SAA, Howard BV, Johnson KC (2002):** *Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial.* JAMA 288, Nr. 3, 321–333
- Russo IH, Russo J (1978):** *Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene.* J Natl Cancer Inst 61, Nr. 6, 1439–1449
- Russo IH, Russo J (1996):** *Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies.* Environ Health Perspect 104, Nr. 9, 938–967

- Russo J, Lynch H, Russo IH (2001):** *Mammary gland architecture as a determining factor in the susceptibility of the human breast to cancer.* Breast J 7, Nr. 5, 278–291
- Russo J, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH (2005):** *The protective role of pregnancy in breast cancer.* Breast Cancer Res 7, Nr. 3, 131–142
- Schedin P, Mitrenga T, Kaeck M (2000):** *Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague-Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis.* J Mammary Gland Biol Neoplasia 5, Nr. 2, 211–225
- Schlattner U, Vafopoulou X, Steel CGH, Hormann RE, Lezzi M (2006):** *Non-genomic ecdysone effects and the invertebrate nuclear steroid hormone receptor EcR—new role for an old receptor?* Mol Cell Endocrinol 247, Nr. 1-2, 64–72
- Sehmisch S, Erren M, Kolios L, Tezval M, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Stuermer KM, Stuermer EK (2009a):** *Effects of isoflavones equol and genistein on bone quality in a rat osteopenia model.* Phytother Res 24, 168–174
- Sehmisch S, Uffenorde J, Maehlmeyer S, Tezval M, Jarry H, Stuermer KM, Stuermer EK (2009b):** *Evaluation of bone quality and quantity in osteoporotic mice - The effects of genistein and equol.* Phytomedicine 17, 424–430
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003):** *Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus.* Maturitas 44Suppl1, S39–50
- Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Rimoldi G, Thelen P, Christoffel V, Wuttke W (2004):** *Belamcanda chinensis and the thereof purified tectorigenin have selective estrogen receptor modulator activities.* Phytomedicine 11, Nr. 5, 392–403
- Seidlova-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010a):** *Beta-ecdysone has bone protective but no estrogenic effects in ovariectomized rats.* Phytomedicine 17, Nr. 11, 884–889
- Seidlova-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010b):** *Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats.* J Steroid Biochem Mol Biol 119, Nr. 3-5, 121–126

- Silberstein GB (2001):** *Postnatal mammary gland morphogenesis*. *Microsc Res Tech* 52, Nr. 2, 155–162
- Simon P, Koolman J** *Ecdysteroids in vertebrates : pharmalogical aspects ; in: Ecdysone - from chemistry to mode of action*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1989, 254–259
- Sláma K, Lafont R (1995):** *Insect hormones-ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates*. *Eur J Entomol* 92, 355–377
- Sohn BH, Moon HB, Kim TY, Kang HS, Bae YS, Lee KK, Kim SJ (2001):** *Interleukin-10 up-regulates tumour-necrosis-factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) gene expression in mammary epithelial cells at the involution stage*. *Biochem J* 360, Nr. Pt 1, 31–38
- Spindler KD, Hönl C, Tremmel C, Braun S, Ruff H, Spindler-Barth M (2009):** *Ecdysteroid hormone action*. *Cell Mol Life Sci* 66, Nr. 24, 3837–3850
- Statistisches Bundesamt (2011):** *Lebenserwartung* <http://bit.ly/tKVx5L>
- Stauber S, Weyerstahl T** *Gynäkologie und Geburtshilfe* 2. Auflage Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2005
- Sternlicht MD, Kouros-Mehr H, Lu P, Werb Z (2006):** *Hormonal and local control of mammary branching morphogenesis*. *Differentiation* 74, Nr. 7, 365–381
- Suzuki T, Toi M, Saji S, Horiguchi K, Aruga T, Suzuki E, Horiguchi S, Funata N, Karasawa K, Kamata N (2006):** *Early breast cancer*. *Int J Clin Oncol* 11, Nr. 2, 108–119
- Swami S, Krishnan AV, Feldman D (2000):** *1alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells*. *Clin Cancer Res* 6, Nr. 8, 3371–3379
- Syrov VN, Kurmukov AG (1976):** [*Anabolic activity of phytoecdysone-ecdysterone isolated from Rhaponticum carthamoides (Willd.) Iljin*] *Farmakol Toksikol* 39, Nr. 6, 690–693
- 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, Nr. 5, 40–43

- Tocchini-Valentini G, Rochel N, Wurtz JM, Mitschler A, Moras D (2001):** *Crystal structures of the vitamin D receptor complexed to superagonist 20-epi ligands.* Proc Natl Acad Sci U S A 98, Nr. 10, 5491–5496
- Toth N, Szabo A, Kacsala P, Heger J, Zador E (2008):** *20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat.* Phytomedicine 15, Nr. 9, 691–698
- Tyczynski JE, Bray F, Parkin DM (2002):** *Breast cancer in europe.* International agency for research on cancer 2, 1–4
- Walker RA, Martin CV (2007):** *The aged breast.* J Pathol 211, Nr. 2, 232–240
- Welsch CW (1987):** *Enhancement of mammary tumorigenesis by dietary fat: review of potential mechanisms.* Am J Clin Nutr 45, Nr. 1 Suppl, 192–202
- Wrensch MR, Petrakis NL, King EB, Miike R, Mason L, Chew KL, Lee MM, Ernster VL, Hilton JF, Schweitzer R (1992):** *Breast cancer incidence in women with abnormal cytology in nipple aspirates of breast fluid.* Am J Epidemiol 135, Nr. 2, 130–141
- Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V, Seidlova-Wuttke D (2002):** *Phytoestrogens for hormone replacement therapy?* J Steroid Biochem Mol Biol 83, Nr. 1-5, 133–147
- Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D (2003):** *Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy?* Maturitas 44Suppl1, 9–20
- Wuttke W, Gorkow C, Seidlová-Wuttke D (2006a):** *Effects of black cohosh (Cimicifuga racemosa) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study.* Menopause 13, Nr. 2, 185–196
- Wuttke W, Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D (2006b):** *Plant extracts for the treatment of menopausal women: safe?* Maturitas 55, 92–100
- Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D (2007):** *Isoflavones—safe food additives or dangerous drugs?* Ageing Res Rev 6, Nr. 2, 150–188
- Wysowski DK, Governale LA (2005):** *Use of menopausal hormones in the United States, 1992 through June, 2003.* Pharmacoepidemiol Drug Saf 14, Nr. 3, 171–176

**Xie W, Yeuh MF, Radomska-Pandya A, Saini SPS, Negishi Y, Bottroff BS, Cabrera GY, Tukey RH, Evans RM (2003):** *Control of steroid, heme, and carcinogen metabolism by nuclear pregnane X receptor and constitutive androstane receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A 100, Nr. 7, 4150–4155

**Yao TP, Segraves WA, Oro AE, McKeown M, Evans RM (1992):** *Drosophila ultraspiracle modulates ecdysone receptor function via heterodimer formation.* Cell 71, Nr. 1, 63–72

**Yen SS, Martin PL, Burnier AM, Czekala NM, Greaney Jr MO, Callantine MR (1975):** *Circulating estradiol, estrone and gonadotropin levels following the administration of orally active 17beta-estradiol in postmenopausal women.* J Clin Endocrinol Metab 40, Nr. 3, 518–521

# Danksagung

Sehr herzlich möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich bei der Arbeit zu dieser Dissertation privat und fachlich unterstützten.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. Wuttke für die interessante Aufgabenstellung zu diesem Thema. Mit wichtigen Denkanstößen und fachlichem Rat stand er mir bei der Arbeit wohlwollend und interessiert zur Seite. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.

Des Weiteren möchte ich mich sehr herzlich bei Frau PD Dr. med. Seidlová-Wuttke bedanken, die die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit dankenswerterweise übernahm. Ihr Interesse und Engagement waren eine große Hilfe bei der Einarbeitung in die experimentelle Arbeit sowie bei Fragen jedweder Art. Vielen Dank für Anregungen, Denkanstöße und eine jederzeit offene Tür.

Mein besonderer Dank gilt zudem dem medizinisch-technischen Personal der Arbeitsgruppe Endokrinologie, welches mir die experimentelle Arbeit sehr erleichterte. Hier seien besonders Frau Brüggemann-Meyer und Frau Lüdemann erwähnt. Ihre Fachkenntnis, gute Laune und Erfahrung halfen mir bei der Aufarbeitung der Gewebe für die histologischen Untersuchungen und beim Einstieg ins wissenschaftliche Abreiten. Auch bei Fragen, die nicht direkt in ihre Zuständigkeit fielen, waren sie immer hilfreich, den korrekten Ansprechpartner zu finden und Probleme zu lösen.