

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

Metabolisches Syndrom:
Die Effekte von 20-Hydroxyecdysen und 17 β -Östradiol auf das
Fettgewebe und die subkutane Körpertemperatur der ovariectomierten
Ratte

INAUGURAL – DISSERTATION

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

vorgelegt von
Moritz Pettenkofer
aus
Berlin

Göttingen 2014

Die Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe Endokrinologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen im Zeitraum von März 2011 bis Juni 2014 angefertigt.

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

I. Berichterstatterin: PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke (Betreuerin)

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. Heide Siggelkow (Koreferentin)

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

Tag der mündlichen Prüfung: 09. Dezember 2014

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	3
1.1 Das Klimakterium	4
1.2 Das Fettgewebe	5
1.3 Serumparameter	6
1.3.1 Glukose	6
1.3.2 Insulin	6
1.3.3 Insulinresistenz und HOMA-Index	7
1.3.4 Cholesterol	7
1.3.5 HDL	8
1.3.6 LDL	8
1.3.7 Triglyzeride	8
1.4 Metabolisches Syndrom	9
1.4.1 Dyslipidämie	9
1.4.2 Adipositas	10
1.5 Vasomotorische Symptomatik im Klimakterium	11
1.5.1 Die Körpertemperatur der Ratte	12
1.5.2 Die Thermoregulation	12
1.5.3 Hitzewallungen	13
1.5.4 Definition und Symptomatik	13
1.5.5 GnRH- Pulsgenerator und Hitzewallungen	14
1.6 Die Therapieansätze im Vergleich	15
1.6.1 Östrogene	15
1.6.2 20-Hydroxyecdysol	16
1.7 Zielsetzung	17
2. Material und Methoden	18
2.1 Tierversuche	18
2.1.1 Versuchstiere	18
2.1.2 Ovariectomie (Ovx)	19
2.1.3 Applikation der Wirkstoffe	20
2.1.4 Ablauf von Transponderimplantation und qCT-Messung	21
2.1.5 Ablauf der Temperaturmessung	22
2.1.6 Obduktion	23
2.1.7 Serumdiagnostik	24
2.2 Auswertung	
2.2.1 Ermittelte Parameter der qCT-Messung	24
2.2.2 Statistische Methoden der qCT-Auswertung	26
2.2.3 Statistische Methoden zur Auswertung der Temperaturmessung	26

3. Ergebnisse	27
3.1 Körpergewicht und Futteraufnahme	27
3.2 Fettgewebe	29
3.2.1 Fläche des viszeralen Fettdepots	29
3.2.2 Anteil des viszeralen Fettdepots	31
3.2.3 Fläche des paratibialen Fettdepots	32
3.2.4 Anteil des paratibialen Fettdepots	34
3.3 Serumparameter	35
3.3.1 Serum-Glukose	35
3.3.2 Serum-Insulin	36
3.3.3 HOMA-Index	37
3.3.4 Serum-Cholesterol	38
3.3.5 Serum-HDL	39
3.3.6 Serum-LDL	40
3.3.7 Serum-Triglyzeride	41
3.4 Körpertemperatur	42
4. Diskussion	44
4.1 Analyse von Futteraufnahme und Körpergewicht	44
4.2 Analyse der fettgeweblichen Untersuchung mit qCT	45
4.2.1 Effekte auf viszerales Fettgewebe	45
4.2.2 Effekte auf paratibiales Fettgewebe	47
4.3 Analyse der Serumparameter	48
4.3.1 Effekte auf Serum-Glukose	48
4.3.2 Effekte auf Serum-Insulin	48
4.3.3 Effekte auf Serum-Cholesterol	49
4.3.4 Effekte auf Serum-HDL	50
4.3.5 Effekte auf Serum-LDL	50
4.3.6 Effekte auf Serum-Triglyzeride	52
4.4 Analyse der Körpertemperatur	53
5. Zusammenfassung	56
6. Literaturverzeichnis	57
7. Abbildungsverzeichnis	69
8. Tabellenverzeichnis	71

Abkürzungsverzeichnis

Δ BW	<i>delta body weight</i> , Körpergewichtszunahme
Abb.	Abbildung
Apo-E	Apolipoprotein E
BMI	Body Mass Index
BW	<i>body weight</i> , Körpergewicht
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CR	<i>Cimicifuga racemosa</i>
DAG	Deutsche Adipositas-Gesellschaft
d.h.	das heißt
dl	Deziliter
E2	17 β - Östradiol bzw. Östradiolbenzoat
Ecd	β -Ecdyson, 20-Hydroxyecdyson
ER	Östrogenrezeptor
et al.	et alii
g	Gramm
GABA	Gamma-Aminobuttersäure
GAD	Glutamatdecarboxylase
GnRH	<i>gonadotropin releasing hormone</i>
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HOMA	<i>homeostasis model assessment</i>
HOMA-IR	<i>homeostasis model assessment - insulin resistance</i>
HRT	<i>hormone replacement therapy</i> , Hormonersatztherapie
i.v.	intravenös
kg	Kilogramm
Ko	Kontrollgruppe / Kontrolltiere
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LH	luteinisierendes Hormon
mg	Miligramm
ml	Mililiter
n	<i>number</i> , Anzahl
NAMS	North American Menopause Society
Obd.	Obduktion
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
ovx	ovarietomiert
Präovx, präovx	vor Ovariectomie
qCT	quantitative Computertomographie
RXR	<i>retinoid x receptor</i>
S.D.-Ratte	Sprague-Dawley-Ratte
sf	soyafrei
Tab.	Tabelle
Temp.	Temperatur
TG	Triglyzeride

u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche
VMS	vasomotorische Symptomatik
vs	versus
WHO	World Health Organisation, Weltgesundheitsorganisation
WHR	<i>waist-hip-ratio</i>
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

1. Einleitung

In Deutschland ist mittlerweile jeder Vierte von einer Konstellation aus stoffwechselbedingten Erkrankungen betroffen, die in der Literatur als "Metabolisches Syndrom" zusammengefasst wird (Schipf et al. 2010). Die so genannten Volkskrankheiten Arterieller Hypertonus, Dyslipoproteinämie, stammbetonte Adipositas und Diabetes mellitus bilden dabei ein Cluster, welches insbesondere wegen der bedeutsamen Erhöhung des kardiovaskulären Risikos mit einer gesteigerten Mortalitätsrate einhergeht. Aufgrund seiner schleichenden Entwicklung und oft erst späten Erkennung spricht man auch vom "tödlichen Quartett". Infolge von zunehmender Fehlernährung und Bewegungsmangel drängt sich das Metabolische Syndrom in den Wohlstandsgesellschaften immer mehr ins Zentrum des klinischen und letztlich auch wirtschaftlichen Interesses (WHO 2002; Yusuf et al. 2005).

Heute weiß man, dass Fett, insbesondere das Bauchfettdepot, im Stoffwechsel eine wichtige Funktion als endokrine Drüse einnimmt. Es stellt dem Körper Hormone und Apokine zur Verfügung, die wesentlich für die Entstehung von Adipositas-assoziierten Erkrankungen mitverantwortlich sind (Pasquali et al. 2003). Daher liegt es nahe, dass eine Reduktion vor allem des viszeralen Fettgewebes das Risiko für Erkrankungen zu senken vermag, die dem Metabolischen Syndrom zuzuordnen sind. Für eine Vielzahl von Patientinnen in den Wechseljahren stellt die durch den Östrogenmangel bedingte Anreicherung von Bauchfettgewebe also nicht nur ein kosmetisches Problem dar. Überhaupt verursacht das Klimakterium, die Phase des "hormonellen Umbruchs", Veränderungen, die für die betroffene Frau eine maßgebliche Beeinträchtigung der Lebensqualität darstellen können (Blumel et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde am Modell der ovariektomierten (ovx) Sprague-Dawley-Ratte (S.D.-Ratte) neben abdominellem und paratibialem Fettdepot auch die Körpertemperatur untersucht. Denn Hitzewallungen gehören zu den Hauptproblemen, wegen derer menopausale Frauen medizinische Hilfe suchen (Kronenberg 1990).

1.1 Das Klimakterium

Das Klimakterium bezeichnet die natürliche Übergangsphase zwischen der terminierenden Geschlechtsreife und dem Senium im Leben einer Frau. Als Menopause wird nach aktueller Definition der Zeitpunkt im Klimakterium verstanden, an dem die letzte uterine Blutung 12 Monate zurückliegt (Greendale et al. 1999; Göretzlehner et al. 2003). Da sich im Klimakterium die ovarielle Funktion allmählich erschöpft, was mit einer Abnahme der Östrogenproduktion in den Gonaden einhergeht, ist die postmenopausal gebildete Menge an Östrogenen im Durchschnitt viel geringer als im reproduktiven Alter (Kuller et al. 1990). Die vorherrschenden klimakterischen Symptome reichen von Schweißausbrüchen und Hitzewallungen über vaginale Trockenheit, Schlafstörungen und depressive Verstimmungen bis hin zu manifesten Organstörungen (Hammar et al. 1984).

Die weibliche Ratte erreicht unter physiologischen Umständen kein Klimakterium. Ab dem Erreichen des etwa 15. Lebensmonats beginnt für sie ein hyperöstrogener Hormonzustand, bevor sie nach etwa weiteren drei Monaten gemäß der Lebenserwartung von ca. 2 Jahren verstirbt. Um die weibliche Ratte trotzdem in den hormonellen Zustand einer klimakterischen Frau zu versetzen, bietet es sich an, ihr die Ovarien operativ zu entfernen. Durch dieses Prinzip ist die ovx Ratte zu einem etablierten Modell in der experimentellen endokrinologischen Forschung geworden (Bellino 2000). Verglichen mit anderen üblichen Tiermodellen der Forschung, wie z.B. Affen, Ziegen, Schafen oder Schweinen, erreicht die Ratte nach Ovariectomie (Ovx) wesentlich schneller einen postmenopausalen Hormonzustand. Das begünstigt sie insbesondere für Forschungsdesigns, die für einen kurzen Zeitraum konzipiert sind, da sie relativ schnell auf Veränderungen durch Hormonsubstitution und hormonelle Defizite anspricht (Kalu 1991; Frost und Jee 1992). Mit der wichtigste Faktor für die Ratte als Modell ist jedoch, dass ihre endokrinen Regulationskreise denen des Menschen sehr ähnlich sind (Liu und Bachmann 1998).

1.2 Das Fettgewebe

Makroskopisch lässt sich Fettgewebe in weißes (univakuoläres) und braunes (plurivakuoläres) Fettgewebe unterteilen. Weißes Fettgewebe kann in seiner Funktion sowohl als Energiespeicher, Wärmeisolator oder Druckpolster dienen und unterliegt in erster Linie hormoneller Regulation (Lüllmann-Rauch 2006). Das weiße Fettgewebe lässt sich weiterhin in subkutanes und viszerales Fettgewebe differenzieren. Subkutanes Fettgewebe findet sich vor allem in der Unterhaut von Bauch und Gesäß. Viszerales Fettgewebe ist in der Bauchhöhle eingelagert (Fanghänel et al. 2003). Zu- bzw. Abnahme der Fettmasse werden durch Anzahl und Volumen der univakuolären Adipozyten bestimmt. Neben ihrer Speicherfunktion für den Energiehaushalt regulieren sie in bedeutendem Maße die Leptin- und Zytokinausschüttung ins Blut und produzieren Steroidhormone (Guerre-Millo 2003). Die vorliegende Arbeit zielt auf die Untersuchung des weißen Fettgewebes ab, welches, abhängig vom subkutanen oder viszeralen Verteilungstyp, entscheidenden Einfluss auf das Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko nimmt (Vague 1947). Die Differenzierung der Fettverteilungstypen findet sich in Kapitel 1.4.2 im Zusammenhang mit der Klassifikation der Adipositas.

Da sich die Fettgewebe der Ratte abhängig von ihrer Gewebelokalisation hinsichtlich ihres Stoffwechsels unterscheiden, wurden in der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Fettgewebe hinsichtlich ihrer Fläche mittels quantitativer Computertomographie (qCT) untersucht (Rodriguez-Cuenca et al. 2005). Zum einen das viszerale ("schlechte") Fettgewebe und zum anderen das paratibiale ("gute") Fettgewebe. Als paratibiales Fettgewebe wird in unserer Abteilung das Fettdepot des distalen Unterschenkels bezeichnet, welches anatomisch als subfasziales Fett definiert ist und dem "guten" weißen Fettgewebe zuzuordnen ist (Seidlová-Wuttke et al. 2003 b; Seidlová-Wuttke 2010 b). Aufgrund seiner Expression der Östrogenrezeptoren ER α und ER β gilt das paratibiale Fettdepot als besonders östrogensensibel (Seidlová-Wuttke et al. 2003 a; Seidlová-Wuttke et al. 2008). Die qCT-Aufnahmen erfassen im gesamten tibialen Querschnitt mit Fett, Muskel und Knochen insgesamt drei Kompartimente, von denen nur das Fettgewebe Inhalt der vorliegenden Arbeit ist.

Das viszerale Fett der Ratte wird ebenfalls dem weißen Fettgewebe zugeordnet (Fruhbeck und Gomez-Ambrosi 2002). In der vorliegenden Arbeit wird der Begriff

viszerales Fettgewebe als das "schlechte" Fettgewebe definiert (Gabriely et al. 2002; Fain et al. 2004). Bei der Ratte ist das viszerale Fettgewebe kleiner und weniger stoffwechselaktiv als das subkutane Fettdepot (Tchernof et al. 2006).

In der internationalen Literatur ist man sich dahingehend einig, dass sowohl viszerales als auch paratibiales Fettdepot einer Regulation durch Östrogene unterliegen. Es hat sich gezeigt, dass beide Gewebe nach Ovx der Ratten an Masse zunehmen (Seidlová-Wuttke et al. 2003 a; Seidlová-Wuttke et al. 2008; Rachon et al. 2008).

1.3 Serumparameter

Im Folgenden findet sich eine kurze Vorstellung der für diese Arbeit relevanten Serumparameter.

1.3.1 Glukose

Glukose ist für Säugetiere ein lebenswichtiger Brennstoff. Abgesehen von Zeiten langer Nahrungskarenz stellt es praktisch den einzigen Brennstoff für ihr Gehirn dar. Als Glykogen liegt die Glukose gekettet als Speicherform in Leber und Skelettmuskulatur vor und kann schnell mobilisiert werden. Die kontrollierte Freisetzung hält die Blutglukose zwischen den Mahlzeiten auf einem konstanten Spiegel. So wird gewährleistet, dass das Gehirn stets ausreichend versorgt ist. Bei zu hohen Blutzuckerspiegeln wird dem Körper über Insulin die Notwendigkeit zur Entfernung der Glukose signalisiert und eine Umwandlung in Glykogen oder Fett stimuliert (Berg et al. 2007).

1.3.2 Insulin

Insulin als wichtigstes anaboles Hormon wird aus dem Vorläufermolekül Proinsulin in den B-Zellen der Bauchspeicheldrüse synthetisiert und in Sekretgranula gespeichert (Kitabchi 1977). Durch ein Ansteigen des Glukosespiegels im Blut wird eine pulsatile Ausschüttung bewirkt, welche über Beeinflussung des Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsels schnell und effizient eine Senkung des Blutzuckerspiegels herbeiführt. (Meier et al. 2006; Löffler und Petrides 2007).

1.3.3 Insulinresistenz und HOMA-Index

Die durch Insulin induzierte Glukoseaufnahme in die Zellen von Fettgewebe und Muskulatur ist im Wesentlichen für die Senkung des Blutzuckerspiegels verantwortlich (Löffler und Petrides 2007). Als Insulinresistenz bezeichnet man eine reduzierte oder aufgehobene Wirkung des Insulins an der Zielzelle. Die Folge ist ein erhöhter Insulinbedarf (Bonara et al. 1998). Beim Diabetes mellitus Typ 2 zeigt sich im zeitlichen Ablauf der Ereignisse eine Insulinresistenz bereits mehrere Jahre vor der Manifestation einer Hyperglykämie.

Um sich diese Tatsache präventivdiagnostisch zunutze zu machen, wird in der endokrinologischen Klinik der HOMA-Index nach Matthews herangezogen, welcher die Serumparameter Insulin und Glukose beinhaltet (Matthews et al. 1985):

HOMA-Index = Nüchtern-Insulin ($\mu\text{U/ml}$) x Nüchtern-Glukose (mg/dl) / 405.

Die Beurteilung erfolgt anhand des Referenzbereichs. Demnach besteht bei einem Index ≤ 1 keine Insulinresistenz. Ein Index > 2 gibt einen Hinweis auf eine möglicherweise bestehende Insulinresistenz. Bei einem Index von $> 2,5$ ist eine Insulinresistenz sehr wahrscheinlich. Der Durchschnittswert bei Typ-2-Diabetikern liegt bei $> 5,0$ (Rudenski et al. 1991). Eine Absicherung der Insulinresistenz kann mit der zusätzlichen Messung des intakten Proinsulins erzielt werden (Pfützner und Forst 2004).

1.3.4 Cholesterol

Cholesterol ist sowohl Bestandteil von Zellmembranen und Lipoproteinen als auch Ausgangsstoff für die Biosynthese von Steroidhormonen und Gallensäuren. Störungen im Verwertungskreislauf oder ein Überangebot können zu einer vermehrten Ablagerung des Cholesterols in den Gefäßwänden führen und stellen damit einen Risikofaktor für deren Verkalkung dar. (Singer und Nicholson 1972; Kuchinskiene und Carlson 1982; Stone und Evans 1992).

1.3.5 HDL

HDL (*high density lipoproteins*) haben die Funktion des Cholesteroltransports aus der Peripherie zurück zur Leber, wo überschüssiges Cholesterol für die Biosynthese der Gallenflüssigkeit genutzt wird (Arbeeny et al. 1987; Mackinnon et al. 1987). HDL werden somit gemeinhin als "gute" Fette angesehen, da sie durch ihren Abtransport des Cholesterols einer übermäßigen Akkumulation desselben vorbeugen und damit das Arteriosklerose-Risiko zu senken vermögen (Tall 2008; Libby et al. 1996). Bei der Ratte sind sie, im Gegensatz zum Menschen, das Lipoprotein mit dem größten Anteil an Cholesterol (Windler et al. 1980; Lundeen et al. 1997).

1.3.6 LDL

Die LDL (*low density lipoproteins*) bilden sich aus der in der Leber synthetisierten Vorstufe VLDL und besitzen beim Menschen einen besonders hohen Anteil an Cholesterol. Ein hoher LDL-Spiegel im Blut geht daher mit einem erhöhten Risiko für die Verkalkung peripherer Gefäße einher (Nelson und Cox 2005). Beim Menschen machen sie den größten Anteil der Lipoproteine im Blut aus. Im Gegensatz dazu sind die LDL der Ratte nur in geringem Maße vertreten. Ihr dominantes Lipoprotein sind die HDL (Windler et al. 1980; Lundeen et al. 1997).

1.3.7 Triglyzeride

Triglyzeride sind Ester und bestehen aus einem Molekül Glycerin sowie drei Fettsäuren. Nach Aufnahme in die Enterozyten des Dünndarms werden sie in Chylomikronen verpackt und über den Lymphweg in den Kreislauf abgegeben (Iqbal et al. 2003; Lee 1986). Unter Aktivität der Lipoproteinlipase geben Chylomikronen freie Fettsäuren an die Zellen in der Peripherie ab (Blanchette-Mackie et al. 1989). Übriggebliebene Partikel, so genannte "Remnants", werden zur Leber transportiert und von Hepatozyten aufgenommen (Faria et al. 1996). Eine Synthese der Triglyzeride ist auch endogen, vor allem in der Leber, möglich. Fertige Triglyzeride verlassen die Leber verpackt in VLDL, um in die Peripherie zu gelangen (Kay und Entenman 1961). Funktionell sind Triglyzeride Energielieferanten, die bei Bedarf

durch Lipolyse im Fettgewebe mobilisiert werden. In ihrer gespeicherten Form verweilen sie als Depotfett im Adipozyten (Langin et al. 2005).

1.4 Metabolisches Syndrom

Seit der Erstbeschreibung des Syndroms im Jahr 1923 durch Kylin wurden verschiedene Ansätze für Definitionen erbracht (Kylin 1923). Die Deutsche Adipositas-Gesellschaft (DAG) richtet sich aktuell nach der Definition der American Heart Association (AHA) und des National Heart, Lung and Blood Institute (NHLBI) aus dem Jahr 2004. Hierbei ist das Vorliegen von drei der insgesamt fünf Kriterien für die Definition des Metabolischen Syndroms erforderlich. Herangezogen werden einerhöhter Taillenumfang, erhöhte Serum-Triglyzeride und Serum-LDL, erniedrigtes Serum-HDL, Bluthochdruck und eine erhöhte Nüchtern glukose (Grundy et al. 2005). Seinen Ursprung hat das Metabolische Syndrom häufig in der Ausprägung mehrerer genetischer Faktoren. Allerdings wird das Syndrom meist erst durch Verhaltensumstände wie Fehlernährung, körperliche Inaktivität, Stress oder Alkoholabusus klinisch manifest. Die Diagnosestellung ohne das Vorliegen einer Fettleibigkeit ist selten. 80% aller Patienten sind übergewichtig (Despres 2001). Insbesondere die abdominellen Depots spielen in der Herausbildung von Insulinresistenzen und Dyslipidämien eine entscheidende Rolle und so gehen diese Morbiditäten oft mit der Adipositas einher (Jahnke 1969).

1.4.1 Dyslipidämie

Die Dyslipidämie bezeichnet eine Verschiebung in der Zusammensetzung der Blutfette. Charakteristisch für die Dyslipidämie beim Metabolischen Syndrom ist nach AHA/NHLBI-Definition eine Hypercholesterinämie (>200 mg/dl), einhergehend mit vermehrten Triglyzeriden (>150 mg/dl) und LDL (>150 mg/dl) sowie verminderten HDL (<50 bei Frauen; <40 bei Männern) (Klose 2002; Grundy et al. 2005). Diese Art der Fettstoffwechselstörung tritt besonders häufig bei Patienten auf, deren viszerales Fettgewebe vermehrt ist (Despres 1991). Im Vergleich der Serumlipide von Ratte und Mensch ist zu beachten, dass sie sich in der Dominanz ihrer Lipoproteine unterscheiden. Wie bereits erwähnt, ist bei der Ratte das HDL vorherrschend und

speichert den größten Teil des Cholesterols. Beim Menschen wird die dominante Rolle vom LDL eingenommen (Windler et al. 1980; Lundeen et al. 1997).

Die Serumwerte von Ratte und Mensch lassen sich dennoch gut vergleichen, da bereits in einer Vielzahl von Forschungsarbeiten gemeinsame Veränderungen, beispielsweise durch E2, aufgezeigt werden konnten (Bein 2010).

1.4.2 Adipositas

Für die Definition der Adipositas wurde in der Vergangenheit der so genannte Quetelet-Index herangezogen, welcher besser bekannt ist als "Body Mass Index" (BMI). Statur- und geschlechtsunabhängig bildet er den Quotienten aus Körpergewicht (in kg) und quadrierter Körpergröße (in m²) (Quetelet 1870). Da der BMI aber trotz seiner Korrelation mit der Körperfettmasse weder die Verteilung des Fetts noch die Muskelmasse mit einschließt, wird zur genaueren Adipositas-Klassifikation der Taillenumfang herangezogen, da er ein Maß für das viszerale Fettgewebe darstellt. Demzufolge spricht man bei einem Taillenumfang von ≥ 88 cm bei Frauen und ≥ 102 cm bei Männern von einer abdominellen Adipositas (Lean et al., 1995). Eine weitere Methode zur genaueren Klassifizierung bietet sich durch die Taille-Hüfte-Relation (*WHR, waist-hip-ratio*). Hierzu werden der Taillenumfang zwischen Rippenbogen und Beckenkamm sowie der Hüftumfang auf Höhe des Trochanter major gemessen. Bei einem Taille/Hüfte-Verhältnis von $> 0,85$ bei Frauen und $> 1,0$ bei Männern liegt eine abdominelle Adipositas vor (Wenzel 2002). Die Unterscheidung von Bauch- und Hüftfettgewebe hat klinisch extrem hohe Relevanz, da die Fettverteilung einen maßgeblichen Faktor für Gesundheitsrisiken darstellt. Das für das männliche Geschlecht typische androide Fettverteilungsmuster (Apfeltyp) ist gekennzeichnet durch eine verstärkte Anreicherung von abdominellem Fettgewebe.

Das für das weibliche Geschlecht typische gynoide Fettverteilungsmuster (Birnentyp) bezeichnet dagegen eine gesteigerte Akkumulation von Fettgewebe in Hüft- und Oberschenkelregion (Hauner 1999). Ein Östrogenmangel, wie er im Klimakterium stattfindet, führt bei einer Vielzahl der Frauen einen androiden Fettverteilungstyp herbei (Hsu et al. 2006; Zillikens et al. 2010).

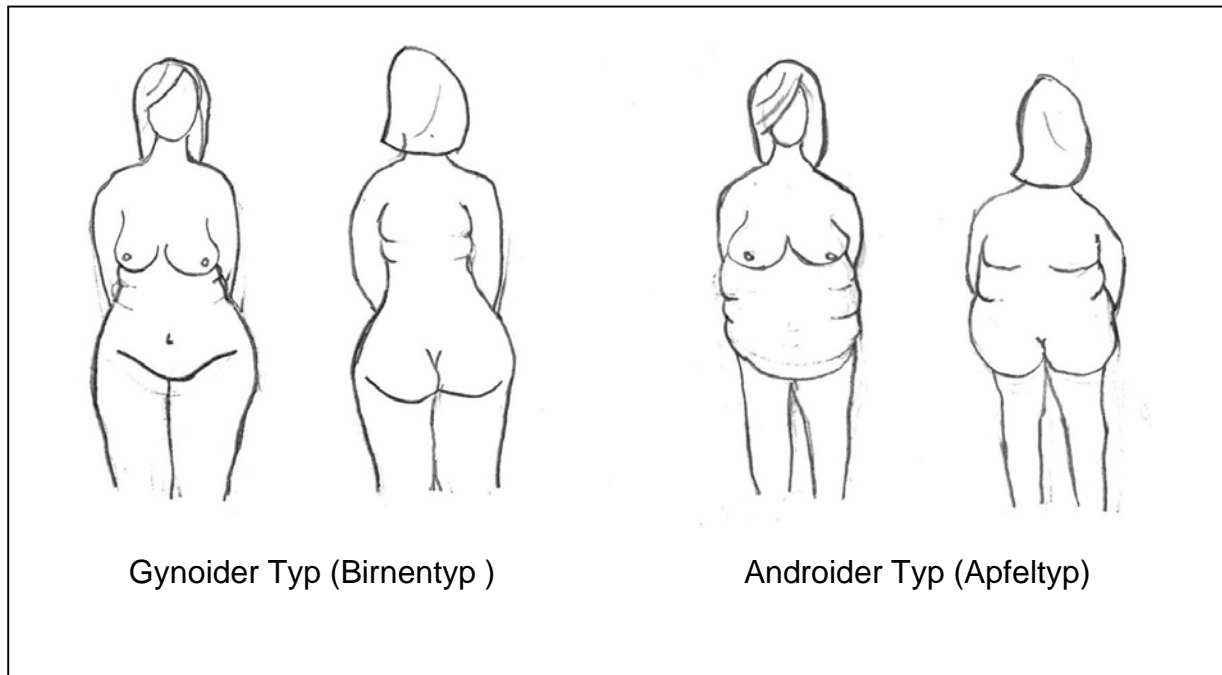


Abbildung 1. Fettverteilungstypen Gynoider und Androider Typ (Bild: Moritz Pettenkofer, 2012).

1.5 Vasomotorische Symptomatik im Klimakterium

Die Homöostase der Körpertemperatur beruht auf einer komplexen Regulation im Zusammenspiel von Körperkerntemperatur, zentralem Nervensystem und peripherem Gefäßsystem (Deecher 2005). Eine Störung des Gleichgewichts kann zu thermoregulatorischer Dysfunktion führen. Beispiele, die mit einer Erhöhung der Körperkerntemperatur einhergehen, sind Fieber und Hyperthermie. Fieber wird ausgelöst durch ein Ansteigen der Zytokinproduktion und ist von der Hyperthermie insofern abzugrenzen, dass es eine kontrollierte Hyperthermie im Rahmen der hypothalamischen Sollwertregulation darstellt (Silbernagl und Lang 2005). Die klassische Hyperthermie dagegen kann, entgegen der körpereigenen Temperatursollwerte, durch exogene Einflüsse oder durch schwankende bzw. abnehmende ovarielle Hormonspiegel zustande kommen (Hensel 1973; Silbernagl und Lang 2005; Maswood et al. 2006). Hitzewallungen im Sinne einer thermoregulatorischen Dysfunktion betreffen daher vor allem klimakterische Frauen (Couzi et al. 1995; Rossmannith und Rübberdt 2008).

1.5.1 Die Körpertemperatur der Ratte

Es existieren nur wenige Forschungszentren, die sich mit der Temperaturmessung von Ratten beschäftigen und sich darüber hinaus unterschiedlicher Messverfahren bedienen. Das in der Abteilung und für die vorliegende Arbeit verwendete Transpondersystem misst die Temperatur subkutan und kopfnah im Nackenbereich der Tiere. Im Gegensatz zur telemetrischen Messung ist das Verfahren sehr viel zeitaufwändiger. In vorangehenden Untersuchungen ergaben sich mit diesem Messverfahren für intakte weibliche Ratten subkutane Körpertemperaturen im Bereich von $37,5 \pm 0,4^{\circ}\text{C}$ (Puri et al. 2011; Kapur et al. 2010 b). Im vorliegenden Versuch lagen die Temperaturen noch etwas höher bei durchschnittlich $38,7^{\circ}\text{C}$ bei den intakten Tieren. Demnach liegt die mittlere physiologische Körpertemperatur der Ratte um $1\text{-}2^{\circ}\text{C}$ höher als die des Menschen.

1.5.2 Die Thermoregulation

Neuroendokrines und somatomotorisches System bilden zusammen mit dem vegetativen Nervensystem den bidirektionalen Regelkreis der Thermoregulation (Deecher 2005). Resultierend ist die von der Außentemperatur unabhängige Konstanthaltung der Körperkerntemperatur, was die vollständige Organintegrität gewährleistet (Charkoudian 2003).

Dem Hypothalamus, insbesondere seiner Area preoptica, wird eine übergeordnete thermoregulatorische Kontrollfunktion beigemessen (Crawshaw et al. 1985; Boulant und Dean 1986; Romanovsky 2007). Hier wird die Körperkerntemperatur sensorisch mit oberen und unteren Sollwerten für Schwitzen bzw. Frieren abgeglichen (Freedman 2001; Charkoudian 2003). Der Temperaturbereich innerhalb dieser beiden Schwellwerte definiert die thermoneutrale Zone (Cabanac und Massonnet 1977). Ihre Grenzen können tagesrhythmisch variieren (Deecher 2005; Hensel 1973). Schwitzen und Kältezittern sind als thermoregulatorische Reaktionen zu verstehen, welche die Konstanthaltung der Körpertemperatur innerhalb der Sollwerte, wenn nötig, bewirken (Deecher 2005).

Die Temperatur im Körperkern wird durch Temperatursensoren an inneren Geweben und Nervenfasern der Haut erfasst (Frank et al. 2000; Simon 2000; Romanovsky 2007). Über afferente Signalwege wird die Information an das ZNS fortgeleitet, wo

die Verarbeitung über Neurotransmitter, insbesondere Monoamine und GABA, stattfindet (Rossmanith und Rübberdt 2009). Die thermosensiblen Neurone des präoptischen Hypothalamus induzieren indirekt über sympathische Nervenfasern Signale zur Vasodilatation bzw. -konstriktion im peripheren Gefäßsystem, was die thermoregulatorischen Reaktionen wie Schwitzen und Kältezittern auslöst (Bruck und Zeisberger 1990; Zhang et al. 1997; Boulant 2000).

1.5.3 Hitzewallungen

Hitzewallungen (*hot flushes, hot flashes*) sind als Teil der vasomotorischen Symptome (VMS) zu verstehen. Nach der North American Menopause Society (NAMS 2004) bilden VMS damit einen Überbegriff für die Symptome von Hitzewallungen und Nachtschweiß, die in individuell unterschiedlichem Ausmaß auftreten können.

Erste Symptome machen sich oft in der frühklimakterischen Phase, d.h. etwa ab dem 50. Lebensjahr bemerkbar. Auch noch zehn Jahre nach der Menopause leiden etwa 10% der betroffenen Frauen an Hitzewallungen, deren Häufigkeit und Intensität sehr unterschiedlich sein können (National Institutes of Health 2005).

1.5.4 Definition und Symptomatik

Hitzewallungen sind definiert als in der Regel 1-5 (maximal 20 Minuten) andauernde und vorübergehende, jedoch wiederkehrende Episoden von Hyperthermie der Haut und erhöhter Schweißabsonderung. Diese betreffen insbesondere Oberkörper und Gesicht und reichen von einem Wärmegefühl bis hin zur intensiven Hitzeempfindung. Oft sind sie begleitet von einer Rötung der Haut. Gelegentlich sind Hitzewallungen von Kälteempfinden und Schüttelfrost gefolgt. Als Nachtschweiß werden Hitzewallungen bezeichnet, die nachts und mit erhöhter Schweißsekretion auftreten (NAMS 2004). Starke nächtliche Schweißattacken führen oftmals zu Schlafstörungen (Woodward und Freedman 1994). Desweiteren gehen Hitzewallungen häufig mit vegetativen Beschwerden wie Druckgefühl im Kopf oder Brustkorb, innerer Unruhe, Übelkeit, Tachykardie oder Tachypnoe einher (Kronenberg 1990).

Für die Definition der Hitzewallungen bei Ratten gibt es verschiedene Ansätze, abhängig vom jeweiligen Temperaturmessverfahren. Für die vorliegende Arbeit sind

die Ergebnisse aus vorangegangenen Studien unserer Abteilung relevant, welche mit dem gleichen Transpondermesssystem subkutan an ovx Kontrolltieren erhoben wurden. Es konnte gezeigt werden, dass die ovx Ratte ein sinnvolles Modell für Studien an Hitzewallungen darstellt, da die *hot flushes* in mehr oder weniger regelmäßigem Intervall von 20-40 Minuten auftraten, während sie bei inktakten Tieren nicht beobachtet wurden (Kapur et al. 2010 b). Dabei wurde ein Ansteigen der subkutanen, kopfnahen Körpertemperatur um etwa 1°C verglichen mit der Ausgangstemperatur als *hot flush* gewertet. Der Peak hielt in der Regel 5 Minuten an (Kapur et al. 2010 b; Puri et al. 2011).

1.5.5 GnRH-Pulsgenerator und Hitzewallungen

Menopausal und postmenopausal finden sich deutlich erhöhte Konzentrationen der Gonadotropine LH und FSH im Serum. Die Sekretion der Gonadotropine während des Klimakteriums ist pulsatil, also durch Freisetzungsepisoden, gesteuert. Die höchsten LH- und FSH-Spiegel treten in der frühen Menopause auf. (Rossmannith et al. 1990; Rossmannith und Ulrich 1993; Rossmannith und Rübberdt 2008). Es besteht eine bemerkenswerte Korrelation zwischen pulsatiler LH-Freisetzung und dem Auftreten von Hitzewallungen. Es ist bekannt, dass der GnRH-Pulsgenerator unter Östrogenmangel eine erhöhte Aktivität zeigt (O'Byrne und Knobil 1993). Besonders wichtig für die Regulation des Pulsgenerators sind die Neurotransmitter Serotonin, Dopamin, Noradrenalin und nicht zuletzt GABA. Unter hypoöstrogenen Bedingungen scheinen diese als "Transmitter-Cocktail" auf benachbarte thermoregulatorische Nervenzellen des Hypothalamus überzuspringen. Dieser Übersprung äußert sich in der Peripherie vasodilatatorisch und als Episode von Hitzewallungen, welche deshalb simultan zur pulsatilen LH-Freisetzung auftritt (Tataryn et al. 1980; DeFazio et al. 1984; Smith und Jennes 2001; Sturdee 2008; Kapur et al. 2010 b).

Somit ist davon auszugehen, dass allgemein jene Substanzen, die die Aktivität von Neurotransmittern zu regulieren bzw. zu inhibieren vermögen, potenziell wirksam in der Behandlung von Hitzewallungen sind. Am Modell der ovx Ratte konnte gezeigt werden, dass der Neurotransmitter GABA sowie GABAerge Stoffverbindungen in östrogensensitiven Neuronen der Area preoptica die Hemmung der gesteigerten Aktivität des GnRH-Pulsgenerators bewirken (Mansky et al. 1982; Flügge et al. 1986; Herbison et al. 1991).

1.6 Die Therapieansätze im Vergleich

1.6.1 Östrogene

Das für den Organismus bedeutendste Östrogen ist das 17β -Östradiol (E₂). Seine Synthese erfolgt zum größten Teil in den Gonaden, also den Ovarien der Frau und den Hoden des Mannes. Desweiteren findet auch in der Plazenta, der Nebennierenrinde und zu kleinerem Teil im Fett-, Muskel- und auch Nervengewebe E₂-Produktion statt (Zhao et al. 2005; Ghosh et al. 2009). Um menopausalen Östrogenmangelerscheinungen medikamentös entgegenzuwirken, spielt die Hormonersatztherapie (*HRT, hormone replacement therapy*) mit einer Kombination aus Östrogen- und Progesteronpräparaten eine große Rolle in der Behandlung der klimakterischen Beschwerden wie z.B. Hitzewallungen. Neurone des Hypothalamus, insbesondere der Area preoptica, verfügen über Steroidrezeptoren und unterliegen somit einer sensiblen Beeinflussung durch Östrogene (Woolley und McEwen 1993; Boulant 2000). Auf diese Weise greifen sie in neuronale Regelkreise ein, die von thermoregulatorischer Relevanz sind (McEwen 2002). Unter HRT konnten Hitzewallungen erfolgreich gemindert werden, da die Hyperaktivität des GnRH-Pulsgenerators durch die Östrogensupplementation renormalisiert werden konnte (Loprinzi et al. 2009).

Im Lipidstoffwechsel spielt E₂ prä- und postmenopausal eine wichtige Rolle. In Studien an ovx Ratten, die im Rahmen des Versuchs E₂-substituiert wurden, konnte eine Verminderung von HDL, LDL und Cholesterol gezeigt werden (Kuller et al. 1990; Liu und Bachmann 1998). Grund dafür ist eine E₂-stimulierte vermehrte Expression des LDL-Rezeptors in der Leber, was wiederum zu einer gesteigerten Endozytose der LDL in die Hepatozyten und damit zu einem Absinken der LDL im Serum führt (Cooper et al. 1987; Parini et al. 1997; Parini et al. 2000). Auf gleiche Art und Weise bewirkt E₂ auch postmenopausal eine Verminderung der Serumlipide.

Die in Studien beschriebene karzinogene Wirkung der HRT auf das Mammagewebe sowie der Anstieg des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen (Rossouw et al. 2002; Beral 2003) führten zur Suche nach geeigneten Alternativen.

1.6.2 20-Hydroxyecdysone

Die im Experiment verwendete Testsubstanz 20-Hydroxyecdysone (β -Ecdysone, E20, Ecd) gehört zur Gruppe der Ecdysteroide und wird in der vorliegenden Arbeit als Ecd bezeichnet. Erstmals beschrieben wurde Ecd im Jahr 1954 von Butenandt und Karlson als ein "Metamorphosehormon der Insekten in kristallisierter Form" (Butenandt und Karlson 1954). Im Laufe der Nachforschungen wurden die Ecdysteroide jedoch nicht mehr nur aus Arthropoden, sondern vielmehr auch aus Pflanzen gewonnen (Dinan et al. 2001). Säugetiere hingegen sind nicht in der Lage, Ecd selbst zu produzieren. Als Lebensmittel gebräuchliche Pflanzen, wie beispielsweise Spinat oder Quinoa, enthalten hohe Anteile des Phytoecdysteroids (Zhu et al. 2001; Findeisen 2005). Ein Ecdysteroidezeptor, wie er bei Arthropoden existiert, konnte beim Säuger nicht identifiziert werden (Dinan und Lafont 2006). Nicht zuletzt deswegen bleibt der genaue Wirkmechanismus von Ecd in Säugern bislang nicht hinreichend verstanden. Sicher ist aber, dass Ecd nicht an Östrogenrezeptoren zu binden vermag (Kapur et al. 2010 a; Seidlová-Wuttke et al. 2010 a; Seidlová-Wuttke et al. 2010 b), da es keinerlei stimulierende Wirkung auf das Uterusgewebe besitzt. Laut Kriterien der OECD ist Ecd somit als Wirkstoff ohne östrogene Aktivität definiert (Owens und Koeter 2003). Auch eine Wirkung von Ecd auf Androgenrezeptoren konnte nicht beschrieben werden (Dinan und Lafont 2006). Zu seinen Effekten zählt unter anderem eine hypoglykämische und somit antidiabetische Wirkung (Yoshida et al. 1971; Kizelsztejn et al. 2009). Auch Effekte von Ecd auf Serumlipide konnte vielfach gezeigt werden. Beobachtet wurde dabei ein Absinken des Serum-Cholesterins und der freien Fettsäuren im Blut (Mironova et al. 1982; Catalan et al. 1985).

Für die vorliegende Arbeit ist die hemmende Wirkung von Ecd auf vasomotorische Symptomatik von besonderer Relevanz (Puri et al. 2011). Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ist für Ecd ein stimulierender Einfluss auf GABAerge Signalwege gezeigt worden (Tsujiyama et al. 1995; Okada et al. 1998). Die Hemmung der thermosensitiven Neurone des Hypothalamus durch GABA ist der bedeutendste therapeutische Ansatz zur Linderung von Hitzewallungssymptomatik in ovx Ratten (Puri et al. 2011).

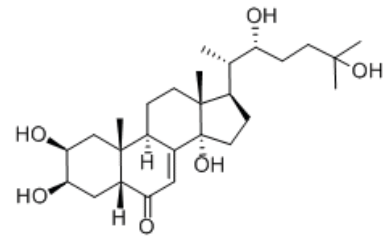


Abbildung 2. Strukturformel von 20-Hydroxyecdysone

1.7 Zielsetzung

Die Untersuchung der Effekte von Ecd und E2 auf die Körpertemperatur und das abdominale und paratibiale Fettgewebe der ovx Ratte unter zusätzlicher Betrachtung relevanter Serumparameter ist Inhalt der vorliegenden Dissertation. Die ovx S.D.-Ratte wurde dabei als Versuchstier ausgewählt, da sie in der endokrinologischen Forschung ein etabliertes Modell für die klimakterische Frau darstellt (Bellino 2000). Auch in unserer Abteilung wird sie seit Jahren erfolgreich als Modell für Studien bezüglich Osteoporose und Osteoarthritis (Seidlová-Wuttke et al. 2008; Kapur et al. 2010 a), dem Metabolischen Syndrom (Seidlová-Wuttke et al. 2010) und klimakterischen Beschwerden (Ehrhardt et al. 2010; Kapur et al. 2010 b; Puri et al. 2011) eingesetzt.

Folgenden Fragen sollen in der vorliegenden Arbeit beantwortet werden:

1. Welchen Einfluss haben die Testsubstanzen Ecd und E2 auf das viszerale und paratibiale Fettgewebe von S.D.-Ratten nach einer kurzfristigen Applikation von nur vier Wochen? Gibt es dabei unterschiedliche Effekte in den verschiedenen Fettdepots?
2. Besteht ein regulatorischer Einfluss von Ecd und E2 auf die Serumlipide und Insulin und Glukose von S.D.-Ratten nach nur vierwöchiger Wirkstoffapplikation? Kann anhand des HOMA-Index bei Ecd- und E2-Tieren ein Anhalt für eine mögliche Insulinresistenz gefunden werden?
3. Zeigt Ecd innerhalb von zwei Wochen einen Effekt auf die Thermoregulation von S.D.-Ratten? Wie äußern sich die Effekte und wie anhaltend zeigen sie sich?

2. Material und Methoden

Die Untersuchungen fanden vom 16. März 2011 (qCT1) bis 30. April 2011 (Obduktion) unter Aufsicht von Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und unter Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig 33.11.42504-04-043/08 in der Zentralen Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen statt und wurden von meinem Co-Doktoranden Matthias Schumann und mir zu gleichen Anteilen selbstständig durchgeführt. Abbildung 3 gibt einen zeitlichen Überblick über den Versuchszeitraum.

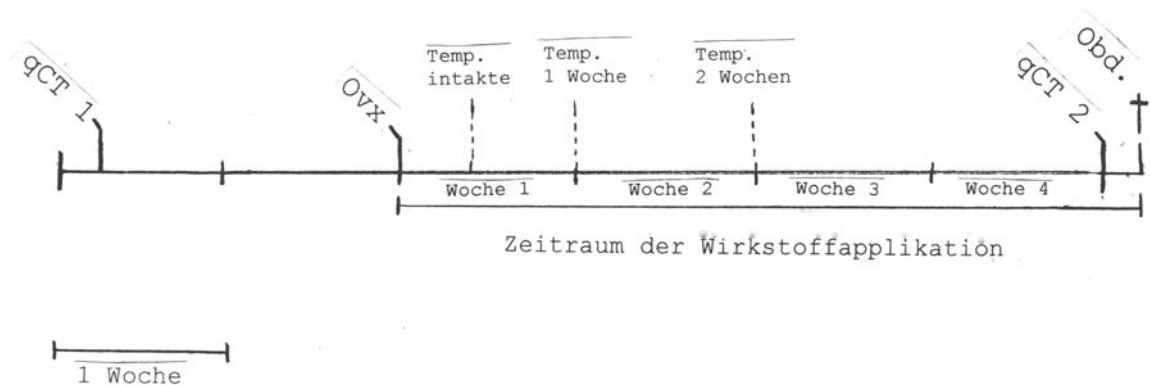


Abbildung 3. Zeitlicher Überblick der Ereignisse über den gesamten Versuchszeitraum. Die initiale qCT-Messung aller Tiere (qCT 1) fand ca. zwei Wochen vor OvX statt. Anschließend folgte die Applikation der Wirkstoffe über 4 Wochen mit den Temperaturmessungen (Temp.). Die Temperatur der intakten Tiere wurde nur einmal drei Tage nach Beginn der Wirkstoffapplikation gemessen. Am Ende des Testzeitraums wurden alle Tiere erneut im qCT (qCT 2) gemessen und zwei Tage später getötet und obduziert (Obd.). Skizze: Moritz Pettenkofer, 2012.

2.1 Tierversuche

2.1.1 Versuchstiere

Untersucht wurden 40 S.D.-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln), welche auf acht Käfige (Makrolon®-Käfig Typ IV, Firma Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) zu je fünf Tieren verteilt wurden. Das bedeutet, dass während der Versuchszeit jeweils zwei Käfige mit der gleichen Substanz gefüttert wurden (4 Gruppen à 10 Ratten). Zu Versuchsbeginn hatten die Tiere ein Alter von ca. drei

Monaten. Unter konstanten Raumbedingungen (Temperatur von 23° C und relative Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 55%) wurden die Tiere separat vom Untersuchungslabor gehalten. Unter automatischer Regulation wurde der Raum der Versuchstierunterbringung über den gesamten Zeitraum der Versuchstierhaltung täglich von 6.00 Uhr bis 18.00 Uhr beleuchtet. Die Tiere erhielten zu ihrer freien Verfügung Futter über eine Raufe und Wasser über eine Trinkflasche. Der wöchentliche Futterwechsel und das Wiegen des Restfutters wurden von Matthias Schumann und mir eigenständig durchgeführt. Das Gewicht jeder einzelnen Ratte zu Versuchsbeginn betrug jeweils zwischen 227 und 284 g. Vor der ersten Verabreichung des speziellen Futters tauschten wir einige der Tiere gemäß ihres individuellen Körpergewichts mit Tieren aus anderen Käfigen, um ein ausgewogenes Gesamtgewicht der Ratten jedes einzelnen Käfigs zu erzielen. So wurde ein Referenzwert ermittelt, der es erlaubte, die im Laufe des Versuchs gemessenen Körpergewichte, und den damit verbundenen Zuwachs an Gewebe, vergleichbar zu machen.

2.1.2 Ovariectomie (Ovx)

Die bilaterale Ovariectomie fand nach der ersten qCT-Messung unter Isoflurannarkose (Forene® , Abbott, Illinois, USA) und postoperativer Analgesie mit Rimadyl® (Pfizer GmbH, Karlsruhe) unter operativer Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke statt. Es assistierten Matthias Schumann und ich. Zunächst erfolgte eine Rasur des Abdomens im Bereich der Ovarien. Nach beidseitigen Inzisionen wurde der Peritonealraum der Ratte eröffnet um Uterus und Adnexe mittels Pinzette nach Außen zu verlagern. Die Ovarien wurden erst abgeklemmt und dann vom Gewebe getrennt. Anschließend wurde der Uterus wieder in die Bauchhöhle zurückverlagert. Beim Wundverschluss wurden Muskeln und Peritoneum zusammen vernäht (Vicryl®, Firma Ethicon, Norderstedt) und der Hautschnitt mit Michel-Klammern® (Firma Martin, Tuttlingen) verschlossen. Um eine Nachblutung der Wunden auszuschließen wurden die Ratten nach Ende der Isoflurangaszufuhr in einen separaten Käfig gesetzt, in welchem sie unter Beobachtung erwachten.

2.1.3 Applikation der Wirkstoffe

Alle Versuchstiere erhielten in der Eingewöhnungsphase bis zwei Wochen vor Versuchsbeginn sojafreie Nahrung. Somit war eine vergleichbare östrogenfreie Ausgangssituation für jedes Tier gewährleistet. Zwei Wochen vor Beginn des Versuchs erfolgte dann eine Umstellung auf das ebenfalls sojafreie Kontrollfutter ssniff® EF R/M Kontrolle (E 15000-04, 10 Pellets, ssniff® Spezialitäten GmbH, Soest)

Im Anschluss an die Ovx am 28. März 2011 teilten wir eigenhändig die Versuchstiere gemäß ihres Gewichts in vier Gruppen à 10 Tiere auf. Die Ausgangsgewichte der einzelnen Tiere wurden im Rahmen der qCT-Messung ermittelt (siehe 2.1.4). Bei der Einteilung in die Gruppen wurde darauf geachtet, dass jedes der 5 Tiere eines Käfigs in etwa das gleiche mittlere Körpergewicht hatte. Die einzelnen Testsubstanzen wurden schließlich nach Ovx per Futter gegeben (ssniff® Spezialitäten GmbH, Soest) und bildeten 4 Gruppen:

- EF R/M sojafreies Kontrollfutter bei Ko,ovx Tieren
- EF R/M sojafreies Kontrollfutter bei intakten Tieren
- EF R/M ecdysonhaltiges sojafreies Futter bei Ecd,ovx Tieren (3g/kg Futter)
- EF R/M östradiolhaltiges Futter bei E2,ovx Tieren (10 mg/kg Futter)

Das Futter stand den Tieren über den Versuchszeitraum von 4 Wochen per Raufe zur Verfügung.

Während der Versuchslaufzeit wurde von uns alle 7 Tage vormittags die Menge des in der Raufe übrigen Futters gewogen, um die mittlere aufgenommene Nahrungsmenge pro Tier und Tag zu ermitteln. Exakte Mengenangaben sind der Tabelle 3 zu entnehmen.

Tabelle 1. Mittlere Futtermenge eines Versuchstieres pro Tag in Gramm und die damit durchschnittlich aufgenommene Substanz pro Tier/Tag in Milligramm.

Testsubstanz	Futtermenge (g/Tier/Tag)	Substanzmenge (mg/Tier/Tag)
EF R/M sojafrei (Ko,ovx)	18,66	-
EF R/M sojafrei (intakt)	16,38	-
EF R/M Ecd (Ecd,ovx)	21,90	65,7
EF R/M E2 (E2,ovx)	15,48	0,1548

2.1.4 Ablauf von Transponderimplantation und qCT-Messung

Gemessen wurde mittels eines quantitativen Computertomographen (Norland Stratec XCT Research SA+, Firma Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim). Unter Anleitung von Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke wurden die im Folgenden beschriebenen Handlungen eigenständig von Matthias Schumann und mir durchgeführt.

Es wurden zwei qCT-Messungen vorgenommen um den Effekt der Futtermenge auf die Gewebeanteile Fett, Knochen und Muskel zu quantifizieren. Für die vorliegende Arbeit sind die qCT-Ergebnisse für das Fettgewebe relevant. Knochen und Muskulatur sind Inhalt der Dissertationsarbeit von Matthias Schumann. Die erste Messung erfolgte präovx und die zweite nach der vierwöchigen Applikation der Wirkstoffe. Bereits eine Stunde vor Messbeginn brachten wir den jeweiligen Käfig samt der zu messenden Tiere zum Eingewöhnen in das Untersuchungslabor. Dort herrschten mit einer Raumtemperatur von 23°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 55% die gleichen Bedingungen wie im Raum der Versuchstierunterbringung.

Die Tiere wurden von uns einzeln zur qCT-Messung herangezogen und dafür zunächst mittels Isofluran-Gas (Forene®, Abbott, Illinois, USA) narkotisiert. Anschließend wurde das Tier gewogen. Das hierbei ermittelte Körpergewicht wurde als Anfangsgewicht festgelegt. Es folgte die subkutane Implantation eines Transpondersystems (IPPT-300, ELAMS PLEXX, Elst, Niederlande) im Nackenbereich. Jeder einzelne der insgesamt 40 Transponder war für eine individuelle Kennzahl von 1 bis 40 programmiert und mit einem Thermosensor

ausgestattet, was eine Identifizierung und gleichzeitige subkutane Temperaturmessung der Ratte durch ein elektronisches Lesegerät (ELAMS PLEXX System, Elst, Niederlande) ermöglichte. Die Größe der Transponder (14 mm Länge und 2,2 mm Breite) erlaubte die Implantation mit Hilfe einer Hohlnadel. So konnte der Transponder ohne Komplikation an gewünschter Stelle zwischen Dermis und subdormaler Fettschicht eingepflanzt werden. Der Transponder sendete ein konstantes elektromagnetisches Signal aus, welches vom stabartigen elektronischen Lesegerät innerhalb von zwei Sekunden erfasst wurde, wenn das Lesegerät 1-3 cm über der Implantationsstelle gehalten wurde. So konnte die Information über Identifikation und subkutaner Körpertemperatur erfasst werden, ohne die sich frei bewegende Ratte aus ihrem Umfeld zu nehmen.

Für die qCT-Messung wurde die identifizierte Ratte seitlich auf eine Messvorrichtung gelegt. Für die paratibiale Messung wurde der linke Fuß unmittelbar oberhalb des Malleolus mit einer Klemme fixiert um ein stets gleich lokalisiertes Schnittbild auf Höhe der tibialen Metaphyse zu gewährleisten (siehe Abbildung 4). Die eigentliche Messdauer der qCT der Tibia betrug etwa 15 Minuten pro Tier. Anschließend wurde das Tier unter Narkose aus der Vorrichtung entfernt und in eine eigens für die Abdomen-Messung zugeschnittene Plastikvorrichtung gelegt. Das Tier lag hierbei auf dem Rücken. Die Orientierung zur richtigen Platzierung des Tieres im qCT erfolgte anhand der Höhe der Beckenkämme bei L4/L5. Die Messung dauerte etwa 10 Minuten pro Tier. Nach Abschluss der Abdomen-Messung wurde die Narkosegaszufuhr ausgeschaltet und das Tier aus der Vorrichtung gelöst. Zur Akklimatisierung stand ein mit Zellstoff gepolsterter Aufwachkäfig bereit, in dem das Tier unter Beobachtung wieder erwachte. Das Prinzip der qCT-Messung wurde in vorangegangenen Arbeiten der Abteilung bereits mehrere Male beschrieben. Zum Verständnis wird in Kapitel 2.2.1 ein Überblick gegeben.

2.1.5 Ablauf der Temperaturmessung

Auch die Temperaturmessungen wurden von Matthias Schumann und mir eigenständig nach Anleitung von Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke durchgeführt. Drei Tage nach Ovx wurde zunächst die Temperatur der 10 intakt gebliebenen Tiere gemessen, um im weiteren Verlauf Vergleichswerte zu den ovx Ratten zu erhalten. Die ovx Ratten wurden zweimal gemessen. Die erste Messung

fand 7 Tage nach Ovx statt und die zweite Messung weitere 7 Tage später. Die Messungen erfolgten bei konstanten Raumbedingungen von 23-25°C und einer relativen Luftfeuchtigkeit zwischen 50 und 55 % im Untersuchungslabor mittels subkutan implantierten, temperatursensitiven Transpondern (IPPT-300) des ELAMS PLEXX Systems (Elst, Niederlande). Die Transponder waren dieselben, welche vor Versuchsbeginn zur numerischen Identifizierung der einzelnen Ratten genutzt wurden (Zum Ablauf der Implantation siehe 2.1.2.). 30 Minuten vor Beginn der Messung wurden die Tiere zur Eingewöhnung ins Untersuchungslabor gebracht, wo sie spielerisch mit dem Lesegerät vertraut gemacht wurden. Der implantierte Transponder sendet ein konstantes elektromagnetisches Signal aus, welches Informationen zur Identifikation und subkutanen Körpertemperatur der Ratte beinhaltet. Die Informationen wird innerhalb von zwei Sekunden erfasst , wenn das digitale Lesegerät im Abstand von etwa 1-3 cm über die Ratte gehalten wird. So konnten die Ratten sich während des Versuchs in ihrem gewohnten Umfeld frei bewegen. Zur Erleichterung der Unterscheidung wurden die Tiere auf dem Rückenfell unterschiedlich farblich markiert. Ein kompletter Messdurchlauf dauerte zwei Stunden und beinhaltete pro Tier mindestens 20 Messungen im 5-Minuten-Intervall. Pro Intervall wurde jede Ratte einmal gemessen. Untersucht wurde vormittags zwischen 10.00 und 12.00 Uhr, da die Tiere in diesem Zeitraum am ruhigsten waren. Zeitgleich wurden pro Durchlauf zwei Käfige à 5 Tiere gemessen.

2.1.6 Obduktion

Die Obduktion der Versuchstiere erfolgte an einem Vormittag zwischen 8.30 und 12 Uhr im Anschluss an die vierwöchige Applikation der Wirkstoffe und der abschließenden qCT-Messung unter Leitung von Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke. Ihnen assistierten die Doktorandinnen der Abteilung Maria Tschernova und Lea Lass. Die Tiere wurden zunächst im Raum der Versuchstierunterbringung randomisiert und mittels ELAMS PLEXX-System (Elst, Niederlande) von Mathias Schumann und mir identifiziert. Dann wurden die Tiere von uns einzeln und nacheinander in den Obduktionsraum gebracht, wo die Dekapitation von Prof. Dr. rer. nat. Hubertus Jarry unter vorangegangener CO₂-Narkose durchgeführt wurde. Es wurde tibiales Knochengewebe sowie Fett- und Muskelgewebe konserviert. Organewebe wurde für die histologische Auswertung

als Inhalt weiterer Arbeiten der Abteilung gewonnen. Das Blut wurde für die Serumiagnostik aufgefangen.

2.1.7 Serumiagnostik

Für die vorliegende Arbeit wurden die für die Diagnostik des Metabolischen Syndroms relevanten Serumparameter Glukose, Insulin, Cholesterol, HDL, LDL und Triglyzeride erhoben. Das im Rahmen der Obduktion aufgefangene Blut wurde zu diesem Zwecke mit dem Analysegerät Hitachi 902 automatic analyzer (Boehringer, Mannheim) analysiert und die Parameter bestimmt. Serum-Vergleichswerte mit Tieren präovx existieren nicht, da dies eine Tötung der Tiere zur lediglichen Bestimmung der Serumwerte verlangt hätte.

2.2 Auswertung

2.2.1 Ermittelte Parameter der qCT-Messung

In mehreren Publikationen der Abteilung wurde das Prinzip der qCT-Messung schon genau beschrieben (Seidlová-Wuttke et al., 2010 b). An dieser Stelle soll trotzdem eine kurze Übersicht der ausgewerteten Parameter erfolgen.

Die quantitativen CT-Messungen fokussierten sich in zwei voneinander getrennten Messungen zum einen auf die Tibia und zum anderen auf das Abdomen in Höhe L4/L5. Beide Messvorgänge wurden an allen 40 Versuchstieren jeweils einmal Präovx und dann zum Versuchsende nach der vierwöchigen Wirkstoffapplikation durchgeführt. Mit Hilfe eines Computerprogramms (XCT5,40; Stratec, Pforzheim) nahmen Matthias Schumann und ich die Auswertung der in den Messungen erhobenen Daten vor. Um die Fläche des paratibialen Fettdepots zu bestimmen wurde der Gesamtquerschnitt des Unterschenkels genommen, abzüglich der Knochen und Muskeln. Äquivalent dazu erfolgte die Bestimmung des abdominalen Fettdepots durch den Gesamtquerschnitt des Abdomens auf Höhe L4/L5, abzüglich des Knochen- und Muskelgewebes. Als Fettgewebe definiert wurde in der Auswertung ein Gewebe mit einer Dichte von bis zu 40 mg/cm^3 . Eine höhere Dichte von $40 - 99 \text{ mg/cm}^3$ gab definitionsgemäß einen Hinweis auf das Vorliegen von Muskulatur. Gewebedichten zwischen 200 und 400 mg/cm^3 bezeichneten

trabekuläres Knochengewebe. Die in Ebene 3 ermittelte kortikale Dichte des Knochens lag im Bereich oberhalb von 710 mg/cm^3 . Die Abbildung 4a dient zur Veranschaulichung von Messlinie und Dichtebereichen bei der qCT-Auswertung. Jede einzelne Messung der Tibia wurde in drei spezifischen Ebenen vorgenommen (3.75, 4.25 und 15 mm distal vom Referenzpunkt entfernt). Die Ebenen 1 und 2 dienten dabei der Betrachtung von trabekulärem Knochengewebe sowie Muskel- und Fettgewebe. Die Ebene 3 lieferte Werte zur Auswertung der Kortikalis.

Die Messungen des Abdomenquerschnitts wurden in drei Ebenen und jeweils 0,1 mm proximal und kaudal von der Referenzlinie entfernt, durchgeführt. Die zu bestimmenden Parameter waren auch hierbei in Ebene 1 und 2 trabekulär und in Ebene 3 kortikal. Die Abbildung 4b zeigt die Messpunkte des Abdomenquerschnitts.

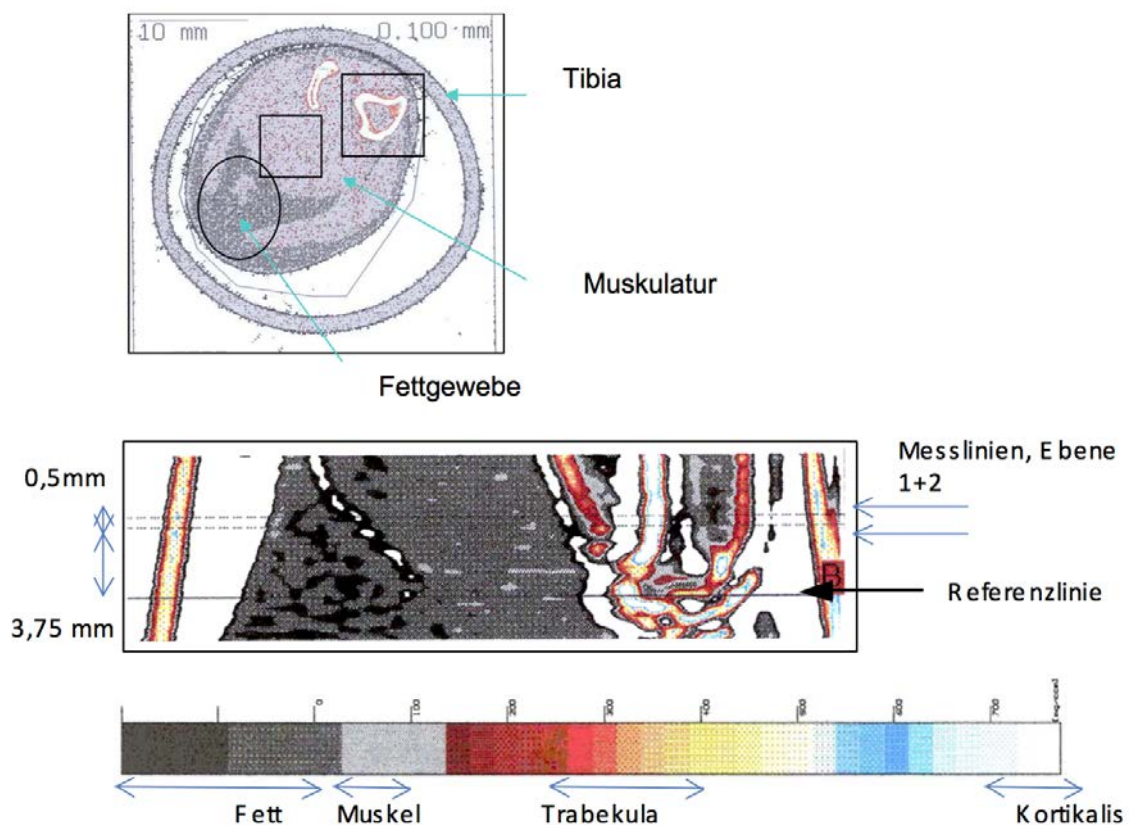


Abbildung 4a. Messlinie und Dichtebereiche bei der qCT - Auswertung am Beispiel der Tibia.

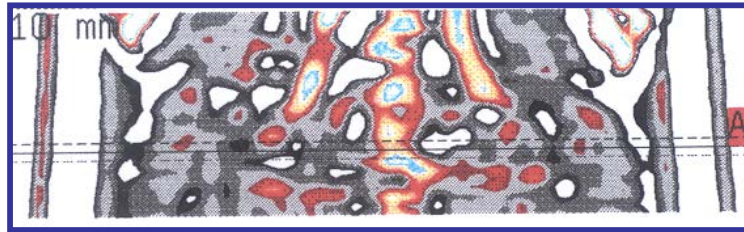


Abbildung 4b. Messlinie bei der qCT - Auswertung des Abdomen-Scans.

2.2.2 Statistische Methoden der qCT-Auswertung

Anhand der Computersoftware PRISM® (GraphPadPrism 5.0, San Diego, USA) erstellten Matthias Schumann und ich die den mittels qCT erhobenen Daten zugehörigen Graphen und deren Analyse. Hierbei wurde eine Varianzanalyse für die wiederholte Messung eines Faktors (ANOVA) sowie ein multipler Vergleichstest nach Dunnett herangezogen. Dabei erfolgte stets ein Vergleich der jeweiligen Substanzgruppe mit der Kontrollgruppe. Ein ungepaarter T-Test wurde letztlich genutzt, um die Mittelwerte einer Gruppe mit denen der Kontrollgruppe gezielt vergleichen zu können. Ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ war für jede einzelne Analyse fest bestimmt. Miteinander korrelierte Werte basieren auf linearen Regressionsanalysen.

2.2.3 Statistische Methoden zur Auswertung der Temperaturmessung

Die mittels ELAMS PLEXX-System (Elst, Niederlande) erhobenen Daten wurden von Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke in das Computerprogramm Excel (Microsoft, USA) eingelesen. Sortiert wurden die Temperaturwerte nach den jeweiligen Wirkstoffgruppen und nach Messdatum. Die statistische Analyse mittels Varianzanalyse (ANOVA) und multiplern Vergleichstest nach Dunnett, sowie die graphische Darstellung, wurden von Matthias Schumann und mir mit der Software PRISM® (GraphPadPrism 5.0, San Diego, USA) durchgeführt. Der entstandene Graph ermöglichte die Betrachtung der subkutanen Körpertemperatur im Verlauf von zwei Stunden. Ein ungepaarter T-Test mit einem festgelegten Signifikanzniveau von $P < 0,05$ wurde herangezogen, um die Mittelwerte der Kontrollgruppe mit einer anderen Gruppe zu vergleichen.

3. Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse vorgestellt, die sich bei der Auswertung der qCT für das Fettgewebe und mittels subkutaner Transpondermessung für die Körpertemperatur von S.D.-Ratten gezeigt haben. Dabei stehen die Effekte der per Futter verabreichten Wirkstoffe Ecd und E2 im Fokus der Untersuchungen. Die Serumwerte wurden aus dem nach Ende der vierwöchigen Wirkstoffapplikation im Rahmen der Dekapitation aufgefangenen Blut ermittelt. Somit existieren keine Vergleichswerte zu Präovx.

3.1 Körpergewicht und Futteraufnahme

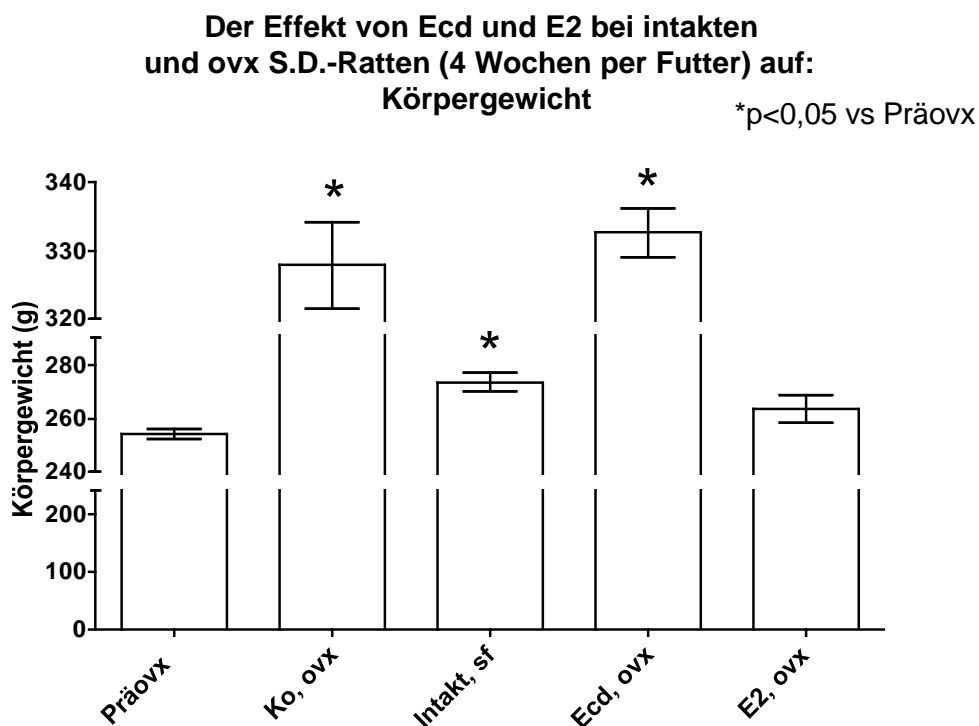


Abbildung 5. Die mittleren Körpergewichte aller Tiere vor Versuchsbeginn (Präovx) und nach Versuchsablauf in den einzelnen Gruppen.

Die Abbildung 5 zeigt die durchschnittlichen Körpergewichte der einzelnen Gruppen nach vierwöchiger Applikation der Wirkstoffe im Vergleich zu Präovx. Das durchschnittliche Körpergewicht aller Tiere lag präovx bei 254,1 g. Die jeweiligen

Gruppen waren mit ihrem mittleren Gewicht zwischen 249,1 und 261,4 g keinen signifikanten Schwankungen unterlegen. Die Ecd-Gruppe hat nach Versuchsablauf mit einem mittleren Körpergewicht von 332,7 g noch etwas mehr Gewicht zugelegt als die Kontrollgruppe mit 327,9 g. Die E2-Gruppe konnte als einzige kein Signifikanzniveau erreichen und hielt das Körpergewicht nahe dem Ausgangsgewicht bei 263,4 g. Die Abbildungen 5 und 6 sind identisch mit den entsprechenden Graphen in der Arbeit von Matthias Schumann, da sie demselben Versuch entstammen.

Der Effekt von Ecd und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: mittlere Körpergewichtszunahme (Δ BW)

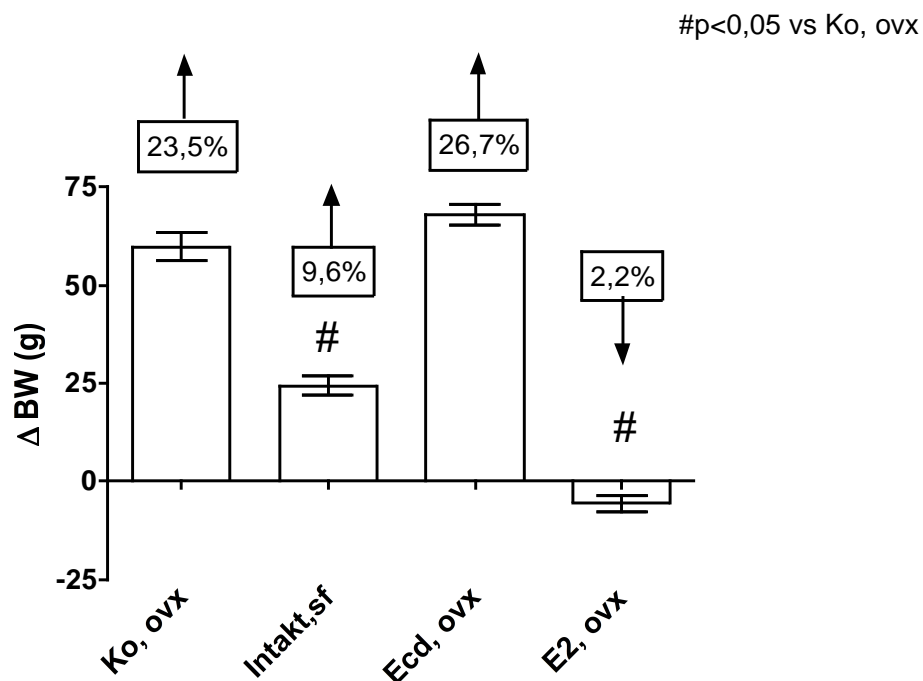


Abbildung 6. Die mittlere Körpergewichtszunahme von S.D.-Ratten über den Versuchszeitraum (Δ BW, *delta body weight*) in Gramm. In den Kästchen findet sich die prozentuale Zu- bzw. Abnahme im Vergleich zu Präovx.

Abbildung 6 zeigt den jeweiligen Gewichtszuwachs (Δ BW) der einzelnen Gruppen über den Zeitraum der Wirkstoffapplikation. Der Gewichtszuwachs ist nicht ganz proportional zur mittleren Futteraufnahme (g/Tier/Tag) zu verstehen. Die Tiere der Ecd-Gruppe fraßen mit 21,9 g/Tier/Tag im Schnitt am meisten und verzeichneten kongruent dazu den größten Gewichtszuwachs (26,7%). Jedoch war die

Futteraufnahme der E2-Tiere mit 15,48 g/Tier/Tag ähnlich der intakten Tiere mit 16,38 g/Tier/Tag, obgleich sich hier deutliche Differenzen im Δ BW zeigten. Die intakten nahmen um 9,6% an Gewicht zu, während die E2-Tiere um 2,2% abnahmen. Beide Gruppen konnten damit ein Signifikanzniveau verglichen mit der Kontrollgruppe erreichen. Die Ecd-Gruppe zeigte aufgrund der starken Gewichtszunahme kein Signifikanzniveau verglichen mit der Kontrollgruppe.

3.2 Fettgewebe

3.2.1 Fläche des viszeralen Fettdepots

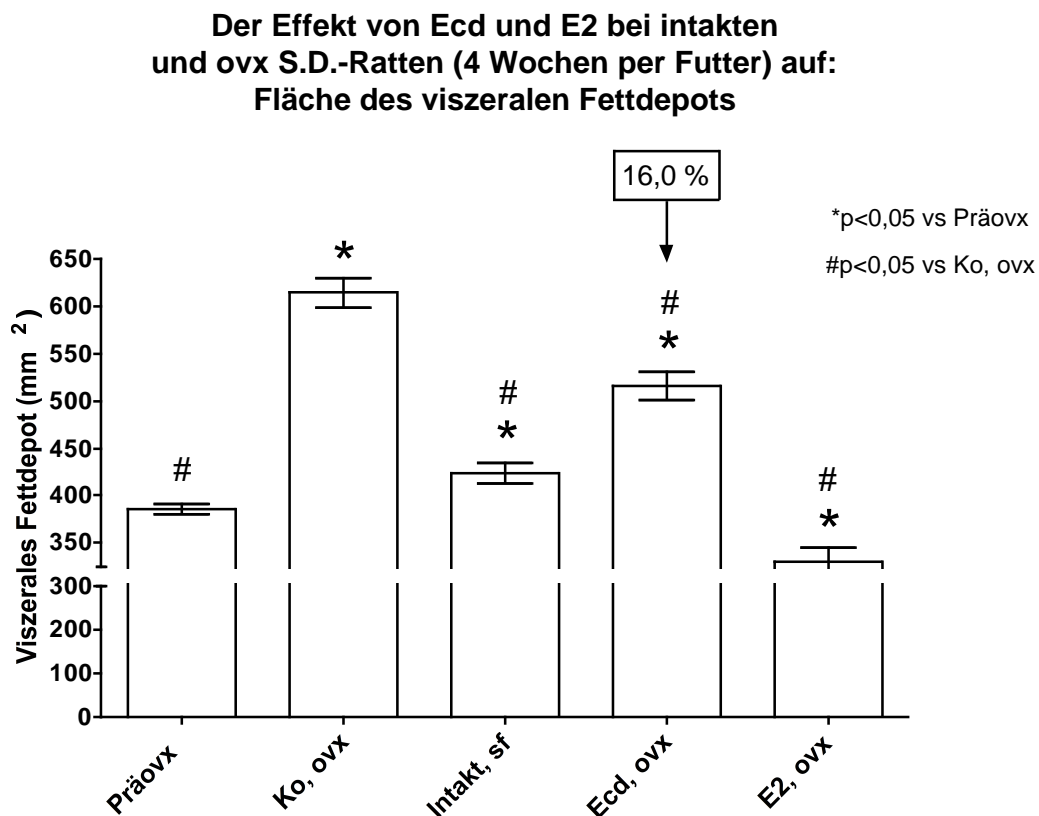


Abbildung 7. Fläche des viszeralen Fettdepots von intakten und ovx S.D.-Ratten vor Versuchsbeginn (Präovx) und nach vierwöchiger Applikation der jeweiligen Testsubstanz. Die mittlere Fettfläche der Ecd-Tiere zeigte im Vergleich zu den Kontrolltieren 16% weniger Masse und erreichte damit ein Signifikanzniveau. Die Abbildung verdeutlicht, dass die E2-Gruppe als einzige eine signifikante Abnahme der Fettfläche im Vergleich zu Präovx verzeichnen konnte. Alle anderen Gruppen nahmen signifikant zu.

Die Abbildung 7 zeigt die Flächen des viszeralen Fettgewebes der einzelnen Gruppen im Vergleich. Mit Ausnahme der E2-Gruppe zeigten alle anderen Gruppen einen signifikanten Zuwachs im Vergleich mit Präovx. Den größten Zuwachs an Fettfläche verglichen mit Präovx zeigten dabei die Kontrolltiere. Die E2-Tiere zeigten als einzige Gruppe eine Abnahme im Vergleich zu Präovx und hatten damit gegenüber der Kontrollgruppe den geringsten Zuwachs. Die Ecd-Gruppe hatte zwar nicht die vergleichsweise niedrigere Fettgewebsfläche der E2-Gruppe, jedoch war ihre viszerale Fettfläche um 16% niedriger als die der Kontrollgruppe und erreichte damit ebenfalls ein Signifikanzniveau. Die intakten Tiere haben über die gesamte Versuchslaufzeit vergleichsweise wenig an Fettfläche zugenommen und lagen deutlich signifikant unter dem Wert der ovx Kontrollgruppe.

**Korrelation delta Körpergewicht (Δ BW)
und Fläche des viszeralen Fettdepots
aller S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation**

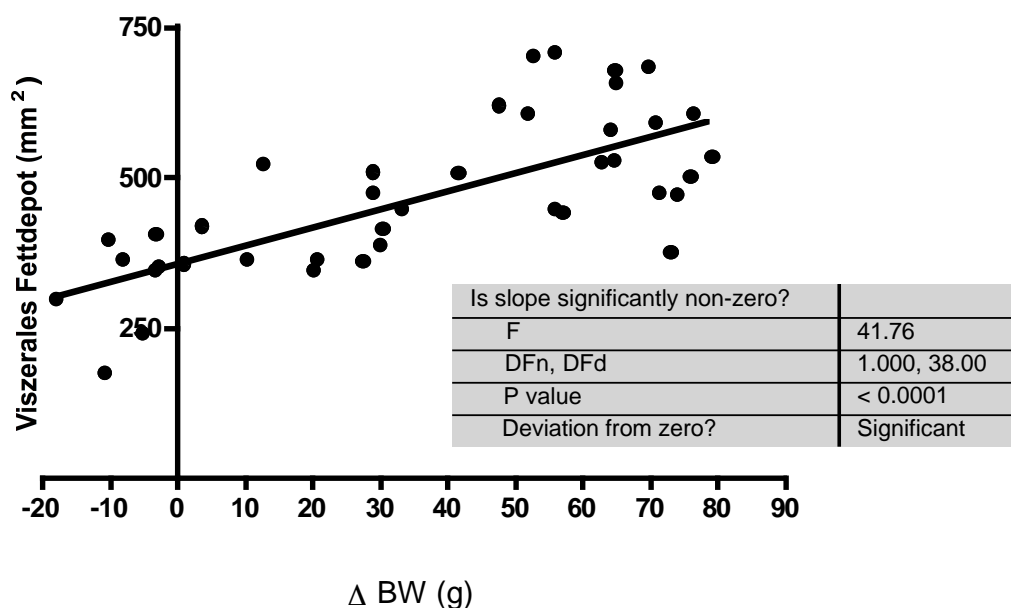


Abbildung 8. Korrelation der mittleren Körpergewichtszunahme (Δ BW) und der Fläche des viszeralen Fettgewebes aller S.D.-Ratten (n=40) nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation. Es besteht ein signifikanter linearer Zusammenhang.

Wie Abbildung 8 verdeutlicht, besteht ein signifikanter linearer Zusammenhang zwischen der Gewichtszunahme und der Fläche des viszeralen Fettgewebes aller

Tiere über den Versuchszeitraum. Da die Tiere der E2-Gruppe über den vierwöchigen Versuchszeitraum eine Gewichtsabnahme verzeichneten, zeigen sich in der Grafik Ordinatenwerte im negativen Bereich.

3.2.2 Anteil des viszeralen Fettdepots

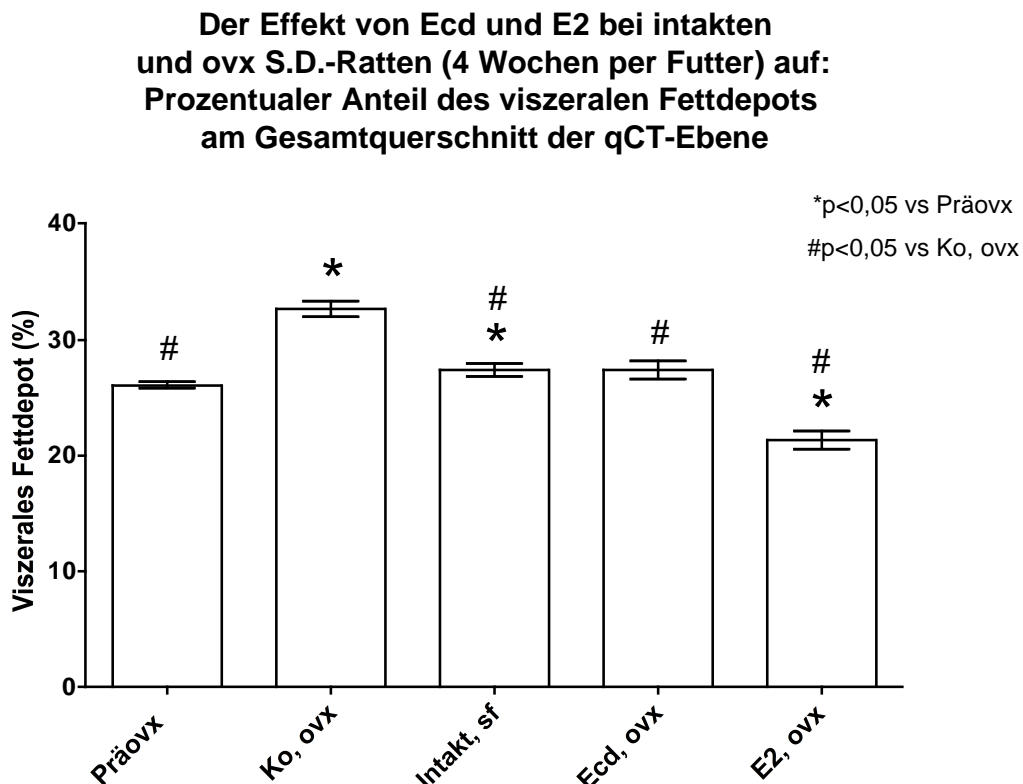


Abbildung 9. Prozentualer Anteil des viszeralen Fettdepots am abdominellen Querschnitt von intakten und ovx S.D.-Ratten vor Versuchsbeginn (Präovx) und nach vierwöchiger Applikation der jeweiligen Testsubstanz. Die Gewebeanteile von Fett, Muskel und Knochen ergeben zusammen 100%. Im Vergleich zur Kontrollgruppe nahmen alle Versuchsgruppen im Laufe des Versuchs signifikant ab. Dabei hielt die Ecd-Gruppe annähernd das Niveau der intakten Tiere und erreichte so ein Signifikanzniveau verglichen mit der Kontrollgruppe. Die E2-Gruppe zeigte im Vergleich mit Präovx und Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme des Bauchfettanteils.

Die Abbildung 9 zeigt den Anteil des viszeralen Fettgewebes am Abdomen-Querschnitt, wobei die Anteile Fett- Muskel und Knochengewebe zusammen 100 % ergeben. Es zeigt sich eine signifikante prozentuale Zunahme der Kontrollgruppe gegenüber Präovx. Im Vergleich mit den Kontrolltieren zeigten alle Versuchsgruppen eine signifikant geringere Zunahme des Bauchfettanteils. Hierbei verzeichnete die E2-Gruppe den größten messbaren Erfolg. Die Ecd-Gruppe behielt nach

Versuchsende ungefähr den gleichen Anteil an Bauchfettgewebe wie die intakten Tiere. Verglichen mit Präovx zeigte sich keine signifikante Veränderung des Anteils unter Ecd. Die einzige Gruppe, die eine signifikante Abnahme des viszeralen Fettdepots im Vergleich mit Präovx verzeichnen konnte, war die E2-Gruppe. Entsprechend zeigte sie verglichen mit der Kontrollgruppe den geringsten Zuwachs.

3.2.3 Fläche des paratibialen Fettdepots

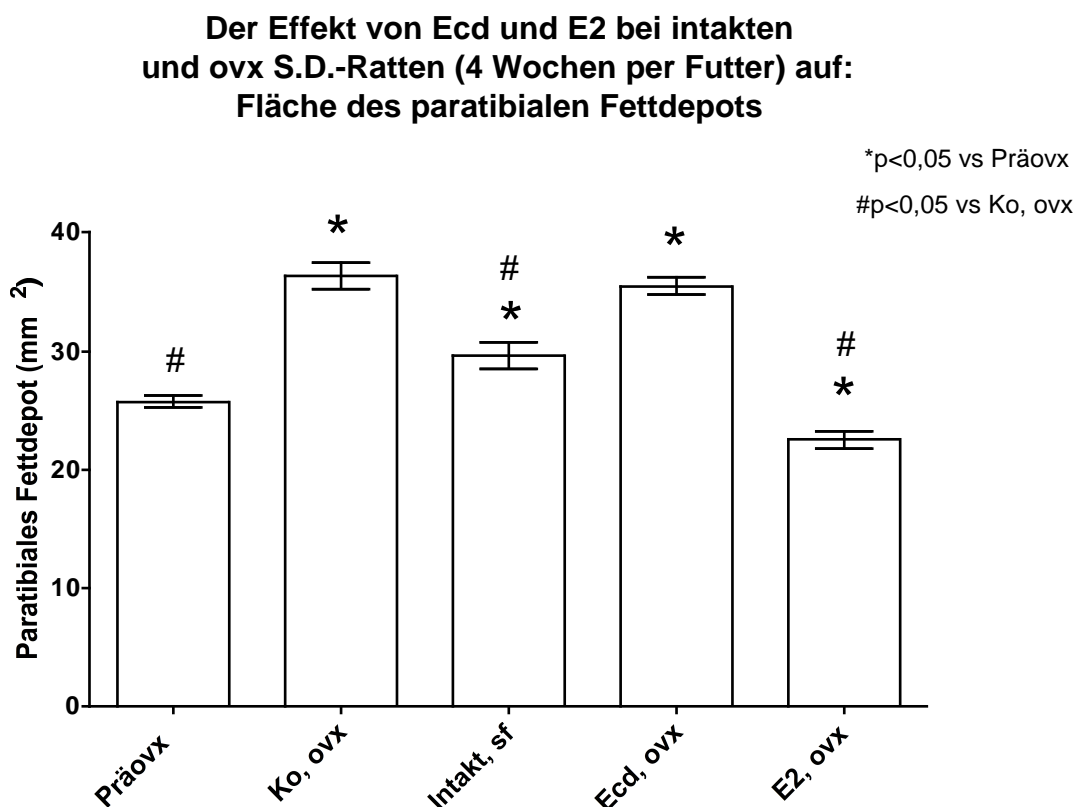
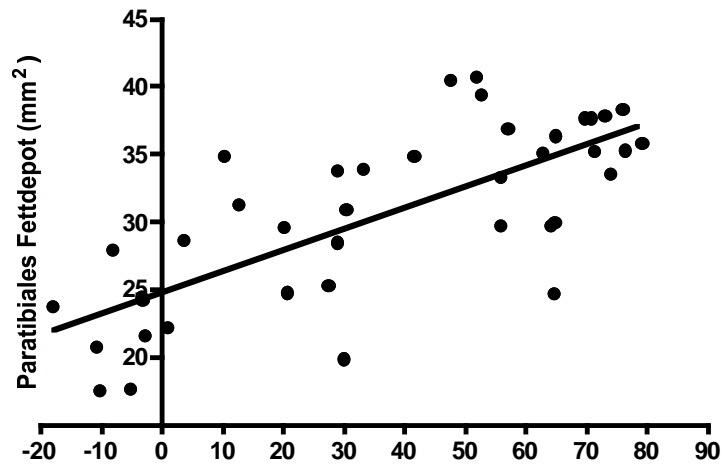


Abbildung 10. Fläche des paratibialen Fettdepots von intakten und ovx S.D.-Ratten. Die Ecd-Gruppe erreichte im Vergleich mit der Kontrollgruppe keine signifikante Minderung. Dagegen erzielten die E2-Gruppe eine signifikante Reduktion der paratibialen Fettfläche im Vergleich zu Präovx und Kontrolltieren.

Abbildung 10 zeigt den größten Zuwachs an paratibialer Fettfläche, verglichen mit Präovx, bei den Tieren der Kontrollgruppe. Die Abnahme der Ecd-Gruppe im Vergleich mit den Kontrolltieren fiel zu gering aus und erreichte somit kein Signifikanzniveau. Die E2-Gruppe konnte eine signifikante Abnahme der paratibialen Fettfläche im Vergleich zur Kontrollgruppe (62% des Kontrollgruppenwertes) und zu

Präovx erreichen. Die intakten Tiere nahmen im Vergleich zu Präovx signifikant zu und im Vergleich mit den Kontrolltieren signifikant ab.

**Korrelation delta Körpergewicht (Δ BW)
und Fläche des paratibialen Fettdepots
aller S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation**



Is slope significantly non-zero?	
F	45.00
DFn, DFd	1.000, 38.00
P value	< 0.0001
Deviation from zero?	Significant

Abbildung 11. Korrelation der mittleren Körpergewichtszunahme (Δ BW) und der Fläche des paratibialen Fettgewebes aller S.D.-Ratten (n=40) nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation. Es besteht ein signifikanter linearer Zusammenhang.

Bezogen auf die Fläche des Fettgewebes der distalen Tibia ließ sich ein signifikanter Zusammenhang mit der Körpergewichtszunahme aller S.D.-Ratten über den Versuchszeitraum feststellen, wie Abbildung 11 verdeutlicht.

3.2.4 Anteil des paratibialen Fettdepots

Der Effekt von Ecd und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Prozentualer Anteil des paratibialen Fettdepots am Gesamtquerschnitt der qCT-Ebene

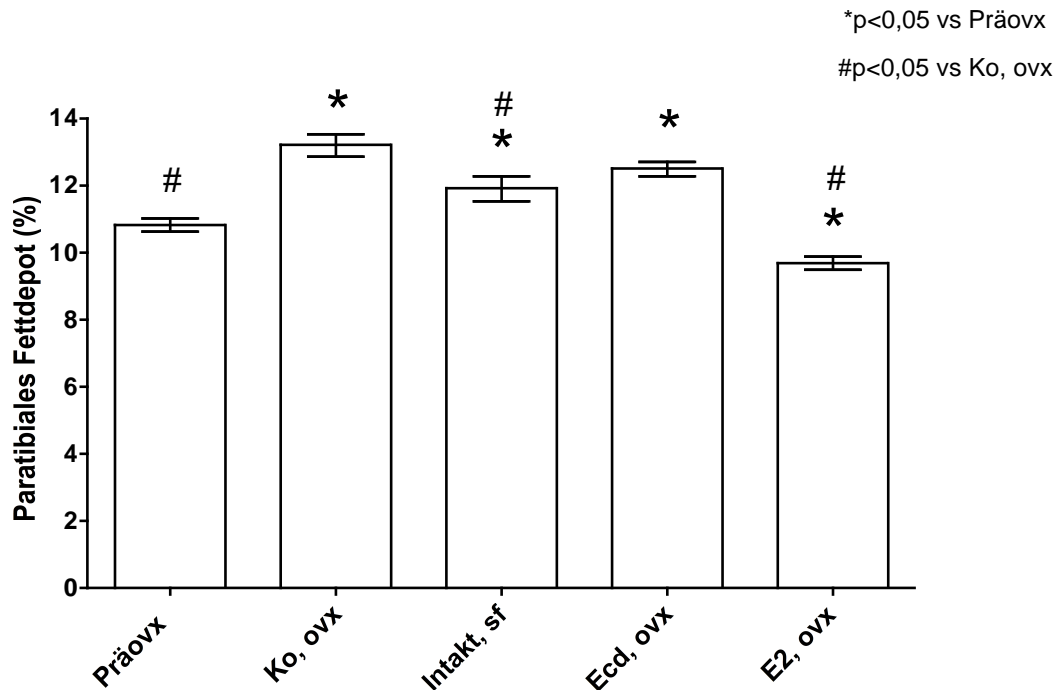


Abbildung 12. Prozentualer Anteil des paratibialen Fettdepots am tibialen Querschnitt von intakten und ovx S.D.-Ratten vor Versuchsbeginn (Präovx) und nach vierwöchiger Applikation der jeweiligen Testsubstanz. Die Gewebeanteile von Fett, Muskel und Knochen ergeben zusammen 100%. Der paratibiale Fettanteil der Ecd-Gruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe kein Signifikanzniveau. Die E2-Gruppe konnte den Fettanteil im Vergleich zu Präovx reduzieren und zeigte den geringsten prozentualen Zuwachs im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Abbildung 12 verdeutlicht, dass allein die E2-Gruppe eine Abnahme des paratibialen Fettanteils gegenüber der Präovx-Gruppe bewirken konnte. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte sie entsprechend den geringsten prozentualen Zuwachs. Die Ecd-Gruppe erreichte als einzige kein Signifikanzniveau im Vergleich mit der Kontrollgruppe, wenngleich der Anteil etwas geringer ausfiel.

3.3 Serumparameter

3.3.1 Serum-Glukose

Abbildung 13 zeigt, dass die einzelnen Gruppen untereinander keine signifikanten Unterschiede in der Blutglukosekonzentration aufweisen.

Der Effekt von Ecd und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Serum-Glukose

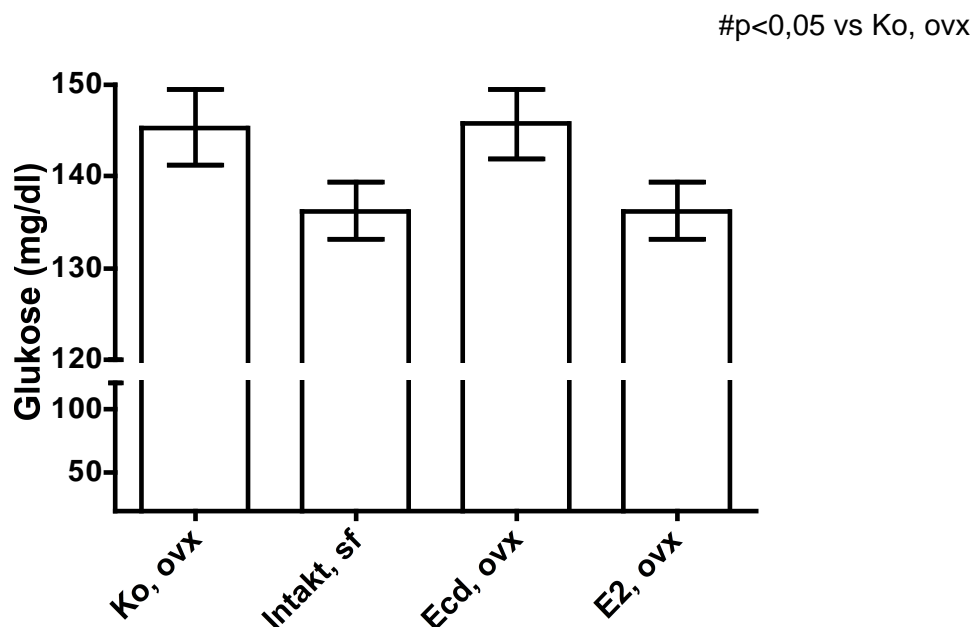


Abbildung 13. Effekt auf die Serum-Glukose von intakten und ovx S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation. Es lässt sich kein signifikanter Unterschied unter den einzelnen Versuchsgruppen feststellen. Die intakten Tiere und die Tiere der E2-Gruppe haben eine tendenziell niedrigere Serum-Glukose als die Tiere der Kontroll- und der Ecd-Gruppe.

3.3.2 Serum-Insulin

Der Effekt von Ecd und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Serum-Insulin

#p<0,05 vs Ko, ovx

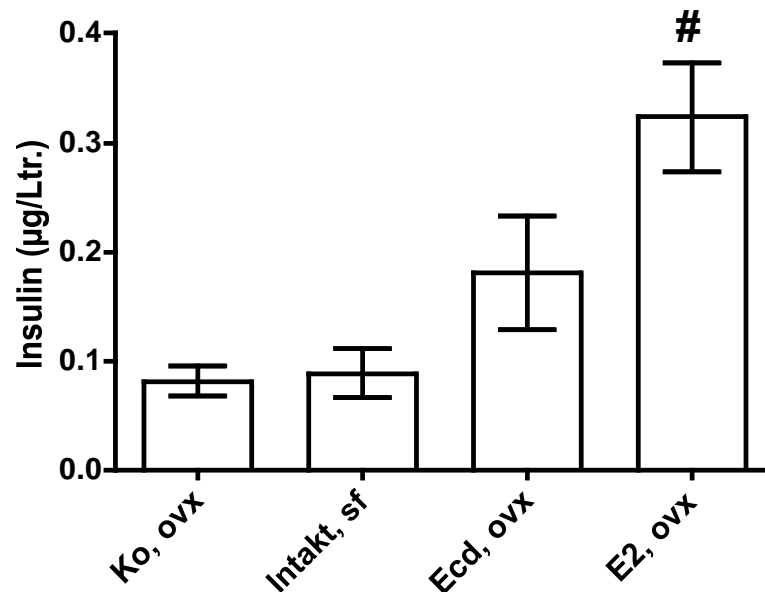


Abbildung 14. Effekt auf das Serum-Insulin von intakten und ovx S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation. Die E2-Tiere erreichten als einzige Gruppe ein Signifikanzniveau im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Die Insulinspiegel nach Versuchsende waren bei Kontroll- und intakter Gruppe auf ähnlich niedrigem Niveau. Die Ecd-Gruppe konnte dagegen zwar einen höheren Insulinspiegel aufweisen, erreichte jedoch kein Signifikanzniveau verglichen mit der Kontrollgruppe. Einzig die E2-Gruppe zeigte einen signifikant höheren Spiegel des Serum-Insulins verglichen mit den Kontrolltieren. Dies ist Abbildung 14 zu entnehmen.

3.3.3 HOMA-Index

Tabelle 2. HOMA-Index zur Bestimmung der Insulinresistenz bei intakten und ovx S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation: ≤ 1 = normal, > 2 = Hinweis auf mögliche Insulinresistenz, $> 2,5$ = Insulinresistenz sehr wahrscheinlich, $> 5,0$ = Durchschnittswert bei Typ 2-Diabetikern.				
Serumwert	Ko, ovx	Intakt, sf	Ecd, ovx	E2, ovx
Glukose (mg/dl)	145,3	136,3	145,7	136,2
Insulin ($\mu\text{U/ml}$)	2,03	2,21	4,49	8,02
HOMA-Index	0,7	0,7	1,6	2,7

Tabelle 4 zeigt, dass die E2-Gruppe mit einem HOMA-Index von 2,7 deutlich über dem Cut-off für eine Insulinresistenz lag. Die Ecd-Gruppe lag mit 1,6 im hochnormalen Bereich. Die intakten Tiere und die Tiere der Kontrollgruppe lagen mit einem Index von jeweils 0,7 im Normbereich. Es ist anzunehmen, dass im vorliegenden Versuch die Tiere zum Zeitpunkt der Dekapitation nicht nüchtern waren, da ihnen im Rahmen des Versuchsaufbaus zu jederzeit eine freie Verfügung des Futters gewährleistet wurde. Nüchtern-Blutwerte für Glukose und Insulin stellen eine Grundvoraussetzung für die standardisierte Berechnung des HOMA-Index beim Menschen dar.

3.3.4 Serum-Cholesterol

Der Effekt von Ecd und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Serum-Cholesterol

#p<0,05 vs Ko, ovx

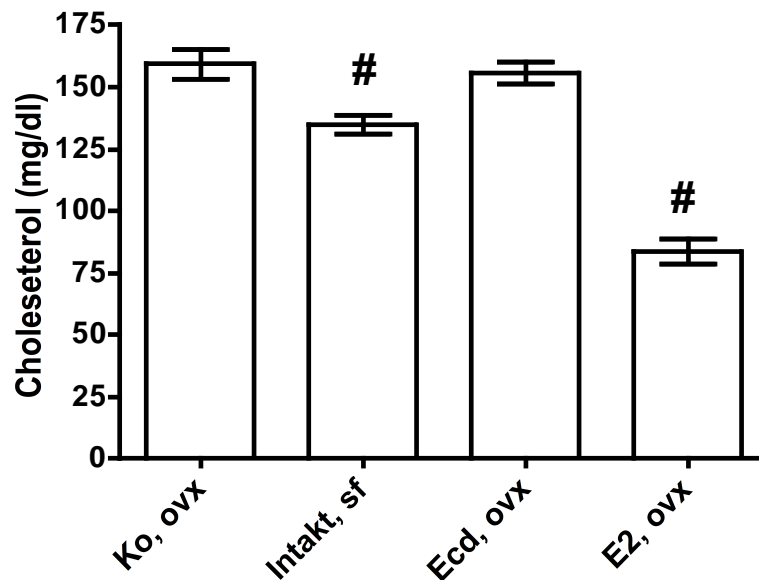


Abbildung 15. Effekt auf das Serum-Cholesterol von intakten und ovx S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation. Die Ecd-Gruppe konnte im Gegensatz zur E2-Gruppe und den intakten Tieren keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe aufweisen.

Abbildung 15 verdeutlicht, dass der Cholesterolspiegel im Serum der E2-Gruppe im Vergleich mit den Tieren der Kontrollgruppe am signifikant geringsten ausfiel. Ebenfalls ein Signifikanzniveau verglichen mit der Kontrollgruppe erreichten die intakten Tiere, wenngleich ihr Cholesterolspiegel vergleichsweise höher war als bei den E2-Tieren. Die Ecd-versorgten Tiere konnten kein Signifikanzniveau im Vergleich mit der Kontrollgruppe erzielen.

3.3.5 Serum-HDL

Die Ecd-Gruppe erreichte in ihrer Wirkung auf die Serum-HDL keinen signifikanten Unterschied im Vergleich mit den Kontrolltieren, wenngleich in Abbildung 16 ein tendenziell höherer Spiegel zu sehen ist. Insgesamt waren die Serumwerte der HDL bei der Ecd- und der Kontrollgruppe am höchsten. Intakte und E2 verzeichneten beide einen signifikant niedrigeren Spiegel der Serum-HDL im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dabei zeigte die E2-Gruppe den geringsten Serumwert.

Der Effekt von Ecd und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Serum-HDL

#p<0,05 vs Ko, ovx

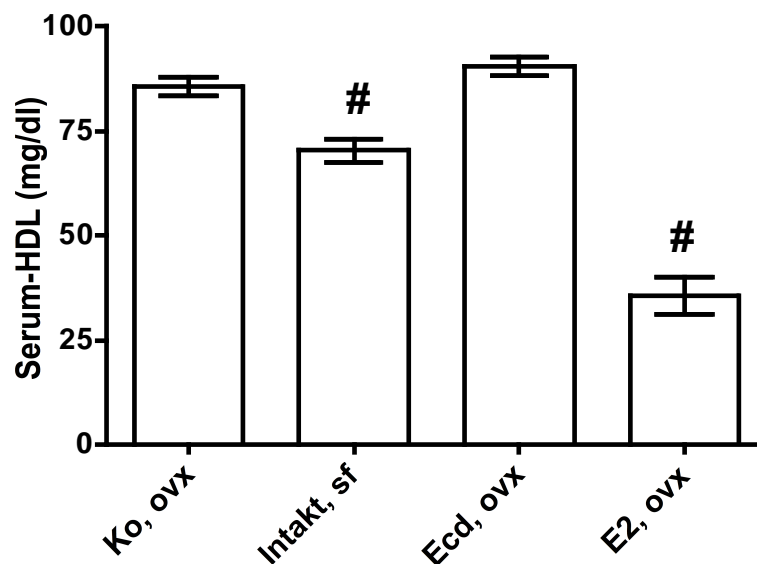


Abbildung 16. Effekt auf das Serum-HDL von intakten und ovx S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation. Die Ecd-Gruppe konnte im Vergleich mit der Kontrollgruppe kein Signifikanzniveau erreichen. Die E2-Gruppe zeigte einen deutlich niedrigeren HDL-Spiegel im Serum als die Kontrollgruppe.

3.3.6 Serum-LDL

Der Effekt von Ecd und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Serum-LDL

#p<0,05 vs Ko, ovx

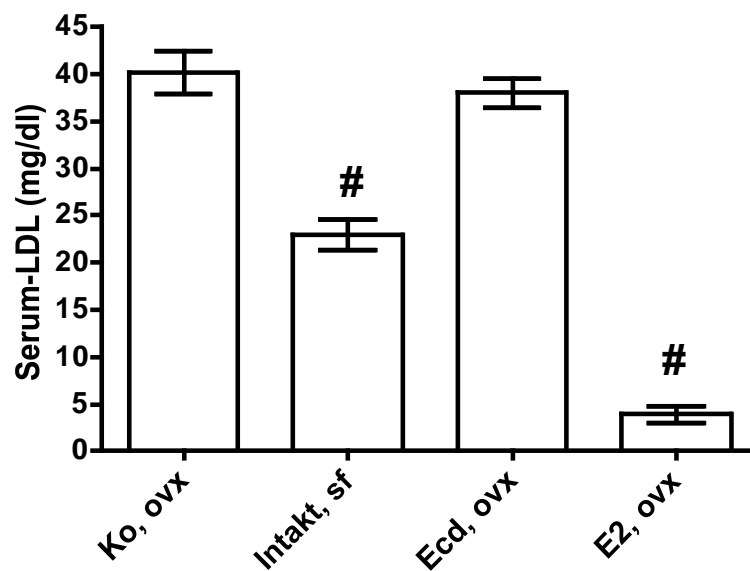


Abbildung 17. Effekt auf das Serum-LDL von intakten und ovx S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation. Intakte und E2 Tiere zeigten signifikante Veränderungen im Vergleich mit der Kontrollgruppe.

Abbildung 17 zeigt den deutlich geringeren LDL-Serumspiegel der E2-Gruppe im Vergleich mit den Kontrolltieren. Ebenfalls signifikant niedriger fiel der Serumwert der LDL für die intakten Tiere aus, wenngleich nicht annähernd im Ausmaß der E2-Gruppe. Die Ecd-versorgten Ratten konnten trotz tendenziell geringerem Serum-LDL im Vergleich zur Kontrollgruppe kein Signifikanzniveau erreichen.

3.3.7 Serum-Triglyzeride

Betrachtet man die Triglyzeride, so lässt sich allein für die E2-Gruppe im Vergleich mit den Kontrolltieren ein signifikant höherer Serumspiegel beobachten. Eine leichte Tendenz für einen geringeren Triglyzeridwert im Blut verglichen mit den Kontrolltieren zeigt Abbildung 18 für die Ecd-Gruppe, wenngleich sie dabei kein Signifikanzniveau erreichte. Die intakten Tiere zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe einen tendenziell höheren Serumwert.

Der Effekt von Ecd und E2 bei intakten und ovx S.D.-Ratten (4 Wochen per Futter) auf: Serum-Triglyzeride

#p<0,05 vs Ko, ovx

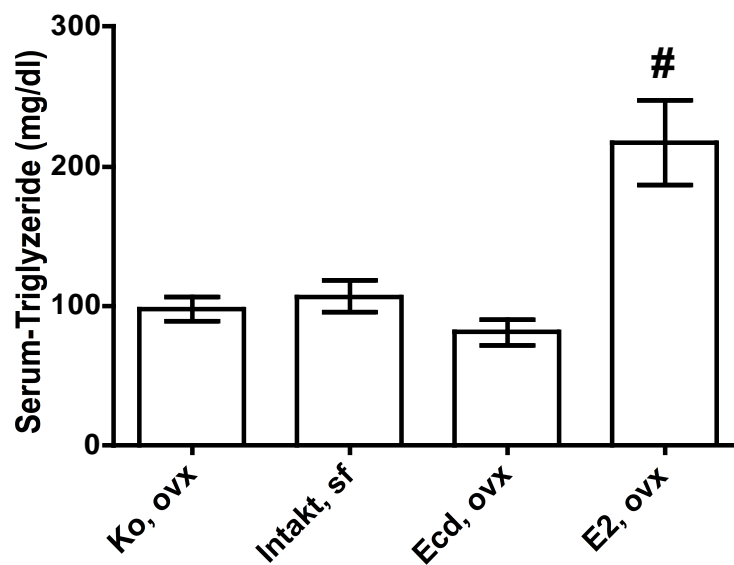


Abbildung 18. Effekt auf die Serum-Triglyzeride von intakten und ovx S.D.-Ratten nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation. Allein der E2-Gruppe konnte ein signifikant höherer Spiegel im Vergleich mit der Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Die Ecd-Gruppe erreichte kein Signifikanzniveau gegenüber der Kontrollgruppe.

3.4 Körpertemperatur

Temperaturveränderungen einzelner S.D.-Ratten , 1 Woche nach Ovx
(subkutan gemessen mittels IPPT-300, ELAMS PLEXX)

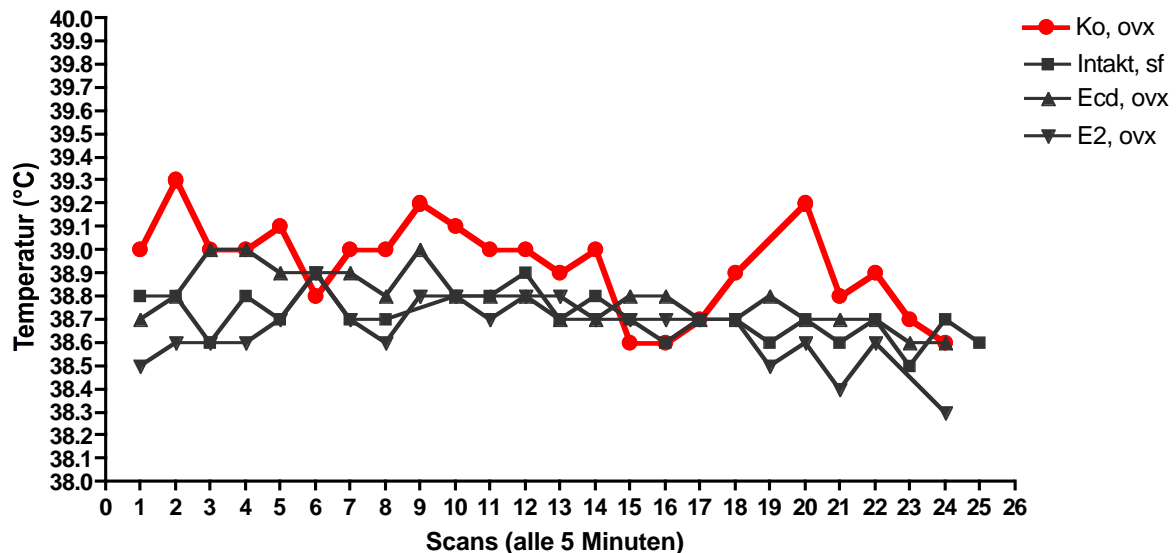


Abbildung 19. Die Temperaturverläufe einzelner S.D.-Ratten, gemessen 1 Woche nach Ovx im 5-Minuten-Takt in einem Messzeitraum von 2 Stunden. Die Kontrollgruppe zeigt einen für *hot flushes* charakteristischen Verlauf.

Die mittlere subkutane Körpertemperatur der Kontrolltiere lag eine Woche nach Ovx bei 38,7°C. Wenngleich die mittlere Temperatur damit genauso hoch lag wie bei den intakten Tieren, so konnte dennoch bei einzelnen Kontrolltieren im Verlauf der Messung episodische Fluktuationen mit Temperaturpeaks beobachtet werden. Ähnliche episodische Schwankungen fanden sich in den anderen Gruppen nicht (siehe Abbildung 19). Die Ecd- und die E2-Gruppe erzielten beide eine signifikant geringere Körpertemperatur verglichen mit der Kontrollgruppe in Woche 1. Dabei erzielte die E2-Gruppe einen stärkeren Effekt als die Ecd-Gruppe und hatte mit 37,7°C eine etwa um 1°C geringere mittlere Temperatur im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Die Ecd-Gruppe wies dagegen mit 38,2°C einen um 0,5°C geringeren Temperaturwert als die Kontrollgruppe auf.

In der zweiten Woche nach Ovx lag die mittlere subkutane Körpertemperatur der Kontrolltiere etwas niedriger als in der Vorwoche. Dennoch ließen sich sowohl für die

Ecd- als auch für die E2-Gruppe eine im Vergleich mit der Kontrollgruppe weiterhin signifikant geringere subkutane Temperatur messen. E2 zeigte hierbei einen um 1,1°C und Ecd einen um 0,4°C geringeren Temperaturwert verglichen mit der Kontrollgruppe der gleichen Woche. Abbildung 20 verdeutlicht dies.

**Mittelwerte der Körpertemperaturen von S.D.-Ratten
(subkutan gemessen mittels IPPT-300 ELAMS PLEXX-System)
im Vergleich über 2 Wochen**

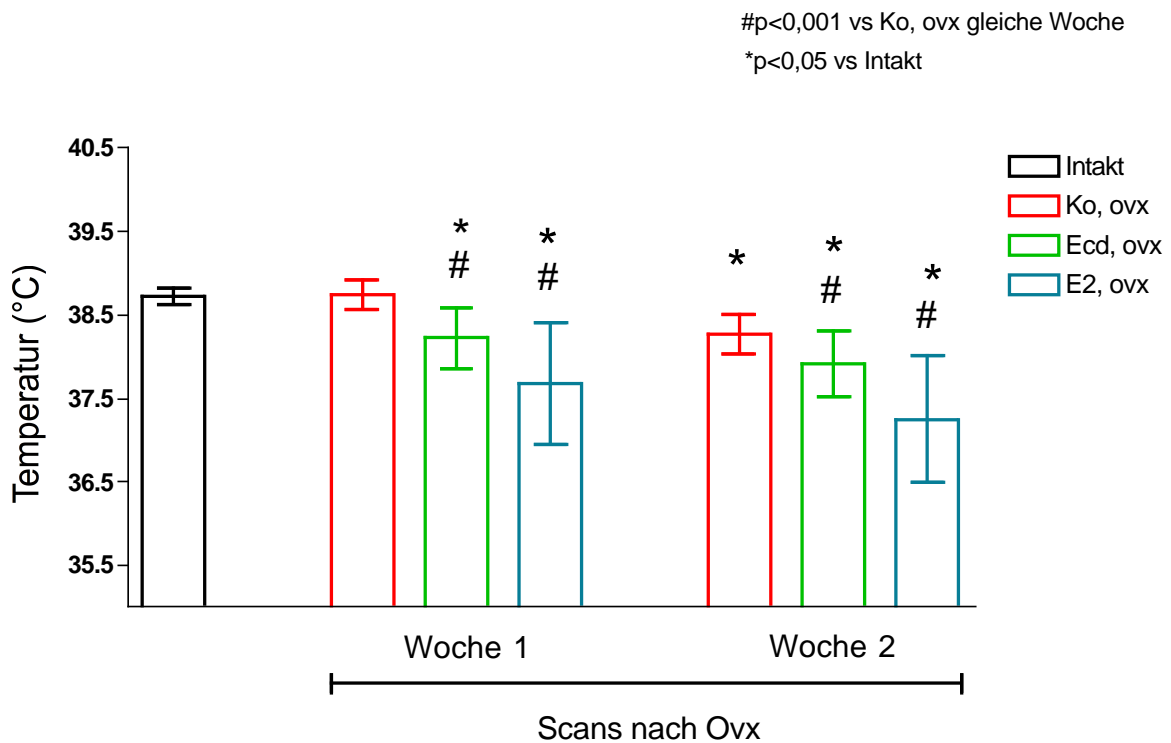


Abbildung 20. Effekt auf die mittlere subkutane Körpertemperatur von ovx S.D.-Ratten im Vergleich mit intakten Tieren über einen Zeitraum von 2 Wochen nach Ovx. Eine Minderung der mittleren Körpertemperatur im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte sich bei Ecd- und E2-versorgten Tieren.

4. Diskussion

Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Experimente sollten viszerales und paratibiales Fettgewebe der Ratte bezüglich ihrer Einflüsse durch Ecd und E2 untersuchen sowie thermoregulatorische Effekte der Testsubstanzen hinsichtlich postmenopausaler Hitzewallungen aufdecken. Dafür wurden die Versuchstiere (n=40) in vier Gruppen unterteilt und über einen Zeitraum von vier Wochen mit den jeweiligen Testsubstanzen per Futter versorgt.

Es bleibt anzumerken, dass sich einige der diskutierten Effekte im vorliegenden einmonatigen Versuch nicht nachweisen ließen, welche am gleichen Tiermodell in dreimonatigen Versuchsdesigns jedoch signifikant waren. Als möglicher Grund kann die kürzere Dauer der Verabreichung der Testsubstanzen gewertet werden.

4.1 Analyse von Futteraufnahme und Körpergewicht

Den größten Gewichtszuwachs im Vergleich zu Präovx verzeichnete die Ecd-Gruppe (+26,7% vgl. mit Präovx), welche kongruent dazu auch den größten Futtermittelverbrauch aufwies. Allerdings zeigte sie keine signifikante Zunahme gegenüber der ovx Kontrollgruppe (+23,5% vgl. mit Präovx), die eine annähernd gleich hohe Futteraufnahme verzeichnete. Diese Ergebnisse decken sich mit denen eines zwölfwöchigen Versuchs der Abteilung (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Bekanntermaßen ist die Gewichtszunahme der ovx Kontrolltiere auf eine vermehrte Fettanreicherung zurückzuführen (Seidlová-Wuttke et al. 2011). Dahingegen ist der große Gewichtszuwachs der Ecd-versorgten Tiere vielmehr das Resultat eines vermehrten Muskelwachstums bei zusätzlich geringerer Fettanreicherung (Dinan und Lafont 2006; Gorelick-Feldman et al. 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

In der vorliegenden Studie wies die E2-Gruppe als einzige eine leichte Gewichtsabnahme (-2,2% vgl. mit Präovx) auf. Interessanterweise war ihre durchschnittliche Futteraufnahme (15,48 g/Tier/Tag) ähnlich der von intakten Tieren (16,38 g/Tier/Tag), welche immerhin um ca. 10%, verglichen mit Präovx, an Gewicht zulegten. Auch hier konnten die Resultate eines zwölfwöchigen Versuchs bereits nach vierwöchiger Applikation bestätigt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Eine Erklärung für die Reduktion des viszeralen Fettdepots durch E2 ist die effektive Reduktion der Fettdepots bei erhöhter lokomotorischer Aktivität der Tiere. Eine

Vermehrung der Muskulatur, die das Gewicht steigern könnte, wurde unter E2 bisher nicht nachgewiesen (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

4.2 Analyse der fettgeweblichen Untersuchung mit qCT

Im Folgenden findet sich die Diskussion der Fragestellung Nr. 1 (siehe Zielsetzung).

4.2.1 Effekte auf viszerales Fettgewebe

Das viszerale Fettgewebe wurde in der vorliegenden Arbeit als Teil des Körperfettes am gesamten Querschnitt des Bauchraumes auf Höhe L4/L5, exklusive Muskulatur und Knochengewebe, ausgewertet. Die Werte ergaben sich aus drei festgelegten Schnittebenen im Bauchraum. Zusätzlich wurde der Fettanteil am intraabdominellen Gesamtquerschnitt in Prozent angegeben.

Mit einziger Ausnahme der E2-versorgten Tiere, die im Verlauf sogar eine Abnahme der Fettfläche zeigten, haben alle weiteren Gruppen im Vergleich zu Präovx signifikant an viszeralem Fett zugelegt. Die Kontrollgruppe verzeichnete dabei den mit Abstand größten Zuwachs an Fettgewebe. Damit konnten wir im vorliegenden vierwöchigen Experiment ähnliche Ergebnisse verschiedener Studien erzielen, welche die vermehrte Anreicherung von Fettgewebe bei ovx Ratten in länger angelegten Versuchsdesigns nachweisen konnten. Ursächlich für die Fettgewebsanreicherung kann der Verlust der Ovarien gesehen werden (Rachon et al. 2008; Babaei et al. 2010; Seidlová-Wuttke et al. 2011). Eine vergleichbar starke Anreicherung des Bauchfettdepots, im Zusammenhang mit dem klimakterischen Hormonzustand, findet sich auch beim Menschen und geht mit der Entwicklung des Metabolischen Syndroms einher (Carr 2003). Verbunden mit den Risiken, die das viszerale Fett durch seine Funktion als endokrine Drüse birgt, ist es durchaus als "böses" Fettgewebe des menschlichen Körpers zu verstehen (Pasquali et al. 2003).

Wie erwähnt, zeigten im vorliegenden Versuch die E2-versorgten Tiere eine signifikant geringere Fettgewebsfläche im Vergleich zu Präovx und zur Kontrollgruppe. Damit konnten wir auch für die E2-Gruppe dieselben Effekte bereits nach 4 Wochen nachweisen, die bereits aus zwölfwöchigen Versuchen bekannt waren (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Grund für die Abnahme des Fettgewebes ist

u.a. die Steigerung der lokomotorischen Aktivität. Sie ist als nachfolgender Effekt auf die Wirkung des Östrogens an den im Fettgewebsdepot vorhandenen Östrogenrezeptoren zurückzuführen (Seidlová-Wuttke et al. 2003 a; Seidlová-Wuttke et al. 2008; Rachon et al. 2008).

Besonderes Augenmerk gilt im vorliegenden Versuch dem Effekt der Ecd-Gruppe auf das viszerale Fett. Zwar konnte sie im Vergleich mit den ovx Kontrolltieren keine ähnlich geringere Zunahme der Fettfläche bewirken, wie es bei den Tieren der E2-Gruppe zu sehen war. Jedoch zeigte die Ecd-Gruppe 16% weniger Fettfläche und lieferte damit ein deutlich signifikantes Ergebnis im Vergleich mit der ovx Kontrollgruppe. Aus dem zwölfwöchigen Versuch der Abteilung war uns dieser Effekt bereits bekannt (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Wir konnten nun beweisen, dass auch eine vierwöchige Applikation bereits eine signifikant geringere Anreicherung an viszeralem Fettgewebe unter Ecd liefern kann. Der genaue Wirkmechanismus ist noch unklar. Eine Wirkung an Östrogenrezeptoren kann jedoch aufgrund der fehlenden Effekte auf das Uterusgewebe ausgeschlossen werden (Owens und Koeter 2003). Die mittlere Körpergewichtszunahme korrelierte bei allen Tieren über den Versuchszeitraum signifikant mit der viszeralen Fettfläche.

Eine Körpergewichtszunahme ging bei unseren Versuchstieren also stets mit einer Anreicherung von viszeralem Fettgewebe einher. Eine Abnahme des Körpergewichts, wie sie bei E2-Tieren zu sehen war, bedeutete entsprechend auch eine Abnahme des viszeralen Fettgewebes.

Um zu untersuchen, ob eine Anreicherung der Fettfläche auch mit einem erhöhten Fettgewebsanteil am Gesamtquerschnitt einer qCT-Ebene des Bauches einhergeht, wurden Fett-, Muskel- und Knochengewebe zueinander prozentual in Relation gesetzt. Den größten Fettanteil im Abdomen zeigte die Kontrollgruppe (32,7%), den geringsten die E2-Gruppe (21,3%). Die Ecd-Gruppe (27,4%) wies einen um 16% geringeren Bauchfettanteil als die Kontrollgruppe auf und schaffte es zudem, diesen im Vergleich zu Präovx (26,1%) nicht signifikant zu steigern. Ecd ist demnach in der Lage, ohne östrogenabhängige Aktivität bei ovx Ratten eine geringere Anreicherung des viszeralen Fettgewebes zu bewirken.

4.2.2 Effekte auf paratibiales Fettgewebe

Bei der qCT-Untersuchung des paratibialen Fettgewebes wurde nach vierwöchiger Wirkstoffapplikation bereits eine signifikante Zunahme an Fettmasse bei den Kontrollgruppentieren im Vergleich mit Präovx aufgezeigt. Damit bewiesen wir eine ähnlich starke paratibiale Fettgewebsakkumulation bei ovx Ratten noch deutlich schneller, verglichen mit einem zwölfwöchigen Versuchsdesign (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

Erwartungsgemäß konnte in unserem Versuch bei der E2-Gruppe eine signifikante Abnahme der paratibialen Fettfläche im Vergleich mit Präovx beobachtet werden. Entsprechend zeigte sich eine deutlich geringere Zunahme im Vergleich mit der Kontrollgruppe. Gleiches galt für den prozentualen Anteil am Gesamtquerschnitt des Unterschenkels. Damit besteht Kongruenz unserer Ergebnisse mit den Resultaten vorangegangener Studien, welche die E2-induzierte paratibiale Fettreduktion auf die Expression der Östrogenrezeptoren ER α und ER β zurückführen. Das paratibiale Fettgewebe verfügt über beide Rezeptoren, was mit einer hohen Östrogensensitivität einhergeht. Die nachfolgenden Wirkungen auf den Organismus äußern sich u.a. in einer gesteigerten lokomotorischen Aktivität (Seidlová-Wuttke et al. 2003 a; Seidlová-Wuttke et al. 2008; Rachon et al. 2008).

Auch unter Ecd-Gabe konnte an ovx Ratten bereits eine geringere Zunahme von paratibialer Fettfläche und Fettanteil beschrieben werden. In unserem Versuch zeigte sich dieser Effekt gegenüber der Kontrollgruppe jedoch nicht signifikant. Ecd- und Kontrollgruppe nahmen ähnlich viel an Fläche zu und auch im prozentualen Anteil am Gesamtquerschnitt der Tibia zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen. In diesem Fall konnten wir im Zeitraum von vier Wochen also nicht die Effekte beobachten, die in der Vergleichsstudie über zwölf Wochen erbracht wurden (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b), was die unterschiedliche Applikationsdauer als Ursache vermuten lässt.

Definitiv anzunehmen ist, dass viszerales und paratibiales Fettgewebe im Körper der Ratte jeweils unterschiedlicher Regulation unterliegen. Der genaue Mechanismus bleibt unklar. Eine Existenz von Ecd-Rezeptoren, wie beispielsweise bei Arthropoden, konnte an Säugetieren nicht nachgewiesen werden.

4.3 Analyse der Serumparameter

Die Analyse der Serumparameter, insbesondere der Blutfette, Insulin und Glukose, hat in der Diagnostik des Metabolischen Syndroms einen hohen Stellenwert. Zudem stellt die S.D.-Ratte ein gutes Modell zur Untersuchung dieser Parameter dar (Bellino 2000). Im Folgenden findet sich die Diskussion der Fragestellung Nr. 2 (siehe Zielsetzung).

4.3.1 Effekte auf Serum-Glukose

Im vorliegenden Versuch konnte bei keiner der Gruppen eine signifikante Beeinflussung der Serum-Glukose durch die Testsubstanzen oder durch Ovx beobachtet werden. Alle Spiegel befanden sich im Dekapitationsblut im Normbereich (134 – 219 mg/dl = 7,44 – 12,16 mmol/l) (Van Zuphten et al. 1995). Ein diabetogener Effekt, wie er für das Metabolische Syndrom typisch wäre, ließ sich demnach für keine Gruppe nach nur vierwöchiger Versuchsdauer nachweisen. Allerdings ließen sich diese auch in einer zwölfwöchigen Vergleichsstudie nicht beweisen (Müller 2007).

4.3.2 Effekte auf Serum-Insulin

Unser Versuch konnte bei der Kontrollgruppe keine signifikante Veränderung des Serum-Insulins gegenüber den intakten Tieren feststellen. Ein Effekt auf die Insulinausschüttung nach Ovx war demnach nicht gegeben. Die Ecd-Gruppe erreichte gegenüber der Kontrollgruppe ebenfalls kein Signifikanzniveau. Einzig für die E2-Gruppe konnte ein signifikanter Anstieg des Insulinspiegels im Dekapitationsblut, verglichen mit der Kontrollgruppe, gemessen werden. Ähnliche Ergebnisse fanden sich in einem 28-tägigen Versuch mit Mäusen (Naaz et al. 2002). Nach Berechnung des HOMA-Index (siehe Kapitel 3.3.3.) bedeutet dies ein wahrscheinliches Vorliegen einer Insulinresistenz bei E2-versorgten Tieren und einen hochnormalen Wert bei Ecd-versorgten Tieren. Eine erwartungsgemäß identifizierbare Insulinresistenz anhand des HOMA-Index für die Tiere der Kontrollgruppe, wie sie an postmenopausalen Frauen gezeigt werden konnte, fand sich im vorliegenden Versuch nicht (Santen et al. 2010; NAMS 2010).

4.3.3 Effekte auf Serum-Cholesterol

Das hohe Serum-Cholesterol macht die ovx Ratte im Zusammenhang mit der vermehrten Bildung von Fettgewebe zu einem besonders geeigneten Model für Studien des Metabolischen Syndroms. Auch unsere Ergebnisse haben gezeigt, dass die Kontrollgruppe einen, verglichen mit den intakten Tieren, erhöhten Cholesterolspiegel aufwies. Damit erbringt unser Versuch nach vier Wochen die Resultate aus Studien, welche einen Serum-Cholesterolanstieg nach 22 Wochen bewiesen (Meli et al. 2004). Der genaue Mechanismus, der letztlich eine Östrogenmangel-bedingte Hypercholesterinämie verursacht, ist noch nicht hinreichend verstanden. Eine mögliche Erklärung sei die aufgrund des Östrogenmangels niedrigere Aktivität des Enzyms 7 α -Hydroxylase, welches Cholesterol in Gallensäuren umwandelt (Lucas et al. 2000).

E2 ist bekanntermaßen in der Lage, an postmenopausalen Patientinnen und ovx Ratten eine gesteigerte Fettgewebsakkumulation zu verhindern und den Cholesterolspiegel im Serum zu senken (Bartels et al. 2007; Rachon et al. 2008; Redinger 2008). Dies konnte im vorliegenden Versuch bereits nach 4 Wochen Wirkstoffapplikation festgestellt werden.

Dagegen zeigte sich über diesen verhältnismäßig kurzen Versuchszeitraum keine signifikante Veränderung des Cholesterols bei Ecd-Tieren. Ähnliche Resultate mit Ecd lieferte Seidlová-Wuttke bereits in der über 12 Wochen angelegten Studie. Darin wurden Ecd-versorgte Tiere in drei Gruppen unterteilt und erhielten jeweils unterschiedliche Dosierungen Ecd (18, 56 und 116 mg/Tier/Tag). Nur die Gruppe mit der geringsten Ecd-Dosis konnte eine leichte, aber signifikante, Senkung des Cholesterols im Vergleich mit der Kontrollgruppe erzielen. Im vorliegenden Versuch lag die applizierte Dosis von Ecd bei durchschnittlich 65,7 mg/Tier/Tag. So konnte entsprechend der Vergleichsstudie auch nach 4 Wochen kein signifikanter Effekt registriert werden (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Im Vergleich mit der internationalen Literatur sind unsere Resultate nur eingeschränkt beurteilbar, da die erhobenen Daten sowohl über andere Versuchszeiträume als auch teilweise mit anderen Rattenmodellen oder Ecd-Dosierungen gewonnen wurden (Mironova et al. 1982; Catalan et al. 1985).

4.3.4 Effekte auf Serum-HDL

Die HDL bilden das bei Ratten vorherrschende Lipoprotein und enthalten den größten Anteil an Cholesterol. Demnach geht der Anstieg der Serum-HDL bei der Ratte Hand in Hand mit dem Anstieg des Cholesterols (Bein 2010). Unsere Resultate zeigten eine Erhöhung der Serum-HDL bei der Kontrollgruppe im Vergleich mit den intakten Tieren.

Der Effekt von Ecd auf das Serum-HDL fiel im vorliegenden Versuch, verglichen mit der Kontrollgruppe, nicht signifikant aus. Dieses Resultat deckt sich mit Ergebnissen aus der bereits mehrfach zum Vergleich herangezogenen 12-Wochen-Studie (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Dort ergab sich lediglich eine signifikante Erhöhung des HDL-Spiegels bei den Tieren, welche die höchste Dosis Ecd (116 mg/Tier/Tag) erhielten. Da in unserem Versuch die durchschnittlich aufgenommene Substanzmenge für Ecd mit 65,7 mg/Tier/Tag deutlich niedriger war und die Applikationsdauer nur vier Wochen betrug, waren unsere nicht-signifikanten Ergebnisse erwartungsgemäß (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

E2 dagegen erbrachte im vorliegenden Versuch die im 12-Wochen-Versuch beobachteten signifikant geringeren HDL-Serumspiegel gegenüber der Kontrollgruppe bereits nach vier Wochen (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Der niedrige Serumwert lässt sich durch die unter E2 vermehrte Expression von LDL-Rezeptoren begründen. Diese haben eine primäre Affinität zu Apo-E, das in Ratten sowohl in LDL als auch HDL vorhanden ist. Mit der Bindung der Lipoproteine an den Rezeptor erfolgt ein Absinken ihrer Serum-Werte (Chao et al. 1979; Parini et al. 1997).

4.3.5 Effekte auf Serum-LDL

Ein signifikant höherer LDL-Serumspiegel bei ovx Ratten im Vergleich zu intakten Tieren wurde bereits mehrfach beschrieben (Van Lenten et al. 1983) und findet auch in der vorliegenden Studie erneut Bestätigung. Gleicher Effekt wurde auch bei postmenopausalen Frauen festgestellt (Suda et al. 1998). Östrogenmangel bewirkt eine ohnehin altersbedingte Minderung der Expression von LDL-Rezeptoren, was einen Anstieg des LDL-Spiegels im Blut zur Folge hat (Pickar et al. 1998).

Bei unserer Ecd-Gruppe waren die Serum-LDL im Vergleich mit der Kontrollgruppe nur in geringem Maße und nicht signifikant niedriger. In der zum Vergleich herangezogenen 3-Monats-Studie kam es ausschließlich in der Gruppe mit der geringsten Ecd-Dosisapplikation (18 mg/Tier/Tag) zu einer signifikanten Abnahme der LDL im Serum. Die höheren Dosen zeigten keine signifikanten Effekte. An dieser Stelle sei darauf verwiesen, dass die Ratten in unserem Versuch eine durchschnittliche Ecd-Dosis von 65,7 mg/Tier/Tag zu sich nahmen und die Applikationsdauer von Ecd nur vier Wochen betrug (Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Dagegen konnte die E2-Gruppe in unserem Versuch schon nach der vierwöchigen Versuchsdauer einen deutlich signifikant niedrigeren LDL-Serumwert, verglichen mit der Kontrollgruppe, verzeichnen. Ähnliche Resultate lieferten neben der zwölfwöchigen Vergleichsstudie von Seidlová-Wuttke et al. auch verschiedene andere Publikationen mit unterschiedlichen Versuchsdauern (Kuller et al. 1990; Liu und Bachmann 1998; Seidlová-Wuttke et al. 2010 b). Bei E2-Substitution wird die Bildung von LDL-Rezeptoren in der Leber gesteigert. Folglich gelangen mehr im Blutkreislauf zirkulierende LDL in die Hepatozyten, und der Serum-Spiegel sinkt ab (Cooper et al. 1987; Parini et al. 1997; Parini et al. 2000). Diese Art der Lipidregulation findet sich auch im prämenopausalen östrogenen Hormonzustand und ist von großer Relevanz für die E2-abhängige geringere Anreicherung der Fettdepots (Meli et al. 2004). Die signifikant niedrigeren LDL-Serumwerte bei den intakten Tieren, verglichen mit der ovx Kontrollgruppe, sind auch im vorliegenden Versuch zu beobachten gewesen, allerdings nicht in dem Ausmaß wie bei den E2-Tieren. Die genaue Begründung hierfür ist nicht klar. Unwahrscheinlich ist jedoch eine derart starke Einflussnahme der Östrogen-Zyklusphasen bei Ratten wie bei Menschen, dass ein so deutlicher Unterschied zwischen intakter und E2-Gruppe, resultieren würde (Kuller et al. 1990; Bein 2010). Da die E2-Serumspiegel der Ratten in der vorliegenden Arbeit nicht bestimmt wurden, ist ein Vergleich der Gruppen hinsichtlich ihrer Zyklusphasen nicht möglich. Zudem wäre die Validität eines solchen Vergleichs fraglich, da die oral applizierte Form von E2 einer zu starken intestinalen wie hepatischen Verstoffwechslung unterliegt, als dass ein hoher E2-Spiegel im Serum messbar wäre (Nahoul et al. 1993).

4.3.6 Effekte auf Serum-Triglyzeride

In der vorliegenden Arbeit fand sich bei Betrachtung der Serum-Triglyzeride für die ovx Kontrolltiere kein signifikanter Effekt verglichen mit den intakten Tieren.

Ein Effekt von Ecd, verglichen mit der Kontrollgruppe, blieb ebenfalls aus. In der internationalen Literatur finden sich abweichende Resultate. So beschrieben Catalan et al. (1985) sowie Sláma und Lafont (1995) einen Anstieg der Triglyzeride unter Ecd-Zufuhr. In einer aktuelleren Studie von Hamden et al. (2008) konnte dagegen ein Absinken des Triglyzeridspiegels bei S.D.-Ratten unter Phytoecdysteroidgabe gezeigt werden. Als mögliche Ursache für die Abnahme der Serum-Triglyzeride wäre das vermehrte Muskelwachstum unter Ecd zu sehen, da die gesteigerte Stoffwechselaktivität des Muskelgewebes einen positiven Effekt auf die Senkung des Triglyzeridspiegel haben könnte (Syrov et al. 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2010 b).

Die E2-Gruppe hatte im vorliegenden Versuch als einzige nach Ende der vierwöchigen Versuchsdauer signifikant höhere Serum-Triglyzeride verglichen mit der Kontrollgruppe. Ähnliche Forschungsergebnisse, die unter E2-Applikation bei Ratten einen Triglyzerid-Anstieg zeigen, lassen sich in der Literatur auch nach längeren Versuchszeiträumen finden (Meli et al. 2004; Seidlová-Wuttke et al. 2005). Auch bei postmenopausalen Frauen konnte unter Östrogensersatztherapie eine Anhebung der Serum-Triglyzeride beobachtet werden (Walsh et al. 1991). An dieser Stelle ist zu erwähnen, dass die unter 4.2. beschriebene deutlich geringere Fettgewebsanreicherung unter E2 u.a. anhand des erhöhten Serumspiegels der Triglyzeride erklärbar gemacht werden kann. Zwar ist die Bildung der Triglyzeride in der Leber unter E2 stimuliert, und es kommt zu einer erhöhten Freisetzung in VLDL (Weinstein et al. 1986), jedoch findet sich ebenso eine E2-abhängige Hemmung der Lipoproteinlipase. Letztere ist für die Spaltung der Lipoproteine zur Aufnahme in die Zellen der Peripherie zuständig, weshalb unter E2 weniger Triglyzeride in die Adipozyten gelangen, um Depotfett zu bilden. In der Folge mobilisieren die Fettdepots ihre Fettsäuren zur Energiegewinnung (Pedersen et al. 1992).

Allerdings lassen sich in der internationalen Literatur auch Studien finden, die keinerlei Effekte von E2 auf ovx Tiere und klimakterische Frauen aufzeigen konnten (Kim et al. 1994; Suda et al. 1998).

4.4 Analyse der Körpertemperatur

Klimakterische Frauen mit Metabolischem Syndrom haben nicht selten unter vasomotorischer Symptomatik zu leiden (Gold et al. 2000). Im Folgenden findet sich die Diskussion der Fragestellung Nr. 3 (siehe Zielsetzung).

In verschiedenen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass die ovx Ratte ein geeignetes Modell für die Untersuchung vasomotorischer Symptomatik darstellt, da sich an ihr die episodisch auftretenden Erhöhungen der Hauttemperatur entwickelten, welche als *hot flushes* - Phasen zu interpretieren sind (Kapur et al. 2010 b; Puri et al. 2011). Da für die Messmethodik international kein einheitliches Verfahren standardisiert ist, wurden für die Diskussion der Ergebnisse in erster Linie Resultate herangezogen, die mit dem gleichen Messverfahren, der subkutanen Temperaturmessung über Transponder (IPPT-300, ELAMS PLEXX), erhoben wurden. Puri et al. (2011) veröffentlichten eine Studie, in der mit diesem Messverfahren erstmalig positive Effekte von Ecd an ovx Ratten festgestellt werden konnten. Die S.D.-Ratten der Ecd-Gruppe erhielten im Versuch von Puri et al. (2011) nach dreiwöchiger Einnahme von sojafreiem Kontrollfutter eine einmalige akute intravenöse Ecd-Injektion (5 mg) während der dreistündigen Temperaturmessung, an welche sich eine zweiwöchige chronische Applikation von Ecd per Futter (73,2 mg/Tier/Tag) anschloss. Eine i.v.-Applikation wurde im vorliegenden Versuch nicht durchgeführt. Die Applikation per Futter war in unserem Versuch mit 65,7 mg/Tier/Tag etwas geringer, was jedoch bei gleicher Ecd-Konzentration (3g/Kg) auf eine geringere Futteraufnahme der Tiere zurückzuführen ist.

Wie bei Puri et al. (2011) konnten auch bei unseren intakten Tieren keine *hot flushes* - Phasen beobachtet werden, wenngleich die mittlere Körpertemperatur unserer intakten (38,7°C) um ca. 1,0°C höher lag als bei den Ratten im Versuch von Puri et al. (2011). So konnte, im Gegensatz zur Studie von Puri et al. (2011), eine Woche nach Ovx kein signifikanter Anstieg der Körpertemperatur der Kontrolltiere gemessen werden.

Die mittlere Körpertemperatur der Kontrollgruppe lag im vorliegenden Versuch bei 38,7°C, was in etwa dem Mittelwert der Kontrollgruppe der Puri-Studie (38,4°C) entspricht (Puri et al. 2011). Da einige unserer Kontrolltiere eindeutig die typischen Fluktuationen mit Temperaturpeaks von mehr als 1,0°C zeigten, die als

Hitzewallungen zu werten sind, scheinen mögliche Messartefakte an dieser Stelle eher ausgeschlossen als bei den intakten Tieren. An dieser Stelle sei anzumerken, dass in einer Studie von Williams et al. (2010), mit telemetrischem Messverfahren am Schwanz der Tiere, auch an intakten Ratten Temperaturanstiege mit Amplituden von 8,0°C und höher gemessen wurden. Das telemetrische Messverfahren gehört zu einer der gebräuchlichsten internationalen Methoden zur Erfassung von Hitzewallungen in tierexperimentellen Studien. Mit gleichem Verfahren wurden in Versuchen von Berendsen et al. (2001) und Pawlyk et al. (2006) auch bei ovx Ratten Temperaturpeaks als Hitzewallungen interpretiert, die, ähnlich der Studie von Williams et al. (2010), sehr viel höher lagen als die Werte unserer Kontrollgruppe. Da die Werte unserer Kontrollgruppe sich jedoch im Niveau derer von Puri et al. (2011) befanden, liegt die Vermutung nahe, dass die unterschiedliche Verfahrensweise für die hohe Varianz verantwortlich ist.

Bei der Ecd-Gruppe konnte im vorliegenden Experiment eine signifikante Temperaturreduktion im Vergleich mit der Kontrollgruppe verzeichnet werden. Dabei hatten die Ecd-Tiere in Woche 1 nach Ovx eine um 0,5°C geringere mittlere Körpertemperatur als die Tiere der ovx Kontrollgruppe. In Woche 2 wurde eine erneute Senkung, diesmal um ca. 0,3°C zur Vorwoche, festgestellt. Somit konnten wir bei einer Applikation von Ecd per Futter schon nach einer Woche signifikante Ergebnisse beobachten, was die Erwartungshaltung in Hinblick auf das Phytoecdysteroid bezüglich der Linderung von vasomotorischer Symptomatik erfüllte, wenngleich nicht in dem Ausmaß der E2-Gruppe.

Die mittleren Temperaturwerte der E2-Gruppe lagen in unserem Versuch in den Wochen 1 und 2 jeweils unter 38°C und somit signifikant unter den Werten der Kontrollgruppe. Ähnliche Resultate für E2 lieferte die Studie von Puri et al. (2011). In Woche 2 konnten wir an unseren E2-Tieren noch einen weiteren Temperaturabfall messen. Dahingegen blieb ihre mittlere Temperatur im Versuch von Puri et al. (2011) über zwei Wochen konstant.

Da Ecd auch im vorliegenden Versuch keinerlei Effekte auf das Uterusgewebe ausübte und somit nicht an Östrogenrezeptoren zu binden vermag, ist von anderen Rezeptormechanismen auszugehen. Entscheidend für die Wirkung von Ecd auf die Thermoregulation in den Gehirnen von Ratten ist sein Effekt auf die GABAerge Stoffwechselaktivität. Ecd stimuliert die Aktivität des GABA-Syntheseenzym Glutamatdecarboxylase (GAD) und induziert somit indirekt die GABAerge Hemmung

von Neuronen im Hypothalamus. Durch diese Hemmung wird die Hyperaktivität des Pulsgenerators gedrosselt (Mansky et al. 1982; Flügge et al. 1986; Tsujiyama et al. 1995; Okada et al. 1998).

Auch Gabapentin, eine GABAerge Substanz, welche klinisch zur Behandlung bei Epilepsie indiziert ist, konnte Erfolge bei der Linderung von vasomotorischer Symptomatik an ovx Ratten erbringen (Leventhal et al. 2005). Auch an Frauen, die postmenopausal oder chirurgisch einen Verlust der Ovarialfunktion erfahren haben, konnten in verschiedenen Studien signifikante Effekte von Gabapentin zur Besserung von Hitzewallungen beobachtet werden (Guttuso et al. 2003; Hayes et al. 2011).

5. Zusammenfassung

Das Metabolische Syndrom ist infolge der zunehmenden Fehlernährung und mangelnden körperlichen Betätigung ein stetig wachsendes Problem der Wohlstandsgesellschaft geworden. Insbesondere die Anreicherung des viszeralen Fettgewebes wurde als großer Risikofaktor für die Entstehung von Adipositas-assoziierten Erkrankungen identifiziert. Entscheidenden Einfluss auf die Entwicklung des Syndroms hat unter anderem das Klimakterium. Postmenopausale Mehranreicherung, insbesondere des viszeralen Fettgewebes, ist ebenso die Antwort auf die östrogenarme klimakterische Situation wie auch die Entwicklung von VMS. Dem vorliegenden Versuch liegt die Fragestellung zugrunde, ob und auf welche Weise, der Wirkstoff Ecd im Vergleich mit E2 der postmenopausalen Fettanreicherung und Hitzewallungen entgegenzuwirken vermag. Die einzelnen Testsubstanzen wurden den S.D.-Ratten (n=40) über einen Versuchszeitraum von vier Wochen per Futter verabreicht.

Klar gezeigt werden konnte eine signifikante Beeinflussung des viszeralen Fettgewebes unter Gabe von Ecd nach nur vier Wochen Wirkstoffapplikation. Diese zeigte sich in einer deutlich geringeren Mehranreicherung von viszeralem Fettgewebe im Vergleich zur Kontrollgruppe. So könnte der Wirkstoff Ecd also in Zukunft in der Medikation zur Prophylaxe östrogenmangelbedingter Fettleibigkeit bzw. des Metabolischen Syndroms eine bedeutende Rolle spielen.

Bei den Serumparametern Glukose, Insulin, Cholesterol, HDL, LDL und TG konnten im vorliegenden Versuch keine signifikanten Effekte von Ecd erhoben werden.

Nicht zuletzt zeigte Ecd im vorliegenden Versuch einen signifikanten Effekt auf die mittlere subkutane Körpertemperatur. Die Ecd-Ratten zeigten schon eine Woche nach Ovx eine um ca. 0,5°C geringere Temperatur, verglichen mit der ovx scheinbehandelten Kontrollgruppe, welche klare *hot flushes* aufwies. Da Ecd in unserem Versuch keine Effekte auf das Uterusgewebe zeigte, ist von einem durch GABA regulierten Wirkmechanismus über eine Beeinflussung des GnRH-Pulsgenerators auszugehen. Unter dem Aspekt der durch E2 verursachten Nebenwirkungen stellt Ecd eine wirksame Alternative in der Behandlung klimakterischer Hitzewallungen dar.

Im Ganzen hat die Wirksubstanz Ecd erneut ihre vielversprechende Rolle als Alternativwirkstoff zu E2 unterstrichen.

6. Literaturverzeichnis

- Ahren B, Havel PJ (1999): Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). *Am J Physiol* 277, 959-966
- Arbeeny CM, Rifici VA, Eder HA (1987): The uptake of apoprotein and cholesteryl ester of high density lipoproteins by the perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta* 917, 9-17
- Babaei P, Mehdizadeh R, Ansar MM, Damirchi A (2010): Effects of ovariectomy and estrogen replacement therapy on visceral adipose tissue and serum adiponectin levels in rats. *Menopause Int* 16, 100-104
- Bartels DW, Davidson MH, Gong WC (2007): Type 2 diabetes and cardiovascular disease: reducing the risk. *J Manag Care Pharm* 13 (2 Suppl A), 2-15
- Bein M: Der Einfluss von 20-Hydroxyecdysen und 17 β -Östradiol auf das Colonepithel und die Serumfette der ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratte als Therapiemodell der postmenopausalen Frau. Med. Diss. Göttingen 2010
- Bellino FL (2000): Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 7, 14-24
- Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-427
- Berendsen HH, Weekers AH, Kloosterboer HJ (2001): Effect of tibolone and raloxifene on the tail temperature of oestrogen-deficient rats. *Eur J Pharmacol*, 419, 47-54
- Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L: Biochemistry, 6. Auflage; hrsg. v. Berg JM, Tymoczko JL, Stryer L; W.H. Freeman and Company, New York 2007
- Blanchette-Mackie EJ, Masuno H, Dwyer NK, Olivecrona T, Scow RO (1989): Lipoprotein lipase in myocytes and capillary endothelium of the heart: immunocytochemical study. *Am J Physiol* 256, 818-828
- Blumel JE, Castelo-Branco C, Binfal L, Gramegna G, Tacla X, Aracena B, Cumsille, MA, Sanjuan A (2000): Quality of life after the menopause: a population study. *Maturitas* 34, 17-23
- Bonara E, Kiechl S, Willeit J, Oberhollenzer F, Egger G, Targher G, Alberiche M, Bonadonna RC and Muggeo M (1998): Prevalence of Insulin Resistance in Metabolic Disorders - The Bruneck Study. *Diabetes* 47, 1643-1649
- Boulant JA (2000): Role of the preoptic-anterior hypothalamus in thermoregulation and fever. *Clin Infect Dis* 31, 157-161
- Boulant JA, Dean JB (1986): Temperature receptors in the central nervous system. *Ann Rev Physiol* 48, 639-654

Bruck K, Zeisberger E: Adaptive changes in thermoregulation and their neuropharmacological basis; in: Thermoregulation: Physiology and Biochemistry; hrsg. v. Schonbaum E, Lomax P; Pergamon Press, New York 1990, 255–307

Burt AM: Autonomic nervous system and hypothalamus; in: Textbook of Neuroanatomy; WB Saunders Company, Harcourt Brace Jovanovich Inc., Philadelphia, USA 1993, 392-394

Butenandt A, Karlson P (1954): Über die Isolierung eines Metamorphosehormones der Insekten in kristallisierter Form. Zeitschrift für Naturforschung 9, 389-391

Cabanac M, Massonnet B (1977): Thermoregulatory responses as a function of core temperature in humans. J Physiol 265, 587–596

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

Catalan RE, Martinez AM, Aragonez MD, Miguel BG, Robles A, Godoy JE (1985): Alterations in rat lipid metabolism following ecdysterone treatment. Comp Biochem Physiol B 81, 771-775

Chao Y, Windler EE, Chen GC, Havel RJ (1979): Hepatic Catabolism of Rat and Human Lipoproteins in Rats Treated with 17 α -Ethinyl-Estradiol. J Biol Chem 254, 11360-11366

Charkoudian N (2003): Skin blood flow in adult human thermoregulation: how it works, when it does not, and why. Mayo Clin Proc 78, 603-612

Cooper AD, Nutik R, Chen J (1987): Characterization of the estrogen-induced lipoprotein receptor of rat liver. J Lipid Res 28, 59-68

Couzi RJ, Helzlsouer KJ, Fetting JH et al. (1995): Prevalence of menopausal symptoms among women with a history of breast cancer and attitudes toward estrogen replacement therapy. J Clin Oncol 13, 2737–2744

Crawshaw L, Grahn D, Wollmuth L, Simpson L (1985): Central nervous regulation of body temperature in vertebrates: comparative aspects. Pharmacol Ther 30, 19–30.

Deecher DC (2005): Physiology of thermoregulatory dysfunction and current approaches to the treatment of vasomotor symptoms. Expert Opin Investig Drugs 14, 435–448

DeFazio J, Verheugen C, Chetkowski R, Nass T, Judd HL, Meldrum DR (1984): The effects of naloxone on hot flashes and gonadotropin secretion in postmenopausal women. J Clin Endocrinol Metab 58, 578–581

Després JP (1991) Obesity and lipid metabolism: relevance of body fat distribution. Curr Opin Lipidology 2, 5-15

Després JP, Lemieux I, Prud'homme D (2001): Treatment of obesity: need to focus on high risk abdominally obese patient. BMJ 322, 716-720

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

Dinan L, Savchenko T, Whiting P (2001): On the distribution of phytoecdysteroids in plants. *Cell Mol Life Sci* 58, 1121-1132

Ehrhardt C, Wessels JT, Wuttke W, Seidlová-Wuttke D (2010): The effects of 20-hydroxyecdysone and 17 β -estradiol on the skin of ovariectomized rats. *Menopause* 18, 323-327

Fain JN, Madan AK, Hiler ML, Cheema P, Bahouth SW (2004): Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. *Endocrinology* 145, 2273-2282

Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F: Unterhaut, Tela subcutanea, Subcutis; in: *Waldeyer Anatomie des Menschen*, 17. Auflage; hrsg. v. Fanghänel J, Pera F unter Mitarbeit namhafter Autoren; De Gruyter, Berlin 2003, 1222

Faria E, Fong LG, Komaromy M, Cooper AD (1996): Relative roles of the LDL receptor, the LDL receptor-like protein, and the hepatic lipase in remnant removal by the liver. *J Lipid Res* 37, 197-209

Findeisen, E: Ecdysteroide in der menschlichen Nahrung. Med. Diss. Marburg 2005

Flügge G, Oertel WH, Wuttke W (1986): Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic/anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology* 43, 1-5

Frank SM, Raja SN, Bulcao CF, Goldstein DS (1999): Relative contribution of core and cutaneous temperatures to thermal comfort and autonomic responses in humans. *J Appl Physio* 86, 1588–1593

Freedman RR (2001): Physiology of hot flushes. *Am. J. Human Biol.* 13 Suppl 4, 453-464

Frost HM, Jee WS (1992): On the rat model of human osteopenias and osteoporoses. *Bone Miner* 18, 227-236

Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J (2002): Depot-specific differences in the lipolytic effect of leptin on isolated white adipocytes. *Med Sci Monit* 8, 47-55

Gabriely I, Ma XH, Yang XM, Atzmon G, Rajala MW, Berg AH, Scherer P, Rossetti L, Barzilai N (2002): Removal of visceral fat prevents insulin resistance and glucose intolerance of aging: an adipokine-mediated process? *Diabetes* 51, 2951- 2958

Ghosh D, Griswold J, Erman M, Pangborn W (2009): Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature* 457, 219-223

Göretzlehner G, Lauritzen C, Göretzlehner U; Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie; 4. Auflage; De Gruyter, Berlin 2003

Gold EB, Sternfeld B, Kelsey JL, Brown C, Mouton C, Reame N, Salamone L, Stellato R (2000): Relation of demographic and lifestyle factors to symptoms in a multiracial/ethnic population of women 40-55 years of age. *Am J Epidemiol* 152, 463-473

Gorelick-Feldman J, MacLean D, Ilic N, Poulev A, Lila MA, Cheng D, Raskin I (2008): Phytoecdysteroids Increase Protein Synthesis in Skeletal Muscle Cells. *J Agric Food Chem* 56, 3532-3537

Greendale G, Lee N, Arriola E (1999): The menopause. *Lancet* 353, 571-580

Grundy SM, Cleemann JI, Daniels SR, Donato KA, Eckel RH, Franklin BA, Gordon DJ, Krauss RM, Savage PJ, Smith SC Jr (2005): Diagnosis and management of the Metabolic Syndrome. An American Heart Association/National Heart, Lung, and Blood Institute scientific statement. *Circulation* 112, 2735-2752

Guerre-Millo M (2002): Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest* 25, 855-61

Guttuso T Jr, Kurlan R, McDermott MP, Kiebertz K (2003): Gabapentin's effects on hot flashes in postmenopausal women: a randomized controlled trial. *Obstet Gynecol* 101, 337-345

Hamden K, Ayadi F, Jamoussi K, Masmoudi H, Elfeki A (2008): Therapeutic effect of phytoecdysteroids rich extract from *Ajuga iva* on alloxan induced diabetic rats liver, kidney and pancreas. *Biofactors* 33, 165-175

Hammar M, Berg G, Fahraeus L, Larssoncohn U (1984): Climacteric symptoms in an unselected sample of Swedish women. *Maturitas* 6, 345-350

Hauner H; Übergewicht im Erwachsenenalter; in: Ernährungsmedizin; hrsg. v. Biesalski HK, Fürst P unter Mitarbeit namhafter Autoren; Thieme Verlag Stuttgart/New York 1999, 246-269

Hayes LP, Carroll DG, Kelley KW (2011): Use of gabapentin for the management of natural or surgical menopausal hot flashes. *Ann Pharmacother* 45, 388-394

Hensel H (1973): Neural processes in thermoregulation. *Physiol Rev* 53, 948-1017

Herbison AE, Capman C, Dyer RG (1991): Role of medial preoptic GABA neurones in regulating luteinising hormone secretion in the ovariectomised rat. *Exp Brain Res* 87, 345-352

Hsu YH, Venners SA, Terwedow HA, Feng Y, Niu T, Li Z, Laird N, Brain JD, Cummings SR, Bouxsein ML (2006): Relation of body composition, fat mass, and serum lipids to osteoporotic fractures and bone mineral density in Chinese men and women. *Am J Clin Nutr* 83, 146-154

Iqbal J, Anwar K, Hussain MM (2003): Multiple, Independently Regulated Pathways of Cholesterol Transport across the Intestinal Epithelial Cells. *J Biol Chem* 278, 31610-31620

Jahnke K, Daweke H, Liebermeister H (1969): Hormonal and metabolic aspects of obesity in humans. *Proc 6th Congress IDF Excerpta Medica Amsterdam*, 533-539

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

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

Kapur P, Wuttke W, Seidlova-Wuttke D (2010 b): The Cimicifuga racemosa special extract BNO 1055 prevents hot flashes in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 890-894

Kay RE, Entenman C (1961): The Synthesis of "Chylomikron-like" Bodies and Maintenance of Normal Blood Sugar Levels by the Isolated, Perfused Rat Liver. *J Biol Chem* 236, 1006-1012

Kim CJ, Jang HC, Cho DH, Min YK (1994): Effects of Hormone Replacement Therapy on Lipoprotein(a) and Lipids in Postmenopausal Women. *Arterioscler Thromb* 14, 275-281

Kitabchi AE (1977): Proinsulin and C-peptide: a review. *Metabolism* 26, 547-587

Kizelsztejn P, Govorko D, Komarnytsky S, Evans A, Wang Z, Cefalu WT, Raskin I (2009): 20-Hydroxyecdysone decreases weight and hyperglycemia in a diet-induced obesity mice model. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, 433-439

Klose G: Adipositas und Hyperlipidämie; in: Wechsler JG: Adipositas, Ursachen und Therapie, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage, Blackwell Verlag 2002, 180-182

Knerr I, Herzog D, Rauh M, Rascher W, Horbach T (2006): Leptin and ghrelin expression in adipose tissues and serum levels in gastric banding patients. *Eur J Clin Invest* 36, 389-394

Kronenberg F (1990): Hot flushes: epidemiology and physiology. *Ann NY Acad Sci* 592, 52-86.

Kuchinskiene Z, Carlson LA (1982): Composition, concentration, and size of low density lipoproteins and of subfractions of very low density lipoproteins from serum of normal men and women. *J Lipid Res* 23, 762-769

Kuller LH, Gutai JP, Meilahn E, Matthews KA, Plantinga P (1990): Relationship of Endogenous Sex Steroid Hormones to Lipids and Apoproteins in Postmenopausal Women. *Arteriosclerosis* 10, 1058-1066

Kylin E (1923): Studien über das Hypertonie-Hyperglykämie-Hyperurikämiesyndrom. Zentralblatt für Innere Medizin 44, 105-127

Langin D, Dicker A, Tavernier G, Hoffstedt J, Mairal A, Rydén M, Arner E, Sicard A, Jenkins CM, Viguerie N (2005): Adipocyte Lipases and Defect of Lipolysis in Human Obesity. Diabetes 54, 3190-3197

Lean MEJ, Han TS, Seidell JC (1995): Waist circumference as a measure for indicating need for weight management. BMJ 311, 158-161

Lee JS (1986): Tissue Fluid Pressure, Lymph Pressure, and Fluid Transport in Rat Intestinal Villi. Microvasc Res 31, 170-183

Lee MJ, Fried SK (2006): Multilevel regulation of leptin storage, turnover and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue. J Lipid Res 47, 1984-1993

Leventhal L, Cosmi S, Deecher D (2005): Effect of calcium channel modulators on temperature regulation in ovariectomized rats. Pharmacol Biochem Behav. 80, 511-520

Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT (1996): Macrophages and atherosclerotic plaque stability. Curr Opin Lipidol 7, 330-335

Liu D, Bachmann KA (1998): An Investigation of the Relationship Between Estrogen, Estrogen Metabolites and Blood Cholesterol Levels in Ovariectomized Rats. J Pharmacol Exp Ther 286, 561-568

Löffler G, Petrides PE: Biochemie & Pathobiochemie. 8. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2007, 809-826

Loprinzi CL, Sloan J, Stearns V (2009): Newer antidepressants and gabapentin for hot flashes: an individual patient pool analysis. J Clin Oncol 27, 2831-2837

Lucas EA, Juma S, Stoecker BJ, Arjmandi BH (2000): Prune suppresses ovariectomy-induced hypercholesterolemia in rats. J Nutr Biochem 11, 255-259

Lüllmann-Rauch R: Histologie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2006, 132-135

Lundeen SG, Carver JM, McKean M, Winneker RC (1997): Characterization of the Ovariectomized Rat Model for the Evaluation of Estrogen Effects on Plasma Cholesterol Levels. Endocrinology 138, 1552-1558

Mackinnon AM, Drevon CA, Sand TM, Davis RA (1987): Regulation of bile acid synthesis in cultured rat hepatocytes: stimulation by apoE-rich high density lipoproteins. J Lipid Res 28, 847-855

Mansky T, Mestres-Ventura P, Wuttke W (1982): Involvement of GABA in the feedback action of estradiol on gonadotropin and prolactin release: hypothalamic GABA and catecholamine turnover rates. Brain Res 231, 353-364

Maswood N, Cosmi S, Alfinito PD, Leventhal L, Deecher DC (2006): The Role of the Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Fluoxetine in Temperature Regulation in Ovariectomized Rat Models. *Neuroendocrinology* 84, 330–338

Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC (1985): Homeostasis model assessment: insulin resistance and beta-cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologica* 28, 412-419

McEwen BS (2002): Estrogen actions throughout the brain. *Recent Prog Horm Res* 57, 357–384

Meier JJ, Kjems LL, Veldhuis JD, Lefebvre P, Butler PC (2006): Postprandial suppression of glucagon secretion depends on intact pulsatile insulin secretion: further evidence for the intraislet insulin hypothesis. *Diabetes* 55, 1051-1056

Meinders AE, Toornvliet AC, Pijl H (1996): Leptin. *Neth J Med* 49, 247-252

Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, Di Carlo C, Nappi C, Di Carlo R (2004): Estrogen and Raloxifene Modulate Leptin and Its Receptor in Hypothalamus and Adipose Tissue from Ovariectomized Rats. *Endocrinology* 145, 3115-3121

Mironova VN, Kholodova ID, Skachkova TF, Bondar OP, Datsenko ZM (1982): Hypocholesterolemic effect of phytoecdysones during experimental hypercholesterolemia in rats. *Vopr Med Khim* 28, 101-105

Müller M: Der Einfluss endokriner Disruptoren auf das Fettgewebe der Sprague-Dawley-Ratte. Med. Diss. Göttingen 2007

Naaz A, Zakroczymski M, Heine P, Taylor J, Saunders P, Lubahn D, Cooke PS (2002): Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Horm Metab Res* 34, 758-763

Nahoul K, Dehennin L, Jondet M, Roger M (1993): Profiles of plasma estrogens, progesterone and their metabolites after oral or vaginal administration of estradiol or progesterone. *Maturitas* 16, 185-202

National Institutes of Health (2005): National Institutes of Health State-of-the-Science Conference statement: management of menopause-related symptoms. *Ann Intern Med* 142, 1003–1013

Nelson DL, Cox MM: Biosynthese von Lipiden; *Lehninger Biochemie*; hrsg. v. Nelson DL, Cox MM unter Mitarbeit namhafter Autoren; Springer Verlag, Berlin 2005, 871-878

Niimi M, Sato M, Taminato T (2001): Neuropeptide Y in central control of feeding and interactions with orexin and leptin. *Endocrine* 14, 269-273

North American Menopause Society, The (2004): Treatment of menopause-associated vasomotor symptoms: position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 11, 11-33

North American Menopause Society, The (2010): Estrogen and progestogen use in postmenopausal women: 2010 position statement of the NAMS. *Menopause* 17, 242–55

O'Byrne KT, Knobil E (1993): Electrophysiological approaches to gonadotrophin releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. *Hum. Reprod.* 8 Suppl 2, 37-40

Okada M, Ishihara K, Sasa M, Izumi R, Yajin K, Harada Y (1998): Enhancement of GABA-mediated inhibition of rat medial vestibular nucleus neurons by the neurosteroid 20-hydroxyecdysone. *Acta Otolaryngol* 118, 11-16

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

Parini P, Angelin B, Rudling M (1997): Importance of Estrogen Receptors in Hepatic LDL Receptor Regulation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17, 1800-1805

Parini P, Angelin B, Stavréus-Evers A, Freyschuss B, Eriksson H, Rudling M (2000): Biphasic Effects of the Natural Estrogen 17 β -Estradiol on Hepatic Cholesterol Metabolism in Intact Female Rats. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 20, 1817-1823

Pasquali R, Vicennati V, Pagotto U: Endocrine determinants of fat distribution; *Handbook of Obesity*; hrsg v. Bray GA, Bouchard C; Marcel Dekker Inc., New York 2003, 671-692

Pawlyk AC, Cosmi S, Alfinito PD, Maswood N, Deecher DC (2006): Effects of the 5-HT_{2A} antagonist mirtazapine in rat models of thermoregulation. *Brain Res* 1123, 135-144

Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B (1992): Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 85, 13-19

Pfützner A, Forst T (2004): Typ-2 Diabetiker in Zukunft noch gezielter behandeln? *MMW-Fortschr. D. Med.* 20, 419-422

Pickar JH, Thorneycroft I, Whitehead M (1998): Effect of hormone replacement therapy on the endometrium and lipid parameters: A review of randomized clinical trials 1985 to 1995. *Am J Obstet Gynecol* 178, 1087-1099

Puri P, Wuttke W, Seidlová-Wuttke D (2011): 20-OH-Ecdysone Prevents Hot Flashes in Ovariectomized Rats. *Planta Med* 78, 109-114

Quetelet A: *Anthropométrie ou mesure des différentes facultés de l'homme*; Muquardt C, Bruxelles 1870

Rachon D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W (2008): Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 60, 209-215

Redinger RN (2008): The prevalence and etiology of nongenetic obesity and associated disorders. *South Med. J.* 101, 395-399

Riley EH, Inui TS, Kleinman K, Connelly MT (2004): Differential Association of modifiable health behaviors with hot flashes in perimenopausal and postmenopausal women. *Journal of General Internal Medicine* 19, 740-746

Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM, Roca P (2005): Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288, 200-207

Romanovsky AA (2007): Thermoregulation: some concepts have changed. Functional architecture of the thermoregulatory system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292, 37-46

Rossmannith WG, Ulrich U: Neuroendokrine Aspekte der Hormonregulation in Peri- und Postmenopause; Aktuelle Hormontherapie in der Gynäkologie; hrsg v. Kiesel L, Rabe T, Runnebaum B; Zuckerschwerdt Verlag, München 1993, 103

Rossmannith WG, Ruebberdt W (2008): What causes hot flushes? The neuroendocrine origin of vasomotor symptoms in the menopause. *Gynecological Endocrinology* 25, 303-314

Rossmannith WG, Ruebberdt W (2009): Neuroendokrinologie der Menopause: Wie entstehen Hitzewallungen? *Journal für Gynäkologische Endokrinologie* 3, 29-38

Rossmannith WG, Liu CH, Laughlin GA, Mortola JF, Suh BY, Yen SS (1990): Relative changes in LH pulsatility during the menopausal cycle: using data from hypogonadal women as a reference point. *Clin Endocrinol* 32, 667

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

Rudenski AS, Matthews DR, Levy JC, Turner RC (1991): Understanding insulin resistance: Both glucose resistance and insulin resistance are required to model human diabetes. *Metabolism* 40, 908-917

Santen RJ, Allred DC, Ardoin SP, Archer DF, Boyd N, Braunstein GD, Burger HG, Colditz GA, Davis SR, Gambacciani M (2010): Postmenopausal hormone therapy: an Endocrine Society scientific statement. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (Suppl 1), 1-66

Schipf S, Alte D, Voelzke H, Friedrich N, Haring R, Lohmann T, Rathmann W, Nauck M, Felix SB, Hoffmann W et al. (2010): Prävalenz des Metabolischen Syndroms in Deutschland: Ergebnisse der Study of Health in Pomerania (SHIP). *Diabetologie und Stoffwechsel* 5, 161-168

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

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003 b): Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 Suppl 1, 39-50

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2005): Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphtalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: a 3 months comparison with effects of estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) rats. *Toxicology* 213, 13-24

Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Jaeger Y, Wuttke W (2008): Bone development in female rats maintained with soy-free or soy-containing food as determined by computer-assisted tomography and serum bone markers. *J Bone Miner Metab*, 26, 321–323

Seidlová-Wuttke D, Christel D, Kapur P, Nguyen BT, Jarry H, Wuttke W (2010 a): Beta-ecdysone has bone protective but not estrogenic effects in oviectomized rats- *Phytomedecine* 17, 884-889

Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W (2010 b): Metabolic effects of 20-OH-Ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119 (3-5), 121-126

Seidlová-Wuttke D, Wuttke M, Moses K, Senft A, Jarry H, Wiese KG, Wuttke W (2011) Comparison of effects of castration and vibration therapy of female and male rats on bone, muscle and fat tissue. (*Calcif Tissue Int*, im Druck)

Silbernagl S, Lang F: Taschenatlas der Pathophysiologie. 2. Auflage; Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2005

Simon E (2000): The enigma of deep-body thermosensory specificity. *Int J Biometeorol* 44, 105–120

Singer SJ, Nicolson GL (1972): The Fluid Mosaic Model of the Structure of Cell Membranes. *Science* 175, 720-731

Sláma K, Lafont R (1995): Insect hormones-ecdysteroids: their presence and actions in vertebrates. *Eur J Entomol* 92, 355-377

Smith MJ, Jennes L (2001): Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 122, 1–10

Stone BG, Evans CD (1992): Evidence for a common biliary cholesterol and VLDL cholesterol precursor pool in rat liver. *J Lipid Res* 33, 1665-1675

Sturdee DW (2008): The menopausal hot flush – anything new? *Maturitas* 60, 42–49

Suda Y, Ohta H, Makita K, Takamatsu K, Horiguchi F, Nozawa S (1998): Influence of bilateral oophorectomy upon lipid metabolism. *Maturitas* 29, 147-154

Syrov VN, Shakhmurova GA, Khushbaktova ZA (2008): Effects of phytoecdysteroids and bemithyl on functional, metabolic, and immunobiological parameters of working capacity in experimental animals. *Eksp Klin Farmakol* 71, 40-43

Tall AR (2008): Cholesterol efflux pathways and other potential mechanisms involved in the atheroprotective effect of high density lipoproteins. *J Intern Med* 263, 256-273

Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, Richards GJ, Campfield LA, Clark FT, Deeds J (1995): Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271

Tataryn IV, Lomax P, Bajorek JG, Chesarek W, Meldrum DR, Judd HL (1980): Postmenopausal hot flushes: a disorder of thermoregulation. *Maturitas* 2, 101-107

Tchernof A, Belanger C, Morisset AS, Richard C, Mailloux J, Laberge P, Dupont P (2006): Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* 55, 1353-1360

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

Van Lenten BJ, Melchior GW, Roheim PS (1983): Lipoprotein metabolism in the ovariectomized rat. *J Lipid Res* 24, 1475-1484

Van Zuphten LFM, Baumans V, Beynen AC: *Grundlage der Versuchstierkunde*. 1. Auflage; Fischer Verlag, Stuttgart 1995

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Raynikar V, Sacks FM (1991): Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 325, 1196-1204

Weinstein I, Wilcox HG, Heimberg M (1986): Effects of high-dose ethinyl estradiol on serum concentrations and hepatic secretion of the very-low-density lipoprotein, triacylglycerol, cholesterol, and apolipoprotein A-I in the rat. *Biochim Biophys Acta* 876, 450-459

Wenzel H: Definitionen, Klassifikation und Messung der Adipositas; in: Wechsler JG *Adipositas, Ursachen und Therapie*, 2. aktualisierte und erweiterte Auflage; Blackwell Verlag 2002, 45-59

Whiteman MK, Staropoli CA, Langenberg PW, McCarter RJ, Kjerulff KH, Flaws JA (2003): Smoking, body mass, and hot flashes in midlife women. *Obstetrics & Gynecology* 101, 264-272

Williams H, Dacks PA, Rance NE (2010): An improved method for recording tail skin temperature in the rat reveals changes during the estrous cycle and effects of ovarian steroids. *Endocrinology* 151, 5389-5394

Windler EE, Kovanen PT, Chao Y, Brown MS, Havel RJ, Goldstein JL (1980): The Estradiol-stimulated Lipoprotein Receptor of Rat Liver. A Binding Site that Membrane mediates the Uptake of Rat Lipoprotein containing Apoproteins B and E. *J Biol Chem* 255, 10464-10471

Woodward S, Freedman RR (1994): The thermoregulatory effects of menopausal hot flashes on sleep. *Sleep* 17, 497– 501

Woolley CS, McEwen BS (1993): Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. *J Comp Neurol* 336, 293–306

World Health Organisation: Integrated management of cardiovascular risk: Report of a WHO meeting, Geneva 2002

World Health Organisation: Obesity: Preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation. World Health Organ Techn Report Series, Geneva 2003

Yoshida T, Otaka T, Uchiyama M, Ogawa S (1971): Effect of ecdysterone on hyperglycemia in experimental animals. *Biochem Pharmacol* 20, 3263-3268

Yusuf S, Hawken S, Ounpuu S, Dans T, Avezum A, Lanas F, McQueen M, Budaj A, Pais P, Varigos J, Lisheng L (2004): On behalf of the 'Interheart' Study Investigators. Obesity and the risk of myocardial infarction in 27 000 participants from 52 countries: a casecontrol study. *Lancet* 366, 1640–1649

Zhang YH, Yamada K, Hosono T, Chen XM, Shiosaka S, Kanosue K (1997): Efferent neuronal organization of thermoregulatory vasomotor control. *Ann NY Acad Sci* 813, 117–122

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

Zhu N, Kikuzaki A, Vastano BC, Nakatani N, Karwe MV, Rosen RT, Ho C (2001): Ecdysteroids of Quinoa Seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). *J Agric Food Chem* 49, 2576-2578

Zillikens MC, Uitterlinden AG, Van Leeuwen JP, Berends AL, Henneman P, van Dijk KW, Oostra BA, van Duijn CM, Pols HA, Rivadeneira F (2010): The role of body mass index, insulin, and adiponectin in the relation between fat distribution and bone mineral density. *Calcif Tissue Int* 86, 116-125

7. Abbildungsverzeichnis

Seite

Abbildung 1.	Fettverteilungstypen gynoider und androider Typ	11
Abbildung 2.	Strukturformel von 20-Hydroxyecdysen (http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB8113524.htm)	17
Abbildung 3.	Zeitlicher Überblick der Ereignisse über den gesamten Versuchszeitraum	18
Abbildung 4a.	Messlinie und Dichtebereiche bei der qCT - Auswertung der Tibia	25
Abbildung 4b.	Messlinie bei der qCT - Auswertung des Wirbelkörpers	26
Abbildung 5.	Mittlere Körpergewichte präovx versus einzelne Gruppen nach Versuchsende	27
Abbildung 6.	Mittlere Körpergewichtszunahme (Δ BW) über den Versuchszeitraum	28
Abbildung 7.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Fläche des viszeralen Fettdepots	29
Abbildung 8.	Korrelation der mittleren Körpergewichtszunahme (Δ BW) und der Fläche des viszeralen Fettgewebes	30
Abbildung 9.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Anteil des viszeralen Fettdepots	31
Abbildung 10.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Fläche des paratibialen Fettdepots	32
Abbildung 11.	Korrelation der mittleren Körpergewichtszunahme (Δ BW) und der Fläche des paratibialen Fettgewebes	33
Abbildung 12.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Anteil des paratibialen Fettdepots	34
Abbildung 13.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Serum-Glukose	35
Abbildung 14.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Serum-Insulin	36
Abbildung 15.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Serum-Cholesterol	38

Abbildung 16.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Serum-HDL	39
Abbildung 17.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Serum-LDL	40
Abbildung 18.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Serum-Triglyzeride	41
Abbildung 19.	Temperaturverläufe einzelner Ratten 1 Woche nach Ovx und Beispiel für <i>hot flushes</i>	42
Abbildung 20.	Der Effekt von Ecd und E2 auf: Mittlere subkutane Körpertemperatur im Vergleich über 2 Wochen	43

8. Tabellenverzeichnis

Seite

Tabelle 1.	Futteraufnahme (g/Tier/Tag) und aufgenommene Substanzmenge (mg/Tier/Tag)	21
Tabelle 2.	HOMA-Index	37

Danksagung

Frau Priv.- Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke danke ich für die Ermöglichung der wissenschaftlichen Arbeit in der Abteilung für klinische und experimentelle Endokrinologie.

Mein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke für die sehr umfangreiche und professionelle Betreuung während des gesamten Projektes, die für die Entstehung der vorliegenden Arbeit unabdingbar war. Das Assistieren bei der durch sie durchgeführten Ovariectomie der Versuchstiere war nur eines von zahlreichen Erlebnissen, die mir besonders positiv in Erinnerung geblieben sind.

Auch möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke nochmals meinen Dank aussprechen, dass er seinen großen Erfahrungsschatz einmal mehr für sehr bereichernde und wertvolle Kritik an meiner Arbeit nutzte.

Mein Dank gilt desweiteren meinem Freund und Co-Doktoranden Matthias Schumann, mit dem zusammen ich den Versuch und dessen Auswertung durchführte. Nicht zuletzt möchte ich den medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung für ihre Hilfe bei der Durchführung des Versuchs und ihre Hilfe bei der Auswertung bedanken. Gleichermaßen möchte ich Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hubertus Jarry, Frau Maria Tschernova, Frau Dr. med. Lea Laß, Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke und Frau Priv.- Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke für die tatkräftige Unterstützung bei der Obduktion der Ratten meinen Dank aussprechen.