

**Der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen
eingereicht von Prof. Dr. med. W. Wuttke**

*Die Effekte von endokrinen Disruptoren auf den Herzmuskel
orchidektomierter Ratten*

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

vorgelegt von
Friederike Erdwine Klinker
aus Würzburg

Göttingen 2013

Erstellung der Dissertation in Göttingen/Köln, 2008 - 2013, Betreuung durch Prof. Dr. med. Wuttke

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke (Betreuer)

II. Berichterstatter: PD Dr. J. Männer (Korreferent)

III. Berichterstatter: PD Dr. P. Thelen (Drittreferent)

IV. Berichterstatter: Prof. Dr. M. Oppermann (Promoter)

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Andropause.....	2
1.2	Hypertrophie und Hyperplasie des Herzmuskels	4
1.3	Substanzen.....	6
1.3.1	Steroidhormone	6
1.3.1.1	Wirkungsweise.....	6
1.3.2.	Androgene und Östrogene.....	7
1.3.2.1	Testosteron (T).....	7
1.3.2.1.1	Androgenrezeptor (AR) und Wirkung.....	8
1.3.2.2	Östrogene	8
1.3.2.2.1	Östrogenrezeptoren (ER) und Wirkung.....	9
1.3.2.2.2	Die Rolle der Östrogene bei männlichen Individuen	9
1.3.3.	Phytoöstrogene	10
1.3.3.1	Genistein (Gen).....	10
1.3.3.2	Resveratrol (Res)	11
1.3.3.3	8-Prenylnaringenin (8-PN).....	12
1.3.4	UV-Filter-Substanzen.....	12
1.3.4.1	Benzophenon-2 (BP2).....	13
1.3.4.2	4-Methylbenzyliden-Camphor (4-MBC) und Octylmethoxycinnamat (OMC)	13
1.3.5	Pestizide.....	14
1.3.5.1	Linuron (Lin)	14
1.3.5.2	Procymidon (Pro).....	15
1.4	Die orchidektomierte Ratte als Modell für den Mann in der Andropause	15
1.5	Ziel der vorliegenden Arbeit	16
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Zeitlicher Versuchsablauf	17
2.2	Versuchstiere	18
2.3	Orchidektomie (orx) der Ratten	19
2.4	Tierfutter.....	20
2.5	Organhistologie	21
2.6	Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.....	22
2.7	Immunzytologische Färbung mittels Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) .	22
2.8	Mikroskopie der Hämatoxylin-Eosin (HE)-angefärbten Präparate.....	23
2.9	Mikroskopie der Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-angefärbten Präparate	24

2.10	Statistische Methoden	26
3	Ergebnisse.....	27
3.1	Futtermittelverbrauch	27
3.2	Gewichtsentwicklung	28
3.3	Herzgewichte nach drei Monaten.....	31
3.4	Übersicht über die Effekte der zu untersuchenden Testsubstanzen auf die Muskelfaserfläche und den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzmuskels..	32
3.4.1	Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche.....	32
3.4.2	Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens	33
3.5	Die Effekte der Orchidektomie (orx) sowie von Testosteron (T) und Resveratrol (Res).....	35
3.5.1	Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche.....	35
3.5.2	Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens	36
3.6	Die Effekte der Orchidektomie (orx) sowie von Östradiol (E2) und Genistein (Gen)	37
3.6.1	Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche.....	37
3.6.2	Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens	38
3.7	Die Effekte der Phytoöstrogene Genistein (Gen), Resveratrol (Res) und 8-Prenylnaringenin (8-PN).....	39
3.7.1	Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche.....	39
3.7.2	Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens	40
3.8	Die Effekte der UV-Filter-Substanzen Benzophenon-2 (BP2), 4-Methylbenzyliden-Camphor (4-MBC) und Octylmethoxycinnamat (OMC)	41
3.8.1	Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche.....	41
3.8.2	Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens	42
3.9	Die Effekte der Pestizide Linuron (Lin) und Procymidon (Pro).....	43
3.9.1	Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche.....	43
3.9.2	Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens	44
4	Diskussion.....	45
4.1	Futtermittelverbrauch	46
4.2	Gewichtsentwicklung	47
4.3	Herzgewichte nach drei Monaten.....	48
4.4	Die Effekte der verschiedenen Testsubstanzen auf die Muskelfaserfläche des Herzens	48
4.5	Die Effekte der verschiedenen Testsubstanzen auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens.....	49
4.6	Die Effekte der Orchidektomie (orx) sowie von Testosteron (T) und Resveratrol (Res) auf das Herz	49
4.7	Die Effekte der Orchidektomie (orx) sowie von Östradiol (E2) und Genistein (Gen)	

	auf das Herz	52
4.8	Die Effekte der Phytoöstrogene Genistein (Gen), Resveratrol (Res) und 8-Prenylnaringenin (8-PN) auf das Herz	54
4.9	Die Effekte der UV-Filter-Substanzen Benzophenon-2 (BP2), 4-Methylbenzyliden-Camphor (4-MBC) und Octylmethoxycinnamat (OMC) auf das Herz.....	55
4.10	Die Effekte der Pestizide Linuron (Lin) und Procymidon (Pro) auf das Herz.....	57
5	Zusammenfassung	59
6	Anhang.....	62
7	Literaturverzeichnis	68

Abkürzungsverzeichnis

AR	Androgenrezeptor
BP2	Benzophenon-2
CT	Computertomographie
DAB	Diaminobenzidine
DHT	Dihydrotestosteron
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E ₂	Östradiol
ED	Endokrine Disruptoren
EDTA	Endocrine Disruptor Testing and Assessment Task Force
EPA	U.S. Environmental Protection Agency
ER	Östrogenrezeptor
ERE	Östrogen-Response-Element
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
Gen	Genistein
HE	Hämatoxylin-Eosin
HDL-Cholesterin	High-Density-Lipoprotein-Cholesterin
HRE	Hormon-Response-Element
HRP	Horseradish peroxidase
Ko	Kontrollgruppe
LDL-Cholesterin	Low-Density-Lipoprotein-Cholesterin
LH	Luteinisierendes Hormon
Lin	Linuron
4-MBC	4-Methylbenzyliden-Camphor
OMC	Octylmethoxycinnamat
orx	Orchidektomie/orchidektomiert
PBS	Phosphate Buffer Solution
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
8-PN	8-Prenylnaringenin
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
Pro	Procymidon
Q	Quadrant
Res	Resveratrol
RXR	Retinoid-X-Rezeptor

SD	Sprague-Dawley
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SHBG	Sexualhormonbindendes Globulin
T	Testosteron
Tf	testsubstanzfrei
TSHR	Thyroidhormon-Rezeptor
UV	ultraviolett

1 Einleitung

Im Zuge der Industrialisierung kam es in den letzten Jahrzehnten zu einem zunehmenden Einsatz von Pestiziden zum Schutz von Ernteerträgen (Swedenborg et al. 2009). Die Pestizide gelangen über die Pflanzen und das Grundwasser in die Nahrungskette von Mensch und Tier, wodurch sie sich nachteilig auf die Gesundheit auswirken können. Die amerikanische Umweltorganisation U.S. Environmental Protection Agency (EPA) schreibt auf ihrer Internetseite, dass bereits in den 1990er Jahren einige Wissenschaftler vermuteten, dass gewisse chemische Substanzen das Hormon-system von Lebewesen beeinflussen und so gesundheitliche Schäden hervorrufen könnten (<http://www.epa.gov/endo/>). Hormone sind Botenstoffe, die von endokrinen Drüsen gebildet werden und über den Blutweg an ihr Zielorgan gelangen. Sie dienen in den verschiedenen Organsystemen als Signalübermittler, koordinieren die verschiedenen Körperfunktionen und erlauben dem Organismus so, auf äußere Reize zu reagieren.

Wissenschaftler zeigten sich zunehmend besorgt über die möglichen gesundheitlichen Folgen und auch in der Öffentlichkeit und den Medien gewannen Endokrine Disruptoren (ED) erhöhtes Interesse. Bei ED handelt es sich um Substanzen, die in zahlreichen Dingen des alltäglichen Lebens vorkommen und in der Lage sind, in das Hormonsystem einzugreifen (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). Seit Mitte der 1990er Jahre treffen sich internationale Gesundheits- und Umweltorganisationen, um sich über den neuesten Forschungsstand und neue Erkenntnisse auszutauschen. Zahlreiche Studien führten bereits zu dem Ergebnis, dass ED eine erhebliche Gefahr für die Gesundheit der Gesamtbevölkerung darstellen (Diamanti-Kandarakis et al. 2009). Bei einem internationalen Treffen der Europäischen Kommission 1996 in Weybridge/UK wurden die ED sinngemäß als exogene Substanzen oder ein Gemisch aus Substanzen definiert, das die Funktion der Hormone verändert und folglich un-günstige Auswirkungen auf die Gesundheit eines intakten Organismus und dessen Nachkommen hat (Damstra et al. 2002). Dabei können ED natürlicherweise vorkommen oder künstlich hergestellt sein (Patisaul und Adewale 2009). 1998 wurde von der Europäischen Kommission eine „Endocrine Disruptor Testing and Assessment Task Force“ (EDTA) eingerichtet mit dem Ziel, einheitliche Testmethoden für ED zu

entwickeln. Zwischen 2000 und 2006 wurden insgesamt knapp 600 Substanzen auf ihre Wirkung hin untersucht, wovon sich etwa die Hälfte der Substanzen als ED bestätigten (Commission Staff Working Document 2007). Sie kommen in vielfältigen Bereichen des alltäglichen Lebens vor und können unterteilt werden in zwei Gruppen. Es gibt zum einen die künstlich hergestellten Chemikalien, wie beispielsweise Lösungs- und Gleitmittel, die häufig in der Industrie verwendet werden. Außerdem kommen sie in Kosmetika, Plastikverpackungen und Weichmachern vor sowie in Pestiziden und Fungiziden. Zum anderen gibt es die ED, die natürlicherweise in Nahrungsmitteln und pflanzlichen Stoffen wie zum Beispiel in Sojabohnen, aber auch in Rotwein und Bier vorkommen (Diamanti-Kandarakis et al. 2009, Loizzo et al. 2011, Izzo et al. 2010, Zhang et al. 2011).

ED sind in der Lage, auf verschiedene Art und Weise das Hormonsystem zu beeinflussen. So gibt es ED, die die Hormonwirkung imitieren und beispielsweise östrogenähnliche Wirkung haben oder aber den Hormonrezeptor blockieren, ohne eine Antwort in der Zielzelle hervorzurufen, wie es bei den ED mit antiandrogener Wirkung der Fall ist. Daneben existieren noch etliche weitere Wirkmechanismen, zum Beispiel über andere nukleäre Rezeptoren wie den Thyroidhormon-Rezeptor (TSHR) oder den Retinoid-X-Rezeptor (RXR) und Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren (PPAR) (Swedenborg et al. 2009).

1.1 Andropause

Der Begriff „Andropause“ entstand als Anlehnung an den Begriff der Menopause bei der Frau. Neben dem Begriff „Andropause“ existieren weitere Bezeichnungen, wie beispielsweise „Männliche Menopause“, „Partielle Androgen-Defizienz des alternden Mannes“ oder „Late-onset-Hypogonadismus“, die alle die Beschwerden des Mannes beschreiben sollen, die im Alter häufig auftreten (Pines 2011). In den letzten Jahren beschäftigten sich zahlreiche Wissenschaftler mit der Frage, ob die Andropause als Äquivalent zur Menopause anzusehen ist. Fest steht, dass es bei Männern wie auch bei Frauen mit zunehmendem Alter zu einer Abnahme der Gonadenfunktion und damit zu einem Absinken des Androgen- bzw. Östrogenspiegels kommt. Allerdings geschieht dies bei der Frau relativ abrupt mit einem völligen Verlust der ovariellen Funktion und damit der Fertilität. Beim Mann dagegen nimmt die Funktion der Keimdrüsen

allmählich über einen längeren Zeitraum ab und unterliegt interindividuellen Schwankungen, die Fertilität bleibt häufig bis ins hohe Alter erhalten (Vermeulen 2000). Dennoch treten beim Mann im Alter gewisse Symptome auf, die auch junge Männer mit Gonadenunterfunktion zeigen, wie beispielsweise Libidoverlust, Abnahme der Muskelmasse und der Muskelkraft, Antriebsarmut, Zunahme des Bauchfetts und Insulinresistenz, Veränderungen des Lipidstoffwechsels und Atherosklerose sowie Abnahme der Knochendichte und Impotenz. Dies lässt einen Zusammenhang der Symptome mit der Abnahme des Testosteron (T)-Spiegels im Alter vermuten (Vermeulen 2000).

Vermeulen beschäftigte sich in zahlreichen Studien mit der Andropause und kam zu dem Schluss, dass die Symptome, unter denen der Mann im Alter leidet, wenig spezifisch für die Abnahme der T-Produktion, sondern multifaktoriell bedingt seien (Vermeulen 2000). Einen direkten und signifikanten Zusammenhang fanden Vermeulen et al. zwischen der Muskelmasse und der Konzentration an freiem T: Hier erzeugte T eine Hypertrophie der Muskelzellen einhergehend mit einer Zunahme des Muskelzelldurchmessers (Vermeulen et al. 1999). Vermeulen et al. fanden bereits 1996 heraus, dass weniger das Gesamt-Plasma-T im Alter abnimmt (35 % zwischen dem 25. und dem 75. Lebensjahr), als vielmehr das freie T, nämlich von 430 ± 100 auf 220 ± 80 pmol/l, was eine Abnahme von 50-60 % darstellt. Grund dafür ist ein Anstieg des Sexualhormon-bindenden Globulins (SHBG), welches das freie T bindet (Vermeulen et al. 1996). Zu direkten Auswirkungen der Andropause auf den Herzmuskel findet man nur sehr wenig in der Literatur. Ein T-Defizit wird häufig bei einer chronischen Herzinsuffizienz beobachtet (Malkin et al. 2010, Volterrani et al. 2012, Kang et al. 2012, Güder et al. 2011). Allerdings ist bislang ungeklärt, ob der niedrigere T-Spiegel Ursache oder Folge der Herzinsuffizienz ist (Malkin et al. 2010, Güder et al. 2011). Hewitson et al. fanden heraus, dass die Kastration vor altersbedingter Fibrosierung des Herzmuskels schützt, während von außen zugeführtes T diese begünstigt (Hewitson et al. 2012). Gegenwärtig wird die Hormonersatztherapie der Männer kontrovers diskutiert. So vermuten Kang et al. einen günstigen Effekt einer Androgentherapie bei der Behandlung einer Herzinsuffizienz (Kang et al. 2012), Urhausen et al. dagegen beschreiben einen schädlichen Effekt einer Androgensubstitution bei Kampfsportlern durch Hypertrophie des Herzmuskels (Urhausen et al. 2004).

1.2 Hypertrophie und Hyperplasie des Herzmuskels

Die kardiale Hypertrophie ist einer der Hauptrisikofaktoren für die Entstehung eines Herzversagens und gilt selbst als prognostisch ungünstig (Regitz-Zagrosek et al. 2010). Da es auch bei der Entstehung und Ausprägung der Herzhypertrophie Unterschiede zwischen den Geschlechtern gibt, liegt der Einfluss von Sexualhormonen nahe (Carroll et al. 1992, Krumholz et al. 1993, Regitz-Zagrosek et al. 2010). Diese Vermutung konnte in Tiermodellen bestätigt werden. So wiesen beispielsweise Pelzer et al. spezifische, d.h. östrogenrezeptorvermittelte Östrogenwirkungen im Rattenmodell nach (Pelzer et al. 2002). Van Eickels et al. zeigten im Mausmodell eine Abschwächung der Myokardhypertrophie nach Druckbelastung durch die Gabe von Östradiol (E_2) (van Eickels et al. 2001). Neben den Östrogenrezeptoren (ER) $ER\alpha$ und $ER\beta$ konnte auch der Androgenrezeptor (AR) in Kardiomyozyten und kardialen Fibroblasten nachgewiesen werden. Somit ist auch die direkte Wirkung des Androgens T auf den Herzmuskel möglich. Sowohl die beiden ER als auch der AR kommen bei beiden Geschlechtern vor (Grohé et al. 1997, Meyer et al. 1998, Marsh et al. 1998). Es wird vermutet, dass die ER Einfluss auf die kardiale Hypertrophie und die Herzinsuffizienz haben. Beide ER werden in diesen Fällen hochreguliert (Mahmoodzadeh et al. 2006, Nordmeyer et al. 2004). Es ist bekannt, dass die beiden ER-Subtypen $ER\alpha$ und $ER\beta$ in verschiedenen Organen und Geweben unterschiedliche Funktionen und Wirkungen besitzen (Zhu et al. 2002, Krege et al. 1998, Dupont et al. 2000, Hall et al. 2001). Der unselektive ER-Agonist 17β -Östradiol bewirkte im Tiermodell am Herzen eine Abschwächung der Hypertrophie (van Eickels et al. 2001, Babiker et al. 2004). Einige Arbeitsgruppen haben sich in den letzten Jahren mit der Frage beschäftigt, durch welchen der beiden Rezeptoren es zu diesem Effekt kommt oder ob es einer Aktivierung beider Rezeptoren bedarf. Pelzer et al. fanden heraus, dass die Gabe des selektiven $ER\alpha$ -Agonisten 16α -LE2 zu einer absoluten Verminderung des Herzgewichts sowie zu einer relativen Verminderung des Herzgewichts im Verhältnis zum Körpergewicht führt. Damit wäre die alleinige Aktivierung des $ER\alpha$ ausreichend, um eine Abschwächung der Herzhypertrophie zu erzielen. Da 16α -LE2 keine Auswirkung auf den Blutdruck aufweist, ist anzunehmen, dass die Wirkung auf die Herzhypertrophie direkt über die Myokardzellen erfolgt (Pelzer et al. 2005). Der selektive $ER\beta$ -Agonist 8β -VE2 dagegen wirkt einer Herzhypertrophie zwar ebenfalls entgegen, indem er allerdings - hauptsächlich - den

Blutdruck und damit die Nachlast des Herzens senkt (Jazbutyte et al. 2008).

Anders als die pathologische Herzhypertrophie, die in Folge mechanischer Belastung durch z.B. erhöhten Blutdruck oder durch neuronale oder humorale Faktoren entsteht (Ritter und Neyses 2003), wird die physiologische Hypertrophie durch körperliches Training oder im Rahmen einer Schwangerschaft hervorgerufen (Regitz-Zagrosek et al. 2010). Sie unterscheidet sich von der pathologischen Hypertrophie durch die vorwiegend konzentrische Hypertrophie des Herzmuskels, die fehlende Fibrose und die Reversibilität. Auch bei der physiologischen Hypertrophie treten Unterschiede zwischen den Geschlechtern auf, was den Einfluss von Sexualhormonen wahrscheinlich macht. So entwickelt sich aus der physiologischen Hypertrophie bei Vorhandensein pathologischer Stimuli bei Männern häufiger eine pathologische Herzhypertrophie als bei Frauen. Im Mausmodell führte körperliches Training bei den Weibchen zu einer stärkeren Ausprägung der physiologischen Hypertrophie als bei den Männchen (Regitz-Zagrosek et al. 2010). Generell zeichnet sich die kardiale Hypertrophie durch eine anormale Vergrößerung des Zellvolumens der Kardiomyozyten aus (Ritter und Neyses 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde als Maß für die Ausprägung einer Hypertrophie die Muskelfaserfläche im Querschnitt der einzelnen Herzmuskelzellen herangezogen.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der Hyperplasie zu einer Vergrößerung der Herzmuskelmasse durch Vermehrung der Kardiomyozyten mittels mitotischer Zellteilung. Diese Proliferation der Herzmuskelzellen wurde in der vorliegenden Arbeit mittels der Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-Färbung erfasst. Mithilfe dieser Färbung lassen sich diejenigen Zellen anfärben, die sich gerade in Zellteilung befinden. So kann der Anteil der in Proliferation befindlichen Zellen ausgezählt und eine Aussage über die Proliferationsaktivität des Herzmuskels getroffen werden. Adulte Herzmuskelzellen sind hochspezialisierte, ausdifferenzierte Zellen. In der fetalen Phase vermehren sie sich rasch, bis sie perinatal ihre Proliferationsfähigkeit verlieren. Danach finden zwar weiterhin Zellkernteilungen statt, allerdings ohne dass es zur kompletten Zellteilung kommt (azytokinetische Mitose). So weist ein Großteil der adulten Kardiomyozyten zwei Zellkerne auf (Li et al. 1997). Normalerweise sind die adulten Herzmuskelzellen nicht in der Lage, wieder in den Zellzyklus einzutreten und sich zu vermehren (Dimmeler et al. 2005). Auf

Wachstumsstimuli wie Druck- oder Volumenbelastung reagieren sie typischerweise mit Zellhypertrophie (Ahuja et al. 2007). Vor einigen Jahren wurden allerdings kardiale Stammzellen entdeckt, also Vorläuferzellen, die sich vermehren und zu Kardiomyozyten ausdifferenzieren können (Dimmeler et al. 2005, Anversa et al. 2006, Engel et al. 2005). Dies führte zu einem großen Interesse bei Forschern und Klinikern im Hinblick auf neue Therapiemöglichkeiten bei akuter oder chronischer ischämischer Herzerkrankung (Leri et al. 2011, Centola et al. 2008, Srivastava und Ivey 2006, Dimmeler et al. 2005). Bis heute bleibt allerdings unklar, inwieweit diese kardialen Vorläuferzellen therapeutisch genutzt werden können. Das Herz bleibt auch nach neuesten Erkenntnissen ein Organ mit geringem Regenerationspotenzial nach ischämischen Schäden und reagiert auf pathologische Stimuli wie Druck- oder Volumenbelastung vorwiegend mit Hypertrophie der Kardiomyozyten (Ahuja et al. 2007).

1.3 Substanzen

Die untersuchten Testsubstanzen können unterteilt werden in die beiden Steroidhormone Testosteron und Östradiol sowie Phytoöstrogene, UV-Filtersubstanzen und Pestizide.

1.3.1 Steroidhormone

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Substanzen greifen alle in das Steroidhormonsystem ein. Sie wurden auf ihre östrogene bzw. antiandrogene Wirkung hin untersucht.

1.3.1.1 Wirkungsweise

Hormone gelangen von ihrem Bildungsort über den Blutweg zu ihrem Zielorgan. Auf Grund ihrer hydrophoben Eigenschaften werden Steroidhormone mit Hilfe von spezifischen Trägerproteinen im Blut transportiert und können wegen ihrer geringen Größe und ihrer Lipophilie ungehindert durch die Plasmamembran diffundieren. Im Zytosol der Zielzelle angekommen, binden die Steroidhormone an ein im Zytosol befindliches spezifisches Rezeptorprotein. Daraufhin kommt es zu einer

Konformationsänderung des Rezeptorproteins, wodurch der Transport des Hormon-Rezeptor-Komplexes in den Zellkern ermöglicht wird. Dort bindet dieser Komplex an hoch spezifische Desoxyribonukleinsäure (DNS)-Sequenzen, sogenannte Hormon-Response-Elemente (HRE), und verändert so die Genexpression, wobei die Expression entweder aktiviert oder reprimiert werden kann (Nelson und Cox 2009).

Steroidhormone können demnach die Bildung neuer Proteine hervorrufen, wohingegen Peptidhormone schon vorhandene inaktive Proteine aktivieren können. Die Proteinaktivierung ist ein sehr viel schnellerer Prozess als die Neusynthese von Proteinen, weshalb Peptidhormone bereits innerhalb von Minuten wirken, wohingegen Steroidhormone eher auf langsame, aber beständige Stoffwechselveränderungen ausgelegt sind (Crapo 1988).

1.3.2. Androgene und Östrogene

Als wichtigstes Androgen gilt das Testosteron (T), das wichtigste Östrogen ist das Östradiol (E₂).

1.3.2.1 Testosteron (T)

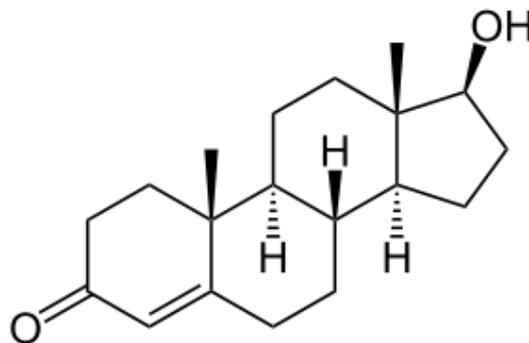


Abbildung 1: Strukturformel Testosteron

T wird - wie alle Steroidhormone - aus Cholesterin gebildet. Beim Mann findet die Produktion von T hauptsächlich in den Leydigzellen der Hoden statt. Daneben werden Androgene aber auch in der Zona reticularis der Nebennierenrinde synthetisiert. Diese Androgene spielen beim Mann allerdings eine untergeordnete Rolle (Herold 2011). Beim erwachsenen Mann beträgt die tägliche T-Bildungsrate 5-10 mg, die tägliche Androstendion-Bildungsrate liegt bei 2-4 mg (Schweikert 2003). Aus T, dessen

Synthese ab Beginn der Pubertät der Steuerung des Luteinisierenden Hormons (LH) aus dem Hypophysenvorderlappen unterliegt, kann einerseits durch die 5- α -Reduktase Dihydrotestosteron (DHT), andererseits mit Hilfe der Aromatase Estradiol gebildet werden. Da der Metabolit DHT sehr viel stärker wirksam ist als T, gilt er als der aktive Metabolit des T. T selbst ist u.a. für die Zunahme der Muskelmasse zuständig (Fauci et al. 2009).

1.3.2.1.1 Androgenrezeptor (AR) und Wirkung

AR kommen im Zytoplasma und im Zellkern vor. Nach Bindung eines Androgens an das Rezeptorprotein gelangt der Hormon-Rezeptor-Komplex in den Zellkern, wo er als Transkriptionsfaktor entweder direkt an die DNS oder an andere Transkriptionsfaktoren, die bereits an der DNS lagern, bindet (Fauci et al. 2009).

AR werden in vielen Organen, u.a. in Herzmuskelzellen, exprimiert (McGill et al. 1980, Marsh et al. 1998).

1.3.2.2 Östrogene

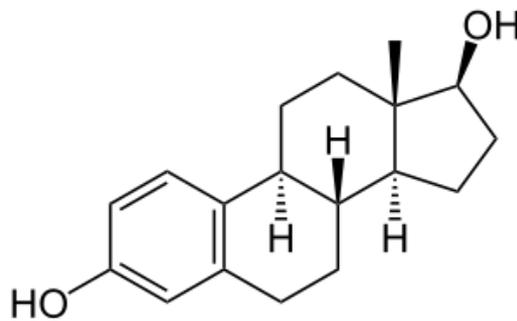


Abbildung 2: Strukturformel Östradiol (E₂)

Östrogene werden mit Hilfe der Aromatase, einem Enzym aus der Cytochrom P 450-Familie, aus T bzw. Androstendion gebildet. Dabei kommt es durch Entfernen einer Methylgruppe zur Bildung des für Östrogene typischen aromatischen A-Ringes (O'Donnell 2003). Es entsteht E₂ aus T, wohingegen das Östrogen Östron aus Androstendion abgeleitet wird (Berg et al. 2007). Besonders viel Aromatase kommt bei den weiblichen Individuen in den Granulosazellen der Ovarien vor, wo unter der Steuerung des Gonadotropins Follikelstimulierendes Hormon (FSH) Östradiol (E₂) für die Follikelreifung gebildet wird (Fauci et al. 2009). Außerdem kommt die Aromatase

in vielen weiteren Geweben vor, beim Mann unter anderem auch im Hoden (O'Donnell 2003).

1.3.2.2.1 Östrogenrezeptoren (ER) und Wirkung

Wie alle Steroidhormonrezeptoren gehören auch die ER zu den nukleären Rezeptoren (O'Donnell 2003). Nach Bindung eines Liganden heftet sich der Ligand-Rezeptor-Komplex an spezifische Stellen der DNS, die sogenannten Östrogen-Response-Elemente (EREs) und reguliert somit mit Hilfe von Koaktivatoren die Transkription verschiedener Gene (Berg et al. 2007). Lange Zeit kannte man nur einen ER (ER α), bevor man in den 90'er Jahren eine zweite Form des Rezeptors, ER β , entdeckte (Kuiper et al. 1996). Beide ER, ER α und ER β , kommen sowohl bei der Frau als auch beim Mann [z.B. in der Prostata (Ekman et al. 1983, Kuiper et al. 1996)] vor und sind in der Lage, E₂ mit hoher Affinität zu binden. Sie unterscheiden sich aber in ihrem Vorkommen in verschiedenen Geweben bzw. Organen und in ihrer Affinität zu anderen östrogenen Liganden (O'Donnell 2003, Dahlman-Wright et al. 2003). So ist im Uterus beispielsweise vor allem ER α zu finden, wohingegen in den Granulosazellen der Ovarien hauptsächlich ER β vorkommt. In anderen Geweben, wie zum Beispiel dem Gehirn und im kardiovaskulären System, kommen beide Rezeptoren vor (Wintermantel et al. 2007, Murphy und Korach 2007), vermitteln aber unterschiedliche Effekte (Wintermantel et al. 2007). So können die Östrogene in verschiedenen Geweben ganz spezifische und unterschiedliche Wirkungen hervorrufen, eine Eigenschaft, die sich die Medizin zu therapeutischen Zwecken in Form von Selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren, den sogenannten SERMs, zu Nutze gemacht hat (O'Donnell 2003).

1.3.2.2.2 Die Rolle der Östrogene bei männlichen Individuen

Auch wenn Östrogene typischerweise als weibliche Sexualhormone betrachtet werden, spielen sie bei männlichen Individuen vor allem bei der Knochenneubildung und der Knochendichte eine entscheidende Rolle (Schweikert 2003). Außerdem hemmen Östrogene die Bildung von Wachstumsfaktoren in der Leber, wodurch die Epiphysenfugen geschlossen werden und das Längenwachstum eingestellt wird (Göretzlehner et al. 2007). Die Östrogene beim Mann werden hauptsächlich mit Hilfe

der Aromatase aus T und Androstendion in peripheren Geweben gebildet. Nur etwa 15% des E₂ werden von den Hoden sezerniert. So waren Männer mit Aromatase-Defizienz infolge nicht geschlossener Epiphysenfugen überdurchschnittlich groß und zeigten eine Osteopenie (Schweikert 2003). Aufgrund des Vorkommens von Östrogenen und ER bei männlichen Individuen haben auch ED mit östrogenähnlicher Wirkung, wie sie in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, Auswirkungen auf den Mann und sind von besonderem Interesse.

1.3.3. Phytoöstrogene

Als Phytoöstrogene werden chemische Verbindungen bezeichnet, die in Pflanzen enthalten sind und in ihrer biologischen Aktivität sowie in ihrer chemischen Struktur den Östrogenen ähneln (Cos et al. 2003). Somit greifen sie in das Hormonsystem ein und können als ED wirken. Entdeckt wurden die Phytoöstrogene, als man auf der Suche nach einer nebenwirkungsärmeren Alternative zur Hormonersatztherapie zur Linderung postmenopausaler Beschwerden war. Man kann die Phytoöstrogene anhand ihrer chemischen Struktur in vier Gruppen einteilen: Isoflavonoide, Flavonoide, Stilbene und Lignane (Cos et al. 2003).

1.3.3.1 Genistein (Gen)

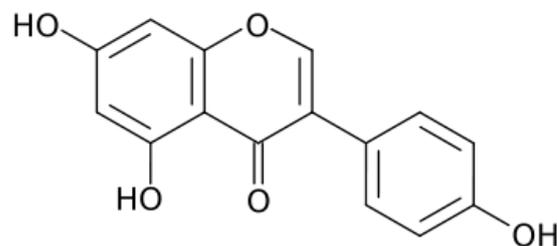


Abbildung 3: Strukturformel Genistein

Gen gehört zu den Isoflavonen und kommt hauptsächlich in Soja und Sojaprodukten sowie in Rotklee vor (Rimoldi et al. 2007). Grundsätzlich ist Gen in der Lage, an beide ER, also ER α und ER β , zu binden, jedoch mit einer etwas höheren Affinität zu ER β (Manas et al. 2004, Sullivan et al. 2011).

Die Sojapflanze ist eine der am besten untersuchten Pflanzen in Hinblick auf die Therapie von postmenopausalen Beschwerden. Beispielsweise konnte gezeigt werden, dass Isoflavone protektiv hinsichtlich der Entstehung einer Osteoporose wirken (Messina et al. 2004, Alekel et al. 2000), um nur einen der zahlreichen Effekte in der Postmenopause zu nennen.

1.3.3.2 Resveratrol (Res)

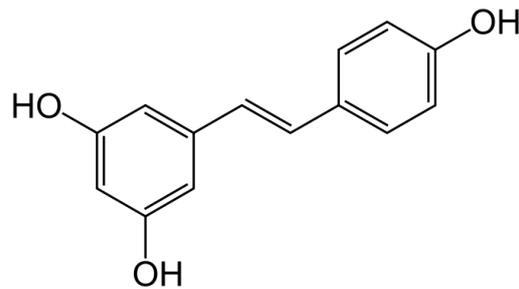


Abbildung 4: Strukturformel Resveratrol

Res gehört zu der Gruppe der Stilbene und kommt in der Haut von Weintrauben, Rotwein, Beeren und Erdnüssen vor (Böttner et al. 2006, Bagchi et al. 2001). Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu E_2 ist Res in der Lage, an beide ER zu binden und so die östrogene Aktivität im Körper zu erhöhen (Bagchi et al. 2001).

Auch Res wurde hinsichtlich seiner Wirkung auf postmenopausale Beschwerden hin untersucht. So vermag es beispielsweise Hitzewallungen und Stimmungsschwankungen zu lindern (Böttner et al. 2006). Weiterhin wirkt Res als Antioxidans (Bhat und Pezzuto 2002, Cadenas und Barja 1999, Lin und Tsai 1999) und besitzt antikarzinogene (ElAttar und Virji 1999, Bhat et al. 2001) sowie antiinflammatorische (Donnelly et al. 2004) Eigenschaften.

1.3.3.3 8-Prenylnaringenin (8-PN)

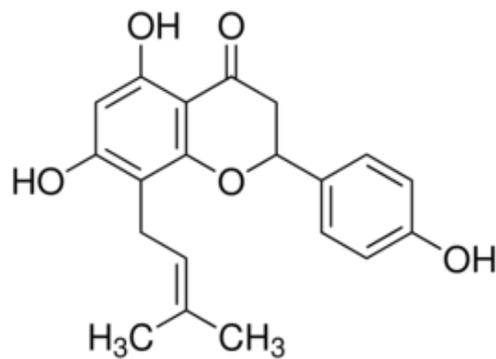


Abbildung 5: Strukturformel 8-Prenylnaringenin

8-PN ist ein Flavonoid und in einem thailändischen Naturheilmittel enthalten, das aus Annonengewächsen hergestellt wird (Kitaoka et al. 1998) sowie in den weiblichen Blüten des Hopfens und damit in geringen Mengen auch in Bier (Milligan et al. 1999) zu finden ist. 8-PN wirkt als Östrogen-Agonist und besitzt eine um ein Vielfaches höhere Aktivität als andere Phytoöstrogene wie beispielsweise Gen (Kitaoka et al. 1998). In Hinblick auf die Prävention von Osteoporose zeigte 8-PN einen ähnlich hohen protektiven Effekt wie E_2 . Im Vergleich zu anderen Phytoöstrogenen wie Gen und Res wurde die Knochendichte durch 8-PN deutlich stärker erhöht (Sehmisch et al. 2008).

1.3.4 UV-Filter-Substanzen

Neben den Phytoöstrogenen sind auch einige UV-Filter-Stoffe wie Benzophenon-2 (BP2), 4-Methylbenzyliden-Camphor (4-MBC) und Octylmethoxycinnamat (OMC) in der Lage, als ED in das Hormonsystem einzugreifen. Auch den UV-Filter-Substanzen werden östrogene Wirkungen zugeschrieben. Sie kommen in diversen Kosmetika wie Sonnencremes und Anti-Aging-Produkten vor, aber auch in Verpackungsmaterial zum Schutz gegen lichtinduzierte Schäden (Schmutzler et al. 2007). Die ED werden transkutan oder über die Nahrung aufgenommen und können so Einfluss auf das Hormonsystem nehmen (Seidlová-Wuttke et al. 2006a, Schlecht et al. 2006).

1.3.4.1 Benzophenon-2 (BP2)

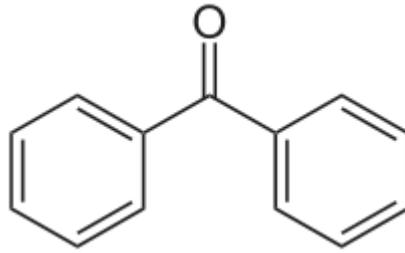


Abbildung 6: Strukturformel Benzophenon-2

In verschiedenen Studien konnte die Wirkung von BP2 als ED gezeigt werden. So führte die Gabe von BP2 in Versuchen mit weiblichen Ratten in verschiedenen Organen zu östrogenagonistischen Effekten wie beispielsweise einem Anstieg des Uterusgewichts, einer verminderten LH-Synthese in der Hypophyse und der Senkung der Lipoproteine (Jarry et al. 2004, Schlecht et al. 2006). Weiterhin wird beschrieben, dass BP2 in den Thyroidhormon-Regelkreis eingreift und eine Hypothyreose zur Folge hat (Schmutzler et al. 2007, Jarry et al. 2004). Aufgrund seiner gesundheitsschädlichen Wirkungen ist BP2 in der Europäischen Union nicht mehr als UV-Filter in Cremes und anderen Kosmetika zugelassen. Allerdings ist BP2 immer noch in vielen Packungsmaterialien zum Schutz gegen Lichtschäden vorhanden, wenn auch in viel geringerer Konzentration als in Sonnencremes (Schmutzler et al. 2007).

1.3.4.2 4-Methylbenzyliden-Camphor (4-MBC) und Octylmethoxycinnamat (OMC)

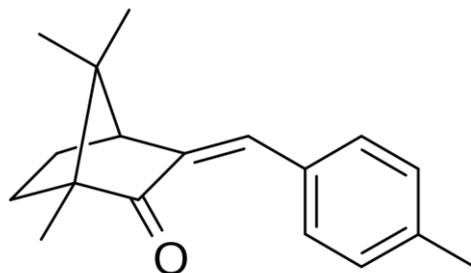


Abbildung 7: Strukturformel 4-Methylbenzyliden-Camphor

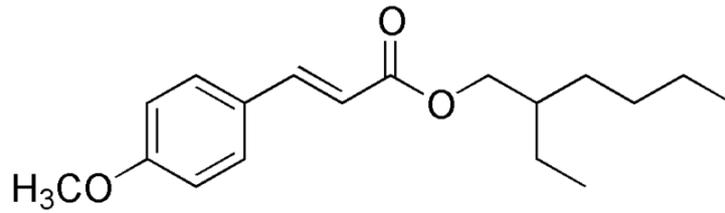


Abbildung 8: Strukturformel Octylmethoxycinnamat

Wie BP2 greifen auch 4-MBC und OMC in das Hormonsystem ein. So wirken 4-MBC und OMC am Uterus und der Vagina als schwache Östrogen-Agonisten und wirken dort stimulatorisch auf das Zellwachstum. Weiterhin zeigen beide Substanzen Wirkungen auf Organsysteme, die nicht denen des E₂ entsprechen, weshalb anzunehmen ist, dass sie über andere Wirkmechanismen ablaufen als über die ER (Seidlova-Wuttke et al. 2006b, Klammer et al. 2007).

1.3.5 Pestizide

Pestizide werden großflächig in der Landwirtschaft zum Schutz der Pflanzen vor Mikroorganismen eingesetzt. Mittlerweile ist bekannt, dass bestimmte Pestizide als ED Einfluss auf das Hormonsystem von Mensch und Tier nehmen können, wenn sie über das Trinkwasser oder die Nahrung aufgenommen werden. Die meisten Pestizide besitzen – nicht wie die bisher besprochenen ED - östrogene Wirkung, sondern antiandrogene Wirkung, weshalb sie vor allem bei männlichen Individuen von Bedeutung sind.

1.3.5.1 Linuron (Lin)

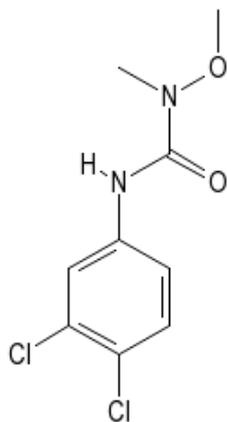


Abbildung 9: Strukturformel Linuron

Lin ist ein Herbizid und wirkt als schwacher AR-Antagonist, indem es den AR kompetitiv hemmt und somit die Androgeninduzierte Genexpression unterdrückt (Lambright et al. 2000). Männliche Feten, die *in utero* Lin ausgesetzt wurden, zeigten u.a. ein verringertes Gewicht von Prostata, Samenblase und Nebenhoden sowie Malformationen von Nebenhoden und Hoden (Hotchkiss et al. 2004).

1.3.5.2 Procymidon (Pro)

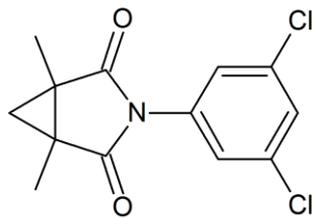


Abbildung 10: Strukturformel Procymidon

Pro wird zum Schutz von Obst und Gemüse vor Pilzbefall eingesetzt und konnte in verschiedenen Früchten nachgewiesen werden (Gebara et al. 2011, Rodríguez et al. 2001). Pro besitzt im Vergleich zu Lin eine größere Affinität zum AR und wirkt daher als stärkerer AR-Antagonist (Lambright et al. 2000).

1.4 Die orchidektomierte Ratte als Modell für den Mann in der Andropause

Als Modell für den Mann in der Andropause wurden in der vorliegenden Arbeit orchidektomierte Ratten verwendet. Es wird vorausgesetzt, dass der T-Spiegel durch die Orchidektomie in ähnlichem Maße gesenkt wird wie beim Mann durch Reduktion der T-Synthese im Alter. Ratten eignen sich besonders gut als Tiermodell, da ihre Anatomie und Physiologie weitgehend bekannt ist. Seit mehr als einem Jahrhundert dienen sie als Tiermodell für kardiovaskuläre Erkrankungen, in den letzten zehn Jahren konnten sogar mit Hilfe transgener Technologien die Gene identifiziert werden, die bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen eine Rolle spielen (Bader 2010). Desweiteren sind Ratten als Tiermodell relativ kosteneffektiv und ihre kurze Gestationsdauer bietet den Vorteil, dass ein großer Umfang an Versuchstieren in kurzer Zeit produziert werden kann (Hasenfuß 1998).

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Aus der Einleitung ist klar geworden, dass ED im alltäglichen Leben in vielen Bereichen vorkommen und deshalb von großem öffentlichem Interesse sind. Es konnte gezeigt werden, dass es ED gibt, die an ER und AR binden können und somit östrogene bzw. antiandrogene Wirkung hervorrufen. Bislang hat sich die Wissenschaft hauptsächlich mit den Auswirkungen der ED auf die Reproduktion von Mensch und Tier auseinandergesetzt (Swedenborg et al. 2009). Insgesamt ist bisher wenig über die Wirkung von Sexualhormonen, v.a. von Östrogenen, auf den Herzmuskel männlicher Individuen bekannt. Da ER und AR aber auch am Herzen nachgewiesen werden konnten (McGill et al. 1980, Marsh et al. 1998), war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Wirkungen der ED auf den Herzmuskel zu untersuchen. Gibt es womöglich auch positive Auswirkungen auf die Gesundheit, die bei der Therapie bestimmter Erkrankungen oder prophylaktisch genutzt werden können? Bei der Therapie postmenopausaler Beschwerden bei der Frau beispielsweise wurden bereits einige Phytoöstrogene, also pflanzliche Substanzen mit östrogenähnlicher Wirkung, als Alternative zur chemisch hergestellten Hormonersatztherapie untersucht (Wuttke et al. 2008). Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, ob und inwieweit die untersuchten ED schädlichen Einfluss auf den Herzmuskel haben und somit eine Gefährdung für den Menschen darstellen könnten. Andererseits wird untersucht, ob es, ähnlich wie bei der Therapie von postmenopausalen Beschwerden, auch Substanzen unter den untersuchten Disruptoren gibt, die einen günstigen Effekt auf den Herzmuskel haben und so protektiv in der Therapie des Mannes in der Andropause eingesetzt werden könnten.

2 Material und Methoden

Für die vorliegende Arbeit wurden die fixierten und in Paraffin konservierten Organe sowie die Daten des zeitlichen Ablaufs, der Versuchstiere, der Körper- und Herzgewichte, des Tierfutters und der Futteraufnahme von einer Mitarbeitergruppe des Department für Endokrinologie zur Verfügung gestellt. Die Daten entstammen folglich dem Datenpool dieser Abteilung und wurden auch von Anderen genutzt. Diese Daten sind für die Interpretation der Ergebnisse und das Verständnis der vorliegenden Arbeit zwingend notwendig, da sie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Größen „Herzmuskelfaserfläche“ und „Anzahl der proliferierenden Zellen des Herzmuskels“ beeinflussen bzw. von diesen beiden Größen beeinflusst werden.

2.1 Zeitlicher Versuchsablauf

Für den Tierversuch lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig vor (Az 509.42502/01-36.03). Der Versuch insgesamt, von der ersten Computertomographie (CT)-Messung bis zur Obduktion des letzten Versuchstieres, dauerte ca. vier Monate vom 16.02.2004 bis zum 07.06.2004 (vgl. Abb. 11). Wie alle Versuche des Departments für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen wurde er nach einem standardisierten Schema durchgeführt.

Den Beginn der Studie stellte die erste CT-Messung dar. Anhand dieser konnten die Ausgangswerte der Knochendichte von Tibia und Vertebra gemessen und so eine Aussage über den Zustand des Skeletts gemacht werden. Zu diesem Zeitpunkt waren die Versuchstiere dieser Studie ca. drei Monate alt. Vor der CT-Aufnahme wurden die Versuchstiere zur Wiedererkennung in einer kurzzeitigen Vollnarkose mit einem Transponder (UNO MICRO-ID System, ISO-Transponder (12 mm), UNO ROESVASTSTAAL BV Zereenaar) ausgestattet, der mithilfe eines Applikators in den Nackenbereich injiziert wurde. Außerdem wurden die Tiere zum ersten Mal gewogen (Waage basic lite BL3, Sartorius). Nach Messung aller Tiere wurden die Tiere drei Wochen lang ausschließlich mit sojafreiem Pelletfutter ohne Substanzzusatz (V1355, sniff, Spezilitäten GmbH, Soest) gefüttert, um den Kontakt mit Östrogenaktiven

Substanzen auszuschließen. Anschließend erfolgte die Entfernung der Hoden der Ratten (08.-11.03.2004), bevor direkt nach der Orchidektomie (orx) die Fütterung mit substanzhaltigem Futter gemäß der vor dem Versuch vorgenommenen Einteilung in Substanzgruppen startete. Jede Substanzgruppe umfasste zwischen zehn und zwölf Tiere. Der Futterverbrauch eines jeden Käfigs wurde einmal pro Woche bestimmt und das Futter in den einzelnen Käfigen einmal in der Woche auf 1500 g pro Käfig aufgefüllt. Des Weiteren wurden die Tiere in regelmäßigen Abständen gewogen. Nach drei Monaten erfolgte die zweite und gleichzeitig letzte CT-Messung jeder einzelnen Ratte, wobei erneut das jeweilige Körpergewicht bestimmt wurde (KG). Etwa 13 Wochen nach Beginn der Fütterung mit den Testsubstanzen wurde die Tötung der Tiere durch Dekapitation vorgenommen. Bei der anschließenden Obduktion wurden Blut und verschiedene Organe zur Konservierung und späteren Untersuchung entnommen. Für die vorliegende Dissertation wurde das Herz der Ratten von einer Mitarbeitergruppe entnommen, präpariert und zur Verfügung gestellt. Weiterhin wurden verschiedene Blutparameter (z.B. Leptin und Osteocalcin) zur Beurteilung des Einflusses der Testsubstanzen auf die Knochendichte und das Fettgewebe durch das technische Personal bestimmt.

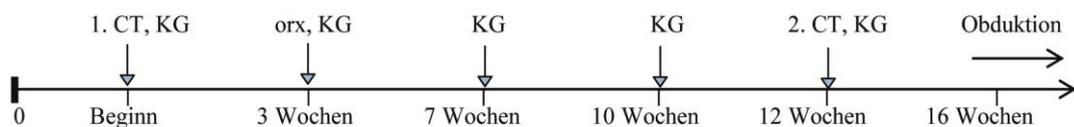


Abbildung 11: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs (die Daten wurden vom Department für Endkriologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt) (0=Geburt der Ratten, CT=Computertomographie-Messung, KG=Körpergewichts-Messung, orx=Orchidektomie)

2.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelt es sich um 164 selbstgezeugene, männliche Sprague-Dawley (SD)-Ratten, die in der vierten Generation sojafrei gezüchtet wurden. Die ursprünglichen Mutter- und Vatertiere wurden von der Firma Winkelmann (Borchen, Deutschland) bezogen. Zu Versuchsbeginn waren die Tiere ca. drei Monate alt (Geburt der Tiere zwischen dem 03. und 18.11.2003) und wurden bis zu diesem Zeitpunkt in Gruppen von sechs Tieren pro Käfig gehalten. Das Körpergewicht zu Beginn des Versuchs betrug 375 ± 26 g. Die Ratten hatten in den Käfigen jederzeit Zugang zu sojafreiem Pellet-Futter [Pellet-Futter V 1354-000 sniff R-Z, 10 mm

Phytoestrogenarm, Maus/Ratte (mit 21,7 % von Rohprotein)] und frischem Trinkwasser (ad libitum). Bei den Käfigen handelte es sich um Makrolonkäfige Typ IV der Firma Techniplast Deutschland GmbH aus Hohenpreißenberg. Der Raum, in dem die Käfige standen, war 12 Stunden pro Tag von 6 bis 18 Uhr beleuchtet (12h-dark-light-cyclus) und hatte eine Raumtemperatur von ca. 23°C, sowie eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 %.

2.3 Orchidektomie (orx) der Ratten

Nach Aufteilung der Käfige in die jeweiligen Substanzgruppen wurden die drei Monate alten Ratten ausgewählter Käfige orchidektomiert (orx). Dieser Eingriff erfolgte unter kurzzeitiger Vollnarkose durch CO₂-Inhalation und anschließender intraperitonealer Injektion von Xylozin (Rompun®, Firma Bayer, Leverkusen) 2,5 mg/Tier, entsprechend 10 mg/kg Körpergewicht, und Ketamin (Hostaket®, Hoechst, Bad Soden) 11 mg/Tier, entsprechend 45 mg/kg Körpergewicht, im Verhältnis 4:5. Die Dauer der Vollnarkose betrug zwischen 10 und 15 Minuten. Zum Schutz der Augen vor Austrocknung während der Operation wurde den Ratten ein Feuchtigkeitsgel (Thilo-Tears®, Alcon) appliziert.

Für die Entfernung der Hoden wurden zunächst durch Palpieren der Bauchhöhle beidseits die Hoden des Tieres aufgesucht. Nach medialer Inzision der Skrotalhaut wurde das viszerale Peritoneum durchtrennt, um den Hoden präparieren und darstellen zu können. Als Nächstes wurde der Ductus epididymidis mit seinen Gefäßen zur Unterbindung der Blutversorgung mithilfe von Vicrylfäden ligiert und anschließend entfernt. Schließlich erfolgte eine Kontrolle des Operationsfeldes auf Blutungsfreiheit. Nach Durchführung des Prozederes auf der kontralateralen Seite wurde die Skrotalhaut mittels Vicrylfäden wieder verschlossen. Zur Vermeidung einer postoperativen Dehydratation wurde den Tieren 5 ml isotoner Kochsalzlösung der Firma Braun subkutan verabreicht. Um die Narkose nach der Operation auszuleiten, wurde den Versuchstieren Antisedan® (Antipamezolhydrochlorid, 10 ml, Pfizer) intraperitoneal injiziert, wobei 0,3 bis 0,5 ml einer 10-prozentigen (%) Lösung mit NaCl Verwendung fanden. Während der Aufwachphase standen die Ratten unter ständiger Beobachtung.

2.4 Tierfutter

Den Versuchstieren wurde über einen Zeitraum von drei Monaten sojafreies Pellet-Futter verabreicht. Die Firma sniff Spezialitäten GmbH (Soest, Deutschland) fügte diesem Futter die zu untersuchenden Testsubstanzen zu (siehe Tabelle 1). Die Dosierungen der Testsubstanzen wurden wie folgt gewählt, da in Voruntersuchungen in diesen Dosierungen für die jeweiligen Testsubstanzen östrogene Wirkungen am Uterus bzw. antiandrogene Wirkungen am Hoden nachgewiesen werden konnten.

Tabelle 1: Konzentration der einzelnen Testsubstanzen im sojafreien Basisfutter (die Daten wurden vom Department für Endkrinologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt), [E₂=Östradiol; T=Testosteron; Gen=Genistein; Res=Resveratrol; 8-PN=8-Prenylnarigenin; BP2=Benzophenon-2; 4-MBC=4-Methylbenzyliden-Camphor; OMC=Octylmethoxycinnamat; Lin=Linuron; Pro=Procymidon]

Testsubstanz	Konzentration
Sojafreies und testsubstanzfreies Kontrollfutter [Pellet-Futter V 1354-000 sniff R-Z, 10 mm Phytoestrogenarm, Maus/Ratte (mit 21,7 % von Rohprotein)]	
E ₂ -haltiges Futter	~ 4,3 mg E ₂ -benzoat (entsprechend 2,5 mg freies 17β-Estradiol)/kg Futter auf sojafreier Basis
T-haltiges Futter	2,986 g T/kg Futter auf sojafreier Basis
Gen-haltiges Futter	1 g Gen/kg Futter auf sojafreier Basis
Res-haltiges Futter	0,84 g Res/kg Futter auf sojafreier Basis
8-PN-haltiges Futter	0,126 g 8-PN/kg Futter auf sojafreier Basis
BP2-haltiges Futter	2,5 g BP2/kg Futter auf sojafreier Basis
4-MBC-haltiges Futter	2,5 g 4-MBC/kg Futter auf sojafreier Basis
OMC-haltiges Futter	12,5 g OMC/kg Futter auf sojafreier Basis
Lin-haltiges Futter	0,25 g Lin/kg Futter auf sojafreier Basis
Pro-haltiges Futter	1,25 g Pro/kg Futter auf sojafreier Basis

Die ungeöffneten Tierfuttersäcke wurden in einem abgeschlossenen Kühlraum bei -20°C gelagert, die geöffneten Futtersäcke für die einmalige Fütterung pro Woche durch Mitarbeiter der Arbeitsgruppe bei Raumtemperatur (ca. 20-23 °C) aufbewahrt.

Ein Futtersack (15 kg) reichte, abhängig von der aufgenommenen Futtermenge, über einen Zeitraum von vier bis sechs Wochen.

Zum Schutz vor perkutaner Absorption und Inhalation trugen die Mitarbeiter beim Umgang mit dem Futter Kittel, Einmal-Latexhandschuhe sowie Mund-Nasenmasken.

2.5 Organhistologie

Nach Abschluss des Versuches und Tötung der Tiere wurden verschiedene Organe zur Konservierung und weiteren Untersuchung entnommen. Dabei ging man für die einzelnen Organe in gleicher Weise vor. Für die vorliegende Arbeit wurde durch eine Mitarbeitergruppe das Herz entnommen und präpariert.

Die Herzen wurden direkt nach der Entnahme für maximal 72 Stunden in 10-%igem Formalin (Firma Sigma®) aufbewahrt. Für den weiteren Gebrauch mussten die histologischen Präparate entwässert und fixiert werden. Dazu wurden von den technischen Mitarbeitern der Abteilung zunächst Schnitte der einzelnen Organe angefertigt, die in Einbettkästen aufbewahrt wurden. Mit Hilfe einer Zitadelle (Leica TP 1020, V 2,0, Ordernummer: 070430101, Herstellung 03/98) wurden diese Schnitte nacheinander in verschiedene Alkohol-, Xylol- und Paraffinlösungen getaucht und anschließend verwahrt. Dabei diente die aufsteigende Alkoholreihe der Entwässerung, das Paraffin der Stabilisierung der Organschnitte (Schema siehe Tabelle 2 im Anhang).

Die Einbettkästen wurden nach Entnahme aus der Zitadelle bis zur endgültigen Fixierung in einem Wärmeschrank (Firma Schütt Labortechnik, GFL 7601) bei 56-62 °C gelagert und nacheinander in einen Paraffinblock (Gerät: Leica EG 11404) gegossen, welche anschließend eingefroren wurden. Später wurden die paraffinfixierten, noch eingefrorenen Organschnitte in eigener Arbeit mithilfe eines Mikrotoms (Leica Modell RM 2135, Fabriknummer: 2794/10.2000, Kat.-Nummer: 050029802) in Schichten von 3-5 µm Dicke geschnitten und auf einen Objektträger (Firma Menzel Superfrost Plus) aufgebracht. Zur Anfertigung der Herzpräparate wurden insgesamt je zwei Tiere pro Substanzgruppe verwendet. Pro Organ wurden jeweils zehn Schnitte von proximal nach distal aus dem Bereich der Herzapex

angefertigt, so dass insgesamt 280 Präparate verwendet werden konnten (vgl. Abb. 12).

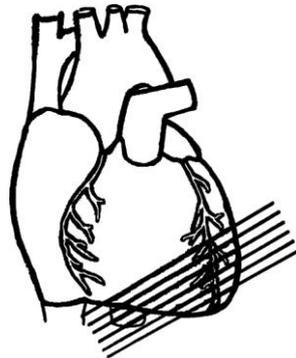


Abbildung 12: Schematische Darstellung der Schnittführung zur Herstellung histologischer Präparate im Bereich der Herzapex

Die eigene wissenschaftliche Arbeit umfasste weiterhin die Färbung der Präparate mit Hämatoxylin-Eosin (HE) sowie die immunzytologische Färbung mittels PCNA und die mikroskopische Auswertung der histologischen Schnitte.

2.6 Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung

Bei jeweils vier Präparaten einer Substanzgruppe wurde eine HE-Färbung der histologischen Schnitte durchgeführt. Diese bestand aus einer absteigenden Alkoholreihe, der eigentlichen Färbung und einer aufsteigenden Alkoholreihe (Schema der HE-Färbung siehe Tabelle 3 im Anhang).

Die gefärbten Präparate konnten nun mithilfe eines Zeiss Axiophot-Mikroskops (Zeiss Axiophot® Fotomikroskop, Fa. Zeiss, Carl Zeiss AG, Oberkochen), welches über eine digitale Fotokamera (ColorView, Soft Imaging System, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster) an ein Rechnersystem angeschlossen war, beurteilt und ausgemessen werden. Das Softwareprogramm analySIS® der Firma Olympus (Soft Imaging System, Münster) wurde zur Messung und Evaluierung verwendet.

2.7 Immunzytologische Färbung mittels Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)

Für die PCNA-Färbung mussten die histologischen Schnitte zuerst entparaffiniert werden, bevor sie in absteigenden Alkoholkonzentrationen rehydriert werden konnten.

Im Anschluss daran mussten die Epitope aufgefunden und die Präparate in aufsteigenden Alkoholkonzentrationen wieder dehydriert werden. Daraufhin wurde die Peroxidaseaktivität der Zellen geblockt. Anschließend wurden die Präparate erneut rehydriert. Nach dem Blocken der nicht spezifischen Immunglobuline mit Normalserum der Ziege wurde zunächst der Primärantikörper, dann der Sekundärantikörper aufgetragen und das Diaminobenzidine (DAB)-Reagenz hergestellt. Im Anschluss daran wurde eine Gegenfärbung durchgeführt, bevor die Präparate wieder dehydriert und schließlich eingedeckt wurden (Schema der PCNA-Färbung siehe Tabelle 4 im Anhang).

2.8 Mikroskopie der Hämatoxylin-Eosin (HE)-angefärbten Präparate

Nach Färbung der Herzpräparate mit HE (Verfahren siehe oben) wurden die Flächen der Herzmuskelfasern im Querschnitt mithilfe des Axiophot-Mikroskops beurteilt. Dazu wurde das Präparat in vier Quadranten (Q) unterteilt und nummeriert (siehe Abb. 13).

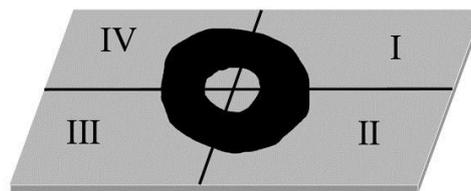


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Objektträgers mit Unterteilung des histologischen Schnittes der Herzapex in 4 Quadranten

In jedem Quadranten wurden zehn Myokardfaserflächen im Querschnitt bei einer 40,0-fachen Vergrößerung (Objektiv 20-fach, Okular 2,0-fach vergrößert) mithilfe der digitalen Fotokamera am Bildschirm des Computers gemessen. Dafür wurde das Programm analySIS® (Soft Imaging System, Olympus Soft Imaging Solutions, Münster) verwendet und die Werte anschließend in Excel®-Tabellen (Microsoft®) übertragen. Um sicher zu gehen, dass die Muskelfaser im Querschnitt getroffen wurde, wurde darauf geachtet, dass der Zellkern möglichst zentral liegt. Zur Dokumentation wurden Fotos angefertigt (siehe Abb. 14).

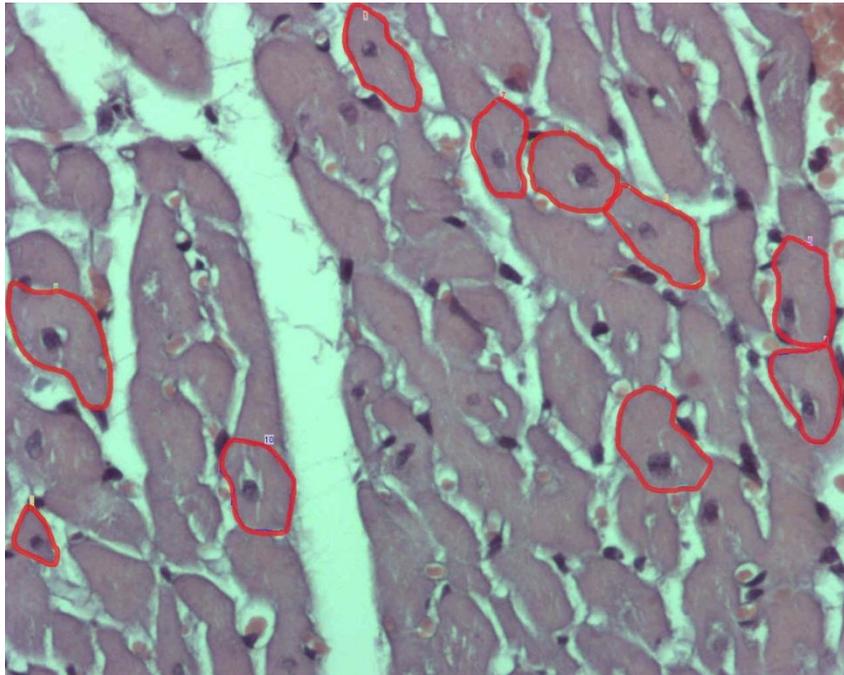


Abbildung 14: Umrandung der querschnittenen Zellen, deren Fläche zur Auswertung gemessen wurde (Präparat 1-4, 3. Q) (Q=Quadrant)

2.9 Mikroskopie der Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-angefärbten Präparate

Zur Beurteilung der Proliferations-Aktivität der Herzmuskelfaserzellen wurden pro Präparat drei bis fünf Gesichtsfelder (in den nachfolgenden Abbildungen auch als Q bezeichnet) eingestellt und fotografiert (Fotokamera: ColorView, Soft Imaging System, Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster). Bei einer 25,0-fachen Vergrößerung (Objektiv 10-fach, Okular 2,5-fach vergrößert) und einem Weißabgleich von 850 μ s wurden am Bildschirm des Rechners insgesamt 500 Zellen pro Präparat mittels Zählgerät abgezählt (siehe Abb. 15) und die Anzahl der positiv angefärbten Zellen in den jeweiligen Gesichtsfeldern notiert und in Excel[®]-Tabellen übertragen (siehe Tabelle 5). Da für die jeweiligen Substanzgruppen unterschiedlich viele Präparate zur Verfügung standen, wurden nach Auszählung aller Präparate einer Substanzgruppe die proliferationspositiven Zellen addiert und in Verhältnis zur Gesamtzahl der ausgezählten Zellen, also x mal 500 Zellen gesetzt (siehe Tabelle 6).



Abbildung 15: Vergrößerter Ausschnitt einer Gesichtsfeldeinstellung, proliferationspositive Zellen beispielhaft mit Pfeilen markiert (Präparat 1-10, 1.Q.) (Q=Quadrant, hier Gesichtsfeldeinstellung)

Tabelle 5: Beispiel einer verwendeten Excel-Tabelle zur Ermittlung der gesamten Anzahl proliferationspositiver Zellen: 1. Spalte: Proliferationspositive Zellen in den einzelnen Gesichtsfeldern (Q), 2. Spalte: Gezählte Zellen insgesamt, 3. Spalte: Gezählte Zellen pro Gesichtsfeld, 4. Spalte: Anteil der proliferationspositiven Zellen pro Gesichtsfeld. Gesamtzahl der positiven Zellen und entsprechend der Anteil an positiven Zellen bezogen auf die insgesamt gezählten 500 Zellen. (Präparat 1-10) (Q=Quadrant, hier Gesichtsfeld)

1-10

	Positiv	Gesamt	Einzel Zellen im Q.	Anteil pos. Zellen im Q.
I. Q.	25	142	142	17,61%
II. Q.	4	264	122	3,28%
III. Q.	15	385	121	12,40%
IV. Q.	12	500	115	10,43%
Gesamt pos.	56			
Entspr. %	0,11			

Tabelle 6: Beispiel einer verwendeten Excel-Tabelle zur Berechnung des Anteils proliferationspositiver Zellen an der Gesamtzahl gezählter Zellen einer Substanzgruppe: 1. Spalte: Alle Präparate einer Substanzgruppe; 2. Spalte: Anzahl proliferationspositiver Zellen; 3. Spalte: insgesamt gezählte Zellen; 4. Spalte: Anteil der proliferationspositiven Zellen an Gesamtzahl gezählter Zellen

Präparat	Anzahl positiver Zellen	Zellen gezählt	Anteil der positiven Zellen an Zellen insgesamt
1,6	40	500	
1,1	56	500	
12,6	9	500	
12,8	24	500	
Gesamt	129	2000	0,0645

2.10 Statistische Methoden

Die Berechnung der Werte für die Statistik wurde mit dem Computerprogramm GraphPad Prism 4[®] (Fa. GraphPad Software, Inc., San Diego, USA) vorgenommen. Dabei wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt. Die statistische Auswertung erfolgte durch die Anwendung einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) und anschließendem t-Tests nach Dunnett.

3 Ergebnisse

Da die Tierversuche nicht selbst durchgeführt wurden, wurden alle Daten zu Futtermittelverbrauch, Gewichtsentwicklung und Herzgewichten vom Department für Endokrinologie zur Verfügung gestellt. Diese Daten sind für die Interpretation und das Verständnis der Ergebnisse notwendig.

3.1 Futtermittelverbrauch

Der Futtermittelverbrauch pro Käfig wurde einmal in der Woche von Mitarbeitern der Arbeitsgruppe gemessen und daraus der Verbrauch jeder einzelnen Ratte in dem Käfig pro Tag berechnet. So konnte die durchschnittlich von jedem Tier pro Tag aufgenommene Substanzmenge ermittelt werden (siehe Tabelle 7 im Anhang). Die Werte entstammen dem Versuchsprotokoll.

In den ersten drei Wochen des Versuchs bekamen alle Tiere das gleiche sojafreie Pellet-Futtermittel ohne Testsubstanzzusatz, um für alle Tiere dieselben Ausgangsbedingungen zu schaffen. In dieser Zeit nahm jedes Tier durchschnittlich 20,13 g Futtermittel pro Tag auf. Nach dieser Zeit wurden die Ratten orchidektomiert und anschließend mit der jeweiligen Testsubstanz gefüttert. Es zeigte sich, dass T-haltiges Futtermittel mit 24,78 g pro Tag und Tier am meisten verbraucht wurde, wohingegen das Futtermittel, dem E₂ zugefügt war, am wenigsten aufgenommen wurde (18,89 g pro Tag und Tier) (siehe auch Tabelle 7 im Anhang).

Insgesamt machte es keinen signifikanten Unterschied im Fressverhalten, ob die Tiere orchidektomiert (orx) waren oder nicht. Dazu wurden die orchidektomierten und die intakten, also unbehandelten Tiere verglichen, die keine Testsubstanzen erhalten haben (Ko,orx vs. Tf,intakt) (vgl. Abb. 16).

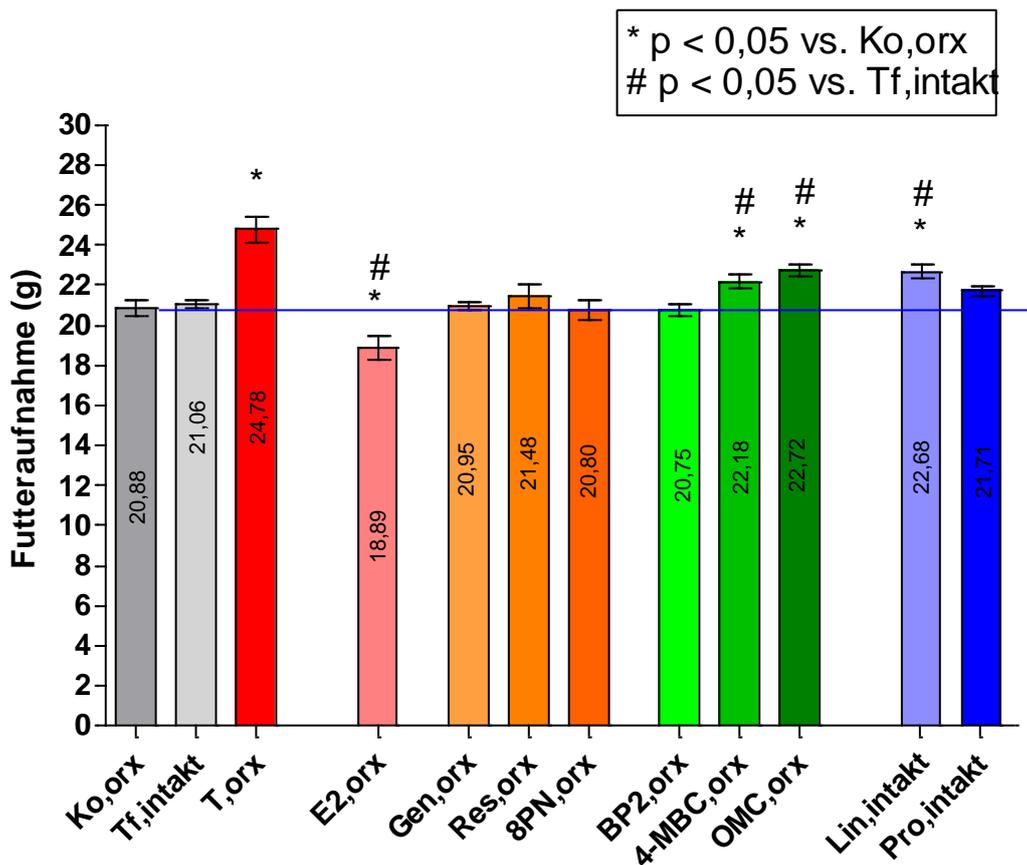


Abbildung 16: Durchschnittliche Futtermittelaufnahme in drei Monaten (post-orch) in g/Tier/Tag (die Daten wurden vom Department für Endokrinologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt), [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC=4-Methylbenzyliden-Camphor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamat-Gruppe; Lin=Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

3.2 Gewichtsentwicklung

Der Versuch dauerte insgesamt ca. 16 Wochen. Während dieser Zeit wurde das Körpergewicht der Versuchstiere insgesamt sechsmal zu bestimmten Zeitpunkten gemessen: Die erste Messung erfolgte während des ersten CT-Scans und stellt den Beginn des Versuchs dar. Die zweite Messung wurde drei Wochen später nach der Orchidektomie (orx) durchgeführt, in den darauffolgenden Monaten wurden die Ratten jeweils einmal pro Monat gewogen. Eine weitere Gewichtsbestimmung erfolgte während des zweiten CT-Scans nach ca. zwölf Wochen, bevor die Tiere ein letztes Mal unmittelbar vor der Obduktion 13 Wochen nach orx und Zufütterung der Testsubstanzen gewogen wurden.

Das durchschnittliche Körpergewicht der Ratten zu Versuchsbeginn betrug 374 ± 11 g. Da alle Tiere bis zur orx alle soja- und testsubstanzfreies Pellet-Futter erhalten hatten, verlief die Gewichtszunahme bei den verschiedenen Substanzgruppen in den ersten drei Versuchswochen bis zu diesem Zeitpunkt ohne signifikante Unterschiede. Erst nach Zugabe der verschiedenen Testsubstanzen konnten unterschiedliche Gewichtsentwicklungen entsprechend der verschiedenen Substanzgruppen festgestellt werden. Dabei zeigte sich, dass die Tiere, die E_2 -haltiges Futter erhalten hatten, eine im Vergleich zu den anderen Substanzgruppen geringere Gewichtszunahme aufwiesen. Ihr mittleres Gewicht gegen Ende des Versuchs betrug ca. 410 g, was eine durchschnittliche Gewichtszunahme von etwa 25 g darstellt. Die Ratten dagegen, die Futter mit Res-Zusatz aufgenommen, sowie diejenigen Ratten, die Gen-haltiges Futter zu sich genommen hatten, wiesen jeweils mit einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von ca. 89 g die im Vergleich zu den anderen Substanzgruppen stärkste Gewichtszunahme auf. Das mittlere Körpergewicht der Res-Gruppe betrug am Ende des Versuchs knapp 480 g. Das mittlere Gewicht der Gen-Gruppe lag bei knapp 450 g. Das Körpergewicht der Ratten der übrigen Substanzgruppen lag am Versuchsende zwischen 431 g und 455 g.

Beim Vergleich der nicht behandelten, intakten Tiere untereinander konnte festgestellt werden, dass sowohl die Tiere, die Lin bekommen hatten als auch die Tiere, die Pro erhalten hatten, signifikant weniger an Gewicht zunahmten als die übrigen, intakten Tiere.

Die orx der Tiere bewirkte mit 66,36 g eine signifikant geringere Gewichtszunahme im Vergleich zu den intakten Tieren mit einer Gewichtszunahme von durchschnittlich 94,75 g. Hierbei wurden nur die Tiere verglichen, die keine Testsubstanzen erhalten hatten (Ko,orx vs. Tf,intakt) (vgl. Abb. 17).

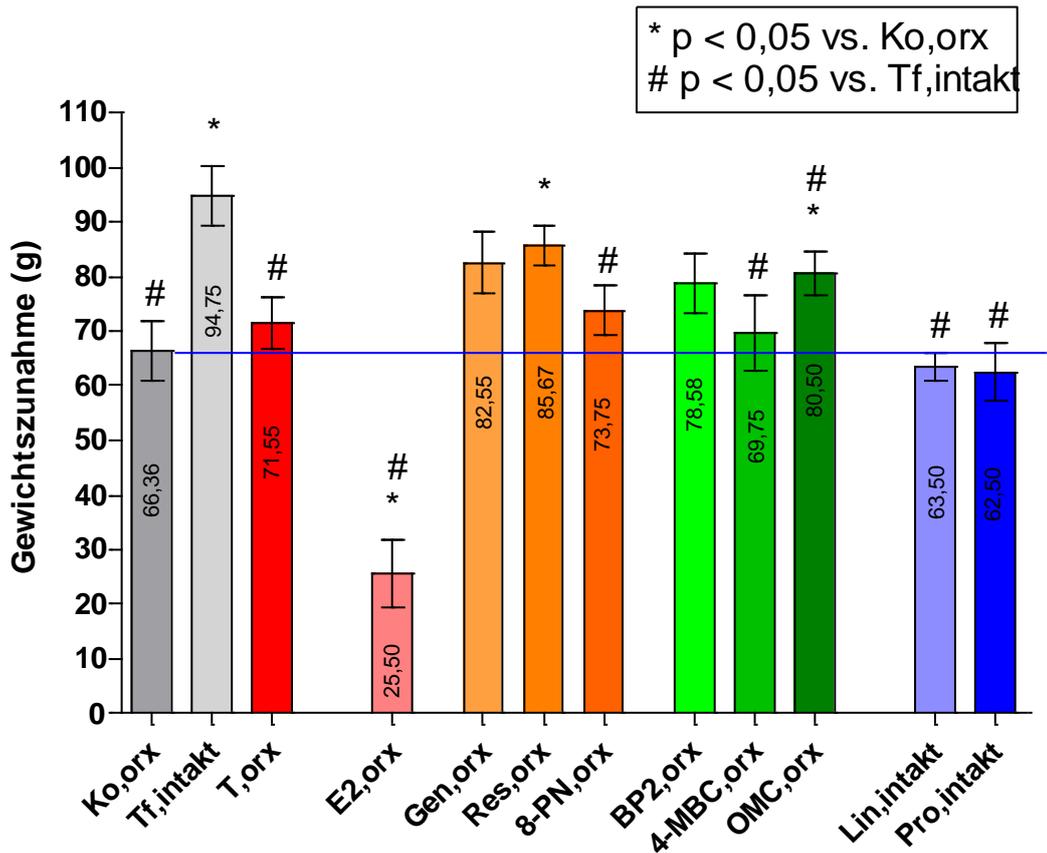


Abbildung 17: Veränderung des Körpergewichts nach drei Monaten Futter- und Substanzaufnahme (die Daten wurden vom Department für Endkriologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt), [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko= Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC=4-Me-thylbenzyliden-Camphor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamate-Gruppe; Lin=Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

3.3 Herzgewichte nach drei Monaten

Tabelle 8 zeigt die absoluten mittleren Herzgewichte nach drei Monaten Futtergabe. Die Werte variieren um Werte zwischen 12,06 g (8-PN,orx) und 17,71 g (Pro,intakt). Das Herzgewicht der orchidektomierten Kontrollgruppe Ko,orx betrug im Mittel 12,10 g.

Tabelle 8: Absolute mittlere Herzgewichte nach drei Monaten Futtergabe (die Daten wurden vom Department für Endkrinologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt), [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC=4-Methylbenzyliden-Camphor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamat-Gruppe; Lin=Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

Substanzgruppe	Herzgewicht (g)	Substanzgruppe	Herzgewicht (g)
Ko,orx	12,10	8-PN,orx	12,06
Tf,intakt	14,73	BP2,orx	14,07
T,orx	15,70	4-MBC,orx	14,24
E ₂ ,orx	13,43	OMC,orx	14,23
Gen,orx	13,38	Lin,intakt	14,72
Res,orx	13,95	Pro,intakt	17,71

In Abbildung 18 ist das Herzgewicht in Relation zum Körpergewicht der jeweiligen Substanzgruppe dargestellt. Die orchidektomierten Tiere, die 8-PN bekommen hatten (8-PN,orx), zeigten hier mit einem Mittelwert von 2,69 % das prozentual geringste Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht. Dieser Wert kommt dem relativen Herzgewicht der orchidektomierten Kontrollgruppe mit 2,74 % sehr nahe. Das größte Herzgewicht in Relation zum Körpergewicht hat die Pro-Substanzgruppe mit 4,13 % im Mittel. Die relativen Herzgewichte der übrigen Substanzgruppen variieren zwischen 2,92 % (Res,orx) und 3,46 % (T,orx).

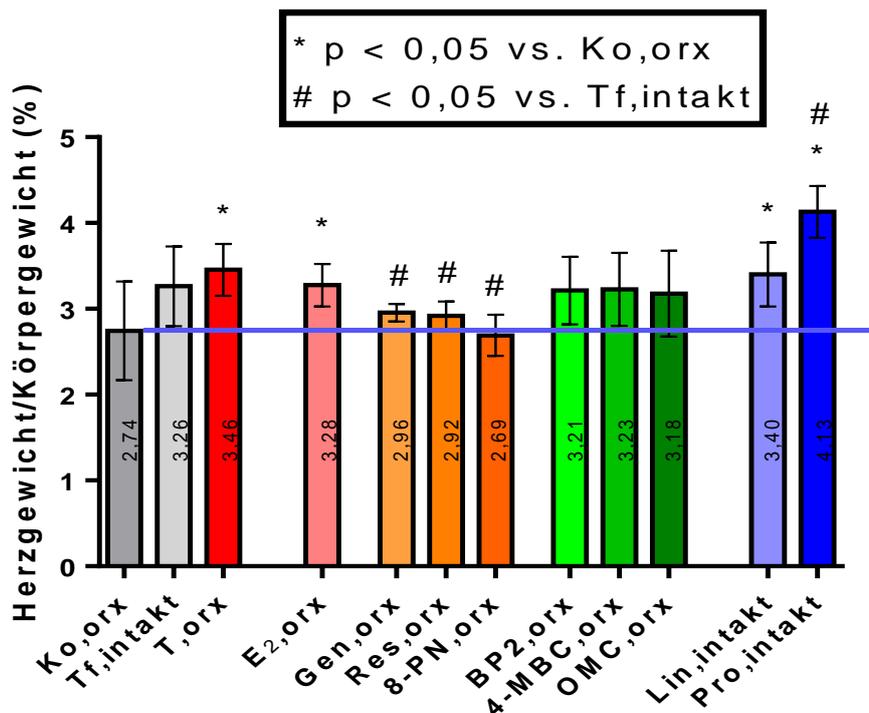


Abbildung 18: Prozentualer Anteil der mittleren Herzgewichte zum mittleren Körpergewicht der einzelnen Substanzgruppen (nach drei Monaten Futter- und Substanzaufnahme) [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=test-substanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC =4-Methylbenzyliden-Camphor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamat-Gruppe; Lin =Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

3.4 Übersicht über die Effekte der zu untersuchenden Testsubstanzen auf die Muskelfaserfläche und den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzmuskels

3.4.1 Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche

Als Kontrollgruppe dienten diejenigen Ratten, die orchidektomiert wurden und sojafreies Futter ohne Testsubstanz erhalten hatten. Bei diesen Kontrolltieren betrug die mittlere Myokardfaserfläche der Herzmuskelfasern 194,6 μm^2 . Signifikant vergrößert waren die Faserflächen bei den orchidektomierten Ratten, die die Testsubstanzen T, E₂, Gen, Res, 8-PN und BP2 aufgenommen hatten, bei den intakten Ratten ohne Substanzzusatz sowie den intakten Ratten der Substanzgruppen Lin und Pro. Dabei war die mittlere Myokardfaserfläche der intakten Lin-Gruppe mit 254,6 μm^2 am größten. Insgesamt variierten die signifikant vergrößerten Faserflächen in einem Bereich zwischen 218,4 μm^2 (E₂,orx) und 254,6 μm^2 (Lin,intakt). Die

Muskelfaserflächen der orchidektomierten Ratten, die 4-MBC und OMC erhalten hatten, waren nicht signifikant verändert (vgl. Abb. 19).

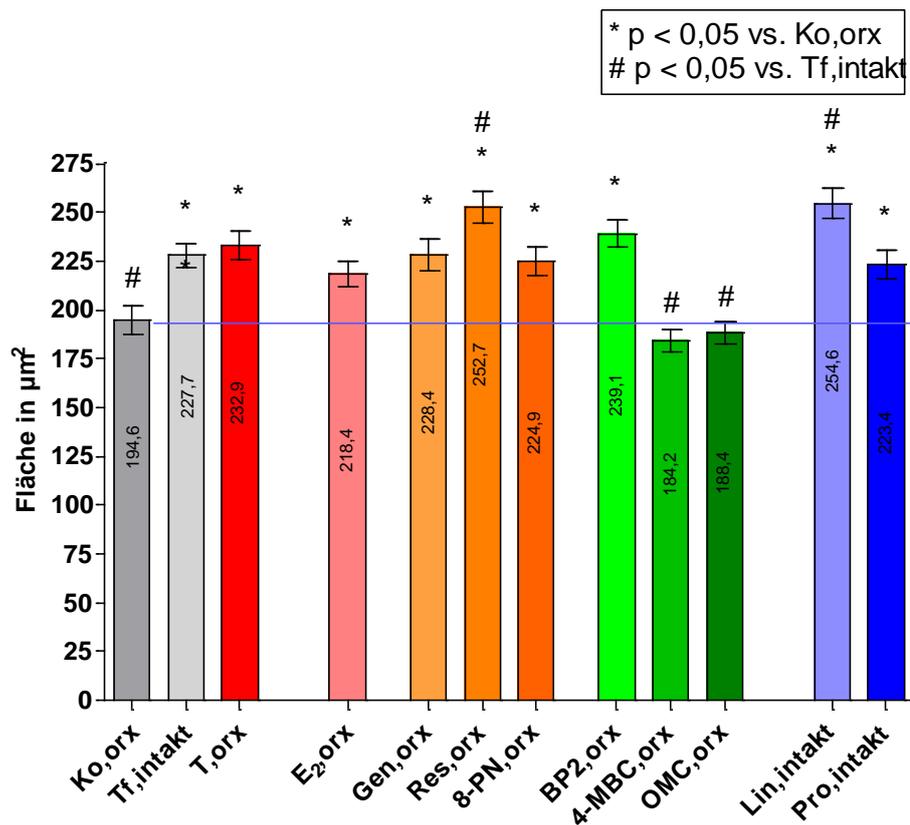


Abbildung 19: Die Effekte der Testsubstanzen (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf die Muskelfaserfläche des Herzens [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC=4-Methylbenzyliden-Camphor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamate-Gruppe; Lin=Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

3.4.2 Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens

Bei der Messung des Anteils der proliferativen Zellen des Herzmuskels zeigte sich, dass alle Testsubstanzgruppen bis auf die 8-PN-Gruppe einen erheblich geringeren Anteil an proliferativen Zellen aufwiesen als die orchidektomierte Kontrollgruppe mit einem Anteil von 6,5 %. Mit der Ausnahme der 8-PN-Substanzgruppe, deren Anteil an proliferativen Herzmuskelzellen sich nur sehr wenig verringerte (6,2 %), sank der Anteil an proliferativen Zellen bei den anderen Testsubstanzgruppen auf Werte zwischen 1,6 % (4-MBC-Gruppe) und 3,0 % (Gen,orx-Gruppe) ab (vgl. Abb. 20).

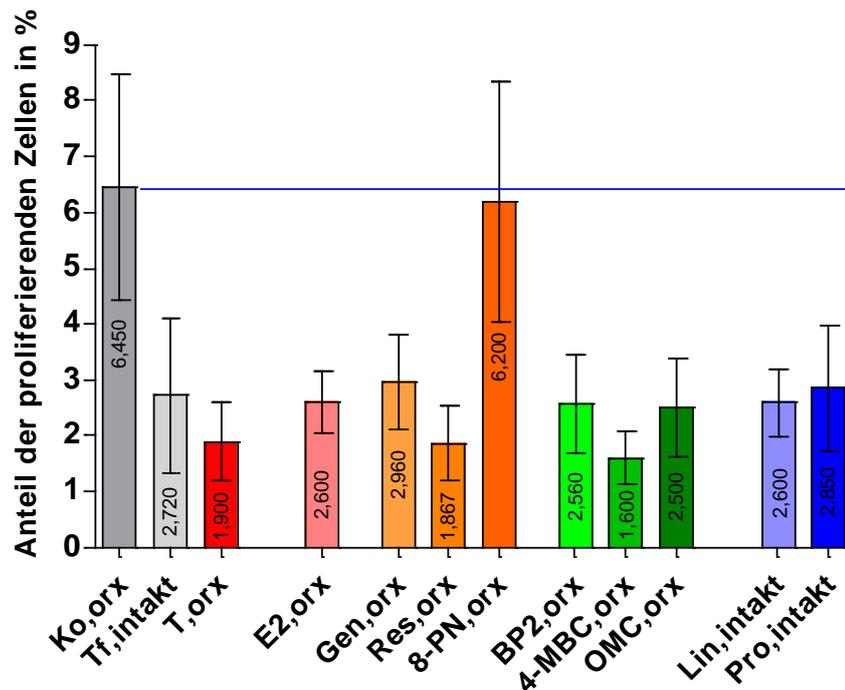


Abbildung 20: Die Effekte der Testsubstanzen (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzmuskels [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC=4-Methylbenzyliden-Camphor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamat-Gruppe; Lin=Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

Im Folgenden wird dieselbe Abbildung mehrfach gezeigt, die relevanten Substanzgruppen sind jeweils farblich hervorgehoben.

3.5 Die Effekte der Orchidektomie (orx) sowie von Testosteron (T) und Resveratrol (Res)

3.5.1 Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche

Es zeigte sich, dass im Vergleich zur orchidektomierten Kontrollgruppe (Ko,orx) die Myokardfaserfläche der intakten Tiere der Tf,intakt-Gruppe mit 227,7 μm^2 signifikant vergrößert waren. Die Zufütterung sowohl mit T-haltigem als auch mit Res-haltigem Futter führte ebenfalls zu einer signifikanten Vergrößerung der Muskelfaserfläche. Die Faserfläche der mit T gefütterten Tiere betrug 232,9 μm^2 , die der Res-Gruppe sogar 252,7 μm^2 . Die Gabe von Res bewirkte also auch eine signifikante Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche im Vergleich zur intakten Gruppe Tf,intakt (vgl. Abb. 21).

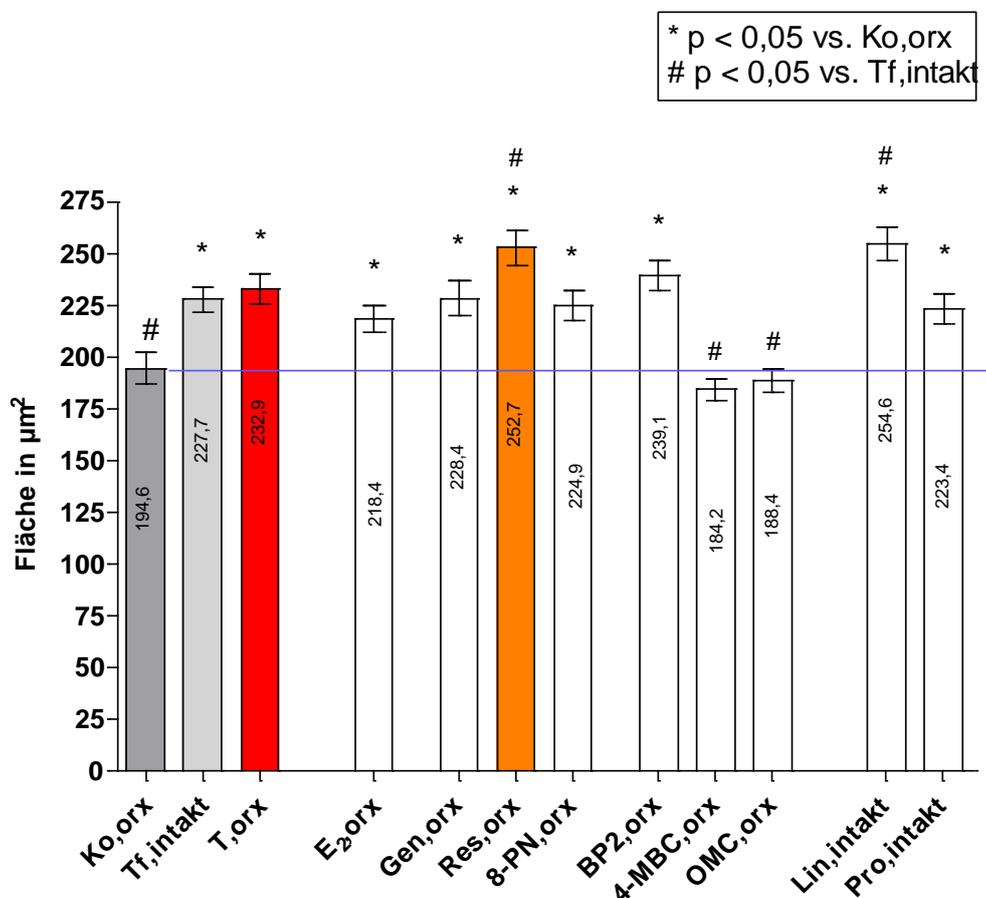


Abbildung 21: Die Effekte der Orchidektomie sowie von Testosteron und Resveratrol (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf die Muskelfaserfläche des Herzens [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; Res= Resveratrol-Gruppe]

3.5.2 Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens

Die orx bewirkte einen Anstieg der Anzahl an proliferativen Zellen von einem prozentualen Wert von 2,7 % der intakten Gruppe Tf,intakt auf 6,5 % (Ko,orx). Die Zufütterung von T führte zu einem Rückgang des Anteils an proliferativen Zellen auf einen Wert von 1,9 %. Ähnlich wie T verhält sich auch Res: Diese Substanzgruppe weist eine Verringerung der proliferativen Zellen auf 1,9 % auf (vgl. Abb. 22).

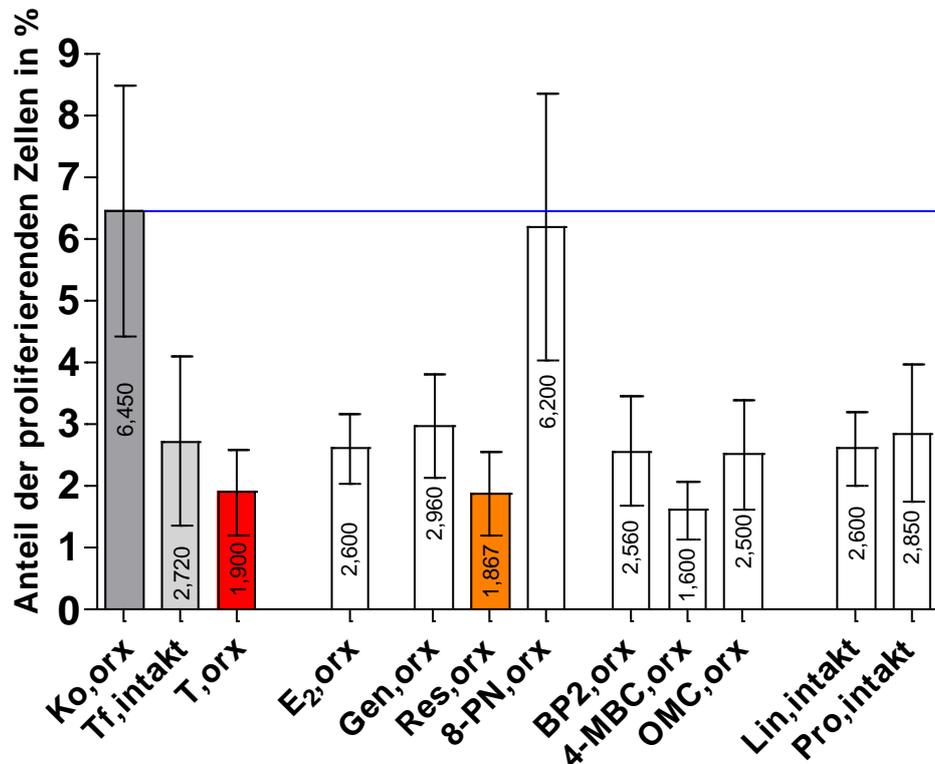


Abbildung 22: Die Effekte der Orchidektomie sowie von Testosteron und Resveratrol (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzmuskels [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe]

3.6 Die Effekte der Orchidektomie (orx) sowie von Östradiol (E₂) und Genistein (Gen)

3.6.1 Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche

Die orx bewirkte eine signifikante Verringerung der Herzmuskelfaserfläche von einem Ausgangswert von 227,7 μm^2 (Tf,intakt) auf 194,6 μm^2 . Die Zufütterung von E₂ und Gen führte zu einem Wiederanstieg der Myokardfaserfläche auf Werte von 218,4 μm^2 (E₂) und 228,4 μm^2 (Gen) (vgl. Abb. 23).

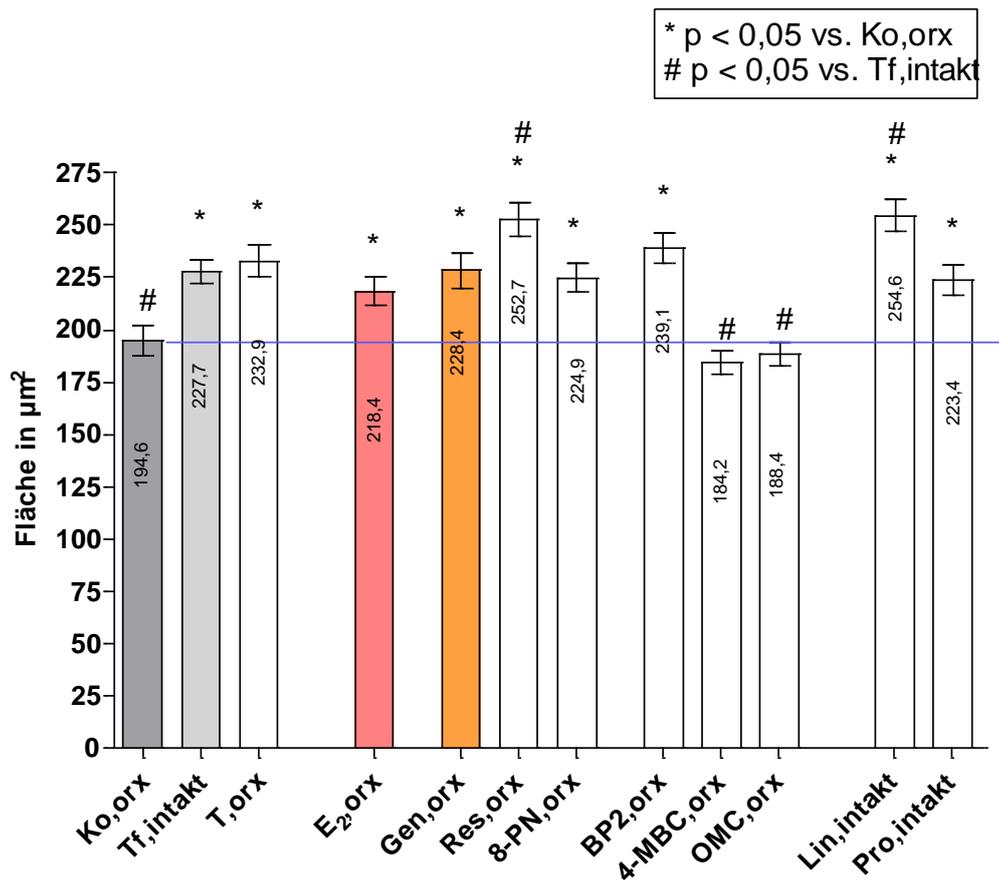


Abbildung 23: Die Effekte der Orchidektomie sowie von Östradiol und Genistein (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf die Muskelfaserfläche des Herzens [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen= Genistein-Gruppe]

3.6.2 Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens

Auch bei Betrachtung der proliferierenden Herzmuskelzellen zeigte sich, dass sowohl E₂ als auch Gen den Effekt der orx, also die Vermehrung der proliferativen Zellen (Ko,orx: 6,5 %), wieder rückgängig machten. E₂ senkte den Anteil an proliferativen Zellen auf 2,6 %, Gen auf 3,0 % (vgl. Abb. 24).

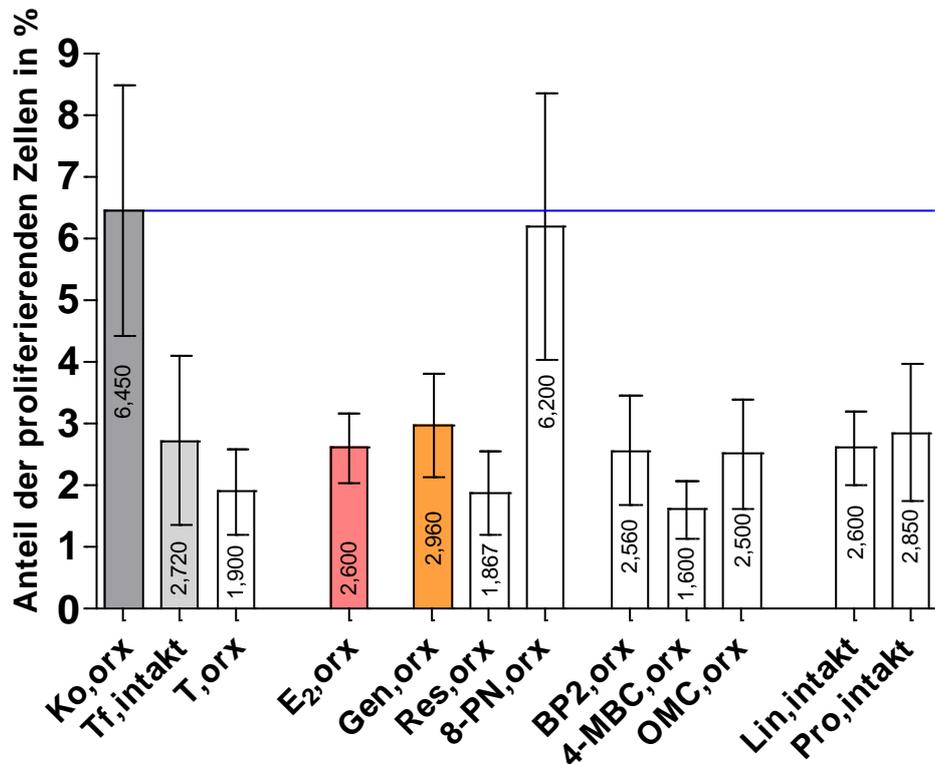


Abbildung 24: Die Effekte der Orchidektomie sowie von Östradiol und Genistein (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzmuskels [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen= Genistein-Gruppe]

3.7 Die Effekte der Phytoöstrogene Genistein (Gen), Resveratrol (Res) und 8-Prenylnaringenin (8-PN)

3.7.1 Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche

Die drei Testsubstanzen Gen, Res und 8-PN führten alle zu einer signifikanten Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche bei den jeweiligen Substanzgruppen im Vergleich zur orchidektomierten Kontrollgruppe (Ko,orx). Dabei hat Res den größten Effekt unter den drei Testsubstanzen. Hier betrug die mittlere Muskelfaserfläche nach drei Monaten Zufütterung mit Res 252,7 μm^2 . Gen bewirkte eine Vergrößerung auf 228,4 μm^2 , 8-PN eine Vergrößerung auf 224,9 μm^2 . Der Kontrollwert beträgt 194,6 μm^2 (vgl. Abb. 25).

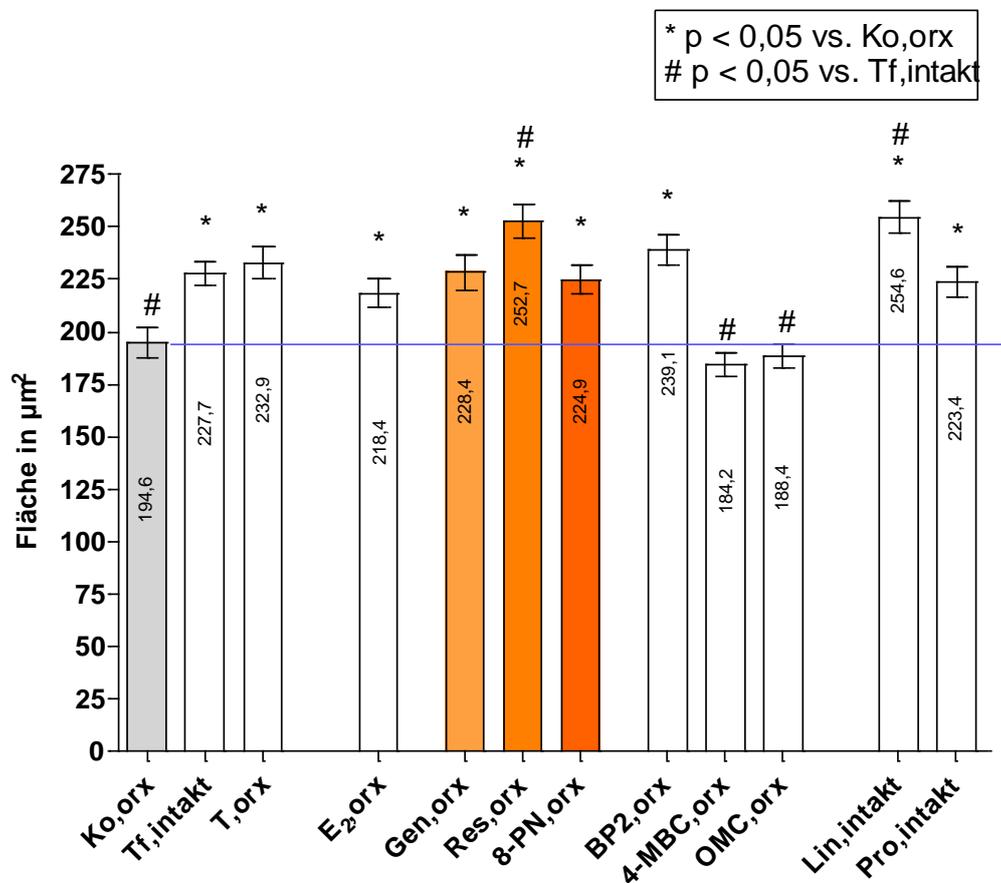


Abbildung 25: Die Effekte von Genistein, Resveratrol und 8-Prenylnaringenin (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf die Muskelfaserfläche des Herzens [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Ko=Kontrollgruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe]

3.7.2 Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens

Die beiden Testsubstanzen Gen und Res senkten mit Werten von 3,0 % (Gen) und 1,9 % (Res) den Anteil der proliferierenden Zellen tendenziell, wohingegen 8-PN im Vergleich dazu nur eine sehr geringe Wirkung auf den Anteil der proliferierenden Herzmuskelzellen hatte. Die Tiere, die mit 8-PN-haltigem Futter gefüttert worden waren, hatten am Ende des Versuchs einen Anteil an proliferierenden Herzmuskelzellen von 6,2 %. Die orchidektomierte Kontrollgruppe zeigte einen Anteil an proliferierenden Zellen von 6,5 % (vgl. Abb. 26).

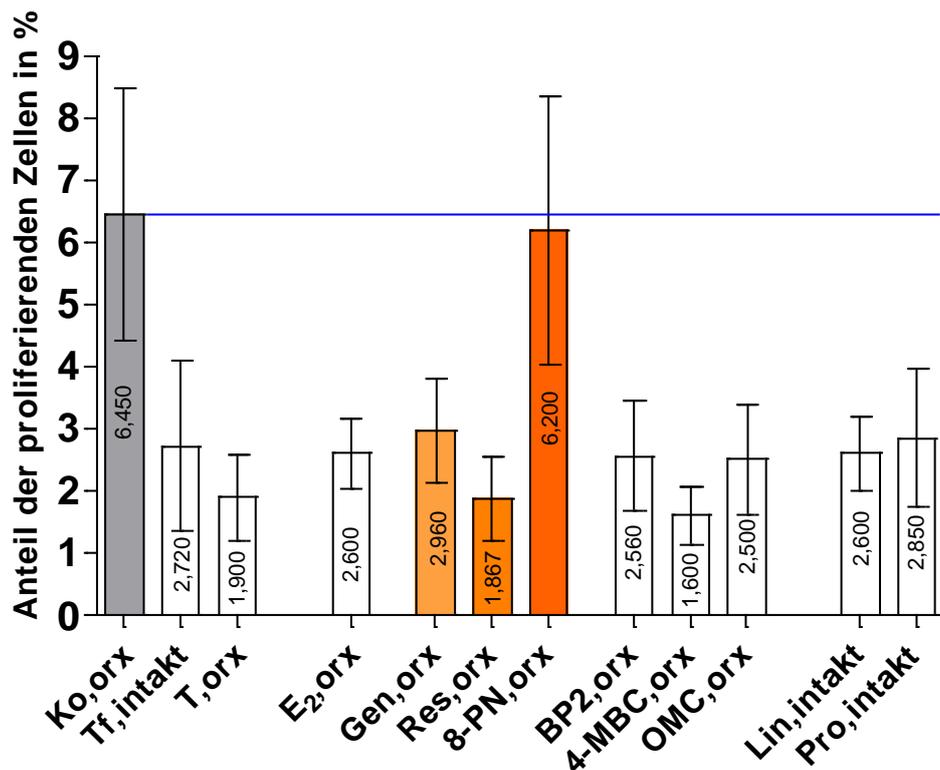


Abbildung 26: Die Effekte von Genistein, Resveratrol und 8-Prenylnaringenin (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzmuskels [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Ko=Kontrollgruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe]

3.8 Die Effekte der UV-Filter-Substanzen Benzophenon-2 (BP2), 4-Methyl- benzyliden-Camphor (4-MBC) und Octylmethoxycinnamat (OMC)

3.8.1 Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche

Die Messung des Effekts dieser drei Testsubstanzen zeigte, dass 4-MBC und OMC keine signifikante Wirkung auf die Faserfläche des Herzmuskels verglichen mit der Kontrollgruppe Ko,orx hatten. Sie verringerten die Faserfläche von 194,6 μm^2 (Ko,orx) auf 184,2 μm^2 (4-MBC) bzw. 188,4 μm^2 (OMC). Lediglich die Zufütterung mit BP2 führte bei den jeweiligen Versuchstieren zu einer signifikanten Vergrößerung der Myokardfaserfläche auf 239,1 μm^2 (vgl. Abb. 27).

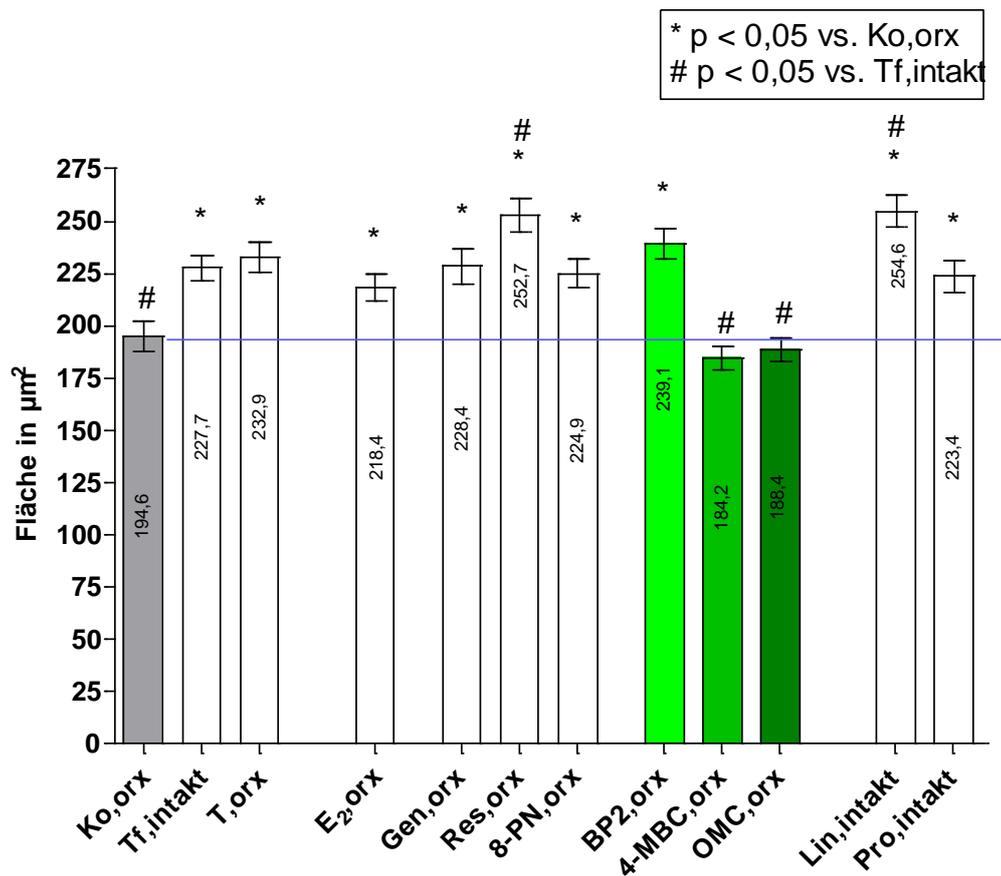


Abbildung 27: Die Effekte von Benzophenon-2, 4-Methylbenzyliden-Camphor und Octylmethoxycinnamate (nach dreimonatiger Zufütterung über das Futter) auf die Muskelfaserfläche des Herzens [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Ko=Kontrollgruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC=4-Methylbenzyliden-Camphor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamate-Gruppe]

3.8.2 Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens

Bei der Untersuchung des Anteils der proliferierenden Zellen des Herzmuskels führten alle drei Testsubstanzen zu einer Verringerung der proliferierenden Zellen im Vergleich zur orchidektomierten Kontrollgruppe. Dabei senkte 4-MBC den Anteil an proliferierenden Zellen mit 1,6 % am Ende des Versuchs am stärksten, gefolgt von BP2 mit 2,6 % und OMC mit 2,5 % (vgl. Abb. 28).

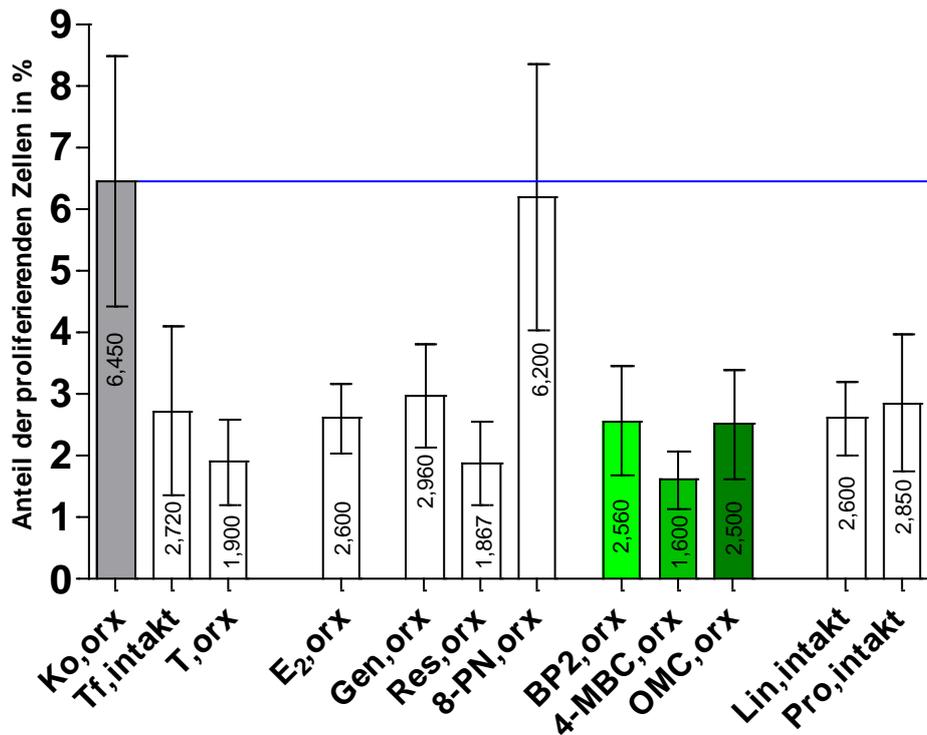


Abbildung 28: Die Effekte von Benzophenon-2, 4-Methylbenzyliden-Camphor und Octylmethoxycinnamate (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzmuskels [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Ko=Kontrollgruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC=4-Methylbenzyliden-Camphor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamat-Gruppe]

3.9 Die Effekte der Pestizide Linuron (Lin) und Procymidon (Pro)

Zur Untersuchung des Effekts der Testsubstanzen Lin und Pro wurden nur intakte Tiere verwendet. Als Kontrollgruppe dienen hier die intakten Tiere der Tf,intakt-Gruppe mit einer mittleren Myokardfaserfläche von $227,7 \mu\text{m}^2$.

3.9.1 Die Effekte auf die Herzmuskelfaserfläche

Die Testsubstanz Lin bewirkte im Vergleich dazu eine signifikante Vergrößerung der Myokardfaserfläche des Herzens. Nach drei Monaten Substanzzufütterung betrug in dieser Gruppe die Muskelfaserfläche im Mittel $254,6 \mu\text{m}^2$. Pro dagegen hatte keinen wesentlichen Einfluss auf die Faserfläche des Herzmuskels. Vergleicht man jedoch die beiden intakten Substanzgruppen Lin,intakt und Pro,intakt mit der orchidektomierten Kontrollgruppe Ko,orx ($194,6 \mu\text{m}^2$), dann wiesen beide Gruppen eine signifikante Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche auf (vgl. Abb. 29).

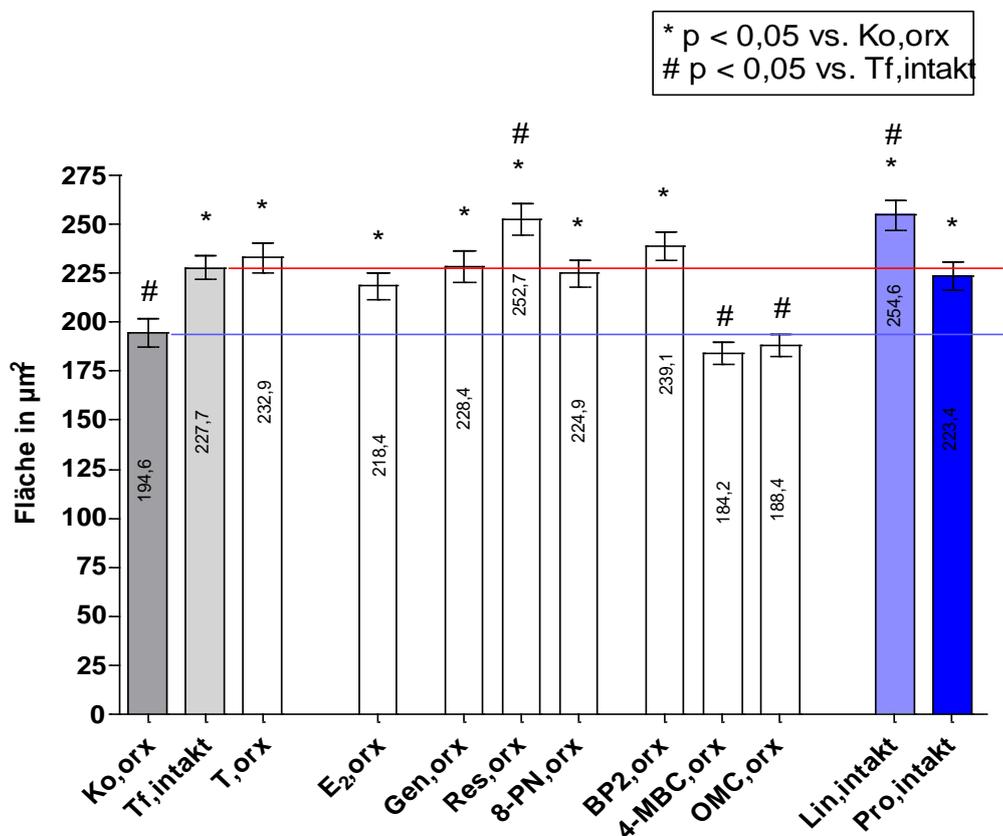


Abbildung 29: Die Effekte von Linuron und Procymidon (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf die Muskelfaserfläche des Herzens [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; Lin=Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

3.9.2 Die Effekte auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens

Bei der Auszählung der proliferierenden Herzmuskelzellen zeigte sich, dass die Werte der beiden Substanzgruppen mit 2,6 % (Lin,intakt) bzw. 2,9 % (Pro,intakt) nur geringfügig vom Kontrollwert der intakten Gruppe Tf,intakt abwichen (2,7 %). Die orchidektomierte Kontrollgruppe (Ko,orx) wies mit 6,5 % einen sehr viel höheren Anteil an proliferierenden Zellen auf (vgl. Abb. 30).

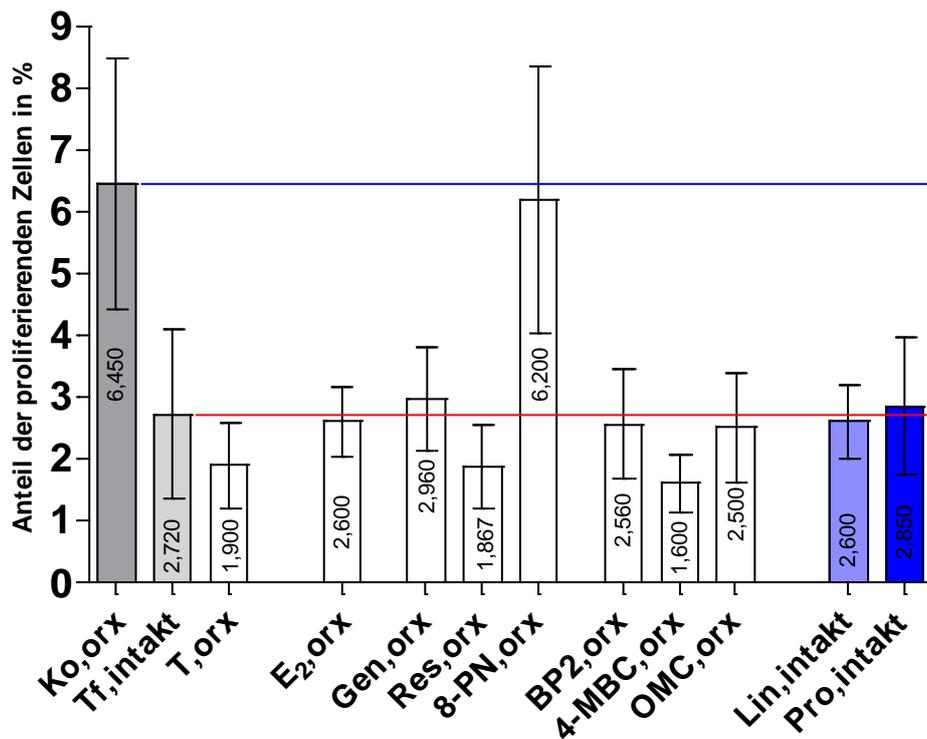


Abbildung 30: Die Effekte von Linuron und Procymidon (nach dreimonatiger Zuführung über das Futter) auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzmuskels [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; Lin=Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

4 Diskussion

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde u.a. die Frage gestellt, ob und wenn ja, in welchem Ausmaß ED Auswirkungen auf den Herzmuskel haben. Untersucht wurde einerseits der Effekt der ED auf die Herzgewichte sowie Faserfläche des Herzmuskels, andererseits auf die Anzahl der proliferierenden Zellen des Herzmuskels. Dabei ist eine Vergrößerung der Muskelfaserfläche gleichbedeutend mit einer Herzhypertrophie, welche als Hauptrisikofaktor für Herzversagen gilt, aber auch physiologisch bei Sportlern durch körperliches Training auftreten kann. Eine Erhöhung der Anzahl an proliferierenden Zellen steht dagegen für eine Herzhyperplasie, also die Zunahme der Herzmasse durch Zellvermehrung, welche eine gewisse Regenerationsfähigkeit der Herzmuskelzellen annehmen lässt. Die Daten der einzelnen Herzgewichte sowie der Körpergewichte und die Futteraufnahme der jeweiligen Testsubstanzgruppen, die für die Interpretation und das Verständnis der Ergebnisse notwendig sind, wurden von einer Mitarbeitergruppe des Departments für Endokrinologie der Universität Göttingen erhoben und zur Verfügung gestellt.

Die vorliegende Arbeit hat gezeigt, dass sich die untersuchten ED, wie erwartet, auf den Herzmuskel der orchidektomierten Ratte ausgewirkt und Veränderungen am Herzmuskel hervorgerufen haben. Im Hinblick auf die möglichen Auswirkungen auf das Herz, wie die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Variablen Hypertrophie („Zunahme der Muskelfaserfläche“) und Hyperplasie („Zunahme der proliferierenden Zellen“) und der jeweiligen Folgen bzw. Risiken, ist diese Erkenntnis von zentraler Bedeutung.

Um jedoch die Wirkung der ED auf die beiden Zielvariablen diskutieren zu können, werden im Folgenden zunächst der Einfluss der ED auf den Futterverbrauch und der mit dem Futter aufgenommenen Testsubstanzmenge sowie die Gewichtsentwicklung und die Herzgewichte besprochen, da die beiden untersuchten Zielvariablen Größe der Muskelfaserfläche und Anzahl der proliferierenden Zellen von diesen drei Größen beeinflusst werden.

4.1 Futtermittelverbrauch

Da die Testsubstanzen in festgelegten Dosen nicht injiziert, sondern von den Tieren selbst über die Nahrung aufgenommen werden müssen, stellt sich zunächst die Frage, ob die verschiedenen Testsubstanzen auch Einfluss auf das Fressverhalten und damit den Futtermittelverbrauch und die Gewichtsentwicklung haben. Ein Tier, dessen Appetit durch eine im Futter vorhandene Testsubstanz gesteigert wird, frisst mehr von dem Futter und nimmt folglich auch mehr von der Substanz zu sich.

Soja ist aufgrund seines relativ hohen Eiweißgehaltes häufig Bestandteil von Tierfutter. Da Soja aber nachweislich auch hohe Konzentrationen an Phytoöstrogenen, insbesondere Isoflavonen, enthält (Geller und Studee 2005) und somit östrogene Wirkungen hervorrufen könnte, wurden alle Tiere mit sojafreiem Pellet-Futter gefüttert. So konnten gleiche Ausgangsbedingungen für alle Versuchstiere geschaffen werden. Nach der Zugabe der verschiedenen Testsubstanzen zu dem sojafreien Basisfutter stellte sich heraus, dass das T-haltige Futter mit Abstand am meisten verbraucht wurde. Dies lässt eine appetitsteigernde Wirkung des T vermuten. Tatsächlich wird T und sein aktiver Metabolit DHT in der Therapie der Kachexie eingesetzt (Thum und Springer 2011, Gullet et al. 2010). Beide Substanzen binden an den AR und rufen anabole Wirkungen in vielen Organen, u.a. in Herz, Leber, Knochen und im Skelettmuskel hervor (Lee und MacLean 2011, Thum und Springer 2011, Mulligan und Schambelan 2002). Ein appetitsteigernder Effekt der Androgene wird nicht beschrieben.

Die Tiere dagegen, die E_2 -haltiges Futter bekamen, nahmen am wenigsten Futter zu sich. In einigen Nagetier-Modellen konnte gezeigt werden, dass Östrogene den Appetit über verschiedene Mechanismen senken (Palmer und Gray 1986, McCaffrey und Czaja 1989, Santollo et al. 2007, Gao et al. 2007, Butera und Czaja 1984). Bei Frauen ist die Energieaufnahme v.a. in Form von Fetten um den Eisprung herum am niedrigsten. In diesem Zeitraum ist der Östrogenspiegel am höchsten (Johnson et al. 1994). Die Effekte von E_2 auf das Fressverhalten männlicher Versuchstiere oder Menschen werden dagegen in der Literatur nicht beschrieben.

4.2 Gewichtsentwicklung

Die erste Messung des Gewichts erfolgte während des ersten CT-Scans und betrug im Mittel 374 ± 11 g. Da alle Tiere bis zur orx soja- und testsubstanzfreies Pellet-Futter erhalten hatten, verlief die Gewichtszunahme in den ersten drei Versuchswochen bis zu diesem Zeitpunkt ohne signifikante Unterschiede. Erst nach Zugabe der verschiedenen Testsubstanzen zum sojafreien Basisfutter konnten unterschiedliche Gewichtsentwicklungen bei den Tieren der unterschiedlichen Testgruppen festgestellt werden. Dabei fiel auf, dass die Tiere, die E_2 -haltiges Futter erhalten hatten, signifikant weniger an Gewicht zunahmten als die Tiere der anderen Gruppen. Diese Beobachtung korreliert mit der signifikant geringeren Futteraufnahme der E_2 -Substanzgruppe. Die Tiere, die am stärksten an Gewicht zunahmten, sind die Res- und die Gen-Testgruppe. Beide Substanzen gehören zu den Phytoöstrogenen und sind in der Lage, an die ER zu binden. Dadurch rufen sie östrogenähnliche Wirkungen hervor und es ist auf den ersten Blick unverständlich, dass sie die Gewichtsentwicklung betreffend so stark von der Wirkung des E_2 abweichen. Eine Studie konnte allerdings zeigen, dass sich Gen erstens geschlechtsspezifisch und zweitens dosisabhängig auf das Fettgewebe auswirkt. So verhinderten im Mausmodell hohe Dosen von Gen das Ansetzen von Fettgewebe, während geringe Dosen – vor allem bei den Männchen - die Fettablagerung begünstigten (Penza et al. 2006). Ob die Gewichtszunahme bei den für die vorliegende Arbeit untersuchten Tieren tatsächlich durch eine Zunahme des Fettgewebes zustande kam, wurde allerdings nicht geklärt. Bezüglich des Res wird in der Literatur die Verringerung der Gewichtszunahme durch Eingriff in die Adipogenese beschrieben. Allerdings wurden die Versuche lediglich bei ovariektomierten weiblichen Tieren durchgeführt (Lai et al. 2011, Rayalam et al. 2011, Kim et al. 2011, Baile et al. 2011). Studien zum Einfluss von Res auf das Gewicht bei männlichen Tieren liegen nicht vor. Die orx der Tiere bewirkte eine signifikant geringere Gewichtszunahme im Vergleich zu den intakten Tieren Tf,intakt. Dieses Ergebnis ist vereinbar mit der Tatsache, dass T anabole Wirkungen besitzt und infolge der orx in erheblich geringerem Maße gebildet wird als bei den intakten Tieren. Die Zugabe von T zu dem Basisfutter führte bei den orx-Tieren zwar zu einer stärkeren Gewichtszunahme als bei den orx-Tieren ohne T-Zugabe, eine Zunahme wie bei den intakten Tieren der Tf,intakt-Gruppe konnte allerdings nicht erzielt werden.

Hauptaugenmerk der vorliegenden Arbeit liegt jedoch auf den Auswirkungen der ED auf den Herzmuskel orchidektomierter Ratten. Durch das Vorhandensein der ER und AR in kardialen Myozyten und Fibroblasten kann davon ausgegangen werden, dass auch ED prinzipiell in der Lage sind, direkt auf den Herzmuskel Einfluss zu nehmen. Inwiefern sie Einfluss auf den Herzmuskel nehmen und welche Auswirkungen das auf die Gesundheit des Menschen haben kann, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Desweiteren soll geklärt werden, ob die Wirkungen der ED in bestimmten Lebensphasen, wie der Andropause des Mannes, in positiver Weise genutzt werden können.

4.3 Herzgewichte nach drei Monaten

Drei Monate nach Zugabe der Testsubstanzen wurde das Herzgewicht der Tiere gemessen. Aussagekräftiger als das absolute Herzgewicht ist das relative Herzgewicht, also das Herzgewicht im Verhältnis zum Körpergewicht der Ratten. Da das Herzgewicht in engem Zusammenhang mit einer Herzhypertrophie oder -hyperplasie steht, werden die Ergebnisse der Messung des Herzgewichts weiter unten im Kontext mit den Ergebnissen der Messung der Myokardfaserfläche und der Proliferationsaktivität besprochen.

4.4 Die Effekte der verschiedenen Testsubstanzen auf die Muskelfaserfläche des Herzens

Als Kontrollgruppe dienten die orchidektomierten Ratten, denen lediglich das sojafreie Basisfutter ohne Zugabe einer Testsubstanz zur Verfügung stand. Diese Gruppe stellt das Modell für den Mann in der Andropause dar. Durch die orx wird den Tieren der Hauptbildungsort des männlichen Sexualhormons T entfernt. Beim Mann in der sog. „Andropause“ kommt es ebenfalls zu einer Abnahme der Gonadenfunktion und damit zu einem Absinken des T-Spiegels (Vermeulen 2000).

Es fällt auf, dass fast alle Testgruppen sowie die intakten Tiere der Tf,intakt-Gruppe eine signifikante Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche im Vergleich zur orchidektomierten Kontrollgruppe (Ko,orx) zeigten. Lediglich bei der 4-MBC- und die OMC-Testgruppe waren die Myokardfaserflächen nicht signifikant verändert. Bei beiden Substanzgruppen lagen die Muskelfaserflächen im Mittel etwas unter der

mittleren Faserfläche der Kontrollgruppe. Dies lässt darauf schließen, dass sich bis auf die beiden Testgruppen, die keine signifikante Wirkung am Herzen erzielten, alle Substanzen auf die Muskelfaserfläche des Herzens auswirken und potenziell in der Lage sind, eine Hypertrophie des Herzmuskels zu bewirken. Vergleicht man die intakte, unbehandelte und die orchidektomierte Kontrollgruppe miteinander, so stellt man fest, dass die orx bei den Tieren zu einer Verkleinerung der Herzmuskelfaserfläche geführt hat. Dieser Effekt blieb nur bei den 4-MBC- und OMC-Testgruppen unbeeinflusst. Alle anderen Substanzen führten zu einer signifikanten Vergrößerung der Herzmuskelfaserflächen.

4.5 Die Effekte der verschiedenen Testsubstanzen auf den Anteil der proliferierenden Zellen des Herzens

Auch bei der Messung des Anteils an proliferierenden Zellen erzielten fast alle Substanzen einen Effekt am Herzen. Bis auf die 8-PN-Substanzgruppe zeigen alle Gruppen sowie die Tf,intakt-Gruppe einen erheblich geringeren Anteil an proliferierenden Zellen als die orchidektomierte Kontrollgruppe. Auch dieses Ergebnis spricht dafür, dass bis auf 8-PN alle Substanzen eine Wirkung auf die Proliferationsaktivität des Herzmuskels haben. Die orx der Tiere führte also zu einem Anstieg der proliferierenden Zellen. Dieser Effekt wurde ausschließlich von 8-PN nicht verändert. Durch alle anderen Substanzen wurde nach orx der Tiere die Anzahl an proliferierenden Zellen verringert. 8-PN hat bekanntermaßen eine starke östrogene Wirkung (s. 1.4.3.3). Diese konnte in der vorliegenden Arbeit bezüglich der Anzahl der proliferierenden Zellen der Herzmuskelfaser nicht nachgewiesen werden. Weitere Arbeiten über die Wirkung von 8-PN auf die Proliferationsfähigkeit von Herzmuskelfaserzellen sind bislang nicht veröffentlicht.

4.6 Die Effekte der Orchidektomie (orx) sowie von Testosteron (T) und Resveratrol (Res) auf das Herz

Die orchidektomierte Kontrollgruppe (Ko,orx) zeigte im Mittel signifikant kleinere Herzmuskelfaserflächen im Vergleich zur intakten, nicht behandelten Gruppe (Tf,intakt). Die orx führt also zu einer signifikanten Verkleinerung der Muskelfaserfläche. Passend zu diesem Ergebnis lag das mittlere relative Herzgewicht (Herzgewicht/Körpergewicht) der Ko,orx mit 2,74 % zwar nicht signifikant, aber

deutlich unter dem relativen Herzgewicht der Tf,intakt (3,26 %). Es ist also anzunehmen, dass es durch die orx zu einer Abnahme des relativen Herzgewichtes durch Verkleinerung der Muskelfaserfläche kommt. Dieser Effekt kann durch die Zugabe von T aufgehoben werden. T ist in der Lage, über den AR direkt auf die Herzmuskelzellen einzuwirken und so einer Hypotrophie am Herzmuskel entgegenzuwirken (Marsh et al. 1998). Die Zugabe von T zum Basisfutter führte zu einer ähnlich großen Muskelfaserfläche wie die der intakten Gruppe Tf,intakt (T,orx $232,9 \mu\text{m}^2$, Tf,intakt $227,7 \mu\text{m}^2$) und damit auch zu einem ähnlich hohen relativen Herzgewicht (T,orx 3,46 %, Tf,intakt 3,26 %). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die orx tatsächlich zu einem Absinken des T-Spiegels geführt hat und die orchidektomierte Kontrollgruppe als Modell für den Mann in der Andropause geeignet ist.

Fraglich bleibt, ob eine Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche erstrebenswert ist oder ein Risiko für das Entstehen einer Herzinsuffizienz darstellt. Die Herzhypertrophie ist dann erstrebenswert, wenn sie unter physiologischen Bedingungen zustande kommt, beispielsweise durch körperliches Training. In diesem Falle kommt es zu einer konzentrischen Hypertrophie und damit zu einer Zunahme der Herzkraft, ohne Merkmale einer pathologischen Herzhypertrophie wie fibrotische Veränderungen im Herzmuskelgewebe hervorzurufen. In dieser Studie wurden allerdings lediglich die Muskelfaserflächen der Herzmuskelzellen gemessen. Eine Aussage darüber, ob es sich um eine pathologische oder physiologische, also gewünschte Herzhypertrophie handelt, ist deshalb nicht eindeutig zu treffen. Allerdings kommt die Herzmuskelfaserfläche im Mittel bei Zugabe von T dem Wert der intakten Tiere der Tf,intakt-Gruppe sehr nahe und es ist davon auszugehen, dass die Myokardfaserflächen der intakten Gruppe im physiologischen Bereich liegen. Folglich führt die Zugabe von T zu einer Vergrößerung der Herzmuskelfasern, die als physiologisch anzusehen ist. Diese Erkenntnis deckt sich mit den Ergebnissen einer früheren Studie, bei der der Effekt von T auf den Herzmuskel männlicher Ratten nach Myokardinfarkt untersucht wurde (Nahrendorf et al. 2003). Übertragen auf den Menschen würde dies bedeuten, dass eine Hormonersatztherapie in der Andropause zu einer physiologischen Herzhypertrophie und damit einer Steigerung der Herzkraft des Mannes beitragen könnte. In Kombination mit starkem körperlichen Training konnte allerdings beobachtet werden, dass die exogene Zufuhr anabolisch-androgener

Steroide zu einer pathologischen Herzhypertrophie und plötzlichem Herztod führen kann (Riezzo et al. 2011, Nascimento und Medei 2011, Sullivan et al. 1998).

Auch bezüglich der Proliferationsaktivität der Herzmuskelzellen ist T in der Lage, die Wirkung der orx wieder rückgängig zu machen. Die orx der Ratten führt zu einer starken Erhöhung der Anzahl an proliferierenden Herzmuskelzellen. Ein Effekt, der prinzipiell als positiv anzusehen ist, da diese Zellen potenziell in der Lage sind, sich im Falle eines Herzmuskelschadens zu erneuern. Die Erhöhung der Anzahl an proliferierenden Zellen durch die orx hat allerdings nicht zu einer Zunahme des prozentualen Anteils des Herzgewichts am Körpergewicht geführt. Dieser ist durch die gleichzeitige Verkleinerung der Muskelfaserfläche des Herzens durch die orx deutlich geringer als der der Tf,intakt. Durch Zugabe von T zum Basisfutter konnte mit einem Anteil von 1,9 % an proliferierenden Zellen ein der intakten Gruppe Tf,intakt ähnlicher Wert hergestellt werden (Tf,intakt 2,72 %). Dies zeigt wieder, dass die orx tatsächlich zu einer Absenkung des T-Spiegels geführt und die T-Gabe von außen die Wiederherstellung der Ausgangsbedingungen (Tf,intakt) bewirkt hat. Es muss allerdings geklärt werden, ob die größere Anzahl an proliferierenden Zellen tatsächlich zu einer besseren Regenerationsfähigkeit des Herzmuskelgewebes führt, d.h. ob es sich bei den proliferierenden Zellen um Herzmuskelzellen handelt, die sich z.B. bei einer Schädigung des Herzmuskels zu hochspezialisierten Herzmuskelzellen ausdifferenzieren können. Denn dies würde bedeuten, dass sich das Herz des alternden Mannes mit einem niedrigeren T-Spiegel bei ischämischen Stress besser regenerieren kann als das Herz eines jungen Mannes mit höherem T-Spiegel. In diesem Falle hätte auch die Hormonersatztherapie in der Andropause eher negative Wirkungen auf das Herz.

Ähnlich wie T bewirkte die Zugabe von Res zum Basisfutter eine signifikante Vergrößerung der Herzmuskelfaserflächen. Allerdings zeigte die Zugabe von Res mit einem Wert von 252,7 % eine stärkere Vergrößerung der Muskelfaserflächen als T (232,9 %). Ob diese Vergrößerung als physiologisch oder pathologisch anzusehen ist, müsste überprüft werden, indem man den Herzmuskel auf weitere pathologische Zeichen hin untersucht. Betrachtet man die proliferierenden Zellen, so wirkt sich Res auch hier ähnlich auf den Herzmuskel aus wie T. Interessanterweise weist die Res-Gruppe trotz der erkennbar stärkeren Vergrößerung der Myokardfaserfläche ein im Vergleich zur T-Gruppe geringeres relatives Herzgewicht (T,orx 3,46 %, Res,orx 2,92

%) auf. Dieses Ergebnis passt zu der größeren Gewichtszunahme der Res-Gruppe im Vergleich zur T-Gruppe. Res beeinflusst also in stärkerem Ausmaß als T auch das Körpergewicht, wohingegen T hauptsächlich zu einer Zunahme des Herzgewichts führt.

4.7 Die Effekte der Orchidektomie (orx) sowie von Östradiol (E₂) und Genistein (Gen) auf das Herz

Ebenso wie T und Res stellen auch E₂ und Gen nach orx der Ratten den Ausgangswert der intakten Tiere der Tf,intakt-Gruppe weitgehend wieder her. Die Herzmuskelfaserflächen beider Gruppen sind im Mittel mit Werten von 218,4 µm² (E₂) und 228,4 µm² (Gen) signifikant gegenüber der orx-Kontrollgruppe (194,6 µm²) vergrößert. Da beide Substanzen nicht zu einer signifikant größeren mittleren Muskelfaserfläche führten als die Tf,intakt-Gruppe (227,7 µm²), kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei auch um eine physiologische Hypertrophie des Herzmuskels handelt.

Aufgrund des Vorhandenseins beider Rezeptoren ER α und ER β sind sowohl E₂ als auch Gen in der Lage, direkt auf die Kardiomyozyten Einfluss zu nehmen (Grohé et al. 1998). In mehreren Studien mit weiblichen Nagetieren konnte gezeigt werden, dass Östrogene eine Herzhypertrophie vermindern (van Eickels et al. 2001, Cabral et al. 1988). Dabei scheint der Östrogenrezeptor ER β bei druckbelasteten Herzen für den antihypertrophen Effekt verantwortlich zu sein. Interessanterweise konnte diese antihypertrophe Wirkung nicht bei männlichen Tieren beobachtet werden (Skavdahl et al. 2005). Im vorliegenden Versuch führte die Gabe von E₂ bei den orchidektomierten Ratten auch zu einer erkennbar geringeren Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche als T, aber eben trotzdem zu einer signifikant größeren Muskelfaserfläche im Vergleich zur orchidektomierten Kontrollgruppe. Die antihypertrophe Wirkung von E₂ konnte demzufolge bei den hier untersuchten männlichen Tieren nicht bestätigt werden. Die Gabe von E₂ an männliche Individuen birgt weiterhin gewisse kardiovaskuläre Risiken. So kam es bei Männern, die mit hohen Dosen Östrogen behandelt wurden, zu Gynäkomastie, Impotenz und venösen thromboembolischen Ereignissen sowie zu einem höheren Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen durch ein ungünstigeres Cholesterinprofil (The Coronary Drug Project 1973, Tomaszewski

et al. 2009). Nutzen und Risiko einer exogenen Östrogenzufuhr sind daher sorgfältig abzuwägen.

Das Phytoöstrogen Gen ist in der Lage, an beide ER zu binden und so östrogenähnliche Wirkungen hervorzurufen. Im Zuge der Suche nach einer Alternative zur Hormonersatztherapie wurde in den letzten Jahren die Wirkung von Gen auf viele kardiovaskuläre Risikofaktoren untersucht. So wirkt sich Gen günstig auf die Blutfette, den BMI und den Glukose- und Insulinhaushalt aus (Anderson et al. 1995, Welty et al. 2007, Maskarinec et al. 2008, Azadbakht et al. 2007, Cheng et al. 2004). In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt von Gen auf die Herzmuskelzellen selbst eruiert. Wie erwartet, kommt es durch die Gabe von Gen, genau wie bei der Gabe von E₂, zu einer signifikanten Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche im Vergleich zur orx-Kontrollgruppe, allerdings in einem größeren Ausmaß als bei E₂. Gen hat also im Vergleich zu E₂ eine stärkere Wirkung auf die Vergrößerung der Herzmuskelzellen. Trotzdem fällt das relative Herzgewicht der Gen-Gruppe geringer aus als bei der E₂-Gruppe (E₂,orx 3,28 %, Gen,orx 2,96 %). Auch hier liegt der Grund in der gleichzeitigen Zunahme des Gesamtkörpergewichts der Tiere, die mit Gen gefüttert wurden, im Vergleich zu den Tieren, die E₂ erhalten haben, was zu einer signifikanten Abnahme des Körpergewichts geführt hat. Der zellvergrößernde Effekt von E₂ und Gen konnte auch in einer kürzlich durchgeführten Studie an ovariectomierten weiblichen Mäusen beobachtet werden. Beide Substanzen induzierten in Herzmuskelzellen den Wachstumsfaktor Insulin-like growth factor 1 (IGF1) (Nguyen et al. 2011).

Auch bei Betrachtung der proliferierenden Zellen des Herzmuskels haben das Östrogen und das Phytoöstrogen erwartungsgemäß eine gleichsinnige Wirkung. Beide Substanzen führen zu einer erkennbaren Verringerung der proliferierenden Zellen und es ist davon auszugehen, dass somit auch die Regenerationsfähigkeit der Herzmuskelzellen herabgesetzt wird.

Diese Ergebnisse bestätigen Gen als Substanz mit östrogenähnlicher Wirkung. Neben ihren günstigen Eigenschaften bezüglich der kardiovaskulären Risikofaktoren bei der Frau konnte im Rahmen dieser Studie an männlichen Ratten in Hinblick auf die Regenerationsfähigkeit der Herzmuskelzellen ein eher ungünstiger Effekt festgestellt

werden. Zu klären bleibt, ob neben der Vergrößerung der Herzmuskelzellen pathologische Hypertrophiezeichen zu finden sind oder ob es sich tatsächlich um eine physiologische Hypertrophie handelt.

4.8 Die Effekte der Phytoöstrogene Genistein (Gen), Resveratrol (Res) und 8-Prenylnaringenin (8-PN) auf das Herz

Phytoöstrogene sind in der Natur vorkommende Substanzen, die in der Lage sind, in das endokrine System einzugreifen und die Entwicklung und die Funktion der Hormone zu verändern. Die Wirkung der Phytoöstrogene auf die Fortpflanzungsorgane wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht. Obwohl schon lange bekannt ist, dass das Geschlecht und die Sexualhormone bei der Entstehung kardiovaskulärer Erkrankungen eine große Rolle spielen, haben sich bisher nur wenige Wissenschaftler mit der Wirkung von Phytoöstrogenen auf den Herzmuskel beschäftigt. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Phytoöstrogene Gen, Res und 8-PN sind in der Lage, über die Bindung an ER direkt Einfluss auf die Herzmuskelzellen zu nehmen.

Bei der Messung der Muskelfaserfläche zeigten alle drei Testsubstanzen eine signifikante Vergrößerung der Herzmuskelfaserflächen. Dabei fällt auf, dass Res mit einem Wert von $252,7 \mu\text{m}^2$ die Faserflächen im Vergleich zu den anderen beiden Phytoöstrogenen im Mittel am stärksten vergrößert. Auch bezüglich der proliferierenden Zellen hat Res den stärksten Effekt unter den Phytoöstrogenen und senkt den Anteil der proliferierenden Zellen auf 1,9 %. Im Vergleich dazu wird der Anteil der proliferierenden Zellen durch die Gabe von Gen auf 3,0 % und durch die Gabe von 8-PN auf lediglich 6,2 % gesenkt. Res stellt also im Hinblick auf die Veränderungen am Herzmuskel das potenteste der drei untersuchten Phytoöstrogene dar. Es gilt als kardioprotektive Substanz, wobei seine kardioprotektive Eigenschaft in erster Linie auf antiatherosklerotischen und gefäßerweiternden Effekten beruhen. (Azorín-Ortuño et al. 2011, Simoncini et al. 2011, Takahashi und Nakashima 2011).

Im vorliegenden Versuch hat sich herausgestellt, dass Res auch direkt auf die Herzmuskelzellen einwirkt und, in stärkerem Ausmaß als Gen und 8-PN, eine Vergrößerung der Herzmuskelzellen herbeiführt sowie die Proliferation der Zellen

hemmt. Die Gabe von Res birgt also trotz seiner protektiven Eigenschaften bezüglich kardiovaskulärer Erkrankungen die Gefahr einer Herzhypertrophie und folglich einer Herzinsuffizienz sowie einer verminderten Regenerationsfähigkeit der Herzmuskelzellen.

Betrachtet man die Proliferationsrate des Herzens, so fällt auf, dass 8-PN im Vergleich zu den beiden anderen Phytoöstrogenen den Anteil der proliferierenden Zellen nur geringfügig absenkt. Dies würde bedeuten, dass 8-PN die Regenerationsfähigkeit der Herzmuskelzellen weniger stark herabsetzt als die beiden anderen Phytoöstrogene. Auch im Vergleich zu allen anderen Testsubstanzen und zur orx bei der intakten Gruppe, die keine Testsubstanzen aufgenommen hat (Tf,intakt), reduziert 8-PN die Regenerationsfähigkeit der Herzmuskelzellen weniger stark. Folglich würden die Herzmuskelzellen der Tiere, die 8-PN zu sich genommen haben, auf zum Beispiel ischämischen Stress eher mit einer Zellerneuerung reagieren, anstatt zu hypertrophieren und so das Risiko einer Herzinsuffizienz herabsetzen. Da 8-PN aber als starker Östrogen-Agonist gilt und in anderen Organen sehr ähnliche Effekte erzielt wie E₂ (Kitaoka et al. 1998, Christoffel et al. 2006), hier allerdings einen deutlich vom E₂ abweichenden Effekt hat, kann der hohe Anteil an proliferierenden Zellen bei der 8-PN-Gruppe als Messfehler interpretiert werden. Ein weiterer Wirkmechanismus von 8-PN, unabhängig von ER, der dieses Ergebnis erklären könnte, ist bisher nicht bekannt.

4.9 Die Effekte der UV-Filter-Substanzen Benzophenon-2 (BP2), 4-Methyl- benzyliden-Camphor (4-MBC) und Octylmethoxycinnamat (OMC) auf das Herz

UV-Filter-Substanzen sind häufig in Kosmetika, aber auch in Verpackungsmaterial enthalten, um lichtinduzierte Schäden zu verhindern (Schmutzler et al. 2007, Seidlova-Wuttke et al. 2006a). So kommen wir tagtäglich in Kontakt mit diesen Substanzen, die transkutan oder über die Nahrung in den Körper gelangen und dort in das endokrine System eingreifen können (Seidlova-Wuttke et al. 2006a, Schlecht et al. 2006). Alle drei der hier untersuchten UV-Filter-Stoffe besitzen in verschiedenen Organsystemen in unterschiedlichem Ausmaß östrogen-agonistische Wirkung. Die Auswirkungen dieser ED auf das Herz sind bisher weitgehend unklar und wurden in der vorliegenden Arbeit betrachtet.

Bei der Messung der Herzmuskelfaserfläche fällt zunächst einmal auf, dass die Zufütterung der beiden UV-Filter-Substanzen 4-MBC und OMC als einzige aller untersuchten Testsubstanzen nicht zu einer Vergrößerung der Myokardfaserfläche geführt hat. Die Faserfläche war sogar geringfügig reduziert im Vergleich zur orx-Kontrollgruppe (Ko,orx: $194,6 \mu\text{m}^2$; 4-MBC,orx: $184,2 \mu\text{m}^2$; OMC,orx: $188,4 \mu\text{m}^2$). 4-MBC und OMC haben also im orchidektomierten Zustand keinen hypertrophischen Effekt auf den Herzmuskel. Dieses Ergebnis bestätigt die östrogenagonistische Wirkung der beiden Substanzen, da in früheren Studien mit weiblichen Mäusen die antihypertrophe Wirkung von E_2 am Herzen gezeigt werden konnte (van Eickels et al. 2001). Bei diesem Versuch mit männlichen Ratten führte die Zufütterung von E_2 allerdings zu einer signifikanten Vergrößerung der Muskelfaserflächen, weshalb andere Wirkmechanismen als die Bindung von 4-MBC und OMC an die ER in Betracht kommen und untersucht werden müssten. Aus der Literatur ist bereits bekannt, dass 4-MBC und OMC zwar am Uterus und der Vagina als schwache Östrogen-Agonisten wirken (Seidlova-Wuttke et al. 2006a), hinsichtlich der Wirkung auf Lipoproteine, der LH-Synthese und der Thyroidhormon-Produktion aber nicht den Wirkungen von E_2 entsprechen (Seidlova-Wuttke et al. 2006b, Klammer et al. 2007). Auch hier wurden andere Wirkmechanismen als der Weg über die ER angenommen. BP2 dagegen bewirkt eine signifikante Vergrößerung der Myokardfaserflächen bei den orchidektomierten Ratten und ist in der Lage, eine Hypertrophie der Herzmuskelzellen auszulösen. Dadurch wird zunächst die Herzmuskelkraft erhöht. Auf Dauer und mit zunehmendem Ausmaß der Hypertrophie besteht allerdings die Gefahr, dass sich eine Herzinsuffizienz entwickelt. Daher ist das Verwenden von BP2 als UV-Filter in Verpackungsmaterial durchaus als kritisch zu betrachten und sollte vor allem auch aufgrund seiner Wirkungen auf das Herz neu überdacht werden.

Ähnliche Wirkungen zeigen die untersuchten UV-Filter-Substanzen bei der PCNA-Messung. Hier zeigen alle drei Substanzen eine erkennbare Reduktion der proliferierenden Zellen, wobei 4-MBC den Anteil der proliferierenden Zellen von allen untersuchten Testsubstanzen am stärksten absenkt. Die Regenerationsfähigkeit wird demnach durch alle UV-Filter-Substanzen herabgesetzt.

Insgesamt werden die UV-Filter-Substanzen durch dieses Ergebnis als Östrogenagonisten hinsichtlich der Proliferationsrate bestätigt. Im Hinblick auf die

zellvergrößernden Eigenschaften dagegen muss überprüft werden, ob 4-MBC und OMC bei männlichen Individuen eine andere Wirkung erzielen als bei weiblichen Individuen und ob sie in der Lage sind, über andere Wirkmechanismen auf die Herzmuskelzelle einzuwirken als E_2 .

4.10 Die Effekte der Pestizide Linuron (Lin) und Procymidon (Pro) auf das Herz

Pestizid ist ein Sammelbegriff für chemische Substanzen zur Bekämpfung von schädlichen Tieren und Pflanzen. Weltweit werden Pestizide in der Landwirtschaft eingesetzt, um die Pflanzen vor Schädlingen zu schützen und die Ernteerträge sicherzustellen. Doch trotz der Vorteile, die die Pestizide der Landwirtschaft bieten, stellen sie eine Gefahr für Mensch und Tier dar. Durch ihre Anwendung in der Landwirtschaft gelangen die Pestizide ins Grundwasser und persistieren im Erdboden. So werden sie über die Nahrung von Mensch und Tier aufgenommen. Man fand heraus, dass einige der Pestizide in der Lage sind, als ED in das Hormonsystem einzugreifen (Mnif et al. 2011). Die Pestizide Lin und Pro wirken als Androgen-Antagonisten, indem sie an den AR binden und ihn hemmen (Lambright et al. 2000). AR kommen neben vielen anderen Organen auch am Herzen vor (Marsh et al. 1998), weshalb davon ausgegangen werden kann, dass Lin und Pro eine Wirkung am Herzen hervorrufen. Es wurde bereits gezeigt, dass T Auswirkungen auf die Muskelfaserfläche sowie die Anzahl der proliferierenden Zellen des Herzmuskels hat. Interessant ist deshalb nun zu sehen, welche Wirkung antiandrogene Substanzen am Herzmuskel erzielen. Um die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Substanzen Lin und Pro auf ihre antiandrogene Wirkung hin zu untersuchen, müssen im Vergleich intakte, d.h. androgenproduzierende Tiere untersucht werden. Deshalb dient bei der Betrachtung dieser beiden Substanzen Tf,intakt als Kontrollgruppe. Es wird vorausgesetzt, dass bei den intakten Tieren, die keine Testsubstanz erhalten haben, ein physiologischer T-Spiegel vorliegt. Die Substanzen wurden auf ihre antiandrogene Wirkung bezüglich des Herzmuskels hin untersucht.

Die Messung der Muskelfaserfläche ergab eine Vergrößerung der Faserfläche lediglich bei der Lin-Gruppe, Pro hatte keine signifikante Wirkung auf die Herzmuskelfasern bezogen auf Tf,intakt. Auch der Anteil der proliferierenden Zellen zeigte keinen wesentlichen Unterschied zwischen den beiden Testsubstanzen und der

intakten Gruppe Tf,intakt. Daraus lässt sich schließen, dass die postnatale Gabe der beiden Pestizide nur geringfügige Wirkungen auf das Herz besitzt. Eine pränatale Exposition durch Behandlung des Muttertieres mit den Chemikalien dagegen erzeugt bei den Nachkommen zahlreiche Missbildungen im Urogenitalbereich und Veränderungen im Hormonsystem (Hotchkiss et al. 2004, Ostby et al. 1999, Svechnikov et al. 2005). Interessant wäre es zu untersuchen, ob eine pränatale Exposition mit Lin oder Pro auch zu Veränderungen am Herzmuskel führt. Das überdurchschnittlich große relative Herzmuskelgewicht der Pro-Gruppe nach dreimonatiger Futteraufnahme ist demnach nicht mit einer Herzmuskelhypertrophie zu erklären. Vielmehr ist davon auszugehen, dass diese Tiere schon vor der Substanzaufnahme im Schnitt größere Herzgewichte besaßen als die anderen Gruppen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Auswirkungen verschiedener ED sowie der Sexualhormone Testosteron (T) und Östradiol (E_2), die drei Monate lang über das Futter oral aufgenommen wurden, auf den Herzmuskel orchidektomierter Ratten untersucht. Mit Hilfe der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung sowie der immunzytologischen Färbung mittels Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) konnten einerseits die Myokardfaserfläche im Querschnitt der Herzmuskelfaser gemessen, andererseits die proliferationspositiven Zellen gezählt und der Anteil der proliferierenden Zellen berechnet werden. Anhand der Ergebnisse konnten Aussagen über die hypertrophe und hyperplastische Wirkung der ED getroffen werden. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten ED Genistein (Gen), Resveratrol (Res), 8-Prenylnaringenin (8-PN), Benzophenon-2 (BP2), 4-Methylbenzyliden-Camphor (4-MBC), Octylmethoxycinnamat (OMC), Linuron (Lin) und Procymidon (Pro) kommen in verschiedenen Dingen des Alltags vor und sind daher von großem wissenschaftlichen und öffentlichen Interesse.

Die orchidektomierte Ratte steht als Modell für den Mann in der Andropause. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb eruiert, welche Auswirkungen eine Orchidektomie auf das Herz hat und ob unter den ED Substanzen zu finden sind, die sich günstig auf das Herz auswirken. Die vorliegende Arbeit hat zu folgenden Ergebnissen geführt:

1. Wie erwartet hatten die untersuchten ED Auswirkungen auf den Herzmuskel der orchidektomierten Ratte und haben Veränderungen hervorgerufen.
2. Die Orchidektomie (orx) führte zu einer signifikanten Verkleinerung der Myokardfaserfläche im Vergleich zur intakten, nicht orchidektomierten Gruppe (Tf,intakt). Sowohl die Tiere, die nach der orx T-haltiges Futter (T,orx) als auch die Tiere, die E_2 -haltiges Futter (E_2 ,orx) erhalten hatten, zeigten allerdings ähnlich große Myokardfaserflächen wie die intakten Tiere der Tf,intakt-Gruppe. Weiterhin führt die orx zu einer Erhöhung der Anzahl der proliferierenden Zellen des Herzmuskels. Auch hier führte die Zufütterung sowohl von T-haltigen als auch des E_2 -haltigen Futters zu ähnlichen Werten wie denen der intakten Gruppe Tf,intakt. Daraus lässt sich schließen, dass die orx offensichtlich zu einer

hormonellen Umstellung geführt und sich diese hormonelle Umstellung tatsächlich auf den Herzmuskel ausgewirkt hat. Damit ist die orchidektomierte Ratte als Modell für den Mann in der Andropause geeignet.

3. Die Zufütterung von T führt zu einer signifikanten Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche im Vergleich zur orchidektomierten Kontrollgruppe. Damit ist T in der Lage, die Herzkraft des Mannes in der Andropause im Sinne einer physiologischen Herzhypertrophie zu steigern. Zu klären bleibt, ob es sich tatsächlich um eine physiologische Vergrößerung der Herzmuskelzellen handelt oder ob Zeichen einer pathologischen Herzhypertrophie vorhanden sind. T bewirkt des Weiteren eine erkennbare Senkung der Anzahl an proliferierenden Zellen des Herzmuskels.
4. Auch die Gabe von E_2 nach der orx der Ratten führte zu einer signifikanten Vergrößerung der Myokardfaserflächen im Vergleich zur orchidektomierten Kontrollgruppe, allerdings in geringerem Maße als T. Eine antihypertrophe Wirkung von E_2 wie sie in der Literatur über Studien mit weiblichen Nagetieren beobachtet wurde, konnte bei den hier untersuchten männlichen Tieren nicht bestätigt werden. Der Anteil der proliferierenden Zellen wurde durch die Zufütterung von E_2 erkennbar gesenkt. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Regenerationsfähigkeit des Myokards durch E_2 herabgesetzt wird.
5. Die untersuchten Phytoöstrogene Gen, Res und 8-PN bewirken alle eine signifikante Vergrößerung der Herzmuskelfaserflächen im Vergleich zur Kontrollgruppe Ko,orx. Alle drei Phytoöstrogene sind in der Lage, an ER zu binden und so direkt Einfluss auf die Herzmuskelzellen zu nehmen. Dabei hat Res sowohl auf die Vergrößerung der Myokardfaserflächen als auch auf den Anteil der proliferierenden Zellen den stärksten Effekt. Hier senken sowohl Gen als auch Res im Vergleich zur Kontrollgruppe die Proliferationsrate der Herzmuskelzellen signifikant ab, wohingegen 8-PN den Anteil an proliferierenden Zellen nur geringfügig absenkt. Aufgrund der Tatsache, dass 8-PN als starker Östrogen-Agonist gilt und auch bei der Messung der Myokardfaserfläche einen ähnlichen Effekt erzielt wie E_2 , ist bei diesem Ergebnis davon auszugehen, dass es sich um einen Messfehler handelt.

6. Ebenso wie die Phytoöstrogene haben auch die drei UV-Filter-Substanzen BP2, 4-MBC sowie OMC östrogenagonistische Eigenschaften. Bei der Untersuchung der Myokardfaserfläche fällt allerdings auf, dass 4-MBC und OMC als einzige aller untersuchten Testsubstanzen die Faserfläche nicht signifikant vergrößert, sondern sie sogar geringfügig reduziert haben. Es wurde bei diesen beiden Substanzen also eine tendenziell antihypertrophe Wirkung festgestellt. Die östrogenagonistische Wirkung konnte hier somit nicht bestätigt werden, da die Gabe von Östrodiol zu einer signifikanten Vergrößerung der Myokardfaserflächen geführt hat. BP2 dagegen bewirkt erwartungsgemäß eine signifikante Vergrößerung der Herzmuskelfaserfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bezüglich der Proliferationsfähigkeit der Herzmuskelzellen zeigten alle drei Substanzen eine erkennbare Senkung des Anteils an proliferierenden Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies bestätigt die drei UV-Filtersubstanzen als Östrogenagonisten.

7. Die beiden Substanzen Lin und Pro kommen in Pestiziden vor und gelten als Androgen-Antagonisten. Als Kontrollgruppe gilt hier deshalb die intakte Gruppe, die nur sojafreies Basisfutter ohne Testsubstanz-Zusatz bekommen hatte (Tf,intakt). Lediglich Lin bewirkte eine Vergrößerung der Myokardfaserfläche. Die Zufütterung von Pro bewirkte keine signifikante Veränderung der Herzmuskelfaserfläche. Auch den Anteil an proliferierenden Zellen veränderten die beiden Substanzen nicht wesentlich im Vergleich zur intakten Gruppe Tf,intakt. Die beiden Substanzen Lin und Pro haben somit nur geringfügige Auswirkungen auf den Herzmuskel. Abzugrenzen hiervon sind mögliche Auswirkungen bei pränataler Exposition des Muttertieres mit den Chemikalien, die in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht wurden.

6 Anhang

Tabelle 2: Schema der Organentwässerung und –stabilisierung (zur Verfügung gestellt vom Department für Endokrinologie der Universitätmedizin Göttingen)

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

Tabelle 3: Schema der Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung (zur Verfügung gestellt vom Department für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen, angelehnt an ein Standardschema)

Substanz	Einwirkzeit
Xylene	10 Min.
Xylene	10 Min.
Xylene	10 Min.
Ethanol 100 %	2 Min.
Ethanol 100 %	2 Min.
Ethanol 100 %	2 Min.
Ethanol 96 %	2 Min.
Ethanol 96 %	2 Min.
Ethanol 75 %	2 Min.
Aqua dest.	2 Min.
Hämatoxylin	20 Sek.
Wässern unter kühlem, fließendem H ₂ O	10 Min.
Aqua dest.	1-2 Min.
Eosin	20 Sek.
Aqua bidest.	10-15-maliges Eintauchen des Objektträgers in Aqua bidest.
Ethanol 75 %	30 Sek.
Ethanol 96 %	30 Sek.
Ethanol 96 %	30 Sek.
Ethanol 100 %	1 Min.
Ethanol 100 %	1 Min.
Ethanol 100 %	2 Min.
Xylene	5 Min.
Xylene	5 Min.
Xylene	5 Min.

Tabelle 4: Schema der Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA)-Färbung (zur Verfügung gestellt vom Department für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen, basierend auf dem Basisprotokoll für Immunzytologische Färbungen. Im Department für Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen modifiziert von Dr. Guillermon Rimoldi und überarbeitet von Panida Louchanwoot)

Substanz	Einwirkzeit		
Xylol	5 Min.	<i>Entparaffinierung</i>	
Xylol	5 Min.		
Xylol	5 Min.		
Ethanol 100 %	3 Min.	<i>Rehydratation in absteigender Ethanolkonzentration</i>	
Ethanol 100 %	3 Min.		
Ethanol 100 %	3 Min.		
Ethanol 96 %	2 Min.		
Ethanol 96 %	2 Min.		
Ethanol 75 %	2 Min.		
Aqua bidest.	5 Min.		
Schnitte in ein Plastikgefäß mit 0,01 M Zitratpuffer pH 6,0 in die Mikrowelle stellen			<i>Epitop-Auffindung</i>
Kochen bei 750 Watt	5 Min.		
Mit Zitratpuffer auffüllen			
Abkühlen lassen bei Raumtemperatur	1 Min.		
Kochen bei 750 Watt	5 Min.		
Mit Zitratpuffer auffüllen			
Abkühlen lassen bei Raumtemperatur	20 Min.		
Ethanol 75 %	2 Min.	<i>Dehydratation in aufsteigender Ethanolkonzentration</i>	
Ethanol 96 %	2 Min.		
Ethanol 96 %	2 Min.		
Ethanol 100 %	2 Min.		
3 % H ₂ O ₂ in Methanol	30 Min.	<i>Blocken der Peroxidaseaktivität</i>	
Ethanol 100 %	2 Min.	<i>Rehydratation in absteigender Ethanolkonzentration</i>	
Ethanol 96 %	2 Min.		
Ethanol 96 %	2 Min.		

Fortsetzung Tabelle 4

Substanz	Einwirkzeit	
Ethanol 75 %	2 Min.	
Aqua bidest.	3 Min.	
Schnitte in 1 x PBS auf dem Schüttler waschen	5 Min.	
Schnitte in 1 x PBS auf dem Schüttler waschen	5 Min.	
Bedecken der Schnitte	30 Min.	<i>Blocken der nicht spezifischen Immunglobuline mit Normalserum der Ziege</i>
Schnitte in 1 x PBS auf dem Schüttler	5 Min.	
Schnitte in 1 x PBS auf dem Schüttler waschen	5 Min.	
PCNA (PC 10) mouse monoclonal IgG 2a, 200 µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Cat# sc- 56, Lot# I1902) mit der Arbeitsverdünnung 1:800. Verdünnt mit DakoCytomation Antibody Diluent with Background Reducing Components Ready-to-use Code S3022		<i>Auftragen des Primärantikörpers</i>
Bedecken der Schnitte mit Lösung	30 Min.	
Schnitte in 1 x PBS auf dem Schüttler waschen	5 Min.	
Schnitte in 1 x PBS auf dem Schüttler waschen	5 Min.	
DakoCytomation EnVision+ Dual Link System-HRP (DAB+) Code K4065, für Primär-antikörper rabbit und mouse. Der Antikörper ist ohne Verdünnung zu benutzen		
Bedecken der Schnitte mit Lösung	30 Min.	
Schnitte in 1 x PBS auf dem Schüttler waschen	5 Min.	
Schnitte in 1 x PBS auf dem Schüttler waschen	5 Min.	
Bedecken der Schnitte mit Lösung	10-15 Min. (je nach Farbumschlag in Braun)	<i>DAB-Reagenz</i>

Fortsetzung Tabelle 4

Substanz	Einwirkzeit	
Mit Aqua bidest. aus Sprühflasche abspülen		
Mit Aqua bidest. auf Schüttler waschen	3 Min.	
Eintauchen in Hämatoxylin	5-10 Sek.	<i>Gegenfärbung</i>
Wässern unter kühlem, fließendem H ₂ O	3 Min.	
Schnitte in Gefäß mit H ₂ O stehen lassen	8 Min.	
Ethanol 75 %	2 Min.	
Ethanol 96 %	2 Min.	<i>Dehydratation in aufsteigender Ethanolkonzentration</i>
Ethanol 96 %	2 Min.	
Ethanol 100 %	2 Min.	
Ethanol 100 %	2 Min.	
Ethanol 100 %	2 Min.	
Xylol	5 Min.	
Xylol	5 Min.	
Xylol	5 Min.	
Eindecken der Schnitte mit DePex. Mounting medium und Deckgläsern der Fa. Menzel 24 x 40		

Tabelle 7: Tägliche Futter- und Substanzaufnahme pro Tier (die Daten wurden vom Department für Endkriologie der Universität Göttingen zur Verfügung gestellt) [intakt=nicht orchidektomiert; orx=orchidektomierte Tiere; Tf=testsubstanzfreie Gruppe; Ko=Kontrollgruppe; T=Testosteron-Gruppe; E₂=Östradiol-Gruppe; Gen=Genistein-Gruppe; Res=Resveratrol-Gruppe; 8-PN=8-Prenylnaringenin-Gruppe; BP2=Benzophenon-2-Gruppe; 4-MBC=4-Methylbenzyliden-Cam-phor-Gruppe; OMC=Octylmethoxycinnamat-Gruppe; Lin=Linuron-Gruppe; Pro=Procymidon-Gruppe]

Substanzgruppe	Durchschnittlicher Verbrauch (post-orx)	Aufgenommene Substanzmenge
Tf,intakt	21,06 g/Tag/Tier	0
Ko,orx	20,88 g/Tag/Tier	0
T,orx	24,78 g/Tag/Tier	73,993 mg
E ₂ ,orx	18,89 g/Tag/Tier	81,23 µg
Gen,orx	20,95 g/Tag/Tier	20,95 mg
Res,orx	21,48 g/Tag/Tier	18,04 mg
8-PN,orx	20,80 g/Tag/Tier	2,62 mg
BP2,orx	20,75 g/Tag/Tier	51,88 mg
4-MBC,orx	22,18 g/Tag/Tier	55,45 mg
OMC,orx	22,72 g/Tag/Tier	284,00 mg
Lin,intakt	22,68 g/Tag/Tier	5,67 mg
Pro,intakt	21,71 g/Tag/Tier	27,14 mg

7 Literaturverzeichnis

- AHUJA P, SDEK P, MACLELLAN WR (2007): Cardiac myocyte cell cycle control in development, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 87(2),521-44
- ALEKEL DL, GERMAIN AS, PETERSON CT, HANSON KB, STEWART JW, TODA T (2000): Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 72(3), 844-52
- ANDERSON JW, JOHNSTONE BM, COOK-NEWELL ME (1995): Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 333(5), 276-82
- ANVERSA P, KAJSTURA J, LERI A, BOLLI R (2006): Life and death of cardiac stem cells: a paradigm shift in cardiac biology. *Circulation* 113(11), 1451-63
- AZADBAKHT L, KIMIAGAR M, MEHRABI Y, ESMAILLZADEH A, PADYAB M, HU FB, WILLETT WC (2007): Soy inclusion in the diet improves features of the metabolic syndrome: a randomized crossover study in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr* 85(3), 735-41
- AZORÍN-ORTUÑO M, YÁÑEZ-GASCÓN MJ, GONZÁLEZ-SARRÍAS A, LARROSA M, VALLEJO F, PALLARÉS FJ, LUCAS R, MORALES JC, TOMÁS-BARBERÁN FA, GARCÍA-CONESA MT, ESPÍN JC (2011): Effects of long-term consumption of low doses of resveratrol on diet-induced mild hypercholesterolemia in pigs: a transcriptomic approach to disease prevention. *J Nutr Biochem*
- BABIKER FA, DE WINDT LJ, VAN EICKELS M, THIJSEN V, BRONSAER RJ, GROHÉ C, VAN BILSEN M, DOEVENDANS PA (2004): 17beta-estradiol antagonizes cardiomyocyte hypertrophy by autocrine/paracrine stimulation of a guanylyl cyclase A receptor-cyclic guanosine monophosphate-dependent protein kinase pathway. *Circulation* 109(2), 269-76
- BADER M (2010): Rat models of cardiovascular diseases. *Methods Mol Biol* 597, 403-14
- BAGCHI D, DAS DK, TOSAKI A, BAGCHI M, KOTHARI SC (2001): Benefits of resveratrol in women's health. *Drugs Exp Clin Res* 27(5-6), 233-48
- BAILE CA, YANG JY, RAYALAM S, HARTZELL DL, LAI CY, ANDERSEN C, DELLA-FERA MA (2011): Effect of resveratrol on fat mobilization. *Ann N Y Acad Sci* 1215, 40-7
- BERG J, TYMOCZKO J, STRYER L (2007): *Biochemie*, 6. Auflage, Elsevier GmbH München, S. 839-841, 1015-1017
- BHAT KP, PEZZUTO JM (2002): Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Ann N Y Acad Sci* 957, 210-29

- BHAT KP, LANTVIT D, CHRISTOV K, MEHTA RG, MOON RC, PEZZUTO JM (2001): Estrogenic and antiestrogenic properties of resveratrol in mammary tumor models. *Cancer Res* 61(20), 7456-63
- BÖTTNER M, CHRISTOFFEL J, RIMOLDI G, WUTTKE W (2006): Effects of long-term treatment with resveratrol and subcutaneous and oral estradiol administration on the pituitary-thyroid-axis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114(2), 82-90
- BUTERA PC, CZAJA JA (1984): Intracranial estradiol in ovariectomized guinea pigs: effects on ingestive behaviors and body weight. *Brain Res* 322(1), 41-8
- CABRAL AM, VASQUEZ EC, MOYSÉS MR, ANTONIO A (1988): Sex hormone modulation of ventricular hypertrophy in sinoaortic denervated rats. *Hypertension* 11(2 Pt 2), I93-7
- CADENAS S, BARJA G (1999): Resveratrol, melatonin, vitamin E, and PBN protect against renal oxidative DNA damage induced by the kidney carcinogen KBrO₃. *Free Radic Biol Med* 26(11-12), 1531-7
- CARROLL JD, CARROLL EP, FELDMAN T, WARD DM, LANG RM, MCGAUGHEY D, KARP RB (1992): Sex-associated differences in left ventricular function in aortic stenosis of the elderly. *Circulation* 86(4), 1099-107
- CENTOLA M, SCHULERI KH, LARDO AC, HARE JM (2008): [Stem cell therapy for myocardial regeneration: mechanisms and current clinical applications]. *G Ital Cardiol (Rome)* 9(4), 234-50
- CHENG SY, SHAW NS, TSAI KS, CHEN CY (2004): The hypoglycemic effects of soy isoflavones on postmenopausal women. *J Womens Health (Larchmt)* 13(10), 1080-6
- CHRISTOFFEL J, RIMOLDI G, WUTTKE W (2006): Effects of 8-prenylnaringenin on the hypothalamo-pituitary-uterine axis in rats after 3-month treatment. *J Endocrinol* 188(3), 397-405
- COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT ON THE IMPLEMENTATION OF THE „COMMUNITY STRATEGY FOR ENDOCRINE DISRUPTERS“ - a range of substances suspected of interfering with the hormone systems of humans and wildlife (COM (1999) 706), (COM (2001) 262) and (SEC (2004) 1372), 2007 (SEC (2007) 1635)
- COS P, BRUYNE T, APERS S, VANDEN BERGHE D, PIETERS L, VLIETINCK AJ (2003): Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* 69(7), 589-99
- CRAPO L (1988): *Hormone: Die chemischen Boten des Körpers*, 3. Auflage, Spektrum der Wissenschaft Verlagsgesellschaft mbH & Co. Heidelberg, S. 27-28
- DAHLMAN-WRIGHT K, KOEHLER K, GUSTAFFSON J (2003): Estrogen Receptor- β : Structure and Function in: *Encyclopedia of Hormones*, Volume 1, Elsevier Inc. San Diego

California, S. 600, 607

- DAMSTRA T, BARLOW S, BERGMAN A, KAVLOCK R, VAN DER KRAAK G (2002): Global Assessment of the State-of-Science of Endocrine Disruptors. WHO publication no. WHO/PCS/EDC/02.2, Chapter 1, World Health Organization, Geneva, Switzerland
- DIAMANTI-KANDARAKIS E, BOURGUIGNON JP, GIUDICE LC, HAUSER R, PRINS GS, SOTO AM, ZOELLER RT, GORE AC (2009): Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev* 30(4), 293-342
- DIMMELER S, ZEIHNER AM, SCHNEIDER MD (2005): Unchain my heart: the scientific foundations of cardiac repair. *J Clin Invest* 115(3), 572-83
- DONNELLY LE, NEWTON R, KENNEDY GE, FENWICK PS, LEUNG RH, ITO K, RUSSELL RE, BARNES PJ (2004): Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287(4), L774-83
- DUPONT S, KRUST A, GANSMULLER A, DIERICH A, CHAMBON P, MARK M (2000): Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) on mouse reproductive phenotypes. *Development* 127(19), 4277-91
- EICKELS VAN M, GROHÉ C, CLEUTJENS JP, JANSSEN BJ, WELLENS HJ, DOEVENDANS PA (2001): 17beta-estradiol attenuates the development of pressure-overload hypertrophy. *Circulation* 104(12), 1419-23
- EKMAN P, BARRACK ER, GREENE GL, JENSEN EV, WALSH PC (1983): Estrogen receptors in human prostate: evidence for multiple binding sites. *J Clin Endocrinol Metab* 57(1), 166-76
- ELATTAR TM, VIRJI AS (1999): Modulating effect of resveratrol and quercetin on oral cancer cell growth and proliferation. *Anticancer Drugs* 10(2), 187-93
- ENGEL FB, SCHEBESTA M, DUONG MT, LU G, REN S, MADWED JB, JIANG H, WANG Y, KEATING MT (2005): p38 MAP kinase inhibition enables proliferation of adult mammalian cardiomyocytes. *Genes Dev* 19(10), 1175-87
- FAUCI A, BRAUNWALD E, KASPER D, HAUSER S, LONGO D, JAMESON J, LOSCALZO J (2009): *Harrisons Innere Medizin*, Band 2, 17. Auflage, ABW Wissenschaftsverlag GmbH Berlin, S. 2782, 2853-2854
- GAO Q, MEZEI G, NIE Y, RAO Y, CHOI CS, BECHMANN I, LERANTH C, TORAN-ALLERAND D, PRIEST CA, ROBERTS JL, GAO XB, MOBBS C, SHULMAN GI, DIANO S, HORVATH TL (2007): Anorectic estrogen mimics leptin's effect on the rewiring of melanocortin cells and Stat3 signaling in obese animals. *Nat Med* 13(1), 89-94
- GEBARA AB, CISCATO CH, MONTEIRO SH, SOUZA GS (2011): Pesticide residues in some

- commodities: dietary risk for children. *Bull Environ Contam Toxicol* 86(5), 506-10
- GELLER SE, STUDEE L (2005): Botanical and dietary supplements for menopausal symptoms: what works, what does not. *J Womens Health (Larchmt)* 14(7), 634-49
- GÖRETZLEHNER G, LAURITZEN C, GÖRETZLEHNER U (2007): *Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie*, 5. Auflage, Walter de Gruyter GmbH & Co. KG, Berlin, S. 19
- GROHÉ C, KAHLERT S, LÖBBERT K, STIMPEL M, KARAS RH, VETTER H, NEYSES L (1997): Cardiac myocytes and fibroblasts contain functional estrogen receptors. *FEBS Lett* 416(1), 107-12
- GROHÉ C, KAHLERT S, LÖBBERT K, VETTER H (1998): Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 156(2), R1-7
- GÜDER G, ALLOLIO B, ANGERMANN CE, STÖRK S (2011): Androgen deficiency in heart failure. *Curr Heart Fail Rep* 8(2), 131-9.
- HALL JM, COUSE JF, KORACH KS (2001): The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276(40), 36869-72
- HASENFUB G (1998): Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. *Cardiovasc Res* 39(1), 60-76
- HEROLD G (2011): *Innere Medizin*, Herausgeber Dr. med. Gerd Herold, S. 754
- HEWITSON TD, ZHAO C, WIGG B, LEE SW, SIMPSON ER, BOON WC, SAMUEL CS (2012): Relaxin and castration in male mice protect from, but testosterone exacerbates, age-related cardiac and renal fibrosis, whereas estrogens are an independent determinant of organ size. *Endocrinology* 153(1), 188-99
- HOTCHKISS AK, PARKS-SALDUTTI LG, OSTBY JS, LAMBRIGHT C, FURR J, VANDENBERGH JG, GRAY LE JR (2004): A mixture of the "antiandrogens" linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion. *Biol Reprod* 71(6), 1852-61
- IZZO G, SÖDER O, SVECHNIKOV K (2010): The prenylflavonoid phytoestrogens 8-prenylnaringenin and isoxanthohumol differentially suppress steroidogenesis in rat Leydig cells in ontogenesis. *J Appl Toxicol*, doi: 10.1002/jat.1602
- JARRY H, CHRISTOFFEL J, RIMOLDI G, KOCH L, WUTTKE W (2004): Multi-organic endocrine disrupting activity of the UV screen benzophenone 2 (BP2) in ovariectomized adult rats after 5 days treatment. *Toxicology* 205(1-2), 87-93
- JAZBUTYTE V, ARIAS-LOZA PA, HU K, WIDDER J, GOVINDARAJ V, VON POSER-KLEIN C, BAUERSACHS J, FRITZEMEIER KH, HEGELE-HARTUNG C, NEYSES L, ERTL G, PELZER T (2008): Ligand-dependent activation of ER{beta} lowers blood pressure and attenuates

- cardiac hypertrophy in ovariectomized spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 77(4), 774-81
- JOHNSON WG, CORRIGAN SA, LEMMON CR, BERGERON KB, CRUSCO AH (1994): Energy regulation over the menstrual cycle. *Physiol Behav* 56(3), 523-7
- KANG NN, FU L, XU J, HAN Y, CAO JX, SUN JF, ZHENG M (2012): Testosterone improves cardiac function and alters angiotensin II receptors in isoproterenol-induced heart failure. *Arch Cardiovasc Dis* 105(2), 68-76
- KIM S, JIN Y, CHOI Y, PARK T (2011): Resveratrol exerts anti-obesity effects via mechanisms involving down-regulation of adipogenic and inflammatory processes in mice. *Biochem Pharmacol* 81(11), 1343-51. doi: 10.1016/j.bcp.2011.03.012
- KITAOKA M, KADOKAWA H, SUGANO M, ICHIKAWA K, TAKI M, TAKAISHI S, IJIMA Y, TSUTSUMI S, BORIBOON M, AKIYAMA T (1998): Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med* 64(6), 511-5
- KLAMMER H, SCHLECHT C, WUTTKE W, SCHMUTZLER C, GOTTHARDT I, KÖHRLE J, JARRY H (2007): Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. *Toxicology* 238(2-3), 192-9
- KREGE JH, HODGIN JB, COUSE JF, ENMARK E, WARNER M, MAHLER JF, SAR M, KORACH KS, GUSTAFSSON JA, SMITHIES O (1998): Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(26), 15677-82
- KRUMHOLZ HM, LARSON M, LEVY D (1993): Sex differences in cardiac adaptation to isolated systolic hypertension. *Am J Cardiol* 72(3), 310-3
- KUIPER GG, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12), 5925-30
- LAI CY, YANG JY, RAYALAM S, DELLA-FERA MA, AMBATI S, LEWIS RD, HAMRICK MW, HARTZELL DL, BAILE CA (2011): Preventing Bone Loss and Weight Gain with Combinations of Vitamin D and Phytochemicals. *J Med Food*
- LAMBRIGHT C, OSTBY J, BOBSEINE K, WILSON V, HOTCHKISS AK, MANN PC, GRAY LE JR (2000): Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol Sci* 56(2), 389-99
- LEE NK, MACLEAN HE (2011): Polyamines, androgens, and skeletal muscle hypertrophy. *J*

- Cell Physiol 226(6), 1453-60. doi: 10.1002/jcp.22569
- LERI A, KAJSTURA J, ANVERSA P (2011): Role of cardiac stem cells in cardiac pathophysiology: a paradigm shift in human myocardial biology. *Circ Res* 109(8), 941-61. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243154
- LI F, WANG X, BUNGER PC, GERDES AM (1997): Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart: I. Role of actin-myosin contractile ring. *J Mol Cell Cardiol* 29(6), 1541-51
- LIN JK, TSAI SH (1999): Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc Natl Sci Counc Repub China B* 23(3), 99-106
- LOIZZO MR, NIGRO S, DE LUCA D, MENICHINI F (2011): Detection of ochratoxin A and cis- and trans-resveratrol in red wines and their musts from Calabria (Italy). *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess* 28(11), 1561-8
- MAHMOODZADEH S, EDER S, NORDMEYER J, EHLER E, HUBER O, MARTUS P, WEISKE J, PREGLA R, HETZER R, REGITZ-ZAGROSEK V (2006): Estrogen receptor alpha up-regulation and redistribution in human heart failure. *FASEB J* 20(7), 926-34
- MALKIN CJ, CHANNER KS, JONES TH (2010): Testosterone and heart failure. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17(3), 262-8
- MANAS ES, XU ZB, UNWALLA RJ, SOMERS WS (2004): Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods. *Structure* 12(12), 2197-207
- MARSH JD, LEHMANN MH, RITCHIE RH, GWATHMEY JK, GREEN GE, SCHIEBINGER RJ (1998): Androgen receptors mediate hypertrophy in cardiac myocytes. *Circulation* 98(3), 256-61
- MASKARINEC G, AYLWARD AG, ERBER E, TAKATA Y, KOLONEL LN (2008): Soy intake is related to a lower body mass index in adult women. *Eur J Nutr* 47(3), 138-44
- MCCAFFREY TA, CZAJA JA (1989): Diverse effects of estradiol-17 beta: concurrent suppression of appetite, blood pressure and vascular reactivity in conscious, unrestrained animals. *Physiol Behav* 45(3), 649-57
- MCGILL HC JR, ANSELMO VC, BUCHANAN JM, SHERIDANPJ (1980): The heart is a target organ for androgen. *Science* 207(4432), 775-7
- MESSINA M, HO S, ALEKEL DL (2004): Skeletal benefits of soy isoflavones: a review of the clinical trial and epidemiologic data. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 7(6), 649-58
- MEYER R, LINZ KW, SURGES R, MEINARDUS S, VEES J, HOFFMANN A, WINDHOLZ O, GROHÉ C (1998): Rapid modulation of L-type calcium current by acutely applied

- oestrogens in isolated cardiac myocytes from human, guinea-pig and rat. *Exp Physiol* 83(3), 305-21
- MILLIGAN SR, KALITA JC, HEYERICK A, RONG H, DE COOMAN L, DE KEUKELEIRE D (1999): Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab* 84(6), 2249-52
- MNIF W, HASSINE AI, BOUAZIZ A, BARTEGI A, THOMAS O, ROIG B (2011): Effect of endocrine disruptor pesticides: a review. *Int J Environ Res Public Health* 8(6), 2265-303
- MULLIGAN K, SCHAMBELAN M (2002): Anabolic treatment with GH, IGF-I, or anabolic steroids in patients with HIV-associated wasting. *Int J Cardiol* 85(1), 151-9
- MURPHY E, KORACH K S (2007): Actions of Estrogen and Estrogen Receptors in Nonclassical Target Tissues, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 16
- NAHRENDORF M, FRANTZ S, HU K, VON ZUR MÜHLEN C, TOMASZEWSKI M, SCHEUERMANN H, KAISER R, JAZBUTYTE V, BEER S, BAUER W, NEUBAUER S, ERTL G, ALLOLIO B, CALLIES F (2003): Effect of testosterone on post-myocardial infarction remodeling and function. *Cardiovasc Res* 57(2), 370-8
- NASCIMENTO JH, MEDEI E (2011): Cardiac effects of anabolic steroids: hypertrophy, ischemia and electrical remodelling as potential triggers of sudden death. *Mini Rev Med Chem* 11(5), 425-9
- NELSON L, COX M (2009): *Lehninger Biochemie*, 4. Auflage, Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 473, 477, 478, 1114-1116, 1512
- NGUYEN BT, KARARIGAS G, WUTTKE W, JARRY H (2011): Long-Term Treatment of Ovariectomized Mice with Estradiol or Phytoestrogens as a New Model to Study the Role of Estrogenic Substances in the Heart. *Planta Med*
- NORDMEYER J, EDER S, MAHMOODZADEH S, MARTUS P, FIELITZ J, BASS J, BETHKE N, ZURBRÜGG HR, PREGLA R, HETZER R, REGITZ-ZAGROSEK V (2004): Upregulation of myocardial estrogen receptors in human aortic stenosis. *Circulation* 110(20), 3270-5
- O'DONNELL L (2003): Estrogen and Spermatogenesis in: *Encyclopedia of Hormones*, Volume 1, Elsevier Inc. San Diego, California, S. 579
- OSTBY J, KELCE WR, LAMBRIGHT C, WOLF CJ, MANN P, GRAY LE JR (1999): The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicol Ind Health* 15(1-2), 80-93
- PALMER K, GRAY JM (1986): Central vs. peripheral effects of estrogen on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. *Physiol Behav* 37(1), 187-9
- PATISAUL HB, ADEWALE HB (2009): Long-term effects of environmental endocrine

- disruptors on reproductive physiology and behavior. *Front Behav Neurosci* 3, 10
- PELZER T, DE JAGER T, MUCK J, STIMPEL M, NEYSES L (2002): Oestrogen action on the myocardium in vivo: specific and permissive for angiotensin-converting enzyme inhibition. *J Hypertens* 20(5), 1001-6
- PELZER T, JAZBUTYTE V, HU K, SEGERER S, NAHRENDORF M, NORDBECK P, BONZ AW, MUCK J, FRITZEMEIER KH, HEGELE-HARTUNG C (2005): The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 67(4), 604-12
- PENZA M, MONTANI C, ROMANI A, VIGNOLINI P, PAMPALONI B, TANINI A, BRANDI ML, ALONSO-MAGDALENA P, NADAL A, OTTOBRINI L, PAROLINI O, BIGNOTTI E, CALZA S, MAGGI A, GRIGOLATO PG, DI LORENZO D (2006): Genistein affects adipose tissue deposition in a dose-dependent and gender-specific manner. *Endocrinology* 147(12), 5740-51
- PINES A (2011): Male menopause: is it a real clinical syndrome? *Climacteric* 14(1), 15-7
- RAYALAM S, DELLA-FERA MA, BAILE CA (2011): Synergism between resveratrol and other phytochemicals: implications for obesity and osteoporosis. *Mol Nutr Food Res* 55(8), 1177-85. doi: 10.1002/mnfr.201000616
- REGITZ-ZAGROSEK V, OERTELT-PRIGIONE S, SEELAND U, HETZER R (2010): Sex and gender differences in myocardial hypertrophy and heart failure. *Circ J* 74(7), 1265-73
- RIEZZO I, DE CARLO D, NERI M, NIEDDU A, TURILLAZZI E, FINESCHI V (2011): Heart disease induced by AAS abuse, using experimental mice/rats models and the role of exercise-induced cardiotoxicity. *Mini Rev Med Chem* 11(5), 409-24
- RIMOLDI G, CHRISTOFFEL J, SEIDLOVA-WUTTKE D, JARRY H, WUTTKE W (2007): Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1, 62-8
- RITTER O, NEYSES L (2003): The molecular basis of myocardial hypertrophy and heart failure. *Trends Mol Med* 9(7), 313-21
- RODRÍGUEZ R, BOYER I, FONT G, PICÓ Y (2001): Capillary zone electrophoresis for the determination of thiabendazole, prochloraz and procymidone in grapes. *Analyst* 126(12), 2134-8
- SANTOLLO J, WILEY MD, ECKEL LA (2007): Acute activation of ER alpha decreases food intake, meal size, and body weight in ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293(6), R2194-201
- SCHLECHT C, KLAMMER H, WUTTKE W, JARRY H (2006): A dose-response study on the

- estrogenic activity of benzophenone-2 on various endpoints in the serum, pituitary and uterus of female rats. *Arch Toxicol* 80(10), 656-61
- SCHMUTZLER C, BACINSKI A, GOTTHARDT I, HUHNE K, AMBRUGGER P, KLAMMER H, SCHLECHT C, HOANG-VU C, GRÜTERS A, WUTTKE W, JARRY H, KÖHRLE J (2007): The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology* 148(6), 2835-44
- SCHWEIKERT H (2003): Estrogen in the Male: Nature, Sources, and Biological Effects in: *Encyclopedia of Hormones*, Volume 1, Elsevier Inc. San Diego, California, S. 584, 587, 589
- SEHMISCH S, HAMMER F, CHRISTOFFEL J, SEIDLOVA-WUTTKE D, TEZVAL M, WUTTKE W, STUERMER KM, STUERMER EK (2008): Comparison of the phytohormones genistein, resveratrol and 8-prenylnaringenin as agents for preventing osteoporosis. *Planta Med* 74(8), 794-801
- SEIDLOVÁ-WUTTKE D, JARRY H, CHRISTOFFEL J, RIMOLDI G, WUTTKE W (2006a): Comparison of effects of estradiol (E2) with those of Octylmethoxycinnamat (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)--2 filters of UV light - on several uterine, vaginal and bone parameters. *Toxicol Appl Pharmacol* 210(3), 246-54
- SEIDLOVÁ-WUTTKE D, CHRISTOFFEL J, RIMOLDI G, JARRY H, WUTTKE W (2006b): Comparison of effects of estradiol with those of Octylmethoxycinnamat and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicol Appl Pharmacol* 214(1), 1-7
- SIMONCINI T, LENZI E, ZÖCHLING A, GOPAL S, GOGLIA L, RUSSO E, POLAK K, CASAROSA E, JUNGBAUER A, GENAZZANI AD, GENAZZANI AR (2011): Estrogen-like effects of wine extracts on nitric oxide synthesis in human endothelial cells. *Maturitas* 70(2), 169-75
- SKAVDAHL M, STEENBERGEN C, CLARK J, MYERS P, DEMIANENKO T, MAO L, ROCKMAN HA, KORACH KS, MURPHY E (2005): Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288(2), H469-76
- SRIVASTAVA D, IVEY KN (2006): Potential of stem-cell-based therapies for heart disease. *Nature* 441(7097), 1097-9
- SULLIVAN AW, HAMILTON P, PATISAUL HB (2011): Neonatal agonism of ER β impairs male reproductive behavior and attractiveness. *Horm Behav* 60(2), 185-94
- SULLIVAN ML, MARTINEZ CM, GENNIS P, GALLAGHER EJ (1998): The cardiac toxicity of

- anabolic steroids. *Prog Cardiovasc Dis* 41(1), 1-15
- SVECHNIKOV K, SUPORNILCHAI V, STRAND ML, WAHLGREN A, SEIDLOVA-WUTTKE D, WUTTKE W, SÖDER O (2005): Influence of long-term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary-gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. *J Endocrinol* 187(1), 117-24
- SWEDENBORG E, RÜEGG J, MÄKELÄ S, PONGRATZ I (2009): Endocrine disruptive chemicals: mechanisms of action and involvement in metabolic disorders. *J Mol Endocrinol* 43(1), 1-10
- TAKAHASHI S, NAKASHIMA Y (2011): Repeated and long-term treatment with physiological concentrations of resveratrol promotes NO production in vascular endothelial cells. *Br J Nutr* 27, 1-7
- THE CORONARY DRUG PROJECT. Findings leading to discontinuation of the 2.5-mg day estrogen group. The coronary Drug Project Research Group. *JAMA*. (1973); 226(6), 652-7
- THUM T, SPRINGER J (2011): Breakthrough in cachexia treatment through a novel selective androgen receptor modulator?! *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 2(3), 121-123
- TOMASZEWSKI M, CHARCHAR FJ, MARIC C, KUZNIEWICZ R, GOLA M, GRZESZCZAK W, SAMANI NJ, ZUKOWSKA-SZCZECZOWSKA E (2009): Association between lipid profile and circulating concentrations of estrogens in young men. *Atherosclerosis* 203(1), 257-62
- URHAUSEN A, ALBERS T, KINDERMANN W (2004): Are the cardiac effects of anabolic steroid abuse in strength athletes reversible? *Heart* 90(5), 496-501
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, Internetseite <http://www.epa.gov/endo/>, abgerufen am 15.08.2011
- VERMEULEN A (2000): Andropause. *Maturitas* 34(1), 5-15
- VERMEULEN A, KAUFMANN JM, GIAGULLI VA (1996): Influence of some biological indices on sex hormone binding globulin and androgen levels in aging and obese males. *J Clin Endocrinol Metab* 81(5), 1821-6
- VERMEULEN A, GOEMAERE S, KAUFMAN JM (1999): Testosterone, body composition and aging. *J Endocrinol Invest* 22(5 Suppl), 110-6
- VOLTERRANI M, ROSANO G, IELLAMO F (2012): Testosterone and heart failure. *Endocrine* 42(2), 272-7
- WELTY FK, LEE KS, LEW NS, ZHOU JR (2007): Effect of soy nuts on blood pressure and

lipid levels in hypertensive, prehypertensive, and normotensive postmenopausal women. *Arch Intern Med* 167(10), 1060-7

WINTERMANTEL T M, ELZER J, HERBISON A E, FRITZEMEIER K-H, SCHÜTZ G (2007): Genetic Dissection of Estrogen Receptor Signaling In Vivo in Tissue-Specific Estrogen Action: Novel Mechanisms, Novel Ligands, Novel Therapies? Springer Verlag Berlin Heidelberg, S. 27-28

WUTTKE W, JARRY H, BECKER T, SCHULTENS A, CHRISTOFFEL V, GORKOW C, SEIDLOVÁ-WUTTKE D (2008): Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 61(1-2), 159-70

ZHANG Z, REN N, LI YF, KUNISUE T, GAO D, KANNAN K (2011): Determination of benzotriazole and benzophenone UV filters in sediment and sewage sludge. *Environ Sci Technol* 45(9), 3909-16

ZHU Y, BIAN Z, LU P, KARAS RH, BAO L, COX D, HODGIN J, SHAUL PW, THOREN P, SMITHIES O, GUSTAFSSON JA, MENDELSON ME (2002): Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. *Science* 295(5554), 505-8