

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

Fraktionen von *Cimicifuga racemosa* BNO 1055: Eine Alternative zur
herkömmlichen Hormonersatztherapie bezogen auf die Haut?

INAUGURAL-DISSERTATION

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

Vorgelegt von

Maria Tschernov

aus

Wladimir/Russland

Göttingen 2014

Die Dissertation entstand in der Arbeitsgruppe Endokrinologie an der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen in dem Zeitraum von Februar 2011 bis März 2012.

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

I. Berichterstatterin: PD Dr. Seidlová-Wuttke

II. Berichterstatterin: Prof. Dr. Cornelia Sabine Seitz

III. Berichterstatter: Prof. Dr. Dirk Raddatz

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Februar 2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	1
1. Einleitung	2
1.1 Die Postmenopause und die Hautalterung.....	2
1.2 Das metabolische Syndrom.....	3
1.3 Das Klimakterium und die Postmenopause der Frau	4
1.4 Die Haut	5
1.4.1 Histologie der menschlichen Haut	5
1.4.2 Wirkung von Östrogenen auf die menschliche Haut	6
1.4.3 Die Haut der Sprague-Dawley-Ratte.....	7
1.5 Die ovariectomierte Sprague-Dawley-Ratte als Tiermodell	8
1.6 Die Therapiemöglichkeit der klimakterischen Haut mit oral östrogensubstituierter	8
Hormonersatztherapie und topischen Alternativen	8
1.7 <i>Cimicifuga racemosa</i> als Alternative zur herkömmlichen HRT	10
1.8 Ziel der Studie	12
2. Material und Methoden	14
2.1 Allgemeine Angaben.....	14
2.1.1 Versuchstiere und deren Haltung	14
2.1.2 Versuchsablauf und Gabe der Testsubstanz.....	14
2.1.3 Obduktion.....	16
2.1.4 Serumanalytik.....	16
2.2 Histomorphometrische Auswertung.....	17
2.2.1 Schnittpräparation	17
2.2.2 Herstellung der histologischen Schnitte	18
2.2.3 Hämatoxylin/Eosin – Färbemethode.....	18
2.3 Immunhistochemie	19
2.4 Histomorphometrische, statistische und immunhistochemische Auswertung	19
3. Ergebnisse	21
3.1 Futteraufnahme der Versuchstiere	21
3.2 Körpergewicht der Versuchstiere	22
3.3 Leptin im Serum.....	24
3.4 Die Haut, absolute Dicke	25
3.4.1 Epidermis	26
3.4.2 Dermis	27
3.4.3 Subkutanes Fettgewebe	29
3.4.4 Subkutane Muskelschicht.....	30
3.5 Die Haut, prozentuale Dicke	32
3.5.1 Epidermis	32
3.5.2 Dermis	33
3.5.3 Subkutanes Fettgewebe	34
3.5.4 Subkutane Muskelschicht.....	35

3.6 Immunhistochemische Auswertung (PCNA), Epidermis	36
3.7 Immunhistochemische Auswertung (PCNA), Haarfollikel	37
3.8 Graphische Darstellung der Gesamtdicke der Haut	38
3.9 Korrelation ausgewählter Parameter	39
4. Diskussion	40
4.1 Futteraufnahme.....	42
4.2 Dosierung	42
4.3 Körpergewicht der Versuchstiere	43
4.4 Serumanalyse, metabolische Effekte.....	44
4.4.1 Leptin und das subkutane Fettgewebe	44
4.4.2 Subkutane Muskelschicht.....	46
4.5 Die Haut	47
4.5.1 Epidermis	47
4.5.2 Proliferation der Epidermis mittels PCNA.....	49
4.5.3 Dermis	50
4.5.4 Proliferation in Haarfollikeln der Dermis mittels PCNA.....	51
5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	52
6. Methodischer Anhang	56
6.1 Sojafreies Pellet-Futter ssniff® R-Z Phytoestrogenarm	56
6.2 Schema der Organentwässerung	56
6.3 Ansetzen der Eosinlösung	57
6.4 Detailliertes Schema der Hämatoxylin/Eosin-Färbung.....	57
6.5 PCNA-Färbeprotokoll	58
6.6 Zusammenfassende Tabelle Histomorphometrie und PCNA	59
6.7 Kosmetika mit <i>Cimicifuga racemosa</i> als Inhaltsstoff	61
7. Literaturverzeichnis.....	62

Abkürzungsverzeichnis

C001/R,R1-3	Restfraktion des Extraktes <i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055 und dessen Subfraktionen R1-3
C001/S,S1-3	Saponinfraktion des Extraktes <i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055 und dessen Subfraktionen S1-3
CR	<i>Cimicifuga racemosa</i>
E2	17- β -Östradiol
ER α	Östrogenrezeptor α
ER β	Östrogenrezeptor β
HDL	High Density Lipoprotein
HRT	Hormone Replacement Therapy (kombinierte Hormonersatztherapie, bestehend aus Östrogenen und Gestagenen)
KG	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
Ko,ovx	Kontrollgruppe, ovariectomiert
LDL	Low Density Lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
Ovx	Ovariectomie
ovx	ovariectomiert
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
qCT	quantitative Computertomographie
SD-Ratte	Sprague-Dawley-Ratte
SERM	selektive Östrogenrezeptormodulatoren
s.c.	subkutan
TGF	Transforming Growth Factor
VLDL	Very Low Density Lipoprotein

1. Einleitung

Die Haut als größtes Organ des Menschen prägt mit ihrer Gesundheit, ihrem Zustand und ihren funktionellen Eigenschaften das Erscheinungsbild jedes Menschen und sorgt für Wohlbefinden und Selbstvertrauen. Wird die hormonelle Produktion im Laufe des Lebens eingestellt, so wirkt sich dieser Zustand auf die Haut genauso wie auf die Stoffwechsellage der Frau aus. Die Postmenopause, die über ein Drittel des Lebens einer Frau einnimmt, stellt eine besondere Herausforderung in diesen Punkten dar und ist einer der wichtigsten gesundheitlichen und kommerziellen Faktoren. Die postmenopausalen Veränderungen und ihre Therapie sollen in dieser Arbeit diskutiert werden.

1.1 Die Postmenopause und die Hautalterung

Im Zuge des demographischen Wandels und der Tatsache, dass das Klimakterium einen großen Teil des Lebens einer Frau einnimmt, sollte die postmenopausale Frau und ihre Gesundheit im Fokus der Forschung stehen. Da die Lebenserwartung einer Frau im Jahre 2011 rund 83 Lebensjahre beträgt (Statistisches Bundesamt, Sterbetafel 09/11), handelt es sich bei der Postmenopause um einen beträchtlichen Zeitraum, in dem Frauen weiterhin eine gute Lebensqualität genießen und diese nicht durch postmenopausale Symptome mindern wollen.

Eines der Symptome in der Menopause ist die Hautveränderung auf Grund von Östrogenmangel (Verdier-Sévrain 2007). Obwohl die Hautalterung der Sonnenexposition und dem Alterungsprozess an sich unterliegt, spielt die Östrogenfizienz eine Schlüsselrolle (Verdier-Sévrain et al. 2006). Östrogene haben einen entscheidenden Einfluss auf die Elastizität der Haut (Piérard et al. 1995), die Speicherung von Wasser (Piérard-Franchimont et al. 1995) und die Vaskularisierung (Haryell et al. 1992; Haenggi et al. 1995; Arora et al. 1998). Nimmt die Östrogenkonzentration in der Postmenopause ab, so werden grundlegende Strukturen, die für die Dicke, Elastizität und Wasserspeicherkapazität durch Glykosaminoglykane verantwortlich sind, negativ in ihrer Qualität beeinflusst. Als Folge nimmt die Schutzfunktion der Haut ab (Brincat et al. 2005), sie wird trocken, blass und Fältchen bilden sich (Verdier-Sévrain 2007). Vor allem sind es Kollagene Typ I und III sowie Elastinfasern, die eine Abnahme in der Dosis erfahren. Somit nimmt die Dicke ab und die Hautschichten atrophieren (Brincat et al. 2005; Verdier-Sévrain 2007). Brincat und Kollegen beschreiben sogar einen Rückgang des kollagenen Gewebes um 2,1% pro postmenopausalen Jahr innerhalb der ersten 15 Jahre und eine Abnahme um 1,13% der Hautdicke in demselben

Zeitraum. Zudem gibt es einen signifikanten Zusammenhang zwischen Abnahme der Knochendichte und Kollagenverlust durch Hypoöstrogenämie. Durch die Hormondefizienz laufen die Abbauvorgänge beider Strukturen parallel ab (Castelo-Branco et al. 1994).

Auch die Rückstellkräfte des Elastins und ihre Struktur werden durch den Hormonmangel negativ beeinflusst, sodass die Dehnbarkeit der Gesichtshaut um 1,1% pro Jahr zunimmt und die Elastizität, also die Rückwirkung der Dehnung, um 1,5% pro Jahr abnimmt (Henry et al. 1997; Piérard 1995). Faltenbildung wird durch den Schwund von oben genannten Vernetzungsstrukturen in der Dermis hervorgerufen (Brincat et al. 2005) und ist einer der bedeutendsten Gründe für das emotionale Empfinden des Alterns und des Wohlbefindens jeder Frau.

Zudem spielt in der menopausalen Haut auch die Pigmentierung, die sowohl durch Sonnenexposition als auch von Östrogenen reguliert wird, eine wichtige Rolle (Snell und Turner 1966).

Auch Wundheilung kann durch den Hormonabfall im Klimakterium beeinflusst werden. Durch den Abfall des TGF- β , eines Wachstumsfaktors (Ashcroft et al. 1997), und einer verminderten Vaskularisierung der Dermis kann die Wundheilung deutlich verlangsamt werden (Brincat et al. 2005).

1.2 Das metabolische Syndrom

Ein Syndrom bezeichnet eine Gruppe verschiedener Merkmale mit einheitlicher Ätiologie, jedoch unbekannter Pathogenese, die metabolische, also stoffwechselbedingte, Ursachen haben. Zu den Merkmalen des metabolischen Syndroms gehören viszerale Adipositas, erhöhte Glukose- und Triglyzeridserumspiegel, niedrige HDL-Cholesterinkonzentrationen im Blut sowie Hypertonie. Alle diese Risikofaktoren begünstigen kardiovaskuläre Erkrankungen und können im Verlauf zu einer Insulinresistenz und folglich zum Diabetes Typ II führen (Blüher und Stumvoll 2006). Dabei gibt es zwischen den einzelnen Parametern kausale Zusammenhänge. Viele freie Fettsäuren begünstigen die Apolipoproteinsynthese in der Leber zu triglyzeridreichen VLDL, das zusätzlich zu niedrigen HDL-Cholesterin kardiovaskuläre Schäden verursacht (Eckel et al. 2005). Diese beiden Parameter sind ebenfalls mit einer schlechten Einstellung des Diabetes Typ II assoziiert (Malik et al. 2004). Auch gibt es eindeutige Zusammenhänge zwischen Adipositas und arterieller Hypertonie (Eckel et al. 2005). Hiermit soll gezeigt werden, dass die Verbesserung einer Variablen auch Einfluss auf andere Risikofaktoren ausüben kann.

Im besten Fall greift eine Therapie sogar mehrschichtig auf mehrere Parameter, sodass eine Senkung von Morbiditätsraten und folglich Mortalitätsraten erreicht werden kann.

1.3 Das Klimakterium und die Postmenopause der Frau

Das Klimakterium umfasst die prä- und die postmenopausale Zeit der Frau, in dem die ovarielle Funktion und somit die Östrogenproduktion beendet wird. Das Klimakterium ist demnach ein fließender Übergang mehrerer Stadien, nämlich der Prämenopause, der Menopause und der Postmenopause.

Die Menopause ist der Zeitpunkt der letzten Menstruationsblutung und wird retrospektiv klinisch diagnostiziert, sofern sich nachfolgend eine 12-monatige Amenorrhoe eingestellt hat. Das mittlere Alter der Menopause beträgt 51,4 Jahre (Stute 2011). Die Prämenopause bestimmt eine Änderung der ovariellen Funktion, die eine Dysfunktion der Östrogenproduktion und die Irregularität des Zyklus beinhaltet. An die Menopause schließt sich die Postmenopause an, in der die ovarielle Hormonproduktion permanent erlischt und an die sich das Senium anschließt (Greendale et al. 1999).

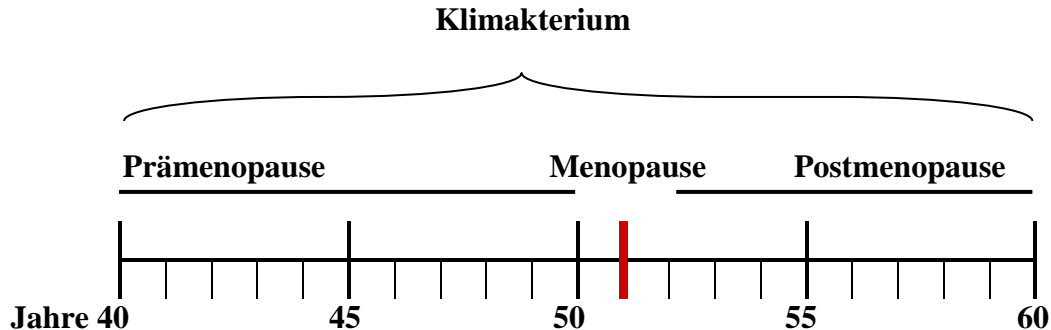


Abb.1 Prämenopause, Menaupause und Postmenopause bezogen auf das Lebensalter der Frau. Abbildung selbst erstellt.

Weil ovarielle Hormone nicht nur auf reproduktive Organe, sondern auf den ganzen Körper wirken, ist die Symptomatik der Hormondefizienz vielfältig (Blumel et al. 2000).

Die menopausalen Symptome können bereits in der Prämenopause eintreten und sind in Intensität und Dauer individuell. Zu den menopausalen Symptomen gehören vasomotorische Störungen wie Hitzewallungen sowie kardiovaskuläre, metabolische, sensorische, digestive, skelettale, muskuläre, glanduläre und zentralnervöse Defizite (Neugarten und Kraines 1965).

Insgesamt kann durch die Menopause die Lebensqualität der Frau eingeschränkt werden, was jedoch subjektiv von soziodemographischen Faktoren wie Berufstätigkeit, Familienstand und Parität beeinflusst werden kann (Blumel et al. 2000).

1.4 Die Haut

1.4.1 Histologie der menschlichen Haut

Wie bereits am Anfang ausgeführt, stellt die Haut mit einer Oberflächengröße von ca. 2 m² und einer Dicke von durchschnittlich 1,5 - 4 mm das größte Organ des Menschen dar und erfüllt zahlreiche unterschiedliche Funktionen. Sie ist die Grenzfläche des Organismus zur Umwelt, schützt ihn mechanisch von außen und dient als Barriere für Mikroorganismen sowohl durch ihre Struktur als auch durch ihr trockenes und saures Milieu auf der Hautoberfläche. Sie dient der Wärmeregulation, bietet Schutz vor UV-Strahlung durch Melaninpigmentierung, erfüllt immunologische Funktionen und ermöglicht unterschiedliche Qualitäten von Sinneswahrnehmungen (Fritsch 2004).

Die Haut wird von außen durch die Epidermis, danach von der Dermis und anschließend vom subkutanen Fettgewebe aufgebaut. Die Epidermis mit einer Dicke von 0,1 mm ist gefäßfrei, besteht zu 90% aus Keratinozyten, enthält freie Nervenendigungen und beherbergt die immunkompetenten Langerhansschen Zellen. Sie ist einem ständigen Differenzierungsprozess der Keratinozyten unterworfen. Die einzelnen Lebenszyklen der Keratinozyten bestimmen von der Basalmembran, der innersten Grenzschrift zur Dermis hin, die vier Zellschichten, nämlich das Stratum basale, das Stratum spinosum, das Stratum granulosum und das Stratum corneum. Ein wichtiger Faktor für die Wasserretention einerseits und andererseits als Barrierefunktion der Epidermis sind Lipide im Stratum corneum. Hydrophobe Pharmaka haben es demnach leichter, die Schicht zu passieren (Fritsch 2004).

Die Hauptstruktur der Dermis bilden Glykosaminoglykane (Mucopolysaccharide), die durch ihre Bindung zu einem Protein in der Form der Proteoglykane vorliegen. Ihre Hauptfunktion besteht in ihrer Wasserspeicherkapazität. Des Weiteren wird die Dermis durch Kollagene, insbesondere Typ I, aber zu geringerem Teil auch durch Typ III und Typ VI, aufgebaut. Sie sind Stütz- und Strukturproteine und bestimmen die Straffheit und Dehnbarkeit der Haut. Elastinfasern hingegen bewirken die Rückstellkraft der Dehnung. Sind diese beiden Mechanismen nicht im Gleichgewicht, kommt es zu alterstypischen Hautveränderungen in Form von Falten. Erst die Dermis ist vaskularisiert und versorgt die darüber liegende Epidermis durch Diffusion. Des Weiteren verlaufen viele afferente und efferente Fasern durch

die Dermis (Fritsch 2004). Das subkutane Fettgewebe ist in Läppchen aufgebaut, vaskularisiert, dient als Polstersubstanz mechanischer Reize und der Wärmeisolation und fördert die Gleitfähigkeit der Dermis gegenüber den tieferen Strukturen (Fritsch 2004). Unterhalb des subkutanen Fettgewebes befindet sich die quergestreifte subkutane Muskulatur. Diese wird in den histologischen Fachbüchern selten erwähnt, obwohl sie vor allem in der Gesichtshaut vorkommt. Ihre Schichtdicke ist von der Lokalisation abhängig (Yus und Simon 2000).

Der detaillierte histologische Aufbau wurde der Vollständigkeit halber aufgeführt. Diese Studie beschäftigt sich lediglich mit der groben Struktur der Epidermis, der Dermis, des subkutanen Fettgewebes und der subkutanen Muskelschicht und kann die einzelnen Zellarten nicht differenziert betrachten. Ein histologisches Bild des Schichtaufbaus ist auf Seite 20 im Abschnitt Material und Methoden zu sehen.

1.4.2 Wirkung von östrogenen auf die menschliche Haut

östrogene sind C-18 steroidale Hormone, die aus Cholesterol synthetisiert werden. Eine Zwischenstufe der Synthese bilden die Androgene, welche durch die Aromatase zu östrogenen umgewandelt werden. Das Enzym Aromatase kommt sowohl in den ovariellen Granulosazellen als auch im peripheren Gewebe wie Haut, Knochen, Gehirn und vor allem im Fettgewebe vor (Hall und Phillips 2005). 17--ostradiol (E2), dessen Strukturformel unten zu sehen ist, ist neben Estriol (E3) und Estron (E1) das potenteste östrogen.

Die Wirkung ist am Zielorgan rezeptorvermittelt, wobei es zwei Typen von intrazellulären Rezeptoren, nämlich ER und ER, gibt. Beide Rezeptoren haben die gleiche Bindungsaffinität gegenüber E2, wobei jedoch die Verteilung im peripheren Gewebe nicht proportional verteilt ist. Eine topische Präferenz liegt in der Haut auf dem ER.

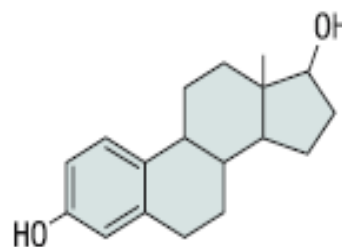


Abb.2 Strukturformel von 17--ostradiol (E2). (Modifiziert nach Löffler et al.: Biochemie und Pathobiochemie, 8. Auflage, Springer-Verlag 2007)

Vor allem im Stratum basale, spinosum und granulosum, sowie der papillären Dermis wurde der -Rezeptorverstarkt nachgewiesen (Thornton 2002). Keratinozyten der Epidermis exprimieren gleichermaßen ER und ER und haben eine hohe Affinität gegenüber E2, wodurch ihre Proliferation stimuliert wird und die Epidermisdicke zunimmt (Kanda und

Watanabe 2004, Verdier-Sevrain 2004). Neben dem klassischen intrazellulären Steroidrezeptor, der nach Ligandenbindung dimerisiert und an die *Estrogen Responsive Elements* (HRE) bindet, wurden auch membranständige Östrogenrezeptoren entdeckt. Über diesen Rezeptor wird eine schnelle Signalkaskade über cAMP, IP3 und Phospholipase A aktiviert und wirkt auf Zellwachstum, Apoptose und Angiogenese (Levin 2002).

Insgesamt haben Östrogene eine Wirkung auf die Kollagenneogenese, Hautdicke, Vaskularisierung, mitotische Aktivität der Epidermis, Hautfeuchtigkeit, Faltenbildung, Atrophie, Lipideinlagerung der Epidermis und Wundheilung (Thornton 2002, Hall und Phillips 2005).

1.4.3 Die Haut der Sprague-Dawley-Ratte

In der vorliegenden Studie sollen die Unterschiede der Beschaffenheit der Rattenhaut mit der menschlichen Haut verglichen werden.

Im Vergleich zu der menschlichen Epidermis hat die Epidermis der Sprague-Dawley-Ratte (SD-Ratte) weniger Schichten und ist an manchen Körperregionen wie dem Abdomen zum Teil sogar einschichtig (Bhattacharyya und Thomas 2004). Auch die Verhornung der Rattenhaut ist geringer, da die Haut mechanisch durch dichten Fellbesatz geschützt ist. Der histologische Aufbau der Haut und der Subkutis gleicht jedoch der menschlichen.

Einen besonderen Unterschied zwischen dem Menschen und der SD-Ratte stellt die Menge an Aromatase in der Rattenhaut und anderen Geweben dar. Sie ist bei der Ratte im peripheren Gewebe in einem viel geringeren Anteil vorhanden und weist nur eine sehr schwache Aktivität auf. Ist demnach die ovarielle Funktion nach Ovariectomie (Ovx) eingestellt, können Östrogene nur in sehr geringen Mengen synthetisiert werden, die chemisch kaum nachgewiesen werden können, und es kommt zu einer nahezu vollkommenen Östrogenmangel (van Weerden et al. 1992). Diese wirkt sich negativ auf die Hauteigenschaften aus. Durch die fehlenden Östrogene wird die Kollagensynthese in den Knochen sowie parallel dazu in der Haut reduziert (Black et al. 1970). Ferner wird die Anordnung der Fibrillen unregelmäßiger und nimmt in ihrer Gesamtheit im Vergleich zu intakten Tieren in ihrer Schichtdicke ab (Kafantari et al. 2000). Vor allem betrifft dieses Kollagen Typ I, das sowohl in der Dermis wie auch im Knochen vorkommt, was im gleichen Maße zu Osteoporose wie auch zu abbauenden Prozessen in der Dermis führt (Kafantari et al. 2000). Des Weiteren wirkt sich die Östrogenmangel auch negativ auf die Linearität der elastischen Fibrillen aus (Tsukahara et al. 2001).

1.5 Die ovariectomierte Sprague-Dawley-Ratte als Tiermodell

SD-Ratten, die unter Laborbedingungen aufgezogen und weder Sonneneinstrahlung noch Krankheiten ausgesetzt sind, entsprechen einem geeigneten Tiermodell für den Vergleich zwischen der Nagelhaut und der menschlichen Haut (Thomas 2005). Durch die besonderen Haltungsbedingungen, einer speziellen Futterapplikation und der Ovx zur Einstellung ihrer hormonellen Situation soll mit Hilfe der SD-Ratten die postmenopausale Phase der Frau nachgeahmt werden.

Die menschliche Haut ist nicht nur ein hormonsensitives Organ, sondern auch selbst in der Lage, aus Hormonvorstufen das aktive Hormon umzuwandeln (Labrie et al. 2000, Zouboulis 2000). Dies geschieht vor allem bei der postmenopausalen Frau, nachdem sich die ovarielle Hormonproduktion einstellt. Die Hormonvorstufen liefert die Nebennierenrinde (Labrie et al. 2000). Ganz im Gegensatz dazu findet bei SD-Ratten keine Hormonproduktion in der Haut statt, da die Sexualsteroiden ausschließlich in den Gonaden synthetisiert werden können und ihnen das Enzym 17 α -Hydroxylase der Nebennierenrinde für die Androgensynthese fehlt (van Weerden et al. 1992). Somit lassen sich in der ovx SD-Ratte keine signifikanten Konzentrationen von Androgenen oder Östrogenen nachweisen (Labrie et al. 2000, van Weerden et al. 1992), sodass diese der Östrogenkonzentrationen postmenopausaler Frauen entsprechen (Allred et al. 2004), was ein hervorragendes Modell der postmenopausalen Frau darstellt.

Insgesamt ist die Haut der SD-Ratte ein gutes Modell, um Veränderungen der Epidermis, Dermis, des subkutanen Fettgewebes und der subkutanen Muskelschicht während der Östrogenmangel zu beurteilen und nachfolgend Effekte nach Applikation von Testsubstanzen zu bewerten.

1.6 Die Therapiemöglichkeit der klimakterischen Haut mit oral östrogensubstituierter Hormonersatztherapie und topischen Alternativen

Durch die endogene Abnahme der weiblichen Östrogenproduktion und damit verbundenen Wirkungen auf eine große Anzahl der Organsysteme wurde versucht, die Östrogene synthetisch nachzuahmen, und zur Linderung klimakterischer Beschwerden wurde die Hormonersatztherapie (HRT) eingeführt. Die alleinige Monotherapie mit Östradiol konnte jedoch nur bei hysterektomierten Frauen eingesetzt werden, da die alleinige Gabe von Östrogenen eine Proliferation des Endometriums bewirkt und somit kanzerogen wirkt. Frauen

mit Uterus erhalten eine kombinierte Therapie von Östradiol und Progesteron und umgehen somit das Risiko des Endometriumkarzinoms.

Unter einer oralen 6-monatigen kombinierten Therapie wurde eine signifikante Erhöhung der kollagenen Strukturen nachgewiesen (Castelo-Branco et al. 1992, Sauerbronn et al. 2000). In weiteren Studien wurde eine positive Wirkung auf die Hautelastizität nach einer 5-jährigen bzw. 7-monatigen kombinierten HRT beobachtet. Die Elastizität, also die Rückstellwirkung der Hautdehnung, nahm bei der Behandlungsgruppe weniger stark ab als bei der unbehandelten Testgruppe (Piérard-Franchimont et al. 1999, Sator et al. 2007). Zu beachten ist jedoch, dass in dieser Studie die Ergebnisse uneinheitlich waren und es Gruppen an Respondern und Non-Respondern der Therapie gab. Außerdem bestanden Messunterschiede abhängig von der Lokalisation der Messungen. So profitieren vor allem UV-exponierte Areale von der Elastizitätszunahme.

Ungeachtet dessen, dass die HRT sowohl auf die Haut als auch auf Osteoporose und das Kolonkarzinomrisiko einen positiven Effekt hat, stehen die Nebenwirkungen einer solchen Therapie in keinem Verhältnis zum Nutzen. Es gibt den Nachweis, dass die kombinierte HRT bei einer Applikation von über 5 Jahren deutlich das Risiko für ein Mammakarzinom erhöht. Des Weiteren kann diese Therapie kardiovaskuläre Schäden verursachen, das Schlaganfall- und Thromboserisiko erhöhen sowie Ovarialkarzinome und Blasenerkrankungen begünstigen (Women's Health Initiative 2002, Hall und Phillips 2005). Diese schwerwiegenden Nebenwirkungen einer HRT überwiegen den positiven Effekt eines Entgegenwirkens der Atrophie der Hautstrukturen, sodass keine Indikation einer HRT bei Hautalterung aufgrund von Östrogendefizit gegeben ist.

Ein weiterer Aspekt ist, dass die herkömmliche HRT nur in der frühen Phase der Postmenopause ein Fortschreiten der Atrophie der einzelnen Zellarten verhindert oder unterbindet und in der Regel eine solche Therapie maximal 5 Jahre angewandt wird. Nach Beendigung der Therapie laufen alle hautverändernden Prozesse ungehindert ab. Sie ist demnach nur ein hinauszögernder Faktor einer unwillkürlichen Hautalterung.

Eine Alternative zur oralen östrogensubstituierten Hormontherapie stellt die topische Applikation von Östrogenen dar. Östrogene sind gut in organischen Lösungsmitteln löslich, können aufgrund ihrer kleinen Molekularmasse gut das Stratum corneum passieren und das Zielgewebe, die Dermis, erreichen (Draeos 2005).

Studien zeigen, dass topische Applikation die Festigkeit und die Elastizität eindeutig verbessert und die Faltentiefe sowie Porengröße reduziert (Schmidt et al. 1996). In der

immunhistochemischen Auswertung nach Biopsie wurde eine Zunahme von Kollagenen der papillären Dermis beobachtet (Schmidt et al. 1996) und nach 6-monatiger Therapie gewinnt die Dermis sogar an Masse (Sauerbronn et al. 2000). Dadurch ließ sich beweisen, dass Östrogene einen Einfluss auf die Kollagensynthese ausüben.

Des Weiteren konnte die Vaskularisierung und Hautfeuchtigkeit aufgrund von Zunahme an epidermaler Dicke und der wasserretendierenden Lipidschicht beobachtet werden (Schmidt et al. 1996, Rauramo und Punnonen 1974, Madison 2003). Auch elastine Strukturen und die Wundheilung sind der positiven steroidalen Wirkung unterworfen (Punnonen et al. 1987, Ashcroft et al. 1999).

Gleichzeitig wurde keine signifikante Erhöhung des E2 im Serum gemessen. Beschränkt sich die Applikation auf den Gesichts- und Dekolleté-Bereich, muss nicht von systemischer Wirkung der Östrogene ausgegangen werden (Schmidt et al. 1996).

Bislang ist es nicht gestattet „Östrogen-wirkende Stoffe“ nach der Kosmetikverordnung §1 Anlage 1 Nr. 260 kosmetischen Mitteln zuzusetzen.

1.7 *Cimicifuga racemosa* als Alternative zur herkömmlichen HRT

Cimicifuga racemosa (dt. Traubensilberkerze, CR) ist ein Strauchgewächs, das in Nordamerika beheimatet ist (Foster 1999). Medizinisch wirksam sind die Wurzeln der Pflanze, die bereits im 19. Jahrhundert bei gynäkologischen Beschwerden, Fieber, Arthritis und Schlaflosigkeit Anwendung fanden (Foster 1996). Auch heute wird CR als pflanzliches Mittel gegen klimakterische Beschwerden wie Hitzewallungen, bei vaginaler Atrophie oder psychischen Symptomen angewandt (Wuttke et al. 2003), als Therapeutikum in diesem Zusammenhang gut toleriert und ist dabei sicher in der Anwendung (Liske 1998).

Während der Forschung über den Wirkmechanismus von CR BNO 1055 (CR BNO 1055) wurde zunächst eine SERM-Aktivität postuliert, die auf den hypothalamischen und hypophysären Kreislauf Einfluss nimmt (Seidlová-Wuttke et al. 2003). Die Substanz sollte eine östrogene Wirkung besitzen und könnte durch ihre Applikation den LH-Spiegel des Serums senken, genauso wie die negative Feedbackhemmung durch Östrogen. Ein weiterer selektiver östrogener Effekt wäre die Osteoprotektivität von CR BNO 1055, was die Entstehung von Osteoporose hinauszögert und verlangsamt (Seidlová-Wuttke et al. 2003). Heute weiß man, dass CR BNO 1055 keine östrogene Wirkung aufweist und somit nicht ER α - oder ER β -vermittelt an ihrem Zielgewebe wirkt (Seidlová-Wuttke et al. 2012).

Weitere Wirkungen von CR BNO 1055 sind, dass der Extrakt Einfluss auf den Fettstoffwechsel ausübt, indem er signifikant das HDL-Cholesterin erhöht und das LDL-Cholesterin senkt (Nappi et al. 2005).

Insgesamt scheint der Extrakt CR BNO 1055 eine sehr gute Alternative für die herkömmliche HRT zu sein. In der vorliegenden Studie werden jedoch die wirksamsten Fraktionen, nämlich die Saponinfraktion (S) und die Restfraktion (R), des Extraktes untersucht. Die Fraktionen werden ihrerseits in Subfraktionen (S1-3, R1-3) unterteilt, um eine genaue Analytik zu gewinnen, in welchem Maße die Subfraktionen an dem Effekt beteiligt sind. Somit lässt sich genau ermitteln, welche Subfraktionen des Extraktes BNO 1055 C001 mit welchen Inhaltsstoffen in welcher Hautschicht und in welcher Intensität eine Wirkung zeigen.

Die unten stehende Abbildung zeigt die in der Studie applizierten Subfraktionen S1-3 und R1-3 und deren Inhaltsstoffe.

Komplementierende Analytik zu C001/S/1-3 und C001/R/1-3

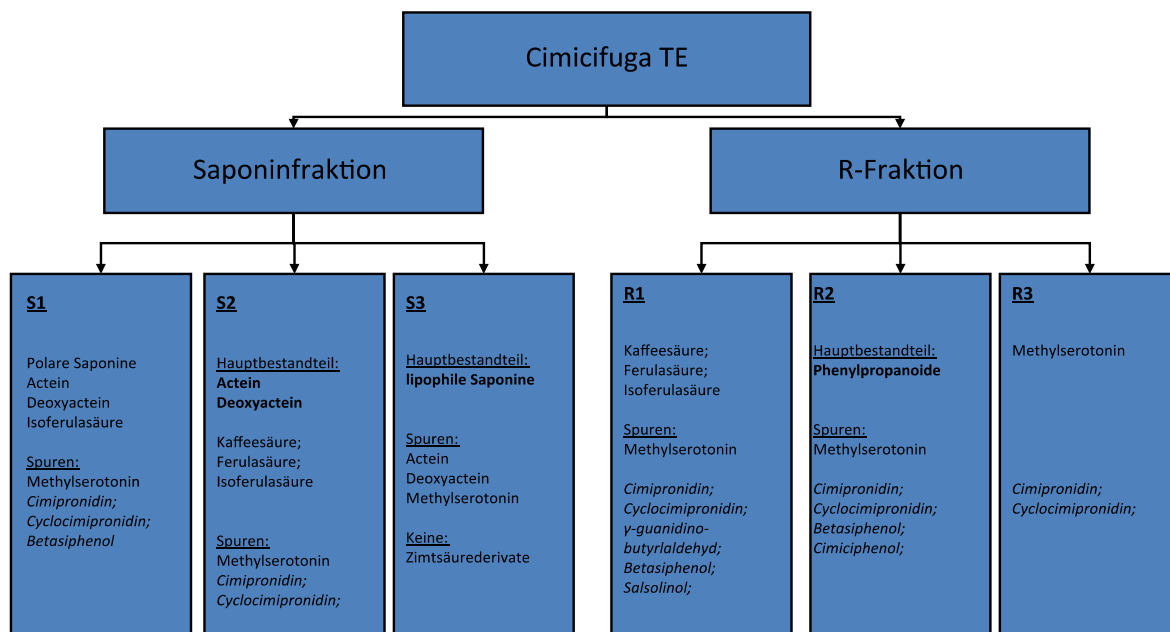


Abb.3 Komplementierende Analytik zu C001/S/S1-3 und C001/R/R1-3. Zur Verfügung gestellt von dem Pharmaunternehmen BIONORICA. Analytik wurde vom Unternehmen selbständig wissenschaftlich erarbeitet und bislang nicht publiziert.

Diese Analytik ist bislang nicht publiziert und stammt aus dem wissenschaftlichen Forschungsprojekt AZ-838-08 von Bionorica. Dabei handelt es sich um innovative

Erkenntnisse über die Inhaltsstoffe von CR BNO 1055 und soll so die Wirksamkeit des Extraktes erklären. Diese Analytik ist besonders hervorzuheben, da bislang kein pflanzliches Präparat so gut in seine Bestandteile differenziert worden ist und diese Information in der Zukunft dafür genutzt werden kann, um der postmenopausalen Hautalterung entgegenzuwirken.

Vor allem ist durch diese Analytik interessant, welche der Substanzen eigenständig oder in welcher Kombination auf die Haut den größten Effekt erweisen werden.

1.8 Ziel der Studie

Wie aus vielen Studien bekannt, kann die oral substituierte Hormonersatztherapie genauso wie die transdermale Hormonapplikation von Östrogenen die Veränderungen der postmenopausalen Haut verlangsamen oder gar verbessern. Dem gegenüber stehen einerseits Ängste der Patientinnen, die sich keiner Hormontherapie unterziehen wollen, und andererseits die Suche nach geeigneten Alternativen, um das Erscheinungsbild und die Gesundheit der Haut positiv zu beeinflussen. Vor allem sollen die Risiken, die eine herkömmliche HRT birgt wie kardiovaskuläre Schäden, die erhöhte Mammakarzinomrate, Thromboseneigung und Schlaganfallrisiko gänzlich vermieden werden. Das Ziel ist, ein risikoarmes und sicheres Präparat herzustellen, welches dauerhafte Anwendung erlaubt, im Gegensatz zur maximal 5-jährigen risikobehafteten HR-Therapie. Gleichzeitig soll das Präparat einen herausragenden Effekt auf das gesunde Aussehen und die Ästhetik der Haut bewirken – dem „Spiegel“ der Weiblichkeit.

Die Testsubstanz CR mit ihrem Extrakt BNO 1055 hat bereits in anderen Studien eine Osteoprotektivität, positive Einflüsse auf Hitzewallungen und verbesserte metabolische Parameter bewiesen (Seidlová-Wuttke et al. 2003, Seidlová-Wuttke et al. 2012), wobei die Wirkung vermutlich auf dem Triterpen-vermittelten Mechanismus beruht. Der Stoffgruppe der Triterpensaponine, zu der unter anderem das Actein der Saponinfraktion zählt, werden zahlreiche Aktivitäten zugesprochen. Beispiele dafür sind die Senkung des Cholesterinspiegels sowie antiphlogistische und immunstimulierende Effekte (Reznicek und Jurenitsch 1991). Möglicherweise ist auch ein Effekt aus diesem Wirkprinzip in den unterschiedlichen Hautschichten und im Blutserum nachzuweisen und dies soll hier untersucht werden.

Eine solch detaillierte Analyse der Stoffklassen stellt sich als sehr innovativ dar und kann Aussagen darüber geben, welche von ihnen am effektivsten der postmenopausalen Hautalterung entgegenwirken oder ob Kombinationen der Subfraktionen eine bessere Wirkung

erzielen. Die Wirksamkeit der einzelnen Subfraktionen und Gesamtfractionen wird über die histomorphometrische Auswertung in dieser Studie nachgewiesen.

Für diese Studie wurde die SD-Ratte als geeignetes Tiermodell verwendet, da nach Ovx eine komplette Östrogenfizienz im Organismus entsteht und sich gleiche Abbauprozesse und gleiche Erscheinungsformen wie in der menschlichen Haut finden lassen. Dabei wurden die Schichtdicken der Epidermis, der Dermis, des subkutanen Fettgewebes und der subkutanen Muskelschicht vermessen und zusätzlich die Proliferationsrate in der Epidermis nach 4-wöchiger Applikation der Testsubstanzen bestimmt. Durch den ständigen Vergleich jeder Hautschicht mit den östrogenbehandelten Tieren lässt sich eine Aussage treffen, welche der Subfraktionen in welchem Maße eine Alternative zu der Hormontherapie darstellt.

Als weiteres Ziel der vorliegenden Studie soll über das subkutane Fettgewebe und über die Serumkonzentration von Leptin das Risikoprofil für kardiovaskuläre Schäden abgeschätzt werden. Diese Parameter gelten als Risikomerkmale für das metabolische Syndrom und können maßgeblich zu Herzkreislauferkrankungen und Diabetes Typ II beitragen. Mit der Applikation der Testsubstanzen wird versucht, eine positive metabolische Situation für die Testtiere herbeizuführen, die dann auf eine Frau übertragen werden kann und das Morbiditätsrisiko reduziert.

Durch die Ergebnisse dieser Studie kann in der Zukunft eine pflanzliche, auf die Effektivität genau abgestimmte Alternative zu der risikobehafteten HRT geschaffen werden, um die postmenopausale Haut jugendlich und gesund zu erhalten und dadurch für gestiegenes Wohlbefinden und Selbstbewusstsein zu sorgen.

Es ist zu klären, ob die Subfraktionen des Extraktes CR BNO 1055 eine Wirkung auf die Haut aufweisen, welche der Subfraktionen die stärksten Effekte zeigt, ob sich diese mit dem Serumparameter verbinden lassen und welche Therapieempfehlung auszusprechen ist.

2. Material und Methoden

Im folgenden Abschnitt werden der detaillierte Versuchsablauf und dessen Voraussetzungen beschrieben. Ich selber habe an den Tierversuchen und der Betreuung der Testtiere nicht persönlich teilgenommen. Für die Ergebnisinterpretation wurden mir die Werte von Serumleptin, der Futterverbrauch und die Gewichte der Testtiere aus einem Datenpool, der allen Doktoranden zu diesem Versuch zu Verfügung steht, überlassen. Diese Werte wurden durch andere Doktoranden ermittelt.

Meine zentrale Aufgabe war es, in den nächsten Schritten histologische Schnitte der Hautproben anzufertigen, diese zu färben sowie histomorphometrisch und immunhistochemisch auszuwerten.

Alle Schritte des Versuchs fanden unter Aufsicht von Dr. med. Seidlová-Wuttke statt.

2.1 Allgemeine Angaben

2.1.1 Versuchstiere und deren Haltung

Bei den Versuchstieren handelte es sich um 3 Monate alte, weibliche, intakte SD-Ratten (Fa. Winkelmann, Borken, Deutschland). Es liegt eine Tierversuchsgenehmigung der Bezirksregierung Braunschweig mit der Nr. G 43.08 vor. In dieser Studie wurden zehn Gruppen à zehn Tiere, insgesamt 100 Tiere, eingesetzt. Zu Versuchsbeginn lag ihr mittleres Gewicht bei 250 g.

Die Versuchstiere wurden in Makrolonkäfigen Typ IV (Fa. Tecniplast Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) in den Tierställen der Universität Göttingen gehalten. Es waren maximal 5 Tiere in einem Käfig untergebracht. Leitungswasser und Futter wurden *ad libitum* zur Verfügung gestellt.

In der Eingewöhnungsphase erhielten die Tiere sojafreies Pellet-Futter (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) genaue Zusammensetzung siehe Kapitel 6.1, S. 56.

Die Raumtemperatur lag bei $23^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, die Luftfeuchtigkeit betrug 55% und beides wurde durch ein Thermohygrometer kontrolliert. Die Belichtungszeit in den Tierställen war von 06.00 bis 18.00 Uhr.

Die Aufsicht über die tierexperimentelle Durchführung fand durch Dr. med. Seidlová-Wuttke statt.

2.1.2 Versuchsablauf und Gabe der Testsubstanz

Im Rahmen dieses Versuches wurden insgesamt 100 Tiere, in je zehn Gruppen à zehn Tiere,

untersucht.

Während der Eingewöhnungsphase, in der alle Tiere sojafreies Futter erhielten, sollten die Versuchstiere auf ein gleiches Hormonniveau gebracht werden und die zuvor vorherrschenden Abweichungen im Alter und Gewicht reduziert werden. Nach der Eingewöhnungsphase von zwei Wochen wurden zunächst Knochendichtemessungen per Computer Tomographie (qCT) und eine Ovx durchgeführt. Zusätzlich wurde jedem Tier während der Narkose mit Isofluran ein Transponder 12 mm (UNO MICRO-ID System) s.c. der Nackenhaut implantiert. Dieser ermöglicht es im Versuchsverlauf die Tiere anhand einer Identifikationsnummer durch ein ISO-Lesegerät (Gesreader II Ge S008) eindeutig zuzuordnen. Der Transponder und das Lesegerät wurden von der Fa. UNO ROEVASTAAL BV (Zevenaar, Holland) verwendet.

Die Ovx setzt den eigentlichen Versuchsbeginn fest. Durch sie wird die endogene Hormonproduktion der SD-Ratten unterbunden und kann als Vergleich zur postmenopausalen Frau herangezogen werden.

Von diesem Zeitpunkt werden die zehn Gruppen der Versuchstiere vier Wochen mit unterschiedlichem Futter behandelt. In diesen vier Wochen wurde die verzehrte Futtermenge jeweils nach sieben Tagen bestimmt und so der Futtermittelverbrauch pro Tier und Tag errechnet. Genaue Angaben über die zugefügten Substanzen im Futter sind der folgenden Tabelle zu entnehmen:

Futterart	Name der Gruppe	Zahl der Tiere	Dosis in mg/kg Futter	Futteraufnahme (g/Tier/Tag)	Substanzeinnahme (mg)
Ko,östrogenfrei	Ko,ovx	10	keine	17,95	keine
Estradiolbenzoat	E2	10	10	10,81 *	0,108
Saponinfraktion	C001/S	10	117,6	17,17	2,019
Saponinfraktion 1	C001/S1	10	31,2	18,37	0,573
Saponinfraktion 2	C001/S2	10	46,06	17,63	0,802
Saponinfraktion 3	C001/S3	10	46,04	19,56	0,900
Restfraktion	C001/R	10	382,35	19,03	7,26
Restfraktion 1	C001/R1	10	276,81	18,75	5,190
Restfraktion 2	C001/R2	10	75,37	18,71	1,410
Restfraktion 3	C001/R3	10	35,979	18,52	0,666

Abb.4 zeigt die Dosis in mg/kg Futter, die Futteraufnahme in g/Tier/Tag und die Substanzeinnahme in mg der Versuchsgruppen

Jeweils vor Versuchsbeginn, nach der Ovx, sowie nach Versuche, wird jedes Tier gewogen und die Gewichtsschwankungen werden dokumentiert.

2.1.3 Obduktion

Nach der vierwöchigen Applikation des Futters mit Testsubstanz wurden die Versuchstiere erneut einer Knochenvolumenmineraldichtemessung mittels qCT unterzogen. Anschließend an je zwei Vormittagen zwischen 8.30 und 12.00 Uhr obduziert. Die Versuchstiere wurden randomisiert und nach erfolgter Identifikation durch den Transponder einzeln in den Obduktionsraum gebracht. Die Tiere wurden mittels CO₂ in Narkose versetzt und enthauptet, wobei ihr Blut aufgefangen wurde. Dieses wurde zu weiteren diagnostischen Zwecken für Serumparameter benötigt.

Es wurden den Tieren Organe entnommen, die zur weiteren histologischen Aufarbeitung an ein Labor geleitet wurden. So wurde es möglich die Wirkung von den unterschiedlichen Testsubstanzen auf unterschiedliche Organsysteme zu analysieren.

Neben anderen Organen ist auch eine Hautprobe entnommen worden, welche mir für meine Hautanalyse zur Verfügung gestellt wurde.

2.1.4 Serumanalytik

Das nach der Dekapitation aufgefangene Blut wurde für eine Serumanalytik verwendet. Unter anderem wurde so die Konzentration von Leptin im Blut nach der vierwöchigen Applikation der Testsubstanzen bestimmt. Die Leptinanalytik wurde mit Hilfe von standardisierter Radioimmunfluoreszenzanalyse RIA-Kits (RL-83K, Linco Research, multispecies kit RIA 125) vorgenommen.

2.2 Histomorphometrische Auswertung

2.2.1 Schnittpräparation

Die Hautproben für diese Studie wurden jedem Tier am Unterbauch, der zunächst rasiert wurde, entnommen. Insgesamt wurden dadurch zwei Proben pro Tier, also 200 Proben, für den Versuch gewonnen. Bei der einzelnen Probe sollte eine intakte Epidermis und Dermis, sowie subkutanes Fettgewebe und eine subkutane Muskelschicht vorhanden sein, die später durch die histomorphometrische Untersuchung analysiert werden können. Nach Entnahme wurden die Proben in 10% Formalin für maximal 72 Stunden konserviert.

Die Dicke der Proben erreichte maximal 5 mm, eine Länge von 20 mm und eine Breite von 15 mm, sodass sie in die Einbettkapseln passen und weiter verarbeitet werden können.

Jede Einbettkapsel wurde zuvor mit Versuchsnummern, Datum des Versuchsendes und der Identifikationsnummer des Versuchstieres beschriftet, sodass eine eindeutige Zuordnung des Tieres zu der jeweiligen Versuchsgruppe stets gewährleistet war.

Es folgt die Gewebereinbettung über mehrere Schritte. Zunächst wurde das Fixierungsmittel im Leitungswasser ausgewaschen. Reste von Fixierungsmittel im Präparat könnten zu Artefakten führen oder die Qualität der späteren Färbung negativ beeinflussen. Anschließend wurden die Gewebeproben über eine Zytadell/Einbettautomat (Leica TP 1020, V 2,0, Ordnernummer: 070430101, Herstellung 03/98) in eine aufsteigende Alkoholreihe, Xylol und Paraffinlösungen vollautomatisch getaucht. Der Alkohol dient der Dehydratation und das Paraffin der Konservierung (detailliertes Schema der Organentwässerung siehe Kapitel 6.2, S. 56). Die Entwässerung der Präparate führt zu einer 10-15%-igen Schrumpfung des Ausgangsvolumens.

Nach der Fixierung mit Paraffin in der Zytadelle kommen die Einbettkapseln bei einer Temperatur von 56-62°C in einen Wärmeschrank (Fa. Schütt Labortechnik, GFL 7601), bis sie endgültig im Paraffin eingebettet werden können. Nacheinander werden die vorbehandelten Organteile in einen Paraffinblock gegossen (EG 1160, Leica) und durch eine Kühlplatte rasch ausgehärtet, damit das Paraffin homogen und feinkristallin erstarrt und zu einer guten Schneidbarkeit führt.

Solch eingelegte Paraffinblöcke sind unbegrenzt haltbar und werden im Gefrierschrank aufbewahrt.

2.2.2 Herstellung der histologischen Schnitte

Die tiefgekühlten Paraffinblöcke wurden nach dem Versuchprotokoll sortiert und nacheinander mit einem Rotationsmikrotom (Leica Model RM 2135 Fabriknummer: 2794/10.2000, Kat.Nr: 050029802) geschnitten. Bei diesem Mikrotomtyp werden die Paraffinblöcke über eine fest eingespannte Einwegklinge (Mikrotome Blade S35, FEATHER) bewegt.

Zunächst wird der Probenblock vertikal im Deklinationswinkel von 90° zur Klinge eingespannt und mit grobem Vorschub von 30 µm bis zur gewünschten Gewebetiefe angeschnitten. Um histologische Präparate zu gewinnen, wird nun im Feinvorschub der Paraffinblock auf die Dicke von 3 µm manuell durch eine Kurbel zugeschnitten. Das Aufrollen der Schnitte verhindert ein befeuchteter Pinsel.

Einige Schnitte werden von der Gleitbahn genommen und in ein kaltes Wasserbad überführt. Nach der Schnittherstellung müssen die Schnitte auf Objektträger (Menzel+Superfrost Plus) aufgebracht und in ein warmes Wasserbad von ca. 37°C zum Glätten getaucht werden. Da insbesondere die Haut sehr anfällig für die Wärmeplatte ist, die im Anschluss folgt, wurde dieser Schritt ausgelassen und die Präparate direkt in den Trockenschrank überführt. Bei einer Temperatur von 37°C wurden diese über Nacht getrocknet.

2.2.3 Hämatoxylin/Eosin – Färbemethode

Vor der eigentlichen Färbung müssen die Präparate durch Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert werden. Anschließend folgt der erste Färbeschritt mit Hämatoxylin (Hämalaunlösung, 1.09249.0500, MERCK). Bei diesem natürlichen Farbstoff ist eigentlich sein Oxidationsprodukt, das Hämatein, das Färbereagenz. Durch eine progressive Färbung, d.h. die Schnitte verbleiben solange in der Lösung bis sie angefärbt sind, werden die negativ geladenen Zellkerne angefärbt.

Der zweite Färbeschritt mit Eosin (Certisain/Eosin, 1.15935.0025, MERCK, Ansatz der Lösung siehe Kapitel 6.3, S. 57) färbt das Zytoplasma durch eine regressive Färbung, d.h. nach einer Überfärbung werden die überschüssigen Farbanteile durch eine aufsteigende Alkoholreihe herausgewaschen.

Abschließend werden Alkoholreste durch Xylol entfernt und durch Deckgläser (Menzel-Gläser, #1) und Kleber (DePex, 1824, Serva) zu Dauerpräparaten fertiggestellt (detaillierter Färbevorgang siehe Kapitel 6.4, S. 56).

2.3 Immunhistochemie

Die zuvor getrockneten Schnitte werden mittels Xylol entparaffiniert und in absteigender Alkoholreihe dehydriert. Durch 3% H₂O₂ soll die Peroxidaseaktivität geblockt und anschließend die unspezifische Bindung durch 1% Ziegen Serum in PBS (phosphate buffered saline + 1% Rinderserum) unterbunden werden.

In einer Verdünnung von 1:800 wird der erste PCNA-Antikörper (mouse monoclonal IgG2a, clone PC10, Fa. Santa Cruz Biotechnology, CA, USA) hinzugegeben und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird der zweite Antikörper (HRP Rabbit/Mouse, K 5007, Dako Real) unverdünnt eingesetzt und nach mehreren Waschläufen mit DAB-Reagenz (DAB und Chromogen, K 5007, Dako Real) und Hämatoxylin gegengefärbt (detailliertes Färbeprotokoll siehe Kapitel 6.5, S. 58).

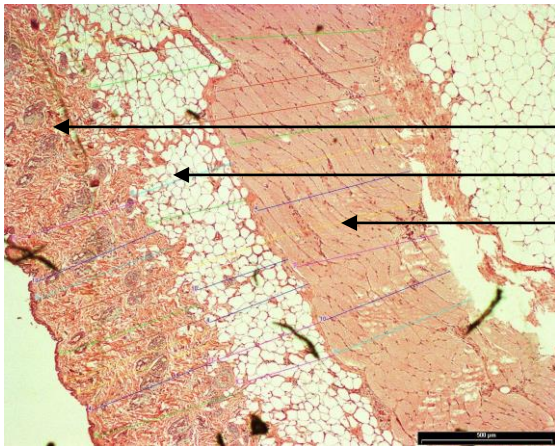
2.4 Histomorphometrische, statistische und immunhistochemische Auswertung

Die histomorphometrische Auswertung konnte mit Hilfe eines Zeiss Axiophot-Mikroskops, welches über eine digitale Fotokamera an ein Rechnersystem angeschlossen war, beurteilt und ausgemessen werden. Zur Messung und Evaluierung wurde das Softwareprogramm der Fa. Olympus, Münster (Software Imaging System, SIS) verwendet.

Bei den Präparaten wurde linear die Dicke der Epidermis, der Dermis, des subkutanen Fettgewebes und der subkutanen Muskelschicht in µm gemessen, nachdem diese durch das Softwareprogramm als Bild aufgenommen wurden (s. Abb. 5). Die Epidermis wurde in einer Vergrößerung von 12,5x, die Dermis, das Fettgewebe und die Muskelschicht in einer 3,125x Vergrößerung gemessen.

Es lagen pro Tier zwei Präparate, also insgesamt 200 Schnitte, vor. Da nicht in jedem Präparat alle Schichten getroffen waren, konnte nicht die Gesamtzahl der Schnitte evaluiert werden. Die Mindestzahl der Messungen pro Gruppe betrug dennoch 40 Messungen. Alle Werte wurden im Excel-Format gespeichert, um in einer weiteren statistischen Auswertung verwendet werden zu können.

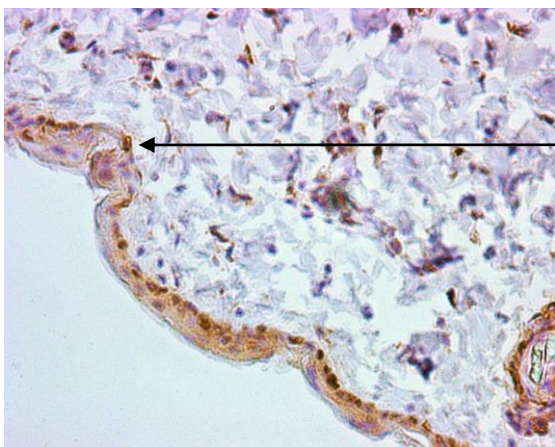
In dieser Studie werden die Begriffe der absoluten und der prozentualen Dicke der Schichten voneinander abgegrenzt. Die absolute Dicke beschreibt hier die tatsächlich gemessene Schichtdicke in µm, die prozentuale den Anteil einer Schicht in % an der gesamten gemessenen Hautdicke, die aus der Epidermis, der Dermis, dem subkutanen Fettgewebe und der subkutanen Muskelschicht besteht.



Dermis
 Subkutanes Fettgewebe
 Subkutane Muskelschicht

Abb. 5 Histomorphometrische Auswertung der Dermis, des subkutanen Fettgewebes und subkutaner Muskelschicht, 3,125x Vergrößerung, HE-Färbung, Kontrollgruppe ovx

Die immunhistochemische Auswertung erfolgte nach demselben Prinzip bei einer 25x Vergrößerung. Es wurden pro Präparat und 500 Zellen der Anteil an PCNA-positiven Zellen in der Epidermis ausgezählt (s. Abb.6). Pro Gruppe wurden mindestens zwei Präparate, insgesamt mindestens 1000 Zellen, evaluiert.



PCNA-positive Zelle

Abb. 6 Immunhistologische Auswertung PCNA-positiver Zellen in der Epidermis, 25x Vergrößerung, immunhistochemische Färbung, Kontrollgruppe ovx

Die statistischen Werte der histomorphometrischen Messungen und die immunhistochemischen Daten wurden aus dem Excel-Format in das Programm GraphPad Prism 5 (Prism™ GraphPad, San Diego, USA) übertragen, aus denen ein Balkendiagramm dargestellt werden konnte.

Die Analyse und Unterschiede der Daten in den verschiedenen Gruppen wurden durch den „one-way ANOVA“ und den Anschlussstest nach Dunnett auf ihre Signifikanz überprüft. Als signifikant wurden p-Werte <0,05 festgelegt.

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Wirkung von *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001. Es werden die Effekte ihrer Subfraktionen C001/S,S1-3 und C001/R,R1-3 bezogen auf einzelnen Schichten der Haut und Serumparameter untersucht.

Des Weiteren soll auf die Ergebnisse der Studie eingegangen werden. Da ich an den Tierversuchen nicht teilgenommen habe, wurden mir die entsprechenden Daten zur Verfügung gestellt. Meine eigenen Ergebnisse beginnen mit den histomorphometrischen Messungen.

3.1 Futteraufnahme der Versuchstiere

Es wurde der Futterverbrauch der 3 Monate alten SD-Ratten nach ihrer Ovx, dem Versuchsbeginn, zwischen den einzelnen Gruppen miteinander verglichen. Den 10 Gruppen à 10 Tiere, insgesamt 100 Tieren, wurde innerhalb von vier Wochen unterschiedliches Futter appliziert, wöchentlich die Futtermenge in g pro Käfig dokumentiert und ein Futterverbrauch pro Tier und Tag errechnet (detaillierte Futterzusammensetzung wurde im Kapitel 2 beschrieben).

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Futteraufnahme

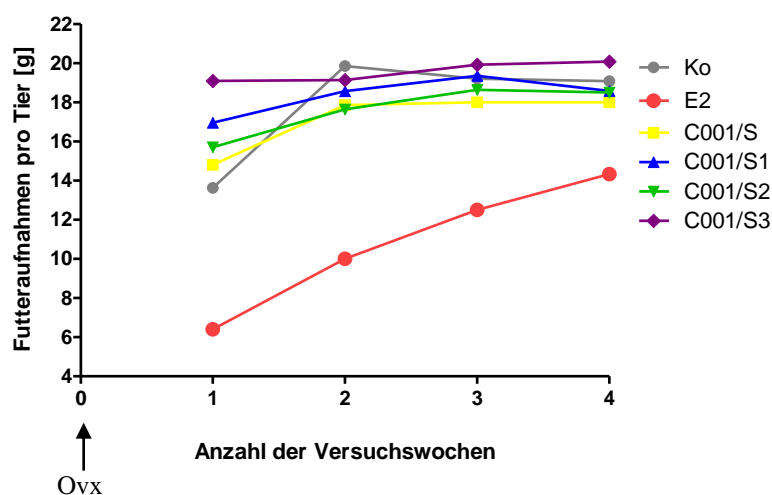


Abb. 7 Durchschnittliche Futteraufnahme der Behandlungsgruppen E2, Saponinfraktion C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-S3 im Vergleich zur Kontrollgruppe in [g/ Tier/ Tag]. Die Futteraufnahme pro Tier

wurde aus dem wöchentlich dokumentierten Futterverbrauch errechnet. Die Werte sind dem Datenpool dieser Versuchsserie entnommen.

**Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Futteraufnahme**

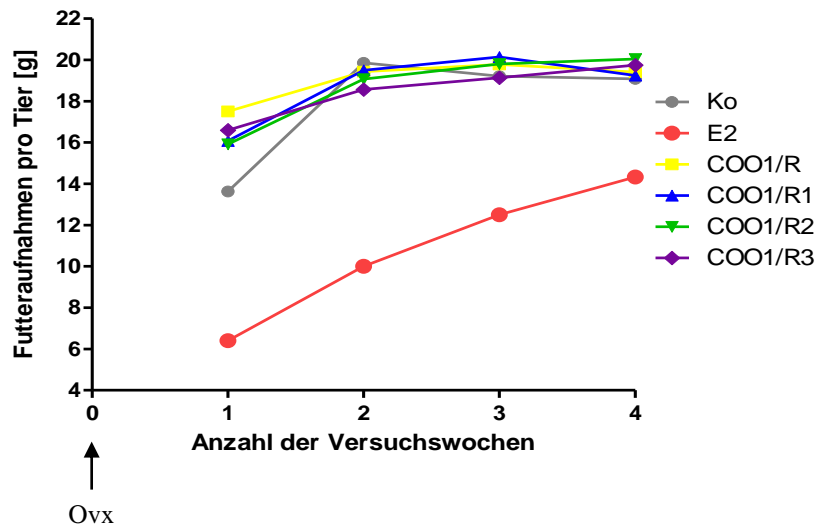


Abb. 8 Durchschnittliche Futteraufnahme der Behandlungsgruppen E2, Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-S3 im Vergleich zur Kontrollgruppe in [g/ Tier/ Tag]. Die Futteraufnahme pro Tier wurde aus dem wöchentlich dokumentierten Futterverbrauch errechnet. Die Werte sind dem Datenpool dieser Versuchsserie entnommen.

Bis auf die östrogenbehandelten Tiere lag der durchschnittliche Futterverbrauch der anderen 9 Gruppen bei ca. 18-19 g/ Tier/ Tag. Die Futteraufnahme konnte während des Applikationszeitraumes von 4 Wochen gesteigert werden.

Zum Versuchsende, nach 4 Wochen, konnte aber die Aufnahme von durchschnittlich 6 g/ Tier/ Tag auf 14 g/ Tier/ Tag gesteigert werden.

3.2 Körpergewicht der Versuchstiere

Für den Versuch wurden die Tiere randomisiert, sodass in einer Versuchsgruppe von 10 Tieren ein durchschnittliches Gewicht von 250 g pro Tier gemessen werden konnte.

Zum Versuchsende wurde ihr Gewicht ermittelt und graphisch in Abbildung 9 und 10 als Gewichtszunahme in g pro ganze Gruppe dargestellt.

**Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Gewichtszunahme im Versuch**

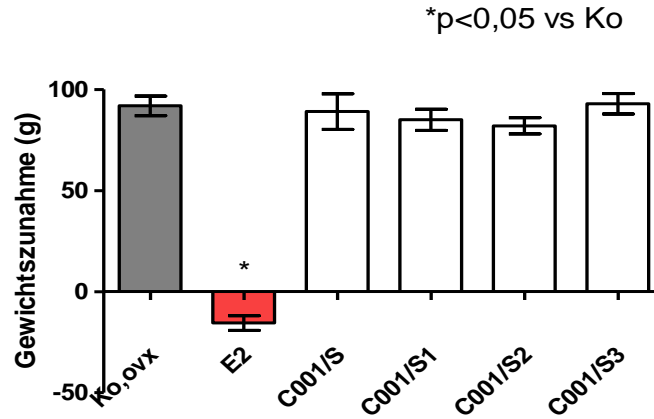


Abb. 9 Durchschnittliche Gewichtszunahme der E2-Gruppe, der Saponinfraktion C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3 im Vergleich zur Kontrollgruppe in [g]. Alle Gruppen weisen wie die Kontrollgruppe eine vergleichbare Gewichtszunahme auf, E2-behandelte Tiere haben im Durchschnitt 16 g abgenommen.

**Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Gewichtszunahme im Versuch**

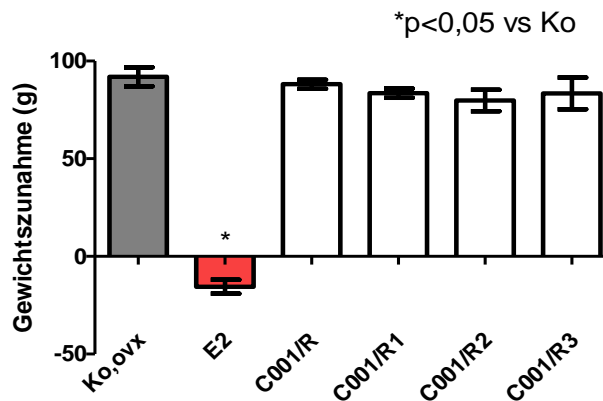


Abb.10 Durchschnittliche Gewichtszunahme der E2-Gruppe, der Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3 im Vergleich zur Kontrollgruppe in [g]. Alle Gruppen weisen wie die Kontrollgruppe eine vergleichbare Gewichtszunahme auf, E2 behandelte Tiere haben im Durchschnitt 16 g abgenommen.

Mit der Ausnahme der östrogenbehandelten Tiere haben alle anderen 9 Versuchsgruppen durchschnittlich denselben Wert von ca. 90 g an Gewicht zugenommen. Dies entspricht einer durchschnittlichen Gewichtszunahme von 36%.

Die einzige signifikante Veränderung des Körpergewichtes besteht bei den Tieren, die mit östrogenhaltigem Futter appliziert worden sind. Anstatt einer Zunahme an Gewicht wird sogar eine Abnahme von durchschnittlich 16 g beobachtet. Dies entspricht einer Abnahme um 6,4%.

Vergleicht man diesen Aspekt mit der Futteraufnahme in den vier Behandlungswochen, so war auch die Aufnahme an östrogenhaltigem Futter um einiges geringer im Vergleich zu den anderen Gruppen.

3.3 Leptin im Serum

Um über das metabolische Risikoprofil Aussagen treffen zu können, wurden die Serumparameter der SD-Ratten bezüglich des Leptins ermittelt. Dieser Werte spielt eine Rolle im Lipidstoffwechsel und ist indirekt als Risikofaktor für kardiovaskuläre Ereignisse anzusehen.

Es wurde das Leptin durch einen Radioimmunoassay im Serum gemessen. Der Vergleichswert der Kontrollgruppe (Ko,ovx) liegt bei 6,18 ng/ml. Die E2-Gruppe weist signifikant niedrige Leptinwerte auf 2,34 ng/ml und die gesamte Saponingruppe C001/S signifikant niedrige Leptinwerte bei 4,55 ng/ml auf. Alle weiteren Testgruppen zeigen keine signifikanten Veränderungen und liegen auf dem Niveau der Kontrollgruppe.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Leptin im Serum

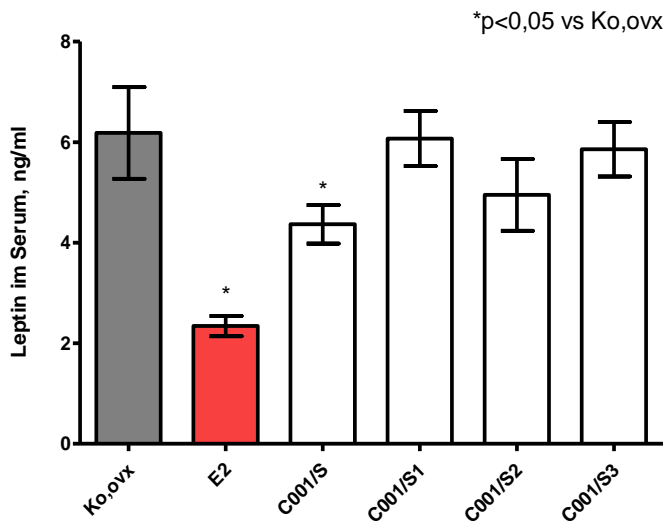


Abb. 11 Leptinkonzentration in ng/ml des Serums der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponingruppe C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Die E2- und Saponingruppe weisen eine signifikante Abnahme auf.

Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Leptin im Serum

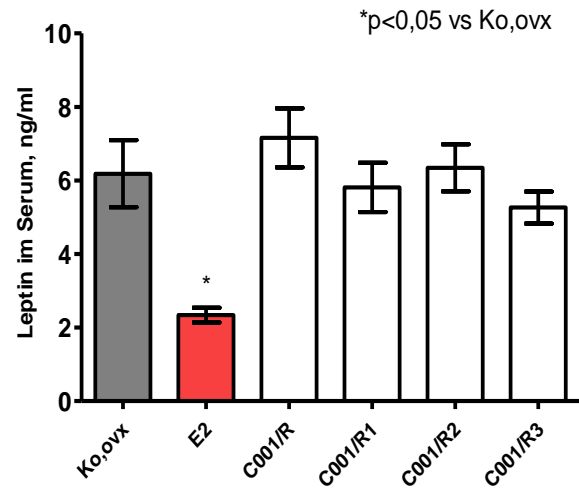


Abb. 12 Leptinkonzentration in ng/ml des Serums der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Nur die E2-Gruppe weist eine signifikante Abnahme auf.

3.4 Die Haut, absolute Dicke

Nachfolgend werden die absoluten Dicken in μm der Epidermis, der Dermis, des subkutanen Fettgewebes und der subkutanen Muskelschicht in Bezug zur Kontrollgruppe (Ko,ovx) auf ihre Signifikanz hin miteinander verglichen.

Zuerst wird die Signifikanz der E2-Gruppe zur Kontrollgruppe überprüft, da hierbei versucht wird, eine Alternative gerade für diese Behandlung zu finden und erwünscht ist, ihre positiven Effekte beizubehalten. Anschließend werden alle anderen Testgruppen auf ihre Signifikanz überprüft.

3.4.1 Epidermis

Es wurde die Epidermis in μm gemessen. Die durchschnittliche Epidermisdicke der Kontrollgruppe (Ko,ovx) betrug nach Versuchsende $13,13 \mu\text{m}$. Im Vergleich zur Ko,ovx war die Epidermisdicke der E2-Gruppe signifikant auf durchschnittlich $11,96 \mu\text{m}$ und die Subfraktion der Restfraktion C001/R1 signifikant auf $11,86 \mu\text{m}$ erniedrigt. Die Dicke der Epidermis der gesamten Saponinfraktion C001/S hat sich auf $14,90 \mu\text{m}$ signifikant erhöht. Bei den restlichen Gruppen zeigte sich kein Effekt bezogen auf die Epidermisdicke als absolute Größe.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Epidermisdicke

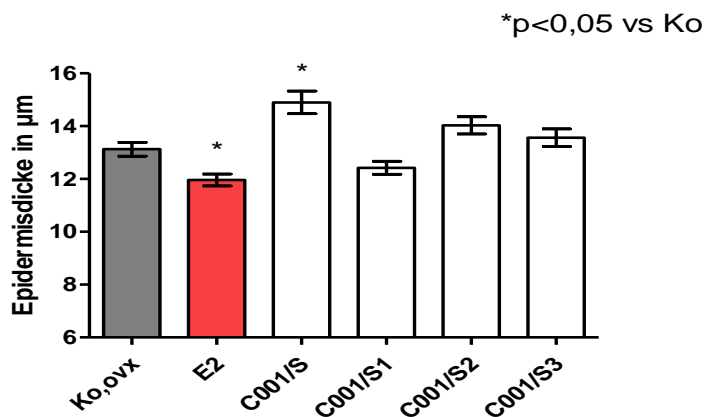


Abb. 13 Absolute Epidermisdicke in μm der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponin-
gruppe C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Nur die E2- und Saponin-
gruppe weisen signifikante Veränderungen der Dicke auf. Die E2-Gruppe weist eine Abnahme, C001/S eine Zunahme der Epi-
dermisdicke auf.

**Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Epidermisdicke**

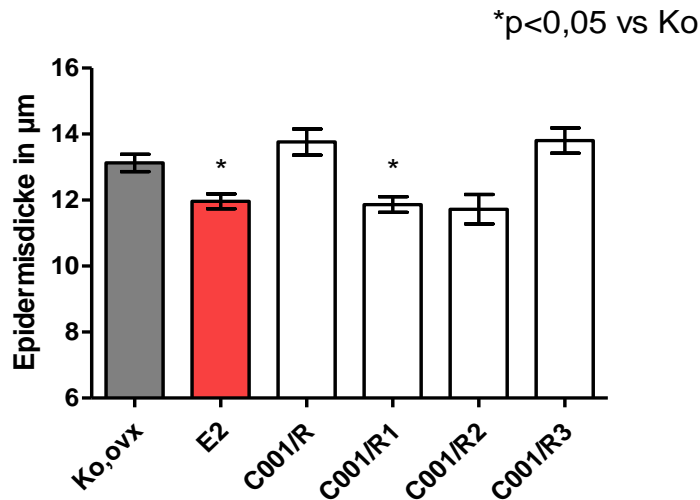


Abb. 14 Absolute Epidermisdicke in µm der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die E2-Gruppe und die Subfraktion C001/R1 weisen signifikante Abnahmen der Dicke auf.

3.4.2 Dermis

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Ko,ovx), die eine durchschnittliche Dicke von 453,58 µm aufweist, zeigt die E2-Gruppe in der Dermis keinen signifikanten Unterschied der absoluten Werte in µm. Dafür ist die Dermis signifikant in den Subfraktionen der Saponinfraktion C001/S1 auf durchschnittlich 566,34 µm und in der Subfraktion C001/S3 auf 543,19 µm erhöht. Des Weiteren kann eine signifikante Erhöhung in der gesamten Restfraktion C001/R auf eine Dicke von 512,84 µm, ihrer Subfraktionen C001/R1 auf 513,15 µm und C001/R3 auf 633,17 µm beobachtet werden. Die Subfraktion C001/R3 weist zugleich die größte Dermisdicke nach 4-wöchiger Applikation auf.

**Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Dermisdicke**

*p<0,05 vs Ko

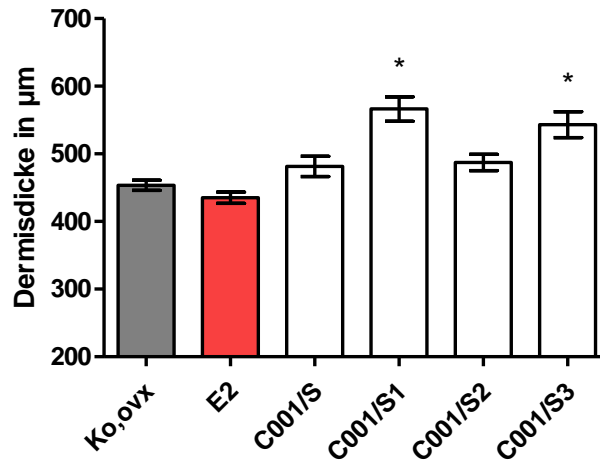


Abb. 15 Absolute Dermisdicke in µm der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponin-
gruppe C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Nur die Subfraktionen C001/S1 und C001/S3
weisen signifikante Zunahmen der Dicke auf.

**Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Dermisdicke**

*p<0,05 vs Ko

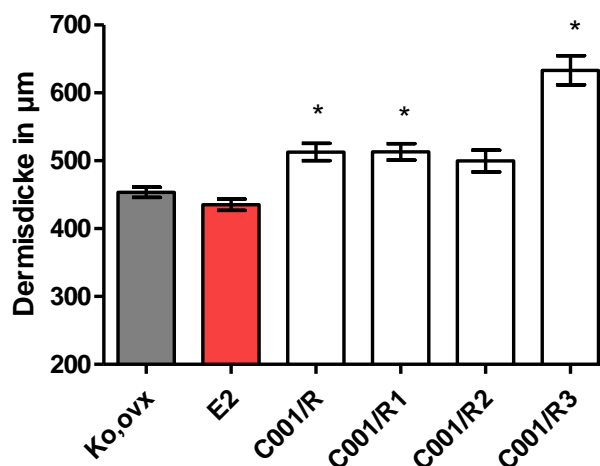


Abb. 16 Absolute Dermisdicke in µm der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion
C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die gesamte Restfraktion C001/R und die Subfraktionen
C001/R1 und C001/R3 weisen signifikante Zunahmen der Dicke auf.

3.4.3 Subkutanes Fettgewebe

Die durchschnittliche Dicke des subkutanen Fettgewebes der Ko,ovx beträgt 587,42 μm . Alle Testgruppen weisen signifikante Unterschiede des subkutanen Fettgewebes auf.

Die E2-Gruppe ist auf 282,14 μm und die gesamte Saponinfraktion auf 457,23 μm signifikant erniedrigt. Auffällig ist, dass bei der E2-Gruppe eine Abnahme des subkutanen Fettgewebes um 48% stattgefunden hat.

Die restlichen Fraktionen und Subfraktionen weisen signifikante Erhöhungen der subkutanen Fettschicht auf. Die Subfraktion C001/S1 auf 797,44 μm , C001/S2 auf 751,57 μm , C001/S3 auf 745,89 μm , die gesamte Restfraktion auf 775,80 μm , die Subfraktion C001/R1 auf 753,40 μm , C001/R2 auf 967,71 μm und die Subfraktion C001/R3 auf 1078,12 μm . Auffällig ist, dass die Subfraktion C001/R3 die größte subkutane Fettdicke besitzt und im Vergleich zur Ko,ovx um 83,53% zugenommen hat.

Somit ist die Fettdicke der Subkutis bei der E2-Gruppe am geringsten und bei der Subfraktion der Restfraktion C001/R3 am größten.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Fettdicke

* $p < 0,05$ vs Ko

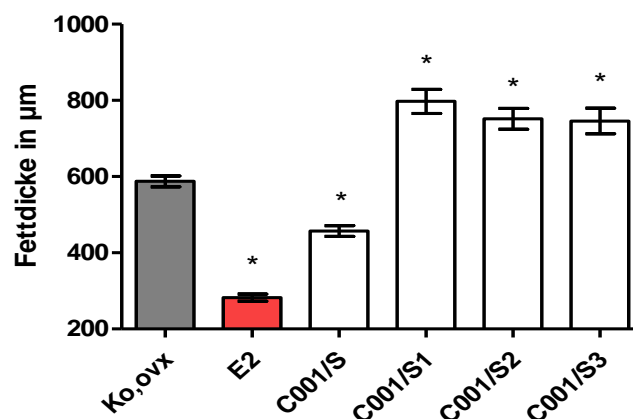


Abb. 17 Absolute Dicke des subkutanen Fettgewebes in μm der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponinfraktion C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Die E2- und Saponinfraktion C001/S weisen signifikante Abnahmen, die Restfraktionen C001/S1 eine signifikante Zunahme der Dicke auf.

**Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Fettdicke**

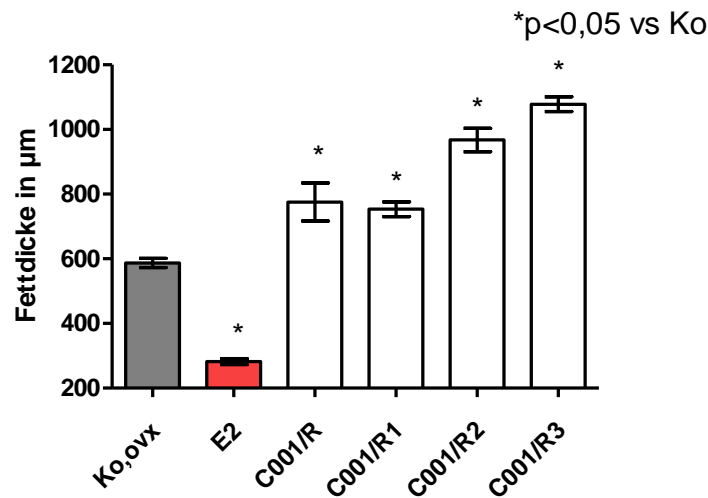


Abb. 18 Absolute Dicke des subkutanen Fettgewebes in µm der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die E2-Gruppe weist eine signifikante Abnahme, alle anderen Testgruppen signifikante Zunahmen der Dicke auf.

3.4.4 Subkutane Muskelschicht

Die durchschnittliche Dicke der Muskelschicht im subkutanen Gewebe beträgt bei der Ko,ovx 473,66 µm. Die E2-Gruppe weist eine signifikant geringere Dicke von 404,00 µm auf. Des Weiteren gibt es einen signifikanten Abfall der Muskeldicke in der gesamten Restfraktion C001/R auf 355,89 µm und ihrer Subfraktion C001/R3 auf 378,40 µm.

Eine signifikante Zunahme der Dicke der subkutanen Muskelschicht weist die gesamte Saponinfraktion mit 559,29 µm und ihre Subfraktion C001/S3 mit 688,55 µm, genauso wie die Subfraktion der Restfraktion C001/R2 mit 597,66 µm. Somit ist die höchste Zunahme der Dicke der subkutanen Muskelschicht in der Subfraktion C001/S3 zu verzeichnen.

**Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Muskeldicke**

*p<0,05 vs Ko

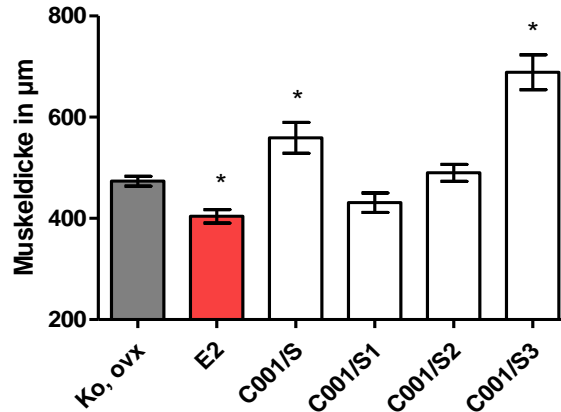


Abb. 19 Absolute Dicke der subkutanen Muskelschicht in µm der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponingruppe C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Die E2-Gruppe weist eine signifikante Abnahme, die Saponingruppe C001/S und ihre Subfraktion C001/S3 signifikante Zunahmen der Dicke auf.

**Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001
und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte
4 Wochen per Futter auf:
Muskeldicke**

*p<0,05 vs Ko

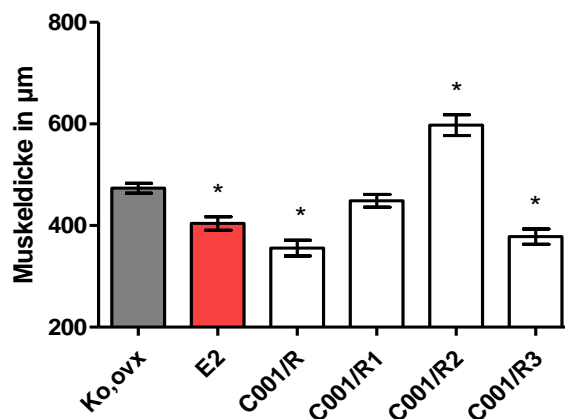


Abb. 20 Absolute Dicke der subkutanen Muskelschicht in µm der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die E2-, die Restfraktion C001/R und ihre Subfraktion C001/R3 weisen signifikante Abnahmen der Dicke auf. Die Subfraktion C001/R2 weist eine signifikante Zunahme der Dicke auf.

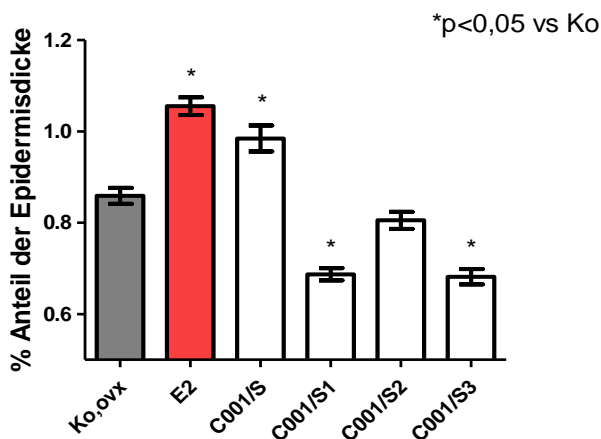
3.5 Die Haut, prozentuale Dicke

Nach den Messungen der absoluten Dicke wurden alle Schichten einer Testgruppe addiert und für diese eine durchschnittliche Gesamtdicke errechnet. Aus der Gesamtdicke für jede einzelne Gruppe wurde der prozentuale Anteil der Epidermis, der Dermis, des subkutanen Fettgewebes und der subkutanen Muskelschicht ermittelt. Somit stellt diese Vorgehensweise ein anderes Verfahren, die Effekte der Applikation zu beurteilen, dar. Die eruierten Effekte sind zum Teil gegensätzlich zu den Effekten der absoluten Dicke.

3.5.1 Epidermis

Im Vergleich zu der Kontrollgruppe (Ko,ovx), deren Epidermisdicke 0,86% an der gesamten Dicke beträgt, weisen die E2-Gruppe mit 1,06% und die gesamte Saponinfraktion mit 0,98% eine signifikante prozentuale Erhöhung der Epidermisdicke auf. Die Subfraktion C001/S1 ist mit der Epidermisdicke auf 0,69% und C001/S3 mit 0,68% signifikant verringert. Auch die Subfraktionen der Restfraktion nehmen in der Epidermis signifikant ab. C001/R1 auf 0,69%, C001/R2 auf 0,56% und C001/R3 auf 0,66%.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: % Anteil der Epidermisdicke



Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: % Anteil der Epidermisdicke

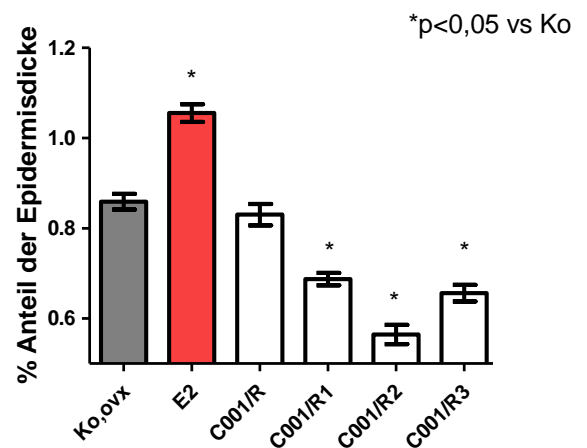


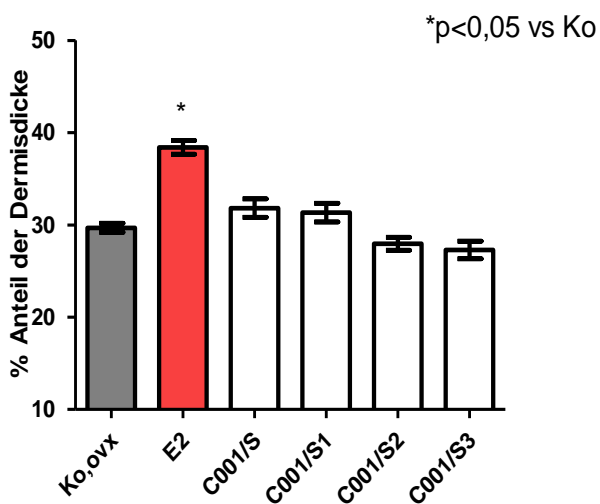
Abb. 21 Prozentuale Epidermisdicke der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponinfraktion C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Die E2- und Saponinfraktion weisen prozentuale signifikante Zunahmen, die Subfraktionen C001/S1 und C001/S3 signifikante Abnahmen der Dicke auf.

Abb. 22 Prozentuale Epidermisdicke der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die E2- Gruppe weist eine prozentuale signifikante Zunahme der Dicke auf. Die Subfraktionen C001/R1-3 eine signifikante Abnahme.

3.5.2 Dermis

Bei der prozentualen Dermisdicke liegt nur bei der E2-Gruppe eine signifikante Erhöhung auf 38,40% von ursprünglich 29,69% der Kontrollgruppe vor. Eine Dickenabnahme der Dermis auf 24,06% liegt bei der Subfraktion der Restfraktion C001/R2 vor.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: % Anteil der Dermisdicke



Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: % Anteil der Dermisdicke

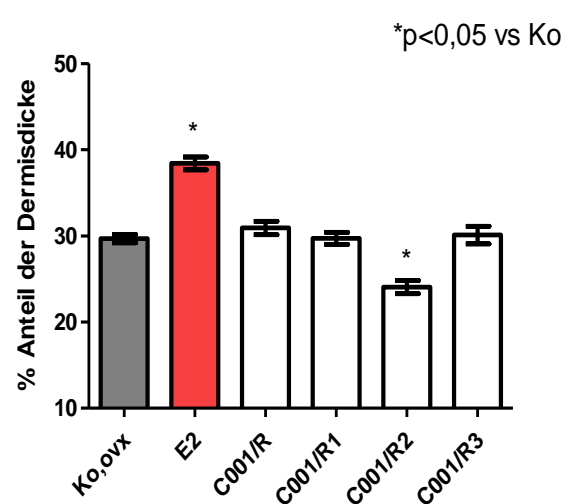


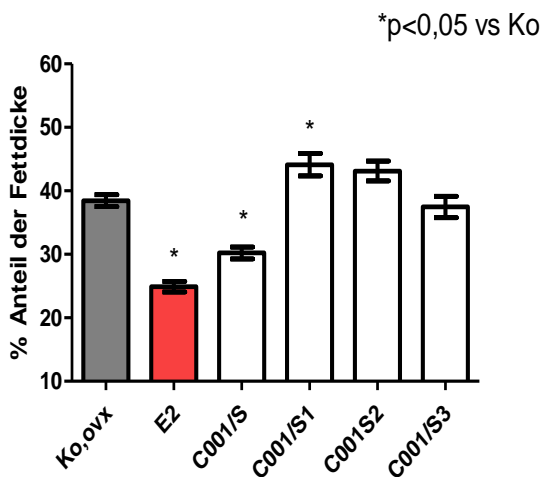
Abb. 23 Prozentuale Dermisdicke der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponinfraktion C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Nur die E2-Gruppe weist eine prozentuale signifikante Zunahme auf. Alle anderen Gruppen wiesen wie die Kontrollgruppe eine vergleichbare prozentuale Dicke auf.

Abb. 24 Prozentuale Dermisdicke der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die E2-Gruppe weist eine prozentuale signifikante Zunahme auf. Die Subfraktion C001/R2 eine signifikante Abnahme.

3.5.3 Subkutanen Fettgewebe

Die Kontrollgruppe (Ko,ovx) hat eine Dicke des subkutanen Fettgewebes von 38,45%. Die E2-Gruppe hat eine signifikante Abnahme der Dicke auf 24,89% und die Saponingruppe auf 30,22%. Die Subfraktion C001/S1 der Saponinfraktion eine Erhöhung auf 44,12%, genauso wie die gesamte Restfraktion C001/R auf 46,78%, ihre Subfraktion C001/R1 auf 43,62%, C001/R2 auf 46,60% und die Subfraktion C001/R3 auf 51,25%.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: % Anteil der Fettdicke



Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: % Anteil der Fettdicke

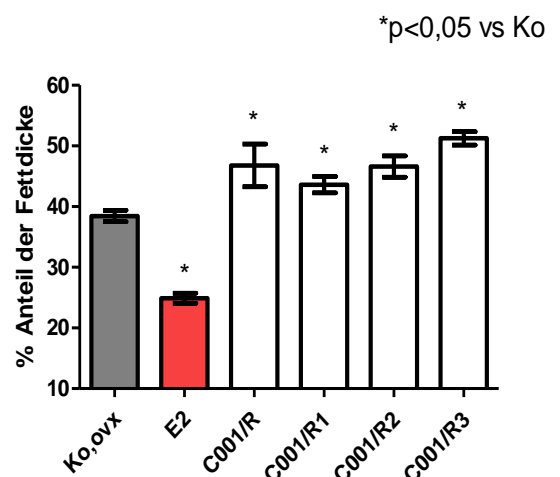


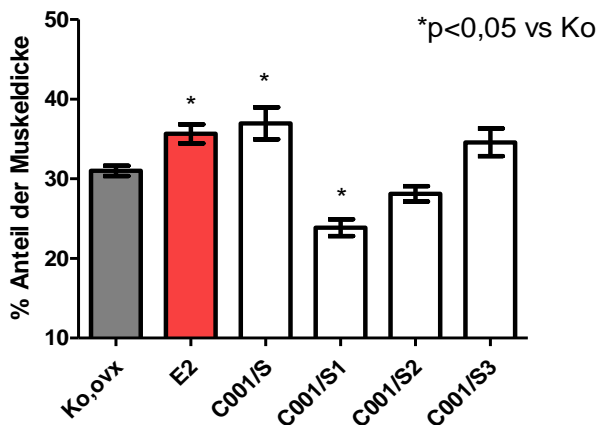
Abb. 25 Prozentuale Dicke des subkutanen Fettgewebes der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponingruppe C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Die E2- und Saponingruppe weisen signifikante prozentuale Abnahmen auf. Die Subfraktion C001/S1 eine signifikante Zunahme.

Abb. 26 Prozentuale Dicke des subkutanen Fettgewebes der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die E2-Gruppe weist eine prozentuale signifikante Abnahme auf. Die restlichen Testgruppen weisen signifikante prozentuale Zunahmen der Fettdicke auf.

3.5.4 Subkutane Muskelschicht

Die prozentuale Dicke der subkutanen Muskelschicht beträgt bei der Kontrollgruppe (Ko,ovx) 31,00%. Diese nimmt bei der E2-Gruppe auf 35,65% und bei der Saponingruppe C001/S auf 36,97% signifikant zu. Eine Abnahme der Dicke ist bei ihrer Subfraktion C001/S1 auf 23,86%, bei der gesamten Restfraktion C001/R auf 21,46% und deren Subfraktionen C001/R1 auf 25,98% und C001/R3 auf 17,99% nachweisbar.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: % Anteil der Muskeldicke



Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: % Anteil der Muskeldicke

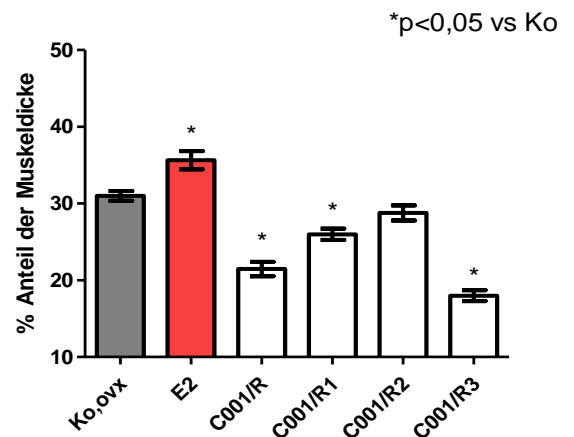


Abb. 27 Prozentuale Dicke der subkutanen Muskelschicht der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponingruppe C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Die E2- und Saponingruppe weisen signifikante prozentuale Zunahmen auf. Die Subfraktionen C001/S1 eine signifikante Abnahme der prozentualen Muskeldicke.

Abb. 28 Prozentuale Dicke des subkutanen Fettgewebes der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die E2-Gruppe weist eine signifikante prozentuale Zunahme auf. Die Restfraktion C001/R und die Subfraktionen C001/R1 und C001/R3 weisen eine signifikante Abnahme der prozentualen Muskeldicke auf.

3.6 Immunhistochemische Auswertung (PCNA), Epidermis

Mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung wurde versucht, den prozentualen Anteil an proliferativen Zellkernen in der Epidermis darzustellen. Dieses wurde durch das Auszählen von PCNA-positiven Zellen, die sich in ihrem Färbeverhalten von nicht-proliferierenden Zellen unterscheiden, aus mindestens 500 Zellen untersucht.

Bei der Kontrollgruppe (Ko,ovx) liegt der prozentuale Anteil an proliferierenden Zellen bei 23,96%. Eine signifikante Erhöhung auf 44,89% findet man in der E2-Gruppe und auf 42,45% in der Subfraktion der Restfraktion C001/R3 vor.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Anteil an PCNA-positiven Zellen in der Epidermis

Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Anteil an PCNA-positiven Zellen in der Epidermis

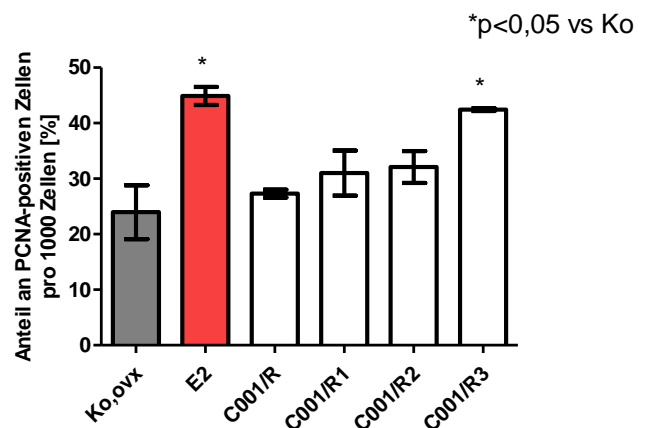
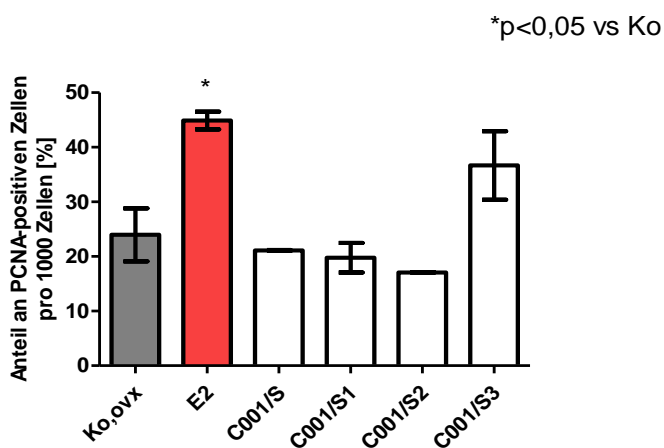


Abb. 29 Anteil an PCNA-positiven Zelle pro 1000 Zellen in der Epidermis der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponinfraktion C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Nur die E2-Gruppe weist eine signifikante Zunahme der proliferativen Zellen auf. Alle anderen Gruppen weisen wie die Kontrollgruppe eine vergleichbare Proliferationsrate auf.

Abb. 30 Anteil an PCNA-positiven Zelle pro 1000 Zellen in der Epidermis der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Die E2-Gruppe und die Subfraktion C001/R3 weisen eine signifikante Proliferationszunahme auf.

3.7 Immunhistochemische Auswertung (PCNA), Haarfollikel

Ebenso wie in der Epidermis wurde die proliferative Wirkung in den Haarfollikeln überprüft. Durchschnittlich waren 29,90% der Zellen in den Haarfollikeln der Kontrollgruppe positiv. Die Auszählung der proliferativ positiven Zellen hat in allen anderen Testgruppen keinen signifikanten Unterschied nachgewiesen.

Der Effekt von E2 und Saponinfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/S1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Anteil an PCNA-positiven Zellen in den Haarfollikeln

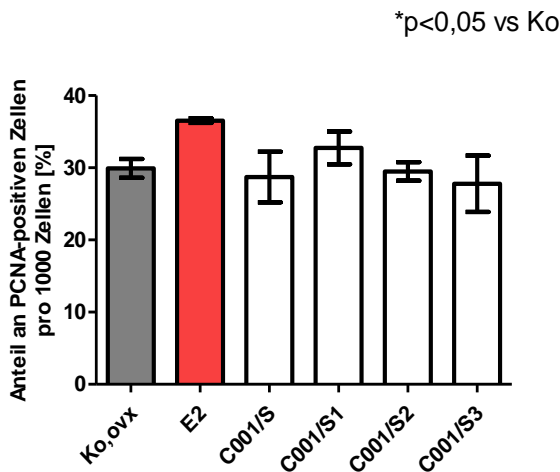


Abb. 31 Anteil an PCNA-positiven Zelle pro 1000 Zellen in den Haarfollikeln der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Saponinfraktion C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3. Alle Gruppen weisen wie die Kontrollgruppe eine vergleichbare Proliferationsrate in den Haarfollikeln auf.

Der Effekt von E2 und Restfraktion der C001 und deren Subfraktionen (C001/R1-3) bei der ovx Ratte 4 Wochen per Futter auf: Anteil an PCNA-positiven Zellen in den Haarfollikeln

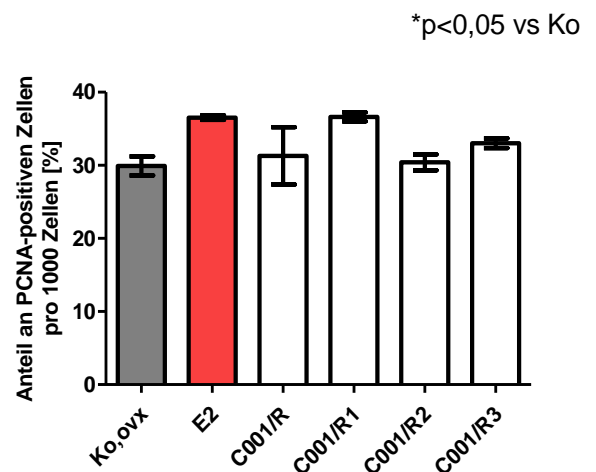


Abb. 32 Anteil an PCNA-positiven Zelle pro 1000 Zellen in den Haarfollikeln der Kontrollgruppe (Ko,ovx), der E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3. Alle Gruppen weisen wie die Kontrollgruppe eine vergleichbare Proliferationsrate in den Haarfollikeln auf.

3.8 Graphische Darstellung der Gesamtdicke der Haut

Mit der graphischen Darstellung der Gesamtdicken und den prozentualen Anteilen an der Epidermis, der Dermis, dem subkutanen Fettgewebe und der subkutanen Muskelschicht kann der Effekt der Testsubstanzen verglichen werden.

Ein Balken stellt die Gesamtdicke der vier Schichten dar. Innerhalb des Balkens ist die prozentuale Verteilung der einzelnen Schichten visualisiert.

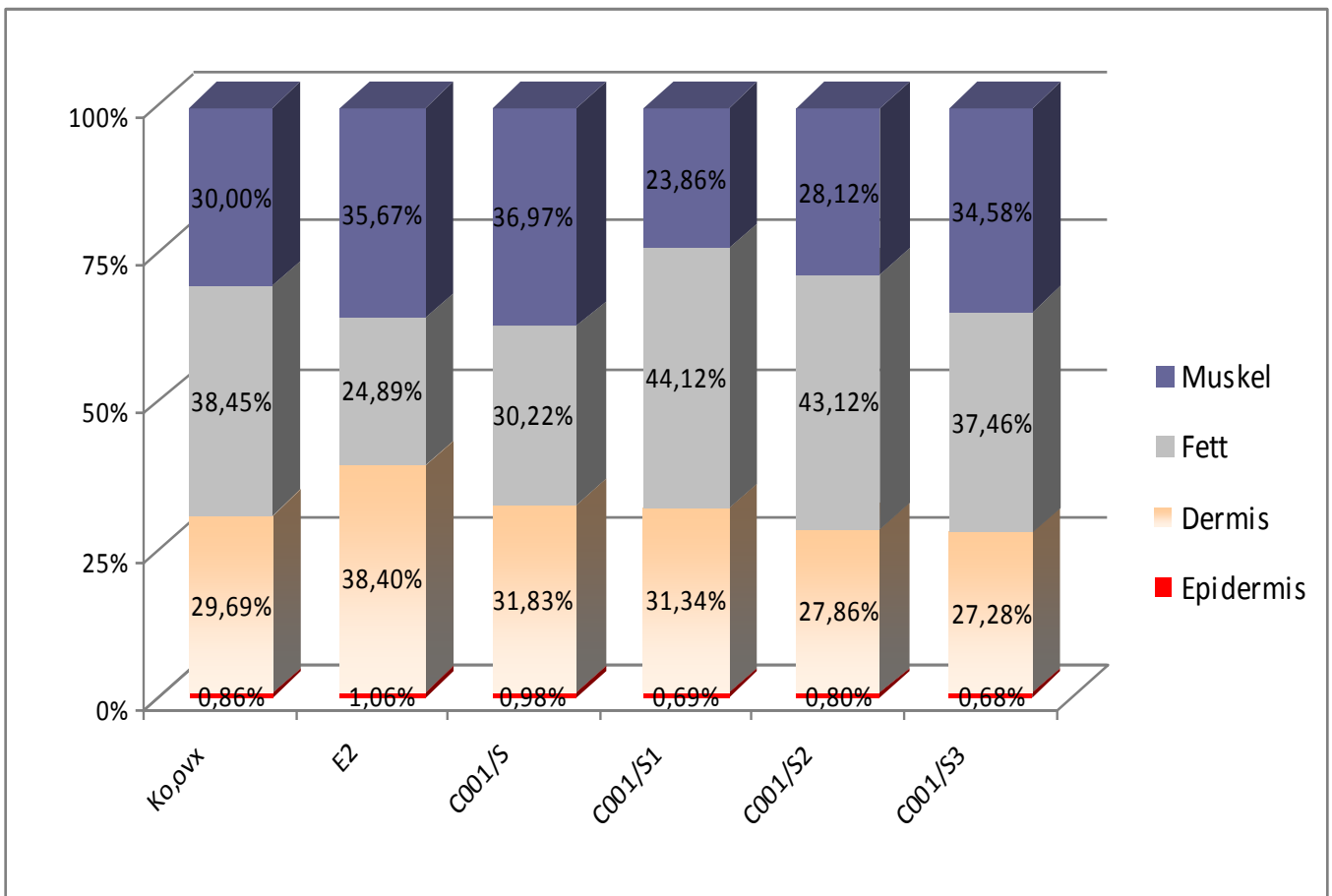


Abb.33 Gesamtdicke der Haut mit prozentualen Anteil der Epidermis, der Dermis, des subkutanen Fettgewebes und der subkutanen Muskelschicht bei der Kontrollgruppe, E2-Gruppe, der gesamten Saponinfraktion C001/S und deren Subfraktionen C001/S1-3.

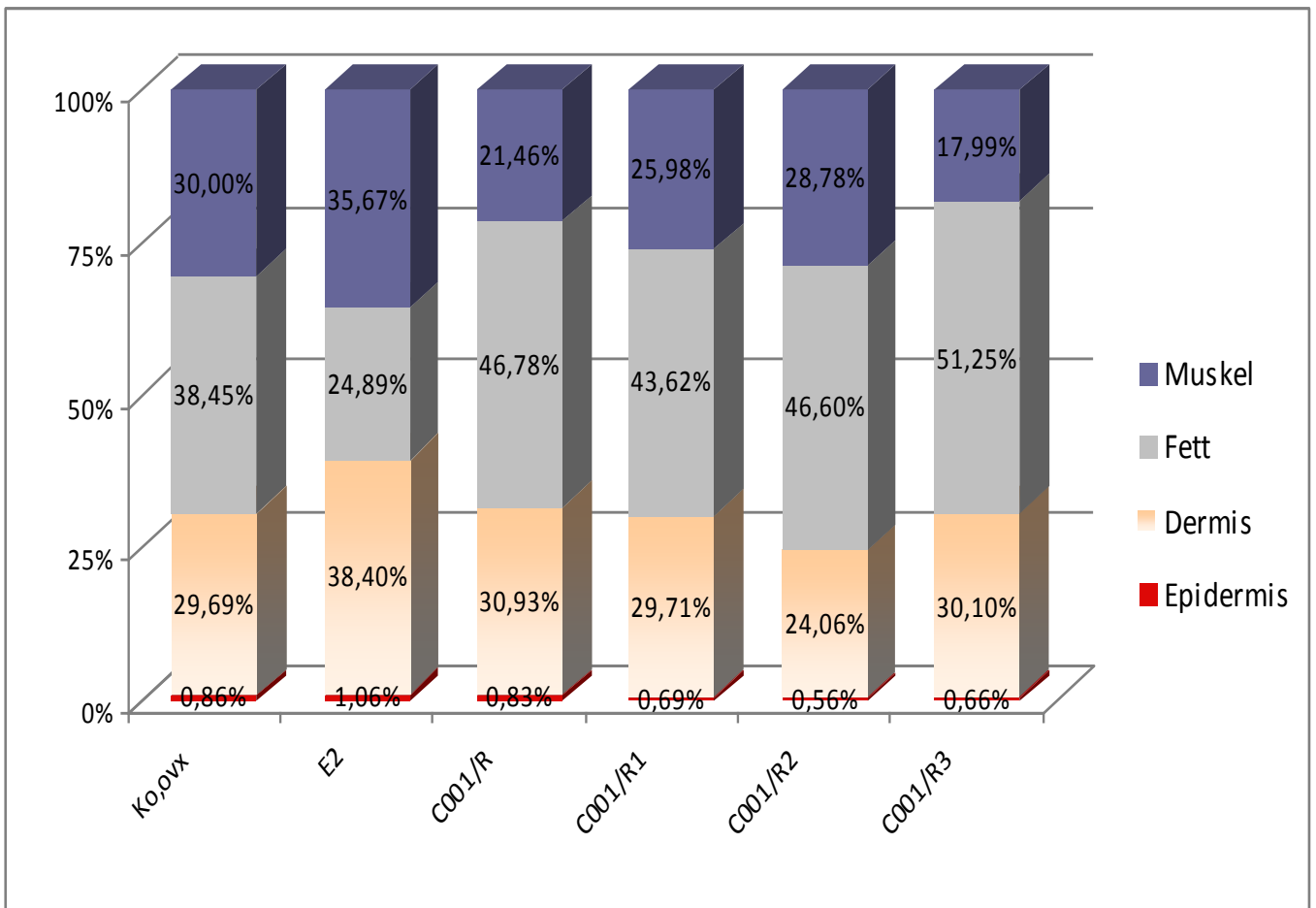


Abb.34 Gesamtdicke der Haut mit prozentualen Anteil der Epidermis, der Dermis, des subkutanen Fettgewebes und der subkutanen Muskelschicht bei der Kontrollgruppe, E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1-3.

3.9 Korrelation ausgewählter Parameter

Der folgende Graph (Abb. 35) beschreibt eine Korrelation zwischen dem prozentualen Anteil an subkutanem Fettgewebe und den ermittelten Leptinwerten im Serum der Testtiere.

Es ist eindeutig zu erkennen, dass mit Zunahme des Fettanteils in der Subkutis auch die Leptinkonzentration steigt.

Korrelation subkutanen Fett/Serum Leptin

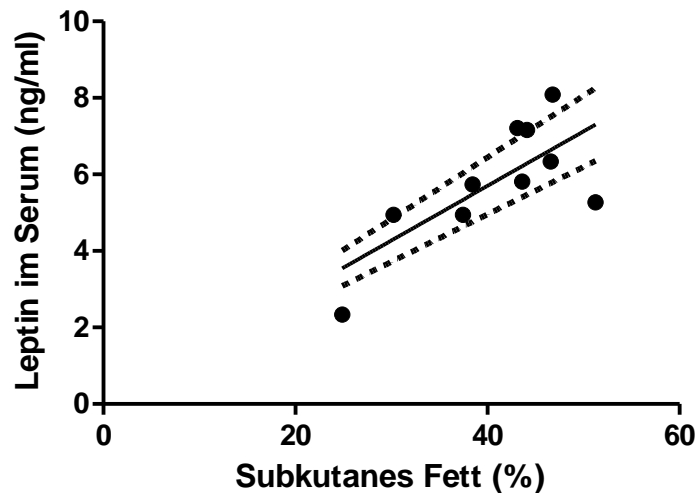


Abb. 35 Korrelation zwischen dem subkutanen Fettgewebe und dem Serumleptinwert.

4. Diskussion

Die vorliegende Dissertation stellt den Extrakt von *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 differenziert in seine Subfraktionen vor und beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob und in welchem Maße dieser Extrakt eine vergleichbare Wirkung auf die postmenopausale Haut hat wie die herkömmliche HRT. Die Annahme dazu liefert die Erkenntnis, dass CR BNO 1055 in anderen Studien postmenopausale Beschwerden lindern konnte, osteoprotektiv wirkt, aber keine Effekte am Uterus zeigt (Seidlová-Wuttke et al. 2003). Da CR selbst keine Östrogene enthält, soll untersucht werden, ob auch die Subfraktionen im gleichen Maße wie die HRT den ursprünglichen Zustand der Haut zu erhalten vermögen. Es soll demnach ein Präparat gefunden werden, das die positiven Eigenschaften von Östrogenen wie Osteoprotektivität, Linderung klimakterischer Beschwerden und Verhinderung der Hautalterung durch Hormondefizienz besitzt, gleichzeitig aber keine Risiken der Östrogentherapie hervorruft und deshalb als langfristige Therapie appliziert werden kann. In der vorliegenden Studie sollte nicht nur die Wirkung des Extraktes auf die Haut nachgewiesen werden, sondern auch anhand der Inhaltsstoffe differenziert werden, welche der Substanzgruppen die Effekte hervorrufen. Diese Differenzierung der Inhaltsstoffe und deren Analytik ist ein Novum.

Dazu wurde der Extrakt in zwei Fraktionen, in die Saponin- und in die Restfraktion, gespalten. Diese Fraktionen wurden wiederum in jeweils drei Subfraktionen (S1-3, R1-3) unterteilt und vier Wochen lang per Futter ovx SD-Ratten appliziert. Bislang lässt sich keine

Literatur zur Wirkung von CR auf postmenopausale Haut finden. Darüber hinaus sind bislang keine Publikationen vorhanden, die eine Wirkung von Actein oder Desoxyactein auf die Haut beschreiben. Gerade diese beiden Substanzen weisen in der vorliegenden Studie einen erheblichen Effekt auf postmenopausale Haut auf, sodass durch diese Ergebnisse sich in der Zukunft neue Erkenntnisse bezüglich des metabolischen Syndroms und der Hautalterung erschließen lassen.

Als erste Kontrollgruppe dienten Tiere, die weder Testsubstanz noch östrogenhaltiges Futter verabreicht bekommen haben. Zusätzlich war ihr Futter sojafrei, da auch Soja östrogene Wirkung besitzt. Als zweite Kontrollgruppe dienten Tiere, die mit E2 substituiert wurden, nach der vollkommenen Östrogendefizienz durch Ovx. Wie aus Vorversuchen bekannt war, wurde hier eine positive Wirkung auf die Hautstruktur erwartet und diese soll als Vergleich zur Wirkung der Testsubstanzen herangezogen werden.

Dieser Vergleich zur menschlichen Haut ist dadurch möglich, da Ratten eine sehr geringe extragonadale Östrogenproduktion haben (Labrie et al. 2000, van Weerden et al. 1992) und sich nach einer Ovx gleiche abbauende Prozesse in der tierischen Haut abspielen.

Nach der Testperiode wurde die Haut histomorphometrisch ausgewertet, indem die Epidermis, die Dermis, das subkutane Fett- und Muskelgewebe in ihrer Schichtdicke miteinander verglichen worden sind. Zur Beurteilung einer Zunahme der Schichtdicke ist es wichtig, nicht nur eine Messung, wie die der absoluten Schicht, als Resultat zu sehen, sondern hier sollte der prozentuale Anteil dieser Schicht als Vergleich herangezogen werden. Dabei ist weder der eine noch der andere Wert maßgeblich für einen „positiven Effekt“, vielmehr ist es eine Kombination aus beiden. Ein Beispiel dafür sind die Effekte in der Hautanalyse der östrogenbehandelten Tiere. Durch die sehr starke Reduktion des Fettgewebes erscheinen alle anderen Schichten im prozentualen Anteil als besonders gut ausgebildet. Dieses wird jedoch in der μm -Messung widerlegt, sodass teilweise durchschnittliche absolute Werte wie in der Kontrollgruppe zu sehen sind.

Zusätzlich erfolgte eine immunhistochemische Analyse der Epidermis auf ihre Proliferationsrate und der Proliferationsrate in den Haarfollikeln.

4.1 Futteraufnahme

Die Futteraufnahme war im Verlauf des Versuchs für alle, bis auf die E2-Gruppe, gleich. Daher kann davon ausgegangen werden, dass gleiche Mengen an Substanzen aufgenommen wurden, wie in den früheren Untersuchungen, in denen der Gesamtextrakt getestet wurde.

Die Versuchstiere erhielten nach Ovx, dem Versuchsbeginn, Pellett-Futter ad libitum, das sojafrei war, um hieraus östrogene Effekte auszuschließen. Es wurde darauf geachtet, dass keine Beeinflussung der Ergebnisse auf Grund der Nahrung stattfindet. Bei dem Futter handelt es sich um eine vollwertige Nagernahrung, die Aminosäuren, Mineralstoffe, Vitamine und Spurenelemente enthält (siehe 6.1 Sojafreies Pellet-Futter, S. 56).

Die durchschnittliche Aufnahme der Nahrung in den Testgruppen lag bei 18 g pro Tier pro Tag. Eine Ausnahme der Futteraufnahme bildet die E2-Gruppe. Ihre Aufnahme lag zu Beginn des Versuchs bei 6 g pro Tier pro Tag und nach 4-wöchiger Applikation bei 14 g pro Tier pro Tag. Dieses Verhalten der Tiere ist bereits bei diesem östrogenhaltigen Futter bekannt. Das Futter scheint für die Tiere durch den Östrogenzusatz zunächst weniger schmackhaft zu sein. Zusätzlich lässt sich die geringere Futteraufnahme auf höhere Aktivität und Bewegung der Testtiere zurückführen.

4.2 Dosierung

Die unterschiedlichen Dosierungen der Testsubstanzen lassen sich wie folgt erklären. Die wirksamen Dosen des Urextraktes von CR BNO 1055/C001 sind bekannt. Wird dieser Extrakt in seine Fraktionen (Saponin- und Restfraktion) und Subfraktionen (C001/S1-3, C001/R1-3) zerlegt, enthält er unterschiedliche Anteile dieser Fraktionen. Somit sind auch in der Saponin- und Restfraktion sowie in den Subfraktionen stets die gleichen Mengen an wirksamen Substanzen enthalten, wie in dem Ausgangsextrakt BNO 1055.

Genau in diesem Verhältnis und in der bekannten wirksamen Konzentration wurden die Testsubstanzen den Tieren mit dem Futter verabreicht.

War demnach eine Subfraktion in der effektiven Dosis des Gesamtextrakts C001 konzentriert vertreten, so wird in der vorliegenden Studie ihr Anteil an mg in der Gesamtapplikationsdosis größer ausfallen als Subfraktionen, die zuvor eine niedrige Konzentration im Gesamtextrakt C001 enthielten. Damit kommt es zustande, dass das Futter mit der Subfraktion C001/S1 31,2 mg pro kg enthält, das Futter mit der gesamten Restfraktion C001/R als Testsubstanz 382,35

mg im kg Futter aufweist. Somit erhalten die Testgruppen in dieser Studie unterschiedliche Gesamtapplikationsmengen der zu testenden Substanzen in den vier Wochen.

Mit der Applikation dieser Dosierung kann demnach davon ausgegangen werden, dass die Dosis einen maximalen Effekt erreicht und die Wirkung der einzelnen Subfraktionen gut beurteilbar ist.

4.3 Körpergewicht der Versuchstiere

Zunächst wurden die Versuchstiere randomisiert in Gruppen zu je 10 Tieren eingeteilt, wobei ihr durchschnittliches Körpergewicht (KG) bei 250 g lag. Das Gewicht wurde wöchentlich ermittelt. Die größte Körpergewichtszunahme zeigt die Kontrollgruppe, die substanzfreies Futter appliziert bekommen hat und durchschnittlich um 90 g nach 4-wöchiger Studiendauer zugenommen hat. Das entspricht einer Zunahme um 36%. Die Gruppen, denen Testsubstanz C001/S,S1-3 und C001/R,R1-3 appliziert worden ist, nahmen durchschnittlich 85 g in 4 Wochen zu, was einer Zunahme von 34% entspricht.

Die östrogenbehandelten Tiere haben im Gegenteil 16 g an Gewicht während der Studie verloren, was eine Abnahme um 6,4% des KG bedeutet. Obwohl der zunächst geminderte Futtermittelverbrauch im Vergleich zu anderen Vergleichsgruppen stetig ansteigt, liegt das KG der E2-Tiere trotz steigender Energiezufuhr deutlich unterhalb der anderen Testgruppen.

Studien belegen, dass das KG Postovarektomie signifikant zunimmt, E2-Applikation bei Ovx-Ratten das KG sogar senken kann (Wegorzewska et al. 2008), das auch in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Östrogene wirken demnach anorektisch und lassen so den Gewichtsverlust erklären (Bonavera et al. 1994).

Ein weiterer Erklärungsansatz ist die Tatsache, dass in Abwesenheit von E2 die körperliche Aktivität der Versuchstiere sinkt. Auch in Studien von postmenopausalen Frauen konnte gezeigt werden, dass Östrogenmangel die körperliche Aktivität vermindert (Poehlman und Tchernof 1998). Eine Gewichtsreduktion der E2-Tiere kann demnach mit erhöhtem Energieverbrauch trotz gleicher Energiezufuhr einhergehen.

Wird das KG der Ko,ovx-Gruppe mit den Testsubstanzen C001/S,S1-3 und C001/R,R1-3 verglichen, so liegen die Werte der Testgruppen um lediglich 2% unter dem der Ko,ovx-Gruppe und weisen keine signifikante Abnahme des KG auf. Ein östrogenener Effekt auf das KG lässt sich durch diese Werte nicht nachweisen. Es sollte jedoch beachtet werden, dass sich die Zusammensetzung des KG aus unterschiedlichen Parametern ergibt und das Verhältnis

von Fett und Muskelmasse maßgeblich für die Beurteilung hinsichtlich eines positiven oder negativen Effektes der Testsubstanzen sein soll.

4.4 Serumanalyse, metabolische Effekte

Das Metabolische Syndrom spielt in der westlichen Gesellschaft die größte Rolle bei kardiovaskulären Erkrankungen und nimmt somit eine der wichtigsten Stellungen bei Behandlungen und als kommerzieller Faktor ein. Die Definition des Metabolischen Syndroms beinhaltet mehrere Parameter, wie Adipositas, hohe Konzentration von Cholesterin und Triglyzeriden im Serum, Hypertonie oder Insulinresistenz.

In diesem Abschnitt wird die Serumkonzentration von Leptin bei ovx Ratten ohne Applikation von Testsubstanz, nach Applikation von E2 und nach Testsubstanzen C001/S,S1-3 und C001/R,R1-3 betrachtet und mit dem s.c. gemessenen Fettgewebe und der subkutanen Muskelschicht verglichen. Diese Ergebnisse können zusammen mit dem KG Rückschlüsse auf das Fettdepot der Versuchstiere geben und Vorhersagen über mögliche weiterführende Schäden gewährleisten.

4.4.1 Leptin und das subkutane Fettgewebe

Leptin als Proteohormon, das vor allem in Adipozyten synthetisiert wird, spielt eine wichtige Rolle in der Regulation von Körpergewicht. Eine große Menge von Adipozyten bedeutet eine hohe Syntheserate von Leptin, das seinerseits durch die neuronale negative Rückkopplung das Hungergefühl senkt (Halaas et al. 1995). Eine hohe Leptinkonzentration senkt somit die Futteraufnahme und verhilft zur Senkung des Körpergewichtes.

Eine von vornherein niedrige Adipozytenzahl hat eine niedrige Leptinserumkonzentration zur Folge, wobei das negative Feedback ausbleibt und das Körpergewicht ansteigt. Dasselbe Phänomen entsteht bei hoher Leptinkonzentration, jedoch zugleich einer Resistenz der Leptinrezeptoren. Durch die Desensibilisierung der Leptinrezeptoren wird das Hungergefühl im Futterzentrum nicht inhibiert und es kommt zu weiterer Gewichtszunahme durch fehlendes Sättigungsgefühl. Solch eine Leptinresistenz ist häufig bei Adipositas zu finden und führt des Weiteren ebenfalls zur Aktivitätsabnahme bei den Testtieren (Ainslie et al. 2001).

In dieser Studie lag die Serumkonzentration von Leptin der Ko,ovx bei 6,18 µg/ml. Eine signifikante Abnahme der Werte zeigt die E2-Gruppe mit 2,34 µg/ml und die C001/S-Gruppe mit 4,55 µg/ml. Eine Erklärung für die niedrigen Leptinwerte der E2-Gruppe liefert das niedrige KG und das wenig vorhandene s.c. Fettgewebe, genauso wie die abnehmenden Fettwerte der C001/S-Gruppe.

In der vorliegenden Studie wird das subkutane Fettgewebe durch histomorphometrische Messungen ermittelt und anschließend der prozentuale Anteil an der gesamten Hautdicke berechnet.

Wie oben bereits aufgeführt, lässt sich über die Masse des Fettgewebes die Stoffwechsellage der postmenopausalen Frau beurteilen und es lassen sich bestimmte Risikoprofile konstruieren. Da Adipozyten für die Leptinsynthese verantwortlich sind, ist davon auszugehen, dass eine hoher Fettgewebeanteil einen hohen Leptinspiegel verursachen kann und umgekehrt. In der Serumanalyse des Leptins waren die Werte der E2-behandelten Tiere und der gesamten Saponinfraktion C001/S signifikant niedriger als in der Ovx-Gruppe. Im Vergleich dazu ist es nicht außergewöhnlich, dass auch in der absoluten Messung und im prozentualen Anteil das Fettgewebe ebenfalls signifikant reduziert ist. Besonders hervorzuheben sind die besonders guten Effekte auf das Fettgewebe durch die Gesamtsaponine C001/S, die annähernd die Werte der E2-Applikation erreichen. Im Vergleich zu den ovx Tieren hatten die Saponin-behandelten, genauso wie E2-behandelten Tiere, wesentlich weniger an s.c. Fettgewebe vorzuweisen. Die Gesamtsaponine C001/S zeigen somit eine positive Wirkung auf die metabolische Stoffwechsellage. Wenn die Ergebnisse auf den Menschen übertragbar wären, würden die Gesamtsaponine das Risikoprofil der Frau verbessern.

Dass Östrogene in der HRT das Fettgewebe reduzieren, wurde bereits in anderen Studien gezeigt (Gower et al. 2006). Auch Studien an SD-Ratten, die eine Saponinapplikation erfahren hatten, wiesen nach 3-wöchiger Testphase ein geringeres Fettgewebe auf (Kim et al. 2005). Genauso werden diese Werte von der Studie der endokrinologischen Abteilung der UMG bestätigt, in der unter Saponinapplikation das Fettgewebe signifikant abnimmt (Seidlová-Wuttke et al. 2012). Mit der Saponinfraktion C001/S liegt bezüglich des Fettgewebes hier vermutlich ein vergleichbarer Effekt vor. Dies unterstützt die Zielsetzung dieser Ausarbeitung, eine Alternative für die HRT mit ähnlich guten Ergebnissen zu finden. Es sind also die Inhaltsstoffe von C001/S, welche diese Effekte hervorrufen.

Alle anderen Testgruppen zeigten in ihrer Leptinserumkonzentration keine signifikanten Unterschiede zu der Kontrollgruppe auf. Bei der Fettgewebsmessung sind die Werte jedoch gravierender, da außer der E2- und der Gesamtsaponin-Gruppe, alle weiteren Testgruppen eine signifikante Zunahme an Fett in der subkutanen Schicht in der absoluten Messung aufweisen und annähernd alle ebenfalls im prozentualen Anteil an Fettgewebe gewinnen.

Ein niedriger Leptinwert der C001/S-Gruppe bei vergleichbar hohem KG zu der Kontrollgruppe könnte den oben genannten Fall widerspiegeln, dass das Hungergefühl durch das fehlende Leptin angeregt wird und die Tiere an Gewicht zunehmen. Da die Testtiere jedoch keine hohen Fettgewebswerte aufweisen, muss dieses Gewicht durch andere Strukturen wie z.B. Muskelmasse zustande kommen.

Alle weiteren Testgruppen C001/S1-3 und C001/R,R1-3 weisen keine signifikanten Unterschiede der Leptinserumkonzentration im Vergleich zur Ko,ovx auf. Hier lässt sich schlussfolgern, dass nur die Summe aller Inhaltsstoffe zu einer Signifikanz führt. Die synergistische Wirkung von C001/S1-3 vermögen nur additiv die Leptinkonzentration im Serum, genauso wie das Fettgewebe in der Subkutis, auf einem niedrigen Niveau zu halten.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass es eine Korrelation zwischen dem s.c. Fettgewebe und der Leptinkonzentration im Serum der behandelten Tiere gibt, wobei die E2- sowie die C001/S-Gruppe die besten metabolischen Effekte erzielen.

4.4.2 Subkutane Muskelschicht

Die quergestreifte subkutane Muskulatur ist eine in der Literatur kaum erwähnte Struktur der Haut. Jedoch untersuchten wir ihre Schichtdicke und Veränderungen auf die Testsubstanzen und können die gemessenen Tendenzen mit zukünftigen Studien, die in der selben Arbeitsgruppe erstellt werden, bezüglich der Muskulatur vergleichen.

Wird die Dicke der Muskelschicht gemessen, so zeigt sich unter der Applikation der gesamten Saponingruppe C001/S signifikante und dessen Subfraktion C001/S3 sogar hochsignifikante Zunahmen. Des Weiteren ergeben sich bei der Subfraktion der Restfraktion C001/R2 signifikant erhöhte Werte. Erstaunlicherweise zeigen die E2-behandelten Tiere eine scheinbare signifikante Abnahme der Muskelschicht, genauso wie die gesamte Restfraktion C001/R und dessen Subfraktion C001/R3. In diesem Zusammenhang scheint die Muskeldicke der E2-behandelten Tiere lediglich in der absoluten Messung abgenommen zu haben, jedoch nicht im prozentualen Anteil. Dort lassen sich im Gegenteil signifikant erhöhte Muskeldicken nachweisen. Diese Ergebnisse sind mit Studien, in denen Östrogen-Ersatz-Therapie angewandt wurde, kongruent, wobei in dieser Studie nicht das subkutane Muskelgewebe zunahm, sondern andere quergestreifte Skelettmuskulatur. Die Ergebnisse besagen jedoch, dass diese Zunahme an Muskelmasse gering ist und keine Qualität der Muskulatur widerspiegelt sowie für eine Verbesserung der Physis unzureichend sei (Taaffe et al. 2005).

Die zuvor positiven Effekte der Saponingruppe setzten sich auch im prozentualen Anteil an der Gesamtdicke durch, sodass auch hier signifikant hohes subkutanes Muskelgewebe zu verzeichnen ist. Vergleichbare Studien mit Saponinen und quergestreifter Muskulatur sind bislang nicht zu finden.

Insgesamt lassen sich die positiven metabolischen Effekte von E2 und vor allem von C001/S auch auf die Muskulatur nachweisen.

4.5 Die Haut

Dieses Kapitel beschäftigt sich mit der Fragestellung, welche der Testsubstanzen einen positiven Effekt auf die Haut aufweisen und der E2-Applikation vergleichbare Werte liefern. Dazu wurden zunächst die Schichten der Epidermis und der Dermis nach 4-wöchiger Applikation gemessen und anschließend der prozentuale Anteil an der Gesamtdicke errechnet. Die tatsächlich gemessene Dicke wird hier als absolute Dicke bezeichnet. So ergeben sich teilweise konträre Aussagen, da einerseits die absolute Dicke zunehmen kann, aber im Vergleich zu den anderen Schichtdicken im prozentualen Anteil abnimmt. Diese scheinbar kontroversen Ergebnisse veranschaulichen, dass über die absolute Dicke einer Schicht kein Urteil darüber gefällt werden kann, ob die Testsubstanz eine gewünschte Wirkung zeigt. Viel mehr ist die Betrachtung der absoluten und der prozentualen Zu- oder Abnahme in Kombination in dieser Studie im Fokus.

Zusätzlich wurde untersucht, ob und in welchem Maße die proliferative Aktivität der Epidermis unter Einwirkung von Testsubstanz vorhanden war. Dieses wurde mit einer immunhistochemischen Analyse nachgewiesen.

Des Weiteren, ebenfalls durch Immunhistochemie, wurde die Proliferationsrate in den dermalen Haarfollikeln ausgewertet.

4.5.1 Epidermis

Durch die besonderen Anforderungen als Barrierschutz zur Außenwelt unterliegt die Epidermis hohem Anspruch in ihrer Beschaffenheit. Zum einen bildet die Epidermis als äußerste Zellschicht eine Begrenzung zu exogenen Einflüssen, zum anderen verhindert sie durch Oberflächenlipide des Stratum corneums einen Feuchtigkeitsverlust. Beide Funktionen werden durch eine ausreichende Schichtdicke und genügende Zellfunktion determiniert.

Sind diese Parameter gestört, kommt es durch fehlenden Schutz zu irritativen Zuständen oder durch Wasserverlust zu Faltenbildung und Hautalterung. Durch die Östrogendefizienz treten genau die negativen Effekte der gestörten Barrierefunktion und Feuchtigkeitsverlust auf (Hall und Phillips 2005).

Im Idealfall soll die Epidermis über eine ausreichende Dicke verfügen, um alle schützenden Funktionen erfüllen zu können, andererseits darf ihre Dicke und Proliferation nicht überschießend sein, da sich sonst eine Keratose manifestieren kann. Wie bereits aus zahlreichen Studien bekannt, wirkt die E2-Applikation der Östrogendefizienz entgegen und verhindert weitere funktionelle Beeinträchtigungen oder revidiert sie sogar (Brincat et al. 1985, Madison 2003).

Werden die Ergebnisse der absoluten Dickemessungen der Epidermis betrachtet, so ist die signifikante Abnahme der E2-Gruppe in der Gesamtdicke im Vergleich zur unbehandelten Ko,ovx-Gruppe hervorzuheben. Eine signifikante Zunahme der absoluten Dicke erfährt jedoch die gesamte Saponingruppe C001/S. Bis auf eine signifikante Reduzierung der Epidermisdicke der Subfraktion C001/R1 gibt es keine signifikanten Veränderungen der anderen Epidermisdicken der Testtiere.

Nach Auswertung an dem prozentualen Anteil an der Gesamtdicke, verändert sich die Schlussfolgerung hinsichtlich der Resultate schlagartig. Prozentual gesehen weisen die E2-behandelten Tiere die größte Epidermisdicke auf. Der Wert liegt sogar über 20% höher als der Messwert der Ko,ovx-Tiere. Der zuvor hohe absolute Wert der gesamten Saponingruppe C001/S konnte sich auch im prozentualen Anteil durchsetzen und zeigt auch hier fast annähernd hohe Werte wie die E2-Gruppe.

Viele anderen Testsubstanzen, die zuvor keine signifikanten Veränderungen der absoluten Dicke gezeigt haben, weisen nun signifikante relative Reduktion der Epidermisdicke auf. Dies gilt für die Subfraktionen der Saponinfraktion C001/S1 und C001/S3 und alle Subfraktionen der Restfraktion C001/R1-3.

Besonders hervorzuheben ist hier ein Phänomen, bei dem die gesamte Fraktion wie C001/S einen signifikant positiven Effekt ausweist, ihre Subfraktionen aber für sich allein teils signifikant abnehmende Werte zeigen. Hier spielt der summierte Effekt aller drei Subfraktionen zusammen, die nur in Kombination eine Zunahme der Dicke der Epidermis hervorrufen. Diese Kombination besteht bei der gesamten Saponingruppe aus polaren und lipophilen Saponinen. Es gibt bereits Nachweise aus einer anderen Studie, dass Saponine aus *Medicago sativa* (der Luzerne) einen erneuerbaren Effekt der Epidermis aufweisen und somit

der natürlichen Hautalterung entgegen wirken können (Bonte et al. 1998). Auch in dieser Studie ließen sich die Ergebnisse, auch wenn sich die Saponinquelle unterschied, reproduzieren und lassen den Schluss zu, dass einen vergleichbaren Effekt zu herkömmlichen HRT auf die Epidermis aufweist.

4.5.2 Proliferation der Epidermis mittels PCNA

Die PCNA-Färbung (Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen) ist eine immunhistochemische Methode, um die Proliferationsphase der Zellen nachzuweisen, die sich gerade in der Synthesephase des Zellzyklus befinden. Durch das gebundene Antigen können im speziellen Färbeverfahren die sich teilenden Zellen dargestellt werden.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt aufgeführt war die Schichtdicke der Epidermis im prozentualen Anteil bei den E2-behandelten Tieren am größten. Auch in der Analyse der Proliferationsrate zeigt diese Gruppe die höchste Aktivität der Zellteilung, was einerseits für eine schnelle Bildung von neuen Keratinozyten spricht und damit einer zunehmenden Schichtdicke, möglicherweise aber auch für eine erhöhte Apoptoserate, die eine Keratose verhindert. Einen weiteren signifikanten Wert liefert die Subfraktion der Restfraktion C001/R3. Diese Tatsache ist sehr außergewöhnlich, denn diese Testgruppe hatte weder in der absoluten Schichtdicke signifikante Zunahmen, noch im prozentualen Anteil eine signifikante Abnahme der Epidermisdicke. Hier lässt sich lediglich schlussfolgern, dass die Proliferation durch die Inhaltsstoffe von C001/R3 zwar eine hohe Proliferation auslösen kann, da sich aber kein Wachstumsgewinn der gesamten Schicht einstellt, muss die Apoptoserate viel höher sein. Der Hauptinhaltsstoff von C001/R3 ist Methylserotonin. Bedauerlicher Weise lassen sich diese Aussagen nicht mit vorhandener Literatur belegen, da bislang keine Untersuchungen bezüglich der Wirkung von serotoninerger Substanzen auf die Keratinozytenproliferation existieren.

Die gesamte Saponinfraktion C001/S weist bei der Proliferationsmarkierung keine signifikanten Werte auf, wie es bei der absoluten und prozentualen Schichtdicke der Fall war. Hier ist die hohe Schichtdicke vermutlich auf niedrige Zellapoptose zurückzuführen. Alle anderen Testsubstanzen zeigen ebenfalls keine signifikanten Unterschiede bezüglich der epidermalen Proliferation.

Außerdem kommt hinzu, dass die im Rahmen dieser Ausarbeitung entnommene Haut aus dem Abdominalbereich der SD-Ratte stammt und im Vergleich zur humaner Epidermis

einschichtig ist. Um eine bessere Proliferationsrate der Epidermis beurteilen zu können, sollte eine Hautprobe mit mehrschichtiger Epidermis vorgezogen werden.

4.5.3 Dermis

Genauso wie die Epidermis unterliegt die Dermis hormonellen Einflüssen. Enden diese in der Menopause, so sind wichtige strukturelle Bestandteile der Dermis betroffen. Sie nimmt durch Kollagenverlust an Elastizität ab, die Elastinabnahme führt zur geminderten Rückstellungskräften, die Abnahme an Glykosaminoglykanen vermindert die Wasserretention und führt zu Trockenheit (Brincat et al. 2005). Insgesamt nimmt die Dicke der Dermis ab und verliert damit an den oben genannten Funktionen, sodass das Altern der Haut eintritt und es zu einer Faltenbildung kommt.

Nach einer 4-wöchigen Applikation der Testsubstanzen lassen sich folgende Werte ermitteln: Eine signifikante Zunahme der absoluten Schichtdicke der Dermis erfahren die Subfraktionen der Saponinfraktion C001/S1 und C001/S3, die gesamte Restfraktion C001/R und ihre Subfraktionen C001/R1 und C001/R3. Weder die E2-Gruppe noch die zuvor gezeigte gute Wirksamkeit der Saponingruppe C001/S bei der Epidermis zeigen in der absoluten μm -Betrachtung signifikante Unterschiede auf.

Bei der prozentualen Analyse ändern sich jedoch die Verhältnisse. Nun ist nach E2-Applikation eine deutlich signifikante Zunahme der Dermisdicke zu erkennen. Diese Ergebnisse sind mit anderen Studien kongruent, die eine Dickezunahme nach Östrogenapplikation wie in der HRT bestätigen (Castelo-Branco et al. 1991, Sauerbronn et al. 1999). Diese Zunahme kann vor allem auf den erhöhten Kollagengehalt zurückgeführt werden, auch wenn sich positive Wirkungen auf das Elastin und Feuchtigkeitsgehalt der Dermis zu verzeichnen lassen (Piérard-Franchimont 1999, Sator 2007).

Die zuvor signifikanten Werte der Subfraktionen in der absoluten Betrachtung führen im prozentualen Anteil zu keiner signifikanten Schichtzunahme mehr und liegen auf dem Niveau der Ko,ovx Tiere.

Trotz der fehlenden Signifikanz der Saponingruppe C001/S weist diese Testsubstanz jedoch im Vergleich zu den anderen Testgruppen den höchsten prozentualen Anteil auf. Es gibt bereits eine Studie, in der eine Saponinapplikation den Kollagen IV-Gehalt in der junktionalen Zone zwischen Epidermis und Dermis nachweist. Gerade in der dermo-epidermalen Junktionszone ist Kollagen Typ IV der am stärksten exprimierte Kollagentyp und es ist vorteilhaft, dort eine feste Struktur von Kollagenfasern zu besitzen (Bonte et al. 2003).

Genauso wie bei der Epidermis können in diesen Messungen keine strukturellen Eigenschaften der Dermis beurteilt werden. Weder die Veränderungen des Kollagengehalts noch des Elastins oder der Glykosaminoglykane sind erkennbar und es wird ebenfalls wie bei der Epidermis bei einer Zunahme der Schichtdicke von einem positiven Effekt auf alle strukturellen Bestandteile ausgegangen. Um genaue Angaben über die Anzahl der Fasern und ihrer Anordnung machen zu können und zu erfassen, auf welche der Dermisparameter die Testsubstanzen am stärksten Einfluss genommen haben, müssen weitere Färbetechniken angewendet werden, um Kollagenfasern oder Elastin darzustellen und gleichzeitig eine Differenzierung zwischen Zunahme der Fasern und ihrem Abbau vorzunehmen.

4.5.4 Proliferation in Haarfollikeln der Dermis mittels PCNA

Auch hier wurde das immunhistochemische Färbeverfahren durch Antigenbindung an das Proliferating-Cell-Nuclear-Antigen in den Haarfollikeln der Dermis angewandt. Nach dem Färbeverfahren wurden die sich am aktivsten teilenden Zellen ausgezählt und ein prozentualer Anteil an den gesamten Zellen berechnet.

Weder die Testsubstanzen von CR C001 noch Östrogenapplikation haben signifikante Unterschiede zu der Kontrollgruppe Ko,ovx gezeigt, auch wenn die E2-Tiere den höchsten Proliferationswert erreichten. Bezüglich der östrogenbehandelten Tiere konnte die Erwartung teilweise gehalten werden, denn Östrogene spielen auch bei der Modulation des Haarwachstums eine entscheidende Rolle. E2 hat Auswirkungen auf den Androgenmetabolismus durch Einfluss auf die 5 α -Reduktase und auch andere Haarfollikelmediatoren werden durch Östrogen beeinflusst (Ohnemus et al. 2006). Vermutlich sind diese Signalwege weniger sensitiv auf Östrogen und bedürfen einer längeren Applikationsdauer, um signifikante Werte liefern zu können.

Einen vergleichbar hohen Wert der Proliferation in Haarfollikeln zeigt die Subfraktion der Restfraktion C001/R1. Der Hauptbestandteil dieser Subfraktion sind Kaffeesäure, Ferulasäure und Isoferulasäure. Studien zu diesen Bestandteilen und deren Wirkungen auf Haarfollikel sind nicht bekannt.

5. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Durch die postmenopausale Östrogendefizienz verliert die Haut an wichtigen strukturellen Bestandteilen und durch die hervorgerufene Atrophie nimmt das äußere Erscheinungsbild und der Gesundheitszustand der Haut deutlich ab. Auch der Stoffwechsel der Frau unterliegt negativen Veränderungen und kann durch metabolische Parameter gesundheitliche Schäden hervorrufen. Um das Wohlbefinden der Frau zu stärken, ihre Gesundheit und die Gesundheit der Haut zu erhalten, ohne die Risiken der herkömmlichen HRT, wurde in dieser Studie versucht, eine Testsubstanz zu finden, die ähnlich positive Effekte wie die HRT aufweist, jedoch ohne gesundheitliche Nebenwirkungen. Hierfür wurde der Extrakt von *Cimicifuga racemosa* BNO 1055/C001 verwendet, dabei in die potentesten Fraktionen und deren Subfraktionen aufgespalten, und vier Wochen den Testtieren oral appliziert.

Im Folgenden können über das Serum der Testtiere im Vergleich zum subkutanen Fettgewebe und subkutanem Muskelfett Aussagen über den metabolischen Zustand getroffen werden.

Zusätzlich wurden Analysen über die Schichtdicken der Epidermis und der Dermis für die Hautparameter erhoben. Ist ein positiver Effekt der Testsubstanzen auf die metabolische Situation in der Postmenopause erwünscht, so sind abnehmende Leptinkonzentrationen und ein reduziertes Fettgewebe von großer Bedeutung. Diese Parameter spielen indirekt eine Rolle bei kardiovaskulären Ereignissen und werden in dieser Studie bei der Beurteilung der Effektivität der Testsubstanzen ein Kriterium für eine Therapieempfehlung sein.

Werden die Testsubstanzen auf ihre Wirksamkeit für den serologischen Parameter verglichen, so fallen deutlich positive Veränderungen der Serumkonzentration bei der gesamten Saponinfraktion C001/S auf. Die gesamte Saponinfraktion C001/S, die sowohl die polaren als auch lipophilen Subfraktionen beinhaltet, weist eine signifikante Abnahme der Leptinkonzentration nach. Gleichzeitig ist unter der C001/S-Applikation das subkutane Fettdepot mit der E2-Applikation nahezu vergleichbar gering und weist bei der subkutanen Muskelschicht sogar bessere Werte auf. Daraus kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die gesamte Saponinfraktion C001/S einen stark positiven Effekt auf den Metabolismus hat.

In Anbetracht dieser guten Ergebnisse der C001/S-Applikation kann durch diese Wirkungen auf eine verringerte Rate an kardiovaskulären Erkrankungen geschlossen werden und es ist infolgedessen auf eine abnehmende Mortalitätsrate zu hoffen, wenn die Ergebnisse auf den Menschen übertragen werden.

Die gesamte Saponinfraktion ist auch diejenige, die auch in den Hautanalysen dominiert.

In der epidermalen Analyse löst die Saponinfraktion C001/S die stärkste absolute Schichtzunahme in μm aus, übertrifft sogar die Epidermisdicke der E2-behandelten Tiere. Bei dem umgerechneten prozentualen Anteil sind die Werte der E2-Gruppe zwar höher, aber die Saponingruppe hat vergleichbar gute Effekte aufzuweisen. Ernüchternd sind die Resultate der anderen Testgruppen, die größtenteils sogar signifikant abnehmende Epidermisdicken aufzeigen.

In der immunhistochemischen Analyse der Proliferation der Epidermis konnten nur die E2-Gruppe und die Subfraktion der Restfraktion C001/R3 signifikante hohe Werte erreichen. Da hier aber nur die Proliferationsrate und keine zusätzliche Apoptoserate gemessen wurden, ist dies kein guter Parameter, um Rückschlüsse auf die Wirkung der starken Proliferation zu ziehen. Zwar ist die Proliferationsrate bei der Subfraktion C001/R3 stark erhöht, aber es zeigen sich in der absoluten Schichtdicke nur geringfügig höhere Werte als in der unbehandelten Kontrollgruppe. Dies lässt vermuten, dass gleichzeitig eine sehr hohe Apoptoserate in der Epidermis stattfindet. Das Färbeverfahren mittels PCNA kann demnach nur richtungsweisend sein, wenn andere Parameter wie absolute Schichtdicke herangezogen werden, jedoch nicht als einzelner Faktor für Qualität der Zellschicht sprechen. Im Vergleich erreichte hier die gesamte Saponingruppe nur durchschnittliche Werte auf demselben Niveau der Kontrollgruppe.

In der absoluten Messung der Dermis zeigen weder die östrogenbehandelten Tiere noch die Saponingruppe signifikante Werte, dagegen viele andere Subfraktionen wie C001/S1, C001/S3, die Restfraktion C001/R und deren Subfraktionen C001/R1 und C001/R3. Werden diese Werte jedoch wieder auf den prozentualen Anteil an der gesamten Hautdicke bezogen, so sind die zuvor signifikanten Werte nun auf annähernd demselben Wert der Kontrollgruppe. Jetzt weist aber die E2-Gruppe signifikante Werte auf, und obwohl die C001/S-Applikation keine Signifikanz zeigt, hat sie von allen Testsubstanzen den größten Anteil an der Dermisdicke.

Bei der Bewertung der Proliferationsrate in den dermalen Haarfollikeln haben sich keinerlei hervorzuhebenden Veränderungen ergeben.

Auch wenn die dermale Proliferation zur keiner signifikanten Erhöhung unter der C001/S-Applikation geführt hat, so sprechen trotzdem die positiven Tendenzen und insbesondere eine stark positive Wirkung auf die Epidermis für eine gute Effektivität der C001/S-Fraktion.

Ungeachtet der Tatsache, dass in der vorliegenden Studie versucht wurde, auf zwei Aspekte der alternativen Therapie einzugehen, nämlich auf die Wirkung auf das metabolische Syndrom und zusätzlich auf die Hautalterung, ist es gelungen, einheitliche Ergebnisse zu gewinnen.

Auf beide Bereiche hat hier die gesamte Saponingruppe C001/S einen stark positiven Effekt. Die verbesserte metabolische Situation wird durch ein reduziertes Fettgewebe und durch abnehmende Serumparameter bewirkt. Bei einer Therapie mit der gesamten Saponingruppe C001/S würde die postmenopausale Frau weniger an Gewicht zunehmen, ihre Leptinwerte wären reduziert, was das kardiovaskuläre Risiko senkt und dem metabolischen Syndrom entgegenwirkt. Gleichzeitig weist die Hautanalyse hervorragende Schichtdicken der Epidermis, zunehmende Werte in der Dermis und erneut signifikante Zunahme in der Muskulatur auf, was zur Reduktion der Hautatrophie, bedingt durch das Altern, führt. Vergleicht man die Saponingruppe mit den Ergebnissen der E2-behandelten Tiere, so fallen diese Ergebnisse für die Hautalterung sogar deutlich positiver aus.

Dieses herausragende Ergebnis der Studie hat nicht nur das Ziel erreicht, eine Alternative für die HRT, bezogen auf die Haut mit vergleichbaren östrogenen Werten zu finden, sondern sogar übertroffen. Alle diese Effekte führen zum Wohlbefinden durch das äußere Erscheinungsbild, sie dienen der Gesundheit der Frau und vor allen zur guten Compliance der Therapie durch keine zusätzliche Gewichtszunahme nach der Menopause.

Die gesamte Saponingruppe C001/S besteht aus polaren und lipophilen Saponinen und den Hauptbestandteilen Actein, Deoxyactein und Isoferulasäure. Bislang sind keine vergleichbaren Studien mit diesen Inhaltsstoffe zu finden und es lassen sich somit nur schwer Vergleiche zu der vorliegenden Studie erstellen.

Hervorzuheben ist ebenfalls, dass gerade die Kombination aus allen diesen Bestandteilen den größten Effekt erzielt und keiner der Inhaltsstoffe für sich vergleichbare Werte zeigt.

Im Vergleich zu den Saponinen stellt die Restfraktion eine sehr schwache Potenz auf die strukturellen Eigenschaften der Haut und den metabolischen Parameter dar.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das Ziel dieser Studie, eine Alternative für die risikobehaftete HRT zu finden, bezogen auf die Haut, erstaunlich gute Ergebnisse geliefert hat und eine hormonelle Therapie sogar übertrifft. Durch diese Therapie wird der Gewichtszunahme in der Postmenopause entgegengewirkt, die kardiale Gesundheit gestärkt und zusätzlich die Hautalterung verlangsamt. Eine Therapieempfehlung mit der gesamten

C001/S-Fraktion ist daher mehr als geboten. Dies kann in Zukunft ein sehr wichtiger kommerzieller Faktor für die Forschung und die Pharmaindustrie werden.

6. Methodischer Anhang

6.1 Sojafreies Pellet-Futter ssniff® R-Z Phytoestrogenarm

Energie	[MJ/kg]	Aminosäuren	[%]	Vitamine	per kg
Bruttoenergie (GE)	16,8	Lysin	1,22	Vitamin A	15.000 IE
Umsetzbare Energie (ME)	13,3	Methionin	0,44	Vitamin D ₃	1.000 IE
		Met+Cys	0,83	Vitamin E	115 mg
Rohnährstoffe	[%]	Threonin	0,97	Vitamin K (als Menadion)	5mg
Trockensubstanz	88,2	Tryptophan	0,28	Thiamin (B ₁)	18mg
Rohprotein (N x 6,25)	21,7	Arginin	1,13	Riboflavin (B ₂)	22 mg
Rohfett	4,3	Histidin	0,51	Pyridoxin (B ₆)	20 mg
Rohfaser	4,2	Valin	1,25	Cobalamin (B ₁₂)	100 mg
N freie Extraktstoffe	52,2	Isoleucin	1,03	Nicotinsäure	120 mg
Stärke	34,0	Leucin	1,95	Panthothensäure	40 mg
Zucker	3,0	Phenylalanin	1,21	Folsäure	7 mg
		Phe+Tyr	2,20	Boitin	460 µg
Fettsäuren	[%]	Glycin	1,05	Cholin-Cl	2.380 mg
C 12:0	---	Glutaminsäure	3,96	Inositol	100 mg
C 14:0	0,01	Asparaginsäure	2,18		
C 16:0	0,56	Prolin	1,53	Spurenelemente	per kg
C 16:1	0,01	Alanin	1,26	Eisen	169 mg
C 18:0	0,08	Serin	1,17	Mangan	78 mg
C 18:1	0,82			Zink	101 mg
C 18:2	2,26	Mineralstoffe	[%]	Kupfer	14 mg
C 18:3	0,22	Calcium	1,00	Jod	2,2 mg
C 20:0	0,01	Phosphor	0,70	Selen	0,4 mg
C 20:1	0,02	Natrium	0,19	Cobalt	2,2 mg
C 20:5	---	Magnesium	0,20		
C 22:6	---	Kalium	0,67		

6.2 Schema der Organentwässerung

Substanz	Einwirkzeit
50%iger Alkohol	1 Std
75%iger Alkohol	1 Std 20 min
75%iger Alkohol	1 Std 20 min
96%iger Alkohol	1 Std 20 min
96%iger Alkohol	1 Std 20 min
100%iger Alkohol	1 Std 20 min
100%iger Alkohol	1 Std 20 min

100%iger Alkohol	1 Std 20 min
Xylol	1 Std 20 min
Xylol	1 Std 20 min
Paraffin	1 Std
Paraffin	1 Std

6.3 Ansetzen der Eosinlösung

1. Ansetzen der Stocklösung:
1 g Eosin (Cerstin/Eosin, 1.15935.0025, MERCK)
50 ml 70%igem Ethanol
50 ml Aqua dest.
2. Es entsteht eine Arbeitslösung aus Stocklösung, indem mit 200 ml Aqua dest. aufgefüllt wird.
3. Die fertige Arbeitslösung wird in Einbettchalen überführt

6.4 Detailliertes Schema der Hämatoxylin/Eosin-Färbung

Substanz	Einwirkdauer
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 100%	2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 96%	2 min
Ethanol 75%	2 min
Aqua dest	2 min
Hämatoxylin	40 sec
Leitungswasser	10 min
Eosin	50 sec
Aqua bidest	5 – 10 sec
Ethanol 75%	30 sec

Ethanol 96%	30 sec
Ethanol 96%	30 sec
Ethanol 100%	1 min
Ethanol 100%	1 min
Ethanol 100%	2 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min
Xylol	5 min

6.5 PCNA-Färbeprotokoll

1. Xylol 3 x 5 Min.
2. Wässern in absteigender Alkoholreihe: 100 x 2, 96 x 2, 75 x 1, jeweils 2 min
3. Destilliertes Wasser 5 min
4. Mit 0,01 M Citratpuffer, pH 6 bedecken
5. In der Mikrowelle bei 750 Watt 5 min kochen
6. Verloren gegangenes Volumen auffüllen und 1 min bei Raumtemperatur stehen lassen
7. Schritt 5 wiederholen
8. Verloren gegangenes Volumen auffüllen und Träger 20 min bei Raumtemperatur abkühlen lassen
9. Objektträger für 3 min in destilliertes Wasser geben
10. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: 75 x 1, 96 x 2, 100 x 2, jeweils 2 min
11. Abblocken der Peroxidaseaktivität: 3% H₂O₂ in Methanol für 30 min
12. Wässern in absteigender Alkoholreihe: 100 x 2, 96 x 2, 75 x 1, jeweils 2 min
13. Destilliertes Wasser 3 min
14. PBS 2 x 5 min
15. Blocken der unspezifischen Bindung: 1% Ziegenserum in PBS (+1% Rinderserum)
500 µl pro Objektträger für 30 min
16. Waschen mit PBS
17. 1. Antikörper in Arebitsverdünnung 1:800 PCNA zugeben für 30 min, 200 µl pro
Objektträger, Übernacht-Inkubation
18. Waschen mit PBS
19. 2. Antikörper (Rabbit/Mouse) für 30 min, unverdünnt
20. Waschen mit PBS
21. DAB-Reagenz für 10-15 min
22. Waschen mit destilliertem Wasser
23. Hämatoxylin für 17-20 sec, anschließend in Leitungswasser für 10 min
24. Destilliertes Wasser für 2 min
25. Entwässern in aufsteigender Alkoholreihe: 75 x 1, 96 x 2, 100 x 2, jeweils 2 min
26. Xylol 3 x 5 min
27. Objektträger eindecken

6.6 Zusammenfassende Tabelle Histomorphometrie und PCNA

Die folgenden Tabellen zeigen einen zusammenfassenden Überblick über die Effekte der Testsubstanzen nach 4-wöchiger Applikation bezogen auf zunächst den absoluten Unterschied der Schichtdicke in μm und sogleich ihre prozentuale Veränderung an der Gesamtdicke. Dabei wurde die Kontrollgruppe auf 100% festgelegt und dient als Bezugsgröße für die Mittelwerte der folgenden Testgruppen.

	E2	C001/S	C001/S1	C001/S2	C001/S3
Epidermis, absolute Dicke in μm	- 1,17 *	+ 1,77 *	- 0,71	+ 0,90	+ 0,43
Epidermis, %-Anteil an Gesamtdicke	+ 0,20 *	+ 0,12 *	- 0,17 *	- 0,05	- 0,18 *
Dermis, absolute Dicke in μm	- 18,35	+ 27,94	+ 112,76 *	+ 33,69	+ 89,61 *
Dermis, %-Anteil an Gesamtdicke	+ 8,71 *	+ 2,14	+ 1,64	- 1,73	- 2,41
Subkutanes Fettgewebe, absolute Dicke in μm	- 305,28 *	- 130,19 *	+ 210,02 *	+ 164,15 *	+ 158,47 *
Subkutanes Fettgewebe, %-Anteil an Gesamtdicke	- 13,56 *	- 8,23 *	+ 5,67 *	+ 4,67	- 0,99
Subkutane Muskelschicht, absolute Dicke in μm	- 69,66 *	+ 85,63 *	- 42,50	+ 16,36	+ 214,89 *
Subkutane Muskelschicht, %-Anteil an Gesamtdicke	+ 4,65 *	+ 5,97 *	- 7,14 *	- 2,88 *	+ 3,58
Anteil PCNA-pos. Zellen in Epidermis	+ 20,93 *	- 2,85	- 4,18	- 6,88	+ 12,71
Anteil PCNA-pos. Zellen in Haarfollikeln	+ 6,63	- 1,2	+ 2,84	- 0,41	- 2,12

Abb. 36 Die Tabelle zeigt einen zusammenfassenden Überblick über die Effekte der Testsubstanzen auf die E2-Gruppe, die Saponingruppe C001/S und ihrer Subfraktionen C001/S1-3. Zunächst ist die absolute Zu-/Abnahme in μm angegeben, darunter im direkten Vergleich die prozentuale Veränderung der jeweiligen Schicht. Als Bezugsgröße wird der Wert der Kontrollgruppe (Ko,ovx) verwendet.

Mit * gekennzeichnete Werte stellen signifikante Veränderungen dar. Rot hinterlegte Felder spiegeln die entgegengesetzten Vorzeichen zweier signifikanter Werte einer Schicht wider.

	E2	C001/R	C001/R1	C001/R2	C001/R3
Epidermis, absolute Dicke in μm	- 1,17 *	+ 0,63	- 1,27 *	- 1,41	+ 0,67
Epidermis, %-Anteil an Gesamtdicke	+ 0,20 *	- 0,03	- 0,17 *	- 0,30 *	- 0,20 *
Dermis, absolute Dicke in μm	- 18,35	+ 59,26 *	+ 59,57 *	+ 46,04	+ 179,59 *
Dermis, %-Anteil an Gesamtdicke	+ 8,71 *	+ 1,24	+ 0,02	- 5,63 *	+ 0,41
Subkutanes Fettgewebe, absolute Dicke in μm	- 305,28 *	+ 188,38 *	+ 165,98 *	+ 380,29 *	+ 490,70 *
Subkutanes Fettgewebe, %-Anteil an Gesamtdicke	- 13,56 *	+ 8,33 *	+ 5,17 *	+ 8,15 *	+ 12,80 *
Subkutane Muskelschicht, absolute Dicke in μm	- 69,66 *	- 117,77 *	- 24,92	+ 124,00 *	- 95,26 *
Subkutane Muskelschicht, %-Anteil an Gesamtdicke	+ 4,65 *	- 9,54 *	- 5,02 *	- 2,21	- 13,01 *
Anteil PCNA-pos. Zellen in Epidermis	+ 20,93 *	+ 3,35	+ 7,04	+ 8,14	+ 18,49 *
Anteil PCNA-pos. Zellen in Haarfollikeln	+ 6,63	+ 1,39	+ 6,73	+ 0,51	+ 3,11

Abb. 37 Die Tabelle zeigt einen zusammenfassenden Überblick über die Effekte der Testsubstanzen auf die E2-Gruppe, der gesamten Restfraktion C001/R und ihrer Subfraktionen C001/R1-3. Zunächst ist die absolute Zu-/Abnahme in μm angegeben, darunter im direkten Vergleich die prozentuale Veränderung der jeweiligen Schicht. Als Bezugsgröße wird der Wert der Kontrollgruppe (Ko,ovx) verwendet. Mit * gekennzeichnete Werte, stellen signifikante Veränderungen dar. Rot hinterlegte Felder spiegeln die entgegen gesetzten Vorzeichen zweier signifikanter Werte einer Schicht wider.

6.7 Kosmetika mit *Cimicifuga racemosa* als Inhaltsstoff

Alverde Naturkosmetik Clear Peelingmaske Heilerde

Alverde Naturkosmetik Clear Gesichtstonic Heilerde

Alverde Naturkosmetik Clear Gesichtsfliuid Heilerde

Channoine Age Preventing 24h Formula

Dr. Schwarzenbach Cosmetics Ag Cellulite & Body Slimming

Heliotrop Balance Reinigungsgel Für Mischhaut

Hormocenta Spezialcreme

Lailique 66 Days Herb Mineral Spray

Logona Naturkosmetik Tagescreme Zaubernuss

Logona Naturkosmetik Clear Skin Bio Minze

Logona Naturkosmetik Reinigungsschaum Minze & Zaubernuss

Luvos Heilerde Gesichtswasser

Manu Faktum Apotheke Kaffee- Shampoo

Murad Clarifying Cleanser

Naturland Herbal Schweden Bitter Toothpaste

Neobio Magnolia Balance Cream

Neobio Natural Cosmetics Balance Creme

Sanctum Recovery Serum

Sanctum Intensive Repair Cream

Vilate Vilate Essentielle Tagespflege

7. Literaturverzeichnis

Ainslie DA, Morris MJ, Wittert G, Turnbull H, Proietto J, Thorburn AW (2001): Estrogen deficiency causes central leptin insensitivity and increased hypothalamic neuropeptide Y. *Int J Obesity* 25, 1680–1688

Allred CD, Allred KF, Ju YH, Clausen LM, Doerge DR, Schantz SL, Korol DL, Wallig MA, Helferich WG (2004): Dietary Genistein Results in Larger MNU-Induced, Estrogen-Dependent Mammary Tumors Following Ovariectomy of Sprague–Dawley Rats. *Carcinogenesis* 25, 211–218

Arora S, Veves A, Caballero AE, Smakowski P, LoGerfo FW (1998): Estrogen improves endothelial function. *J Vasc Surg* 27, 1141–1147

Ashcroft GS, Dodsworth J, Boxtel EV, Tarnuzzer RW, Horan MA, Schultz GS, Ferguson MWJ (1997): Estrogen accelerates cutaneous wound healing associated with an increase in TGF- β 1 levels. *Nat Med* 3, 1209–1215

Ashcroft GS, Greenwell-Wild T, Horan MA, Wahl SM, Ferguson MWJ (1999): Topical Estrogen Accelerates Cutaneous Wound Healing in Aged Humans Associated with an Altered Inflammatory Response. *Am J Pathol* 155, 1137

Asia Pacific Cohort Studies Collaboration (2004): Serum triglycerides as a risk factor for cardiovascular diseases in the Asia-Pacific region. *Circulation* 110, 2678–2686

Bayerl C, Keil D (2002): Isoflavonoide in der Behandlung der Hautalterung postmenopausaler Frauen. *AktDermatol* 28, 14–18

Bhattacharyya TK, Thomas JR (2004): Histomorphologic changes in aging skin: observations in the CBA mouse model. *Arch Facial Plast Surg* 6, 21-5

Black MM, Shuster S, Bottoms E (1970): Osteoporosis, Skin Collagen, and Androgen. *Brit M J* 4, 773–774

Bjorntorp P (1990): “Portal” adipose tissue as a generator of risk factors for cardiovascular disease and diabetes. *Arteriosclerosis* 10, 493-6

Blüher M, Stumvoll M (2006): Metabolic syndrome – myths, mechanisms, management. *Dtsch Med Wochenschr* 131, 1167–1172

Blumel JE, Castelo-Branco C, Binfa L, Gramegna G, Tacla X, Aracena B, Cumsille MA, Sanjuan A (2000): Quality of life after the menopause: a population study. *Maturitas* 34, 17–23

Bonavera JJ, Dube MG, Kalra PS, Kalra SP (1994): Anorectic effects of estrogen may be mediated by decreased neuropeptide-Y release in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* 134, 2367–2370

- Bonte F, Meybeck A, Massiot G (1998): Use of medicago saponins for the preparation of cosmetic or pharmaceutical compositions, especially dermatological compositions, promoting renewal of the epidermis, stimulating hair regrowth or delaying hair loss. Patent US5723149
- Bonte F, Dumas M, Perrier P (2003): Saponin or sapogenol compositions for increasing collagen IV synthesis. Patent US6641848
- Boström K, Boren J, Wettsten M, Sjöberg A, Bondjers G, Wiklund O, Carlsson P, Olofsson SO (1988): Studies on the assembly of apo-B-100-containing lipoproteins In Hep G2 cells. *J Biol Chem* 263, 4434–4442
- Brincat M, Moniz CJ, Studd JWW, Darby A, Magos A, Emburey G, Versi E (1985): Long-term effects of the menopause and sex hormones on skin thickness. *Int J of Obstetric Gynaecol* 92, 256–259
- Brincat M, Muscat Baron Y, Galea R (2005): Estrogens and the skin. *Climacteric* 8, 110–123
- Carlson L, Böttiger LE (1972): Ischaemic heart-disease in relation to fasting values of plasma triglycerides and cholesterol. *Lancet* 299, 865–868
- Castelo-Branco C, Duran M, González-Merlo J (1992): Skin collagen changes related to age and hormone replacement therapy. *Maturitas* 15, 113–119
- Castelo-Branco C, Pons F, Gratacós E, Fortuny A, Vanrell JA, González-Merlo J (1994): Relationship between skin collagen and bone changes during aging. *Maturitas* 18, 199–206
- Circosta C, Pasquale RD, Palumbo DR, Samperi S, Occhiuto F (2006): Effects of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*) on skin changes induced by ovariectomy in rats. *Phytother Res* 20, 1096–1099
- Draeos ZD (2005): Topical and oral estrogens revisited for antiaging purposes. *Fertil Steril* 84, 291–292
- Eckel R H, Grundy S M, Zimmet P Z (2005): The metabolic syndrome. *Lancet* 365, 1415–1428
- Foster S (1996): *Herbs for your health*. Loveland, CO: Interweave Press 37–38
- Foster S (1999): Black cohosh: *Cimicifuga racemosa* a literature review. *Herbal Gram* 45, 35–50
- Fritsch P: *Dermatologie Venerologie*. 2. Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2004, 4–18
- Gower BA, Muñoz J, Desmond R, Hilario-Hailey T, Jiao X (2006): Changes in intra-abdominal fat in early postmenopausal women: effects of hormone use. *Obesity* 14, 1046–1055
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER (1999): The menopause. *Lancet* 353, 571–580

Haenggi W, Linder HR, Birkhaeuser MH, Schneider H (1995): Microscopic findings of the nail-fold capillaries-dependence on menopausal status and hormone replacement therapy. *Maturitas* 22, 37–46

Haenggi W, Lippuner K, Riesen W, Jaeger P, Birkhauser MH (1997): Long-term influence of different hormone replacement regimens on serum lipids and lipoprotein(a) – a randomised study. *Br J Obstet Gynaecol* 104, 708–717

Halaas J, Gajiwala K, Maffei M, Cohen S, Chait B, Rabinowitz D, Lallone R, Burley S, Friedman J (1995): Weight-reducing effects of the plasma protein encoded by the obese gene. *Science* 269, 543–546

Hall G, Phillips T (2005): Estrogen and skin: The effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol* 53, 555–568

Haryell J, Hussona-Saeed I, Maibach I (1992): Changes in transepidermal water loss and cutaneous blood flow during the menstrual cycle. *Contact Dermatitis* 27, 294–301

Henry F, Piérard-Franchimont C, Cauwenbergh G, und Piérard GE (1997): Age-related changes in facial skin contours and rheology. *Am J Geriatrics* 45, 220

Hokanson JE, Austin MA (1996): Plasma Triglyceride Level is a Risk Factor for Cardiovascular Disease Independent of High-Density Lipoprotein Cholesterol Level: A Metaanalysis of Population-Based Prospective Studies. *Eur J Cardio Prev R* 3, 213–219

Investigators for Women's Health Initiative (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women. *JAmMed* 288, 321–333

Kafantari H, Kounadi E, Fatouros M, Milonakis M, Tzaphlidou M (2000): Structural alterations in rat skin and bone collagen fibrils induced by ovariectomy. *Bone* 26, 349–353

Kanda N, Watanabe S (2004): 17beta-Estradiol Stimulates the Growth of Human Keratinocytes by Inducing Cyclin D2 Expression. *J Invest Dermatol* 123, 319–328

Kenagy R, Weinstein I, Heimberg M (1981): The Effects of 17β-Estradiol and Progesterone on the Metabolism of Free Fatty Acid by Perfused Livers from Normal Female and Ovariectomized Rats. *Endocrinology* 108, 1613–1621

Kim JH, Hahm DH, Yang DC, Kim JH, Lee HJ, Shim I (2005): Effect of Crude Saponin of Korean Red Ginseng on High-Fat Diet-Induced Obesity in the Rat. *J Pharmacol Sci* 97, 124–131

Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Pelletier G, El-Alfy M (2000): Intracrinology and The Skin. *Hor Res* 54, 218–229

Levin ER (2002): Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 67, 471–475

Liske E (1998): Therapeutic efficacy and safety of treatment racemosa for gynecologic disorders. *Adv Ther* 15, 45–53

Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC: Biochemie und Pathobiochemie. 8. Auflage; Springer Medizin Verlag, Heidelberg 2007, S. 882

Madison KC (2003): Barrier Function of the Skin: “La Raison d’Etre” of the Epidermis. *J Invest Dermatol* 121, 231–241

Malik S, Wong ND, Franklin SS, Kamath TV, L’Italien GJ, Pio JR, Williams GR (2004): Impact of the metabolic syndrome on mortality from coronary heart disease, cardiovascular disease, and all causes in United States adults. *Circulation* 110, 1245–1250

Nappi RE, Malavasi B, Brundu B, Facchinetti F (2005): Efficacy of Cimicifuga racemose on climacteric complaints: A randomized study versus low-dose transdermal estradio. *Gynecol Endocrinol* 20, 30–35

Neugarten BL, Kraines RJ (1965): “Menopausal Symptoms” in Women of Various Ages. *Psychosom Med* 27, 266–273

Ohnemus U, Uenalan M, Inzunza J, Gustafsson J-Å, Paus R (2006): The Hair Follicle as an Estrogen Target and Source. *Endocr Rev* 27, 677–706

Piérard GE, Letawe C, Dowlati A, und Piérard-Franchimont C (1995): Effect of hormone replacement therapy for menopause on the mechanical properties of skin. *Am J Geriatr Soc* 43, 662

Piérard-Franchimont C, Letawe C, Goffin V, Piérard GE (1995): Skin water-holding capacity and transdermal estrogen therapy for menopause: a pilot study. *Maturitas* 22, 151–154

Piérard-Franchimont C, Cornil F, Dehavay J, Deleixhe-Mauhin F, Letot B, Piérard GE (1999): Climacteric skin ageing of the face - a prospective longitudinal comparative trial on the effect of oral hormone replacement therapy. *Maturitas* 32, 87–93

Poehlman ET, Tchernof A (1998): Traversing the menopause: changes in energy expenditure and body composition. *Coronary Artery Dis* 9, 799–803

Punnonen R, Vaajalahti P, Teisala K (1987): Local oestriol treatment improves the structure of elastic fibers in the skin of postmenopausal women. *Ann Chir Gynaecol Suppl* 202, 39–41

Rauramo L, Punnonen R (1974): Wirkungen von Kastration und Östrogentherapie auf die Haut der Frau. *Ther Umsch* 31, 173–175

Reznicek G, Jurenitsch J (1991): Der therapeutische Wert von Triterpensaponinen - Anspruch und Wirklichkeit. *Pharm. in unserer Zeit* 20, 278–281

Sacks FM, Alaupovic P, Moye LA, Cole TG, Sussex B, Stampfer MJ, Pfeffer MA, Braunwald E (2000): VLDL, apolipoproteins B, CIII, and E, and risk of recurrent coronary events in the cholesterol and recurrent events (CARE) trial. *Circulation* 102, 1886–1892

Sator P-G, Sator MO, Schmidt JB, Nahavandi H, Radakovic S, Huber JC, Hönigsmann H (2007): A prospective, randomized, double-blind, placebo-controlled study on the influence of a hormone replacement therapy on skin aging in postmenopausal women. *Climacteric* 10, 320–334

Sauerbronn AV, Fonseca A, Bagnoli V, Saldiva P, Pinotti J (2000): The effects of systemic hormonal replacement therapy on the skin of postmenopausal women. *Int J Gynecol Obstet* 68, 35–41

Schmidt JB, Binder M, Demshik G, Bieglmayer C, Reiner A (1996): Treatment of Skin Aging with Topical Estrogens. *Int J Dermatol* 35, 669–674

Seidlová-Wuttke D, Eder N, Stahnke V, Kammann M, Stecher G, Haunschild J, Wessels JT, Wuttke W (2012): *Cimicifuga racemosa* and its triterpene-saponins prevent the Metabolic Syndrome and deterioration of cartilage in the knee joint of ovariectomized rats by similar mechanisms. *Phytomedicine* 19, 846–853

Seidlová-Wuttke D, Stecher G, Kammann M, Haunschild J, Eder N, Stahnke V, Wessels J, Wuttke W (2012): Osteoprotective effects of *Cimicifuga racemosa* and its triterpene-saponins are responsible for reduction of bone marrow fat. *Phytomedicine* 2012 19, 855–860

Seidlová-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* 49, 351–362

Snell RS, Turner R (1966): Skin Pigmentation in Relation to the Menstrual Cycle1. *J Invest Dermatol* 47, 147–155

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2012:

https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Bevoelkerung/Sterbefaelle/Tabellen/SterbetafelDeutschland.xls?__blob=publicationFile, aufgerufen September 2012

Statistisches Bundesamt, Wiesbaden, 2012:

<https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/EckdatenTU.html>, aufgerufen September 2012

Stute P (2011): Veränderungen in der Menopause. *Gynacol endokrinol* 9, 144–150

Taaffe DR, Newman AB, Haggerty CL, Colbert LH, De Rekeneire N, Visser M, Goodpaster BH, Nevitt MC, Tylavsky FA, Harris TB (2005): Estrogen replacement, muscle composition, and physical function: The Health ABC Study. *Med Sci Sports Exerc* 37, 1741-7

Thomas JR (2005): Effects of Age and Diet on Rat Skin Histology. *Laryngoscope* 115, 405–411

Thornton MJ (2002): The biological actions of estrogens on skin. *Exp Dermatol* 11, 487–502

Tsukahara K, Moriwaki S, Ohuchi A, Fujimura T, Takema Y (2001): Ovariectomy Accelerates Photoaging of Rat Skin. *Photochem Photobiol* 73, 525–531

Van Weerden WM, Bierings HG, Van Steenbrugge GJ, De Jong FH, Schröder FH (1992): Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50, 857–861

Verdier-Sevrain S (2004): Estradiol induces proliferation of keratinocytes via receptor-mediated mechanisms. *Faseb J* 18, 1252–1254

Verdier-Sévrain S (2007): Effect of estrogens on skin aging and the potential role of selective estrogen receptor modulators. *Climacteric* 10, 289–297

Verdier-Sévrain S, Bonté F, Gilchrist B (2006): Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol* 15, 83–94

Wegorzewska IN, Walters K, Weiser MJ, Cruthirds DF, Ewell E, Larco DO, Handa RJ, Wu TJ (2008): Postovariectomy weight gain in female rats is reversed by estrogen receptor α agonist, propylpyrazone triol. *Am J Obstet Gynecol* 199, 67e1–67e5

Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002): Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women. *Am J Med Assoc* 288, 321–333

Wuttke W, Seidlová-Wuttke D, Gorkow C (2003): The Cimicifuga preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 44, 67–77

Yus ES, Simón P (2000): Striated muscle: a normal component of the dermis and subcutis in many areas of the face. *Am J Dermatopathol* 22, 503-9.

Zouboulis CC (2000): Human Skin: An Independent Peripheral Endocrine Organ. *Horm Res* 54, 230–242