

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

**Wie gefährdet sind wir durch endokrine Disruptoren?
Effekt von Daidzein und 4-MBC im Vergleich mit 17 β -Östradiol
auf den Uterus der ovariectomierten Ratte**

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

vorgelegt von
Philine Merker
aus
Bielefeld

Göttingen 2012

Dekan:	Prof. Dr. Heyo K. Kroemer
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Wuttke
2. Berichterstatter:	Prof. (a.D.) Dr. med. Hüfner
3. Berichterstatter:	Prof. Dr. med. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2013

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis	III
1 Einleitung	1
1.1 Grundidee des Versuchs	1
1.2 Endokrine Disruptoren.....	1
1.3 Der Uterus im Klimakterium	2
1.4 Östrogene: Regelkreis und Klimakterium	4
1.4.1 Physiologische Wirkung der Östrogene.....	5
1.4.2 Die Östrogenrezeptoren	5
1.4.3 Östrogensubstitution im Klimakterium	6
1.5 Untersuchte Serumhormonparameter.....	7
1.5.1 Die Schilddrüsenhormone	7
1.6 Untersuchte Substanzen.....	8
1.6.1 Daidzein	8
1.6.1.1 Sojakonsum in Asien	11
1.6.2 4-Methylbenzyliden-Camphor.....	11
1.7 Einführung in das tierexperimentelle Modell.....	13
1.8 Fragestellung und Studienziel.....	13
2 Material und Methoden	16
2.1 Der Tierversuch.....	16
2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	16
2.1.2 Versuchsablauf.....	16
2.1.3 Ovariectomie	17
2.1.4 Applikation der Testsubstanzen	17
2.1.5 Obduktion und Aufarbeitung der Organe	18
2.2 Mikroskopie	19
2.3 Serundiagnostik	19
2.4 PCNA-Färbung.....	20
2.5 Statistische Methoden	21
3 Ergebnisse	22

3.1 Körpergewicht.....	22
3.2 Uterusgewicht.....	24
3.3 Histometrische Auswertung	25
3.3.1 Epithelium.....	26
3.3.2 Endometrium	28
3.3.3 Myometrium	29
3.4 Histomorphologie	30
3.5 PCNA-Färbung.....	36
3.6 Serumanalyse von LH und der Schilddrüsenachse	39
3.6.1 Luteinisierendes Hormon (LH).....	39
3.6.2 Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH).....	40
3.6.3 Thyroxin (T4)	41
3.6.4 Trijodthyronin (T3).....	42
3.7 Linearer Zusammenhang Uterusgewicht und LH-Level.....	43
4 Diskussion	44
4.1 Zielsetzungen	44
4.2 Wirkungen auf das Körpergewicht	45
4.3 Wirkungen auf den Uterus	46
4.3 Wirkung auf die Serumparameter	52
5 Zusammenfassung	58
6 Methodischer Anhang	61
7 Abbildungsverzeichnis	66
8 Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenokortikotropes Hormon
Dai	Daidzein
E2	17 β -Östradiol
ED	Endokriner Disruptor
EDs	Endokrine Disruptoren
ER	Östrogenrezeptor
ERT	Östrogensatztherapie
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
HRT	Hormoneersatztherapie
HVL	Hypophysenvorderlappen
IGF-1	Insulin-Like-Growth-Factor-1
Ko	Kontrollgruppe
4-MBC	4-Methylbenzyliden-Camphor
OMC	Octyl-Methoxycinnamat
ovx	ovarektomiert
LH	Luteinisierendes Hormon
PCNA	Proliferating cell nuclear antigene
RIA	Radioimmunassay
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
TBG	Thyroxin-bindendes Globulin
TPO	Thyreoperoxidase
TRH	Tyroliberin
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
UV	Ultraviolett
SEM	Standardabweichung vom Mittelwert
SERM	selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren
sf	sojafrei
WHI	Women's Health Initiative

1 Einleitung

1.1 Grundidee des Versuchs

Im Rahmen der EU-geförderten Multipartner-Projekte EURISKED (2002-2005) und CASCADE (2004-2009) wurden endokrine Disruptoren auf ihr Gefährdungspotenzial untersucht. Anlehnend an die Ergebnisse diverser Arbeitsgruppen, bildet die Untersuchung zweier ausgewählter Substanzen die Grundlage dieser Arbeit. Im Vergleich mit 17β -Östradiol (E2) und einer Kontrollgruppe (Ko) werden das Phytoöstrogen Daidzein (Dai) und das synthetische 4-Methylbenzyliden-Camphor (4-MBC) analysiert und der uterotrophe Effekt sowie eine Wirkung auf die Hypophysen-Schilddrüsen-Achse untersucht.

1.2 Endokrine Disruptoren

Endokrine Disruptoren (EDs) bezeichnen exogene Stoffe, die endogen auf das sensible Gleichgewicht des Hormonsystems wirken. Dabei greifen sie in die Synthese, den Transport, die Bindung, die Wirkung oder die Eliminierung von natürlichen Hormonen ein (Sonnenschein und Soto 1998). Viele EDs weisen in ihrer chemischen Struktur Ähnlichkeit mit den Sexualhormonen auf und beeinflussen daher direkt das Reproduktionsgeschehen. Daneben wirken sie auch auf eine Vielzahl anderer Gewebe und können an der Entstehung von Karzinomen beteiligt sein.

EDs können pflanzlicher Herkunft sein und in der Natur vorkommen. Hierzu gehören die *Phytoöstrogene*, wie die Isoflavone Genistein und Daidzein. Aber auch synthetisch hergestellte chemische Produkte aus der Industrie wirken auf das endokrine System. Derartige Fremdstoffe können beispielsweise über Abwässer in die Nahrungskette gelangen. Zudem werden auch in zahlreichen Dingen des alltäglichen Lebens EDs vermutet. Besonders Kosmetikartikel stehen in dem Verdacht, endogen wirksame Stoffe zu beinhalten (*Xenoöstrogene*). Vor allem in Lichtschutzmitteln, Deodorants, Nagellackentfernern sowie *Anti-Aging*-Produkten finden sich Stoffe mit endokrin disruptivem Potential (Gill 2006; Koda et al. 2005; Darbre 2005; Schlumpf et al. 2004).

Die Exposition mit diesen Substanzen findet einerseits über die bewusste Einnahme statt, wie z.B. durch Pharmazeutika, pflanzliche Substrate oder Nahrungsmittel, andererseits unwissentlich über anthropogene Stoffe, die von der Industrie zur Produktion von Verpackungsmaterial oder in der Landwirtschaft als Insektizide etc. verwendet werden und über das Grundwasser in die Umwelt gelangen, weiterhin über transkutane Resorption bei der Applikation von Kosmetika. Durch Akkumulation im Gewebe (vorwiegend Fettgewebe) kann sich die Wirkung der endokrin-wirksamen Substanzen potenzieren und über einen längeren Zeitraum entfalten (Muñoz-de-Toro et al. 2006).

EDs nehmen auf unterschiedliche Weise Einfluss auf das endokrine Gleichgewicht von Tier und Mensch. Am besten erforscht ist der Wirkmechanismus im Reproduktionstrakt mittels intrazellulärer Sexualsteroidrezeptoren. Die EDs ähneln in ihrer Struktur den Steroidhormonen und passen durch die recht unspezifische Bindungsdomäne am Steroidrezeptor in dessen Bindungstasche. Dort können sie dann antagonistisch, teilagonistisch oder vollagonistisch wirken (Rodriguez et al. 2004).

Die Mehrzahl der detektierten EDs ist östrogenaktiv. Aber auch anti-androgene EDs sind bekannt. In mehreren Studien konnte belegt werden, dass die Spermienqualität deutlich abnahm und das Risiko für Brustkrebs und vaginale Adenokarzinome bei der Frau durch den Wandel des Lebensstils, der Ernährung und der Exposition gegenüber Chemikalien erheblich anstieg (Herbst et al. 1999; Wolff et al. 1993; Holt und Herbst 1982; Golden et al. 1998; Swan et al. 2000).

Die Mehrzahl dieser Effekte wurde im Hinblick auf das Reproduktionssystem detektiert und beschrieben. Da jedoch Steroidrezeptoren in beinahe allen Körperzellen exprimiert werden, sind extragonadale Wirkungen nicht auszuschließen.

1.3 Der Uterus im Klimakterium

In dieser Arbeit wurde der Rattenuterus als Referenzorgan zur Beurteilung des östrogenen Effektes gewählt. Die Anatomie und Physiologie dieses Organs sind im methodischen Anhang näher erläutert. Im Folgenden werden die physiologischen Veränderungen des Organs im Klimakterium der Frau beschrieben und seine Unterschiede im Bezug auf das Modell.

Im Klimakterium, das bei der Frau zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr beginnt und die Übergangsphase der reproduktiven zur postmenopausalen Phase beschreibt, kommt es zu einer Atrophie der Ovarien, verbunden mit einer verminderten Östrogensynthese.

Der Uterus ist ein hoch östrogensensitives Organ. Deshalb reagiert dieses besonders empfindlich auf die hormonellen Veränderungen.

Östrogene wirken auf alle uterinen Kompartimente, indem sie die Zellproliferation fördern. Im Klimakterium der Frau lässt die ovarielle Funktion nach und die Östrogenspiegel fallen. Dadurch atrophiert das Uterusgewebe. Bei einer Ovariectomie kommt es entsprechend zu einer Atrophie des Uterus, die sich in allen Schichten ausprägt.

Im Klimakterium steigt das Risiko für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms. 75% der Endometriumkarzinome treten postmenopausal auf (Petru 2011). Einen wichtigen Risikofaktor stellt neben Alter und Adipositas der reine Einfluss von Östradiol auf das Endometrium dar. Bei der Substitution im Rahmen einer Östrogensubstitutionstherapie (EST) spricht der atrophierte Uterus schnell auf die Östrogene an. Damit steigt das Risiko der malignen Entartung. Die EST ist somit nur bei der hysterectomierten Frau indiziert.

Die Ratte hat einen *Uterus duplex*. Dieser ähnelt den ursprünglichen embryonalen Beschaffenheiten des menschlichen Uterus (paarige Anlage). Der Schichtaufbau ist ebenfalls vergleichbar mit dem des Menschen. Hier grenzt sich jedoch das Epithelium vom Endometrium ab. Umgeben wird das Endometrium von einer kräftigen Schicht aus glatter Muskulatur (Myometrium). Auch der Rattenuterus ist beeinflusst durch das Sexualhormon Östradiol, das einen Zyklus kontrolliert. Dieser Zyklus besteht aus 4 Phasen: Proöstrus, Östrus, Metöstrus und Diöstrus. Im Gegensatz zu der Frau tritt die weibliche Ratte physiologisch nie in das Klimakterium ein. Um die Nager als Modell der postmenopausalen Frau zu untersuchen, erfolgt eine Ovariectomie, die ein künstliches Klimakterium schafft. Damit gilt die ovariectomierte (ovx) Ratte heute als renommiertes Modell der postmenopausalen Frau in Forschung und Studien.

1.4 Östrogene: Regelkreis und Klimakterium

Östrogene sind weibliche Sexualhormone aus der Klasse der Steroidhormone. Produziert werden sie hauptsächlich von den Theka- und Granulosazellen in den Ovarien, im subkutanen Fettgewebe und von der Plazenta während der Schwangerschaft.

Die Ovarfunktion wird durch die Hypothalamus-Hypophysen-Achse gesteuert. Das Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH) wird von den neurosekretorischen Zellen des Nucleus arcuatus *en pulse* freigesetzt und stimuliert die deshalb ebenfalls pulsatile Ausschüttung des Luteinisierenden Hormons (LH) aus dem Hypophysenvorderlappen (HVL). LH stimuliert im Ovar die Androgensynthese, aus welcher Östradiol entsteht.

Der HVL und der Hypothalamus unterliegen einem Feedbackmechanismus. Die Östrogene wirken hemmend auf die Hypophyse sowie auf den Hypothalamus zurück. Damit wird die Ausschüttung der Gonadotropine kontrolliert und an den Zyklus angepasst.

Als Folge der nachlassenden ovariellen Funktion im Klimakterium kommt es zu endokrinologischen Umstellungen im humanen weiblichen Organismus. Durch den kontinuierlichen Abfall des Östrogenserumspiegels und die damit fehlende negative Rückkopplung nimmt die Gonadotropinausschüttung zu. Das atrophe Ovar spricht jedoch nur noch vermindert auf diese Hormone an, so dass Schwankungen im Menstruationszyklus das Erlöschen der ovariellen Funktion ankündigen. Mit der letzten ovariell gesteuerten Regelblutung (Menopause) befindet sich die Frau noch in der Perimenopause, an die sich die Postmenopause anschließt.

Analoges gilt für die Ovariectomie, die einen künstlichen Östrogenmangel induziert und das Klimakterium im Rattenorganismus simuliert.

Die ungehemmte, pulsatile Ausschüttung des Gonadotropin-freisetzenden Hormons (Überaktivität des GnRH-Pulsgenerators) wird mit den klimakterischen Beschwerden der Hitzewallungen assoziiert. Dabei geht jede Hitzewallung mit einem LH-Puls einher, jedoch löst nicht jeder LH-Puls einen *Hot flash* aus. Es wird vermutet, dass eine funktionelle Verbindung zwischen den GnRH-produzierenden Neuronen und der hypothalamischen Thermoregulation besteht (Ravnikar et al. 1984). Demnach ist der LH-Puls eher als ein Parallelphänomen aufzufassen, als dass er die *Hot flashes* direkt auslöst. Viele Frauen nehmen auf Grund dieser Beschwerden im Klimakterium Östrogene ein, welche die

Hitzewallungen durch LH-Suppression vermindern. Ob alternativ auch Phytoöstrogene die LH-Ausschüttung beeinflussen, ist zurzeit Gegenstand der Forschung.

1.4.1 Physiologische Wirkung der Östrogene

Östrogene haben vielfältige Wirkungen im Organismus. Als weibliche Sexualhormone stimulieren sie die Proliferation von Vagina, Zervix, Uterus und Mammæ, sensibilisieren die Ovarien für ihr Ansprechen auf Gonadotropine und erhöhen die Motilität und Sekretion der Tuben. E2 stimuliert durch Bindung an seinen Rezeptor die *Insulin-Like-Growth-Factor-1* (IGF-1) - Genexpression. IGF-1 bewirkt die Proliferation des Endometriums und des Myometriums (Seidlová-Wuttke 2004).

Östrogene haben eine anorektische Wirkung und mindern demzufolge den Appetit. Dazu führen Östrogene zu einem vermehrten Zellumsatz, der wiederum mit einer Reduktion des Körpergewichtes einhergeht. Im Klimakterium kommt es durch den kontinuierlich abfallenden Östrogenhormonspiegel damit zu einer Gewichtszunahme, die mit dem Risiko, an einem Metabolischen Syndrom (gestörter Glukosestoffwechsel, arterieller Hypertonus, Adipositas und Dyslipidämie) zu erkranken, vergesellschaftet ist (Carr 2003).

Im Knochen bewirken Östrogene die Hemmung der osteoklastären Knochenresorption und sind damit ein bedeutender Faktor für die Prävention der Osteoporose.

Bei Frauen im gebärfähigen Alter beträgt die Östrogenausschüttung, abhängig von der Zyklusphase, 25-400 µg/Tag. Im Klimakterium sinkt sie auf < 20 µg/Tag.

Die fallenden Östrogenserumspiegel im Klimakterium sind für die „klassischen Wechseljahrsbeschwerden“ verantwortlich und gehen entsprechend einher mit einer Atrophie und Trockenheit von Vagina und Uterus, Osteoporose, Hitzewallungen, Tachykardien und assoziierten Symptomen des Metabolischen Syndroms.

1.4.2 Die Östrogenrezeptoren

Die transkriptionelle Wirkung von 17β-Östradiol wird durch zwei verschiedene Östrogenrezeptoren (ER) vermittelt. Der ER ist ein intrazellulärer Rezeptor aus der Gruppe der Steroidrezeptoren, der über verschiedene Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Genexpression im Zellkern nimmt. Bis heute sind zwei Subtypen bekannt. ERα gilt als

klassischer ER. Seine Gensequenz wurde 1986 vollständig entschlüsselt (Greene et al. 1986). 1996 wurde der zweite ER, der ER β , kloniert. Das physiologische E2 bindet an beide ER mit etwa gleicher Affinität (Kuiper et al. 1997).

Die ER kommen gewebespezifisch in unterschiedlicher Verteilung und Dichte vor. ER α dominiert in Uterus, Vagina, Mamma, Tuben, Hypophyse, Niere, Nebennierenrinde und den Theka-interna-Zellen des Ovars, wohingegen ER β vorwiegend in den Granulosazellen des Ovars und der Schilddrüse exprimiert wird (Kuiper et al. 1997; Pelletier 2000). Die Gewebeverteilung der Rezeptoren ist individuell verschieden und variiert zudem je nach Entwicklungsstand und Zyklusphase.

Das komplizierte Zusammenspiel der ERs ist noch nicht im Detail untersucht. Grundsätzlich lässt sich jedoch festhalten, dass über ER α die Transkription aktiviert und über den ER β diese Aktivität fördernd oder hemmend beeinflusst wird. Lindberg et al. beschrieben den ER β als einen *wichtigen Modulator des ER α* und nannten diese Theorie *“Ying-Yang- Beziehung“* zwischen ER α und ER β (Lindberg et al. 2003).

Die Bindungstaschen der beiden ER sind in ihrer Struktur sehr ähnlich, so dass zahlreiche Östrogen-ähnliche Substanzen dort binden und agonistisch, teilagonistisch oder antagonistisch wirken können (Rodriguez et al. 2004).

1.4.3 Östrogensubstitution im Klimakterium

Seit längerer Zeit ist bekannt, dass die reine Östrogensubstitutionstherapie (ERT) zur Linderung der klimakterischen Beschwerden auf Grund eines erhöhten Endometriumkarzinomrisikos nur bei hysterektomierten Frauen Anwendung finden soll. In der Hormonersatztherapie (HRT) werden die Östrogene mit Gestagenen kombiniert. Dabei mehrten sich jedoch die Hinweise, dass diese Therapie möglicherweise Risiken für die Entwicklung eines Mammakarzinoms und für die Entstehung von Arteriosklerose birgt. Tatsächlich bestätigte sich dieser Verdacht mit der Veröffentlichung der Womens-Health-Initiative (WHI)-Studie im Jahr 2002 (Rossouw et al. 2002). Als Alternative zur HRT betrachteten fortan viele Wissenschaftler die östrogenen Effekte pflanzlicher Substrate, wie die der Isoflavone. Vor allem durch die geringe Brustkrebsinzidenz in Japan gelangten Substrate aus der Sojapflanze in den Fokus des Interesses. Ihr therapeutisches Potenzial und mögliche Nebenwirkungen sind Gegenstand intensiver Forschung.

1.5 Untersuchte Serumhormonparameter

In dieser Arbeit wird die Konzentration der Hormone LH, TSH, T3 und T4 im Rattenserum gemessen. Es soll bewertet werden, inwieweit diese Hormone durch Östradiol selbst, sowie durch Substrate, denen man Östrogen-ähnliche bzw. endokrin-disruptive Wirkungen zuspricht, beeinflusst werden. Können Daidzein und 4-MBC auch auf die Hypophysen-Hypothalamus-Achse wirken und dadurch einen Effekt auf den Stoffwechsel und die *Hot-Flash*-Symptomatik in den Wechseljahren generieren? Greifen diese endokrin-aktiven Substanzen darüber hinaus auch in den Schilddrüsenhormonregelkreis ein?

Der Zusammenhang von Östradiol mit dem **Luteinisierenden Hormon LH** ist bereits unter 1.4 beschrieben worden. Beim Abfall der Östrogenserumkonzentration durch Ovariectomie müsste es demnach, auf Grund fehlender negativer Rückkopplung, zu einem Anstieg der LH-Serumkonzentration in der Kontrollgruppe kommen.

1.5.1 Die Schilddrüsenhormone

Die aufgeführten Schilddrüsenhormone wurden versuchsweise mit einbezogen, um einen Effekt der Substanzen über deren Östrogenität hinaus zu erfassen. Durch die bekannte erhöhte Inzidenz chronischer Autoimmunthyreoididen im Klimakterium, die den größten Risikofaktor für eine klinische Hypothyreose darstellen, ist eine Wirkung der Substrate auf die Schilddrüsenachse interessant und wichtig.

TSH ist das **Thyroidea-stimulierende Hormon** aus dem HVL, das ebenfalls vom übergeordneten Hypothalamus gesteuert wird. Das *Releasing-Hormon* des TSH ist das Thyroliberin (TRH), das die Freisetzung von TSH stimuliert. TSH reguliert die Synthese der Schilddrüsenhormone **Trijodthyronin (T3)** und **Thyroxin (T4)**. T3 und T4 sind Iodverbindungen und werden in den Follikelepithelzellen der Schilddrüse gebildet. T3 besitzt die 3-8-fache Potenz des T4 und wirkt außerdem schneller, jedoch ist T4 in vielfacher Konzentration im Blut vorhanden. Mit Abspaltung eines Iodatoms entsteht in der Peripherie das parakrin wirkende T3. Beide Hormone wirken dabei regulierend auf Hypophyse und Hypothalamus zurück und schließen den Regelkreis.

T3 und T4 beeinflussen den Zellstoffwechsel des Organismus und damit auch den Energieumsatz und die Leistungsfähigkeit.

Bei einer Schilddrüsenunterfunktion sinkt der Energieumsatz und es kommt entsprechend zu einer Erhöhung der TRH- und TSH-Sekretion.

Die Wirkungen von E2 sind in diesem Regelkreis noch nicht vollständig geklärt. Jedoch kann durch eine Östrogensubstitution eine Erhöhung des Thyroxin-bindenden Globulins (TGB) induziert werden (Ain et al. 1987). Die dadurch vermehrte Proteinbindung der Hormone im Plasma führt zu erniedrigten freien Thyroxinspiegeln, welche hauptsächlich die Rückkopplung auf TRH und TSH modulieren. Aus diesem Feedbackmechanismus resultiert eine TSH-Erhöhung, welche die vermehrte Synthese der Schilddrüsenhormone stimuliert.

Die Isoflavone Genistein und Daidzein inhibieren *in vitro* jeweils die Thyreoid-Peroxidase (TPO), welche im Organismus die Bildung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 katalysiert (Divi et al. 1997; Doerge und Sheehan 2002; Divi und Doerge 1996). Damit einher gehen eine verminderte Bildung der Hormone sowie eine fehlende negative Rückkopplung, die in einer TSH-Erhöhung resultieren.

Die gewählten Serumparameter sollen in dieser Arbeit aufzeigen, ob das endokrine disruptive Potential von Daidzein und 4-MBC in der gewählten Dosierung auch die Schilddrüsenhormon-Achse beeinflusst.

1.6 Untersuchte Substanzen

1.6.1 Daidzein

Daidzein (Dai) ist ein Substrat aus der Gruppe der natürlichen Isoflavone, die man hauptsächlich in der Sojapflanze findet. Den quantitativ bedeutendsten Anteil an Dai enthält die Sojabohne mit 20-52 mg/100 g, gefolgt von Sojamilch mit 1-13 mg/100 g und Tofu mit 7-11 mg/100 g (Fletcher 2003; Reinli und Block 1996; Munro et al. 2003).

Die allgemeine, natürliche Funktion der Isoflavone ist der Schutz der Pflanze vor Stress auslösenden Umweltfaktoren und Pathogenen. Damit sind sie Teil des pflanzlichen Abwehrsystems.

Chemisch gehört Dai zur Gruppe der Polyphenole, die einen aromatischen Ring und mehrere OH-Gruppen aufweisen. Daidzein besitzt zwei OH-Gruppen (4',7-

Dihydroxyisoflavan). Auf Grund seiner strukturellen Ähnlichkeit mit 17β -Östradiol werden Stoffe dieser Gruppe als Phytoöstrogene bezeichnet. Dai bindet dabei ebenso an die Östrogenrezeptoren (ER) wie E₂, jedoch mit 10-1000-fach geringerer Affinität (Markiewicz et al. 1993). Beide bekannten Subtypen von ERs können durch das Isoflavon besetzt werden, jedoch hat Dai eine leichte Präferenz zu ER β gegenüber ER α (Markiewicz et al. 1993; Wuttke et al. 2007).

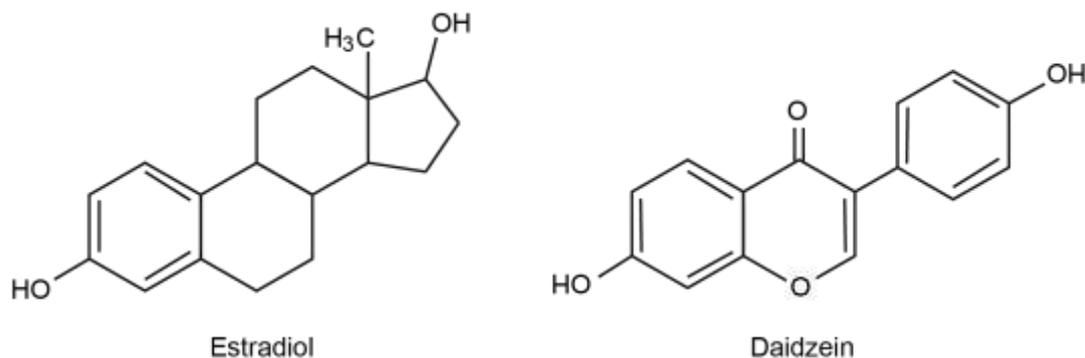


Abb. 1: Struktur von Daidzein im Vergleich mit Östradiol

Durch die Bindung an den ER können die Phytoöstrogene als schwacher Östrogenagonist, Teilagonist, oder Östrogenantagonist wirken. Sie werden daher als SERMs (selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren) angesehen (Setchell 2001). Der molekulare Bindungsmechanismus von Isoflavonen und E₂ ist dabei sehr ähnlich, die transkriptionellen Eigenschaften der Phytoöstrogene sind jedoch schwächer.

Die Isoflavone werden hauptsächlich mit der Nahrung aufgenommen, im Gastrointestinaltrakt absorbiert und über die Nieren ausgeschieden. Einige Extrakte aus Soja, wie Genistein und Daidzein, sind kommerziell als Nahrungsergänzungsmittel erhältlich (Wuttke et al. 2007) und finden zur Linderung klimakterischer Beschwerden Anwendung.

Isoflavone sind durch diese natürliche Imitation des endogenen E₂ in den westlichen Ländern als Alternative zur herkömmlichen Hormonersatztherapie (HRT) immer mehr gefragt und sehr populär. Ihre Wirksamkeit wird auf Grund der gesunden Ernährung und den geringen Brustkrebsraten in Asien immer wieder diskutiert. Bei starken

Wechseljahrsbeschwerden greifen heute viele Frauen zu den pflanzlichen Östrogenen, in dem Glauben, damit die gesunde Alternative zur herkömmlichen Östrogentherapie gefunden zu haben.

In einer Vielzahl von Studien ist der Effekt der Isoflavone auf Östrogen-sensitiven Organen untersucht worden. In tierexperimentellen Studien konnte eine leichte antiosteoporotische Wirkung von Sojaextrakten auf den Knochen nachgewiesen werden (Blum et al. 2003). In klinischen Studien an postmenopausalen Frauen scheinen auch geringe Dosen an Isoflavonen eine Verdichtung des Knochens zu induzieren und damit eine osteoprotektive Wirkung zu haben (Burke et al. 2003; Mei et al. 2001).

Für die mittlere Konzentration von Isoflavonen in kommerziell erhältlichen Sojaprodukten konnten in diversen zell- und tierexperimentellen Modellen proliferative Wirkungen auf Brustkrebszelllinien festgestellt werden. Bei der Gabe von hohen Genistein-Konzentrationen sind jedoch auch mammaprotektive Ergebnisse publiziert worden (Constantinou et al. 1998). Die Datenlage für Phytoöstrogene in Bezug auf eine mammaprotektive Wirkung wird kontrovers diskutiert und ist bisher noch ungeklärt. Die Studienlage auf die Effekte am Uterus ist ebenfalls uneinheitlich und weist auf eine dosisabhängige Wirkung am Uterusgewebe hin.

Weiterhin ist ein Zusammenhang zwischen Isoflavon-Substitution und der Entstehung einer thyreoidalen Struma bei Ratten bekannt (Doerge und Sheehan 2002; Kay et al. 1988; Konijn et al. 1972). Bei Säuglingen, die mit Sojamilch gefüttert wurden, wurde ebenfalls eine Entwicklung einer Struma beobachtet, die jedoch mit Umstellen der Ernährung wieder rückläufig war (Hydovitz 1960; Ripp 1961; Van Wyk et al. 1959).

Ob die schwache östrogene Wirkung der Isoflavone ausreicht, um symptomatisch gegen Wechseljahrsbeschwerden zu wirken, und ob sie auf der anderen Seite stark genug Östrogen-aktiv wirken, um gesundheitsgefährdende bis kanzerogene Effekte zu erzielen, wird bis dato kontrovers diskutiert. Vermehrt zeigen jedoch Studien, dass die „gesunde Alternative Soja“ auch Risiken birgt, sie insbesondere die Entstehung von Malignomen der hormonsensitiven Organe fördert (Rachoń et al. 2007; Andres et al. 2011). In dieser Arbeit soll der Effekt von 1g Daidzein/kg Futter auf den Uterus der Ratte untersucht werden, um ein mögliches Risiko bezüglich Veränderungen der Uterusschleimhaut und eine Interaktion mit den Hypophysenhormonen aufzuzeigen.

1.6.1.1 Sojakonsum in Asien

In Asien besteht ein großer Teil der Ernährung aus Sojaprodukten. In China werden beispielsweise im Durchschnitt täglich 20-80 mg Isoflavone durch Sojaprodukte mit der Nahrung zugeführt, bei postmenopausalen Amerikanerinnen zum Vergleich weniger als 1mg pro Tag (Barnes et al. 1995; de Kleijn et al. 2001).

Die geringe Inzidenz von Mammakarzinomen, Endometriumkarzinomen, Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Osteoporose in den asiatischen Ländern lässt vermuten, dieses Phänomen könne in der gesunden, sojareichen Ernährung begründet sein. Dies bestätigt sich, wenn man die Nachkommen japanischer Migranten in den USA beobachtet. In den Tochtergenerationen kann eine ebenso hohe Prävalenz an Mammakarzinomen beobachtet werden, wie in der amerikanischen Vergleichspopulation. Diese Beobachtung erweckt den Verdacht, dass eher Umweltfaktoren als genetische Faktoren für dieses Phänomen verantwortlich sind (Wuttke et al. 2007). In Studien zeigte sich, dass eine Herunterregulation des Wachstumsfaktors EGF (*epidermal growth factor*) durch das Isoflavon Genistein mit einer Reduktion von Mammatumoren einhergeht (Cotroneo et al. 2002). Die Asiatinnen nehmen bereits pränatal die Soja-Isoflavone mit der Nahrung auf, die in der Pubertät die EGF-Rezeptoren in der sich entwickelnden Brustdrüse herabregulieren und später auftretende Mammakarzinome reduzieren.

1.6.2 4-Methylbenzyliden-Camphor

4-Methylbenzyliden-Camphor (4-MBC) ist eine endokrin aktive chemische Verbindung, die als Ultraviolett (UV)-Absorber in Sonnencremes und Kosmetika Verwendung findet. Das wachsende Bewusstsein bezüglich Krebserkrankungen der Haut durch UV-Schäden rückt Produkte mit UV-Filter in den Fokus der Öffentlichkeit.

Durch vorangegangene Studien sind 4-MBC und andere UV-Filter wie Oxyt-Methoxycinnamat (OMC) in Verdacht geraten, Östrogen-ähnliche Wirkung zu haben und durch Akkumulation in der Biota als EDs wirksam zu sein. Mittlerweile bestätigte sich in verschiedenen *in-vitro*- (Mueller et al. 2003; Schreurs et al. 2002), sowie *in-vivo* -Studien (Tinwell et al. 2002) der östrogene Effekt von 4-MBC. Außerdem bestätigten

Langzeitstudien an ovx Ratten, dass unterschiedliche Hormone durch UV-Filter wie 4-MBC beeinflusst werden (Seidlová-Wuttke et al. 2006; Schlumpf et al. 2001).

In Ligandenbindungsassays wurde nachgewiesen, dass 4-MBC selektiv an den ER β bindet (Schlumpf et al. 2004; Mueller et al. 2003). Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass aktive Metabolite möglicherweise eine andere Rezeptorbindung aufweisen.

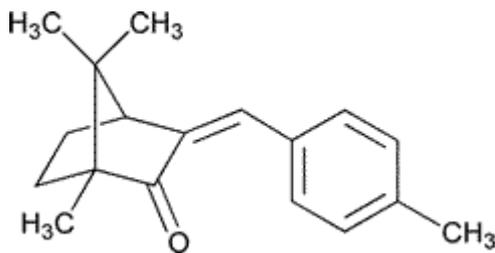


Abb. 2: Struktur von 4-Methylbenzyliden-Camphor

Für den Menschen erfolgt die Exposition einerseits über die Nahrungskette, andererseits über dermale Absorption. Nach der Anwendung von 4-MBC-haltigen Kosmetika gelangen die Inhaltsstoffe über das Duschen oder Waschen in das Abwassersystem. Auch über belastete Badeseen geraten Tier und Mensch unbewusst in Kontakt mit der Substanz. 4-MBC wurde in Wasserproben sowohl von Abwasseraufbereitungsanlagen als auch in Badeseen nachgewiesen (Schlumpf et al. 2008). Des Weiteren wurde 4-MBC im Fleisch von Fischen gefunden, die in Badeseen oder in durch Abwasseraufbereitungsanlagen verunreinigten Gewässern leben (Buser et al. 2006). In einigen Tieren fanden sich neben erhöhten Konzentrationen diverser getesteter UV-Filter Hinweise auf eine Veränderung der Fruchtbarkeit und damit einhergehend des Reproduktionsverhaltens (Kunz et al. 2006; Kunz und Fent 2006; Holbech et al. 2002).

Weiter wurde die Substanz 4-MBC in Muttermilch gefunden (Hany und Nagel 1995), was vermuten ließ, dass dieser lipophile Stoff eine potentielle Gefahr für das gestillte Kind darstellen könnte.

Auch die topische Anwendung durch dermale Resorption stellt nach einigen Studien eine Gefahr für Mensch und Tier dar. In beiden Organismen konnten erhöhte Werte des Metaboliten in Blut und Urin nachgewiesen werden (Janjua et al. 2007; Schauer et al. 2006). In Europa ist die zulässige Höchstkonzentration von 4-MBC im gebrauchsfertigen Produkt mit 4% festgelegt.

Die orale Aufnahme, beispielsweise durch Lippenstifte, aber auch durch belastetes Wasser und Fischfleisch bis hin zur Aufnahme über die Brustmilch, stellen zusammenfassend möglicherweise gesundheitsschädliche Gefahrenquellen für den Menschen dar.

Neben der Wirkung auf das Reproduktionssystem sind auch extragonadale Effekte bekannt. 4-MBC zeigte anti-osteoporotische Wirkung nach chronischer Exposition (Seidlová-Wuttke et al. 2006). Ferner wurde eine Wirkung auf die Thyroid-Achse beschrieben, die den Verdacht der antithyroiden Wirkung mit einer Reduktion der Schilddrüsenhormone bestätigte (Schmutzler et al. 2004).

Folglich resultieren die Wirkungen von 4-MBC nicht nur direkt durch Bindung an den ER, sondern möglicherweise auch östrogen-unabhängig durch Effekte auf die Schilddrüse.

In dieser Arbeit sollen die Wirkungen von 5g 4-MBC/kg Futter auf das Uterusgewebe und ausgewählte Serumparameter untersucht werden.

1.7 Einführung in das tierexperimentelle Modell

In diesem Versuch wurde die ovx Ratte als Modell der postmenopausalen Frau gewählt, um die Effekte östrogenwirksamer Substanzen auf den Uterus der Tiere zu untersuchen.

Durch das künstliche Klimakterium, das durch die Ovariectomie herbeigeführt wird, gilt die ovx Ratte heute als renommiertes Modell der postmenopausalen Frau in Studien und Forschung.

1.8 Fragestellung und Studienziel

Die schädliche Wirkung von endokrin wirksamen Chemikalien auf die Tier- und Pflanzenwelt wird aktuell vielfältig in der medialen Öffentlichkeit thematisiert. Basierend auf Beobachtungen verschiedener Ökosysteme und auf Tierexperimenten beruhend führt die Belastung mit industriellen Chemikalien zu Veränderungen im Reproduktionserfolg und der Entwicklung vieler Arten und fördert die Entstehung und Proliferation von Karzinomen.

Tier und Mensch sind diesen Substanzen einerseits ausgesetzt, andererseits greifen die Menschen auch ganz bewusst zu Produkten, die Einfluss auf ihr endokrines System nehmen. Am Beispiel des Phytoöstrogen Daidzein und des UV-B-Filters 4-Methylbenzyliden-Camphor wurden in dieser Arbeit zwei Substanzen untersucht, die von Verbrauchern als gesundheitsfördernd wahrgenommen werden. Diese wurden dabei auf ihre Östrogenität hin untersucht im Hinblick auf die Frage, inwieweit sie das sensible Gleichgewicht in unserem Körper verändern könnten.

Im Vordergrund stehen dabei die histologischen Veränderungen des atrophen Uterus der ovariectomierten Ratte sowie die Frage nach einer möglichen kanzerogenen Gefährdung durch sogenannte *Lifestyleprodukte*. Am Modell der ovariectomierten Ratte wird in dieser Arbeit untersucht, inwieweit Daidzein, als pflanzliches Östrogen, und 4-Methylbenzyliden-Camphor, als UV-B Filter in diversen Kosmetika, die Uterusschleimhaut durch ihre Östrogen-wirksamen Eigenschaften beeinflussen und potentiell karzinogen wirken.

Weiter soll der Effekt auf das Luteinisierende Hormon im Hinblick auf das klimakterische Symptom der Hitzewallungen beurteilt werden sowie eine Tendenz, ob auch die Schilddrüsenachse durch diese Substanzen beeinflusst wird.

Ferner simuliert der Applikationszeitraum von 10 Wochen einen relativ langen Lebensabschnitt der Ratte und ist deshalb sehr gut mit einer Langzeitexposition von gering konzentrierten Umweltgiften am Menschen vergleichbar.

Daraus ergeben sich für meine Arbeit folgende Fragestellungen:

Welches Östrogen-ähnliche Potenzial kann von Daidzein und 4-MBC in Nahrung und Kosmetik erwartet werden und wie wirken sie auf das endokrine Gleichgewicht?

Wie stellen sich die untersuchten Effekte von Daidzein und 4-MBC im Vergleich mit E2 dar?

Bergen diese Substanzen unvorhersehbare Nebenwirkungen und haben sie möglicherweise sogar kanzerogenes Potenzial?

Kann das östrogene Potential der Isoflavone im Klimakterium genutzt werden, um die LH-Ausschüttung signifikant zu supprimieren und damit Beschwerden der Hitzewallungen zu lindern?

Inwieweit beeinflussen die untersuchten EDs die Hypophysen-Hypothalamus-Achse sowie die Schilddrüsenhormone T3 und T4 und greifen damit auch in andere endokrine Prozesse ein?

Ist die Applikationsform, -menge, und -dauer der ovx Ratte im Versuch repräsentativ für die postmenopausale Frau?

2 Material und Methoden

2.1 Der Tierversuch

2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen

Die in dieser Arbeit untersuchten Organe stammen von 45 weiblichen Sprague-Dawley-Ratten, die als Modell in einem vorangegangenen Experiment dienten („Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene-camphor or estrogen on gastocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period“ (Komrakova et al. 2009)). Da ich an dieser Untersuchung selbst nicht teilnahm, wird in meiner Arbeit auf diese Versuche verwiesen. Es wurden die bereits in Formaldehyd konservierten und bereitgestellten Organblöcke der Rattenuteri verwendet.

Für die Tiere lag eine Genehmigung von der Bezirksregierung Braunschweig vom 12.5.2003 vor (Az. 509.42502/01-53.03). Die Ratten wogen zu Beginn des Versuches durchschnittlich 220 g und waren 3 Monate alt.

Nach der Ovariectomie der Tiere erfolgte die zufällige Verteilung der Ratten auf genormte Käfige zu 3-4 Tieren pro Käfig. Die Raumtemperatur war mit $22\pm 1^\circ\text{C}$ durchgehend konstant, ebenso die Luftfeuchtigkeit. Die Beleuchtung der Käfige folgte einem künstlichen 12-Stunden-Licht-, 12-Stunden-Dunkelheit-Turnus und blieb ebenfalls über die Dauer des Versuches konstant. Sojafreies (sf) Pelletfutter und Wasser standen den Tieren zur freien Verfügung. Das Sojaprotein wurde in diesem Futter durch Kartoffelprotein ersetzt, um den bekannten Östrogen-ähnlichen Effekt der Isoflavone auszuschließen.

2.1.2 Versuchsablauf

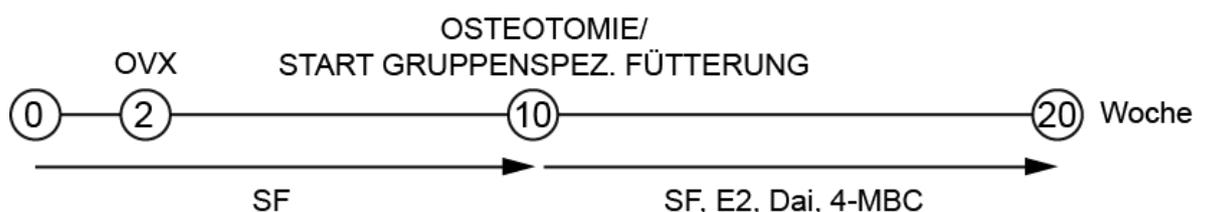


Abb. 3: Zeitachse des Versuchs.

Die Tiere kamen zum Zeitpunkt 0 zu uns und wurden fortan mit sojafreiem (sf) Futter gefüttert, um den bekannten östrogenen Effekt des Sojas sicher zu eliminieren. In Woche 2 wurden alle Tiere ovariectomiert. Nach 10 Wochen wurden sie im Rahmen der oben genannten Studie von Komrakova et al. (2009) osteotomiert und bekamen eine beidseitige Osteosynthese der Tibia. Die vorangegangenen Experimente werden der Vollständigkeit halber erwähnt, auch wenn sie für diese Untersuchung nicht primär relevant ist. Bis zu diesem Zeitpunkt wurden alle Tiere sojafrei ernährt und können als vollständig klimakterisch angesehen werden. Fortan wurden die Tiere gruppenspezifisch nach dem Schema der Testsubstanzen über 72 Tage gefüttert. Anschließend erfolgten die Obduktion der Tiere und der Organgewinn.

2.1.3 Ovariectomie

Die Tiere wurden bilateral unter i.p. Ketamin-/ (Medistar, Holzwickede, Deutschland) und Xylazin- (Riemser, Greifswald-Insel Riems, Deutschland) Narkose ovariectomiert (40mg und 10mg pro kg Körpergewicht). Anschließend wurden sie in vier Gruppen á 9-12 Tiere gleicher Gewichtsverteilung unterteilt und in standardisierten Käfigen zu je 3-4 Tieren gehalten. Den Tieren wurde subkutan ein Transponder injiziert, um eine Identifikation zu ermöglichen.

2.1.4 Applikation der Testsubstanzen

Die Tiere wurden über einen Zeitraum von 72 Tagen mit gruppenspezifischem Futter ernährt. Die Substratmenge und Applikationsdauer wurden auf der Basis von vorangegangenen Untersuchungen der Abteilung gewählt. Die Testsubstanzen wurden mit dem Futter per os zugeführt. Die Basis des Futters bestand aus sojafreien Pellets und stand den Ratten ad libitum zur Verfügung. Die Tiere wurden ausschließlich mit diesem Futter ernährt. Unmittelbar nach der Ovariectomie wurden die Tiere in vier Gruppen aufgeteilt. Gruppe 1 (11 Ratten) bekam weiterhin lediglich die Grundmischung und diente damit als Kontrollgruppe (ovx+sf). Gruppe 2 (12 Tiere) erhielt zusätzlich zum sojafreien Pelletfutter 10mg E2/kg Futter (ovx+E2). Die 3. Gruppe bestand ebenfalls aus 12 Ratten

und bekam 1g Daidzein/kg Futter (ovx+Dai) beigemischt. Weitere 11 Tiere bildeten Gruppe 4. Ihr Futter wurde mit 5g 4-MBC pro kg Futter (ovx+4-MBC) zugesetzt.

Tabelle 1: Gruppenzuordnung, Dosis der Futtermischung und mittlere Futterraufnahme

Gruppe	Substrat und Menge	mittlere Futterraufnahme	Substrataufnahme pro Tag
Gr. 1 (ovx+sf)	sf-Grundmischung	15g/Ratte am Tag	
Gr.2 (ovx+E2)	sf+10mg E2/kg Futter	13g/Ratte am Tag	0,13mg/Tag
Gr.3 (ovx+Dai)	sf+1g Dai/kg Futter	15g/Ratte am Tag	15mg/Tag
Gr.4 (ovx+4-MBC)	sf+5g 4-MBC/kg Futter	14g/Ratte am Tag	70mg/Tag

Um die Aufnahme des Futters in seiner Menge zu bestimmen, wurden zweimal wöchentlich das Futter, sowie insgesamt zu vier Zeitpunkten auch die Tiere selbst, gewogen. Die Menge an gefressenem Futter und getrunkenem Wasser wurde pro Käfig zweimal wöchentlich bestimmt. Daraus ließ sich die durchschnittliche Futtermenge jedes Tieres abschätzen und auch die reine Substrataufnahme im Futter bestimmen.

2.1.5 Obduktion und Aufarbeitung der Organe

20 Wochen nach Ovariectomie wurden die Ratten unter CO₂-Narkose dekapitiert. Anschließend folgte die Organentnahme. Die Uteri wurden fettfrei herauspräpariert und nass gewogen. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff zur Konservierung eingefroren.

Für die Anfertigung der histologischen Schnitte wurden die Organe aufgetaut und für 24-72 Stunden in 10%igem Formaldehyd konserviert. Für den weiteren Gebrauch mussten die Präparate entwässert und fixiert werden. Dazu wurden die in Einbettkästen aufbewahrten Schnitte mit Hilfe einer Zitadelle (Leica TP 1020, V 2.0, Ordnernr. 070430101, Herstellung 03/98) nacheinander in verschiedene Alkohol-, Xylol- und Paraffinlösungen getaucht und aufbewahrt. Die aufsteigende Alkoholreihe dient zur Entwässerung, das Paraffin zur Stabilisierung der Organe. Zur endgültigen Fixierung wurden die Einbettkästen anschließend in einem Wärmeschrank bei 56-62°C (Fa: Schütt

Labortechnik, GFL 7601) aufbewahrt. Die so vorbehandelten Organteile wurden dann in einen Paraffinblock gegossen, der dazu dient, im Anschluss die histologischen Schnitte anfertigen zu können.

Die Paraffin-fixierten und wieder gefrorenen Blöcke wurden zum Schneiden in ein Mikrotom (Leica Model RM 2135 Fabriknr: 2794/10.2000, Kat.Nr: 050029802) eingespannt und in Schichten von je 3 µm Dicke geschnitten. Von jedem Organ wurden 10 Schnitte angefertigt, auf Objektträger (Menzel+Superfrost Plus) aufgebracht und anschließend im Wärmeschrank getrocknet. 24 Stunden später wurden die Schnitte einer Hämatoxylin-Eosin-Färbung unterzogen. Diese bestand aus einer absteigenden Alkoholreihe, der eigentlichen Färbung und einer aufsteigenden Alkoholreihe (Protokoll s. methodischer Anhang). Von jedem Organ wurden zwei Schnitte ausgewählt und angefärbt.

2.2 Mikroskopie

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

Von jedem Tier wurden zwei Präparate ausgewertet. Es erfolgten pro Schnitt je 10 Messungen in den Schichten des Myometriums und des Endometriums sowie insgesamt 40 Messungen in den Schichten des Epitheliums. Dabei wurden zufällig zwei unterschiedliche Stellen im Präparat ausgewählt und gemessen.

Für die Messungen im Bereich des Myometriums sowie des Endometriums wurde eine 25-fache Vergrößerung gewählt, für die Messungen des Epitheliums eine 50-fache. In dieser Vergrößerung konnte neben der Breite der Struktur auch jeweils die Morphologie der Zellen genauer beurteilt werden.

2.3 Serumdiagnostik

Der Radioimmunassay (RIA) dient dem quantitativen Nachweis kleinster Antigene (hier Hormone). Bei dem Prinzip des RIA konkurrieren radioaktiv-markierte Antigene mit den

unmarkierten Antigenen der Serumprobe um eine begrenzte Anzahl spezifischer und definierter Antikörperbindungsstellen. Durch diese kompetitive Reaktion wird eine bestimmte Menge an markiertem Antigen aus der Bindung mit seinem Antikörper verdrängt und von unmarkiertem Antigen besetzt. Aus der bestimmten Menge des markierten Antigens kann anhand der Radioaktivität und der bekannten Antikörperreaktion die Menge des unmarkierten Antigens der Serumprobe errechnet werden. Durchgeführt wurden diese Messungen von den technischen Assistentinnen der Abteilung.

Die Schilddrüsenhormone Trijodthyronin (T3) und Thyroxin (T4) wurden mit einem RIA bestimmt (Kit DSL-3100, DSL-3200). Für das Thyroidea-stimulierende Hormon (TSH) wurde ebenfalls ein RIA genutzt (NIAMD, Dr.Parlow, Torrance Harbour General Hospital CA). LH wurde mittels eines laboreigenen RIA bestimmt, welche mit den Standardkurven, Hormonen und Antikörpern des *National Hormone and Pituitary Program* arbeiten. E2 ist mit Hilfe des RIA DSL Kits 43-100 (Sinsheim, Germany) untersucht worden. Die Radioaktivität wurde mit dem *Gamma Counter Wizard 1470* (WALLAC, Schweden) gemessen und mit dem RIA-CALC-Programm ausgewertet.

2.4 PCNA-Färbung

PCNA (*Proliferating cell nuclear antigen*) ist ein Komplex aus Protein, der bei der DNA-Replikation eine Rolle spielt. Dieser Faktor wird oftmals als Marker proliferierender Zellen genutzt.

Der PCNA-Komplex ist ein Faktor, der an die Polymerase δ und ϵ bindet und im Replikationsprozess für die Verlängerung der Primer mitverantwortlich ist (Kelman und Hurwitz 1998). Die Expression von PCNA ist demnach zellzyklusspezifisch und in der S-Phase am höchsten reguliert. Damit dient die Anfärbung des PCNAs einer Analyse, welche Zellkerne sich zum Zeitpunkt der Obduktion in der Zellteilung befinden und damit einen Hinweis auf eine Proliferation des Gewebes geben.

Für diese Arbeit wurden pro Gruppe je vier Präparate ausgewählt. In jedem Präparat wurden alle Zellen des Epitheliums und zusätzlich die deutlich dunkel angefärbten Zellkerne ausgezählt, in denen sich das PCNA anfärben ließ. Der Quotient wurde graphisch aufgetragen.

Die Immunzytologische PCNA-Färbung wurde durch die medizinisch-technische Assistentin Heidi Meyer-Brüggemann der Abteilung gemäß dem Färbungsprotokoll durchgeführt (s. methodischer Anhang).

2.5 Statistische Methoden

Für die Statistische Auswertung konnten die Werte der mikroskopischen Messungen, sowie die post mortem bestimmten Körpergewichte, Uterusgewichte und Serumwerte (LH, TSH, T3, T4) verwendet werden.

Die ermittelten Werte wurden in das Tabellenkalkulationsprogramm Excel von Microsoft eingefügt und die Mittelwerte berechnet.

Alle Werte wurden anschließend in das Statistikprogramm **GraphPad Prism 5** übertragen. Der Mittelwert, sowie die Standardfehler der Mittelwerte (SEM) wurden für die einzelnen Gruppen berechnet und im Säulendiagramm graphisch dargestellt. Für die Bestimmung der Signifikanz wurde die einfache Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors *1-way-ANOVA* gewählt und anschließend ein multipler T-Test nach Dunnet durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde für alle Auswertungen auf $P < 0,05$ festgelegt. Dabei wurden die Gruppen E2, Dai und 4-MBC mit der Kontrollgruppe ovx+sf verglichen und bei Signifikanz mit * im Graphen gekennzeichnet.

Die lineare Regression, als Spezialfall der Regressionsanalyse, wurde ebenfalls mit dem PRISM-Programm berechnet und erstellt. Sie dient zur Darstellung einer Beziehung zwischen einer abhängigen Variablen und einer oder mehreren unabhängigen Variablen.

3 Ergebnisse

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Körpergewichtsmessungen, der Uterusgewichte, der Histometrie, der Histomorphologie und die Auswertung der Serumwerte dargestellt werden. Weiter wurden lineare Regressionen zwischen dem Uterusgewicht und der LH-Serum-Konzentration beschrieben. Für alle Auswertungen wurde das Signifikanzniveau auf $P < 0,05$ festgelegt und die Standardabweichung vom Mittelwert berechnet (SEM).

3.1 Körpergewicht

Um eine Aussage über den östrogenen Effekt auf den Stoffwechsel und damit auf das Körpergewicht machen zu können, sind nachfolgend die Körpergewichte der Tiere in allen Gruppen über die Zeit des Versuchs aufgetragen.

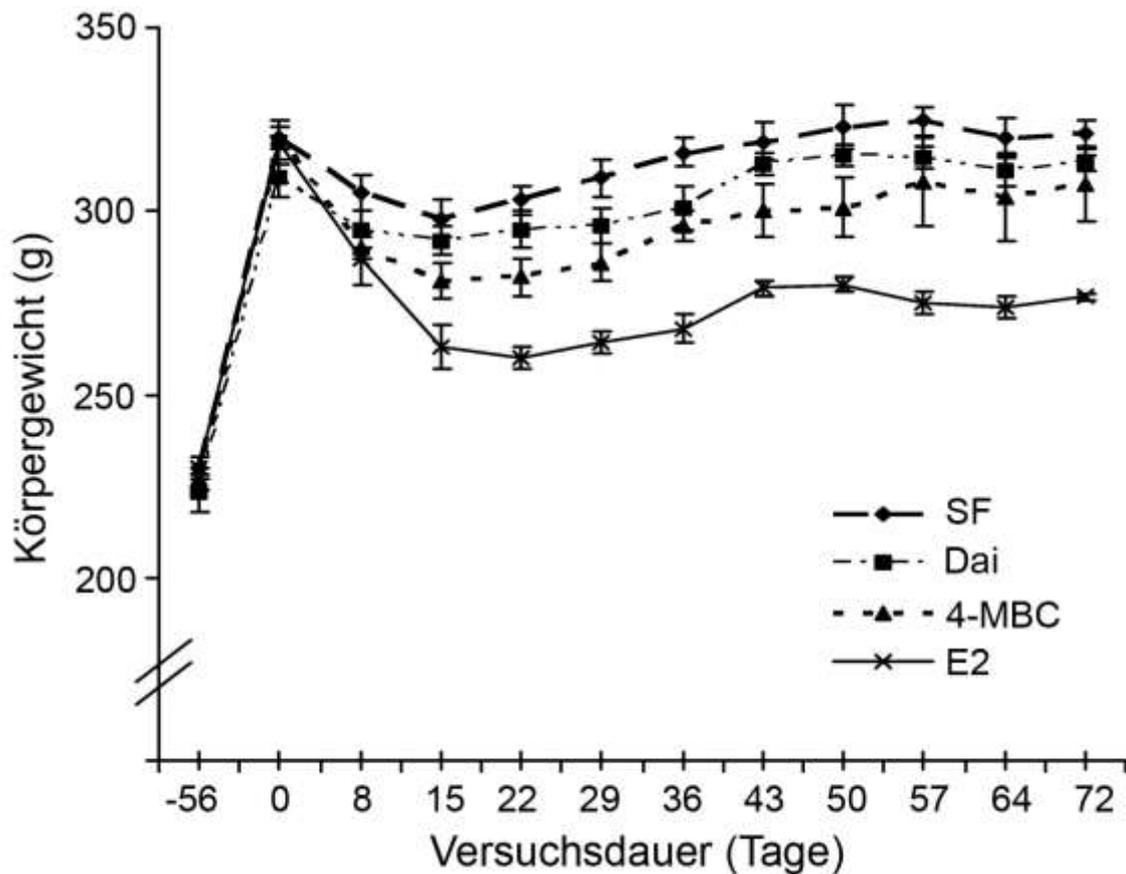


Abb. 4: Gewichtsveränderung der Tiere über den Verlauf des Versuchs in den 4 Gruppen

Ausgehend von der Ovariectomie an Tag -56 nahmen die Tiere aller Gruppen um durchschnittlich 98 g zu. Nach 8 Wochen sojafreier Ernährung erfolgte die Osteotomie und Osteosynthese der Tibia und die substratspezifische Fütterung der Tiere begann. Die Körpergewichte aller Tiere nahmen in den ersten zwei Wochen signifikant ab. Danach stiegen die Gewichte der Tiere gruppenspezifisch kontinuierlich an. In der Gruppe E2 blieb das Gewicht der Tiere erwartungsgemäß über das gesamte Experiment auf einem deutlich niedrigeren Level als zum Zeitpunkt der Osteotomie und signifikant erniedrigt gegenüber den Kontrolltieren. Die Kontrollgruppe dagegen erreichte zum Ende des Versuchs wieder das Ausgangsgewicht, das die Tiere zum Start der gruppenspezifischen Fütterung aufwiesen. Die Gruppen E2 und 4-MBC wiesen signifikant geringere Körpergewichte als die Kontrollgruppe auf. Dai zeigte bei den Tieren ebenfalls geringere Körpergewichte, die jedoch nicht signifikant waren.

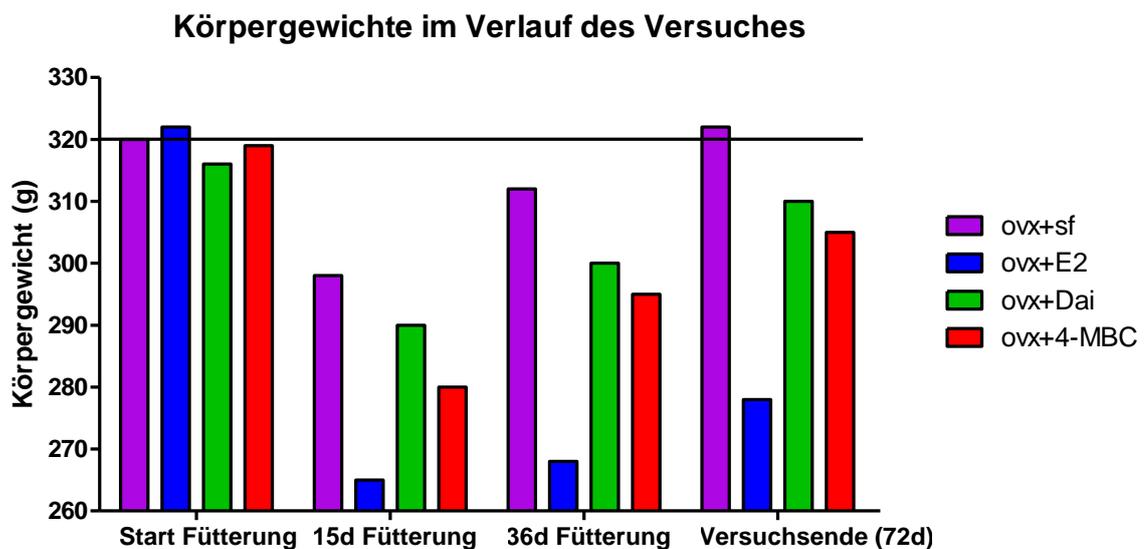


Abb. 5: Gewichtsveränderungen der Versuchstiere

Messung zu Beginn der gruppenspezifischen Fütterung, nach 15 Tagen (d), nach 36d und zum Versuchsende nach 72d.

Zu Beginn der gruppenspezifischen Fütterung wiesen alle Tiere ein nahezu identisches Gewicht auf. Die enorm erniedrigten Körpergewichte nach 15 Tagen sind auf die Osteotomie zurückzuführen, nach der die Tiere sich nicht viel bewegten. Nach 36 Tagen

lässt sich eine Tendenz erkennen, dass die E2-behandelten Tiere auch im Verlauf deutlich geringere Körpergewichte aufwiesen als die anderen Gruppen. Zum Versuche sind die Kontrolltiere durchschnittlich etwas schwerer (+2 g) als zu Beginn des Versuches. Die Tiere der Gruppe E2 nahmen im Verlauf der 72 Tage durchschnittlich 44 g an Gewicht ab. In geringerem Maße nahmen auch die Tiere der Dai-Gruppe um durchschnittlich 6 g und die Tiere der 4-MBC-Gruppe um 14 g ab.

3.2 Uterusgewicht

Um die Gewichtszunahme der Uteri unter der gruppenspezifischen Substratapplikation (10mg E2/kg Futter, 1g Dai/kg Futter, 5g 4-MBC/kg Futter) beurteilen zu können, wurden die Uterusgewichte nach Obduktion nass bestimmt. Hier zeigte sich ein erster Hinweis auf einen Behandlungseffekt.

**Effekt von E2, Daidzein und 4-MBC (70 Tage per Futter in ovx S.D. Ratte) auf:
Uterusgewicht**

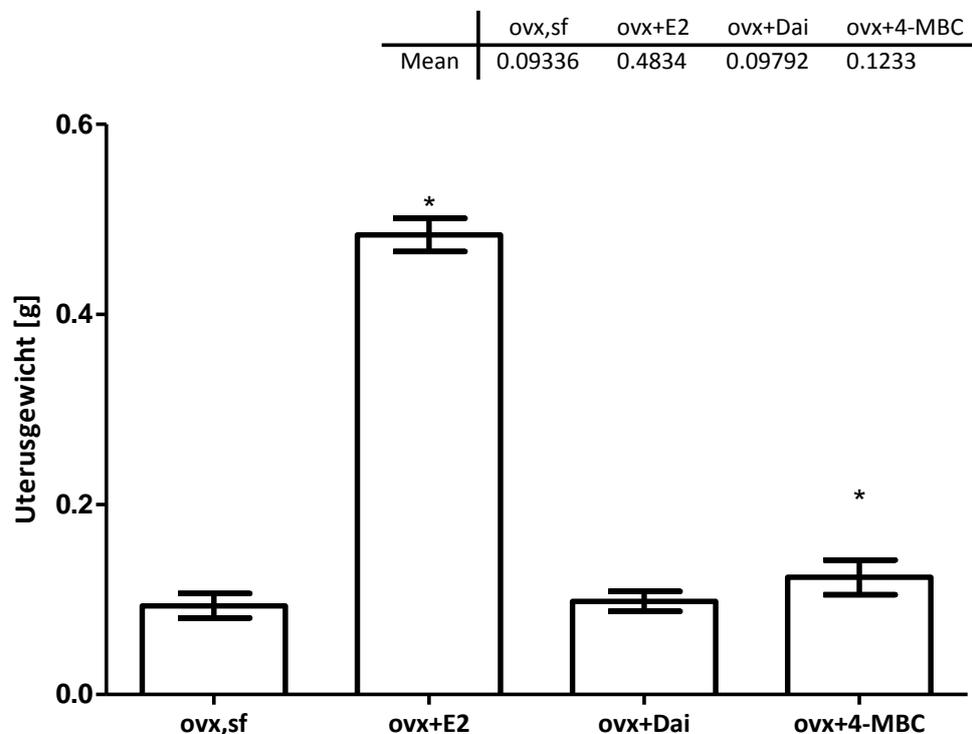


Abb. 6: Durchschnittliches Uterusgewicht in den einzelnen Gruppen

* $P \leq 0.05$ vs ovx+sf

Die Uteri der E2-, und der 4-MBC-behandelten Tiere waren signifikant schwerer als die der Kontrollen ovx+sf ($0,09336 \pm 0,01281\text{g}$). Die Tiere, die mit Daidzein behandelt wurden, wiesen keine signifikanten Unterschiede der Uterigewichte in Bezug auf die Kontrollen auf. Auch makroskopisch fiel Dr. Seidlová-Wuttke, die die Obduktion durchführte, bereits auf, dass die Uteri der Gruppen 2 und 4 deutlich größer waren als die der Gruppen 1 und 3.

3.3 Histometrische Auswertung

Die histologischen Präparate des Uterus wurden gemäß ihrem anatomischen Aufbau in den drei Schichten vermessen und ausgewertet, um eine Aussage über die Wirkung der Substanzen in den einzelnen uterinen Kompartimenten treffen zu können. Dabei folgten pro Präparat je 40 Messungen des Epitheliums, 10 Messungen des Endometriums und 10 Messungen des Myometriums. Die Wahl der jeweiligen Vergrößerung ist bereits im Teil Material und Methoden umfassend beschrieben.

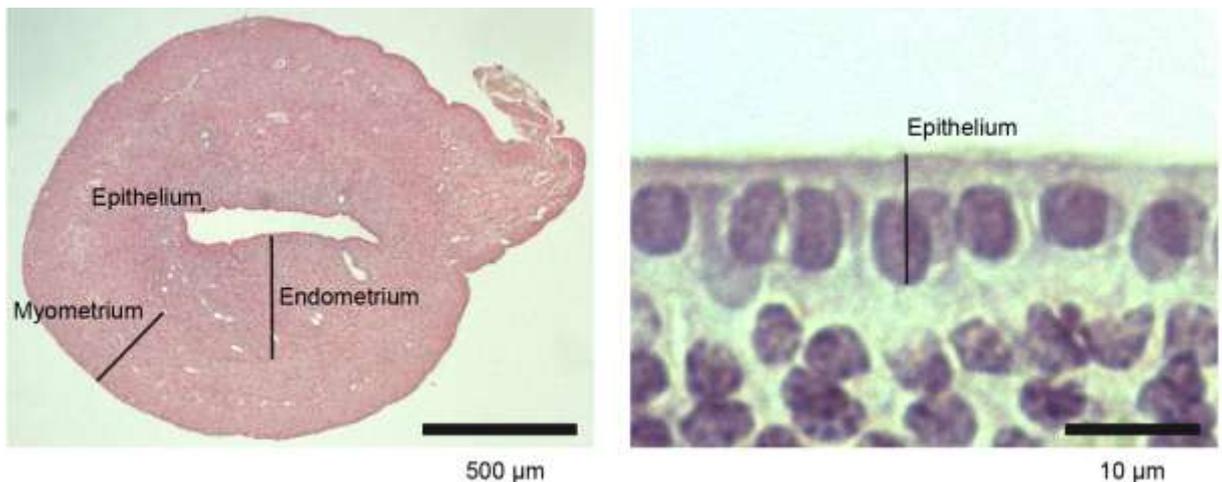


Abb. 7: Darstellung der histometrischen Messung am Uterus

Links: Übersicht des histologischen Aufbaus des Rattenuterus. Darstellung der drei ausgewerteten Kompartimente Epithelium, Endometrium und Myometrium. Rechts: Beispielhafte Darstellung der Vermessung des Epitheliums.

3.3.1 Epithelium

Die folgenden Bilder zeigen das Epithelium der vier Versuchsgruppen. Im Vergleich wird deutlich, wie stark die Höhe des Epitheliums in den vier Gruppen variiert.

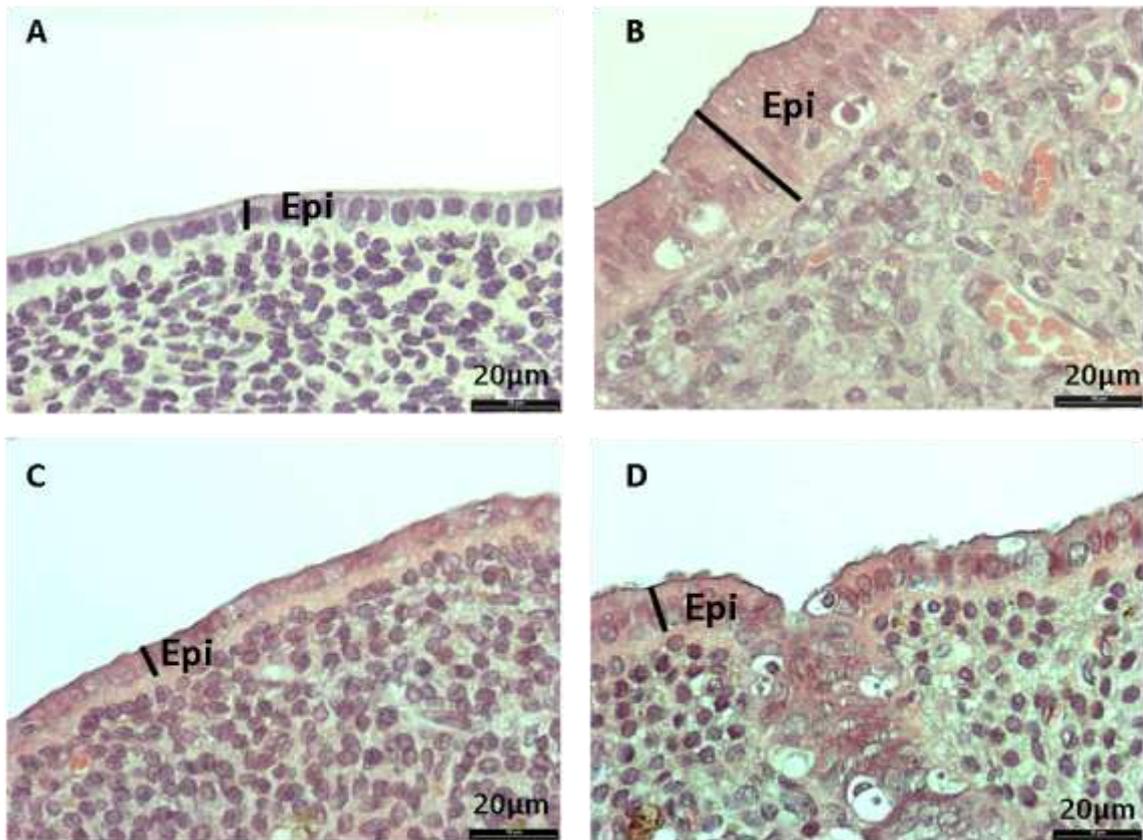


Abb. 8: Histologie der Epithelien in den untersuchten Gruppen

A: Gr.1 (ovx+sf) flaches einreihiges Epithelium; B: Gr.2 (ovx+E2) hoch stimuliertes, teils mehrschichtiges Epithelium; C: Gr. 3 (ovx+Dai) leicht bis mäßig stimuliertes Epithelium; D: Gr.4 (ovx+4-MBC) mäßig bis hoch stimuliertes Epithelium.

Epi=Epithelium, Maßstabballen entspricht 20 µm

**Effekt von E2, Daidzein und 4-MBC (70 Tage per Futter in ovx S.D. Ratte) auf:
Epitheliumdicke im Uterus**

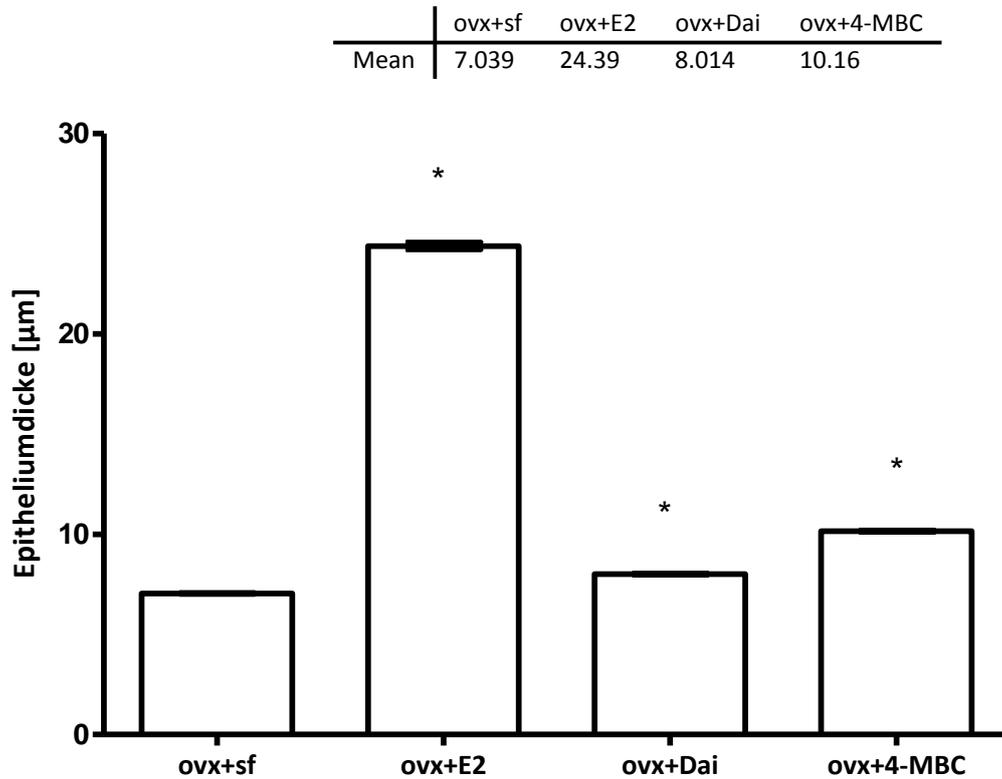


Abb. 9: Durchschnittliche Epitheliumdicke in den einzelnen Gruppen

Die uterine Epitheliumdicke wurde durch E2, Dai und 4-MBC jeweils signifikant stimuliert. * $P \leq 0.05$ vs ovx+sf

In den Gruppen E2, Dai und 4-MBC fanden sich eine signifikante Dickenzunahme des Epitheliums im Vergleich mit der Kontrollgruppe ovx+sf ($7,039 \pm 1,283 \mu\text{m}$). Die stärkste Zunahme der Epitheliumdicke zeigte die Gruppe ovx+E2 ($24,39 \pm 4,832 \mu\text{m}$).

3.3.2 Endometrium

Effekt von E2, Daidzein und 4-MBC (70 Tage per Futter in ovx S.D. Ratte) auf:
Endometriumdicke im Uterus

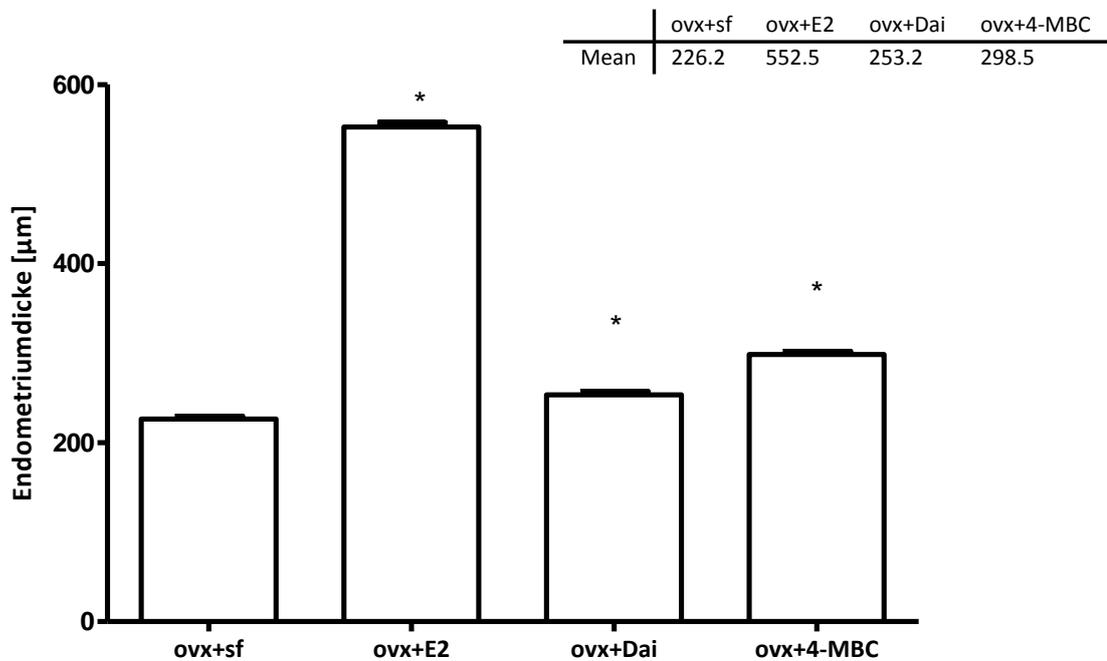


Abb. 10: Durchschnittliche Endometriumdicke in den einzelnen Gruppen

Wie E2 stimulierten Dai und 4-MBC die Endometriumdicke signifikant. * $P \leq 0.05$ vs ovx+sf

Auch bei der Vermessung des Endometriums zeigen sich signifikante Verbreiterungen in den Gruppen E2, Dai und 4-MBC im Vergleich mit der Kontrollgruppe ovx+sf ($226,2 \pm 51,56 \mu\text{m}$). Wie erwartet, stimuliert auch hier der Zusatz von E2 das Endometrium am stärksten, gefolgt von 4-MBC. Aber auch Daidzein stimuliert das Endometrium signifikant.

3.3.3 Myometrium

Effekt von E2, 4-MBC und Daidzein (70 Tage per Futter in ovx S.D. Ratte) auf:
Myometriumdicke im Uterus

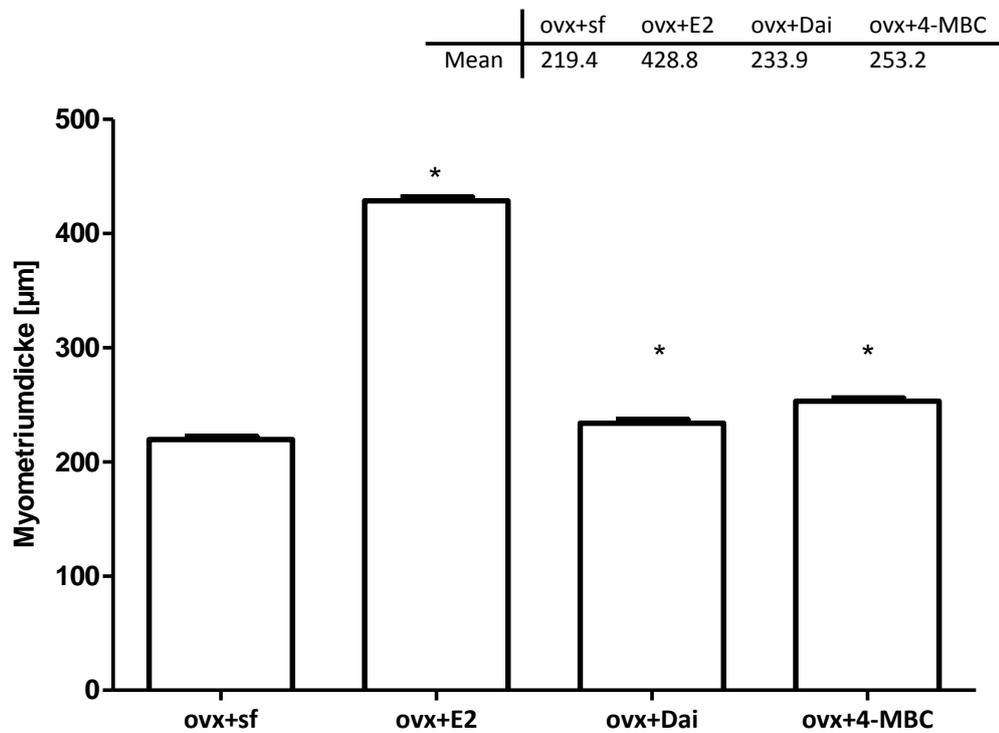


Abb. 11: Durchschnittliche Myometriumdicke in den einzelnen Gruppen

Dai und 4-MBC stimulierten, wie E2, die uterine Myometriumdicke signifikant. * $P \leq 0.05$ vs ovx+sf

Analog zur Stimulation des Epitheliums und des Endometriums, konnte auch in der Vermessung des Myometriums eine signifikante Stimulation durch E2, Dai und 4-MBC im Vergleich zu den Kontrollen ovx+sf ($219,4 \pm 44,32 \mu\text{m}$) beschrieben werden.

3.4 Histomorphologie

Die Ergebnisse der Uterusgewichte sowie der histometrischen Analyse erweckten bereits den Eindruck, dass die verabreichten Substanzen die uterinen Kompartimente der untersuchten Organe unterschiedlich stimulierten. Die Histomorphologie soll nun weiter die möglichen Veränderungen in der Zellstruktur aufzeigen. Dabei wurde insbesondere das Epithelium untersucht.

Die histologischen Bilder lagen Prof. Dr. Wilting vom Anatomischen Institut, Göttingen vor. Die Kriterien der Histomorphologie wurden im Einklang mit der internationalen Nomenklatur verwendet. Da es keine spezifische Nomenklatur für die Histologie des Rattenuterus gibt, wurden die humanen Kriterien und Bezeichnungen für unser Modell übernommen.

Nachfolgend werden die Auffälligkeiten in der Histomorphologie im mikroskopischen Bild dargestellt.

Uterus Epithelium ovx+sf

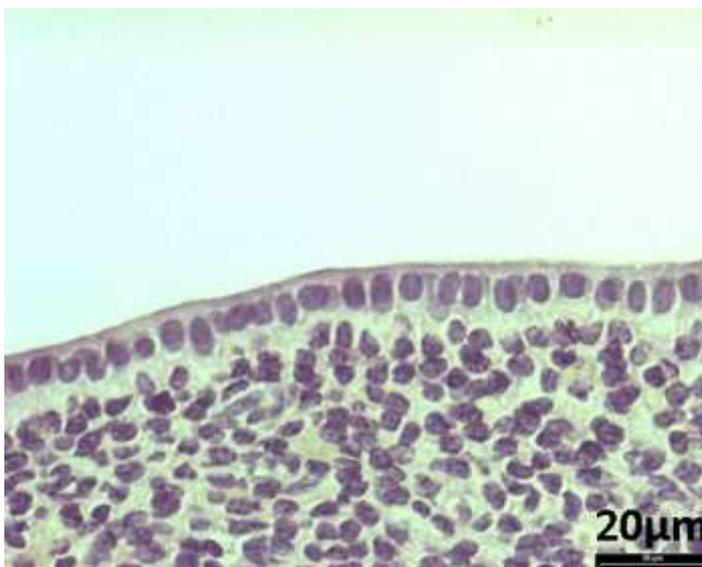


Abb. 12: Epithelium Gruppe 1

Atrophes, einschichtiges Epithelium mit homogenem Chromatinmuster und ohne Anzeichen der Hypertrophie oder Hyperplasie. Maßstabballen entspricht 20 μm .

Uterus Epithelium ovx+E2

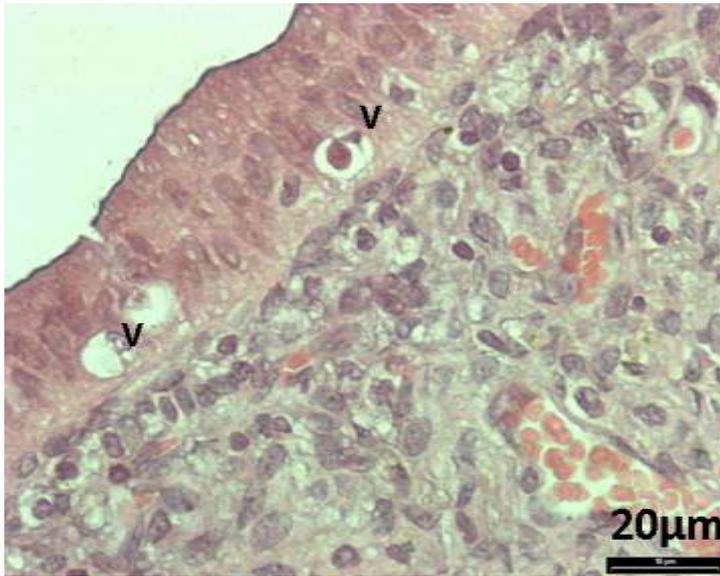


Abb. 13: Epithelium Gruppe 2

Stark proliferiertes Epithelium (Hyperplasie und Hypertrophie) mit zytoplasmatischen Vakuolenbildung (V). Maßstabbalken entspricht 20 μm .

Uterus Epithelium ovx+Dai

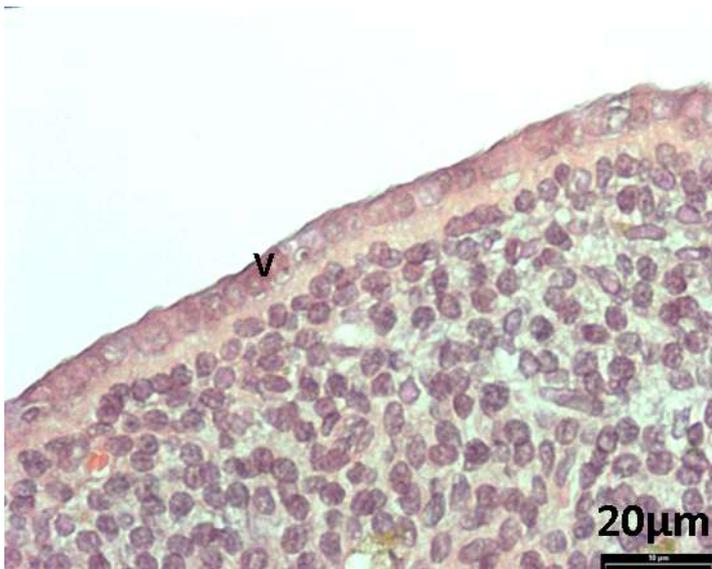


Abb. 14: Epithelium Gruppe 3

Leicht bis mäßig stimuliertes Epithelium. Vereinzelt zytoplasmatische Vakuolen (V) mit atropen Zellkernen. Maßstabbalken entspricht 20 μm .

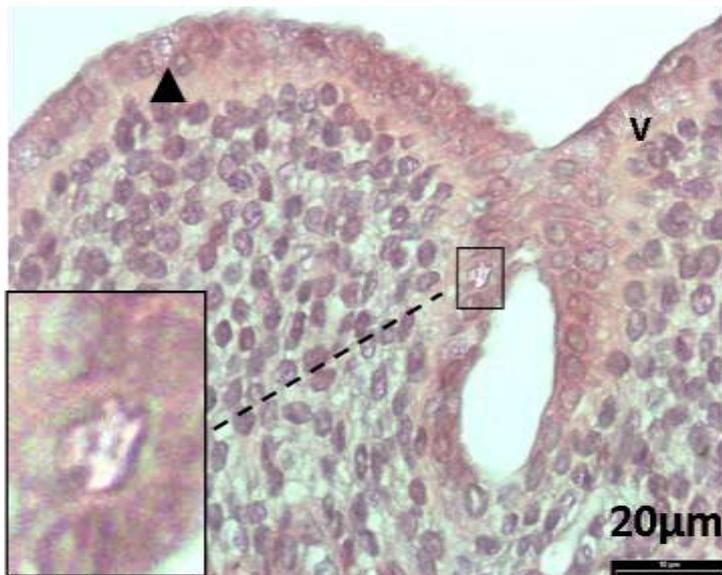


Abb. 15: Epithelium Gruppe 3

Mäßig stimuliertes Epithelium mit Zeichen der Hyperplasie. Zytoplasmatische Vakuolenbildung (V), Anisochromasie (▲▲) sowie entrundete Zellkerne (Ausschnitt). Maßstabbalken entspricht 20 μm.

Uterus Epithelium ovx+4-MBC

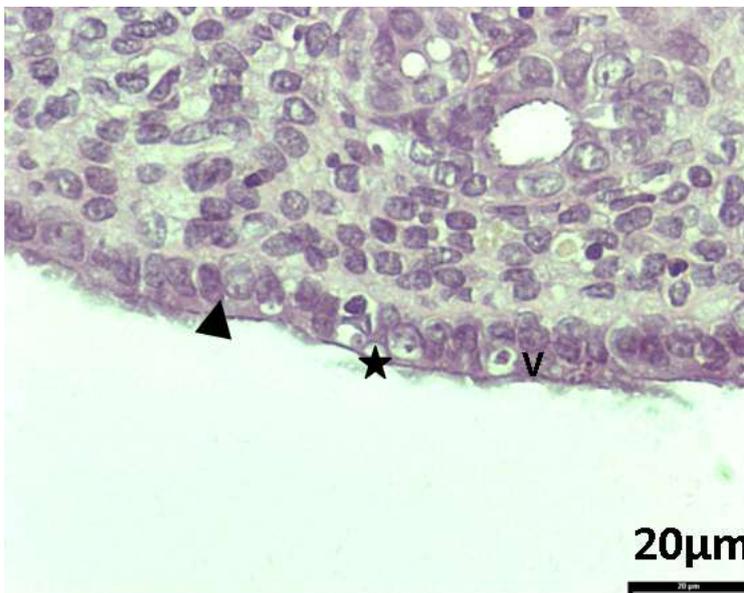


Abb. 16: Epithelium Gruppe 4

Mäßig stimuliertes Epithelium mit Zeichen der Hyperplasie. Es finden sich zytoplasmatische Vakuolen mit atrophem Kern (V), multiplen Nukleoli (*) und Anisochromasie (▲). Maßstabbalken entspricht 20 μm.

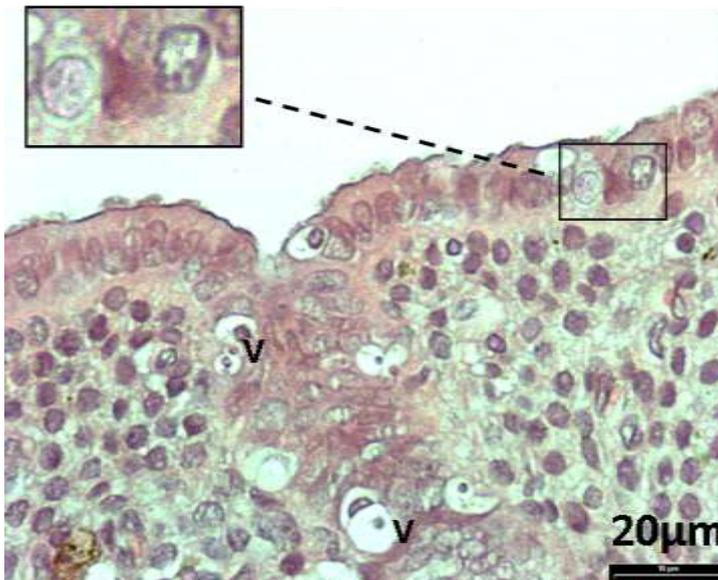


Abb. 17: Epithelium Gruppe 4

Mäßig bis stark proliferiertes Epithelium mit deutlichen Zeichen der Hyperplasie und Hypertrophie. Zytoplasmatische Vakuolenbildung (V) mit atrophem Kern, entrundete und heterochrom imponierende Zellkerne (Ausschnitt). Maßstabbalken entspricht 20 μ m.

Das Epithel des Endometriums, sowohl der Frau als auch der Ratte, ist ein einschichtiges Epithel, das kubisch bis zylindrisch imponiert. Die Kerne liegen mittelständig und sind rund-oval.

Der atrophe Uterus (ovx) ist gekennzeichnet durch ein flaches, einschichtiges, lumenauskleidendes Epithel ohne Anzeichen von Hyperplasie oder Hypertrophie.

E2 stimuliert bekanntermaßen die Proliferation des Uterus. Daher imponiert das Epithel in dieser Phase hoch aufgebaut, teilweise mehrschichtig und weist Zeichen der Hyperplasie und Hypertrophie auf.

Als *Hyperplasie* bezeichnet man dabei einen Gewebezuwachs durch vermehrte Zellteilung und damit eine erhöhte Zellzahl.

Eine *Hypertrophie* ist definiert als Gewebezuwachs durch Größenzunahme der einzelnen Zelle, z.B. durch vermehrte Syntheseleistung oder auf Grund starker Beanspruchung.

Eine Hyperplasie im Uterus wird als Präkanzerose für die Entstehung eines Adenokarzinoms gewertet. Zur Beurteilung der Hyperplasie- und Hypertrophiezeichen wurden daher fünf morphologische Kriterien festgelegt und untersucht. Dabei wurden die Präparate nach Zelltyp, Kernform, Chromatinverteilung, Anfärbbarkeit des Zellkerns (Hyperchromasie) und Vakuolisierung beurteilt.

In der folgenden Tabelle findet sich eine Übersicht über die gewählten Kriterien und ihr Auftreten im normalen, nicht-stimulierten Epithelium im Vergleich mit Veränderungen im hyperplasierten Epithelium, sowie einem Epithelium, das bereits Malignitätscharakter aufweist.

Tabelle 2: Kriterien zur morphologischen Beurteilung zelltypischer Veränderungen in normalem Epithelium, hyperplasiertem Epithelium und Epithelium mit malignen Veränderungen

Kriterien	Normales Epithelium	Hyperplasie des Epitheliums	Maligne Veränderungen
Zelle	Zylinderepithel; bei ovx einschichtig	Zylinderepithel, einschichtig bis mehrschichtig	unregelmäßig aufgebaut, mehrschichtiges Zylinderepithel, Basalmembran nicht mehr intakt, polymorphe Zellen
Kernform	rund-oval	rund-oval bis oval- länglich	Rund-oval bis entrundet, polymorph
Chromatin	fein, gleichmäßig verteilt	fein, gleichmäßig verteilt bis aufgeraut mit Verteilungsstörungen	granulär, unregelmäßig verteilt
Anisochromasie	keine	mäßig	deutlich
Vakuolisierung	wenig	mäßig	gehäuft

Im nicht-stimulierten, unveränderten Epithelium der Ratte findet sich einschichtiges Zylinderepithel. Im stimulierten Epithelium ist das Zylinderepithel hochprismatisch und je nach Zyklusphase unterschiedlich hoch aufgebaut. Es kann zwischen einschichtigem und mehrschichtigem Epithel variieren. Ein Kriterium für bereits begonnene maligne Entartung ist ein ungleichmäßig hoch aufgebautes mehrschichtiges Zylinderepithel, welches keine intakte Basalmembran mehr aufweist. Hier finden sich polymorphe Zellen, die sich in Gestalt und Größe deutlich unterscheiden.

Normalerweise haben die Zellen des Epitheliums rund-ovale Zellkerne, die in der Hyperplasie auch länglich imponieren können. Im entarteten Epithelium finden sich polymorphe, entrundete Zellkerne.

Der Chromatingehalt der Zellen im unveränderten Epithelium ist gleichmäßig im Zellkern verteilt, imponiert im hyperplasierten Epithel bereits zum Teil aufgeraut und mit unterschiedlichem Verteilungsmuster. Granuläres Chromatin mit deutlichen Verteilungsstörungen weist dabei auf ein malignes Geschehen hin.

Im nicht-stimulierten Epithelium des Uterus findet sich keine verstärkte Anfärbbarkeit des Zellkerns. Diese ist jedoch umso stärker nachweisbar, je mehr das Epithelium stimuliert ist (Hyperchromasie). Eine Hyperchromasie oder eine wechselnd starke Anfärbbarkeit der Zellkerne (Anisochromasie) kann somit ebenfalls als zelluläres Malignitätskriterium gewertet werden.

Zytoplasmatische Vakuolen entstehen bei der schnellen Proliferation von Geweben, die vor allem bei Tumoren sehr ausgeprägt ist. Sie können damit auch als Kriterium für die Beurteilung der Malignität herangezogen werden. Je stärker das Epithelium stimuliert ist, desto gehäuft finden sich Vakuolen.

Tabelle 3: Auswertung der festgelegten morphologischen Kriterien in den vier untersuchten Gruppen

Kriterien	ovx+sf	ovx+E2	ovx+Dai	ovx+4MBC
Mehrschichtiges Epithelium	-	+++	+	++
Polymorphe Kerne/Anisonukleose	-	+	++	+++
Chromatin- Verteilung unregelmäßig	-	-	++	+++
Anisochromasie	-	-	++	+++
Vakuolisierung	-	+++	++	++

- Wie erwartet, fand sich bei der Gruppe E2 in allen Präparaten ein hoch aufgebautes, mehrschichtiges Epithel, da E2 den stärksten Stimulus zum Aufbau der Schleimhaut darstellt. Auch in der Gruppe 4-MBC fand sich ein ausgeprägt stimuliertes Epithel. In der

Gruppe Dai fand sich in einigen Präparaten ein aufgebautes, mehrschichtiges Epithel, in anderen war es wiederum atroph einschichtig.

- Polymorphe Kerne, die ein weiteres Kriterium für eine übermäßige Stimulation darstellen und für ein potentiell Malignitätskriterium sprechen, fanden sich in den Gruppen E2, Dai und 4-MBC. Besonders auffällig waren diese atypischen Kerne in der Gruppe 4-MBC, doch auch bei den Tieren, denen Dai appliziert wurde, fanden sich diese in Größe und Form variierenden Zellkerne gehäuft. Wesentlich seltener fiel diese Polymorphie bei den Kernen im Epithelium der Gruppe E2 auf. In der Kontrollgruppe fanden sich keine Atypien hinsichtlich der Zellkerne.

- Die Chromatinverteilung in den Nuklei war in den Gruppen Dai und 4-MBC auffällig heterochrom. Besonders in der Gruppe 4-MBC fielen die unregelmäßigen Chromatinschollen gehäuft auf.

- Die unterschiedliche Anfärbbarkeit der Zellkerne (Anisochromasie) wurde ebenfalls untersucht. Dabei ergab sich in den Gruppen Dai und 4-MBC ein gehäuftes Nebeneinander von stark und weniger stark angefärbten Zellkernen, was ebenfalls ein zelluläres Malignitätskriterium darstellt.

- Zytoplasmatische Vakuolisierung, als Zeichen einer schnellen Proliferation von Gewebe, fand sich in den Gruppen E2, Dai und 4-MBC, in der Gruppe E2 jedoch am deutlichsten. Das korreliert sehr gut mit den Ergebnissen der Höhe des stimulierten Epitheliums.

3.5 PCNA-Färbung

Im Folgenden werden die Ergebnisse der PCNA-Färbung dargestellt, um eine Aussage über die tatsächliche Proliferation des Gewebes treffen zu können. Die Ergebnisse beziehen sich jeweils auf 4 Präparate je Gruppe. Die Zellkerne, die durch das PCNA-Antigen angefärbt werden konnten, imponieren dunkelbraun. Der Quotient von nicht-angefärbten Zellkernen zu stark-angefärbten Zellen ist auf der Y-Achse aufgetragen.

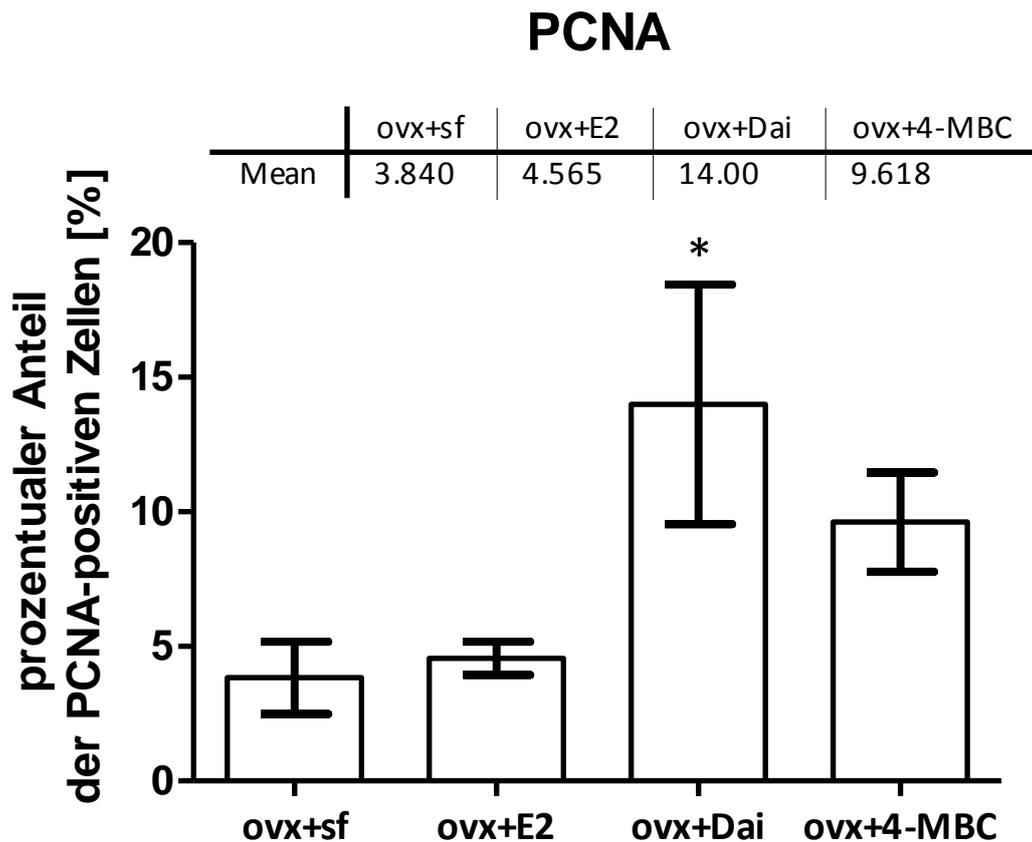


Abb. 18: Darstellung der prozentualen PCNA-positiven Zellkerne der einzelnen Gruppen.

E2 zeigte einen gering höheren Prozentsatz an PCNA-positiven Zellen gegenüber den Kontrollen. Dai wies signifikant mehr positive Zellen auf. 4-MBC zeigte doppelt so viele positive Zellen wie E2, aber keine signifikant höheren Prozentzahlen gegenüber den Kontrollen. * $P \leq 0.05$ vs ovx+sf

In der getroffenen Auswahl der Präparate zeigten sich signifikant erhöhte prozentuale Anteile an PCNA-positiven Zellkernen am Epithelium ausschließlich in der Gruppe Dai. 4-MBC wies ebenfalls mehr als doppelt so viele PCNA-positive Zellkerne wie die Kontrollen auf, jedoch waren die Ergebnisse nicht signifikant. In den Präparaten der E2-behandelten Tiere fand sich nur ein geringfügig erhöhter Anteil von PCNA-positiven Zellkernen am Gesamtepithelium.

Nachfolgend sind die Ergebnisse der PCNA-Färbung im mikroskopischen Bild dargestellt.

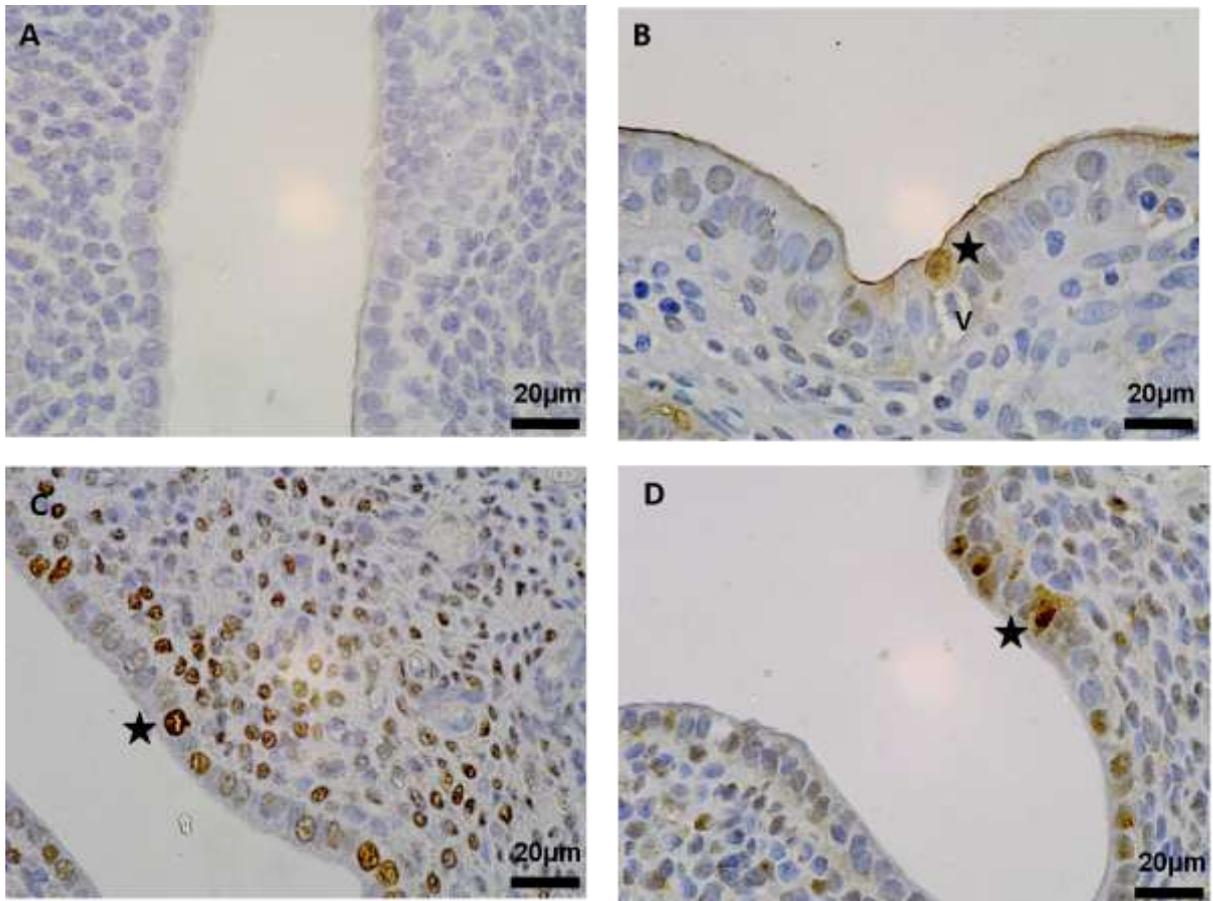


Abb. 19: Darstellung der Histologie des Epitheliums in PCNA-Färbung

* kennzeichnet die deutlich PCNA-positiven Zellkerne. Maßstabbalken entspricht je 20µm.

A: Gruppe 1 (ovx+sf): keine PCNA-positiven Zellkerne erkennbar; **B:** Gruppe 2 (ovx+E2): gemessen am Gesamtepithelium nur vereinzelt PCNA-positiven Zellkerne zu detektieren; **C:** Gruppe 3 (ovx+Dai): vermehrt PCNA-positiven Zellkerne im Epithelium; **D:** Gruppe 4 (ovx+4-MBC): vermehrte Expression von PCNA.

3.6 Serumanalyse von LH und der Schilddrüsenachse

Wie bereits beschrieben, hängt die hypophysäre Ausschüttung des Luteinisierenden Hormons stark mit der Anwesenheit von E2 zusammen. Östradiol hemmt dabei die LH-Ausschüttung. Gemäß der Annahme, dass Dai und 4-MBC Östrogen-ähnliche Wirkung haben, wurde für die Serumanalyse der LH-Spiegel abgenommen.

3.6.1 Luteinisierendes Hormon (LH)

LH im Serum

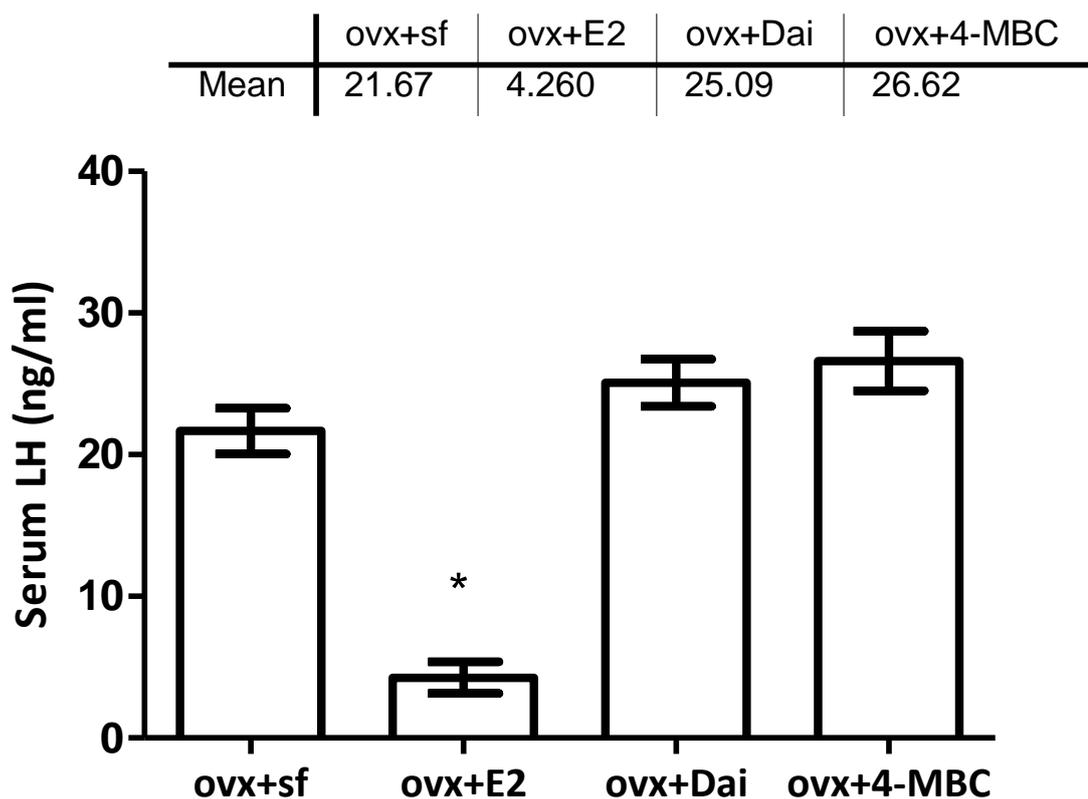


Abb. 20: Durchschnittliche LH-Serumwerte der einzelnen Gruppen

Serum-LH war unter E2 signifikant supprimiert. Keine Beeinflussung des Serum-LH durch Dai und 4-MBC.

* $P \leq 0.05$ vs ovx+sf

Die Serum-LH-Spiegel wurden erwartungsgemäß durch E2 signifikant supprimiert. Durch die Gabe von Daidzein und 4-MBC zeigte sich keine Suppression, im Gegenteil fand sich eine leichte, aber nicht signifikante Erhöhung der Spiegel.

3.6.2 Thyroidea-stimulierendes Hormon (TSH)

Die Serumanalyse der Schilddrüsenhormone wurde gewählt, um eine mögliche weitere disruptive Wirkung der Testsubstanzen zu untersuchen. TSH ist dabei der entscheidende Marker für eine Schilddrüsenfunktionsstörung. Ist TSH erniedrigt, spricht man von einer Hyperthyreose, ist TSH erhöht, liegt eine Hypothyreose vor.

TSH im Serum

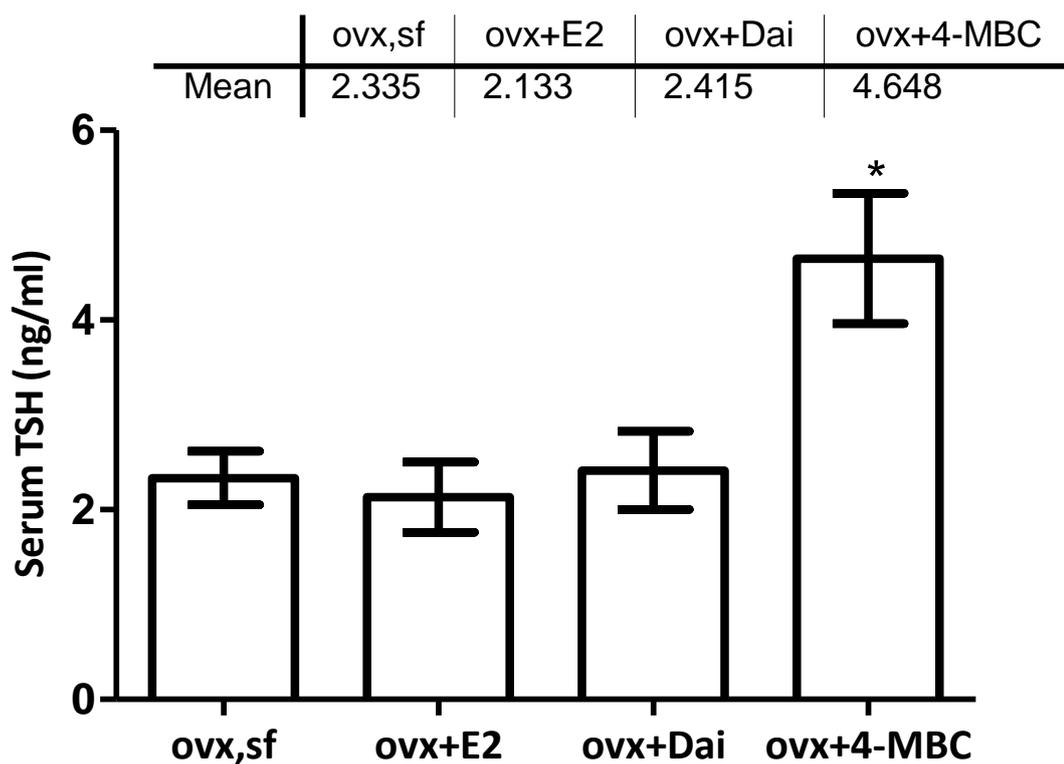


Abb. 21: Durchschnittliche TSH-Serumwerte der einzelnen Gruppen

Die Serum-TSH-Spiegel waren unter der Therapie mit 4-MBC signifikant erhöht. E2 und Dai nahmen keine signifikante Beeinflussung auf den SerumTSH-Spiegel. * $P \leq 0.05$ vs ovx+sf

Die Serum-TSH-Werte waren nur unter 4-MBC signifikant beeinflusst, wenngleich eine kaum messbare Suppression unter E2 und eine geringfügige Erhöhung unter Dai zu beobachten war. Die TSH-Spiegel unter 4-MBC waren um 50% höher als die der Kontrollen.

3.6.3 Thyroxin (T4)

Zusätzlich zu dem TSH-Serumwert wurden die Schilddrüsenhormone T3 und T4 bestimmt. T4 bildet den Hauptanteil der von der Schilddrüse sezernierten Hormone, T3 stellt jedoch den biologisch aktiven Metaboliten dar (Verhältnis 1:20). 99% des sezernierten T4 ist dabei an Bindungsproteine gebunden und liegt nicht frei vor. Im Assay wurde das Gesamt-T4 bestimmt.

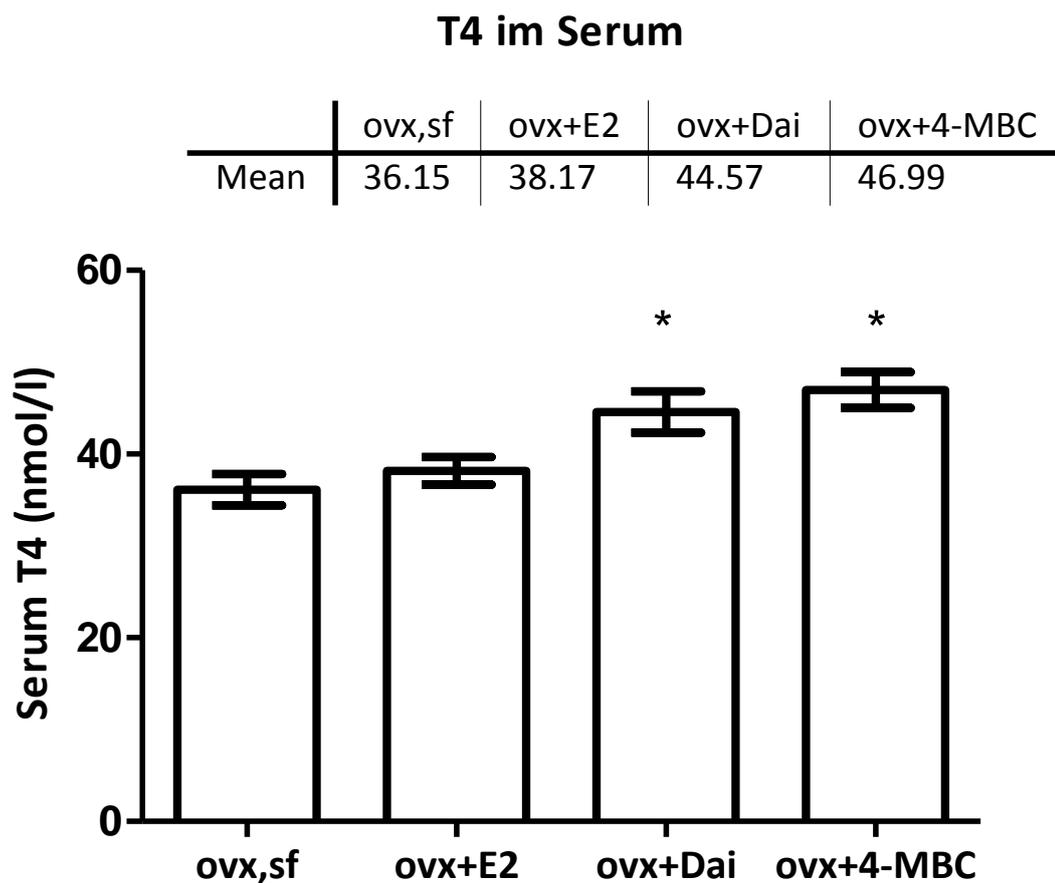


Abb. 22: Durchschnittliche T4-Serumwerte der einzelnen Gruppen

Die Serumwerte von T4 waren unter Dai und 4-MBC signifikant erhöht. * P≤0.05 vs ovx,sf

Die Serum-T4-Spiegel waren unter Dai und 4-MBC signifikant erhöht im Vergleich mit der Kontrollgruppe ovx+sf. Unter E2 fand sich eine geringfügige, jedoch nicht signifikante Erhöhung der T4-Spiegel.

3.6.4 Trijodthyronin (T3)

T3 im Serum

	ovx,sf	ovx+E2	ovx+Dai	ovx+4-MBC
Mean	0.7210	0.6657	0.9656	1.183

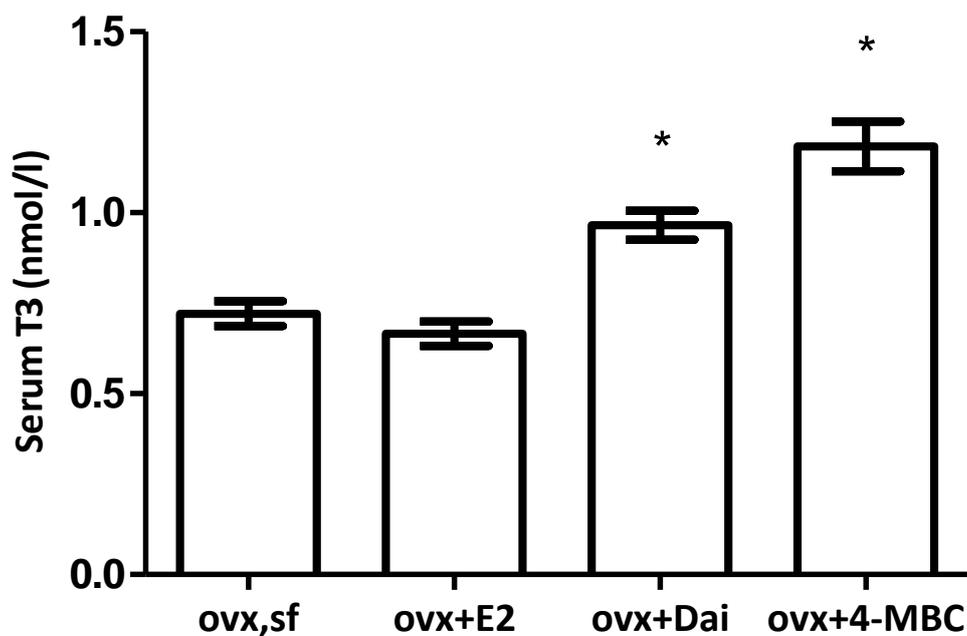


Abb. 23: Durchschnittliche T3-Serumwerte der einzelnen Gruppen

Dai und 4-MBC erhöhten signifikant die T3-Serumlevel.* P<0.05 vs ovx+sf

Die Serum-T3-Spiegel waren ebenfalls unter Dai und 4-MBC-Gabe signifikant erhöht im Vergleich mit den Kontrollen. Unter E2 fand sich eine leichte Reduktion der T3-Spiegel, die jedoch nicht signifikant gegenüber den Kontrollen war.

3.7 Linearer Zusammenhang Uterusgewicht und LH-Level

Lineare Regression: Uterusgewicht (g) und LH-Serumkonzentration (ng/ml)

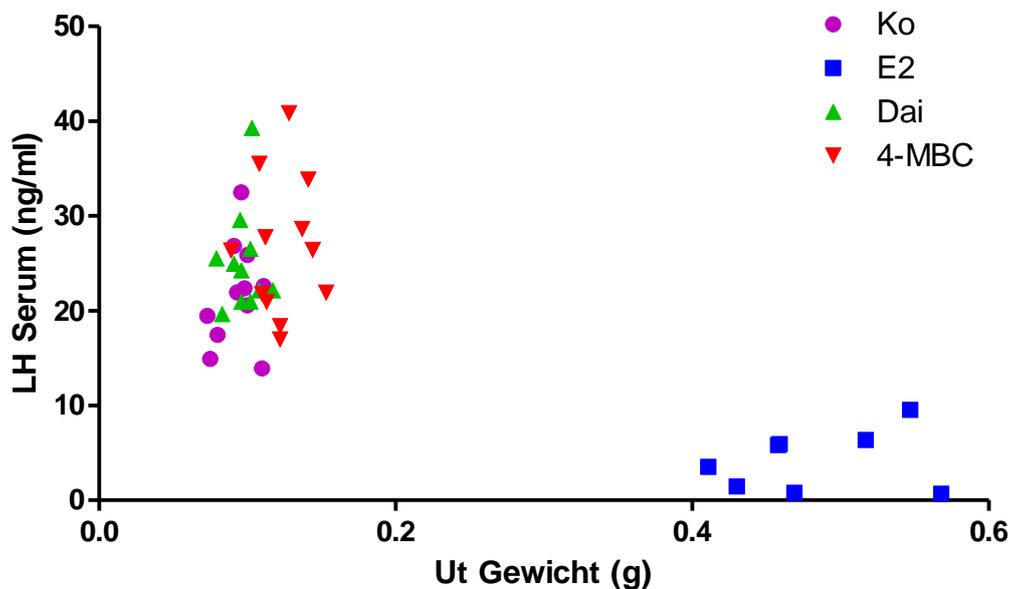


Abb. 24: Zusammenhang des Uterusgewichtes in g und der LH-Serumkonzentration in ng/ml. Die untersuchten 4 Gruppen im Vergleich.

Der Graph zeigt den linearen Zusammenhang zwischen dem Uterusgewicht und der LH-Serumkonzentration. Wie erwartet, zeigt die E2-Substitution ein erhöhtes Uterusgesamtgewicht bei supprimierten LH-Spiegeln. Die Wertepaare der Gruppen Dai und 4-MBC liegen dicht bei den Werten der Kontrollgruppe und zeigen bei geringerem Uterusgewicht erhöhte LH-Werte im Vergleich mit E2.

4 Diskussion

4.1 Zielsetzungen

Endokrine Disruptoren mit östrogenem Effekt werden für eine Vielzahl von Erkrankungen und Anomalien verantwortlich gemacht, darunter Veränderungen der Spermiogenese und Hodenkrebs beim Mann, sowie eine erhöhte Rate von Mammakarzinomen und Endometriumkarzinomen bei der Frau. Damit sind die endokrin wirksamen Stoffe von hoher ökotoxologischer Bedeutung, denn sie beeinflussen vorwiegend das Reproduktionsgeschehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden das pflanzliche Isoflavon Daidzein und der UV-Filter 4-Methylbenzyliden-Camphor in ihrer bekannten östrogenen Wirkung mit Östradiol verglichen und ihr Effekt auf den Uterus, die Hypophysen-Hypothalamus-Achse sowie auf die Schilddrüsenhormonachse im Tiermodell untersucht. Die Gabe der Substrate erfolgte im Langzeitversuch an ovariectomierten Ratten und ist daher mit einer kontinuierlichen, geringen Belastung des Menschen mit Umweltgiften vergleichbar. Zum Studium der postmenopausalen Effekte gilt die ovx Ratte heute als renommiertes Modell, da die Regulation verschiedener Organsysteme über Sexualhormone der des Menschen sehr ähnlich ist.

Die Substanz Daidzein gehört zur Gruppe der Phytoöstrogene, die als Nahrungsergänzungsmittel unter anderem zur Therapie klimakterischer Beschwerden kommerziell erhältlich sind und verbreitet Anwendung finden. 4-Methylbenzyliden-Camphor ist als Xenoöstrogen in Kosmetika mit UV-Absorbern beschrieben und wurde in dieser Arbeit ebenfalls im Hinblick auf seine Östrogenität und mögliche Wirkungen auf die Schilddrüse untersucht. Als Referenzorgan dienten der Uterus der ovariectomierten Ratte sowie die Hormone LH, TSH, T3 und T4 im Rattenserum.

Im Fokus der Untersuchungen stand die Frage nach einer potenziellen Gefährdung, die von Substanzen aus Nahrung und Kosmetik, am Beispiel von Daidzein und 4-Methylbenzyliden-Camphor, ausgehen. Zu diesem Zweck wurde untersucht, wie sich die Effekte der Substanzen im Vergleich mit einer Kontrollgruppe und einer Östradiol-substituierten Gruppe darstellten. Die Fragestellungen resultierten aus der Überlegung, dass Verbraucher mit dem Konsum vorgeblich gesundheitsfördernder Produkte

Inhaltsstoffe aufnehmen, die über ihren erwünschten Effekt hinaus potenziell gesundheitsgefährdend wirken.

4.2 Wirkungen auf das Körpergewicht

Es ist bekannt, dass Nagetiere nach der Ovariectomie stark an Gewicht zunehmen, sie eine gesteigerte Nahrungsaufnahme zeigen und ihre motorische Aktivität nachlässt (Shimomura et al. 2002). Dieses Phänomen war bei den Tieren dieses Versuchs gut nachzuvollziehen (s. Abb. 4 und 5).

Bei Betrachtung des Körpergewichts zeigte sich im Verlauf des dreimonatigen Versuchs eine signifikant geringere Gewichtszunahme unter E2 und 4-MBC im Vergleich zu den Kontrollen. Bereits 1985 wurde der Zusammenhang einer reduzierten Gewichtszunahme unter Östradiol beschrieben (Wade, GN et al. 1985). Die geringere Gewichtszunahme der 4-MBC substituierten Tiere spricht für eine Östrogen-ähnliche Wirkung im Bezug auf das Körpergewicht. Dieser Effekt kann im Hinblick auf assoziierte Erkrankungen wie Arteriosklerose und Metabolisches Syndrom als präventiv beurteilt werden.

Die Gruppe Dai zeigte ebenfalls geringere Körpergewichte als die Kontrollen. Obwohl die Unterschiede nicht signifikant waren, ließ sich auch bei Dai eine positive Tendenz beobachten. Diese Ergebnisse sind durch die, im Vergleich mit E2, schwächere ER-Bindung erklärbar. Möglicherweise ist die schwächere Potenz von Dai und 4-MBC auch in einem mildereren oder bisher ungeklärten Östrogen-ähnlichen Mechanismus begründet.

Darüber hinaus wurden reduzierte Aktivität und Bewegung bei ovariectomierten Nagern beobachtet, die für die Gewichtszunahme aller Tiere nach Ovariectomie und die anhaltenden erhöhten Körpergewichte der Kontrollgruppe verantwortlich sein könnten (Wade, GN et al. 1985; Kadi et al. 2002).

Die E2-behandelten Tiere nahmen, gemäß der anorektischen Wirkung Östradiols, eine vergleichbar geringere Menge an Futter auf (13 vs. 15g/Ratte pro Tag respektiv). Das niedrige Körpergewicht unter E2 ist damit nicht nur in einem vermehrten Stoffwechsel der Tiere, sondern auch durch eine geringere Aufnahme an Futter begründet.

Im Hinblick auf die Fragestellung nach einer potentiellen Gefährdung durch die untersuchten Substanzen ergaben sich bezüglich des Körpergewichts bislang keine Hinweise auf ein erhöhtes Risiko für übergewichtsassoziierte Erkrankungen wie Diabetes

oder Arteriosklerose. Sowohl die Substitution mit 4-MBC als auch mit Dai ließen eine präventive Tendenz bezüglich der Körpergewichtszunahme erkennen.

4.3 Wirkungen auf den Uterus

Östrogene wirken auf den Uterus im Allgemeinen proliferativ und wachstumsfördernd. Im sogenannten *uterotrophic assay* dient die Bestimmung der Uterusgewichtszunahme der Beurteilung der Östrogenität verschiedenster Umweltöstrogene (Odum et al. 1997). Orale Gabe von Östrogenen induziert einen uterotrophen Effekt, der sich in den ovariectomierten Nagern in einer Zunahme des Uterusgewichts widerspiegelt (Mohamed und Abdel-Rahman 2000). Der regulierende Effekt am Uterus wird über den klassischen ER α vermittelt, wie an ER-Knockout-Mäusen gezeigt werden konnte (Couse und Korach 1999). Da Daidzein mit leichter Präferenz und 4-MBC primär an den ER β bindet, stellte sich die Frage, inwieweit das Uterusgewicht dennoch über diese Substanzen beeinflusst wird.

Nach Tötung der Tiere wurden die Uteri entnommen und die Organfeuchtgewichte bestimmt. Wie erwartet, fanden sich signifikant schwerere Organe unter E2 Substitution (siehe Abb. 5). Auch die Gewichtsmessung der Rattenuteri unter 4-MBC-Applikation ergab signifikante Zunahmen. Lediglich Daidzein schien keinen signifikant stimulierenden Effekt auf das Uterusgesamtgewicht zu nehmen, wenngleich eine geringfügige Tendenz zu einer Organgewichtszunahme im Vergleich mit der Kontrollgruppe festzustellen war. Damit weist Dai keinen signifikanten uterusstimulierenden Effekt im Hinblick auf das Gesamtorgangewicht auf.

Dieses Ergebnis bestätigt die bisherigen Forschungsergebnisse. In der *in-vivo*-Studie von Schlumpf et al. (2001), in der UV-Filter in ihrer östrogenen Potenz miteinander verglichen wurden, fanden sich deutliche Steigerungen des Uterusgewichts bei der dosisabhängigen Gabe von 4-MBC. Die Ergebnisse entsprachen einer Verdopplung des Uterusgewichts im Bezug auf die Kontrollen. In der vorliegenden Arbeit betrug der Faktor 1,3 in Bezug auf die Kontrollen bei einer durchschnittlichen Gabe von 5 g 4-MBC pro kg Futter. Die beschriebene Zunahme des Uterusgewichts in diesem Experiment weist also auf einen agonistischen Effekt von 4-MBC am Uterus (ER α -Effekt). Der Mechanismus bleibt ungeklärt, ist für 4-MBC doch eine nahezu ausschließliche Bindung an ER β beschrieben.

Für Daidzein konnte in dieser Arbeit kein signifikanter Effekt auf das Uterusgewicht nachgewiesen werden. In der Literatur können jedoch dosisabhängig Wirkungen auf das Uterusgewebe durch Dai festgestellt werden. In einer Studie von Rachoń et al. (2007) wurden 80 ovx Ratten über drei Monate mit unterschiedlichen Dosen von Dai substituiert (250 mg pro kg, 600 mg pro kg, 1000 mg pro kg und 3000 mg pro kg). In allen Tieren fand sich nach Extirpation der Organe eine signifikante Zunahme des Uterusfeuchtgewichts im Vergleich mit den Kontrollen. Auch Uesugi et al. (2001), Picherit et al. (2001) sowie Ishimi et al. (2000) belegten in ihren Untersuchungen, dass verschiedene Dosen von Phytoöstrogenen unterschiedliche Effekte auf Knochen und Uterus haben. Damit hat Dai erwiesenermaßen uterotrophe Eigenschaften, die jedoch dosisabhängig unterschiedlich ausfallen. In dieser Arbeit hatte die Gabe von 1 g Dai pro kg Futter über 72 Tage keinen signifikant messbaren Einfluss auf das Uterusgesamtgewicht. In Studien jedoch, die die 3-6-fache Konzentration des Phytoöstrogens applizierten, wurde verstärktes Uteruswachstum verzeichnet (Diel et al. 2004a; Diel et al. 2004b; Erlandsson et al. 2005). Dieser antiöstrogene Effekt, bzw. die nicht vorhandene Wirkung am Uterus, wird bei der Suche nach geeigneten SERMs angestrebt, da eine Organgewichtszunahme und die damit verbundene Proliferation des Gewebes das bekannte Risiko für eine Tumorentstehung erhöht.

In der Auswertung der Uterushistometrie fanden sich gleichartige Veränderungen bei den E2 und 4-MBC behandelten Gruppen. Bezüglich dieser Parameter zeigten sich auch in den Präparaten der Dai-Gruppe deutliche Unterschiede im Vergleich zu den Kontrolltieren. Die drei untersuchten Substanzen wiesen eine signifikante Dickenzunahme der uterinen Kompartimente auf. Gemäß den Ergebnissen aus der Uterusgewichtsbestimmung lässt sich nun analysieren, welches Kompartiment am Uterus die höchste Stimulation erfahren hat und welche Substanz den größten stimulativen Effekt bezüglich der Schichtdicke aufweist.

E2 hat bekanntermaßen einen starken Effekt auf die Proliferation aller histologischen Schichten des Uterus, wohingegen die ovariectomierten Kontrolltiere eine Atrophie in allen Kompartimenten zeigen. In diesem Experiment fand sich wie erwartet die stärkste Proliferation des Gewebes unter E2 im Epithelium wieder (Faktor 3,46 gegenüber den Kontrollen), gefolgt vom Endometrium (Faktor 2,4) und dem Myometrium (1,95).

Der Östrogen-ähnliche Effekt von Dai und 4-MBC ließ sich für alle Kompartimente signifikant nachweisen.

Daidzein zeigte eine signifikante Dickenzunahme der drei uterinen Schichten bei nur minimal erhöhtem Uterusgesamtgewicht. Im Epithelium fand sich die stärkste Zunahme der Schichtbreite gegenüber den Kontrollen (Faktor 1,14), nahezu gleich dem Faktor der Stimulation im Endometrium (Faktor 1,12) und im Myometrium (Faktor 1,07). In der Literatur finden sich wenige Ergebnisse bezüglich stimulativer Effekte auf die unterschiedlichen unterinen Kompartimente. Einigkeit besteht darin, dass Dai als schwacher ER-Agonist die Wirkung von E2 nachahmt und am Uterus in hohen Dosen stimulierend wirken kann. Die in Nahrungsergänzungsmitteln üblichen Dosen von 40-100mg Isoflavon entsprechen einem Äquivalent von 4-10mg für die Ratte. In diesen Konzentrationen konnten keine Effekte auf das Uterusgewebe gezeigt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2003; Wade, MG et al. 2003). In einem Langzeitversuch von Unfer et al. (2004) über 5 Jahre an 197 postmenopausalen Frauen, die mit 150 mg Isoflavon behandelt wurden, zeigte sich in der Histologie der Endometriumbiopsie bei einer signifikant erhöhten Anzahl der behandelten Frauen eine Endometriumhyperplasie im Vergleich mit den Kontrollen (3,37% vs. 0%). In kürzeren Applikationszeiträumen konnte jedoch kein Effekt auf das Endometrium beschrieben werden (Penotti et al. 2003; Kaari et al. 2006). Die vorliegende Arbeit spricht nun dafür, dass auch nach Applikationsdauer von drei Monaten messbare Hyperplasien unter Dai-Gabe auftreten, die in gleicher Weise alle Kompartimente des Uterus betreffen, wenn auch schwach im Vergleich mit E2. Möglicherweise ist der Zeitraum zwischen Ovariectomie und Beginn der gruppenspezifischen Fütterung entscheidend, da die Tiere nach diesen 8 Wochen als vollständig klimakterisch anzusehen sind (s. Abb. 3). Weiter ist auch die Applikationsmenge und -dauer als Einflussfaktor zu betrachten. Die Menge von 1 g Dai/kg Futter in diesem Versuch ist eine für die Ratte unphysiologisch hohe Menge des Substrats und führt daher möglicherweise zu Ergebnissen, die mit der durchschnittlichen Aufnahme von Isoflavonen nicht zu vergleichen ist.

Obwohl keine Zunahme des Uterusgesamtgewichts festgestellt werden konnte, wiesen alle drei uterinen Kompartimente für sich genommen signifikante Verbreiterungen unter Dai auf. Erklärbar ist dieses Phänomen mit der schwachen östrogenen Wirkung an ER α .

Denkbar ist auch eine Veränderung im Aufbau der Schichten. Beispielsweise könnten Dichte, Wassereinlagerung und Vakuolisierung im Vergleich mit den anderen Substanzen variieren.

4-MBC stimulierte ebenfalls alle uterinen Kompartimente signifikant. Hier spiegelt sich die Histometrie auch im Uterusgewicht wieder. Es zeigte sich eine stärkere Stimulation als durch Dai, im Vergleich mit E2 ließ sich jedoch nur eine halb so starke Wirkung feststellen. Auch für 4-MBC konnten die endometriumstimulierenden Effekte in der Literatur bereits beschrieben werden und decken sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit. Seidlová-Wuttke et al. (2006) zeigten, dass sowohl das Uterusgewicht als auch das Epithelium signifikant durch zwei verschiedene Dosen (57,7mg und 250mg) von 4-MBC-Gabe über 12 Wochen stimuliert werden konnten. Außerdem fiel eine geringfügige Verminderung der Endometriumschichtdicke bei einer nahezu unveränderten Schichtdicke des Myometriums auf, die den Ergebnissen dieser Arbeit widersprechen. In den vorliegenden Untersuchungen konnte eine Zunahme sowohl der Epitheliumdicke um den Faktor 1,44, als auch der Endometriumdicke um den Faktor 1,32 und der Myometriumdicke um den Faktor 1,15 festgestellt werden, die gegenüber den Kontrollen signifikant waren. In dieser Arbeit wurde demnach eine Stimulation aller unterinen Kompartimente festgestellt. Das Epithelium war dabei am sensitivsten für die Stimulation durch 4-MBC. Obwohl 4-MBC in einer nahezu selektiven Affinität an den ER β bindet (Schlumpf et al. 2004) und obwohl die uterotrophen Effekte ausschließlich durch ER α vermittelt werden (Korach et al. 2003), bleibt zu überlegen ob der uterotrophe Effekt von 4-MBC via eines anderen, nicht ER β -vermittelten Mechanismus' geschieht oder ob der ER β einen modulierenden Einfluss auf den ER α und damit auf das Uterusgewebe hat. Denkbar wären bislang unbekannte aktive Metabolite von 4-MBC, die über eine andere Rezeptorbindungsaffinität verfügen (Schlumpf et al. 2004). Ausgehend von der Annahme, dass die östrogene Potenz von 4-MBC durch eine metabolische Aktivierung *in vivo* geschieht, untersuchten Mueller et al. (2003) in unterschiedlichen Analysen 4-MBC in seiner direkten Interaktion mit ER α und ER β . Die Tatsache, dass 4-MBC in *uterotrophic assays* bei Ratten deutliche Aktivität zeigte (Tinwell et al. 2002; Schlumpf et al. 2001) und *in vitro* nur schwache, direkte Interaktion zum ER nachzuweisen waren (Schreurs et al. 2002; Tinwell et al. 2002), legt die Vermutung nahe, dass eine Aktivierung *in vivo* für den östrogenen Effekt verantwortlich

ist. Mueller et al. (2003) konnten ebenfalls keine signifikante Bindungsaffinität zu den ER-Subtypen nachweisen. Des Weiteren fanden sie keine Hinweise auf eine Umwandlung von 4-MBC in stärker wirksame östrogene Metabolite, weder in Ratten, noch in humanen Hepatozyten. Möglicherweise ist der beschriebene Effekt *in vivo* bedingt durch eine noch unbekannte Metabolisierung oder durch einen ER-unabhängigen Pfad. Damit bleibt der östrogene Effekt von 4-MBC auf den Uterus Gegenstand weiterführender Forschung.

In der histomorphologischen Auswertung ließen sich die Anzeichen von Hyperplasie und Hypertrophie näher quantifizieren. Unter E2-Behandlung fand sich eine massive Hypertrophie und Hyperplasie aller Zellschichten mit teilweise mehrschichtig hohem Epithelium und vermehrter zytoplasmatischen Vakuolen. Polymorphe Kerne waren vereinzelt zu erkennen, Chromatinverteilungsstörungen waren dagegen nicht zu beobachten.

Die Gabe von Dai verursachte eine geringe Stimulation des Epitheliums. Jedoch fanden sich im Epithelium Zellkerne, die in Form und Größe deutlich variierten und anisochrom imponierten. Darüber hinaus fanden sich zytoplasmatische Vakuolen, die als Zeichen schneller Zellproliferation gewertet werden können.

Das Epithelium der 4-MBC-Gruppe war in seinem Aufbau unregelmäßig und heterogen. Vermehrt fielen polymorphe Kerne und zytoplasmatische Vakuolenbildung auf. Auch die Chromatinverteilung in den Zellkernen war massiv variabel.

Eine stimulierende Tendenz war neben der bekannten Wirkung von E2 auch in den Gruppen Dai und 4-MBC zu erkennen. Besonders 4-MBC wies, anders als E2, eine Vielzahl von polymorphen Kernen in einem variabel stimulierten Epithelium auf.

Unter Daidzein fand sich ein geringfügig stimuliertes Epithelium, das jedoch signifikant unterschiedlich gegenüber dem atrophem Epithel der Kontrollgruppe war. Im Gegensatz zu E2 fanden sich auch hier gehäuft Anisonukleosomen und Anisochromasien.

Mit der Tendenz zur Proliferation des Uterusgewebes erhöht sich das Risiko für eine maligne Entartung. Hier zeigt sich der unerwünschte uterotrophe Effekt im Hinblick auf einen möglichen Einsatz als SERM in der HRT.

Diese Beobachtungen machen deutlich, dass Dai und 4-MBC auch auf Zellebene das Uterusgewebe beeinflussen und stimulativ wirken. Die Ergebnisse der histologischen

Beurteilung lassen einen Effekt erkennen, der Tendenzen zu malignen Veränderungen aufzeigt. Besonders in den Präparaten der 4-MBC-Gruppe fielen grobe Unregelmäßigkeiten im Aufbau und in der Struktur des Epitheliums auf.

Da das Epithelium die höchste Dichte an ER aufweist, ist nicht verwunderlich, dass die untersuchten Substanzen auch vorwiegend in diesem Kompartiment Veränderungen zeigten. Wie beschrieben, ist im Uterusgewebe der ER α vorherrschend. Damit bleibt fraglich, ob der gesehene stimulative Effekt auch von ER β ausgehen kann. Experimentelle Ergebnisse, basierend auf der Analyse von ER β -mRNA durch Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR), zeigten keine Korrelationen zwischen der Expression von ER β und der Entwicklung eines Endometriumkarzinoms (Oshima et al. 1999). Takama et al. (2001) vermuteten jedoch einen Zusammenhang zwischen der ER β -Expression und der Tiefe der myometrialen Tumorinvasion und hielten das ER α /ER β -Verhältnis für möglicherweise entscheidend. Es gibt also Hinweise, dass auch der Signalweg über ER β entscheidenden Einfluss an der Entstehung oder an der Entwicklung einer endometrialen Karzinogenese haben könnte. Warum nun insbesondere der selektive ER β -Agonist 4-MBC massive Veränderungen des Uterusgewebes verursacht hat, bleibt zunächst offen. Denkbar ist ein bislang unterschätzter Effekt von diesem ER-Subtyp im Bezug auf die Stimulation der Zellen – möglicherweise im Rahmen eines modulierenden Einflusses des ER β auf die Wirkung des ER α .

Das *Proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) wird genutzt, um Zellen zu detektieren, die sich in der Replikationsphase befinden. Der PCNA-Proteinkomplex gilt damit als endogener Marker für Zellproliferation und findet in vielen Studien Anwendung. Des Weiteren ist PCNA in die DNA-Reparatur involviert und lässt sich sogar als Marker für apoptotische Zellen einsetzen (Lai et al. 2000). Der Uterus ist ein geeignetes Modell, um die Expression von PCNA zu studieren, da das Gewebe durch die ovarielle Regulation im Zellwachstum und Zelluntergang gesteuert wird. Da die Gabe von Östrogen die Proliferation des uterinen Epithels stimuliert und durch den Entzug die Zellen in Apoptose gehen, ergab sich für diese Arbeit die Hypothese, dass sowohl Dai als auch 4-MBC, wie E2, die Zellen zur Proliferation anregen und die epithelialen Zellen den Faktor exprimieren.

In dieser Arbeit wurden je 4 Präparate pro Gruppe angefärbt und ausgewertet. Dabei wurden alle Zellen des Epitheliums ausgezählt, die PCNA-positiven Zellen vermerkt und als Quotient graphisch aufgetragen (s. Abb. 17). Die Ergebnisse der untersuchten Gruppen

ermöglichten eine Aussage über die proliferative Tendenz der Substrate. Für E2 ergab sich nur eine geringfügig höhere prozentuale Expression von PCNA als für die Kontrollen. Dieses Ergebnis war nicht zu erwarten und lässt die Frage offen, warum das hypertrophierte Epithelium wenig Proliferationsmarker aufwies. Möglicherweise handelt es sich bei dem stimulierten Epithel nicht um ein mehrschichtiges, sondern um ein mehrreihiges Epithel, in dem sich nicht die Zellzahl vervielfacht hat, sondern lediglich die einzelnen Zellen an Größe zunahmen.

Dai wies die stärkste Expression auf, die den 4-fachen Wert der Kontrolltiere betrug. In den Präparaten der 4-MBC behandelten Tiere zeigte sich ebenfalls eine deutliche, wenn auch nicht signifikante Überexpression des PCNA gegenüber den Kontrollen.

Obgleich E2 und 4-MBC ein weitaus größeres Potenzial zur Stimulation des uterinen Wachstums in der Organgewichtsmessung und der Histometrie zeigten, dominiert in dieser Analyse der Zellproliferation das Phytoöstrogen Dai. Schon in der histomorphologischen Beurteilung zeigten sich starke Effizienzen zur Stimulation des Uterusgewebes, die durch die PCNA-Färbung bestätigt wurden.

Dennoch überrascht dieses Ergebnis, da die höchste Potenz zur Aktivierung des Uterusgewebes von E2 ausgehend vermutet wurde. Möglicherweise war die Anzahl der Präparate in dieser Studie nicht ausreichend, um eine signifikante Aussage über die proliferativen Eigenschaften treffen zu können.

4.3 Wirkung auf die Serumparameter

Die in dieser Arbeit untersuchten Hormone LH und TSH werden von der Hypophyse sezerniert und unterliegen dem Hypophysen-Hypothalamus-Regelkreis. Die Hormonwerte wurden mittels RIA im Serum der Tiere bestimmt. Mit den Ergebnissen lassen sich Aussagen über die Wirkung der Testsubstanzen an Hypophyse und Hypothalamus treffen. Die Werte der gemessenen Serumparameter werden im Folgenden einzeln diskutiert.

Bei intakter Ovarialfunktion wird der weibliche Zyklus über die feinabgestimmte Hypothalamus (GnRH)-Hypophysen (LH)-Gonaden (Östrogene)- Achse reguliert. Östradiol, als potentestes Östrogen, koppelt dabei auf die höheren Zentren negativ zurück. Beim

Nachlassen der Ovarialfunktion oder nach Ovariectomie fehlt diese Regulation und die LH-Spiegel im Blut steigen an.

Hohe LH-Spiegel werden mit dem klimakterischen Symptom der Hitzewallungen in Verbindung gebracht. Dieser Mechanismus ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Im Hypothalamus liegen die Neurone des GnRH-Pulsgenerators in räumlicher Nähe zu den Neuronen, die die Körpertemperatur und das Herz-Kreislaufsystem regulieren. Dadurch bedingt, scheint es bei ungehemmten pulsatilen LH-Ausschüttungen zu den klassischen vegetativ-vasomotorischen Symptomen der Schweißausbrüche und Hitzewallungen im Klimakterium zu kommen.

Im Serum der Tiere wurde der LH-Spiegel mittels RIA bestimmt. Während E2 den bekannten negativen Feedback-Effekt auf LH bestätigte (s. Abb. 20), hatten Dai und 4-MBC keinen suppressiven Effekt auf den LH-Spiegel. Im Gegenteil fand sich eine leichte Erhöhung der LH-Level über die Kontrollen, die jedoch nicht signifikant waren. Ähnliche Ergebnisse bezüglich des UV-Filters 4-MBC fanden sich in den Ergebnissen von Seidlová-Wuttke et al. (2007). Es zeigten sich signifikante stimulative Effekte auf den LH-Serumspiegel bei niedriger (50mg pro 20g Futter) und hoher Applikation (250mg pro 20g Futter) von 4-MBC. Diese Tendenz könnte theoretisch als anti-östrogener Effekt bewertet werden. Allerdings ist der ER α der vorherrschende Subtyp am Hypothalamus zur LH-Sekretion (Korach et al. 2003), so dass ein antagonistischer Effekt durch 4-MBC eher unwahrscheinlich ist. Andere neurotransmitterische Mechanismen könnten also auch hier für die beschriebene Tendenz verantwortlich sein.

Für Daidzein konnte bislang keine direkt supprimierende Wirkung auf den LH-Spiegel nachgewiesen werden. Rachoń et al. (2007) zeigten in ihrer Untersuchung, dass Dai zur Therapie der klimakterischen Hitzewallungen auf Grund fehlender LH-Suppression nicht geeignet sei. Vielmehr fanden sich in dieser Studie neben den unzureichenden Wirkungen auf den Hypothalamus uterotrophe Effekte, die sogar für exponierte Frauen mit intaktem Uterus ein Risiko für eine Endometriumhyperplasie darstellen könnten.

Entgegengesetzte Ergebnisse lieferte die Studie von Upmalis et al. (2000). Dort wurde der Einfluss von 50 mg Isoflavonen auf das Endometrium von postmenopausalen Frauen untersucht. Dabei fand sich kein Effekt auf das Uterusgewebe, wohl aber auf die subjektive *Hot-flash*-Symptomatik. Die verwendeten Sojaisoflavonextrakte konnten effektiv die Häufigkeit und Schwere der Hitzewallungen reduzieren.

Kronenberg und Fugh-Berman (2002) werteten alle publizierten Studien von Januar 1966 bis März 2002 aus, die mit Isoflavonen durchgeführt wurden. Lediglich 3 von 14 Studien belegten einen positiven Effekt von Daidzein auf klimakterische Beschwerden.

Dai hatte auch in der vorliegenden Studie keinen nachweislichen Effekt auf den LH-Spiegel. Ob dennoch subjektiv empfundene Besserungen der Hitzewallungen durch Isoflavone hervorgerufen werden, lässt sich auf Grund dieses Experiments nicht beurteilen und bedarf weiterer klinischer Studien.

Mit Zunahme des Alters steigt die Inzidenz von Schilddrüsenfunktionsstörungen, insbesondere der Hypothyreose. Subklinische Schilddrüsenunterfunktionsstörungen finden sich bei ca. 10% der postmenopausalen Frauen (Faughnan et al. 1995).

Um eine Interaktion der Substanzen mit den Schilddrüsenhormonen zu beschreiben, wurden die Hormone TSH, T3 und T4 im Rattenserum bestimmt.

Die Literatur zu einem Effekt von E2 auf die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse ist alt und widersprüchlich. In dieser Arbeit waren die Serum-TSH-, T3- und T4-Level durch die E2-Behandlung nicht signifikant beeinflusst. Ähnliche Ergebnisse wurden von Seidlová-Wuttke et al. (2006) gezeigt.

Unter Daidzein fand sich keine signifikante Beeinflussung von TSH, jedoch eine signifikante Erhöhung der Schilddrüsenhormone T3 und T4.

Für die Isoflavone aus der Sojapflanze sind diese Östrogen-unabhängigen Wirkungen auf die Schilddrüse bekannt. So werden die Einnahme von Sojaprodukten und die Entstehung einer Struma miteinander in Verbindung gebracht (Ain et al. 1987; Ripp 1961). Die Isoflavone Genistein und Daidzein inhibieren *in vitro* jeweils die Thyreoid-Peroxidase (TPO), welche im Organismus die Bildung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 katalysiert (Divi et al. 1997; Doerge und Sheehan 2002; Divi und Doerge 1996). Danach dürften erniedrigte T3 und T4- Serumwerte und erhöhte TSH-Level erwartet werden. Jedoch zeigten *in-vivo*-Studien keine Veränderungen der Hormonwerte im Serum und auch keine Veränderungen im Gewicht der Schilddrüse oder in ihrer Histopathologie (Doerge und Sheehan 2002; Ikeda et al. 2000). Diese Ergebnisse erscheinen paradox und bleiben zunächst ungeklärt. Zusätzliche Faktoren scheinen nötig, um den toxischen Effekt auf die

Schilddrüse zu erklären. Es zeigt sich beispielsweise ein weitaus größeres Potenzial für die antithyroide Wirkung der Isoflavone unter Ioddefizienz, während Iodsupplementation als präventiv anzusehen ist (Doerge und Sheehan 2002). Auch andere strumaverursachende Faktoren könnten zusätzlich für diesen Effekt verantwortlich sein.

Weiter ist bekannt, dass sowohl die Östrogensubstitution, als auch physiologische Östrogenzunahme in der Schwangerschaft die Serumkonzentration des Thyroxin-bindenden-Globulins (TBG) erhöht. TBG ist das Transportprotein der Schilddrüsenhormone mit der höchsten Affinität und bindet über 99% des T3 und T4. Damit ist die *Gesamt*-Konzentration von T3 und T4, nicht aber die Konzentration der biologisch wirksamen *freien* Hormone, von der Konzentration und Zusammensetzung der Bindungsproteine abhängig.

In der vorliegenden Arbeit fanden sich unter Dai signifikant erhöhte Werte von T3 und T4 bei nahezu unveränderten TSH-Spiegeln im Vergleich zu den Kontrollen. Obwohl eine antithyreoidale Wirkung von Sojaextrakten beschrieben wurde, ähneln die Ergebnisse dieser Arbeit eher einer hyperthyreoten Stoffwechsellage. Diskutieren könnte man die Annahme, dass die Schilddrüsenhormone in ihrem Gesamtgehalt und nicht in ihrer freien Form gemessen wurden und damit die Aussagefähigkeit über einen möglichen hyperthyreoten Effekt begrenzt ist. Es konnte in dieser Arbeit keine signifikante Veränderung des TSH-Wertes unter Dai festgestellt, wohl aber eine Tendenz zu erhöhten Werten beobachtet werden. Möglicherweise handelt es sich in dieser Konstellation daher um eine Hypothyreose im Initialstadium, in der die zentrale Regulation noch nicht auf die Veränderungen reagiert hat. T4 sinkt dabei nur langsam und T3 kann bis zur manifesten Hypothyreose lange im Normbereich bleiben. Es ist auch anzunehmen, dass eine Isoflavon-induzierte TBG-Induktion mit vermehrter Bindung der Schilddrüsenhormone für den beschriebenen Effekt mitverantwortlich ist. Der Organismus produziert daraufhin mehr Hormone, die die Gesamtkonzentration von T3 und T4 im Serum ansteigen lassen. Wie dieses Ergebnis abschließend zu bewerten ist, bleibt zunächst offen und bedarf weiterer Studien.

4-MBC hat eine bekannte hypothyreote Wirkung auf die Schilddrüsenhormonachse. In verschiedenen Studien konnte eine Erhöhung des TSH-Spiegels in Kombination mit einer leichten Erniedrigung der Schilddrüsenhormone nachgewiesen werden (Hamann et al. 2006; Schmutzler et al. 2004; Seidlová-Wuttke et al. 2006).

In der vorliegenden Arbeit konnten sowohl eine signifikante Erhöhung des TSH-Serumspiegels als auch der T3- und T4-Spiegel gegenüber den Kontrollen gezeigt werden. Bei einer vorangegangenen Studie von Schmutzler et al. (2004) ergaben sich erhöhte TSH Spiegel bei erhöhten T3- und erniedrigten T4-Spiegeln, sowohl unter hoher (12,5 g/kg), als auch unter niedriger (2,5 g/kg) 4-MBC-Gabe. Auch die Ergebnisse von Seidlová-Wuttke et al. (2006) zeigten ähnliche Ergebnisse. Auch hier fanden sich signifikant erhöhte TSH-Spiegel bei signifikant erniedrigten T4-Spiegeln. T3 wies eine erhöhte Tendenz in den Daten auf, die jedoch nicht signifikant gegenüber den Kontrollen war. In diesen genannten Studien wurden die Ergebnisse der Serumanalyse als typisch für die initiale Phase einer Hypothyreose beschrieben, in der die peripheren Organe die T3-Level noch aufrechterhalten können (Hamann et al. 2006).

Das beschriebene Phänomen kann möglicherweise auch die Konstellation der Hormone dieser Arbeit erklären. Jedoch bleibt offen, warum auch die T4- Werte neben den T3-Levels signifikant erhöht waren, die in den vorangegangenen Arbeiten bislang stets herabgesetzt waren. Möglicherweise lässt sich auch dieses Ergebnis durch die Hypothese erklären, dass die Tiere sich zum Zeitpunkt ihres Todes in der Initialphase der Hypothyreose befanden. Jedoch ist die Erhöhung der T3- und T4-Spiegel so massiv, dass diese Erklärung nicht ausreicht, um das Phänomen zu interpretieren. Interessant wäre die Bestimmung des freien T3 und des freien T4 gewesen, wodurch eine genauere Aussage über die tatsächliche biologische Aktivität getroffen werden könnte.

Vorstellbar ist darüber hinaus ein bislang unbekannter neurotransmittorischer Effekt von 4-MBC auf die Stimulation des TRH oder TSH. In Anwesenheit von 4-MBC würde, in bisher unbekannter Weise, die TSH-Ausschüttung stimuliert und damit auch die Synthese von T3 und T4 angetrieben. Diese Konstellation entspräche der einer sekundären Hyperthyreose und würde dem beschriebenen hypothyreotem Effekt entgegenstehen.

Ob sich die Stimulation auf hypothalamischer (TRH) oder hypophysärer Ebene (TSH) vollzieht, kann aus den vorliegenden Daten nicht hinreichend beantwortet werden. Der Einfluss von 4-MBC auf den TRH-Spiegel im Serum könnte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein. Auch könnte ein autonomer TSH-produzierender Hypophysentumor die Daten erklären. Ein Auftreten eines solchen Tumors bei allen Versuchstieren ist jedoch nicht anzunehmen.

Zuletzt schließt sich die Überlegung an, inwieweit die gewonnenen Ergebnisse übertragbar auf den menschlichen weiblichen Organismus sind und inwieweit die Substanzen in ihrer Dosis und Darreichungsform den natürlichen Kontakt mit den Substanzen repräsentieren. Die ca. 3 kg schwere Ratte nahm etwa 15 mg Dai/Tag auf. Umgerechnet auf eine 60 kg schwere Frau entspricht das einer Aufnahme von etwa 300 mg/Tag. Das würde bedeuten, dass eine Frau täglich ca. 5 Liter Sojamilch verzehrte oder etwa 3 kg Tofu am Tag zu sich nehmen müsste. Für Frauen, die zu frei verkäuflichen Nahrungsergänzungspräparaten greifen und pro Kapsel 40 mg Isoflavon aufnehmen, bedeutet die in dieser Arbeit verabreichte Dosierung eine etwa 9-10-fache Aufnahme der empfohlenen Menge. Somit scheint es, als ob die in dieser Studie beobachteten Effekte nicht im humanen weiblichen Organismus zu erwarten wären. Allerdings gilt es zu berücksichtigen, dass Nager und Menschen über einen unterschiedlichen Stoffwechsel verfügen und die Ratte Substrate schneller metabolisieren kann. Durch vorangegangene Studien der Abteilung hat sich die gewählte Dosis als wirksam und für den menschlichen Organismus kompatibel erwiesen.

Anlass für weitergehende Forschungen gibt, dass Isoflavone Effekte auf das Uterusgewebe in der Langzeitexposition zeigen, dabei aber nicht LH-suppressiv wirken und neben den proliferativen Eigenschaften auch die Schilddrüsenachse beeinflussen.

4-MBC wurde den Ratten mit 5 g/kg Futter zugeführt. Die Ratten nahmen 70 mg/Tag dieses Substrates auf. In verschiedenen Badeseen in der Schweiz wurden im Sommer die Konzentrationen von 4-MBC bis 80 ng/l gemessen. Für die im See lebenden Fische stellt die Belastung mit dem UV-Filter vermutlich eine Gesundheitsgefährdung dar, doch für den Menschen scheint das Risiko, das vom See ausgeht, eher gering zu sein. Berechnet man jedoch den Gehalt des UV-Filters im anwendungsfertigen Produkt, so beträgt die maximale Dosis als Inhaltsstoff der Kosmetika 40 g/kg (1000 ml). Unsere Ratten bekamen ein Achtel des in Sonnencreme zulässigen Stoffes. Die orale Darreichungsform von 4-MBC ist für den Menschen meines Erachtens weniger von Bedeutung als die transkutane Resorption. Der beobachtete hyperthyreote Effekt war massiv und lässt die Frage offen, inwieweit 4-MBC auch in geringeren Dosen und möglicherweise durch einen oralen Kontakt (Lippenstifte, Lippenbalsam) auf die Schilddrüse wirkt.

Um den Rattenorganismus mit dem des Menschen genauer zu vergleichen zu können, bedarf es weiterer Studien zur Aufnahme und Metabolisierung dieser Substanzen.

5 Zusammenfassung

1. Endokrine Disruptoren bezeichnen exogene Substanzen, die in die endogene hormonelle Steuerung des Organismus eingreifen und diese verändern können. Ziel der vorliegenden Studie war die Evaluation einer uterotrophen Wirkung bei der ovariectomierten Ratte bei oraler Gabe des Phytoöstrogens Daidzein und des UV-Absorbers 4-Methylbenzyliden-Camphor im Vergleich mit einer Östradiol-substituierten Gruppe und einer sojafrei behandelten Kontrollgruppe über die Dauer von 70 Tagen.

Ferner wurde der Effekt auf die Hypothalamus-Hypophysenachse mittels ausgewählter Hormonparameter (LH, TSH) evaluiert. Besonders aufmerksam wurde dabei die Wirkung auf die Schilddrüsenachse (TSH, T3, T4) untersucht.

2. Unter Verwendung histologischer Schnitte wurde das Uterusgewebe vermessen und mittels histomorphologischer Kriterien sowie der immunzytochemischen PCNA-Färbung die Potenz zur Proliferation untersucht. Die Serumparameter wurden mittels RIA bestimmt.

3. Beide Testsubstanzen zeigten mehr oder weniger starke Wirkungen am Uterusgewebe. Sowohl Dai als auch 4-MBC wiesen signifikante Verbreiterungen der uterinen Kompartimente auf. Hinzu kamen deutliche Zeichen der Epitheliumproliferation in der Histomorphologie und der PCNA-Färbung. Das Uterusgewicht war unter E2- und 4-MBC-Gabe signifikant erhöht, unter Dai war nur eine leichte Tendenz zu einer Organgewichtszunahme festzustellen.

4. Bekannte Folge der Ovariectomie war eine deutliche Gewichtszunahme aller Tiere. Im Verlauf konnten die applizierten Substanzen geringere Zunahmen der Körpergewichte aufweisen als die Kontrollen. Dieser Östrogen-ähnliche Effekt kann als präventiv beurteilt werden, birgt zumindest aber kein erhöhtes Risiko für die Entstehung übergewichtsassoziierter Erkrankungen.

5. Die bekannte, reduzierende Wirkung von E2 auf die hypothalamische/hypophysäre Achse ist in dieser Arbeit bestätigt worden. Einerseits wurden in der E2-Gruppe durch den bekannten Feedbackmechanismus am Hypothalamus supprimierte LH-Level beschrieben und andererseits in der Kontrollgruppe erhöhte LH-Spiegel nachgewiesen (überaktiver GnRH-Pulsgenerator).

Die neuroendokrine Dysregulation als Folge reduzierter E2-Spiegel wird mit dem klimakterischen Symptom der Hitzewallungen assoziiert (topographische Nähe zu den temperaturregulierenden Neuronen). Dai und 4-MBC hatten keinen supprimierenden Einfluss auf die LH-Level. Sie wiesen hingegen leicht erhöhte Werte auf, die als Überaktivität des GnRH-Pulsgenerators gewertet werden können. Demnach konnten Dai und 4-MBC in der untersuchten Dosis keine reduzierende Wirkung auf das Symptom der Hitzewallungen nehmen.

6. Die Untersuchung der Schilddrüsenparameter T3 und T4 zeigte eine deutliche Erhöhung der Serumkonzentrationen durch die Substanzen Dai und 4-MBC. Unter E2 fand sich dagegen bei T3 nur eine geringe, nicht signifikante Suppression, bei T4 eine leichte Erhöhung der Level. TSH wurde durch 4-MBC signifikant erhöht und ist am ehesten durch einen neurotransmittorischen Effekt am Hypothalamus zu interpretieren, dessen Folge ein erhöhter TSH sowie erhöhte T3- und T4-Spiegel sind. Unter Dai fand sich nur eine minimale Erhöhung der TSH-Spiegel, unter E2 eine minimale Verminderung der Level gegenüber den Kontrollen. Die untersuchten Parameter waren nicht ausreichend, um eine Aussage über die Funktion der Schilddrüse machen zu können. Möglicherweise handelt es sich um eine Hypothyreose im Initialstadium, die besonders im Hinblick auf die physiologische nachlassende Syntheseleistung der Schilddrüse im Alter potentielle Nebenwirkungen birgt.

7. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die untersuchten Substanzen uterotrophe Wirkungen zeigten, die sich sowohl in einer Verbreiterung der uterinen Kompartimente als auch anhand der gewählten Proliferationsmarker darstellen ließ. Demnach besitzt sowohl das Phytoöstrogen Daidzein als auch der synthetische UV-Filter 4-MBC im Uterusgewebe der ovariectomierten Ratte die Potenz, proliferative Veränderungen hervorzurufen. In der Betrachtung der Zellstruktur des Epitheliums fielen deutliche Unregelmäßigkeiten auf, die teilweise die Kriterien einer Hyperplasie oder eines malignen Geschehens erfüllten. Besonders das Epithelium der 4-MBC-behandelten Tiere erschien heterogen und wies vermehrte polymorphe Zellkerne auf.

Die untersuchten Substanzen Dai und 4-MBC zeigten weiter keinen supprimierenden Effekt auf die Ausschüttung des Gonadotropins LH, wodurch ein positiver Effekt im Sinne einer Reduktion klimakterischer Hitzewallungen unwahrscheinlich ist. Bei der Analyse der Schilddrüsenparameter ließen sich jedoch signifikante Effekte nachweisen.

Die Exposition des Menschen gegenüber den untersuchten Substanzen ist aktuell bekannt und weit verbreitet. Eine unmittelbare Gefährdung für den Rattenorganismus konnte in dieser Arbeit nicht gezeigt werden. Allerdings lässt sich eine Tendenz erkennen, dass sowohl Dai als auch 4-MBC das Uterusgewebe mäßig bis stark verändern können und damit möglicherweise das Krebsrisiko erhöhen. Außerdem wurde der Effekt auf die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenachse gezeigt, der wiederum ein Gesundheitsrisiko bergen kann.

6 Methodischer Anhang

Der Uterus: Funktion und Anatomie

Der Uterus gehört zu den primären weiblichen Geschlechtsorganen. Hier nistet sich die befruchtete Eizelle ein und wird über die Schleimhaut des Uterus genährt. Die Eizelle reift zum Fetus heran und wird am Ende der Schwangerschaft durch Kontraktionen der kräftigen Muskelschicht des Uterus ausgetrieben (Wehen).

Anatomisch befindet sich der Uterus bei der Frau im kleinen Becken, ventral liegt die Harnblase, nach dorsal grenzt das Rektum. Seitlich befinden sich die Ovarien, die über die Eileiter mit dem Uterus in Verbindung stehen.

Abhängig von der Füllung von Blase und Mastdarm, variiert die Lage des Uterus. Normalerweise befindet sich der Uterus in Anteversio-Anteflexio-Stellung, das bedeutet, dass er nach vorn geneigt in Bezug auf die Vagina (Anteversio) und einen ventral gerichteten Winkel zwischen Isthmus und Corpus uteri aufweist (Anteflexio).

Beim Menschen entwickelt sich der unpaare Uterus aus den paarig angelegten Müller'schen Gängen, die im Laufe der embryonalen Entwicklung miteinander verschmelzen. Das entstehende Septum wird dabei während der Reifung des embryonalen Organs resorbiert. Bei fehlender oder mangelhafter Resorption kann es dabei zu Missbildungen des Uterus kommen.

Der Uterus ist ein Hohlorgan aus glatter Muskulatur, an dessen oberem Ende, dem *fundus uteri*, die zwei Eileiter einmünden. Das *cavum uteri* bildet die Uterushöhle, die mit der Uterusschleimhaut, dem Endometrium ausgekleidet ist. Die Schleimhaut des Uterus unterliegt dem ovariellen Zyklus und ist daher stark beeinflusst durch das Steroidhormon Östradiol.

Das Endometrium gliedert sich bei der Frau in Epithel, Stratum functionale und Stratum basale. Das drüsenreiche Stratum functionale wird bei der Menstruation abgestoßen bzw. dient in der Schwangerschaft der Implantation und Ernährung der befruchteten Eizelle. Aus dem Stratum basale entsteht das Ausgangsgewebe für ein neues Stratum functionale. Dem Stratum basale liegt direkt das Myometrium an. Auch diese Schicht aus glatter Muskulatur reagiert empfindlich auf die zyklischen Hormonspiegel. Im Myometrium erhöhen sich bei Anwesenheit von Östrogen die Kontraktilität und das Ansprechen auf Oxytocin, dem wehenauslösenden Hormon.

Östrogensynthese

Grundgerüst aller Steroide bildet das Cholesterin, das aus einem polyzyklischen Alkohol mit 27-Kohlenstoffatomen (C₂₇) besteht. Die über mehrere Zwischenstufen entsteht das Pregnenolon mit 21C-Atomen, aus dem später das Progesteron und schließlich das Androstendion (C₁₉) entstehen. Aus Androstendion wird Testosteron. Der überwiegende Teil der Östrogenproduktion läuft nun über die Umwandlung von Testosteron (C₁₉) zu Östradiol (C₁₈) durch das Enzym Aromatase. Östradiol trägt nach der enzymatischen Umwandlung einen aromatischen A-Ring, sowie an Position 3 und 17 eine Hydroxylgruppe (OH-Gruppe). Das entstehende 17 β -Östradiol ist das am stärksten wirksamste Östrogen.

Protokoll der Organentwässerung

Substanz	Einwirkzeit
50%-Alkohol	1 Std
75%-Alkohol	1 Std 20 Min
75%-Alkohol	1 Std 20 Min
96%-Alkohol	1 Std 20 Min
96%-Alkohol	1 Std 20 Min
100%-Alkohol	1 Std 20 Min
100%-Alkohol	1 Std 20 Min
100%-Alkohol	1 Std 20 Min
Xylol	1 Std 20 Min
Xylol	1 Std 20 Min
Paraffin	1 Std
Paraffin	1 Std

Protokoll der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Substanz	Einwirkdauer
Xylene	5 Min
Xylene	5 Min
Xylene	5 Min
Ethanol 100%	2 Min
Ethanol 100%	2 Min
Ethanol 100%	2 Min
Ethanol 96%	2 Min
Ethanol 96%	2 Min
Ethanol 75%	2 Min
Aqua dest	2 Min
Hämatoxylin	1 Min
Leitungswasser	10 Min
Aqua dest	2 Min
Eosin	30 Sec
Aqua bidest	5-10 Sec
Ethanol 75%	30 Sec
Ethanol 96%	30 Sec
Ethanol 96%	30 Sec
Ethanol 100%	1 Min
Ethanol 100%	1 Min
Ethanol 100%	2 Min
Xylene	5 Min
Xylene	5 Min
Xylene	5 Min

Protokoll der Immunzytologischen Färbung PCNA

Protokoll basierend auf dem Basisprotokoll für Immunzytologische Färbungen. Im Department für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen modifiziert von Dr. Guillermon Rimoldi und überarbeitet von Panida Louchanwoot.

Entfärbeparaffinierung:

1. Xylol 5 Min
2. Xylol 5 Min
3. Xylol 5 Min

Rehydratation in absteigender Ethanolkonzentration:

4. 100%-Ethanol 3 Min
5. 100%-Ethanol 3 Min
6. 100%-Ethanol 3 Min
7. 96%-Ethanol 2 Min
8. 96%-Ethanol 2 Min
9. 75%-Ethanol 2 Min
10. Aqua bidest 5 Min

Epitop-Auffindung:

11. Schnitte in ein Plastikgefäß mit 0,01 M Zitratpuffer pH 6,0 in die Mikrowelle stellen
12. Kochen bei 750 Watt, 5 Min
13. mit Zitratpuffer auffüllen
14. Abkühlen lassen bei Raumtemperatur für 1 Min
15. Kochen bei 750 Watt, 5 Min
16. mit Zitratpuffer auffüllen
17. Abkühlen lassen für 20 Min

Dehydratation in aufsteigender Ethanolkonzentration:

18. 75%-Ethanol 2 Min
19. 96%-Ethanol 2 Min
20. 96%-Ethanol 2 Min
21. 100%-Ethanol 2 Min

Blocken der Peroxidaseaktivität:

22. 3% H₂O₂ in Methanol für 30 Min

Rehydratation in absteigender Ethanolkonzentration:

23. 100%-Ethanol 2 Min
24. 96%-Ethanol 2 Min
25. 96%-Ethanol 2 Min
26. 75%-Ethanol 2 Min
27. Aqua bisdest 3 Min
28. Schnitte in 1xPBS auf dem Schüttler waschen für 5 Min
29. Schnitte in 1xPBS auf dem Schüttler waschen für 5 Min

Blocken der nicht spezif. Immunglobuline mit Normalserum der Ziege:

30. Bedecken der Schnitt für 30 Min
31. Schnitte in 1xPBS auf dem Schüttler waschen für 5 Min
32. Schnitte in 1xPBS auf dem Schüttler waschen für 5 Min

Auftragen des Primärantikörpers (Proliferating cell nuclear antigen PCNA, PC10 mouse monoclonal IgG2a, 200µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc-56, Lot#1902) mit der Arbeitsverdünnung von 1:800. Verdünnt mit DakoCytomation Antibody Diluent with Background Reducing Components Ready-to-use Code S3022):

33. Bedecken der Schnitte mit Lösung für 30 Min
34. Schnitte in 1xPBS auf dem Schüttler waschen für 5 Min
35. Schnitte in 1xPBS auf dem Schüttler waschen für 5 Min

Auftragen des Sekundärantikörpers (DakoCytomation EnVision+DualLink System-HRP (DAP+) Code K 4065, für Primärantikörper *rabbit* und *mouse*. Antikörper ist ohne Verdünnung zu nutzen.):

36. Bedecken der Schnitte für 30 Min
37. Schnitte in 1xPBS auf dem Schüttler waschen für 5 Min
38. Schnitte in 1xPBS auf dem Schüttler waschen für 5 Min

DAB-Regenz:

39. Bedecken der Schnitt für 10-15 Min, je nachdem wann der Farbton in Braun umschlägt
40. Mit Aqua bidest aus Sprühflasche abspülen
41. Mit Aqua bisdest auf Schüttler waschen für 3 Min

Gegenfärbung:

42. Hamatoxylin. Eintauchen für 5-10 Sec
43. Wässern, unter kühlem, fließendem Wasser für 3 Min
44. Schnitte in Gefäß mit H₂O stehen lassen für 8 Min

Dehydratation in aufsteigender Ethanolkonzentration:

45. 75%-Ethanol 2 Min
46. 96%-Ethanol 2 Min
47. 96%-Ethanol 2 Min
48. 100%-Ethanol 2 Min
49. 100%-Ethanol 2 Min
50. 100%-Ethanol 2 Min

51. Xylol 5 Min
52. Xylol 5 Min
53. Xylol 5 Min

54. Eindecken der Schnitte mit DePex. Mounting medium und Deckgläsern der Fa. Menzel 24x40

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Struktur von Daidzein im Vergleich mit Östradiol.....	9
Abb. 2: Struktur von 4-Methylbenzyliden-Camphor	12
Abb. 3: Zeitachse des Versuchs.	16
Abb. 4: Gewichtsveränderung der Tiere über den Verlauf des Versuchs in den 4 Gruppen	22
Abb. 5: Gewichtsveränderungen der Versuchstiere.....	23
Abb. 6: Durchschnittliches Uterusgewicht in den einzelnen Gruppen.....	24
Abb. 7: Darstellung der histometrischen Messung am Uterus	25
Abb. 8: Histologie der Epithelien in den untersuchten Gruppen	26
Abb. 9: Durchschnittliche Epitheliumdicke in den einzelnen Gruppen.....	27
Abb. 10: Durchschnittliche Endometriumdicke in den einzelnen Gruppen.....	28
Abb. 11: Durchschnittliche Myometriumdicke in den einzelnen Gruppen.....	29
Abb. 12: Epithelium Gruppe 1	30
Abb. 13: Epithelium Gruppe 2	31
Abb. 14: Epithelium Gruppe 3	31
Abb. 15: Epithelium Gruppe 3	32
Abb. 16: Epithelium Gruppe 4	32
Abb. 17: Epithelium Gruppe 4	33
Abb. 18: Darstellung der prozentualen PCNA-positiven Zellkerne der einzelnen Gruppen.	37
Abb. 19: Darstellung der Histologie des Epitheliums in PCNA-Färbung.....	38
Abb. 20: Durchschnittliche LH-Serumwerte der einzelnen Gruppen.....	39
Abb. 21: Durchschnittliche TSH-Serumwerte der einzelnen Gruppen.....	40
Abb. 22: Durchschnittliche T4-Serumwerte der einzelnen Gruppen	41
Abb. 23: Durchschnittliche T3-Serumwerte der einzelnen Gruppen	42
Abb. 24: Zusammenhang des Uterusgewichtes in g und der LH-Serumkonzentration in ng/ml.....	43

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Gruppenzuordnung, Dosis der Futtermischung und mittlere Futteraufnahme .	18
Tabelle 2: Kriterien zur morphologischen Beurteilung zelltypischer Veränderungen in normalem Epithelium, hyperplasiertem Epithelium und Epithelium mit malignen Veränderungen	34
Tabelle 3: Auswertung der festgelegten morphologischen Kriterien in den vier untersuchten Gruppen	35

8 Literaturverzeichnis

Ain, K, Mori, Y und Refertoff, S (1987): Reduced Clearance Rate of Thyroxine-Binding Globulin (TBG) with Increased Sialylation: Mechanism for Estrogen-Induced Elevation of Serum TBG Concentration. *J Clin Endocrinol Metab*, 65(4), S.689 -696.

Andres, S, Abraham, K, Appel, KE, Lampen A (2011): Risks and benefits of dietary isoflavones for cancer. *Crit Rev Toxicol*, 41(6), S.463-506.

Barnes, S, Peterson, T, Coward, L (1995): Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *J Cell Biochem Suppl*, 22, S.181-187.

Blum, SC, Heaton,SN, Bowman, BM, Hegstred, M, Miller, SC (2003): Dietary soy protein maintains some indices of bone mineral density and bone formation in aged ovariectomized rats. *J Nutr*, 133(5), S.1244-1249.

Burke, GL, Legault, C, Anthony, M, Bland, DR, Morgan, TM, Naughton, MJ, Leggett, K, Washburn, SA, Vitolins, MZ (2003): Soy protein and isoflavone effects on vasomotor symptoms in peri- and postmenopausal women: the Soy Estrogen Alternative Study. *Menopause*, 10(2), S.147-153.

Buser, HR, Balmer, ME, Schmid, P, Kohler, M (2006): Occurrence of UV Filters 4-Methylbenzylidene Camphor and Octocrylene in Fish from Various Swiss Rivers with Inputs from Wastewater Treatment Plants. *Environ Sci Technol*, 40(5), S.1427-1431.

Carr, MC (2003): The Emergence of the Metabolic Syndrome with Menopause. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(6), S.2404-2411.

Constantinou, AI, Krygier, AE, Mehta, RR (1998): Genistein induces maturation of cultured human breast cancer cells and prevents tumor growth in nude mice. *Am J Clin Nutr*, 68(6 Suppl), S.1426S-1430S.

Cotroneo, MS, Wang, J, Fritz, WA, Eltoum, IE, Lamartiniere, CA (2002): Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model. *Carcinogenesis*, 23(9), S.1467-1474.

Couse, J, Korach, K (1999): Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev*, 20(3), S.358-417.

Darbre, PD (2005): Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J Inorg Biochem*, 99(9), S.1912-1919.

Diel, P, Schmidt, S, Vollmer, G, Janning, P, Upmaier, A, Michna, H, Bolt, HM, Degen GH (2004 a): Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch Toxicol*, 78(4), S.183-193.

- Diel, P, Geis, RB, Caldarelli, A, Schmidt, S, Leschowsky, UL, Voss, A, Vollmer, G (2004 b): The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Mol Cell Endocrinol*, 221(1-2), S.21-32.
- Divi, RL, Doerge, DR (1996): Inhibition of thyroid peroxidase by dietary flavonoids. *Chem Res Toxicol*, 9(1), S.16-23.
- Divi, RL, Chang, HC, Doerge, DR (1997): Anti-thyroid isoflavones from soybean: isolation, characterization, and mechanisms of action. *Biochem Pharmacol*, 54(10), S.1087-1096.
- Doerge, DR, Sheehan, DM (2002): Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environ Health Perspect*, 110(Suppl 3), S.349-353.
- Erlandsson, MC, Islander, U, Moverare, S, Ohlsson, C, Carlsten, H (2005): Estrogenic agonism and antagonism of the soy isoflavone genistein in uterus, bone and lymphopoiesis in mice. *APMIS*, 113(5), S.317-323.
- Faughnan, M, Lepage, R, Fugère, P, Bissonnette, F, Brossard, JH, D'Amour, P (1995): Screening for thyroid disease at the menopausal clinic. *Clin Invest Med*, 18(1), S. 11-18
- Fletcher, RJ (2003): Food sources of phyto-oestrogens and their precursors in Europe. *Br J Nutr*, 89 Suppl 1, S.39-43.
- Gill, MS (2006): Endocrine targets for pharmacological intervention in aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell*, 5(1), S.23-30.
- Golden, RJ, Noller KL, Titus-Ernstoff, L, Kaufman, RH, Mittendorf, R, Stillman, R, Reese, EA (1998): Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological evidence. *Crit Rev Toxicol*, 28(2), S.109-227.
- Greene, GL, Gilna, P, Waterfield, M, Baker A, Hort, Y, Shine, J (1986): Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science (New York)*, 231(4742), S.1150-1154.
- Hamann IH, Schmutzler, C, Kirschmeyer, P, Jarry, H, Köhrle, J: 4-methylbenzylidene-camphor (4MBC) causes pituitary effects comparable to hypothyroidism. Zitiert nach Inhaltsangabe des Vortrages in: European Congress of Endocrinology 2006, Glasgow, 01. April bis 05. April 2006
Programm und Inhaltsangaben; o. Hrsg., o. Verl., o. O. 2006, 11 (OC60)
- Hany, J und Nagel, R, (1995): Nachweis von UV Filtersubstanzen in Muttermilch. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau* 91, 341–345.
- Herbst, AL, Ulfelder, H, Poskanzer, DC, Longo, LD (1999): Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. 1971. *Am J Obstet Gynecol*, 181(6), S.1574-1575.

Holbech, H, Nørum, U, Korsgaard, B, Poul, B (2002): The chemical UV-filter 3-benzylidene camphor causes an oestrogenic effect in an in vivo fish assay. *Pharmacol Toxicol*, 91(4), S.204-208.

Holt, LH und Herbst, AL (1982): DES-related female genital changes. *Semin Oncol*, 9(3), S.341-348.

Hydovitz, JD (1960): Occurrence of goiter in an infant on a soy diet. *N Engl J Med*, 262, S.351-353.

Ikeda, T, Nishikawa, A, Imazawa, T, Kimura, S, Hirose, M (2000): Dramatic synergism between excess soybean intake and iodine deficiency on the development of rat thyroid hyperplasia. *Carcinogenesis*, 21(4), S.707-713.

Ishimi, Y, Arai, N, Wang, X, Wu, J, Umegaki, K, Miyaura, C, Takeda, A, Ikegami, S (2000): Difference in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem Biophys Res Commun*, 274(3), S.697-701.

Janjua, NR, Kongshoj, B, Petersen, JH, Wulf, HC (2007): Sunscreens and thyroid function in humans after short-term whole-body topical application: a single-blinded study. *Br J Dermatol*, 156(5), S.1080-1082.

Kaari, C, Haidar, MA, Júnior, JMS, Nunes, MG, Quadros, LGA, Kemp, C, Stavale, JN, Baracat, EC (2006): Randomized clinical trial comparing conjugated equine estrogens and isoflavones in postmenopausal women: a pilot study. *Maturitas*, 53(1), S.49-58.

Kadi, F, Karlsson, C, Larsson, B, Eriksson, J, Larval, M, Billig, H, Jonsdottir, IH (2002): The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. *J Muscle Res Cell Motil*, 23(4), S.335-339.

Kay, T, Kimura, M, Nishing, K, Itokawa, Y (1988): Soyabean, goitre, and prevention. *J Trop Pediatr*, 34(3), S.110-113.

Kelman, Z und Hurwitz, J (1998): Protein-PCNA interactions: a DNA-scanning mechanism? *Trends Biochem Sci*, 23(7), S.236-238.

de Kleijn, M J, van der Schouw, Y T, Wilson, P W, Adlercreutz, H, Mazur, W, Grobbee, D E, Jaques, P F (2001): Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: the Framingham study(1-4). *J Nutr*, 131(6), S.1826-1832.

Koda, T, Umezu, T, Kamata, R, Morohoshi, K, Ohta, T, Morita, M (2005): Uterotrophic effects of benzophenone derivatives and a p-hydroxybenzoate used in ultraviolet screens. *Environ Res*, 98(1), S.40-45.

Komrakova, M, Werner, C, Wicke, M, Nguyen, BT, Sehmisch, S, Tezval, M, Stuermer, KM, Stuermer, EK (2009): Effect of daidzein, 4-methylbenzylidene camphor or estrogen on

gastrocnemius muscle of osteoporotic rats undergoing tibia healing period. *J Endocrinol*, 201(2), S.253-262.

Konijn, AM, Edelstein, S, Guggenheim, K (1972): Separation of a thyroid-active fraction from unheated soya bean flour. *J Sci Food Agric*, 23(5), S.549-555.

Korach, KS, Emmen JMA, Walker, VR, Hewitt, SC, Yates, M, Hall, JM, Swope, DL, Harrell, CL, Couse, JF (2003): Update on animal models developed for analyses of estrogen receptor biological activity. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 86(3-5), S.387-391.

Kronenberg, F und Fugh-Berman, A (2002): Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms: a review of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med*, 137(10), S.805-813.

Kuiper, GG, Carlsson, B, Grandien, K, Enmark, E, Häggblad, J, Nilsson, S, Gustafsson, JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3), S.863-870.

Kunz, PY und Fent, K (2006): Estrogenic activity of UV filter mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol*, 217(1), S.86-99.

Kunz, PY, Gries, T, Fent, K (2006): The ultraviolet filter 3-benzylidene camphor adversely affects reproduction in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Toxicol Sci*, 93(2), S.311-321.

Lai, MD, Lee, LR, Cheng, KS, Wing, LY (2000): Expression of proliferating cell nuclear antigen in luminal epithelium during the growth and regression of rat uterus. *J Endocrinol*, 166(1), S.87-93.

Lindberg, MK, Movéare, S, Skrtic, S, Gao, H, Dahlmann-Wright, K, Gustafsson, JA, Ohlsson, C (2003): Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a „ying yang“ relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol*, 17(2), S.203-208.

Markiewicz, L, Garey, J, Adlercreutz, H, Gurbide, E (1993): In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 45(5), S.399-405.

Mei, J, Yeung, SSC, Kung, AWC (2001): High Dietary Phytoestrogen Intake Is Associated with Higher Bone Mineral Density in Postmenopausal but Not Premenopausal Women. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(11), S.5217 -5221.

Mohamed, MK und Abdel-Rahman, AA (2000): Effect of long-term ovariectomy and estrogen replacement on the expression of estrogen receptor gene in female rats. *Eur J Endocrinol*, 142(3), S.307-314.

Mueller, SO, Kling, M, Arifin Firanzi, P, Mecky, A, Duranti, E, Shields-Botella, J, Delansorne, R, Borschard, T, Kramer, RJ (2003): Activation of estrogen receptor alpha and ERbeta by 4-

methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicol Lett*, 142(1-2), S.89-101.

Muñoz-de-Toro, M, Beldoménica, HR, García, SR, Stoker, C, De Jesús, JJ, Beldoménico, PM, Ramos, JG, Luque, EH (2006): Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. *Environ Res*, 102(1), S.107-112.

Munro, IC, Harwood, M, Hlywka, JJ, Stephen, AM, Doull, J, Flamm, WG, Adlercreutz, H (2003): Soy isoflavones: a safety review. *Nutr Rev*, 61(1), S.1-33.

Odum, J, Lefevre, PA, Tittensor, S, Patron, D, Routledge, EJ, Beresford, NA, Sumpter, JP, Ashby, J (1997): The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul Toxicol Pharmacol*, 25(2), S.176-188.

Oshima, CT, Wonrath, DR, Catarino, RM, Mattos, D, Forones, NM (1999): Estrogen and progesterone receptors in gastric and colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 46(30), S.3155-3158.

Pelletier, G (2000): Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol*, 15(4), S.1261-1270.

Penotti, M, Fabio, E, Modena, AB, Rinaldi, M, Omodei, U, Viganó, P (2003): Effect of soy-derived isoflavones on hot flushes, endometrial thickness, and the pulsatility index of the uterine and cerebral arteries. *Fertil Steril*, 79(5), S.1112-1117.

Petru, E, Jonat, W, Fink, D, Köschli, O: *Praxisbuch gynäkologische Onkologie*, 3. Auflage; Springer Verlag, Berlin Heidelberg. 2011, S.40

Picherit, C, Chanteranne, B, Bennetau-Pelissero, C, Davicco, MJ, Lebeque, P, Barlet, JP, Coxam, V (2001): Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomized rat. *Br J Nutr*, 85(3), S.307-316.

Rachoń, D, Vortherms, T, Seidlova-Wuttke, D, Wuttke, W (2007): Dietary daidzein and puerarin do not affect pituitary LH expression but exert uterotrophic effects in ovariectomized rats. *Maturitas*, 57(2), S.161-170.

Ravnikar, V, Elkind-Hirsch, K, Schiff, I, Ryan, KJ, Tulchinsky, D (1984): Vasomotor flushes and the release of peripheral immunoreactive luteinizing hormone-releasing hormone in postmenopausal women. *Fertil Steril*, 41(6), S.881-887.

Reinli, K und Block, G (1996): Phytoestrogen content of foods--a compendium of literature values. *Nutr Cancer*, 26(2), S.123-148.

Ripp, JA (1961): Soybean-induced goiter. *Am J Dis Child*, 102, S.106-109.

- Rodriguez, A.L, Tamrazi, A, Collins, ML, Katzenellenbogen, JA (2004): Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of small molecule inhibitors of estrogen receptor alpha coactivator binding. *J Med Chem*, 47(3), S.600-611.
- Rossouw, JE, Anderson, GL, Prentice, RL, LaCroix, AZ, Kooperberg, C, Stefanick, ML, Jackson, RD, Beresford, SA, Howard, BV, Johnson, KC (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288(3), S.321-333.
- Schauer, UMD, Völkel, W, Heusener, A, Colnot, T, Broschard, TH, von Landenberg, F, Dekant, W (2006): Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats and humans after dermal application. *Toxicol Appl Pharmacol*, 216(2), S.339-346.
- Schlumpf, M, Cotton, B, Conscience, M, Haller, V, Steinmann, B, Lichtensteiger, W (2001): In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect*, 109(3), S.239-244.
- Schlumpf, M, Jarry, H, Ma, R, Lichtensteiger, W (2004): Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology*, 199(2-3), S.109-120.
- Schlumpf, M, Durrer, S, Faass, O, Ehnes, C, Fuetsch, M, Gaille, C, Henseler, M, Hofkamp, L, Maerkel, K, Reolon, S (2008): Developmental toxicity of UV filters and environmental exposure: a review. *Int J Androl*, 31(2), S.144-151.
- Schmutzler, C, Hamann, I, Hofmann, PJ, Kovacs, G, Stemmler, L, Mentrup, B, Schomburg, L, Ambrugger, P, Grüters, A, Seidlova-Wuttke, D (2004): Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology*, 205(1-2), S.95-102.
- Schreurs, R, Lanser, P, Seinen, W, van der Burg, B (2002): Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Arch Toxicol*, 76(5-6), S.257-261.
- Seidlová-Wuttke, D: *Vergleich der Wirkungen von Estradiol und fünf endokrinen Disruptoren in ovariectomierten Ratten*. Med.Diss. Göttingen 2004
- Seidlová-Wuttke, D, Jarry, H, Becker, T, Christoffel, V, Wuttke, W (2003): Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas*, 44 Suppl 1, S.S39-50.
- Seidlová-Wuttke, D, Jarry, H, Christoffel, J, Rimoldi, G, Wuttke, W (2006): Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC) - 2 filters of UV light - on several uterine, vaginal and bone parameters. *Toxicol Appl Pharmacol*, 210(3), S.246-254.
- Setchell, KD (2001): Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr*, 20(5 Suppl), S.354-362.

Shimomura, K, Shimizu, H, Tsuchiya, T, Abe, Y, Uehara, Y, Mori, M (2002): Is leptin a key factor which develops obesity by ovariectomy? *Endocr J*, 49(4), S.417-423.

Sonnenschein, C und Soto, AM (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 65(1-6), S.143-150.

Swan, SH, Elkin, EP, Fenster, L (2000): The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect*, 108(10), S.961-966.

Takama, F, Kanuma, T, Wang, D, Kagami, I, Mizunuma, H (2001): Oestrogen receptor β expression and depth of myometrial invasion in human endometrial cancer. *Br J Cancer*, 84(4), S.545-549.

Tinwell, H, Lefevre, PA, Moffat, GJ, Burns, A, Odum, J, Spurway, TD, Orphanides, G, Ashby, J (2002): Confirmation of uterotrophic activity of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in the immature rat. *Environ Health Perspect*, 110(5), S.533-536.

Uesugi, T, Toda, T, Tsuji, K, Ishida, H (2001): Comparative study on reduction of bone loss and lipid metabolism abnormality in ovariectomized rats by soy isoflavones, daidzin, genistin, and glycitin. *Biol Pharm Bull*, 24(4), S.368-372.

Unfer, V, Casini, ML, Costabile, L, Mognosa, M, Gerli, S, Di Renzo, GC (2004): Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril*, 82(1), S.145-148, quiz 265.

Upmalis, DH, Lobo, R, Bradley, L, Warren, M, Cone, FL, Lamia, CA (2000): Vasomotor symptom relief by soy isoflavone extract tablets in postmenopausal women: a multicenter, double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Menopause*, 7(4), S.236-242.

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

Wade, MG, Lee, A, Cooke, G, Curran, I (2003): The influence of dietary isoflavone on the uterotrophic response in juvenile rats. *Food Chem Toxicol*, 41(11), S.1517-1525.

Wolff, MS, Toniolo, PG, Lee, EW, Rivera, M, Dubin, N (1993): Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst*, 85(8), S.648-652.

Wuttke, W, Jarry, H, Seidlová-Wuttke, D (2007): Isoflavones--safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev*, 6(2), S.150-188.

Van Wyk, JJ, Arnold, MB, Wynn, J, Pepper, F (1959): The effects of a soybean product on thyroid function in humans. *Pediatrics*, 24, S.752-760.

Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Frau PD Dr. D. Seidlová-Wuttke bedanken für die Bereitstellung des Themas und die stets freundliche Unterstützung meiner Arbeit. Ebenso gebührt Prof. W. Wuttke ein großer Dank für die Möglichkeit, die Arbeit unter seiner fachlichen und wissenschaftlichen Supervision zu schreiben.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen, hier besonders Frau Heidi Brüggemann-Meyer, danke ich für die gute Einarbeitung, die Hilfe und die freundliche Zusammenarbeit.

Ich möchte mich im Besonderen bei meinem Freund Alex dafür bedanken, dass er mich stets in allen Lebenslagen unterstützt und aufzubauen vermag. Auch meinen Eltern gilt ein besonderer Dank für ihren uneingeschränkten Rückhalt und ihr Vertrauen.