

Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen

eingereicht von PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke

**Die Wirkung von Vitamin D in Kombination  
mit Ecdyson und Östrogen auf Uterus und  
Mamma der ovariectomierten Ratte**

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von

**Ulrike Hingst**

aus

Rostock

Göttingen 2018

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von August 2010 bis August 2016 in der Abteilung für experimentelle Endokrinologie, geleitet durch Herrn Prof. Dr. W. Wuttke, an der Universitätsmedizin Göttingen erstellt.

<b>Dekan:</b>	Prof. Dr. H. K. Kroemer
<b>Referentin:</b>	PD Dr. D. Seidlová-Wuttke
<b>Ko-Referentin:</b>	Prof. Dr. H. Siggelkow
<b>Drittreferent:</b>	Prof. Dr. Dr. K. G. Wiese

Datum der mündlichen Prüfung:	17. Juli 2019
-------------------------------	---------------

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „ Die Wirkung von Vitamin D in Kombination mit Ecdyson und Östrogen auf Uterus und Mamma der ovariectomierten Ratte." eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Hannover, 11. Juni 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das Klimakterium der Frau: Hormonelle Situation, Klimakterisches Syndrom und Komorbiditäten in der Perimenopause</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Hormonersatztherapie und ihre Risiken</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Östrogene im Stoffwechsel</b>	<b>3</b>
1.3.1 Wirkmechanismen und Effekte von Östrogen	6
1.3.2 Wirkungen von Östrogen auf den Uterus	8
1.3.3 Wirkungen von Östrogen auf die Mamma	8
<b>1.4 Ecdysteroide</b>	<b>9</b>
1.4.1 Wirkmechanismen von Ecdyson	10
1.4.2 Wirkungen von Ecdyson auf den Organismus	11
<b>1.5 Vitamin D</b>	<b>12</b>
1.5.1 Wirkungen von Vitamin D auf den Organismus	13
<b>1.6 Das verwendete Tiermodell</b>	<b>14</b>
1.6.1 Der Uterus bei Ratte und Frau	15
1.6.2 Die Brustdrüse bei Ratte und Frau	16
<b>1.7 Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>18</b>
<b>2.1 Versuchsaufbau</b>	<b>18</b>
<b>2.2 Versuchsgruppen</b>	<b>18</b>
<b>2.3 Versuchsablauf</b>	<b>19</b>
2.3.1 Ovariectomie	20
2.3.2 Applikation der Wirkstoffe	21
2.3.3 Histomorphologische Aufarbeitung der Gewebe	22
2.3.4 Färbemethodik – Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung)	23

2.3.5 Histologische Auswertung	23
2.3.6 Auswertung Uterus	23
2.3.7 Auswertung Mamma	24
2.3.8 Statistische Auswertung	25
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>27</b>
<b>3.1 Futterraufnahme und Gewichtszuwachs</b>	<b>27</b>
<b>3.2 Uterusgewichte</b>	<b>32</b>
<b>3.3 Histomorphometrische Analyse des Uterus</b>	<b>34</b>
3.3.1 Epithelium	34
3.3.2 Endometrium	36
3.3.3 Myometrium	37
<b>3.4 Histologische Analyse der Mamma</b>	<b>39</b>
3.4.1 Lobulus 1	41
3.4.2 Lobulus 2	42
3.4.3 Duktus	43
<b>4 Diskussion</b>	<b>46</b>
<b>4.1 Postmenopause und klassische Hormonsubstitution im Tierversuch</b>	<b>46</b>
<b>4.2 Alternative Therapie mit Ecdyson</b>	<b>50</b>
<b>4.3 Der Einfluss von Vitamin D-Substitution oder -Mangel</b>	<b>55</b>
<b>4.4 Mögliche kompetitive Wirkmechanismen von Ecdyson und Vitamin D</b>	<b>57</b>
<b>4.5 Einfluss der Futterzusammensetzung</b>	<b>58</b>
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>60</b>
<b>6 Anhang</b>	<b>62</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>8 Abbildungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>9 Tabellenverzeichnis</b>	<b>85</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACD	<i>advanced chemistry development</i>
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	<i>Adenosintriphosphat</i>
BMI	<i>body mass index</i>
DM	Diabetes mellitus
E1	Östron
E2	Östradiol
Ecd	20-OH-Ecdyson
EcR	Ecdysteroidrezeptor
ER	Östrogenrezeptor
ET	Östrogenmonotherapie
EPIC	<i>European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition</i>
EPT	kombinierte Östrogen-Progestagen-Therapie
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GnRH	<i>gonadotropin-releasing- hormone</i>
gr.	griechisch
HRT	<i>hormone replacment therapy</i>
IE	Internationale Einheit
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1</i>
IP3	Inositoltrisphosphat
Lb 1/ 2	Lobulus/Lobuli 1/ 2
LH	luteinisierendes Hormon
NR	nukleärer Rezeptor
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
ovx	ovarektomiert

PI3K/Akt	Phosphoinositid 3-Kinase/ Serin/ Thyreonin-Kinase
PPAR	Peroxisomenproliferator-aktivierter Rezeptor
q CT	quantitative Computertomographie
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SD	Sprague-Dawley
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SERM	selektiver Östrogen-Rezeptor-Modulator
sf	sojafreies Kontrollfutter
TEBs	<i>terminal end buds</i>
TR	Thyreoidhormonrezeptor
TRAIL	<i>tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand</i>
USP	<i>ultraspiracle protein</i>
VD	Vitamin D (Calcitriol)
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
WHI	<i>Women's Health Initiative</i>

## 1 Einleitung

### 1.1 Das Klimakterium der Frau: Hormonelle Situation, Klimakterisches Syndrom und Komorbiditäten in der Perimenopause

Im Alter zwischen 45 und 55 Jahren kommt es bei Frauen durch eine physiologische, nicht kompensierbare Follikelatresie zum Erliegen der ovariellen Funktion (Burger et al. 2002). Gekennzeichnet ist dieser Zeitraum von Zyklusunregelmäßigkeiten und vegetativen Beschwerden. Der Zeitpunkt der letzten Regelblutung wird retrospektiv als Menopause bezeichnet. Die Zeit um die Menopause, vom Beginn unregelmäßiger Zyklen bis ein Jahr nach der Menopause, wird als Perimenopause oder auch Klimakterium der Frau (gr. *klimaktér* „Stufenleiter, kritischer Zeitpunkt im Leben“) bezeichnet. Im Anschluss folgt die Postmenopause.

Die Follikelatresie führt zu niedrigen Östrogenspiegeln und erhöhten Spiegeln von follikelstimulierendem (FSH) und luteinisierendem Hormon (LH) (Burger et al. 2002). Eine vergleichbare hormonelle Situation wird bei beidseits ovariectomierten Ratten beobachtet und macht diese zu einem häufig verwendeten Vergleichsmodell im Tierversuch. Neben der beschriebenen hormonellen Umstellung kommt es bei vielen alternden Frauen parallel zu einer Vitamin D-(VD)-Mangelsituation (Gloth et al. 1995; Vitezova et al. 2015).

Im Rahmen der perimenopausalen hormonellen Umstellung entwickeln mehr als die Hälfte der Frauen klimakterische Beschwerden (Powell et al. 2008). Neben vegetativen Symptomen wie Hitzewallungen und Schweißausbrüchen gehört die vulvovaginale Atrophie zu den häufigsten Symptomen. Des Weiteren kann es zu depressiven Verstimmungen, Schlaf- und Konzentrationsstörungen sowie zu Kopfschmerzen und Libidoverlust kommen. Atrophien u. a. an Brust, Uterus und Haut sind ebenfalls mögliche Folgen (Vortherms 2006; Nelson 2008).

Eine Gewichtszunahme bei vielen Frauen verdeutlicht zudem die appetit- und gewichtsreduzierende Wirkung der Östrogene (Gao et al. 2007). In der Folge steigt mit der Menopause die Inzidenz des Metabolischen Syndroms (Lobo 2008), wozu neben der abdominalen Fettleibigkeit der arterielle Hypertonus, die Dyslipidämie und die Insulinresistenz im Sinne eines Diabetes mellitus Typ II (DM II) gehören (Carr 2003).

Langfristig führt der Östrogenmangel außerdem zu einer fortschreitenden Osteoporose (Greendale et al. 1999; Wuttke et al. 2002). Besteht zudem über eine gewisse Zeit eine VD-Mangelsituation, resultiert ein erheblich erhöhtes Frakturrisiko (Bucchebner et al. 2014).

## **1.2 Hormonersatztherapie und ihre Risiken**

Seit Ende der 1960er Jahre besteht für Frauen mit klimakterischen Beschwerden die Möglichkeit der therapeutischen Hormonsubstitution (Rhoades 1967). Zunächst wurden die Symptome des Östrogenmangels mit einer Östrogenmonotherapie (ET) therapiert, später wurde die auch heute noch gebräuchliche kombinierte Gabe von Östrogen und Gestagen (EPT) bei Frauen mit intaktem Uterus eingeführt. Sie soll ebenfalls einen absoluten oder relativen Hormonmangelzustand ausgleichen. Bei hysterektomierten Frauen kann auf die uteruschützende Gestagensubstitution verzichtet werden. Mithilfe dieser Hormonersatztherapie (HRT) können die häufigsten klimakterischen Symptome wie Hitzewallungen und Schweißausbrüche am effektivsten gelindert werden (Nelson 2008). Außerdem sind günstige Auswirkungen einer HRT auf das Metabolische Syndrom beschrieben (Salpeter et al. 2006). Zur Behandlung oder Prävention einer klinisch relevanten Osteoporose ist die HRT dagegen keine Erstlinientherapie. Soll es zu einer Verbesserung der osteoporotischen Veränderungen kommen, müsste die HRT über Jahre hinweg verabreicht werden und gilt aufgrund der Nebenwirkungen in dieser Hinsicht nicht als Therapie der Wahl.

Denn schon früh war eine Assoziation zwischen der HRT und einem erhöhten Risiko von Krebserkrankungen bekannt (Hoover et al. 1976; Ross et al. 1980). Allerdings führten erst die Veröffentlichungen von Studien wie der Placebo-kontrollierten *Woman's Health Initiative* (WHI) (Rossouw et al. 2002) in den USA und der prospektiven Kohortenstudie *Million Woman Study* (Beral 2003; Beral et al. 2005) aus England zu einem neuen Diskurs über die Vor- und Nachteile dieser Behandlungsform. Das Endometriumkarzinomrisiko unter ET steigt mit zunehmender Dauer der Anwendung und ist auch noch mindestens fünf Jahre nach Absetzen der Therapie um einen zwei- bis zehnfachen Faktor erhöht (Emons et al. 2000). Unter EPT sinkt die Wahrscheinlichkeit einer Endometriumsentartung

dagegen gegenüber einem nicht behandelten Patientinnenkollektiv sogar leicht (Beral et al. 2005). Entsprechend zeigen histologische Untersuchungen von Endometriumsproben von Probandinnen nach EPT eine klassische Endometriumsatrophie im Gegensatz zu stark hypertrophierten Zellen und mitunter atypisch veränderten Zellen nach ET (Horn et al. 2005).

Die Datenlage zum Mammakarzinomrisiko ist hingegen nicht eindeutig. Einig scheinen sich die WissenschaftlerInnen darüber zu sein, dass es unter einer EPT zu einer Zunahme der Inzidenz von Mammakarzinomen kommt (Beral 2003; Prelevic et al. 2005). Das Risiko unter einer ET wird unterschiedlich bewertet. In der englischen *Million Woman Study*, der französischen E3-N-Studie und der deutschen MARIE (Mammakarzinom-Risikofaktoren-Erhebung) kam es auch unter einer ET zu einer erhöhten Brustkrebsinzidenz (Beral 2003; Fournier et al. 2008; Flesch-Janys et al. 2008). Dem gegenüber stehen Ergebnisse anderer Studien wie auch der amerikanischen WHI, welche unter ET ein signifikant niedrigeres Brustkrebsrisiko im Vergleich zur Placebogruppe zeigen konnten (Conner et al. 2008; LaCroix et al. 2011; Gurney et al. 2014). Diese teils widersprüchliche Datenlage erschwert eine fundierte Aussage bezüglich der Auswirkungen auf das Brustkrebsrisiko (Shapiro 2007). Ebenfalls konnte bislang noch nicht eindeutig beantwortet werden, ob die Hormonzufuhr Tumorzellen direkt induziert oder ob eine Östrogentherapie bei prädisponierten Frauen zu einem beschleunigten Krebsverlauf/-ausbruch führt (Dietel et al. 2005).

### **1.3 Östrogene im Stoffwechsel**

Bei der Frau werden Östrogene in den Granulosazellen des Ovars und während der Schwangerschaft in der Plazenta gebildet. Da die für den letzten Syntheseschritt verantwortliche Aromatase außerdem im Fettgewebe, im Uterus und in der Brustdrüse exprimiert wird, kann hier ebenfalls eine Umwandlung von Androstendion bzw. Testosteron zu Östrogenen katalysiert werden (Nelson und Bulun 2001). Da das Östron (E1) im Vergleich zu den anderen Östrogenen besonders durch die periphere Konversion von Androgenen entsteht, überwiegt in der Postmenopause physiologisch das E1. Östradiol (E2) ist dagegen das potenteste und prämenopausal bedeutendste Östrogen.

Durch einen hohen *first-pass-effect* kommt es bei den natürlich vorkommenden Östrogenen zu einer schnellen Inaktivierung in der Leber. Bei einer oralen Applikation werden daher synthetisch veränderte Östrogene wie das Östradiolbenzoat eingesetzt, um eine bessere systemische Wirkung zu erzielen.

17- $\beta$  Östradiol (Abb. 1) besteht aus 18 Kohlenstoffatomen, welche im A-Ring zu einer aromatischen Struktur, dem Phenolring, verbunden sind. Dieser Aromat sowie eine weitere Hydroxylgruppe am D-Ring sind entscheidend für die Bindungsfähigkeit am Östrogenrezeptor (ER).

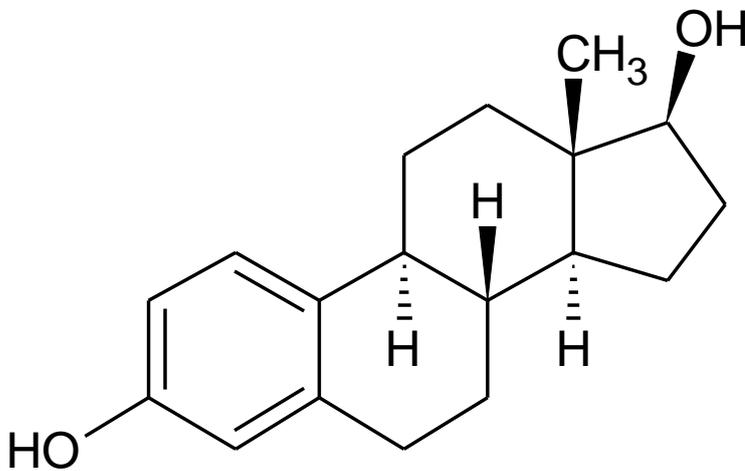


Abbildung 1: Chemische Struktur des wichtigsten Östrogens in der Prämenopause 17-  $\beta$  Östradiol (erstellt mit ACD/ ChemSketch)

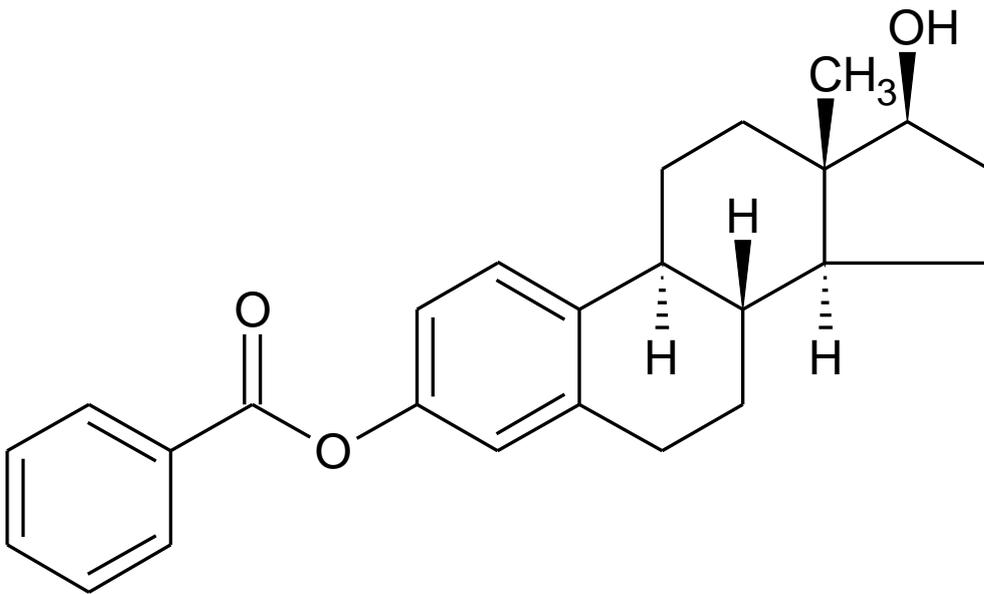


Abbildung 2: Chemische Struktur des synthetisch hergestellten Östradiol-(17  $\beta$ )-3-benzoats (erstellt mit ACD/ ChemSketch)

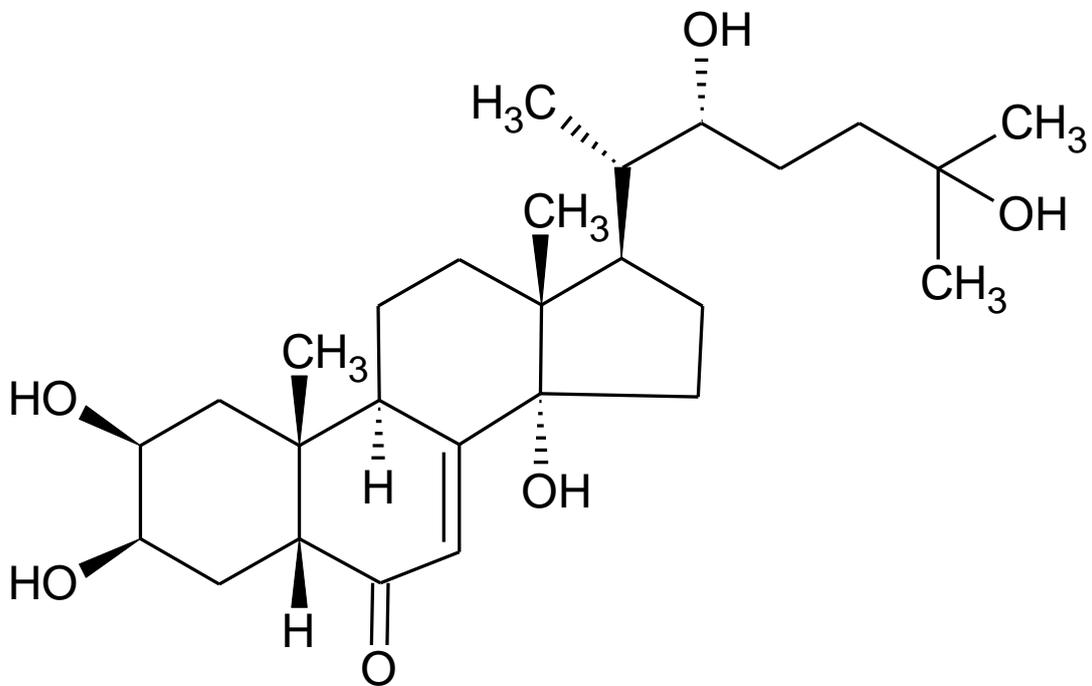


Abbildung 3: Chemische Struktur des häufigsten Ecdysteroids 20-OH-Ecdyson (erstellt mit ACD/ ChemSketch)

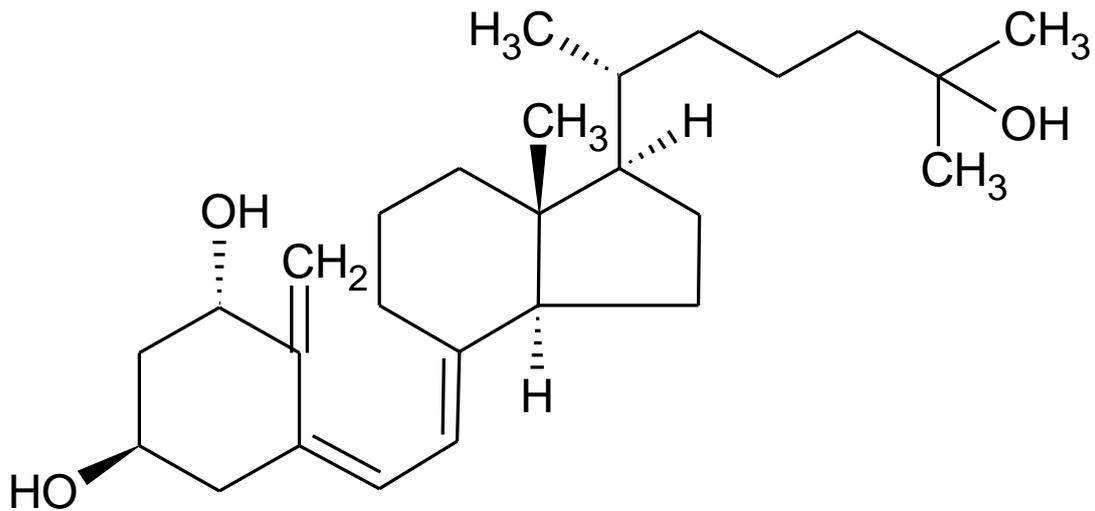


Abbildung 4: Chemische Struktur des VD (Calcitriol) (erstellt mit ACD/ ChemSketch)

### 1.3.1 Wirkmechanismen und Effekte von Östrogen

Die klassische Signalübertragung der Steroidhormone erfolgt über intrazelluläre Rezeptoren, welche nach Ligandenbindung selbst zu Transkriptionsfaktoren an der DNA werden.

Die bekannten Östrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren (NR) (Matthews und Gustafsson 2003; Germain et al. 2006). Neben strukturellen Ähnlichkeiten ist diesen Rezeptoren gemein, dass sie ihre Wirkung erst nach einer Dimerisierung entfalten können. ER $\alpha$  und ER $\beta$  homo- bzw. heterodimerisieren miteinander zu ER $\alpha\alpha$ , ER $\beta\beta$  bzw. ER $\alpha\beta$ . Zu den NR gehören u. a. der VD-Rezeptor (VDR), der bei Arthropoden nachgewiesene EcR (vgl. Abschnitt 1.4), der Retinoid-X-Rezeptor (RXR), der Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptor (PPAR) sowie noch eine Vielzahl weiterer Rezeptoren (Zhang et al. 2004; Germain et al. 2006; Lafont und Dinan 2003).

ER $\alpha$  und ER $\beta$  binden E<sub>2</sub> mit etwa gleich hoher Affinität (Kuiper et al. 1997). Sie unterscheiden sich jedoch hinsichtlich ihrer physiologischen Funktion und ihres Verteilungsmusters:

Im Tiermodell zeigte sich, dass der ER $\alpha$  v. a. für die Zellproliferation verantwortlich ist, während dem ER $\beta$  antiproliferative und differenzierungsfördernde Eigenschaften zugeschrieben werden (Wuttke et al. 2007). ER $\alpha$  wird vorrangig im Uterus (Pelletier 2000; Pelletier et al. 2000; Wang et al. 2000), in der Brustdrüse (Wang et al. 2000), in der Vagina und in der Leber (Pelletier 2000) exprimiert. ER $\beta$  dominiert dagegen in der Harnblase, den Speicheldrüsen, im Gefäßendothel und in der Lunge (Pelletier 2000). Außerdem exprimieren einige Organe je nach Gewebetyp sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  (Pelletier 2000; Pelletier et al. 2000). Eine organselektive Wirkung wird darüber hinaus entscheidend durch Genregulatoren wie Coaktivatoren und -repressoren vermittelt (Shang und Brown 2002; McDonnell 2004). Diesen Effekt versucht man sich mit dem Einsatz von selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMS) zunutze zu machen, welche eine nebenwirkungsarme Therapie der Osteoporose in Hinblick auf negative Folgen für Mamma- und Uterusgewebe ermöglichen (Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

Nichtgenomische Wirkmechanismen der Östrogene sind ebenfalls beschrieben. So führt E2 bei der Frau und bei der Ratte bspw. zu einer vermehrten Freisetzung von Wachstumsfaktoren wie *insulin-like growth factor 1* (IGF1) (Seidlová-Wuttke et al. 2010b; Wuttke und Seidlová-Wuttke 2011). Diese Botenstoffe führen para- und autokrin über den Phosphoinositid-3-Kinase/Akt (PI3K/Akt)-Signalweg zu einer Proliferation von Epithelium sowie Endo- und Myometrium (Zhang et al. 1998; Zhu und Pollard 2007).

Vor dem Hintergrund ihrer proliferationsfördernden Wirkung können Östrogene einen Einfluss auf die Entwicklung von malignen Erkrankungen ausüben. So zählen sie zu den Hauptrisikofaktoren für die Entstehung von Endometriumkarzinomen (Brinton et al. 2005). Ihr Einfluss auf die Entstehung von Mammakarzinomen muss differenziert betrachtet werden und ist Gegenstand aktueller Forschung (siehe Abschnitt 1.2).

Im Folgenden soll der Einfluss von Östrogen auf die besonders hormonsensitiven Organe Uterus und Mamma näher erläutert werden.

### **1.3.2 Wirkungen von Östrogen auf den Uterus**

Die klassische proliferationsfördernde Wirkung von Östrogenen und anderen ER-Agonisten auf den Uterus wird über den ER vom Subtyp  $\alpha$  vermittelt, welcher in allen Uterusschichten exprimiert wird (Pelletier et al. 2000). Neben der verstärkten Proliferation der kubischen Zellen des Uterusepithels kommt es unter Östrogeneinfluss zur Bildung von Sekretionsproteinen wie Lactoferrin (Winuthayanon et al. 2010).

Durch diese uterotrophen Wirkungen kann es zu Epithelotypen kommen, welche Vorstufen eines endometrioiden Adenokarzinoms sein können (Cirisano et al. 2000), bzw. mit einem erhöhten Risiko für maligne Transformation verbunden sind (Lacey et al. 2010). Eine alleinige E2-Substitution in der Postmenopause führt dementsprechend zu einem erhöhten Endometriumkarzinomrisiko (Wuttke et al. 2002).

In Endometriumkarzinomzellen konnten im Unterschied zu Brustkrebszellreihen auch ER-unabhängige Mechanismen gefunden werden, die über eine PI3K/Akt-Aktivierung zu Proliferationsvorgängen führen (Lee et al. 2005; Guo et al. 2006).

Physiologischerweise atrophiert der Uterus in der Postmenopause unter dem verringerten E2-Einfluss.

### **1.3.3 Wirkungen von Östrogen auf die Mamma**

ER werden sowohl in duktalem und lobulärem Epithelzellen als auch im Stroma der Brustdrüse exprimiert (Gabrielson et al. 2016). Im Unterschied zum Uterusgewebe ist der ER für den Östrogeneinfluss auf die Brust nach heutigem Kenntnisstand unverzichtbar (Feng et al. 2007; Winuthayanon et al. 2010). Während der pubertären Brustentwicklung stimuliert E2 die Ausbildung und das Wachstum von duktalem Strukturen. Bei Mäusen konnte dieser stimulierende Effekt nach lokal applizierter Gabe von E2 ebenfalls auch noch nach Ovariectomie nachgewiesen werden (Daniel et al. 1987). Durch eine Zunahme von periduktalem Binde- und Fettgewebe und eine verstärkte Vaskularisation unter E2-Einfluss kommt es zu einem Größenwachstum der Brust. Die Differenzierung von Duktus und Lobuli sowie die Ausdifferenzierung der Alveolarzellen zu sekretorischen Zellen ist dagegen abhängig vom Progesteroneinfluss (Russo und Russo 1996; Silberstein 2001).

Unter einer reinen Zufütterung von E2 lässt sich bei weiblichen Ratten eine multifokale oder diffus lobuloalveoläre Hyperplasie beobachten (Biegel et al. 1998). Ein morphologisch ähnliches Bild zeigt sich unter dem Einfluss von Phytoöstrogenen, wobei hier nicht ein ER $\alpha$ -agonistischer Wirkmechanismus, sondern eine Hyperprolaktinämie ursächlich erscheint (Lucas et al. 2007).

Durch einen Hypoöstrogenismus bzw. E2-Antagonismus kommt es dagegen zu einer zunehmenden Atrophie des Brustparenchyms und Involution durch Fettgewebe, wobei duktale wie lobuläre Strukturen betroffen sind (Hutson et al. 1985; Lucas et al. 2007).

Die genauen Bedingungen der Karzinogenese in Bezug auf den Östrogeneinfluss sind Gegenstand aktueller Forschung. Ein Zusammenhang zwischen einer langanhaltenden endogenen Östrogenexposition und einem steigenden Brustkrebsrisiko scheint jedoch mit Blick auf bekannte Risikofaktoren wie frühe Menarche, späte Menopause und Adipositas in der Perimenopause offensichtlich (Messina und Wood 2008). Ebenso weisen therapeutische Erfolge durch den Einsatz von Antiöstrogenen, Aromatasehemmern, Ovariectomie und *gonadotropin-releasing-hormone*-(GnRH)-Analoga auf die Bedeutung von Östrogenen im Rahmen der Mammakarzinomentstehung hin (Santen 2002).

## 1.4 Ecdysteroide

20-OH-Ecdyson (Ecd) ist der häufigste Vertreter der Ecdysteroide, wobei über 300 weitere strukturelle Analoga bekannt sind (Lafont und Dinan 2003; Dinan und Lafont 2006). Es wird in natürlicher Form von Arthropoden (Gliederfüßler), Pflanzen, Pilzen und Algen produziert (Dinan 2009). Bei Schmetterlingen spielt Ecd eine Rolle in der Metamorphose von der Larve bis zum adulten Stadium. Zudem kommt Ecd bei Pflanzen z. B. in Spinat (*Spinacia oleracea*) und Quinoa (*Chenopodium quinoa*) in höheren Konzentrationen vor (Bathori et al. 2008). Ecd konnte 1954 erstmals in seiner reinen Form isoliert werden (Butenandt und Karlson 1954). Einige Jahre später wurde die chemische Struktur (Abb. 3) beschrieben (Huber und Hoppe 1965; Dinan und Lafont 2006). Im Jahr 2008 gelang es dann, Ecd als aktiven Bestandteil der osteoprotektiv wirksamen Pflanze *Tinospora cordifolia* zu identifizieren (Kapur et al. 2008).

### 1.4.1 Wirkmechanismen von Ecdyson

Ecd kommt unter physiologischen Umständen nicht im Stoffwechsel von Säugetieren vor (Dinan und Lafont 2006; Bathori et al. 2008). Nach Aufnahme Ecd-haltiger Nahrungsmittel ist jedoch eine entsprechende Konzentration im Blut nachweisbar (Dinan und Lafont 2006). Ein spezifischer Ecdysteroidrezeptor (EcR) wurde bei Säugetieren im Gegensatz zu Arthropoden bislang allerdings nicht identifiziert (Seidlová-Wuttke et al. 2010a). Selbst in hohen Konzentrationen konnte für Ecd in Radioligandenbindungsassays keine Affinität zu den bei Säugetieren vorkommenden Steroidhormonrezeptoren nachgewiesen werden (Bathori et al. 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Kapur et al. 2010). Bei dem intrazellulär vorliegenden EcR der Gliederfüßer handelt es sich um einen Komplex aus zwei unterschiedlichen Proteinen, EcR und *ultraspiracle protein* (USP), welche nach Ligandenbindung heterodimerisieren und eine genomische Zellantwort vermitteln (Yao et al. 1993). Der EcR gehört ebenfalls zu den NR (Lafont und Dinan 2003). Das Äquivalent des USP bei Vertebraten ist das RXR-Protein (Oro et al. 1990; Gorelick-Feldman et al. 2008; Evans und Mangelsdorf 2014). Da RXR-Proteine Dimerisierungspartner für viele andere nukleäre Steroidrezeptoren sind, ist hierüber ein Einfluss von Ecd denkbar.

Dass Ecd möglicherweise auch über eine Interaktion mit dem VDR wirkt, wird schon länger diskutiert (Kuzmenko et al. 1997; Lafont und Dinan 2003). Ecd und VD sind entwicklungsbiologisch der gleichen Subfamilie zuzuordnen (Gronemeyer und Laudet 1995). Im Vergleich der jeweiligen chemischen Struktur ist VD unter den menschlichen Steroidhormonen dem Ecd am ähnlichsten. Hierdurch und mithilfe des *conformational ensemble model* der Steroidhormone lassen sich potenzielle allosterische Effekte des Ecd möglicherweise auch an alternativen Bindungsstellen des membranständigen VDRs vermuten (Mizwicki et al. 2004; Toth et al. 2010).

Wirkungen über nicht genomische Mechanismen wie den PI3K/Akt-Signalweg wurden bereits für verschiedene Ecdysteroide beschrieben (Oehme et al. 2006; Kizelsztejn et al. 2009). In hämatopoetischen Zellen wirkten Ecd-Analoga (Muristerone A und Ponasterone A) auf diesem Weg antiapoptotisch (Constantino et al. 2001). Dagegen zeigte sich in der humanen Kolonkarzinomzellreihe RKO ein pro-apoptotischer Effekt unter Muristeron A (Oehme et al. 2006). Diese unterschiedliche gewebeabhängige Wirkweise ähnelt den

ebenfalls zellspezifischen pro- bzw. antiapoptotischen Eigenschaften der humanen Steroidhormone (Pushkala und Gupta 2001).

### **1.4.2 Wirkungen von Ecdyson auf den Organismus**

Eine anabole Wirkung von Ecd auf den Proteinstoffwechsel konnte 1968 erstmalig in Leberzellen von Mäusen nachgewiesen werden (Okui et al. 1968; Otaka et al. 1968). Nachfolgende Studien reproduzierten diesen Effekt auch bei anderen Tierarten wie Ratten, Schweinen und Schafen (Tóth et al. 2008; Dinan 2009). Auch in humanen und murinen Skelettmuskelzellen kam es in In-vitro-Versuchen unter Ecd zu einer dosisabhängigen Steigerung der Proteinbiosynthese (Gorelick-Feldman et al. 2008). Diskutiert wird auch hier eine direkte oder indirekte Aktivierung der PI3K/Akt-Signalkaskade (Gorelick-Feldman et al. 2008; Gorelick-Feldman et al. 2010). Eine direkte Größenzunahme der Muskelfasern wurde bei Ratten beobachtet (Tóth et al. 2008). Auch zur Therapie vegetativ klimakterischer Beschwerden wird Ecd diskutiert. So konnte Ecd über einen neuronalen Wirkmechanismus am GABA (Gamma-Aminobuttersäure)-Rezeptor bei ovariectomierten Ratten Hitzewallungen lindern (Tsujiyama et al. 1995; Puri et al. 2012).

Darüber hinaus übt Ecd einen positiven Effekt auf die Ausprägung des Metabolischen Syndroms aus. Bei Nagetieren konnte Ecd neben einer Reduzierung des Serumcholesterins bspw. auch antidiabetisch über eine Verminderung von Hyperglykämien ohne Änderung des Insulinspiegels wirken (Kizelsztein et al. 2009; Sundaram et al. 2012). Außerdem lässt sich unter Ecd-Einfluss eine Abnahme der Körperfettmasse beobachten (Kizelsztein et al. 2009; Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Seidlová-Wuttke et al. zeigten, dass bei den ovariectomierten Versuchstieren unter Ecd-Applikation die gravierendste Gewichtszunahme zu verzeichnen war. Quantitative Computertomographiemessungen (qCT) konnten allerdings belegen, dass dieses Phänomen der starken anabolen Wirkung auf die Muskelmasse zuzusprechen war. Das paratibiale Fett - als Surrogatparameter für den viszeralen Fettanteil - minimierte sich dagegen (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Durch eine Abnahme des viszeralen Fettanteils wäre durch Ecd auch ein positiver Effekt auf die Koronare Herzkrankheit (KHK), den DM II,

das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS) und die Karzinomentstehung denkbar (Wuttke und Seidlová-Wuttke 2013).

Außerdem zeigten sich in mehreren Studien an Tiermodellen osteoprotektive Effekte von Ecd vergleichbar mit der Wirkung von VD (Gao et al. 2008; Kapur et al. 2010; Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

## 1.5 Vitamin D

Menschen und Nagetiere sind in der Lage endogen aus Cholesterin oder über aus der Nahrung aufgenommenes Cholecalciferol über verschiedene Zwischenstufen VD zu synthetisieren. In der Leber entsteht zunächst aus Cholesterin 7-Dehydro-cholesterin (Pro-VD). Anschließend kommt es in der Haut u. a. im Rahmen einer photochemischen Reaktion mit UV-B-Strahlen zur Bildung von Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>). Für die physiologisch aktive Form des VD-Hormons (Calcitriol; 1,25(OH)<sub>2</sub>-D<sub>3</sub>) muss das Cholecalciferol im Körper noch in Leber und Niere bzw. in anderen Gewebe durch ortsständige Hydroxylasen hydroxyliert werden.

Dann kann VD als hochaffiner Ligand an den VDR binden. Der VDR kann mit dem RXR wie auch mit dem PPAR sowohl heterodimerisieren und als Transkriptionsfaktor genmodulatorisch wirken. Ein genomischer Effekt findet sich Stunden bis Tage später (Toth et al. 2010).

Neben diesem Wirkprinzip existiert noch eine schnelle, nicht genomische Zellantwort. Diese wird über plasmamembrangebundene VDR vermittelt. Über intrazelluläre Signalkaskaden mittels verschiedener Botenstoffe (Inositoltriphosphat (IP<sub>3</sub>), 1,2-Diacylglycerin (DAG), zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP)) ist VD so bspw. in der Lage, den Kalziumhaushalt direkt zu beeinflussen. Insbesondere wurde dieser rasche Wirkeffekt in Darm- und Skelettmuskelzellen beobachtet (Nemere et al. 1984; Toth et al. 2010). Ein vergleichbarer Effekt konnte auch für Ecd beobachtet werden (Toth et al. 2010). In Pankreaszellen konnte über eine ebenfalls durch IP<sub>3</sub> vermittelte Signaltransduktion eine Anregung der Insulinsekretion durch VD nachgewiesen werden

(Norman 2006). Außerdem erhöht VD die Insulinsensibilität von Muskelzellen und führt somit zu einem sinkenden Glukosespiegel und zu erhöhter Muskelkraft (Zhou et al. 2008).

### **1.5.1 Wirkungen von Vitamin D auf den Organismus**

VD spielt eine entscheidende Rolle im Mineralstoffwechsel, indem die Aufnahme von Kalzium und Phosphat aus dem Darm sowie deren Einbau in die Knochensubstanz angeregt werden (Holick 2007). Mittlerweile wird jedoch eine Vielzahl extraossärer Wirkungen diskutiert, z. B. positive Effekte auf Stoffwechselerkrankungen wie Diabetes mellitus, Autoimmunerkrankungen, Fett- und Glukosestoffwechsel, eine Steigerung der Muskelkraft bis hin zur Reduktion von Tumorerkrankungen (Dusso et al. 2005; Bouillon et al. 2008; Anagnostis et al. 2015).

VDR und ortsständige Hydroxylasen zur Aktivierung der Vorstufen zu VD lassen sich in beiden Zielorganen des vorliegenden Versuchs, Uterus und Mamma, bei Ratten und Menschen nachweisen (Johnson et al. 1996; Holick 2007; Agic et al. 2007). Außerdem werden VDR in der Skelett- als auch in der glatten Muskulatur exprimiert (Bischoff et al. 2001; Halder et al. 2013).

Nach Ligandenbindung wirkt der VDR als Transkriptionsfaktor in der Genexpression und nimmt direkten Einfluss auf das Wachstum, die Differenzierung und Apoptose von benignen und malignen Zellen (Bergadà et al. 2014). In humanen Ovarien führt VD zu einer erhöhten Syntheserate von E2, E1 und Progesteron (Parikh et al. 2010). VDR-*knockout*-Ratten haben dementsprechend eine um 75 % verminderte Fruchtbarkeit (Johnson und DeLuca 2001). Auch Mäuse zeigten in einer VD-Mangelsituation durch eine VDR-Mutation eine Gonadeninsuffizienz in Form einer verminderten Follikulogenese und einer Uterushypoplasie (Yoshizawa et al. 1997; Kinuta 2000). Durch einen Ausgleich des Kalziumhaushaltes sowie eine E2-Substitution war dieses Phänomen jedoch reversibel (Lerchbaum und Obermayer-Pietsch 2012).

Der Einfluss von VD auf Zellproliferation und Differenzierung wird auch im Zusammenhang mit Erkrankungen des Uterus untersucht. So fand sich kein protektiver Zusammenhang zwischen einer VD-reichen Ernährung bzw. einem hohen VD-Spiegel im

Blut und dem Risiko von Endometriumskarzinomen (Liu et al. 2013). Allerdings lässt sich bei Patientinnen mit Endometriumkarzinom oder Endometriose im Vergleich zu gesunden Probandinnen eine erhöhte Expression von VDR und Hydroxylasen nachweisen (Agic et al. 2007). Ein Einfluss von VD auf Proliferation und Differenzierung im Rahmen von Endometriumserkrankungen erscheint somit denkbar.

Auch in Bezug auf Prävention und Therapie von Brustkrebserkrankungen werden die antiproliferativen und differenzierungsfördernden Eigenschaften des VD diskutiert (Banerjee und Chatterjee 2003; Artaza et al. 2010). Im Brustgewebe von Mäusen konnte gezeigt werden, dass VDR besonders stark in differenziertem und weniger stark in proliferativem Gewebe exprimiert wird (Zinser et al. 2002). Die Brustdrüsen von VDR-*knockout*-Mäusen erwiesen sich als signifikant größer und schwerer im Vergleich zum Wildtyp durch eine höhere Anzahl an undifferenzierten *terminal end buds* (TEB), verstärktes duktales Wachstum und eine gesteigerte Aufzweigung der einzelnen Drüsenlappen (Zinser et al. 2002).

Bei postmenopausalen Frauen ist wiederholt ein reziprokes Verhältnis von VD-Spiegel und dem Auftreten von Brustkrebs nachgewiesen worden (Wang et al. 2013; Kim et al. 2014). In einer prospektiven Fall-Kontroll-Studie (EPIC) mit 2782 Patientinnen konnte diese positive Assoziation für Anwenderinnen einer HRT bestätigt werden (Kühn et al. 2013).

## **1.6 Das verwendete Tiermodell**

Ein Klimakterium gibt es bei der Ratte nicht. Auch unterscheiden sich Lebenserwartung und Reproduktionsphasen von Ratten und Menschen erheblich (Bellino 2000). Durch eine Ovariectomie der Ratte lässt sich aber eine mit der menschlichen Postmenopause vergleichbare Hormonmangelsituation simulieren. Diese führt wie auch beim Menschen zu östrogenabhängigen Veränderungen bspw. zu Atrophien am Urogenitaltrakt und an der Brustdrüse (Vortherms 2006). Ebenso kommt es bei den Tieren kurze Zeit nach der Ovariectomie zu einer Veränderung der Knochensubstanz im Sinne einer Osteoporose (Bellino 2000).

Ein Zeitraum von drei Monaten bei Ratten entspricht ungefähr 7,5 Jahren beim Menschen (Andreollo et al. 2012). Die ovariectomierte Sprague-Dawley (SD)-Ratte in diesem Versuchszeitfenster stellt ein etabliertes Tiermodell in der medizinischen Forschung der Postmenopause der Frau dar (Kalu 1991).

Unter physiologischen Bedingungen erfolgt die endogene E<sub>2</sub>-Produktion bei Ratten fast ausschließlich in den intakten Ovarien, da den Ratten das Enzym 17- $\alpha$ -Hydroxylase für die adrenale Androgensynthese fehlt (van Weerden et al. 1992). Dennoch ist eine extragonadale E<sub>2</sub>-Produktion in geringem Ausmaß möglich, wie langsam wieder ansteigende E<sub>2</sub>-Spiegel im Blut nach Ovariectomie bei Ratten vermuten lassen. Diese Zunahme zeichnet sich jedoch erst nach vier Monaten ab (Zhao et al. 2005), weshalb dieser Effekt im vorliegenden Versuch nicht zum Tragen kommen sollte.

Ratten können ebenso wie Menschen Vorstufen von VD über pflanzliche und tierische Nahrung aufnehmen sowie über verschiedene Zwischenstufen selbst produzieren. Für die photochemische Umwandlung in der Haut brauchen die Tiere jedoch ebenfalls UV-B-Licht. Da unter normalen Umständen keine UV-B-Wellen im künstlichen Licht vorhanden sind, ist eine endogene VD-Produktion bei den Versuchstieren und damit eine Beeinflussung der Ergebnisse unwahrscheinlich.

### **1.6.1 Der Uterus bei Ratte und Frau**

Der histologische Aufbau des Uterus ist bei der Ratte und der Frau vergleichbar. Er gliedert sich in vier Schichten: Epithel, Endo-, Myo- und Perimeterium. Das Endometrium der Frau besteht aus einem einschichtigen Zylinderepithel und Drüsengewebe und wird noch einmal unterteilt in das stark zyklisch beeinflusste, dem Lumen zugewandte Stratum functionale und das schmale Stratum basale. Das Epithel der Ratte, welches ebenfalls zyklusabhängig stimuliert wird (Spencer et al. 2005), entspricht dem Stratum functionale der Frau. Das Myometrium wird bei beiden Uteri dominiert durch longitudinal, zirkulär und schräg verlaufende glatte Muskelfasern (Broderick und Broderick 1990). Der wesentliche Unterschied zwischen dem Uterus der Ratte und der Frau liegt im makroskopischen Aufbau. Bei der Ratte handelt es sich um einen Uterus duplex mit zwei

getrennten Cornus (Hörner) und kurzem Corpus. Im Gegensatz dazu hat die Frau in der Regel eine einfach angelegte Gebärmutter (Uterus simplex).

### **1.6.2 Die Brustdrüse bei Ratte und Frau**

Im Unterschied zur weiblichen Ratte mit in der Regel sechs paarig angelegten Brustdrüsen (Russo und Russo 1996) besitzt die Frau normalerweise nur eine paarig angelegte Brustdrüse. Die Brustdrüse ist bei Frau und weiblicher Ratte aufgebaut aus duktuloalveolären Epithelien und bindegewebigen Anteilen. Die epithelialen Strukturen bilden sich bei der weiblichen Ratte ab der zweiten Lebenswoche und bei der Frau kurze Zeit nach der Menarche aus (Russo und Russo 1978; Russo et al. 1990).

Die Funktionseinheiten der Brustdrüse werden Lobuli genannt. Ihre Bezeichnung ist abhängig von Alveolenanzahl und Grad ihrer Differenzierung. Lobulus 1 (Lb 1) bezeichnet die am wenigsten differenzierte lobuläre Struktur und setzt sich aus fünf bis zehn Alveolae zusammen (Russo et al. 2001). Bei einer Gruppe von zehn bis zwanzig Alveolae spricht man von Lobulus 2 (Lb 2) (Fritz et al. 1998).

Der Grad der Differenzierung der Brustdrüse nimmt bei der weiblichen Ratte mit dem Lebensalter zu. Bei der Frau ist der Differenzierungsgrad dagegen primär abhängig von hormonellen Einflüssen wie Schwangerschaft und Stillzeit und korreliert nicht so stark mit dem Alter (Russo et al. 1990). Die am wenigsten differenzierten Lb 1 dominieren vor den etwas komplexeren Lb 2 die Morphologie bei nulliparen Frauen aller Altersstufen (Russo et al. 1994). Die Lb 1 der Frau sind das Äquivalent zu den Funktionseinheiten der weiblichen Ratte, den TEBs. Eine besondere gemeinsame Eigenschaft dieser Einheiten ist die hohe Hormonsensitivität und Proliferationsfähigkeit, welche sie empfänglich für eine maligne Transformation macht (Russo und Russo 1996).

Der Grad der Differenzierung nimmt von Lb 1 zu 2 zu, während die Proliferationsrate abnimmt. Demnach wäre Brustgewebe mit einer deutlichen Prädominanz von Lb 1 im Gegensatz zu Lb 2 empfänglicher für neoplastische Veränderungen. In malignen Brustläsionen bei Frauen konnte gezeigt werden, dass hohe Proliferationsaktivität (Mitoserate, Proliferationsmarker) stark assoziiert ist mit einer schlechten Prognose (van Diest et al. 2004).

## 1.7 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Alternativmöglichkeiten zur weitverbreiteten HRT in Verbindung mit einer VD-Substitution. Durch günstige Auswirkungen auf postmenopausale Beschwerden sowie osteoprotektive Effekte ist E2 ein wichtiger Bestandteil der hormonellen Behandlung von Frauen im Klimakterium. Neben diesen positiven Eigenschaften führt E2 allerdings auch zu einer gesteigerten Proliferation in Uterus und Mamma mit dem erhöhten Risiko einer malignen Transformation.

Als mögliche Alternative in der Behandlung klimakterischer Beschwerden gilt das Phytosteroid Ecd. Versuche am Tiermodell konnten osteoprotektive Eigenschaften und einen günstigen Einfluss auf Symptome des Klimakterischen Syndroms sowie auf das Metabolische Syndrom belegen. Erste Studien an Menschen zeigten diesbezüglich ebenfalls positive Auswirkungen. Ein uterotropher und damit potenziell risikovermittelnder Effekt konnte bislang nicht nachgewiesen werden. Die tatsächliche Wirkweise auf den menschlichen Organismus ist bislang weitgehend ungeklärt.

Auch VD vermittelt osteoprotektive Eigenschaften, hat einen positiven Effekt auf das Metabolische Syndrom und kann auf bestimmte Zellreihen antiproliferativ sowie differenzierungsfördernd wirken. Weiterhin gibt es Hinweise, dass Ecd und VD aufgrund ihrer molekularen Ähnlichkeit Interaktionen auf Rezeptorebene aufweisen.

Aus diesen Gründen ist eine Untersuchung von VD in Kombination mit den spezifischen Testsubstanzen Ecd und E2 lohnenswert.

Als besonders östrogensensible und dementsprechend gut geeignete Testorgane im Hinblick auf potenziell unerwünschte Nebenwirkungen werden dabei Brust- und Uterusgewebe untersucht.

Zusammenfassend widmet sich die Arbeit folgenden Fragestellungen:

- 1.) Bestätigt sich der fehlende uterotrophe Effekt von Ecd?
- 2.) Welchen Einfluss hat Ecd auf das Gewebe der Brustdrüse?
- 3.) Welchen Einfluss hat VD in Kombination mit der klassischen oder alternativen HRT?

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchsaufbau**

Als Versuchstiere dienten 67 weibliche SD-Ratten (Fa. Winkelmann, Borcheln). Eine Genehmigung für die tierexperimentellen Versuche fand durch die Bezirksregierung Braunschweig unter dem Aktenzeichen 33.11.42504-04-043/08 statt.

Die Versuche beinhalteten eine Reihe von Organentnahmen und Messungen. Da ich an der Tötung der Tiere und der Organgewinnung nicht beteiligt war, wurden mir die Organe Uterus und Mamma zur histologischen Aufarbeitung und Auswertung freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Pro Käfig (Makrolonkäfige vom Typ IV, Fa. Tecnisplast Deutschland GmbH, Hohenpreiberg) wurden jeweils fünf Tiere gehalten. In einer Eingewöhnungsphase erhielten die Ratten zunächst phytostrogenarmes, sojafreies Futter „EF R/M, E 150000-04“ (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest) ohne besondere Zusätze. Ebenso stand den Tieren Wasser zur freien Verfügung. Als Zeitgeber für den zirkadianen Rhythmus wurde das künstliche Licht von 6-18 Uhr eingeschaltet. Die Raumtemperatur lag bei 23 °C und die relative Luftfeuchtigkeit bei 50-55 %. Eine Gruppenzuordnung der Ratten erfolgte zu Beginn in Abhängigkeit vom jeweiligen Körpergewicht, sodass das mittlere Gewicht einer Gruppe im Vergleich untereinander annähernd übereinstimmte. Zu Beginn des Versuchs wogen die einzelnen Tiere zwischen 245 und 295 g.

### **2.2 Versuchsgruppen**

Die Einteilung der Versuchsgruppen sah, neben einer Gruppe mit intakten Ratten, sechs weitere Gruppen mit ovariectomierten Tieren vor. Die Testsubstanz Ecd wurde in den Versuchsgruppen als Monotherapie (ovx, Ecd-VD) sowie in Kombination mit VD (ovx, Ecd+VD) verabreicht. Als Referenzgruppe zu der Ecd-Gruppe erhielten die ebenfalls ovariectomierten Tiere der Versuchsgruppen: ovx, E2+VD und ovx, E2-VD das in der HRT etablierte E2 in Kombination mit als auch ohne VD. Die Tiere der Gruppen: ovx, +VD und ovx, -VD bekamen neben dem VD keine weiteren Testsubstanzen verabreicht, um die

Auswirkungen einer Ovariectomie hormonell gleichbedeutend mit dem Zustand der Postmenopause beurteilen zu können. Die sieben Ratten der Gruppe intakt, +VD wurden während des Versuchs nicht ovariectomiert und erhielten das Basisfutter mit einer VD-Anreicherung.

Tabelle 1: Versuchsgruppen

Gruppengröße	Gruppe	Futterart
n=7	intakt, +VD	nicht ovariectomiert, Basisfutter mit VD
n=10	ovx, +VD	ovariectomiert, Basisfutter mit VD
n=10	ovx, -VD	ovariectomiert, Basisfutter ohne VD
n=10	ovx, Ecd+VD	ovariectomiert, Basisfutter mit VD und Ecd
n=10	ovx, Ecd-Vd	ovariectomiert, Basisfutter ohne VD mit Ecd
n=10	ovx, E2+VD	ovariectomiert, Basisfutter mit VD und E2
n=10	ovx, E2-Vd	ovariectomiert, Basisfutter ohne VD mit E2

### 2.3 Versuchsablauf

Im Alter von ungefähr drei Monaten wurden die Ratten in die Tierställe des Göttinger Universitätsklinikums geliefert. Nach einer kurzen Eingewöhnungsphase von 12-18 Tagen wurden alle Versuchstiere mit Ausnahme der Ratten der Gruppe intakt, +VD in Isoflurannarkose (Forene®, Abbott, Illinois, USA) ovariectomiert. Zur Identifizierung der einzelnen Tiere wurde den Ratten währenddessen ein Transpondersystem „IPPT-300“

(Emsikon Jung GmbH, Fastinning) subkutan im Bereich des Nackens eingesetzt. Mithilfe eines Lesegeräts (Gesreader II GeS008: ISO-kompatibler Taschenleser) war somit eine eindeutige Zuordnung möglich. Anschließend wurden sie gruppenspezifisch für drei Monate mit den jeweiligen Testsubstanzen gefüttert. Im Rahmen von parallel stattfindenden Untersuchungen osteoporotischer Veränderungen fanden zweimalig q CT-Untersuchungen der lebenden Tiere statt. Zum Ende der Testphase wurden die Ratten obduziert. Unterschiedliche Organe wurden zu Forschungszwecke entnommen und das dabei gewonnene Blut auf bestimmten Serumparameter (z. B. Cholesterin, Leptin und Glukose) untersucht.

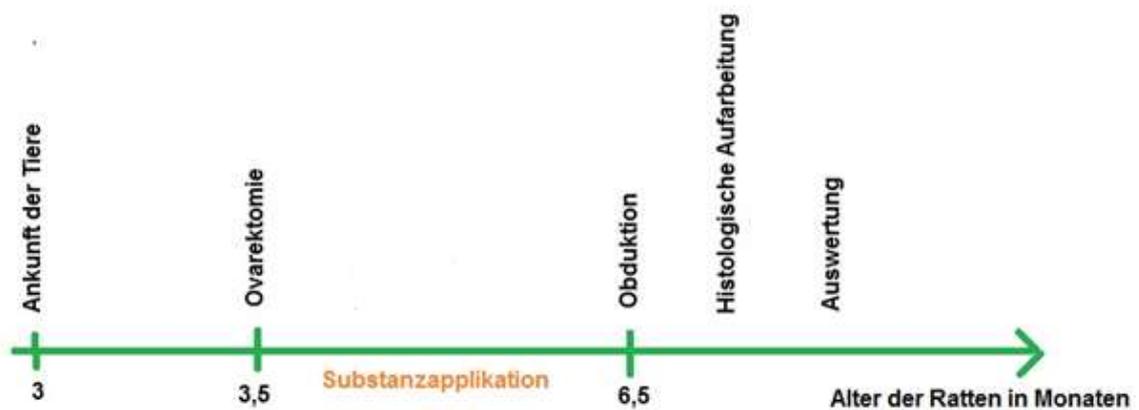


Abbildung 5: Zeitlicher Versuchsablauf

### 2.3.1 Ovarektomie

Unter Inhalationsnarkose wurden den Ratten im Alter von ca. 3,5 Monaten auf beiden Seiten die Ovarien entfernt, um eine endogene Produktion von Östrogenen zu unterbinden. Die postoperative Analgesie erfolgte mit dem nicht-steroidalen Antiphlogistikum Rimadyl. Zur Vorbereitung auf diesen operativen Eingriff wurden die Tiere am Abdomen beidseits rasiert und an selbiger Stelle die Haut anschließend inzidiert. Zur Eröffnung der Bauchhöhle präparierte man schichtweise Muskulatur und Peritoneum voneinander und konnte somit den Uterus mit den Adnexen darstellen. Um die Ovarien besser abklemmen zu können, wurden diese mit dem Uterus kurzzeitig nach außen

verlagert. Die mithilfe einer Pean-Klemme unterbundenen Ovarien wurden anschließend entfernt. Nachdem der Uterus auf mögliche Blutungen kontrolliert worden war, erfolgte die Rückverlagerung in die Bauchhöhle. Muskulatur und Peritoneum wurden mit einer Vicryl®-Naht (Firma Ethicon, Norderstedt) vernäht. Der abschließende Hautverschluss erfolgte mit Michel-Klammern® (Firma Martin, Tuttlingen). Eine Gruppe von sieben Tieren wurde nicht ovariectomiert, sondern diente als intakte Vergleichsgruppe.

### **2.3.2 Applikation der Wirkstoffe**

Nach der Ovariectomie erhielten die Ratten je nach Gruppenzugehörigkeit (siehe Tab. 1) eine unterschiedliche Futterzusammensetzung. Innerhalb der Gruppen wurden die Ratten auf jeweils zwei Käfige zu je fünf Tieren mit ungefähr gleichen mittleren Gewichten aufgeteilt. Die Tiere erhielten entweder ein VD-reiches oder VD-armes Basisfutter. Bei beiden Basisfuttermitteln handelte es sich um sojafreie Experimentalkontrollfuttermittel (EF R/M) ohne sonstige versuchsrelevante Zusätze in 10 mm-Pellets (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest). Die genaue Futterzusammensetzung kann dem Anhang entnommen werden (Tab. 5 und 6). Die weiteren Testsubstanzen Ecd (Changzhou Dahua Corporation, China) mit Spinat (Iglo GmbH, Hamburg) und E2 (Sigma-Aldrich, USA) wurden dem Basisfutter entsprechend angereichert. Die Testsubstanzen wurden ausnahmslos oral, d. h. mit der Futteraufnahme verabreicht. Die Zusammenstellung und Dosis der Testsubstanzen wurde über den Versuchszeitraum nicht geändert. Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme wurde ab dem Zeitpunkt der Ovariectomie bestimmt. Dazu wurde im wöchentlichen Rhythmus das noch vorhandene Futter von der zur Verfügung gestellten Futtermenge subtrahiert und anschließend durch die Anzahl der jeweiligen Tiere und Tage dividiert. Anhand der Futtermenge konnte ebenfalls auf die mittlere aufgenommene Substanzmenge pro Tag geschlossen werden. Die Dosis der einzelnen Extrakte im Futter setzte sich wie folgt zusammen Östradiolbenzoat (E2): 10 mg/kg Futter, Ecd: 3 g/kg Futter angereichert in Spinatpulver: 1 g/kg Futter und VD: 1500 IE/kg Futter. Für Ratten wird eine VD-Dosis von 1000 IE/kg Futter empfohlen (National Research Council 1995). Der Anteil im VD-armen Futter lag bei < 5 IE/kg Futter.

Nach einem Applikationszeitraum von drei Monaten mit den jeweiligen speziellen Extrakten wurde eine zweite q CT-Messung an der Tibiametaphyse durchgeführt, bevor am 8.7.2010 alle Versuchstiere mit Kohlendioxid narkotisiert und dekapitiert wurden.

### **2.3.3 Histomorphologische Aufarbeitung der Gewebe**

Die weitere technische Aufarbeitung der Organe wurde von der Medizinisch-Technischen Assistentin Frau H. Brüggemann-Meyer (Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie der Universität Göttingen) begleitet. Als Doktorandin wurde ich unter ihrer Anleitung mit dem Zuschneiden und Färben der Präparate vertraut. Nach der Obduktion wurden die entnommenen Organe zunächst bei  $-70\text{ °C}$  in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Zur Weiterverarbeitung wurden die Präparate nach dem Auftauen für maximal 72 h in 10 % iger Formalinlösung fixiert. Anschließend wurden die Organe unter fließendem Wasser für 30 min gespült. Bevor die gereinigten Gewebe in Paraffin eingebettet werden konnten, mussten sie aufgrund der hydrophoben Eigenschaft dieses Mediums in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert werden (siehe Tab. 7 im Anhang). Durch Xylol wurde der Alkohol im Verlauf dann wieder entfernt. Anschließend konnten die Organe mithilfe einer Einbettungsmaschine (EG 1140 A, Leica, Solms) in mit flüssigem Paraffinwachs gefüllte Metallschablonen gegeben werden. Zum vollständigen Trocknen der Blöcke wurden diese auf einer Kühlplatte (EG 1140 C, Leica, Solms) gelagert. Für die weitere Verarbeitung wurden die Organblöcke erneut bei  $-20\text{ °C}$  tiefgefroren. Am Mikrotom (RM 2135, Leica, Solms, Fabriknummer: 2794/10.2000, Kat. Nr.: 050029802) konnten das Uterus- und Mammagewebe dann jeweils in  $3\text{-}5\text{ }\mu\text{m}$  dünne Transversalschnitte zugeschnitten werden. Mit besonderer Vorsicht wurden die noch in Paraffin eingebetteten Gewebe in ein warmes Wasserbad zum Strecken gegeben, bevor sie auf Glasobjektträger (SuperFrost® Plus, Menzel GmbH, Braunschweig) aufgezogen werden konnten. Hierbei wurden mittlere unbeschädigte Schnitte favorisiert. Im Anschluss wurden die bestückten Objektträger wiederholt zum Strecken für einige Minuten auf eine Wärmeplatte gelegt. In einem Brutschrank mit einer Innentemperatur von  $37\text{ °C}$  folgte abschließend eine Trocknung für weitere 24 Stunden.

### **2.3.4 Färbemethodik – Hämatoxylin- und Eosin-Färbung (HE-Färbung)**

Zur Darstellung der einzelnen Strukturen und Gewebe wurden diese mit einer HE-Färbung angefärbt. Alle sauren, also basophilen Zellbestandteile wie bspw. Zellkerne, werden durch Hämatoxylin blau angefärbt. Nach einer anschließenden Gegenfärbung erscheinen vor allem die proteinreichen Verbindungen wie das Zytoplasma durch den synthetisch hergestellten Farbstoff Eosin in Rottönen.

Für die Ermittlung eines idealen Färbeschemas bezüglich der einzelnen Zeiten wurden zunächst Probefärbungen durchgeführt. Weitere Einzelheiten zur durchgeführten HE-Färbung sind dem methodischen Anhang in Tab. 8 zu entnehmen. Abschließend wurde jedes Präparat zum Schutz mit einem Deckgläschen.

### **2.3.5 Histologische Auswertung**

Die histomorphologische Auswertung von Uterus- und Mammagewebe fand an einem hochauflösenden Mikroskop der Firma Zeiss (Axiophot, Carl Zeiss AG, Jena) statt. Über eine im Mikroskop integrierte digitale Kamera (Olympus ColorView, Soft Imaging System GmbH, Münster) konnten parallel Aufnahmen gemacht werden. Die Auswertung und Bearbeitung des Fotomaterials am Computerbildschirm erfolgte dann anschließend mithilfe einer Computersoftware analySIS 3.0 (Soft Imaging System GmbH), welche ebenfalls direkt mit Mikroskop und Kamera verbunden war. Die Messergebnisse wurden in Exceltabellen (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation, USA) zusammengetragen. Von jedem Versuchstier wurden jeweils zwei Schnitte bearbeitet.

### **2.3.6 Auswertung Uterus**

Neben den makroskopischen Veränderungen (Uterusgewicht) wurden die einzelnen mikroskopischen Kompartimente wie Epithel, Endo- und Myometrium genauer untersucht. Als Zeichen einer positiven Stimulation durch eine Testsubstanz wurde eine Breitenzunahme angesehen. Die Schichtbreite wurde mithilfe der Abstandsmessfunktion

der analySIS-Software gemessen. Die Epithelausdehnung wurde an jedem der zwei Objektträger pro Ratte mindestens 20-mal gemessen. Für die anschließende statistische Bearbeitung wurden alle 400 Messungen einer Gruppe berücksichtigt. Dabei wurde für die jeweilige Tierauswahl einer Gruppe ein Mittelwert gebildet. Die Auswertungen des Epithels fanden fast ausschließlich bei 50-facher Vergrößerung statt. Wenige Ausnahmen bildeten Präparate mit stark proliferierten Epithelzellen, welche in kleineren Vergrößerungen erfasst wurden.

Die Breite des Endo- sowie Myometriums wurde mit 6,25-facher Vergrößerung ausgemessen. Sowohl Endo- als auch Myometrium wurden pro Objektträger mindestens 15-mal gemessen. Jeder Versuchsgruppe wurden auch hier im Anschluss an das Messen die jeweiligen zugehörigen 300 Werte zugeordnet.

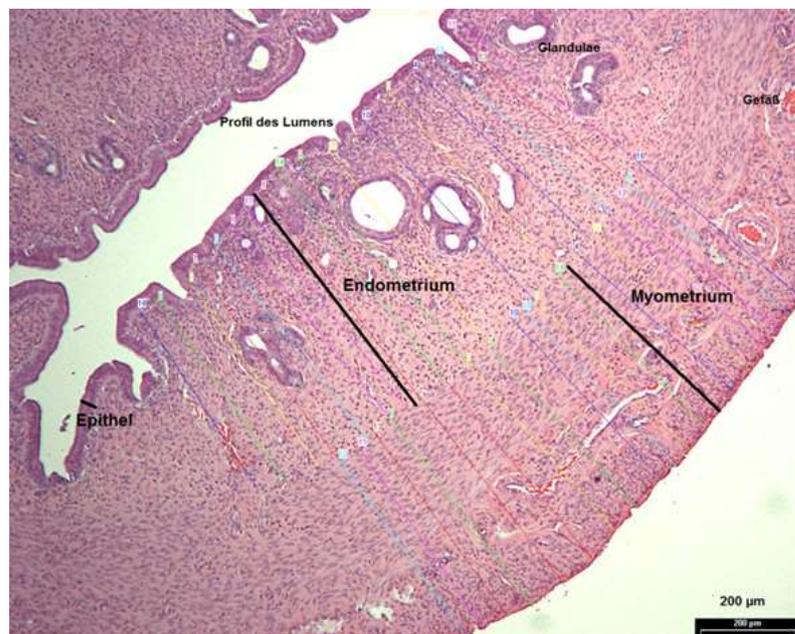


Abbildung 6: Übersicht der einzelnen gemessenen Kompartimente am Ausschnitt eines Rattenuterus im Querschnitt (Messbalken entspricht 200 µm)

### 2.3.7 Auswertung Mamma

Die Aufnahmen vom Mammagewebe erfolgten zunächst in einer 3,125-fachen Vergrößerung. Über das Zusammenfügen mehrerer Einzelbilder konnte das eigentliche Gesamtbild des Gewebequerschnitts dargestellt werden. Anhand dieses Bildes konnte die

Gesamtfläche des Schnitts gemessen werden. Diese Gesamtfläche beinhaltete neben Fettgewebe mit den typischen Strukturen der Mamma wie Duktus und Lb auch Drüsen- und Muskelgewebe. Die ermittelten Strukturen wurden nicht im Verhältnis zum vorhandenen Fettgewebe, sondern zur gesamten Durchschnittsfläche gesetzt. Durch die Vielzahl der Messungen waren dennoch verwertbare Ergebnisse zu erwarten. Für eine übersichtliche Auszählung der mammären Strukturen wie Duktus, Lb 1 und 2 wurde die Gesamtschnittfläche in vier Quadranten aufgeteilt. Unterschiedliche Mikroskop-einstellungen ermöglichten dann ein sicheres Erkennen histologischer Besonderheiten. Die Anzahl der einzelnen Strukturen wurde abschließend ebenfalls in Excel Tabellen zusammengetragen.

Die Bearbeitung der einzelnen histologischen Schnitte von Uterus- und Mammagewebe unter dem Mikroskop erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit der Versuchstiere. Erst im nächsten Schritt wurden die entsprechend nummerierten Objektträger ihren Gruppen zugeordnet.

Die jeweilige Zuordnung der einzelnen histologischen Strukturen richtete sich nach vorbeschriebenen Definitionen aus der Literatur. Als Lb 1 wird eine histologische Struktur ab einem Zusammenschluss von 5-10 Alveolen bzw. Acini bezeichnet. Ein Lb 2 wird mit 11-20 Alveolen beschrieben. Das lichtmikroskopische Korrelat eines Duktus ist eine tubuläre Struktur, welche mit einem ein- oder zweischichtigen Epithel ausgekleidet ist. Für eine bessere Vergleichbarkeit wurden die Strukturen (Duktus, Lb 1 und 2) pro 1 mm<sup>2</sup> dargestellt.

### **2.3.8 Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung und das Erstellen der Graphen wurde mithilfe der Software Graph Pad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, USA) durchgeführt. Alle Messergebnisse aus den Exceltabellen wurden in das Statistikprogramm übertragen und mittels Diagrammen visualisiert. Außerdem wurden die Messungen in den jeweiligen Gruppen gemittelt und der Standardfehler der Mittelwerte (SEM) berechnet. Die jeweiligen Mittelwerte werden im Verlauf in der Regel mit  $\pm$ SEM angegeben. Die

Ergebnisse wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (*one-way-ANOVA*) auf ihre Signifikanz untersucht. Dieses erfolgte unter der Annahme einer Normalverteilung. Das Signifikanzniveau wurde hierbei auf 5 % festgelegt. Ein multipler Vergleichstest nach Dunnett schloss sich der Varianzanalyse an. Verglichen wurden sowohl die jeweiligen Versuchsgruppen mit den intakten Tieren, den Kontrollgruppen (ovx, +VD/-VD), den Gruppen mit Ecd (ovx, Ecd+VD/-VD) und mit E2 (ovx, E2+VD/-VD) als auch die einzelnen Versuchsgruppen untereinander in An- oder Abwesenheit von VD.

Bei allen Messungen wurden einheitlich die gleichen Versuchsgruppenkonstellationen auf Signifikanz getestet. Signifikante Ergebnisse wurden wie folgt gekennzeichnet:

Tabelle 2: Signifikanzlegende

*	vs. intakt, +VD
+	vs. ovx, +VD
°	vs. ovx, -VD
#	vs. ovx, Ecd+VD
~	vs. ovx, Ecd-VD
"	vs. gleiche Gruppe +VD

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Futteraufnahme und Gewichtszuwachs

Über den Versuchszeitraum von Ovariectomie bis Obduktion wurden die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme und der Gewichtsverlauf der Versuchstiere ermittelt (siehe Abb. 7 und 8). Mit Ausnahme der E2 substituierten Tiere nahmen alle ovariectomierten Tiere gegenüber den intakten Tieren eine tendenziell höhere Futtermenge auf. In den Versuchsgruppen ovx, E2+VD/-VD war die tägliche durchschnittliche Futteraufnahme dagegen mit  $12,99 \pm 0,3$  g (ovx, E2+VD) bzw.  $12,18 \pm 0,4$  g (ovx, E2-VD) signifikant geringer als die der intakten Tiere. Gegenüber den Tieren der Versuchsgruppen mit E2-haltigem Futter nahmen die Tiere unter Ecd-Substitution im Mittel 3-4 g/Tier/Tag und damit signifikant mehr Futter auf. Die durchschnittliche Futteraufnahme zwischen den ovariectomierten Kontrolltieren (ovx, +VD/-VD) und den mit Ecd gefütterten Tieren unterschied sich dagegen nicht wesentlich (16,18 g Tag/ Tier). VD führte in Kombination mit Ecd und E2 zu einer tendenziell, aber nicht signifikant gesteigerten Futteraufnahme (siehe Abb. 7).

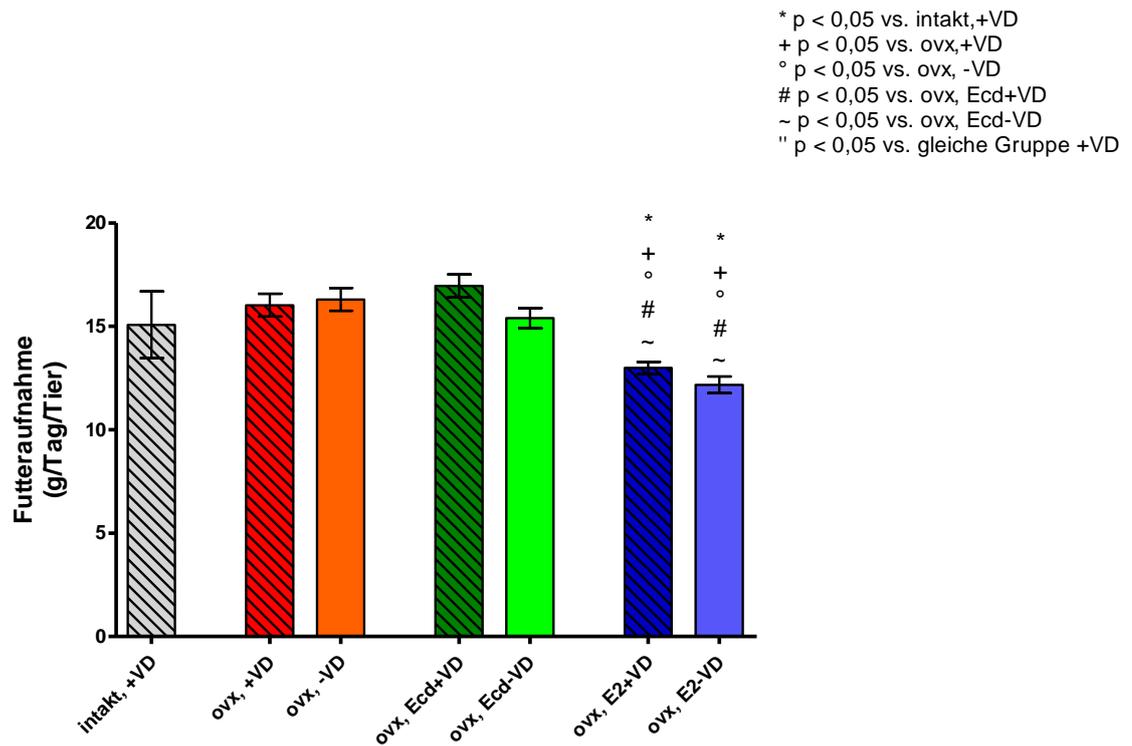


Abbildung 7: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die tägliche Futteraufnahme eines Versuchstieres in g. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler ( $7 \leq n \leq 10$ ; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

Eine genaue Übersicht über die einzelnen Gruppen und die aufgenommenen Substanzmengen bietet folgende Tabelle:

Tabelle 3: Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier

<b>Versuchsgruppe</b>	<b>Substanzaufnahme (Tier/ Tag )</b>
ovx, +VD	24,05 IE VD
ovx, -VD	0,00
ovx, E2+VD	0,130 mg E2 19,5 IE VD
ovx, E2-VD	0,128 mg E2
ovx, Ecd+VD	50,88 mg Ecd 16,9 mg Spinatpulver 25,4 IE VD
ovx, Ecd-VD	46,2 mg Ecd 15,40 mg Spinatpulver
intakt, +VD	22,6 IE VD

Der jeweils positive *Delta Body Weight*-Wert belegt die Gewichtszunahme aller Versuchstiere von der Ovariectomie bis zur Obduktion (siehe Abb. 8). Das durchschnittliche Ausgangsgewicht in den Gruppen zum Zeitpunkt der Ovariectomie betrug 266 g. Die Gewichtszunahme der Versuchsgruppen schwankte zwischen  $20,37 \pm 17,41$  g (ovx, E2-VD) und  $105,9 \pm 16,77$  g (ovx, +VD). Alle ovariectomierten Tiere ohne exogenen E2-Einfluss nahmen signifikant mehr im Vergleich mit den intakten Ratten zu. Der Gewichtsverlauf der unter E2-Substitution stehenden Ratten war mit Ausnahme der intakten Tiere im Vergleich zu allen anderen Versuchsgruppen signifikant unterschiedlich.

Am meisten nahmen die ovariectomierten Kontrollgruppen zu. Die Gewichtszunahme bei den Tieren unter Ecd-Substitution war ebenfalls deutlich. Allerdings führte hier ein VD-Mangel in Kombination mit Ecd zu einer signifikant geringeren Gewichtszunahme im Vergleich zu den ovariectomierten Kontrolltieren sowie zu der Gruppe ovx, Ecd+VD. In den anderen Versuchsgruppen konnte dagegen kein Einfluss durch VD objektiviert werden (siehe Abb. 8).

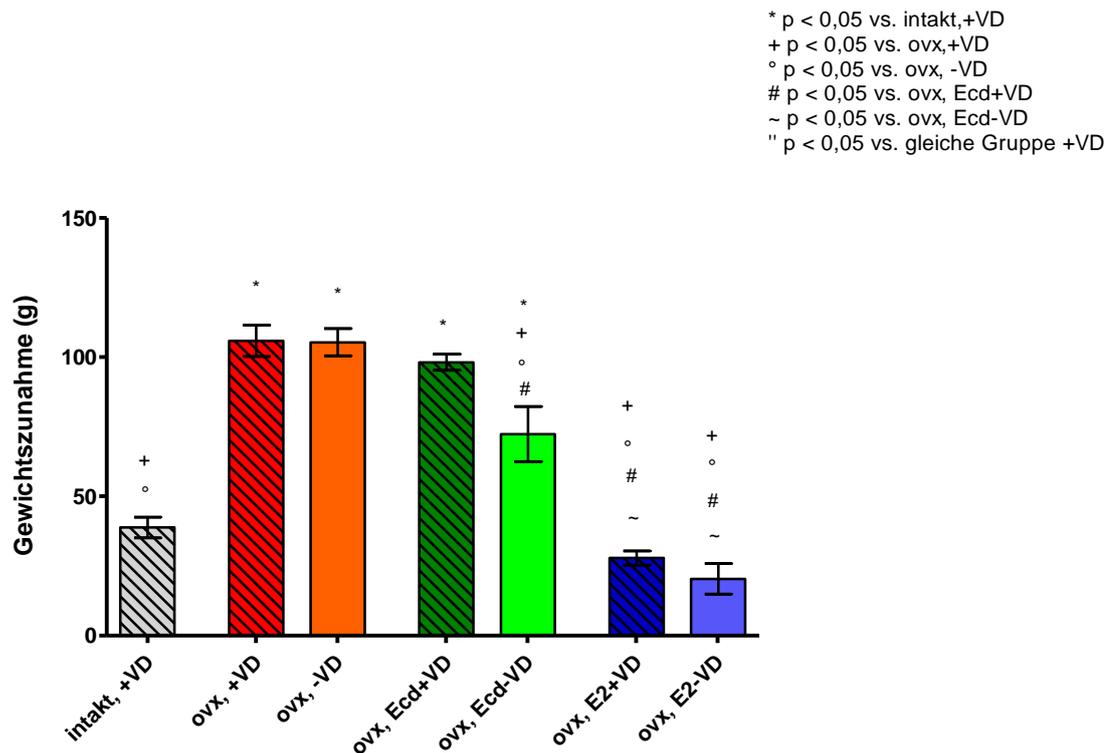


Abbildung 8: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die absolute Gewichtszunahme in g vom Zeitpunkt der Ovariectomie bis zur Obduktion. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler ( $7 \leq n \leq 10$ ; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

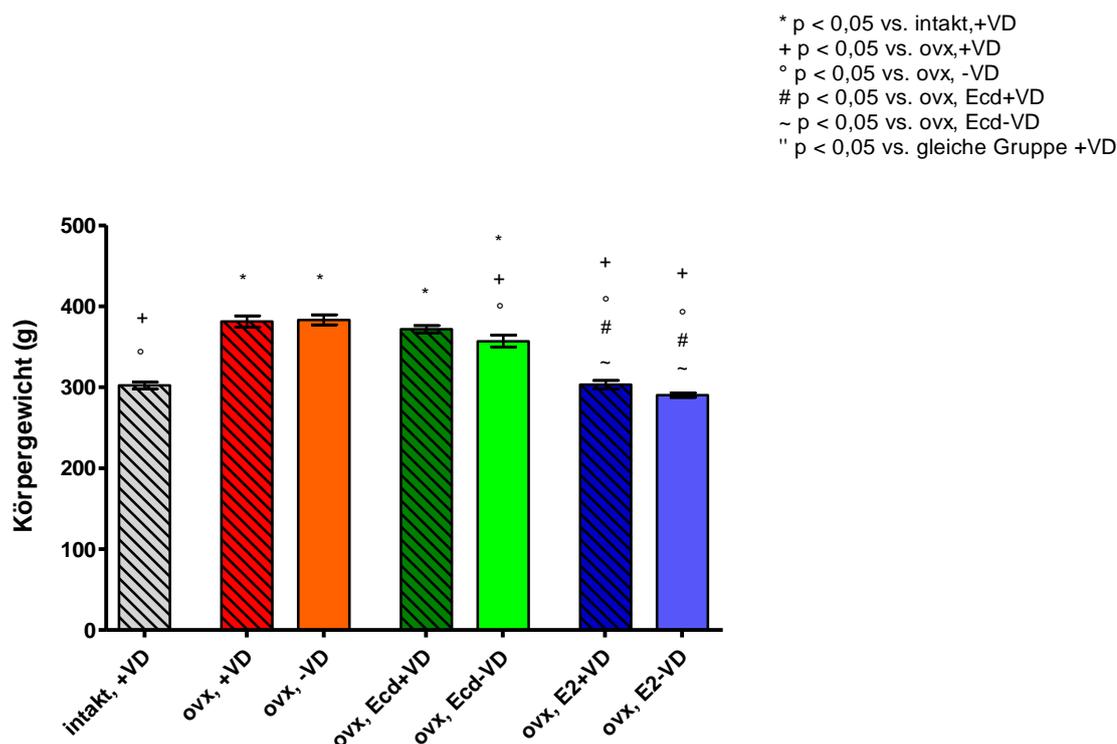


Abbildung 9: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf das absolute Körpergewicht der Ratte in g zum Versuchsende. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler ( $7 \leq n \leq 10$ ; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

Die Darstellung der absoluten Tiergewichte zum Ende des Versuchszeitraums zeigt ähnliche Verhältnisse wie die der Gewichtszunahme. Es ergab sich jedoch kein signifikanter Einfluss in der An- oder Abwesenheit von VD in Kombination mit Ecd (siehe Abb. 9).

Die unter endo- oder exogenem E2-Einfluss stehenden Ratten fraßen pro 1 g Gewichtszunahme im Durchschnitt mit  $35,81 \pm 3,1$  g (intakt,+VD),  $44,78 \pm 3,49$  g (ovx, E2+VD) und  $48,61 \pm 7,34$  g (ovx, E2-VD) deutlich mehr als die Ratten unter Ecd-Substitution bzw. die ovariectomierten Kontrolltiere. Bei diesen nicht unter E2-Einfluss stehenden Tieren führten schon wesentlich geringere Futtermengen zu einer Gewichtszunahme.

Eine VD-Zufuhr zeigte innerhalb keiner Versuchsgruppe signifikante Unterschiede. Auffällig war jedoch in der Ecd-Gruppe, dass die Tiere in einer VD-Mangelsituation unter Ecd-Substitution für eine Gewichtszunahme tendenziell mehr fressen mussten. In der

Gegenüberstellung der Versuchsgruppen unter Ecd- und E2-Therapie zeigte sich mit und ohne VD eine jeweils signifikant höhere Futteraufnahme pro Gewichtszunahme bei den Tieren mit E2-Substitution (siehe Abb. 10).

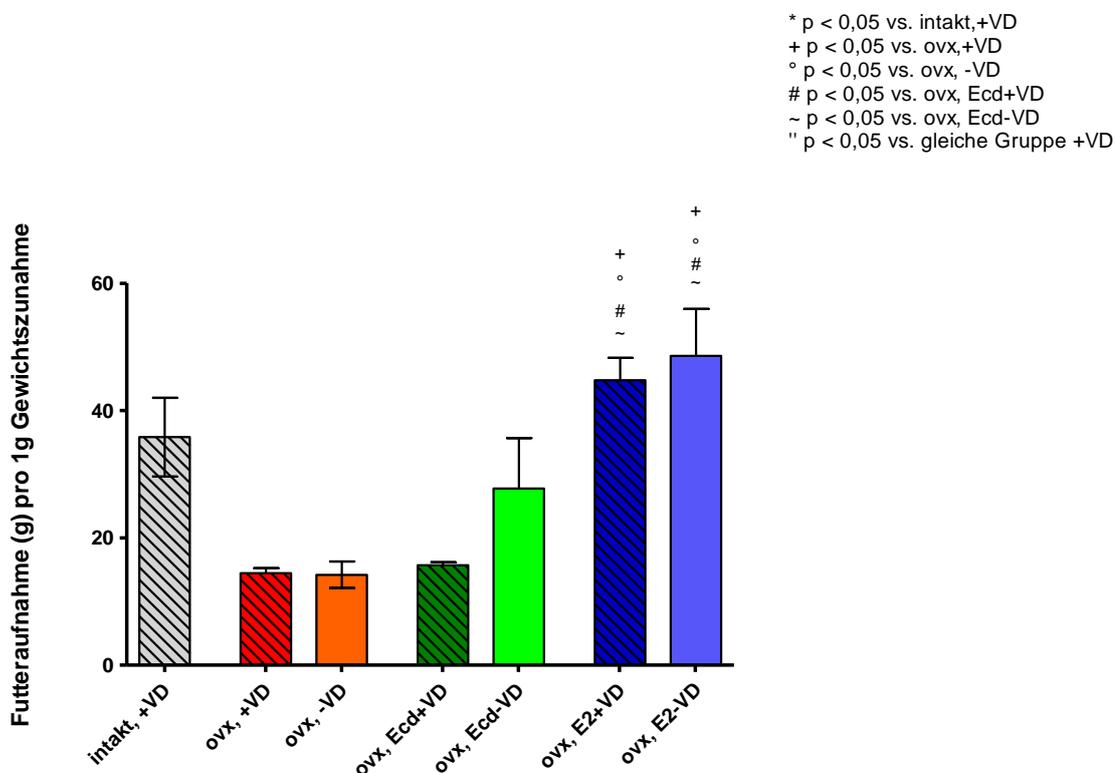


Abbildung 10: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die aufgenommene Futtermenge, die zu 1 g Gewichtszunahme führte. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler (7≤n≤10; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

### 3.2 Uterusgewichte

In Abb. 11 sind die durchschnittlichen absoluten Uterusfeuchtgewichte der jeweiligen Versuchsgruppen abgebildet. Die Rattenuteri waren unter exogener E2-Stimulation gegenüber den anderen ovariectomierten Versuchsgruppen signifikant schwerer. Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zu dem östrogen- und progesteronreichen Milieu der intakten Versuchsgruppe. Die Uterusgewichte der mit Ecd +VD/-VD gefütterten Tiere (durchschnittlich  $0,112 \pm 0,003$  g/  $0,119 \pm 0,004$  g) lagen signifikant unter jenen der mit E2 +VD/-VD gefütterten Ratten (durchschnittlich  $0,571 \pm 0,03$  g/  $0,505 \pm 0,04$  g). Außerdem zeigte eine Ecd-Substitution in Bezug auf das Uterusgewicht keinen

signifikanten Unterschied zu den ovariectomierten Kontrolltieren. In keiner Gruppenkonstellation erbrachte die Kombination mit VD signifikant bedeutsame Ergebnisse (siehe Abb. 11).

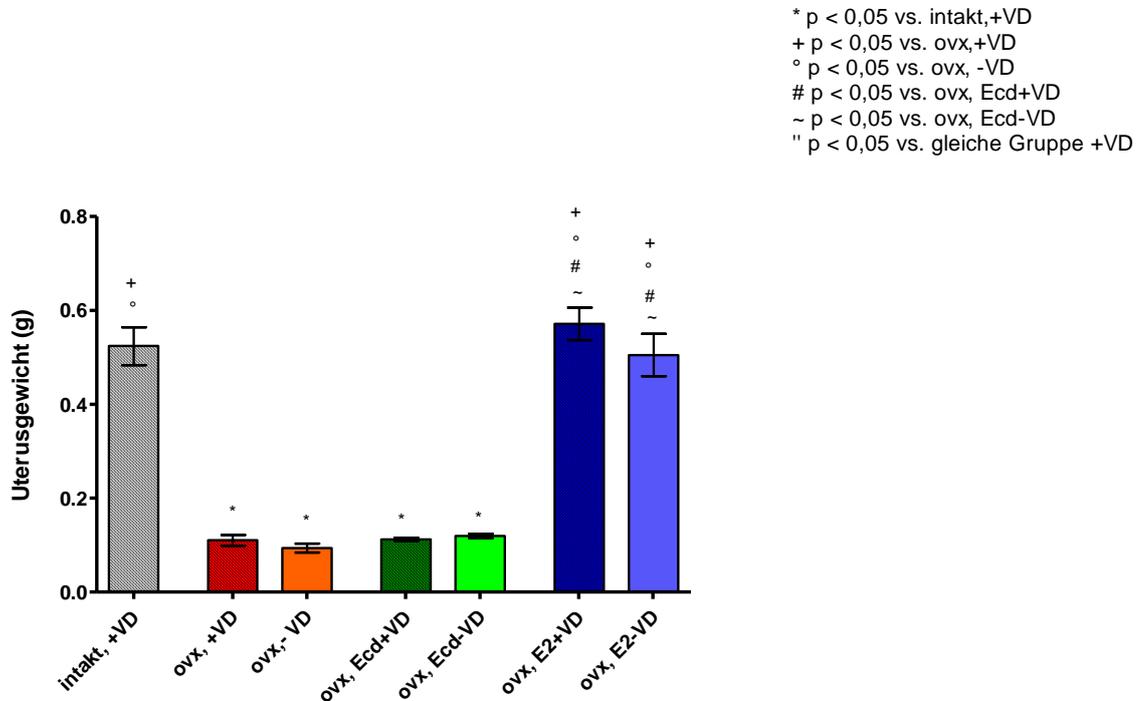


Abbildung 11: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf das absolute Uterusfeuchtgewicht in g. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler ( $7 \leq n \leq 10$ ; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

Die Darstellung der Uterusgewichte in Bezug auf 100 g Körpergewicht zeigt eine ähnliche Verteilung wie die der absoluten Uterusfeuchtgewichte. Auch die statistische Auswertung zeigte keine abweichenden Ergebnisse (siehe Abb.12).

\* p < 0,05 vs. intakt,+VD  
 + p < 0,05 vs. ovx,+VD  
 ° p < 0,05 vs. ovx, -VD  
 # p < 0,05 vs. ovx, Ecd+VD  
 ~ p < 0,05 vs. ovx, Ecd-VD  
 " p < 0,05 vs. gleiche Gruppe +VD

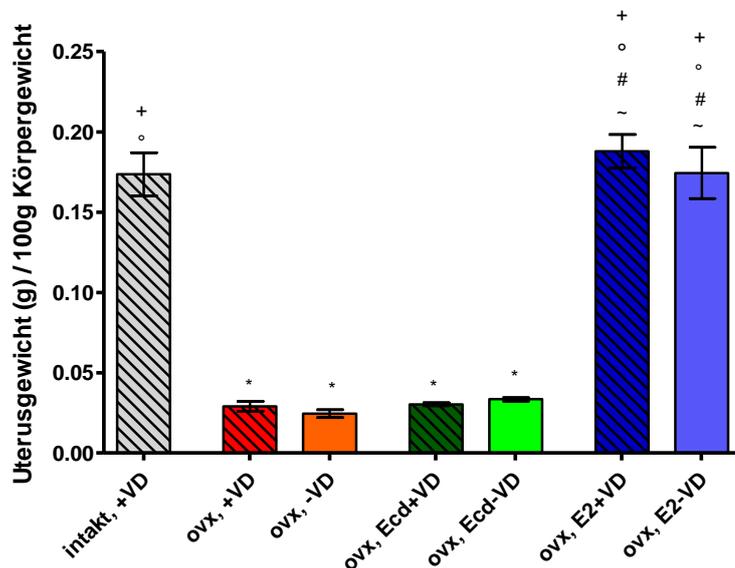


Abbildung 12: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf das Uterusgewicht in Gramm pro 100 g Körpergewicht. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler (7≤n≤10; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

### 3.3 Histomorphometrische Analyse des Uterus

#### 3.3.1 Epithelium

In der histometrischen Analyse der Epitheldicke (siehe Abb. 13) waren sowohl im Vergleich zu beiden ovariectomierten Kontrollgruppen als auch gegenüber den Versuchsgruppen mit Ecd-Substitution sowie unter endo- als auch exogenem E2-Einfluss signifikant höhere Werte zu beobachten. Das breiteste Epithel konnte bei den Tieren der Versuchsgruppe ovx, E2+VD ( $24,91 \pm 2,04 \mu\text{m}$ ) gemessen werden. Die Versuchstiere unter Ecd-Einfluss zeigten keine Zunahme der Epitheldicke im Vergleich zu den ovariectomierten Kontrolltieren (ovx, Ecd+VD:  $10,97 \pm 0,4 \mu\text{m}$ ; ovx, +VD:  $10,67 \pm 0,5 \mu\text{m}$ ; ovx, Ecd-VD:  $9,81 \pm 0,54 \mu\text{m}$ ; ovx, -VD:  $11,2 \pm 0,55 \mu\text{m}$ ). Ein VD-Defizit führte in keiner der Gruppen zu signifikanten Unterschieden.

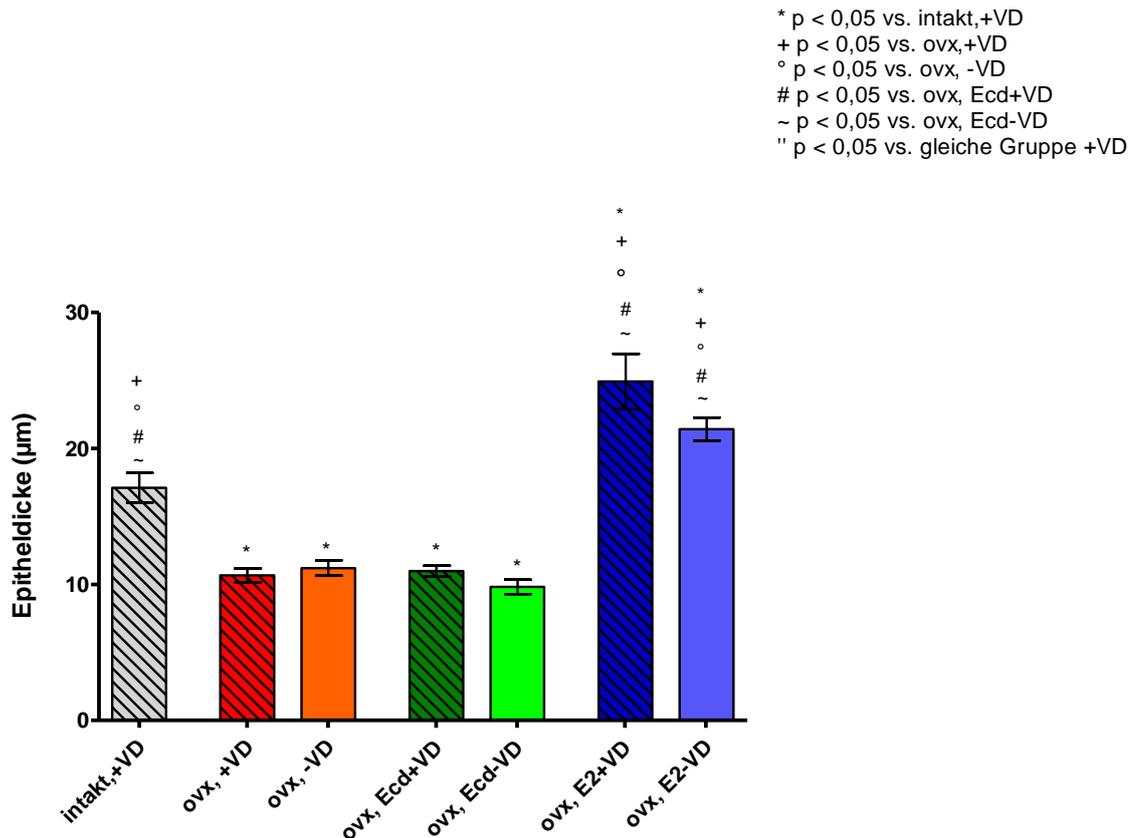


Abbildung 13: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die Epitheldicke (µm) im Uterus. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler ( $7 \leq n \leq 10$ ; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

Bei den histometrischen Messungen fielen zusätzlich morphologische Besonderheiten auf. So zeigte sich das Epithel unter E2-Einfluss hoch proliferativ, teilweise mehrschichtig mit einer Vielzahl von zytoplasmatischen Vakuolen (siehe Abb. 14 G). Diese Vakuolen können als Zeichen für eine rasche Zellproliferation angesehen werden. Bei den ovariectomierten Kontrolltieren (ovx, +VD/-VD) sowie bei den Tieren unter Ecd-Substitution dominierte dagegen ein relativ flaches, homogen imponierendes Epithel mit runden bis ovalen Zellkernen (siehe Abb. 14 B-E).

Die folgenden histologischen Aufnahmen zeigen Epithelausschnitte der einzelnen Uteri der jeweiligen Versuchsgruppen.

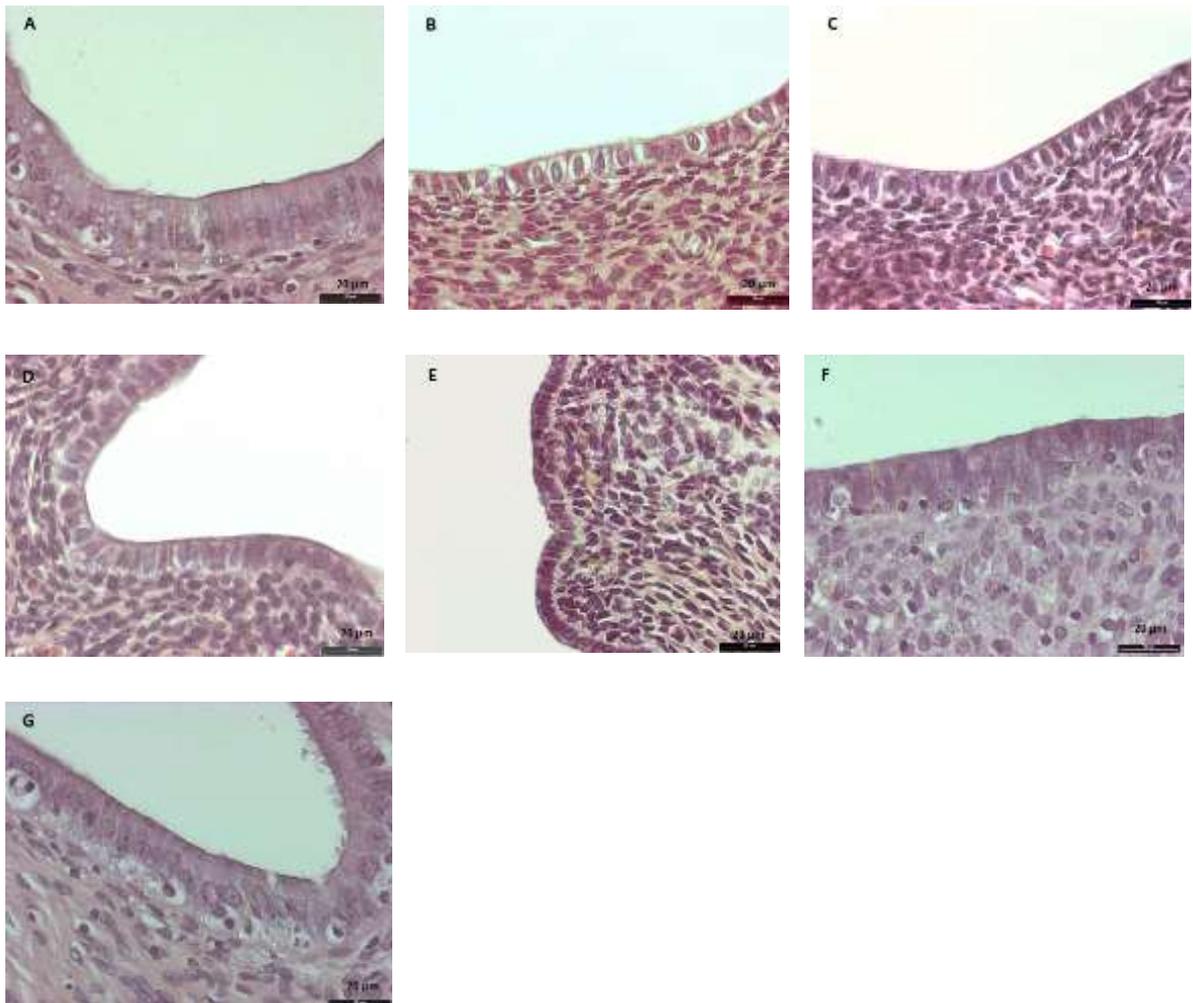


Abbildung 14 A-G: Epitheldicke in den Versuchsgruppen (Messbalken entspricht 20 µm)

A: intakt, +VD: stark stimuliertes hochprismatisches Epithel mit vereinzelter Vakuolenbildung;  
 B: ovx, +VD; C: ovx, -VD; D: ovx, Ecd+VD; E: ovx, Ecd-VD: mäßig stimuliertes einfach kubisches Epithel; F: ovx, E2+VD; G: ovx, E2-VD: hoch stimuliertes hochprismatisches Epithel ebenfalls mit vereinzelter zyto-plasmatischer Vakuolenbildung und multiplen Nucleoli

### 3.3.2 Endometrium

Unter endo- sowie exogenem E2-Einfluss ergab sich ein vergleichbarer Effekt auf das Endometrium wie beim Epithelium. Im Vergleich zur innersten Uterusschleimhaut waren dagegen die Endometriumsmessungen bei den Tieren unter Ecd in Abwesenheit von VD (ovx, Ecd+VD:  $276,9 \pm 11,09 \mu\text{m}$ ) signifikant breiter gegenüber den Kontrolltieren mit VD (ovx, +VD:  $242,3 \pm 7,68 \mu\text{m}$ ). Dieser Unterschied war jedoch deutlich schwächer ausgeprägt als unter E2-Substitution. Die Endometriumsbreite der ovariectomierten Ratten unter exogenem E2-Einfluss war deutlich breiter als die beider unter Ecd

stehenden Versuchsgruppen. Der Einfluss von VD erbrachte wiederholt keine signifikanten Unterschiede innerhalb aller Gruppen (siehe Abb. 15).

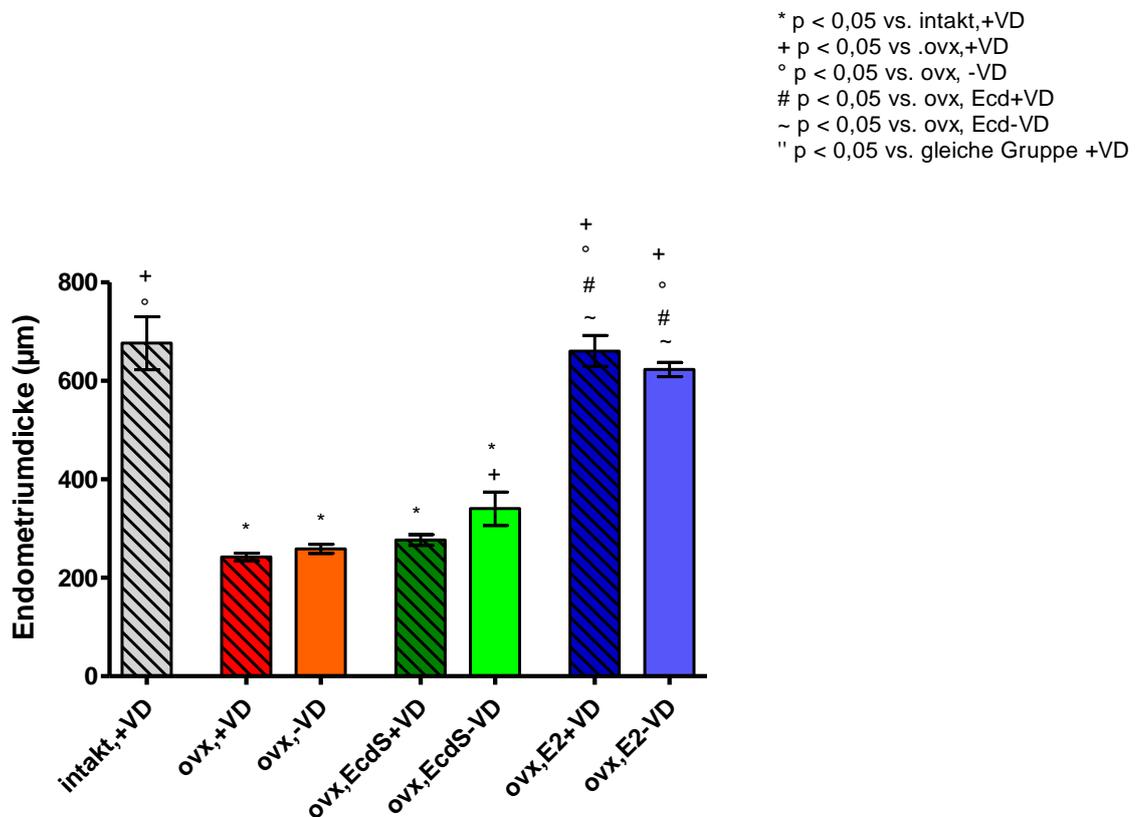


Abbildung 15: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die Endometriumdicke (µm). Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler (7≤n≤10; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

### 3.3.3 Myometrium

Auch in der histometrischen Untersuchung des Myometriums zeigte sich ein vergleichbares Bild unter endo- und exogenem E2-Einfluss wie schon in den anderen beiden Uterusschichten. Wiederholt war der Unterschied zwischen den mit E2 und Ecd substituierten Tieren jeweils mit oder ohne VD signifikant unterschiedlich. Dabei war das Myometrium unter E2 signifikant breiter als unter einer Ecd-Applikation. Das Myometrium der Tiere unter Ecd-Substitution zeigte sich nicht signifikant unterschiedlich zu beiden ovariectomierten Kontrollgruppen. Die Anwesenheit von VD erbrachte ebenfalls keine signifikanten Unterschiede innerhalb der jeweiligen Gruppen (siehe Abb. 16).

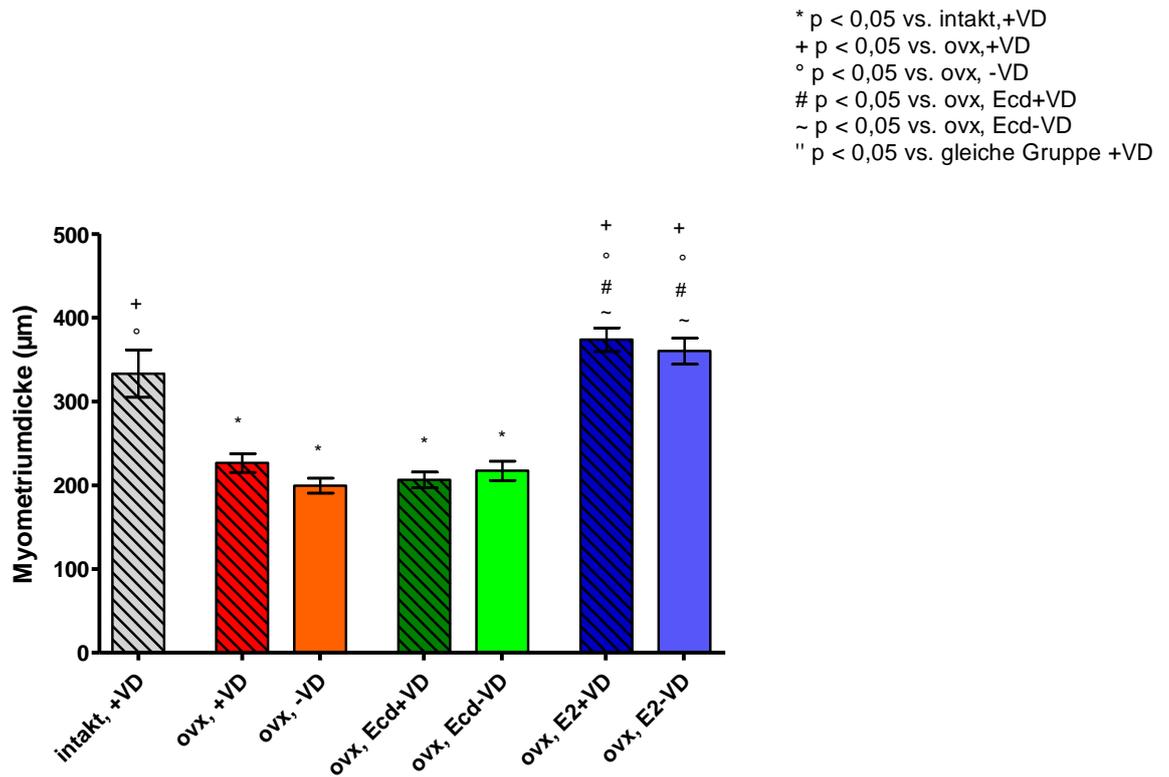


Abbildung 16: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die Myometriumdicke ( $\mu\text{m}$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler ( $7 \leq n \leq 10$ ; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

### 3.4 Histologische Analyse der Mamma

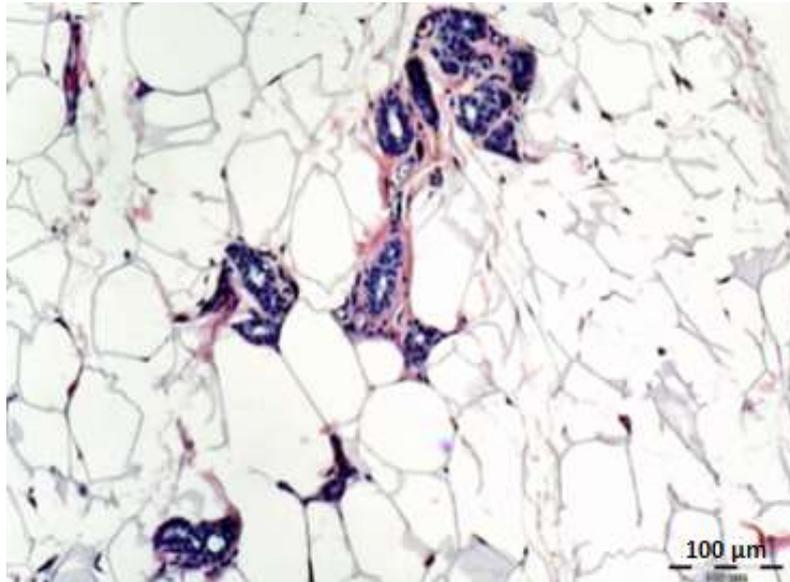


Abbildung 17: Darstellung der einzelnen mammären Strukturen (ovx, -VD): Lobulus 1 (Messbalken entspricht 100 µm)

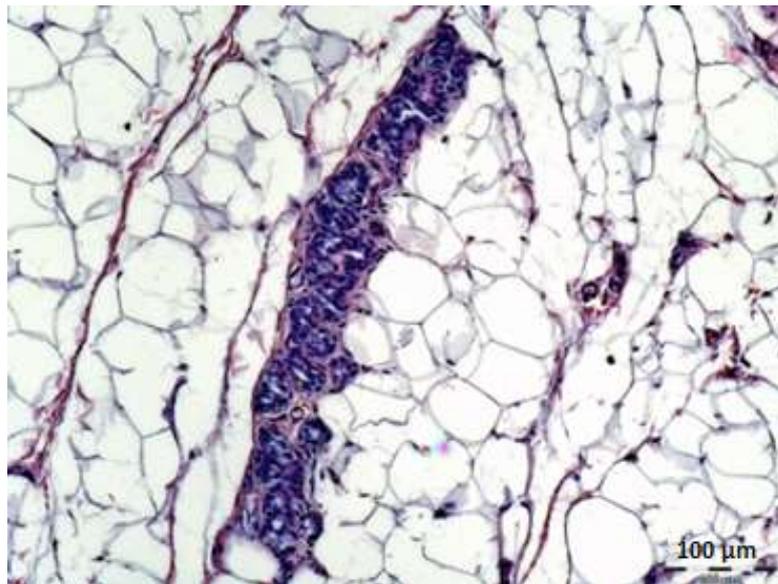


Abbildung 18: Darstellung der einzelnen mammären Strukturen (ovx, -VD): Lobulus 2 (Messbalken entspricht 100 µm)

Die histologischen Einheiten Lb 1 und 2 setzen sich aus einer unterschiedlichen Anzahl von Alveolen bzw. Acini zusammen und unterscheiden sich im Grad der Differenzierung und Proliferationsneigung. Lb 1 besteht aus 5-10 Alveolen (Russo et al. 2001) (siehe

Abb. 17). Ein Zusammenschluss von 10-20 Alveolen wird als Lb 2 definiert (Fritz et al. 1998) (siehe Abb. 18).

Die Ergebnisse der histologischen Auswertung der Brustdrüse beziehen sich jeweils auf die relative Anzahl gemessen auf 1 mm<sup>2</sup> Gewebe.

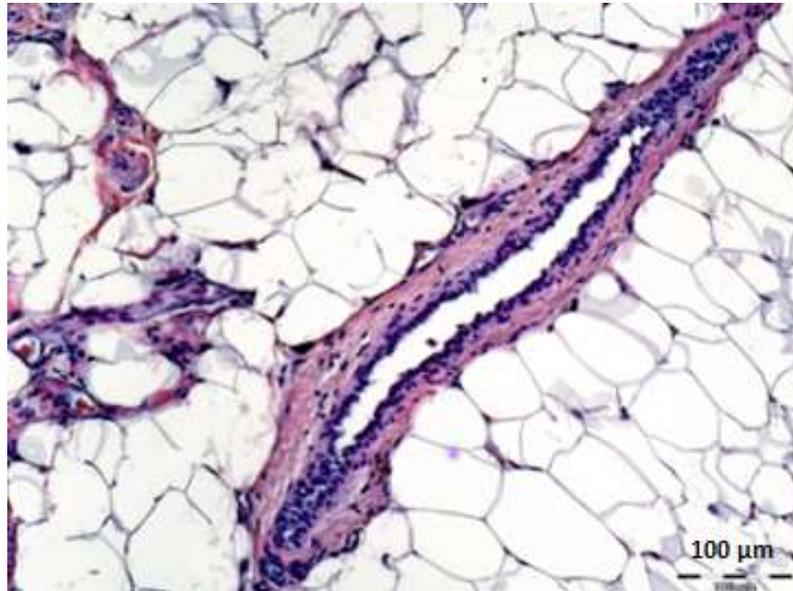


Abbildung 19: Darstellung der einzelnen mammären Strukturen (ovx, -VD): Duktus (Messbalken entspricht 100 µm)

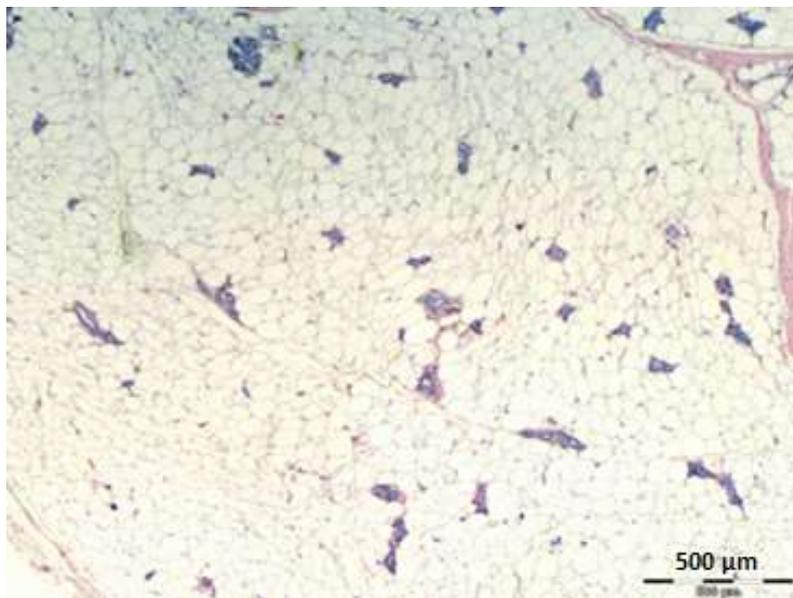


Abbildung 20: Histologische Aufarbeitung von Mammagewebe (ovx, Ecd+VD): relativ wenige epitheliale Strukturen (Messbalken entspricht 500 µm)

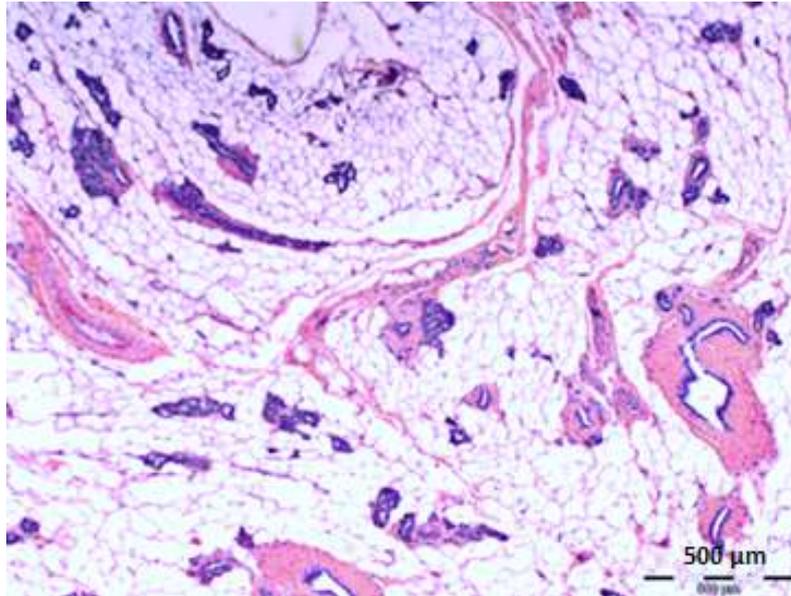


Abbildung 21: Histologische Aufarbeitung von Mammagewebe (ovx, E2+VD): starke Stimulation auf epitheliale Strukturen (Messbalken entspricht 500  $\mu\text{m}$ )

### 3.4.1 Lobulus 1

Im Vergleich sowohl zu den ovariectomierten Kontrolltieren als auch zu den mit Ecd substituierten Tieren waren die Lb 1 pro  $\text{mm}^2$  unter exogenem E2-Einfluss in Anwesenheit von VD signifikant erhöht (siehe Abb. 22). In der Gegenüberstellung der Versuchsgruppen ovx, E2-VD und ovx, Ecd-VD zeigte sich dagegen kein signifikanter Unterschied. Ansonsten verhielt sich der E2-Einfluss ohne VD vergleichbar mit der kombinierten Applikation von E2 und VD. Gegenüber den intakten Tieren zeigte sich die Anzahl der Lb 1 ebenfalls erhöht, wobei dieser Unterschied nur in Kombination mit VD als signifikant anzusehen war.

Unter Substitution von Ecd zeigte sich die Anzahl der Lb 1 nicht signifikant unterschiedlich zu den ovariectomierten Kontrolltieren. Es fiel jedoch eine tendenziell erhöhte Anzahl unter gleichzeitiger VD-Defizienz auf. Ein signifikanter Einfluss von VD innerhalb einer Versuchsgruppe wurde nicht beobachtet (siehe Abb. 22).

\* p < 0,05 vs. intakt,+VD  
 + p < 0,05 vs. ovx,+VD  
 ° p < 0,05 vs. ovx, -VD  
 # p < 0,05 vs. ovx, Ecd+VD  
 ~ p < 0,05 vs. ovx, Ecd-VD  
 " p < 0,05 vs. gleiche Gruppe +VD

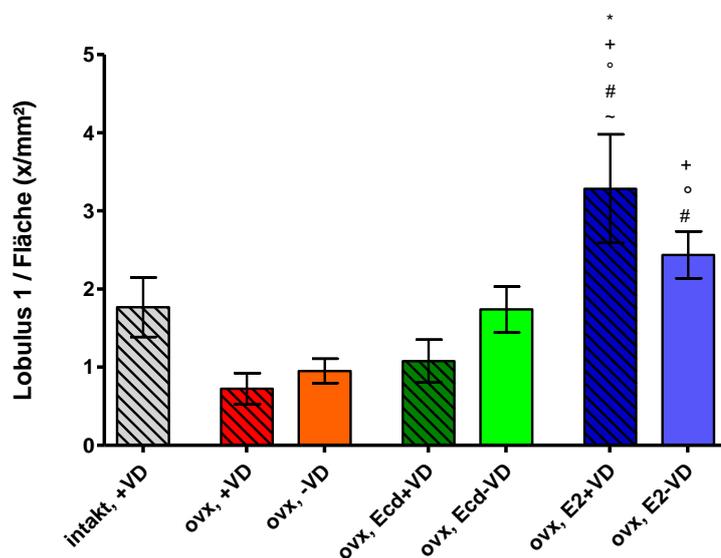


Abbildung 22: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die Anzahl der Lobulus 1 pro 1 mm<sup>2</sup> Fläche. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler (7≤n≤10; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

### 3.4.2 Lobulus 2

Die durchschnittliche Anzahl der Lb 2 pro mm<sup>2</sup> war im Vergleich zu der Anzahl der Lb 1 pro mm<sup>2</sup> in allen Versuchsgruppen deutlich geringer ((z. B.: ovx, +VD: 0,72 ± 0,63 Lb 1/ mm<sup>2</sup> bzw. 0,06 ± 0,07 Lb 2/ mm<sup>2</sup>), vgl. auch Tab. 4, Abb. 22 und 23.). Unter E2- und VD-Substitution kam es bezüglich beider Strukturen zur größten Anzahl an lobulären Strukturen (siehe Tab. 4). Die durchschnittliche Anzahl der Lb 1 pro mm<sup>2</sup> betrug dabei 3,28 ± 2,09. Im Gegensatz dazu beschränkte sich die Anzahl der Lb 2 pro mm<sup>2</sup> unter gleichen Bedingungen auf 0,44 ± 0,51. Lediglich die ovariectomierten Tiere unter E2- und VD-Substitution wiesen signifikant höhere Lb 2-Zahlen im Vergleich zu beiden Kontrollgruppen auf. Einen signifikanten Unterschied im Hinblick auf die Anzahl der Lb 2 gegenüber den intakten Tieren gab es in keiner Versuchsgruppe. Im Vergleich der E2- und Ecd-Tiere untereinander kam es lediglich unter der gleichzeitigen VD-Substitution zu

einem signifikanten Unterschied, wobei hier die gleichzeitige Applikation von E2 mit VD wiederholt stark stimulierend wirkte. Im Gegensatz dazu zeigte sich im direkten Vergleich zwischen Ecd und E2 jeweils ohne VD kein signifikanter Unterschied der Lb 2 pro mm<sup>2</sup>. Der Einfluss von VD war tendenziell eher uneinheitlich und in allen Konstellationen innerhalb der Testgruppen jeweils nicht signifikant (siehe Abb. 23).

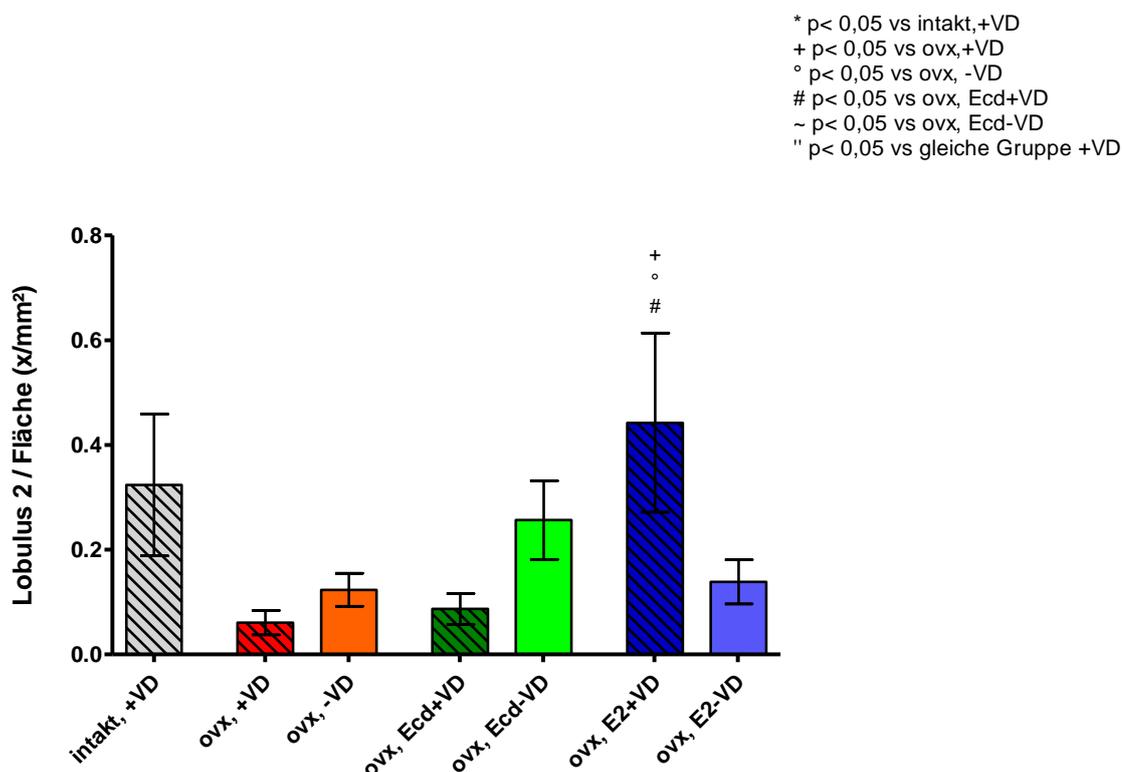


Abbildung 23: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die Anzahl der Lobulus 2 pro 1 mm<sup>2</sup> Fläche. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler (7≤n≤10; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

### 3.4.3 Duktus

Bei den intakten wie auch den Tieren unter E2-Substitution zeigte sich gegenüber den anderen Versuchstieren eine signifikant höhere Anzahl an Duktus (siehe Abb. 24). Die durchschnittliche Anzahl der Duktus pro mm<sup>2</sup> betrug in den jeweiligen Gruppen  $1,78 \pm 0,32$  (intakt, +VD),  $2,0 \pm 0,41$  (ovx, E2+VD) und  $2,0 \pm 0,39$  (ovx, E2-VD) gegenüber den ovariectomierten Kontrolltieren mit durchschnittlich  $0,28 \pm 0,08$  Duktus (vgl. Tab. 4). Der Effekt von Ecd im Hinblick auf die Duktusanzahl erbrachte keine signifikanten Unterschiede gegenüber den ovariectomierten Kontrolltieren. Im Vergleich der mit Ecd

und E2 substituierten Tiere waren die Ergebnisse unabhängig von VD in der E2-Gruppe signifikant höher. Der Einfluss von VD bezüglich der durchschnittlichen Duktusanzahl erwies sich in keiner Konstellation als statistisch relevant (siehe Abb. 24).

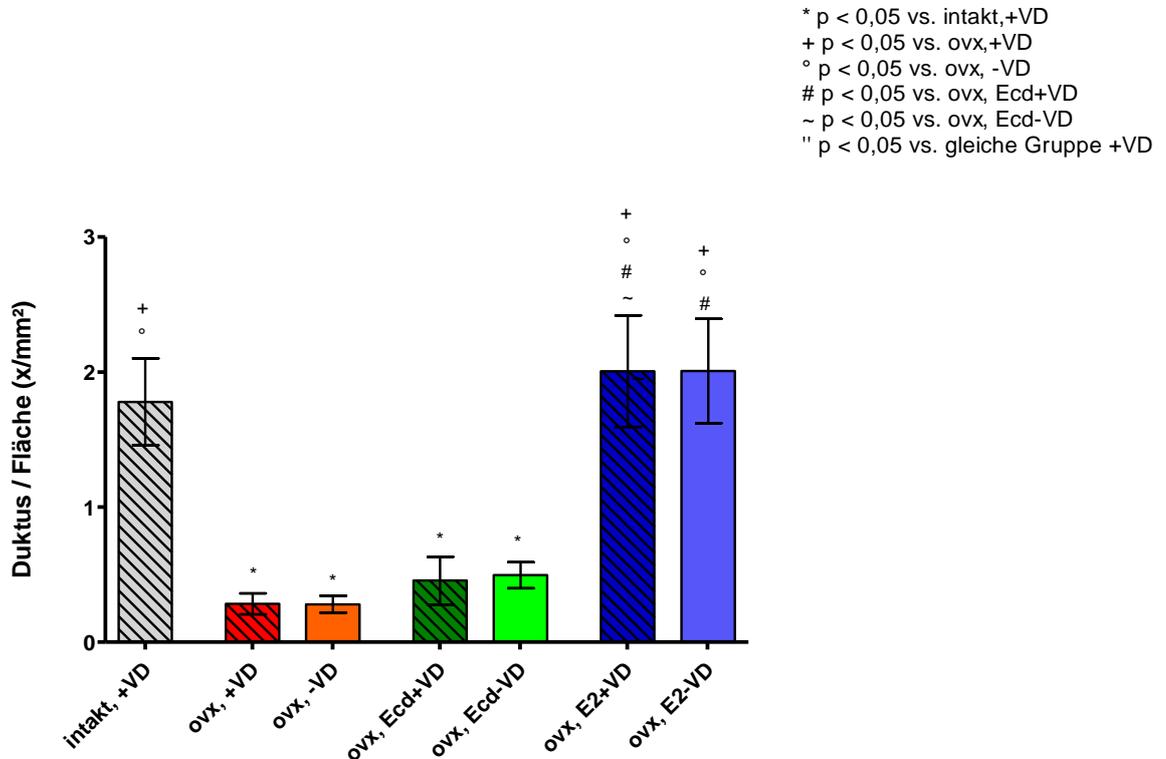


Abbildung 24: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 (3 Monate per Futter) auf die Duktusanzahl pro 1 mm<sup>2</sup> Fläche. Dargestellt sind die Mittelwerte und der Standardfehler (7≤n≤10; one-way-ANOVA und Dunnett-Test).

Die folgende Abb. 25 stellt die prozentualen Verhältnisse der Mammastrukturen in der jeweiligen Versuchsgruppe dar. Dabei ist die gesamte Anzahl aller tatsächlich gezählten Strukturen pro Fläche in der jeweiligen Versuchsgruppe mit 100 % gleichgesetzt. In allen Versuchsgruppen dominierten die lobulären gegenüber den duktalem Strukturen. Unter E2-Einfluss nahm der Anteil der Duktus gegenüber den Lb sichtbar zu. Am eindeutigsten war dies bei den intakten Tieren zu beobachten.

### 3 Ergebnisse

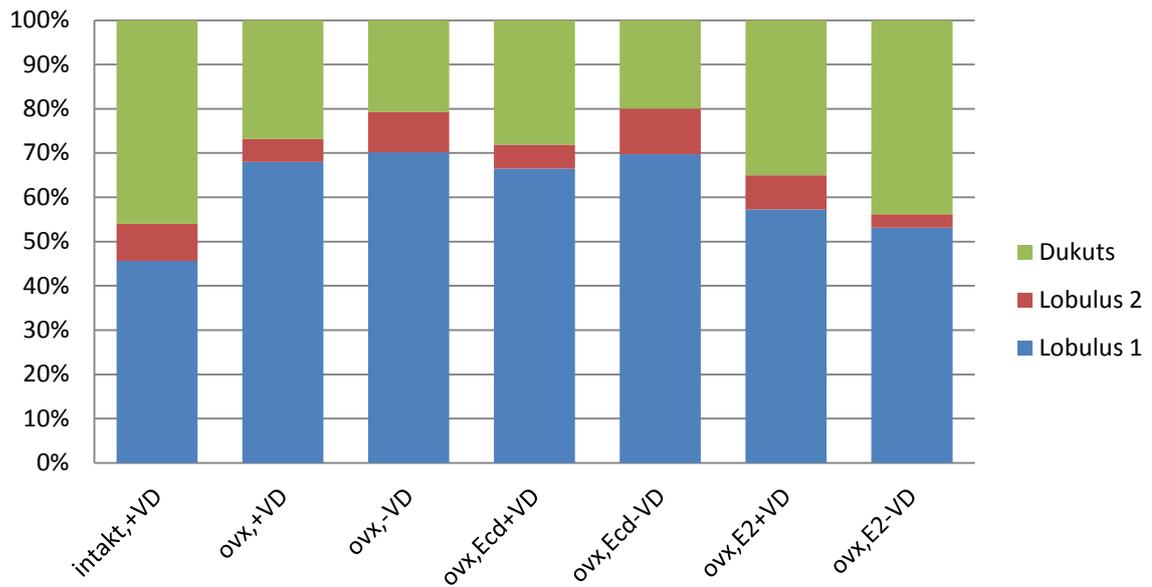


Abbildung 25: Prozentualer Anteil von Lobulus 1/ 2 und Duktus auf die Gesamtanzahl der gezählten mammären Strukturen der jeweiligen Versuchsgruppen

Tabelle 4: Anzahl der einzelnen Strukturen

	intakt, +VD	ovx, +VD	ovx, -VD	ovx, Ecd+VD	ovx, Ecd-VD	ovx, E2+VD	ovx, E2-VD
Lb 1	1,77	0,72	0,95	1,08	1,74	3,28	2,43
Lb 2	0,32	0,06	0,12	0,08	0,26	0,44	0,14
Summe der lobuloalveolären Strukturen	2,09	0,78	1,07	1,16	2	3,72	2,57
Duktus	1,78	0,28	0,28	0,45	0,5	2,01	2,01
Summe der tubuloalveolären Strukturen	3,78	1,06	1,35	1,61	2,5	5,73	4,58

## 4 Diskussion

### 4.1 Postmenopause und klassische Hormonsubstitution im Tierversuch

Die ovariectomierten SD-Ratten erwiesen sich im vorliegenden Versuch als geeignetes Tiermodell zur Untersuchung einer mit der Postmenopause der Frau vergleichbaren Situation:

Eine gesteigerte Nahrungsaufnahme nach Ovariectomie ist in Untersuchungen an Ratten und Mäusen bereits gezeigt worden (Roesch 2006). Dieser Effekt bestätigte sich bei den ovariectomierten Tieren des vorliegenden Versuchs. Lediglich unter E2-Substitution ergab sich eine signifikant geringere Nahrungsaufnahme gegenüber den Vergleichstieren, was ebenfalls im Einklang mit bisherigen Forschungsergebnissen steht (Santollo et al. 2013).

Über den Versuchszeitraum nahmen alle Ratten an Gewicht zu. Dass eine Ovariectomie nicht nur zu einer höheren Futtermittelaufnahme, sondern auch zu einer gesteigerten Gewichtszunahme gegenüber Kontrolltieren führt, ist bereits früh beschrieben worden (Wade et al. 1985; Richard 1986). Ursächlich hierfür ist eine Fettsäureakkumulation (Poehlman et al. 1995). Dementsprechend verzeichneten die ovariectomierten Tiere (ovx, +VD/-VD) im vorliegenden Versuch die stärkste Gewichtszunahme gegenüber den intakten Kontrolltieren.

E2 ist in der Lage, diesem Effekt entgegenzuwirken (Zoth et al. 2010), folglich nahmen die Versuchstiere unter E2-Substitution im Vergleich zu den anderen Ratten signifikant am wenigsten an Gewicht zu. Auch bei postmenopausalen Frauen konnte durch eine HRT mit E2 eine positive Wirkung auf die Entwicklung eines Übergewichts belegt werden (Gambacciani et al. 1997; Salpeter et al. 2006).

Der Gewichtszuwachs im Verhältnis zur Futtermittelaufnahme kann als Parameter für den metabolischen Umsatz angesehen werden. Da ein hoher Grundumsatz als ein protektiver Faktor im Zusammenhang mit der Entwicklung gynäkologischer Tumoren wie Endometrium- (Cust 2011) und Mammakarzinom (Gao et al. 2009) gilt, wäre hier ein positiver Einfluss nach Ovariectomie bzw. in der Postmenopause der Frau von Vorteil.

Unter E2-Substitution nahmen die Versuchstiere signifikant mehr Futter pro 1 g Gewichtszuwachs auf als die ovariectomierten Kontrollen und die unter Ecd-Einfluss stehenden Tiere, sie zeigten somit einen erhöhten Grundumsatz. In dieser Beobachtung spiegeln sich bekannte positive Effekte einer E2-Substitution auf den Energiestoffwechsel wider, welche sich auch in einer günstigen Beeinflussung z. B. des Metabolischen Syndroms äußern.

Dieser Aspekt von E2 mag auf das Gesamtrisiko der Entwicklung gynäkologischer Tumoren Einfluss haben, jedoch spielt die direkte hormonelle Wirkung auf die hormonsensiblen Zielorgane hierbei wohl die entscheidende Rolle.

#### **Uterus:**

Im vorliegenden Versuch konnte ein uterotropher Effekt bei den mit E2 substituierten Tieren im Sinne von signifikant erhöhten Uterusgewichten beobachtet werden. Dies spiegelt Ergebnisse aus Voruntersuchungen gemäß dem *Uterotrophic Assay* für Nager der OECD wider (Owens et al. 2003; Kanno et al. 2003).

Ebenso führte E2 in allen Kompartimenten zu einer signifikant breiteren jeweiligen Schichtdicke im Vergleich zu den Kontrolltieren (ovx, +VD/ -VD). Dabei waren Epithel und Endometrium gegenüber den ovx, +VD Tieren ungefähr gleichstark verdickt. Beim Myometrium war der Einfluss von E2 zwar noch signifikant, aber nicht so stark ausgeprägt. Dies deckt sich mit Ergebnissen anderer Arbeiten (Seidlová-Wuttke 2004). Möglicherweise wird der ER im Epithel und Endometrium gegenüber dem Myometrium vermehrt exprimiert, sodass es hier zu einer deutlicheren Stimulation unter E2 kommt. Ob es sich hierbei um eine Größenzunahme infolge einer Hyperplasie oder Hypertrophie handelte, war durch die angewandte Methodik nicht eindeutig zu bestimmen. Zu Beginn einer Stimulation führt E2 zunächst durch eine Ödematisierung des Uterusgewebes zu einer Größenzunahme im Sinne einer Hypertrophie (He et al. 2013). Darüber hinaus kann E2 im Uterusepithel von Ratten zu einer verstärkten Zellteilung, d. h. einer Hyperplasie führen und hat somit auch mitogene Eigenschaften (Zhang et al. 1998; Groothuis et al. 2007). Als hinweisend auf eine mögliche Zellproliferation bei den untersuchten Tieren könnten die auffällig vielen zytoplasmatischen Vakuolen (siehe Abb. 14 G) unter E2-Einfluss in den Epithelzellen gesehen werden (Rimoldi et al. 2007).

Durch das östrogen- und progesteronreiche Milieu war das Epithel und Endometrium der intakten Tiere signifikant breiter im Vergleich zu den ovariectomierten Kontrollgruppen, wobei die intakte ovarielle Funktion zu einer signifikant geringeren Epitheldicke als bei den Tieren unter exogener E2-Stimulation führte. Die Endometriumdicke war in beiden Gruppen dagegen nahezu gleich. Möglicherweise ist dies über einen stärkeren protektiven Progesteroneinfluss auf das Epithel gegenüber dem Endometrium zu erklären. Eine Protektion, die nach Ovariectomie bzw. in der Postmenopause verloren geht.

Bei den ovariectomierten-Kontrolltieren führte der fehlende E2-Einfluss erwartungsgemäß zu einer Atrophie von Epithel-, Endometriums- und Myometriumszellen.

**Mamma:**

In der Verteilung der lobuloalveolären Strukturen zeigte sich die Anzahl der Lb 1 pro mm<sup>2</sup> bei allen Versuchstieren gegenüber den differenzierteren Lb 2 erhöht. Ein Zusammenschluss von 5-10 Alveolen bzw. Acini ist definiert als Lb 1 (Russo et al. 2001). Lb 2 setzt sich aus 10-20 Alveolen zusammen (Fritz et al. 1998). Erwartungsgemäß wurden bei keiner der nulliparen Ratten Lb 3 beobachtet, da diese nur während einer Schwangerschaft bzw. unter einer damit vergleichbaren hohen kurzzeitigen E2-Exposition ausgebildet werden (Russo und Russo 2008). Dieses Verteilungsmuster deckt sich mit anderen experimentellen Studien an Ratten und ist ebenfalls bei nulliparen Frauen jeden Alters oder bei postmenopausalen Frauen zu beobachten (Russo und Russo 1996; Russo et al. 2001).

Bei den ovariectomierten Tieren als Modell der postmenopausalen Situation ohne endo- oder exogenen E2-Einfluss fiel eine verminderte Anzahl aller epithelialen Strukturen in der Brustdrüse auf. Dies könnte im Sinne einer Involution der mammären Epithelien nach Erliegen der ovariellen Funktion gedeutet werden:

Mit Beginn der Postmenopause kommt es bei der Frau zu einer schrittweisen Umstrukturierung der Brustdrüse. Diese ist gekennzeichnet durch eine epitheliale Strukturrückbildung und eine Zunahme an interstitiellem Bindegewebe (Sohn et al. 2001). Das Phänomen der Involution ist in humanen (Henson und Tarone 1993; Russo et al. 2007) und in tierexperimentellen Untersuchungen nachgewiesen worden (Russo und

Russo 1996; Masso-Welch et al. 2000), der genaue Mechanismus ist jedoch noch ungeklärt (Sohn et al. 2001; Khodr et al. 2014; Figueroa et al. 2014).

Ein histologisches Korrelat für das Ausmaß dieser Involution ist nicht klar definiert. Die Anzahl der Acini pro Flächeneinheit als Parameter für noch vorhandene epitheliale Strukturen ist in der Literatur jedoch wiederholt beschrieben worden und diente im vorliegenden Versuch ebenfalls als Grundlage (Milanese et al. 2006; Figueroa et al. 2014).

Die exogene E2-Exposition führte bei den ovariectomierten Ratten zu einer erhöhten Anzahl von Lb 1 sowohl gegenüber den ovariectomierten als auch den intakten Kontrolltieren. Lb 2 waren unter E2-Substitution gegenüber den ovariectomierten Kontrolltieren ebenfalls erhöht, jedoch war dieser Unterschied lediglich unter VD-Kombination signifikant. Dies erklärt sich durch eine höhere E2-Sensitivität niedrig differenzierter Lb 1 (Russo et al. 2001).

Der tatsächliche E2-Einfluss auf die lobuloalveolären Strukturen scheint dabei weniger einen stimulierenden, differenzierungsfördernden Charakter zu haben, sondern beruht eher auf einer Hemmung von Apoptose und damit einer verminderten Involution nach der Menopause bzw. Ovariectomie (Khodr et al. 2014).

Dieser Effekt durch E2 auf die lobuloalveolären Strukturen ovariectomierter Ratten kann womöglich mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung gesetzt werden (Rimoldi et al. 2007). Auch bei der Frau steht eine verminderte Involution von lobulären Strukturen im Verdacht, das Brustkrebsrisiko zu steigern (Milanese et al. 2006; Figueroa et al. 2014).

Der endogene E2-Einfluss bei den intakten Tieren führte durch das dementsprechende Ausbleiben einer Involution ebenfalls zu höheren Anzahlen lobuloalveolärer Strukturen im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren, jedoch blieben diese hinter denen der mit E2-substituierten Tiere zurück. Somit könnte zusätzlich zur verzögerten Involution auch von einem direkt proliferationsfördernden Effekt von E2 ausgegangen werden, wobei auch ein dosisabhängiger Effekt und der zusätzliche Einfluss von Gestagen bei den intakten Tieren zu berücksichtigen sind.

Direkt proliferations- oder differenzierungsfördernde Auswirkungen hat E2 im Brustgewebe im eigentlichen Sinne nur auf die duktal-epitheliale Strukturen (Russo und

Russo 1996). Die duktaalen Strukturen waren dementsprechend unter endo- wie exogener E2-Stimulation gegenüber den ovariectomierten Tieren sowohl absolut als auch im Verhältnis zu den lobuloalveolären Strukturen signifikant stärker ausgeprägt. Dies steht im Einklang mit früheren Beobachtungen (Cardy 1991; Lucas et al. 2007).

Bei den ovariectomierten Tieren kam es dagegen in allen Gruppen ohne E2-Einfluss zu einem eindeutig verminderten duktaalen Anteil im Verhältnis zu den lobulären Strukturen. Diese Beobachtung unterstreicht nochmals die stimulierende Wirkung von E2 auf das duktaale Wachstum (Silberstein 2001; Sternlicht 2006).

Die Beschreibung tatsächlicher dynamischer Veränderungen in den Brustdrüsen der Versuchstiere im Sinne einer voranschreitenden oder ausbleibenden Involution ist jedoch aufgrund eines fehlenden zeitlichen Vergleichswerts spekulativ. Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsgruppen konnten lediglich untereinander verglichen und im Hinblick auf eine mögliche dynamische Tendenz vor dem Hintergrund bestehender wissenschaftlicher Erkenntnisse diskutiert werden.

## **4.2 Alternative Therapie mit Ecdyson**

Bisher konnte in Geweben von Säugetieren kein EcR beschrieben werden. Es gibt jedoch zahlreiche Hinweise darauf, dass Ecd sehr wohl unterschiedliche Effekte im Säugetierorganismus hat. Bei Arthropoden und Schmetterlingen heterodimerisiert der EcR mit dem Protein USP. Das Homolog für USP beim Menschen ist der RXR, welcher daher möglicherweise eine Schlüsselrolle für die Wirkweise von Ecd spielt (Lafont und Dinan 2003).

Bezüglich der Gewichtszunahme zeigte sich unter alleiniger Ecd-Substitution ein vergleichbar günstiger Effekt wie unter einer E2-Therapie. Im Vergleich zu beiden ovariectomierten Kontrollgruppen (ovx,+VD/-VD) zeigte sich der Gewichtszuwachs unter alleiniger Ecd-Substitution signifikant geringer. In Kombination mit VD war dieser Unterschied hingegen kaum erkennbar. Innerhalb der Ecd-Gruppe führte VD ebenfalls zu einem signifikanten Unterschied. Dieser Effekt von Ecd ist nicht vorherbeschrieben, allerdings wurde Ecd bisher auch nicht im Rahmen eines (manifesten) VD-Mangels getestet.

Die Futteraufnahme der mit Ecd substituierten ovariectomierten Ratten war vergleichbar zu jener der ovariectomierten Kontrolltiere. Der deutlich geringere Gewichtszuwachs unter Ecd-Monotherapie spricht daher für eine günstigere Stoffwechsellage, vergleichbar mit jener der ovariectomierten Tiere unter E2-Therapie.

Im Vergleich zu den intakten Tieren nahmen die ovariectomierten Ratten unter Ecd-Substitution sowohl in Kombination mit VD als auch in Monotherapie jedoch signifikant mehr an Gewicht zu. Eine Gewichtszunahme unter Ecd-Substitution ist in der Regel begründet durch eine Zunahme der Muskelmasse und eine Abnahme des Körperfettanteils (Wuttke und Seidlová Wuttke 2011; Wuttke und Seidlová-Wuttke 2013), wohingegen ovariectomierte Ratten ohne Hormonsubstitution eine Gewichtszunahme mit verringerter Muskelmasse (Sarkopenie) und erhöhtem Körperfettanteil entwickeln (Wade et al. 1985; Tagliaferri et al. 2015). Zu diesem Aspekt liegen qCT-Daten sowie histologische Untersuchungen aus der gleichen Versuchsreihe vor. Diese dokumentieren geringere paratibiale Fettanteile und eine vergrößerte Muskelfläche unter Ecd-Substitution (Dannenbergh 2013). Da sich die paratibialen Fettanteile annähernd proportional zu den abdominalen Fettdepots verhalten, sind sie als sensitiver Surrogatparameter anerkannt (Seidlová-Wuttke et al. 2003; Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Insgesamt ist also ein positiver Effekt von Ecd auf den Fettstoffwechsel zu verzeichnen. In diesem Zusammenhang ist auch ein günstiger Einfluss von Ecd auf die Entwicklung eines Metabolischen Syndroms im Tiermodell wie auch beim Menschen zu sehen (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

Dieser positive Effekt von Ecd in Monotherapie, d. h. in diesem Fall ohne VD, auf den Gewichtsverlauf bei SD-Ratten ist in dieser Form erstmalig beschrieben worden. Unter einer kombinierten Ecd- und VD-Substitution kam es diesbezüglich ebenso wie in Vorversuchen zu keinem signifikanten Unterschied gegenüber der ovariectomierten Kontrollgruppe (Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

In anderen tierexperimentellen Studien an Mäusen führte eine orale Ecd-Applikation in Verbindung mit einer hochkalorischen Diät zu einer geringeren Gewichtszunahme als bei den Tieren mit einer rein hochkalorischen Nahrung, allerdings gilt zu beachten, dass bei diesen Tieren zusätzlich zum Ecd auch die endogene E2-Produktion Einfluss auf den

Gewichtsverlauf genommen haben dürfte. Mittels einer Dual-Röntgen-Absorptiometrie konnte bei diesen Versuchstieren ebenfalls ein deutlich geringerer Fettgewebeanteil unter Ecd-Substitution gemessen werden. Möglicherweise spielt eine in Rattenhepatozyten gezeigte Reduzierung der Blutzuckerspiegel über einen PI3K-Signalweg durch Ecd eine Rolle (Kizelsztejn et al. 2009). Insgesamt erscheint Ecd in Bezug auf Körpergewicht und Stoffwechsellage als geeignete Therapieoption im Klimakterium.

Der Einfluss diätetischer und metabolischer Faktoren auf die Karzinogenese ist in Tier- und Menschenstudien etabliert worden (Russo et al. 1990; Hursting und Dunlap 2012). So kann eine kalorienreiche Nahrung, insbesondere durch einen hohen Fettanteil, bei Ratten zu einer gehäuften Inzidenz und einer reduzierten Latenz von Tumoren der Mamma führen (Russo et al. 1990). Auch bei postmenopausalen Frauen konnte ein Zusammenhang diesbezüglich gezeigt werden (Thiébaud et al. 2007). Ein direkter Einfluss der Ernährung auf die Entwicklung von Endometriumkarzinomen ist nicht eindeutig belegt. Gesichert ist jedoch eine hohe Korrelation mit dem Vorliegen einer Adipositas. So erhöht sich das relative Risiko für Frauen um 1,59 pro Steigerung des *body mass index* (BMI) um 5 kg/m<sup>2</sup>. Das Risiko in Abhängigkeit vom BMI in der Postmenopause an Brustkrebs zu erkranken, ist im Vergleich etwas geringer (Renehan et al. 2008).

Ecd mit seinem beschriebenen Wirkprofil wäre somit als protektiver Faktor in diesem Zusammenhang denkbar. Ein direkter Einfluss auf Uterus oder Mamma ist jedoch ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit untersucht worden:

#### **Uterus:**

Ein mit den Tieren unter E2-Substitution vergleichbar hohes Uterusgewicht war unter Ecd-Einfluss nicht zu verzeichnen. Die Uterusgewichte der Versuchstiere unter Ecd-Substitution waren vielmehr nicht signifikant unterschiedlich zu denen der ovariectomierten Kontrolltiere. Die Betrachtung der Uterusgewichte pro 100 g Körpergewicht sollte zusätzlich den Einfluss der Körpergröße auf das Uterusgewicht ausblenden. Auch in Betrachtung des relativen Uterusgewichtes zeigte sich kein uterotropher Effekt von Ecd. Demnach bestätigt der vorliegende Versuch die Ergebnisse aus Vorversuchen (Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Seidlová-Wuttke et al. 2010b; Kapur et al. 2010).

Auch die Epithelschicht der Uteri zeigte sich unter Ecd-Substitution mit dem der ovariectomierten Kontrolltiere vergleichbar. Ein E2-artiger Einfluss im Sinne einer proliferationsfördernden Eigenschaft konnte hier also ebenfalls nicht beobachtet werden. Rein rechnerisch zeigte sich unter einer Ecd-Monotherapie zwar ein signifikant verbreitertes Endometrium im Vergleich zu der Kontrollgruppe ovx, +VD, jedoch war das Ausmaß der Endometriumverbreiterung unter E2-Zufuhr deutlich größer. Eine E2-artige Wirkung scheint daher in dieser Hinsicht ebenfalls nicht vorzuliegen.

Eine proliferationsfördernde Wirkung von Ecd auf das Myometrium konnte ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Die muskuläre Schichtdicke des Uterus unter Ecd zeigte sich vielmehr nicht unterschiedlich gegenüber den ovariectomierten Kontrolltieren.

Dabei hatte das im vorliegenden Versuch verwendete Ecd-Präparat im Einklang mit bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnissen zu einer Wachstumsstimulation der Skelettmuskulatur der Versuchstiere geführt (Dannenberg 2013). Grundsätzlich scheint mit dem verwendeten Ecd-Präparat also eine muskuläre Stimulation möglich zu sein, die sich jedoch auf das Myometrium nicht auswirkt.

Eine Erklärung könnte im Unterschied zwischen der unwillkürlich innervierten glatten Uterusmuskulatur vom *single unit* Typ und der quergestreiften Skelettmuskulatur liegen:

In Skelettmuskelzellen kann z. B. IGF-1 über eine Aktivierung des PI3K/Akt-Signalweg einen regulierenden Einfluss auf Proliferation und Regeneration einnehmen (Bathori et al. 2008). Da Ecd und Analoga ebenfalls stimulierend auf die Signaltransduktion von PI3K/Akt wirken, ist hierüber möglicherweise ein vergleichbarer Effekt denkbar (Constantino et al. 2001; Oehme et al. 2006; Dinan und Lafont 2006; Gorelick-Feldman et al. 2008). Inwiefern diese Mechanismen auch auf die glatte Muskulatur übertragbar sind, ist jedoch unklar.

Ergänzend wird vermutet, dass Ecd seine anabole Wirkung über eine Erhöhung des intrazellulären Kalziumspiegels entfaltet (Bathori et al. 2008). So konnte Ecd im Rahmen eines VD-Mangels einen erhöhten intrazellulären Kalzium- und verminderten Adenosintriphosphat (ATP)-Spiegel in Skelettmuskelzellen von Ratten ausgleichen (Kholodova et al. 1997). In Bezug auf die Schichtdicke des Myometriums hatte ein Mangel an VD jedoch keinen Einfluss auf die Wirkung von Ecd.

In Zusammenschau der Gewichtsmessungen und der histopathologischen Analyse erscheint ein proliferationsfördernder und damit potenziell risikoreicher Effekt von Ecd auf die Gewebe des Rattenuterus eher unwahrscheinlich. Dies erscheint im Hinblick auf eine mögliche Therapie des Klimakterischen Syndroms wünschenswert. Eine Abhängigkeit von der An- oder Abwesenheit von VD ließ sich anhand der uterinen Parameter nicht erkennen.

**Mamma:**

Ähnlich den ovariectomierten Kontrolltieren war bei den Ratten unter kombinierter Ecd- und VD-Therapie eine erniedrigte Anzahl lobuloalveolärer Strukturen im Sinne einer Involution zu verzeichnen. Dem gegenüber stand eine tendenziell erhöhte Anzahl an epithelialen Strukturen (Lb 1 und 2) unter einer Ecd-Monotherapie. Wie bei den metabolischen Parametern scheint die Wirkung von Ecd auch in diesem Zusammenhang von der An- oder Abwesenheit von VD abhängig zu sein und hier einen eher proliferationsfördernden Charakter zu haben.

Die Ecd-Analoga Muristeron A und Ponasteron A können in humanen Kolonkarzinomzellen dosisabhängig vor einem Fas- und *tumor necrosis factor related apoptosis inducing ligand* (TRAIL)-vermittelten Zelltod schützen und somit apoptosehemmend wirken (Oehme et al. 2006). Da Involutionsprozesse in der murinen Brustdrüse ebenfalls durch Fas-Liganden und TRAIL-induzierte Apoptosemechanismen gefördert werden (Sohn et al. 2001), wäre eine involutionshemmende Einflussnahme durch Ecd denkbar. Die Anzahl der Lb 1 und Lb 2 unter Ecd-Monotherapie lag ungefähr auf dem Niveau der intakten Tiere, blieb jedoch hinter dem der mit E2 substituierten Ratten zurück. Eine Aussage über einen direkt proliferationsfördernden Charakter von Ecd auf die epithelialen Brustdrüsenstrukturen oder dazu ob lediglich involutionshemmende Mechanismen greifen, lässt sich aus den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht ableiten.

Auf die Anzahl der Duktus hatte die Gabe von Ecd weder in alleiniger noch in mit VD kombinierter Therapie einen Einfluss, vielmehr zeigte sich eine vergleichbare Reduktion wie bei den ovariectomierten Kontrollen. Damit stand eine Substitution von Ecd bezüglich

dieses sehr hormonsensiblen Merkmals in deutlichem Gegensatz zur Verabreichung von E2.

Insgesamt scheint Ecd in Hinblick auf die Brustdrüse selektive proliferationsfördernde und damit potenziell risikoreiche Eigenschaften zu haben, die jedoch nicht im Bereich des Risikoprofils einer E2-Substitution liegen.

### **4.3 Der Einfluss von Vitamin D-Substitution oder -Mangel**

Ein günstiger Effekt von VD auf Blutzuckerspiegel und Fettstoffwechsel und damit indirekt auch auf das Körpergewicht ist mehrfach beschrieben worden (Major et al. 2007; Adams und Hewison 2010; Sorkin et al. 2014). Dieser positive Einfluss ließ sich im vorliegenden Versuch in Bezug auf Parameter wie Futteraufnahme, Gewichtsverlauf und metabolische Situation nicht reproduzieren. Lediglich in der Ecd-Gruppe zeigten sich VD-abhängige Unterschiede, wobei der günstige Effekt auf Futtermenge und Gewichtszunahme ausgerechnet unter einem VD-Mangel verzeichnet wurde und wohl eher auf die Ecd-Wirkung zurückzuführen ist.

Ein Erklärungsansatz für den gänzlich fehlenden positiven Einfluss der VD-Zugabe in allen Gruppen könnte das im Vergleich zu den Vorversuchen neuartig zusammengesetzte Basisfutter bieten. Alle Tiere des vorliegenden Versuchs nahmen bei geringerer Futteraufnahme im Vergleich zu Vorversuchen mehr an Gewicht zu (Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Dies ist möglicherweise Folge des höheren Zucker- und Kaloriengehalts des neu eingesetzten Futters. Ein konsekutiv höherer Körperfettanteil könnte zu einer Akkumulation des lipophilen Hormons VD im Fettgewebe und damit zu einer Einschränkung seiner hormonellen Wirksamkeit geführt haben (Adams und Hewison 2010).

#### **Uterus:**

VDR wird in allen Uterusschichten sowohl bei der Frau als auch bei der Ratte exprimiert (Johnson et al. 1996; Vienonen et al. 2004). Ein durch Genmanipulation hervorgerufener VDR-Verlust führt im Tierversuch unter bestimmten diätetischen Voraussetzungen über eine eingeschränkte Follikulogenese zu einer Uterushypoplasie. VD übt somit einen

indirekten Einfluss auf die Trophik des Uterus aus. Durch eine E2-Substitution erwies sich dieser Zustand als reversibel (Yoshizawa et al. 1997).

Ein statistisch signifikanter Einfluss von VD auf das Uterusgewicht oder die Schichtdicken der einzelnen Kompartimente konnte in dieser Arbeit jedoch in keiner der Versuchsgruppen nachgewiesen werden. Die absoluten und relativen Uterusfeuchtgewichte sowie die histometrisch untersuchten Gewebe zeigten in keiner der Konstellationen mit VD einen signifikanten Unterschied zu einer VD-Mangelsituation. Jedoch fielen unter einer kombinierten E2- und VD-Substitution tendenziell höhere Uterusfeuchtgewichte sowie breitere Schichtdicken in den einzelnen Uteruskompartimenten auf. Ursächlich für diese Tendenz könnte ein durch VD wie auch durch E2 hervorgerufener Anstieg der IGF-1-Sekretion sein (Yoshizawa et al. 1997). Die tatsächlich aufgenommenen durchschnittlichen E2-Mengen über das Futter waren dabei in An- oder Abwesenheit von VD annähernd gleich (ovx, E2+VD: 0,130 mg E2; ovx, E2-VD: 0,128 mg E2).

### **Mamma:**

In experimentellen Studien an Brustkrebszellreihen konnte für VD eine anti-proliferative Wirkung gezeigt werden (Zinser et al. 2002; Deeb et al. 2007), indem VD bspw. die ER-Dichte herunterregulierte (Swami et al. 2000). Bei VDR-*knockout*-Mäusen erwiesen sich außerdem Involutionsprozesse im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren als verlangsamt und es konnte ein vergrößertes Brustgewebe mit diversen Aufzweigungen und einem verstärkten Duktuswachstum beobachtet werden (Zinser et al. 2002). Die Rolle von VD/VDR als mögliche therapeutische Option in der Behandlung und Prävention von Mammkarzinomen wird dementsprechend vielfach diskutiert und untersucht (Welsh et al. 2003; Welsh 2007; Anderson et al. 2010).

Vor diesem Hintergrund erscheint die in diesem Versuch beobachtete relativ hohe Lb 2-Anzahl unter einer kombinierten VD- und E2-Therapie insbesondere im Vergleich zu einer Monotherapie mit E2 nicht plausibel. Anscheinend konnte VD in diesem Zusammenhang seine antiproliferative Wirkung nicht entfalten. Der Unterschied fällt zwar nicht statistisch signifikant aus, die Tendenz ist jedoch nicht zu leugnen.

#### 4.4 Mögliche kompetitive Wirkmechanismen von Ecdyson und Vitamin D

Insgesamt schien die An- oder Abwesenheit von VD im diesem Versuch lediglich auf die Wirksamkeit von Ecd einen reproduzierbaren Einfluss zu haben. Mehrere untersuchte Parameter deuten einen Einfluss von VD auf den Effekt von Ecd an. Ecd schien auf Parameter wie Stoffwechsellage, Gewichtszuwachs und Anzahl der Lobuli der Brustdrüse nur unter einem VD-Mangel eine tendenziell östrogenartige Wirkung zu entfalten.

Ursächlich für diese Beobachtung könnten kompetitive Interaktionen zwischen Ecd und VD auf Rezeptorebene sein, zumal der genaue Wirkmechanismus von Ecd auf zellulärer Ebene noch nicht komplett geklärt ist. Da ein EcR beim Menschen und bei der Ratte bislang nicht nachgewiesen werden konnte, gibt es möglicherweise Interaktionen mit anderen (nukleären) Rezeptoren, die dem EcR strukturell ähnlich sind (Koelle et al. 1991). Neben dem bereits erwähnten VDR steht bei Vertebraten der RXR als Homolog des USP im Blickpunkt (Thomas et al. 1993; Palli et al. 2005).

Die strukturelle Ähnlichkeit von Ecd und VD im Rahmen des *conformational ensemble model* machen allobiotische Effekte und Interaktionen von Ecd an VDR bzw. RXR denkbar (Norman et al. 2004). Eine Rezeptoraffinität für Ecd an diese Rezeptoren konnten allerdings bislang mittels Radioligandenbindungsassays nicht nachgewiesen werden, sodass es sich bei dem Erklärungsansatz eines Ecd/RXR bzw. Ecd/VDR Liganden-Rezeptorkomplex um einen hypothetischen Gedanken handelt. Interaktionen über membrangebundene oder -assoziierte Rezeptoren oder intrazelluläre Signalkaskaden erscheinen außerdem möglich (Schlattner et al. 2006; Toth et al. 2010). Eine gemeinsame intrazelluläre Endstrecke verschiedener Signalkaskaden (z. B. PI3K/Akt) könnte ebenfalls kompetitive Effekte und damit einen modulatorischen Einfluss von VD auf die Wirksamkeit von Ecd und umgekehrt zur Folge haben. Die Folge all dieser potenziellen Interaktionen könnte sein, dass Ecd nur dann seine volle Wirkung entfaltet, wenn gemeinsame Rezeptoren und Interaktionspartner nicht durch VD besetzt sind.

Eine Erklärung für eine gewebeabhängige (unterschiedliche) Wirkung von Ecd in Abhängigkeit von VD kann zudem womöglich mit einer organspezifischen bzw. stoffwechselprozessabhängigen unterschiedlichen Rezeptormodulation zusammenhängen. So ist es denkbar, dass Ecd und VD in Kombination teilweise aktivierend und an

anderer Stelle hemmend wirken können und somit unterschiedliche Effekte erzielen, wie z. B. an Skelett- und Uterusmuskulatur beobachtet.

Weitere bekannte Dimerisierungspartner von RXR, die Einfluss auf den Lipid- und Kohlenhydratstoffwechsel nehmen, sind die PPAR. Auch über eine PPAR-Interaktion wären gewebeabhängige, teilweise gegenläufige Effekte denkbar, da PPAR abhängig vom Dimerisierungspartner und Co-Faktoren sowohl die Aktivierung als auch die Inhibierung einer Genexpression hervorrufen können (Ricote und Glass 2007).

#### **4.5 Einfluss der Futterzusammensetzung**

Das für den vorliegenden Versuch modifizierte und erstmalig verwendete Futter mit einer erhöhten Kalorienmenge über eine Steigerung des Kohlenhydrat- (Glukose und Stärke) sowie Fettanteils hatte möglicherweise einen entscheidenden Einfluss auf die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs. So wurde im Durchschnitt bei allen Tieren der einzelnen Versuchsgruppen eine niedrigere mittlere Futterraufnahme im Vergleich zu früheren Versuchen beobachtet (Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Seidlová-Wuttke et al. 2010b).

Das Basisfutter (+VD/-VD) des vorliegenden Versuchs beinhaltet 12,9 bzw. 10,8 % Zucker und jeweils 46,8 % Stärke. Dem gegenüber steht das in den Vorversuchen eingesetzte Basisfutter mit einem deutlich niedrigeren jeweiligen Anteil von 3 % Zucker und 34 % Stärke (Seidlová-Wuttke et al. 2010a; Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Außerdem verfügte das neu zusammengesetzte Futter über einen hohen Anteil des Milchproteins Kasein, welches zu einem schnellen Sättigungsgefühl führen kann (Abou-Samra et al. 2011).

Möglicherweise ist das Futter des vorliegenden Versuches verantwortlich für die signifikant höhere Gewichtszunahme bei gleichzeitig signifikant geringerer täglicher Futterraufnahme.

Konkret fraßen die Ratten der Gruppe ovx, +VD in einem der Vorversuche durchschnittlich 17,32 g/Tier/Tag und wogen am Versuchsende  $324,7 \pm 21,47$  g (Ausgangsgewicht:  $250 \pm 10$  g) (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Demgegenüber war die Futterraufnahme der

Tiere im vorliegenden Versuch der Gruppe ovx, +VD 16,03 g/Tier/Tag und das Körpergewicht vor der Obduktion  $381,1 \pm 7,28$  g.

Da Ecd in einer mittleren Dosierung von 3 g/kg Futter in den vorherigen Versuchen die besten Ergebnisse im Hinblick auf metabolische Effekte und Auswirkungen auf den Knochen erzielte, wurde diese Dosierung für das jetzige Experiment übernommen (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Ebenso wurde die Dosierung von E2 (10 mg/kg Futter) beibehalten.

Da die Ratten mit dem neuen Basisfutter aber deutlich weniger fraßen, nahmen bspw. die Tiere unter einer kombinierten Ecd- und VD-Therapie insgesamt nur 50,88 mg Ecd (Vorversuch: 56,58 mg Ecd) auf (Seidlová-Wuttke et al. 2010b). Die relative Dosis von Ecd (ovx, Ecd+VD) pro 1 g Körpergewicht lag mit 0,137 mg/g deutlich niedriger als im Vorversuch (0,170 mg/g). Somit ist die Einschätzung der Wirkung von Ecd, insbesondere im Vergleich mit bisherigen Versuchen nur eingeschränkt möglich.

Auch die weiter oben diskutierte potenziell eingeschränkte Verfügbarkeit des lipophilen Hormons VD durch eine eher ungünstige Stoffwechselsituation mit einem höheren Körperfettanteil könnte auf die Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit früheren Erkenntnissen einen Einfluss gehabt haben.

## 5 Zusammenfassung

Klimakterische Beschwerden und osteoporotische Veränderungen betreffen in einer alternden Gesellschaft immer mehr Patientinnen. Behandlungsmethoden wie die HRT oder die VD-Substitution sind dabei seit langem etablierte therapeutische Optionen. Insbesondere die HRT steht jedoch aufgrund des signifikanten Nebenwirkungsprofils in der Diskussion, sodass es eine Nachfrage nach alternativen Therapien gibt. Auch Präparate wie z. B. Ecd werden hinsichtlich ihres therapeutischen Nutzens untersucht. Natürlich stellt sich auch bei diesen Ersatzpräparaten die Frage nach Risiken und Nebenwirkungen, insbesondere im Hinblick auf den Fett- und Energiestoffwechsel sowie hormonsensible Organe wie Uterus und Mamma.

Anhand der vorliegenden tierexperimentellen Studie an ovariectomierten Ratten wurde erstmalig die Wirkung von Ecd in Abhängigkeit von VD erprobt. Die ovariectomierte Ratte stellt dabei ein anerkanntes Tiermodell der postmenopausalen Frau dar. Es wurde sowohl die kombinierte Substitution von Ecd und VD als auch die Monotherapie dieser Testsubstanzen untersucht. Als Positivkontrollgruppe der herkömmlichen HRT galten zwei weitere Testgruppen mit E2 in Mono- oder Kombinationstherapie mit VD. Ovariectomierte Tiere ohne zusätzliche Hormonsubstitution bildeten eine Negativkontrollgruppe. Als weitere Vergleichsgruppe für die postmenopausale Situation unter VD-Einfluss diente die Gruppe ovx, +VD. Während des Versuchs wurden Aussagen zur Futteraufnahme und Gewichtszunahme getroffen. Im Anschluss daran wurden die Uterusfeuchtgewichte bestimmt und das Uterus- und Mammagewebe histologisch untersucht.

Erfreulicherweise konnte im vorliegenden Versuch bestätigt werden, dass Ecd nicht uterotroph wirkt. Weder die Uterusfeuchtgewichte noch die histologischen Messungen zeigten signifikante Ergebnisse im Sinne einer proliferationsfördernden Wirkung. Auch eine östrogenartige und damit potenziell risikofördernde Wirkung auf mamäre Strukturen konnte nicht nachgewiesen werden.

Allerdings führte die Ecd-Monotherapie im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu günstigen Effekten auf den Energiestoffwechsel und den Gewichtsverlauf.

Ein bezüglich mehrerer untersuchter Parameter signifikanter Einfluss von VD zeigte sich lediglich in der kombinierten Therapie mit Ecd. Auf Energiestoffwechsel und Gewichtsverlauf schien die Wirkung von Ecd erst im Rahmen eines VD-Mangels zum Tragen zu kommen, was sich eventuell mit kompetitiven Rezeptorinteraktionen erklären lässt. Die Wirkung von Ecd auf Uterus und Mamma schien insgesamt jedoch nicht von VD abhängig zu sein.

Davon abgesehen führte die An- oder Abwesenheit von VD auch in den anderen Testgruppen zu keinen signifikanten Veränderungen.

Eine potenziell ungünstige Stoffwechselsituation aufgrund eines vergleichsweise hohen Energiegehaltes des verwendeten Futters hat möglicherweise auf die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs einen verzerrenden Einfluss gehabt. Die Tiere fraßen im Vergleich deutlich weniger, nahmen jedoch mehr an Gewicht zu. Dies führte zu einer geringeren Wirkstoffaufnahme und zu einem erhöhten Körperfettanteil. Insbesondere im Hinblick auf die Vergleichbarkeit mit früheren Versuchen ist hier eine Einschränkung der Bewertbarkeit der vorliegenden Ergebnisse möglich.

## 6 Anhang

Tabelle 5: Futterzusammensetzung Basisfutter mit VD

<b>Rohnährstoffe</b>	<b>[Prozent]</b>	<b>Mineralstoffe</b>	<b>[Prozent]</b>
Trockensubstanz	95,2	Kalzium	0,9
Rohprotein	20,8	Phosphor	0,63
Rohfett	4,2	Natrium	0,19
Rohfaser	5	Magnesium	0,21
Rohasche	5,6	Kalium	0,97
N-freie Extraktstoffe	59,4		
Stärke	46,8	<b>Energie</b>	<b>[MJ/kg]</b>
Zucker	10,8	Bruttoenergie	18
<b>Vitamine</b>	<b>per kg</b>	<b>Spurenelemente</b>	<b>per kg</b>
Vitamin A	15.000 IE	Eisen	166 mg
Vitamin D3	1.500 IE	Mangan	98 mg
Vitamin E	150 mg	Zink	65 mg
Vitamin K	20 mg	Kupfer	14 mg
Vitamin C	30 mg	Iod	1,2 mg
Thiamin (B1)	16 mg	Selen	0,14 ng
Riboflavin (B2)	16 mg	Cobalt	0,15 mg
Pyridoxin (B6)	18 mg		
Cobalamin (B12)	30 µg	<b>Aminosäuren</b>	<b>[Prozent]</b>
Nicotinsäure	49 mg	Lysin	1,71
Pantothensäure	56 mg	Methionin	0,73
Folsäure	19 mg	Met+Cys	0,82
Biotin	310 µg	Threonin	0,93
Cholin-Cl	1.040 mg	Tryptophan	0,27
Inositol	80 mg	Arginin	0,76
		Histidin	0,66
<b>Fettsäuren</b>	<b>[Prozent]</b>	Valin	1,42
C 14:0	0,02	Isoleucin	1,09
C 16:0	0,45	Leucin	2,05
C 16:1	0,02	Phenylalanin	1,11
C 18:0	0,19	Phe+Tyr	2,22
C 18:1	1,07	Glycin	0,43
C 18:2	2,12	Glutaminsäure	4,69
C 18:3	0,26	Asparaginsäure	1,55
C 20:0	0,02	Prolin	2,39
		Alanin	0,68
		Serin	1,24

Tabelle 6: Futterzusammensetzung Basisfutter ohne VD

<b>Rohnährstoffe</b>	<b>[Prozent]</b>	<b>Mineralstoffe</b>	<b>[Prozent]</b>
Trockensubstanz	95,1	Kalzium	0,34
Rohprotein	20,8	Phosphor	0,22
Rohfett	4,2	Natrium	0,19
Rohfaser	5	Magnesium	0,21
Rohasche	4	Kalium	0,67
N-freie Extraktstoffe	61,2		
Stärke	46,8	<b>Energie</b>	<b>[MJ/kg]</b>
Zucker	12,9	Bruttoenergie	18
<b>Vitamine</b>	<b>per kg</b>	<b>Spurenelemente</b>	<b>per kg</b>
Vitamin A	15,000 IE	Eisen	166 mg
Vitamin D3	< 5 IE	Mangan	98 mg
Vitamin E	150 mg	Zink	65 mg
Vitamin K	20 mg	Kupfer	14 mg
Vitamin C	30 mg	Iod	1,2 mg
Thiamin (B1)	16 mg	Selen	0,14 mg
Riboflavin (B2)	16 mg	Cobalt	0,15 mg
Pyridoxin (B6)	18 mg		
Cobalamin (B12)	30 µg	<b>Aminosäuren</b>	<b>[Prozent]</b>
Nicotinsäure	49 mg	Lysin	1,71
Pantothensäure	56 mg	Methionin	0,73
Folsäure	19 mg	Met+Cys	0,82
Biotin	310 µg	Threonin	0,93
Cholin-Cl	1.040 mg	Tryptophan	0,27
Inositol	80 mg	Arginin	0,76
		Histidin	0,66
<b>Fettsäuren</b>	<b>[Prozent]</b>	Valin	1,42
C 14:0	0,02	Isoleucin	1,09
C 16:0	0,45	Leucin	2,05
C 16:1	0,02	Phenylalanin	1,11
C 18:0	0,19	Phe+Tyr	2,22
C 18:1	1,07	Glycin	0,43
C 18:2	2,12	Glutaminsäure	4,69
C 18:3	0,26	Asparaginsäure	1,55
C 20:0	0,02	Prolin	2,39
		Alanin	0,68
		Serin	1,24

Tabelle 7: Organentwässerung

<b>Lösung</b>	<b>Einwirkzeit</b>
50%-Alkohol	1 Std
75%-Alkohol	1 Std 20 Min
75%-Alkohol	1 Std 20 Min
96%-Alkohol	1 Std 20 Min
96%-Alkohol	1 Std 20 Min
100%-Alkohol	1 Std 20 Min
100%-Alkohol	1 Std 20 Min
100%-Alkohol	1 Std 20 Min
Xylol	1 Std 20 Min
Xylol	1 Std 20 Min
Paraffin	1 Std
Paraffin	1 Std

Tabelle 8: Hämatoxylin-Eosin-Färbung

<b>Lösung</b>	<b>Einwirkzeit</b>
Xylol	5 Min
Xylol	5 Min
Xylol	5 Min
Ethanol 100%	2 Min
Ethanol 100%	2 Min
Ethanol 100%	2 Min
Ethanol 96%	2 Min
Ethanol 96%	2 Min
Ethanol 75%	2 Min
Aqua destilliert	2 Min
Hämatoxylin	1 Min
Leitungswasser	10 Min
Aqua destilliert	2 Min
Eosin	30 Sec
Aqua bidest	5-10 Sec
Ethanol 75%	30 Sec
Ethanol 96%	30 Sec
Ethanol 96%	30 Sec
Ethanol 100%	1 Min
Ethanol 100%	1 Min
Ethanol 100%	2 Min
Xylol	5 Min
Xylol	5 Min
Xylol	5 Min

## 7 Literaturverzeichnis

Abou-Samra R, Keersmaekers L, Brienza D, Mukherjee R, Mace K (2011): Effect of different protein sources on satiation and short-term satiety when consumed as a starter. *Nutr J* 10, 139

Adams JS, Hewison M (2010): Update in Vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 95, 471–478

Agic A, Xu H, Altgassen C, Noack F, Wolfler MM, Diedrich K, Friedrich M, Taylor RN, Hornung D (2007): Relative expression of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor, vitamin D 1 alpha-hydroxylase, vitamin D 24-hydroxylase, and vitamin D 25-hydroxylase in endometriosis and gynecologic cancers. *Reprod Sci* 14, 486–497

Anagnostis P, Dimopoulou C, Karras S, Lambrinoudaki I, Goulis DG (2015): Sarcopenia in post-menopausal women: Is there any role for vitamin D? *Maturitas* 82, 56–64

Anderson LN, Cotterchio M, Vieth R, Knight JA (2010): Vitamin D and calcium intakes and breast cancer risk in pre- and postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 91, 1699–1707

Andreollo NA, Santos, Elisvania Freitas dos, Araujo MR, Lopes LR (2012): Rat's age versus human's age: what is the relationship? *Arq Bras Cir Dig* 25, 49–51

Artaza JN, Sirad F, Ferrini MG, Norris KC (2010): 1,25(OH)<sub>2</sub>vitamin D<sub>3</sub> 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

Banerjee P, Chatterjee M (2003): Antiproliferative role of vitamin D and its analogs--a brief overview. *Mol Cell Biochem* 253, 247–254

Bathori M, Toth N, Hunyadi A, Marki A, Zador E (2008): Phytoecdysteroids and anabolic-androgenic steroids--structure and effects on humans. *Curr Med Chem* 15, 75–91

Bellino FL (2000): Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 7, 14–24

Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419–427

Beral V, Bull D, Reeves G (2005): Endometrial cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 365, 1543–1551

Bergadà L, Pallares J, Maria Vittoria A, Cardus A, Santacana M, Valls J, Cao G, Fernàndez E, Dolcet X, Dusso AS et al. (2014): Role of local bioactivation of vitamin D by CYP27A1 and CYP2R1 in the control of cell growth in normal endometrium and endometrial carcinoma. *Lab Invest* 94, 608–622

Biegel LB, Flaws JA, Hirshfield AN, O'Connor JC, Elliott GS, Ladics GS, Silbergeld EK, Van Pelt, C S, Hurtt ME, Cook JC et al. (1998): 90-day feeding and one-generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17 beta-estradiol. *Toxicol Sci* 44, 116–142

Bischoff HA, Borchers M, Gudat F, Duermueller U, Theiler R, Stahelin HB, Dick W (2001): In situ detection of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in human skeletal muscle tissue. *Histochem J* 33, 19–24

Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M (2008): Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 29, 726–776

Brinton LA, Lacey JV, Trimble EL (2005): Hormones and endometrial cancer—new data from the Million Women Study. *Lancet* 365, 1517–1518

Broderick R, Broderick KA: Ultrastructure and Calcium Stores in the Myometrium: In: *Uterine Function: Molecular and Cellular Aspects*. Springer US, New York 1990, 1-33

Buchebner D, McGuigan F, Gerdhem P, Malm J, Ridderstrale M, Akesson K (2014): Vitamin D insufficiency over 5 years is associated with increased fracture risk-an observational cohort study of elderly women. *Osteoporos Int* 25, 2767–2775

Burger HG, Dudley EC, Robertson DM, Dennerstein L (2002): Hormonal changes in the menopause transition. *Recent Prog Horm Res* 57, 257–275

Butenandt A, Karlson P: Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormons der Insekten in kristallisierter Form. *Z Naturforschung* 9b, 389–391

Cardy RH (1991): Sexual dimorphism of the normal rat mammary gland. *Vet Pathol* 28, 139–145

Carr MC (2003): The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88, 2404–2411

Cirisano FD, Robboy SJ, Dodge RK, Bentley RC, Krigman HR, Synan IS, Soper JT, Clarke-Pearson DL (2000): The outcome of stage I-II clinically and surgically staged papillary serous and clear cell endometrial cancers when compared with endometrioid carcinoma. *Gynecol Oncol* 77, 55–65

Conner P, Lundström E, Schoultz B von (2008): Breast cancer and hormonal therapy. *Clin Obstet Gynecol* 51, 592–606

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

Cust AE (2011): Physical activity and gynecologic cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 186, 159–185

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, 6052–6057

Dannenberg L: Osteoporose - Das Metabolische Syndrom des Knochens - Wirkungen von Ecdyson und Vitamin D auf den postmenopausalen, osteoporotischen Knochen im Zusammenhang mit dem Metabolischen Syndrom. Med. Diss. Göttingen 2013

Deeb KK, Trump DL, Johnson CS (2007): Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 7, 684–700

Dietel M, Lewis MA, Shapiro S (2005): Hormone replacement therapy: pathobiological aspects of hormone-sensitive cancers in women relevant to epidemiological studies on HRT: a mini-review. *Hum Reprod* 20, 2052–2060

Dinan L (2009): The Karlson Lecture. Phytoecdysteroids: what use are they? *Arch Insect Biochem Physiol* 72, 126–141

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

Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E (2005): Vitamin D. *Am J Physiol Renal Physiol* 289, F8–28

Emons G, Fleckenstein G, Hinney B, Huschmand A, Heyl W (2000): Hormonal interactions in endometrial cancer. *Endocr Relat Cancer* 7, 227–242

Evans RM, Mangelsdorf DJ (2014): Nuclear Receptors, RXR, and the Big Bang. *Cell* 157, 255–266

Feng Y, Manka D, Wagner K, Khan SA (2007): Estrogen receptor-alpha expression in the mammary epithelium is required for ductal and alveolar morphogenesis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 14718–14723

Figuroa JD, Pfeiffer RM, Patel DA, Linville L, Brinton LA, Gierach GL, Yang XR, Papatomas D, Visscher D, Mies C et al. (2014): Terminal duct lobular unit involution of the normal breast: implications for breast cancer etiology. *J Natl Cancer Inst* 106, 286–312

Flesch-Janys D, Slanger T, Mutschelknauss E, Kropp S, Obi N, Vettorazzi E, Braendle W, Bastert G, Hentschel S, Berger J et al. (2008): Risk of different histological types of postmenopausal breast cancer by type and regimen of menopausal hormone therapy. *Int J Cancer* 123, 933–941

Fournier A, Berrino F, Clavel-Chapelon F (2008): Unequal risks for breast cancer associated with different hormone replacement therapies: results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 107, 103–111

Fritz WA, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA (1998): Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 19, 2151–2158

Gabrielson M, Chiesa F, Paulsson J, Strell C, Behmer C, Rönnow K, Czene K, Östman A, Hall P (2016): Amount of stroma is associated with mammographic density and stromal expression of oestrogen receptor in normal breast tissues. *Breast Cancer Res Treat* 158, 253–261

Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Piaggese L, Simone L de, Orlandi R, Genazzani AR (1997): Body weight, body fat distribution, and hormonal replacement therapy in early postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 414–417

Gao C, Tajima K, Ding J, Tang J, Wu J, Li S, Cao H, Liu Y, Su P, Qian Y et al. (2009): Body size, physical activity and risk of breast cancer - a case control study in Jangsu Province of China. *Asian Pac J Cancer Prev* 10, 877–881

Gao L, Cai G, Shi X (2008): Beta-ecdysterone induces osteogenic differentiation in mouse mesenchymal stem cells and relieves osteoporosis. *Biol Pharm Bull* 31, 2245–2249

Gao Q, Mezei G, Nie Y, Rao Y, Choi CS, Bechmann I, Leranth C, Toran-Allerand D, Priest CA, Roberts JL et al. (2007): Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 13, 89–94

Germain P, Staels B, Dacquet C, Spedding M, Laudet V (2006): Overview of nomenclature of nuclear receptors. *Pharmacol. Rev.* 58, 685–704

Gloth FM 3rd, Gundberg CM, Hollis BW, Haddad, J G Jr, Tobin JD (1995): Vitamin D deficiency in homebound elderly persons. *JAMA* 274, 1683–1686

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

Gorelick-Feldman J, Cohick W, Raskin I (2010): Ecdysteroids elicit a rapid Ca<sup>2+</sup> flux leading to Akt activation and increased protein synthesis in skeletal muscle cells. *Steroids* 75, 632–637

Greendale GA, Lee NP, Arriola ER (1999): The menopause. *Lancet* 353, 571–580

Gronemeyer H, Laudet V (1995): Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* 2, 1173–1308

Groothuis PG, Dassen, H H N M, Romano A, Punyadeera C (2007): Estrogen and the endometrium: lessons learned from gene expression profiling in rodents and human. *Hum Reprod Update* 13, 405–417

- Guo R, Wei L, Tu Z, Sun P, Wang J, Zhao D, Li X, Tang J (2006): 17 beta-estradiol activates PI3K/Akt signaling pathway by estrogen receptor (ER)-dependent and ER-independent mechanisms in endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 99, 9–18
- Gurney EP, Nachtigall MJ, Nachtigall LE, Naftolin F (2014): The Women's Health Initiative trial and related studies: 10 years later: a clinician's view. *J Steroid Biochem Mol Biol* 142, 4–11
- Halder SK, Osteen KG, Al-Hendy A (2013): 1,25-dihydroxyvitamin d3 reduces extracellular matrix-associated protein expression in human uterine fibroid cells. *Biol Reprod* 89, 150
- He F, Zhang W, Zhang H (2013): Apoptotic signaling pathways in uteri of rats with endometrial hyperplasia induced by ovariectomy combined with estrogen. *Gynecol Obstet Invest* 76, 51–56
- Henson DE, Tarone RE (1993): On the possible role of involution in the natural history of breast cancer. *Cancer* 71, 2154–2156
- Holick MF (2007): Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 357, 266–281
- Hoover R, Gray, L A Sr, Cole P, MacMahon B (1976): Menopausal estrogens and breast cancer. *N Engl J Med* 295, 401–405
- Horn L, Dietel M, Eibenkel J (2005): Hormone replacement therapy (HRT) and endometrial morphology under consideration of the different molecular pathways in endometrial carcinogenesis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 122, 4–12
- Huber R, Hoppe W (1965): On the chemistry of ecdysone. VII. Analysis of the crystal and molecular structure of the molting hormone in insects, ecdysone, using the automatized folding molecule method. *Chem Ber* 98, 2403–2424
- Hursting SD, Dunlap SM (2012): Obesity, metabolic dysregulation, and cancer: a growing concern and an inflammatory (and microenvironmental) issue. *Ann N Y Acad Sci* 1271, 82–87
- Hutson SW, Cowen PN, Bird CC (1985): Morphometric studies of age related changes in normal human breast and their significance for evolution of mammary cancer. *J Clin Pathol.* 38, 281–287

Johnson JA, Grande JP, Roche PC, Kumar R (1996): Immunohistochemical detection and distribution of the 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> receptor in rat reproductive tissues. *Histochem Cell Biol* 105, 7–15

Johnson LE, DeLuca HF (2001): Vitamin D receptor null mutant mice fed high levels of calcium are fertile. *J Nutr.* 131, 1787–1791

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

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W (2003): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environ Health Perspect* 111, 1530–1549

Kapur P, Jarry H, Wuttke W, Pereira, B M J, Seidlová-Wuttke D (2008): Evaluation of the antiosteoporotic potential of *Tinospora cordifolia* in female rats. *Maturitas* 59, 329–338

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

Khodr ZG, Sherman ME, Pfeiffer RM, Gierach GL, Brinton LA, Falk RT, Patel DA, Linville LM, Papatomas D, Clare SE et al. (2014): Circulating sex hormones and terminal duct lobular unit involution of the normal breast. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 23, 2765–2773

Kholodova ID, Tugai VA, Zimina VP (1997): Effect of vitamin D<sub>3</sub> and 20-hydroxyecdysone on the content of ATP, creatine phosphate, carnosine and Ca<sup>2+</sup> in skeletal muscles. *Ukr Biokhim Zh* 69, 3–9

Kim Y, Franke AA, Shvetsov YB, Wilkens LR, Cooney RV, Lurie G, Maskarinec G, Hernandez BY, Le Marchand L, Henderson BE et al. (2014): Plasma 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> is associated with decreased risk of postmenopausal breast cancer in whites: a nested case-control study in the multiethnic cohort study. *BMC Cancer* 14, 29

Kinuta K (2000): Vitamin D Is an Important Factor in Estrogen Biosynthesis of Both Female and Male Gonads. *Endocrinology* 141, 1317–1324

Kizelsztejn P, Govorko D, Komarnytsky S, Evans A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I (2009): 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E433-9

Koelle MR, Talbot WS, Seagraves WA, Bender MT, Cherbas P, Hogness DS (1991): The *Drosophila* EcR gene encodes an ecdysone receptor, a new member of the steroid receptor superfamily. *Cell* 67, 59-77

Kühn T, Kaaks R, Becker S, Eomois P, Clavel-Chapelon F, Kvaskoff M, Dossus L, Tjønneland A, Olsen A, Overvad K et al. (2013): Plasma 25-hydroxyvitamin D and the risk of breast cancer in the European prospective investigation into cancer and nutrition: a nested case-control study. *Int J Cancer* 133, 1689-1700

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-870

Kuzmenko AI, Morozova RP, Nikolenko IA, Korniets GV, Kholodova Y (1997): Effects of vitamin D3 and ecdysterone on free-radical lipid peroxidation. *Biochemistry (Mosc)* 62, 609-612

Lacey JV, Sherman ME, Rush BB, Ronnett BM, Ioffe OB, Duggan MA, Glass AG, Richesson DA, Chatterjee N, Langholz B (2010): Absolute risk of endometrial carcinoma during 20-year follow-up among women with endometrial hyperplasia. *J Clin Oncol* 28, 788-792

LaCroix AZ, Chlebowski RT, Manson JE, Aragaki AK, Johnson KC, Martin L, Margolis KL, Stefanick ML, Brzyski R, Curb JD et al. (2011): Health outcomes after stopping conjugated equine estrogens among postmenopausal women with prior hysterectomy: a randomized controlled trial. *JAMA* 305, 1305-1314

Lafont R, Dinan L (2003): Practical uses for ecdysteroids in mammals including humans: an update. *J Insect Sci* 3, 7

Lee Y, Park J, Yu H, Kim J, Youn HJ, Jung SH (2005): Up-regulation of PI3K/Akt signaling by 17beta-estradiol through activation of estrogen receptor-alpha, but not estrogen receptor-beta, and stimulates cell growth in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 336, 1221-1226

Lerchbaum E, Obermayer-Pietsch B (2012): Vitamin D and fertility: a systematic review. *Eur J Endocrinol* 166, 765–778

Liu JJ, Bertrand KA, Karageorgi S, Giovannucci E, Hankinson SE, Rosner B, Maxwell L, Rodriguez G, Vivo I de (2013): Prospective analysis of vitamin D and endometrial cancer risk. *Ann Oncol* 24, 687–692

Lobo RA (2008): Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. *Maturitas* 60, 10–18

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, 199–207

Major GC, Alarie F, Dore J, Phouttama S, Tremblay A (2007): Supplementation with calcium + vitamin D enhances the beneficial effect of weight loss on plasma lipid and lipoprotein concentrations. *Am J Clin Nutr* 85, 54–59

Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM(2000): A developmental atlas of rat mammary gland in histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5, 165–185

Matthews J, Gustafsson J (2003): Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3, 281–292

McDonnell DP (2004): The molecular determinants of estrogen receptor pharmacology. *Maturitas* 48 Suppl 1, S7-12

Messina MJ, Wood CE (2008): Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutr J* 7, 17

Milanese TR, Hartmann LC, Sellers TA, Frost MH, Vierkant RA, Maloney SD, Pankratz VS, Degenim AC, Vachon CM, Reynolds CA et al. (2006): Age-related lobular involution and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 98, 1600–1607

Mizwicki MT, Keidel D, Bula CM, Bishop JE, Zanello LP, Wurtz J, Moras D, Norman AW (2004): Identification of an alternative ligand-binding pocket in the nuclear vitamin D receptor and its functional importance in 1alpha,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12876–12881

National Research Council: Nutrient Requirements of Laboratory Animals, 4. Auflage; The National Academy Press, Washington, D.C. 1995

Nelson HD (2008): Menopause. *Lancet* 371, 760–770

Nelson LR, Bulun SE (2001): Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 45, S116

Nemere I, Yoshimoto Y, Norman AW (1984): Calcium transport in perfused duodena from normal chicks: enhancement within fourteen minutes of exposure to 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>. *Endocrinology* 115, 1476–1483

Norman AW (2006): Minireview: vitamin D receptor: new assignments for an already busy receptor. *Endocrinology* 147, 5542–5548

Norman AW, Mizwicki MT, Norman, Derek P G (2004): Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* 3, 27–41

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, 189–201

Okui S, Otaka T, Uchiyama M, Takemoto T, Hikino H (1968): Stimulation of protein synthesis in mouse liver by insect-moulting steroids. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 16, 384–387

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

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

Owens W, Koeter, Herman B W M (2003): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: an overview. *Environ Health Perspect* 111, 1527–1529

Palli SR, Kapitskaya MZ, Potter DW (2005): The influence of heterodimer partner ultraspiracle/retinoid X receptor on the function of ecdysone receptor. *FEBS J* 272, 5979–5990

Parikh G, Varadinova M, Suwandhi P, Araki T, Rosenwaks Z, Poretsky L, Seto-Young D (2010): Vitamin D regulates steroidogenesis and insulin-like growth factor binding protein-1 (IGFBP-1) production in human ovarian cells. *Horm Metab Res* 42, 754–757

Pelletier G (2000): Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* 15, 1261–1270

Pelletier G, Labrie C, Labrie F (2000): Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 165, 359–370

Poehlman ET, Toth MJ, Gardner AW (1995): Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Ann Intern Med* 123, 673–675

Powell SL, Gödecke T, Nikolic D, Chen S, Ahn S, Dietz B, Farnsworth NR, van Breemen, Richard B, Lankin DC, Pauli GF et al. (2008): In vitro serotonergic activity of black cohosh and identification of N(omega)-methylserotonin as a potential active constituent. *J Agric Food Chem* 56, 11718–11726

Prelevic GM, Kocjan T, Markou A (2005): Hormone replacement therapy in postmenopausal women. *Minerva Endocrinol* 30, 27–36

Puri P, Wuttke W, Seidlová-Wuttke D (2012): 20-OH-ecdysone prevents hot flushes in ovariectomized rats. *Planta med* 78, 109–114

Pushkala K, Gupta PD (2001): Steroid hormones regulate programmed cell death: a review. *Cytobios* 106, 201–217

Renehan AG, Tyson M, Egger M, Heller RF, Zwahlen M (2008): Body-mass index and incidence of cancer: a systematic review and meta-analysis of prospective observational studies. *Lancet* 371, 569–578

Rhoades FP (1967): Minimizing the menopause. *J Am Geriatr Soc* 15, 346–354

Richard D (1986): Effects of ovarian hormones on energy balance and brown adipose tissue thermogenesis. *Am J Physiol* 250, R245-9

Ricote M, Glass CK (2007): PPARs and molecular mechanisms of transrepression. *Biochim Biophys Acta* 1771, 926–935

Rimoldi G, Christoffel J, Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W (2007): Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1, 62–68

Roesch DM (2006): Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 87, 39–44

Ross RK, Paganini-Hill A, Gerkins VR, Mack TM, Pfeffer R, Arthur M, Henderson BE (1980): A case-control study of menopausal estrogen therapy and breast cancer. *JAMA* 243, 1635–1639

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford, Shirley A A, Howard BV, Johnson KC et al. (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321–333

Russo IH, Russo J (1978): Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7, 12-dimethylbenzaanthracene. *J Natl Cancer Inst* 61, 1439–1449

Russo IH, Russo J (1996): Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104, 938–967

Russo J, Russo IH (2008): Breast development, hormones and cancer. *Adv Exp Med Biol* 630, 52–56

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, van Zwieten, M J (1990): Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62, 244–278

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, 278–291

Russo J, Balogh G, Mailo D, Russo PA, Heulings R, Russo IH (2007): The genomic signature of breast cancer prevention. *Recent Results Cancer Res* 174, 131–150

Salpeter SR, Walsh, J M E, Ormiston TM, Greyber E, Buckley NS, Salpeter EE (2006): Meta-analysis: effect of hormone-replacement therapy on components of the metabolic syndrome in postmenopausal women. *Diabetes Obes Metab* 8, 538–554

Santen RJ (2002): To block estrogen's synthesis or action: that is the question. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 3007–3012

Santollo J, Marshall A, Daniels D (2013): Activation of membrane-associated estrogen receptors decreases food and water intake in ovariectomized rats. *Endocrinology* 154, 320–329

Schlattner U, Vafopoulou X, Steel, Colin G H, 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, 64–72

Seidlová-Wuttke D: Vergleich der Wirkungen von Estradiol und fünf endokrinen Disruptoren in ovariectomierten Ratten. Med. Diss. Göttingen 2004

Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* 149, 351–362

Seidlová-Wuttke D, 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, 884–889

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

Shang Y, Brown M (2002): Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs. *Science* 295, 2465–2468

Shapiro S (2007): Recent epidemiological evidence relevant to the clinical management of the menopause. *Climacteric* 10 Suppl 2, 2–15

Silberstein GB (2001): Tumour-stromal interactions. Role of the stroma in mammary development. *Breast Cancer Res* 3, 218–223

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, 31–38

Sorkin JD, Vasaitis TS, Streeten E, Ryan AS, Goldberg AP (2014): Evidence for threshold effects of 25-hydroxyvitamin D on glucose tolerance and insulin resistance in black and white obese postmenopausal women. *J Nutr* 144, 734–742

Spencer TE, Hayashi K, Hu J, Carpenter KD (2005): Comparative developmental biology of the mammalian uterus. *Curr Top Dev Biol* 68, 85–122

Sternlicht MD (2006): Key stages in mammary gland development: the cues that regulate ductal branching morphogenesis. *Breast cancer Res* 8, 201

Sundaram R, Naresh R, Shanthi P, Sachdanandam P (2012): Efficacy of 20-OH-ecdysone on hepatic key enzymes of carbohydrate metabolism in streptozotocin induced diabetic rats. *Phytomedicine* 19, 725–729

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, 3371–3379

Tagliaferri C, Salles J, Landrier J, Giraudet C, Patrac V, Lebecque P, Davicco M, Chanet A, Pouyet C, Dhaussy A et al. (2015): Increased body fat mass and tissue lipotoxicity associated with ovariectomy or high-fat diet differentially affects bone and skeletal muscle metabolism in rats. *Eur J Nutr* 54, 1139–1149

Thiébaud ACM, Kipnis V, Chang S, Subar AF, Thompson FE, Rosenberg PS, Hollenbeck AR, Leitzmann M, Schatzkin A (2007): Dietary fat and postmenopausal invasive breast cancer in the National Institutes of Health-AARP Diet and Health Study cohort. *J Natl Cancer Inst* 99, 451–462

Thomas HE, Stunnenberg HG, Stewart AF (1993): Heterodimerization of the *Drosophila* ecdysone receptor with retinoid X receptor and ultraspiracle. *Nature* 362, 471–475

Tóth N, Szabó A, Kacsala P, Héger J, Zádor E (2008): 20-Hydroxyecdysone increases fiber size in a muscle-specific fashion in rat. *Phytomedicine* 15, 691–698

Toth N, Hunyadi A, Bathori M, Zador E (2010): Phytoecdysteroids and vitamin D analogues--similarities in structure and mode of action. *Curr Med Chem* 17, 1974–1994

Tsujiyama S, Ujihara H, Ishihara K, Sasa M (1995): Potentiation of GABA-induced inhibition by 20-hydroxyecdysone, a neurosteroid, in cultured rat cortical neurons. *Jpn J Pharmacol* 68, 133–136

van Diest, P J, van der Wall, E, Baak, J P A (2004): Prognostic value of proliferation in invasive breast cancer: a review. *J Clin Pathol* 57, 675–681

van Weerden, W M, Bierings HG, van Steenbrugge, G J, de Jong, F H, Schroder FH (1992): Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50, 857–861

Vienonen A, Miettinen S, Blauer M, Martikainen PM, Tomas E, Heinonen PK, Ylikomi T (2004): Expression of nuclear receptors and cofactors in human endometrium and myometrium. *J Soc Gynecol Investig* 11, 104–112

Vitezova A, Zillikens MC, van Herpt, T T W, Sijbrands, E J G, Hofman A, Uitterlinden AG, Franco OH, Kiefte-de Jong, J C (2015): Vitamin D status and metabolic syndrome in the elderly: the Rotterdam Study. *Eur J Endocrinol* 172, 327–335

Vortherms T: Effekte von Östradiol und Equol sowie der pflanzlichen Substanzen Daidzein, Puerarin und Quercetin in der Hypophyse und im Urogenitaltrakt der ovariectomierten Ratte. *Med. Diss. Vet. Hannover* 2006

Wade GN, Gray JM, Bartness TJ (1985): Gonadal influences on adiposity. *Int J Obes* 9 Suppl 1, 83–92

Wang D, Vélez de-la-Paz, Omar Israel, Zhai J, Liu D (2013): Serum 25-hydroxyvitamin D and breast cancer risk: a meta-analysis of prospective studies. *Tumour Biol.* 34, 3509–3517

Wang H, Eriksson H, Sahlin L (2000): Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* 63, 1331–1340

Welsh J (2007): Targets of vitamin D receptor signaling in the mammary gland. *J. Bone Miner Res* 22 Suppl 2, V86-90

Welsh J, Wietzke JA, Zinser GM, Byrne B, Smith K, Narvaez CJ (2003): Vitamin D-3 receptor as a target for breast cancer prevention. *J Nutr* 133, 2425S-2433S

Winuthayanon W, Hewitt SC, Orvis GD, Behringer RR, Korach KS (2010): Uterine epithelial estrogen receptor  $\alpha$  is dispensable for proliferation but essential for complete biological and biochemical responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 19272–19277

Wuttke W, Seidlová Wuttke D (2011): Beta-ecdysone prevents the metabolic syndrome in ovariectomized rats: effects on metabolic parameters. *Planta Med* 77, PJ 14

Wuttke W, Seidlová-Wuttke D (2013): Pflanzlicher Präparate für die Therapie klimakterischer und postmenopausaler Erkrankungen und Beschwerden. *Frauenarzt* 45, 580–587

Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V, Seidlová-Wuttke D (2002): Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 83, 133–147

Wuttke W, Jarry H, Seidlová-Wuttke D (2007): Isoflavones--safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev* 6, 150–188

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

Yoshizawa T, Handa Y, Uematsu Y, Takeda S, Sekine K, Yoshihara Y, Kawakami T, Arioka K, Sato H, Uchiyama Y et al. (1997): Mice lacking the vitamin D receptor exhibit impaired bone formation, uterine hypoplasia and growth retardation after weaning. *Nat Genet* 16, 391–396

Zhang Z, Laping J, Glasser S, Day P, Mulholland J (1998): Mediators of estradiol-stimulated mitosis in the rat uterine luminal epithelium. *Endocrinology* 139, 961–966

Zhang Z, Burch PE, Cooney AJ, Lanz RB, Pereira FA, Wu J, Gibbs RA, Weinstock G, Wheeler DA (2004): Genomic analysis of the nuclear receptor family: new insights into structure, regulation, and evolution from the rat genome. *Genome Res* 14, 580–590

Zhao H, Tian Z, Hao J, Chen B (2005): Extragonadal aromatization increases with time after ovariectomy in rats. *Reprod Biol Endocrinol* 3, 6

Zhou QG, Hou FF, Guo ZJ, Liang M, Wang GB, Zhang X (2008): 1, 25-Dihydroxyvitamin D improved the free fatty-acid-induced insulin resistance in cultured C2C12 cells. *Diabetes Metab Res Rev* 24, 459–464

Zhu L, Pollard JW (2007): Estradiol-17 beta regulates mouse uterine epithelial cell proliferation through insulin-like growth factor 1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15847–15851

Zinser G, Packman K, Welsh J (2002): Vitamin D (3) receptor ablation alters mammary gland morphogenesis. *Development* 129, 3067–3076

Zoth N, Weigt C, Laudенbach-Leschowski U, Diel P (2010): Physical activity and estrogen treatment reduce visceral body fat and serum levels of leptin in an additive manner in a diet induced animal model of obesity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 122, 100–10

## 8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chemische Struktur des wichtigsten Östrogens in der Prämenopause 17- $\beta$ Estradiol .....	4
Abbildung 2: Chemische Struktur des synthetisch hergestellten Estradiol-(17 $\beta$ )-3-benzoats .....	5
Abbildung 3: Chemische Struktur des häufigsten Ecdysteroids 20-OH-Ecdyson .....	5
Abbildung 4: Chemische Struktur des VD (Calcitriol) .....	6
Abbildung 5: Zeitlicher Versuchsablauf .....	20
Abbildung 6: Übersicht der einzelnen gemessenen Kompartimente am Ausschnitt eines Rattenuterus im Querschnitt .....	24
Abbildung 7: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die tägliche Futteraufnahme eines Versuchstieres .....	28
Abbildung 8: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die absolute Gewichtszunahme vom Zeitpunkt der Ovariectomie bis zur Obduktion.....	30
Abbildung 9: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf das absolute Körpergewicht der Ratte zum Versuchsende.....	31
Abbildung 10: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die aufgenommene Futtermenge, die zu 1 g Gewichtszunahme führte .....	32
Abbildung 11: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf das absolute Uterusfeuchtgewicht .....	33
Abbildung 12: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf das Uterusgewicht in Gramm pro 100 g Körpergewicht. ....	34
Abbildung 13: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die Epitheldicke im Uterus. ....	35

Abbildung 14 A-G: Epitheldicke in den Versuchsgruppen .....	36
Abbildung 15: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die Endometriumdicke.....	37
Abbildung 16: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die Myometriumdicke. ....	38
Abbildung 17: Darstellung der einzelnen mammären Strukturen: Lobulus 1 .....	39
Abbildung 18: Darstellung der einzelnen mammären Strukturen: Lobulus 2 .....	39
Abbildung 19: Darstellung der einzelnen mammären Strukturen: Duktus .....	40
Abbildung 20: Histologische Aufarbeitung von Mammagewebe (ovx, Ecd+VD) .....	40
Abbildung 21: Histologische Aufarbeitung von Mammagewebe (ovx, E2+VD) .....	41
Abbildung 22: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die Anzahl der Lobulus 1 pro 1 mm <sup>2</sup> Fläche.....	42
Abbildung 23: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die Anzahl der Lobulus 2 pro 1 mm <sup>2</sup> Fläche.....	43
Abbildung 24: Der Effekt von VD in Kombination mit Ecd und E2 auf die Duktusanzahl pro 1 mm <sup>2</sup> Fläche.....	44
Abbildung 25: Prozentualer Anteil von Lobulus 1/ 2 und Duktus auf die Gesamtanzahl der gezählten mammären Strukturen der jeweiligen Versuchsgruppen .....	45

## 9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Versuchsgruppen .....	19
Tabelle 2: Signifikanzlegende.....	26
Tabelle 3: Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier.....	29
Tabelle 4: Anzahl der einzelnen Strukturen.....	45
Tabelle 5: Futterzusammensetzung Basisfutter mit VD .....	62
Tabelle 6: Futterzusammensetzung Basisfutter ohne VD .....	63
Tabelle 7: Organentwässerung .....	64
Tabelle 8: Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	65

---

## **Danksagung**

Besonders bedanken möchte ich bei Frau Priv. Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. W. Wuttke für die Bereitstellung des Themas sowie die freundliche Zusammenarbeit und die kritische Auseinandersetzung beim Anfertigen meiner Arbeit.

Ebenso gilt mein herzlicher Dank Frau Heidi Brueggemann-Meyer für die Anleitung und Unterstützung bei der Herstellung der histologischen Präparate und dem Arbeiten im Labor.

---