

**Aus dem Department für Endokrinologie  
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)**

**der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

---

*Effekte von Östradiol, Equol, Cimicifuga racemosa und Metformin im Serum  
und auf die Histomorphologie im Uterus  
der ovariectomierten Ratte*

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

vorgelegt von  
Frauke Schebb  
aus  
Bremen

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

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

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Knabe (Korreferent)

III. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Gründker (Drittreferent)

IV. Berichterstatter: Prof. Dr. med., Dr. rer. nat. Crozier (Promotor-Vertretung)

Tag der mündlichen Prüfung: 17.11.2010

# **Inhaltsverzeichnis**

<b>I Einleitung</b>	<b>1</b>
1. Klimakterium	1
1.1 Hormonelle Veränderungen	2
1.2 Klimakterisches Syndrom	2
2. Sexualsteroid	3
2.1 Östrogen (17 $\beta$ Östradiol = E2)	4
2.2 Östrogenrezeptoren (ER alpha und ER beta)	5
2.3 SERMs	6
3. Hormonersatztherapie	7
4. Phytoöstrogene	9
4.1 Equol	10
4.2 Cimicifuga racemosa	11
5. Metformin	12
6. Die Ratte als Tiermodell	13
7. Die untersuchten Parameter	14
7.1 Uterus	14
7.2 Serum- Hormonwerte	15
8. Ziele	17
<b>II Material und Methoden</b>	<b>19</b>
1. Tierversuch	19
1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen	19
1.2 Ovariectomie	19
1.3 Testsubstanzen und Versuchsablauf	20
1.4 Serumanalyse	21
1.5 Histologische Methoden und Aufarbeitung des Uterus	21
2. Statistische Methoden	23
<b>III Ergebnisse</b>	<b>24</b>
1. Tierfutteraufnahme	24
2. Gewichte	27
2.1 Tiergewicht	27
2.2 Uterusgewicht	29
3. Uterushistologie	30
3.1 Myometrium und Endometrium	30

3.2 Epithel des Endometriums _____	33
4. Analyse der Hormongehalte des Serums _____	37
4.1 Östradiolwerte _____	37
4.2 LH- Werte _____	38
4.3 TSH- Werte _____	39
4.4 IGF-1- Werte _____	39
5. Zusammenfassung der Ergebnisse _____	41
<b>IV Diskussion _____</b>	<b>43</b>
1. Zielsetzung _____	43
2. Wirkung auf das Körpergewicht _____	44
3. Wirkung auf den Uterus _____	45
3.1 Wirkung auf das Uterusgewicht _____	45
3.2 Wirkung auf die Histomorphologie des Uterus _____	47
3.2.1 Myometrium _____	47
3.2.2 Endometrium _____	48
3.2.3 Epithel des Endometriums _____	50
4. Wirkung auf die Serumparameter _____	51
4.1 Östradiolwerte (E2-Serumkonzentration) _____	51
4.2 LH- Werte _____	52
4.3 TSH- Werte _____	53
4.4 IGF-1- Werte _____	54
5. Limitierung der Studie _____	56
<b>V Zusammenfassung _____</b>	<b>58</b>
<b>VI Literaturverzeichnis _____</b>	<b>61</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ca	Karzinom
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CR	Cimicifuga racemosa, black cohosh, Traubensilberkerze
E2	17β- Östradiol, Östrogen
ER	Östrogenrezeptor(en)
ER $\alpha$	Östrogenrezeptor alpha
ER $\beta$	Östrogenrezeptor beta
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GH	Wachstumshormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HDL	High Density Lipoprotein
HET	Hormonersatztherapie
IGF-1	Insulin-like growth factor
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
$\mu$ l	Mikroliter
$\mu$ m	Mikrometer
Min.	Minute
ng	Nanogramm
ovx	Ovarektomie, ovariectomiert
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PCOS	Polyzytisches Ovarialsyndrom
PRL	Prolaktin
p. o.	per os
POF	Premature ovarian failure
RIA	Radioimmunoassay
S. D. -Ratten	Sprague- Dawley- Ratten
SEM	Standardfehler der Mittelwerte
SERM	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren
s. c.	subkutan
t3	Trijodthyronin
t4	Thyroxin
TAG	Triacylglycerid
TRH	Thyreotropin Releasing Hormone
TSH	Thyroidea stimulierendes Hormon

WHI

Women's Health Initiative

# **I Einleitung**

## **1. Klimakterium**

Das Klimakterium (Wechseljahre) ist für Frauen eine entscheidende Lebensphase und bezeichnet die Jahre der hormonellen Umstellung vor und nach der Menopause. Diese Übergangsphase von der Geschlechtsreife bis zum Senium ist ein natürlicher Abschnitt im Leben der Frauen und grundsätzlich nicht als Krankheit zu bewerten.

Das Klimakterium wird in verschiedene Stadien eingeteilt. Als Prämenopause wird nach neuerer WHO- Definition die gesamte Phase der reproduktiven Periode bis zur Menopause zusammengefasst, die Perimenopause umfasst 2 Jahre (max. 4) um das Menopausenalter herum (vor und nach der Menopause) und die Postmenopause schließt sich daran an. Die Menopause ist definiert als letzte vom Ovar gesteuerte uterine Blutung (Göretzlehner und Lauritzen 2000), d.h. es kommt zum permanenten Stillstand der Menstruation als Resultat der verloren gegangenen Eierstock/Follikel- Aktivität (Burger et al. 2007)

Das mittlere Alter der Frauen bei Eintritt in die Menopause liegt bei 51,4 Jahren (Gold et al. 2001) und variiert zwischen dem 45. und 60. Lebensjahr (Schwenkhagen 2007). Verschiedene Faktoren nehmen auf diesen Zeitpunkt Einfluss. Eine bestehende/ frühere Herzerkrankung und soziale Aspekte (Scheidung oder Verwitwung, Rauchen, eine geringere Schulbildung, Arbeitslosigkeit etc.) führen zu einer Menopause in jüngeren Jahren, während eine größere Kinderanzahl (Anzahl der Schwangerschaften) und eine frühere Einnahme von oralen Kontrazeptiva zu einer späteren Menopause führen (Gold et al. 2001). Ebenso wirkt sich die Zykluslänge auf den Zeitpunkt der letzten Menstruationsblutung aus. Frauen, deren Zyklus kürzer als 26 Tage war, erreichen die Menopause durchschnittlich 1,4 Jahre früher als die, deren Zyklus zwischen 26 und 32 Tagen lag (Whelan et al. 1990).

Etwa mit dem 70. Lebensjahr beginnt das Senium (Göretzlehner und Lauritzen 2000). Da die Lebenserwartung gegenwärtig sehr hoch ist und z. Zt. weiter ansteigt (im Jahr 2007 betrug die durchschnittliche Lebenserwartung der in der Bundesrepublik Deutschland neugeborenen Mädchen 82,1 Jahre (Statistisches Bundesamt Deutschland)), verbringen Frauen somit ein Drittel ihres Lebens als postmenopausale, und damit unfruchtbare, Individuen (Greendale und Judd 1993).

## 1.1 Hormonelle Veränderungen

Als Folge der nachlassenden Aktivität der Eierstöcke und durch die Abnahme der Follikelzahl mit steigendem Alter kommt es zu endokrinen Veränderungen in den Wechseljahren. So kommt es schon am Ende der Prämenopause zum Nachlassen der zyklischen Östradiol- und Progesteronproduktion (Göretzlehner und Lauritzen 2000). Bereits ab dem 40. Lebensjahr kommt es zu Umstellungen in der Hypophysen- Ovar- Achse. Ein selektiver Anstieg der FSH- und LH- Werte im Serum tritt zeitgleich mit der verringerten Zahl an aktiven Follikeln im Ovar auf (Burger 1996). Als Mechanismus für die hohen prämenopausalen FSH- Werte wird u.a. die verminderte Produktion von Inhibin A und B in den Ovarien angenommen. Als Reaktion auf die niedrigen Inhibin- Werte schüttet die Hypophyse vermehrt FSH aus (Burger 1999). In der Postmenopause erreichen die Gonadotropine ihre Maximalwerte (FSH>LH), die E2- Spiegel sind niedrig und Inhibin B ist nicht mehr nachweisbar (Burger et al. 2007).

Die Östrogensynthese endet mit der Funktionsaufgabe der Ovarien nicht gänzlich. Durch die sog. „extragonadale Aromatisierung“ wird in verschiedenen Geweben (vor allem im Fettgewebe) aus Androstendion das wichtigste Steroidhormon der Postmenopause Estron synthetisiert (Göretzlehner und Lauritzen 2000).

## 1.2 Klimakterisches Syndrom

Im Zuge der oben beschriebenen hormonellen Umstellungen kommt es bei vielen Frauen häufig zu Symptomen, die allgemeingültig unter dem Begriff „klimakterisches Syndrom“ oder „Menopausensyndrom“ zusammengefasst werden. Es gibt allerdings kein universelles Menopausensyndrom. Die Symptomwahrnehmung zwischen den Ethnien variiert und viele Frauen gehen beschwerdefrei durch die Wechseljahre (Avis et al. 2001). So klagen nur 17% der Frauen in China über Hitzewallungen, in Europa leiden dagegen zwischen 70 und 80% der Befragten unter diesem typischen Wechseljahressymptom (Karger 2001). Die Menopause wird aber assoziiert mit der Entstehung einiger Erkrankungen wie z.B. Osteoporose, kardiovaskuläre Erkrankungen und Krebs (Castelo-Branco und Rostro 2006) sowie mit der Prävalenz des metabolischen Syndroms durch die Zunahme des Stammfettes, der LDL- Zunahme und HDL- Abnahme und der steigenden Glucose- und Insulinwerte (Carr 2003).



Psychische Auswirkungen wie Nervosität und vor allem depressive Symptomatiken treten während der gesamten Wechseljahre gehäuft auf. Der geringere Östrogenspiegel wird als Risikofaktor für depressive Verstimmungen betrachtet (Maartens et al. 2002).

Durch den Östrogenwegfall kommt es in der Postmenopause zur Atrophie des Urogenitaltraktes, insbesondere das Vaginalepithel ist davon betroffen. Neben Dyspareunia und Pruritis vulvae kommt es häufig zu Entzündungen und zu urologischen Erkrankungen (Brizzolara et al. 1999; Pandit und Ouslander 1997). Im Uterus kommt es durch eine Abnahme der Zellzahl und durch Verkleinerung der Zellen zu einer Atrophie des Myo-, Endometriums und der Epithelzellen des Endometriums, da die proliferierende Wirkung des Östrogens fehlt.

## 2. Sexualsterioide

Östrogen, Progesteron und Testosteron sind die bekanntesten Vertreter der Sexualsterioide und gehören zu der Gruppe der Steroidhormone (Abb. 1). Gebildet werden sie alle aus einem körpereigenen vom Cholesterin abgeleiteten Steroid- Grundgerüst. Syntheseort ist bei Frauen vor allem das Ovar, welches Östrogen, Progesteron und Testosteron bildet. Bei den Männern findet im Testis die Synthese von Testosteron statt. Bei beiden Geschlechtern tragen die Nebennierenrinde und das Fettgewebe ebenfalls in geringeren Mengen zur Synthese bei. Steroidhormone gehören zu den Lipidhormonen. Da sie schlecht wasserlöslich sind, erfolgt der Transport im Blut an Plasmaeiweiße gebunden (Löffler 2003).

Steroidhormone binden in den Zellen an verschiedene, für sie spezifische, Rezeptoren und entwickeln durch ligandenaktivierte Transkription verschiedener Gene diverse Wirkungen.

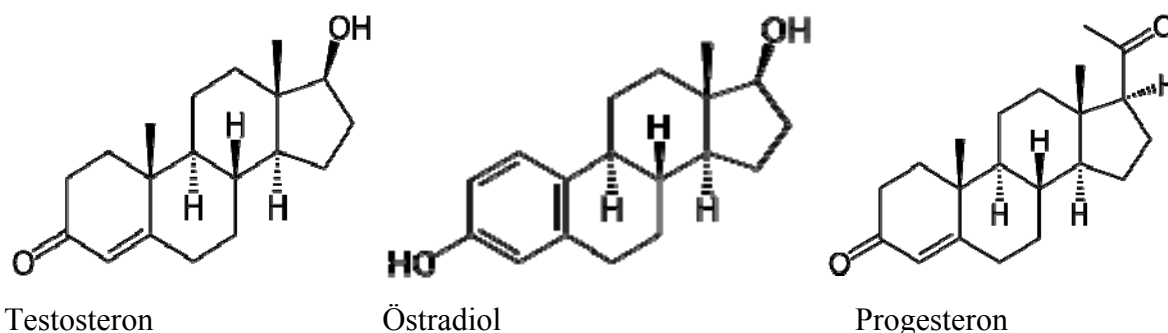


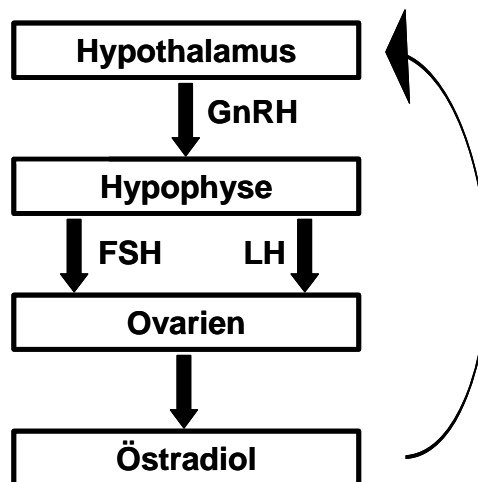
Abbildung 1: Steroidhormone

## 2.1 Östrogen (17 $\beta$ Östradiol = E2)

Östrogene, bestehend aus 18 C-Atomen, werden durch Enzyme (z.B. Aromatase) aus verschiedenen (Zwischen-)Produkten der Steroidgenese (z.B. Testosteron, Estron) gebildet.

Das wichtigste im menschlichen Körper vorkommende natürliche Östrogen ist Östradiol. Die Serumkonzentration unterliegt den hormonellen Zyklusschwankungen und nimmt mit zunehmendem Alter, aufgrund der Atresie der Follikel, stetig ab.

Die Steuerung der ovariellen Östrogensynthese geschieht über einen Regelkreislauf der Hypothalamus- Hypophysen-Gonaden-Achse (Abb. 2). Von dem Hypothalamus pulsatil ausgeschüttetes Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) regt die Hypophyse zur Gonadotropinabgabe an. LH und FSH stimulieren im Ovar die Follikelreifung was, über mehrere chemische Reaktionen, zur Synthese von Östradiol führt. Ansteigende Östrogenspiegel hemmen über negative Feedbackmechanismen die zentrale Hormonproduktion (Göretzlehner und Lauritzen 2000; Löffler 2003).



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung der Hypothalamus- Hypophysen- Gonaden- Achse

Östrogene nehmen Einfluss auf viele Geschehnisse im Körper. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Zelldifferenzierung und kontrollieren so das Wachstum und die Aufrechterhaltung der Zielgewebe. Dabei rufen sie neben positiven Effekten, wie z.B. Zunahme der Knochendichte durch die Hemmung der Osteoklasten (Wuttke et al. 2006), ein geringeres Darmkrebsrisiko oder Schutz des kardiovaskulären Systems auch negative

Wirkungen hervor. So sind Östrogene mit der Entstehung von Mamma-, Endometrium- und Ovarialkarzinomen assoziiert (Matthews und Gustafsson 2003).

E2 stimuliert die uterine und vaginale Epithelproliferation und ist dort obligatorisch an der normalen Epithelmorphogenese, der Zelldifferenzierung und sekretorischen Aktivität beteiligt (Buchanan et al. 1998; Cooke et al. 1998). Im Uterus erhöht Östradiol den Blutfluss (Van Buren et al. 1992) und führt über verschiedene Mechanismen zur vermehrten Expression von Progesteronrezeptoren (Graham und Clarke 1997; Kurita et al. 2001) und Androgenrezeptoren (Bramlett und Burris 2003; Weihua et al. 2002) und IGF-1 (Murphy et al. 1987).

Die östrogene Wirkung wird durch Bindung an einen der zwei Steroidrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  übermittelt (Cooke et al. 1998; Kuiper et al. 1998; Matthews und Gustafsson 2003).

## **2.2 Östrogenrezeptoren (ER alpha und ER beta)**

1958 wurde der erste Östrogenrezeptor, heute ER $\alpha$ , von Jensen und Jacobsen entdeckt. 1986 konnte dieser erstmals kloniert werden (Kuiper et al. 1998). Lange wurde angenommen, dass nur ein Rezeptortyp existiert und dieser allein für die Übermittlung von allen physiologischen und pharmakologischen Effekten von Östrogenen und Antiöstrogenen verantwortlich ist, bis 1995 ein zweiter Östrogenrezeptor, benannt als ER $\beta$ , geklont wurde. Seitdem sind verschiedene Spezies und Isoformen der Rezeptoren erforscht (Nilsson et al. 2001).

ER alpha und ER beta sind Kernrezeptoren der Steroid/Thyroidhormon-Superfamilie-Nuklearrezeptoren und bestehen aus 6 funktionalen Domänen (Matthews und Gustafsson 2003; Nilsson et al. 2001). Nach Bindung des Hormons erfolgt eine Dimerisierung des Rezeptors und Anlagerung an die spezifischen DNA- Bindungsdomänen. Im Folgenden werden weitere Transkriptionsfaktoren rekrutiert, welche die Expression von E2- abhängigen, östrogenansprechenden (estrogen-response-elements (ERE)) Genen (Marino et al. 2005) bestimmen.

Die Östrogenrezeptoren zeigen eine unterschiedliche Verteilung in den einzelnen Geweben. ER $\alpha$  wird vorwiegend in Uterus, Vagina, Hoden, Leber, Niere und in der vorderen Hypophyse exprimiert, während ER $\beta$  überwiegend in Schilddrüse, Ovar, Prostata, Haut, Harnblase, Lunge, Knochen, Knorpel und im Magen-Darm-Trakt beschrieben ist (Pelletier 2000; Wang et al. 2000). In Geweben, die beide Rezeptorsubtypen beinhalten, wie z. B. Ovar, Hoden und Teile des Gehirns (Hypophyse), wurde eine zellspezifische Lokalisation für jeden ER- Subtyp nachgewiesen (Pelletier 2000; Pelletier et al. 2000).

Beide Rezeptoren haben überlappende als auch individuelle Aufgaben bzw. Wirkungsweisen. Werden sie koexprimiert, wirkt ER $\beta$  hemmend auf die über ER $\alpha$  vermittelte Genexpression und in vielen Fällen wirkt ER $\beta$  den Aktionen von ER $\alpha$  entgegen (Matthews und Gustafsson 2003). In Abwesenheit von ER $\alpha$  kann ER $\beta$  diesen teilweise ersetzen, so dass eine Balance zwischen den beiden Rezeptoren und ihren Varianten (Heldring et al. 2007) resultiert und sie in einer „Ying Yang“ Beziehung zueinander stehen (Lindberg et al. 2003).

Der Östrogeneffekt am Uterus und in der Hypophyse wird vorwiegend durch ER $\alpha$  vermittelt. Eine gleichzeitige Gabe von beiden Rezeptorliganden führt zu keiner Abnahme der über ER $\alpha$  vermittelten Effekte der oben genannten Organe (Frasor et al. 2003; Hillisch et al. 2004).

Aufgrund der unterschiedlichen Expression der beiden Rezeptortypen stellt eine selektive pharmakologische Hemmung/ Stimulierung von ER $\alpha$  und ER $\beta$  einen neuen Ansatz zur Behandlung vom klimakterischen Syndrom dar. Durch Einsatz solcher Selektiven- Östrogen-Rezeptor- Modulatoren (SERMs) erhofft man sich die als positiv angesehenen Wirkungen der klassischen HET zu erzielen, ohne dabei auf Uterus und Mamma proliferierend zu wirken (Heldring et al. 2007; Hsieh et al. 2006).

### **2.3 SERMs**

SERMs sind Östrogenrezeptorliganden, die in einigen Geweben antagonistische Aktivität haben und in anderen als Teil- oder Vollagonist agieren (Bramlett und Burris 2003; Lewis und Jordan 2005; Palacios 2007). SERMs zeigen oft eine teilagonistische Aktivität im Uterusgewebe (Bramlett und Burris 2003). Tamoxifen wurde bereits in den 70er Jahren entwickelt und war der erste SERM, der erfolgreich in der Brustkrebsprävention bei Hochrisiko- Patientinnen eingesetzt wurde (Lewis und Jordan 2005). Ein bedeutender Nachteil bei dieser Substanz ist die oben angesprochene agonistische Wirkung im Endometrium. Vertreter der SERMs der nächsten Generation, wie z.B. Raloxifen, zeigen eine Verringerung dieses Effektes (Stygar et al. 2003).

Auf der Suche nach pharmakologischen Alternativen wurde vermehrt in der Klasse der Phytoöstrogene (siehe I 4.) nach Substanzen gesucht, die SERM Eigenschaften zeigen. In Extrakten der Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*, CR) (siehe 4.2) zeigten sich selektiv Östrogen- agonistische Wirkungen am Knochen und auf die Hypothalamus- Hypophysen-Achse, ein Effekt auf Uterus und Mamma blieb aus (Seidlova-Wuttke et al. 2003).

Im Rahmen der optimalen Behandlung des klimakterischen Syndroms besteht das Ziel der gegenwärtigen Forschungen weiterhin darin, spezifische Subtypen zu finden, die sich selektiv an ER $\alpha$  oder ER $\beta$  als Agonist oder Antagonist binden (Hsieh et al. 2006).

### **3. Hormonersatztherapie**

Die Hormonersatztherapie wird eingesetzt zur Linderung von vegetativen und psychischen Symptomen wie z.B. Hitzewallungen und Unruhezuständen und zur Verhinderung von urogenitalen Rückbildungserscheinungen (z.B. atrophische Vaginitis) bei peri- und postmenopausalen Frauen. Angewendet als Langzeittherapie übt die HET durch die Reduzierung von Osteoporose und der Abnahme von ischämischen Herzerkrankungen einen protektiven Effekt aus (Feeley und Wells 2001; Greendale und Judd 1993; Greendale et al. 1998). Tiefe Beinvenenthrombosen und ein signifikant erhöhtes Risiko an einer solchen zu erkranken sind Kontraindikatoren für eine Behandlung mit Östrogenen (Cosman 2003). Neuere Studien sprechen sich gegen eine Langzeithormontherapie zur Prävention von chronischen Erkrankungen aus und empfehlen eine symptomorientierte Kurzzeitbehandlung (Anderson et al. 2004; Dull 2006).

In der klassischen HET wird der Östrogenmangel des klimakterischen Syndroms durch Gabe von Östrogenen behandelt. Die alleinige Gabe von Östrogenen führt zu einer signifikanten Hyperplasie des Endometriums und erhöht damit das Risiko einer malignen Entartung (The Writing Group for the PEPI Trial 1996). Diese Ergebnisse und die Veröffentlichung der Women's- Health- Initiative- Studie sowie der Million- Woman- Studie, in der weitere Risiken wie z.B. die Zunahme von Thrombose und Brustkrebserkrankungen publiziert wurden (Gray 2003), führten bei etwa 2/3 der mit Hormonen substituierten Frauen zu einem Abbruch, meist ohne ärztliche Konsultation, der Therapie (MacLennan 2007). Moderne HET- Pharmazeutika beinhalten als Kombinationspräparate sowohl Östrogen(e) als auch Progesteron(e). Letztere(s) schützt bei Frauen mit intaktem Uterus vor der Endometriumhyperplasie. Frauen nach anamnestischer Hysterektomie können Östrogene ohne Zusatz einnehmen (Feeley und Wells 2001; Lethaby et al. 2000).

Die Hormonersatztherapie wird sequentiell/ zyklisch oder kontinuierlich praktiziert. Die Verabreichung erfolgt oral oder transdermal (als Gel oder Pflaster). Bei der sequentiellen/ zyklischen HET wird entweder monatlich oder vierteljährlich, zusätzlich zum Östrogen, für 10- 14 Tage Progesteron gegeben. Es kommt zur monatlichen bzw. zur 3- monatlichen

Abbruchblutung. Bei der kontinuierlichen HET wird E2 dauerhaft mit Progesteron kombiniert. Eine Abbruchblutung bleibt aus. Histologisch zeigt sich bei der sequentiellen Therapie im Endometrium eine große Anzahl von sekretorischen, proliferativen und inaktiven Zellen. Die Atrophie des Endometriums ist wesentlich weniger deutlich ausgeprägt als im Gewebe von kontinuierlich behandelten Frauen. Studien zeigten, dass die kontinuierliche Gabe von Progesteron zu einer Herunterregulation der Östrogen- und Progesteronrezeptoren führt, was eine verminderte Hormonsensitivität mit sich führt (Feeley und Wells 2001).

Es wird empfohlen, unabhängig davon, welche Therapieform angewandt wird, die Dosis von Östrogen gering als auch die gesamte Therapiedauer möglichst kurz zu halten (Dull 2006; MacLennan 2007).

Zu den positiven Effekten der HET zählt die Wiederherstellung der atrophischen Mukosa im Urogenitaltrakt, die Senkung des vaginalen pH- Wertes und die damit verbundene präventive Wirkung auf urogenitale Infektionen (Raz und Stamm 1993). Weiter führt die Hormongabe zu einer Senkung des Serum- Lipoproteinspiegels, der als Risikofaktor für koronare Herzerkrankungen bekannt ist (Barrett-Connor et al. 1997; Espeland et al. 1998; Shlipak et al. 2000). Zusätzlich ändern sie die Zusammensetzung der Lipoproteine (Anstieg der TAG und HDL) (Legault et al. 1999). Östrogeneinnahme bedingt ferner eine signifikante Abnahme der Wirbelkörper- und nicht vertebralem Frakturen (Torgerson und Bell-Syer 2001/a; Torgerson und Bell-Syer 2001/b). Nachteile der HET sind in der Zunahme von Schlaganfällen, koronaren Herzerkrankungen und Thrombosen zu sehen. Bei einer Hormoneinnahme über 5 Jahre ist vermehrtes Auftreten von Brustkrebs zu verzeichnen (Nelson et al. 2002), so dass eine sorgfältige Nutzen- Risiko- Abwägung vor Beginn einer Hormonersatztherapie erfolgen sollte. Nach heutigem Kenntnisstand gilt nur eine starke vegetative Symptomatik als Behandlungsindikation bei Wechseljahresbeschwerden und die Hormontherapie sollte einen Zeitraum über zwei Jahre nicht überschreiten. Einzige Ausnahme bildet die Therapie der vorzeitigen Ovarialinsuffizienz (POF). Aus verschiedenen Gründen (z.B. Verlust oder Funktionsstörungen der Eizellen, Entfernung der Eierstöcke) kommt es hier bereits bei jungen Frauen zu einem Wegfall der Östrogensynthese, so dass dauerhaft E2 substituiert wird, um frühzeitige klimakterische Beschwerden zu verhindern (Sinha und Kuruba 2007).

#### 4. Phytoöstrogene

Phytoöstrogene sind natürlich vorkommende pflanzliche Substanzen, die vorwiegend mit der Nahrung aufgenommen werden. Sie weisen eine strukturelle und/oder funktionelle Ähnlichkeit zum genuinen 17 $\beta$ - Estradiol (E2) auf und wirken im Körper somit ähnlich wie das weibliche Sexualhormon (Kulling und Watzl 2003). Mengenmäßig, über die Nahrung aufgenommene, für den Menschen bedeutsame Phytoöstrogene sind vorwiegend Isoflavone und Lignane (Kulling und Watzl 2003).

Epidemiologische Studien zeigen, dass hohe Konzentrationen von Lignan- und Isoflavonoiden mit einem verringerten Risiko für Brust-, Prostata- und Kolonkarzinomen, sowie mit einem geringeren Auftreten von koronaren Herzerkrankungen assoziiert sind (Adlercreutz 1998; Taechakraichana et al. 2002; Umland et al. 2000). So leiden asiatische Frauen wesentlich weniger unter klimakterischen Beschwerden als westliche Frauen und asiatische Männer erkranken seltener an Prostatakrebs. In den asiatischen Ländern machen Sojaprodukte einen Großteil der traditionellen Nahrung aus, so dass die tägliche Isoflavonaufnahme (vorwiegend Aglykone) etwa 5-50 mg beträgt. In den westlichen Industrieländern hingegen werden weniger als 2 mg Isoflavone pro Tag aufgenommen (Eisenbrand 2006). Dementsprechend unterschiedlich sind die Gesamtisoflavon-Plasmaspiegel. Die „westliche Ernährung“ führt zu mittleren Plasmakonzentrationen von ca. 10 nmol/L, wohingegen „östliche Bevölkerungsgruppen“ durchschnittliche Werte von 870 nmol/L im Plasma aufweisen (Adlercreutz et al. 1993).

Phytoöstrogene zeigen eine Bindungsaffinität an die Östrogenrezeptoren (ER), die allerdings wesentlich schwächer ausfällt als die des E2 (Branham et al. 2002). Verschiedenen Pflanzensubstanzen wurde eine kompetitive Bindung an beide Rezeptoruntereinheiten, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , nachgewiesen (Liu J et al. 2001). Einige Phytoöstrogene, wie z.B. Coumestrol oder Genistein, zeigen eine stärkere Bindungsneigung an ER $\beta$  als an ER $\alpha$  (Kuiper et al. 1998). Unter Beachtung der Verteilung der beiden Rezeptortypen im Körper (siehe I, 2.2) erklärt dies eine mögliche gewebsspezifische Wirkung. Die Effekte von Isoflavonen zeigen an den einzelnen Geweben östrogenähnliche (agonistische) und östrogen-antagonistische Wirkungen (Anderson und Garner 1998), so dass Phytoöstrogene, wie z.B. *Cimicifuga racemosa*, in einiger Literatur als SERM charakterisiert werden (Winterhoff et al. 2002; Wuttke et al. 2003/a). Versuche zeigten eine Verminderung der postmenopausalen Hitzewallungen infolge der Nutzung von Sojapräparaten als Nahrungsergänzungsmittel (Carusi 2000). In einigen Studien zeigen Isoflavone wie z.B. Genistein, im Gegensatz zu E2, neben den positiven

vasomotorischen Effekten keine Auswirkungen auf die Endometriumdicke des Uterus (D'Anna et al. 2007). Bei regelmäßiger Einnahme zeigen einige Phytoöstrogene eine Reduzierung des mittleren Endometrium- Karzinom- Risikos (Horn-Ross et al. 2003).

Neben den hormonabhängigen Wirkungsmechanismen der Pflanzenöstrogene werden auch hormonunabhängige Effekte wie z.B. antioxidative Wirkung, Hemmung der Zellproliferation verschiedener Tumorzellen, Induktion der Apoptose, Hemmung der DNA- Topoisomerase II usw. beschrieben (Kulling und Watzl 2003).

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit untersuchten Phytoöstrogene im Einzelnen vorgestellt.

#### 4.1 Equol

Anfang der 30er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde Equol (4,7-Dihydroxyisoflavan) erstmalig im Urin trächtiger Stuten entdeckt. Erste Forschungen wurden aufgenommen und publiziert (Marrian und Haslewood 1932). Die Substanz liegt nicht als Pflanzenextrakt vor, sondern wird metabolisch in Tier und Mensch aus Isoflavonen gebildet. Mit der Nahrung aufgenommene Isoflavone (Prämetaboliten) werden zumeist im Dünndarm resorbiert. Werden sie dort nicht aufgenommen, gelangen sie in den Dickdarm und können dort durch Bakterien der Darmflora reaktiv metabolisiert werden. Daidzein wird dabei zu Dihydrodaidzein reduziert und anschließend unter Erhalt des C-Ringes zu Equol verstoffwechselt (Abb. 3) (Kulling und Watzl 2003).

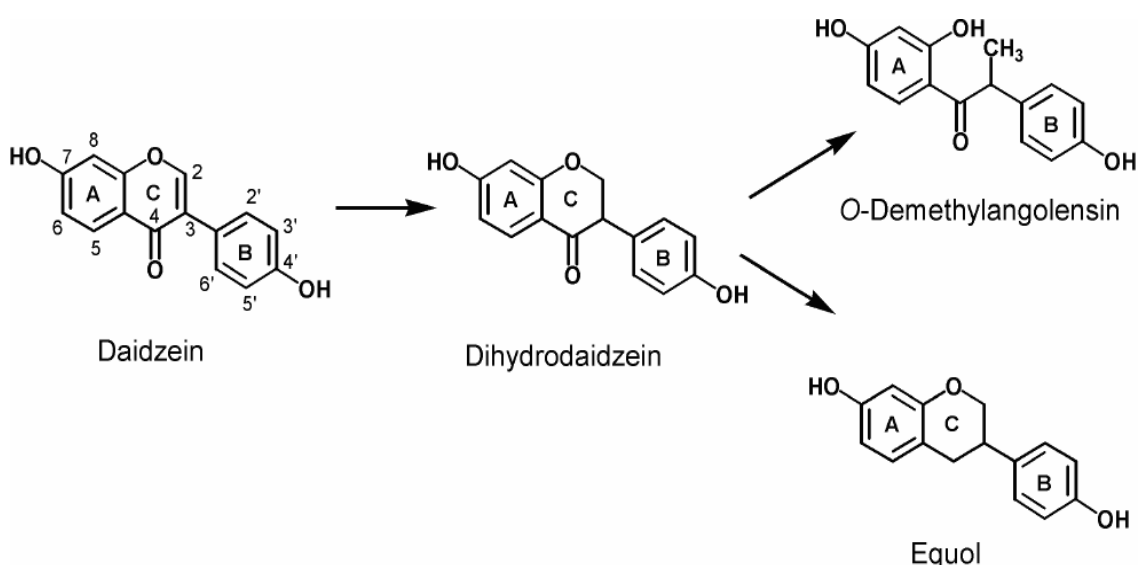


Abbildung 3: Bildung von Equol aus Daidzein



Nicht alle Menschen, bzw. die Mikroflora aller Menschen, sind in der Lage Daidzein zu Equol zu metabolisieren. Man geht davon aus, dass es nur in etwa  $\frac{1}{3}$  der Kaukasier und etwa bei der Hälfte der Japaner zur Equolsynthese kommt. Im Bezug auf die Effekte von Isoflavonen wird die Eigenschaft, Equol produzieren zu können, als sehr wichtig bewertet (Vatanparast und Chilibeck 2007).

Equol existiert als *R*- und *S*-Enantiomer. Die biologisch aktivere *S*-Form weist eine höhere Bindungsaffinität zu ER $\beta$  auf, während *R*-Equol deutlich schwächer und dann mit Präferenz an ER $\alpha$  bindet. Insgesamt zeigen beide Isomere eine größere östrogene Bindungsneigung als Daidzein (Muthyala et al. 2004). Equol gilt als potentes Phytoöstrogen am ER $\beta$  (Mueller et al. 2004). Im Tierversuch führte Equol zu einer Gewichtsabnahme und zu einem Absinken verschiedener Plasmawerte wie z.B. Leptin, Cholesterin und TAG. Eine, wenn auch deutlich schwächer als bei E2, dennoch signifikante uterotrope Wirkung, bezüglich des Organgewichtes, wurde ebenfalls beobachtet (Rachon et al. 2007).

#### 4.2 *Cimicifuga racemosa*

*Cimicifuga racemosa* (CR), im englischen als *black cohosh*, im deutschen Sprachraum als Traubensilberkerze bekannt, ist in Nordamerika beheimatet und wird seit Jahrhunderten als Heilkraut genutzt. Verschiedene indianische Stämme verwendeten CR bereits als Sedativ, zur Schmerzlinderung und gegen rheumatische und gynäkologische Beschwerden (Upton et al. 2002). Die Pflanze enthält viele Triterpenglykoside, insbesondere Actein und 27-Deoxyactein zählen zu den bedeutendsten (Chen et al. 2002). Flavonoide als Inhaltsstoffe werden diskutiert, der dauerhafte Nachweis erwies sich als schwierig (Upton et al. 2002).



**Abbildung 4:** *Cimicifuga racemosa* (Upton et al. 2002)

In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl von Studien zur Erforschung der Wirkungen von CR durchgeführt. Diese belegen, dass CR postmenopausale Symptome um 50 % reduziert und Hitzewallungen sogar um 80% lindert (Winterhoff et al. 2002; Wuttke et al. 2003/b). Ferner zeigt CR positive Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel (Li et al. 2007; Nisslein und Freudenstein 2003), sowie antiosteoporotische Effekte (Wuttke et al. 2002), die durch eine Stimulation der Osteoblasten zu erklären sind (Viereck et al. 2005). Eine östrogen-ähnliche Aktivität konnte in verschiedenen Geweben gezeigt werden (Liu et al. 2001), allerdings nicht im Uterus/ Endometrium der ovariectomierten Ratte (Reed et al. 2008). Dementsprechend zeigen sich unter CR- Behandlung keine uterotrophen Effekte. Auch in der Langzeitanwendung wurden keine Veränderungen am Endometrium oder am Brustgewebe beobachtet (Raus et al. 2006). Eine signifikante Abnahme des Serum- LH- Spiegels (Duker et al. 1991) und eine leichte Anhebung der IGF-1- Expression (Seidlova-Wuttke et al. 2003) ist zu vermerken. Im Gegensatz zu diesen östrogen- ähnlichen Mechanismen konnten, durch die Hemmung der E2- induzierten Proliferation durch CR- Extrakt, antiöstrogene Eigenschaften dargestellt werden (Zierau et al. 2002).

## **5. Metformin**

Das orale Antidiabetikum Metformin wird zur Behandlung des nicht- insulinabhängigen Diabetes Typ II und des metabolischen Syndroms eingesetzt. Das Medikament zählt zu der Gruppe der Biguanide, in der Leber hemmt es die Glucose- Neubildung und nimmt so Einfluss auf den Blutzuckerspiegel (Karow und Lang 2007). In der Gynäkologie findet Metformin ebenfalls Einsatz. Bei Frauen mit Polyzystischem Ovar(-ial)syndrom (PCOS) wird Metformin gegeben, um einen regelmäßigen Eisprung, und damit die Möglichkeit auf eine Schwangerschaft, zu erhalten (Palomba et al. 2008). Andere Studien über Behandlung der Endometriose zeigen antiinflammatorische Eigenschaften, modulatorische Effekte auf die Steroid- Produktion des Ovars und eine Proliferation des Endometriums durch Gabe des Antidiabetikums, so dass mögliche Therapieoptionen durch Metformin gegeben sind (Takemura et al. 2007).

## 6. Die Ratte als Tiermodell

Bei einer durchschnittlichen Lebenserwartung von 1-2 Jahren erreichen Ratten im Alter von ca. 36-45 Tagen ihre Geschlechtsreife. Diese Phase ist bei weiblichen Tieren durch das sogenannte Eröffnen der Vagina, bei den männlichen Tieren durch den Deszensus des Hodens gekennzeichnet. Bei den weiblichen Ratten stellt sich nach etwa einer Woche ein regelmäßiger Zyklus ein. Ein durchschnittlicher Kreislauf dauert 4-5 Tage, welcher sich in vier Phasen: Proestrus, Estrus, Metestrus und Diestrus einteilen lässt (Krinke 2000; Montes und Luque 1988).

Der Uterus der Ratte ist paarig angelegt (uterus duplex). Die Wand setzt sich (von innen nach außen) aus Endometrium (Mukosa), Myometrium (2 Muskelschichten) und Adventitia zusammen (Krinke 2000).

In der proestrischen Phase kommt es unter dem Einfluss von FSH zur Heranreifung der Follikel im Ovar und, unter Einfluss des in den Follikeln gebildeten Östrogens, zur Proliferation des Endometriums. Das Lumen des Uterus dehnt sich mit Flüssigkeit aus, so dass die Epithelzellen eher würfel- als säulenförmig sind. Das Stroma und Myometrium zeigen eine beträchtliche Infiltration von Leukozyten. Dieser Abschnitt dauert etwa 1-2 Tage. Unter Einfluss von der Sekretion von FSH und LH der Hypophyse kommt es im Ovar zum Eisprung und das Tier ist im sogenannten Estrus (6-10 Stunden) empfänglich. Hierbei ist das Gewebe im Uterus, insbesondere vom Endometrium und Epithel des Endometriums durch weitere Einwirkung von Östrogen, maximal verdickt. Kommt es zu keiner Befruchtung, wird im folgenden Metestrus und Diestrus, unter Abklingen der Östrogenstimulation und Progesteronbildung des Corpus luteums, das Endometrium und Epithel des Endometriums abgebaut. Die Flüssigkeitsmenge verringert sich und das kubische Epithel zeigt eine vaskuläre Degeneration. Auch die Leukozyteninfiltration im Stroma und Myometrium nimmt ab. Das Epithel hat sich nun säulenförmig regeneriert und die Leukozyteninfiltration ist auf das Minimum reduziert (Krinke 2000). Der Diestrus ist durch die Zurückbildung des Corpus luteum und das damit verbundene Ende der Progesteronbildung terminiert und der Zyklus beginnt von neuem.

Der Rattenuterus dient als Marker zur Bestimmung der Östrogenität nach den Richtlinien der Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) (Kanno et al. 2001; Kim et al. 2005).

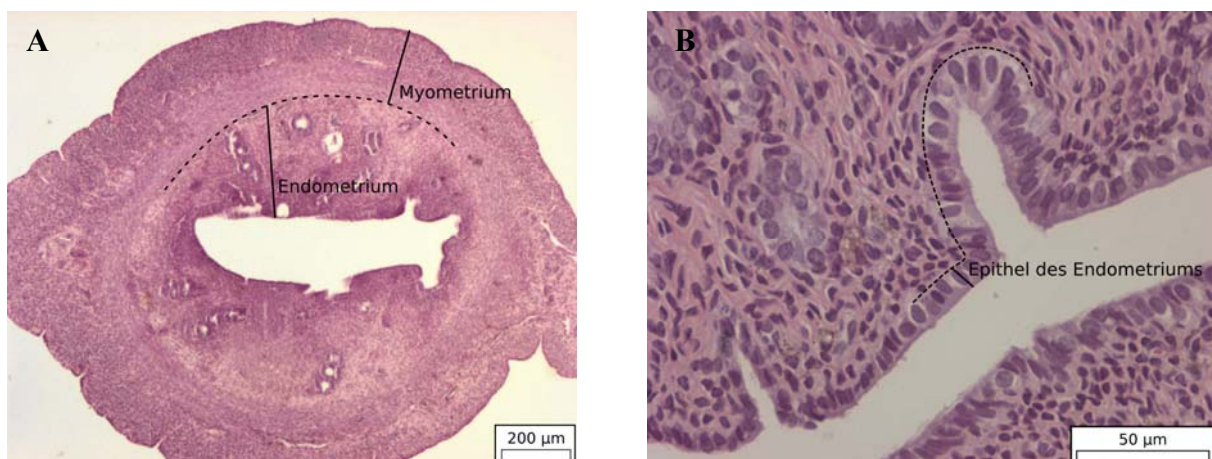
In dieser Arbeit sollen die Effekte zweier Phytoöstrogene und eines oralen Antidiabetikums im Vergleich zu Östradiol im Serum und auf die Histomorphologie des Uterus beschrieben werden. Als Tiermodell dient hierfür die ovariectomierte Sprague- Dawley- Ratte. Diese ist für die Darstellung der klimakterischen Frau ein anerkanntes Modell. Die Tiere sind durch die Ovariectomie in einen den Wechseljahren ähnlichen Zustand versetzt, da die Synthese des Östradiols in den Ovarien wegfällt. Dadurch kommt es bei den Ratten zu typischen Veränderungen wie LH- Anstieg, Knochenabbau und zur Atrophie der entsprechenden Östrogen-Zielorgane wie z.B. das Epithel der Vagina, Uterus und Mamma (Vortherms 2006).

## 7. Die untersuchten Parameter

### 7.1 Uterus

Der Uterus der ovariectomierten Ratten wurde in dieser Arbeit histologisch und nach Gewicht erfasst und ausgewertet.

Die Gebärmutter der Versuchstiere wird anhand der klassischen Einteilung (Krinke 2000) in Myometrium, Endometrium und dessen Randstruktur dem Epithel beurteilt. Das Myometrium und Endometrium sind eng miteinander verzahnt, eine Tela submucosa fehlt (Abb. 5 A, B). Bei der Bestimmung der Endometriumdicke wurde das zum Endometrium zählende Epithel nicht mit einbezogen, sondern als einzelne Schicht, im Folgenden als Epithel des Endometriums bezeichnet, gemessen.



**Abbildung 5:** A: Mikroskopische Aufnahme des Rattenuterus 5-fach vergrößert. Die durchgezogenen schwarzen Linien markieren beispielhaft das Myo- und Endometrium, die gestrichelte Linie markiert den Übergang zwischen Endometrium und Myometrium. B: Mikroskopische Aufnahme des Rattenuterus 40-fach vergrößert. Die schwarze durchgezogene Linie markiert beispielhaft das Epithel

des Endometriums, die gestrichelte Linie markiert die in dieser Arbeit gewählte Messgrenze zwischen dem Endometrium und dem Epithel des Endometriums.

Der histologische Aufbau der menschlichen Gebärmutter ist ähnlich. Anders als bei der Ratte liegt sie als einheitliches Hohlorgan (Uterus simplex) vor, allerdings ist sie ebenfalls aus drei Schichten aufgebaut (Stauber 2005; Stauber und Weyerstahl 2005). Wie bei der Ratte bildet die Innenwand des Uterus das Endometrium (Gebärmutter Schleimhaut), welches sich aus zwei Schichten zusammensetzt. Die nach innen liegende Zona functionalis setzt sich aus einem einschichtigen Zylinderepithel und Drüsengewebe zusammen. Die anliegende Zona basalis, mit Drüsen und bindegewebigem Stroma, grenzt basal an das Myometrium. Diese Schicht besteht überwiegend aus glatter Muskulatur, gestützt von Bindegewebe und eingestreuten Gefäßen. Nach außen grenzt sie an das Perimetrium (Tunica adventitia). Sie bildet zur Bauchhöhle die äußere Schicht des Uterus (Gratzl 2002).

Östrogen(e) zeigen ihre uterotrophen Wirkungen im Uterus im Endometrium als auch im Myometrium (Seidlova-Wuttke 2004).

Eine östrogen- agonistische Wirkung der zu untersuchenden Substanzen müsste sich demnach histologisch durch Wachstum bzw. durch eine Zunahme der oben genannten Schichtdicken auszeichnen, dadurch bedingt sollte eine Gewichtszunahme des Organs zu dokumentieren sein. Die in dieser Arbeit dargestellten Messwerte beziehen sich auf die Schichtdicken der Uteruswand (Myometrium, Endometrium, Epithel des Endometriums).

## **7.2 Serum- Hormonwerte**

In dieser Arbeit wird die Konzentration verschiedener Hormonwerte im Rattenserum gemessen. Vier Parameter, E2, LH, TSH, und IGF-1, werden bewertet. Alle Hormone unterliegen dem Kreislauf der Hypothalamus- Hypophysen- Gonaden- Achse (Abb. 2). Beim Menschen als auch bei der Ratte wird vom Hypothalamus GnRH pulsatil ausgeschüttet, welches den Hypophysenvorderlappen zur Sekretion von FSH und LH anregt (Knobil und Briggs 1955). Nach der Ovariectomie fehlt durch den Wegfall von E2 die negative Rückkopplung am Hypothalamus; es kommt zum Postkastrationsanstieg von FSH und LH (Seidlova-Wuttke 2004). Eine Östrogengabe führt somit in ovariectomierten (ovx) Ratten, durch Hemmung der GnRH- Sekretion im Hypothalamus, zu einem Absinken der Serum- FSH- und LH- Werte. Die Gabe von aktiven Phytoöstrogenen, die an den ER im

Hypothalamus binden (ER $\alpha$ / ER $\beta$ ), müsste also ebenso zu verringerten FSH- und LH- Werten im Rattenserum führen.

Weiterhin schüttet der Hypothalamus Thyreotropin Releasing Hormone (TRH) aus. Dieses führt im Hypophysenvorderlappen zur Sekretion von TSH und Prolaktin. Sowohl TSH als auch Prolaktin werden vom Hypophysenvorderlappen auf Anreiz von TRH (aus dem Hypothalamus) sekretiert. TSH führt in der Schilddrüse zur vermehrten Bildung von T<sub>3</sub>. Prolaktin stimuliert in der Brustdrüse die Galaktogenese und -poese und führt am Corpus luteum zu einer ER $\alpha$ - und ER $\beta$ - Expression (Frasor und Gibori 2003). Wirkungen von E<sub>2</sub> in diesen Regelkreisen sind bei Ratten bisher wenig untersucht.

Die Ausschüttung des Wachstumshormons GH aus der Hypophyse wird durch GHRH/SRH (Somatoliberin) gefördert und durch Somatostatin gehemmt. Seine Wirkungen im Körper entfaltet es zumeist über den insulin- like growth-factor IGF-1 (Golenhofen 2000). IGF-1 ist ein Wachstumsfaktor für eine Vielzahl von Geweben. Das Peptid-Wachstumhormon wird in der Leber synthetisiert und ist für die physiologische Regulation der Zellproliferation wichtig. Die Bedeutung des zirkulierenden IGF-1- Serumspiegels wird vielseitig diskutiert. IGF-1 spielt eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel und ist essentiell für das Knochenwachstum und die Knochenmasse. *In vivo* wird IGF-1 synthetisiert durch Stimulation von GH, Östrogen, Vit. D<sub>3</sub>, Cortisol etc. (Gulhan et al. 2008). Neueste Studien zeigen, dass IGF-1 als Marker zur Früherkennung von Osteoporose in prä- und postmenopausalen Frauen einsetzbar ist, da niedrige IGF-1- Serumspiegel scheinbar das Risiko von osteoporosebedingten Frakturen bei postmenopausalen Frauen ansteigen lassen (Liu et al. 2008). Daneben besitzt IGF-1 mitogene und "Anti- Apoptose"- Eigenschaften (Lacey et al. 2004), welche früher mit der Entstehung von Endometrium- Ca in postmenopausalen Frauen assoziiert wurden (Rosen und Pollak 1999). In neueren Arbeiten fanden sich allerdings keine Korrelationen zwischen der Plasmakonzentration des IGF-1 und dem Auftreten o. g. Erkrankung (Lacey et al. 2004). Weiterhin werden ansteigende bzw. angestiegene IGF-1- Serumspiegel als unabhängiger Risikofaktor für die Entwicklung von prämenopausalem Mamma- Ca gewertet (Campbell et al. 2001).

Da eine hormonelle Behandlung in der Postmenopause auch zur Osteoporoseprävention dienen soll, ohne dabei das Brustkrebsrisiko zu erhöhen, wird die Wirkung von Hormonpräparaten auf IGF-1- Serumspiegel vielfältig untersucht. Bezüglich der Effekte von SERMs auf den IGF-1- Serumspiegel finden sich in der Literatur kontroverse Ergebnisse. In einer Studie von Cakmak et al. zeigte sich nach 6- monatiger Raloxifengabe eine signifikante

Abnahme des IGF-1- Serumspiegels bei keiner Korrelation mit der Knochenmasse, so dass eine direkte Verbindung von IGF-1 und Knochenstoffwechsel nicht zwingend angenommen werden kann (Cakmak et al. 2005). Eng- Wong et al. konnten nach 3 Monaten Anwendungszeit von Raloxifen keine Änderung des IGF-1- Serumspiegels nachweisen (Eng- Wong et al. 2003). Die Auswirkungen einer HET auf den IGF-1- Wert sind ebenfalls nicht einheitlich. In Humanstudien wurden sowohl zunehmende Serumspiegel (Hartmann et al. 1995) als auch gleichbleibende Werte unter Hormonsubstitution beschrieben (Posaci et al. 2001).

Das im Serum zirkulierende IGF- 1 wird in dieser Arbeit unter der Stimulation der verwendeten Substanzen gemessen.

## **8. Ziele**

Die Anwendung der klassischen Hormonersatztherapie im Zuge von Wechseljahresbeschwerden ist spätestens seit den Ergebnissen der WHI- Studie von 2002 umstritten.

Die Forschungen beschäftigen sich seitdem mit der Suche nach einer Substanz, die positive Eigenschaften wie z.B. Osteoporoseschutz und Prävention von Brustkrebs besitzt, ohne dabei negative Wirkungen, wie eine Zunahme des Endometrium- Ca, Thrombose oder Hitzewallungen, hervorzurufen (Palacios 2007).

Durch die Entdeckung der SERMs gelang teilweise eine Steuerung von gewebspezifischen östrogenen oder antiöstrogenen Wirkungen. Bis heute wird nach dem am besten geeigneten selektiven Modulator gesucht, der ausschließlich die gewünschten Effekte der Östrogen-Hormontherapie bewirkt.

Phytoöstrogene sind bei dieser Fragestellung eine mögliche Alternative. Ihr Potential bei der Linderung von menopausalen Beschwerden und das Auftreten von unerwünschten Wirkungen ist derzeit Gegenstand vieler Forschungsprojekte.

Im Rahmen dieser Arbeit werden die Wirkungen von dem Phytoöstrogen Equol, dem Extrakt von *Cimicifuga racemosa* und dem oralen Antidiabetikum Metformin im Vergleich mit dem Steroidhormon Östradiol in einer Langzeitverabreichung über 42 Tage an ovariectomierten Sprague-Dawley- Ratten untersucht.

Als Untersuchungsparameter dienen die Uterushistologie, die Uterusgewichte, die Körpergewichte sowie die Serumparameter E2, LH, TSH und IGF-1.

Zielsetzung ist die Beantwortung der Fragestellung, ob und wie stark die Phytoöstrogene aus CR und Equol auf das Wachstum des Uterus wirken, und in wie weit sie mit der Hypothalamus- Hypophysen- Achse interagieren. Östradiol wird im Vergleich untersucht, um die erhaltenen Ergebnisse bewerten zu können. Von besonderem Interesse ist hierbei, ob CR oder Equol selektiv agonistische bzw. antagonistische Wirkung entfalten und somit SERM-ähnliche Eigenschaften besitzen. Wünschenswert für eine Therapie des klimakterischen Syndroms wäre eine agonistische Östrogenwirkung auf die Körpergewichte und die Hormonwerte, am Uterus wäre ein antagonistischer Östrogeneffekt von Vorteil. Weiterhin soll der Einfluss der Verabreichungsart untersucht werden, wobei die orale Substanzaufnahme und s. c. Applikation von E2 betrachtet werden.

Die Gabe der Phytoöstrogene erfolgte oral, da die Aufnahme der Pflanzenpräparate sowohl über die Nahrung als auch als Pharmazeutikum überwiegend per os erfolgt und somit einer Therapiemöglichkeit, zur Behandlung des klimakterischen Syndroms, am ehesten entspricht. Metformin wurde ebenfalls ausschließlich über das Futter verabreicht. E2 wurde, entsprechend den ersten Ansätzen der HET, oral gegeben und in einer zweiten Gruppe subkutan gespritzt. Durch die s. c. Applikation wird die Metabolisierung durch den enterohepatischen Kreislauf umgangen/ reduziert. Dieses lässt eine höhere Aufnahme von E2 nach s. c. Injektion erwarten, da nach oraler Applikation E2 nicht vollständig resorbiert wird. Weiterhin resultiert durch die s. c. Applikation ein E2- Depot im Fettgewebe der Tiere, so dass eine konstante Substratkonzentration im Blut gewährleistet ist.



## **II Material und Methoden**

### **1. Tierversuch**

#### **1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Der Tierversuch wurde im Zeitraum vom 08.11.2005 bis zum 21.12.2005 unter der Leitung von Frau Dr. med. D. Seidlova- Wuttke durchgeführt.

Eine Genehmigung von der Bezirksregierung Braunschweig lag unter der Nummer Az 509.42502/01-36.03 vor. Der Versuch wurde an 65 selbstgezogenen, weiblichen Sprague-Dawley- Ratten (S.D.- Ratten) (Fa. Winkelmann, Borchen) vorgenommen. Die Tiere wurden im Universitätsklinikum Göttingen gezüchtet und bis zum Versuchsstart mit soja- und isoflavonoid- freiem Pellet-Futter (Ssniff®, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) und Wasser, welches zur freien Verfügung stand, ernährt. Zweimal pro Woche wurden die Futterspeicher aufgefüllt und die verbrauchte Futtermenge gemessen. Die Futtersäcke wurden bei Raumtemperatur dunkel und trocken gelagert.

Die Tierhaltung erfolgte in 14 Käfigen (Makrolon®-Käfige vom Typ IV, Fa. Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg). Pro Käfig wurden jeweils 4 (5×) bzw. 5 Tiere (9×) gehalten. Die Belichtung des Raumes mit künstlichem Licht erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus von 6 bis 18 Uhr, die Raumtemperatur betrug bei Messung mit einem Thermo-Hygrometer durchschnittlich  $23 \pm 1$  °C, die relative Luftfeuchtigkeit lag bei 55%.

Bei Versuchsbeginn hatten die Ratten ein Alter von 82 Tagen und ein durchschnittliches Gewicht von  $240,9\text{g} \pm 19,4\text{g}$  (Waage basic lite BL3, Sartorius).

Zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere in 7 Gruppen zu jeweils 8-10 Tieren eingeteilt.

#### **1.2 Ovariectomie**

Am 08.11.2005 wurden die Tiere unter CO<sub>2</sub>- Betäubung intraperitoneal mit 45 mg/kg KG (~11,25mg) Ketamin (Hostaket®, Fa. Bayer, Leverkusen) narkotisiert. Der Bereich kaudal des Rippenbogens wurde rasiert und desinfiziert, anschließend wurde zur Freilegung der Ovarien die Bauchhöhle beidseits an der vorbereiteten Stelle eröffnet. Nach Ligation zwischen Uterushorn und Ovar wurde letzteres mittels eines Skalpell entfernt. Mit sterilem Faden wurde die Bauchdecke verschlossen.

Vor Ausleitung der Narkose wurde jeder Ratte ein Transponder- System zur Erkennung (Transponder-UNO MICRO-ID System, ISO-Transponder (12 mm), Gesreader II Ge S008:

ISO kompatibler Taschenleser, UNO ROESVASTSTAAL BV Zereenaar, Niederlande) unter die Haut implantiert.

### 1.3 Testsubstanzen und Versuchsablauf

Im Anschluss an die Ovariectomie wurden die 65 weiblichen Ratten in 7 Gruppen (4 Gruppen á 10 Ratten, 1 Gruppe á 9 Ratten, 2 Gruppen á 8 Ratten) eingeteilt und über einen Zeitraum von 42 Tagen mit folgendem Futter behandelt:

- Kontrolle, p. o.                      Soja- und testsubstanzfreies Kontrollfutter
- Kontrolle, s. c.                      SF + s.c. Rizinusöl 0,2 ml/ Tier
- E2, p. o.                                SF + Estradiolbenzoat 10 mg/kg
- E2, s. c.                                SF + s.c. Estradiolvalerat 200 µg/kg
- Equol, p. o.                            SF + Equol 400 mg/kg
- CR, p. o.                                SF + CR 166,5 mg/kg
- Metformin, p. o.                      SF + Metformin 2,2 g/kg.

Die Herstellung aller Futtermittel erfolgte auf der Basis von soja- und isoflavonoid- freiem Pellet-Futter unter der Registrationsnummer V-1354, R-2, 100 mm bei der Firma Ssniff (Ssniff®, Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Das zur Nahrungsherstellung verwendete Equol stammte von der Firma Import and Export Group Changzhu, China. Um die durchschnittliche Nahrungs- und Wasseraufnahme zu ermitteln, wurden die Futter- und Flüssigkeitsmenge sowie die Tiergewichte einmal wöchentlich über die gesamte Dauer des Versuches gemessen. Über den Futterverbrauch wurde die Menge der täglichen Aufnahme der einzelnen Testsubstanzen errechnet (siehe III, Tab. 4). Nach einem Futterzeitraum von 42 Tagen wurden die Tiere unter CO<sub>2</sub>- Betäubung am 21.12.2005 dekapitiert. Das Blut wurde für die spätere Serumdiagnostik gesammelt und zentrifugiert. Aus den sieben Gruppen wurde jeweils bei drei, in der Metformingruppe bei zwei Tieren die Gebärmutter zur Auswertung entnommen und in flüssigem Stickstoff zur histologischen Aufarbeitung eingefroren. Neben der Serumanalyse und dem Uterus für diese Arbeit wurden für andere Studien und Fragestellungen Thymus, Milz, Herz, Leber, Nieren, Nebennieren, Lunge, Pankreas, Aorta,

subkutan- und intraabdominales Fettgewebe und der M. quadriceps femoris der Ratten aufgearbeitet.

#### **1.4 Serumanalyse**

Im bei der Dekapitation erhaltenen Blut wurde die Konzentration von 5 Hormonen in den Laboren der klinischen Chemie der Universität Göttingen analysiert.

Die einzelnen Hormone der Rattenserum wurden durch radioimmunologische Assays (RIA) bestimmt.

Die Östradiolwerte wurden mit Hilfe des RIA DSL Kits- 43 100 (DSL, Sinsheim, Deutschland) ermittelt. Das Thyroidea- stimulierende- Hormon (TSH) und T3 + T4 wurden mittels RIA Active™ T<sub>3</sub>/Active™ Thyroxin Kit, DSL (DSL, Sinsheim, Deutschland) gemessen. Die Analytik des Insulin-like growth Factor (IGF-1) fand ebenfalls unter Nutzung eines RIAs (Ratte, DSL-KP32 CT) statt. LH wurde durch laboreigene RIA, welche mit Hormonen und Antikörpern von National Hormone + Pituitary Program (National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) arbeiten, erfasst.

#### **1.5 Histologische Methoden und Aufarbeitung des Uterus**

Die bei der Sektion entnommenen und anschließend eingefrorenen Uteri wurden nach dem Auftauen für 72 h in 10% Formalin fixiert und im Entwässerungsautomat (TP 1020, Leica, Wetzlar, Deutschland) dehydriert und nachfolgend, gemäß dem in Tab. 1 dargestellten Protokoll, in Paraffin gegossen. Die Blöcke wurden 24 Stunden vor Weiterverarbeitung eingefroren.

**Tabelle 1:** Schema der Organentwässerung

<b>Substanz</b>	<b>Zeit</b>
50%iger Alkohol	1 h
75%iger Alkohol	1 h 20 min
75%iger Alkohol	1 h 20 min
96%iger Alkohol	1 h 20 min
96%iger Alkohol	1 h 20 min
100%iger Alkohol	1 h 20 min
100%iger Alkohol	1 h 20 min
100%iger Alkohol	1 h 20 min
Xylol	1 h 20 min
Xylol	1 h 20 min
Paraffin	1 h
Paraffin	1 h

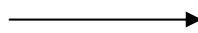
Pro Rattenuterus wurden mit Hilfe eines RM2135-Mikrotoms (Leica, Wetzlar, Deutschland) jeweils 10 Schnitte des gefrorenen Paraffinblockes, mit einer Schnittdicke von 3-4  $\mu\text{m}$ , geschnitten und auf einen mit Versuchsname, Tier- und Schnittnummer beschrifteten Objektträger (SuperFrost®Plus, Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht. Anschließend wurden die Schnitte bei 37°C für mindestens 12 Stunden im GFL 7601 Wärmeschrank (Fa. Schütt Labortechnik, Göttingen, Deutschland) getrocknet.

Zwei der jeweils 10 geschnittenen Schichten pro Uterus wurden weiter verarbeitet und ausgewertet. Diese Schnitte wurden durch die Hämatoxylin- Eosin (HE) Färbung (Mayers Hämalaunlösung und Eosin Lösung, Merck, Darmstadt; Deutschland) nach dem in Tabelle 2 dargestellten Protokoll gefärbt.

Anschließend wurden die Objektträger mit den eingefärbten Uterusschnitten mit DePeX (Serva/ Boehringer Ingelheim Bioprod., Heidelberg) eingedeckt und bei Raumtemperatur getrocknet. Unter einem Axiophot Mikroskop (Zeiss®), mit integrierter digitaler Kamera, wurden die Schnitte begutachtet und fotografiert. Fotoausschnitte des Myo- und des Endometriums wurde in 5- facher Vergrößerung (Objektivgröße 2,5 x Okularvergrößerung 2,0- fach), Bilder der Epithelzellen des Endometriums in 40- facher Vergrößerung (Objektivgröße 20 x Okularvergrößerung 2,0- fach) dargestellt. Mit Hilfe des Computerprogramms AnalySIS 3.0 (Soft Imaging GmbH Münster, Deutschland) wurden die drei Uterusschichten je 10-mal pro Schnitt markiert und vermessen.

**Tabelle 2:** Schema der HE- Färbung

Substanz	Zeit
Xylen	5 Minuten
Xylen	5 Minuten
Xylen	5 Minuten
Ethanol 100%	2 Minuten
Ethanol 100%	2 Minuten
Ethanol 100%	2 Minuten
Ethanol 96%	2 Minuten
Ethanol 96%	2 Minuten
Ethanol 75%	2 Minuten
Aqua dest.	2 Minuten
Hämatoxylin	30 Sekunden
Fließendes Leitungswasser	10 Minuten
Aqua dest.	1-2 Minuten



Substanz	Zeit
Eosin	1 Minute
Aqua dest.	10-15 mal schwenken
Ethanol 75%	30 Sekunden
Ethanol 96%	30 Sekunden
Ethanol 96%	30 Sekunden
Ethanol 100%	1 Minuten
Ethanol 100%	1 Minuten
Ethanol 100%	2 Minuten
Xylen	5 Minuten
Xylen	5 Minuten
Xylen	5 Minuten

## 2. Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wurde das Computerprogramm PRISM (Graph Pad Prism4®, San Diego, USA), unter Anwendung einer Varianzanalyse für die wiederholte Messung eines Faktors (ANOVA) und anschließendem multiplen T-Test nach Dunnett, genutzt. Das Signifikanzniveau wurde auf  $p < 0,05$  festgelegt.

Aus den Werten der Schnittdicken wurde der Mittelwert berechnet, der Standardfehler des arithmetischen Mittelwertes (Hillisch et al. 2004) bestimmt und graphisch in Säulendiagrammen dargestellt.

Die Kontrollgruppen wurden mit den stimulierten Gruppen verglichen. Eine bestehende Signifikanz wurde in den Graphen gekennzeichnet.

### III Ergebnisse

#### 1. Tierfutteraufnahme

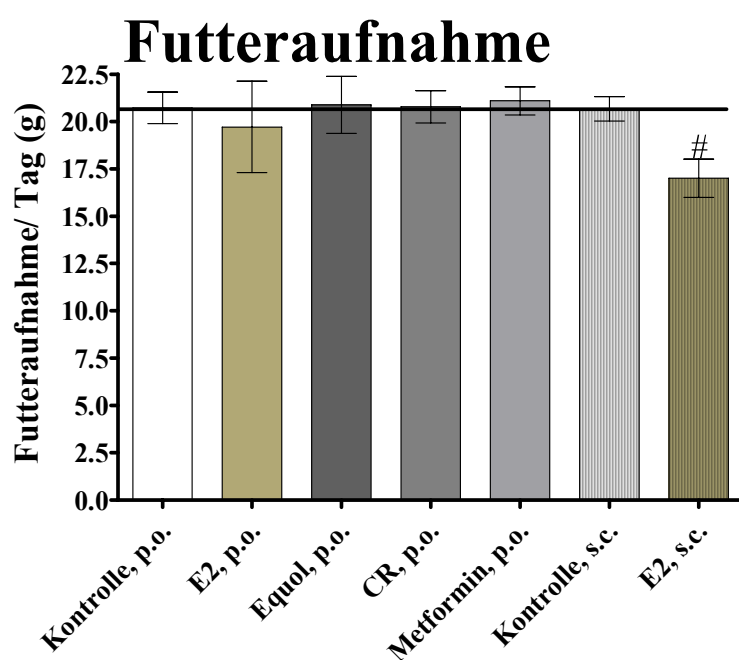
Zur Errechnung der durchschnittlichen Nahrungsaufnahme wurden die Tiere und die Futterbestände, über die Dauer des Versuches, einmal wöchentlich gewogen. In Tabelle 3 ist die Tierfutteraufnahme dargestellt.

**Tabelle 3:** Futter- und Substanzaufnahme der Versuchstiere in den 7 Gruppen

<b>Kontrolle p.o.</b>	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag (g)	Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier/Tag (mg)	<b>Kontrolle s.c.</b>	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag (g)	Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier/Tag (mg)
Woche 1	19,55	-	Woche 1	19,48	-
Woche 2	22,18	-	Woche 2	21,50	-
Woche 3	22,77	-	Woche 3	22,84	-
Woche 4	22,46	-	Woche 4	21,79	-
Woche 5	19,66	-	Woche 5	19,46	-
Woche 6	17,73	-	Woche 6	18,98	-
<b>Mittel</b>	<b>20,89</b>	-	<b>Mittel</b>	<b>20,68</b>	-
<b>E2 p.o.</b>	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag (g)	Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier/Tag (mg)	<b>E2 s.c.</b>	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag (g)	Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier/Tag (mg)
Woche 1	10,11	0,101	Woche 1	14,84	-
Woche 2	15,23	0,152	Woche 2	18,44	-
Woche 3	22,40	0,224	Woche 3	15,73	-
Woche 4	23,06	0,231	Woche 4	21,27	-
Woche 5	26,07	0,261	Woche 5	15,01	-
Woche 6	21,44	0,216	Woche 6	16,76	-
<b>Mittel</b>	<b>19,74</b>	<b>0,197</b>	<b>Mittel</b>	<b>17,01</b>	-
<b>Equol</b>	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag (g)	Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier/Tag (mg)	<b>CR</b>	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag (g)	Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier/Tag (mg)
Woche 1	26,31	10,53	Woche 1	21,55	3,59
Woche 2	17,01	6,81	Woche 2	23,80	3,96
Woche 3	16,70	6,68	Woche 3	21,39	3,56
Woche 4	20,20	8,08	Woche 4	20,95	3,49
Woche 5	22,83	9,13	Woche 5	19,33	3,22
Woche 6	22,25	8,90	Woche 6	17,68	2,94
<b>Mittel</b>	<b>20,88</b>	<b>8,35</b>	<b>Mittel</b>	<b>20,78</b>	<b>3,46</b>

<b>Metformin</b>	Durchschnittliche Futteraufnahme pro Tier/Tag (g)	Durchschnittliche Substanzaufnahme pro Tier/Tag (mg)
Woche 1	20,40	44,88
Woche 2	21,99	48,37
Woche 3	22,81	50,19
Woche 4	22,51	49,53
Woche 5	21,04	46,29
Woche 6	17,83	39,23
<b>Mittel</b>	<b>21,10</b>	<b>46,42</b>

Die Futteraufnahme in den einzelnen Tiergruppen verhält sich unterschiedlich. Gegenüber den Kontrollgruppen und den mit Equol, CR und Metformin stimulierten Tieren zeigen die beiden mit Östrogen behandelten Rattengruppen eine deutlich geringere Nahrungsaufnahme (Abb. 6).



**Abbildung 6:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf die Futteraufnahme; \*: Signifikanz p. o ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

Während die oral behandelte Östrogengruppe mit einer durchschnittlichen Futteraufnahme von  $19,7 \pm 2,4$  g pro Tier/ Tag gegenüber der oralen Kontrollgruppe mit  $20,7 \pm 0,8$  g pro Tier/ Tag eine Tendenz der verminderten Kostaufnahme aufweist, zeigt sich dies bei den mittels subkutanen Injektionen behandelten Versuchsgruppen signifikant. Neben der Kontrollgruppe s. c., die im Mittel  $20,7 \pm 0,6$  g pro Tier/ Tag sojafreies Futter aufgenommen hat, kommt es bei den E2 s. c. Ratten mit  $17,0 \pm 1,0$  g pro Tier/ Tag zu einer deutlich geringeren Kostaufnahme.

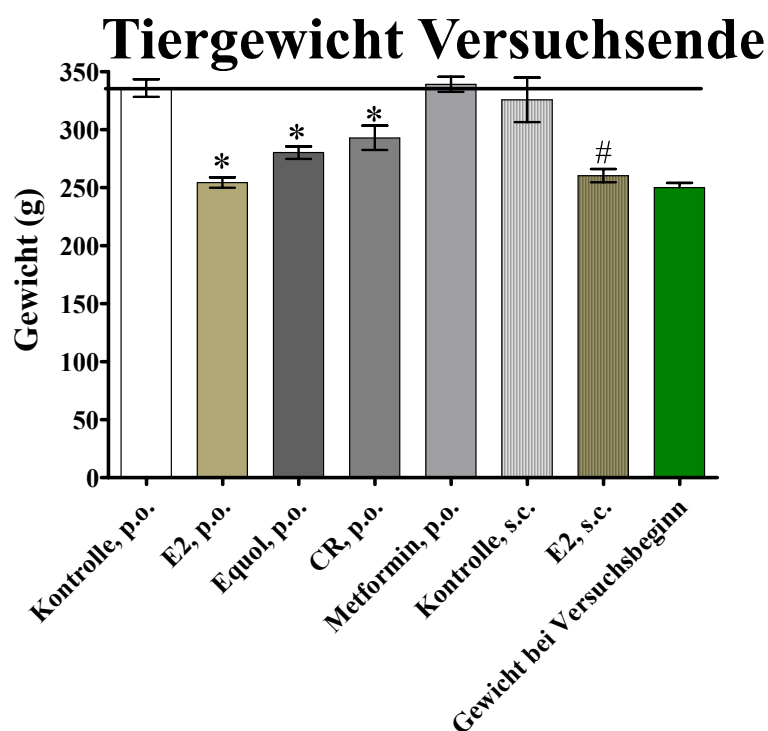
Die Futterzusätze Equol ( $\bar{O}$   $20,9 \pm 1,5$  g pro Tier/ Tag), CR ( $\bar{O}$   $20,8 \pm 0,9$  g pro Tier/ Tag) und Metformin ( $\bar{O}$   $21,1 \pm 0,8$  g pro Tier/ Tag) führten zu keiner abweichenden Futteraufnahme gegenüber der oralen Kontrollgruppe.



## 2. Gewichte

### 2.1 Tiergewicht

Zu Beginn des Versuches war das Gewicht der einzelnen Tiere in den eingeteilten, und zu diesem Zeitpunkt noch unbehandelten, Gruppen mit  $240,9 \text{ g} \pm 19,4 \text{ g}$  nahezu identisch. Nach einem Zeitraum von 42 Tagen, und vor Beendigung des Versuches, wurden die Tiere erneut gewogen und die Tiergewichte abermals erfasst (Abb. 7).



**Abbildung 7:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf das Tiergewicht zu Versuchsende; \*: Signifikanz p. o ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ ) im Vergleich zum Gewicht bei Versuchsbeginn

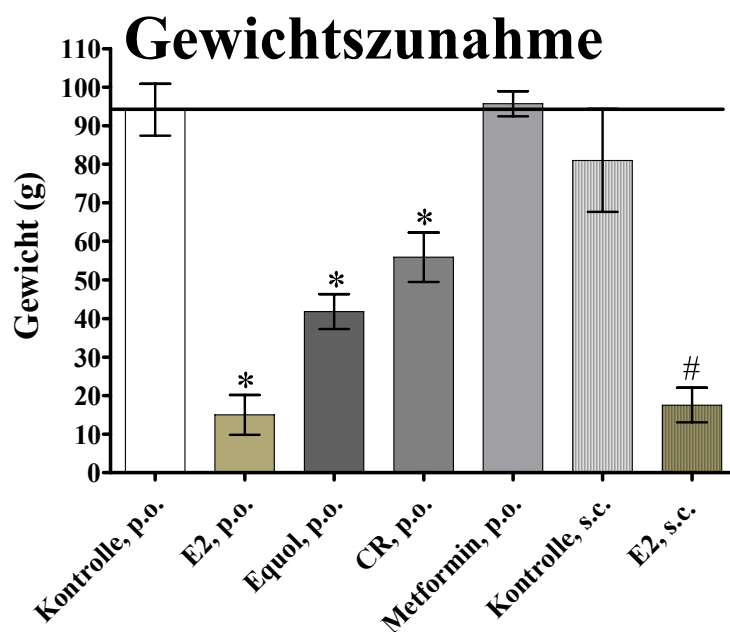
Das Gewicht der Tiere der Kontrollgruppe p. o. hat innerhalb des Versuchszeitraumes deutlich zugenommen, was mit dem natürlichen Wachstum der Ratte zu erklären ist, und lag im Mittel bei  $335,9 \text{ g} \pm 7,6 \text{ g}$ . Das Körpergewicht der Ratten mit Metformin als Futterzusatz zeigt als einzige Gruppe mit  $338,9 \text{ g} \pm 6,5 \text{ g}$  keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Alle anderen, oral stimulierten Gruppen weisen ein signifikant geringeres Körpergewicht zu Versuchsende auf. Es zeigen alle Gruppen eine physiologische Zunahme zum Ausgangsgewicht, welche aber im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich geringer liegt. Am deutlichsten wird dieser Effekt bei den mit E2 als Futterzusatz behandelten Tieren; das

durchschnittliche Körpergewicht lag am Versuchsende bei  $254,3 \text{ g} \pm 4,5 \text{ g}$ . Die Ratten der mit Equol gefütterten Gruppe haben im Mittel ein Gewicht von  $280,1 \text{ g} \pm 5,4 \text{ g}$ , die mit CR- stimulierten Tiere wiegen  $292,9 \text{ g} \pm 10,5 \text{ g}$ .

Ein ähnliches Ergebnis findet sich bei den subkutan behandelten Tieren. Die Kontrollgruppe zeigt auch hier eine deutliche physiologische Gewichtszunahme auf  $325,6 \text{ g} \pm 19,1 \text{ g}$ . Die Zunahme der mit E2 s. c. applizierten Tiere ist mit  $260,2 \text{ g} \pm 5,756 \text{ g}$  demgegenüber signifikant geringer.

Zur Verdeutlichung wird noch einmal die Gewichtszunahme von Versuchsbeginn bis zum Ende nach 42 Tagen Versuchsdauer graphisch aufgezeigt (Abb. 8).

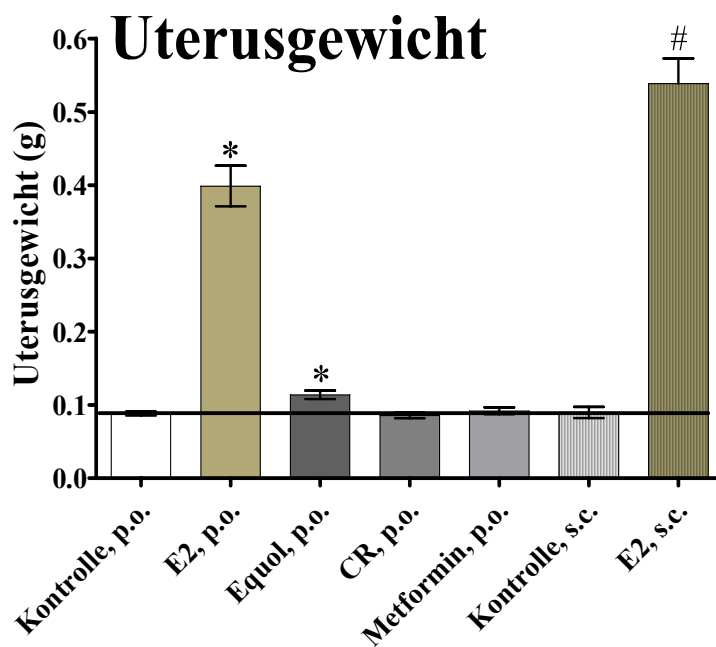
Das oben angedeutete Ergebnis bezüglich der Gewichtsdiﬀerenz ist hier deutlich zu sehen. Die beiden Kontrollgruppen, und die mit Metformin stimulierten Tiere, erhöhen ihr Gewicht um durchschnittlich  $94,1 \text{ g} \pm 6,7 \text{ g}$  (Kontrollgruppe p. o.) bzw. um  $95,7 \text{ g} \pm 3,3 \text{ g}$  in der Metformin-Gruppe und um  $81,0 \text{ g} \pm 13,3 \text{ g}$  in der Kontrollgruppe s. c.. Signifikant geringer ist die Gewichtszunahme in den anderen Gruppen. Vor allem bei den mit Östrogen behandelten Tieren ist die Zunahme des Gewichts im Mittel mit  $15,0 \text{ g} \pm 5,1 \text{ g}$  bei der oralen und mit  $17,6 \text{ g} \pm 4,5 \text{ g}$  bei der subkutan gespritzten Gruppe wesentlich geringer.



**Abbildung 8:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf die Gewichtszunahme; \*: Signifikanz p. o ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

## 2.2 Uterusgewicht

Nach Exstirpation des Uterus wurden die Organfeuchtgewichte erfasst. Die Ergebnisse werden in Abbildung 9 dargestellt. Eine deutliche Gewichtszunahme des Organs zeigt sich bei den mit Östrogen, oral als auch s. c., behandelten Tieren. Das Uterusdurchschnittsgewicht der E2 p. o. Gruppe beträgt mit  $0,398 \text{ g} \pm 0,027 \text{ g}$  ungefähr das Vierfache im Vergleich zur Kontrollgruppe p. o. ( $0,088 \text{ g} \pm 0,003 \text{ g}$ ). Die mit Equol zugesetzten Futtergruppen zeigen ebenfalls eine signifikante, wenn auch geringe Uterusgewichtszunahme mit  $0,114 \text{ g} \pm 0,006 \text{ g}$ .



**Abbildung 9:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf das Uterusgewicht; \*: Signifikanz p. o. ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

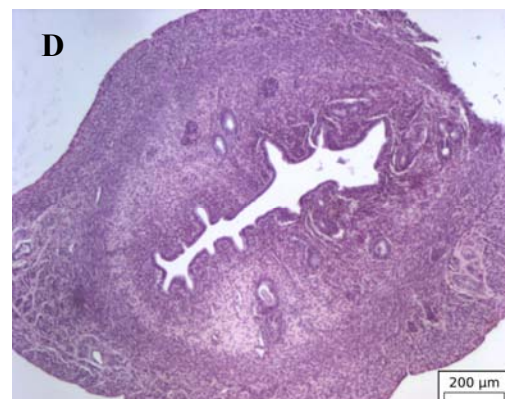
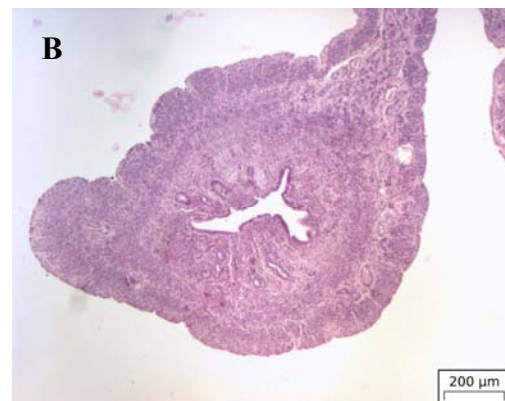
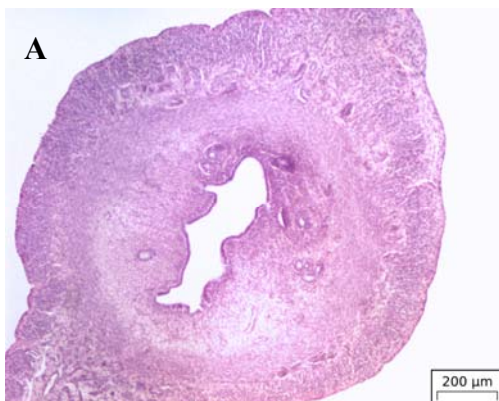
Am deutlichsten ist die Organgewichtszunahme in der E2 s. c. applizierten Gruppe zu sehen; hier nimmt das Gewicht mit  $0,538 \text{ g} \pm 0,035 \text{ g}$  im Vergleich zur Kontrollgruppe s. c. mit  $0,090 \text{ g} \pm 0,007 \text{ g}$  um mehr als das Fünffache zu.

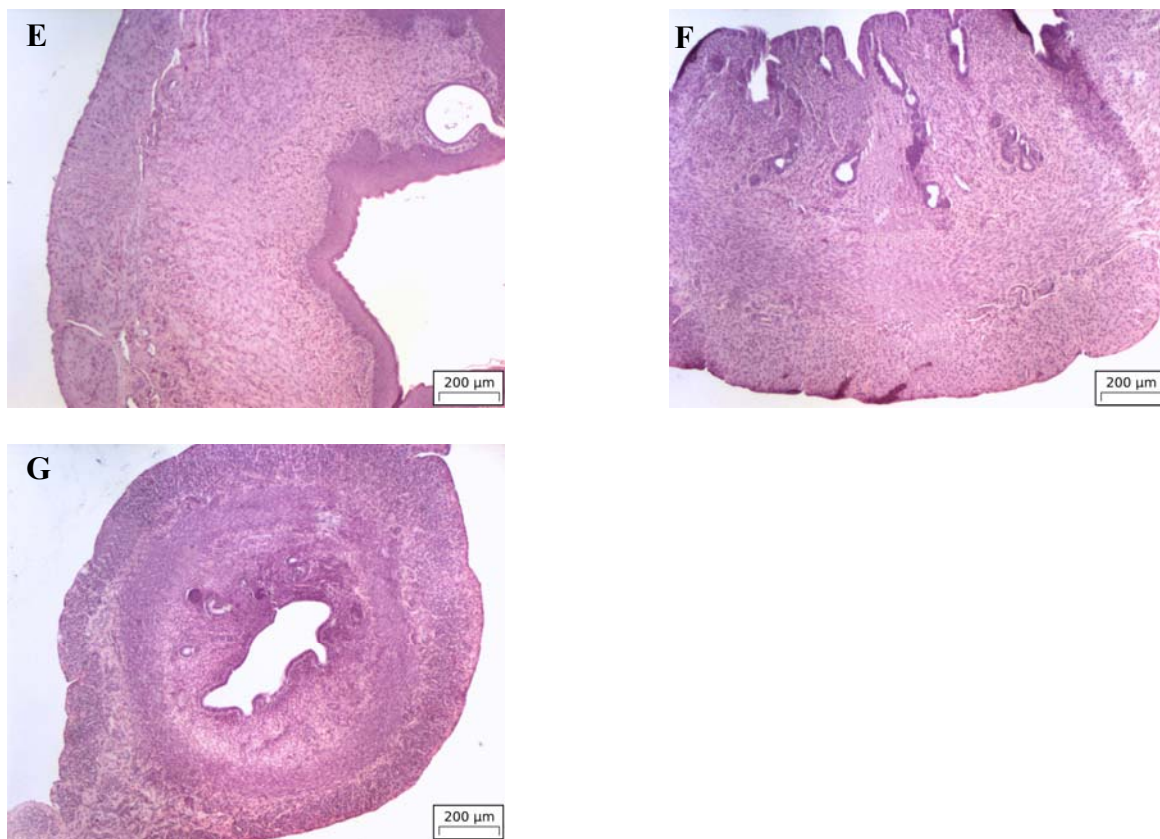
### 3. Uterushistologie

Die angefertigten Organschnitte wurden zur mikroskopischen Vermessung der Uterusschichten Myometrium, Endometrium und Epithel des Endometriums genutzt. Rund um den Querschnitt des Uterus wurden zehn Messungen im Myometrium, zehn im Endometrium und zehn Messungen im Epithel des Endometriums durchgeführt (entsprechend Kapitel I 7.1, Abb. 5 A, B). Die Ergebnisse werden im Folgenden, von peripher zur Organmitte, beschrieben.

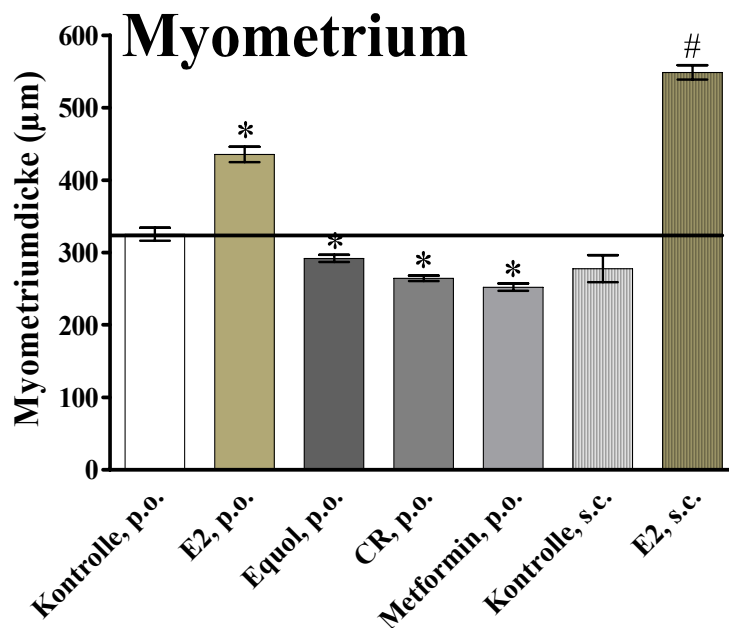
#### 3.1 Myometrium und Endometrium

Die Abbildung 10 A-G zeigt Ausschnitte des Rattenuterus 5-fach vergrößert. Zur Illustrierung der Varianz innerhalb der Gruppen sind für die Kontrollgruppen (Abb. 10A, B) ein relativ großer Uterus (Abb. 10A) und ein kleiner Uterus nach ovx (Abb. 10B) dargestellt. Auffällig ist, dass selbst der größte Uterus der Kontrollgruppen noch deutlich kleiner ist als alle Uteri der mit E2 behandelten Gruppen. Bei den mit E2 behandelten Tieren (Abb. 10E, F) ist bei gleicher Vergrößerung nur ein Bildausschnitt der Uteri darstellbar.





**Abbildung 10:** Mikroskopische Aufnahmen des Rattenuterus 5-fach vergrößert der verschiedenen Versuchsgruppen. A: relativ großer Uterus der Kontrollgruppe p. o., B: relativ kleiner Uterus der Kontrolle, s. c., C: CR, p. o., D: Equol, p. o., E: E2, s. c., F: E2, p. o., G: Metformin, p. o.

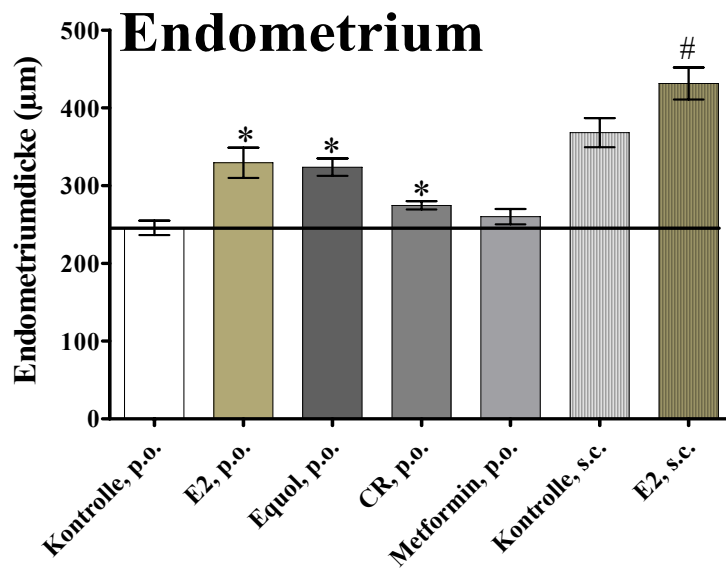


**Abbildung 11:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf die Myometriumdicke; \*: Signifikanz p. o. ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

Das Myometrium der Tiere der Futter-Kontrollgruppe wurde im Mittel mit  $325,2 \mu\text{m} \pm 8,9 \mu\text{m}$  gemessen (Abb. 11). Bei den mit Östradiol gefütterten Ratten zeigt sich eine signifikante Verdickung dieser Muskelschicht mit  $435,3 \mu\text{m} \pm 10,6 \mu\text{m}$ . Die mit den anderen Substanzen gefütterten Tiergruppen zeigen hingegen eine signifikante Abnahme der Gewebsschicht (Abb. 11). Bei der mit Metformin stimulierten Tiergruppe zeigt sich dieser Effekt mit einer durchschnittlichen Schichtdicke von  $252,2 \mu\text{m} \pm 5,0 \mu\text{m}$  am deutlichsten, Equol mit  $291,9 \mu\text{m} \pm 5,1 \mu\text{m}$  und CR mit  $264,5 \pm 3,7 \mu\text{m}$  weisen eine ähnliche Tendenz auf.

Ein stärkeres Wachstum des Myometriums unter Östradioleinfluss zeigt sich bei den subkutan behandelten Tieren. Die Muskelschicht der Ratten, denen E2 s. c. appliziert wurde, zeigt eine signifikante Verdickung mit  $548,6 \mu\text{m} \pm 9,9 \mu\text{m}$  gegenüber der Kontrollgruppe s. c., die eine mittlere Myometriumdicke von  $277,7 \mu\text{m} \pm 18,5 \mu\text{m}$  aufweist.

Auch im Endometrium des Uterus zeigt die Applikation der Substanzen einen Einfluss auf die Schichtdicke (Abb. 12).



**Abbildung 12:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf die Endometriumdicke; \*: Signifikanz p. o ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

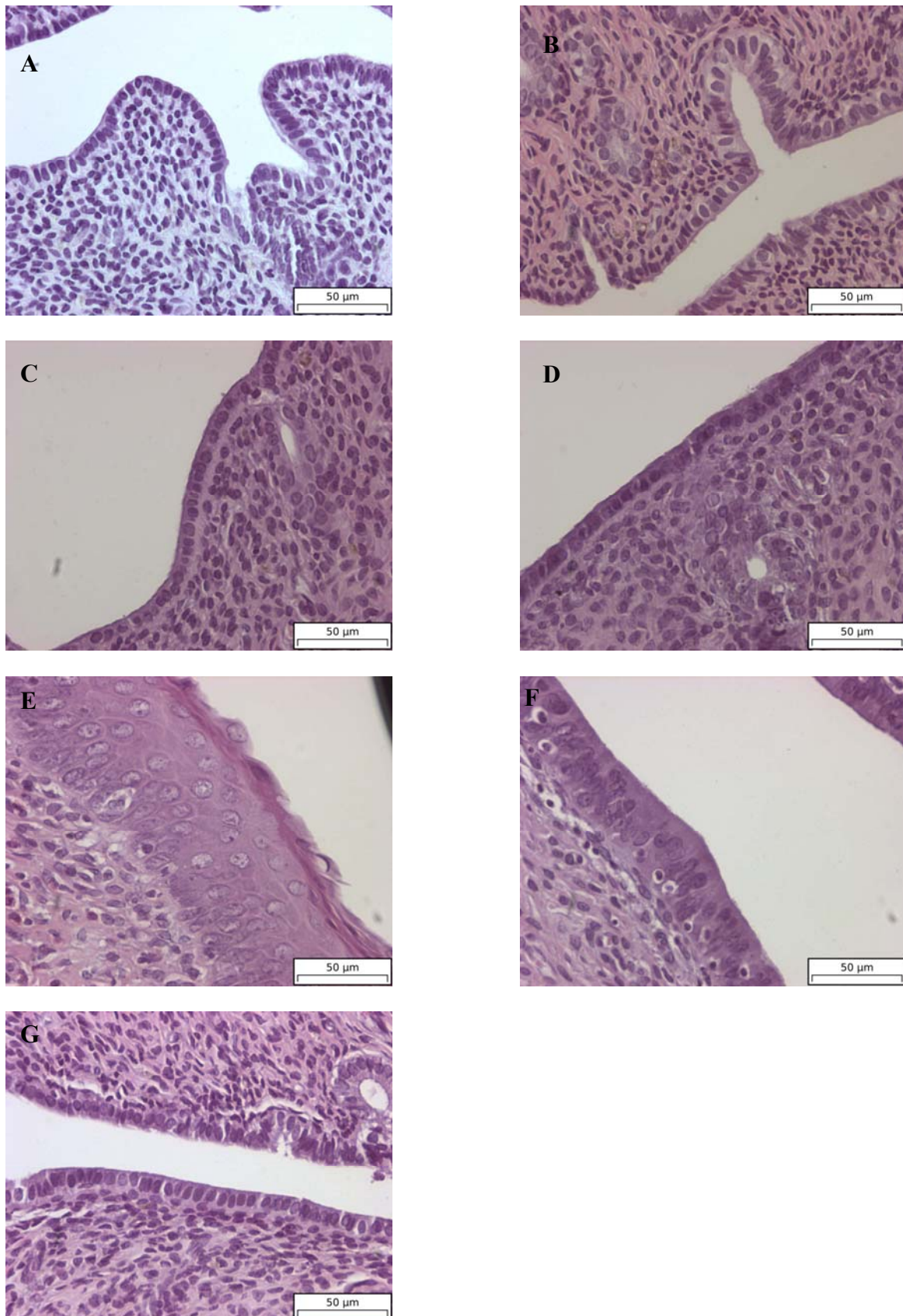
Eine signifikante Verdickung des Endometriums gegenüber der Kontrollgruppe zeigt sich bei den oral stimulierten Tieren sowohl in der Gruppe, die mit E2 gefüttert wurde als auch bei den Ratten, die die Phytoöstrogene aus CR sowie Equol als Futterzusatz erhielten. Die deutlichste Zunahme der Uterusschleimhaut zeigt die Östradiol- Gruppe mit einer durchschnittlichen Dicke von  $329,4 \mu\text{m} \pm 19,6 \mu\text{m}$ , gefolgt von den mit Equol behandelten Tieren mit  $323,8 \mu\text{m} \pm 11,3 \mu\text{m}$  und den mit CR zugefütterten Ratten mit  $274,7 \mu\text{m} \pm 5,4 \mu\text{m}$ . Der Futterzusatz von Metformin zeigte keine signifikante Veränderung hinsichtlich der Dicke des Endometriums gegenüber der Kontrollgruppe ( $245,7 \mu\text{m} \pm 9,3 \mu\text{m}$ ).

Bei den subkutan gespritzten Tieren zeigt die Tiergruppe, welcher E2 injiziert wurde, ebenfalls eine signifikante Verdickung des Endometriums. Im Mittel lag die Endometriumdicke hier mit  $431,5 \mu\text{m} \pm 20,5 \mu\text{m}$  deutlich über der Kontrollgruppe s. c., die eine durchschnittliche Schichtdicke von  $368,2 \mu\text{m} \pm 18,95 \mu\text{m}$  aufwies.

### 3.2 Epithel des Endometriums

Die Abbildungen 13 A-G zeigen Fotos der Epithelzellen des Endometriums der Rattenuteri in 40- facher Vergrößerung.





**Abbildung 13:** Mikroskopische Aufnahme des Rattenuterus 40-fach vergrößert der verschiedenen Versuchsgruppen. A: Kontrollgruppe p. o., B: Kontrolle, s. c., C: CR, p. o., D: Equol, p. o., E: E2, s. c., F: E2, p. o., G: Metformin, p. o.

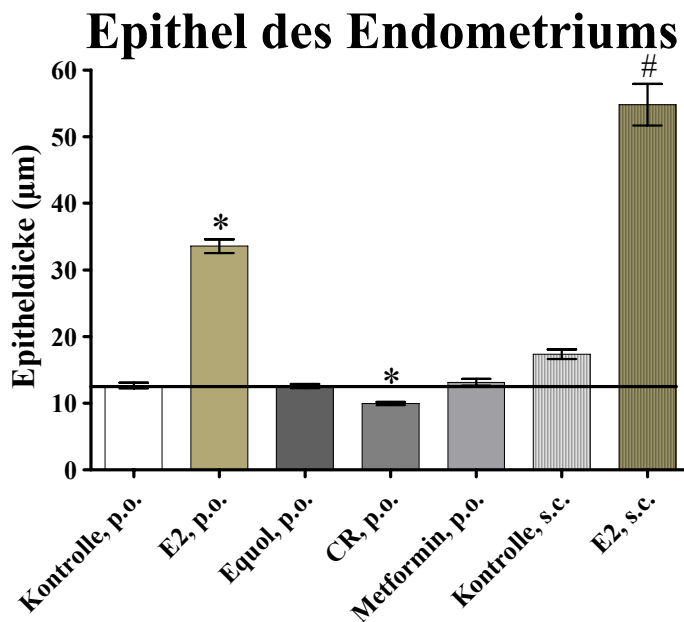


In den beiden Kontrollgruppen zeigen sich in der Abbildung 13 A und B isoprismatische, teils hochprismatische Epithelzellen mit runden Zellkernen, eine mitotische Aktivität (Zellteilung nach identischer DNA- Replikation) ist nicht zu sehen.

Bei den mit Östrogen stimulierten Gruppen kommt es zu einer deutlichen Verdickung des Epithels des Endometriums (Abb. 13E, F).

Das Epithel des Endometriums der Ratten, die mit den Substanzgruppen Equol, CR und Metformin behandelt wurden, weist optisch keine Besonderheiten und Veränderungen auf.

In Abbildung 14 ist die Epithelschichtdicke unter Einfluss der verschiedenen Substanzen dargestellt.



**Abbildung 14:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf die Dicke des Epithels vom Endometrium; \*: Signifikanz p. o ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

Das Uterusepithel der Tiere der Futter-Kontrollgruppe zeigt im Mittel eine Dicke von  $12,7 \mu\text{m} \pm 0,4 \mu\text{m}$  (Abb. 14). Für die Ratten mit E2 im Futter wurde eine starke Zunahme der Epitheldicke festgestellt. Im Mittel verbreiterte sich die Schicht auf  $33,6 \mu\text{m} \pm 1,0 \mu\text{m}$ , was über dem Doppelten der Kontrollgruppe liegt. Die orale Gabe der Substanzen Equol und Metformin zeigt so gut wie keinerlei Veränderungen im Epithel des Endometriums und dessen Dicke entspricht somit in etwa den Maßen der Kontrollgruppe (Equol:  $12,6 \mu\text{m} \pm 0,3$

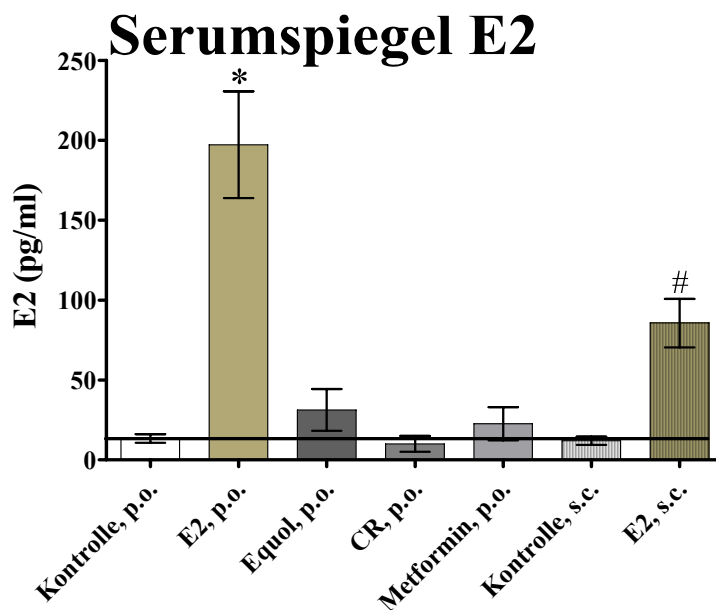
$\mu\text{m}$  und Metformin:  $13,1 \mu\text{m} \pm 0,5 \mu\text{m}$ ). Eine signifikante Abnahme der Dicke der Epithelzellen des Endometriums tritt bei den Ratten mit CR als Futterzusatz auf. Hier nimmt die Schichtdicke auf  $9,9 \mu\text{m} \pm 0,2 \mu\text{m}$  ab.

Bei den s. c. gespritzten Tiergruppen zeigt sich eine ähnlich starke Zunahme durch E2 wie nach oraler Gabe. Bei den mit E2 applizierten Tieren kommt es zu einer Verdreifachung der Epitheldicke im Vergleich zur Kontrolle auf eine Dicke von  $54,8 \mu\text{m} \pm 3,1 \mu\text{m}$ . Bemerkenswert ist, dass die durchschnittliche Dicke des Epithels des Endometriums der subkutan behandelten Kontrollgruppe mit  $17,6 \mu\text{m} \pm 0,7 \mu\text{m}$  größer ist als die der Kontrollgruppe p.o..

## 4. Analyse der Hormongehalte des Serums

### 4.1 Östradiolwerte

Radioimmunologisch wurden die Hormonwerte im Serum der Tiere bestimmt. Nach einer Substanzaufnahme von 42 Tagen spiegelt sich die Höhe des resorbierten E2 deutlich im Serum wider (Abb. 15).



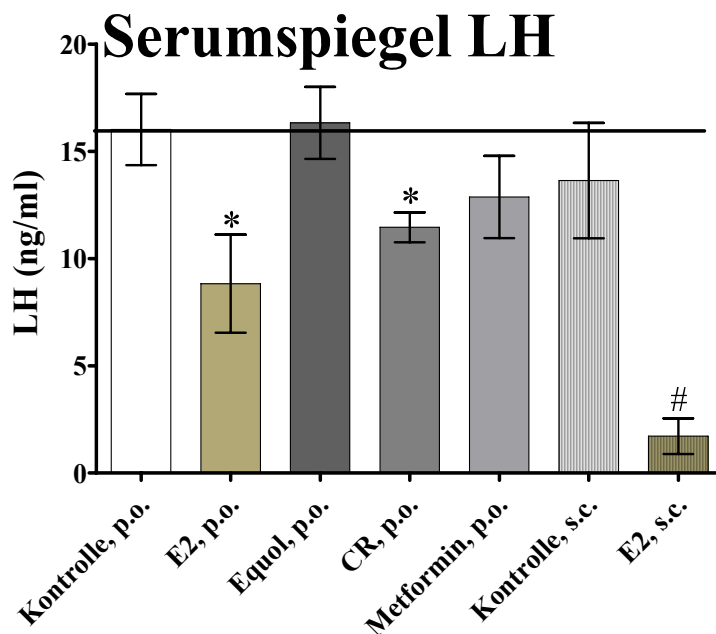
**Abbildung 15:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf den Serumspiegel von E2; \*: Signifikanz p. o ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

Bei den oral stimulierten Tieren erhöht sich der E2- Spiegel im Serum signifikant auf  $233,7 \text{ pg/ml} \pm 47,2 \text{ pg/ml}$  und liegt somit fast 18- fach über den Werten der Kontrollgruppe ( $13,4 \text{ pg/ml} \pm 2,7 \text{ pg/ml}$ ). Die Substanzen Equol und Metformin zeigen nur eine sehr leichte Zunahme des Serumspiegels, die mit CR stimulierte Gruppe mit  $10,0 \text{ pg/ml} \pm 5,0 \text{ pg/ml}$  sogar geringfügig gesenkte Östrogenkonzentration.

Bei den mit E2 subkutan applizierten Tieren kommt es zu einem geringeren, aber dennoch deutlichen, Hormonspiegel- Anstieg als bei der oral stimulierten Tiergruppe. Es ergibt sich eine knapp achtfache Erhöhung des Östradiolspiegels mit  $85,6 \text{ pg/ml} \pm 15,2 \text{ pg/ml}$  gegenüber der Kontrollgruppe s. c., die Durchschnittswerte von  $12,0 \text{ pg/ml} \pm 2,6 \text{ pg/ml}$  zeigt.

## 4.2 LH- Werte

Nach der 6-wöchigen Versuchsdauer liegt ein deutlich niedrigerer LH-Spiegel in den beiden Gruppen der mit Östrogen stimulierten Tiere, gegenüber den Kontrollgruppen, vor (Abb. 16). Hierbei ist zu beobachten, dass der Hormonspiegel bei den Ratten mit E2 als Futterzusatz weniger absinkt als der der subkutan gespritzten Tiere.

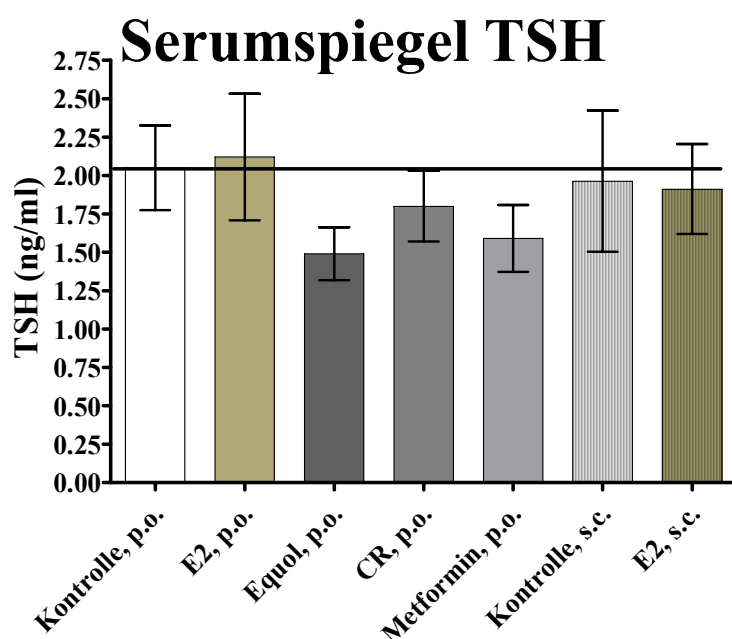


**Abbildung 16:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf den Serumspiegel von LH; \*: Signifikanz p. o. ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

In der oral stimulierten Gruppe halbiert sich der LH- Spiegel von 16,0 ng/ml  $\pm$  1,7 ng/ml der Kontrollgruppe p. o. auf 8,8 ng/ml  $\pm$  2,3 ng/ml (E2, p. o.) Bei den subkutan behandelten Versuchsratten ist hingegen nur ca. ein siebtel der LH-Konzentration bei den mit E2 applizierten Tieren (1,7 ng/ml  $\pm$  0,8 ng/ml), gegenüber der Kontrollgruppe (13,6 ng/ml  $\pm$  2,7 ng/ml), messbar. In den beiden Gruppen, welche mit Phytoöstrogenen stimuliert wurden, zeigt sich ein anderes Bild. Die Gruppe der mit Equol versetzten Futtersubstanz zeigt keinerlei Tendenz zur Erniedrigung des Serum- LH- Spiegels. Die Ratten, die CR oral aufnahmen, zeigen hingegen ein signifikantes, wenn auch im Vergleich zu E2 geringeres, Absinken der LH- Konzentration auf 11,5 ng/ml  $\pm$  0,7 ng/ml. Metformin zeigt ebenfalls einen tendenziell herabsetzenden Effekt auf den LH- Spiegel, welcher aber nicht signifikant ist.

### 4.3 TSH- Werte

Die TSH- Serumwerte verändern sich bei keiner der verabreichten Substanzen gegenüber den Kontrollgruppen signifikant. Die Messungen ergeben geringe Schwankungen im Nanogramm/ml- Bereich. Hierbei liegt die gemessene Konzentration der Kontrollgruppe p. o. mit  $2,1 \pm 0,23$  ng/ml sehr eng an der E2 p. o. stimulierten Gruppe, die Durchschnittswerte von  $2,1 \pm 0,4$  ng/ml erreicht. Eine nicht signifikante Tendenz zu einer Verringerung der TSH- Konzentration im Blut lässt sich für Equol, CR und Metformin erkennen (Abb. 17).



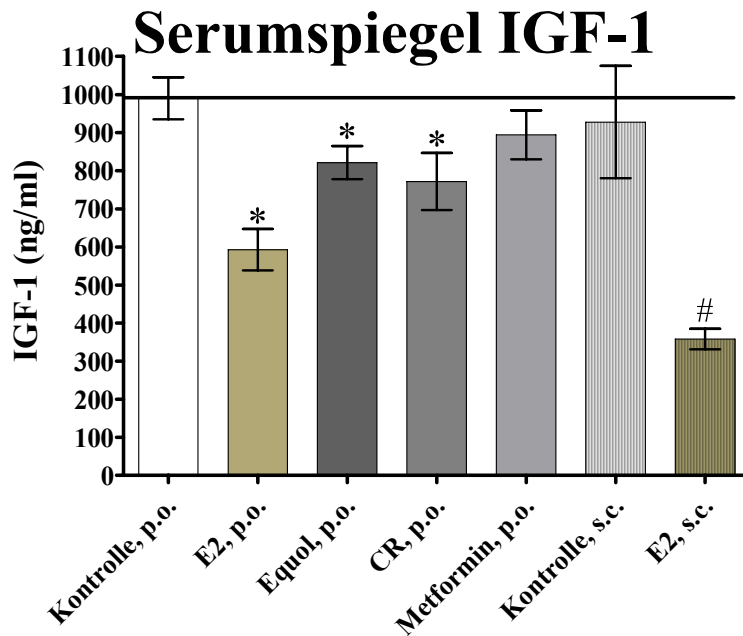
**Abbildung 17:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf den Serumspiegel von TSH; \*: Signifikanz p. o ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

### 4.4 IGF-1- Werte

Der IGF-1- Spiegel zeigt unterschiedliche Veränderungen nach Versuchsablauf.

In der Kontrollgruppe der oral stimulierten Tiere findet sich eine Durchschnittsmenge des IGF-1 von  $990,1 \text{ ng/ml} \pm 55,1 \text{ ng/ml}$ . Alle oral stimulierten Gruppen zeigen eine Verringerung des IGF-1- Spiegels. Während Metformin nur eine Tendenz anzeigt, sinkt unter Equol der Hormonwert signifikant auf  $821,3 \text{ ng/ml} \pm 43,4 \text{ ng/ml}$ , unter Zufütterung von CR fällt IGF-1 auf  $771,6 \text{ ng/ml} \pm 75,9 \text{ ng/ml}$ . Die deutlichste Abnahme tritt bei der Stimulation

mit E2 p. o. auf, hier fällt der IGF-1- Spiegel signifikant auf 592,9 ng/ml  $\pm$  54,5 ng/ml (Abb. 18).



**Abbildung 18:** Effekt von E2, Equol, CR und Metformin (42 Tage, p. o. und s. c. in ovx S. D. Ratten) auf den Serumspiegel von IGF-1; \*: Signifikanz p. o ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ )

Bei der mit E2 subkutan gespritzten Tiergruppe zeigt sich der gleiche Effekt. Bei diesen Ratten liegt der Hormonspiegel mit 358,2 ng/ml  $\pm$  26,7 ng/ml signifikant unter dem der Kontrollgruppe mit 927,5 ng/ml  $\pm$  147,3 ng/ml.

## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse

In den folgenden Tabellen werden die Ergebnisse der gemessenen Parameter zusammengefasst dargestellt.

**Tabelle 4:** Zusammenfassung der Ergebnisse in Bezug auf die Gewichte (Futtermittelaufnahme, Körpergewicht, Uterusgewicht) bei ovariectomierten S. D.- Ratten nach Gabe von E2 p. o. und s. c., Equol p. o., CR p. o. und Metformin p. o. über 42 Tage. ↑: Anstieg, ↓: Abfall, \*: Signifikanz p. o. ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ ), -: keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe erkennbar

	Futtermittelaufnahme (g)	Körpergewicht (g)	Uterusgewicht (g)
Kontrolle, p. o.	20,7 ± 0,8	335,9 ± 7,6	0,08 ± 0,002
E2, p. o.	↓	↓↓*	↑↑*
Equol, p. o.	-	↓*	↑*
CR, p. o.	-	↓*	-
Metformin, p. o.	-	-	-
Kontrolle, s. c.	20,6 ± 0,6	325,6 ± 19,1	0,09 ± 0,008
E2, s. c.	↓#	↓↓#	↑↑#

**Tabelle 5:** Zusammenfassung der Ergebnisse in Bezug auf die Dicke der Uterusschichten (Myometrium, Endometrium, Epithel des Endometriums) bei ovariectomierten S. D.- Ratten nach Gabe von E2 p. o. und s. c., Equol p. o., CR p. o. und Metformin p. o. über 42 Tage. ↑: Anstieg, ↓: Abfall, \*: Signifikanz p. o. ( $p < 0,05$ ), #: Signifikanz s. c. ( $p < 0,05$ ), -: keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe erkennbar

	Myometrium (µm)	Endometrium (µm)	Epithel des Endometriums (µm)
Kontrolle, p. o.	325,2 ± 8,9	245,7 ± 9,3	12,65 ± 0,4
E2, p. o.	↑*	↑*	↑↑*
Equol, p. o.	↓*	↑*	-
CR, p. o.	↓*	↑*	↓*
Metformin, p. o.	↓↓*	-	-
Kontrolle, s. c.	277,7 ± 18,5	368,2 ± 18,9	17,35 ± 0,7
E2, s. c.	↑↑#	↑↑#	↑↑#

**Tabelle 6:** Zusammenfassung der Ergebnisse in Bezug auf die Hormonparameter im Serum (E2, LH, TSH, IGF-1) bei ovariectomierten S. D.- Ratten nach Gabe von E2 p. o. und s. c., Equol p. o., CR p. o. und Metformin p. o. über 42 Tage. ↑: Anstieg, ↓: Abfall, \*: Signifikanz p. o (p<0,05), #: Signifikanz s. c. (p<0,05), -: keine Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe erkennbar

	E2 (pg/ml)	LH (ng/ml)	TSH (ng/ml)	IGF-1 (ng/ml)
Kontrolle, p. o.	13,4 ± 2,7	16,0 ± 1,7	2,1 ± 0,4	592,9 ± 54,5
E2, p. o.	↑↑*	↓↓*	-	↓↓*
Equol, p. o.	↑	-	↓	↓*
CR, p. o.		↓*	↓	↓*
Metformin, p. o.		↓	↓	↓
Kontrolle, s. c.	12,0 ± 2,6	13,6 ± 2,7	2,0 ± 0,5	927,5 ± 147,3
E2, s. c.	↑#	↓↓#		↓↓#



## IV Diskussion

### 1. Zielsetzung

Seit den Veröffentlichungen der Ergebnisse der WHI-Studie und der Million- Woman- Studie ist die Anwendung der klassischen Hormonersatztherapie im Zuge von Wechseljahresbeschwerden stark umstritten (Gray 2003). Die Einnahme von Östrogen in Kombination mit Progesteron führt nachweislich zu einem erhöhten Risiko, an hormonabhängigen Tumoren wie Brustkrebs zu erkranken (Beral 2003; The Writing Group for the PEPI Trial 1996). Neue Therapieoptionen für die Behandlung von Frauen mit klimakterischen Beschwerden sind somit aktueller Gegenstand der Forschung. Hierbei steht die Suche nach Substanzen, die positive Eigenschaften wie z.B. Osteoporoseschutz oder Prävention von Brustkrebs aufweisen, ohne dabei nachteilige Wirkungen wie Thrombose oder eine Zunahme des Endometrium-Ca zu besitzen (Palacios 2007), im Vordergrund. Mit der Entdeckung der SERMs ist eine Steuerung von gewebspezifischen östrogenen und antiöstrogenen Wirkungen eingeschränkt möglich. Bis heute wird nach einem selektiven Modulator gesucht, der ausschließlich die gewünschten positiven Effekte der Östrogen-Hormontherapie bewirkt, ohne die typischen unerwünschten Wirkungen auszulösen. Neben den chemisch synthetisierten SERMs wie Tamoxifen und Raloxifen stellen Phytoöstrogene hier eine mögliche Alternative dar.

Über ihr Potential als Phytopharmaka Wirkungen auf die Zielgewebe von Östrogenen zu entfalten, mit entsprechend günstigen und ggf. ungünstigen Resultaten, ist derzeit noch wenig bekannt. Trotz einer beachtlichen Anzahl durchgeführter Studien ist die Wirkungsweise der Phytoöstrogene umstritten. Gleichzeitig werden aber Nahrungsergänzungsmittel mit einem hohen Gehalt an Phytoöstrogenen angeboten (Maul 2008). Um die Wirkung und mögliche Nebenwirkungen dieser Substanzen zu untersuchen, sind detaillierte Ergebnisse von placebokontrollierten Patientinnen-Studien von Nöten. Ebenso müssen die Folgen einer Langzeitanwendung untersucht werden.

Zum Verständnis der physiologischen Wirkung von Phytoöstrogenen sind ferner Tierversuchsstudien unabdingbar, um die Interaktion dieser Substanzen ausführlich untersuchen zu können. Ziel dieser Arbeit war es, die pflanzlichen Substanzen aus *Cimicifuga racemosa* sowie Equol und das orale Antidiabetikum Metformin auf ihre Östrogenität und mögliche SERM- Wirkungen nach Langzeitapplikation zu untersuchen. Als Untersuchungsparameter wurden die Körper- und Uterusgewichte, die Beurteilung der

Uterushistologie sowie die Serumparameter E2, LH, TSH und IGF-1 gewählt. E2 wurde als Positiv-Kontrolle zur Beurteilung der Ergebnisse der Testsubstanzen eingesetzt.

Eine agonistische Östrogenwirkung bezüglich der Körpergewichte und Hormonwerte wäre wünschenswert, da es durch den Abfall von Östrogen häufig zu einer Gewichtszunahme und durch die Veränderung der Hormonspiegel zu den vegetativ-vasomotorischen Symptomen wie z.B. Hitzewallungen kommt. Am Uterus wäre ein antagonistischer Östrogeneffekt, um einer östrogenvermittelten Endometriumproliferation und dadurch bedingter Krebsentstehung entgegen zu wirken, von Vorteil.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sollen das Wissen über die Wirksamkeit der Phytoöstrogene weiter ergänzen und einen Ausblick auf mögliche therapeutische Alternativen zur klassischen HET bei Behandlung der postmenopausalen Beschwerden liefern.

## **2. Wirkung auf das Körpergewicht**

Alle Tiere haben im Versuchsverlauf zugenommen, was unter anderem durch ihr physiologisches Wachstum zu erklären ist. Basierend auf der hormonellen Umstellung kommt es häufig zu einer Gewichtszunahme, vor allem die Masse des Stammfettes nimmt zu und die Prävalenz des Metabolischen Syndroms steigt (Carr 2003).

Sowohl die mit E2 behandelten Tiere als auch die Tiergruppen, die Phytoöstrogene mit der Nahrung erhielten, wiesen am Ende der Studie ein signifikant geringeres Körpergewicht auf als die Kontrollgruppe (Abb. 7). Dieser Effekt zeigte sich besonders deutlich, wenn man die Unterschiede in der physiologischen Gewichtszunahme der Tiere betrachtet (Abb. 8). Die stärkste Wirkung erbrachte hierbei E2, wobei kein deutlicher Unterschied zwischen der Applikationsart zu beobachten ist. Diese Wirkung kann nicht auf eine, durch den Futtermittelzusatz bedingte geringere Nahrungsaufnahme zurückzuführen sein, da die durchschnittliche Futteraufnahme über den Zeitraum der gesamten Studie, kalkuliert in g/kg Körpergewicht, in allen oral applizierten Gruppen nicht entscheidend voneinander abwich (Tab. 4). Nur bei der s. c. Gabe von E2 zeigte sich, aus ungeklärten Gründen, eine signifikante Verringerung der Nahrungsaufnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 6).

Den stärksten Effekt der Phytoöstrogene auf das Tiergewicht wies hierbei Equol auf gefolgt von CR. Eine weitere Untersuchung der Versuchstiere ergab, dass beide

Phytoöstrogengruppen darüber hinaus eine Verminderung der intra-abdominellen Fettanhäufung zeigten (Daten veröffentlicht in Rachon et al. 2007).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die zwei untersuchten Phytoöstrogene einen positiven Effekt auf die, mit der Menopause verbundene, Gewichtszunahme und Fettumverteilung haben könnten. Da allerdings alle Tiere wachstumsbedingt während der Studie an Gewicht zunehmen ist unklar, ob die gefundenen Effekte auf eine Wirkung auf die Körperfettakkumulation oder auf das veränderte Wachstum zurückzuführen sind.

Die Langzeitverabreichung von Metformin bewirkte keinen Einfluss auf das Körpergewicht. Die Gewichte dieser Tiergruppe waren bei Versuchsende nahezu identisch mit der Kontrollgruppe.

### **3. Wirkung auf den Uterus**

Der Uterus diente in dieser Untersuchung als Referenzorgan, da Östrogene an diesem Organ proliferierend wirken. Eine dauerhafte E2- Substitution zur Behandlung von klimakterischen Beschwerden wie sie in der klassischen HET angewandt wurde führt zu einem vermehrten Endometriumwachstum und erhöht somit, als Tumorpromotor, die Anzahl von malignen Entartungen (Feeley und Wells 2001). Von den in dieser Arbeit untersuchten Phytoöstrogenen erwünscht man sich daher antagonistische Östrogeneffekte auf den Uterus. Die Resultate der Messung der Uterusgewichte und die Ergebnisse der Histologie der einzelnen Schichten werden bezüglich dieser Annahme im Folgenden diskutiert.

#### **3.1 Wirkung auf das Uterusgewicht**

Im Anschluss an die Tötung der Tiere wurde das Organ exstirpiert und das Uterusfeuchtgewicht erfasst, um eine Aussage über die Östrogenität der verwendeten Substanzen an der Gebärmutter treffen zu können.

Vermittelt über ER $\alpha$  (siehe I 2.2) führt E2, wie erwartet, zu einer starken Zunahme (4-fach) des Uterusgewichts (Abb. 9). Die Tiergruppen, denen E2 als s. c. Injektion zugeführt wurde, weisen ein noch deutlicheres Organwachstum auf (5-fach). Dieses lässt sich durch eine höhere Dosis von E2 nach s. c. Injektion erklären. Zum einen muss angenommen werden, dass E2 bei

oralen Aufnahme nicht vollständig resorbiert wird, zum anderen resultiert durch s. c. Applikation ein E2- Depot im Fettgewebe der Tiere. Dieses Depot gewährleistet eine längere Wirkstoffkonzentration von E2 im Blut. Weiterhin wird bei der s. c. Injektion eine direkte Metabolisierung umgangen, wie sie bei oraler Aufnahme im Darm und Transport direkt in der Leber stattfindet (First- Pass Effekt).

Durch die orale Equolgabe (6,87 mg/Tag/Tier) über 42 Tage kam es in diesem Versuch zu einer leichten, aber signifikanten Erhöhung des Uterusgewichts, die im Vergleich zu E2 allerdings deutlich geringer ausfällt. Dieses Ergebnis wurde bereits im Rahmen einer weiteren Auswertung der Tierversuchsstudie publiziert. Für Equol ist in der Literatur *in vitro* eine starke Bindung an die ER beschrieben (Maul 2008). Die gefundene Erhöhung des Uterusgewichts in unserem Experiment deutet also auf eine agonistische Wirkung von Equol auf das Uterusgewebe hin. Somit ist die Zunahme des Uterusgewichts vermutlich durch eine ER vermittelte Wirkung zu erklären. Selvaraj et al. beschreiben in einem ähnlichen Experiment ebenso eine signifikante Wirkung von Equol auf das Uterusgewicht. Hier wurden ovx Ratten über 12 Tage durch Futterzusatz und s. c. Injektionen mit Equol in verschiedenen Dosen behandelt. In den gespritzten Gruppen resultierte bei höheren Dosierungen (12 mg und 20 mg/ kg Körpergewicht) eine signifikante Zunahme des Uterusgewichts (Selvaraj et al. 2004). Diese Ergebnisse weisen daraufhin, dass Equol bei Langzeitverabreichung oder hoch dosierter s. c. Injektion eine milde, vermutlich über ER $\alpha$  vermittelte, uterotrope Aktivität aufweist.

Die in der vorliegenden Arbeit getestete Phytoöstrogenmischung aus *Cimicifuga racemosa* (CR) zeigt nach der Langzeitapplikation von 6 Wochen, in der gewählten Konzentration, keinen Effekt auf das Uterusgewicht. Dieses Ergebnis entspricht verschiedenen anderen *in-vivo*- Studien. Weder in der Kurzzeit/Akutanwendung noch in der Langzeittherapie wies CR Auswirkungen auf die Uterusmasse auf (Rachon et al. 2008/b; Seidlova-Wuttke et al. 2003; Wuttke et al. 2003/a). Es kann also geschlussfolgert werden, dass CR keine oder nur eine sehr geringe, über ER $\alpha$  vermittelte, östrogenagonistische- uterotrope Aktivität besitzt.

Die orale Metformingabe bewirkt, entsprechend den Erwartungen, keinerlei Konsequenz bezüglich des Uterusgewichts. Metformin ist weder *in vitro* noch *in vivo* als ER bindende

Substanz beschrieben und nimmt so keinen Einfluss auf die durch ER ( $\alpha$ ) vermittelte Zunahme des Uterusgewebes.

### **3.2 Wirkung auf die Histomorphologie des Uterus**

Die histologische Auswertung der Uteri dieser Versuchsreihe zeigte unter E2-Gabe eine deutliche Zunahme der untersuchten Schichtdicken des Uterus. Die verwendeten Phytoöstrogene und Metformin zeigten bezüglich der Histomorphologie von Myometrium, Endometrium und Epithel des Endometriums unterschiedliche Ergebnisse.

Durch welche Mechanismen (Hypertrophie, Hyperplasie, Proliferation) es jeweils zu einer Zunahme der gemessenen Uterusschichten gekommen ist, lässt sich mit der in der Arbeit verwendeten Methode nicht differenzieren, da weder die Zellzahl pro Fläche noch Zellvolumina gemessen wurden. Ebenso wurde die Mitoserate nicht bestimmt, noch die Proliferation anhand üblicher Marker erfasst. Aus der Literatur ist bekannt, dass Östrogene zu einer Proliferation und Hypertrophie des Uterus und so zu einer Vergrößerung dieses Gewebes führen. Deshalb kann angenommen werden, dass die im Rahmen dieser Arbeit beobachteten Zunahmen in den Schichtdicken der Uteruswand (Myometrium, Endometrium, Epithel des Endometriums) auf o.g. Mechanismen zurückzuführen sind.

Der Einfluss der getesteten Substanzen auf die einzelnen Uterusschichten wird im Folgenden diskutiert.

#### **3.2.1 Myometrium**

E2 führte im Myometrium zu einer signifikanten Zunahme der Schichtdicke und zeigte damit einen deutlichen uterotrophen Effekt (Abb. 11). Im Gegensatz hierzu erbrachten die verwendeten Phytoöstrogene eine entgegengesetzte Wirkung.

So kam es bei oraler Equolgabe zu einer geringen, aber signifikanten Abnahme der Myometriumdicke. CR bewirkte eine etwas deutlichere Abnahme der Myometriumdicke. Diese Ergebnisse decken sich mit anderen Studien. So konnte in verschiedenen Arbeiten keine östrogen- ähnliche Aktivität von Equol und CR im Uterus der ovx Ratte nachgewiesen werden (Seidlova-Wuttke et al. 2003). Die untersuchten Phytoöstrogene zeigten also bezüglich des Myometriums keine östrogenagonistischen Wirkungen. Dieses deutet darauf

hin, dass weder Equol noch die Substanzen aus CR mit dem in diesem Gewebe exprimierten ER interagieren. Gemäß Sakaguchi et al. wird im Myometrium bzw. im gesamten Uterus besonders ER $\alpha$  exprimiert (Sakaguchi et al. 2003). Allerdings wird deutlich weniger ER in diesem Gewebe des Uterus gebildet als z.B. im Endometrium (Scharl et al. 1987), so dass die Konzentration der eingesetzten Phytoöstrogene zu gering gewesen sein könnte, um einen Effekt zu erzielen. Somit kann nicht ausschließlich von einer selektiven „Nicht-Bindung“ an die im Myometrium exprimierten ER ausgegangen werden.

Interessanterweise führt Metformin, nach einer Verabreichungszeit von 42 Tagen, zu der deutlichsten Abnahme der Myometriumdicke. Metformin ist nicht als Östrogenagonist oder Antagonist bekannt. Seine Wirkung entfaltet es durch eine Steigerung der E2- Produktion im Ovar, u. a. durch eine Erhöhung der Aromatase- Aktivität (Takemura et al. 2007). Für die deutliche Abnahme der Myometriumdicke kann hier keine ursächliche Begründung geliefert werden. Eine mögliche Begründung liegt in der IGF-1 ähnlichen Wirkung von Insulin im Uterus, wie von Kacalska et al. beschrieben (Kacalska et al. 2005). Ein Absinken des Insulinspiegels durch Metformin würde so zu weniger Proliferationssignalen führen. Ein derart deutlicher Effekt von Insulin auf den Uterus, mit einer Spezifität für das Myometrium, ist aber bisher nicht beschrieben.

### **3.2.2 Endometrium**

Wie im Myometrium führte eine E2- Gabe bei ovx Ratten erwartungsgemäß zu einer deutlichen Zunahme der Drüsenschicht (Abb. 12).

Bemerkenswerterweise zeigte das Phytoöstrogen Equol den gleichen Effekt auf das Endometrium. Es kam zu einer nahezu gleichen Zunahme der Endometriumdicke wie bei den oral mit E2 stimulierten Tieren. Equol wirkte also östrogenagonistisch auf das Endometrium, und die Erhöhung des Uterusgewichtes ist vermutlich auf die stark induzierte Proliferation des Endometriums zurückzuführen. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine ER vermittelte Wirkung des Phytoöstrogens Equol zurückzuführen. Im Endometrium liegt vor allem ER $\alpha$  vor (Frasor et al. 2003) und es werden deutlich mehr Rezeptoren im Endometrium exprimiert als in den anderen Geweben/ Schichten des Uterus (Scharl et al. 1987). Somit reagiert das Endometrium erheblich stärker auf Östrogene als das Myometrium. Dieses könnte eine Erklärung für den uterotrophen Effekt von Equol auf das Endometrium und den gleichzeitig

abnehmenden Effekt auf die Myometriumdicke (s. o.) sein. Bemerkenswert ist allerdings, dass Equol auf das Endometrium fast ebenso stark wirkt wie E2, denn Equol zeigt *in vitro* eine deutlich geringere Affinität an ER $\alpha$  (Gurer-Orhan et al. 2005). Somit ist es wahrscheinlich, dass weitere Faktoren als nur die Bindung an ER $\alpha$  für die Equolwirkung auf das Endometrium verantwortlich sind.

Insgesamt ist die uterotrophe Wirkung auf dieses Gewebe unter dem Aspekt kritisch zu bewerten, da die meisten Uterustumore dem Endometrium entstammen.

Die CR- Applikation führte zu einer geringen, aber signifikanten Zunahme der Endometriumdicke. Dieser Befund steht im Widerspruch zu Ergebnissen, die eine Anwendung als Medikament bei postmenopausalen Frauen beschreiben. In einer Studie mit 62 postmenopausalen Frauen mit klimakterischen Beschwerden wurde die Wirkung von CR mit 40 mg/ Tag in einer Anwendung über 3 Monate getestet. Im Rahmen dieser Beobachtung kam es zu keiner Zunahme der Endometriumdicke, so dass CR als sichere Alternative bei der medikamentösen Therapie von Wechseljahresbeschwerden diskutiert werden muss (Wuttke et al. 2003/b). Eine andere Untersuchung an 400 Frauen in der Postmenopause erbrachte nach einer Langzeitanwendung von einem Jahr, mit selbiger Präparatsdosis, das gleiche Ergebnis; es kam zu keinem, durch die Einnahme von CR vermittelten, uterotrophen Effekt (Raus et al. 2006). Mögliche Erklärungen für den abweichenden Befund in dieser Studie könnten in einer spezieabhängigen unterschiedlichen Wirkung liegen, oder darin, dass die hier applizierte Menge (135 mg/Tier/Tag) deutlich oberhalb der in der Humanstudie eingesetzten täglichen Gabe lag.

Das orale Antidiabetikum Metformin hat nach 42 Tagen als Futterzusatz keine signifikanten Auswirkungen auf das Endometrium der ovx Ratte. Allerdings belegen Studien für dieses Biguanid eine Proliferation der Stromazellen des Endometriums (Takemura et al. 2007). Hierbei dürfte aber, wie oben diskutiert, diese Wirkung durch die induziert erhöhte endogene (ovarielle) Östrogenproduktion durch Metformin zu begründen sein. Da dieser Effekt in einer ovx Ratte nicht zum Tragen kommen kann, entspricht das Ausbleiben einer Wirkung in unserem Experiment den Erwartungen.

### 3.2.3 Epithel des Endometriums

Die E2- Gabe führte, wie erwartet, zu einer Schichtdickenzunahme der Epithelzellen des Endometriums (Abb. 14). Mikroskopisch zeigte sich das Epithel des Endometriums stark vergrößert, eine Zunahme der Schichtdicke ist deutlich erkennbar (Abb. 13 E, F)

Die Langzeitverabreichung von Equol erbrachte im Rahmen dieses Versuches keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe. Frühere Studien an ovx Mäusen führten zu gegenteiligen Ergebnissen. So konnten Selvaraj et al. nach einer 12- tägigen s. c. Equolgabe eine Proliferation des Uterusepithels bei den Versuchsgruppen mit hohen Präparatdosen nachweisen. Bei der Wirkung des Equols auf das Uterusepithel scheint aber die Darreichungsform von Equol eine wichtige Rolle zu haben (Selvaraj et al. 2004). So konnten Selvaraj et al., ebenso wie in unserem Experiment, nach oraler Equolgabe keinen Effekt auf das Uterusepithel beobachten. Ferner traten die beschriebenen Effekte nur bei einer hohen täglichen Injektionsmenge von 8-20 mg/kg KG auf (Selvaraj et al. 2004).

Equol kann also eine östrogenähnliche, vermutlich über ER vermittelte, Aktivität auf das Epithel des Endometriums ausüben. Eine erkennbare Wirkung ist allerdings nur nach der Gabe von sehr hohen Dosen messbar. Somit kann durch das Ausbleiben einer Wirkung in unserem Experiment für das Epithel des Endometriums nicht grundsätzlich von einer selektiven „Nicht-Bindung“ an die im Epithel des Endometriums exprimierten ER ausgegangen werden.

Das zweite getestete Phytoöstrogen (CR) zeigte eine geringfügige, aber signifikante Abnahme der Epitheldicke des Endometriums. CR bewirkt damit keinen uterotrophen und einen schwach östrogenantagonistischen Effekt. Hiermit entspricht CR der erwünschten Wirkung für die Anwendung als Pharmakon bei postmenopausalen Beschwerden, da es weder auf das Epithel des Endometriums noch auf das Myometrium einen stimulierenden Effekt ausübt und die Zunahme der Endometriumdicke sehr gering, wenn auch signifikant ist. Die Wirkung von CR könnte durch keine oder keine große Wirkung auf den ER $\alpha$  am Uterus, oder dadurch, dass die Substanzen aus CR nach Bindung an den ER keine DNA- Bindung und damit keine zellproliferierende Wirkung zeigen (siehe I 2.2), begründet sein.

Eine orale Metformingabe erbrachte, wie erwartet, keinen Effekt auf das Uterusepithel (siehe IV 3.2.2).



#### 4. Wirkung auf die Serumparameter

Die in dieser Arbeit untersuchten Hormone werden alle von der Hypophyse sekretiert. Sie unterliegen, wie in Kapitel I 7.2 beschrieben, dem Kreislauf der Hypothalamus- Hypophysen- Gonaden- Achse. Durch die Untersuchung dieser Hormonspiegel im Blutserum kann eine Aussage über die Wirkung der Substanzen auf die im Hypothalamus lokalisierten ER-Rezeptoren getroffen werden. Die verschiedenen gemessenen Parameter werden im Folgenden einzeln diskutiert.

##### 4.1 Östradiolwerte (E2-Serumkonzentration)

Im Zuge der hormonellen Umstellung in den Wechseljahren kommt es zum drastischen Abfall des Serum- Östrogenspiegels. Diese Veränderung wird für einen Großteil der klimakterischen Beschwerden verantwortlich gemacht (Hall und Phillips 2005; Maartens et al. 2002; Pandit und Ouslander 1997). Eine geschlechtsreife Frau hat während des Eisprungs durchschnittliche Östradiolwerte von 150 bis 600 pg/ml, während nach der Menopause der Spiegel deutlich absinkt.

Die im Experiment gemessenen Serumspiegel von E2 waren bei den ovx Ratten der Kontrollgruppen erwartungsgemäß sehr niedrig (Abb. 15). Folglich führte die E2-Substitution bei den ovx Ratten zu einem starken Anstieg des Serum E2- Spiegels. Hierbei führte, bei einer ähnlichen Menge an verabreichtem E2, die orale Gabe von E2 überraschenderweise zu einer deutlich höheren Konzentration als die s. c. Applikation. Wie bereits diskutiert, wird durch s. c. Applikation die Metabolisierung durch den enterohepatischen Kreislauf umgangen/ reduziert. Ein höherer Plasmaspiegel nach s. c. Applikation wäre erwartet worden. Gründe für diesen Befund können in einer verstärkten Akkumulation im abdominalen Fettgewebe nach s. c. Applikation liegen.

Aufgrund ihrer anderen chemischen Natur bewirkte die Gabe der Phytoöstrogene und Metformin keine direkten Veränderungen der Serum E2- Konzentration. Für östrogenwirksame Substanzen wäre eine Wirkung über die Feedback-Hemmung (=negative Rückkopplung) der E2- Synthese denkbar. So könnte durch eine starke Bindung der Phytoöstrogene an die ER der E2- synthetisierenden extragonadalen Zellen, z.B. im Fettgewebe, deren E2- Syntheserate reduziert werden. Kein Effekt ist hierbei für Equol, bei einer oralen Gabe von 6.87 mg/Tag, zu beobachten. Hingegen lässt sich ein (nicht

signifikanter) Trend zu einer reduzierten E2- Synthese in ovx Ratten nach CR- Gabe beobachten (Abb. 15). Dieses könnte auf eine Bindung der Substanzen aus CR an die ER in diesen Geweben hindeuten. Da diese Wirkung allerdings gering und nicht signifikant ist, sind weitere Experimente notwendig, um eine fundierte Aussage treffen zu können. Interessant wäre ein solcher Versuch auch mit nicht ovx Ratten, da hier die Wirkung auf die stärkere E2- Synthese der Ovarzellen zu deutlicheren Effekten führen könnte.

#### **4.2 LH- Werte**

Zu den klassischen vegetativ- vasomotorischen Symptomen des Klimakteriums zählen Schweißausbrüche und Hitzewallungen. Die Genese wird über den Abfall des Östrogens und den dadurch resultierenden Anstieg des Serumspiegels von LH erklärt (LH wird pulsatil sekretiert).

Eine dauerhafte E2-Gabe führte in dieser Tierversuchsstudie zu einem signifikanten Absinken der LH- Serumspiegel. Dieses lässt sich so erklären, dass die ansteigenden E2- Mengen im Körper, über negative Rückkopplung, die zentrale Hormonproduktion im Hypothalamus hemmen (Göretzlehner und Lauritzen 2000). Bei den subkutan gespritzten Tieren ist, da durch Umgehung des hepatischen Abbaus eine konstante Substratkonzentration erreicht wird, der Effekt des erniedrigten LH- Spiegels noch deutlicher (Abb. 16).

Equol zeigte in der durchgeführten Studie keinen Effekt auf den LH- Serumspiegel der ovx Ratten. Somit scheint es keine zentralen Wirkungen zu entwickeln. Dieses ist vermutlich darüber zu erklären, dass Equol weder an den ER noch an anderen, für die Regulation des LH-Spiegels wichtigen Rezeptoren als Ligand bindet. Ein positiver Effekt auf die klimakterische Symptomatik im Sinne einer Reduktion von Hitzewallungen und Schweißausbrüchen ist somit nicht zu erwarten.

Nach 6 Wochen Versuchsdauer kommt es zu einer signifikanten Absenkung des LH- Serumspiegels in der Gruppe der mit CR als Futterzusatz behandelten Tiere. Die Ursache der Wirkung von CR auf den LH- Spiegel wird derzeit wissenschaftlich kontrovers diskutiert. Frühere Arbeiten gingen davon aus, dass CR mindestens drei Fraktionen endokrinologisch aktiver Substanzen enthält. Die erste zeigt keine Bindung an die ER, die zweite ist Ligand der

ER, aber nur die dritte Fraktion zeigt nach ER Bindung einen Effekt auf die LH- Sezernierung (Duker et al. 1991). Neuere Überlegungen gehen davon aus, dass CR seinen positiven Effekt auf die *hot flushes* nicht im Sinne einer östrogenagonistischen Wirkungsweise, vermittelt über ER $\alpha$  und ER $\beta$ , ausübt. Vielmehr wird eine Bindung an andere Rezeptoren, wie z. B. an Serotonin- HT- Rezeptoren angenommen. Hierbei wirken die Substanzen aus CR vermutlich als kompetitiver Ligand mit teilagonistischer Wirkung (Burdette et al. 2003).

Durch die deutliche Wirkung auf den LH-Spiegel kann ein positiver Effekt auf die vegetativen postmenopausalen Beschwerden somit angenommen werden. Dieser wurde bereits auch in Humanstudien belegt (Raus et al. 2006; Wuttke et al. 2003/b).

Auch die orale Metformingabe bewirkte bei den ovx Ratten eine, wenn auch nicht signifikante, Abnahme des LH- Serumspiegels. Dieses Ergebnis entspricht den Befunden einer Studie an Frauen mit PCOS. Hierbei führte eine 6- monatige Dosis von 2550 mg/Tag zu einer Absenkung der LH- Werte (Sahin et al. 2007). Diese Effekte wurden allerdings über die These einer modulierenden Wirkung von Metformin auf die Ovarfunktion (Hypothalamus- Hypophysen- Gonaden- Achse, s.o.) erklärt (Morin-Papunen et al. 1998). Folglich kann dies nicht als Begründung für eine Wirkung in der ovx Ratte herangezogen werden.

#### **4.3 TSH- Werte**

TSH wird auf Anreiz von TRH vom Hypophysenvorderlappen sekretiert (siehe I 7.2). Es wirkt sowohl stimulierend auf das Wachstum als auch auf die Hormonproduktion der Schilddrüse von t3 und t4. Da eine ausgeglichene Schilddrüsenfunktion (euthyreote Stoffwechsellage) für den Körper ausgesprochen wichtig ist, wurde der Einfluss der untersuchten Substanzen auf den TSH- Serumspiegel in diesem Versuch betrachtet.

In dieser Arbeit führte keine der verwendeten Testsubstanzen zu einer signifikanten Ab- oder Zunahme der TSH- Serumwerte (Abb. 17). Eine leicht abnehmende Tendenz wurde für Equol, Metformin und CR beobachtet.

Phytoöstrogene als auch E2 scheinen nicht in den TSH- Kreislauf einzugreifen, was als positiv zu bewerten ist.

#### 4.4 IGF-1- Werte

IGF-1 wird von der Leber auf Anreiz von verschiedenen, aus der Hypophyse ausgeschütteten, Stoffen, wie z.B. GH oder E2, produziert. Es ist ein Wachstumsfaktor für eine Vielzahl von Geweben (siehe I 7.2).

Bei den mit E2 behandelten Tieren lag die IGF-1- Konzentration deutlich und signifikant unterhalb der Werte der Kontrollgruppen (Abb. 19). Für ovariectomisierte Ratten ist ein Anstieg der IGF-1 Plasmakonzentration beschrieben (Barengolts et al. 1996; Gaumet et al. 1997). Bezüglich der Wirkung von E2 auf den IGF-1- Spiegel von ovx Ratten liegen in der Literatur widersprüchliche Angaben vor. Während Barengolts et al. keinen Einfluss auf den IGF-1- Level durch E2 beschreiben (Barengolts et al. 1996), kam es bei Gaumet et al., wie in unserem Experiment, zu einem Absinken des Plasmaspiegels (Gaumet et al. 1997). Bezüglich des Osteoporoserisikos sind diese Ergebnisse schwer zu interpretieren. Insbesondere ist es fraglich, ob die gemessenen Plasmaspiegel die Konzentration von IGF-1 am gewünschten Wirkungsort (Knochengewebe) repräsentieren.

Auch die Gabe von Equol und CR führte in diesem Versuch zu einer ähnlichen, wenn auch geringeren, Reduktion der IGF-1- Plasmakonzentration, wobei CR den stärkeren Effekt bewirkte.

Das gesteigerte Risiko, im Zuge der Menopause an Osteoporose zu erkranken, wird durch den Abfall der Östrogenmenge begründet. Dieser Annahme folgend wäre also, im Hinblick auf die Osteoporoseprävention, eine Erhöhung des IGF-1 im Knochengewebe ein gewünschter Effekt. Allerdings wird eine erhöhte IGF-1- Plasmakonzentration mit einem gesteigerten Risiko, an einem Mamma- Ca zu erkranken, assoziiert (Campbell et al. 2001). Die in diesem Versuch festgestellte Senkung des IGF-1- Serumspiegels durch Phytoöstrogene ist also im Hinblick auf die Anwendung als SERM ambivalent zu bewerten.

Sofern die in diesem Versuch beobachtete Wirkung auf den Plasmaspiegel die IGF-1- Aktivität im Knochengewebe repräsentiert, und sich die in ovx Ratten beobachteten Effekte auf den Menschen übertragen lassen, muss eine IGF-1 vermittelte Osteoporoseprävention durch E2 und die untersuchten Phytoöstrogene, Equol und CR, als fraglich angesehen werden.

Weiterhin führte die orale Metformingabe nach Versuchsablauf ebenfalls zu einer, wenn auch nicht signifikanten, Abnahme des IGF-1- Spiegels gegenüber der Kontrollgruppe. Eine

ursächliche Begründung für diesen Effekt dieses oralen Antidiabetikums kann an dieser Stelle nicht gegeben werden.

## 5. Limitierung der Studie

Ziel dieser Arbeit war es, zum Verständnis der Wirkung von Phytoöstrogenen zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden von postmenopausalen Frauen beizutragen. Als grundlegende präklinische Studie wurden die Untersuchungen an Ratten durchgeführt. Generell können Ergebnisse aus Tierversuchen nicht direkt, sondern nur unter Betrachtung der unterschiedlichen physiologischen Voraussetzungen, auf den Menschen übertragen werden.

Die Verwendung von Tiermodellen für Wechseljahresbeschwerden stellt sich insbesondere als schwierig dar, denn klimakterische Symptome sind in Ratten nicht beschrieben. Als gängiges Modell wurde die ovx Ratte verwendet, bei der durch die Ovariectomie ein der Postmenopause ähnlicher Zustand herbeigeführt wurde. Ob und wie weit die Physiologie einer ovx Ratte der einer postmenopausalen Frau entspricht, ist aber trotz der Tatsache, dass es sich hierbei um das gängigste Postmenopausen-Modell handelt, stets kritisch für jeden einzelnen untersuchten Parameter zu prüfen.

Die in der Literatur beschriebenen Ergebnisse von Östrogenen auf ovx Ratten sind stark von der Versuchsdauer abhängig bzw. davon, ob die Substanzen Kurz- oder Langzeit verabreicht wurden. Ratten haben eine durchschnittliche Lebenserwartung von 1-2 Jahren. Die gewählte „Testdauer“ von 42 Tagen ist somit als eine Mittel- bis Langzeitwirkung der Phytoöstrogene zu bewerten.

Generell stellt die Höhe der Dosierung der Testsubstanzen einen wichtigen Parameter bezüglich der Beurteilung der Ergebnisse dar. Im Rahmen dieser Studie wurden alle Präparate nur in einer Dosis verabreicht. Eine Aussage über die benötigte Dosis zum Effekteintritt kann hier nicht getroffen werden. Weiterhin können keine Dosis-Wirkungsbeziehungen abgeleitet werden. Gerade dieser Aspekt ist mitentscheidend für die Beurteilung von Einsatzmöglichkeiten und Wirkung von Phytoöstrogenen, wie es auch in der Literatur beschrieben ist (Liu et al. 2001; Rachon et al. 2008/a).

Der Beginn der Phytotherapie in den bisher publizierten Untersuchungen, bezüglich der Wirkung von Phytoöstrogenen, war stark unterschiedlich. Ein Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen zeigte, dass eine möglichst frühe Einnahme größere Effekte erbringt (Viereck et al. 2005). In der durchgeführten Studie wurde nur zu einem Zeitpunkt, direkt nach der ovx, mit der Substanzapplikation begonnen. In dieser Arbeit wurden alle Phytoöstrogene oral verabreicht, da das dem Modell der Frau mit klimakterischen Beschwerden, die Präparate einnimmt, am ehesten entspricht. Da keine weiteren

Applikationsformen (z.B. s. c., transdermal) untersucht wurden, kann keine Aussage darüber getroffen werden, wie und ob die Pflanzenprodukte, unter Umgehung des enterohepatischen Kreislaufes, wirken. Ein weiterer kritischer Punkt ist, dass die Zusammensetzung von CR nicht charakterisiert ist. So sind die aktiven Bestandteile der Traubensilberkerze bis heute noch nicht vollständig identifiziert. Unterschiedliche geographische und geologische Bedingungen, wie z. B. Wachstumsstandort, Witterungsbedingungen und die Art der chemischen Produktherstellung beeinflussen möglicherweise die Zusammensetzung des Extrakts. Diese Faktoren führen ggf. zu uneinheitlichen Ergebnissen und erschweren den Vergleich verschiedener Studien untereinander.

Generell erlangen tierexperimentelle Studien eine höhere Aussagekraft, je größer die Versuchszahlen (n) sind. In dieser Arbeit wurde mit einer relativ kleinen Dosisgruppe von 8-10 Tieren gearbeitet. Weiterhin erfolgten die Schichtdickenmessungen an einer relativ kleinen Schnittmenge.

## V Zusammenfassung

### **Effekte von Östradiol, Equol, Cimicifuga racemosa und Metformin im Serum und auf die Histomorphologie im Uterus der ovariectomierten Ratte**

Phytoöstrogene sind natürlich vorkommende Substanzen, die vorwiegend mit der Nahrung aufgenommen werden. Im Zuge der Diskussionen über die klassische HET und deren Nebenwirkungen rückten die pflanzlichen Produkte in den letzten Jahren in den Mittelpunkt vieler Studien. Ziel ist es, neue Präparate zu entwickeln, die das klimakterische Syndrom nicht durch Steroidhormonanaloga, im Sinne einer HET, behandeln und die charakteristischen Symptome lindern.

Epidemiologische Studien offenbarten, dass hohe Konzentrationen von Lignan- und Isoflavonoiden mit einer geringeren Inzidenz von verschiedenen Erkrankungen, wie z.B. Mamma- Ca, einhergehen (Adlercreutz 1998).

Auf der Suche nach pharmakologischen Alternativen zur Behandlung des Klimakteriums wird z. Zt. vermehrt in Phytoöstrogenen nach Substanzen gesucht, die SERM- Eigenschaften besitzen. Das Ziel ist es, ein Produkt zu finden, welches selektiv östrogenagonistische Effekte an Knochen, ZNS, Vagina und Herzkreislaufsystem besitzt und gleichzeitig östrogenantagonistische Wirkungen an Mamma und Uterus ausübt, um eine, u. U. maligne, Proliferation vermeiden zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der Phytoöstrogene Equol und jener aus Cimicifuga racemosa (CR) und dem oralen Antidiabetikum Metformin am Uterus und auf verschiedene Serumparameter bei ovariectomierten (ovx) Sprague- Dawley- Ratten mit der des biologisch vorhandenen Östradiols (E2) zu vergleichen. Die Substanzen wurden über einen Zeitraum von 42 Tagen mit dem Futter gegeben. E2 wurde zusätzlich noch in einer zweiten Gruppe s. c. gespritzt und mit einer s. c. Kontrollgruppe verglichen. Im Folgenden sollen nur die Wirkungen der Phytoöstrogene diskutiert werden, da eine Anwendung des oralen Antidiabetikums Metformin, welches als Biguanid durch die Hemmung der Gluconeogenese die Insulinwirkung erhöht, ohne den Insulinspiegel zu steigern (Karow und Lang 2007), als SERM zur Therapie des Menopausensyndroms nicht in Frage kommt.

Beide Phytoöstrogenpräparate zeigten milde östrogene Wirkungen auf die untersuchten Parameter. Sie bewirkten, wie E2, eine deutliche Reduktion der Gewichtszunahme der Tiere.



Dieser Aspekt ist im Hinblick auf die Gewichtszunahme, die als Reaktion auf die drastisch abfallende Östrogenproduktion im Zuge der Menopause oftmals auftritt, als gewünschter Effekt zu bewerten.

Bezogen auf eine erhöhte Proliferationsrate des Uterus, welche unter der klassischen HET als Nebenwirkung anzunehmen ist, zeigten die Pflanzenpräparate unterschiedliche Wirkungen.

Equol deutete eine wachstumsfördernde Wirkung auf den Uterus an. So kam es zu einer geringen, aber signifikanten Zunahme des Uterusgewichtes und insbesondere zu einem besonders starken Anstieg der Endometriumdicke. Bei letzterem war die Effektstärke mit dem der eingesetzten E<sub>2</sub>- Menge vergleichbar. Am Myometrium bewirkte Equol eine leichte Abnahme der Schichtdicke, auf die Dicke des Epithels des Endometriums nahm Equol keinen Einfluss.

Die Gabe von Extrakten aus CR bewirkte keine Änderung bezüglich des Uterusfeuchtgewichtes. In den histologisch erfassten Parametern des Uterus zeigte sich eine leichte Zunahme der Endometriumdicke. Die Myometriumdicke nahm unter CR- Stimulation deutlich ab, ebenso kam es zu einer diskreten Schichtdickenabnahme des Epithels des Endometriums.

Zusammenfassend übte Equol einen leicht östrogenagonistischen Effekt im Uterus aus, während bei CR antagonistische Östrogeneffekte dominierten. Es ist anzunehmen, dass diese Wirkungen über den in diesem Gewebe besonders häufig exprimierten Östrogenrezeptor alpha (ER $\alpha$ ) vermittelt werden. Im Hinblick auf die Anwendung als SERM zeigt CR in diesem Gewebe also die gewünschte Wirkung, wie es auch in der Literatur wiederzufinden ist (Rachon et al. 2008/b; Wuttke et al. 2003/b). Equol hingegen ist durch seine östrogenagonistische Wirkung in diesem Gewebe eher nicht als SERM zu bewerten.

Bezüglich der vegetativen Beschwerdesymptomatik, im Sinne von Hitzewallungen, resultierend aus dem Absinken des Östradiolspiegels und dem Anstieg des LH-Serumspiegels, erbrachte CR eine positiv regulierende Wirkung, wie sie auch in der Literatur unter anderem von Winterhoff et al. beschrieben wurde (Winterhoff et al. 2002). Ein Einfluss von Equol auf dieses Hormon und den Serumspiegel wurde nicht beobachtet. Ein Effekt auf die oben genannte Symptomatik ist durch Equol folglich nicht zu erwarten.

Somit lässt sich feststellen, dass CR milde SERM- Eigenschaften aufweist und damit möglicherweise einsetzbar für die klimakterische Beschwerdetherapie ist. Am Uterus zeigt CR keine östrogenähnlichen, uterotrophen Wirkungen, es kommt zu keinem relevanten Wachstum. Das Nebenwirkungsprofil wird dadurch deutlich verkleinert. Die LH- Spiegel werden signifikant gesenkt, so dass die vegetative Symptomatik verringert werden könnte. Dennoch ist zu beachten, dass CR ein komplexes Gemisch vieler Substanzen ist. Es ist unklar, ob eine einzelne Substanz (z.B. Triterpenglykoside, Actein) diese Wirkungen entfalten kann, oder ob eine Mischung von verschiedenen, in CR enthaltenen Komponenten zu den o. g. Effekten führt.

Equol hingegen zeigte in der durchgeführten Tierversuchsstudie die gewünschten Eigenschaften nicht. Es bewirkte mehrheitlich eine Zunahme der Uterusschichtdicken und zeigte keinen supprimierenden Effekt auf den LH- Serumspiegel. Einen positiven Einfluss nimmt Equol allerdings auf die Gewichtszunahme, so dass die Anwendung als Prävention zur, postmenopausal bedingten, Gewichtszunahme, unter Berücksichtigung der anderen Wirkungen, erwogen werden kann. Insgesamt legen die Ergebnisse aber nahe, dass Equol nicht als SERM gesehen werden kann.

Ob die Entwicklung eines idealen SERM überhaupt möglich ist, ist noch nicht vollständig geklärt und bedarf weiterer Versuche. Von den Östrogenrezeptoren gibt es nur 2 bekannte Subtypen (ER $\alpha$  und ER $\beta$ ). Beide werden in einer Vielzahl von Geweben im Körper exprimiert (siehe I 2.2). Eine selektive Bindung der Modulatoren an z.B. ER $\alpha$  im Uterus schließt einen nachteiligen Effekt durch die Bindung an ER $\alpha$  in anderen Organen nicht aus, da unterschiedliche Genexpressionen durch ER $\alpha$  reguliert werden können. Die Möglichkeit, dass (Phyto-) Pharmaka nicht nur rezeptorspezifisch, sondern auch in einzelnen Organen eine unterschiedliche Wirkung entfalten, beispielsweise durch eine gewebspezifische Verteilung, stellt ein Ziel der weitergehenden Forschungen dar.

## VI Literaturverzeichnis

- Adlercreutz H (1998): Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12:605-23.
- Adlercreutz H, Fotsis T, Lampe J, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T (1993): Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 215:5-18.
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B et al. (2004): Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 291:1701-12.
- Anderson JJ, Garner SC (1998): Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12:543-57.
- Avis NE, Stellato R, Crawford S, Bromberger J, Ganz P, Cain V, Kagawa-Singer M (2001): Is there a menopausal syndrome? Menopausal status and symptoms across racial/ethnic groups. *Soc Sci Med* 52:345-56.
- Barengolts EI, Kouznetsova T, Segalene A, Lathon P, Odvina C, Kukreja SC, Unterman TG (1996): Effects of progesterone on serum levels of IGF-1 and on femur IGF-1 mRNA in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res* 11:1406-12.
- Barrett-Connor E, Slone S, Greendale G, Kritz-Silverstein D, Espeland M, Johnson SR, Waclawiw M, Fineberg SE (1997): The postmenopausal estrogen/progestin interventions study: primary outcomes in adherent women. *Maturitas* 27:261-74.
- Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362:419-27.
- Bramlett KS, Burris TP (2003): Target specificity of selective estrogen receptor modulators within human endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86:27-34.
- Branham WS, Dial SL, Moland CL, Hass BS, Blair RM, Fang H, Shi L, Tong W, Perkins RG, Sheehan DM (2002): Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *J Nutr* 132:658-64.
- Brizzolara S, Killeen J, Severino R (1999): Vaginal pH and parabasal cells in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 94:700-3.
- Buchanan DL, Kurita T, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR, Cooke PS (1998): Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology* 139:4345-52.
- Burdette JE, Liu J, Chen SN, Fabricant DS, Piersen CE, Barker EL, Pezzuto JM, Mesecar A, Van Breemen RB, Farnsworth NR et al. (2003): Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *J Agric Food Chem* 51:5661-70.

- Burger HG (1996): The endocrinology of the menopause. *Maturitas* 23:129-36.
- Burger HG (1999): The endocrinology of the menopause. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69:31-5.
- Burger HG, Hale GE, Robertson DM, Dennerstein L (2007): A review of hormonal changes during the menopausal transition: focus on findings from the Melbourne Women's Midlife Health Project. *Hum Reprod Update* 13:559-65.
- Cakmak A, Posaci C, Dogan E, Caliskan S, Guclu S, Altunyurt S (2005): Raloxifene increases serum leptin levels in postmenopausal women: a prospective study. *Am J Obstet Gynecol* 193:347-51.
- Campbell MJ, Woodside JV, Secker-Walker J, Titcomb A, Leathem AJ (2001): IGF status is altered by tamoxifen in patients with breast cancer. *Mol Pathol* 54:307-10.
- Carr MC (2003): The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88:2404-11.
- Carusi D (2000): Phytoestrogens as hormone replacement therapy: an evidence-based approach. *Prim Care Update Ob Gyns* 7:253-9.
- Castelo-Branco C, Rostro F (2006): Management of menopause. *Minerva Ginecol* 58:137-52.
- Chen SN, Li W, Fabricant DS, Santarsiero BD, Mesecar A, Fitzloff JF, Fong HH, Farnsworth NR (2002): Isolation, structure elucidation, and absolute configuration of 26-deoxyactein from *Cimicifuga racemosa* and clarification of nomenclature associated with 27-deoxyactein. *J Nat Prod* 65:601-5.
- Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR (1998): Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod* 59:470-5.
- Cosman F (2003): Selective estrogen-receptor modulators. *Clin Geriatr Med* 19:371-9.
- D'Anna R, Cannata ML, Atteritano M, Cancellieri F, Corrado F, Baviera G, Triolo O, Antico F, Gaudio A, Frisina N et al. (2007): Effects of the phytoestrogen genistein on hot flashes, endometrium, and vaginal epithelium in postmenopausal women: a 1-year randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Menopause* 14:648-55.
- Duker EM, Kopanski L, Jarry H, Wuttke W (1991): Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Planta Med* 57:420-4.
- Dull P (2006): Hormone replacement therapy. *Prim Care* 33:953-63.
- Eisenbrand G: Isoflavone als Phytoestrogene in Nahrungsergänzungsmitteln und diätetischen Lebensmitteln für besondere medizinische Zwecke. Senatskommission zur Beurteilung der gesundheitlichen Unbedenklichkeit von Lebensmitteln. Technische Universität Karlsruhe 2006.

- Eng-Wong J, Hursting SD, Venzon D, Perkins SN, Zujewski JA (2003): Effect of raloxifene on insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, and leptin in premenopausal women at high risk for developing breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12:1468-73.
- Espeland MA, Marcovina SM, Miller V, Wood PD, Wasilauskas C, Sherwin R, Schrott H, Bush TL (1998): Effect of postmenopausal hormone therapy on lipoprotein(a) concentration. PEPI Investigators. Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions. *Circulation* 97:979-86.
- Feeley KM, Wells M (2001): Hormone replacement therapy and the endometrium. *J Clin Pathol* 54:435-40.
- Frasor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS (2003): Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology* 144:3159-66.
- Frasor J, Gibori G (2003): Prolactin regulation of estrogen receptor expression. *Trends Endocrinol Metab* 14:118-23.
- Gaumet N, Seibel MJ, Coxam V, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP (1997): Influence of ovariectomy and estradiol treatment on calcium homeostasis during aging in rats. *Arch Physiol Biochem* 105:435-44.
- Gold EB, Bromberger J, Crawford S, Samuels S, Greendale GA, Harlow SD, Skurnick J (2001): Factors associated with age at natural menopause in a multiethnic sample of midlife women. *Am J Epidemiol* 153:865-74.
- Golenhofen K: *Physiologie heute*. Urban & Fischer, Marburg 2000.
- Göretzlehner G, Lauritzen C: *Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie*. De Gruyter, Berlin 2000.
- Graham JD, Clarke CL (1997): Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18:502-19.
- Gratzl M: *Histologie*. Springer Verlag, Berlin 2002.
- Gray S (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy: the Million Women Study. *Lancet* 362:1332.
- Greendale GA, Judd HL (1993): The menopause: health implications and clinical management. *J Am Geriatr Soc* 41:426-36.
- Greendale GA, Reboussin BA, Hogan P, Barnabei VM, Shumaker S, Johnson S, Barrett-Connor E (1998): Symptom relief and side effects of postmenopausal hormones: results from the Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions Trial. *Obstet Gynecol* 92:982-8.
- Gulhan I, Bilgili S, Gunaydin R, Gulhan S, Posaci C (2008): The effect of strontium ranelate on serum insulin like growth factor-1 and leptin levels in osteoporotic postmenopausal women: a prospective study. *Arch Gynecol Obstet* 278:437-41.

- Gurer-Orhan H, Kool J, Vermeulen NPE, Meerman JHN (2005): A novel microplate reader-based high-throughput assay for estrogen receptor binding. *Int J Environ Anal Chem* 85:149-61.
- Hall G, Phillips TJ (2005): Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol* 53:555-68.
- Hartmann B, Kirchengast S, Albrecht A, Laml T, Bikas D, Huber J (1995): Effects of hormone replacement therapy on growth hormone secretion patterns in correlation to somatometric parameters in healthy postmenopausal women. *Maturitas* 22:239-46.
- Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M et al. (2007): Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87:905-31.
- Hillisch A, Peters O, Kosemund D, Muller G, Walter A, Schneider B, Reddersen G, Elger W, Fritzscheier KH (2004): Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. *Mol Endocrinol* 18:1599-609.
- Horn-Ross PL, John EM, Canchola AJ, Stewart SL, Lee MM (2003): Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 95:1158-64.
- Hsieh RW, Rajan SS, Sharma SK, Guo Y, DeSombre ER, Mrksich M, Greene GL (2006): Identification of ligands with bicyclic scaffolds provides insights into mechanisms of estrogen receptor subtype selectivity. *J Biol Chem* 281:17909-19.
- Kacalska O, Krzyczkowska-Sendrakowska M, Milewicz T, Zabinska-Popiela M, Bereza T, Krzysiek-Maczka G, Krzysiek J (2005): [Molecular action of insulin-sensitizing agents]. *Endokrynol Pol* 56:308-13.
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W; Organisation for Economic Co-operation and Development (2001): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1. *Environ Health Perspec* 109(8):785-94.
- Karger S (2001): Sekundäre Pflanzenstoffe- Phytoöstrogene in der Präventivmedizin. *Forschende Komplementärmedizin und klassische Naturheilkunde* 8:243-6.
- Karow T, Lang R: *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, Eigenverlag, Köln 2007.
- Kim HS, Kang TS, Kang IH, Kim TS, Moon HJ, Kim IY, Ki H, Park KL, Lee BM, Yoo SD, Han SY (2005): Validation study of OECD rodent uterotrophic assay for the assessment of estrogenic activity in Sprague-Dawley immature female rats. *J Toxicol Environ Health A* 68(23-24):2249-62.
- Knobil E, Briggs FN (1955): Fetal-maternal endocrine interrelations: the hypophysealadrenal system. *Endocrinology* 57:147-52.
- Krinke GJ: *The laboratory rat*. Academic Press, London 2000.

- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139:4252-63.
- Kulling S, Watzl B (2003): Phytoöstrogene. *Ernährungs-Umschau* 50(6):234-9.
- Kurita T, Lee K, Saunders PT, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB, Zhao C, Makela S, Gustafsson JA, Dahiya R et al. (2001): Regulation of progesterone receptors and decidualization in uterine stroma of the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod* 64:272-83.
- Lacey JV, Jr., Potischman N, Madigan MP, Berman ML, Mortel R, Twiggs LB, Barrett RJ, Wilbanks GD, Lurain JR, Fillmore CM et al. (2004): Insulin-like growth factors, insulin-like growth factor-binding proteins, and endometrial cancer in postmenopausal women: results from a U.S. case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:607-12.
- Legault C, Stefanick ML, Miller VT, Marcovina SM, Schrott HG (1999): Effect of hormone replacement therapy on the validity of the Friedewald equation in postmenopausal women: the postmenopausal estrogen/progestins interventions (PEPI) trial. *J Clin Epidemiol* 52:1187-95.
- Lethaby A, Farquhar C, Sarkis A, Roberts H, Jepson R, Barlow D (2000): Hormone replacement therapy in postmenopausal women: endometrial hyperplasia and irregular bleeding. *Cochrane Database Syst Rev*.
- Lewis JS, Jordan VC (2005): Selective estrogen receptor modulators (SERMs): mechanisms of anticarcinogenesis and drug resistance. *Mutat Res* 591:247-63.
- Li JX, Liu J, He CC, Yu ZY, Du Y, Kadota S, Seto H (2007): Triterpenoids from *Cimicifuga rhizoma*, a novel class of inhibitors on bone resorption and ovariectomy-induced bone loss. *Maturitas* 58:59-69.
- Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C (2003): Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 17:203-8.
- Liu J, Burdette JE, Xu H, Gu C, van Breemen RB, Bhat KP, Booth N, Constantinou AI, Pezzuto JM, Fong HH et al. (2001): Evaluation of estrogenic activity of plant extracts for the potential treatment of menopausal symptoms. *J Agric Food Chem* 49:2472-9.
- Liu JM, Zhao HY, Ning G, Chen Y, Zhang LZ, Sun LH, Zhao YJ, Xu MY, Chen JL (2008): IGF-1 as an early marker for low bone mass or osteoporosis in premenopausal and postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 26:159-64.
- Liu ZP, Yu B, Huo JS, Lu CQ, Chen JS (2001): Estrogenic Effects of *Cimicifuga racemosa* (Black Cohosh) in Mice and on Estrogen Receptors in MCF-7 Cells. *J Med Food* 4:171-8.
- Löffler PDG: Basiswissen Biochemie. Prof.Dr. Georg Löffler, Institut für Biochemie, Genetik und Mikrobiologie der Universität Regensburg, Regensburg 2003.

- Maartens LW, Knottnerus JA, Pop VJ (2002): Menopausal transition and increased depressive symptomatology: a community based prospective study. *Maturitas* 42:195-200.
- MacLennan AH (2007): HRT: a reappraisal of the risks and benefits. *Med J Aust* 186:643-6.
- Marino M, Acconcia F, Ascenzi P (2005): Estrogen receptor signalling: bases for drug actions. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 5:305-14.
- Marrian GF, Haslewood GA (1932): Equol, a new inactive phenol isolated from the ketohydroxyoestrin fraction of mares' urine. *Biochem J* 26:1227-32.
- Matthews J, Gustafsson JA (2003): Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3:281-92.
- Maul R: *Metabolismus von Rotkleeisoflavonen*. Diss.chem, Hamburg 2008.
- Montes GS, Luque EH (1988): Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat (Basel)* 133:192-9.
- Morin-Papunen LC, Koivunen RM, Ruokonen A, Martikainen HK (1998): Metformin therapy improves the menstrual pattern with minimal endocrine and metabolic effects in women with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril* 69:691-6.
- Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS (2004): Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ERalpha) and ERbeta in human cells. *Toxicol Sci* 80:14-25.
- Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG (1987): Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol* 1:445-50.
- Muthyala RS, Ju YH, Sheng S, Williams LD, Doerge DR, Katzenellenbogen BS, Helferich WG, Katzenellenbogen JA (2004): Equol, a natural estrogenic metabolite from soy isoflavones: convenient preparation and resolution of R- and S-equols and their differing binding and biological activity through estrogen receptors alpha and beta. *Bioorg Med Chem* 12:1559-67.
- Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD (2002): Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *Jama* 288:872-81.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001): Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535-65.
- Nisslein T, Freudenstein J (2003): Effects of an isopropanolic extract of *Cimicifuga racemosa* on urinary crosslinks and other parameters of bone quality in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Bone Miner Metab* 21:370-6.
- Palacios S (2007): The future of the new selective estrogen receptor modulators. *Menopause Int* 13:27-34.
- Palomba S, Oppedisano R, Tolino A, Orio F, Zullo F (2008): Outlook: Metformin use in infertile patients with polycystic ovary syndrome: an evidence-based overview. *Reprod Biomed Online* 16:327-35.



- Pandit L, Ouslander JG (1997): Postmenopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Am J Med Sci* 314:228-31.
- Pelletier G (2000): Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* 15:1261-70.
- Pelletier G, Labrie C, Labrie F (2000): Localization of oestrogen receptor alpha, oestrogen receptor beta and androgen receptors in the rat reproductive organs. *J Endocrinol* 165:359-70.
- Posaci C, Altunyurt S, Islekel H, Onvural A (2001): Effects of HRT on serum levels of IGF-I in postmenopausal women. *Maturitas* 40:69-74.
- Rachon D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W (2007): Effects of dietary equol on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids, and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 14:925-32.
- Rachon D, Menche A, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W (2008/a): Effects of dietary equol administration on the mammary gland in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Menopause* 15:340-5.
- Rachon D, Vortherms T, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W (2008/b): Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 60:209-15.
- Raus K, Brucker C, Gorkow C, Wuttke W (2006): First-time proof of endometrial safety of the special black cohosh extract (*Actaea or Cimicifuga racemosa* extract) CR BNO 1055. *Menopause* 13:678-91.
- Raz R, Stamm WE (1993): A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. *N Engl J Med* 329:753-6.
- Reed SD, Newton KM, LaCroix AZ, Grothaus LC, Grieco VS, Ehrlich K (2008): Vaginal, endometrial, and reproductive hormone findings: randomized, placebo-controlled trial of black cohosh, multibotanical herbs, and dietary soy for vasomotor symptoms: the Herbal Alternatives for Menopause (HALT) Study. *Menopause* 15:51-8.
- Rosen CJ, Pollak M (1999): Circulating IGF-I: New Perspectives for a New Century. *Trends Endocrinol Metab* 10:136-41.
- Sahin Y, Unluhizarci K, Yilmazsoy A, Yikilmaz A, Aygen E, Kelestimur F (2007): The effects of metformin on metabolic and cardiovascular risk factors in nonobese women with polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)* 67:904-8.
- Sakaguchi H, Fujimoto J, Aoki I, Tamaya T (2003): Expression of estrogen receptor alpha and beta in myometrium of premenopausal and postmenopausal women. *Steroids* 68:11-9.
- Scharl A, Vierbuchen M, Graupner J, Fischer F, Bolte A (1987): Immunohistochemische Lokalisation des Östrogenrezeptors am Uterus. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 242:454-6.

- Schwenkhagen A (2007): Hormonal changes in menopause and implications on sexual health. *J Sex Med* 4 Suppl 3:220-6.
- Seidlova-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W (2003): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* 149:351-62.
- Seidlova-Wuttke D: Vergleich der Wirkungen von Estradion und fünf endokrinen Disruptoren in ovariectomierten Ratten. Med. Diss., Göttingen 2004.
- Selvaraj V, Zakroczymski MA, Naaz A, Mukai M, Ju YH, Doerge DR, Katzenellenbogen JA, Helferich WG, Cooke PS (2004): Estrogenicity of the isoflavone metabolite equol on reproductive and non-reproductive organs in mice. *Biol Reprod* 71:966-72.
- Shlipak MG, Simon JA, Vittinghoff E, Lin F, Barrett-Connor E, Knopp RH, Levy RI, Hulley SB (2000): Estrogen and progestin, lipoprotein(a), and the risk of recurrent coronary heart disease events after menopause. *Jama* 283:1845-52.
- Sinha P, Kuruba N (2007): Premature ovarian failure. *J Obstet Gynaecol* 27:16-9.
- Stauber M, Weyerstahl T: Gynäkologie und Geburtshilfe. Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart 2005.
- Stygar D, Muravitskaya N, Eriksson B, Eriksson H, Sahlin L (2003): Effects of SERM (selective estrogen receptor modulator) treatment on growth and proliferation in the rat uterus. *Reprod Biol Endocrinol* 1:40.
- Taechakraichana N, Jaisamrarn U, Panyakhamlerd K, Chaikittisilpa S, Limpaphayom KK (2002): Climacteric: concept, consequence and care. *J Med Assoc Thai* 85 Suppl 1:S1-15.
- Takemura Y, Osuga Y, Yoshino O, Hasegawa A, Hirata T, Hirota Y, Nose E, Morimoto C, Harada M, Koga K et al. (2007): Metformin suppresses interleukin (IL)-1beta-induced IL-8 production, aromatase activation, and proliferation of endometriotic stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 92:3213-8.
- The Writing Group for the PEPI Trial (1996): Effects of hormone replacement therapy on endometrial histology in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. *Jama* 275:370-5.
- Torgerson DJ, Bell-Syer SE (2001/a): Hormone replacement therapy and prevention of nonvertebral fractures: a meta-analysis of randomized trials. *Jama* 285:2891-7.
- Torgerson DJ, Bell-Syer SE (2001/b): Hormone replacement therapy and prevention of vertebral fractures: a meta-analysis of randomised trials. *BMC Musculoskelet Disord* 2:7.
- Umland EM, Cauffield JS, Kirk JK, Thomason TE (2000): Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. *Pharmacotherapy* 20:981-90.

- Upton R, Graff A, Swisher D (2002): Black Cohosh Rhizome. American Herbal Pharmacopoeia: 1-36.
- Van Buren GA, Yang DS, Clark KE (1992): Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide synthesis. *Am J Obstet Gynecol* 167:828-33.
- Vatanparast H, Chilibeck PD (2007): Does the effect of soy phytoestrogens on bone in postmenopausal women depend on the equol-producing phenotype? *Nutr Rev* 65:294-9.
- Viereck V, Emons G, Wuttke W (2005): Black cohosh: just another phytoestrogen? *Trends Endocrinol Metab* 16:214-21.
- Vortherms T: Effekte von Östradiol und Equol sowie der pflanzlichen Substanzen Daidzein, Puerarin und Quercetin in der Hypophyse und im Urogenitaltrakt der ovariectomierten Ratte. *Vet.med. Diss., Hannover Tiho* 2006.
- Wang H, Eriksson H, Sahlin L (2000): Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* 63:1331-40.
- Weihua Z, Ekman J, Almkvist A, Saji S, Wang L, Warner M, Gustafsson JA (2002): Involvement of androgen receptor in 17beta-estradiol-induced cell proliferation in rat uterus. *Biol Reprod* 67:616-23.
- Whelan EA, Sandler DP, McConnaughey DR, Weinberg CR (1990): Menstrual and reproductive characteristics and age at natural menopause. *Am J Epidemiol* 131:625-32.
- Winterhoff H, Butterweck V, Jarry H, Wuttke W (2002): [Pharmacologic and clinical studies using *Cimicifuga racemosa* in climacteric complaints]. *Wien Med Wochenschr* 152:360-3.
- Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V, Seidlova-Wuttke D (2002): Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 83:133-47.
- Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D (2003/a): Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 44 Suppl 1:S9-20.
- Wuttke W, Seidlova-Wuttke D, Gorkow C (2003/b): The *Cimicifuga* preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 44 Suppl 1:S67-77.
- Wuttke W, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D (2006): Effects of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study. *Menopause* 13:185-96.
- Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M, Vollmer G (2002): Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:125-30.

## **Danksagung**

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke für die Überlassung des interessanten Themas und des damit verbundenen Vertrauens bedanken.

Frau Dr. med. Dana Seidlova- Wuttke danke ich für die Betreuung und Hilfestellung bei allen Fragen zur Durchführung und Anfertigung dieser Dissertation.

Weiterhin gilt mein Dank der gesamten Abteilung der experimentellen Endokrinologie der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen für die freundliche Einweisung in die Arbeitstechniken und das Überlassen der Arbeitsplätze, sowie für die netten Gespräche während der Frühstückspausen.