
Aus dem Institut für
Experimentelle Endokrinologie der Medizinischen Fakultät Charité-
Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Wirkung ausgewählter endokriner Disruptoren auf T3-regulierte
Endpunkte in der Hypothalamus-Hypophysen-
Schilddrüsenhormon-Achse und verschiedene von ihr regulierte
Enzyme.**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von
Inga Nobis
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. J. Köhrle
2. Priv.-Doz. Dr. rer. nat. P. Diel
3. Prof. Dr. med. K.-M. Derwahl

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1. Einleitung	1
1.1. CREDO (Cluster of Research on Endocrine Disruption in Europe).....	2
1.2. Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse.....	3
1.3. Endokrine Disruptoren (ED's)	5
1.4. Physiologische Interaktion der Reproduktions-und Schilddrüsenachse	7
1.5. Schilddrüsenhormon-regulierte Endpunkte der HPT-Achse.....	9
1.5.1. Iodothyronine-Deiodasen (DIO)	9
1.5.2. Malatenzym (ME)	11
1.5.3. Glutathionperoxidase (GPx).....	12
1.6. Hintergrundinformationen zu den Testsubstanzen.....	13
1.6.1. Genistein (GEN).....	13
1.6.2. Resveratrol (RES)	15
1.6.3. 8-Prenylnaringenin (8-PN).....	15
1.6.4. Bisphenol A (BPA)	16
1.6.5. Benzophenon-2 (BP-2).....	18
1.6.6. Dibuthylphthalat (DBP)	19
1.6.7. Linuron (LIN).....	20
1.6.8. Procymidon (Proc)	21
1.7. Zielsetzung und Methodik.....	21
2. Material und Methoden	23
2.1. Chemikalien und Geräte.....	23
2.2. Übersicht über die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente.....	24
2.3. Tierexperimente	24
2.3.1. Versuchstiere und Tierhaltung	25
2.3.2. Ernährung	25
2.3.3. Ovariectomie	26
2.3.4. Sektion.....	26
2.3.5. Aufarbeitung und Aufbewahrung des Futters	26
2.4. Versuchsaufbau der Tierexperimente.....	28
2.4.1. Dosierung	29
2.4.2. Messungen während der Versuche.....	31
2.4.3. Bestimmung der Serumlevel der Schilddrüsenhormone.....	32
2.5. Vorbereitung der Proben	33
2.5.1. Probenaufarbeitung für enzymatische Versuche.....	33
2.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford.....	34
2.5.3. Probenaufarbeitung für molekularbiologische Versuche.....	34
2.6. Enzymatische Versuche	35
2.6.1. Deiodase-Assay	35
2.6.2. Malatenzym-Assay	37
2.6.3. Glutathionperoxidase (GPx)-Assay.....	39
2.7. Molekularbiologische Methoden.....	40
2.7.1. Real Time-PCR (rt-PCR)	40
2.7.2. Denaturierendes Gel zur Qualitätskontrolle der RNA	41
2.7.3. Reverse Transkription	41
2.7.4. TaqMan®-rtPCR-Assay.....	42
2.8. Statistik.....	43

3. Ergebnisse	45
3.1. Phytoöstrogenversuch	45
3.1.1. Körpergewichtsentwicklung	45
3.1.2. Lebergewicht	46
3.1.3. Schilddrüsenhormonkonzentration	47
3.1.4. Deiodase-Assay	50
3.1.5. Genexpression der Deiodase 1 in der Leber	51
3.1.6. Malatenzym-Aktivität	52
3.1.7. Genexpression des Malatenzyms in der Leber	53
3.1.8. Glutathionperoxidase-Aktivität	53
3.2. Xenobiotikaversuch	54
3.2.1. Körpergewichtsentwicklung	54
3.2.2. Lebergewicht	55
3.2.3. Schilddrüsenhormonkonzentrationen	56
3.2.4. Genexpression der DIO 1 in der Leber	58
3.2.5. Genexpression des Malatenzyms in der Leber	59
4. Diskussion	60
4.1. Metabolismus und Kinetik der Phytoöstrogene und Xenobiotika	61
4.2. Beeinflussung der HPT-Achse durch Phytoöstrogene	64
4.3. Beeinflussung T3 regulierter Endpunkte der HPT-Achse	68
4.4. Beeinflussung der HPT-Achse durch Xenobiotika	70
4.5. Geschlechtseinfluss auf die DIO 1 und GPx	72
4.6. Vergleich der Ergebnisse mit verschiedenen toxikologischen Studien	74
5. Zusammenfassung	78
Literaturverzeichnis	80
Appendix	102
Eidstaatliche Erklärung	103
Danksagung	104
Lebenslauf	105

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden die internationalen SI-Einheiten verwendet.

AGD	Anogenitale Distanz
AR	Androgenrezeptor
BP-2	Benzophenon-2
BPA	Bisphenol A
BSA	Bovines Serumalbumin
BV	Bioverfügbarkeit
BVL	Bundesministerium für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
cDNA	komplementäre DNA
cpm	Anschläge pro Minute
CREDO	Cluster of Research on Endocrine Disruption in Europe
CT	Computer Tomographie
Ct	Reizschwelle
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DBP	Dibuthylphthalat
DIO 1	5' Deiodase Typ 1
DIO 2	5' Deiodase Typ 2
DIO 3	5 Deiodase Typ 3
DTT	Dithiothreitol
ED	Endokriner Disrupter
EDTA	Ethylendiamineteraacetat Säure
ER(α , β)	Östrogenrezeptor (α oder β)
EURISKED	European Union RISK assessment of Endocrine Disruptors research Consortium
FRET	Flourescence Resonance Energy Transfer
ft3	freies Triiodthyronin
ft4	freies Thyroxin
GEN	Genistein
GPx	Glutathionperoxidase
HCl	Salzsäure
HDL	Lipoproteine hoher Dichte
HEPES	2-[-4-(Hydroxyethyl)-1- Piperazinyl]-Ethansulfon Säure

HPLC-UV	High-Performance-Liquid-Chromatographie-Ultraviolette-Light
HPT	Hypothalamus-Pituitary-Thyroid-Axis (engl.) (dt: Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse)
HRT	Hormonersatztherapie
HWZ	Halbwertszeit ($t_{1/2}$)
LDL	Lipoproteine niedriger Dichte
LH	Luteinisierendes Hormon
LIN	Linuron
mM	millimolar
MOPS	3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure
ME	Malatenzym
min	minimale Konzentration
Min	Minute
NADP	Nicotinamid-Adenin- Dinucleotid-Phosphat
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat (reduzierte Form)
mRNA	Messenger Ribonucleinsäure
Proc	Procymidon
PTU	6-n- Propyl-2-Thiouracil
8-PN	8-Prenylaryngenin
Proc	Procymidon
RES	Resveratrol
REST	Relative Expression Software Tool
OD	optische Dichte
ovx	ovarektomiert
PCR	Polymerase Kettenrektion
rpm	Runden pro Minute
PB	Phenobarbital
PTU	Propylthiouracil
RIA	Radioimmunassay
RP-HPLC	Reverse-Phase-Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie
RT-PCR	Real- time PCR
RT	Raumtemperatur
rT3	reverse T3
s	Sekunde

SD	Standardabweichung
SERM	Selectiver Östrogenrezeptormodulator
T	Zeit
t	Tonnen
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
TT3/TT4	Totales T3 bzw. T4, d.h. freies sowie an Serumprotein gebundenes
Taq	Thermophilus aquaticus
Tris-	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
UV	Ultraviolettes Licht

1. Einleitung

Die unterschiedliche Inzidenz und die Ursachen von Schilddrüsenerkrankungen, kardiovaskulärer-, neurologischer- und maligner Erkrankungen, sowie Störungen metabolischer Prozesse, sind Gegenstand vielseitiger Untersuchungen. Genetische Eigenschaften und Exposition während der Entwicklung spielen eine wesentliche Rolle, Veränderungen der Inzidenz von Erkrankungen nach Migration und damit einhergehende Veränderungen der Lebensgewohnheiten zeigten, dass auch Umweltfaktoren und Ernährung Einfluss haben (Adlercreutz 1998; Stephens 1997; Tominaga et al. 1995, Ziegler et al. 1993). Daher sind gesundheitsfördernde und -schädliche Eigenschaften von Pflanzen, Lebensmitteln und deren Inhaltsstoffe, Chemikalien sowie Konsumprodukte und ihr Einfluss auf den Organismus immer mehr in den Blickpunkt der Forschung gerückt (Colborn et al. 1993, Gray et al. 2001, Kloas et al. 2002, Toppari et al. 2002).

Beeinflussende Effekte exogener Substanzen, wie zum Beispiel Veränderungen der Synthese, der Freisetzung, des Transportes, des Metabolismus, der Bindung, der Aktivität oder der Elimination natürlicher Hormone werden als endokrine Disruption bezeichnet (Kavlock et al. 1996). Teilweise täglich kommt der Körper mit Industrieprodukten und Chemikalien wie z.B. Verpackungen, Insektiziden und Pflanzenschutzmitteln, Kosmetika und vielen anderen chemischen Verbindungen, aber auch pflanzlichen Inhaltsstoffen in Kontakt. Auf oralem Weg oder während des Kontakts der verschiedenen Substanzen mit der Haut, Schleimhaut oder den Atemwegen, können Anteile davon aufgenommen werden. Es ist nachgewiesen, dass diese nicht nur im Körper, hier vor allem im Fettgewebe, akkumulieren können, sondern auch in der Lage sind, mit körpereigenen Prozessen und Bestandteilen zu interagieren, daher ist der Umgang nicht unbedenklich (Kloas et al. 2002, Colborn 1993, Cos et al. 2003, Doerge und Chang 2002).

In dieser Arbeit wurden drei Pflanzeninhaltsstoffe und fünf chemische Substanzen, mit denen wir teilweise täglich in Kontakt kommen, bezüglich ihres Einflusses auf T3-regulierte Endpunkte der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT-Achse) untersucht. Eingebettet in das EU-geförderte Projekt CREDO, ging es um die weiterführende Untersuchung des Einflusses von exogenen Substanzen auf körpereigene Hormonsysteme.

Sowohl für Genistein, eine der beiden biologischen Hauptkomponenten in Soja, als auch für Resveratrol und 8-Prenylnaringenin wurden bereits östrogene Eigenschaften nachgewiesen (Kuiper et al 1997, Bowers et al. 2000, Bovee et al. 2004); sie werden aufgrund ihrer Fähigkeit zur Interaktion mit Östrogenrezeptoren als Phytoöstrogene bezeichnet. Phytoöstrogene werden z. Zt. vor allem im Bereich der Hormonersatztherapie zur Linderung postmenopausaler Erscheinungen, aber auch auf dem Anti-Aging-Sektor und zur Brustvergrößerung (Coldham et al. 2001) teilweise als hochkonzentrierte Präparate angeboten, ohne dass die endokrinen Eigenschaften dieser Pflanzenderivate vollständig erfasst sind (Christoffel 2004).

Neben diesen hochwirksamen pflanzlichen Substanzen spielen auch chemisch hergestellte Substanzen wie beispielsweise Bisphenol A (BPA) und Benzophenon-2 (BP-2) eine große Rolle. BPA ist eine Substanz, die vor allem zur Herstellung von Kunststoffen dient, die u.a. für Zahnfüllungen, Trinkverpackungen und Plastikbauteile verwendet werden. BP-2 wirkt in vielen kosmetischen Produkten zum Produktschutz als UV-Lichtabsorber. Beide Substanzen haben östrogene Eigenschaften (Calafat et al. 2004, Schlecht 2004). Dibuthylphthalat (DBP) ist ein (Plastik-)Weichmacher und wird besonders in Verpackungen von Nahrungsmitteln verwendet. Für DBP(-Metabolite) sind neben schwachen östrogenen auch antiandrogene Eigenschaften bekannt (Yamasaki et al. 2002). Die Pflanzenschutzmittel Linuron (LIN) und Procymidon (Proc) sind in der Lage, androgen-regulierte Prozesse störend zu beeinflussen; sie wirken also antiandrogen (Lambright et al. 2000, Ostby et al. 1999). Ob östrogenbeeinflusste Parameter, wie Lipidmetabolismus und/oder Hormonstatus, oder die Schilddrüsenachse ebenfalls beeinflusst werden, ist bei diesen Substanzen bis jetzt nicht vollständig geklärt.

1.1. CREDO (Cluster of Research on Endocrine Disruption in Europe)

Mit wachsendem Wissen über endokrine Disruption steigt die Notwendigkeit gesetzlicher Verwendungsvorschriften. Aus diesem Grund legte die EU 1999 eine Strategie zum weiteren Verfahren mit endokrinen Disruptoren fest, wobei zunächst weitere Substanzen und ihre Aktivitäten identifiziert werden sollten, um eine Prioritätenliste zur Risikobewertung zu

erstellen. In mittel- und langfristiger Sicht sollten diese ausführlich getestet werden, um schließlich ggf. die nötigen gemeinschaftlichen Rechtsgrundlagen anzupassen.

CREDO wurde durch das 5. Rahmenprogramm der EU finanziert und bildet das Dach von vier verschiedenen Ansätzen, alle die endokrinen Disruptoren betreffend: EDEN, COMPRENDO, EURISKED und FIRE. Mit einem Budget von über 20 Millionen Euro wurde von Mai 2002 bis September 2005 unter diesem Namen in 64 Laboren in allen Teilen Europas unterschiedlichste Projekte bearbeitet. Die verschiedenen Gruppen suchten nach potentiell schädlichen Substanzen und untersuchten die Wirkung bei Fischen (EDEN), analysierten halogenorganische Produkte, die die Industrie bei der Herstellung von Möbeln, Elektrogeräten, Baustoffen und Textilien (FIRE) verwendet, analysierten Nahrungsbestandteile und / oder Nahrungsmittelzusätze, sowie Konsumprodukte, z.B. Kosmetik (EURISKED).

Diese Doktorarbeit wurde im Rahmen von EURISKED (<http://www.eurisked.org>), in Zusammenarbeit mit der Universität Göttingen (Arbeitsgruppe Prof. W. Wuttke) durchgeführt. In ihr soll die Wirkung ausgewählter endokriner Disruptoren auf die Schilddrüsenhormonachse und verschiedene periphere T3-regulierte Proteine auf Transkriptions- und Aktivitätsebene beurteilt werden.

1.2. Die Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse

Die von der Schilddrüse produzierten Hormone Thyroxin (T4) und Triiodthyronin (T3) spielen eine zentrale Rolle im Wirbeltierorganismus. Sie beeinflussen Entwicklung, Differenzierung und Wachstum und regulieren den Grundumsatz, Stoffwechselprozesse und Körpertemperatur. In jeder Phase der Entwicklung, aber auch in der Erwachsenenperiode, hat ein Mangel (Hypothyreose) oder ein Überangebot (Hyperthyreose) der Schilddrüsenhormone erheblichen Einfluss auf den Organismus. Ein kongenitales Fehlen kann zu schweren Entwicklungsstörungen (Kretinismus) führen, es kommt zu Wachstumsstörungen, die mentale Retardierung sowie eine allgemeine Verlangsamung von Stoffwechselprozessen nach sich ziehen. Bernal et al. 1995 beschrieben die u. a. durch T3 beeinflusste neuronale Differenzierung und Genexpression in Rattengehirnen. Durch frühe Erkennung (Neugeborenen-Screening) und kontinuierliche Schilddrüsenhormonsubstitution kann diese

Erkrankung gut behandelt werden (Grueters et al. 2003). Ein Überangebot von Schilddrüsenhormonen führt zu einer Steigerung des Grundumsatzes, des Sauerstoffverbrauchs und der Thermogenese. Patienten mit Hyperthyreose klagen u. a. über eine generelle Nervosität, Hitzegefühl und Herzrasen. Da der Leidensdruck in beiden Richtungen der Fehlregulation hoch ist, ist die Homöostase der Schilddrüsenhormone sehr wichtig. Sie wird über einen Feedbackmechanismus, die sog. Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse (HPT-Achse), reguliert (Köhrle 2004).

Im Hypothalamus wird, unter dem Einfluss verschiedener neuronaler und humoraler Stimuli, eine Tripeptid (Pyroglutamyl-histidyl-prolinamid), das als Thyreotropin-Releasing-Hormon (TRH) bezeichnet wird, hergestellt. Dieses gelangt über das hypophysäre Pfortadersystem direkt in den Hypophysenvorderlappen (HVL, Adenohypophyse) und bewirkt dort eine Freisetzung des Thyroidea-stimulierenden-Hormons (TSH). Dieses glandotrope Hormon stimuliert in der Schilddrüse die Hormonbiosynthese und –freisetzung. Ein Anstieg von T4 und T3 im Blut, führt zu einer negativen Rückkopplung auf der hypothalamischen und der hypophysären Ebene (Leonard und Köhrle 1996).

T3 und T4 sind iodierete Derivate des Tyrosins. Iod wird als Iodid mit der Nahrung aufgenommen und an der basolateralen Schilddrüsenzellenmembran über den Natrium-Iodid-Symporter (NIS) in die Thyreozyten aufgenommen und dort angereichert. An der apikalen Membran der Thyreozyten wird es in das Kolloid des Follikellumens abgegeben. Nach der Aufnahme wird das angereicherte Iodid oxidiert, um dann auf Tyrosinreste im Thyreoglobulin übertragen zu werden, wobei Monoiod- und Diiodtyrosin entstehen. Beide sind hormonell inaktiv. Zwei iodierete Tyrosylreste werden verknüpft, wobei Tri- bzw. Tetraiodthyronin gebildet werden. Beide Schritte werden durch die Thyreoperoxidase katalysiert, die als Kofaktor H_2O_2 benötigt. An Thyreoglobulin gebunden werden sie gespeichert. Zur Ausschüttung von Schilddrüsenhormonen ins Blut, wird Thyreoglobulin rezeptorvermittelt endozytotisch in den Thyreozyten aufgenommen. In Phagolysosomen wird es durch Proteasen hydrolysiert, so dass T3 und T4 freigesetzt werden können, wobei das Prohormon T4 das Hauptsekretionsprodukt darstellt. In der Peripherie ist T3 jedoch das einzige aktive thyromimetische Hormon, das in der Zielzelle an die spezifischen Schilddrüsenhormonenrezeptoren (TR, thyroid hormone receptor) bindet. Die Schilddrüsenhormone sind nicht wasserlöslich. Sie liegen im zirkulierenden Blut zum größten Teil gebunden an drei Proteinen vor: Thyroxinbindendes Globulin (TBG), Thyroxin

bindendes Präalbumin (TTR, auch Transthyretin) und Albumin. Obwohl die Transportkapazität vom Albumin sehr viel größer ist, wird der größte Anteil der Schilddrüsenhormone durch das TBG transportiert. Die Affinität der Schilddrüsenhormone zum TBG ist mit Abstand am höchsten, und beim TTR etwas höher ist als beim Albumin (Löffler 2003).

Der wesentlich kleinere, aber biologisch aktive Anteil der Schilddrüsenhormone liegt nicht an Proteine gebunden vor, sondern zirkuliert frei im Blut. Sie werden als freies Triiodthyronin (freies T_3 , fT_3) beziehungsweise freies Thyroxin (freies T_4 , fT_4) bezeichnet. Die freien Schilddrüsenhormone machen jeweils nur einen Anteil von etwa 0,3 % aller Schilddrüsenhormone aus.

Durch Monodeiodierung am äußeren Ring wird aus der Vorstufe T_4 das rezeptorbindende T_3 gebildet, eine Reaktion, die durch die Deiodasen Typ 1 (DIO1) und 2 (DIO2) katalysiert wird. Diese sequentielle, enzymgesteuerte Deiodierung erfolgt in 70-90% der täglichen T_3 Produktion (Köhrle 1999, Leonard und Köhrle 1996). Insgesamt sind drei verschiedene Deiodaseisoenzyme (DIO 1-3) bekannt, sie werden entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert und unterscheiden sich in ihren biochemischen und regulatorischen Eigenschaften, der Substratspezifität und Inhibition (Bianco et al 2002). Sowohl die Deiodasen, als auch die TPO, sind u.a. TSH-abhängig reguliert (Dunn et al. 2001).

1.3. Endokrine Disruptoren (ED's)

Als „Endokrine Disruptoren“ (engl. „endocrine disruptors“ (ED's)) werden exogene Agenzien, Umwelt -oder auch Ökosubstanzen und deren Metabolite gezählt, die Bildung, Freisetzung, Transport, Metabolismus, Bindung, Aktivität oder Elimination endogener, natürlicher Hormone beeinflussen, die im Körper für die Aufrechterhaltung der Homöostase und der Regulation von Entwicklungsprozessen verantwortlich sind. (Kavlock et al. 1996).

Die endokrine Aktivität von Substanzen aus der Umwelt geriet ins Interesse von Wissenschaft und Öffentlichkeit, nachdem Störungen des Reproduktionstraktes und der Embryonalentwicklung an Wildtierpopulationen xenobiotisch belasteter Lebensräume entdeckt wurden. Diese äußerten sich in Form von Veränderungen primärer Geschlechtsorgane, Verschiebungen des Geschlechtergleichgewichtes und einer

Beeinträchtigung der Fertilität (Colborn and Clement, 1992; Colborn et al, 1993; Miljøproject, 1995; Toppari et al, 1996). Schon zu Beginn der 60iger Jahre beschrieben Van Wyk et al. (1959) und Shepard et al. 1960 die Induktion von Strumen nach Gabe von Sojamilch an Säuglinge mit Jodmangel. In den folgenden Jahren konnte, im Wesentlichen aufgrund der Arbeit von Doerge et al. 2002, nachgewiesen werden, dass die Isoflavonoide des Soja, insbesondere das Genistein, für die kindlichen Strumen verantwortlich sein könnten. Im weiteren Verlauf zeigte sich, dass verschiedene pflanzliche Bestandteile in der Lage sind, essentielle Enzyme des Schilddrüsensystems, z.B. die Thyreoperoxidase (TPO) (Doerge und Chang 2002) oder die DIO 1 (Aufmkolk et al. 1996, Ferreira et al. 2002, Köhrle et al. 1988) zu hemmen. Wie bereits beschrieben führt eine Störung des Schilddrüsensystems zu fatalen Veränderungen der Entwicklung und Funktion von Organen des Herz-Kreislauf-Systems, des ZNS, und des Immun- und Fortpflanzungssystems. Den größten Einfluss endokriner Disruptoren vermutet man in der sensiblen Phase der Embryonalentwicklung von Organen, zentralem Nervensystem und in bestimmten neonatalen und pubertären Phasen, in denen (Steroid-)Hormone und verschiedene Enzyme an feinregulierten Prozessen beteiligt sind. Folgen dieser Einflüsse können sich möglicherweise in Form von Reproduktionsstörungen, Stoffwechselstörungen und geistiger Retardierung viel später zeigen (Ardies and Dees, 1998; Danzo, 1998; Ferguson et al. 2000).

Pflanzliche Substanzen, welche selbst oder nach Verstoffwechslung in der Lage sind, im tierischen/menschlichen Organismus die Wirkungen von endogenen Östrogenen nachzuahmen oder diese zu modulieren, zumeist – aber nicht ausschließlich – über eine Bindung an die Östrogenrezeptoren in den tierischen/menschlichen Geweben, werden als Phytoöstrogene bezeichnet. In der Natur dienen sie der Pflanze meist als Gerb- und Farbstoffe, sowie der Abwehr von Mikroben- und Pilzbefall (Tahara et al. 1994). Anhand der chemischen Struktur werden verschiedene Gruppen der Phytoöstrogene unterschieden. Flavonoide, Isoflavonoide, Stilben, Coumestane und Lignane gehören zu den Phytöstrogenen mit phenolischer Grundstruktur und östrogenen Eigenschaften (Cos et al. 2003). Die ausgesuchten Testsubstanzen Resveratrol, Genistein und 8-PN gehören jeweils einer dieser genannten Untergruppen an. Entsprechend ihrer Wirkung werden den Phytoöstrogenen aber auch protektive Eigenschaften im kardiovaskulären System durch antioxidative Eigenschaften, Senkung der LDL- und Steigerung der HDL-Konzentration, hormonabhängige Senkung der Inzidenz von malignen Neoplasien und Linderung postmenopausaler

Beschwerden, wie Osteoporose, zugeschrieben (Adlerkreutz 1998; Cassidy et al. 1995, Beck et al. 2005, Tominaga et al. 1995, Anthony et al 1996).

Als Xenobiotika bezeichnet man einerseits die exogenen (Steroid-)Hormone, die ihren Einsatz vor allem in der Hormonersatztherapie oder Empfängnisverhütung haben. Darüber hinaus besitzen eine Vielzahl anthropogener Substanzen, genauso wie die Phytoöstrogene, die unerwünschte Fähigkeit, verschiedene Hormonsysteme des Menschen zu beeinflussen. Dazu gehören auch Insektizide, Pflanzenschutzmittel und Industriechemikalien, die u. a. bei der Synthese von Kunststoffen Verwendung finden. Bei vielen von ihnen sind östrogene Eigenschaften bereits nachgewiesen. Dazu gehören auch BPA und BP-2. Sie reichern sich aufgrund ihrer lipophilen Struktur und ihrer hohen Halbwertszeit in bestimmten Lebensräumen oder Geweben an und weisen dementsprechend eine erhöhte Bioverfügbarkeit und Konzentration auf (Bolt und Degen, 2000; Colborn et al. 1993).

Die beeinflussenden Eigenschaften einer Substanz lassen sich u. a. an klassischen Parametern, mit in vivo- und in vitro-Tests untersuchen. Bei einer vergleichenden Bewertung des Expositionsrisikos gegenüber endokrin aktiven Substanzen müssen zusätzlich verschiedene Expositionsfaktoren berücksichtigt werden: Quellen und Vorkommen in der Umwelt, Expositionswege, Aufnahmemengen, Konzentrationen in der Umwelt, Konzentrationen in Organismen, Abbauverhalten, Bioakkumulation und Geoakkumulation. Wirkungsseitig sind die Bereiche: Wirkungsmechanismus, Bioverfügbarkeit, Metabolisierung, Ausscheidungswege und -geschwindigkeit, Speicherung, Toxikodynamik und Wirkungsstärken zu untersuchen (Gies et al. 2001).

1.4. Physiologische Interaktion der Reproduktions-und Schilddrüsenachse

Körpereigene Östrogene sind u. a. für die Ausprägung und Aufrechterhaltung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale und des Menstruationszyklus verantwortlich, darüber hinaus haben sie eine schwache proteinanabole Wirkung (Löffler 2001). Die Literatur über den Einfluss der Östrogene auf die Schilddrüse ist widersprüchlich. Teilweise wird die Aktivierung der HPT-Achse nach E2-Behandlung beschrieben (D'Angelo and Fisher 1969; Chen and Walfish 1978), teilweise können keine Veränderungen der Schilddrüsenhormon-

Serumlevel festgestellt werden (Carlson et al. 1973). Einen suppressiven Effekt des E2 zeigten Fisher und D'Angelo 1971 sowie Susic-Jurjevic et al. 2005. Donda et al. 1990, Lima et al. 2006 und Böttner et al. 2006 beschrieben erhöhte TRH- und TSH-Level unter Östrogeneinfluss. Weibliche Ratten zeigen ein anderes Profil in der Konzentration der TRH-Rezeptoren in der Hypophyse und auch in der DIO 1 Aktivität (Donda et al. 1990). Die TRH, TSH und TT3/TT4-Serumkonzentrationen verändern sich vor allem unter oraler Applikation von Östrogenen, hingegen hat s.c. E2-Applikation keinen Einfluss auf die HPT-Achse (Böttner et al. 2006). Banu et al. 2002 dokumentierten die Veränderung der Schilddrüsengröße unter Östrogeneinfluss. ER-Rezeptoren konnten 1992 in den Calcitonin-produzierenden C-Zellen der Schilddrüse nachgewiesen werden (Naveh-Many et al. 1992). Lima et al. 2006 vermuten einen direkten Einfluss von Östrogenen auf die Schilddrüse, abhängig vom vorherigen gonadalen Hormonstatus. E2-Einfluss wurde schon mehrfach als begünstigender Faktor für die Entstehung von malignen Erkrankungen der Schilddrüse beschrieben (Mori et al. 1990, Takagi et al. 2002, Thiruvengadam et al. 2003).

Bei den körpereigenen Androgenen handelt es sich um C19-Steroidhormone. Die männlichen Sexualhormone haben androgene- und anabole- Wirkungen im Körper aller Wirbeltiere, Fische und Amphibien. Dazu gehören unter anderem die Stimulation von Stoffwechselfvorgängen in den Zielorganen und Muskelgeweben (Eiweißsynthese, Muskelaufbau), Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane im Mutterleib und während der Pubertät, Steuerung der Spermatogenese, Aufrechterhaltung der Libido beider Geschlechter, Förderung des Längenwachstums während der Pubertät, sowie eine zentrale Wirkung auf das Gehirn, d.h. direkte Einflüsse auf die Psyche (Löffler 2001). Antiandrogene kommen im menschlichen Körper nicht vor. Therapeutisch werden sie beim Mann zur palliativen Therapie des fortgeschrittenen Prostatakarzinoms, bei frühzeitiger sexueller Reifung und bei Hypersexualität verwendet. Bei der Frau führt eine übermäßige Androgenproduktion zu einer „Vermännlichung“ hinsichtlich des Behaarungstyps, der Stimme, des Muskelaufbaus usw. (Herold et al. 2004). Während der Embryonalentwicklung ist die männliche Differenzierung extrem abhängig vom Vorhandensein und der normalen Wirkung von Androgenen. Verschiedenen antiandrogenen Substanzen wurde in Tierversuchen die Fähigkeit der Störung der sexuellen Differenzierung nachgewiesen. Eine zunehmende Zahl von Hodentumoren, extragenitalen und genitalen Malformationen, sowie eine abnehmende Samenzahl wird seit den 90iger Jahren immer wieder durch den zunehmenden Einfluss von endokrinen Disruptoren erklärt (Toppari 2002).

Hinsichtlich der Wirkung von Sexualhormonen auf die Schilddrüse, wiesen Sheridan et al. 1984 Androgenrezeptoren in gesunden humanen Schilddrüsen nach. Die Konzentration von AR im Zytosol und im Nukleus der Männer war dabei signifikant höher als die in den Schilddrüsen der Frauen. In pathologisch nodulär verändertem Schilddrüsengewebe ist die Konzentration der Androgenrezeptoren niedriger als im Gesunden. Die höhere Prävalenz von malignen Schilddrüsenerkrankungen bei Frauen wurde ebenfalls auf diese Unterschiede zurückgeführt (Marugo et al. 1991).

1.5. Schilddrüsenhormon-regulierte Endpunkte der HPT-Achse

Die in dieser Arbeit untersuchten, die Homöostase der HPT-Achse u.a. bestimmenden und beeinflussenden Enzyme sind die Deiodasen und die Glutathionperoxidasefamilie. Schilddrüsenhormone spielen in verschiedenen Stoffwechselprozessen eine permissive oder induktive Rolle, so auch im Lipidstoffwechsel. Das Malatenzym (ME) ist ein wichtiges T₃-beeinflusstes Enzym des Lipidstoffwechsels. Ist die Schilddrüsenfunktion verändert, z.B., durch den Einfluss endokriner Disruptoren, kann man die Veränderung u. a. an der Aktivität des ME nachweisen.

1.5.1. Iodothyronine-Deiodasen (DIO)

Gross und Pitt-Rivers postulierten nach der Entdeckung von T₃ im Jahr 1952 die Existenz von Deiodasen, T₄ war zu diesem Zeitpunkt bereits seit fast 50 Jahren bekannt. Aber erst 1970 konnte durch Braverman et al. der Beweis für eine extrathyroidale Deiodierung erbracht werden, als bei athyreoten Patienten, denen T₄ verabreicht worden war, T₃ im Serum gefunden wurde.

Bisher sind drei verschiedenen Deiodaseisoenzyme (DIO) bekannt: 5'-Deiodase Typ 1 (DIO 1), die 5'-Deiodase Typ 2 (DIO 2) und die 5-Deiodase Typ 3 (DIO 3). Sie werden entwicklungs- und gewebespezifisch exprimiert und unterscheiden sich in ihren biochemischen und regulatorischen Eigenschaften, der Substratspezifität und Inhibition (Bianco et al. 2002).

Jede der Deiodasen beeinflusst die lokale und/oder systemische T₃-Produktion, d.h. die Konzentration aktiven Schilddrüsenhormons (Köhrle et al. 2000). Während die DIO 1 und die

DIO 2 die Aktivierung von T4 zu T3 katalysieren, ist die DIO 3 ausschließlich für die Inaktivierung von T4 zu rT3 zuständig. Allen drei Enzymen ist gemeinsam, dass sie physiologische Kofaktoren benötigen, die in vivo bisher noch nicht bekannt sind. In vitro übernehmen reduzierte Dithiole (z.B. DTT, Dithiothreitol) diese Funktion. Zusätzlich haben alle drei Enzyme ein Selenocystein in ihrem aktiven Zentrum, das durch ein UGA-Codon kodiert wird (Köhrle 1999).

Die DIO 1 ist am stärksten in Leber, Nieren, Schilddrüse und Hypophyse exprimiert (Köhrle et al. 2002). Sie hat in diesen reich durchbluteten Geweben die Aufgabe der systemischen T3-Bildung und -Konzentrationskontrolle, aber auch des weiterführenden Abbaus von rT3 zu T2 durch Außenringdeiodierung (Leonard und Köhrle 1996). Als Substrat favorisiert das Enzym rT3 vor T4. Bei hyperthyreotem Stoffwechszustand ist eine erhöhte Aktivität, im hypothyreoten Zustand eine verringerte Aktivität nachweisbar. Sie ist sehr empfindlich gegenüber einer Hemmung durch PTU, wohingegen die DIO 2 und DIO 3 diesem Inhibitor gegenüber gänzlich unsensibel sind (Bianco et al. 2002), sie wurde 1990 erstmals als ein Selenoprotein identifiziert (Behne et al. 1990, Arthur et al. 1990).

Die DIO 2 wurde als letzte der drei Deiodasen entdeckt und charakterisiert, die Aktivität kann in Schilddrüse, Herz, ZNS, braunem Fettgewebe und Skelettmuskulatur nachgewiesen werden. Ihre Funktion liegt, unter physiologischen Zuständen, in der lokalen T3-Produktion im Gehirn (Kalsbeek et al. 2004) durch Außenringdeiodierung. Die im Skelettmuskel exprimierte DIO 2 des Menschen soll auch für die Bereitstellung der extrathyroidalen T3 Serumkonzentration im euthyreoten Zustand verantwortlich sein (Maia et al. 2005). Im Gegensatz zur DIO 1 ist die Aktivität der DIO 2 im hypothyreoten Stoffwechszustand erhöht, im hyperthyreoten aber verringert.

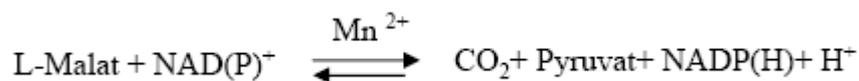
Während der Entwicklung ändert sich das Expressionsmuster der DIO 3: Während der Embryonalentwicklung hält sie den T3-Spiegel in einer für den Embryo physiologischen Höhe (Köhrle 1999). Bei adulten Menschen kann man sie in ZNS, Haut und Plazenta nachweisen. Genau wie bei den anderen Isoformen reguliert der Schilddrüsenhormonstatus die Enzymaktivität: wie bei der DIO 1 ist die Aktivität im hyperthyreoten Zustand erhöht und im hypothyreoten Zustand erniedrigt.

Zusätzlich wird die Aktivität, Expression und Funktion der Deiodasen durch verschiedene Systeme beeinflusst, wobei die Schilddrüsenhormone selbst eine Schlüsselfunktion haben. Aber auch der zirkadiane Rhythmus, die Ernährung, pharmakologische Substanzen, schwere Krankheitszustände, Geschlechtshormone, verschiedene Zytokine, Wachstumsfaktoren und Glukokortikoide haben Einfluss auf die Deiodasen. (Bianco et al. 2002, Köhrle 2002).

1.5.2. Malatenzym (ME)

Das NADP⁺-abhängige ME katalysiert die reversible oxidative Decarboxylierung von Malat. Es stellt das benötigte NADPH für die Bildung langkettiger Fettsäuren bereit. Es gibt zwei NADP⁺-abhängige Malatenzymformen, eine zytosolische (ME1) und eine mitochondriale (ME3), sie werden als Malatdehydrogenasen bezeichnet. Die dritte Variante des Malatenzyms ist NAD⁺-abhängig.

Alle drei katalysieren folgende Reaktion:



Die Reaktion ist abhängig von einem zweiwertigen Metallion (Mn²⁺ oder Mg²⁺). Die Bindung eines Metallions hilft bei der Stabilisierung der quartären Struktur des Enzyms (Chang et al. 2003).

Die Tatsache, dass Menschen mit Schilddrüsenunterfunktion für gewöhnlich auch eine veränderte Lipogenese haben, führte zu der Frage, welche Enzyme der Lipogenese durch Schilddrüsenhormone beeinflusst sind. Eine 3-4fache Erhöhung der Transkriptionsrate des ME nach zehntägiger T3-Behandlung konnte bei in vitro-Versuchen von Song et al. 1988 dokumentiert werden. Der 10-15fach erhöhte nukleäre RNA-Level, zusammen mit einer gleichwertigen Erhöhung der zytoplasmatischen mRNA, ließen einen zusätzlichen Mechanismus vermuten: T3 beeinflusst nicht nur die Translation sondern verringert in der Leber auch die Abbaurate der pre-mRNA, die für das ME kodiert (Song et al. 1988).

Neben den Schilddrüsenhormonen beeinflusst auch die Ernährung die ME-Aktivität. Sowohl eine glukose- als auch eine kohlenhydratreiche Ernährung führen zu einer erhöhten ME-Enzymaktivität. Eine kohlenhydratreiche Diät bewirkt eine erhöhte Sensitivität gegenüber T3. Die T3-Dosis, die benötigt wird, um eine halbmaximale Wirkung zu erzielen, ist 3-7fach

reduziert. Auch in kompletter Abwesenheit von T3 ist Glukose in der Lage eine ME-Induktion zu bewirken, wobei Insulin eine permissive Eigenschaft hat. T3 moduliert die Induktion weiter (Mariash et al. 1980 und 1981), so dass die Veränderung der ME-Aktivität auch in Bezug auf den metabolischen Zustand zu bewerten ist.

Weiterhin nimmt das Prohormon Dehydroandrosteron (DHEA), ein androgenes 17-Ketosteroid aus der *Zona retikularis* der Nebennierenrinde und eines der stärksten wirksamen Androgene, Einfluss auf die Aktivität des ME. In Anwesenheit von Schilddrüsenhormonen ist DHEA in der Lage, dosisabhängig in der Leber die Transkriptionsrate des ME zu steigern (Song et al. 1989).

1.5.3. Glutathionperoxidase (GPx)

Die Glutathionperoxidasen stellen eine Familie von Proteinen dar, die in der Lage sind, oxidative Schäden durch reaktive Sauerstoffspezies oder Peroxide zu verhindern. Sie katalysieren die Reduktion von Wasserstoffperoxid und organischen Hydroperoxiden zu deren analogen Alkoholen in Gegenwart von Glutathion oder alternativen Thiolen als Elektronendonatoren. Diese antioxidativen Eigenschaften der Enzyme spielen bei diversen zellulären Prozessen, wie inflammatorischen Reaktionen und Apoptose, Krebs oder dem Alterungsprozess (Gärtner et al. 2001; Sinitsyna et al. 2006) eine wichtige Rolle.

Den Glutathionperoxidasen (GPx1, 2, 3, 4, 6) und den Iodothyronine-Deiodasen (DIO1, 2, 3) ist gemeinsam, dass sie beide zu den insgesamt 25 bekannten humanen Genen gehören, die für SeCys haltige Selenoproteine kodieren (Kryukov et al. 2003). Bei der GPx-Familie ist seit Kryukov et al. 2003 bekannt, dass Selenocystein ein essentieller Bestandteil ist.

Es sind verschiedene Glutathionperoxidasen bekannt: Man unterscheidet zurzeit die zytosolische-GPx (cGPx; GPx1), die gastrointestinale-GPx (GiGPx; GPx2), die Plasma-GPx (pGPx; GPx3), die Phospholipidhydroperoxid-GPx (PHGPx; GPx4) und die GPx-6 (Kryukov et al. 2003).

Die Glutathionperoxidasen können in allen Geweben nachgewiesen werden, in denen oxidative Prozesse ablaufen, in der Schilddrüse wird diese Enzymfamilie besonders stark exprimiert. Entsprechend der hohen H₂O₂-Konzentration, die für die

Schilddrüsenhormonsynthese von der TPO benötigt wird, benötigen die Zellen auch ein effektives antioxidatives Membranschutzsystem (Köhrle et al. 1996).

Die zytosolische GPx

Die zytosolische GPx wird nahezu ubiquitär exprimiert, wobei Leber und Erythrozyten der Ratte die höchsten Konzentrationen aufweisen (Behne et al. 1983). Sie ist das erste identifizierte Selenoprotein und besteht aus vier 22 kDa schweren Untereinheiten. Wie die anderen Familienmitglieder katalysiert die zytosolische GPx die Reduktion von Peroxiden mit Hilfe von Glutathion zu stabilen Alkoholderivaten bzw. Wasser (Flohé et al. 1973; Rotruck et al. 1973). GPx1-KO-Mäuse zeigten keine pathologischen Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe (Ho et al. 1997; Sunde et al. 1997). Erst unter extremen Zuständen oxidativen Stresses zeigten die GPx1-KO-Tiere pathologische Veränderungen (Beck et al. 1998; Cheng et al. 1998).

1.6. Hintergrundinformationen zu den Testsubstanzen

1.6.1. Genistein (GEN)

Genistein ist neben Daidzein der wichtigste Vertreter der Isoflavonoide. Die Sojabohne ist die größte Quelle. Man kann es auch in tropischen Hülsenfrüchten, Besenginsterkraut, Färbeginsterkraut, und verschiedenen Kleearten nachweisen (Setchell et al. 1987; Liu et al. 2001).

Wie die Substanz selbst, sind auch die östrogenen Eigenschaften des GEN schon lange bekannt. GEN ist in der Lage, sowohl den Östrogenrezeptor ER α als auch ER β zu binden, hat aber eine größere Affinität zu ER β (Kupier et al. 1997). Da es vornehmlich in der Sojabohne und ihren Folgeprodukten vorkommt, wird es dementsprechend auch in verschiedenen Bevölkerungsgruppen in unterschiedlichen Mengen konsumiert. Besonders im asiatischen Raum decken die Menschen einen Großteil des Proteinbedarfs durch Sojaprodukte. Eine verringerte Prävalenz von Brustkrebs und kardiovaskulären Erkrankungen in dieser Region, ließen einen Zusammenhang zwischen den Ernährungsunterschieden und der unterschiedlichen Prävalenz von malignen Erkrankungen vermuten (Stephens 1997,

Adlerkreutz 1998). Die ernährungskonzentrierte Hypothese wurde gefestigt durch die Beobachtung, dass die in den USA lebende Tochtergeneration der Emigrantinnen, eine höhere Inzidenz von Brustkrebs aufwies (Ziegler et al. 1993).

Die Perimenopause der Frau ist gekennzeichnet durch die stetige Abnahme der ovariellen Östrogenproduktion und der gleichzeitig verminderten Ansprechbarkeit der Ovarien auf die vermehrt produzierten hypophysären Gonadotropine, wodurch oftmals vasomotorische (Hitzewallungen), psychische (Stimmungsschwankungen, Libidoverlust) und somatische (urogenitale Veränderungen) Symptome bedingt sind. Die schwerwiegendste, mit der Abnahme der Östrogenproduktion einhergehende, Erkrankung ist jedoch die Osteoporose (Herold et al. 2004). Bis zum Abbruch der WHI-Studie (women's health initiative) im Jahr 2002, bei der vor allem ein erhöhtes Brustkrebs- und Herzinfarkttrisiko nach der Einnahme von Östrogen-/Progesteronpräparaten festgestellt wurde (Rossouw et al. 2002), wurden diese peri- und postmenopausalen Beschwerden (PMS) häufig durch synthetische Östrogenpräparate behandelt. Daher suchen heute immer mehr Frauen nach Alternativen zu synthetischen Hormonen und nehmen pflanzliche Präparate, wie Sojaprodukte ein, mit teilweise hohen Konzentrationen von Isoflavonoiden, um ihre Beschwerden zu lindern. Dabei ist nicht geklärt, ob GEN eine sichere und Erfolg versprechende Substanz zur Supplementierung darstellt, denn GEN hat uterotrope Effekte (Diel et al. 2001), stimuliert das Wachstum von menschlichen Mamma-Karzinomzellen (in vitro und bei transplantierten Tieren) und reduziert die Hitzewallung gar nicht, oder nur ganz leicht (Ju et al. 2001, Maggiolini et al. 2001, Van Patten et al. 2002).

In Hinsicht auf diese multidimensionale Wirkung, wird diskutiert ob GEN als gefährlich betrachtet werden muss (Wuttke et al. 2007). Dementsprechend ist z.B. auch der Einfluss auf das Schilddrüsenhormonsystem nicht vollständig geklärt: Chang et al. 2000 konnten zeigen, dass Genistein die Schilddrüsenhormonsynthese durch Störung der Iodidaufnahme und Inhibition der TPO beeinflusst - ein Effekt, der nicht auftritt, wenn ausreichend Iod vorhanden ist (Schmutzler et al. 2006). In Hinsicht auf den immer noch weit verbreiteten Iodmangel, ist das Risiko einer Hypothyreose nicht zu ignorieren.

1.6.2. Resveratrol (RES)

Resveratrol (RES) gehört zu der Gruppe der Stilbene. Für Menschen sind wichtige Quellen v.a. Nüsse und Weintrauben (*Vitis vinifera*, *Vitis lambrusca*) mit ihren Folgeprodukten wie beispielsweise Rotwein. Allgemein kann es in mehr als 70 gewöhnlich verbreiteten Pflanzenspezies nachgewiesen werden (Turner et al. 1999). Es ist es ein Teil des pflanzlichen Abwehrsystems.

Aufmerksamkeit in der Wissenschaft hat es erst seit wenigen Jahren, seit es für das „French Paradox“ -also der niedrigen Inzidenz von kardiovaskulären Erkrankungen in der französischen Bevölkerung, die sich vergleichsweise fettreich ernährt- verantwortlich gemacht wird (Soleas et al. 1997, Kopp et al. 1998). In verschiedenen in vitro Studien konnte eine antioxidative (Frankel et al. 1993), antimutagene (Jang et al.1997) und antikanzerogene Potenz (Chun et al. 1999) von Resveratrol gezeigt werden. Es ist in der Lage, die Lebensdauer von Mäusen unter hochkalorischer Ernährung, entgegen dem vergrößertem kardiovaskulären Risiko, zu verlängern (Baur et al. 2006). Eine verringerte Plättchenaggregationsfähigkeit und die antioxidativen Eigenschaften sind zusätzliche Gründe für die häufig beschriebenen kardioprotektiven Effekte. Resveratrol bindet, im Unterschied zu vielen anderen Phytoöstrogenen, gleich stark an beiden Östrogenrezeptoren, aber mit geringerer Affinität als Östradiol. Viele der genannten Effekte konnten bis jetzt nur in vitro gezeigt werden. Der Einfluss auf die Schilddrüsenachse ist noch weitestgehend unbekannt, jedoch konnten Schmutzler et al. 2006 die Hemmung der TPO auch für RES nachweisen.

1.6.3. 8-Prenylnaringenin (8-PN)

8- Prenylnaringenin (8-PN) wurde erstmals 1979 als Bestandteil von *Compositae* (Korbbütler) beschrieben (Bohlmann et al. 1979). Erst 1999 zeigte Milligan, dass 8-PN die östrogene Substanz in den Blüten weiblicher Hopfenpflanzen ist, anschließend wurde es auch im Bier nachgewiesen.

Sowohl mit Hilfe von in vitro- als auch in vivo-Studien konnte gezeigt werden, dass 8-PN das Phytoöstrogen mit der bis jetzt bekannten höchsten endokrinen Aktivität ist (Kitaoka et al. 1998). Im Gegensatz zu Genistein und Resveratrol ist das Wissen über 8-PN aber noch gering. Es bindet mit gleicher Affinität an ER α als auch ER β , entwickelt jedoch am ER α -Rezeptor eine wesentlich stärkere Aktivität (Bovee et al. 2004). Mit der Zeit konnte man für

8-PN weitere Effekte nachweisen: So zeigten Pepper et al. 2002 und 2004, sowohl in vivo als auch in vitro, antiangiogene und antithrombotische Effekte. Die antioxidativen Eigenschaften (Miranda et al. 2000b, Shirataki et al. 2001, Toda und Shirataki 2000), die vielen Phytoöstrogen gemeinsam sind, werden unter anderem auch im Zusammenhang mit einer neuroprotektiven Wirkung diskutiert (Youdim et al. 2002). Bei in vivo-Studien hatte 8-PN einen uterotrophen Effekt, gleichzeitig konnte man auch eine Knochendichteerhöhung nachweisen, dabei zeichnete sich eine Gewebespezifität ab (Knochen>Uterus) (Miyamoto et al. 1998). Entsprechend der hohen östrogenen Wirkung ist die Substanz 8-PN sehr interessant für den Einsatz als pflanzliches Östrogen, z.B. bei der Hormonersatztherapie.

Der Einfluss von 8-PN auf die HPT-Achse ist bis jetzt noch wenig untersucht. Christoffel et al. 2004 zeigten, dass der hormonelle Status und die Genexpression (IGF1, ER α , ER β) der Schilddrüse weit weniger anfällig gegenüber der starken östrogenen Potenz von 8-PN sind, als die Reproduktionsachse. Jedoch zeigte sich das Gewicht der Schilddrüse in vivo nach Kurz- und Langzeitbehandlung signifikant erhöht, entsprechend einem östrogenen Einfluss auf das Schilddrüsengewebe.

1.6.4. Bisphenol A (BPA)

Bisphenol A (BPA) gehört weltweit zu den meistproduzierten Chemikalien. Allein in der Bundesrepublik Deutschland werden jährlich über 200.000 t synthetisiert. Es ist die strukturelle Grundlage der Polykarbonate und Epoxidharze, wird für Zahnfüllungen und Thermopapier, sowie CDs, Armaturen und Plastikteile im Auto, Haushaltsgegenstände, transparente Babyplastikflaschen, Nahrungs- und Getränkeverpackungen u.v.m. verwendet. Auch Klebstoffe und viele Do-it-yourself-Produkte enthalten BPA, Nahrungsmittel- und Getränkedosen werden in der Regel innen mit einem BPA-haltigen Epoxidharz überzogen. In der breiten Öffentlichkeit wurde BPA durch Pressemitteilungen über seine Migration aus Kronkorken von Bierflaschen oder Auskleidungen von Konservendosen (Brotons et al. 1995) bekannt. Freies BPA ist in unserer Umwelt, z.B. im Trinkwasser, in abgefüllten Getränken, sogar in Milchflaschen, nachweisbar. Daher ist es nicht verwunderlich, dass Spuren im Blut und Urin von Erwachsenen sowie in Geweben von Feten nachweisbar sind (Calafat et al. 2004).

Die Kenntnis des östrogenen Potentials der Bisphenole ist schon über 60 Jahre alt (Reid et al. 1944). Weitere Untersuchungen von BPA zeigten seine proliferationsfördernde Wirkung auf menschliche MCF-7-Brustkrebszellen (Brotons et al. 1995); bei in vitro-Versuchen konkurriert BPA mit Östradiol um die Bindung an den ER α -Rezeptor und induziert die Expression von Progesteronrezeptoren (Krishnan et al. 1993). Somit konnte gezeigt werden, dass BPA sowohl in vivo also auch in vitro als Xenoöstrogen wirkt, wobei die östrogene Potenz in vitro teilweise bis zu 10.000fach geringer als die von 17 β -Östradiol ist (Kim et al. 2001; Kupier et al. 1998), und dass sie in vivo abhängig ist von Versuchstierspezies bzw.-stamm (Milligan et al. 1998; Steinmetz et al. 1997,1998).

Mit anderen Versuchen wurde festgestellt, dass die Exposition mit BPA zu morphologischen und funktionellen Anomalitäten im Reproduktionssystem führt: Die Exposition von Nagetierfeten gegenüber niedrigen BPA Dosen von 20-40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{Tag}$ führte zu schwerwiegenden postnatalen Effekten, wie z.B. reduzierter täglicher Spermienproduktion und erhöhtem Prostatagewicht bei männlichen Tieren. Es konnte eine Veränderung in der Entwicklung und der Gewebeorganisation der Brustdrüsen nachgewiesen werden, Störungen der sexuellen Differenzierung im Gehirn, schädliche Langzeiteffekte auf die Zellen der Vagina, sowie ein beschleunigtes Wachstum und geschlechtliche Differenzierung bei weiblichen Tieren (Howdeshell et al. 1999; Kubo et al. 2003; Markey et al. 2001; Nagel et al. 1997; Schönfelder et al. 2002; vom Saal et al. 1998; Welshons et al. 1998; White et al. 1994).

Bei Mäusen, die eine mit dem menschlichen Expositionsniveau vergleichbare orale Dosis (20-100 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{KG}/\text{Tag}$) erhielten, zeigte sich, dass BPA ein potenter Disruptor der Meiose, des Zellteilungsprozesses, ist. Die als „congression failure“ bezeichnete meiotische Veränderung stellt keine Mutation dar, sondern ist ein Fehler im Aufbau des Spindelapparates und kann zu Aneuploidien führen, welche wiederum als der Grund für mentale Retardierung, sowie als genetische Hauptursache von Fehlgeburten bei Menschen gesehen werden (Hassold and Hunt 2001).

In transienten Genexpressionstests, konnte gezeigt werden, dass BPA dosisabhängig die durch T3- induzierte Transkription hemmt (Moriyama et al. 2002). Dabei war die T3 Konzentration in physiologischer Höhe. Schmutzler et al. 2006 beschrieben den inhibierenden Einfluss von BPA auf die TPO.

1.6.5. Benzophenon-2 (BP-2)

Die Benzophenone sind eine heterogene Gruppe. Sie sind sog. Photosensibilisatoren, d. h. sie sind in der Lage, Licht primär zu absorbieren und anschließend die Energie strahlungslos auf andere Moleküle oder Atome zu übertragen, wodurch diese zur Reaktion gebracht werden. Sie werden als Hilfsmittel in der Photographie, in der Photochemie, in der Photodynamischen Therapie, sowie also Schutz vor UV-A und UV-B Strahlen eingesetzt. Sie ziehen in die Haut ein und absorbieren aufgrund ihrer kondensierten und häufig aromatischen π -Bindungssysteme die hochenergetische UV-Strahlung, um sie in Form von Wärme wieder abzugeben. Um Schäden durch Sonnenlicht vorzubeugen, werden sie in Plastik zur Erhöhung der Produktstabilität, aber auch in Sonnenlotionen, sowie zunehmend in anderen Kosmetika wie Lippenstiften, Cremes und Haarpflegemitteln verwendet (Schlecht 2006).

Durch neuere Untersuchungen ist BP-2 als mögliche EAC in Verdacht geraten. BP-2 wurde positiv im ER α -Reporterassay sowie im uterotrophen Assay getestet (Yamasaki et al. 2002). Dementsprechend konnte eine E2-ähnliche Wirkung in vivo an Lipid- (Erniedrigung von LDL, HDL, Cholesterol) und Östrogenkonzentration nach 5-tägiger Akut- und einer 3 Monate andauernden Langzeitbehandlung beobachtet werden (Jarry et al. 2004; Seidlova-Wuttke et al. 2005). Nicht-östrogene Effekte von BP-2 auf die GH- und LH-Sekretion, wurden durch teilweise antiandrogene Eigenschaften von BP-2 erklärt.

Besonderes Augenmerk muss auf die HPT-Achse gelegt werden, denn BP-2 ist in Konzentrationen von 333 und 1000 mg/kg Körpergewicht (KG) in der Lage, TT4 und TSH-Serumlevel signifikant im Sinne einer Hypothyreose zu verändern (Schlecht 2006). Genau wie Genistein hemmt BP-2, besonders in Iodmangelsituationen, die Aktivität der TPO und dadurch die Schilddrüsenhormonsynthese (Schmutzler et al. 2006). Das kann schwere Folgen für die Gesundheit haben, besonders in Hinsicht auf die immer noch herrschenden Iodmangelsituationen vieler Menschen in weiten Bereichen der Welt. Mittlerweile ist es in der Europäischen Union nicht mehr für die Verwendung in Sonnenlotionen zugelassen, dennoch wird es noch immer in vielen kosmetischen Produkten zum Produktschutz verwendet. In diesen Produkten ist die BP-2-Konzentration wesentlich geringer, da aber eine Vielzahl von Gegenständen Anteile beinhalten, muss man von einem täglichen Kontakt mit der menschlichen Haut ausgehen.

1.6.6. Dibuthylphthalat (DBP)

Diester der Phthalsäure gehören ebenfalls zu jenen Industriechemikalien, die in größten Mengen hergestellt und verbreitet werden. Allein in Deutschland werden jährlich etwa 400.000 t produziert. Sie dienen als Hilfsstoffe, sog. „Weichmacher“, für verschiedene Kunststoffe, Öle, Lacke und Klebstoffe, sind ubiquitär verbreitet, auch als Bestandteil von Kosmetik oder Körperpflegemitteln und pharmazeutischen Produkten kommen sie zum Einsatz (Kuch und Ballschmiter 1999).

Die Ergebnisse bezüglich der endokrinen Wirkung sind widersprüchlich. Mittels Reinsubstanzen konnten Harris et al. 1997, und Jobling et al. 1995 in vitro östrogene Aktivitäten des DBP nachweisen. Nach einer Mehrgenerationenstudie von Mylchreest 1998 scheinen, im Gegensatz zur Arbeit von Harris, besonders die antiandrogenen Eigenschaften des DBP eine wesentliche Rolle zu spielen.

Es antagonisiert vermutlich während der Gonadendifferenzierung bei in utero exponierten männlichen Ratten die Testosteronwirkung, die zur Entwicklung des Wolff'schen Ganges essentiell ist. Die Entwicklung der primären Geschlechtsteile wie Nebenhodengängen, Samenleiter und Bläschendrüse wird dadurch sensibel gestört. Gray et al. 2001 beschreiben gleichzeitig eine inhibitorische Wirkung von Phthalatsäureestern auf die fötale Testosteronsynthese. In Anbetracht der Kenntnisse über die fein austarierte zelluläre Hormonhomöostase, gerade während früher Differenzierungsphasen in der Entwicklung eines Organismus, kompliziert sich die Bewertung des Risikos durch Kontakt mit DBP. Swan et al. 2005 beschrieben die Übereinstimmung der inkompletten Ausbildung der primären und sekundären männlichen Geschlechtsteile beim Menschen und bei Nagetieren im Sinne eines „Phthalatsyndroms“ bei pränataler Phthalatexposition. Ein mögliches Szenario ist eine verstärkte Aktivierung des Östrogenrezeptors durch die potentiellen östrogenen Eigenschaften und die gleichzeitige Repression der Aktivität des Androgenrezeptors. Da sich diese beiden ligandenabhängigen Transkriptionsfaktoren in einigen Geweben und Zellen als Gegenspieler gegenüberstehen, kann möglicherweise eine schwache Verschiebung des Gleichgewichts fatale Folgen nach sich ziehen. Exponierte männliche Ratten zeigten nach der Geburt reduzierte anogenitale Distanz (AGD), Nippelretention, reduziertes Gewicht der akzessorischen Geschlechtsdrüsen, reduziertes Gewicht der Hoden und Nebenhoden, sowie vermehrte Flüssigkeitsfüllung der Hoden und reduzierte Spermienzahl (Mylchreest et al.

1998, 1999, 2000; Gray et al. 2001). Über den Einfluss auf die HPT-Achse ist bis jetzt wenig bekannt.

1.6.7. Linuron (LIN)

Das Unkrautvernichtungsmittel Linuron ist als krebbsverdächtig, reproduktionstoxisch und hormonell antiandrogen wirksam eingestuft (Cook et al. 1993, Lambright et al. 2000). Dieser Problemstoff ist für die Anwendung in der deutschen Landwirtschaft eigentlich nicht zugelassen. Er kann nur eingesetzt werden, wenn das Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit (BVL) eine Ausnahmegenehmigung erteilt. Im Jahr 2003 wurden in Deutschland 1-2,5 t im Möhren- und Porreeanbau angewendet, im Jahr 2004 waren es bereits 2,5-10 t (Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit).

Lambright et al. 2000 zeigten die schwache Bindung von LIN an den humanen Androgenrezeptor (AR) und den AR der Ratte. In vivo-Versuche mit adulten und juvenilen männlichen Ratten, die mit 200 mg/kg Linuron behandelt wurden, führten nach zwei Wochen zu einer Abnahme des Gewichts der Geschlechtsorgane. Die Serumspiegel von Testosteron, E2 und luteinisierendem Hormon waren dabei, vermutlich aufgrund der fehlenden negativen Rückkopplung, erhöht (Cook et al. 1993). Beim Hershberger-Assay wird die Entwicklung androgenabhängig wachsender Gewebe wie Samenblase und Prostata durch 100 mg Linuron/kg KG/Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe kastrierter und ausschließlich mit Testosteron behandelte unreifer männlicher Ratten reduziert. Eine Multigenerationsstudie beschreibt bei Dosierungen von 40 mg Linuron/kg KG/Tag in der F1-Generation vermindertes Hodengewicht, verringerte Spermien- und Nachkommenzahl sowie die Ausbildung von Brustwarzen bei männlichen Ratten (Gray et al. 1999; Gray et al. 2001; Lambright et al. 2000). Bei der kombinierten Exposition von LIN und einem zweiten antiandrogenem ED, z.B. eines Phthalatesters (BBP), zeigte sich eine kumulative Wirkung mit einer noch stärker verringerten Testosteronkonzentration (Hotchkiss et al. 2004). Die Reduzierung von Serumtriglyceriden nach Langzeitbehandlung mit LIN (Seidlova-Wuttke et al. 2005) ist, hinsichtlich des folglich reduzierten atherogenem Risikos, ein interessanter Effekt.

1.6.8. Procymidon (Proc)

Procymidon wird als Kontaktfungizid bezeichnet. Es wird in der Landwirtschaft besonders häufig für den Schutz von Porree und Möhren vor Pilzbefall verwendet. Der Wirkungsmechanismus der Dicarboximidfungizide ist noch nicht vollständig aufgeklärt; es werden u.a. Interferenzen mit der Zellteilung, dem Nukleinsäurestoffwechsel, der Lipid- und der Steroidbildung diskutiert (Hoffmann et al. 1994). Bei der Nahrungsmittelanalyse, gehören sie mittlerweile zu den wichtigsten Substanzen, da sie auch in tierischen Geweben nachgewiesen werden konnten (Lott and Baker 1993), wodurch sich ihr potentieller Einfluss auf den Menschen erhöht. Erhebliche Mengen dieses Pestizids wurden in Saaten als Folge des häufigen Gebrauchs oder zu kurzer Gebrauchsabstände nachgewiesen (Vanni et al. 2000a).

Schon seit den neunziger Jahren ist bekannt, dass Proc auch antiandrogene Eigenschaften besitzt und dass es sowohl in vivo als auch in vitro in der Lage ist, die AR-abhängige Genexpression zu inhibieren und damit die sexuelle Differenzierung zu verändern (Ostby et al. 1999). Eine östrogene Aktivität beschrieben Radice et al. 2005 an MCF-7 Zellen. Il Hyun Kang et al. 2004 zeigten, dass es nach zehntägiger oraler Aufnahme von Proc in verschiedenen Konzentrationen zu einer signifikanten Abnahme des Gewichts von androgenregulierten Organen und Drüsen kommt, während die Testosteronkonzentration und die LH-Serumspiegel unverändert bleiben. Perinataler Kontakt mit Proc in unterschiedlicher Dosis (50-200 mg/kg/Tag) induzierten bei männlichen Ratten einen verringerten anogenitalen Abstand und Hypospadiasis, ein reduziertes Gewicht des ventralen Prostatalappens, sowie der restlichen androgenregulierten Gewebe (Ostby et al. 1999). In Bezug auf die Schilddrüsenachse konnte bereits gezeigt werden, dass Proc, ebenso wie LIN, in der Lage ist, die Serumkonzentration von T4 und T3 zu reduzieren (Seidlova-Wuttke et al. 2005).

1.7. Zielsetzung und Methodik

Seit Anfang der 90er Jahre besteht ein großes öffentliches und wissenschaftliches Interesse am Einfluss von Phytoöstrogenen und Xenobiotika auf den menschlichen Hormonhaushalt (Colborn et al. 1993). Eine Beeinträchtigung der Gesundheit muss vor dem Hintergrund der Belastung des Menschen mit einer großen Anzahl von EDs diskutiert werden.

Hinsichtlich der Interaktion zwischen Gonaden- und Schilddrüsenhormonen ist es wichtig zu überprüfen, inwieweit exogene Substanzen mit bekannten östrogenen Eigenschaften in der

Lage sind, auch mit schilddrüsenspezifischen Rezeptoren zu interagieren, Enzyme zu beeinflussen und Transportsysteme zu stören.

Mit dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob die bereits bekannten EDs mit östrogenen, androgenen und/oder antiandrogenen Aktivität auch in der Lage sind, Einfluss auf die HPT-Achse zu nehmen. Dazu wurden enzymatische und molekularbiologische Methoden verwendet, wobei der Fokus auf Veränderungen in Leber und Niere gelegt wurde, entsprechend der wichtigen metabolischen Funktion dieser Organe

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Geräte

2.1.1. Chemikalien

Chemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth GmbH (Karlsruhe), Roche Diagnostik GmbH (Mannheim), Sigma-Aldrich GmbH (München) und Sarstaedt (Nümbrecht) bezogen. Es wurden Chemikalien der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe verwendet. Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Eppendorf (Hamburg) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.1.2. Geräte

Tabelle 1: Geräteverzeichnis

Dismembrator	Braun, Melsungen
Gamma Counter	1277 Gammamaster, Turku, Finnland
Gel-Apparatur	Elektrophoresis Power Supply, GibCo BRL ST 504
iCycler iQ™, Optical Tape	Bio-Rad Laboratories Hercules, CA
iCycler iQ™	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA
Kamera	LTF Labortechnik, Vilber Louromat
Mikro-Dismembrator	B. Brau Biotech International GmbH, Melsungen
pH-Meter	inoLab, Laboratory Equipment
Photometer	8,5 mm light center height, Eppendorf, Hamburg
Spectrophotometer	U-2001 HITACHI Scientific Instruments 6 Cell Positioner
Sonifizierer Ultraschall	Ultraschallstab, LaBsonic ®M; Braun, Melsungen
Thermocycler	MWG Biotech Primus 25
Waagen	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifugen	Eppendorf, Hamburg und Heraeus

2.2. Übersicht über die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente

Die Aufzucht und Behandlung der Ratten, sowie die Organextraktion der im Folgenden beschriebenen Tierversuche fand in Göttingen (Institut für experimentelle Endokrinologie, Universität Göttingen, Leiter: Prof. Dr. W. Wuttke) statt. Nachstehend befindet sich eine Übersicht über die für diese Arbeit durchgeführten Versuche.

Tabelle 2: Phytoöstrogenversuch

	Leber	Niere
Deiodase-Assay	X	--
rt-PCR (DIO 1, ME)	X	--
Malatenzym-Assay	X	X
Glutathionperoxidase Assay	X	X

Tabelle 3: Xenobiotikaversuch

	Leber	Niere
rt-PCR (DIO 1, ME)	X	--

2.3. Tierexperimente

Alle Versuche wurden entsprechend den allgemeinen deutschen Richtlinien bei Tierversuchen durchgeführt. Es lag eine Genehmigung durch die Bezirksregierung Braunschweig vor, die Aktenzeichen lauten für den Phytoöstrogenversuch 509.42502/01-36.03 bzw. 509.42502/01-13.00 für den Xenobiotikaversuch. Diese Arbeit entstand im Rahmen des von der EU geförderten Verbundprojektes EURISKED wobei alle beschriebenen Tierversuche durch die AG Prof. Dr. W. Wuttke durchgeführt wurden. Dort wurde im Zuge dieser Fütterungsversuche die Wirkung der Substanzen auf die Reproduktionsachse untersucht. Aus dieser Zusammenarbeit ergibt sich der in den folgenden Abschnitten beschriebene Versuchsaufbau.

2.3.1. Versuchstiere und Tierhaltung

Für beide Experimente wurden weibliche Sprague Dawley Ratten verwendet. Die P-Generation wurde von der Firma Winkelmann (Borchen, Deutschland) im Alter von 2 Monaten erworben und durchgängig, mindestens für 4 Wochen, sojafrei (Firma Sniff, Futter „sniff SM R/M,10mm“) ernährt, bevor die Paarung stattfand. Die weiblichen Tiere der F₁-Generation wurden den Langzeitexperimenten zugeteilt, die jeweils nach dem Absetzen, im Alter von vier Monaten begannen.

Tabelle 4: Umgebungsbedingungen

Einrichtung	Versuchstierstall der Universität Göttingen
Tiere	weibliche Sprague Dawley-Ratten, Durchschnittsgewicht: ca. 280g (Phytoöstrogenversuch) ca. 260 g (Xenobiotikaversuch)
Umgebung	20°C Raumtemperatur, 55% rel. Luftfeuchtigkeit, 12-stündiger Tag/Nacht-Rhythmus
Aufbewahrung	5-6 Tiere/Käfig (Makrolon®IV), Reinigung alle drei Tage
Trinken	Leitungswasser <i>ad libitum</i>
Futter	sojafreie Rezeptur (Sniff Spezialdiäten GmbH Soest, Deutschland „SM R/M, 10mm“)

2.3.2. Ernährung

Die Tiere wurden konstant mit sojafreiem Futter der Firma Sniff (Soest, Deutschland) „SM R/M, 10mm“ gefüttert, wobei die Sojaproteine durch Kartoffelproteine ersetzt waren. Die Nahrung war isokalorisch und wurde in verschiedenen Versuchen bereits verwendet (Seidlova-Wuttke et al. 2003). Eine Übersicht über die Zusammensetzung des Futters befindet sich im Anhang.

2.3.3. Ovariectomie

Die Behandlung der Tiere begann im Alter von vier Monaten. Zu diesem Zeitpunkt wurden alle Tiere bis zum Eintreten von Bewusstlosigkeit gegenüber CO₂ exponiert und anschließend unter Anästhesie mit intraperitoneal injiziertem Ketamin (Hostaket®, Hoechst) und Xylazin (Rompun®, Bayer) ovariectomiert. Dabei lag die verabreichte Dosis/kg KG bei 7,5 mg Xylazin und 62,5 mg Ketamin. Reichte diese Dosis nicht aus, wurden 100 mg/kg KG Ketamin nachträglich appliziert. Vor der abdominalen Inzision wurden die Flanken rasiert und desinfiziert. Nach Präparation der Ovarien wurden die Tuben mit resorbierbarem Catgut (3 metric Ethicon) legiert und mit Hilfe eines Skalpell die Ovarien entnommen. Nach Reposition des Uterus wurde die *Tunica muscularis* zugenäht (Catgut) und anschließend die Haut mit Hilfe von Michel Naht-Klammern® verschlossen (Martin Medizintechnik). Einer Dehydratation vorbeugend erhielten die Tiere 5 ml isotonische NaCl-Lösung s.c. (Braun). Um die Erholung von der Operation zu beschleunigen, erhielten die Tiere einmalig 0,5 mg/kg KG Atipamezol-HCl i.p.; bis zum Erwachen wurden die Tiere am Monitor überwacht.

2.3.4. Sektion

Die Tiere wurden nach CO₂-Narkose mit Hilfe einer Guillotine dekapitiert. Um mögliche zirkadiane und psychologische Einflüsse zu vermeiden, wurden diese Dekapitierungen zwischen 8 und 12 Uhr mittags durchgeführt, wobei die Tiere der einzelnen Gruppen gleichmäßig gemischt wurden. Folgende Organe wurden entnommen und innerhalb von 3-5 Minuten mit Hilfe von flüssigem N₂ schockgefroren und anschließend bei -80 °C aufbewahrt: Blut, Hypophyse, Schilddrüse, Herz, Lungen, Leber, Nieren, Darm, Uterus, Vagina.

2.3.5. Aufarbeitung und Aufbewahrung des Futters

Um den Einfluss der verschiedenen Substanzen auf die Schilddrüsenachse zu untersuchen, wurden die Tiere über einen Zeitraum von drei Monaten oral exponiert, so dass ein konstanter hormoneller Expositionsdruck bestand.

Das Futter wurde mit den jeweiligen Testsubstanzen nach Rezept ergänzt, so dass ein homogenes Gemisch vorlag, das in kleinen Pellets verabreicht wurde. Das gesamte Futter

wurde eine Woche vor Beginn der Experimente fertiggestellt, beschriftet und eingelagert. Dabei wurden die verschiedenen Substanzgruppen separat aufbewahrt, bei Kontakt wurden Einmalhandschuhe, Mund- und Haarschutz, sowie Laborkittel getragen.

Das aufgearbeitete Futter wurde bei beiden Versuchen in zwei Teilen aufbewahrt: Ein Anteil wurde bei -20°C gelagert, der 2. Teil wurde bei Raumtemperatur gehalten und für das Füttern verwendet. Die Stabilität der Testsubstanzen wurde mittels HPLC-UV (High-Performance-Liquid-Chromatographie Ultra Violette) kontrolliert.

2.3.6. Konzentration und Reinheitsgrad der Testsubstanzen

Mittels analytischer RP-HPLC (Reverse-Phase-High-Performance-Liquid-Chromatographie) wurden die Testsubstanzen vor Verwendung getrennt und gereinigt. In der ersten Versuchswoche wurde der Gehalt der zugesetzten Substanzen im Futter kontrolliert. Die Tabellen 5 und 6 zeigen eine Übersicht über die angestrebte und die tatsächlich erzielte Konzentration der Testsubstanzen.

a) Phytoöstrogenversuch: Die erreichte Konzentration von 8-PN im Futter stand im Einklang mit dem erwarteten Wert. Demgegenüber waren die Konzentrationen von GEN und RES geringer als veranschlagt, was auf die Umgebungsbedingungen bei der Verarbeitung zurückgeführt wurde, denn beide Substanzen sind sehr empfindlich gegenüber Temperaturen bzw. UV-Licht (Xu et al. 2002, Wang et al. 2002).

Tabelle 5: Phytoöstrogenversuch, Analyse der Konzentration der Substanzen

Substanzen	Konzentration der Substanzen im Futter
E2B <ul style="list-style-type: none"> • Low • Minimal 	17,3 mg/kg 4,3 mg/kg
AND <ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	0,075g/kg 0,3 g/kg
GEN <ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	0,1 g/kg 1 g/kg
RES <ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	0,084 g/kg 0,84 g/kg

8-PN	
<ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	0,126 g/kg 1,26 g/kg

b) Xenobiotikaversuch:

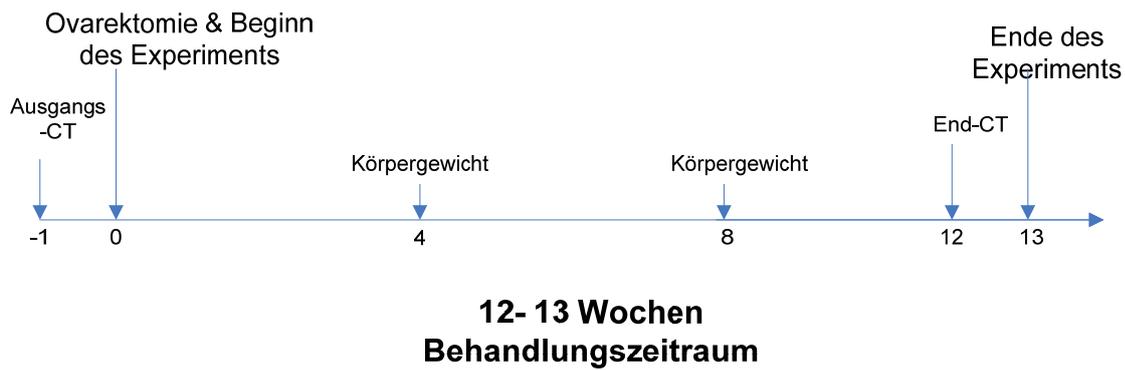
Tabelle 6: Xenobiotikaversuch: Konzentration der Substanzen /20 g Futter

Substanzen	Konzentration in µg/20g Futter
BPA	
<ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	10 100
DBP	
<ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	25 125
BP-2	
<ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	50 250
Proc	
<ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	20 200
LIN	
<ul style="list-style-type: none"> • Low • High 	20 200
E2 (gegeben als 17β-Estradiol)	500 entspricht 325 µg 17 β-Estradiol

2.4. Versuchsaufbau der Tierexperimente

Zeitachse

Die Behandlung begann bei beiden Versuchen am Tag nach der Ovariectomie. Diese wurde durchgeführt, um den Einfluss der Phytoöstrogene auf die Reproduktionsachse, unter Ausschluss interner Hormonproduktion, zu untersuchen (Göttingen).



Grafik 1: Zeitachse

2.4.1. Dosierung

Jede Substanz wurde in 2 verschiedenen Konzentrationen getestet, um eine genauere Aussage über die dosisabhängige Wirkung machen zu können. Die Konzentrationen wurden so ausgewählt, dass sie mit menschlicher Exposition vergleichbar sind. Bei der Planung der Versuche wurde die zu verwendende Dosis einer jeden Substanz basierend auf Ergebnissen von Vorexperimenten definiert, ausgehend von einer täglichen Futteraufnahme von 15-20g/Tag.

Enddosis: Um eine endgültige Aussage über die Wirkung der Phytoöstrogene und Xenobiotika machen zu können und eine Dosis-Wirkungsbeziehung aufstellen zu können, muss neben der verabreichten Substanzmenge auch die schließlich erreichte Dosis bekannt sein. Dabei spielen einerseits Gehalt und Stabilität der Substanzen, andererseits die Futteraufnahme und das Körpergewicht der Tiere eine wichtige Rolle. Weiterhin beeinflussen Bioverfügbarkeit, Metabolismus und Gewebeverteilung die endgültige Serumkonzentration. Die exakte Dosisbestimmung gestaltet sich mitunter schwierig, da die tägliche Aufnahmemenge alteriert. Da in diesem Versuch der Langzeitkontakt untersucht werden sollte, wurden die Durchschnittswerte des Körpergewichts und der Substanzaufnahme aus den Wochen 4-11 verwendet. Zweimal die Woche wurde die Futteraufnahme gemessen um die Aufnahme der Substanzen pro Tier nachvollziehen zu können.

Tabelle 7: Phytoöstrogenversuch, Dosis

Versuchsgruppen	<u>erreicht in mg</u> <u>pro Tier</u>	<u>erreicht in mg</u> <u>pro kg-KG</u>
Kontrollgruppe	-----	-----
E2		
• Low	0,16	0,70
• Minimal	0,05	0,17
AND		
• Low	1,8	45,8
• High	16,3	55,0
GEN		
• Low	1,9	5,4
• High	15,5	53,0
RES		
• Low	1,6	4,5
• High	15,3	45,0
8-PN		
• Low	2,1	6,8
• High	18,4	68,4

Tabelle 8: Xenobiotikaversuch, mittlere tägliche Aufnahme

Versuchsgruppen	<u>Pro Tier</u>	<u>pro kg-KG</u>
Kontrollgruppe	-----	-----
BPA		
• Low	8,88 µg	33 µg
• High	87,8 µg	333 µg
DBP		
• Low	22,1 mg	82 mg
• High	106,3 mg	393 mg
BP-2		
• Low	41,4 mg	153 mg
• High	183,1 mg	677 mg
LIN		
• Low	4,4 mg	16,3 µg
• High	17,7 mg	65,5 mg
Proc		
• Low	5,6 mg	21 mg
• High	22,4 mg	84 mg
E2 (gegeben als 17β-Estradiol)	327 µg	1,2 mg

2.4.2. Messungen während der Versuche

Körpergewicht

Das Körpergewicht eines jeden Tieres wurde regelmäßig kontrolliert: Messungen fanden gleichzeitig mit dem Anfangs-CT, nach Ovariectomie, in der vierten und achten Behandlungswoche, sowie in der 11. Woche nach Durchführung der urodynamischen Studie, beim End-CT und nach 12 Wochen Behandlung direkt vor der Tötung statt.

Wasser- und Nahrungsaufnahme

Die tägliche Nahrungsaufnahme wurde berechnet, indem die für jeden Käfig (d.h. für die 5-6 Tiere/Käfig)

- Die Futtermittelaufnahme 2x/Woche
- Die Wasseraufnahme 3x/Woche kontrolliert wurde.

Die Futtermittelaufnahme ist also nicht das Mittel eines jeden Tieres, sondern berechnet in Bezug auf die Tieranzahl. Nach der Ovariectomie und dem Beginn des Versuchs stabilisierte sich die Futtermittelaufnahme durchschnittlich nach drei Wochen.

a) Phytoöstrogenversuch: Zum Ende des Experiments zeigte sich eine Abnahme der Nahrungsaufnahme, die mit der urodynamischen Studie, die in der elften Woche unter Isoflurane-Anästhesie durchgeführt wurde, in Verbindung gebracht wird (Christoffel 2004). Die Wasseraufnahme variierte ebenfalls. Während der 4.-11. Woche waren die Mengen jedoch relativ konstant, in den RES-Gruppen war die Wasseraufnahme gesteigert, gleichzeitig war das Futterverhalten nicht wesentlich verändert. Bei den Gruppen GEN, 8-PN und E2 zeigte sich eine deutliche dosisabhängige Abnahme der Futter- und Wasseraufnahme, im Vergleich zur Kontrollgruppe.

b) Xenobiotikaversuch: Die Futtermittelaufnahme war am niedrigsten in der Estradiolgruppe und nahm dosisabhängig in allen Gruppen, außer den Proc-Gruppen, ab. Die Wasseraufnahme war in den Proc und LIN-Gruppen gesteigert.

Computer Tomographie (CT)

Es wurde vor Beginn der Experimente, in der vierten und achten Woche, sowie zum Ende der Experimente ein CT durchgeführt. Diese Untersuchung wurde zur Bestimmung der Knochendichte und anderer geometrischer Parameter genutzt. Hierfür wurden die Tiere mit Hilfe von Isoflurane (Forene®, Abbott) narkotisiert.

Urodynamische Studie

In der 11. Woche wurden, unter Isoflavon- Anästhesie, urodynamische Parameter untersucht.

Vaginales Sekret

Während der Narkose für die CT-Untersuchung (12. Behandlungswoche) wurden mit Hilfe von Wattestäbchen Proben des vaginalen Sekrets entnommen.

2.4.3. Bestimmung der Serumlevel der Schilddrüsenhormone

Die Serumkonzentrationen von TSH, T4 und T3 wurden bei beiden Versuchen mit Hilfe von Radioimmunassays (RIA) von unseren Kooperationspartnern bestimmt.

TSH wurde mit Hilfe von einem spezifischen RIA, etabliert im Göttinger Labor, gemessen, für den die Gebrauchssubstanzen (Referenzsubstanzen für die Standardkurve, Iodierungsbedarf und Antiserum) vom National Hormone and Pituitary Program der NIH bezogen wurden. Für die Bestimmung der TT3 und TT4 Menge wurden kommerzielle Kits, entsprechend den Instruktionen des Herstellers, der Firma Sinsheim, Deutschland, verwendet (Active TMT3/ Active TMT4). Das fT3 und fT4 wurde mit RIAZENcoFT3 und RIAZENcoFT4 von ZenTech (Angleur, Belgien) analysiert.

2.5. Vorbereitung der Proben

2.5.1. Probenaufarbeitung für enzymatische Versuche

Die Lagerung der Proben erfolgte bei minus 80°C, während der Pulverisierung und Homogenisierung wurden sie mit flüssigem Stickstoff kühl gehalten. Die Pulverisierung der Proben erfolgte mit Hilfe eines Dismembrators (Braun, Melsungen).

Weiterverarbeitung für den Deiodase-Assay und den GPx-Assay:

Das Gewebepulver wurde in 500µl Homogenisationspuffer mit 1 mM Dithiothreitol (DTT, Kofaktor im Deiodase-Assay) auf Eis gelöst, mit einem Glashomogenisator homogenisiert und anschließend mit einem Ultraschallgerät (LaBsonic ®M; Braun, Melsungen) beschallt. Die Zelltrümmer wurden mit 10.000 rpm bei 4 °C für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -20°C gelagert und diente der Bestimmung der Glutathionperoxidase-Aktivität. Das entstandene Pellet wurde erneut mit Homogenisationspuffer suspendiert, sonifiziert, wodurch die restlichen intakten Zellmembranen aufgebrochen wurden und die membranständige DIO 1 ausgelöst wurde. Anschließend wurde die Proteinkonzentration mit Hilfe der Methode nach Bradford bestimmt. Die aufgearbeiteten Homogenate wurden bei -80°C aufbewahrt.

- Homogenisationspuffer: 250 mM Saccharose, 20 mM HEPES, 1mM EDTA, 1mM Dithiothreitol (DTT, vor Versuchsbeginn frisch zugegeben); pH 7,4.

Weiterverarbeitung für den Malatenzym-Assay:

Nach Suspension des Gewebepulvers in 300 µl S-Tris-EDTA-Puffer, wurde der Überstand, nach Zentrifugation, aliquotiert und für den Assay verwendet. Auch hier wurde zunächst eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford durchgeführt.

- S- Tris- EDTA-Puffer: 0,25 M Saccherose, 50,00 mM Tris-HCl, pH 7,4 + 0,10 mM EDTA.

2.5.2. Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in der Zellhomogenaten wurden Bio-Rad-Proteinassays verwendet (Bradford, 1976).

Es wurden jeweils 15 μ l aus der 1:10 Verdünnung des Zellhomogenats verwendet, mit 1ml Bio-Rad Lösung (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) vermischt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Kontrolle diente eine Verdünnungsreihe mit bovinem IgG-Standard (Bio-Rad, München) definierter Konzentration von 2,0 μ l, 5,0 μ l, 10,0 μ l, 20,0 μ l, 30,0 μ l, die auch jeweils mit 1 ml Bio-Rad Lösung gemischt wurden. Die photometrische Messung wurde mit einem Eppendorf- Photometer bei der Wellenlänge 595 nm durchgeführt. Die Berechnungen der Proteinkonzentration und die enzymatische Bestimmungen der GPx- und ME- Aktivität erfolgten anhand der Lambert-Beer'schen Formel.

2.5.3. Probenaufarbeitung für molekularbiologische Versuche

Die RNA-Extraktion fand in Kooperationslabor in Göttingen statt.

Aufgrund der Instabilität von RNA in Lösung wurden besondere Vorsichtsmaßnahmen beim Umgang mit RNA getroffen. Es wurde mit Dimethylpyrocarbonat (Roth) behandeltes Wasser zum Ansetzen der Lösungen benutzt. Dazu wurde 1 ml Dimethylpyrocarbonat auf 1 l H_2O_{bidest} gegeben, für 4 h inkubiert und autoklaviert.

Konzentrationsbestimmung

Die RNA-Konzentration jeder Probe wurde photometrisch in einer 1:100 Verdünnung mit DEPC- Wasser bestimmt. Die Extinktion bei 260 nm wurde in Quarzküvetten (Suprasil, Hellma, Müllheim) in einem Biophotometer gemessen. Eine OD_{260} von 1 entspricht, bei einer Schichtdicke von 1 cm, einer RNA-Konzentration von ca. 40 μ g/ml. Da organische Verunreinigungen wie z.B. Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, kann durch den Quotienten OD_{260nm} zu OD_{280nm} der Grad der Verunreinigung durch Aminosäuren bestimmt werden. Bei einem Quotienten von 1,8 bis 2 kann die RNA als rein angesehen werden (Sambrook et al. 1989). Anschließend wurde der RNA-Gehalt berechnet.

2.6. Enzymatische Versuche

2.6.1. Deiodase-Assay

Die Aktivität der Deiodaseisoenzyme wird durch einen Test bestimmt, der die enzymatische Freisetzung von $^{125}\text{I}^-$ aus radioaktiv markiertem Substrat beruht (Leonard et al. 1980). Als Substrat für die in der Zellhomogenaten nachzuweisenden Enzyme wurde radioaktiv markiertes 3,3',5'-[^{125}I]-reverses T3 (PerkinElmer, MA, U.S.) verwendet.

Durchführung des Deiodase-Assays

Um die, möglicherweise während der Lagerung, spontan angefallenen Abfallprodukte und gespaltenes Jod zu entfernen, wurde der Tracer vor jeder Messung durch Absorptionschromatographie gereinigt. Dies erfolgte mit Hilfe von Sephadex-LH20-Säule (Sigma-Aldrich, München): Die Säule wurde mit einem Filter (Filter MoBiTec, 10 μm Pore) vorbereitet. In diesen Filter wurden 600 μl Sephadex gegeben und mit 3 ml 0,1 N HCl (Firma Merck, Darmstadt) gespült. Die benötigte Menge Tracer, berechnet nach Probenmenge und Aktivität, wurde direkt auf die Säule gegeben und sukzessiv wurde mit 3,0 ml 0,1 N HCl und 3,0 ml ddH₂O gewaschen. Die angestrebte Aktivität des Substratmixes sollte bei 1000 cpm/ μl liegen. Anschließend wurde der Tracer mit 1 ml einer Ethanol-NH₃-Lösung, im Verhältnis 49:1, in ein Glasröhrchen eluiert, durch Zentrifugation (10.000 rpm über 5 min, 4°C, Hereaus Cryofuge 5000) wurde dieser Vorgang beschleunigt. Der Tracer wurde in einem auf 70°C vorgeheizten Wasserbad unter leichter Stickstoffzufuhr eingedampft.

Entsprechend der Probenanzahl wurde der Substratmix hergestellt:

- x 10 μl 1M KPO₄-Puffer + 10 mM EDTA, pH 6,8
- x 2,0 μl 1 M DTT
- x 0,41 μl 40 mM NaOH
- x 1,00 μl 0,1 mM rT3 (DuPont, Nemours, Belgien)
- x 36,59 μl ddH₂O.

Der eingedampfte Tracer und der Substratmix wurden zusammenpipettiert, anschließend wurden 50 μl in 2 ml 10% Essigsäure (Firma Merck) in einem γ -Counters (1277 Gammamaster, Turku, Finnland) über 10 min gemessen und auf die gewünschte Aktivität von 55.000 cpm/50 μl überprüft.

Das Endvolumen jeder Probe betrug 100 μl , es wurden immer Triplikate gemessen. 50 μl jeder Probe bestanden aus 10 μl H_2O oder 10 μl PTU (MP Biomedicals, Irvine, USA) und 40 μl der resuspendierten Membranpelletfraktion mit Proteinkonzentrationen von 25 μg des Lebergewebes, die vorgelegt wurden. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μl Tracer-Substratmix gestartet, und 60 Minuten lang bei 37°C inkubiert. 50 μl der Stopp-Lösung beendeten die Reaktion durch Abfangen der Iodthyronine bzw. Hemmung der DIO1-Aktivität. Dem Leerwert wurden erst nach Abstoppen der Reaktion 40 μl Homogenat zupipettiert. 400 μl eiskalter TCA führten zu einer Ausfällung der Proteine. Nach Zentrifugation bei 14.000 rpm für 5 Minuten konnten 480 μl des Überstandes abpipettiert werden und auf die Dowex 50 WX 2-Säulen (BioRad Laboratories, Hercules, CA) gegeben werden, die vorher zweimal mit jeweils 2 ml 10%iger Essigsäure gewaschen wurden. Das freie ^{125}I -Iod wurde jetzt mit 2 ml 10%iger Essigsäure eluiert und mit Hilfe eines γ -Counters über 10 min gemessen.

- Tracer: spezifische Aktivität lag zwischen 27.8- 46.3 MBq/ μl ,
800 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$, PerkinElmer, MA, U.S..
- Stopp-Lösung: 1 g BSA
1 ml 0,1 M PTU-Lösung
auffüllen auf 10 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
- KPO_4 -Puffer A: 43,55 g K_2HPO_4
0,93 g EDTA-Na-Dihydrat
auffüllen auf 250 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
B: 34,03 g KH_2PO_4
0,93 g EDTA-Na-Dihydrat
auffüllen auf 250 ml mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$
Lösung A mit Lösung B titrieren auf pH 6,8

Um die spezifische Aktivität zu berechnen, muss der Wert bestimmt werden, der bei 100% Umsatz theoretisch erreicht werden könnte. Dazu wurden, wie oben beschrieben, 50 μl des Tracers-Substratmixes in 2 ml 10%iger Essigsäure ebenfalls im γ -Counter gezählt. Die Berechnung ergibt sich aus den gemessenen Aktivitäten wie folgt und ist in pmol/(min*mg Protein) angegeben.

Berechnung der spezifischen Enzym-Aktivität für DIO 1 und DIO 2:

$$\begin{array}{l} \text{Spez. Deiodase-} \\ \text{Aktivität} \\ \\ \text{[mol/mg/min]} \\ \text{(DIO 1 + DIO2)} \end{array} = \frac{2 * rT3[\text{nmol}] * 1000(\text{cpm}_{\text{frei}} - \text{cpm}_{\text{blind}})}{\text{Cpm}(100\%) * \text{Proteinmenge}[\text{mg}] * \text{Zeit}[\text{min}] * 480/550}$$

nmol rT3 = Stoffmenge an nicht-radioaktivem rT3 im Reaktionsansatz

cpm_{frei} = Mittelwert der im Triplikat gemessenen Probe

cpm_{blind} = Mittelwert der Kontrollen (niedrigerer Wert: entweder K 1-3 oder K 4-6)

min = Reaktionszeit = 60 min

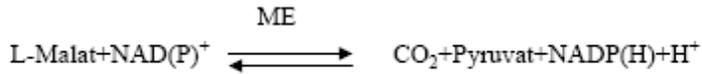
cpm100% = Mittelwert des Tracers

Erläuterungen zur Berechnung:

Aufgrund der freien Drehbarkeit von rT₃ um die Diphenylether-O-Cl'-Bindung wird bei der Reaktion mit gleicher Wahrscheinlichkeit sowohl nicht radioaktives Iodid als auch ¹²⁵I-freigesetzt, daher steht im Zähler der Faktor 2. Es werden nur 480µl von den 550µl des Überstandes über die Säule gereinigt, es muss auch dieser Faktor in der Formel berücksichtigt werden. In die Berechnung geht nur die Menge an kaltem rT₃, die dem Substratmix zugegeben wurde, da die Menge an radioaktiv markiertem rT₃, im Vergleich, verschwindend gering ist und daher vernachlässigt werden kann. Die spezifische Aktivität der ungehemmten Ansätze entspricht der Summe aus DIO 1 und DIO 2 Aktivität, die der gehemmten Ansätze der DIO 2-Aktivität. Erst durch die Differenzbildung der spezifischen Aktivitäten von ungehemmten und gehemmten Ansätzen erhält man die spezifische Aktivität der DIO 1.

2.6.2. Malatenzym-Assay

Die Malatenzymaktivität wird nach der Methode von Ochoa (1955) bestimmt. Die Reaktion läuft in 2 Teilschritten ab, wobei die Aktivitätsbestimmung über die erste Teilreaktion erfolgt:



Die frühe Reduktionsrate von NADP^+ zu NADPH im Beisein des ME, zweiwertigen Mangans und eines L-Malatüberschusses, ist bis zu einem bestimmten Grad proportional der Enzymkonzentration. Mit einem Photometer kann bei der Wellenlänge 340 nm die Bildung von reduziertem NADPH verfolgt werden.

Durchführung des Malatenzym-Assays

Die Proteinbestimmung nach Bradford (2.5.2.) ermöglichte die Verwendung definierter Proteinkonzentrationen (Leber: 500 μg Protein; Niere von 450 μg Protein).

Die Malatenzymaktivität wurde bestimmt bei Raumtemperatur, nach Zusatz des Substratmixes. Mit aqua bidest wurde der Proben-Substratmix-Mix jeweils auf 1000 μl aufgefüllt. Jede Probe wurde als Triplikat gemessen, die Veränderung der Absorption bei 340 nm Wellenlänge wurde im Spektralphotometer (U-2100 Hitachi) über 10 min gemessen.

- Substratmix/Probe: 67 mmol/L Triethanolamine (pH 7.4), 4 mmol/L, MnCl_2 , 1.5mmol/L, L-Malat and 680 mol/L NADP^+ /Probe

Berechnung der Malatenzymaktivität

Die ME-Aktivität wird dargestellt als Menge NADPH in nmol, das in Abhängigkeit von Proteinkonzentration und Zeit entsteht.

$$\Delta c = \frac{\Delta E_{340} [\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}] * V_{\text{Ansatz}} [\text{ml}]}{\epsilon_{340} [\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}] * d [\text{cm}] * m \text{ Protein} [\text{mg}]}$$

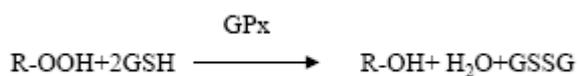
[mol NADPH*
min⁻¹*mg⁻¹]

ΔE_{340} : Extinktionsänderung pro min bei 340 nm
d: Küvettendurchmesser (1 cm)

2.6.3. Glutathionperoxidase (GPx)-Assay

Mit Hilfe eines gekoppelten enzymatischen Tests nach Flohé kann die Aktivität der Glutathionperoxidase bestimmt werden (Flohé et al.1984).

Die GPx ist in der Lage, ein Hydroperoxid (R-OOH; R= organischer bzw. anorganischer Rest) zum analogen Alkohol (R-OH) und Wasser (H₂O) zu reduzieren, wobei Glutathion (GSH) zu Glutathiondisulfid (GSSG) oxidiert wird.



Die Glutathion-Reduktase (GR) ist daraufhin in der Lage, das gebildete GSSG unter Oxidation von NADPH-H⁺ zu NADP⁺ wieder zu regenerieren.



Diese Oxidation kann mit Hilfe eines Spektralphotometers bei 340 nm Wellenlänge verfolgt werden und entspricht der umgesetzten Substratstoffmenge durch die Glutathionperoxidasen.

Durchführung des GPx-Assay

Für diesen Assay wurde der zytosolische Überstand, der überwiegend lösliche Proteine enthält, aus der Probenaufarbeitung des Deiodase-Assays verwendet. Die Proben und der Reaktionsmix wurden die ganze Zeit auf Eis gehalten. Bei jeder Probe wurde zunächst eine Proteinbestimmung analog zu 2.5.2. durchgeführt.

Die Enzymaktivität wurde bei Raumtemperatur in einem Puffer aus 0,2 M Tris (Firma Merck); 1 mM EDTA (Roth); 4,6 mM GSH (Sigma-Aldrich, München); 0,33 mg/ml NADPH+H⁺ (Roche Diagnostik GmbH, Mannheim) und 2 U/ml GR (Calbiochem, Darmstadt) bestimmt. Zunächst wurden 500 µl Puffer vorgelegt, das optimierte Volumen an Zellhomogenat (mit 20µg Leberprotein) zugegeben und mit ddH₂O auf 1000 ml aufgefüllt. Nach dreiminütiger Inkubation bei RT wurde durch die Zugabe des Substrates Tertiär-Butylhydroperoxid (Endkonzentration: 1 mM, Firma Merck) die Reaktion gestartet und über 3 min die Extinktionsveränderung bei 340 nm gemessen. Zur Bestimmung der unspezifischen

Oxidation von NADPH+H⁺ wurde die GPx Aktivität durch Zugabe von Mercaptosuccinat (Endkonzentration: 10 mM) inhibiert und anschließend dieser Wert von den ermittelten Aktivitätswerten subtrahiert.

Berechnung der spezifischen Aktivität der GPx:

Unter Verwendung des molaren Extinktionskoeffizienten lässt sich die GPx Aktivität (ϵ von NADPH+H⁺ $\epsilon = 6200 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) nach folgender Gleichung errechnen und wurde in nmol/(min*mg Protein) für Gewebe angegeben:

$$\text{GPx} = \frac{\Delta E_{340}/\text{min} * V_{\text{Ansatz}}}{[\text{nmol}/(\text{min}^{-1} * \text{mg}^{-1})] \quad \epsilon_{340}[\text{M}^{-1} * \text{cm}^{-1}] * d [\text{cm}] * \text{Protein} [\text{mg}]}$$

$V_{\text{Ansatz}} =$ Gesamtvolumen (1 ml= 1 cm³)
 $\Delta E_{340} =$ Extinktionsänderung pro min bei 340 nm Wellenlänge
 $d =$ Küvettendurchmesser (1cm)

2.7. Molekularbiologische Methoden

2.7.1. Real Time-PCR (rt-PCR)

Einen Durchbruch in der Gentechnik stellte das 1984 von Kary Mullis entwickelte Verfahren der PCR-Methode (Polymerase Chain Reaktion) dar, 1993 erhielt er dafür einen Nobelpreis. Kleinste Mengen von DNA bzw. RNA können in mehreren Reaktionsschritten amplifiziert, charakterisiert und quantifiziert werden.

Die sog. real-time-PCR ist das weiterentwickelte schnellere und vollautomatisierte Verfahren, das zur Quantifizierung des mRNA-Expressionsniveau entwickelt wurde. In einem geschlossenen System werden in einem Schritt Amplifikation, PCR-Produkt-Detektion und -Quantifizierung kombiniert, ohne dass weitere Arbeitsschritte nach der PCR erforderlich sind (Higuchi et al. 1993; Gibson et al. 1996; Heid et al. 1996). Die Methode erlaubt die direkte Detektion der PCR-Produkt-Akkumulation während der log-linearen Phase der Reaktion über Fluoreszenzfarbstoffe oder Fluoreszenzfarbstoff-markierte Sonden. Diese binden in

bestimmten Schritten des PCR-Zyklus an die Ziel-DNA. Das Signal der durch eine Lichtquelle angeregten Fluoreszenzfarbstoffe korreliert dabei quantitativ mit der Menge an PCR-Produkt und kann über eine Software in Echtzeit (real-time) dargestellt werden. Verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe und Sonden können zum Einsatz kommen: SYBR Green I ist ein nicht-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff und bindet generell an jede DNA (Morrison et al. 1998). Bei TaqMan-Sonden (Holland et al. 1991) und Hybridisierungs-Sonden (Wittwer et al. 1997b) handelt es sich hingegen um sequenzspezifische Oligonukleotide, die mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind.

2.7.2. Denaturierendes Gel zur Qualitätskontrolle der RNA

Zur Kontrolle der Unversehrtheit der RNA wurden Formaldehydgele (1,9 g Agarose, 90 ml aqua dest., 12,5 ml MOPS(10*) und 10,5ml Formaldehydlösung (32%-ig) und 2,5µl Ethidiumbromid) gegossen.

Ein Mastermix (3 Teile Probenpuffer und 1 Teil Blue Juice) mit gleichem Volumenanteil wie die RNA-Proben wurde angesetzt und vorgelegt, dann jeweils 2µl RNA in die Geltasche pipettiert. Die Inkubationszeit betrug 2 Minuten bei 60°. Das Gel lief für 3 Stunden bei 80V.

Unter UV-Licht waren bei allen Proben zwei Banden zu erkennen: Diese entsprachen den beiden Untereinheiten der RNA: 18S und 28S. Die RNA war also nicht beschädigt und konnte weiterverwendet werden.

- Blue juice, Farbpuffer: 20 ml Glycerol; 20 ml H₂O; 0,1 ml EDTA; 0,5 M Bromphenolblau.
- RNA Probenpuffer: 250 µl 10x MOPS, 1125 µl Formamid, 425 µl Formaldehyd.

2.7.3. Reverse Transkription

Als reverse Transkription bezeichnet man die Übersetzung einer RNA-Sequenz in cDNA mit komplementärer Basensequenz, die als Vorlage für die anschließende rt-PCR dient. Es wurde ein Mastermix hergestellt, bestehend aus 1 µl iScript Reverse Transcriptase und 4 µl des

5**i*Script Reaction Mix, beides Produkte der Firma Bio-Rad (München). Das Gesamtvolumen des Ansatzes betrug 20 µl, für diesen Versuch wurden also 5 µl Mastermix und 1 µg RNA auf DEPC-Wasser aufgefüllt. Die reverse Transkription erfolgte mit Hilfe eines Thermocyclers (MWG Biotech, Primus 25) bei folgendem Programm: 5 min bei 25° C, 30 min bei 42° C, 5 min bei 85° C und ∞ min bei 4° C.

Aus der cDNA wurde direkt nach Fertigstellung eine 1:3 und 1: 9 Verdünnung hergestellt, die beide bei -20°C aufbewahrt wurden.

2.7.4. TaqMan®-rtPCR-Assay

Zusätzlich zu den beiden Primern befindet sich bei der TaqMan™-Real Time-PCR eine sequenzspezifische Sonde im Ansatz, die an die zu amplifizierende DNA zwischen den beiden Primern bindet. Diese Sonde ist am 5' Ende mit einem fluoreszierenden Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorescein, FAM) markiert und am 3' Ende mit einem Quencherfarbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rodamin, TAMRA). (TaqMan™-Prinzip) (Cardullo et al. 1988; Livak et al. 1995). Wenn der Reporterfarbstoff durch Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt wird, strahlt er Licht einer anderen Wellenlänge ab, welches wiederum von einem räumlich benachbarten Quencherfarbstoff-Molekül aufgenommen werden kann. Durch die räumliche Nähe des Reporterfarbstoffes zum Quencherfarbstoff wird eine Fluoreszenz-Emission zunächst unterdrückt. Trifft die TaqMan-Polymerase bei der Amplifikation auf die DNA-gebundene Sonde, wird diese aufgrund der 5'-3'-Exonucleaseaktivität (Holland et al. 1991) abgebaut. Jetzt ist die „fluorescence resonance emission transfer“ (FRET) zwischen Reporter und Quencher unterbrochen und der Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt. Er kann Licht emittieren, welches wiederum gemessen werden kann. Entsprechend der PCR-Methode wird der Vorgang von Denaturierung durch schnelle Erwärmung, Hybridisierung und Polymerisation vielfach wiederholt. Die Zunahme des Fluoreszenzsignals des Reporterfarbstoffes ist proportional der DNA-Konzentrationszunahme und ermöglicht die Berechnung der Ausgangskonzentration.

Der 25 µl Gesamtreaktionsansatz pro Probe bestand aus 12,5 µl iQ™ Supermix, 5 µl einer cDNA (1:9 Verhältnis) und 20 nmol der jeweiligen vorwärts (F) und rückwärts (R) Primer (Tab.9). Die rt-PCR wurde im 96 Wellformat als Duplikatmessung mit Hilfe des i-Cyclers (BioRad Laboratories, Hercules, CA, USA.) unter folgender Programmierung durchgeführt: Taq Aktivierung und cDNA Denaturierung 15 min bei 95° C, 40 Zyklen: 95° C für 3 s, 56° C

für 45 s und 72° C für 30 s. Die verwendeten Produkte stammen von der Firma Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)

Tabelle 9: Sequenzen von Primern und Sonden, die verwendet wurden

Gen	Sequenzen der <i>forward</i> (F) und <i>reverse</i> (R)Primer	Sequenz der Sonde
rDIO 1	F: 5'- TTT AAG AAC AAC GTG GAC ATC AGG- 3' R: 5'- GGT TTA CCC TTG TAG CAG ATC CT- 3'	5'- AGC ACC GAA GCC TCC AGG ACC GC -3'
rMalatenzym	F: 5'- ATC CAC AAC AGT GTC TAC CCA TC- 3' R: 5'- AAA CGC ATC ATA TTC AGG GCC T - 3'	5'- TCA CTC GAA CT GCC GCA GCC- 3'
rHPRT	F: 5'- TTA TGG ACA GGA CTG AAA GAC TTG- 3' R: 5'- CAG CAG GTC AGC AAA GAA CTT ATA-3'	5'- CCT TCA GCA CAC AGA GGG CCA CAA- 3'

Dabei wurden immer cDNA Proben mit definierter cDNA-Konzentration als Duplikate mitgeführt, so dass eine Standardkurve entwickelt werden konnte. Außerdem wurde immer eine negativ-Kontrolle mit RNase freiem Wasser (DEPC) gemessen, um eine Verunreinigung auszuschließen. Die jeweiligen Transkript Konzentrationen wurden auf das „Housekeeping“-Gen rHPRT normalisiert. Vor der Messung wurden die Platten mit Klebefolien (iCycler iQ™, Optical Tape) verschlossen.

2.8. Statistik

Bei den enzymatischen Versuchen wurden die Werte sowohl in den Grafiken als auch im Text als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) angegeben. Zunächst wurden die Daten auf Normalverteilung getestet. Alle Messwerte wurden mit SYSTAT 10® (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA) ausgewertet. Die Signifikanzermittlung erfolgte mittels Varianzanalyse (ANOVA) bei Normalverteilung mit anschließenden Bonferroni's post-hoc Test. Als nicht-parametrische Tests wurden der Kruskal-Wallis-Test und der Man-Whitney-U-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant wurden Werte mit einem p-Wert kleiner 0,05

bezeichnet ($p < 0,05^*$ vs. CON). Bei den molekularbiologischen Versuchen erfolgte die statistische Auswertung mittels des REST (relative expression software tool)(Pfaffl et al. 2002a).

3. Ergebnisse

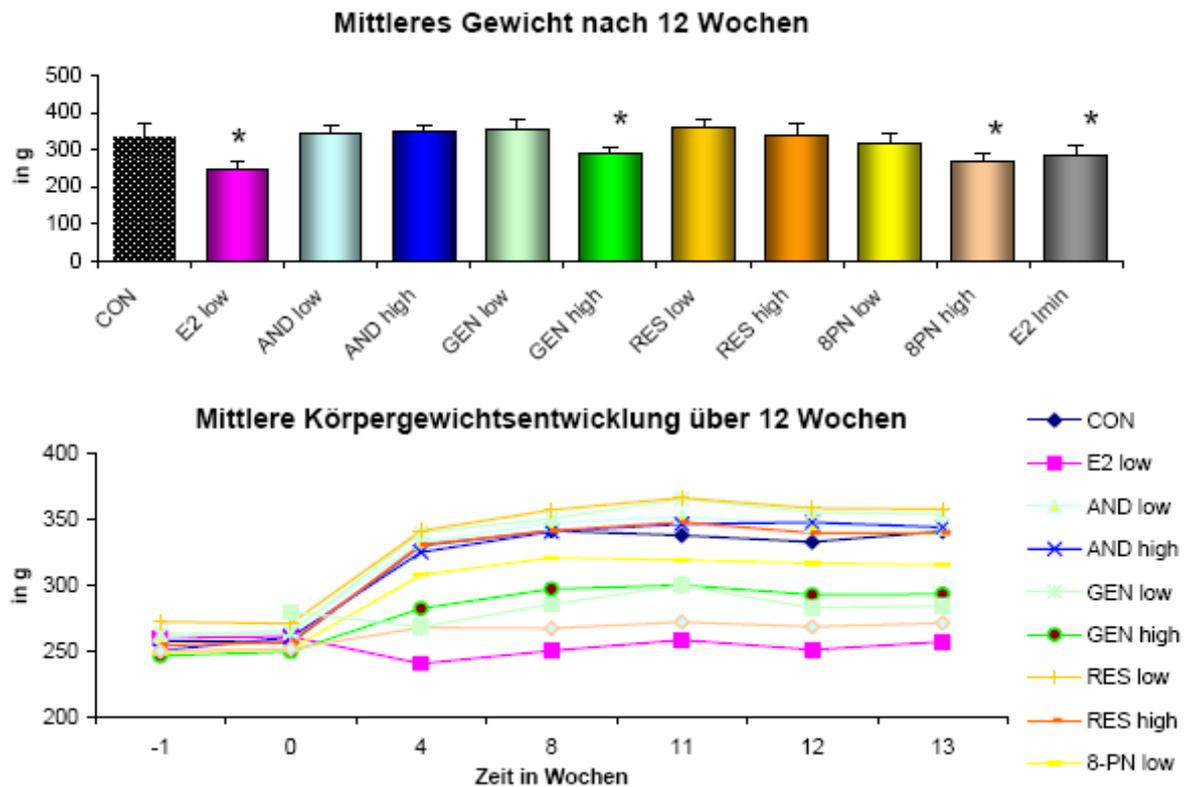
Im Folgenden sind die Veränderungen des Gewichts, der Serumkonzentration der Schilddrüsenhormone, des Deiodase-Assays, des Malatenzym-Assays, des Glutathionperoxidase-Assays und der rt-PCRs aufgeführt.

In allen Grafiken, sind auf der X-Achse die Versuchsgruppen und auf der Y-Achse die gemessene Variable dargestellt. Die Säulenhöhe entspricht dem arithmetischen Mittelwerte einer jeden Gruppe. Der Fehlerbalken entspricht der Standardabweichung. Als signifikant (*) wurden Mittelwertabweichungen $p < 0,05$ im Vergleich zur Kontrollgruppe gekennzeichnet.

3.1. Phytoöstrogenversuch

3.1.1. Körpergewichtsentwicklung

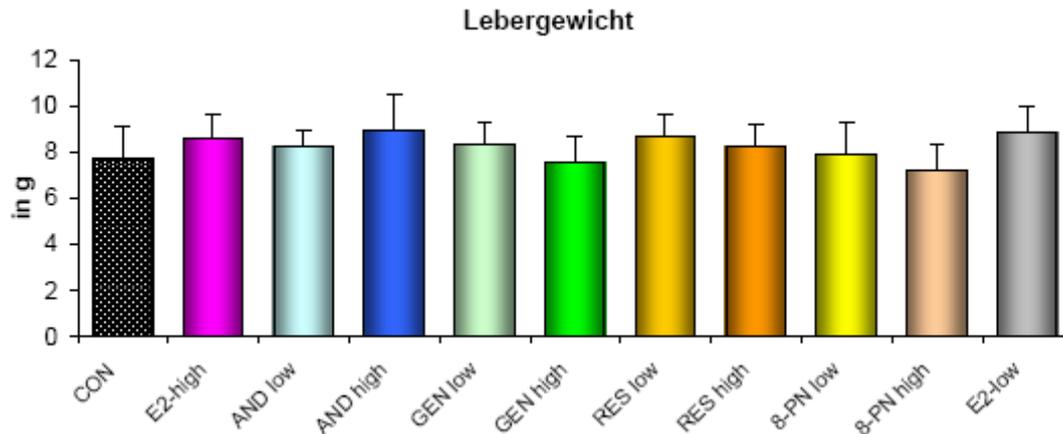
Das Körpergewicht eines jeden Tieres wurde von den Betreuern des Göttinger Kooperationspartners regelmäßig während der 3 Monate kontrolliert. Zum Ende der Behandlung war das Gewicht der Tiere aus den Gruppen E2B high, GEN high und 8-PN high signifikant ($*p < 0,05$ vs. CON) erniedrigt. Dieses verringerte Gewicht korreliert mit der beschriebenen verminderten Futteraufnahme dieser Tiere. Allen Gruppen gemeinsam war eine verminderte Nahrungsaufnahme und damit eine verminderte Körpergewichtszunahme in der letzten Woche.



Grafik 2: a) Körpergewicht nach 12 Wochen Behandlung mit Testsubstanzen; (* $p < 0,05$ vs. CON ovx) und
b) Mittlere Körpergewichtsentwicklung über 13 Wochen

3.1.2. Lebergewicht

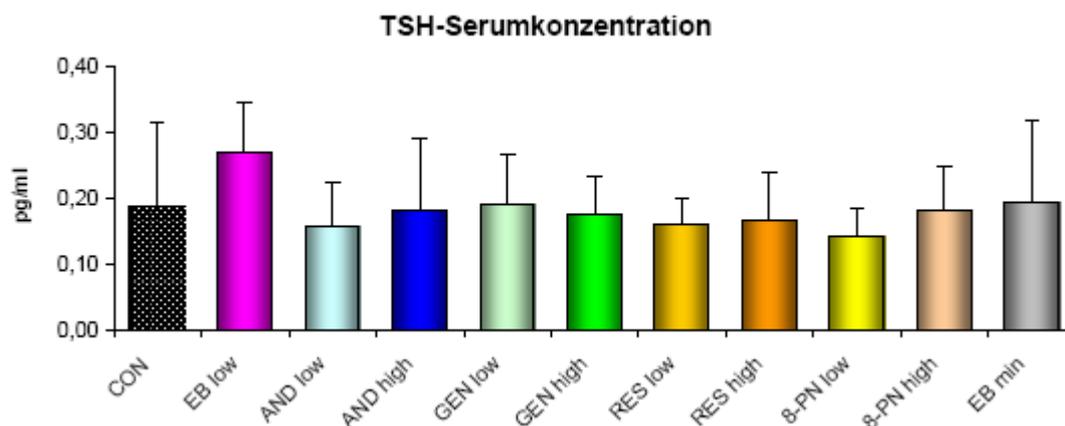
Das Lebergewicht zeigt in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung. Ein leichter Anstieg konnte in den Gruppen AND high, RES low und RES high, sowie in der E2-low Gruppe nachgewiesen werden.



Grafik 3: Mittleres Lebergewicht in g, post mortem. (* $p < 0,05$ vs. CON ovx).

3.1.3. Schilddrüsenhormonkonzentration

Nach der 12-wöchigen Behandlung zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der TSH-Konzentrationen im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Ein nicht-signifikanter Anstieg der TSH-Konzentration war nur in der Gruppe E2 low zu vermerken. Die TSH-Konzentration unter 8-PN war am stärksten reduziert. Unter AND, RES und 8-PN sind die TSH-Konzentrationen bei den Tieren, die mit der niedrigen Konzentration behandelt wurden geringer, als bei den Tieren, mit der höheren Behandlungsdosis. Nur bei GEN wiesen die Tiere der GEN low Gruppe einen höheren TSH-Wert aus, als die Tiere der GEN high Gruppe.

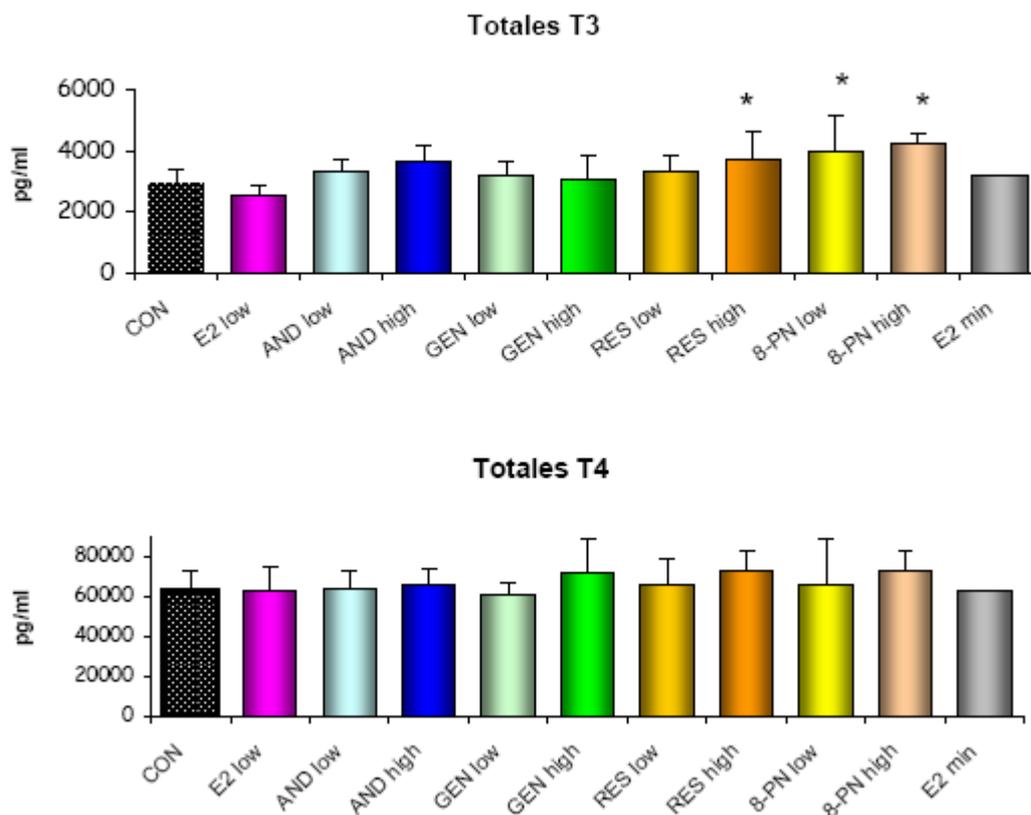


Grafik 4: Mittlere Serumkonzentration von TSH (* $p < 0,05$ vs. CON ovx) nach 12-wöchiger Behandlung

Die TT3 Serumkonzentrationen zeigten in manchen Gruppen nach 12-wöchiger Behandlung signifikante Veränderungen. Unter RES high, sowie unter 8-PN low und high war das TT3-Niveau signifikant erhöht. Verringert war das TT3 nur unter E2 low-Behandlung.

Die TT4-Konzentrationen zeigten keine signifikanten Veränderungen: Ein leichter Anstieg konnte unter GEN high, RES high und 8-PN high gemessen werden, während die niedrigen Konzentrationen der jeweiligen Gruppe eher eine Abnahme des TT4 zeigten, im Sinne einer nicht-kontinuierlichen Dosis-Wirkungsbeziehung, Auch unter E2 min waren die TT4 Werte verringert im Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter AND waren die Veränderungen insgesamt gering, das TT3 war unter beiden Konzentrationen erhöht.

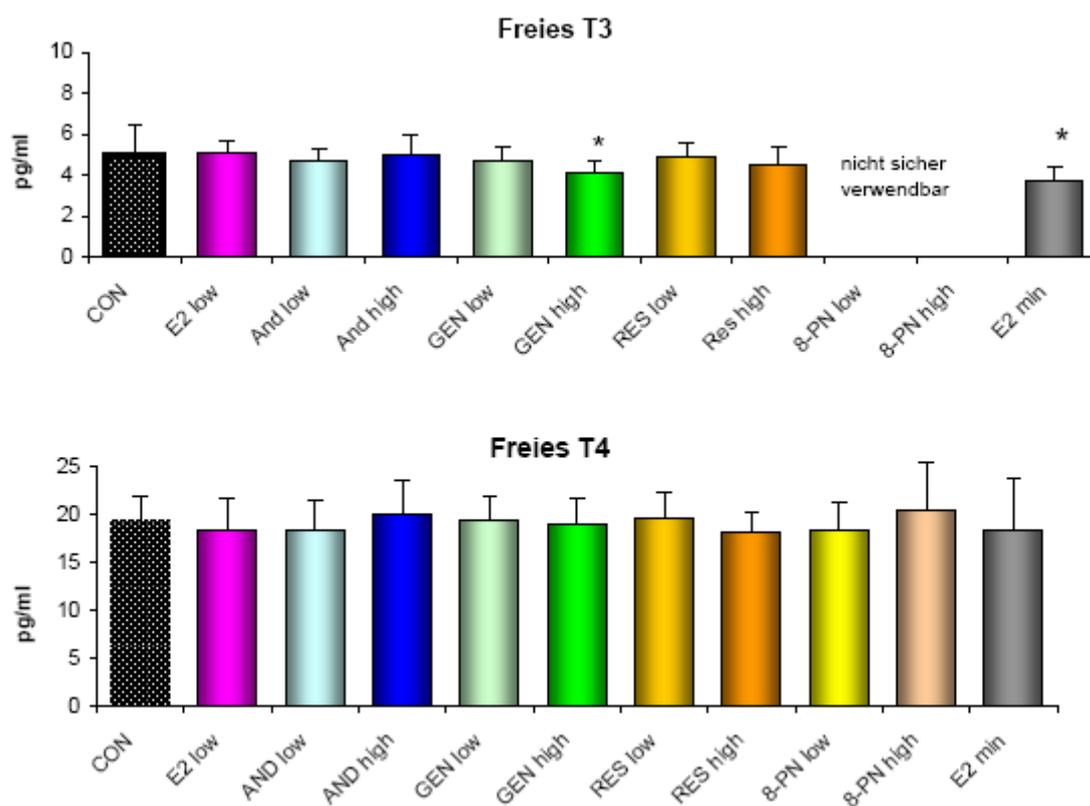
Unter RES high und 8-PN high waren also TT4 und TT3 erhöht, unter GEN high war nur eine Erhöhung von TT4 ohne Veränderung der TT3 Konzentration zu messen.



Grafik 5: Mittlere Serumkonzentration von TT3 und TT4 nach 12 Wochen Behandlung (* $p < 0,05$ vs. CON ovx).

Beim fT4 gab es ebenfalls keine signifikanten (* $p < 0,05$ vs. CON ovx)Veränderungen, wie in Grafik 6 dargestellt. Ein leichter Anstieg konnte unter RES low und 8-PN high verzeichnet werden. Hingegen waren die Serumkonzentrationen vom fT3 unter GEN high und E2 min signifikant verringert. Einen Anstieg von fT3 gab es gar nicht.

Insgesamt veränderte E2 min die Schilddrüsenhormonkonzentration deutlich im Gegensatz zu E2 low: Unter E2 min nahm die Konzentration von fT3 (signifikant) und TT3 ab, ein TT4-Anstieg konnte gleichzeitig gemessen werden. Die Behandlung mit GEN high führte ebenfalls zu signifikant reduzierten fT3 Mengen, messbare TSH, TT4 und fT4-Veränderung gab es nicht. GEN low bewirkte keine Veränderungen. RES high und beide Testkonzentrationen von 8-PN führten hingegen zu einem signifikanten Anstieg des totalen T3 Spiegels im Serum, alle anderen Hormone waren unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Grafik 6: Mittlere Serumkonzentration von fT3 und fT4 nach 12 Wochen Behandlung (* $p < 0,05$ vs. CON ovx).

Folgend befindet sich eine Übersicht über die Schilddrüsenhormonveränderungen im Serum (10 Tabelle).

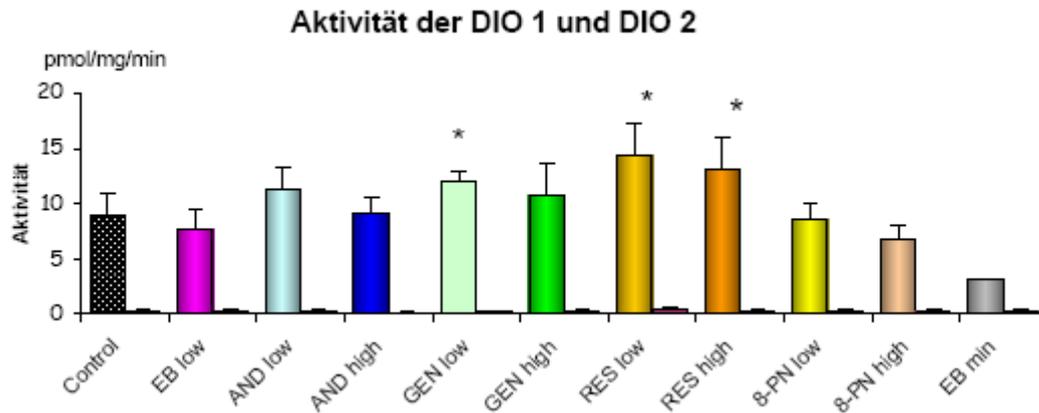
	TSH	ft3	ft4	TT3	TT4
CON					
E2 min E2 low	▲	↓*		▼	▲
AND low AND high		▲			
GEN low GEN high		↓*			▲
RES low RES high				▲*	▲
8-PN low 8-PN high				▲* ▲*	▲

Tabelle 10: Übersicht über Einfluss der Testsubstanzen auf die HPT-Achse im Vergleich zur Kontrollgruppe. Signifikante Veränderungen sind als Pfeile mit Sternchen dargestellt; nicht-signifikante Veränderungen (Trend) als Pfeilköpfe.

3.1.4. Deiodase-Assay

Auf der x-Achse der Grafik 7 sind, wie oben beschrieben, die einzelnen Versuchsgruppen aufgetragen, wobei von jeder Substanz die Aktivität der DIO 1 (1.Säule) und die der DIO 2 (2.Säule) nebeneinander dargestellt sind. Auf der y-Achse ist die Aktivität der beiden Deiodasen in pmol/mg/min dargestellt, d.h. die Freisetzung von markiertem I¹²⁵ an 5' Position. Die basale DIO 1 Aktivität der Kontrollgruppe lag bei 8,9 pmol I¹²⁵ freigesetzt pro mg Protein und pro Minute.

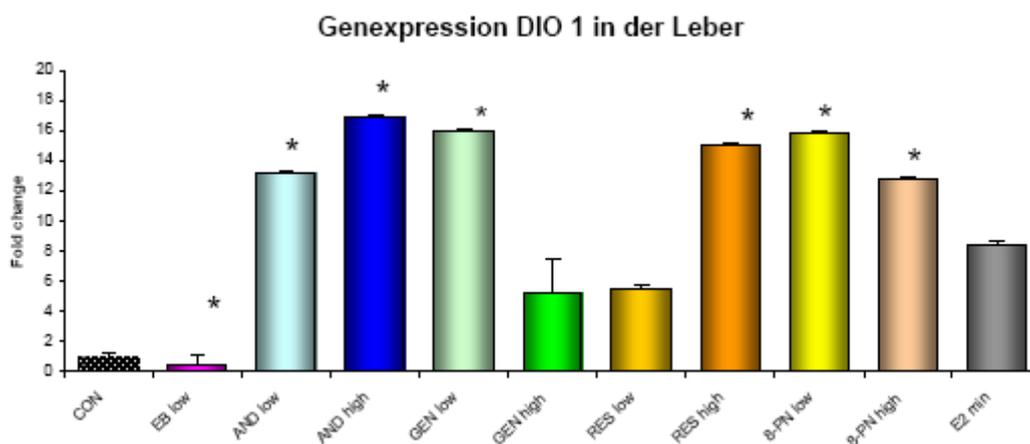
Im Vergleich zur Kontrollgruppe war die DIO 1-Aktivität nach Fütterung mit GEN low und RES in beiden Konzentrationen, signifikant erhöht ist. Unter GEN low und RES low lag der Unterschied bei ca. 0,25facher- und unter RES high bei 0,3facher Aktivitätszunahme. Nach Fütterung mit 8-PN und E2 min und low konnte eine verringerte Aktivität der DIO 1 gemessen werden. Die Aktivität ist bei allen getesteten Substanzen in der niedrigen Konzentration höher, als bei den Tieren der Gruppe, die mit einer höheren Konzentration behandelt wurden.



Grafik 7: Aktivität der DIO 1 und DIO 2 nach 12 wöchiger Behandlung, (* $p < 0,05$ vs. CON ovx)

3.1.5. Genexpression der Deiodase 1 in der Leber

Mit Hilfe der rt-Genexpressionsanalyse wurde der Einfluss der ED auf das Expressionslevel der DIO 1 in der Leber untersucht. Unter den meisten gefütterten Substanzen, außer unter E2 low, bei dem sich eine Abnahme der mRNA Konzentration auf 1/3 zeigte, war eine gesteigerte mRNA-Konzentration der DIO 1 im Vergleich zur Kontrollgruppe zu messen. Diese Zunahme war in den Gruppen AND low, AND high, GEN low, RES high, 8-PN low und 8-PN high signifikant. Bei den Tieren der Gruppen AND high RES high und 8-PN low war die Expression ca. 15fach erhöht. Unter GEN und bei 8-PN hatte die niedrigere Dosis einen stärkeren Einfluss auf die Expression als die höhere Konzentration.

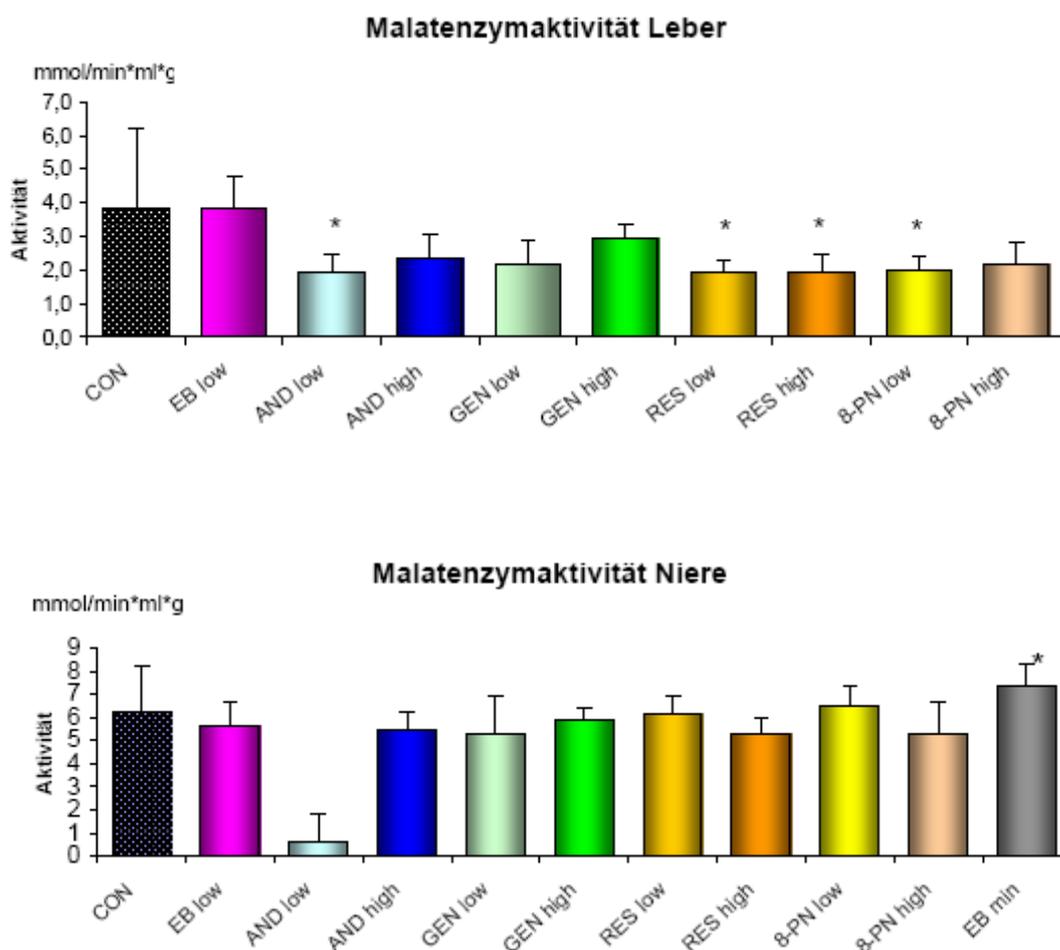


Grafik 8: Genexpression der DIO 1 in der Leber.

3.1.6. Malatenzym-Aktivität

Die Malatenzymaktivität wurde sowohl in der Leber, als auch in der Niere bestimmt. Die Malatenzymaktivität wird beschrieben über die Zunahme der Absorption bei 340 nm Wellenlänge und wird in mmol/min*g*ml angegeben. In der Leber ist die Aktivität des Malatenzyms in der Kontrollgruppe niedriger als in der Niere.

Hinsichtlich der ME-Aktivität in der Leber gab es mehrere signifikante Veränderungen, wobei es sich immer um eine Abnahme der Aktivität handelt: Unter AND low, RES low und high, sowie unter 8-PN war die Aktivität jeweils auf ungefähr die Hälfte reduziert. Eine nicht-signifikante Verminderung der Malatenzym Aktivität in der Niere konnte in den Gruppen AND, GEN und RES, gemessen werden. Eine Aktivitätszunahme konnte unter 8-PN low und EB min nachgewiesen werden, wobei er unter EB min signifikant war (* $p < 0,05$ vs. CON ovx).

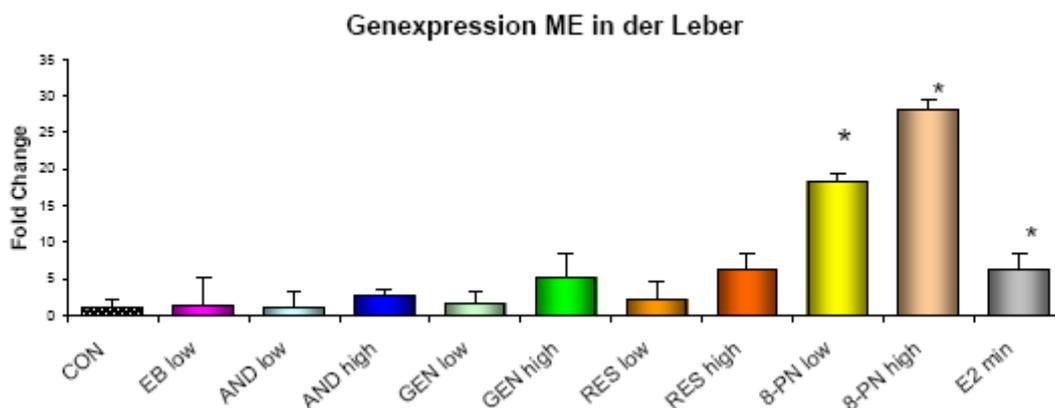


Grafik 9: Malatenzymaktivität in der Leber und der Niere nach 12-wöchiger Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe. (* $p < 0,05$ vs. CON ovx)

3.1.7. Genexpression des Malatenzyms in der Leber

Mit Hilfe der rt-PCR wurde der Status der Malatenzymaktivität auf der Ebene der mRNA untersucht. Zudem wurde der Einfluss der Testsubstanz auf die Expression von Markergenen untersucht.

Die mRNA Konzentration zeigt unter E2 low, AND low, AND high, GEN low, GEN high keine ausgeprägten Veränderungen. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe konnten lediglich unter 8-PN low, 8-PN high und E2 min signifikante Erhöhungen der mRNA Konzentration gemessen werden. In den Gruppen AND, GEN, RES und 8-PN war jeweils in der höheren Konzentration eine erhöhte mRNA-Konzentration gemessen werden.



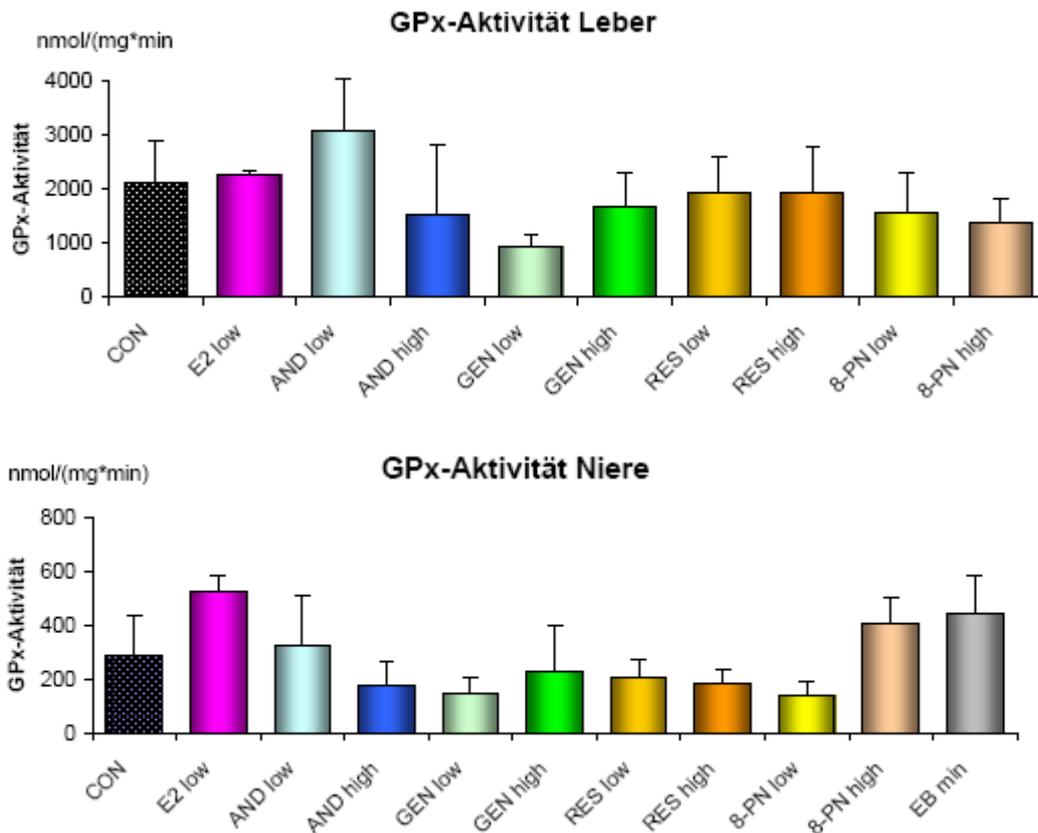
Grafik 10: Genexpression des ME in der Leber.

3.1.8. Glutathionperoxidase-Aktivität

Mit Hilfe des gekoppelten enzymatischen Tests konnte die Aktivität der Glutathionperoxidase anhand der Zunahme der Absorption bei 340nm Wellenlänge bestimmt werden. Sie wird in nmol/(mg*min) auf der y-Achse angegeben. In Grafik 11 ist zunächst die Aktivität in der Leber, anschließend in der Niere, dargestellt. Sie ist in der Leber ungefähr 10fach höher, als in der Niere.

In den Gruppen, die mit Östrogenen (Leber: low; Niere: min und low) und AND low behandelt wurden, zeigte sich in beiden Organen eine Steigerung der GPx-Aktivität.

Gleichzeitig war in beiden Organen eine Verringerung durch AND high und GEN, RES und 8-PN (Leber: low und high; Niere: low) zu beobachten. Jedoch war die Aktivität in keinem Fall signifikant verändert. Klare dosisabhängige Tendenzen waren ebenfalls nicht zu erkennen.

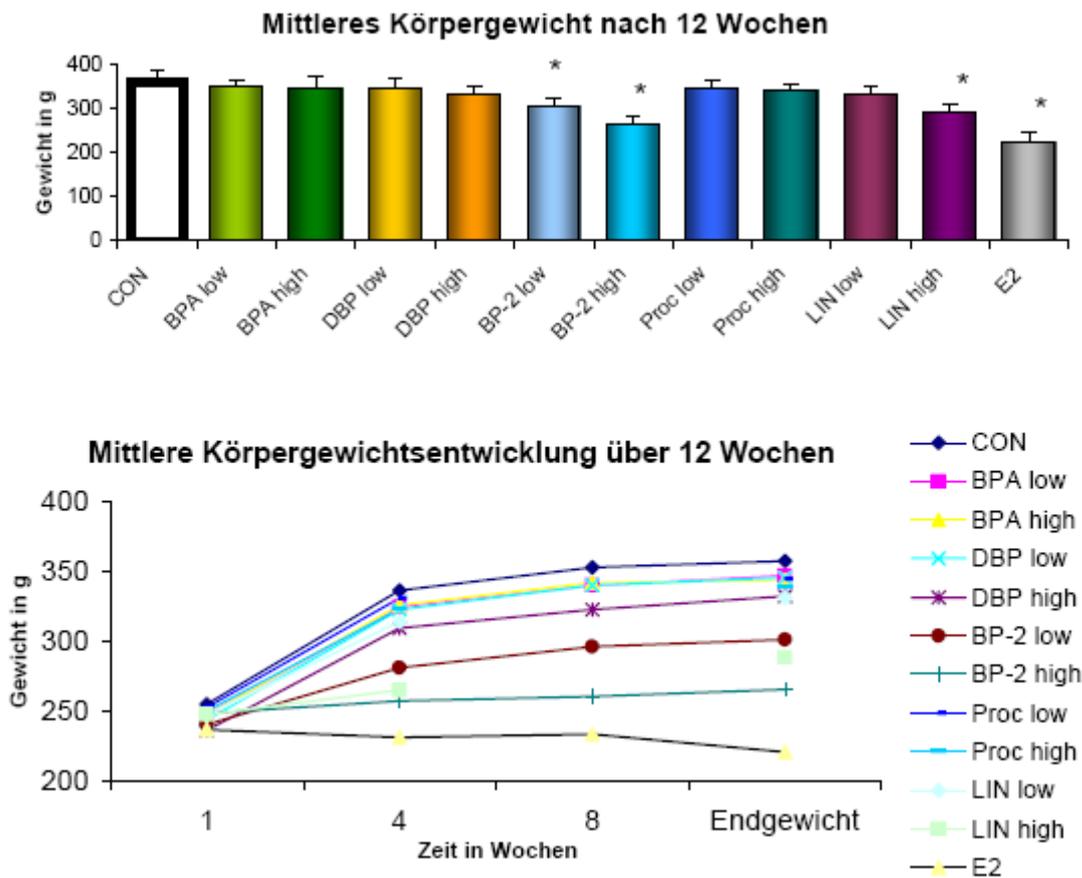


Grafik 11: GPx Aktivität in der Leber und Niere nach 12-wöchiger Behandlung im Vergleich zur Kontrollgruppe (* $p < 0,05$ vs. CON ovx)

3.2. Xenobiotikaversuch

3.2.1. Körpergewichtsentwicklung

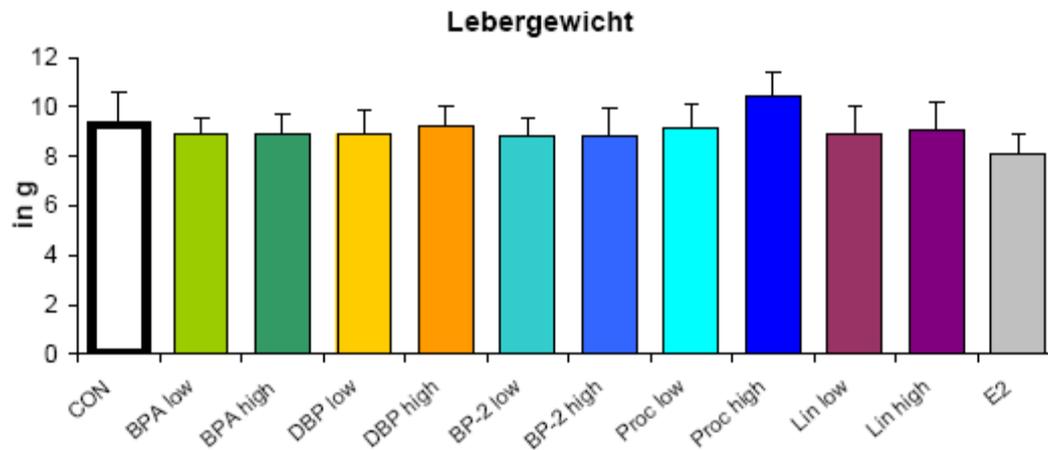
Im Verlauf des 12-wöchigen Experiments war die Gewichtszunahme in den Gruppen E2, BP-2, Proc und LIN, im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant reduziert. Wichtig ist die signifikant verringerte Gewichtszunahme in den Procymidongruppen bei vergleichsweise normaler Futteraufnahme während des Experiments.



Grafik 12: a) Körpergewicht nach 12 Wochen Behandlung mit Testsubstanzen (* $p < 0,05$ vs. CON ovx) und
b) Mittlere Körpergewichtsentwicklung über 12 Wochen

3.2.2. Lebergewicht

Das Lebergewicht zeigt in keiner Gruppe eine signifikante Veränderung. Ein leichter Anstieg konnte in der Gruppe Proc high verzeichnet werden. Das Lebergewicht war unter E2B nicht-signifikant reduziert.

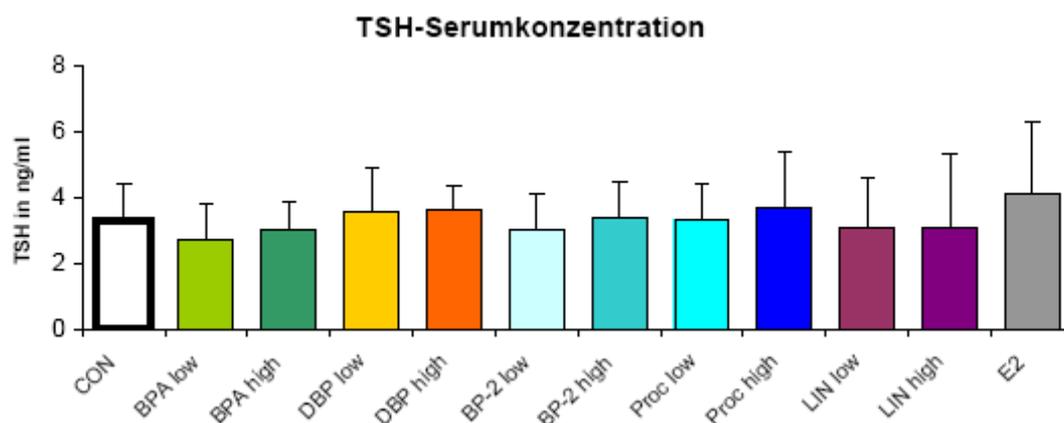


Grafik 13: Mittleres Lebergewicht post mortem nach 12-wöchiger Behandlung (* $p < 0,05$ vs. CON ovx).

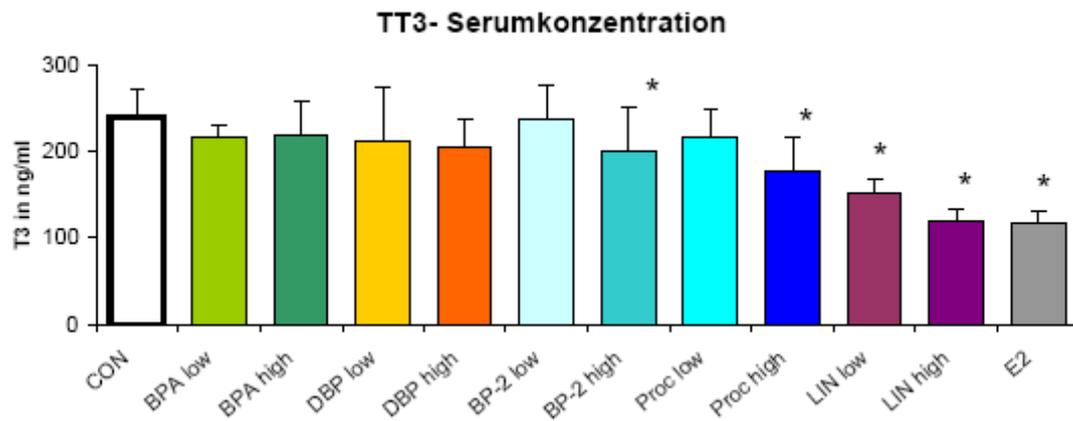
3.2.3. Schilddrüsenhormonkonzentrationen

Die Langzeitbehandlung mit ausgewählten Xenobiotika bewirkte keine Veränderung der TSH-Konzentration, es gab jedoch in der E2-Gruppe eine Tendenz zur Erhöhung. Wichtig sind die TT3- und TT4- Werte, die teilweise auch signifikant verändert sind: TT4 ist reduziert bei BP2, Proc und LIN. Es wurde eine signifikante Reduzierung der TT3-Serumkonzentration gemessen bei den E2-behandelten Tieren, aber auch bei den Gruppen, die einer hohen Dosis von DBP, BP2, Proc und beiden Konzentrationen von LIN ausgesetzt waren.

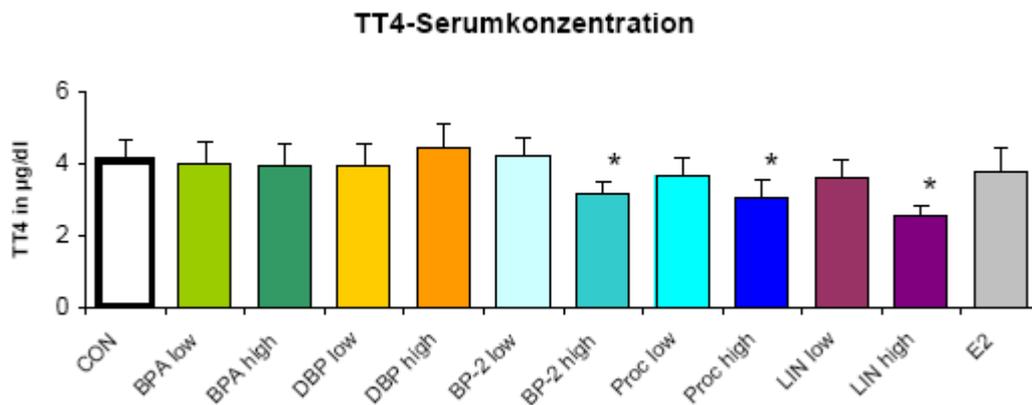
1.



2.



3.



Grafiken 14: (1-3): Mittlere Serumkonzentration der Schilddrüsenhormone (TSH, TT3, TT4) nach 12 Wochen Behandlung (* $p < 0,05$ vs. CON ovx)

Die Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum sind im Folgenden tabellarisch dargestellt (Tabelle 13).

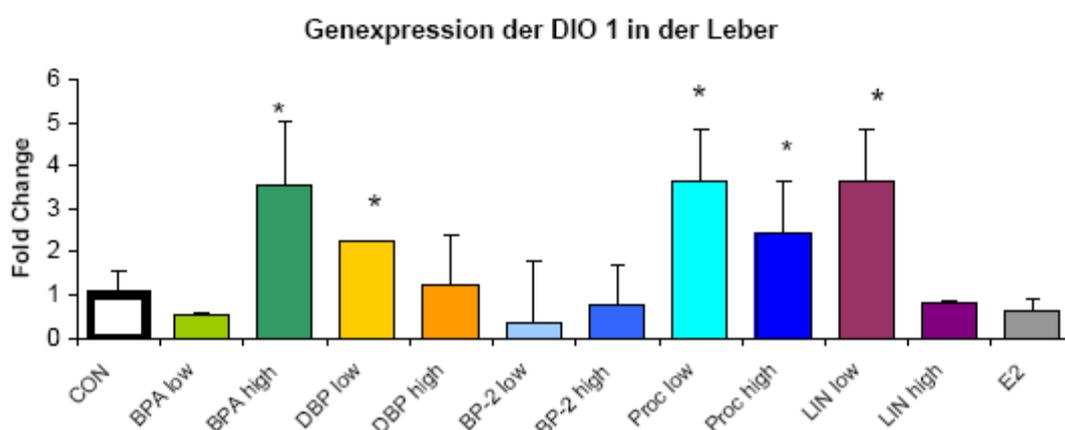
	TSH	TT4	TT3
CON			
BPA low			
BPA high			
DBP low			
DBP high		▲	↓ *
BP-2 low			
BP-2 high		↓ *	↓ *
Proc low			
Proc high		↓ *	
LIN low			↓ *
LIN high		↓ *	↓ *
E2	▲		↓ *

Tabelle 11: Übersicht über Einfluss der Testsubstanzen auf die HPT-Achse: signifikante Veränderungen: Pfeile mit Sternchen; Trend: Pfeilkopf

3.2.4. Genexpression der DIO 1 in der Leber

Mit Hilfe der rt-PCR wurde die Stimulierung der für die DIO 1 kodierenden Gene auf der Ebene der mRNA untersucht und auf die Expression des HPRT-Gens normiert.

Unter BPA high, DBP low, Proc low, Proc high, LIN low konnte eine signifikante Zunahme der Expression gefunden werden. In den anderen Gruppen (BPA low, DBP high, BP-2 low, BP-2 high und ES) wurden im Vergleich zur Kontrollgruppe niedrigere mRNA-Konzentrationen festgestellt, eine Abhängigkeit von der Substanzdosis kann nicht festgestellt werden.

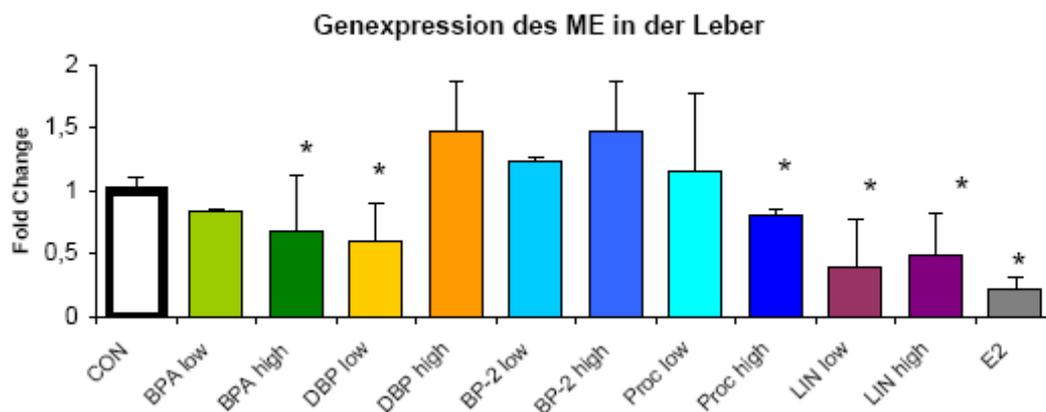


Grafik 15: Genexpression der DIO 1 in der Leber

3.2.5. Genexpression des Malatenzyms in der Leber

Mit Hilfe der rt-PCR wurde die Stimulierung der für das Malatenzym kodierenden Gene auf der Ebene der mRNA untersucht und auf die Expression des HPRT-Gens normiert.

Signifikante Verringerung der mRNA Konzentration konnte unter BPA high, DBP low, Proc high, LIN low, LIN high und ES gemessen werden. Unter DBP high, BP-2 low und BP-2 high, sowie Proc low zeigte sich eine Zunahme der mRNA Konzentration im Vergleich zur Kontrollgruppe, die jedoch nicht signifikant war. In den Gruppen BPA, DBP, BP-2 und LIN waren die Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe in der niedrigeren Konzentration geringer als in der höheren Konzentration.



Grafik 16: Genexpression des ME in der Leber.

4. Diskussion

Es ist unstrittig, dass viele Chemikalien und in der Natur vorkommende Substanzen in hormonell gesteuerte Prozesse eingreifen können mit der Möglichkeit, Entwicklung und Reproduktion zu stören oder einen malignen Prozess zu fördern (Degen et al. 1999). Für eine abschließende Bewertung ist jedoch eine quantitative Betrachtung erforderlich. Dazu ist u. a. wichtig zu wissen, in welchen Konzentrationen und mit welcher Wahrscheinlichkeit derartige Substanzen in Lebensmitteln, Trinkwasser oder Umweltkompartimenten vorkommen oder vorgekommen sind, ob sie also unter realistischen Expositionsbedingungen tatsächlich schädigende Wirkungen bei Mensch und Tier auslösen können. Um diese Frage beantworten zu können, müssen für eine relevante Substanz Informationen vorliegen, die einerseits Aussagen über ihre Wirkungsstärke, d. h. die Dosis- bzw. Konzentrationsabhängigkeit, und Synergismus erlauben und andererseits vorkommende Konzentrationen und damit die Belastung von Mensch und Tier beschreiben (Gies et al. 2001).

Oftmals ist die Reproduktionsachse durch endokrin aktive Substanzen beeinflusst, mittlerweile konnte jedoch verschiedenen ED's auch ein Einfluss auf die HPT-Achse nachgewiesen werden. Diese Interaktion ist nicht auf ein bestimmtes Ziel begrenzt, sondern es kann die Schilddrüsenhormonsynthese, der -metabolismus, die -verteilung, und damit jede Stufe des Rückkopplungskreises betroffen sein: die Thyreotropinrezeptoren (Auf'mkolk et al. 1985a, 1985b; Santini et al. 2003), die DIO 1- Aktivität (Auf'mkolk et al. 1986; Ferreira et al. 2002; Schmutzler et al. 2004), das Transthyretin (TTR) (Köhrle et al. 1988; van den Berg 1990; Yamauchi et al. 2003), die Schilddrüsenhormonrezeptoren (TR) (Bogazzi et al. 2003; Moriyama et al. 2002) und das schilddrüsenhormonabhängige Wachstum der Hypophysenzellen (Ghisari and Bonefeld-Jorgensen 2005) sind nachgewiesen beeinflusste Ziele der HPT-Achse. Insgesamt ist das Wissen über die Wirkung von ED's auf die HPT-Achse jedoch noch gering.

In dieser Arbeit wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit verschiedenen Substanzen oral behandelt. Die auf einer oralen Exposition basierte Serumkonzentration ist u.a. von Faktoren wie tatsächliche Futterraufnahme, oder auch Veränderungen der Stabilität der Substanzen im Futter abhängig (Christoffel, 2004).

4.1. Metabolismus und Kinetik der Phytoöstrogene und Xenobiotika

Die Absorption der Testsubstanz nach der oralen Applikation kann anhand der Serumspiegel verfolgt werden. Substanzen, die oral verabreicht werden, gelangen nach der Absorption im Magen-Darm-Trakt über die Pfortader in die Leber. Dort kommt häufig der first-pass-Effekt zum Tragen (Whitehead et al. 1980). Die Leber ist neben Darm und Niere das zentrale Organ, welches Xenobiotika und Phytoöstrogene degradieren kann (Mutschler et al. 2001). Substanzen, die von den Stoffwechselwegen des Organismus nicht verwertet oder abgebaut werden können, werden über die Biotransformation in den Phase-I-Reaktionen umgewandelt und aktiviert. Anschließend werden diese aktivierten Substanzen in den Phase-II-Reaktionen mit polaren Resten gekoppelt und können dann in der Regel ausgeschieden werden (Mutschler et al. 2001).

In diesem Versuch erreichten GEN und RES in der niedrigen Dosis ungefähr eine $1\mu\text{M}$, in der hohen Dosis eine $10\mu\text{M}$, Konzentration, wohingegen die Serumkonzentration von 8-PN ungefähr 10fach höher war, also $10\mu\text{M}$ und $100\mu\text{M}$, obwohl die Substanzen äquimolar dargereicht wurden. Faktoren, die diese unterschiedlichen Serumkonzentrationen beeinflussen, sind die Gewebeverteilung, die Bioverfügbarkeit und die Metabolisierung (Christoffel 2004).

Es gibt bereits verschiedene Studien, die für GEN und RES die Kinetik und Dynamik untersucht haben: Coldham et al. 2002 zeigten bei weiblichen Ratten, dass die Bioverfügbarkeit (BV) von GEN nach oraler Aufnahme bei 15% liegt. Für RES beschrieben Marier et al. 2002 eine BV von 38%. Bei 8-PN ging man von einer BV von 10%-15% aus, entsprechend den Messungen von Mallis et al 2003. Die Metabolisierung und Halbwertszeit (HWZ) der Substanzen unterscheidet sich deutlich: Nach Aufnahme wird GEN schnell in Phase I in einen polaren Metabolit umgewandelt (Kulling et al. 2000), bevor es durch Glukuronidierung und Sulfatierung in Phase II komplett inaktiviert wird. RES wird sofort glukuronidiert und sulfatiert (Yu et al. 2002; Kaldas et al. 2003). Die HWZ von GEN und seinen Metaboliten beträgt durchschnittlich 8,5h (Coldham et al. 2000), die von RES ca. 1,5 h, wobei eine enterohepatische Resorption mit Rezirkulation nach 4-8h (Marier et al. 2002) nachgewiesen werden konnte. Nikolic et al. veröffentlichten 2004 eine Studie, in der sie die vielen verschiedenen Metabolite von 8-PN, die während der Phase I und II-Metabolisierung entstehen, beschrieben, von denen mindestens zwei selbst östrogene Eigenschaften haben.

Signifikante Veränderungen des Lebergewichts unter GEN, 8-PN oder RES wurden bis jetzt noch nicht beschrieben und konnten hier auch nicht nachgewiesen werden.

Pottenger et al. 1999 untersuchten die BV und Pharmakokinetik von BPA und konnten nachweisen, dass die BV von oral aufgenommenem BPA sehr viel niedriger ist als die Aufnahme nach i.p.- oder s.c.-Darreichung, wobei insgesamt keine Akkumulation nach einwöchiger Gabe festgestellt werden konnte. Trotzdem konnten signifikante Veränderungen der ME und DIO 1 Expression unter der hohen BPA-Dosis festgestellt werden. Aufgrund des multimodalen Kontakts sind die Aufnahmemenge und ein Schwellenwert nicht abschätzbar. Die Ausscheidung von BPA erfolgt sowohl über die Niere, aber insbesondere auch über die Faeces: dabei zeigte sich, dass die hormonell inaktive (Fennell et al. 2000; Matthews et al. 2001) monoglucuronidierte Form des BPA der wichtigste Metabolit ist. Pritchett et al. 2002 zeigten, dass die gewonnenen Daten auch auf Menschen übertragen werden können, so dass nach Aufnahme von BPA von einer schnellen Metabolisierung, Inaktivierung und Ausscheidung ausgegangen werden kann (Fennell et al. 2000; Matthews et al. 2001; Pottenger et al. 2000). Geschlechtsabhängige Absorption beschrieben Schönfelder et al. 2002 und wiesen zusätzlich BPA im Serum von schwangeren Frauen und anschließend auch im Nabelschnurblut nach. Takahashi und Oishi hatten bereit im Jahr 2000 gezeigt, dass BPA die Blut-Placenta-Schranke passiert. Die Daten von Takeuchi und Tsutsumi (2002) beschrieben zusätzlich eine Akkumulation von BPA bei Menschen und die Geschlechtsunterschiede. Völkel et al. 2002 untersuchten den Metabolismus von 5mg BPA bei freiwilligen Testpersonen nach oraler Aufnahme. Hier bestätigte sich die glucuronidierte Form des BPA als einzig nachweisbarer Metabolit im Urin und Blut mit einer HWZ von weniger als 6 Stunden. Die von der Arbeitsgruppe vom Saal (1998) beschriebenen Niedrigdosiseffekte von BPA im Bereich weniger $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ sind kontrovers diskutiert (Nagel et al. 1997, Howdeshell et al. 1999, Welshons et al. 1999). Die Arbeitsgruppe von Chahoud (Fialkowski et al. 2000) sowie eine US-Forschungsgruppe (Gupta 2000) konnten jedoch ebenfalls Effekte im Niedrigdosisbereich (20 bis 100 $\mu\text{g}/\text{kg KG}$) bei Ratten und deren männlichen und weiblichen Nachkommen zeigen. In diesem Versuch wurde die dreimonatige orale Exposition gut vertragen, wobei die verabreichte Dosis etwas höher war, als die effektive Dosis in Mäusen, jedoch wesentlich niedriger als die uterusstimulierende Dosis bei Ratten (Ashby 2001, Witorsch 2002). Veränderungen der Genexpression der DIO 1 und der ME scheinen nicht im Niedrigdosisbereich zu erfolgen. Seidlova-Wuttke et al. 2005 beschrieben unter oraler

Behandlung mit dieser mittleren Dosis allerdings Einfluss auf die Wasseraufnahme und Veränderungen der Serumleptinkonzentration.

Schlecht 2006 beschäftigte sich mit der Pharmakokinetik von BP-2 und dokumentierte, dass die Resorption im Magen-Darm-Trakt nach oraler Aufnahme, durch einen hohen first-pass-Effekt in der Leber, sehr gering ist und nur ca. 2 % des oral aufgenommenen BP2 das Serum erreicht. Trotzdem zeigten sich nach oraler Behandlung mit BP-2 in diesem Versuch weitreichende Veränderungen der Serumspiegel der HPT-Achsen-Hormone. DBP hingegen wurde von Ratten zu mehr als 90% nach oralem oder i.v. Kontakt aufgenommen und erst nach ca. 48h wieder ausgeschieden, wobei es nach Aufnahme schnell zu Monobuthylphthalate (MBP), dem aktiven Hauptmetabolit, hydrolysiert wird. Anschließend wird MBP in MBP-Glucuronide und Phthalatester umgewandelt und im Wesentlichen über die Niere ausgeschieden (Foster et al. 1983, Tanaka et al. 1978). Bei schwangeren Ratten wurde MBP im Plasma, Embryo und Amnionflüssigkeit nachgewiesen. Foster et al. 1981 konnten vermehrt Hodenatrophien nach MBP-Kontakt nachweisen. Bei hoher BV und langer HWZ des aktiven Metabolit zeigte DBP zwar keinen Einfluss auf die Reproduktionsachse und auf den Lipidstoffwechsel, es konnte jedoch eine Interaktion mit der HPT-Achse nachgewiesen werden.

Nagahori et al. 1997 untersuchten die Pharmakokinetik von Proc an weiblichen weißen Neuseelandhasen und konnten die Exkretion von Proc-Metaboliten nach 3 Tagen im Wesentlichen über die Niere nachweisen, wobei die glucuronidierten Metabolite sich von denen der Ratten und Mäuse unterschieden. Die Serum-HWZ lag bei 1-6h. Auch LIN wurde weiblichen weißen Neuseelandhasen oral und i.v. verabreicht. Nach i.v.-Gabe verteilte sich LIN schnell im peripheren Gewebe und wurde auch schnell, genauso wie das oral verabreichte LIN, aufgrund eines hohen first-pass- Metabolismus, eliminiert. Es konnten drei Metabolite von LIN in vivo und in vitro nachgewiesen werden. Die Tatsache, dass LIN in der Lage ist, Leberenzyme zu induzieren macht es wahrscheinlich, dass es auch mit der Cytochromfamilie interagiert, so dass man davon ausgehen muss, das LIN den Abbau von körpereigenen Substanzen, aber auch Medikamenten, verändert und damit wesentlichen Einfluss auch beim Menschen haben kann (Anfossi 1993).

Neumann äußerte 1976 die Vermutung, dass Menschen aufgrund der Größe viel sensitiver gegenüber endokrinen Disruptoren sein könnten als Nagetiere, da diese eine höhere Metabolisierungsrate pro Zeiteinheit im Vergleich zum Menschen hätten und die

Inaktivierung von potentiell schädlichen Substanzen schneller erfolgte (White and Seymour 2005).

4.2. Beeinflussung der HPT-Achse durch Phytoöstrogene

Die Interpretation der Effekte der Testsubstanzen auf die HPT-Achse ist schwierig, da während TSH pulsatil und entsprechend des circadianen Rhythmus abgegeben wird, zeigen die peripheren Schilddrüsenhormone kein eindeutiges entsprechendes Profil, vermutlich wegen der hohen Proteinbildung (Russel et al. 2008), zusätzlich erschweren vielseitige Regulationsmechanismen der essentiellen Homöostase (Ostrowska et al. 2003) die Interpretation.

Nur das freie Hormon (fT₄/fT₃) ist biologisch aktiv, kann die Membran der Zielzelle passieren und im Allgemeinen die Stoffwechselrate und Entwicklungsvorgänge beschleunigen. Eine erhöhte Stoffwechselrate des Organismus kann zu einem reduzierten Körpergewicht führen. Signifikant verringertes Körpergewicht konnte bei den Tieren der Gruppen E2 low und min, GEN high und 8-PN high gefunden werden. E2 erhöht die Stoffwechselrate und senkt die Nahrungsaufnahme (Young 1986). Veränderungen in diesen Gruppen können also nach Fütterung von Substanzen mit hoher östrogenen Potenz oder durch Beeinflussung der HPT-Achse auftreten.

Effekte von Phytoöstrogenen auf die Schilddrüsenhormonkonzentration im Serum

Donda et al. 1990, Lima et al. 2006 und Böttner et al. 2006 beschrieben erhöhte TRH- und TSH-Level unter Östrogeneinfluss. Auch Chen und Walfish 1978 dokumentierten den stimulierenden Einfluss von Östrogenen auf die TRH-abhängige TSH-Freisetzung, womöglich durch eine steigende Anzahl von TRH-Rezeptoren in der Hypophyse. Die TRH, TSH und TT₃/TT₄- Serumkonzentrationen veränderten sich bei Böttner et al. 2006 vor allem unter oraler Applikation von Östrogenen, entsprechende Applikation wurde in diesem Versuch gewählt. Den Einfluss von Östrogenen auf die HPT-Achse fanden Lisboa et al. 1997 dosisabhängig. Entsprechende Ergebnisse wurden in dieser Arbeit gezeigt, denn unter E2 low-

Einfluss zeigte sich eine Erhöhung der TSH-Serumkonzentration. Da es unter E2 min und die anderen Testsubstanzen, mit nachgewiesener, östrogenen Potenz jedoch keinen, oder sogar einen reduzierenden, Einfluss auf die TSH-Serumkonzentration gab, ist von einer andersartigen- nicht östrogenen - Beeinflussung der HPT-Achse auszugehen. Weiterhin kann die verringerte Konzentration von TT3 unter E2 low Ursache für das leicht erhöhte TSH sein, entsprechend des klassischen Feedbackmechanismus.

Die nicht-signifikant erhöhten TT4-Werte unter GEN high, RES high und 8-PN high können Zeichen einer verminderten Umwandlung in T3 oder einer vermehrten Sekretion der Schilddrüse sein. Die signifikant erhöhten Konzentrationen von TT3 unter 8-PN (low und high), sowie unter RES high können mit dem klassischen Feedbackmechanismus bei unveränderten TSH und leicht erhöhten TT4-Konzentrationen nicht erklärt werden. In Hinsicht auf Veränderungen der freien und totalen Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum ist die Serumkonzentration der drei Transportproteinsysteme (Albumin, Thyroxinbindendes Globulin (TBG) und vor allem Transthyretin (TTR)-System) und deren Bindung zu bedenken. Es sind Veränderungen unter ED Einfluss bekannt, z. B. sind polyhalogenierte Phenole in der Lage, T4 von TTR zu verdrängen und damit die Serum-T4-Konzentration zu verringern (Köhrle 2000, Hallgren and Darnerud 2002). Radovic et al. 2006 konnte eine vollständige Verdrängung von radioaktiv markiertem T4 vom TTR im Serum von Menschen und Ratten nach einer Inkubation mit $>10 \mu\text{M}$ GEN feststellen. Eine kompensatorisch vermehrte Bindung von TT4 an andere Transportproteine, wie Albumin wurde hier nicht untersucht. Ebenfalls kann keine Aussage über die Serumkonzentration von TTR, TBG und Albumin in diesem Versuch gemacht werden, so dass eine unveränderte FT4 Konzentration auch durch eine veränderte Transportproteinkonzentration hervorgerufen sein kann. Eine verringerte Konzentration an Transportproteinen, nach Störung der Biosynthese oder des Abbaus (Robbins, 1996) von Schilddrüsenhormonen kann ebenfalls zu einer normalen oder verringerten Konzentration an FT3 führen. Die in diesem Versuch gemessene signifikant verringerte Konzentration des FT3 unter GEN high, bei unveränderten TT3-Werten kann einerseits an einer veränderten Bindungsverhalten, andererseits an einer Veränderung der Transportproteinkonzentration liegen. Ursache für einen rapiden Anstieg von TBG im Serum und damit eine erhöht Bindungskapazität, kann eine direkte Stimulation durch Östrogene sein, wie z.B. auch im ersten Trimenon einer Schwangerschaft. Östrogene verlängern u.a. die Zirkulationshalbwertszeit von TBG, nehmen Einfluss auf die Synthese und den Abbau von

TBG und führen zu einer Abnahme der Bindungskapazität von Tranthyretin im Vergleich zu TBG (Glinoe et al. 1977, 1993 und Premachandra et al. 1977).

Die Beeinflussung der HPT-Achse durch 8-PN scheint geringer zu sein, als die Beeinflussung der Reproduktionsachse. TSH Anstiege im Kurzzeitexperiment, in erster Linie östrogenbedingt (Christoffel 2004), konnten hier nicht mehr gezeigt werden. Veränderungen des Schilddrüsengewichts (Christoffel 2004) und erhöhte Konzentrationen der gebundenen Fraktion von T3 kann hier weiterhin nicht erklärt werden.

Effekte von Östrogenen und Phytoöstrogenen auf die DIO 1 in der Leber

Über die Effekte von E2 an der DIO 1 in der Leber gibt es ebenfalls verschiedene publizierte Daten: Lisboa et al. 2001 beschrieben einen stimulierenden Einfluss auf die hepatische DIO 1, Schmutzler et al. 2004 einen hemmenden. Die Ergebnisse dieses Versuches stimmen mit den Ergebnissen von Schmutzler et al. 2004 überein.

Die signifikant herabgesetzte mRNA-Konzentration der DIO 1 in der Leber unter E2 low bzw. verachtfachte mRNA-Konzentration der hepatischen DIO 1 unter EB min entspricht nicht den Daten von Miyashita et al. 1995, die keinerlei Veränderungen der DIO 1 und der mRNA Konzentration unter Östrogenbehandlung bei ovariectomierten Ratten beobachten konnten und können nicht über den physiologischen Feedbackmechanismus erklärt werden.

Durch die langdauernde GEN-Behandlung in niedriger Konzentration konnten, im Vergleich zu den Effekten unter der hohen Konzentration, stärkere Veränderungen in der HPT-Achse nachgewiesen werden. Die signifikante Steigerung der DIO 1-Aktivität und die signifikante, zehnfache Erhöhung der mRNA-Konzentration unter GEN low zeigen erneut den ausgeprägten Einfluss auf die HPT-Achse. Diesen haben Doerge und Sheehan 2002 bereits durch den Nachweis der Strumainduktion durch GEN, bei starker Hemmung der TPO erkannt. Schmutzler et al. 2004 und 2006 zeigten, dass die TPO-Hemmung durch GEN in Abhängigkeit vom Iodstatus stattfindet. Entsprechend der Zusammensetzung des Futters (siehe Appendix) kann man in diesem Fütterungsversuch von einem euthyreoten Zustand der Ratten ausgehen, so dass eine Beeinflussung der TPO-Aktivität für Veränderungen der Serumspiegel der Schilddrüsenhormone in allen Gruppen nicht zu vermuten ist. Nach diesem Versuch muss davon ausgegangen werden, dass neben der TPO und den Transportproteinen

auch auf der Ebene der Genexpression und der DIO 1-Aktivität Veränderungen stattfinden, die die Homöostase der Schilddrüsenhormone beeinflussen.

Christoffel (2004) konnte weder nach Kurzzeit- noch nach Langzeit-RES-Behandlung eine histologische Veränderung der Schilddrüse oder des Körpergewichts nachweisen. Schmutzler et al. 2004 beschrieben eine RES-bedingte Hemmung der TPO. In diesem Versuch führte der Kontakt mit RES high zu einem signifikanten Anstieg des TT3 im Serum, sowie zu einem signifikanten Anstieg der DIO 1-Aktivität in der Leber, so dass hier weitere Untersuchungen bezüglich der Beeinflussung der endokrinen Disruption der HPT-Achse nötig sind.

Veränderungen der Serum-T3 und -T4 Werte dürfen nicht als ausschließlich von der DIO 1 der Leber bedingt gesehen werden, gewebespezifische Änderungen oder Veränderungen der Konjugation (siehe u.a. 4.1.) können nicht ausgeschlossen werden und müssen untersucht werden.

Die Aktivität der DIO 2 war, entsprechend den Ergebnissen von Bianco et al. 2002, in der Leber sehr nicht nachzuweisen, die dargestellte geringe Aktivität kann auch durch einen initialen Iodidfreisetzung vor PTU-Gabe entstanden sein (Bianco et al. 2002, Köhrle 2002).

In der niedrigeren AND, GEN, RES und 8-PN-Dosis ist die Beeinflussung der DIO 1-Aktivität jeweils stärker, als in hoher Dosis. Daher kann man eine U-förmige Dosis-Wirkungsbeziehung vermuten, d.h. dass kleinere Mengen der Substanzen einen größeren Einfluss haben. Derartige Beziehungen werden in der Pharmakologie zuweilen beobachtet. Es wird vermutet, dass solche Kurven multiple Wirkungsmechanismen wie Homöostase oder die Aktivierung von kompensatorischen oder schützenden Reaktionen zugrunde liegen (David et al. 1990). Daher kann man nicht davon ausgehen, dass hormonelle Wirkmechanismen nur durch Überschreitung einer Schwellendosis ausgelöst werden.

Wie bereits in 1.5.1. beschrieben, sind eine Reihe von endokrinen Signalen, wie z.B. T3, T4, das Wachstumshormon (GH) aber auch die Insulin-like Growth Factors (IGFs) (Baur et al. 1997), in der Lage, die DIO 1 Expression gewebespezifisch zu stimulieren. Die DIO 1 Aktivität in Leber und Schilddrüse gilt seit langem als wichtige Quelle für die Bereitstellung von Serum T3 im euthyreoten Organismus und damit für die systemische Versorgung mit aktivem Schilddrüsenhormon (Bianco et al. 2002; Köhrle 1999). Allerdings deuten

neuerdings Knock-out Mausmodelle (KO) mit totaler oder nur lokaler hepatischer DIO 1-Defizienz auf eine eher untergeordnete Beteiligung derselben an der systemischen Versorgung mit T3 (Schneider et al. 2006, Streckfuss et al. 2005). DIO 1-KO Tiere sind gesund und fertil, weisen zwar erhöhte T4 und rT3 Spiegel im Serum auf, die T3 und TSH-Konzentrationen sind aber unverändert. Unter diesem Aspekt müssen die verschiedenen gemessenen unspezifischen Veränderungen der Serumschilddrüsenwerte betrachtet werden und die u.a. signifikant veränderte DIO 1 Aktivität vielleicht auf die intrazelluläre Aktivierung von T4 in T3 bezogen werden.

4.3. Beeinflussung T3 regulierter Endpunkte der HPT-Achse

Beeinflussung der ME-Aktivität

Wie in 1.6.2. dargestellt, ist das ME einer der am besten charakterisierten T3-regulierten Endpunkte der HPT-Achse. Mariash et al. beschrieben bereits 1981 das hohe Expressionslevel in der Leber und die Beteiligung am Lipidhaushalt, denn ME stellt das benötigte NADPH für die Fettsäuresynthese bereit. T3-beeinflusste Elemente des ME-Promoters konnten in verschiedenen Vertebraten nachgewiesen werden, u. a. auch beim Menschen und der Ratte (Gonzalez-Manchon et al. 1997, Petty et al. 1990). Dementsprechend findet man in der Leber von T3-behandelten vs. unbehandelten Ratten einerseits eine um das 10fache erhöhte Enzymaktivität, als auch ein um das 15fache angehobene mRNA-Expressionsniveau. Allerdings ist die T3-getriggerte Stimulation in anderen Organen nicht so stark wie in der Leber. Dozin et al. 1985 beschrieben einen Anstieg der mRNA Konzentration und der Enzymaktivität im Herzen um das 1,7fache und das in der Niere auf das 3,4 fache. Die Schilddrüsenhormone spielen, also im Lipidstoffwechsel eine wichtige Rolle. Ist die Schilddrüsenfunktion durch den Einfluss endokriner Disruptoren verändert, kann man den Effekt u. a. an der Aktivität des ME nachweisen, allerdings ist die Aussage auch unter Betrachtung des metabolischen Zustandes zu bewerten, denn auch Glukosestoffwechsel und Insulin spielen eine wichtige Rolle.

In der Leber und Niere ist die ME-Aktivität unter AND low nicht dosisabhängig vermindert. Die Aktivitätsabnahme unter AND low kann durch andere Fütterungsexperimente von Kovacs et al. 2004 und Schmutzler et al. 2004 nicht bestätigt werden. Sie fanden einen 1,5-2fachen Anstieg in der Leber, der in der Niere etwas geringer ausfiel. In einem

Fütterungsexperiment von Schmutzler et al. 2004 zeigte sich eine signifikante Reduzierung der ME-Aktivität in der Leber unter GEN, RES und 8-PN um 50-76%. Diese Veränderung konnte in diesem Versuch für RES und 8-PN bestätigt werden. Entsprechend den Daten von Kovacs et al. 2004 haben Östrogene einen ausgeprägten Einfluss auf die ME-Aktivität und auf die Transkriptmenge in der Leber. Eine kausale Schlussfolgerung über die Ursache der Aktivitätsänderung ist, solange keine Kontrollexperimente, die aufwendiger Tierexperimente bedürfen, nicht möglich.

Obwohl das ME eines der am besten charakterisierten metabolischen Endpunkte der Schilddrüse, besonders in der Leber, ist, muss man die metabolisch-, östrogen- und androgenabhängige Regulation des ME und des Lipidhaushalts immer mit in die Beurteilung der Veränderungen einbeziehen, so dass die ME-Aktivität nicht unbedingt ein aussagekräftiger Marker für die endokrine Disruption der HPT-Achse ist. (Mariash et al. 1980 und 1981; Song et al. 1989, Cho und Park 1990, Sissan and Leelamma 1996).

Die vielseitige Abhängigkeit macht es nicht möglich, (anti-)östrogene, androgene oder T3-abhängige Effekte voneinander zu diskriminieren. Damit kann man zwar eine generelle Aussage über die Fähigkeit einer Substanz zur endokrinen Disruption machen, die Klassifikation und Abklärung des genauen Mechanismus ist auf diese Weise jedoch nicht möglich.

Beeinflussung der GPx-Aktivität

Die ausreichende GPx-Aktivität ist unentbehrlich für den Schutz der Schilddrüse und anderer enzymaktiver Organe, wie der Leber und der Niere. Die Beeinflussung der Aktivität im Vergleich zur Kontrollgruppe ist in keinem Fall signifikant, jedoch konnten dosisabhängige und gewebeabhängige Veränderungen nachgewiesen werden. Bis jetzt gibt keine Literaturdaten über den Einfluss von Phytoöstrogenen auf die GPx-Aktivität, da sie jedoch redox-aktiv sind, ist so ein Einfluss nicht völlig auszuschließen. Riese 2007 beschrieb geschlechtsspezifische Unterschiede in der GPx-Aktivität (s.u.)

4.4. Beeinflussung der HPT-Achse durch Xenobiotika

Die ovariectomierten Ratten nahmen enorm schnell an Gewicht zu, was bei den Tieren, die mit E2 behandelt wurden, komplett kompensiert wurde. Partiell, aber nicht dosisabhängig, geschah das auch in den Gruppen BP-2, LIN und Proc. Da die östrogenen Eigenschaften von BP-2 bereits bekannt sind, ist die Gewichtsabnahme sehr wahrscheinlich auf diese zurückzuführen. Jedoch hatte weder LIN noch Proc in früheren Experimenten (Vinggaard et al. 1999 a, 1999b, Seidlova-Wuttke et al. 2005) östrogene Eigenschaften, sondern nur antiandrogene (Gray et al. 1999, Lambright et al. 2000). O'Connor et al. 2002 wiesen bei gesunden männlichen Ratten, die mit dem in der Klinik verwendeten Cyproteronacetat behandelt wurden, ebenfalls ein reduziertes Körpergewicht nach, so dass die Wirkung von LIN und Proc auf dem Mechanismus der Hemmung des anabolen Hormons Testosteron beruhen kann.

Entsprechend der physiologischen Stimulation durch Östrogene und/oder durch den Feedbackmechanismus ist der nicht nicht-signifikante Anstieg der TSH-Serumkonzentration in der E2-Gruppe, bei signifikant erniedrigter TT3-Konzentration, zu sehen.

Die Testsubstanz BP-2 zeigte bei Schlecht 2006 eine deutliche Induktion der TSH-Sekretion, Dies konnte in diesem Versuch nicht nachvollzogen werden. Schmutzler et al. 2007 beschrieben, dass BP-2 in der Lage ist, das TPO-Enzymsystem zu hemmen. Da die TPO zentrale Schritte der Schilddrüsenhormonsynthese (Taurog 2005) katalysiert, wird die gesamte Schilddrüsenhormonsynthese gehemmt. In einem in vitro-TPO-Assay mit rekombinantem humanem Protein inhibierte BP-2 bei einer Konzentration von 0,4 μM die TPO-Aktivität signifikant (Schmutzler et al. 2007). Damit ist BP-2 ein stärkerer Inhibitor der TPO-Aktivität als das GEN. In vivo kann die Administration von BP-2, aufgrund zellspezifischer Effekte, jedoch auch ein anderes Bild hervorrufen: Bei in-vivo Versuchen induziert BP-2 die TPO-Aktivität, wobei die gleichen effektiven Konzentrationen nötig sind. Entgegen diesen Ergebnissen zeigen sich die Serumkonzentrationen von TT3 und TT4 signifikant reduziert, Veränderungen des TSH-Spiegels konnten nicht nachgewiesen werden, so dass man einer Beeinflussung des Feedbackmechanismus oder einer physiologischen Anpassung der Deiodaseaktivität ausgehen muss. Betrachtet man das Deiodasesystem, stellte Schlecht 2006 keine signifikante Änderung der Aktivität der DIO 1 durch BP-2 fest. Mittels rt-PCR zeigt sich hier ein nicht-signifikanter Trend zu einem verringerten Expressionsniveau der DIO 1 in der Leber unter BP-2. Physiologischerweise ist in hypothyreoten Zuständen die

Aktivität der DIO 1 herabgesetzt, eine Abnahme des DIO 1-Expressionsniveaus stellt die Grundlage für eine verminderte Bildung von DIO 1 dar. Die verminderte Genexpression der DIO 1 könnte Folge der signifikanten Erniedrigung des TT3 und TT4 sein.

Das ME-Expressionsniveau zeigte eine deutliche, nicht-signifikante, 8 (low)- und 5 (high)-fache Herunterregulierung unter BP-2, so dass auch der Lipidhaushalt beeinflusst scheint, entweder durch die Substanz selbst, oder infolge der Veränderungen in der HPT-Achse. BP-2 präsentiert sich als eine Chemikalie, die in der Lage ist, mit verschiedenen Hormonachsen zu interagieren, so dass die Folgen einer häufigen Exposition schwer beurteilbar sind.

Auch für BPA ist eine dosisabhängige TPO-Inhibierung nachgewiesen worden (Schmutzler et al. 2006). Weiterhin ist bekannt, dass BPA in der Lage ist, TR-induzierte Transkription antagonistisch zu verhindern. Mittels des Vergleichs der Schilddrüsenhormonkonzentrationen konnte in diesem Versuch keine Beeinflussung der HPT-Achse festgestellt werden. Der signifikante Anstieg der Genexpression der DIO 1 unter BPA-high zeigt jedoch, dass eine Beeinflussung noch nicht auszuschließen ist. Der Lipidhaushalt scheint beeinflusst, denn unter BPA-high war auch die Genexpression des ME signifikant verringert. Die von der Arbeitsgruppe vom Saal 1998 gefundenen Niedrigdosiseffekte von BPA mit verfrühter Pubertät, verringerter Spermaproduktion, Vergrößerung der Prostata, und einem veränderten Verhalten von Mäusen im Bereich weniger $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ zeigen, dass auch der minimale Kontakt mit BPA nicht unterschätzt werden darf. Hier zeigten sich lediglich in der hohen Konzentration signifikante Effekte. Mori et al. 1990 wiesen BPA u.a. in fetalem Gewebe nach, ein Hinweis auf das große Risiko mentaler Retardierung und neurologischer Defekte bei Kontakt während der Schwangerschaft durch Beeinflussung der HPT-Achse.

Die östrogenen und antiandrogenen Eigenschaften von DBP (Harris et al. 1997, Jobling et al. 1995 und Mylchreest 1998) haben einerseits Einfluss auf die Gonadendifferenzierung, andererseits auch auf die HPT-Achse. Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentration zeigten sich in dieser Versuchsreihe vor allem unter der hohen DBP-Behandlung. Veränderungen der Genexpression der DIO 1 und des ME in der Leber konnten hingegen jeweils in der Gruppe DBP low gefunden. Daten über die DIO 1- und TPO-Aktivität unter DBP Einfluss liegen in der Literatur noch nicht vor. Ein Einfluss besonders auf den Lipidmetabolismus muss jedoch vermutet werden, insbesondere da Seidlova-Wuttke et al.

2005 eine signifikante Reduzierung von LDL unter DBP high und eine Abnahme der Serumtriglyceride, von HDL und Cholesterol nachweisen konnten.

Die beiden Pestizide LIN und Proc wurden im ER-Rezeptorbindungsassay von Seidlova-Wuttke et al. 2005 getestet. Keine der beiden Substanzen ging eine Bindung ein, so dass keiner der beschriebenen Effekte durch östrogene Eigenschaften erklärt werden kann. Bei der Untersuchung des Körpergewichts der Ratten nach 3 Monaten Behandlung hatten die Tiere der beiden Gruppen eine verringerte Gewichtszunahme. Eine signifikante Reduktion war lediglich unter LIN high zu verzeichnen, entsprechend der beschriebenen verminderten Futteraufnahme. O'Connor et al. 2002 erklären ähnliche Ergebnisse durch die antiandrogenen Eigenschaften der Substanzen. Da die Tiere der Gruppen LIN und Proc in diesem Versuch jedoch eine massiv erhöhte Wasseraufnahme hatten, ist es zu vermuten, dass die gestörte Gewichtszunahme durch hohe Detoxifikationsprozesse verursacht wird. Dramatischer verhielten sich die Veränderungen von T3 und T4, die dosisabhängig unter LIN und Proc reduziert waren. Unter den hohen Konzentrationen beider Substanzen waren die Effekte statistisch signifikant. Beide Substanzen stehen im Verdacht, die TPO zu inhibieren (Schmutzler et al. 2004). Trotzdem ist die unveränderte TSH-Serumkonzentration, bei signifikant reduzierten TT3-Konzentrationen, zurzeit nicht zu erklären. Man muss zusätzliche Effekte der beiden Pestizide auf die HPT-Achse vermuten. Die rt-PCR zeigte eine deutliche Erhöhung der DIO 1 und ME Genexpression in der Leber unter LIN high, so dass entweder ein physiologischer Effekt zur Erhöhung der T3 Serumkonzentration führt, oder die Substanzen u. a. an dieser Stelle einen regulierenden Einfluss auf die HPT-Achse und den Lipidhaushalt einnehmen. Insgesamt scheint das Risiko, das von den beiden Pestiziden ausgeht, nicht unterschätzt werden darf.

4.5. Geschlechtseinfluss auf die DIO 1 und GPx

Ein Geschlechtseinfluss auf die Selenoprotein-Expression konnte für die GPx3, teilweise für die GPx 1 und die DIO 1 gezeigt werden. Das Wissen über die geschlechtsspezifische DIO 1 Genexpression stammt im Wesentlichen von Ratten, so dass hier eine gute Vergleichbarkeit besteht. Die Literaturdaten zur geschlechtsabhängigen hepatischen und renalen DIO 1 Expression im Rattenmodell sind heterogen.

Deiodase 1

Unter Behandlung mit AND low und high (low > high) war zeigte sich die hepatische mRNA Konzentration der DIO 1 signifikant erhöht im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch der überwiegende Anteil der vorliegenden Arbeiten stellt eine höhere hepatische DIO 1 Expression in den männlichen Tieren fest, wobei eine Kastration die hepatische DIO 1 Aktivität reduzierte. Eine Behandlung mit Testosteron lässt die Aktivität wieder in den Bereich der Kontrollgruppe ansteigen (Lisboa et al. 2001; Harris et al. 1979; Miyashita et al. 1995; Ogawa et al. 1999). Trotzdem zeigte sich hier keine signifikante Aktivitätsänderung der DIO 1.

Lisboa et al. 2001 beschrieben eine Reduzierung der hepatischen DIO 1-Aktivität nach Ovariectomie, die Injektionen von Estradiolbenzoat wirkte signifikant erhöhend auf die Aktivität, was in diesem Versuch nachvollziehbar war, denn unter E2 low war die Aktivität nach Ovariectomie höher als unter E2 min. Die Aktivität der DIO 1 unter Östrogensubstitution war im Vergleich niedriger als unter der Behandlung mit AND low und high, so dass hier die stärkere Wirkung des Testosterons auf die hepatische DIO 1 bestätigt ist. Altersabhängige Veränderungen wie bei der AG Rosenthal wurden hier nicht untersucht (da Costa et al. 2001).

In der Niere gab es bei Ogawa et al. 1999 keine geschlechtsspezifischen Unterschiede der DIO 1-Expression. Riese 2007 dokumentierte eine gegenläufige geschlechtsspezifische Expression der DIO 1 in Leber und Niere. Die Männchen hatten in der Leber eine höhere, in der Niere indes eine niedrigere DIO 1 Aktivität im Vergleich zu den Weibchen. In Wistar und Sprague-Dawley Ratten wurde ebenfalls eine höhere hepatische DIO 1 Aktivität und entsprechend dieses Versuches eine höhere DIO 1 Transkriptmenge in Männchen beobachtet (Harris et al. 1979; Lisboa et al. 2001, Ogawa et al. 1999; Miyashita et al. 1995; Santini et al. 1994). Andererseits fanden da Costa et al. 2001, entgegen den Beobachtungen von Riese 2007, eine höhere hepatische DIO 1 Aktivität in weiblichen Dutch-Miranda Ratten. Bei der Untersuchung der DIO 1-Aktivität und der Transkriptmenge muss man von spezies-, geschlechts- und gewebeabhängigen Unterschieden ausgehen.

Glutathionperoxidase

Bei der Suche nach geschlechtsabhängigen Veränderungen des Expressionsmuster und der Aktivität der Glutathionperoxidasen am Beispiel der GPx1 zeigte Riese 2007, dass nicht alle

Glutathionperoxidasen geschlechtsspezifisch exprimiert werden: während klare Unterschiede z.B. bei der GPx 3 vorliegen, scheint die zytosolische GPx 1 teilweise unabhängig vom Geschlecht zu sein. Alter, Spezies, gewebespezifische Selen-Bioverfügbarkeit (Riese 2007, Bermanno et al. 1995; Lei et al. 1995; Sunde et al. 1997, Banos et al. 2005; Pinto et al. 1969; Yamamoto et al. 2002) und Umgebungsfaktoren scheinen die Aktivität und Expression hingegen wesentlich zu beeinflussen.

Obwohl es keine signifikanten Veränderungen der GPx 1 Aktivität gab, scheint trotzdem eine dosis- und geschlechtsabhängige Beeinflussung möglich zu sein. Sowohl in der Leber, als auch in der Niere war die Aktivität der GPx 1 in der AND low Gruppe höher, als in der AND high Gruppe.

4.6. Vergleich der Ergebnisse mit verschiedenen toxikologischen Studien

Zur Beurteilung der Wirkung der Phytoöstrogene und Xenobiotika müssen neben endokrinologischen auch toxikologische Ursachen für die Veränderungen der HPT-Achse diskutiert werden. Exemplarisch wurden aus diesen Langzeitexperimenten drei Substanzen (GEN, RES, BP-2) ausgewählt, bei denen eine Beeinflussung der HPT-Achse durch andere, nicht hormonell disruptive, Eigenschaften vermutet werden muss. Als Vergleichssubstanzen dienen hier einerseits das seit dem frühen 20. Jahrhundert zur Narkosevorbereitung und heute insbesondere in der Epilepsiebehandlung verschriebene Phenobarbital (PB; ursprünglicher Handelsname: Luminal®; Hersteller: Desitin), auf der anderen Seite PTU (6-*n*-propyl-2-thiouracil), ein seit langem bekannter Hemmer der Schilddrüsenhormonsynthese (Dijkstra et al. 1996; Hardy et al. 1996; Kirby et al. 1997; Marty et al. 1999; O'Conner et al. 1999).

Nach ihrem Kurzzeitexperiment, in dem GEN und RES über 6 h weiblichen Sprague-Dawley per Sonde verabreicht wurde, beschrieb Christoffel 2004 einen signifikanten Abfall der TT3, TT4, fT3 und fT4 Serumkonzentration unter RES. Das TSH zeigte sich in ihrem Experiment zum Messzeitpunkt unverändert. Unter GEN-Behandlung konnte sie keine signifikanten Veränderungen der Schilddrüsenhormone im Serum feststellen. Schlecht 2006 konnte in ihrem fünftägigen BP-2 subakut-Versuch nachweisen, dass die freien T3-Werte in den

Gruppen, die mit 100 mg/kg KG und 333 mg/kg KG behandelt wurden, signifikant gesenkt waren. Der gesamt-T4-Spiegel wurde deutlich dosisabhängig durch die Behandlung mit BP2 gesenkt. Die Serumkonzentration von freiem T4 wurde nur durch die höchste BP2-Dosis (1000 mg/kg KG) signifikant gesenkt, so dass die Veränderungen unter Kurzzeit- und Langzeitexperimenten nicht von einander abweichen. Hingegen konnten in diesen Langzeitversuchen die Veränderungen der Kurzzeitexperimente unter RES nicht mehr nachgewiesen werden. Lediglich das TT3 war unter RES high noch signifikant erhöht. Die unveränderten TSH-Werte zeigen, dass die Veränderungen nicht über den Feedbackmechanismus kompensiert werden.

McClain et al. 1989 beschrieben nach einer zweiwöchigen Behandlung von männlichen und weiblichen Ratten mit PB eine signifikante Abnahme der Serum-T3, -T4, -rT3 Werte, einen signifikanten Anstieg des TSH im Serum, sowie eine signifikante Zunahme des Schilddrüsengewichts. Die Veränderungen waren nach dreimonatiger Exposition bei ihm nicht mehr nachweisbar, zum Ende des Versuchs zeigten sich die Schilddrüsenhormonkonzentrationen wieder im Normalbereich, jedoch konnten erhöhte Leber- und Schilddrüsengewichte gemessen werden. T3 und T4 können über das Biotransformationssystem in der Leber abgebaut werden. T4 wird glucuronidiert, eine Reaktion, die von der UDP-Glucuronyltransferase katalysiert wird (Barter und Klaassen 1992; Capen 1996). T3 wird hingegen mit Sulfat durch das Sulfotransferasesystem konjugiert (Capen 1996). Anschließend erfolgt die biliäre Exkretion (Hill et al. 1989). Über den vermehrten Abbau der Schilddrüsenhormone erfolgte die Kompensation nach vermehrter Bildung, denn McClain 1989 maß eine um ca. 40% erhöhte Enzymaktivität der Thyroxin-Glucuronyltransferase und eine um 42% erhöhte biliäre Exkretionsrate. In den mit RES low und high behandelten Gruppen dieses Langzeitexperimentes wurden erhöhte Lebergewichte post mortem gemessen, jedoch nicht in der Höhe einer Verdreifachung. Entgegengesetzte Veränderungen unter GEN low und GEN high stellen in Frage ob der erhöhte Abbau wirklich die Ursache für die Lebergewichtveränderungen sind. Betrachtet man die absoluten Lebergewichte unter BP-2 im Verhältnis zum Körpergewicht, kann jedoch die Zunahme vermutet werden, denn das Körpergewicht war unter BP-2 signifikant erniedrigt bei normalem Lebergewicht. Gleiches gilt für die Gruppen RES (low und high) und GEN low. Unter GEN high waren sowohl das Leber- als auch das Körpergewicht signifikant reduziert. Eine verringerte Zunahme von Körper- und Lebergewicht kann mit der breiten Partizipation der Schilddrüsenhormone an verschiedenen metabolischen Stoffwechselwegen

zusammenhängen. Die Verschiebung des Verhältnisses zwischen Leber- und Körpergewicht spricht für eine Veränderung der Stoffwechselprozesse. Mellert et al. 2003 beschrieben in den Gruppen, die mit einer hohen Dosis an PTU behandelt wurden, eine Verschlechterung des Verhältnis zwischen Futteraufnahme und Gewichtszunahme, beginnend ab dem 14. Tag der Behandlung, so dass bei Fütterungsversuchen Veränderungen teilweise auch erst ab dem 14. Behandlungstag erscheinen. Die EMSG (The Endocrine Modulator Study Group) und das CEFIC (Council of European Chemical Industry) sprechen sich dafür aus, den 28 tägige Nagetierfütterungsversuche entsprechend des Protokolls der OECD (Test Guideline 407 OECD 1995) zu verwenden (Mellert et al. 2003). In diesem Versuch zeigen sich jedoch Veränderungen des Schilddrüsenhaushaltes, die in Kurzzeitversuchen nicht nachgewiesen werden konnten. Entsprechend können Versuche, die sich lediglich über eine Dauer von einem Monat erstrecken nur unvollständige Aussage über die disruptiven Eigenschaften einer Substanz geben.

McClain 1989 und O'Connor et al. 1999 sahen eine deutliche Geschlechtsabhängigkeit der Wirkung von PB, denn bei weiblichen Ratten waren die Effekte deutlich geringer als bei den männlichen Tieren. Weibchen hatten eine reduzierte T3 und T4 Serumkonzentration unter PB, Männchen hatten zusätzlich auch einen erhöhten TSH-Wert und es konnten histologische Veränderungen nachgewiesen werden. Christoffel 2004 sah nach der dreimonatigen Behandlung mit GEN und RES dementsprechend keine gewichts- oder histologischen Veränderungen der Schilddrüse bei weiblichen Sprague-Dawley-Ratten. Diese geschlechtsabhängigen Veränderungen können auch nach PTU-Behandlung nachgewiesen werden. Veränderungen der Konzentration der Schilddrüsenhormone, sowie der Schilddrüsenhistologie nach 28-tägiger Behandlung mit PTU, waren, wie es bei einer Hemmung der TPO zu erwarten ist, im Sinne einer manifesten Hypothyreose (Mellert et al. 2003). BP2 ist ein stärkerer Inhibitor der TPO-Aktivität als das Goitrogen Genistein (Schmutzler et al. 2006). Für PTU und BP-2 wurden Unterschiede in der Modulation der TPO-Aktivität in vivo und in vitro gefunden (Davidson et al. 1978, Schlecht 2006), so dass hier eine Versuchsreihe lediglich mit weiblichen Ratten, trotz der Ovariectomie, nicht ausreicht. Die erniedrigten Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone ohne konsekutive Erhöhung der TSH-Werte in diesem Langzeitversuch deuten darauf hin, dass die Veränderungen nicht ausschließlich durch die Modulation der TPO-Aktivität entstanden sind. Wie bereits beschrieben ist die regelrechte Aktivität der TPO bei Menschen vom euthyreoten Zustand abhängig, der in vielen Orten der Welt nicht gesichert ist. In diesem Versuchen kann

man von einem euthyreoten Ausgangsstatus der Ratten ausgehen, so dass eine abschließende Beurteilung des Risikos für den Menschen nicht möglich ist.

5. Zusammenfassung

Der Körper kommt, teilweise unbemerkt, täglich mit pflanzlichen Inhaltsstoffen, Industrieprodukten und Chemikalien in Form von z.B. Plastikverpackungen, mit Insektiziden und Pflanzenschutzmitteln, sowie Kosmetika in Kontakt. Phytoöstrogene und Xenobiotika sind pflanzliche bzw. anthropogene Substanzen, die in der Lage sind, körpereigene Prozesse zu beeinflussen. Sie werden als endokrin aktive Substanzen, oder als endokrine Disruptoren bezeichnet. Einigen Substanzen ist bereits nachgewiesen, dass sie in Prozesse der Entwicklung, Homöostase oder Reproduktion eingreifen und sogar die Entstehung und Proliferation von Karzinomen fördern können, man ist jedoch noch weit davon entfernt, das Ausmaß der Veränderungen vollständig erfassen zu können.

In dieser Arbeit wurden drei Pflanzeninhaltsstoffe und fünf chemische Substanzen unseres Alltags, denen disruptive Fähigkeiten, insbesondere in der Reproduktionsachse, bereits nachgewiesen wurden, auf ihren Einfluss auf T3-regulierte Endpunkte in der Peripherie der Schilddrüsen-Achse (HPT-Achse= engl. Hypothalamus-Pituitary-Thyroid-Axis) untersucht.

Genistein(GEN) ist in Soja enthalten und wird in den westlichen Ländern u. a. als Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie und sogar zur Krebsvorsorge auf dem Markt angeboten. Resveratrol (RES) kommt natürlicherweise im Rotwein vor und wird, aufgrund seiner vermeintlichen antioxidativen Eigenschaften, als Protektor des Herz-Kreislauf-Systems angepriesen. Das bis jetzt stärkste bekannte Phytoöstrogen 8-Prenylnaryngenin (8-PN) ist Bestandteil von weiblichem Hopfen, kommt daher in Bier vor und ist Hauptkomponente von pflanzlichen Präparaten, die mit dem Versprechen auf eine Brustvergrößerung verkauft werden. Bisphenol A (BPA) ist eine Substanz, die vor allem zur Herstellung von Kunststoffen dient, die u. a. für Zahnfüllungen und Trinkverpackungen verwendet werden. Benzophenon-2 (BP-2) wirkt in vielen kosmetischen Produkten als UV-Lichtabsorber. Dibuthylphthalat (DBP) ist ein (Plastik-)Weichmacher und wird besonders in Verpackungen von Nahrungsmitteln verwendet. Die Pflanzenschutzmittel Linuron (LIN) und Procymidon (Proc) werden auch in Deutschland zum Schutz von Porree und Möhren eingesetzt.

Entsprechend dem allgemeinen Expositionsrisiko wurden Ratten über drei Monate oral mit diesen Substanzen behandelt und der dosisabhängige Einfluss auf Enzyme der HPT-Achse

und T3-regulierter Endpunkte untersucht. Dazu wurden enzymatische und molekularbiologische Versuche durchgeführt, wobei nach Veränderungen in der Leber und teilweise in der Niere gesucht wurde, um eine mögliche Organselektivität zu erkennen.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die HPT-Achse ein relevantes Ziel für endokrin aktive Substanzen ist. Z.B. verursachte RES hier signifikante Veränderung der totalen T3-Serumkonzentration, der DIO 1-Aktivität, der DIO 1-mRNA Expression in der Leber, sowie eine signifikante Veränderung der Malatenzymaktivität. Die meisten Veränderungen in allen Versuchsgruppen sind nicht durch das Muster der klassischen hormonabhängigen Feedbackregulation zu erklären, man muss also von einer multimodalen Interaktion von endokrinen Disruptoren in der HPT-Achse ausgehen.

Es zeigten sich unter der Dauermedikation Effekte, die in vorausgegangenen Kurzzeitversuchen nicht zu erkennen waren. Die komplexen Effekte verlangen in Zukunft also eine breit gefächerte Annäherung in Hinsicht auf die Screeningmethoden, die Evaluation und die Risikoabschätzung von möglichen anti-thyroidal-wirkenden Substanzen. Die Anwendung in Therapien, in der Prävention oder als Konsumprodukt birgt unbekanntes, noch nicht abschätzbare, Risiken.

Literaturverzeichnis

- Adlercreutz H (1998). Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metabol* 12(4):605-23.
- Anfossi P, Roncada P, Stracciari GL, Montana M, Pasqualucci C, Montesissa C. (1993). Toxicokinetics and metabolism of linuron in rabbit: in vivo and in vitro studies. *Xenobiotica* 10:1113-23.
- Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL, Morgan TM, Burke GL (1996). Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 126(1):43-50.
- Ardies CM and Dees C. (1998). Xenoestrogens significantly enhance risk for breast cancer during growth and adolescence. *Medical Hypotheses* 50:457-464:
- Arthur JR, Nicol F, Beckett GJ (1990). Hepatic iodothyronine 5'-deiodinase. The role of selenium. *Biochem J* 272(2):537-40.
- Ashby J (2001). Increasing the sensitivity of the rodent uterotrophic assay to estrogens, with particular referenceto bisphenol A. *Environ Health Perspect* 109: 1091-1094.
- Aufmkolk M, Amir SM, Kubota K, Ingbar SH (1985a). The active principles of plant extracts with antithyroid activity: oxidation products of derivatives of 3,4-dihydroxycinnamic acid. *Endocrinology* 116:1677-1686.
- Aufmkolk M, Ingbar JC, Kubota K, Amir SM, Ingbar SH (1985b). Extracts and auto-oxidized constituents of certain plants inhibit the receptor-binding and the biological activity of Graves'immunoglobulins. *Endocrinology* 116:1687-1693.
- Aufmkolk M, Koehrlé J, Hesch RD, Cody V (1986). Inhibition of rat liver iodothyronine deiodinase. Interaction of aurones with the iodothyronine ligand-binding site. *J Biol Chem* 261:11623-11630.
- Banos G, Medina-Campos ON, Maldonado PD, Zamora J, Perez I, Pavon N, Pedraza-Chaverri J. (2005): Antioxidant enzymes in hypertensive and hypertriglyceridemic rats: effect of gender. *Clin Exp Hypertens*. 27(1):45-57.
- Banu SK, Govindarajulu P and Aruldas MM (2002). Testosterone and estradiol upregulate androgen and estrogen receptors in immature and adult rat thyroid glands in vivo. *Steroids* 67(13-14):1007-14.
- Barter R, Klaassen C (1992). UDP-Glucoromositytransferase inducers reduce thyroid hormone levels in rats by an extrathyroidal mechanism. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111: 36-42.

- Baur A, Bauer K, Jarry H, Köhrle J (1997). 3,5-diiodo-L-thyronine stimulates type 1 5'-deiodinase activity in rat anterior pituitaries in vivo and in reaggregate cultures and GH3 cells in vitro. *Endocrinology* 138(8):3242-8.
- Baur JA, Pearson KJ, Price NL, Jamieson HA, Lerin C, Kalra A, Prabhu VV, Allard JS, Lopez-Lluch G, et al. (2006). Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. *Nature* 444; 337-342.
- Beck MA, Esworthy RS, Ho YS, Chu FF (1998). Glutathione peroxidase protects mice from viral-induced myocarditis. *FASEB J* 12(12):1143-9.
- Beck V, Rohr U, Jungbauer A (2005). Phytoestrogens derived from red clover: An alternative to the estrogen replacement therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94 (5):499-518.
- Behne D, Wolters W (1983). Distribution of selenium and glutathione peroxidase in the rat. *J Nutr* 113(2):456-61.
- Behne D, Kyriakopoulos A, Meinhold H, Köhrle J (1990). Identification of type I iodothyronine 5'-deiodinase as a selenoenzyme. *Biochem Biophys Res Commun* 173(3):1143-9.
- Bermano G, Dyer JA, Sunde RA, Beckett GJ, Arthur JR, Hesketh JE (1995). Tissue-specific regulation of selenoenzyme gene expression during selenium deficiency in rats. *J Biochem* 311(Pt 2): 425-30.
- Bernal J and Nunez J (1995). Thyroid hormones and brain development. *Europ J Endocrinology* 133(4): 390-398.
- Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ and Larsen PR (2002). Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of iodothyronine selenodeiodinases. *Endocrine Reviews* 23(1): 38-89.
- Bogazzi F, Raggi F, Ultimieri F, Russo D, Campomori A, McKinney JD, et al. (2003). Effects of a mixture of polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) on the transcriptional activity of the thyroid receptor. *J Endocrinol Invest* 26: 972-978.
- Bohlmann F, Zdero C, King RM and Robinson H (1979). New prenylflavonoids from *Marshallia Grandiflora*. *Phytochemistry* 18: 1246-1247.
- Bolt HM und Degen GH (2000). Hormoneeffekte von Chemikalien in der Nahrung und Umwelt. *Chemie in unserer Zeit*, 34 (1), 30–37.
- Böttner M, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2006). Effects of long-term treatment with resveratrol and subcutaneous and oral estradiol administration on the pituitary-thyroid-axis. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114(2): 82-90.

- Bovee TF, Helsdingen RJ, Rietjens IM, Keijer J, Hoogenboom RL (2004). Rapid yeast estrogen bioassay stably expressing human estrogen receptor α and β , and green fluorescent protein: A comparison of different compounds with both receptor types. *J Biochem Mol Biol* 91(3): 99-109.
- Bowers JL, Tyulmenkov VV, Jernigan SC and Klinge CM (2000). Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 141(10): 3657-67.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Braverman LE, Ingbar SH, Sterling K (1970). *J Clin Invest* 49: 855.
- Brotans JA, Olea-Serrano MF, Villalobos M, Pedraza V, Olea N (1995). Xenoestrogens released from lacquer coatings in food Cans, *Environ Health Persp* 103: 608-612.
- Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit): www.bvl.de.
- Calafat AM, Kuklennyik Z, Reidy JA, Caudill SP, Ekong J and Needham L (2004). Urinary concentrations of bisphenol A and 4-nonylphenol in a human reference population. *Environ Health Persp* 113(4): 391-95.
- Capen CC (1996). Toxic responses of the endocrine system. In *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons* (Klaassen CC, Ed) pp 617-640. McGraw-Hill. New York.
- Cardullo RA, Agrawal S, Flores C, Zamecnik PC, Wolf DE (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci USA* 85(23): 8790-8794.
- Carlson HE, Jacobs LS and Daughaday WH (1973). Growth hormone, thyrotropin, and prolactin responses to thyrotropin-releasing hormone following diethylstilbestrol pretreatment. *J Clin Endocrinol Metab* 37(3): 488-490.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell K (1995). Biological effects of isoflavonoids in young woman: importance of the chemical composition of soybean products. *Br J Nutr* 74:587-601.
- Chang HC, Doerge DR (2000). Dietary Genistein inactivates rat thyroid peroxidase in vivo without an apparent hypothyroid effect. *Toxicol Appl Pharmacol* 168: 244-252.
- Chang GG, Tong L (2003). Structure and function of malic enzymes, a new class of decarboxylases. *American Chemical Society* 42 (44): 12721 -12733.

- Chen HJ and Walfish PG (1978). Effects of age and ovarian function on the pituitary thyroid system in female rats. *Endocrinology* 78: 225-232.
- Chen HJ and Walfish PG (1978). Effects of estradiol benzoate on thyroid-pituitary function in female rats. *Endocrinology* 103(4): 1023–1030.
- Cheng WH, Ho YS, Valentine BA, Ross DA, Combs GF Jr, Lei XG (1998). Cellular glutathione peroxidase is the mediator of body selenium to protect against paraquat lethality in transgenic mice. *J Nutr.* 128(7):1070-6.
- Cho BH, Park JR (1990). Estrogen induces hyperlipidemia in fasted chicks. *Proc Soc Exp Biol Med* 193: 104-109.
- Chun JC, Kim MY, Guengerich FP (1999). Resveratrol is a Selective Human Cytochrome P 450 1A1 Inhibitor. *Biochem Biophys Res Commun* 19; 262(1): 20-4.
- Christoffel J (2004). Endocrine potential of Genistein, Resveratrol and 8-Prenylnaringenin in gonadal and thyroid axes and related organs. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades . Christian-Albrechts-Universität Kiel.
- Colborn T and Clement C (1992). Chemically induced alterations in sexual and functional development: The wildlife/human connection. Princeton Scientific Publishing Co., Princeton-New Jersey.
- Colborn T, vom Saal FS and Soto AM (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Persp*, 101: 378–384.
- Coldham NG and Sauer MJ (2000). Pharmacokinetics of [(14)C] Genistein in the rat: gender-related differences, potential mechanisms of biological action, and implication for human health. *Toxicol Appl Pharmacol* 164(2): 206-15.
- Coldham NG and Sauer MJ (2001). Identification, quantitation and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement. *Food Chem Toxicol* 39(12): 1211-24.
- Coldham NG, Zhang AQ, Key P and Sauer MJ (2002). Absolute bioavailability of [14C] genistein in the rat; plasma pharmacokinetics of parent compound, genistein glucuronide and total radioactivity. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 27(4): 249-58.
- Cook JC, Mullin LS, Frame SR and Biegel LB (1993). Investigation of a mechanism for leydig cell tumorigenesis by linuron in rats. *Toxicology* 119(2): 195-204.
- Cos P, De Bruyne T, De Apers S, Vandem Berghe D, Pieters L, Vlietnick AJ (2003). Phytoestrogens- recent developments. *Planta Med* 69: 598-99.
- Da Costa VM, Moreira DG, Rosenthal D (2001). Thyroid function and aging: gender related differences. *Endocrinology* 171(1): 193-8.

- Danzo BJ (1998). The effects of environmental hormones on reproduction. *CMLS, Cellular and Molecular Life Sciences* 54: 1249–1264.
- David JM and Svendsgaard U (1990). U- shaped dose-response curves: their occurrence and implications for risk assessment, *J Toxicol Environ Health* 30: 71 – 83.
- Davidson B, Soodak M, Neary JT, Strout HV, Kieffer JD, Mover H, et al. (1978). The irreversible inactivation of thyroid peroxidase by methylmercaptoimidazole, thiouracil, and propylthiouracil in vitro and its relationship to in vivo findings. *Endocrinology* 103(3): 871-882.
- D'Angelo SA and Fisher JS (1969). Influence of estrogen on the pituitary-thyroid system of the female rat: mechanisms and loci of action. *Endocrinology* 84(1): 117–122.
- Deapen D, Liu L, Perkins C, Bernstein L, Ross RK (2002). Rapidly rising breast cancer incidence rate among asian-american woman. *Int J Cancer* 99: 747- 750.
- Degen GH, Foth H, Kahl R, Kappus H, Neumann HG, Oesch F, Schulte-Hermann R (1999). Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xenoöstrogene. Stellungnahme der Beraterkommission der Sektion Toxikologie der DGPT. DGPT-Forum 24, 30-36.
- DeVito M, Biegel L, Brouwer A, Brown S, Brucker-Davis F, et al. (1999). Screening methods for thyroid hormone disruptors. *Environ Health Perspect* 107(5): 407-15.
- Diel P, Smolnikar K, Schulz T, Laudenschlager U, Michna H and Vollmer G (2001). Phytoestrogens and carcinogenesis-differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium. *Hum Reprod* 16(5): 997-1006.
- Dijkstra G, de Rooij DG, de Jong FH, van den Hurk R (1996). Effects of hypothyroidism on ovarian follicular development, granulosa cell proliferation and peripheral hormonal levels in the pubertal rat. *Eur J Endocrinol* 134:649-654.
- Doerge DR and Chang HC (2002). Inactivation of thyroid peroxidase by soy isoflavones, in vitro and in vivo. *J Chromatogr B Technol Biomed Life Sci* 25: 269-79.
- Doerge DR and Sheehan DM (2002). Goitrogenic and estrogenic activity of soy isoflavones. *Environ Health Perspect* 110 (3): 349-353.
- Donda A, Reymond F, Rey F, Lemarchand- Beraud T (1990). Sex steroids modulate the pituitary parameters involved in regulation of TSH secretion in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 122(5):577-84.
- Dozin B, Magnuson MA and Nikodem VM (1985). Tissue-Specific Regulation of Two Functional Malic Enzyme mRNAs by Triiodothyronine. *Biochemistry* 24, 5581-5586
- Dunn JT and Dunn AT (2001). Update on intrathyroidal iodine metabolism. *Thyroid* 11: 407-414.

- Fennell TR, Snyder RW, Maness SC, Gaido KW, Sumner SCJ and Welsch F (2000). Metabolism and disposition of bisphenol A in female rats. (Abstract 1740), Society of Toxicology, 39th Annual Meeting, Philadelphia, PA, March 19-23, 2000, *Toxicological Sciences* (Supplement: *The Toxicologist*), Vol. 54(1): 371.
- Ferguson SA, Scallet A, Flynn KM, Meredith JM and Schwetz BA (2000). Development neurotoxicity of endocrine disruptors: focus on estrogens. *Neurotoxicology* 21(6), 947–956.
- Ferreira AC, Lisboa PC, Oliveira KJ, Lima LP, Barros IA, Carvalho DP (2002). Inhibition of thyroid type 1 deiodinase activity by flavonoids. *Food Chem Toxicol* 40: 913-917.
- Fialkowski O, Merker HJ, Talsness CE, Chahoud I (2000). Histopathological findings in the testes of rat male offspring following prenatal exposure to a low and a high dose of bisphenol A. in: Hormones and endocrine disrupters in food and water: Possible impact on human health. Workshop, Copenhagen, 27-30: 94-95.
- Flohé L, Gunzler WA, Schock HH (1973). Glutathione peroxidase: a selenoenzyme. *FEBS Lett* 32(1): 132-4.
- Flohé L, Gunzler WA (1984). Assays of glutathione peroxidase. *Methods Enzymol* 105:114-21.
- Foster PM, Lake BG, Thomas LV, Cook MW and Gangolli SD (1981). Studies on the testicular effects and zinc excretion produced by various isomers of monobutyl-phthalate in the rat. *Chem Biol Interact* 34, 233–238.
- Foster PM, Cook MW, Thomas LV, Walters DG and Gangolli SD (1983). Differences in urinary metabolic profile from di-n-butyl-phthalate treated rats and hamsters. A possible explanation for species differences in susceptibility to testicular atrophy. *Drug Metab Dispos* 11: 59–61.
- Frankel EN, Waterhouse AL, Kinsella JE (1993). Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. *Lancet* 341: 1103- 1104.
- Gärtner R, Albrich W, Angstwurm MW (2001). The effect of a selenium supplementation on the outcome of patients with severe systemic inflammation, burn and trauma. *Biofactors* 14 (1-4):199-204.
- Ghisari M, Bonefeld-Jorgensen EC (2005). Impact of environmental chemicals on thyroid hormone function in pituitary rat GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 244: 31-41.
- Gibson UE, Heid CA and Williams (1996). A novel method for real time quantitative RT-PCR. *Genome Research* 6: 995-1001.

- Gies A, Gottschalk C, Greiner P, Heger W, Kolossa M, Rechenberg B, et al. (2001). Umweltchemikalien, die auf das Hormonsystem wirken- Belastungen, Auswirkungen, Minderungsstrategien- www.umweltbundesamt.de/publikationen/fpdf-l/2530.pdf
- Glinoe D, Gershengorn MC, Dubois A, Robbins J (1977). Stimulation of thyroxine-binding globulin synthesis by isolated rhesus monkey hepatocytes after in vitro estradiol administration. *Endocrinology* 100:807.
- Glinoe D (1993). Maternal thyroid function. *J Endocrinol Invest* 16(5):374-8.
- Goldin BR, Brauner E, Adlercreutz H, Ausman LM, Lichtenstein AH (2005). Hormonal response to diets high in soy or animal protein without and with isoflavones in moderately hypercholesterolemic subjects. *Nutr Cancer* 51: 1-6.
- Gonzalez-Manchon C, Butta N, Ferrer M, Ayuso MS, Parrilla R (1997). Molecular cloning and functional characterization of the human cytosolic malic enzyme promoter: hormone responsiveness. *DNA Cell Biol* 16: 533-544.
- Gray LE, Jr, Ostby J, Furr J, Wolf CJ, Lambright C, Parks L, et al. (2001). Effects of environmental antiandrogens on reproductive development in experimental animals. *Human Reproduction Update* 7(3): 248–264.
- Gray LE Jr, Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J (1999). Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat. *Toxicol Ind Health* 15(1-2): 94-118.
- Gross J, Pitt-Rivers R (1952). *Lancet* 1: 439.
- Grueters A, Biebermann H, Krude H (2003). Neonatal thyroid disorders; Hormone research (Horm. res.) ISSN 0301-0163 CODEN HRMRA3 ; 59: 24-29:
- Gupta C (2000). Reproductive malformation of the male offspring following maternal exposure to estrogenic chemicals. *Proc Soc Exp Biol Med* 224: 61-68.
- Hallgren S, Darnerud PO (2002). Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated bisphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats: testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects. *Toxicology* 177(2-3): 227-243.
- Hardy MP, Sharma RS, Arambepola NK, Sottas CM, Russell LD, Bunick D, Hess RA, Cooke PS (1996). Increased proliferation of Leydig cells induced by neonatal hypothyroidism in the rat. *J Androl* 17:231-238.

- Harris AR, Vagenakis AG, Braverman LE (1979). Sex-related differences in outer ring monodeiodination of thyroxine and 3,3',5'-triiodothyronine by rat liver homogenates. *Endocrinology* 104(3): 645-52.
- Harris CA, Henttu P, Parker MG and Sumpter JP (1997). The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ Health Perspect* 105(8): 802–811.
- Hassold T and Hunt P (2001). To ERR (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2: 280–291.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ and Williams PM (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research* 6: 986-994.
- Herold G und Mitarbeiter (2004); Herausgeber: G. Herold, 50737 Köln.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G and Watson R (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions; *Bio/Technology* 11: 1026 – 1030.
- Hill RN, Erdreich LS, Paynter OE, Roberts OA, Rosenthal SL and Wilkensen CF (1989). Thyroid follicular cell carcinogenesis. *Fundam. Appl. Toxicol.* 12: 629-697.
- Ho YS, Magnenat JL, Bronson RT, Cao J, Gargano M, Sugawara M, Funk CD (1997). Mice deficient in cellular glutathione peroxidase develop normally and show no increased sensitivity to hyperoxia. *J Biol Chem* 272(26): 16644-51.
- Hoffmann GM, Nienhaus F, Poehling HM, Schönbeck F, Weltzien HC, Wilbert H (1994). in *Lehrbuch der Phytomedizin*, 3. Aufl. 439-446, Blackwell, Berlin.
- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 88: 7276-7280.
- Hotchkiss AK, Parks-Saldutti LG, Ostby JS, Lambright C, Furr J, Vandenberg JG and Gray LE Jr (2004). A mixture of the “antiandrogens” linuron and butyl benzyl phthalate alters sexual differentiation of the male rat in a cumulative fashion; *Biology of Reproduction* 71: 1852–1861.
- Howdeshell KL, Hotchkiss AK, Thayer KA, Vandenberg JG, vom Saal FS (1999). Environmental toxins—exposure to bisphenol A advances puberty. *Nature* 401(6755): 763–764.
- Hunt PA, Koehler KE, Susiarjo M, Hodges CA, Ilagan A, Voigt RC, et al. (2003). Bisphenol A exposure causes meiotic aneuploidy in the female mouse. *Curr Biol.* 13: 546–553.
- Il Hyun Kang, Hyung Sik Kima, Jae-Ho Shin, Tae Sung Kima, Hyun Ju Moona, In Young Kima, et al. (2004). Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin,

- procymidone, linuron, and *p, p*-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology* 199: 145–15.
- Jakobs TC, Koehler MR, Schmutzler C, Glaser F, Schmid M, Köhrle J (1997). Structure of the human type I 5'-iodothyronine 5'-deiodinase gene and localisation to chromosome 1p32-p33. *Genomics* 42: 361-363.
- Jakobs T, Schmutzler C, Meissner J, Köhrle J (1997). The promoter of the human type 1 5'-deiodinase gene: mapping of the transcription start site and identification of a DR+4 thyroid hormone responsive element. *Eur J. Biochem* 247: 288-297.
- Jang M, et al. (1997). Cancer chemoprotective activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275: 218-220, *Neuroreport* 8:1499- 1502.
- Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Koch L, Wuttke W (2004). Multiorganic endocrine disrupting activity of the UV screen benzophenone 2 (BP2) in ovariectomized adult rats after 5 days treatment. *Toxicology*. 205(1-2): 87-93.
- Jarry H, Schlecht C, Klammer H, Wuttke W (2005). Effects of the putative xenoestrogens Benzophenone-2 (BP2) and Octyl-methoxycinnamate (OMC) on gene expression in the rat pituitary. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 113: 186-189.
- Jobling S; Reynolds T, White R, Parker MG and Sumpter JP (1995). A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ Health Perspect* 103(6): 582–587.
- Ju YH, Allred CD, Allred KF, Karko KL, Doerge DR, Helferich WG (2001). Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast-cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *J. Nutr* 131(11): 2957-62.
- Kaldas MI, Walle UK and Walle T (2003). Resveratrol transport and metabolism by human intestinal Caco-2 cells. *J Pharm Pharmacol* 55(3): 307-12.
- Kalsbeek A, Buijs RM, van Schaik R, Kaptein E, Visser TJ, Doulabi BZ, Fliers E Daily (2004). Variations in type II iodothyronine deiodinase activity in the rat brain as controlled by the biological clock. *Endocrinology* 146(3): 1418-27.
- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, et al. (1996). Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104(4): 715-740.

- Kim HS, Han SY, Yoo SD, Lee BM, Park KL (2001). Potential estrogenic effects of Bisphenol A estimated by in vitro and in vivo combination assays. *J Toxicol Sci* 26: 111–118.
- Kirby JD, Arambepola N, Porkka-Heiskanen T, Kirby YK, Rhoads ML, Nitta H, et al. (1997). Neonatal hypothyroidism permanently alters follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone production in the male rat. *Endocrinology* 138: 2713-2721.
- Kitaoka M, Kadokawa H, Sugano M, Ichikawa K, Taki M, Takaishi S, et al. (1998). Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogens (Part1). Isolation of 8-Isopentenylnaringenin and an initial study on its structur-activity relationship, *Planta Med.* 64: 511-515.
- Kloas W (2002). Amphibians as a model for the study of endocrine disruptors. *Int Rev Cytol* 216, 1-57.
- Kopp P (1998). Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the „French Paradox“? *Europ J Endocrinol* 138: 619-620.
- Köhrle J, Schuppert F, Dreher I (1996). Divergent expressions of selenoproteins type I 5'-deiodinase and glutathione peroxidase in human thyroid tissue. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 104: 17.
- Köhrle J, Spanka M, Irmscher K, Hesch RD (1988). Flavonoid effects on transport metabolism and action of thyroid hormones. Alan R. Liss, New York (pp.323-340)
- Köhrle J (1999). The deiodinase family–selenoenzymes regulating thyroid hormone availability and action. *Cell Mol Life Sci* 57: 1853-1863.
- Köhrle J (1999). Local activation and inactivation of thyroid hormones: the deiodinase family. *Mol Cell Endocrinol.* 151(1-2): 103-19.
- Köhrle J (2000). Flavonoids as risk factors for goiter and hypothyroidism. Schattauer, Stuttgart (pp43-61).
- Köhrle J (2002). Iodothyronine deiodinases, *Methods Enzymol.* 347: 125-167.
- Köhrle J (2004). Schilddrüsenhormone: Metabolismus und Wirkungen. *Z. ärztl. Fortbild. Qual. Gesundheitswesen*, 98 Suppl V:17-24.
- Kovacs G, Hofmann PJ, Hamann I, Schmutzler C, Wuttke W, Jarry H, et al. 2004. Endocrine disruptors alter expression of the thyroid hormone-responsive gene malic enzyme in female rats. *Exp Clin Endocrinol Diab* 112:S70 (Abstract).
- Krishnan AN, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D (1993). Bisphenol A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclavation. *Endocrinology* 132: 2279- 2286.

- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigo R, Gladyshev VN (2003). Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science* 300(5624): 1439-43.
- Kubo K, Arai O, Omura M, Watanabe R, Ogata R, Aou S (2003). Low dose effects of bisphenol A on sexual differentiation of the brain and behavior in rats. *Neurosci Res.* 45: 345–356.
- Kuch H und Ballschmiter K (1999). Hormonell wirksame Verbindungen in der Umwelt Baden-Württembergs; Arbeitsbericht Nr. 151 Akademie für Technikfolgenabschätzung in Baden-Württemberg. ISBN 3-932013-93-x; ISSN 0945-9553.
- Kulling SE, Honig DM, Simat TJ and Metzler M (2000). Oxidative in vitro metabolism of the soy phytoestrogens daidzein and genistein. *J Agric Food Chem* 48(10): 4963-72.
- Kupier GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nielsson S, Gustafsson JA (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138 (3): 863-70.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology*; 139: 4252–4263.
- Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss AK, Mann PC and Gray LE Jr. (2000). Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: An antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicology* 56(2): 389-399.
- Lei XG, Evenson JK, Thompson KM, Sunde RA (1995). Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J Nutr* 1995;125(6):1438-46
- Leonard JL, Köhrle J (1996). Intracellular pathway of iodothyronine metabolism. In: Braverman LE., Utiger RD, (eds): Werner and Ingbar's; The Thyroid- A Fundamental and Clinical Text. Seventh. Ed. Philadelphia , USA; pp121-165. JB. Lippincott Company:
- Leonard JL, Rosenberg IN (1980). Iodthyronin 5'-deiodinase from rat kidney: substrate specificity and the 5'-deiodation of reverse triiodthyronin. *Endocrinology* 107: 1376-1383.
- Lima LP, Barros IA, Lisboa PC, Araujo RL, Silva AC, Rosenthal D, Ferreira AC, Carvalho DP (2006). Estrogen effects on thyroid iodide uptake and thyroperoxidase activity in normal and ovariectomized rats. *Steroids* 71(8): 653-9.

- Lisboa PC, Curty FH, Moreira RM, Oliveira KJ, Pazos-Moura CC (2001). Sex steroids modulate rat anterior pituitary and liver iodothyronine deiodinase activities. *Horm Metab Res* 33(9): 532-5.
- Lisboa PC, Curty FH, Moreira RM, Pazos-Moura CC (1997) Effects of estradiol benzoate on 5iodothyronine deiodinase activities in female rat anterior pituitary gland, liver and thyroid gland. *Brazilian J Med Res* 39: 1479-1484.
- Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu C, van Breemen RB, et al. (2001). Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem* 49(5): 2472-9.
- Livak KJ, Flood SJ, Marmaro J, Giusti W, Deetz K (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* 4(6): 357-362.
- Löffler G (2001) (Hrsg). Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 4.Auflage, S. 467 ff.
- Löffler G, Petrides PE (2003) (Hrsg.). Biochemie und Pathobiochemie. Springer Medizin Verlag, Heidelberg 7. Auflage, S. 871 ff.
- Lott HM and Barker SA (1993). Matrix solid-phase dispersion extraction and gas chromatography screening of 14 chlorinated pesticides in oyster *Crassostrea virginica*, *J Association of Analytical Chemistry* 76: 67–75.
- Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D and Ando S (2001). Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Mol Pharmacol* 60(3): 595-602.
- Maia AL, Kim BW, Huang SA, Harney JW, Larsen PR (2005). Type 2 iodothyronine deiodinase is the major source of plasma T3 in euthyroid humans. *J Clin Invest* 115(9): 2524-33.
- Mariash CN, Kaiser FE, Schwartz HL, Towle HC (1980). Synergism of thyroid hormone and high carbohydrate diet in the induction of lipogenic enzymes in the rat. *J Clin Invest* 65: 1124- 1126.
- Mariash CN, McSwigan CR, Towle HC, Schwartz HL, Oppenheimer JH (1981). Glucose and triiodothyronine both induce malic enzyme in rat hepatocyte culture. *J Clin Invest* 68: 1485-1490.
- Marier JF, Vachon P, Gritsas A, Zhang J, Moreau JP and Ducharme MP (2002). Metabolism and disposition of resveratrol in rats: extent of absorption, glucuronidation, and

- enterohepatic recirculation evidenced by a linked-rat model. *J Pharmacol Exp Ther* 302(1): 369-73.
- Markey CM, Luque EH, deToro MM, Sonnenschein C, Soto AM (2001). In utero exposure to bisphenol A alters the development and tissue organization of the mouse mammary gland. *Biol Reprod* 65: 1215–1223.
- Marty MS, Crissman JW, Carney EW (1999): Evaluation of the EDSTAC female pubertal assay in CD rats using 17 β -estradiol, steroid biosynthesis inhibitors, and a thyroid inhibitor. *Toxicol. Sci* 52: 269-277.
- Marugo M, Torre G, Bernasconi D, Fazzuoli L, Cassulo S, Giordano G (1991). Androgen receptors in normal and pathological thyroids. *J Endocrinol Invest*.14(1): 31-5.
- Matthews JB, Twomey K and Zacharewski TR (2001). In vitro and in vivo interactions of bisphenol A and its metabolite, bisphenol A glucuronide, with estrogen receptors alpha and beta. *Chemical Research in Toxicology* 14(2): 149-157.
- McClain RM, Levin AA, Posch R, Downing JC (1989). The effect of phenobarbital on the metabolism and excretion of thyroxine in rats. *Toxicol Appl Pharmacol.* 15; 99(2):216-28.
- Mellert W, Deckardt K, Walter J, Gfatter S, van Ravenzwaay B (2003). Detection of endocrine-modulating effects of the antithyroid acting drug 6-n-propy-2-thiouracil in rats, based on the "Enhanced OECD Test Guideline 407". *Regulatory Toxicol. and Pharmacol.* 38: 368-377.
- Messina M, Redmond G (2006). Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature. *Thyroid* 16: 249-258.
- Milligan SR, Balasubramanian AV, Kalita JC (1998). Relative potency of xenobiotic estrogens in an acute in vivo mammalian assay. *Environ Health Perspect* 106: 23–26.
- Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, DeCooman L, DeKeukeleire D (1999). Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer. *J Clin Endocrinol Metab* 85(12): 4912-5.
- Miljøproject nr.290 (1995). Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects. Ministry of Environment and Energy, Denmark, Danish Environmental Projection Agency, Miljø- og Energiministeriet Miljøstyrelsen.
- Miranda JL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer ML, Buhler DR (2000b). Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and non-prenylated chalcones and flavones in vitro. *J. Agric. Food Chem* 48: 3876- 84.

- Miyamoto M, Matsushita Y, Kiyokawa A, Fukuda C, Iijima Y, Sugano M, Akiyama T (1998). Prenylflavonoids: a new class of non-seroidal phytoestrogen (Part 2). Estrogenic effects of 8-isopentenylaringenin on bone metabolism. *Planta Med* 64 (6): 516-9.
- Miyashita K, Iriuchijima T, Takeuchi T, Mori M (1995). Regulation of rat liver type 1 iodothyronine deiodinase mRNA levels by testosterone. *Mol Cell Endocrinol* 115(2): 161-7.
- Mori M, Naito M, Watanabe H, Takeichi N, Dohi K, Ito A (1990). Effects of sex difference, gonadectomy, and estrogen on N-methyl-N-nitrosourea induced rat thyroid tumors. *Cancer Res* 50(23): 7662-7.
- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, et al. (2002). Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5185-5190.
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998). Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* 24: 954-8, 960, 962.
- Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD and Evans BA (2002). Phytoestrogen concentration in serum from Japanese men and women over 49 years of age. *J Nutr* 132: 3168- 3171.
- Mullis K. (1987). Process for amplifying nucleic acid sequences. *United States Patent* No. 4 683 202.
- Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M (2001). *Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH.
- Mylchreest E, Cattley CR and Foster PM (1998). Male reproductive tract malformations in rats following gestational and lactational exposure to di(n-butyl)phthalate: an antiandrogenic mechanism? *Toxicological Sciences* 43: 47-60.
- Mylchreest E, Sar M, Cattley CR, Foster PM (1999). Disruption of androgen-regulated male reproductive development by di-(n-butyl)phthalate during late gestation in rats is different from flutamide. *Toxicol Appl Pharmacol* 156: 81-95.
- Mylchreest E, Wallace DG, Cattley CR, Foster PM (2000). Dose-dependent alterations in androgen-regulated male-reproductive development in rats exposed to di(n-butyl)phthalate during late gestation. *Toxicology Science* 55: 143-51.
- Nagel SC, vom Saal FS, Thayer KA, Dhar MG, Boechler M, Welshons WV (1997). Relative binding affinity serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo*

- bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol. *Environ Health Perspect* 105: 70–76.
- Naveh-Many T, Almogi G, Livni N and Silver J (1992). Estrogen receptors and the biologic response in rat parathyroid tissue and the C cells. *J Clin Invest* 90(6): 2434-8.
- Nagahori H, Matsui M, Tomigahara Y, Matsunaga H, Kanekoh H, Nakatsuka I (1997). Metabolism of procymidone in female rabbits. *Nippon Noyaku Gakkaishi* 22(4): 293-298.
- Neumann F (1976). Pharmacological and endocrinological studies on anabolic agents. *Environ Qual Saf* 5(suppl) 253–264.
- Nikolic D, Li Y, Chadwick LR, Grubjesic S, Schwab P, Metz P and van Breemen RB (2004). Metabolism of 8-prenylnaringenin, a potent phytoestrogen from hops (*Humulus lupulus*), by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 32(2): 272-9.
- O'Connor JC, Frame SR, Davis LG, Cook LC (1999). Detection of thyroid toxicants in a tier I screening battery and alterations in thyroid endpoints over 28 days of exposure. *Toxicol Sci* 51: 54-70.
- O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS (2002). Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol. Sci.* 69: 92-108.
- Ochoa S (1955). "Malic" Enzyme. *Methods in Enzymology* Vol. 1(124): 739-753.
- Ogawa Y, Nishikawa M, Toyoda N, Yonemoto T, Gondou A, Inada M. (1999). Age- and sex-related changes in type-1 iodothyronine deiodinase messenger ribonucleic acid in rat liver and kidney. *Horm Metab Res.*31(5):295-9.
- Ostby J, Kelce WR, Lambright C, Wolf CJ, Mann P and Gray LE (1999). The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicology and Industrial Health* 15: 80–93.
- Ostrowska Z, Kos-Kudla B, Marek B and Kajdanuik D (2003). Influence of lighting conditions on daily rhythm of bone metabolism in rats and possible involvement of melatonin and other hormones in this process. *Endocr Regul* 37(3): 163-74.
- Pepper MS (2002). 8-Prenylnaringenin, a novel highly potent phytoestrogen inhibits angiogenesis in vitro and alters the endothelial cell proteolytic repertoire, Schering AG, Berlin.
- Pepper MS, Hazel SJ, Humpel M, Schleuning WG (2004). 8- Prenylnaringenin a novel phytoestrogen inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *J Cell Physiol.*199, 98-107.
- Petty KJ, Desvergne B, Mituhashi T, Nikodem VM (1990). Identification of a thyroid hormone response in the malic enzyme gene. *J Biol Chem* 265: 7395-7400.

- Pfaffl MW, Horgan GW, Daempfle L (2002a). Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Research* 30, No. 9, e36.
- Pinto RE, Bartley W (1969). The effect of age and sex on glutathione reductase and glutathione peroxidase activities and on aerobic glutathione oxidation in rat liver homogenates. *Biochem J* 112(1): 109-15.
- Pottenger LH, Domoradzki JY, Markham DA, Hansen SC, Cagen SZ, Waechter Jr. JM (1999). The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicology Sciences* 54: 3-18.
- Premachandra BN, Gossain WV, Perlstein IB (1977). Effect of pregnancy on thyroxine binding globulin (TBG) in partial TBG deficiency. *American J Med Sci* 274:189)
- Pritchett JJ, Kuester RK and Sipes IG (2002). Metabolism of bisphenol A in primary cultured hepatocytes from mice, rats and humans, *Drug Metabolism and Disposition*. 30(11): 1180-1185.
- Radice S, Chiesara E, Frigerio S, Fumagalli R, Parolaro D, Robino T, Marabini L (2005). Estrogenic effect of procymidone through activation of MAPK in MCF-7 breast carcinoma cell line. *Life Science* 78 (23): 2716-2723.
- Radovic B, Mentrup B, Köhrle J (2006). Genistein and other soya isoflavones are potent ligands for transthyretin in serum and cerebrospinal fluid. *British Journal of Nutrition* 95:1171-1176.
- Reid EE, Wilson E (1944). The relation of estrogenic activity to structure in some 4,4'-dihydroxy diphenylmethanes. *J Am Chem Soc* 66: 967-968.
- Riese C (2007). Einfluss des Geschlechts auf den Selenmetabolismus und die Biosynthese von Selenoproteinen. Manuskript zur Erlangung des akademischen Grades (Dr. rer. Nat.). Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin
- Robbins J (1996). Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia (pp.96-110).
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in health postmenopausal woman: principal results of the woman's health initiative randomized controlled trial; *JAMA* 288: 321- 333.
- Rotruck JT, Pope AL, Ganther HE, Swanson AB, Hafeman DG, Hoekstra WG (1973). Selenium: biochemical role as a component of glutathione peroxidase. *Science*. 179(73): 588-90.

- Russel W, Harrison RF, Smith D, Darzy K, Shalet S, Weetman AP (2008) Free Thriiodothyronine has a distinct circadian rhythm that is delayed but parallels thyrotropin levels. *J Clin Endocrinol Metab* 93(6):2300-6.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbour Laboratory press.
- Santini F, Hurd RE, Lee B, Chopra IJ (1994). Sex-related differences in iodothyronine metabolism in the rat: evidence for differential regulation among various tissues. *Matabolism* 43(6): 793-7.
- Santini F, Vitti P, Mammoli C, Rosellini V, Pelosini C, et al. (2003). In vitro assay of thyroid disruptors effecting TSH-stimulated adenylate cyclase activity. *J Endocrinol Invest* 26: 950-955.
- Schlecht C (2006). Untersuchung endokriner Effekte von Benzophenon-2 und 17 β -Estradiol in estrogen-rezeptiven Organen. Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades. Georg-August-Universität zu Göttingen.
- Schlecht C, Klammer H, Jarry H, Wuttke W (2004). Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology* 205(1-2): 123-30.
- Schneider MJ, Fiering SN, Thai B, Wu SY, St Germain E, Parlow AF, St Germain DL, Galton VA (2006). Targeted disruption of the type 1 selenodeiodinase gene (DIO1) results in marked changes in thyroid hormone economy in mice. *Endocrinology* 147(1): 580-9.
- Schmutzler C, Bacinski A, Ambrugger P, Huhne K, Grütters A, Köhrle J (2006). Thyroid hormone biosynthesis is a sensitive target for the action of endocrine disrupting chemicals (EDC); *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 114.
- Schmutzler C, Bacinski A, Ambrugger P, Klammer H, Wuttke W, Grütters A, Jarry H, Köhrle J (2006). The UV filter benzophenone 2 inactivates human recombinant thyroperoxidase in vitro and disturbs thyroid hormone homeostasis in rats. *Endocrine Abstracts* 11 p.429.
- Schmutzler C, Bacinski A, Gotthardt I, Huhne K, Ambrugger P, Klammer H, Schlecht C, et al. (2007). The UV filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroperoxidase. *Endocrinology* 148(6): 2835-2844.
- Schmutzler C, Hamann I, Hofmann PJ, Kovacs G, Stemmler L, Mentrup B, Schomburg L, Ambrugger P, Grütters A, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W, Köhrle J (2004).

- Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. *Toxicology* 205(1-2): 95-102.
- Schomburg L, Bauer K (1997). Regulation of the adeno-hypophyseal thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme by estradiol. *Enzymol* 138(9):3587-93.
- Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, Talsness CE, Paul M, Chahoud I (2002). Parent bisphenol A accumulation in the human maternal–fetal–placental unit. *Environ Health Perspect.* 110: A703–A707.
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel J, Wuttke W (2003). Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat, uterus. *Maturitas* 44(1): 39-50.
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2005). Effects of bisphenol A (BPA), dibutylphthalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc) and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: A 3 month comparison with effects of Estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) Rats. *Toxicology* 15: 13-24.
- Setchell KD, Welsh MB and Lim CK (1987). High performance liquid chromatographic analysis of phytoestrogens in soy protein preparations with ultraviolet, electrochemical and thermospray mass spectrometric detection. *J Chromatogr.* 386: 315-23.
- Sheehan DM, Willingham E, Gaylor D, Bergeron JM, Crews D (1999). No threshold dose for estradiol-induced sex reversal of turtle embryos: How little is too much?. *Environ Health Perspect* 107: 155–159.
- Shepard TH, Pyne GE, Kirschvink JF and McLean CM (1960). Soybean goiter. *N Engl J Med* 262: 1099-1103.
- Sheridan PJ, McGill Jr HC, Lissitzky JC and Martin PM (1984). The primate thyroid gland contains receptors for androgens. *Endocrinology* 115: 2154-2159.
- Shirataki Y, Motohshi N, Tani S, Skagami H, Satoh K, Nakashima H, Mahapatra SK, et al. (2001). In vitro biological activity of prenylflavones. *Anticancer Res* 21: 275-80.
- Sinitzyna O, Krysanova Z, Ishchenko A, Dikalova AE, Stolyarov S, Kolosova N, et al. (2006). Age-associated changes in oxidative damage and the activity of antioxidant enzymes in rats with inherited overgeneration of free radicals. *J Cell Mol Med* 10(1): 206-15.
- Sissan MA, Leelamma S (1996). Influence of components of oral contraceptive on lipid metabolism. *Indian J Exp Biol* 34: 131-134.

- Soleas GJ, Diamondis EP, Goldberg DM (1997). Resveratrol: A Molecule Whose Time has Come? And Gone? *Clin Biochem* 30: 91-113.
- Song MK, Dozin B, Drieco D, Rall JE, Nikodem VM (1988). Transcriptional activation and stabilization of malic enzyme mRNA precursor by thyroid hormone. *J Biol Chemistry* 263 (34).
- Song MK, Grieco D, Rall JE, Nikodem VM (1989). Thyroidhormon-mediated transcriptional activation of the rat liver malic enzyme gene by dehydroepiandrosterone. *J Biol.Chemistry* 264: 18981-18985.
- Sosic-Jurjevic B, Filipovic B, Milosevic V, Nestorovic N, Manojlovic-Stojanoski M, Brkic B and Sekulic M (2005). Chronic estradiol exposure modulates thyroid structure and decreases T4 and T3 serum levels in middle-aged female rats. *Horm Res* 63(1): 48–54.
- Steinmetz R, Brown NG, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N (1997). The environmental estrogen bisphenol A stimulates prolactin release in vitro and in vivo. *Endocrinology* 138: 1780–1786.
- Steinmetz R, Mitchner NA, Grant A, Allen DL, Bigsby RM, Ben-Jonathan N (1998). The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and *c-fos* gene expression in the female reproductive tract. *Endocrinology* 139: 2741–2747.
- Stephens FO (1997). Breast cancer: Aetiological factors and associations (a positive protective role of phytoestrogens). *Aust N Z J Surg* 67(11): 755-60.
- Streckfuss F, Hamann I, Schomburg L, Michaelis M, Sapin R, Klein MO, Köhrle J, Schweizer U (2005). Hepatic deiodinase activity is dispensable for the maintenance of normal circulating thyroid hormone levels in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 337(2): 739-45.
- Sunde RA, Thompson BM, Palm MD, Weiss SL, Thompson KM, Evenson JK (1997). Selenium regulation of selenium-dependent glutathione peroxidases in animals and transfected CHO cells. *Biomed Environ Sci* 10(2-3): 346-55.
- Swan SH, Main KM, Liu F, Stewart SL, Kruse RL, Calafat AM, et al. (2005): Decrease in Anogenital Distance among Male infants with prenatal phthalate exposure. *Environment Health Perspectives* 113, 1056-61.
- Takagi H, Mitsumori K, Onodera H, Nasu M, Tamura T, Yasuhara K, et al. (2002). Improvement of a two-stage carcinogenesis model to detect modifying effects of endocrine disrupting chemicals on thyroid carcinogenesis in rats. *Cancer Lett* 178(1):1-9.

- Takeuchi T, Tsutsumi O. (2002). Serum bisphenol A concentrations showed gender differences, possibly linked to androgen levels. *Biochem Biophys Res Commun* 291:76–78.
- Tanaka A, Matsumoto A and Yamaha T (1978). Biochemical studies on phthalic esters. Metabolism of dibutyl phthalate (DBP) in animals. *Toxicology* 9, 109–123.
- Tahara S, Katagiri Y, Ingham J and Mizutani J (1994). Prenylated Flavonoids in the roots of yellow lupin. *Phytochemistry* 36: 1261- 1271.
- Takahashi O, Oishi S. (2000). Disposition of orally administered 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane (bisphenol A) in pregnant rats and the placental transfer to fetuses. *Environment Health Perspectives* 108:931–935.
- Taurog A (2005). Hormone synthesis. In: Braverman LE, Utiger RD, eds. Werner and Ingbar's The Thyroid: a fundamental and clinical text. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Thiruvengadam A, Govindarajulu P, Aruldas MM (2003). Modulatory effects of estradiol and testosterone on development of N-nitrosodiisopropanolamine induced thyroid tumors in femal rats. *Endocrin Res* 29(1): 43-51.
- Toda S, Shirataki Y (2000). Inhibitory effects of sophoraflavones B and H in sophora mooracroftiana Beth ex Baker on copper-ion-induced protein oxidative modification of mice brain homogenate in vitro. *Biol Trace Elem Res* 58: 157- 62.
- Tominaga S, Kuroishi T (1995). Epidemiology of breast cancer in Japan. *Breast Cancer* 2:1-7.
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwereman A, Grandjean P, Guillette LJ Jr, Jegou B, et al. (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104: 741–803.
- Toppari J (2002). Enviromental endocrine disruptors and sexual differentiation. *Semin. Reprod Med.* 20: 305- 312.
- Turner RT, Evans GL, Zhang M, Maran A and Sibonga JD (1999). Is Resveratrol an estrogen agonist in growing rats? *Endocrinology* 140(1): 50-4.
- Vanni A, Gamberini R, Calabria A and Pellegrino V (2000a). Determination of presence of fungicides by their common metabolite, 3,5-DCA, in compost, *Chemosphere* 41: 453–458.
- van den Berg KJ (1990). Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin. *Chem Biol Interact* 76: 63-75.

- Van Wyk JJ, Arnold MB, Wynn J, Pepper F (1959). The effects of a soybean product on thyroid function in humans. *Pediatrics* 24: 752-760.
- Vinggaard AM, Breinholt V, Larsen JC (1999a). Screening of selective pesticides for estrogen receptor activation in vitro. *Food Addit Contam* 16: 533-542.
- Vinggaard AM, Joergensen EC, Larsen JC (1999b). Rapid and sensitive reporter gene assay for detection of antiandrogenic and estrogenic effects of environmental chemicals. *Toxicol. Appl Pharmacol.* 155: 150-160.
- vom Saal FS, Cooke PS, Buchanan DL, Palanza P, Thayer KA, Nagel SC, et al. (1998). A physiological based approach to the study of bisphenol A and other estrogenic chemicals on the size of reproductive organs, daily sperm production, and behavior. *Toxicol Ind Health.* 14: 239–260.
- Van Patten CL, Olivotto IA, Chambers GK, Gelmon KA, Hislop TG, Templeton E, et al. (2002). Effect of soy phytoestrogens on hot flushes in postmenopausal woman with breast cancer: A randomized, controlled clinical trial, *J Clin Oncol* 20(6): 1449-55.
- Völkel W, Colnot T, Csanády GA, Filser JG and Dekant W (2002). Metabolism and kinetics of bisphenol A in humans at low doses following oral administration. *Chem Res Toxicol* 15 (10): 1281-1287.
- Wang Y, Catana F, Yang Y, Roderick R and van Breemen RB (2002). An LC-MS method for analyzing total resveratrol in grape juice, cranberry juice, and in wine. *J Agric Food Chem* 50(3):431-5.
- Welshons WV, Nagel SC, Thayer KA, Judy BM, Vom Saal FS (1999). Low-dose bioactivity of xenoestrogens in animals: fetal exposure to low doses of methoxychlor and other xenoestrogens increases adult prostate size in mice. *Toxicol Ind Health* 15:12-25.
- Welshons WV, Nagel SC, vom Saal FS (1998). The importance of protocol design and data reporting to research on endocrine disruption: response [Letter] *Environ Health Perspect* 106: A316–A317.
- White R, Jobling S, Hoare SA, Sumpter JP, Parker MG (1994). Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology* 135:175–182.
- White CR, Seymour RS (2005). Allometric scaling of mammalian metabolism. *J Exp Biol* 208:1611–1619.
- Whitehead MI, Townsend PT, Gill DK, Collins WP, Campbell S (1980). Absorption and metabolism of oral progesterone. *Br Med J* 280(6217):825-827.
- Witorsch RJ (2002). Low-dose in utero effects of xenoestrogens in mice and their relevance to humans: an analytical review of the literature. *Food Chem. Toxicol.* 40: 905-912.

- Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997b). Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *Biotechniques* 22: 130-131, 134-138.
- Wuttke W, Jarry H, Seidlova-Wuttke D (2007). Isoflavones-safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev.*
- Xu Z, Wu Q and Godber JS (2002). Stabilities of daidzin, glycitin, genistein, and generation of derivatives during heating. *J Agric Food Chem* 50(25):7402-6.
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Yakebe Y, Sawaki M, Imatanaka N and Takatsuki M (2002). Comparison of reporter gene assay and immature rat utererotrophic assay of twenty-three chemicals. *Toxicology* 170: 21-30.
- Yamamoto T, Ohkuwa T, Itoh H, Sato Y, Naoi M (2002). Effect of gender differences and voluntary exercise on antioxidant capacity in rats. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2002;132(4):437-44.
- Yamauchi K, Ishihara A, Fukazawa H, Terao Y (2003). Competitive interactions of chlorinated phenol compounds with 3,3',5 triiodothyronine binding to transthyretin: detection of possible thyroid-disrupting chemicals in environmental waste water. *Toxicol Appl Pharmacol* 187: 110-117.
- Youdim KA, Spencer JP, Schroeter H, Rice-Evans C (2002). Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem* 383: 503-19.
- Young JK (1986). Thyroxine treatment reduces the anorectic effect of estradiol in rats. *Behav Neurosci* 100(2): 284-287.
- Yu C, Shin YG, Chow A, Li Y, Kosmeder JW, et al. (2002). Human, rat, and mouse metabolism of Resveratrol. *Pharm Res* 19(12): 1907-14.
- Ziegler RG, Hoover RN, Pike MC, Hildesheim A, Nomura AM, et al. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American woman. *J Natl Cancer Inst* 85 (22):1819-27.
- Zoeller RT (2005). Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals. *Mol Cell Endocrinol* 242: 10-15.

Appendix

Zusammensetzung der Nahrung

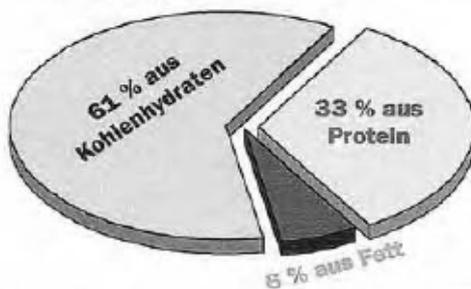
ssniff® SM R/M, phytöstrogenarm (Soja-frei) S8585-S010 *Ratten*

Nährstoffgehalt

Rohnährstoffe	[%]	Mineralstoffe	[%]
Trockensubstanz	88,0	Calcium	1,00
Rohprotein (N x 6,25)	19,1	Phosphor	0,70
Rohfett	2,2	Natrium	0,20
Rohfaser	4,1	Magnesium	0,17
Rohasche	5,8	Kalium	0,70
Stärke	40,0		
Zucker	3,1		

Energie	[MJ/kg]
Bruttoenergie, GE	16,2
Umsetzbare Energie, ME	12,9

Verteilung der ME



Fettsäuren	[% im Futter]
C 16:0	0,33
C 18:0	0,03
C 18:1 n9	0,32
C 18:2 n6	1,18
C 18:3 n3	0,17

Vitamine	[pro kg]
Vitamin A	15.000 IE
Vitamin D ₃	1.000 IE
Vitamin E	110 mg
Vitamin K	5 mg
Vitamin B ₁ (Thiamin)	19 mg
Vitamin B ₂ (Riboflavin)	21 mg
Vitamin B ₆ (Pyridoxin)	19 mg
Vitamin B ₁₂ (Cobalamin)	100 µg
Biotin	450 µg
Pantothensäure	35 mg
Folsäure	6 mg
Nicotinsäure	105 mg
Cholinchlorid	2.450 mg

Aminosäuren	
Lysin	1,04 %
Methionin	0,35 %
Met+Cys	0,70 %
Threonin	0,78 %
Tryptophan	0,25 %
Arginin	0,95 %
Histidin	0,42 %
Valin	1,03 %
Isoleucin	0,85 %
Leucin	1,48 %
Phenylalanin	0,97 %
Phe+Tyr	1,74 %
Glycin	0,88 %
Glutaminsäure	3,75 %

Spurenelemente	[pro kg]
Eisen	145 mg
Mangan	80 mg
Zink	100 mg
Kupfer	14 mg
Iod	2,1 mg
Selen	0,4 mg
Cobalt	2,1 mg

Zusammensetzung: Getreide, Pflanzliche Nebenerzeugnisse, Pflanzliche Eiweißextrakte, Pflanzliche Fette, Mineralstoffe, Vitamine und Spurenelemente.

Eidstaatliche Erklärung

„Ich, Inga Nobis, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Wirkung ausgewählter endokriner Disruptoren auf T3-regulierte Endpunkte in der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsenhormon-Achse und verschiedene von ihr regulierte Enzyme“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Desweiteren versichere ich, dass die vorliegende Dissertation weder ganz, noch zum Teil, bei einer anderen Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen hat.

Berlin, den

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die dazu beigetragen haben, dass diese Arbeit in der vorliegenden Form zustande kam.

Herrn Prof. Dr. J. Köhrle und Cornelia Schmutzler danke ich für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die intensive Betreuung.

Inka Gotthardt möchte ich für die uneingeschränkt ausdauernde Betreuung danken.

Frau Katrin Huhnen, Frau Conny Riese danke ich vor allem für die technische Unterstützung. Besonders möchte ich mich für die herzliche Aufnahme und die gute Atmosphäre im Team der experimentellen Endokrinologie Charité bedanken

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.