Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

eingereicht von Prof. Dr. med. W. Wuttke

**Haben Lignane im Weizen- und Leinsamenbrot eine östrogenartige Wirkung
auf Uterus und Mamma bei der ovariectomierten Ratte
im Vergleich mit 17- β -Östradiol?**

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

vorgelegt von
Jens Wolfgang Kölbel
aus
Husum

Göttingen 2015

Die vorliegende Dissertation wurde in Göttingen im Zeitraum von 2011 bis 2014 in der Arbeitsgruppe Endokrinologie unter der Betreuung von Prof. Dr. med. W. Wuttke angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. H. K. Kroemer

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Wuttke

2. Berichterstatter: PD Dr. M. Müller

3. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 10.11.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung	1
1.1 Grundgedanke der Studie	1
1.2 Allgemeines über Östrogene	2
1.3 Östrogene in der Umwelt	3
1.3.1 Definition von Endokrinen Disruptoren (EDs)	3
1.3.2 EDs und ihre Auswirkungen auf die Gesundheit	4
1.4 Östrogenität an den untersuchten Organen	6
1.4.1 Östrogene Effekte am Uterus	6
1.4.2 Östrogene Effekte an der Mamma	7
1.5 Das tierexperimentelle Modell	9
1.6 Die untersuchten Substanzen	10
1.7 Ziel der Arbeit	11
2 Material und Methoden	15
2.1 Tierversuch	15
2.1.1 Versuchstiere	15
2.1.2 Gruppeneinteilung und zeitlicher Versuchsablauf	16
2.2 Histologie	18
2.2.1 Herstellung der histologischen Präparate	18
2.2.2 Mikroskopische Auswertung der Uteri	18
2.2.3 Mikroskopische Auswertung der Mammae	20
2.3 Statistische Auswertung	21
3 Ergebnisse	22
3.1 Futterverbrauch der Tiere	22
3.2 Gewichtsentwicklung der Tiere	25
3.3 Uterusgewichte	26
3.4 Uterushistologie	27
3.4.1 Epithelium-Dicke	27
3.4.2 Endometrium-Dicke	30
3.4.3 Myometrium-Dicke	32
3.5 Mamma-Histologie	33

3.5.1	Anzahl an Lobuli 1	36
3.5.2	Anzahl an Lobuli 2	37
3.5.3	Anzahl an Ductus.....	38
3.6	<i>Zusammenfassung der Ergebnisse</i>	40
4	Diskussion	41
4.1	<i>Zielsetzung</i>	41
4.2	<i>Futtermverbrauch und Gewichtsentwicklung</i>	42
4.3	<i>Effekte an Uterus und Mamma</i>	43
4.3.1	E2-Gruppe	44
4.3.2	Weizenbrot- und Leinsamenbrotgruppe	45
4.4	<i>Limitationen der Studie</i>	50
5	Zusammenfassung	51
6	Abbildungsverzeichnis	52
7	Tabellenverzeichnis	54
8	Anhang	55
9	Literaturverzeichnis	61

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bzw.	beziehungsweise
CO ₂	Kohlendioxid
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DGE	Deutsche Gesellschaft für Ernährung
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
EDs	Endokrine Disruptoren
ER	Östrogenrezeptor
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER β	Östrogenrezeptor beta
HE	Hämatoxylin-Eosin
HRT	Hormonersatztherapie
LCIS	lobuläres Carcinoma in situ
NOEL	<i>no observed effect level</i>
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
Ovx	Ovarerktomie

ovx	ovarektomiert
POPs	<i>persistent organic pollutants</i> (Persistierende organische Schadstoffe)
SD-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten
SDS	special diet services
SERM	selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Grundgedanke der Studie

Die Sicherheit von pflanzlichen Lebensmitteln ist in Zeiten zunehmender ökologischer Verunreinigung ein wichtiges Thema geworden. Auf unterschiedlichsten Wegen, vor allem aber durch anthropogene Eingriffe, gelangt täglich eine Vielzahl chemischer Stoffe in unsere Umwelt und akkumuliert dort zu einem unberechenbaren Gemisch potenziell gesundheitsgefährdender Substanzen. Viele dieser Stoffe haben sexualhormonähnliche Eigenschaften und interferieren demnach mit dem Hormonhaushalt von Mensch und Tier. Die inzwischen zahlreich beschriebenen adversen Effekte auf die Gesundheit von Wildtieren haben Befürchtungen geweckt, dass diese Substanzen auch die humane Gesundheit negativ beeinflussen könnten. Vor allem Umweltsubstanzen, die mit dem Östrogenrezeptor (ER) interagieren, konnten in zahlreichen Veröffentlichungen als Auslöser dieser Effekte identifiziert werden. Landwirtschaftliche Nutzpflanzen sind derartigen Schadstoffen in besonderem Maße ausgesetzt, da sie häufig zusätzlich mit hormonaktiven Substanzen aus Düngern und Pflanzenschutzmitteln in Berührung kommen.

Eines der aus landwirtschaftlichen Nutzpflanzen hergestellten Endprodukte ist das Brot. Es wird als Grundnahrungsmittel von Menschen auf der ganzen Welt in großen Mengen verzehrt. Die Untersuchung der Auswirkungen von Brotkonsum auf unsere Gesundheit ist demzufolge von hoher ernährungswissenschaftlicher Bedeutung. Es ist bekannt, dass Brot verschiedenste östrogenartig wirkende Substanzen enthält. Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang die sogenannten Phytoöstrogene, also von Pflanzen gebildete Östrogene, die im Getreide und demnach auch im Brot enthalten sind. Zudem ist Brot für den größten Teil der nahrungsbedingten Cadmiumbelastung des Menschen verantwortlich, da es beispielsweise in den häufig für die Brotzubereitung verwendeten Getreidarten Weizen und Leinsamen enthalten ist. In zahlreichen Studien konnte Cadmiumsalzen bereits eine östrogenartige Wirkung nachgewiesen werden.

Die Vielzahl der im Brot enthaltenen Stoffe mit potenziell sexualhormonähnlicher Wirkung macht eine Abschätzung der gesundheitlichen Netto-Auswirkungen von Brot als fertigem Nahrungsmittel sehr schwierig. Aus diesem Grund wurden im vorliegenden Versuch nicht die Inhaltsstoffe Weizen und Leinsamen als solche, sondern der Effekt des Endproduktes Weizenbrot bzw. Leinsamenbrot untersucht. Ziel ist es herauszufinden, ob durch den Verzehr von Brot möglicherweise gesundheitliche Folgen im Hinblick auf östrogenabhängige Organe zu erwarten sind.

1.2 Allgemeines über Östrogene

Östrogene gehören zur großen Gruppe der Steroidhormone und bestehen demzufolge aus einem Cholesterin-Grundgerüst. Zusammen mit den Gestagenen bilden sie die Untergruppe der weiblichen Sexualhormone. Der potenteste Vertreter der Östrogene ist das Östradiol (E2 oder 17- β -Östradiol). Daneben existieren noch die deutlich schwächer wirksamen Östrogene Östron (E1) und Östriol (E3).

Die Biosynthese der Östrogene findet bei der Frau vor allem in den Ovarien statt, indem in den Theca Interna Zellen des Ovars zunächst Cholesterin zu Androstendion umgewandelt wird. Dieses gelangt durch Diffusion in die benachbarten Granulosazellen, wo über die Zwischenstufe Testosteron schließlich durch Aromatisierung das fertige Östrogen entsteht.

Abb. 1, Strukturformel von Östradiol (DailyMed National Library of Medicine 2014)

Neben den Ovarien werden auch in der Nebennierenrinde und im Fettgewebe Östrogene synthetisiert. Dies ist vor allem im postmenopausalen Lebensabschnitt von Bedeutung, da in dieser Phase die ovarielle Hormonproduktion fast vollständig zum Erliegen kommt, was einen deutlichen Abfall des Östrogenspiegels zur Folge hat (Löffler und Heinrich 2011).

Wie alle Steroidhormone sind auch die Östrogene aufgrund ihrer lipophilen Struktur in der Lage, die Zellmembran zu durchdringen. Ihre Wirkung wird durch Bindung an intrazelluläre Östrogenrezeptoren (ER) in den Zielorganen realisiert, deren Aktivierung eine Änderung der Transkriptionsrate östrogensensitiver Gene zur Folge hat. Zur Zeit sind die ER-Subtypen ER α und ER β bekannt, deren unterschiedliche Expression in den östrogensensitiven Organen vermutlich für die gewebespezifische Wirkung von Östrogenen verantwortlich ist (Leidenberger et al. 2009).

1.3 Östrogene in der Umwelt

Es wird diskutiert, dass eine exogene Zufuhr von Östrogenen (beispielsweise im Rahmen einer Hormonersatztherapie (HRT)), negative Auswirkungen auf Wachstum und Differenzierung östrogensensitiver Organen haben kann (Rossouw et al. 2002; Key et al. 2001). So konnte in der britischen Million-Women-Studie belegt werden, dass unter Östrogensubstitution ein erhöhtes Brustkrebs- und Endometriumkarzinom - Risiko besteht (Beral 2003; Beral et al. 2005). In Kenntnis dieser Ergebnisse ist demnach zu klären, ob auch außerhalb einer gezielten HRT, durch die unwissentliche Aufnahme von exogenen Östrogenen, ein Gefährdungspotenzial für die humane Gesundheit besteht. Eine Belastung der Umwelt mit hormonell aktiven Substanzen ist schon seit längerem bekannt und die karzinogenen Wirkungen einer E2-Therapie rücken auch die sogenannten Umweltöstrogene in ein neues Licht.

1.3.1 Definition von Endokrinen Disruptoren (EDs)

Die Europäische Kommission hat in einem Workshop in Weybridge (UK) 1996 folgende allgemein gültige Definition eines Endokrinen Disruptors verfasst:

„Ein ED ist eine exogene Substanz, die durch Veränderung endokriner Funktionen einen negativen Gesundheitseffekt auf einen intakten Organismus oder seine Nachkommen ausübt.“ (eigene Übersetzung (European Commission 1996))

Häufig sind es Chemikalien, die die Wirkung von Sexualhormonen, insbesondere von Östrogen oder Testosteron, imitieren oder auch antagonisieren (Degen 2004). Die Liste derartiger Substanzen ist lang und ihre Verbreitung und Vorkommen in unserer Umwelt ist Gegenstand intensiver Forschung, vor allem da viele von ihnen im Verdacht stehen, die körperliche Entwicklung und die reproduktiven Organe des Menschen negativ zu beeinflussen (Kortenkamp et al. 2011).

Schwierigkeiten bestehen momentan darin, einen direkten Zusammenhang zwischen einem bestimmten ED und einem negativen Gesundheitseffekt nachzuweisen. Dies wird zudem erschwert durch die Tatsache, dass EDs auf sehr unterschiedliche Weise in den Hormonhaushalt eingreifen. Mögliche Angriffspunkte sind zum einen eine direkte agonistische oder antagonistische Wirkung am Hormonrezeptor, zum anderen aber auch die Beeinflussung von Synthese, Transport oder Metabolismus der endogenen Hormone. Ein weiterer Wirkmechanismus von EDs ist die Erhöhung oder Erniedrigung der Rezeptoraffinität gegenüber Sexualhormonen an der Zielzelle (Committee on Hormonally Active Agents in the Environment 1999).

1.3.2 EDs und ihre Auswirkungen auf die Gesundheit

Durch intensive Forschung in den letzten Jahren konnten bereits etliche EDs in der Umwelt identifiziert werden. Auch wenn oftmals ihr genauer Wirkmechanismus noch nicht vollständig geklärt ist, haben doch etliche Studien eine Verbindung zwischen bestimmten EDs und adversen Gesundheitseffekten belegen können. Diese reichen von Feminisierungserscheinungen männlicher Alligatoren durch Pflanzenschutzmittel (Guillette et al. 1994) über erhöhte Brustkrebsinzidenzen durch ubiquitär in der Natur vorkommende persistierende organische Schadstoffe (POP's) (Warner et al. 2002; Pesatori et al. 2009) bis hin zur Verunreinigung landwirtschaftlicher Felder durch mit Rückständen der Anti-Babypille belasteten Klärschlamm (Ternes et al. 1999; Langdon et al. 2013).

Neben den industriellen EDs, die durch humane Einflüsse unsere Agrikultur belasten, nehmen wir mit der Nahrung auch von Pflanzen produzierte Stoffe mit

östrogenähnlichen Eigenschaften auf, die sogenannten Phytoöstrogene. Phytoöstrogene gehören zur chemischen Gruppe der Polyphenole und besitzen aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu den endokrinen Östrogenen die Fähigkeit, mit dem ER zu interagieren (Yildiz 2005). Zu ihren Hauptvertretern zählen die vor allem in Getreide und Früchten vorkommenden Lignane und die überwiegend in Soja enthaltenen Isoflavone (Barrett 1996). Es ist wahrscheinlich, dass sie auf das endokrine System Einfluss nehmen, indem sie entweder direkt am ER wirken oder den Sexualhormonstoffwechsel verändern (Strauss et al. 1998; Mense et al. 2008).

Eine Übersicht über die Menge der in Weizen und Leinsamen nachgewiesenen Lignane wird in Tabelle 3 (Anhang) widerspiegelt. In beiden Getreidearten sind die Lignane Secoisolariciresinol, Lariciresinol und Pinoresinol enthalten. Matairesinol konnte in der zitierten Studie lediglich in Leinsamen nachgewiesen werden. Mit insgesamt 121 µg/100 g ist der Lignan-Gehalt in Weizen vergleichsweise gering. Leinsamen enthalten hingegen insgesamt 301129 µg Lignane pro 100 g (Milder et al. 2005).

Über die Nahrung aufgenommene Pflanzen-Lignane werden durch Darmbakterien von Säugetieren zu Enterolignanen umgewandelt (Saarinen et al. 2010). Penttinen et al. (2007) konnten zeigen, dass das Enterolignan Enterolacton den ER in Brustdrüsenzellen von Mäusen *in vitro* aktivieren kann und eine östrogenagonistische Wirkung *in vivo* hat.

Abb. 2, Strukturformel von Enterolacton (Saarinen et al. 2010)

In Reviews von Patisaul und Jefferson (2010) sowie Mense et al. (2008) konnte anhand der bisher publizierten Studien nicht abschließend geklärt werden, ob Phytoöstrogene neben ihren vermuteten positiven Effekten auf klimakterische Beschwerden auch gesundheitsschädigende Wirkungen haben.

Die lange Liste der bisher bekannten hormonell aktiven Substanzen in unserer Umwelt und die bisher beobachteten negativen Gesundheitseffekte auf Tiere und Menschen verdeutlichen, dass weitere Forschung auf dem Gebiet der EDs vonnöten ist um potenziell gesundheitsschädigende Folgen frühzeitig erkennen und minimieren zu können. Die oben genannten Beispiele unterstreichen die hohe Bedeutung hormonartig wirkender Substanzen im Hinblick auf gesundheitliche Schäden durch Umweltschadstoffe bei Mensch und Tier.

1.4 Östrogenität an den untersuchten Organen

Östrogene haben vielfältige Effekte an unterschiedlichen Organen. Sie wirken unter anderem auf Herz-Kreislauf-System, Vagina und äußeres Genital, Fettgewebe, Leber und Knochen. Die für die vorliegende Arbeit wichtigsten Effekte sind jedoch an Uterus und Mamma zu finden und sollen im Folgenden kurz skizziert werden.

1.4.1 Östrogene Effekte am Uterus

An der Gebärmutter fördern Östrogene die Proliferation des Uterusepithels (=Epithelium) sowie des Endo- und Myometriums durch Zellzahlvermehrung (Hyperplasie) und Zellvolumenzunahme (Hypertrophie). Außerdem erhöhen sie die Blutzufuhr (Hyperämie) und die Flüssigkeitsaufnahme (Imbibition) des Uterus, was zu einer Steigerung des Uterusgewichts und einer Zunahme der einzelnen Uterusschichtdicken führt (Martin et al. 1973). Postmenopausal kommt es durch den sinkenden Östrogenspiegel zur Uterus-Atrophie mit Verschmälerung des Epitheliums wie auch der endo- und myometrialen Schichten und Abnahme des Uterus-Gewichts.

Eine langjährige endogen oder exogen bedingte Östrogenexposition begünstigt jedoch die Entwicklung von östrogenabhängigen Uteruskorpus-Karzinomen (Endometriumkarzinomen). Bekannte Risikofaktoren sind dementsprechend eine frühe Menarche, eine späte Menopause sowie die Einnahme von E2-Präparaten im

Rahmen einer klassischen HRT (s.o.) (Leidenberger et al., 2009). Vor dem Hintergrund der von Evans (2011) beschriebenen Zunahme der Inzidenz östrogenabhängiger Endometriumkarzinome in den letzten Jahren ist aus präventionsstrategischen Gründen zu klären, ob den Umweltöstrogenen (in Form von EDs) ebenfalls eine Rolle als exogener Risikofaktor zukommt.

1.4.2 Östrogene Effekte an der Mamma

Am Brustdrüsengewebe sind Östrogene zusammen mit Progesteron und Prolaktin für die postnatale Entwicklung und Differenzierung verantwortlich. Unter Östrogeneinwirkung kommt es hier zu einer Proliferation von Milchbläschen (Alveoli) und Ausführungsgängen (Ductus) (Leidenberger et al., 2009).

Abb. 3, Schematische Darstellung der weiblichen Brust

(online unter <http://universitypublisher.org/radio2wiki> abgerufen am 26.06.2013,
 Radio2Wiki 2013, modifiziert)

Der Differenzierungsgrad der Brustdrüse kann anhand verschiedener Lobuli-Klassen beschrieben werden. Typ 1-Lobuli bestehen aus 5-10 Alveoli und finden sich ebenso wie die stärker differenzierten Typ 2-Lobuli (11-20 Alveoli) in der Brust von postpubertären Nulliparae. Sie entwickeln sich während einer Schwangerschaft zu Lobuli 3, die die dominante Struktur in der Mamma von Parae sind. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, da Lobuli 1 und 2 als die am wenigsten differenzierten Strukturen am ehesten auf karzinogene Substanzen mit einer malignen Entartung reagieren. So konnten in In-Vitro-Versuchen Lobuli 1 als Ausgangsstrukturen für das duktales Carcinoma in situ (DCIS) identifiziert werden, während Lobuli 2 vor allem zu lobulären Carcinoma in situ (LCIS) entarten. Undifferenzierte lobuläre Strukturen wie Lobuli 1 sind darüber hinaus deutlich sensibler gegenüber östrogenen Einflüssen als Lobuli 3 (Russo J und Russo IH 1994; Russo J et al. 2001; Brown und Lamartiniere 1995).

Postmenopausal kommt es unter fehlendem Östrogeneinfluss bei Parae wie auch bei Nulliparae zur Involution der Brustdrüse mit quantitativer Rückbildung aller Lobuli-Klassen und Ductus (Lamote et al. 2004; Man et al. 2011). In diesem Lebensabschnitt sind Typ 1-Lobuli wieder die vorherrschenden Strukturen, wobei die Typ 1-Lobuli der Parae eine geringere Suszeptibilität gegenüber karzinogenen Einflüssen aufweisen als die der Nulliparae. Dies könnte eine Erklärung dafür sein, dass mit jeder Gravidität das Brustkrebsrisiko gegenüber Nulliparae weiter sinkt (Russo J et al. 2005).

Risikofaktoren für die Entstehung eines Mammakarzinoms sind analog zum Endometriumkarzinom erhöhte Lebenszeit-Östrogenspiegel, unter anderem durch eine frühe Menarche, eine späte Menopause, eine postmenopausale HRT oder durch eine erhöhte Östrogenproduktion im Fettgewebe bei Adipositas (Yager und Davidson 2006). Auch am Brustdrüsengewebe könnte also die exogene Zufuhr von EDs gesundheitlich relevante Folgen haben.

1.5 Das tierexperimentelle Modell

Dieser Versuch wurde an ovariectomierten (ovx) Sprague-Dawley-Ratten (SD-Ratten) durchgeführt. Die ovx SD-Ratte stellt nach Russo IH und Russo J (1996) ein anerkanntes Modell für die Testung und Charakterisierung von endokrin aktiven Substanzen dar. Durch die Ovx wird die endogene Östrogenproduktion weitestgehend eliminiert, wodurch ein gutes Abbild der hormonellen Situation einer postmenopausalen Frau geschaffen wird.

Der feingewebliche Aufbau der Ratten-Mamma ist dem der humanen Brustdrüse identisch (vgl. Kapitel 1.4.2). Analog zur postmenopausalen Frau kommt es auch im Mamma-Gewebe der SD-Ratte nach Ovx zur quantitativen Rückbildung von Ductus sowie zur Involution der höhergradig differenzierten lobulären Strukturen mit konsekutiver Dominanz von Typ 1-Lobuli (Lucas et al. 2007; Russo IH und Russo J 1996).

Der Uterus der Ratte ist im Gegensatz zum humanen Uterus als zweiteiliges Hohlorgan angelegt (Uterus duplex). Die unter Kapitel 1.4.1 beschriebene Aufteilung in 3 Schichten findet sich jedoch auch bei der Ratte. Vergleichbar mit der postmenopausalen Frau zeigen sich auch bei der Ratte nach Ovx eine Uterus-Atrophie mit Abnahme des Uterusgewichts sowie eine Verschmälerung von Epithelium, Endo- und Myometrium (vgl. Kapitel 1.4.1).

Zur Detektion einer Östrogenwirkung der untersuchten Stoffe wurde der von der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) empfohlene Uterotrophie-Test verwendet (Owens und Koeter 2003). Neben dem Uterusgewicht wurden auch die verschiedenen Schichtdicken der Gebärmutter untersucht, da diese sich ebenfalls als gute Indikatoren für mögliche östrogene Effekte erwiesen haben (Seidlova-Wuttke 2004).

Darüber hinaus wurden die Mammae der Ratten einer histomorphologischen Untersuchung unterzogen. Dieses Verfahren ist nach Lucas et al. (2007) ebenfalls als guter Indikator für den Nachweis von endokrin wirksamen Substanzen geeignet.

1.6 Die untersuchten Substanzen

In diesem Versuch wurde phytoöstrogenfreies Kontrollfutter verwendet, um eine östrogenähnliche Wirkung auf die untersuchten Organe in der Kontrollgruppe auszuschließen (Negativ-Kontrolle).

Durch Einsatz von E2-haltigem Futter sollte im Sinne einer Positiv-Kontrolle eine starke Stimulation der untersuchten östrogensensitiven Organe in der E2-Gruppe erzielt werden.

Weiterhin wurden mit Weizenbrot versetztes Futter sowie mit Leinsamenbrot versetztes Futter verwendet. Wie in Kapitel 1.1 geschildert ist Brot, aufgrund seiner großen Bedeutung als Grundnahrungsmittel sowie des schwer abschätzbaren Netto-Effektes der zahlreichen Inhaltsstoffe mit sexualhormonähnlicher Wirkung, ein interessantes Studienobjekt.

Vor allem Leinsamen enthalten hohe Mengen an Phytoöstrogenen, vor allem Lignane. Aus In-Vitro-Assays ist bekannt, dass Lignane dosisabhängig sowohl ER α als auch ER β aktivieren können und damit eine östrogenartige Wirkung *in vitro* haben (Penttinen et al. 2007, Mueller et al. 2004). Die mittels In-Vitro-Fermentation berechnete Produktion des Enterolignans Enterolacton beträgt bei Leinsamen ca. 85 mg/kg, bei Weizen hingegen lediglich ca. 4 mg/kg (Wang 2002). Dementsprechend sind phytoöstrogenbedingte Effekte vor allem in der Leinsamenbrotgruppe zu erwarten.

Neben Phytoöstrogenen enthalten Weizen- und Leinsamenbrot auch Cadmium, welches über Pestizide und Dünger auf landwirtschaftlich genutzte Felder gelangt (Järup und Akesson 2009). Der Cadmiumgehalt ist mit etwa 220 $\mu\text{g/kg}$ in Leinsamen erheblich höher als in Weizen mit ca. 40 $\mu\text{g/kg}$ (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit 2005), sodass auch cadmiumbedingte Effekte vor allem in der Leinsamenbrotgruppe zu erwarten sind. Auch für Cadmium konnte in In-Vitro-Studien gezeigt werden, dass es an ER α binden kann und durch dessen Aktivierung eine Änderung der Transkriptionsrate östrogensensitiver Gene bewirken kann (Aquino et al. 2012). In einer Studie von Johnson et al. (2003) konnte belegt werden, dass Cadmium *in vivo* eine östrogenartige Wirkung auf die östrogensensitiven Organe Uterus und Mamma besitzt. Weitere Studien konnten die

proliferationsfördernde Wirkung bestätigen und erste Hinweise auf ein durch Cadmium erhöhtes Risiko für maligne Entartungen in diesen Organen liefern (Kortenkamp 2011; Mcelroy et al. 2006; Akesson et al. 2008). Eine kürzlich publizierte Fall-Kontrollstudie von Itoh et al. (2013) an japanischen Frauen lieferte darüber hinaus Indizien für einen Zusammenhang zwischen cadmiumreicher Diät und dem Auftreten von ER-positiven Mammakarzinomen. Auch für das Endometriumkarzinom ist eine cadmiumabhängige Risikoerhöhung beschrieben (Akesson et al. 2008). Die Tatsache, dass mehr als ein Drittel der gesamten ernährungsbedingten Aufnahme dieses Metalloöstrogens durch den Verzehr von Brot stattfindet (Olsson et al. 2002), unterstreicht die Bedeutung einer Untersuchung von Brot als vollständiges Nahrungsmittel.

In einem bisher nicht veröffentlichten Teil des vorliegenden Versuchs, durchgeführt von Frau M. Baqaie (Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. Seidlova-Wuttke, Abteilung für Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen), wurden die Effekte der beiden Brotprodukte auf die Knochendichte (Spongiosadichte) der ovx Ratten untersucht. Hier zeigten sich sowohl für das untersuchte Weizenbrotfutter als auch für das Leinsamenbrotfutter östrogenartige Veränderungen an den Ratten-Tibiae im Sinne einer verminderten Abnahme der Knochendichte nach Ovx. Diese Beobachtung ist der Literatur zufolge ein klarer Hinweis auf eine antiosteoporotische und damit östrogenagonistische Wirkung der Testsubstanzen (Nakamura et al. 2007; Seidlova-Wuttke et al. 2008). Ob dieser Effekt durch die in den Testfuttern enthaltenen Phytoöstrogene, durch Cadmium oder durch andere EDs ausgelöst wurde, ist unklar.

1.7 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen des europaweiten Cascade-Projekts (Projektnummer: Food-CT-2004-506319) durchgeführt. Ziel des Cascade-Gesamtprojekts ist es, der breiten Öffentlichkeit und den Konsumenten wissenschaftliche Fakten über die Sicherheit von Nahrungsmitteln bereitzustellen, um sie vor eventuellen Risiken zu schützen. Grundlage ist die Beobachtung, dass viele der oben genannten EDs entweder auf natürlichem Wege oder durch bewusste oder unbewusste anthropogene Verunreinigung in die Umwelt gelangen und auf

diese Weise auch mit unseren Lebensmitteln in Kontakt kommen (Simonich und Hites 1995).

Ein Teilprojekt von Cascade, zu dem auch diese Arbeit gehört, befasst sich mit der Sicherheit von Brot. Als eines unserer Hauptnahrungsmittel – im Durchschnitt konsumiert jeder Deutsche rund 52 kg Brot im Jahr (Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft 2013) – nimmt Brot eine wichtige Stellung in der Ernährung ein. Wegen seiner Bedeutung als Lieferant von komplexen Kohlenhydraten, Vitaminen, Mineralien und Ballaststoffen wurde es von der Deutschen Gesellschaft für Ernährung (DGE) in der Basis der Ernährungspyramide angesiedelt. Allerdings ist mittlerweile bekannt, dass Brot hormonell aktive Substanzen enthält. Vor allem Leinsamenbrot und in geringerem Maße auch Weizenbrot enthalten erhebliche Mengen an natürlichen Phytoöstrogenen (Saarinen et al. 2010). Ein weiterer ED der bereits im Brot identifiziert werden konnte ist Cadmium (Julin et al. 2012; Tahvonen und Kumpulainen 1994). Darüber hinaus scheint es wahrscheinlich, dass noch weitere EDs auf landwirtschaftlich genutzte Flächen und somit letztendlich auch in unsere Brotprodukte gelangen. Die Konzentrationen dieser Chemikalien im Brot sind vermutlich gering. Es konnte jedoch nachgewiesen werden, dass trotz oftmals niedriger Konzentrationen von EDs in der Umwelt, die bisher als unbedenklich eingestuft wurden, durch die komplexen und möglicherweise synergistischen Interaktionen zwischen verschiedenen EDs dennoch endokrine Effekte hervorgerufen werden können. So konnte von Silva et al. (2002) mithilfe eines Hefezell-Östrogentests ein kumulativer östrogenartiger Effekt von einem ED-Gemisch belegt werden, obwohl die Einzelsubstanzen der Mixtur jeweils unterhalb ihres NOEL (*no observed effect level*) - also der Dosierung, bei der in früheren Versuchen kein Effekt beobachtet werden konnte - dosiert wurden.

Dass die Interaktion von EDs in der Natur ein nicht zu unterschätzender Faktor ist, zeigt eine Untersuchung von 139 Flüssen in den USA, bei der herausgefunden wurde, dass diese zu 80% mit organischen Schadstoffen (u.a. Steroidhormonen) belastet waren. Die Konzentration jedes einzelnen Schadstoffs lag zwar nur knapp oberhalb der gesetzlichen Grenzen für Trinkwasser, allerdings war jeder Fluss im Mittel mit sieben verschiedenen organischen Schadstoffen verunreinigt (Kolpin et al. 2002).

Dies macht deutlich, dass es wichtig ist neben den Auswirkungen einzelner EDs vor allem die Kombinationswirkung von den in der Natur häufig vorkommenden komplexen Gemischen unterschiedlichster EDs zu studieren. Bisher liegen dazu nur wenige Erkenntnisse vor. Ebenso wenig ist erforscht, welche Auswirkungen diese Gemische auf den endokrinen Stoffwechsel haben und wie sie die Gesundheit von Menschen und Tieren beeinflussen (Hotchkiss et al. 2008).

Eine Möglichkeit zur Analyse des Gefahrenpotenzials bestimmter Nahrungsmittel ist die quantitative Bestimmung jedes einzelnen enthaltenen EDs. Hierfür sind aufgrund der geringen Stoffkonzentrationen und der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften der EDs allerdings sehr sensitive und komplexe Methoden erforderlich. Der Nachteil dieser Methoden ist weiterhin, dass sie keinerlei Aussage über die Netto-Effekte des Nahrungsmittels treffen können, da jeder ED über verschiedene Mechanismen wirkt und darüber hinaus die komplexen Interaktionen der EDs nicht berücksichtigt werden. Zudem werden lediglich die untersuchten Stoffe selbst, nicht aber die Parameter Absorption, Distribution, Metabolisation oder Exkretion untersucht (Hotchkiss et al. 2008; Committee on Hormonally Active Agents in the Environment 1999). Eine Teilstudie die im Rahmen des Cascade-Projekts durchgeführt wurde konnte zeigen, dass zum Beispiel die östrogenartige Wirkung von Cadmium vermutlich (trotz der gezeigten In-Vitro-Aktivierung von ER α) *in vivo* teilweise nicht über den ER vermittelt wird (Ali et al. 2010). Derartige Effekte sind demnach nur schwer *in vitro* messbar.

In der vorliegenden Arbeit wurde daher ein anderer Ansatz verfolgt: Durch die Testung eines kompletten Nahrungsmittels (Brot) *in vivo* soll durch die Untersuchung von östrogensensitiven Zielorganen eine Information über die kumulativen Netto-Effekte der enthaltenen Chemikalien gewonnen werden. Der gewählte Zeitraum von 8 Wochen soll dabei eine Langzeitbelastung simulieren. Somit kann - aus endokrinologischer Sicht - eine Aussage über die Sicherheit bzw. die gesundheitliche Unbedenklichkeit des Nahrungsmittels im Hinblick auf die Organe Uterus und Mamma getroffen werden (Hotchkiss et al. 2008).

Nachdem bei den untersuchten Ratten sowohl für Weizenbrot- als auch für Leinsamenbrotfutter ein Effekt auf die Knochendichte konstatiert werden konnte, soll im Rahmen dieser Arbeit nun geklärt werden, ob die vermutete Östrogenität auch an den östrogensensitiven Organen Uterus und Mamma bestätigt werden kann. Eine

derartige endokrin disruptive Wirkung durch eines unserer Hauptnahrungsmittel wäre ein alarmierendes Ergebnis in Bezug auf die Sicherheit von Brot.

Sollte das in den Brotprodukten enthaltene Gemisch unterschiedlicher EDs einen gesundheitlich relevanten Netto-Effekt haben, so ist zu erwarten dass diese analog zur Positiv-Kontrollgruppe (E2-Gruppe) eine messbare Änderung der histomorphologischen Strukturen in den oben beschriebenen Organe bewirken. So müsste das Mamma-Gewebe der mit den Brotzusätzen gefütterten Ratten im Sinne einer Involutionsverlangsamung im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt Lobuli 1 und 2 sowie Ductus aufweisen (Lucas et al. 2007). Im Uterusgewebe würden eine Hypertrophie und Hyperplasie der Gewebsschichten und eine Zunahme des Uterusgewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe für eine gesundheitlich relevante Belastung der Brotsorten mit EDs sprechen (Seidlova-Wuttke 2004).

2 Material und Methoden

2.1 Tierversuch

Der Tierversuch wurde von der Medizinstudentin Frau Munira Baqaie unter Betreuung und Anleitung von Frau PD Dr. med. Seidlova-Wuttke durchgeführt. Meine Person war an der Durchführung des Tierversuchs nicht beteiligt. Finanziert wurde der Versuch von der Europäischen Union im Rahmen des Cascade Network of Excellence (Projektnummer: Food-CT-2004-506319).

Meine Aufgabe war es, die Präparate, die von der CTA Frau Heidi Brüggemann-Meyer geschnitten, fixiert und gefärbt wurden, unter dem Mikroskop zu untersuchen, um die unten genannten Daten zu erheben.

2.1.1 Versuchstiere

Dieser Versuch ist Teil einer Versuchsreihe, die an 86 Sprague-Dawley-Ratten (Firma Harlan-Winkelmann, Borcheln), davon 43 männliche und 43 weibliche Ratten, unter der Aufsicht von Frau PD Dr. med. Seidlova-Wuttke in der Abteilung für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt und von der Bezirksregierung Braunschweig unter der Nummer G 82.06 genehmigt wurde. Für die vorliegende Arbeit wurden ausschließlich die 43 weiblichen Tiere verwendet.

Die Ratten waren bei ihrer Ankunft am 23.01.2008 3 Monate alt. Zu Versuchsbeginn wurden sie zu jeweils 5 bzw. 6 Tieren pro Käfig (Makrolon® Käfig Typ IV, Firma Techniplast, Hohenpreißenberg) aufgeteilt.

Die Haltung erfolgte bei einer Raumtemperatur von 21-22 Grad Celsius bei einer relativen Luftfeuchtigkeit von 45-60% und täglicher Beleuchtung von 7-19 Uhr. Während der Eingewöhnungszeit von 3 Wochen standen den Tieren das sojafreie Grundfutter auf Basis von Maisöl und Maisstärke (AIN-93G, Firma special diet services (SDS), Finnland) sowie Wasser jederzeit zur freien Verfügung.

Um jede Ratte später eindeutig identifizieren zu können, wurde allen Tieren unter Inhalationsnarkose mit einer Einmal-Applikationsspritze (Firma Uno-Roevastaal, Zevenaar, Holland) ein Transponder (UNO MICRO-ID, Firma Uno-Roevastaal, Zevenaar, Holland) subkutan implantiert.

Am 04.02.2008 wurde jede Ratte gewogen. Das Durchschnittsgewicht aller Ratten betrug zu diesem Zeitpunkt 236 g. Eine Woche später, in der Zeit vom 12.-14.02.2008, wurden sie durch Frau PD Dr. med. Seidlova-Wuttke unter Isofluran-Inhalationsnarkose (Forene®, Firma Abbott) ovariectomiert, um die endogene Östrogenproduktion der Tiere zu eliminieren.

2.1.2 Gruppeneinteilung und zeitlicher Versuchsablauf

Unmittelbar nach der Ovx wurden die Tiere in 4 Gruppen zu je 10-12 Ratten aufgeteilt und anschließend in Käfigen zu 5 bzw. 6 Tieren gehalten. Ihr Gewicht wurde ab diesem Zeitpunkt einmal pro Woche erhoben und dokumentiert. Jede Gruppe bekam über einen Zeitraum von 2 Monaten ein spezifisches Futter über Raufen zur Verfügung gestellt:

- ◆ Kontrollgruppe: Sojafreies und testsubstanzfreies Kontrollfutter (AIN-93G (Maisöl und Maisstärke), Firma SDS, Finnland)
- ◆ E2-Gruppe: Sojafreies estradiolbenzoathaltiges Futter (Estradiolbenzoat (10 mg/kg Futter), Firma ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland)
- ◆ Weizenbrotgruppe: Sojafreies weizenbrothaltiges Futter (AIN-93G + 42,92% wheat bread, Firma SDS, Finnland)
- ◆ Leinsamenbrotgruppe: Sojafreies leinsamenbrothaltiges Futter (AIN-93G + 42,92% flaxseed bread, Firma SDS, Finnland)

Der Futterverbrauch pro Käfig wurde einmal pro Woche gemessen und daraus der mittlere Futterverbrauch pro Tier berechnet. Eine Übersicht über die Gruppeneinteilung und die durchschnittliche Futteraufnahme ist in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1, Gruppeneinteilung der Tiere mit Futterart und durchschnittlicher Futteraufnahme pro Tier (Daten von Medizinstudentin Frau Munira Baqaie)

	Kontrollgruppe	E2-Gruppe	Weizenbrotgruppe	Leinsamenbrotgruppe
Futter	AIN-93G (Maisöl und Maisstärke)	E2 (10 mg/kg Futter)	AIN-93G + Weizen (42,92%)	AIN-93G + Leinsamen (42,92%)
Anzahl der Ratten	12	10	10	11
Ø Futter-Aufnahme pro Tier (g/Tag)	14,1	14,1	15,6	15,6

Zwei Monate nach der Ovx wurden die Tiere am 07.04.2008 unter CO₂-Narkose dekapitiert. In der anschließenden Obduktion wurden diverse Organe entnommen. Für die vorliegende Arbeit wurden die Organe Uterus und Mamma verwendet. Der zeitliche Ablauf des Tierversuchs ist in Abb. 4 graphisch veranschaulicht.

Abb. 4, Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Tierversuchs

2.2 Histologie

2.2.1 Herstellung der histologischen Präparate

Die Herstellung der histologischen Präparate wurde durch die MTA Frau Brüggemann-Meyer durchgeführt.

Nach der Organentnahme wurde das Feuchtgewicht der Uteri erhoben. Anschließend wurden die Uteri und Mammae in Formalin konserviert. Es folgten die Entwässerung der Organe und die Fixierung durch Einbettung in Paraffinblöcke. Anschließend wurden die Blöcke tiefgefroren, bevor sie mit einem Rotations-Tischmikrotom (Model RM 2135, Leica Microsystems, Nussloch) in 3-6 µm dicke Schichten geschnitten wurden. Von jedem entnommenen Organ wurden auf diese Weise 2 Schnitte angefertigt, die jeweils auf Objektträger (Superfrost Plus, Menzel GmbH, Braunschweig) übertragen wurden. Nach Trocknung der Objektträger im Wärmeschrank über 24h wurden die Präparate nach dem allgemein üblichen Verfahren mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt (siehe Tabelle 2, Anhang).

Die HE-Färbung ist ein etabliertes Routineverfahren in der Histologie, bei der anionische (basophile) Komponenten - wie der Zellkern - durch das Hämatoxylin blau gefärbt werden und kationische (azidophile) Zellbestandteile - wie das Zytoplasma - durch das Eosin rot gefärbt werden. Auf diese Weise können die verschiedenen Gewebestrukturen unter dem Mikroskop unterschieden werden.

Nach der Färbung wurden die Schnitte mit Deckgläsern und Deckmittel fixiert und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet.

2.2.2 Mikroskopische Auswertung der Uteri

An diesem Punkt begann meine Arbeit mit der mikroskopischen Untersuchung der fertigen (fixierten und gefärbten) histologischen Präparate.

Für die histologische Auswertung wurde ein Mikroskop (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG, Jena) mit integrierter digitaler Kamera (Olympus ColorView, Soft Imaging System GmbH, Münster) verwendet. Das auf diese Weise erzeugte digitale Bild wurde auf einem PC mit der Software cell[^]D (Version 3.1, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) ausgewertet.

Um die Schichtdicken des Uterus quantifizieren zu können, wurden die Dicke des endometrialen Epithels (Epithelium), die Dicke des Endometriums und die Dicke des Myometriums mit cell[^]D ausgemessen. Für die Quantifizierung der Epithelium-Dicke wurden pro Präparat 10 Messungen an zufälligen Stellen des Epitheliums durchgeführt. Analog wurde zur Quantifizierung der Endometrium- und Myometriumdicke verfahren, wobei hier jeweils 5 Messungen pro Präparat durchgeführt wurden. Anschließend wurden die jeweiligen Mittelwerte errechnet und dokumentiert. Eine Übersicht über die ausgemessenen Schichten ist in Abb. 5 dargestellt.

Abb. 5, Histologische Darstellung eines Ratten-Uterus (links: Übersicht; rechts: Ausschnittsvergrößerung)

In der Übersicht sind das Endometrium (a), das Myometrium (b) sowie deren Grenzschicht (rote Linie) markiert. Im Detailausschnitt ist das Epithelium (c) markiert sowie die Grenzschicht zwischen Epithelium und Endometrium (rote Linie)

2.2.3 Mikroskopische Auswertung der Mammae

Die histologische Auswertung der Mamma-Präparate wurde mit derselben Hard- und Software durchgeführt wie die Auswertung der Uterus-Präparate.

Jedes Präparat wurde zunächst in 4 Quadranten aufgeteilt und unter dem Mikroskop betrachtet. Durch genaue Auszählung der verschiedenen Strukturen in jedem Quadranten konnte so die Anzahl an Lobuli 1, Lobuli 2 und Ductus im Präparat ermittelt werden. Anschließend wurde das Gesamtpräparat mithilfe der Software fotografiert und die Fläche berechnet um die Anzahl der jeweiligen Strukturen ins Verhältnis zur Fläche setzen zu können.

Die ausgezählten Strukturen sind beispielhaft in Abb. 6 dargestellt.

Abb. 6, Histologische Ausschnitte eines Mamma-Präparates der Ratte

Markiert sind ein Lobulus 1 (a) und ein Ductus (b) (linkes Bild) sowie ein Lobulus 2 (c) (rechtes Bild)

2.3 Statistische Auswertung

Die gemessenen Schichtdicken der Uteri (Epithelium, Endometrium, Myometrium) wurden in das Computerprogramm Excel (Office 2007, Microsoft Corporation, USA) übertragen. Im Anschluss wurde für jede Uterusschicht ein Mittelwert für die jeweiligen Versuchsgruppen berechnet.

Die ermittelte Anzahl an Lobuli 1, Lobuli 2 und Ductus der Mamma-Präparate wurde ebenfalls in Excel übertragen. Anschließend wurden die absoluten Zahlen in Relation zur Fläche des jeweiligen Präparats gesetzt und so die Anzahl pro mm² bestimmt. So konnte trotz unterschiedlicher Präparategrößen eine Vergleichbarkeit zwischen den Schnitten hergestellt werden. Daraufhin wurde auch hier die mittlere Anzahl der gemessenen Mammastrukturen für die jeweiligen Versuchsgruppe berechnet.

Für die graphische Darstellung und die statistische Auswertung der erhobenen Daten wurde das Computerprogramm GraphPad Prism (Version 5.01, GraphPad Software Inc., USA) verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Im Anschluss wurde eine Varianzanalyse mittels one-way ANOVA-Test und nachfolgendem multiplem T-Test nach Dunnett durchgeführt. In den Graphen wurden jeweils die Kontrollgruppen mit den übrigen Gruppen verglichen und Signifikanzen gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

3.1 Futterverbrauch der Tiere

In Abb. 7 ist der durchschnittliche tägliche Futterverbrauch der Tiere im Zeitraum von der Ovx bis zum Versuchsende dargestellt.

Abb. 7, Durchschnittlicher täglicher Futterverbrauch der Tiere nach der Ovx
(Daten von Medizinstudentin Frau Munira Baqaie)

Im zeitlichen Verlauf ist zu erkennen, dass die Tiere der Kontrollgruppe sowie der Weizenbrot- und Leinsamenbrotgruppe über den gesamten Versuchszeitraum relativ konstant gefressen haben. Dagegen haben die Tiere der E2-Gruppe vor allem in der ersten Versuchswoche mit 4,7 g pro Tier/Tag nur sehr wenig Nahrung zu sich genommen.

In Abb. 8 zeigt sich außerdem ein unterschiedlicher Gesamt-Futtermittelverbrauch der Versuchsgruppen. Sowohl die Tiere der Weizenbrotgruppe als auch die der Leinsamenbrotgruppe nahmen im Versuchszeitraum mit einer durchschnittlichen Futteraufnahme von jeweils 15,6 g pro Tier/Tag, mehr Futter zu sich als die der Kontrollgruppe (14,1 g pro Tier/Tag). Die Tiere der E2-Gruppe nahmen, trotz der sehr geringen Futteraufnahme in der ersten Versuchswoche, im mittleren Verbrauch mit 14,1 g pro Tier/Tag durchschnittlich dieselbe Menge Futter zu sich wie die der Kontrollgruppe.

Insgesamt sind die Unterschiede im Futtermittelverbrauch der Versuchsgruppen im Zeitraum von der Ovulation bis zur Obduktion jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Abb. 8, Mittlerer Futterverbrauch der Tiere im Zeitraum von der Ovx bis zur Obduktion
(Daten von Medizinstudentin Frau Munira Baqiaie)

3.2 Gewichtsentwicklung der Tiere

Abb. 9 zeigt die Gewichtsentwicklung der Tiere während des Versuchs.

Abb. 9, Gewichtsentwicklung der Tiere während des Versuchs
(Daten von Medizinstudentin Frau Munira Baqaie)

Ausgehend von einem durchschnittlichen Gewicht von 236 g pro Tier (mittleres Gewicht aller Versuchstiere) entwickelte sich das Körpergewicht der Ratten nach der Ovx und der Aufteilung in die Versuchsgruppen unterschiedlich. Während die Tiere der Weizenbrotgruppe und der Leinsamenbrotgruppe über den gesamten Versuchszeitraum stetig und in ähnlichem Umfang wie die Kontrollgruppe bis zu einem durchschnittlichen Endgewicht von 340 g (Kontroll- und Weizenbrotgruppe) bzw. 354 g (Leinsamenbrotgruppe) zunahmen, entwickelte sich das Gewicht der

Tiere der E2-Gruppe deutlich schwächer. Hier kam es initial 2 Wochen nach der Ovx zu einem Gewichtsverlust auf durchschnittlich 219 g pro Tier. Anschließend kam es auch hier zu einer stetigen Gewichtszunahme, allerdings deutlich langsamer als in der Kontrollgruppe, sodass das durchschnittliche Endgewicht in der E2-Gruppe mit 249 g pro Tier auch signifikant geringer war als in der Kontrollgruppe.

3.3 Uterusgewichte

Unmittelbar nach der Dekapitation der Tiere wurden deren Uteri gewogen. Das Ergebnis der Messung ist grafisch in Abb. 10 dargestellt.

Abb. 10, Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf das Uterusgewicht
(Daten von Medizinstudentin Frau Munira Baqaie)

Das mittlere Uterus-Gewicht der Kontrollgruppentiere betrug 96 mg. Damit waren die Uteri der Weizenbrotgruppe mit durchschnittlich 99 mg geringfügig schwerer und die der Leinsamenbrotgruppe mit 92 mg nicht-signifikant leichter als die der Kontrollgruppe. Deutliche Unterschiede zur Kontrollgruppe zeigen sich bei der Betrachtung der Uterus-Gewichte der E2-Gruppe. Mit einem durchschnittlichen Gewicht von 467 mg waren die Uteri hier rund 5-mal (und damit signifikant) schwerer als die der Kontrollgruppentiere.

3.4 Uterushistologie

Im Folgenden werden die, mittels der in Kapitel 2.2.2 beschriebenen Methoden, gewonnenen Ergebnisse der Uterus-Auswertungen vorgestellt.

3.4.1 Epithelium-Dicke

Bei der Untersuchung der Schichtdicken des Epitheliums ergaben sich zum Teil signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. In Abb. 11 (A–D) sind repräsentative histologische Schnittbilder in identischer Vergrößerung dargestellt, die die Epithelium-Proliferation unter den verschiedenen Futterarten zeigen.

Abb. 11 A, Kontrollgruppe

Abb. 11 B, E2-Gruppe

Abb. 11 C, Weizenbrotgruppe

Abb. 11 D, Leinsamenbrotgruppe

Abb. 11 (A-D), Histologische Darstellung des endometrialen Epithels (Epithelium) der Ratten-Uteri. A: Kontrollgruppe, B: E2-Gruppe, C: Weizenbrotgruppe, D: Leinsamenbrotgruppe

Es zeigt sich bei den Uteri der Kontrollgruppentiere ein atrophisches Epithel (Abb. 11 A). Auch das Epithel in der Weizenbrot- und in der Leinsamenbrotgruppe ist insgesamt atrophisch. Hier sind keine eindeutigen Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe sichtbar (Abb. 11 C + D). In der E2-Gruppe hingegen ist ein deutlich verändertes, teilweise mehrschichtiges und insgesamt hypertrophes Epithel erkennbar (Abb. 11 B) (vgl. Kapitel 1.4.1).

Eine Übersicht über die quantitativen Unterschiede der Epithelium-Schichten in den verschiedenen Versuchsgruppen ist in Abb. 12 dargestellt.

Abb. 12, Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf das endometriale Epithel des Ratten-Uterus

Eine signifikante Verbreiterung des endometrialen Epithels ist nur in der E2-Gruppe messbar. Es ist mit einer Breite von durchschnittlich 43,7 μm mehr als 3-mal so dick wie das Epithelium der Kontrollgruppentiere (13,6 μm). Die übrigen zugefütterten Substanzen hatten hingegen keinen signifikanten Effekt auf die Epithelium-Dicke. Die mit Weizenbrot zugefütterten Tiere hatten mit 13,4 μm ebenso wie die mit Leinsamenbrot zugefütterten Tiere (13,5 μm) ein nur minimal dünneres Epithelium als die Tiere der Kontrollgruppe.

3.4.2 Endometrium-Dicke

In Abb. 13 (A-D) ist aus jeder Versuchsgruppe eine Uterus-Übersichtsaufnahme jeweils in identischer Vergrößerung dargestellt. In erster Linie wird hier der starke Größenunterschied zwischen der E2-Gruppe und den übrigen Gruppen deutlich. Der Uterus aus der E2-Gruppe war in der gewählten Vergrößerung aufgrund der massiven Endometrium- und Myometrium-Proliferation nicht vollständig abzubilden und ist deshalb nur als Ausschnitt dargestellt.

Abb. 13 A, Kontrollgruppe

Abb. 13 B, E2-Gruppe

Abb. 13 C, Weizenbrotgruppe

Abb. 13 D, Leinsamenbrotgruppe

Abb. 13 (A-D), Histologische Darstellung des Endo- und Myometriums der Ratten-Uteri.

A: Kontrollgruppe, B: E2-Gruppe, C: Weizenbrotgruppe, D: Leinsamenbrotgruppe

Es findet sich wie schon bei der Epithelium-Messung eine alleinige Stimulation in der E2-Gruppe. Mit einer durchschnittlichen Dicke von 699,5 μm ist das Endometrium hier rund doppelt so hoch aufgebaut wie bei den Tieren aus der Kontrollgruppe (342,5 μm). Die Uteri der Tiere aus der Weizenbrot- sowie der Leinsamenbrotgruppe weisen lediglich geringfügige, nicht-signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe auf. Bei der Weizenbrotgruppe beträgt die durchschnittliche Endometrium-Dicke 348,9 μm , bei der Leinsamenbrotgruppe 325,6 μm .

Die quantitativen Ergebnisse der Endometrium-Messungen sind in Abb. 14 zu sehen.

Abb. 14, Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf das Endometrium des Ratten-Uterus

3.4.3 Myometrium-Dicke

Neben dem Endometrium ist in Abb. 13 (A-D) auch der myometriale Anteil der Uteri abgebildet. Es zeigt sich, analog zur epithelialen und endometrialen Schicht, lediglich in der E2-Gruppe (475,2 µm) eine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe (272,8 µm). Weder das weizenbrot- noch das leinsamenbrothaltige Futter führten zu einer signifikanten Veränderung der Schichtdicke des Myometriums. Im Durchschnitt ist das Myometrium hier mit 280,9 µm (Weizenbrotgruppe) bzw. 261,7 µm (Leinsamenbrotgruppe) fast unverändert gegenüber den Kontrollwerten (Abb. 15).

Abb. 15, Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf das Myometrium des Ratten-Uterus

Zusammenfassend lässt sich zu den Ergebnissen der Uterus-Auswertung feststellen, dass lediglich in der E2-Gruppe stimulierende Wirkungen auf die Gebärmutter erkennbar sind. Das Weizenbrot- und das Leinsamenbrotfutter haben im Vergleich mit der Kontrollgruppe keinen proliferativen Effekt auf die verschiedenen Schichten der Ratten-Uteri gezeigt.

3.5 Mamma-Histologie

Im folgenden werden die mittels der in Kapitel 2.2.3 beschriebenen Methoden gewonnenen Ergebnisse der Mamma-Auswertung vorgestellt.

In Abb. 16 (A-D) sind mikroskopische Übersichtsaufnahmen von den Ratten-Mammae der verschiedenen Versuchsgruppen in identischer Vergrößerung dargestellt. Es ist zu erkennen, dass das Drüsengewebe unterschiedlich stark proliferiert ist. In der Kontrollgruppe sowie der Weizenbrot- und Leinsamenbrotgruppe sind jeweils nur wenige Drüsenstrukturen (Lobuli 1, Lobuli 2, Ductus) zu erkennen. Hier findet sich ein hoher Fett- und Bindegewebs-Anteil. In der E2-Gruppe ist dagegen ein stark stimuliertes und proliferiertes Drüsengewebe mit vielen Ductus, Lobuli 1 und Lobuli 2 zu erkennen.

Abb. 16 A, Kontrollgruppe

Abb. 16 B, E2-Gruppe

Abb. 16 C, Weizenbrotgruppe

Abb. 16 D, Leinsamenbrotgruppe

Abb. 16 (A-D), Histologische Darstellung der Ratten-Mammae. A: Kontrollgruppe, B: E2-Gruppe, C: Weizenbrotgruppe, D: Leinsamenbrotgruppe

3.5.1 Anzahl an Lobuli 1

Eine signifikante Proliferation von Lobuli 1 ist lediglich in der E2-Gruppe messbar. Hier sind, über alle Präparate der E2-Gruppe gemittelt, 6,4 Lobuli 1 pro mm^2 zu finden. In der Kontrollgruppe sind es dagegen mit 2,4 Lobuli 1/ mm^2 nur etwas mehr als ein Drittel im Vergleich zur E2-Gruppe. In der Weizenbrotgruppe (2,1 Lobuli 1/ mm^2) und der Leinsamenbrotgruppe (2,0 Lobuli 1/ mm^2) ist eine nicht-signifikante Abnahme in der Anzahl der Lobuli 1 zu erkennen. Die Ergebnisse der Lobuli 1 Auszählung sind in Abb. 17 dargestellt.

Abb. 17, Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf die Anzahl der Lobuli 1 im Brustdrüsengewebe der Ratten

3.5.2 Anzahl an Lobuli 2

Insgesamt ist der Anteil an Lobuli 2 in den untersuchten Präparaten nur sehr gering, in einigen Präparaten waren sogar überhaupt keine Lobuli 2 nachweisbar. Die einzige Ausnahme bilden die Mammæ der Tiere aus der E2-Gruppe, in denen im Durchschnitt $0,177 \text{ Lobuli } 2/\text{mm}^2$ erkennbar waren. Die geringste Proliferation an Lobuli 2 ist mit $0,013 \text{ Lobuli } 2/\text{mm}^2$ in der Weizenbrotgruppe auszumachen, die damit nicht-signifikant unter der Kontrollgruppe mit $0,016 \text{ Lobuli } 2/\text{mm}^2$ liegt. Eine nicht-signifikante Stimulation zeigt sich hingegen in der Leinsamenbrotgruppe, in der im Mittel $0,020 \text{ Lobuli } 2/\text{mm}^2$ zu finden waren. Die Ergebnisse der Lobuli 2 Auszählung sind in Abb. 18 dargestellt.

Abb. 18, Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf die Anzahl der Lobuli 2 im Brustdrüsengewebe der Ratten

3.5.3 Anzahl an Ductus

Verglichen mit der Kontrollgruppe (1,63 Ductus/mm²) bewirkte lediglich das E2-haltige Futter mit 3,17 Ductus/mm² eine signifikante Proliferation der Ductus im Mamma-Gewebe der Tiere. Das Weizenbrotfutter sorgte mit 1,70 Ductus/mm² ebenso wie das Leinsamenbrotfutter mit 1,71 Ductus/mm² lediglich für eine minimale und nicht-signifikante Stimulation im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Ergebnisse sind in Abb. 19 zu erkennen.

Abb. 19, Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf die Anzahl der Ductus im Brustdrüsengewebe der Ratten

Bei der Betrachtung aller Ergebnisse der Mamma-Auswertung ist zu erkennen, dass weder beim Weizenbrot- noch beim Leinsamenbrotfutter ein signifikanter Effekt bezüglich der Proliferation der untersuchten Strukturen nachgewiesen werden kann. Das E2-haltige Futter zeigt hingegen in allen Bereichen eine signifikante Zunahme der Proliferation im Brustdrüsengewebe der Ratten.

3.6 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Zusammenschau aller Ergebnisse in Abb. 20 zeigt, dass bei den Tieren der E2-Gruppe sowohl im Uterus- als auch im Brustdrüsengewebe eine Proliferationssteigerung der untersuchten Strukturen und der Gewebeschichtdicken zu verzeichnen ist. Obwohl die Tiere dieser Gruppe im Futterverbrauch gleichauf mit der Kontrollgruppe liegen, ist das Körpergewicht am Versuchsende signifikant geringer.

Bei den Tieren der Weizenbrot- und der Leinsamenbrotgruppe ist in keiner der untersuchten Strukturen und Gewebeschichtdicken eine signifikante Proliferationssteigerung oder Proliferationshemmung erkennbar.

Abb. 20, Zusammenfassung der Ergebnisse

(Daten zu Futterverbrauch, Körpergewicht und Uterusgewicht von Medizinstudentin Frau Munira Baqaie)

4 Diskussion

Ein Vergleich mit der bisher veröffentlichten Literatur ist für den vorliegenden Versuch nur bedingt möglich, da bisher nur wenige Untersuchungen über endokrine Effekte von kompletten Grundnahrungsmitteln auf hormonsensitive Gewebe der ovx Ratte, wie sie in der vorliegenden Studie durchgeführt wurden, publiziert worden sind. Allerdings gibt es Hinweise, dass die in unserem Brot enthaltenen Substanzen wie beispielsweise Phytoöstrogene (Lignane) und das Schwermetall Cadmium eine östrogenartige Wirkung haben (vgl. Kapitel 1.6).

4.1 Zielsetzung

Die Belastung der Umwelt mit EDs ist von zunehmender Bedeutung für die Gesundheit von Mensch und Tier. Über Grundwasser, Pestizide und Düngemittel gelangen viele EDs auch auf landwirtschaftlich genutzte Flächen (vgl. Kapitel 1.3.2). Zusammen mit den in manchen Nutzpflanzen enthaltenen Phytoöstrogenen ergeben sie ein unberechenbares Gemisch endokrin wirksamer Substanzen, deren möglicherweise synergistische Wirkung das Endokrinium von Mensch und Tier stören könnte. Zahlreiche Fälle sind bekannt, in denen in der Natur vorkommende EDs unter anderem zu Feminisierungserscheinungen oder Störungen der Spermatogenese bei Tieren geführt haben (Guillette et al. 1994; Katsiadaki et al. 2006). Auch am Menschen sind in der Vergangenheit morphologische Veränderungen an Uterus und Mamma infolge ED-Belastung beschrieben worden (Warner et al. 2002; Johnson et al. 2003). Ein Hauptnahrungsmittel, welches aus mit EDs belasteten Nutzpflanzen hergestellt wird, ist das Brot. Die in dieser Studie untersuchten Brotsorten enthalten Weizen bzw. Leinsamen und in beiden Getreidearten konnten unterschiedliche Mengen an Phytoöstrogenen (genauer Lignanen) nachgewiesen werden. Vor allem Leinsamen enthalten signifikante Mengen an Lignanen und gleichzeitig im Vergleich zu Weizen auch erheblich höhere Mengen des Metalloöstrogens Cadmium. Dies legt nahe, dass östrogenartige Effekte durch EDs am ehesten in der Leinsamenbrotgruppe zu erwarten sind.

Bisher unveröffentlichte Ergebnisse haben für das untersuchte Weizen- und Leinsamenbrot bereits eine östrogenartige Wirkung auf den Knochen ergeben.

Anhand des für endokrinologische Fragestellungen etablierten Modells der ovx Ratte wurde daher in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob sich die vermutete Östrogenität der Brotprodukte auch in den östrogensensitiven Organen Uterus und Mamma widerspiegelt. Dazu wurden den ovx SD-Ratten die 4 Testsubstanzen phytoöstrogenfreies Futter (Kontrollgruppe), E2-haltiges Futter, weizenbrothaltiges Futter und leinsamenbrothaltiges Futter oral verabreicht. Der gewählte Zeitraum von 8 Wochen diente der Simulation einer Langzeitbelastung. Im Anschluss wurden Uteri und Mammae der Tiere histologisch untersucht. Durch den Vergleich mit der Kontrollgruppe (Negativ-Kontrolle) und der E2-Gruppe (Positiv-Kontrolle) kann eine Aussage über die Östrogenität und damit möglicherweise gesundheitsschädigende Effekte der beiden Brotsorten getroffen werden.

4.2 Futterverbrauch und Gewichtsentwicklung

Die Tiere der E2-Gruppe zeigten zu Versuchsbeginn eine transiente Hypophagie (Abb. 5), was ein häufig beobachteter Effekt einer E2-Substitution ist (Wade und Gray 1979; Roesch 2006). Insgesamt nahmen sie aber über den gesamten Versuchszeitraum gesehen dieselbe Menge Futter zu sich wie die Tiere der Kontrollgruppe (Abb. 8).

Aus der Literatur ist bekannt, dass ein Östrogenmangel infolge Ovx bei Ratten bereits nach einer Woche zu einer erhöhten Futteraufnahme mit konsekutivem Gewichtsanstieg sowie einer massiven Fettakkumulation führt. Durch Substitution von E2 sind derartige Effekte supprimierbar (Seidlova-Wuttke 2004; Roesch 2006; Eckel 2011). In Übereinstimmung mit diesen Studien zeigte sich im vorliegenden Versuch ein deutlicher Gewichtsanstieg in der Kontrollgruppe nach Ovx. Das Endgewicht in der E2-Gruppe war hingegen signifikant erniedrigt trotz identischer Futteraufnahme. Gorzek et al. (2007) analysierten in ihrer Studie die spontane physische Aktivität von Mäusen nach Ovx mit und ohne E2-Substitution. Es zeigte sich in ihrem Versuch eine signifikant gesteigerte körperliche Aktivität mit folglich vermindertem Körpergewicht der E2-behandelten Tiere. Diese Ergebnisse könnten eine Erklärung für das verminderte Endgewicht in der E2-Gruppe sein.

Die beobachteten Folgen eines Östrogenentzugs bei ovx Ratten stehen darüber hinaus im Einklang mit der von Davis et al. (2012) registrierten erhöhten Inzidenz von Adipositas bei postmenopausalen Frauen. Butera (2010) zeigte, dass dieser Effekt auch beim Menschen durch E2-Substitution im Rahmen einer HRT-Monotherapie verhindert werden kann, was auf einen direkten Zusammenhang zwischen der Wirkung von E2 und dem Körpergewicht schließen lässt.

In der Weizenbrotgruppe kam es zu einem geringfügig erhöhten Futterverbrauch, der allerdings nicht signifikant war. Auch die Gewichtsentwicklung zeigte über den Versuchszeitraum keine signifikante Abweichung von der Kontrollgruppe, was in einem identischen Endgewicht resultierte (Abb. 9).

Ähnliche Ergebnisse waren in der Leinsamenbrotgruppe zu beobachten. Bei leicht erhöhtem Futterverbrauch kam es hier lediglich zu einem nicht-signifikant erhöhten Endgewicht.

Diese Resultate legen nahe, dass weder Weizen- noch Leinsamenbrot einen protektiven Einfluss auf die postmenopausale Zunahme des Körpergewichts haben. Eine östrogenartiger Netto-Effekt hinsichtlich der Futteraufnahme und des Körpergewichts kann demnach für die in den Brotsorten enthaltenen Substanzen negiert werden.

4.3 Effekte an Uterus und Mamma

Der Uterotrophie-Test ist als sensitiver Marker für das Aufspüren niedrig-potenter östrogenartig wirkender Substanzen etabliert, da Östrogene eine Proliferation der uterinen Schichten und damit des Uterusgewichts bewirken. Die hohe Sensitivität dieses Tests erfordert jedoch nach Empfehlung der OECD eine vorherige Ovx, da auf diese Weise die endogene E2-Produktion weitgehend eliminiert wird. In der Folge kommt es zu einer Rückbildung der uterinen Schichten und damit zu einem massiven Uterus-Gewichtsverlust, welcher jedoch durch eine E2-Substitution (bzw. durch die Aufnahme von östrogenartig wirkenden Substanzen) unterdrückt werden kann (Owens und Koeter 2003; Seidlova-Wuttke 2004).

Im Brustdrüsengewebe würde eine östrogenagonistische Wirkung der Testsubstanzen der Literatur zufolge eine Hemmung der Involution nach Ovx

bewirken. In diesem Fall müsste also eine erhöhte Anzahl an Typ 1- und Typ 2-Lobuli sowie Ductus nachweisbar sein (Lucas et al. 2007).

Für die E2-Gruppe sind demnach ebensolche Effekte in Uterus und Mamma zu erwarten. Sollten die Brotprodukte hier ebenfalls eine proliferationsfördernde respektive involutionshemmende Wirkung haben, so wäre dies ein Hinweis auf das Vorhandensein gesundheitlich relevanter Mengen östrogenartig wirkender Substanzen in den getesteten Brotsorten. Wünschenswert wäre demnach, zwischen Weizenbrot- und Kontrollgruppe bzw. Leinsamenbrot- und Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich Uterusgewicht, Uterusschichtdicken und Mamma-Histologie zu finden.

4.3.1 E2-Gruppe

In der E2-Gruppe waren die Uteri mit einer 5-fachen Gewichtssteigerung wie erwartet signifikant schwerer als die der Kontrollgruppe (Abb. 10). Eine derart hohe Gewichtszunahme des Uterusgewichts ist eine häufig beobachtete Folge einer E2-Substitution nach Ovx (Owens und Koeter 2003) und vermutlich durch Hyperplasie und Hypertrophie sowie eine gesteigerte wässrige Imbibition bedingt (Martin et al. 1973).

Histomorphometrisch spiegelte sich die Gewichtszunahme der Uteri in der E2-Gruppe in allen drei untersuchten Schichten wider. Im deutlich veränderten Epithelium kam es zu einer Verbreiterung der Schichtdicke auf das über dreifache des unter Östrogenmangel atrophisch erscheinenden Epitheliums der Kontrollgruppe (Abb. 11 A+B, Abb. 12). Das Endometrium zeigte mit einer Verdopplung der Schichtdicke ebenfalls eine signifikante Zunahme unter E2-Stimulation (Abb. 13 A+B, Abb. 14). Im Myometrium war der Effekt des E2-haltigen Futters am geringsten ausgeprägt, allerdings kam es auch hier zu einer signifikanten Zunahme der Schichtdicke auf das 1,7-fache der Kontrollgruppe (Abb. 13 A+B, Abb. 15). Diese Ergebnisse bestätigen die bisher in der Literatur beschriebenen Effekte einer E2-Substitution auf die verschiedenen Schichtdicken des Ratten-Uterus. In Übereinstimmung mit den Arbeiten von Owens und Koeter (2003) sowie von Seidlova-Wuttke (2004) reagierte auch im vorliegenden Versuch das Epithelium am stärksten auf östrogene Einflüsse, gefolgt vom Endometrium. Im Myometrium sind

östrogene Effekte der Literatur zufolge vergleichsweise gering ausgeprägt (Owens und Koeter 2003; Seidlova-Wuttke 2004), was durch den vorliegenden Versuch bestätigt werden kann.

In der Untersuchung des Mamma-Gewebes konnten ebenfalls die erwarteten involutionshemmenden Effekte der E2-Substitution gemessen werden. Die quantitativ dominierenden Strukturen waren wie in allen Testgruppen Lobuli vom Typ 1 (Abb. 17), gefolgt von Ductus (Abb. 19). Die Anzahl an Lobuli 2 war wie in allen Testgruppen sehr gering, allerdings spiegelte sich hier der Effekt des E2-haltigen Futters, mit einer 11-fachen Steigerung im Vergleich zur Kontrollgruppe, am deutlichsten wider (Abb. 18). Insgesamt kam es zu einer signifikanten Erhöhung der Anzahl aller untersuchten Strukturen im Vergleich zu den überwiegend bindegewebig umgebauten Brustdrüsen der Kontrollgruppentiere. Dieses Ergebnis ist im Sinne einer Involutionsverlangsamung unter oraler E2-Applikation zu interpretieren, da die Ovx in der Kontrollgruppe zu einer Atrophie der untersuchten Strukturen führt (Lucas et al. 2007). Auch Russo J et al. (1992) konnten in ihrer Analyse histologischer Schnitte von 51 menschlichen Brustdrüsen eine postmenopausale Abnahme aller lobulären Strukturen und Ductus mit anschließender Dominanz von Typ 1-Lobuli belegen. Im vorliegenden Versuch konnte dieser Effekt unter Östrogenmangel nach Ovx in der Kontrollgruppe ebenfalls beobachtet werden.

Bei Betrachtung der Ergebnisse in der - als Positiv-Kontrolle fungierenden - E2-Gruppe kann festgestellt werden, dass mit Ausnahme des Futterverbrauchs in allen untersuchten Faktoren signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe zu verzeichnen waren. Damit konnte gezeigt werden, dass die für diesen Versuch ausgewählten und untersuchten Parameter adäquat auf eine östrogene Stimulation nach Ovx reagieren und somit eine östrogenagonistische Wirkung widerspiegeln können.

4.3.2 Weizenbrot- und Leinsamenbrotgruppe

Für das weizenbrothaltige Futter konnten weder am Mamma-Gewebe noch am Uterus signifikante Abweichungen festgestellt werden. Die Verabreichung von leinsamenbrothaltigem Futter führte ebenso wenig zu einer signifikanten Veränderung in den untersuchten Organen, jedoch war in dieser Gruppe eine

geringfügige, nicht-signifikante, organspezifische östrogenagonistische Wirkung zu beobachten. So zeigte sich im Mamma-Gewebe eine minimale Abnahme an Lobuli 1 um den Faktor 1,2 bei gleichzeitig geringfügiger Zunahme an Lobuli 2 auf das 1,25-fache der Kontrollgruppe (Abb. 17 und 18). Nach Russo J et al. (1992) verschiebt sich das Verhältnis der Lobuli-Klassen im Rahmen der Involution infolge Östrogenmangel nach Ovx zugunsten von Lobuli 1. In der Leinsamenbrotgruppe scheint jedoch eine entgegengesetzte Tendenz vorzuliegen. Aufgrund der fehlenden Signifikanz kann dies jedoch lediglich als fraglicher Hinweis auf eine schwache endokrin-disruptive östrogenagonistische Wirkung des Leinsamenbrotes gewertet werden, die möglicherweise bedingt ist durch den bedeutend höheren Gehalt an Phytoöstrogenen im Vergleich zum Weizenbrot. So registrierten Penttinen et al. (2007) in ihrem Versuch eine Stimulation der Brustdrüse von Mäusen durch den Phytoöstrogen-Metaboliten Enterolacton. Im Uterus konnten sie hingegen trotz einer starken Reporter-Gen-Antwort keinerlei Epithelverdickung beobachten. Auch im vorliegenden Versuch kam es in der Leinsamenbrotgruppe nicht zu einer Proliferation des Uterusgewebes. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen von Khan et al. (2007), die nach 7tägiger Exposition gegenüber Leinsamenfutter ebenfalls keine Veränderung im Uterusgewicht oder der Uterusmorphologie bei Ratten feststellen konnten. Ursächlich hierfür ist vermutlich eine nur geringe Kontamination von Leinsamenbrot mit EDs. So weisen Owens und Koeter (2003) darauf hin, dass sich sehr geringe ED-Dosen (unterhalb eines Genistein-Äquivalents von 40 mg/kg/d) unter Umständen nicht im Uterotropie-Test widerspiegeln.

Aufgrund der fehlenden Signifikanz ist aber, trotz tendenziell vorhandener Abweichungen und deren Übereinstimmung mit der aktuellen Literatur, vorrangig von einer rein zufälligen Abweichung der Ergebnisse gegenüber der Kontrollgruppe auszugehen. Ein vermuteter Effekt des in Leinsamenbrot reichlich enthaltenen Metalloöstrogens Cadmium und der ebenfalls reichlich enthaltenen Phytoöstrogene auf die untersuchten Organe der ovx Ratten blieb damit im vorliegenden Versuch aus. Johnson et al. (2003) konnten in einer Studie an ovx Ratten erstmals zeigen, dass die intraperitoneale Injektion von Cadmiumchlorid (5 µg/kg) proliferative Effekte am Uterus hervorruft und zudem eine lobuloalveoläre Hyperplasie in der Brustdrüse bewirkt. Diese östrogenagonistischen Effekte von anorganischem Cadmium konnten in folgenden Studien häufig, wenn auch nicht immer, reproduziert werden (Kortenkamp 2011), was scheinbar im Kontrast zu den in dieser Studie gewonnenen

Ergebnissen steht. Ramachandran et al. (2011) weisen allerdings darauf hin, dass von Testsystemen in denen der Effekt anorganischer Cadmium-Salze getestet wird, nicht in gleichem Maße auf einen Effekt von mit Cadmium belasteten Lebensmitteln geschlossen werden kann. In ihrer Studie bewirkte die Verabreichung von anorganischem Cadmiumchlorid einen Anstieg des Uterusgewichts der untersuchten Ratten, bei der Fütterung mit cadmiumhaltigem Brot in ähnlicher und höherer Dosierung blieb dieser Effekt jedoch aus. Eine Reporter-Gen-Antwort als Zeichen einer Stimulation des ER konnte hingegen in beiden Gruppen beobachtet werden. Die Ursache für diese Diskrepanz könnte in einer bei oraler Applikation verminderten gastrointestinalen Resorption liegen.

Andererseits könnte auch das komplexe Gemisch an EDs im Brot für die gewonnenen Ergebnisse ursächlich sein. Wie in Kapitel 1.3.2 beschrieben, wirken multiple anthropogen- und umweltbedingte Faktoren auf unsere landwirtschaftlich genutzten Flächen ein. Diese reichen von zahlreichen Pestiziden über POPs und Schwermetalle bis hin zu Rückständen der Anti-Baby-Pille und den natürlichen Phytoöstrogenen. Ziel des Versuchs war es den Netto-Effekt aller EDs im Brot *in vivo* zu messen, da dies für das Screening von Lebensmitteln auf gesundheitsgefährdende Stoffe die geeignetste Methode ist (Hotchkiss et al. 2008). Es ist aber damit nicht eruierbar, ob im Brot östrogenagonistische EDs enthalten sind, deren Wirkung lediglich durch antagonistisch wirkende Substanzen neutralisiert wurde. Eine komplexe Wechselwirkungsinteraktion zwischen mehreren EDs, wie von Hotchkiss et al. (2008) und Wuttke et al. (2010) beschrieben, muss also als mögliche Ursache für die Ergebnisse in Betracht gezogen werden.

Interpretiert man die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Ergebnisse in Zusammenschau mit den im gleichen Versuch erhobenen und bisher unveröffentlichten Daten von Frau M. Baqaie (Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. med. Seidlova-Wuttke, Abteilung für Endokrinologie, Universitätsmedizin Göttingen), die einen osteoprotektiven Effekt der getesteten Brotsorten belegen, so lässt sich folgendes schlussfolgern: Der Verzehr von Weizen- bzw. Leinsamenbrot scheint auf den Knochen von ovx Ratten eine östrogenähnliche Wirkung auszuüben, während die Brotsorten an Uterus und Mamma keine signifikanten Veränderungen hervorrufen. Als Ursache für diese anzunehmende organspezifische Wirkung kommen verschiedene Möglichkeiten in Betracht.

Eine reine Rezeptorsubtyp-selektive Wirkung am Knochen durch die getesteten Substanzen wäre theoretisch denkbar. Am Knochen wird der antiosteoporotische Effekt von Östrogenen vornehmlich über ER α vermittelt. Da ER α neben dem Knochen jedoch auch im Uterus und in der Mamma exprimiert wird (Moverare et al. 2003; Tessier et al. 2000; Mueller et al. 2002), wären im Uterotropie-Test und in der Mamma-Histologie demzufolge ebenfalls östrogenagonistische Wirkungen zu erwarten gewesen. Damit scheint eine Rezeptorsubtyp-selektive Wirkung der in den Brotsorten enthaltenen EDs eher unwahrscheinlich.

Allerdings könnte eine gewebe selektive Wirkung der Brotsubstanzen ursächlich sein, wie sie von in der Arzneitherapie eingesetzten SERMs (Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren) bekannt ist. SERMs können sehr unterschiedliche Effekte in verschiedenen Organen auslösen, da sie den ER in einem komplexen Zusammenspiel mit Coaktivatoren und Corepressoren in den östrogensensitiven Organen unterschiedlich stark aktivieren oder auch hemmen (Riggs und Hartmann 2003). Eine derartige Wirkung ist für das Arzneimittel Raloxifen bekannt, welches zur Therapie der Osteoporose bei postmenopausalen Frauen eingesetzt wird. Es wirkt im Brustdrüsengewebe ER α -antagonistisch und hat dabei keine Wirkung auf den ER α im Uterus. Gleichzeitig übt es als Östrogenagonist am Knochen eine antiosteoporotische Wirkung über ER α aus (Arnal et al. 2012). Es ist also nicht auszuschließen, dass die Netto-Wirkung der im Brot enthaltenen EDs der eines SERMs ähnelt, was die selektive Knochenwirkung erklären könnte.

Eine dosisabhängige organselektive Wirkung wurde im vorliegenden Versuch nicht getestet, womit der Gehalt an EDs im Brot für eine uterine oder mammarische Stimulation zu gering gewesen sein könnte. Dies wäre aus ernährungsökologischen Aspekten positiv zu bewerten. Für eine Östrogensubstitution im Rahmen der HRT bei postmenopausalen Frauen ist die Tatsache einer dosisabhängigen organselektiven Wirkung bereits bekannt. Sacco und Ward (2010) haben in einem Review die jüngsten Erkenntnisse über HRTs zusammengefasst. Die darin zitierten Studien weisen darauf hin, dass eine sehr niedrig dosierte HRT-Monotherapie trotz antiosteoporotischer Effekte weder eine Wirkung auf den Uterus (im Sinne einer Endometriumproliferation) noch auf das Brustdrüsengewebe (im Sinne einer Brustdichtezunahme) zu haben scheint. Ein ähnlicher dosisabhängiger Mechanismus könnte also eine Erklärung für die in der vorliegenden Studie gewonnenen

Ergebnisse sein. Dies legt nahe, dass die Untersuchung der Knochendichte ein sensitiverer Parameter für die Identifikation östrogenartig wirkender Substanzen in Lebensmitteln ist, als die Untersuchung von Uterus- und Mamma-Gewebe, was in zukünftigen Versuchen berücksichtigt werden sollte. Darüber hinaus lässt sich schlussfolgern, dass eine geringfügige Kontamination mit östrogenagonistischen Substanzen, wie sie in den getesteten Brotsorten vorliegt, keine negativen gesundheitlichen Folgen im Hinblick auf die Gewebe von Uterus- und Mamma hat. Die beobachteten osteoprotektiven Effekte in der Weizenbrot- bzw. Leinsamenbrotgruppe, bei gleichzeitig fehlender Wirkung auf die Gewebe von Uterus und Mamma, könnten sogar ein Hinweis auf eine gesundheitsfördernde Wirkung der enthaltenen Substanzen sein, beispielsweise im Rahmen der Prophylaxe einer postmenopausalen Osteoporose. Diese Effekte erscheinen im Ansatz vergleichbar mit der Wirkung der heutzutage praktizierten pharmakologischen Niedrig-Dosis-HRT zur Behandlung des klimakterischen Syndroms bei Frauen nach der Menopause. Die Ursache für diese organselektive Wirkung der Brotsorten bleibt jedoch unklar. Hier sollten weitere Untersuchungen ansetzen um die genauen Wirkmechanismen identifizieren zu können.

4.4 Limitationen der Studie

Die im Rahmen dieser Studie gewonnenen Ergebnisse sind im Hinblick auf die Sicherheit von Brot als eines unserer Hauptnahrungsmittel zunächst einmal positiv zu bewerten. Dennoch muss beachtet werden, dass es für eine umfassende Beurteilung der gesundheitlichen Auswirkungen von Brotkonsum weiterer Forschung bedarf, zumal im vorliegenden Versuch lediglich die Organe Uterus und Mamma untersucht wurden.

Darüber hinaus wurden in dieser Arbeit ovx Ratten als Versuchstiere ausgewählt. Diese sind als Modell für die Simulation der postmenopausalen Frau bezüglich endokrinologischer Fragestellungen etabliert und bewährt. Dennoch muss bei jedem tierexperimentellen Versuchsergebnis kritisch geprüft werden, ob eine 1:1-Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen möglich ist. Unterschiede könnten hinsichtlich des Bindungsverhaltens der im Brot enthaltenen EDs zwischen Mensch und Ratte vorliegen. Auch Absorption und/oder Metabolismus der EDs könnten im humanen Organismus abweichen.

Die Fütterung der Ratten mit den Testsubstanzen über einen Zeitraum von 8 Wochen gilt aufgrund der relativ kurzen Lebenszeit von Ratten als akzeptierte Simulation einer Langzeitexposition. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass ein lebenslanger Brotkonsum in unterschiedlichen Entwicklungsphasen des Menschen, beispielsweise während der Pubertät oder in der Schwangerschaft, abweichende endokrine Wirkungen hervorruft.

Letztendlich stellen auch die getesteten Brotprodukte eine Variable dar. Sowohl im Pestizideinsatz als auch in der Cadmiumbelastung und der Qualität des Grundwassers bestehen teilweise starke regionale Unterschiede. Diese Parameter können die Kontamination der Brotprodukte mit EDs beeinflussen, was demzufolge auch abweichende gesundheitliche Effekte auslösen könnte.

5 Zusammenfassung

Eine zunehmende Kontamination unserer Umwelt mit östrogenartig wirkenden Substanzen in Kombination mit sich häufenden Berichten über negative Gesundheitseffekte von EDs an Mensch und Tier wirft die Frage auf, ob auch unsere Nahrungsmittel mit gesundheitsschädigenden Stoffen belastet sind. Das Grundnahrungsmittel Brot enthält in vielen Fällen Weizen oder Leinsamen und in beiden Getreidearten sind nachweislich östrogenartig wirkende Substanzen enthalten. Vor allem Leinsamen enthalten signifikante Mengen verschiedener Phytoöstrogene und des Metalloöstrogens Cadmium. Östrogene wirken stimulierend auf das Uterus- und Mammagewebe der ovx Ratte, welche als hormonelles Äquivalent zur postmenopausalen Frau ein anerkanntes Modell für die Testung östrogenartig wirkender Substanzen darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde daher evaluiert, ob durch den Konsum des vollständigen Nahrungsmittels Weizen- bzw. Leinsamenbrot östrogenartige Effekte am Uterus- und Mammagewebe der ovx Ratte zu beobachten sind. Zu diesem Zweck wurden 43 SD-Ratten ovx und im Anschluss in 4 Gruppen aufgeteilt und mit östrogenfreiem Kontrollfutter (Negativkontrolle), östrogenhaltigem Futter (Positivkontrolle), Weizenbrot- oder Leinsamenbrotfutter ernährt. Nach dem zweimonatigen Versuchszeitraum wurden die Tiere dekapitiert und für jede Gruppe die Parameter Uterusgewicht, uterine Schichtdicken sowie die Mamma-Morphologie erfasst. Im Vergleich mit der Negativ-Kontrollgruppe konnten auf diese Weise in der Weizenbrot- und Leinsamenbrotgruppe keine signifikanten Abweichungen der untersuchten Parameter festgestellt werden, während in der Positiv-Kontrollgruppe eine signifikante Stimulation von Uterus- und Mammagewebe zu erkennen war. Somit konnte gezeigt werden, dass die in den beiden Getreidesorten enthaltenen Stoffe mit endokriner Wirkung bei Konsum des kompletten Nahrungsmittels Brot keinen gesundheitlich relevanten Effekt auf die untersuchten Organe zu haben scheinen. Dies kann als Indiz für die Unbedenklichkeit des Konsums von Weizen- und Leinsamenbrot im Hinblick auf die menschliche Gesundheit gewertet werden.

6 Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abbildung 1: Strukturformel von Östradiol.....	2
Abbildung 2: Strukturformel von Enterolacton.....	5
Abbildung 3: Schematische Darstellung der weiblichen Brust.....	7
Abbildung 4: Übersicht über den zeitlichen Ablauf des Tierversuchs.....	17
Abbildung 5: Histologische Darstellung eines Ratten-Uterus.....	19
Abbildung 6: Histologische Ausschnitte eines Mamma-Präparates der Ratte.....	20
Abbildung 7: Durchschnittlicher täglicher Futterverbrauch der Tiere nach der Ovx.....	22
Abbildung 8: Mittlerer Futterverbrauch der Tiere im Zeitraum von der Ovx bis zur Obduktion.....	24
Abbildung 9: Gewichtsentwicklung der Tiere während des Versuchs.....	25
Abbildung 10: Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf das Uterusgewicht.....	26
Abbildung 11: Histologische Darstellung des endometrialen Epithels (Epithelium) der Ratten-Uteri.....	27, 28
Abbildung 12: Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf das endometriale Epithel des Ratten-Uterus.....	29
Abbildung 13: Histologische Darstellung des Endo- und Myometriums der Ratten-Uteri.....	30, 31

Abbildung 14: Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf das Endometrium des Ratten-Uterus.....	32
Abbildung 15: Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf das Myometrium des Ratten-Uterus.....	33
Abbildung 16: Histologische Darstellung der Ratten-Mammae.....	34, 35
Abbildung 17: Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf die Anzahl der Lobuli 1 im Brustdrüsengewebe der Ratten.....	36
Abbildung 18: Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf die Anzahl der Lobuli 2 im Brustdrüsengewebe der Ratten.....	37
Abbildung 19: Einfluss von E2, Weizenbrot und Leinsamenbrot auf die Anzahl der Ductus im Brustdrüsengewebe der Ratten.....	38
Abbildung 20: Zusammenfassung der Ergebnisse.....	40

7 Tabellenverzeichnis

	Seite
Tabelle 1: Gruppeneinteilung der Tiere mit Futterart und durchschnittlicher Futteraufnahme pro Tier.....	17
Tabelle 2: Arbeitsschritte bei der HE-Färbung.....	55
Tabelle 3: Lignan-Gehalt von Weizen und Leinsamen.....	56
Tabelle 4: Zusammensetzung Leinsamenbrotfutter.....	57, 58
Tabelle 5: Zusammensetzung Weizenbrotfutter.....	59, 60

8 Anhang

Tabelle 2, Arbeitsschritte bei der HE-Färbung

Substanz	Wirkdauer
Xylol	3 x 10 min
Absteigende Ethanol-Reihe	6 x 2 min
Aqua dest.	2 min
Hämatoxylin	2,5 min
Leitungswasser	5-10 min
Eosin	25 s
Aqua bidest.	5-10 s
Aufsteigende Ethanol-Reihe	8 min
Xylol	3 x 5 min

Tabelle 3, Lignan-Gehalt von Weizen und Leinsamen (Milder et al. 2005)

	Secoisolarici- resinol (µg / 100 g)	Laricire- sinol (µg / 100 g)	Pinoresinol (µg / 100 g)	Matairesinol (µg / 100 g)	Gesamt (µg / 100 g)
Weizen	15	73	33	0	121
Lein- samen	294210	3041	3324	553	301129

Tabelle 4, Zusammensetzung Leinsamenbrotfutter

DIET FORMULATION AND SPECIFICATION DATA**BASIC DIET INFORMATION:**

Code:	829374
Name:	AIN-93G +42.92% FLAXSEED BREAD(P)
Date:	12/10/2010

CALCULATED ANALYSIS:

		FRESH	10% H2O
TOTAL	%	100.00	110.33
MOISTURE	%	18.43	10.00
CRUDE OIL	%	6.33	6.98
CRUDE PROTEIN	%	15.07	16.63
CRUDE FIBRE	%	2.96	3.27
ASH	%	3.66	4.04
NFE	%	53.02	58.50
PECTIN	%	0.00	0.00
HEMICELLULOSE	%	0.00	0.00
CELLULOSE	%	0.00	0.00
LIGNIN	%	0.00	0.00
STARCH	%	15.95	17.60
SUGAR	%	20.61	22.74
AF ENERGY	kcal/g	3.29	3.63
C14 1 MYRISTOLEIC	%	0.01	0.01
C16 1 PALMITOLEIC	%	0.01	0.01
C18 1 W9 OLEIC	%	0.91	1.00
C18 2 W6 LINOLEIC	%	1.64	1.81
C18 3 W3 LINOLENIC	%	0.03	0.03
C20 4 W6 ARICHIDONIC	%	0.00	0.00
C22 5 W3 CLUPANODONIC	%	0.00	0.00
C12:0 LAURIC	%	0.01	0.01
C14:0 MYRISTIC	%	0.01	0.01
C16:0 PALMITIC	%	0.39	0.43
C18:0 STEARIC	%	0.09	0.10
ARGININE	%	0.34	0.38
LYSINE	%	0.68	0.75
S LYS	%	0.00	0.00
METHIONINE	%	0.26	0.29
S METH	%	0.00	0.00
CYSTINE	%	0.28	0.31
S CYST	%	0.25	0.28
TRYPTOPHAN	%	0.09	0.10
S TRYPT	%	0.00	0.00
HISTIDINE	%	0.24	0.26
CA	%	0.44	0.49
S CA	%	0.43	0.47
TOTAL P	%	0.24	0.26
S PHOS	%	0.20	0.22
PHYTATE P	%	0.00	0.00
AVAIL P	%	0.17	0.19
NA	%	0.24	0.26
S NA	%	0.09	0.10
CL	%	0.17	0.19
S CL	%	0.14	0.15
K	%	0.31	0.34
S K	%	0.31	0.34
MG	%	0.05	0.06
S MG	%	0.04	0.04
FE	mg/kg	39.13	43.17
S FE	mg/kg	36.84	40.65
CU	mg/kg	7.47	8.24
S CU	mg/kg	5.17	5.70
MN	mg/kg	10.62	11.72
S MN	mg/kg	8.33	9.19
ZN	mg/kg	42.23	46.59
S ZN	mg/kg	25.82	28.49
CO	µg/kg	0.00	0.00
S CO	µg/kg	0.00	0.00
I	µg/kg	177.24	195.56
S I	µg/kg	177.24	195.56
SE	µg/kg	137.28	151.47
S SE	µg/kg	137.28	151.47
F	mg/kg	0.87	0.96
VIT A	iu/kg	3432.00	3786.69
S VIT A	iu/kg	3432.00	3786.69
VIT D3	iu/kg	1594.50	1759.29
S VIT D3	iu/kg	858.00	946.67
VIT E	iu/kg	71.58	78.98
S VIT E	iu/kg	64.35	71.00
VIT B1 THI	mg/kg	5.09	5.62

This information is intended as a guide only. For actual data we recommend that analysis work is carried out to confirm the nutrient parameters precisely

THREONINE	%	0.37	0.41
S THREO	%	0.00	0.00
ISOLEUCINE	%	0.54	0.60
LEUCINE	%	0.81	0.89
PHENYLALAN	%	0.44	0.49
VALINE	%	0.64	0.71
TYROSINE	%	0.44	0.49
TAURINE	%	0.00	0.00
GLYCINE	%	0.42	0.46
ASPARTIC A	%	0.60	0.66
GLUTAMIC A	%	1.74	1.92
PROLINE	%	0.73	0.81
SERINE	%	0.40	0.44
HYD PROLIN	%	0.00	0.00
HYD LYSINE	%	0.00	0.00
ALANINE	%	0.34	0.38

S VIT B1	mg/kg	5.05	5.57
VIT B2 RIB	mg/kg	4.33	4.78
S VIT B2	mg/kg	4.12	4.55
VIT B6 PYR	mg/kg	6.00	6.62
S VIT B6	mg/kg	5.95	6.56
VIT B12 CY	µg/kg	21.45	23.67
S VIT B12	µg/kg	21.45	23.67
VIT C ASCO	mg/kg	0.00	0.00
S VIT C	mg/kg	0.00	0.00
VIT K MENE	mg/kg	0.66	0.73
S VIT K	mg/kg	0.66	0.73
FOLIC ACID	mg/kg	1.64	1.81
S FOLIC	mg/kg	1.63	1.80
NICOTINIC	mg/kg	25.40	28.03
S NICOTIN	mg/kg	25.23	27.84
PANTOTHENI	mg/kg	12.36	13.64
S PANTOTH	mg/kg	12.01	13.25
CHOLINE	mg/kg	883.69	975.02
S CHOLINE	mg/kg	883.65	974.97
INOSITOL	mg/kg	0.00	0.00
S INOSITOL	mg/kg	0.00	0.00
BIOTIN	µg/kg	171.60	189.33
S BIOTIN	µg/kg	171.60	189.33

INGREDIENTS:

NAME
FLAXSEED BREAD (CUST.PROVIDED)
MAIZE STARCH
CASEIN
MALTODEXTRIN
SUCROSE
CORN OIL
VITAMINS, MINERALS, AMINO ACIDS AND TRACE ELEMENTS

This information is intended as a guide only. For actual data we recommend that analysis work is carried out to confirm the nutrient parameters precisely

Tabelle 5, Zusammensetzung Weizenbrotfutter

DIET FORMULATION AND SPECIFICATION DATA**BASIC DIET INFORMATION:**

Code:	829373
Name:	AIN-93G+42.92% WHEATBREAD(P)
Date:	12/10/2010

CALCULATED ANALYSIS:

		FRESH	10% H2O
TOTAL	%	100.00	100.00
MOISTURE	%	16.50	10.00
CRUDE OIL	%	6.18	6.66
CRUDE PROTEIN	%	14.86	16.02
CRUDE FIBRE	%	3.00	3.23
ASH	%	3.62	3.90
NFE	%	55.32	59.63
PECTIN	%	0.00	0.00
HEMICELLULOSE	%	0.05	0.05
CELLULOSE	%	2.29	2.47
LIGNIN	%	0.00	0.00
STARCH	%	12.92	13.93
SUGAR	%	20.67	22.28
AF ENERGY	kcal/g	3.36	3.62
C14 1 MYRISTOLEIC	%	0.01	0.01
C16 1 PALMITOLEIC	%	0.01	0.01
C18 1 W9 OLEIC	%	1.12	1.21
C18 2 W6 LINOLEIC	%	2.03	2.19
C18 3 W3 LINOLENIC	%	0.04	0.04
C20 4 W6 ARICHIDONIC	%	0.00	0.00
C22 5 W3 CLUPANODONIC	%	0.00	0.00
C12:0 LAURIC	%	0.01	0.01
C14:0 MYRISTIC	%	0.01	0.01
C16:0 PALMITIC	%	0.48	0.52
C18:0 STEARIC	%	0.11	0.12
ARGININE	%	0.33	0.36
LYSINE	%	0.67	0.72
S LYS	%	0.00	0.00
METHIONINE	%	0.26	0.28
S METH	%	0.00	0.00
CYSTINE	%	0.28	0.30
S CYST	%	0.25	0.27
TRYPTOPHAN	%	0.09	0.10
S TRYPT	%	0.00	0.00
HISTIDINE	%	0.24	0.26
CA	%	0.44	0.47
S CA	%	0.43	0.46
TOTAL P	%	0.24	0.26
S PHOS	%	0.20	0.22
PHYTATE P	%	0.00	0.00
AVAIL P	%	0.17	0.18
NA	%	0.24	0.26
S NA	%	0.09	0.10
CL	%	0.17	0.18
S CL	%	0.14	0.15
K	%	0.31	0.33
S K	%	0.31	0.33
MG	%	0.05	0.05
S MG	%	0.04	0.04
FE	mg/kg	38.81	41.83
S FE	mg/kg	36.84	39.71
CU	mg/kg	7.14	7.70
S CU	mg/kg	5.17	5.57
MN	mg/kg	10.29	11.09
S MN	mg/kg	8.33	8.98
ZN	mg/kg	41.73	44.98
S ZN	mg/kg	25.83	27.84
CO	µg/kg	0.00	0.00
S CO	µg/kg	0.00	0.00
I	µg/kg	177.25	191.05
S I	µg/kg	177.25	191.05
SE	µg/kg	137.30	147.99
S SE	µg/kg	137.30	147.99
F	mg/kg	0.87	0.94
VIT A	iu/kg	3433.48	3700.76
S VIT A	iu/kg	3433.48	3700.76
VIT D3	iu/kg	1585.39	1708.80
S VIT D3	iu/kg	858.37	925.19
A TOCOPHER	mg/kg	66.53	71.71
VIT E	iu/kg	73.18	78.88
S VIT E	iu/kg	64.38	69.39
VIT B1 THI	mg/kg	5.10	5.50

This information is intended as a guide only. For actual data we recommend that analysis work is carried out to confirm the nutrient parameters precisely

THREONINE	%	0.36	0.39
S THREO	%	0.00	0.00
ISOLEUCINE	%	0.53	0.57
LEUCINE	%	0.80	0.86
PHENYLALAN	%	0.44	0.47
VALINE	%	0.64	0.69
TYROSINE	%	0.44	0.47
TAURINE	%	0.00	0.00
GLYCINE	%	0.42	0.45
ASPARTIC A	%	0.59	0.64
GLUTAMIC A	%	1.72	1.85
PROLINE	%	0.72	0.78
SERINE	%	0.40	0.43
HYD PROLIN	%	0.00	0.00
HYD LYSINE	%	0.00	0.00
ALANINE	%	0.34	0.37

S VIT B1	mg/kg	5.05	5.44
VIT B2 RIB	mg/kg	4.33	4.67
S VIT B2	mg/kg	4.12	4.44
VIT B6 PYR	mg/kg	6.00	6.47
S VIT B6	mg/kg	5.95	6.41
VIT B12 CY	µg/kg	21.46	23.13
S VIT B12	µg/kg	21.46	23.13
VIT C ASCO	mg/kg	0.00	0.00
S VIT C	mg/kg	0.00	0.00
VIT K MENE	mg/kg	0.66	0.71
S VIT K	mg/kg	0.66	0.71
FOLIC ACID	mg/kg	1.64	1.77
S FOLIC	mg/kg	1.63	1.76
NICOTINIC	mg/kg	25.41	27.39
S NICOTIN	mg/kg	25.24	27.20
PANTOTHENI	mg/kg	12.36	13.32
S PANTOTH	mg/kg	12.01	12.94
CHOLINE	mg/kg	883.69	952.48
S CHOLINE	mg/kg	883.65	952.44
INOSITOL	mg/kg	0.00	0.00
S INOSITOL	mg/kg	0.00	0.00
BIOTIN	µg/kg	171.67	185.03
S BIOTIN	µg/kg	171.67	185.03

INGREDIENTS:

NAME
WHEAT BREAD (CUST.PROVIDED)
MAIZE STARCH
CASEIN
MALTODEXTRIN
SUCROSE
CORN OIL
VITAMINS, MINERALS, AMINO ACIDS AND TRACE ELEMENTS
CELLULOSE

This information is intended as a guide only. For actual data we recommend that analysis work is carried out to confirm the nutrient parameters precisely

9 Literaturverzeichnis

- Akesson A, Julin B, Wolk A (2008): Long-Term Dietary Cadmium Intake and Postmenopausal Endometrial Cancer Incidence: A Population-Based Prospective Cohort Study. *Cancer Res* 68, 6435-6441
- Ali I, Penttinen-Damdimopoulou PE, Mäkelä SI, Berglund M, Stenius U, Åkesson A, Håkansson H, Halldin K (2010): Estrogen-Like Effects of Cadmium in Vivo Do Not Appear to be Mediated Via the Classical Estrogen Receptor Transcriptional Pathway. *Environ Health Perspect* 118, 1389
- Aquino N, Seigny M, Sabangan J, Louie M (2012): The Role of Cadmium and Nickel in Estrogen Receptor Signaling and Breast Cancer: Metalloestrogens or Not? *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev* 30, 189-224
- Arnal JF, Lenfant F, Flouriot G, Tremolieres F, Laurell H, Fontaine C, Krust A, Chambon P, Gourdy P (2012): From in Vivo Gene Targeting of Oestrogen Receptors to Optimization of Their Modulation in Menopause. *Br J Pharmacol* 165, 57-66
- Barrett J (1996): Phytoestrogens. Friends or Foes? *Environ Health Perspect* 104, 478-482
- 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
- Brown NM, Lamartiniere CA (1995): Xenoestrogens Alter Mammary Gland Differentiation and Cell Proliferation in the Rat. *Environ Health Perspect* 103, 708-713
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit: Berichte Zur Lebensmittelsicherheit 2005 - Lebensmittel-Monitoring; Birkhäuser Verlag, Basel 2005
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Pressemitteilung Nr. 185 vom 13.06.13; ONLINE 05.02.2014
<http://www.bmelv.de/SharedDocs/Pressemitteilungen/2013/185-Zahl-der-Woche-Brot.html> 2013
- Bundesministerium für Ernährung und Landwirtschaft: Verbrauch von Nahrungsmitteln je Kopf. ONLINE 08.11.2014 <http://berichte.bmelv-statistik.de/SJT-4010500-0000.pdf>
- Butera PC (2010): Estradiol and the Control of Food Intake. *Physiol Behav* 99, 175-180

- Committee on Hormonally Active Agents in the Environment: Hormonally Active Agents in the Environment; National Academy of Science, Washington D.C. 1999
- DailyMed National Library of Medicine (2014): Estradiol. ONLINE 19.09.2014 <http://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/archives/fdaDrugInfo.cfm?archiveid=13753>
- Davis SR, Castelo-Branco C, Chedraui P, Lumsden MA, Nappi RE, Shah D, Villaseca P (2012): Understanding Weight Gain At Menopause. *Climacteric* 15, 419-429
- Degen GH (2004): Endokrine Disruptoren in Lebensmitteln. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 47, 848-856
- Eckel LA (2011): The Ovarian Hormone Estradiol Plays a Crucial Role in the Control of Food Intake in Females. *Physiol Behav* 104, 517-524
- European Commission (1996): European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife, 2-4 December, 1996. ONLINE 03.08.2014 http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/documents/reports_conclusions_en.htm
- Evans T, Sany O, Pearmain P, Ganesan R, Blann A, Sundar S (2011): Differential Trends in the Rising Incidence of Endometrial Cancer By Type: Data From a Uk Population-Based Registry From 1994 to 2006. *Br J Cancer* 104, 1505-1510
- Gorzek JF, Hendrickson KC, Forstner JP, Rixen JL, Moran AL, Lowe DA (2007): Estradiol and Tamoxifen Reverse Ovariectomy-Induced Physical Inactivity in Mice. *Med Sci Sports Exerc* 39, 248-256
- Guillette LJ, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR (1994): Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators From Contaminated and Control Lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102, 680-688
- Hotchkiss AK, Rider CV, Blystone CR, Wilson VS, Hartig PC, Ankley GT, Foster PM, Gray CL, Gray LE (2008): Fifteen Years After "Wingspread"—Environmental Endocrine Disrupters and Human and Wildlife Health: Where We Are Today and Where We Need to Go. *Toxicol Sci* 105, 235-259
- Itoh H, Iwasaki M, Sawada N, Takachi R, Kasuga Y, Yokoyama S et al. (2013): Dietary Cadmium Intake and Breast Cancer Risk in Japanese Women: A Case-Control Study. *Int J Hyg Environ Health*
- Järup L, Åkesson A (2009): Current Status of Cadmium as an Environmental Health Problem. *Toxicol Appl Pharmacol* 238, 201-208
- Johnson MD, Kenney N, Stoica A, Hilakivi-Clarke L, Singh B, Chepko G et al. (2003): Cadmium Mimics the in Vivo Effects of Estrogen in the Uterus and Mammary Gland. *Nat Med* 9, 1081-1084
- Julin B, Wolk A, Bergkvist L, Bottai M, Åkesson A (2012): Dietary Cadmium Exposure and Risk of Postmenopausal Breast Cancer: A Population-Based Prospective Cohort Study. *Cancer Res* 72, 1459-1466

- Katsiadaki I, Morris S, Squires C, Hurst MR, James JD, Scott AP (2006): Use of the Three-Spined Stickleback (*Gasterosteus Aculeatus*) as a Sensitive in Vivo Test for Detection of Environmental Antiandrogens. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1, 115-121
- Key TJ, Verkasalo PK, Banks E (2001): Epidemiology of Breast Cancer. *Lancet Oncol* 2, 133-140
- Khan G, Penttinen P, Cabanes A, Foxworth A, Chezek A, Mastropole K et al. (2007): Maternal Flaxseed Diet During Pregnancy or Lactation Increases Female Rat Offspring's Susceptibility to Carcinogen-Induced Mammary Tumorigenesis. *Reprod Toxicol* 23, 397-406
- Kolpin DW, Furlong ET, Meyer MT, Thurman EM, Zaugg SD, Barber LB, Buxton HT (2002): Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ Sci Technol* 36, 1202-1211
- Kortenkamp A (2011): Are Cadmium and Other Heavy Metal Compounds Acting as Endocrine Disrupters? *Met Ions Life Sci* 8, 305-317
- Kortenkamp A, Olwenn M, Faust M, Evans R, McKinlay R, Orton F, Rosivatz E (2011): State of the Art Assessment of Endocrine Disrupters. ONLINE 14.01.2014
http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/pdf/sota_edc_final_report.pdf
- Lamote I, Meyer E, Massart-Leen AM, Burvenich C (2004): Sex Steroids and Growth Factors in the Regulation of Mammary Gland Proliferation, Differentiation, and Involution. *Steroids* 69, 145-159
- Langdon KA, Warne M, Smernik R, Shareef A, Kookana RS (2013): Persistence of Estrogenic Activity in Soils Following Land Application of Biosolids. *Environ Toxicol Chem*
- Leidenberger F, Strowitzki T, Ortmann O: *Klinische Endokrinologie für Frauenärzte*. 4. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2009
- Löffler G, Heinrich PC: *Biochemie und Pathobiochemie*. 9. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2011
- 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
- Man YG, Izadjoo M, Song G, Stojadinovic A (2011): In Situ Malignant Transformation and Progenitor-Mediated Cell Budding: Two Different Pathways for Breast Ductal and Lobular Tumor Invasion. *J Cancer* 2, 401-412
- Martin L, Finn CA, Trinder G (1973): Hypertrophy and Hyperplasia in the Mouse Uterus After Oestrogen Treatment: An Autoradiographic Study. *J Endocrinol* 56, 133-144
- Mcelroy JA, Shafer MM, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Newcomb PA (2006): Cadmium Exposure and Breast Cancer Risk. *J Natl Cancer Inst* 98, 869-873

- Mense SM, Hei TK, Ganju RK, Bhat HK (2008): Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action. *Environ Health Perspect* 116, 426-433
- Milder I, Arts I, Van De Putte B, Venema D, Hollman P (2005): Lignan Contents of Dutch Plant Foods: A Database Including Lariciresinol, Pinoresinol, Secoisolariciresinol and Matairesinol. *Br J Nutr* 93, 393-402
- Moverare S, Venken K, Eriksson AL, Andersson N, Skrtic S, Wergedal J et al. (2003): Differential Effects on Bone of Estrogen Receptor Alpha and Androgen Receptor Activation in Orchidectomized Adult Male Mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13573-13578
- Mueller SO, Clark JA, Myers PH, Korach KS (2002): Mammary Gland Development in Adult Mice Requires Epithelial and Stromal Estrogen Receptor Alpha. *Endocrinology* 143, 2357-2365
- Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach K (2004): Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogen Receptor Alpha (Eralpha) and Erbeta in Human Cells. *Toxicol Sci* 80, 14-25
- Nakamura T, Imai Y, Matsumoto T, Sato S, Takeuchi K, Igarashi K et al. (2007): Estrogen Prevents Bone Loss Via Estrogen Receptor Alpha and Induction of Fas Ligand in Osteoclasts. *Cell* 130, 811-823
- Olsson I, Bensryd I, Lundh T, Ottosson H, Skerfving S, Oskarsson A (2002): Cadmium in Blood and Urine - Impact of Sex, Age, Dietary Intake, Iron Status, and Former Smoking - Association of Renal Effects. *Environ Health Perspect* 110, 1185-1190
- Owens W, Koeter HB (2003): The Oecd Program to Validate the Rat Uterotrophic Bioassay: An Overview. *Environ Health Perspect* 111, 1527-1529
- Patisaul HB, Jefferson W (2010): The Pros and Cons of Phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol* 31, 400-419
- Penttinen P, Jaehrling J, Damdimopoulos AE, Inzunza J, Lemmen JG, Van Der Saag P, Pettersson K, Gauglitz G, Makela S, Pongratz I (2007): Diet-Derived Polyphenol Metabolite Enterolactone is a Tissue-Specific Estrogen Receptor Activator. *Endocrinology* 148, 4875-4886
- Pesatori AC, Consonni D, Rubagotti M, Grillo P, Bertazzi PA (2009): Cancer Incidence in the Population Exposed to Dioxin After the "Seveso Accident": Twenty Years of Follow-Up. *Environ Health* 8, 39
- Radio2Wiki (2013): ONLINE 26.06.2013 <http://universitypublisher.org/radio2wiki>
- Ramachandran B, Makela S, Cravedi JP, Berglund M, Hakansson H, Damdimopoulou P, Maggi A (2011): Estrogen-Like Effects of Diet-Derived Cadmium Differ From Those of Orally Administered CdCl₂ in the Ere-Luc Estrogen Reporter Mouse Model. *Toxicol Lett* 202, 75-84
- Riggs BL, Hartmann LC (2003): Selective Estrogen-Receptor Modulators -- Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *N Engl J Med* 348, 618-629

- Roesch DM (2006): Effects of Selective Estrogen Receptor Agonists on Food Intake and Body Weight Gain in Rats. *Physiol Behav* 87, 39-44
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, Lacroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML 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 (1996): Mammary Gland Neoplasia in Long-Term Rodent Studies. *Environ Health Perspect* 104, 938-967
- Russo J, Russo IH (1994): Toward a Physiological Approach to Breast Cancer Prevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 353-364
- Russo J, Rivera R, Russo IH (1992): Influence of Age and Parity on the Development of the Human Breast. *Breast Cancer Res Treat* 23, 211-218
- 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, Moral R, Balogh GA, Mailo D, Russo IH (2005): The Protective Role of Pregnancy in Breast Cancer. *Breast Cancer Res* 7, 131-142
- Saarinen NM, Smeds AI, Penalvo JL, Nurmi T, Adlercreutz H, Makela S (2010): Flaxseed Ingestion Alters Ratio of Enterolactone Enantiomers in Human Serum. *J Nutr Metab* 2010, 403076
- Sacco SM, Ward WE (2010): Revisiting Estrogen: Efficacy and Safety for Postmenopausal Bone Health. *J Osteoporos* 2010, 708931
- Seidlova-Wuttke D: Vergleich der Wirkungen von Estradiol und fünf endokrinen Disruptoren in ovariectomierten Ratten. Med. Diss. Göttingen 2004
- Seidlova-Wuttke D, Prella K, Fritzemeier KH, Wuttke W (2008): Effects of Estrogen Receptor Alpha- and Beta-Selective Substances in the Metaphysis of the Tibia and on Serum Parameters of Bone and Fat Tissue Metabolism of Ovariectomized Rats. *Bone* 43, 849-855
- Silva E, Rajapakse N, Kortenkamp A (2002): Something From "Nothing" - Eight Weak Estrogenic Chemicals Combined At Concentrations Below Noecs Produce Significant Mixture Effects. *Environ Sci Technol* 36, 1751-1756
- Simonich SL, Hites RA (1995): Organic Pollutant Accumulation in Vegetation. *Environ Sci Technol* 29, 2905-2914
- Strauss L, Santti R, Saarinen N, Streng T, Joshi S, Mäkelä S (1998): Dietary Phytoestrogens and Their Role in Hormonally Dependent Disease. *Toxicol Lett* 102, 349-354
- Tahvonen R, Kumpulainen J (1994): Lead and Cadmium Contents in Finnish Breads. *Food Addit Contam* 11, 621-631
- Ternes TA, Stumpf M, Mueller J, Haberer K, Wilken RD, Servos M (1999): Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci Total Environ* 225, 81-90
- Tessier C, Deb S, Prigent-Tessier A, Ferguson-Gottschall S, Gibori GB, Shiu RP, Gibori G (2000): Estrogen Receptors Alpha and Beta in Rat Decidua Cells: Cell-

- Specific Expression and Differential Regulation By Steroid Hormones and Prolactin. *Endocrinology* 141, 3842-3851
- Wade GN, Gray JM (1979): Gonadal Effects on Food Intake and Adiposity: A Metabolic Hypothesis. *Physiol Behav* 22, 583-593
- Wang LQ (2002): Mammalian Phytoestrogens: Enterodiol and Enterolactone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777, 289-309
- Warner M, Eskenazi B, Mocarelli P, Gerthoux PM, Samuels S, Needham L, Patterson D, Brambilla P (2002): Serum Dioxin Concentrations and Breast Cancer Risk in the Seveso Women's Health Study. *Environ Health Perspect* 110, 625-628
- Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D (2010): Definition, Classification and Mechanism of Action of Endocrine Disrupting Chemicals. *Hormones (Athens)* 9, 9-15
- Yager JD, Davidson NE (2006): Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *N Engl J Med* 354, 270-282
- Yildiz F: Phytoestrogens In Functional Foods. CRC Press, Boca Raton 2005

10 Danksagung

Ich möchte mich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung beim Anfertigen der Arbeit sehr herzlich bei Frau PD Dr. med. D. Seidlova-Wuttke und bei Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke bedanken. Darüber hinaus geht mein Dank an das gesamte Team der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen, insbesondere an Frau H. Brüggemann-Meyer, für die Unterstützung während des praktischen Teils der Arbeit.