

Der Medizinischen Fakultät
der Georg-August-Universität Göttingen
eingereicht von Priv.-Doz. Dr. med. Seidlová-Wuttke

Der Effekt von *Cimicifuga racemosa* BNO 1055-Subfraktionen auf
Leberfettgehalt, Kolonepithel und ausgewählte Blutlipidparameter

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Robert Rehmann

aus

Verl

Göttingen 2013

Die Arbeit ist in der Arbeitsgruppe Endokrinologie im Zeitraum von Oktober 2011 bis Dezember 2013 entstanden.

Dekan:	Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer
1. Berichterstatterin:	Priv. Doz. Dr. Dana Seidlová-Wuttke (Betreuerin)
2. Berichterstatterin:	Prof. Dr. Sabine Mihm (Korreferentin)
Promotor (Vertretung):	Prof. Dr. Rainer Mausberg
Tag der mündlichen Prüfung:	30.04.2014

<u>Inhaltsverzeichnis</u>	<u>Seite</u>
Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	6
<u>1. Einleitung</u>	8
1.1. Das Klimakterium der Frau	9
1.2. Tiermodell der Menopause	10
1.3. <i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055 und Subfraktionen	10
1.3.1 Schema der CR BNO 1055-Subfraktionen	11
1.3.2. CR BNO 1055 und ihre Wirkungen auf die Leber	12
1.3.3. Handelspräparat Klimadynon / Klimadynon UNO	14
1.4. Die Leber	14
1.4.1. Leberpathologie	14
1.4.1.1. Tiermodell Ratte	14
1.4.1.2. Makro- und mikrovesikuläre Steatose	15
1.5. Kolonkarzinom und HET	17
1.5.1. CR BNO 1055 und ihre Wirkung auf das Kolon	17
1.5.2. Wirkung von Östrogen auf das Kolon	17
1.5.3 Östrogenrezeptor Alpha (ERα) und Beta (ERβ)	18
1.5.4. Histologie und Physiologie des Kolon	19
1.6. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigene)	20
1.7. Serumlipidparameter in der Menopause – Mensch- und Tiermodell	21
1.7.1. CR BNO 1055 und ihre Wirkung auf Blutlipidparameter	22
1.8. Serumlipide	22
1.8.1. Cholesterol	22
1.8.2. LDL (Low Density Lipoprotein)	22
1.8.3. HDL (High Density Lipoprotein)	23
1.8.4. Triglyceride	23
1.8.5. Leptin	23

1.9. Zielsetzung	24
<u>2. Material und Methoden</u>	<u>26</u>
2.1. Tierversuche	26
2.1.1. Ovariectomie	26
2.1.2. Obduktion, Blutgewinnung	27
2.2. Futter und Testsubstanzen	27
2.3. Versuchsablauf: Zeitstrahl	29
2.4 Analyse	30
2.4.1 Herstellung der Schnittpräparate	30
2.4.1.1. Leberschnittpräparate	30
2.4.1.2. Kolonschnittpräparate	30
2.5. Färbung	31
2.5.1 Ölrot-Färbung der Leberschnitte	31
2.5.2. Immunzytologische Färbung PCNA	31
2.6. Auswertung der histologischen Präparate	31
2.6.1. Auswertung der Leberschnittpräparate	31
2.6.2 Auswertung der Kolonschnittpräparate	32
2.7. Serumparameter	34
2.8. Graphen und statistische Analyse	34
<u>3. Ergebnisse</u>	<u>35</u>
3.1. Körpergewicht	35
3.2. Futteraufnahme	36
3.3. Ergebnisse der Messungen über den Leberfettgehalt	37
3.3.1. Verhältnis von Leberfettgehalt zu Parenchymfläche	37
3.3.2. Makroskopische Beurteilung der Fettansammlungen in den Leberschnittpräparaten	38
3.4. Zellproliferation im Kolonepithel	39
3.4.1. Zellproliferation als Anteil der PCNA-positiven Zellen an 500 Zellen	39

3.5. Blutlipidparameter	40
3.5.1. Serumcholesterol	40
3.5.2. LDL (Low Density Lipoprotein)	41
3.5.3 HDL (High Density Lipoprotein)	42
3.3.4. Triglyceride	43
3.5.5 Leptin	44
3.6. Korrelationsanalysen	45
3.6.1. Korrelationsanalyse von Leptin und Körpergewicht	45
3.6.2. Korrelationsanalyse PCNA-positive Zellen zu Serumleptin	46
3.6.3. Weitere Korrelationsanalysen	47
<u>4. Diskussion</u>	<u>48</u>
4.1. Leberfettanteile	48
4.2. Proliferationsaktivität in der Kolonschleimhaut	50
4.3. Körpergewicht und Futteraufnahme	52
4.4. Einfluss von CR 1055-Subfraktionen und E2 auf Serumlipidparameter	53
4.4.1. Serumcholesterol	53
4.4.2. LDL	54
4.4.3 HDL	54
4.4.4. Triglyceride	55
4.4.5. Leptin	56
4.5. Korrelationsanalysen	57
4.5.1. Korrelation von PCNA-positiven Zellen zu Serumleptin	57
4.5.2. Weitere Korrelationsanalysen	57
<u>5. Zusammenfassung</u>	<u>58</u>
<u>6. Methodischer Anhang</u>	<u>59</u>
<u>7. Literaturverzeichnis</u>	<u>66</u>
<u>8. Abbildungsverzeichnis</u>	<u>75</u>
<u>9. Tabellenverzeichnis</u>	<u>76</u>

Abkürzungsverzeichnis

5-HT	5-Hydroxytryptamin
%	Prozent
ANOVA	analysis of variance
AST	Aspartat-Aminotransferase
ALT	Alanin-Aminotransferase
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR	<i>Cimicifuga Racemosa</i>
DAB	Diaminobenzidin
DNS	Desoxyribonucleinsäure
E2	Estradiolbenzoat
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER β	Östrogenrezeptor beta
Gamma-GT	Gamma-Glutamyl-Transferase
HDL	High Density Lipoprotein
HET	Hormonersatztherapie
HILI	Herb induced liver injury
KG	Körpergewicht
KRK	kolorektales Karzinom
LDL	Low Density Lipoprotein
MAO	Monoaminoxidase
MMA	Methylmethacrylat
NAFLD	Non-Alcoholic-Fat-Liver-Disease
NASH	Non-Alcoholic-Steatohepatitis
ovx	ovarektomiert
Ovx	Ovarektomie
PBS	phosphate buffered saline

PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigene
PMMA	Polymethylmethacrylat
μm^2	Quadratmikrometer
ROS	Reactive Oxygen Species = reaktive Sauerstoffmetabolite
SD	Sprague-Dawley
SEM	Standardfehler
SSRI	selektiver Serotoninwiederaufnahmehemmer
TG	Triglyceride
UICC	Union internationale contre le cancer
VLDL	Very Low Density Lipoprotein
WHI	Women's Health Initiative
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

In den vergangenen Jahren hat die Nachfrage nach Alternativen für die Hormonersatztherapie (HET) zur Linderung der menopausalen Beschwerden zugenommen, da sie aufgrund eines erhöhten Risikos vor allem für kardiovaskuläre Erkrankungen und Mammakarzinom immer mehr in die Kritik geraten ist. Zwei große epidemiologische Studien, die Million-Women-Study und die Women`s Health Initiative (WHI), konnten diesen Effekt zeigen (Anderson et al. 2004; Beral 2003; Rossouw et al. 2002). Das erhöhte langfristige Risikoprofil der HET hat die Indikation für die Behandlung menopausaler Symptome mittels Hormonen stark eingeschränkt. Meist werden nur schwerwiegende und stark einschränkende Symptome kurzfristig mit HET-Präparaten behandelt, um das Risiko für Nebenwirkungen möglichst gering zu halten. Die entstandene Lücke bei der Behandlung moderater Beschwerden oder der Behandlung über einen längeren Zeitraum wurde u.a. mit einigen Präparaten auf pflanzlicher Basis, sogenannten Phytotherapeutika, gefüllt. Eine in der Therapie menopausaler Beschwerden etablierte Pflanze ist die Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa* = CR). Es konnte nachgewiesen werden, dass CR-Extrakt die Anzahl an Hitzewallungen reduzieren und eine protektive Wirkung auf Osteoporose und Osteopenie ausüben kann (Wuttke et al. 2003). Es gibt zurzeit 32 Monopräparate mit CR-Extrakt in unterschiedlicher Konzentration und Dosierung auf dem Markt. Dazu kommt eine Vielzahl an pflanzlichen Kombinationspräparaten (ABDA-Stoffliste 01/2013). Im Rahmen des Bayrischen Forschungsförderungsprogrammes „Osteoporoseprophylaxe mit pflanzlichen Wirkstoffen“ (AZ-838-08) wurde die Erforschung des CR BNO 1055-Extraktes mit dem Ziel fortgesetzt, die einzelnen Wirksubstanzen des Extraktes zu identifizieren und auf ihre Wirksamkeit hin isoliert zu untersuchen. In einer Arbeitsgemeinschaft, zusammengesetzt aus der Arbeitsgruppe für Endokrinologie der Universitätsklinik Göttingen (Prof. W. Wuttke), dem Zentrum für Muskuloskelettale Forschung der Orthopädischen Klinik der Universität Würzburg (Prof. F. Jakob) und der Firma Bionorica SE mit Hauptsitz in Neu- markt (Dr. Stechmann) wurden die Fraktionen des CR-Extraktes CR BNO 1055 aufgereinigt und in Subfraktionen getrennt (Siehe Schema Kapitel 1.3.1.). Diese Subfraktionen wurden in mehreren Dissertationen in Bezug auf ihre Wirkung *in vivo* am Tiermodell der weißen Labor- ratte (Sprague-Dawley) getestet. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, die metabo- lischen Wirkungen, die Lebersicherheit der CR-Subfraktionen und ihren Effekt auf die Kolo- nepithelproliferation im Vergleich zu Estradiolbenzoat und einer ovariectomierten (ovx) Kon- trollgruppe zu untersuchen.

1.1. Das Klimakterium der Frau

Das Klimakterium der Frau ist eine Phase, in welcher der weibliche Körper substantiellen Veränderungen durch den Verlust der Produktion an weiblichen Geschlechtshormonen unterworfen ist und welche mit einer Vielzahl an Beschwerden einhergehen kann. Das Klimakterium dauert ca. 10-15 Jahre und wird unterteilt in die Prämenopause, Menopause, und Postmenopause. Die Menopause wird definiert als 12-monatige Amenorrhoe durch den Funktionsverlust der Ovarien und tritt bei Frauen im Mittel im 51. Lebensjahr auf (Greendale et al. 1999). Der Verlust der Fähigkeit zur Produktion von Östrogenen in den weiblichen Gonaden ist Folge einer folliculären Atresie (Blumel et al. 2000). Die Menopause ist assoziiert mit hormonellen Veränderungen. An erster Stelle steht dabei der Verlust der Östrogene (Rannevik et al. 1995). Der Östrogenmangel im Verlauf und als Folge der Umbauprozesse im Ovar hat Einfluss auf eine Reihe von Organsystemen und kann sich u.a. durch Hitzewallungen mit Schweißausbrüchen und Schlafstörungen und depressive Verstimmungen äußern (Hunter et al. 1986; Dennerstein et al. 2000; Roush 2012). Diese Symptome werden begleitet durch eine Reihe weiterer östrogenmangelbedingter Funktionsänderungen in Organsystemen, welche langfristig zu erhöhter Morbidität und Mortalität führen können. Hierunter fallen z.B. die erhöhte Inzidenz von Osteoporose (Riis et al. 1996), koronarer Herzkrankheit (Grodstein 1995), dem metabolischen Syndrom, (Lobo 2008) und Harninkontinenz (Gracia et al. 2007). Starke vegetative Beschwerden führen oft zur Indikationsstellung für eine medikamentöse Therapie. Die Substitutionstherapie mit weiblichen Geschlechtshormonen, HET, ist die effektivste Methode zur Linderung menopausaler Beschwerden (Davey 2012), kann jedoch ein erhöhtes Risiko für Krebserkrankungen wie Brustkrebs, Endometriumkarzinom (Beral 2003), Schlaganfälle (Hendrix et al. 2006) und koronare Herzkrankheit mit sich bringen (Beral 2003; Rossouw et al. 2002).

1.2. Tiermodell der Menopause

Die weiße Labormaus (SD-Maus) ist ein viel verwendetes Tiermodell in der medizinischen Forschung. Zum einen lassen sich medikamentöse Effekte durch deren kürzere Lebensdauer von 18 Monaten schneller untersuchen und zum anderen gleichen die endokrinologischen Regelkreise weitestgehend denen des Menschen. Die weibliche Maus hat jedoch unter physiologischen Bedingungen kein Klimakterium. Durch Ovariectomie lassen sich die Mäuse einem hormonellen Zustand nahe bringen, welcher dem Zustand der Postmenopause entspricht. Die Maus ist ein gut etabliertes Versuchstier zur Untersuchung von Hitzewallungen und klimakterischen Beschwerden (Kapur et al. 2010). Aus diesem Grund, und weil Mäuse wegen ihres schnelleren Entwicklungszyklus auch schnell auf induzierte hormonelle Veränderungen reagieren, eignet sich die Maus gut als Modell für die Erforschung der Postmenopause (Bellino 2000; Kalu 1991).

1.3. *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 und Subfraktionen

In den letzten Jahren hat die Verwendung von Alternativpräparaten zur Linderung postmenopausaler Beschwerden an Bedeutung gewonnen. CR-Extrakt hat sich im Verlauf in einigen Studien als mildernd in Bezug auf postmenopausale Beschwerden gezeigt, in anderen Studien wurde hingegen kein signifikanter Effekt gesehen (Osmers et al. 2005; Frei-Kleiner et al. 2005; Seidlová-Wuttke et al. 2003a; Newton et al. 2006; Shams et al. 2010). Kapur et al. konnten 2010 an ovx Mäusen zeigen, dass CR-Extrakt die Entstehung von Hitzewallungen abmildern kann (Kapur et al. 2010). Es konnte zudem in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass *Cimicifuga racemosa* ihre Wirksamkeit weder über den Östrogenrezeptor-alpha (ER α) noch über den Östrogenrezeptor-beta (ER β) vermittelt und aus diesem Grund vermutlich auch keine proliferationsfördernde Wirkung auf Uterus und Mamma im Sinne eines erhöhten Risikos für eine Karzinogenese in diesen Organen ausüben kann (Wuttke et al. 2003; Raus et al. 2006). In Kapitel 1.5.3 wird die Funktion der Östrogenrezeptoren näher erläutert. Ein weiterer positiver Effekt des CR-Extraktes ist, dass er neben der Prävention von Hitzewallungen wohl auch vor Osteoporose schützen kann (Seidlová-Wuttke et al. 2003b). Die Pflanze *Cimicifuga racemosa*, auch Traubensilberkerze oder wilde Schlangenzwurz genannt, gehört zur Familie der Hahnenfußgewächse und kommt vor allem in Nordamerika vor. Als mehrjährige Pflanze kann sie Wuchshöhen von bis zu 2,5 Meter erreichen. Die Droge, d.h. der getrocknete, für die Medikamentenherstellung verwendete Teil der Pflanze ist der

Wurzelstock, zusammengesetzt aus Rhizom und Wurzel. Die wirksamen Fraktionen in der CR-Droge sind zum einen durch Struck et al. 1997 über eine Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (Struck et al. 1997) analysiert worden und zum anderen durch die Firma Bionorica® SE (Neumarkt, Deutschland). Bestandteile der lipophilen Saponinfraktion sind Actein und Deoxyactein. Die wasserlösliche Restfraktion beinhaltet Kaffeesäure, Zimtsäurederivate und Methylserotonin (Bionorica®, 2010). Als Hauptanteil für die Wirksamkeit des Gesamtextraktes wurden in einigen Studien die Triterpenglykoside Actein und Deoxyactein genannt (Shao et al. 2000; Bedir und Khan 2000).

1.3.1 Schema der CR BNO 1055-Subfraktionen

Ein Ergebnis der Kooperation der verschiedenen universitären Arbeitsgemeinschaften und der Firma Bionorica® im Rahmen des bayrischen Forschungsförderungsprogramms „Osteopropylaxe mit pflanzlichen Wirkstoffen“ (AZ-838-08), ist die in diesem Umfang erstmalige Analyse und Aufreinigung der im CR BNO 1055-Extrakt vorkommenden Wirksubstanzen in 8 Subfraktionen. Die Saponinfraktion ist fettlöslich und beinhaltet in ihren Subfraktionen Actein und Deoxyactein, die, wie im vorigen Kapitel erwähnt, die Hauptwirkung des CR-Extraktes ausmachen sollen (Shao et al., 2000; Bedir et al., 2000). Die Restfraktion des CR BNO 1055-Extraktes ist wasserlöslich und enthält neben Kaffee- und Zimtsäure vor allem Methylserotonin. Diese Auftrennung in die einzelnen Subfraktionen hat es ermöglicht, dass in mehreren Dissertationen der Abteilung Endokrinologie der Effekt von CR BNO 1055-Extrakt auf verschiedene Organsysteme der SD-Ratte eingehender untersucht werden konnte.

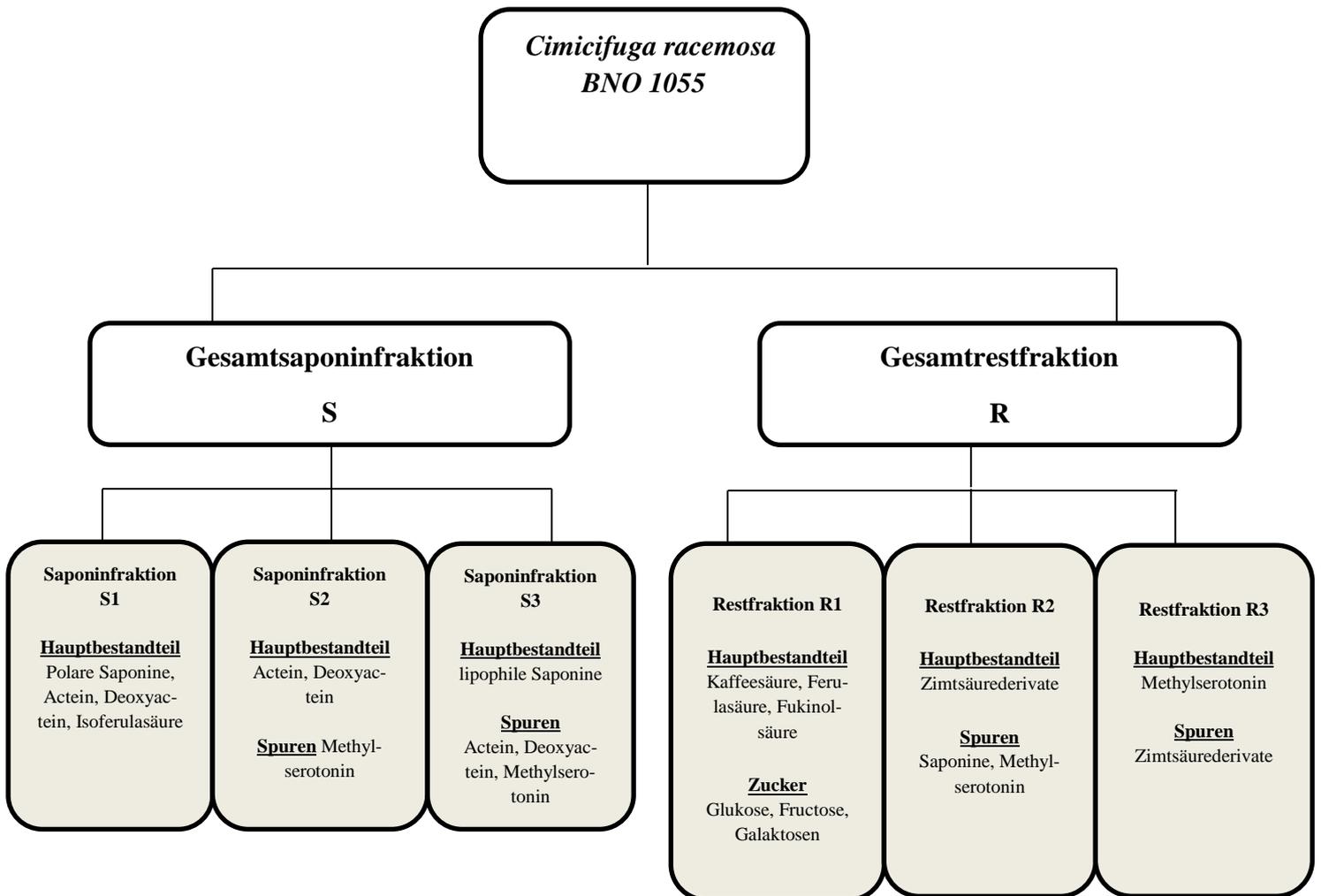


Abb. 1: *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 und ihre für diesen Versuch verwendeten Subfraktionen (Bionorica ® 2010); Die Gruppen S – R3 in den folgenden Graphen des Ergebnisteils entsprechen der obigen Einteilung.

1.3.2. CR BNO 1055 und ihre Wirkungen auf die Leber

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich u.a. mit dem Effekt von CR BNO 1055-Subfraktionen auf das Leberparenchym. In der medizinischen Literatur finden sich Fallberichte über einen Zusammenhang zwischen Leberschädigung unterschiedlichen Ausmaßes und der Einnahme von CR-Extrakt. Eine Frau, der aufgrund eines akuten Leberversagens eine Leber transplantiert werden musste, hatte über den Zeitraum von einer Woche ein nicht näher beschriebenes CR-Präparat eingenommen (Lontos et al. 2003).

Es wurden als mögliche Kofaktoren für eine Leberschädigung Alkoholmissbrauch, Drogenabusus, Bluttransfusionen, positive Familienanamnese für Lebererkrankungen und Leber- oder Gallenblasenerkrankungen in der Vorgeschichte ausgeschlossen. Die Kausalität blieb jedoch unklar. Es folgen weitere Fallberichte, in denen CR in Verdacht geriet, zum einen eine schwere Autoimmunhepatitis getriggert zu haben (Cohen et al. 2004) sowie in 3 Fällen ein fulminantes Leberversagen ausgelöst zu haben. In diesen Berichten reicht die Bandbreite der Dosis von 20mg undefiniertem CR-Extrakt über 500mg und 1000mg täglich eingenommenen, nicht näher definierten CR-Wurzelpräparat (Levitsky et al. 2008; Lynch et al. 2006; Chow et al. 2008). Des Weiteren wird in einer Übersichtsarbeit von 2 Fällen berichtet, bei denen ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von CR und einer transienten Leberenzymerrhöhung gefunden wurde (Joy et al. 2008). Eine 2011 veröffentlichte Metaanalyse der bis dato veröffentlichten Fallrepte und Berichte kommt jedoch zu dem Schluss, dass durch die Einnahme von CR kein kausaler Zusammenhang mit einer akuten Schädigung der Leber bewiesen werden konnte. Zum einen seien die Kriterien für die Definition einer Leberschädigung durch pflanzliche Arzneimittel (HILI - Herb induced liver injury) am Bild einer Transaminasenerhöhung - ALT, AST und Gamma-GT Erhöhung über mindestens 2-fache Norm - nicht ausreichend gewesen und zum anderen konnte in den einzelnen Studien nicht nachgewiesen werden, dass die CR-Extrakte nicht durch Fremdmaterial verunreinigt waren. Es fehlten zudem meist jegliche Angaben über die eingenommenen CR-Präparate (Teschke et al. 2011). Trotz dieser Untersuchungen muss z.B. im Beipackzettel des deutschen Präparates Klimadynon/Klimadynon UNO® ein Hinweis auf mögliche Lebertoxizität stehen. Die Hinweise auf Akutnebenwirkungen im Sinne eines akut toxischen Leberzellschadens scheinen durch verschiedene Metanalysen entkräftet. Lüde et al. konnten 2007 in einer tierexperimentellen Studie an Wistar-Ratten jedoch zeigen, dass CR-Extrakt dosisabhängig ab 1000mg/kg Körpergewicht *in vivo* zu mikrovesikulärer Steatose und *in vitro* in einer Leberzellkultur dosisabhängig bereits ab 10µg/ml zu eingeschränkter β -Oxidation in Mitochondrien führen kann (Lüde et al. 2007). Auch Campos et al. konnten 2012 zeigen, dass CR-Extrakt-Applikation oxidativen Stress und eine reduzierte β -Oxidation in der Leber von Ratten verursachen kann (Campos et al. 2012). Fettakkumulation in der Leber kann mittel- oder langfristig zu einem Leberzellschaden führen (siehe Kapitel Leberpathologie). Da akut-toxische Nebenwirkungen auf das Leberparenchym bereits mehrfach untersucht wurden und die Studie von Lüde et al. 2007 einen Hinweis für eine eventuelle Leberverfettung unter CR-Extrakt-Therapie liefert, konzentriert sich die vorliegende Arbeit auf die Fettakkumulation in SD-Leberschnittpräparaten

als Ausdruck einer möglicherweise pathologischen Fettlebererkrankung unter CR- Subfraktionstherapie.

1.3.3. Handelspräparat Klimadynon / Klimadynon UNO

Klimadynon und Klimadynon UNO von der Firma Bionorica® aus Neumarkt sind CR-Präparate. Für die Herstellung von Klimadynon Filmtabletten wird das getrocknete Rhizom, der Wurzelstock, von *Cimicifuga racemosa* verwendet. Eine Tablette Klimadynon enthält 2,8 mg *Cimicifuga racemosa* Trockenextrakt und soll zweimal pro Tag eingenommen werden. Eine Tablette Klimadynon UNO enthält 6,5 mg Trockenextrakt und soll einmal pro Tag eingenommen werden (Fachinformation Klimadynon / Klimadynon UNO Filmtabletten, 2010)

1.4. Die Leber

1.4.1. Leberpathologie

1.4.1.1. Tiermodell Ratte

In der medizinischen Forschung zu Fettlebererkrankungen existieren einige gut etablierte Tiermodelle, die geeignet sind, näherungsweise die Auswirkung von verschiedenen experimentell kontrollierbaren Einflüssen auf den Leberfettstoffwechsel aufzuzeigen und mit dem menschlichen zu vergleichen (Takahashi et al. 2012). So ist auch die SD-Ratte ein Tiermodell, an dem unter hochkalorischer Diät eine dem Menschen vergleichbare Verfettung und im Endstadium Fibrose der Leber zu beobachten ist (Zou et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wird die Auswirkung von CR-Extrakt-Subfraktionen auf den Leberfettgehalt von SD-Ratten untersucht. Lüde et al. konnten an Wistar-Ratten bereits eine mikrovesikuläre Steatose als Folge einer Inhibition der mitochondrialen β -Oxidation unter CR-Extrakt-Gabe nachweisen (Lüde et al. 2007).

1.4.1.2. Makro- und mikrovesikuläre Steatose

In der Histopathologie der Lebererkrankungen wird zwischen makrovesikulärer und mikrovesikulärer Fettakkumulation in den Hepatozyten unterschieden. Die makrovesikuläre Form der Leberzellverfettung ist ätiologisch der Non-Alcoholic-Fat-Liver-Disease (NAFLD) zuzuordnen und beschreibt eine zumindest anfänglich relativ benigne Form einer Lebererkrankung (Zimmermann 1978; Anstee und Goldin 2006). Die NAFLD ist eine der häufigsten chronischen Leberpathologien weltweit und ist stark assoziiert mit peripherer Insulinresistenz, Diabetes mellitus Typ 2, Dyslipidämie und Adipositas (Braillon et al. 1985; Silverman et al. 1990; Assy et al. 2000; Bellentani und Marino 2009). Eine NAFLD hat verschiedene Gründe. Insulinresistenz und Adipositas können zu einem erhöhten Angebot von Serumlipiden an die Leber und zu gesteigerter Liponeogenese führen, welche eine übermäßige Ansammlung von Triglyceriden in der Leber begünstigt. Des Weiteren kann durch verschiedene Mechanismen die Synthese von VLDL-Partikeln und somit der Triglyceridexport oder die mitochondriale β -Oxidation gestört sein, was ebenfalls zu einer Akkumulation von Triglyceriden und Fettsäuren in den Hepatozyten führen kann. (Zimmermann 1978; Anstee und Goldin 2006; Lettéron et al. 2003). Histologisch sammeln sich größere (Makro-) Lipidvesikel, vornehmlich Triglyceride (TG), in den Hepatozyten an, ohne dabei zunächst eine Entzündung, Vernarbung oder einen Leberzelltod auszulösen. Die Makrovesikel erscheinen monovakuolär, verdrängen im histologischen Bild den Zellkern und können die Hepatozyten komplett ausfüllen (Fromenty et al. 1997). Es gibt Studien, die auch bei der NAFLD eine mikrovesikuläre (s.u.) Hepatosteatose nachweisen konnten und das Vorkommen mit einer schlechteren Prognose in Bezug auf eine Entwicklung hin zur Non-Alcoholic-Steatohepatitis (= NASH) und Zirrhose deuten (Tandra et al. 2011; Clark et al. 2002). Die Leberzirrhose kann den Endpunkt einer auf dem Boden der NAFLD auftretenden NASH markieren. Die Pathogenese von NAFLD zur NASH wurde 1998 von Day und James als „Two Hit“-Theorie eingeführt (Day und James 1998). Es wird beschrieben, dass u.a. Obesitas-induzierter oxidativer Stress, beispielsweise eine erhöhte Rate an Fettsäureoxidation, auf dem Boden einer bereits bestehenden NAFLD zur akut entzündlichen NASH führen kann. Die NASH ist die akut entzündliche Form einer Hepatosteatose und ist charakterisiert durch das Auftreten von lokal entzündlichen Prozessen und Leberzellnekrose. Die entzündlichen Infiltrate beinhalten polymorphkernige Leukozyten und Monozyten und befinden sich häufig um ballonartig aufgetriebene Hepatozyten. Die NASH führt im weiteren Verlauf zu Fibrosierung und Nekrose des betroffenen Leberparenchyms und markiert damit die direkte Vorstufe eines irreversiblen Leberschadens im Sinne einer Zirrhose (Clark et al. 2002; Rolo et al. 2012). Mögliche Mechanismen einer medika-

menteninduzierten makrovesikulären Lipidiakkumulation können zum einen mit einer moderaten Inhibition der mitochondrialen Fettsäureoxidation zusammen hängen, (Fromenty und Pessayre, 1995; Labbe et al., 2008) zum anderen kann die hepatische Produktion von Very Low Density Lipoprotein (VLDL)-Partikeln gestört sein, was zu einem vermindertem Abtransport von Fettsäuren aus der Leber führt (Lettéron et al. 2003; Fromenty und Pessayre 1995). Zudem kann die Liponeogenese in der Leber durch Medikamente gesteigert werden (Gudbrandsen et al. 2006). Im histologischen Bild als Kontrast zu der makrovesikulären Steatose steht die mikrovesikuläre Steatose. Hier erscheint das Zytoplasma der Hepatozyten gefüllt mit multiplen kleinen Lipidvesikeln, die den Zellkern nicht verdrängen. Die mikrovesikuläre Steatose markiert ein schwereres Krankheitsbild, in dessen Verlauf eine verlängerte Prothrombinzeit, hohe Blutammoniakwerte, erhöhte Serumtransaminasen und schnell abfallende Blutglukosewerte zu Koma und Tod führen können (Fromenty und Pessayre 1995; Hautekeete et al. 1990). Ursächlich für diese Form der Lipidakkumulation sieht Fromenty eine gestörte β -Oxidation im mitochondrialen Stoffwechsel, die zur Akkumulation von Triglyceriden, Acyl-CoAs und langkettigen Fettsäuren führt (Fromenty und Pessayre 1997). Die Störung der β -Oxidation kann durch verschiedene Medikamente ausgelöst werden, die entweder auf einzelne Enzyme der mitochondrialen β -Oxidation wirken oder notwendige Co-Faktoren für den mitochondrialen Leberstoffwechsel wie L-Carnitin reduzieren (Fromenty und Pessayre 1995). Lüde et al. zeigten 2007 eine Inhibition der mitochondrialen β -Oxidation sowie eine mikrovesikuläre Steatose an Wistar-Ratten nach Behandlung mit CR-Extrakt (Lüde et al. 2007). Campos et al. zeigten ebenfalls eine gestörte β -Oxidation und eine Zunahme an oxidativem Stress in der Leber von Wistar-Ratten unter CR-Extrakt-Therapie (Campos 2012).

1.5. Kolonkarzinom und HET

Darmkrebs ist die dritthäufigste Krebsursache in den westlichen Industrienationen. Über 90% der Erkrankung findet sich bei Personen über 50 Jahre. Die Prognose und Überlebensdauer hängt stark vom Stadium der Diagnose ab. Die 5-Jahres Überlebensrate im UICC-Stadium 1 ist > 90% wohingegen im Stadium 4 nur noch 5% der Erkrankten länger als 5 Jahre leben (Herold 2102). Pathogenetisch erfolgt die Entwicklung eines Dickdarmkrebses als festes Muster aus adenomatösen intraepithelialen Neoplasien, welche in der Dickdarmschleimhaut entstehen und über einen variablen Zeitraum maligne entarten können, was auch als Adenom-Karzinom-Sequenz bezeichnet wird (Vogelstein et al. 1988; Herold 2012). Daher sind die Früherkennung und vor allem die Prävention dieser Erkrankung von großer Bedeutung. Eine wichtige Erkenntnis in diesem Zusammenhang ist die erhöhte Rate an Darmkrebserkrankungen von postmenopausalen Frauen, die keine HET einnahmen im Vergleich zu denjenigen, welche eine HET zur Linderung ihrer klimakterischen Beschwerden eingenommen hatten (Grodstein et al. 1999). Delellis Henderson et al. zeigten 2010, dass HET-Einnahme das Risiko an einem kolorektalem Karzinom (KRK) zu erkranken um 36% reduzieren kann (Delellis-Henderson et al. 2010).

1.5.1. CR BNO 1055 und ihre Wirkung auf das Kolon

Im Gegensatz zum Einfluss der Östrogene auf die Kolonepithelproliferation wurde die Wirkung von CR-Extrakt und den CR-Subfraktionen auf das Kolon bisher kaum untersucht. Eine Studie aus dieser Abteilung zeigte keinen Effekt von CR BNO 1055-Gesamtextrakt auf das Kolon im Vergleich zu Estradiolbenzoat bei ovx Ratten (Seidlová-Wuttke et al. 2009). Es konnte bereits gezeigt werden, dass CR-Extrakt keine Wirkung an den beiden Östrogenrezeptoren ER β und ER α ausübt (Jarry et al. 2003). Der Effekt der einzelnen Subfraktionen auf die Kolonepithelproliferation wurde bisher noch nicht untersucht.

1.5.2. Wirkung von Östrogen auf das Kolon

In der vorliegenden Arbeit werden die CR-Subfraktionen im Vergleich zu der Wirkung von Estradiolbenzoat auf die Proliferationsaktivität im Kolonepithel getestet. Östrogene vermitteln ihre Wirkung über Östrogenrezeptoren. Es konnte bereits gezeigt werden, dass CR-Extrakt Östrogenrezeptoren nicht aktiviert (Jarry et al. 2003). Da Estradiolbenzoat als eine Ver-

gleichssubstanz in der vorliegenden Arbeit verwendet wird, wird die Funktion und Aufgabe der beiden Östrogenrezeptoren auf das Kolonepithel im Folgenden näher erläutert.

1.5.3. Östrogenrezeptor Alpha (ER α) und Beta (ER β)

Östrogene wirken im Körper über Östrogenrezeptoren. Östrogenrezeptoren gehören zur Familie der nuklearen Transkriptionsfaktoren, zu welcher z.B. auch die Rezeptoren für Sexualhormone und Schilddrüsenhormone gehören. Für die Regulation von Genen und der Transkription der Genprodukte sind zwei Östrogenrezeptoren bekannt: ER α und ER β . Der ER α wurde 1986 durch Green et al. kloniert (Green et al. 1986). Zehn Jahre später erfolgte die Klonierung des ER β (Kuiper et al. 1996). Einige bisher bekannte Effekte der Östrogene konnte somit zwei spezifischen Rezeptoren zugeordnet werden (Sutherland et al. 1983). Die Funktion der beiden Östrogenrezeptoren ist antagonistisch. Der ER α wirkt fördernd auf Zellproliferation, der ER β hingegen wirkt hemmend auf die Proliferation von Zellen unter Östrogeneinwirkung (Hall und McDonnell 1999). Durch Östrogenrezeptor-Knockoutmodelle an Mäusen wurde entdeckt, dass sich die beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β unterschiedlich in verschiedene Organe des Körpers verteilen (Korach et al. 2003). ER α ist vornehmlich lokalisiert in Brustdrüsengewebe (Wang et al. 2000), Knochengewebe (Arts et al. 1997) sowie im Uterus (Wang et al. 2000). ER β hingegen wird, neben zu kleinerem Anteil auch ER α , vor allem in Prostata, Lunge, Kolon, und dem Zentralnervensystem gefunden (Kuiper et al. 1997). Neben der unterschiedlichen Verteilung haben die beiden Östrogenrezeptoren auch unterschiedliche Effekte auf Proliferation und Apoptose. Wada-Hiraike et al. führten Experimente mit ER β -Knockout-Mäusen durch. Sie wiesen nach, dass die Mäuse, die keinen ER β ausbilden, im Vergleich zu Wildtypmäusen eine erhöhte Proliferationsrate und eine gestörte Apoptoserate in der Kolonschleimhaut aufweisen (Wada-Hiraike et al. 2006). Die höchste Dichte an ER β im Kolon konnten Konstantinopoulos et al. in den sich am nächsten zum Darmlumen befindlichen Enterozyten finden (Konstantinopoulos et al. 2003). Di Leo et al. untersuchten die Kolonschleimhaut von 25 gesunden Patienten und 25 Patienten mit adenomatösen Veränderungen auf die Expression von ER β , Zellproliferationsaktivität und Apoptose. Sie konnten bestätigen, dass ER β der am häufigsten vorkommende Östrogenrezeptor in der gesunden Kolonschleimhaut ist und dass in der adenomatös veränderten Schleimhaut signifikant weniger ER β vorhanden war. Sie konnten zudem zeigen, dass die Proliferationsaktivität in adenomatösem Kolongewebe invers zur Expression des ER β korreliert (Di Leo et al. 2008). Kolonkarzinompräventive Effekte durch Östrogene scheinen ihre Rolle unter anderem über die Aktivierung

des ER β im Kolon zu spielen. Barzi et al. gehen davon aus, dass während der Entwicklung von Adenom zu Karzinom ER β -Rezeptoren auf den Kolonzellen verloren gehen und dass die HET diesem Verlust präventiv durch ER β -Rezeptorstimulation entgegenwirken kann (Barzi et al. 2013). Die bisher zitierten Studien zeigen zum einen einen antiproliferativen Effekt von Östrogenen über den ER β auf die Kolonschleimhaut und zum anderen scheint ER β auch am Grad der Differenzierung der Kolonschleimhaut beteiligt zu sein. Die oben genannten epidemiologischen Hinweise auf ein erhöhtes Kolonkarzinomrisiko bei postmenopausalen Frauen sowie auf einen protektiven Effekt der HET scheinen mit der Regulation von Apoptose und Proliferation der Kolonschleimhaut über die Östrogenrezeptoren ER α und ER β zusammen zu hängen.

1.5.4. Histologie und Physiologie des Kolon

Das Kolon ist der mittlere Abschnitt des Magen-Darm-Traktes und stellt die Verbindung zwischen dem Ende des Dünndarmes und dem Rektum dar. Das Kolon gliedert sich in Caecum mit Wurmfortsatz, Colon ascendens, Colon und Colon descendens. Funktionsweise und anatomischer Aufbau des Dickdarms beim Menschen und bei der Ratte sind vergleichbar und werden daher gemeinsam beschrieben. Das Kolon der Ratte besitzt bei einer Länge von 10-15cm den gleichen strukturellen Aufbau mit Caecum und Appendix vermiformis, Colon ascendens, Colon descendens, Sigmoidum und Rectum wie der Mensch. (Krinke 2000). Histologisch ist die Schleimhaut des Dickdarms aus mehreren Schichten aufgebaut. Der Tunica mucosa, der Tela submucosa, der Tunica muscularis und der Tunica serosa.

Die Tunica mucosa besteht aus einer Reihe einschichtig hochprismatischen Flimmerepithels, den Enterozyten. Sie ermöglichen mithilfe ihrer in das Darmlumen gerichteten Mikrovilli, und somit großer resorptiver Oberfläche, eine optimale Aufnahme von Nährstoffen, Mineralien und Wasser. Die Reihe der Enterozyten wird regelmäßig durch tiefe Krypten, den Glandulae intestinales, durchbrochen (Schiebler 1996; Lüllmann-Rauch 2003).

In den Krypten befinden sich neben den Enterozyten schleimabsondernde Becherzellen sowie enteroendokrine Zellen und mitotisch aktive Stammzellen. Die Becherzellen produzieren einen Schleim, der sich auf den Epithelzellen ablagert, eine Gleithilfe für den Speisetransport bildet und vor Proteasen schützt. Die mitotisch aktiven Zellen in den basalen Krypten stellen die Vorläuferzellen zu den Enterozyten dar und bilden den regenerativen Pool, der abgestorbene oder funktionell inaktive Enterozyten von basal nach apikal ersetzt (Deetjen 2005).

Wie bereits erwähnt, wurde in einigen Studien über die Verteilung von Östrogenrezeptoren festgestellt, dass der ER β besonders auf den näher zum Darmlumen lokalisierten, apikalen Enterozyten ausgebildet wird (Konstantinopoulos et al. 2003). Die auf die Tunica mucosa folgende Tela submucosa ist reich an Gefäßen und Bindegewebe welche für die Blutversorgung und Abtransport der Nahrungsbestandteile verantwortlich sind.

In der Tunica muscularis wird in einem komplexen Mechanismus die Peristaltik des Darmes reguliert, an welchem unter anderem auch die Hormone Melatonin und Serotonin als antagonistisches Paar beteiligt sind. Serotonin wirkt prokinetisch, aktiviert die Peristaltik im Magen-Darm-Trakt und verkürzt die Magen-Darm Passage (Tsukamoto et al. 2007), wohingegen Melatonin die durch Serotonin aktivierte Peristaltik hemmt und zudem auch einen antiproliferative Wirkung auf Darmkrebszellen entfalten kann (Farriol et al. 2000). Das Kolon wird durch die Serosa von anderen Organen abgegrenzt (Lüllmann-Rauch 2003).

1.6. PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigene)

In dem Teil der vorliegenden Arbeit, der sich mit der Kolonschleimhaut befasst, habe ich die Proliferationsaktivität der Enterozyten unter Estradiolbenzoat und CR BNO 1055-Subfraktionsbehandlung in den Darmkrypten bestimmt. Als Proliferationsmarker diente mir die PCNA-Färbung. In dieser Färbung werden proliferierende Zellen in der S-Phase fixiert und immunhistochemisch sichtbar gemacht. Das PCNA wurde erstmals von Celis und Bravo 1980 beschrieben. Sie wiesen ein Protein von 36kD nach, welches verstärkt in der S-Phase eines Zellzyklus nachweisbar war (Bravo und Celis 1980). Morris et al. zeigten, dass die Synthese von PCNA ihr Maximum in der S-Phase des Zellzyklus erreicht (Morris und Mathews 1989). In der S-Phase des Zellzyklus erfolgt die Replikation der DNS, somit kann ihre Darstellung als Marker für eine aktive Proliferation verwendet werden (Rassow 2008). PCNA-positiv gefärbte, proliferationsaktive Zellen erscheinen intensiv braun und sind von den sie umgebenden Enterozyten gut abgrenzbar (siehe Abb. 3, S.33).

1.7. Serumlipidparameter in der Menopause - Mensch- und Tiermodell

Wie schon in dem vorangegangenen Kapitel über das Klimakterium der Frau erwähnt, haben zahlreiche epidemiologische Studien den Einfluss eines Östrogenmangels in der Postmenopause als Risikofaktor für verschiedene Erkrankungen wie Osteoporose (Riis et al. 1996), koronare Herzkrankheit (Grodstein und Stampfer 1995) und dem metabolischen Syndrom identifiziert (Lobo et al. 2008). Das voll entwickelte metabolische Syndrom ist gekennzeichnet durch Adipositas, Insulinresistenz, Dyslipidämie und Hypertonie und erhöht das Risiko für Herzinfarkte, Schlaganfälle und für verschiedene Krebserkrankungen inklusive Kolonkarzinom (Trevisan et al. 1998; Haffner et al. 1992). Die Ursache für die Entwicklung des metabolischen Syndroms wird durch eine periphere Insulinresistenz erklärt, welche wiederum mit einem hohen Körperfettgehalt und Adipositas korreliert (Ferrannini et al. 1997; Jeanrenaud 1978). Auch unabhängig von den Faktoren Hypertonus, Insulinresistenz und Adipositas führen erhöhte Cholesterolvere zu einem erhöhten Risiko für Arteriosklerose und koronarer Herzkrankheit, was 1986 bereits an Daten der Framingham-Studie gezeigt werden konnte (Castelli et al. 1986). Es konnte zudem in Studien belegt werden, dass bei postmenopausalen Frauen im Vergleich zu prämenopausalen Frauen das Gesamtcholesterol, das LDL-Cholesterol sowie die Triglyceridwerte signifikant erhöht waren und diese zudem positiv mit dem Körpergewicht korrelierten (Stevenson et al. 1993; Jensen et al. 1990; Reddy Kilim und Chandala 2013). Walsh et al. untersuchten 1991 den Effekt von HET auf die Serumkonzentration von LDL, HDL und Triglyceriden. Sie entdeckten, dass HET zu einer signifikanten Reduktion der LDL Konzentration führte und einen Anstieg des HDLs und der Triglyceride bewirkte (Walsh et al. 1991; Tonstad et al. 1995; Van der Mooren et al. 1992). An ovx Ratten als Tiermodell der Menopause konnte gezeigt werden, dass zum einen eine Ovariectomie zu erhöhtem Gesamtcholesterol und LDL führt (Suda et al. 1998; Ráchon et al. 2008) und zum anderen eine Behandlung mit Estradiol zu einer Reduktion des Gesamtcholesterols führen kann (Liu und Bachmann 1998). In der Leber wird die Synthese des LDL-Rezeptors durch Estradiol stimuliert. Estradiol führt über diesen Mechanismus zu einer verstärkten Aufnahme und Verstoffwechslung von LDL. Dies konnte im Experiment an ovx Ratten nachgewiesen werden (Chao et al. 1979; Cooper et al. 1987). An ovx Ratten konnte in einigen Studien gezeigt werden, dass Estradiol für einen Anstieg der Triglyceride sorgt (Seidlová-Wuttke et al. 2010). In einer klinischen Studie an postmenopausalen Frauen zeigte sich hingegen, dass HET u.a. den Triglyceridspiegel senken kann (De Franciscis et al. 2013). Der Effekt von Estradiol auf Serumlipidwerte und der damit einhergehenden Einfluss auf das kardiovaskuläre Risiko

ist in verschiedenen Studien hinreichend belegt worden. In einem Teil dieser Arbeit untersuche ich den Einfluss von CR-Subfraktionen auf verschiedene Lipidparameter im Vergleich zu Estradiolbenzoat.

1.7.1. CR BNO 1055 und ihre Wirkung auf Blutlipidparameter

Es gibt bisher wenige Studien über die Wirkungen von CR auf Blutlipidparameter. Rachón et al. zeigten 2008 einen Anstieg des LDLs und einen Abfall der Triglyceridkonzentration nach 6-wöchiger Behandlung von ovx Ratten mit CR-Extrakt (Rachón et al. 2008). Am Menschen sahen andere Studien bisher keinen Effekt von CR-Extrakt auf Blutlipidparameter (Spangler et al. 2007; Verhoeven et al. 2007).

1.8. Serumlipide

1.8.1. Cholesterol

Cholesterol kommt als Membranbestandteil in allen Zellmembranen des Körpers vor und ist zudem Grundsubstanz für die Synthese der Steroidhormone, der Gallensäuren und des Vitamin-Ds. Ein Großteil der Cholesterolsynthese erfolgt in der Leber. Das im Darm aufgenommene Cholesterol wird über Chylomikronen zur Leber transportiert und in Lipoproteine eingebaut, welche das Cholesterol zu den Zielzellen im Körper transportieren (Rassow 2008).

1.8.2. LDL (Low Density Lipoprotein)

Das LDL ist für den Cholesteroltransport durch den Organismus zu den Zielzellen verantwortlich. Es entsteht aus VLDL indem eine endotheliale Lipoproteinlipase die in den VLDLs enthaltenen Triglyceride hydrolysiert. Alle Zellen des Körpers bilden in unterschiedlichem Ausmaß LDL-Rezeptoren aus. Die Aufnahme von LDL erfolgt über eine rezeptorvermittelte Endozytose. Da LDL und VLDL die höchsten Anteile an Cholesterol und Triglyceriden aufweisen, gelten sie als besonders einflussreich auf die Entstehung von Arteriosklerose (Rassow 2008; Dietschy 1984).

1.8.3. HDL (High Density Lipoprotein)

HDL sind diejenigen Lipoproteine mit der höchsten Dichte. Sie werden in den Hepatozyten synthetisiert und haben in peripherem Gewebe die Aufgabe überschüssiges Cholesterol aufzunehmen und zur Leber zurück zu transportieren, wo das Cholesterol über die Gallensäuren ausgeschieden werden kann (Arbeeny et al. 1987). Aufgrund dieser Wirkung gilt das HDL als protektiv für Herz-Kreislauferkrankungen, was epidemiologisch bereits in der Framingham-Studie gezeigt werden konnte (Castelli et al. 1986; Rassow 2008). Die Lipidfraktion in der Ratte besteht, im Gegensatz zum Menschen zu 60-70% aus HDL. Beim Menschen besitzt das LDL diesen Anteil (Lundeen et al. 1997).

1.8.4. Triglyceride

Triglyceride sind Ester aus Glycerin und drei Fettsäureresten. Sie dienen dem Organismus als langfristiger Energiespeicher und akkumulieren in den Adipozyten des weißen Fettgewebes. Ihre Aufnahme erfolgt im Darm, von wo sie als Chylomikronen in den Kreislauf gelangen und in der Peripherie unter Mithilfe der Lipoproteinlipase-A ihre Fettsäuren an das Zielgewebe, beispielsweise Adipozyten, abgeben (Rassow 2008).

1.8.5. Leptin

Leptin ist ein Polypeptid aus 167 Aminosäuren (Zhang et al. 1997) und seine Synthese erfolgt hauptsächlich in den Adipozyten des weißen Fettgewebes (Cinti et al. 1997). Die Serumkonzentration von Leptin hängt stark vom Körpergewicht und dem Körperfettanteil ab und ist umso höher, je höher der Körperfettanteil der betreffenden Person ist (Considine et al. 1996). Leptin entfaltet seine Wirkung über spezifische Leptinrezeptoren (Tartaglia 1997), die vor allem im Zentralnervensystem und Hypothalamus lokalisiert sind (Woods und Stock 1996). Im Hypothalamus hemmt Leptin die Funktion von Neuropeptid-Y und wirkt so appetitzügelnd (Schwartz und Seeley 1997). Während der Menopause nimmt als Konsequenz des sinkenden Östrogenspiegels der Körperfettanteil bei Frauen zu und damit auch der Leptinspiegel (Poehlmann et al. 1995; Gower et al. 2000). Experimente an ovx Ratte konnten zeigen, dass sich unter Östrogen Therapie die Leptinwerte wieder auf ein physiologisches Maß reduzieren ließen (Meli et al. 2004). In anderen Studien wurde jedoch kein Effekt von HET auf die Leptinwerte bei postmenopausalen Frauen gefunden, (Gower et al. 2000; Springer et al. 2013)

sodass es in Zukunft weiterer Untersuchungen der Interaktion von Leptin und Östrogenen bedarf.

1.9. Zielsetzung

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, ist es in dem Forschungsprojekt, in dessen Rahmen die vorliegende Dissertation angefertigt wurde, erstmalig möglich gewesen, die einzelnen aufgereinigten Subfraktionen des CR BNO 1055-Extraktes an verschiedenen Organsystemen und unter verschiedenen Fragestellungen zu testen.

In der vorliegenden Arbeit beschäftige ich mich mit drei Aspekten, die der Frage nach einer möglichen Erweiterung der Indikation sowie der Anwendungssicherheit der CR BNO 1055-Subfraktionen untergeordnet sind.

Im ersten Teil der Arbeit untersuche ich den Einfluss der CR BNO 1055-Subfraktionen auf die Leber. Es gibt einige Studien, größtenteils Fallanalysen, die einen akuten Leberschaden unter CR-Extrakt Therapie beschreiben (Levitsky et al. 2008; Lynch et al. 2006; Chow et al. 2008). Es gibt bisher jedoch noch keine Studie, die die Wirkung der Subfraktionen im Einzelnen auf die Leber untersucht hat. Da die Fragestellung eine mögliche Erweiterung der Indikation und die Anwendungssicherheit beinhaltet, ist zu klären, ob einzelne Subfraktionen einen Effekt auf die Leber zeigen können. Durch die Aufarbeitung und Aufteilung des CR BNO 1055-Extraktes in seine wirksamen Subfraktionen durch die Firma Bionorica® bietet sich die Möglichkeit, den Lebereffekt jeder einzelnen Fraktion zu untersuchen. Fast alle bisher durchgeführten Studien und Fallanalysen konzentrierten sich vornehmlich auf akut toxische Leberschäden unter CR-Therapie. In Kapitel 1.3.2 wird erwähnt, dass Lüde et al. Hinweise auf die Entwicklung einer Steatose unter CR-Extrakt-Therapie gefunden haben (Lüde et al. 2011). Als bereits etablierte und histologisch gut durchführbare Methode habe ich ebenfalls die Fettanteile der einzelnen Rattenlebern der jeweiligen Subfraktionen ausgewertet und mit der Kontrollgruppe verglichen. Ziel war hier die Untersuchung eines möglicherweise längerfristigen Schädigungspotentials im Sinne einer Risikoerhöhung für eine Fettlebererkrankung unter CR BNO 1055-Subfraktionstherapie.

Im zweiten Teil dieser Arbeit habe ich die Wirkung der CR-Subfraktionen auf die Proliferationsaktivität im Kolonepithel untersucht. Die Balance zwischen Proliferation und Apoptose ist wichtig für eine anhaltend gesunde Kolonschleimhaut, daher habe ich den Effekt der CR-Subfraktionen auf die Proliferationsaktivität mit der Proliferationsaktivität unter Therapie mit

Estradiolbenzoat bei SD-Ratten verglichen. HET zeigt in verschiedenen epidemiologischen Studien an postmenopausalen Frauen eine kolonkarzinomprotektive Wirkung (Johnson et al. 2007; Delellis Henderson et al. 2010). Der dritte Teil dieser Arbeit hat die Wirkung der CR BNO 1055-Subfraktionen auf Blutlipidparameter im Fokus und beschäftigt sich mit der Fragestellung eines möglichen Effektes auf diese Parameter. Vor allem LDL und HDL haben einen besonderen Stellenwert in der Analyse des individuellen kardiovaskulären Risikos und eine Beeinflussung dieser Parameter könnte auch das kardiovaskuläre Risiko positiv oder negativ beeinflussen. Wenn die CR-Subfraktionen einen positiven Effekt auf die Lipidparameter zeigen sollten, dann ließen sich einzelne Subfraktionen eventuell zusätzlich zur Risikoreduktion kardiovaskulärer Ereignisse einsetzen.

2. Material und Methoden

2.1. Tierversuche

Die Tierversuche fanden unter der Aufsicht von Priv.-Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke und mit der Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig unter der Tierversuchsnummer 33.11.42504-04-043/08 statt. Die insgesamt 100 Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln) wurden in 20 Käfigen (Makrolon®-Käfig Typ IV, Firma Techniplast Deutschland GmbH, Hohenpreißenberg) zu jeweils 5 Tieren in der tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen gehalten. Die Tiere wurden in einem Alter von drei Monaten geliefert und unter konstanter Raumtemperatur von 23° Celsius bei einer Luftfeuchtigkeit von 50 – 55% und mit einer Beleuchtungszeit von 6.00 – 18.00 Uhr untergebracht. Des Weiteren verfügten die Tiere über einen freien Zugang zu Wasser und Futter. Das Anfangsgewicht der Tiere variierte von 245 bis maximal 295 g. Um die Identifizierung der einzelnen Tiere zu erleichtern, wurden die Ratten mit Transpondern der Firma Emsikon Jung (Emsikon Jung GmbH, Fastinning) ausgestattet. Es erfolgte zudem eine Eingewöhnungsphase auf das sojafreie Futter EF R/M, E 150000-04 (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest) von zwei Wochen um die spätere Substanzaufnahme zu optimieren. Da verschiedene Organe entnommen und aufgearbeitet wurden, sind die Tierversuche Bestandteil mehrerer Dissertationen dieser Arbeitsgruppe. Die Daten über die Futteraufnahme, das Körpergewicht und die Lipidparameter entstammen einem Datenpool, der mehreren Doktoranden für ihre Dissertation zur Verfügung stand. Dies ergab sich auch aus Tierschutzgründen. Meine Dissertation bezieht sich auf die Anfertigung, Färbung und histologische Auswertung der Leber- und Kolonpräparate sowie auf die Anfertigung und Auswertung der Korrelationsanalysen der Serumlipidparameter. An der Tierhaltung, Tierpflege und Organentnahme bzw. Obduktion war ich nicht beteiligt.

2.1.1. Ovariectomie

Die Ratten wurden nach einer Woche unter Isoflurannarkose (Forene®, Abbott, Illinois, USA) und postoperativer Analgesie mit Rimadyl® (Pfizer GmbH, Karlsruhe) ovariectomiert.

2.1.2. Obduktion, Blutgewinnung

Nach Abschluss der 4-wöchigen Applikation der Wirkstoffe wurden die Versuchstiere an zwei Vormittagen, jeweils zwischen 8.30 und 12.00 Uhr, durch Doktoranden der Abteilung Endokrinologie unter Supervision von PD Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke obduziert. Nach erfolgreicher Identifizierung mit Hilfe der Transponder wurden die Tiere mittels CO₂-Gas narkotisiert und anschließend enthauptet. Das Blut wurde für spätere Serumanalysen aufgefangen. Der größte Teil der inneren Organe und für spätere Analysen wichtige Gewebe wie Muskel, Fett, Haut, Knochen konnten konserviert werden.

2.2. Futter und Testsubstanzen

Nach der 2-wöchigen Eingewöhnungsphase auf das sojafreie Futter Futter EF R/M, E 150000-04 (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest) und der Ovariectomie wurden die Ratten mit jeweils unterschiedlichen Substanzen gefüttert. Die Gabe der Substanzen erfolgte über die Zugabe zu dem sojafreien Futter, welches den Ratten *ad libitum* zu freier Verfügung stand. Die Gruppeneinteilung belief sich auf 10 Gruppen á 10 Ratten mit einer jeweils anderen, dem Futter beigefügten, Testsubstanz. Über einen Zeitraum von vier Wochen wurden die Tiere dann mit den Subfraktionen aus dem *Cimicifuga racemosa* CR BNO 1055-Extrakt und Estradiolbenzoat behandelt. Die Dosis in mg/kg Futter sowie die Futteraufnahme ist in Tabelle 1 beschrieben. Die Dosis der Subfraktionen entspricht ihrem Anteil an einer bekannten wirksamen Menge CR BNO 1055 Gesamtextrakt von ca. 9mg/d.

Tab. 1: Testsubstanz, Name der Gruppe, Anzahl der Tiere, Substanzdosis in mg/kg Futter

Futterart: EF R/M, E 150000-04 (ssniff® Spezialdiäten GmbH , So- est) + jeweilige Testsubstanz	Name der Gruppe	Anzahl der Tiere	Dosis in mg/kg Futter
Ko, EF R/M	Ko	10	Keine
Estradiolbenzoat	E2	10	10
Saponinfraktion	COO1/S	10	117,6
Restfraktion	COO1/R	10	382,35
Saponinsubfraktion 1	COO1/S1	10	31,2
Saponinsubfraktion 2	COO1/S2	10	46,06
Saponinsubfraktion 3	COO1/S3	10	46,04
Restsubfraktion 1	COO1/R1	10	276,81
Restsubfraktion 2	COO1/R2	10	75,37
Restsubfraktion 3	COO1/R3	10	35,979

Die Obduktion der Tiere erfolgte nach 4 Wochen. Die Futteraufnahme pro Tag war bei allen Gruppen, bis auf die E2 Gruppe, konstant. Die Daten über die Futteraufnahme und Zusammensetzung entstammen einem Datenpool, der von mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden verwendet wird.

2.3. Versuchsablauf: Zeitstrahl

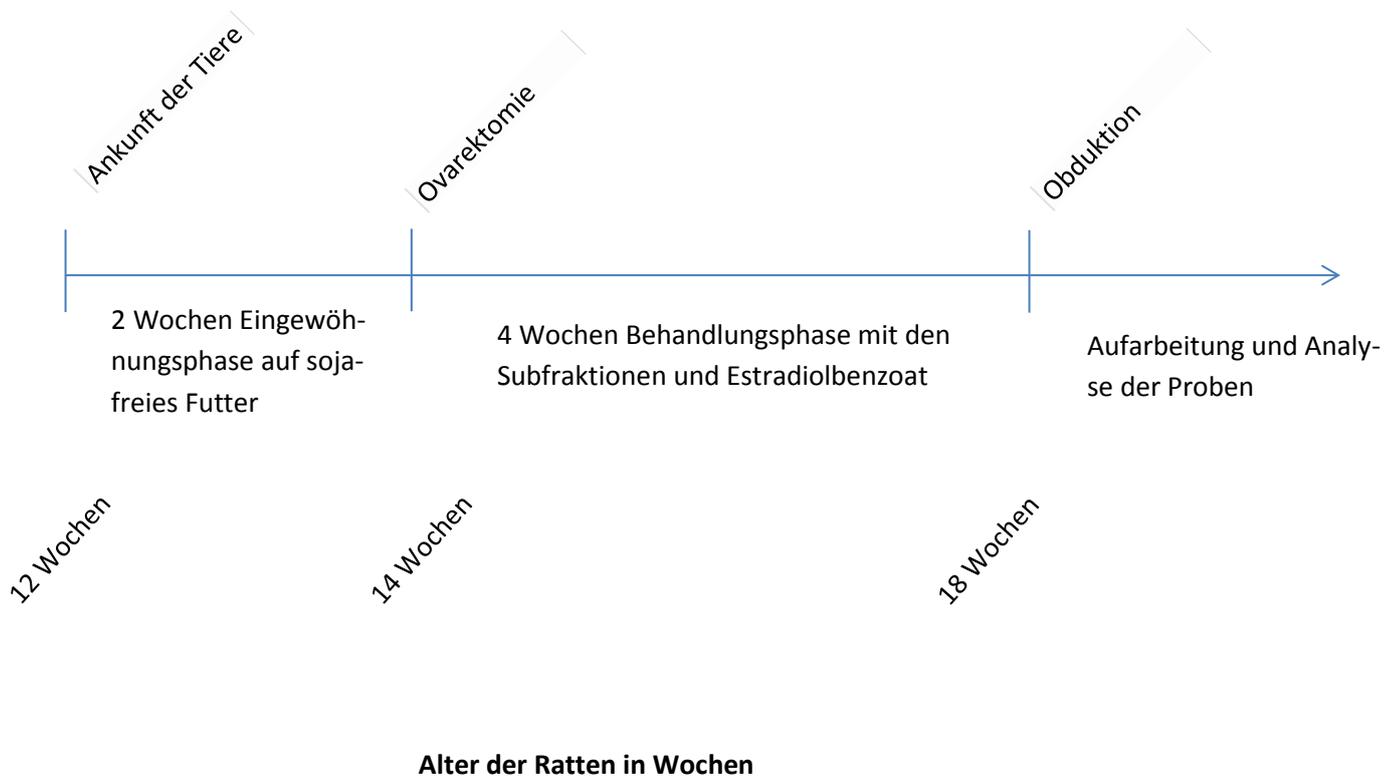


Abb. 2: Zeitstrahl Versuchsablauf

2.4 Analyse

2.4.1 Herstellung der Schnittpräparate

2.4.1.1. Leberschnittpräparate

Es wurden pro Tier 2-3 Gefrierschnittpräparate hergestellt. Die nach der Obduktion entnommenen Lebern wurden in einem Gefrierschrank der Marke Kendro (Kendro HFC 586 TOP) bei einer Temperatur von -70° Celsius tiefgefroren. Anschließend erfolgte die Anfertigung der $4\ \mu\text{m}$ breiten Leberschnittpräparate mithilfe eines Kryotoms (Leica CM 3050). Die fertigen Schnitte wurden schließlich direkt nach dem Schneiden auf Objektträger der Marke Menzel (SuperFrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig) aufgezogen und waren nach dem Trocknen über Nacht bei Raumtemperatur zum Anfärben geeignet.

2.4.1.2. Kolonschnittpräparate

Es wurden pro Tier 2-3 Hartschnittpräparate hergestellt. Der bei der Obduktion entnommene, rektosigmoidale Anteil des Kolons wurde zunächst für 72 Stunden in einer 10%igen formalinhalten Lösung aufbewahrt. Für die Weiterverwendung und zur Stabilisierung des Organes wurden die Organe zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und mithilfe von Xylol und Paraffin fixiert (Siehe methodischer Anhang). Die Kolonpräparate wurden in Kunststoffblöcke gegossen.

Das Protokoll über die Technovit-Kunststoffblockherstellung ist im Anhang zu finden. Die fertigen Kunststoffblöcke wurden anschließend mit einem Rotations-Tischmikrotom der Firma Leica (Leica 2065 Supercut, Leica Biosystems GmbH, Nussloch) in eine Dicke von $3\text{-}5\ \mu\text{m}$ geschnitten. Anschließend erfolgte die Auftragung der Schnitte auf Objektträger der Marke Menzel (SuperFrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig).

2.5. Färbung

2.5.1 Ölrot-Färbung der Leberschnitte

Bei der von Lillie eingeführten Methode des Fettnachweises mit Oil red O (Fa. Sigma, Deisehofen) werden Lipide intensiv rot gefärbt. Das zur Kernfärbung verwendete Hämatoxylin nach Mayer wurde von der Firma Merck KGaA als fertige Färbelösung bezogen und färbt Zellkerne blau an. Aufgrund des entstehenden Kontrastes lassen sich Fettansammlungen in den gefärbten Präparaten sehr gut erkennen. Die genaue Färbanleitung ist im Anhang zu finden. Im Ergebnisse-Teil ist ein typisches Färbebeispiel abgebildet (s. Abb. 6, S. 38)

2.5.2. Immunzytologische Färbung PCNA

Die PCNA-Färbung ist eine immunzytologische Färbung und beinhaltet zwei grundlegende Schritte. Zuerst ist es nötig, die Schnittpräparate zu Anfang so zu behandeln, dass eine optimale Präsentation der Antigene für die später bindenden Antikörper ermöglicht wird. Dies wird durch eine Entparaffinierung der Schnitte und deren Behandlung mit Citratpuffer und Wasserstoffperoxid erreicht. Der zweite Schritt beinhaltet die Färbung mit einem Primärantikörper gegen PCNA (mouse monoclonal IgG 2a, clone PC 10 Firma Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), der an das PCNA binden kann und dessen Sichtbarmachung mithilfe eines Sekundärantikörpers (rabbit/mouse, Fa. Dako, Hamburg) und Diaminobenzidin (DAB) erfolgt. Die Färbanleitung ist im Anhang zu finden.

2.6. Auswertung der histologischen Präparate

2.6.1. Auswertung der Leberschnittpräparate

Für die Auswertung der Leberschnittpräparate wurden aus den insgesamt 10 Tieren pro Gruppe jeweils 3 Tiere ausgewählt, von denen jeweils 2 Schnitte pro Tier untersucht wurden. Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels eines mit einer Kamera (Olympus ColorView, Soft Imaging System GmbH, Münster) an einen Computer angeschlossenen Mikroskops (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG, Jena) bei einer 12,5-fachen Vergrößerung. Durch die Ölrot-Färbung der Schnittpräparate konnte man die als rot imponierenden Fettanhäufungen sehr gut von dem Hintergrund der blau gefärbten Zellkerne abgrenzen. Diese Bedingung konnte mit der analySIS® 3,0 Software ausgenutzt werden. Die einzelnen Leberschnittpräparate wurden

für die bessere Übersicht in 4 Quadranten aufgeteilt und in jedem Quadranten der Fettgehalt und die Parenchymfläche separat bestimmt und hinterher als Gesamtmenge zusammengefügt. Bei einem Fund von Fettansammlungen in einem Gesichtsfeld wurde mit der Kamera ein Foto dieses Gesichtsfeldes gemacht und anschließend mit der Funktion „Farbschwellenwerte setzen“ dem Programm erklärt, welche Farbwerte innerhalb des Bildes Fett (rot) und welche Parenchym (blau) sind. Diese Farbflächen kann das Programm mit gegebener Vergrößerung (10-fach am Objektiv und nochmal 1,25-fach durch die Kamera) einer Fläche in μm^2 zuordnen. Mit der Funktion „Phasenanalyse durchführen“ erhält man somit pro Messung eine Menge an absolut gemessenem Fett in μm^2 , eine Menge an absolut gemessenem Parenchym in μm^2 und ein Verhältnis von Fett zu Parenchym in Prozent, welche von dem Programm in einer Excel-Tabelle gespeichert werden. Diese Tabellen wurden anschließend zusammengefügt, um die Fett und Parenchymwerte für ein ganzes Präparat zu erstellen. In der Auswertung der Leberschnittpräparate wurde aufgrund der unterschiedlichen Größe der Gesamtschnittfläche der einzelnen Proben an den Stellen die Parenchymfläche bestimmt, an denen Fettansammlungen gefunden wurden. Die Messungen werden im Kapitel „Ergebnisse“ als Fettanteil in μm^2 pro Parenchymfläche in μm^2 dargestellt.

2.6.2 Auswertung der Kolonschnittpräparate

Für die Auswertung der Kolonschnittpräparate wurden aus den insgesamt 10 Tieren pro Gruppe jeweils 4 Tiere ausgewählt, von denen jeweils 2 Schnitte pro Tier untersucht wurden. Die Auswertung der Präparate erfolgte mittels eines mit einer Kamera (Olympus ColorView, Soft Imaging System GmbH, Münster) an einen Computer angeschlossenen Mikroskops (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG, Jena) über die Software analySIS® 3,0 (Soft Imaging System GmbH, Münster) bei einer 40-fachen Vergrößerung. Gezählt wurden die PCNA-positiven, braun gefärbten Zellen bzw. Zellkerne im Verhältnis zu 500 Zellen pro Präparat. Verwendet und gefärbt wurden Schnittpräparate aus dem rektosigmoidalen Anteil des Kolon. Jedes Präparat wurde in 4 Quadranten eingeteilt und in jedem Quadranten wurden 125 Zellen gezählt. Kriterium war, dass nur längs angeschnittene und in ihrem Verlauf komplett vom Darmlumen bis zum Boden verfolgbare Krypten in die Auswertung mit einfließen. Jeder intensiv braun gefärbte Zellkern sowie jede Zelle, die ein braun gefärbtes Kernkörperchen aufwies, wurde als positive Zelle gewertet.

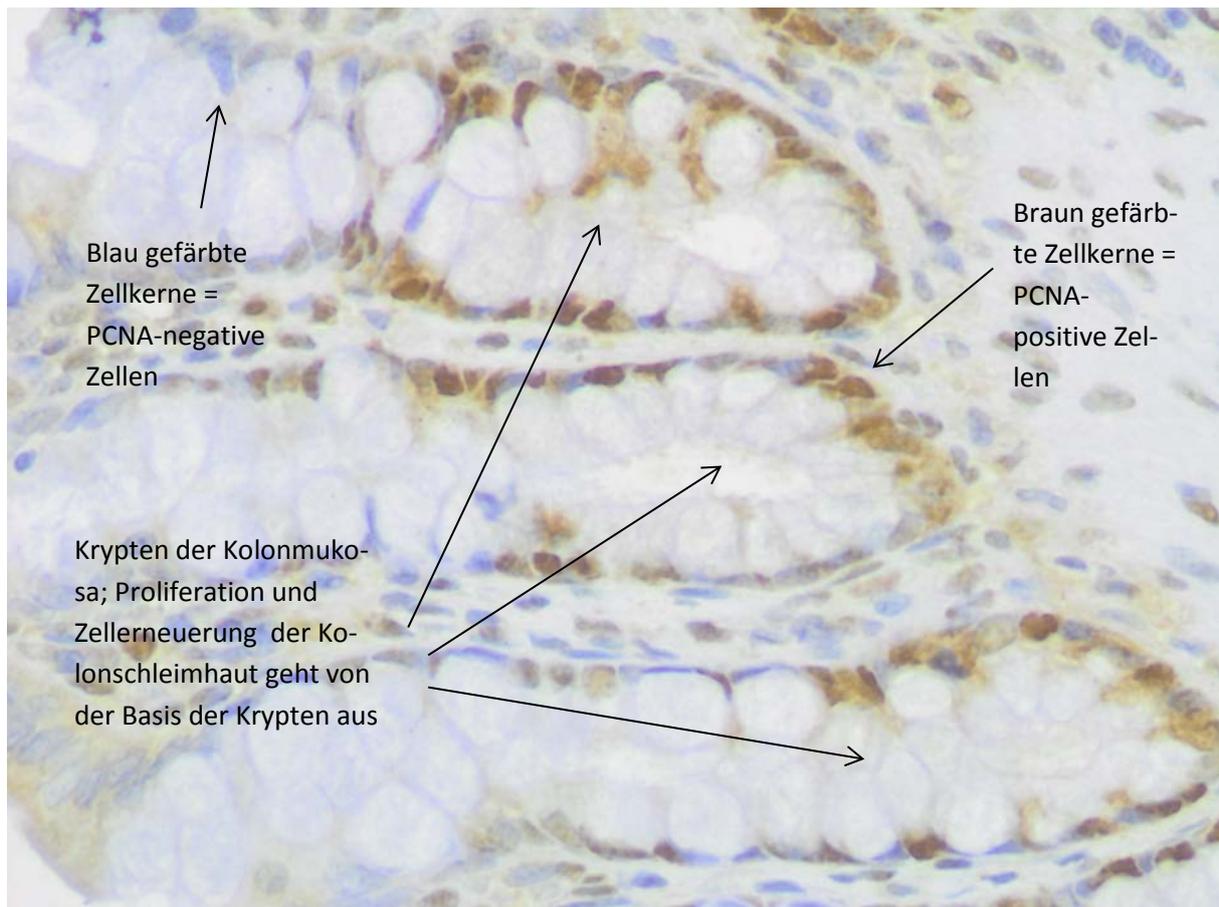


Abb. 3: Kolonschnittpräparat, Zellproliferation, Gruppe R3, Vergrößerung 40x, PCNA-Färbung; Dieses Präparat gehört zu der R3-Gruppe der CR BNO 1055 Subfraktionen und ist mit der PCNA-Färbung gefärbt. PCNA-positive Zellkerne erscheinen intensiv braun gefärbt. Die Zellzählung der positiven Zellen erfolgte bei dieser Vergrößerung. Es wurden pro Präparat 500 Zellen, aufgeteilt in 4 Quadranten á 125 Zellen, gezählt. Es wurden pro Quadrant 3 nebeneinander liegende Krypten ausgewählt und vom Darmlumen beginnend ausgezählt.

2.7. Serumparameter

Aus dem gewonnenem Blut der Versuchstiere wurde eine Vielzahl von Serumparametern bestimmt. Für diesen Versuch von Interesse waren die Konzentrationen von Leptin, HDL, LDL, Gesamtcholesterol und der Triglyceride. Diese Parameter wurden mithilfe des Analysegerätes Hitachi 902 automatic analyzer (Boehringer, Mannheim) bestimmt. Das Leptin ließ sich anhand einer standardisierten Radioimmunfluoreszenzanalyse (RL-83 K, Linco Research, USA) ermitteln. Die Analyse der Serumparameter erfolgte durch die MTA Sabine Lünnemann und stand mehreren Doktoranden der Abteilung in ihren Dissertationen zur Verfügung.

2.8. Graphen und statistische Analyse

Die Grafiken und die statistische Analyse wurde mithilfe der GraphPad Prism 5.0 Software angefertigt. Für die statistische Auswertung wurden 1way ANOVA – Dunnett's Multiple Comparison Test und der t-Test verwendet. P-Werte gelten ab einer Abweichung von kleiner als 0.05 als signifikant. Die Graphen werden im Kapitel „Ergebnisse“ als Balkendiagramm mit Standardfehler (SEM) dargestellt.

3. Ergebnisse

Für die Auswertung der Ergebnisse wurden alle Werte denen der Kontrollgruppe, gekennzeichnet mit Ko, ovx, gegenübergestellt

3.1. Körpergewicht

Effekt von sojafreiem Futter, Estradiolbenzoat und CR BNO 1055-Subfraktionen nach 4-wöchiger Behandlung auf das Körpergewicht der SD-Ratten.

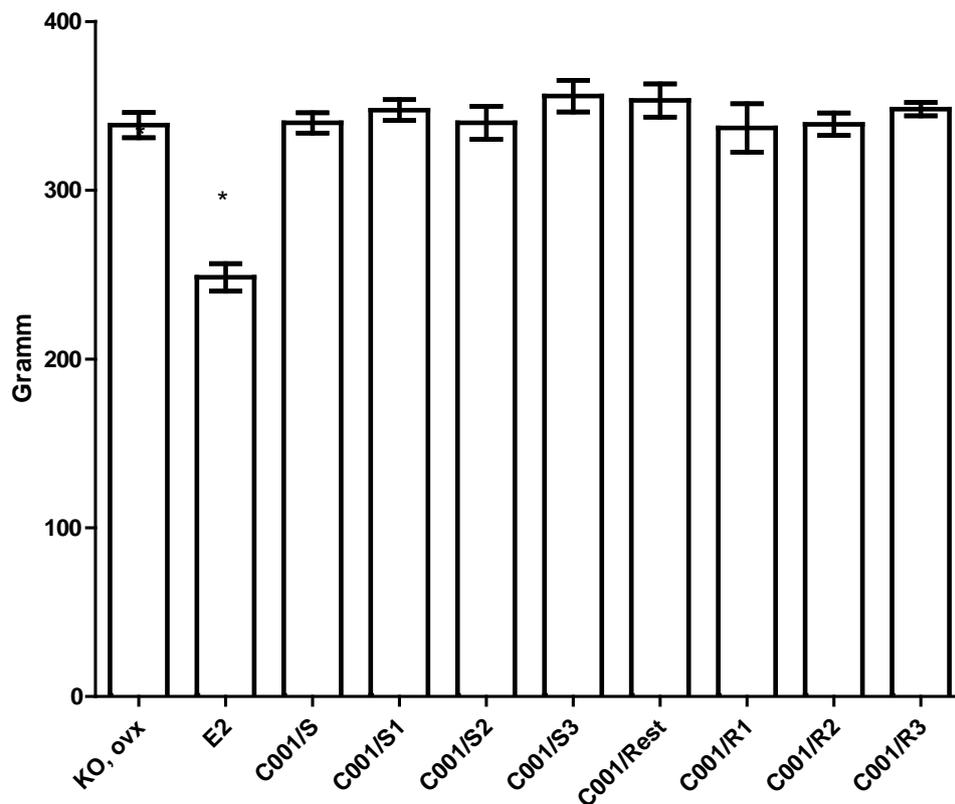


Abb.4: Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf durchschnittliches Körpergewicht der Versuchstiere pro Gruppe. Bis auf die E2-Gruppe zeigen alle anderen Gruppen keine Abweichung zum Körpergewicht der Kontrollgruppe. * = $p < 0,05$ (t-Test; 1way ANOVA – Dunnett's Multiple Comparison Test). Abweichung als SEM

Die Körpergewichte der Tiere, die mit den CR BNO 1055-Subfraktionen behandelt wurden, wiesen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe auf. Die Tiere, die mit Estradiolbenzoat behandelt wurden, waren im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant leichter ($p < 0,0001$). Die Daten über das Körpergewicht der Tiere entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand.

3.2. Futteraufnahme

Tab. 2: Testsubstanz, Name der Gruppe, Anzahl der Tiere, Substanzdosis in mg/kg Futter, Futteraufnahme in g/Tier/Tag und Substanzeinnahme in mg/Tag * $p < 0,05$

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

Die Futteraufnahme der Tiere in der Kontrollgruppe sowie in den Gruppen der CR BNO 1055-Subfraktionen war über den Versuchsverlauf annähernd gleich. Die Futteraufnahme der mit Estradiolbenzoat behandelten Tiere war im Vergleich zu den anderen Gruppen durchschnittlich signifikant niedriger. Die Daten über die Futteraufnahme und die Substanzeinnahme der Tiere entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand

3.3. Ergebnisse der Messungen über den Leberfettgehalt

3.3.1. Verhältnis von Leberfettgehalt zu Parenchymfläche

Hier wird der Effekt von Estradiolbenzoat und CR BNO 1055-Subfraktionen nach 28-tägiger Applikation auf den Fettanteil in den ausgewählten Flächen des Leberparenchyms dargestellt.

Effekt von E2 und CR BNO 1055-Extrakt Subfraktionen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf: Fettanteil pro Fläche Leberparenchym

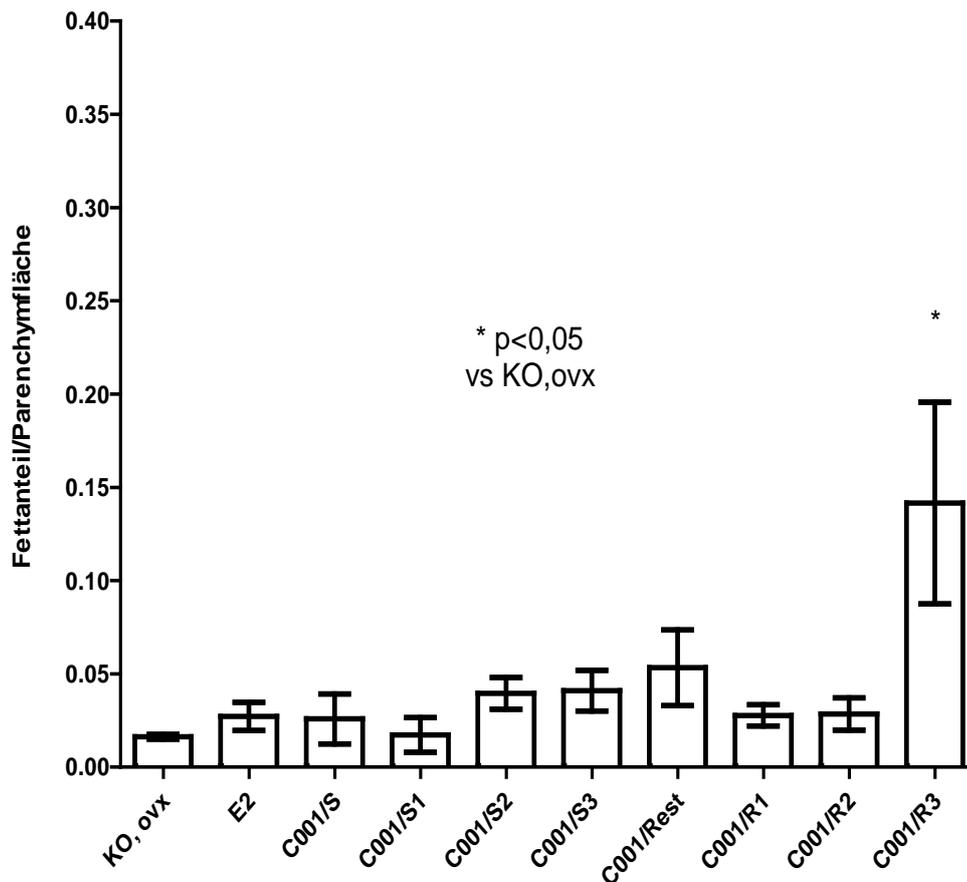


Abb. 5: Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Fettanteil pro Fläche Leberparenchym; Darstellung in %; * = $p < 0,05$ vs KO, ovx (t-Test; Iway ANOVA - Dunett's Multiple Comparison Test). Abweichung als SEM

Die Abbildung zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant höheren Fettanteil pro Parenchymfläche (%) bei den Tieren, die mit der Subfraktion R3 des CR BNO 1055-Extraktes behandelt wurden ($p=0,0072$, Dunett's Multiple Comparison Test). Bei der Estradiolbenzoatgruppe E2 und bei den anderen Subgruppen war kein signifikanter Anstieg des Leberfettgehaltes zu messen. Im t-Test zeigte sich die R3-Gruppe durch hohe Standardabweichung nicht signifikant.

3.3.2. Makroskopische Beurteilung der Fettansammlungen in den Leberschnittpräparaten

Die Gruppe R3 zeigt einen im Vergleich zur Kontrollgruppe höheren Anteil an Fettgewebe und wurde auf die Konfiguration ihrer Fettansammlungen hin mikroskopisch untersucht.

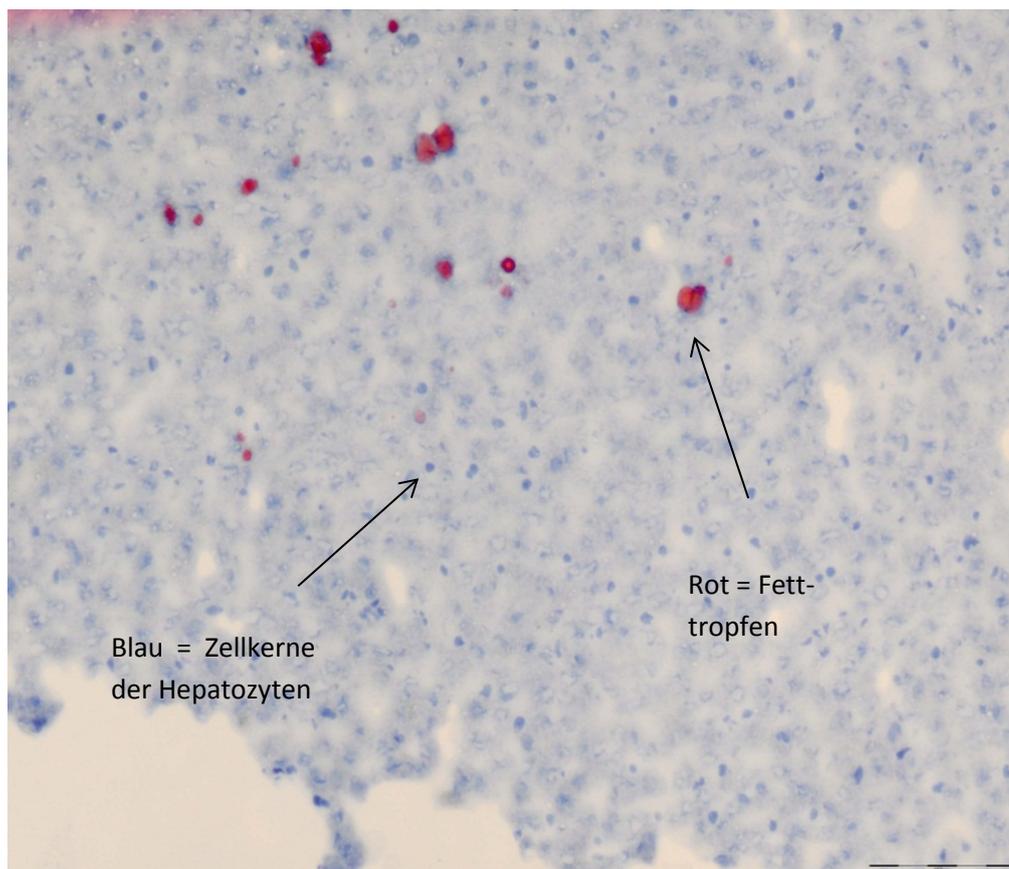


Abb. 6: Leberschnittpräparat, R3-Gruppe, Vergrößerung 12,5-fach, Ölrot-Färbung

Diese Abbildung zeigt ein histologisches Leberschnittpräparat aus der R3-Gruppe. Das Bild wurde bei 12,5-facher Vergrößerung aufgenommen. Man erkennt zwischen dem Hämatoxilin-gefärbten, blauen Leberparenchym eine Ansammlung von Ölrot-gefärbten Fetten, die am ehesten dem Typ der makrovesikulären Fettakkumulation entsprechen, d.h. eine einzelne in der Größe heterogene Lipidvakuole pro Hepatozyt, welche den Zellkern verdrängen kann. Die Art der Fettansammlungen entspricht im gesamten Präparat diesen Kriterien.

3.4. Zellproliferation im Kolonepithel

3.4.1. Zellproliferation als Anteil der PCNA-positiven Zellen an 500 Zellen

Effekt von E2 und CR BNO 1055-Extrakt Subfraktionen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf:
Zellproliferation in der Kolonschleimhaut

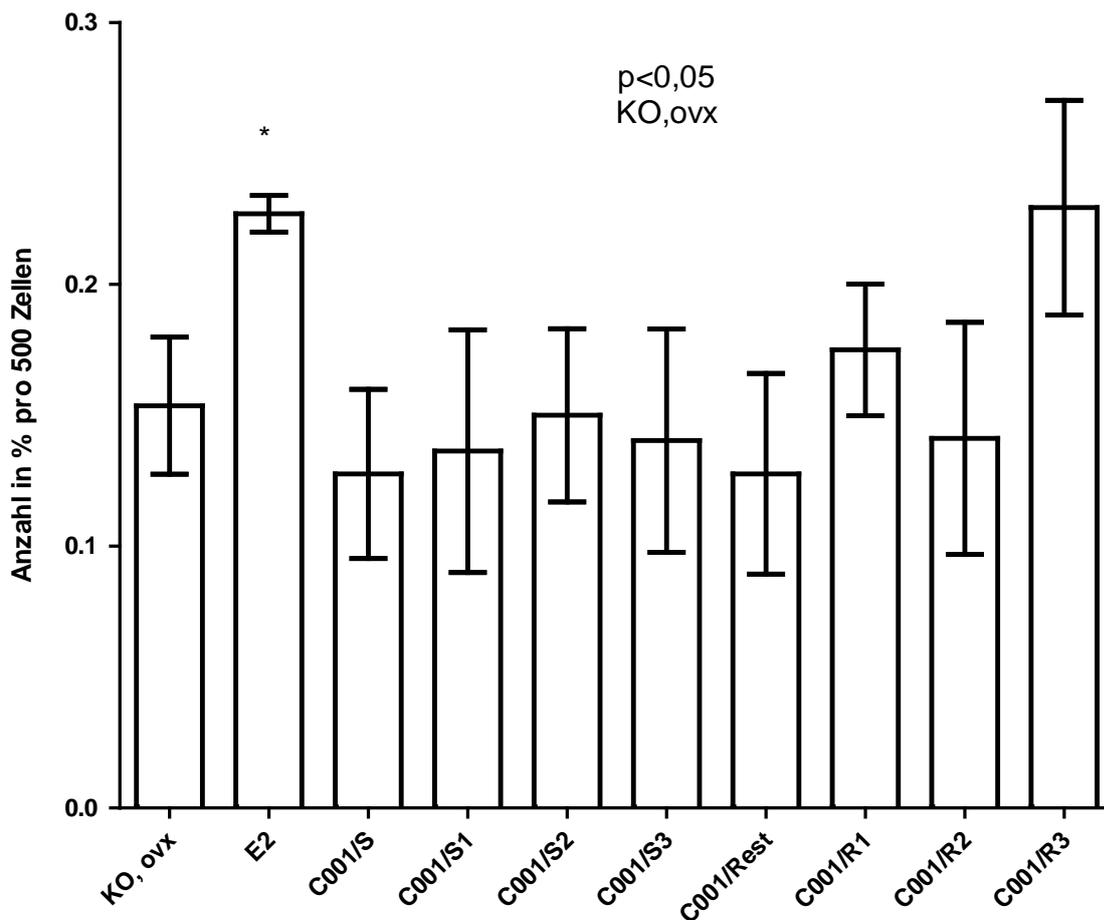


Abb. 7: Effekt von CR BNO 1055-Subfraktionen und E2 auf Zellproliferation in der Kolonschleimhaut; Anteil der positiven PCNA-Zellen an 500 Gesamtzellen. * = $p < 0,05$ vs KO, ovx (t-Test; 1way ANOVA – Dunnett's Multiple Comparison Test). Abweichung als SEM

Die Gruppe der mit Estradiolbenzoat behandelten Tiere wies eine t-Test-signifikant höhere Zellproliferationsrate als die Kontrollgruppe auf ($p=0,0221$). Die anderen Gruppen zeigen in der Zellproliferation keinen statistisch signifikanten Effekt. In der zusätzlich durchgeführten 1way ANOVA – Dunnett's Multiple Comparison Test-Analyse zeigte sich für keine der getesteten Gruppen eine signifikante Abweichung der Mittelwerte von der Kontrollgruppe.

3.5. Blutlipidparameter

3.5.1. Serumcholesterol

Effekt von E2 und CR BNO 1055-Extrakt Subfraktionen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf: Serumwert Cholesterol pro Gruppe (mg/dl)

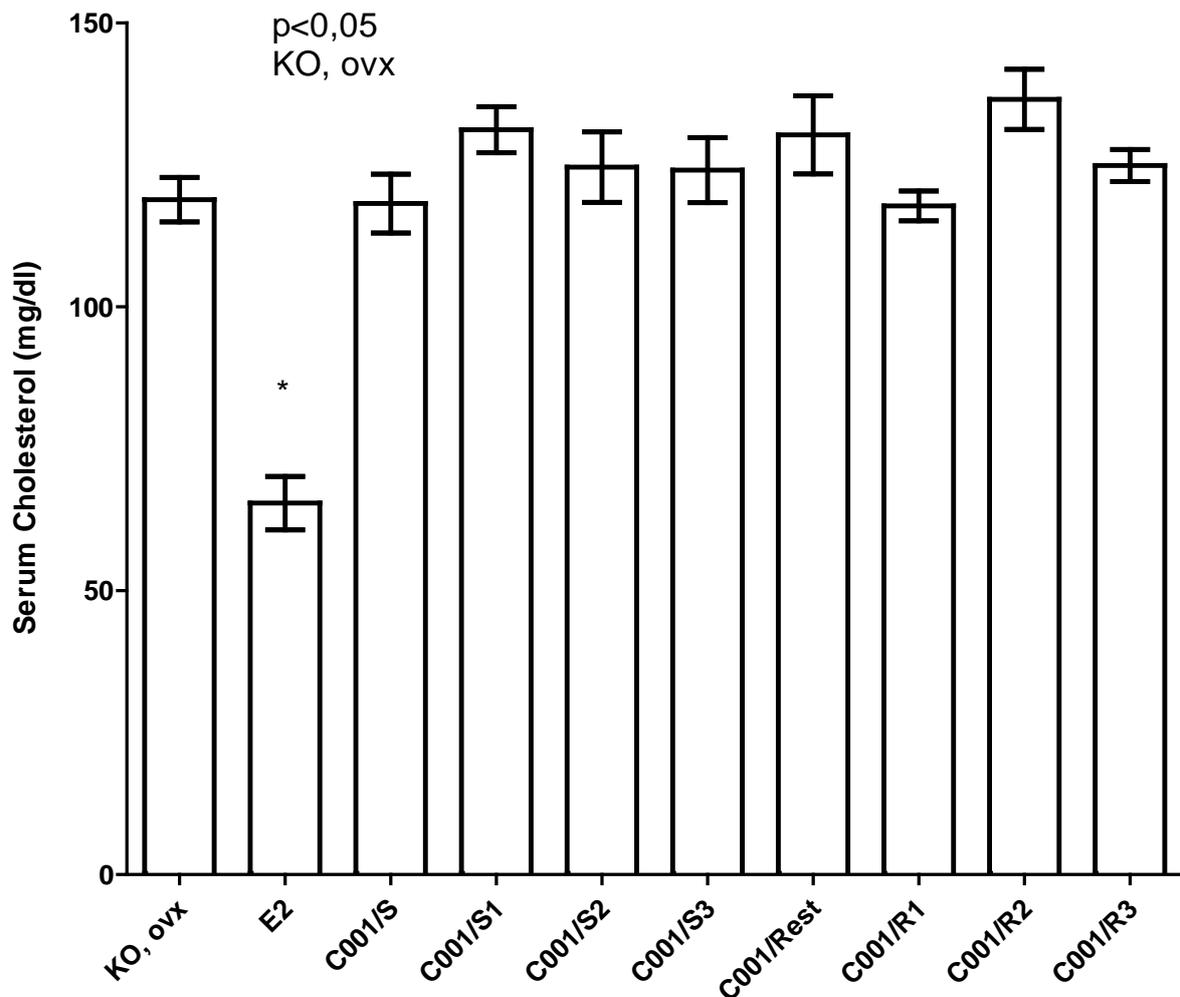


Abb. 8: Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration des Gesamtcholesterols. * = $p < 0,05$ vs KO, ovx (t-Test; Iway ANOVA – Dunnett's Multiple Comparison Test). Abweichung als SEM

Der Serumwert des Gesamtcholesterols ist bei der Gruppe der mit Estradiolbenzoat behandelten Tiere signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vermindert ($p < 0,0001$, t-Test). Die Gruppen der mit den CR BNO 1055-Subfraktionen behandelten Tiere zeigen keinen Effekt auf den Gesamtcholesterolwert im Serum nach 4-wöchiger Behandlung. Die Daten des Serumcholesterols entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand

3.5.2. LDL (Low Density Lipoprotein)

Effekt von E2 und CR BNO 1055-Extrakt Subfraktionen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf:
Serumwert LDLC2 pro Gruppe (mg/dl)

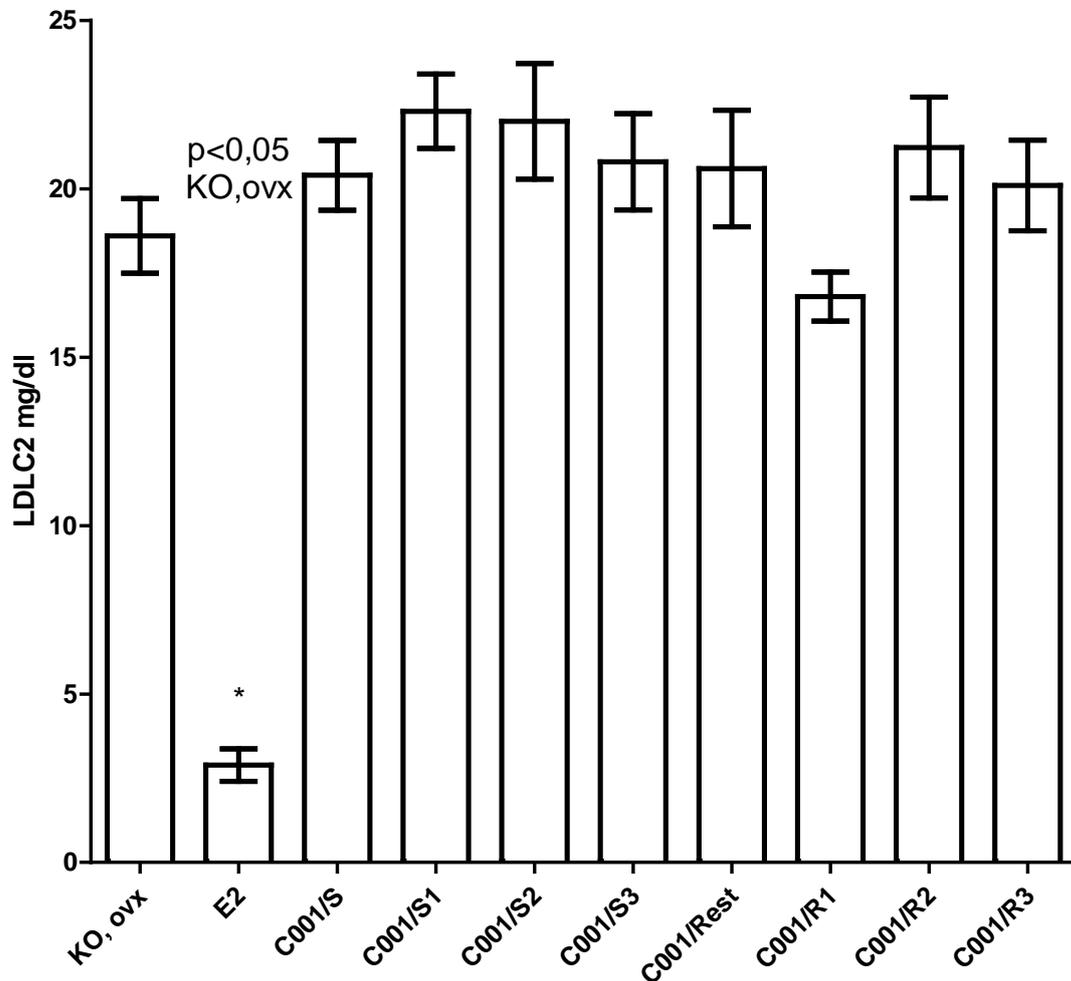


Abb. 9: Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration des LDLs. * = $p < 0,05$ vs KO, ovx (t-Test; 1way ANOVA – Dunnett's Multiple Comparison Test). Abweichung als SEM

Der Serumwert des LDL ist bei der Gruppe der mit Estradiolbenzoat behandelten Tiere signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vermindert ($p < 0,0001$, t-Test). Die Gruppen der mit den Subfraktionen behandelten Tiere zeigen keinen signifikanten Effekt auf den LDL-Wert im Serum nach 4-wöchiger Behandlung. Die Daten des Serum-LDLs der Tiere entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand.

3.5.3 HDL (High Density Lipoprotein)

Effekt von E2 und CR BNO 1055-Extrakt Subfraktionen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf:
Serumwert HDLC2 pro Gruppe (mg/dl)

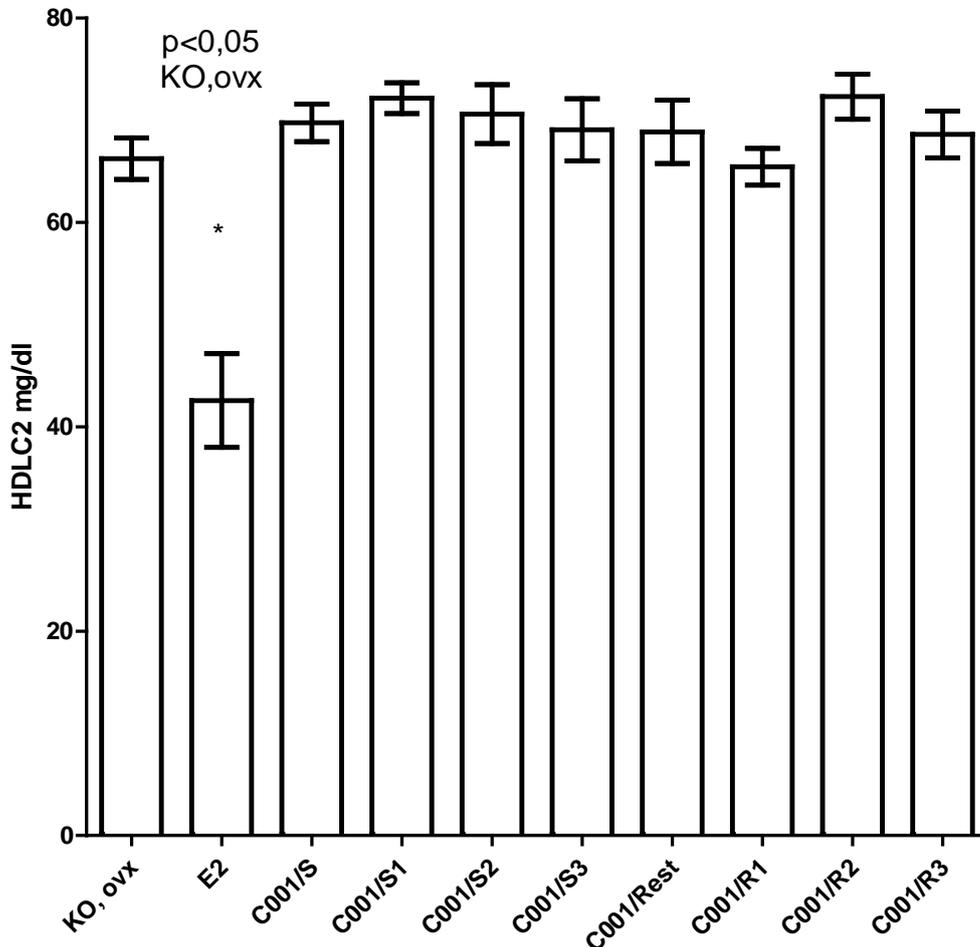


Abb. 10: Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration des HDLs. * = $p < 0,05$ vs KO, ovx (t-Test; 1way ANOVA – Dunnett's Multiple Comparison Test). Abweichung als SEM

Der Serumwert des HDLs ist bei der Gruppe der mit Estradiolbenzoat behandelten Tiere signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vermindert ($p=0,0002$, t-Test). Die Gruppen der mit den Subfraktionen behandelten Tiere zeigen keinen signifikanten Effekt auf das HDL im Serum nach 4-wöchiger Behandlung. Die Daten des Serum-HDLs der Tiere entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand.

3.5.4. Triglyceride

**Effekt von E2 und CR BNO 1055-Extrakt Subfraktionen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf:
Serumwert Triglyceride pro Gruppe (mg/dl)**

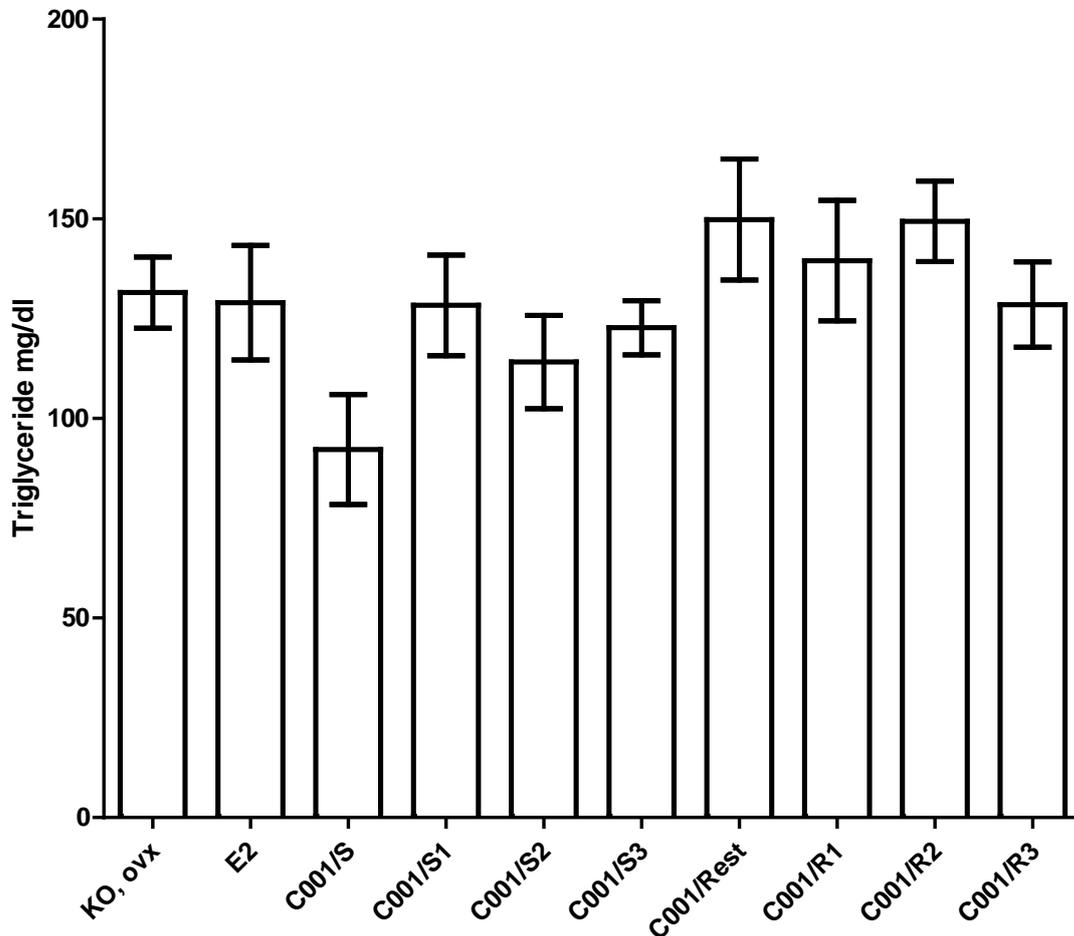


Abb. 11: Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration der Triglyceride. Abweichung als SEM

Der Serumwert der Triglyceride ist in keiner der untersuchten Gruppen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht oder vermindert. Es lassen sich starke Ausreißer bei den Gruppen E2 und Gesamtrastfraktion erkennen. Die Gesamtsaponinfraktion zeigt eine Tendenz zu niedrigeren Triglyceridwerten im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Die Daten der Serum-Triglyceridwerte der Tiere entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand.

3.5.5 Leptin

Effekt von E2 und CR BNO 1055-Extrakt Subfraktionen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf: Serumwert Leptin pro Gruppe (ng/ml)

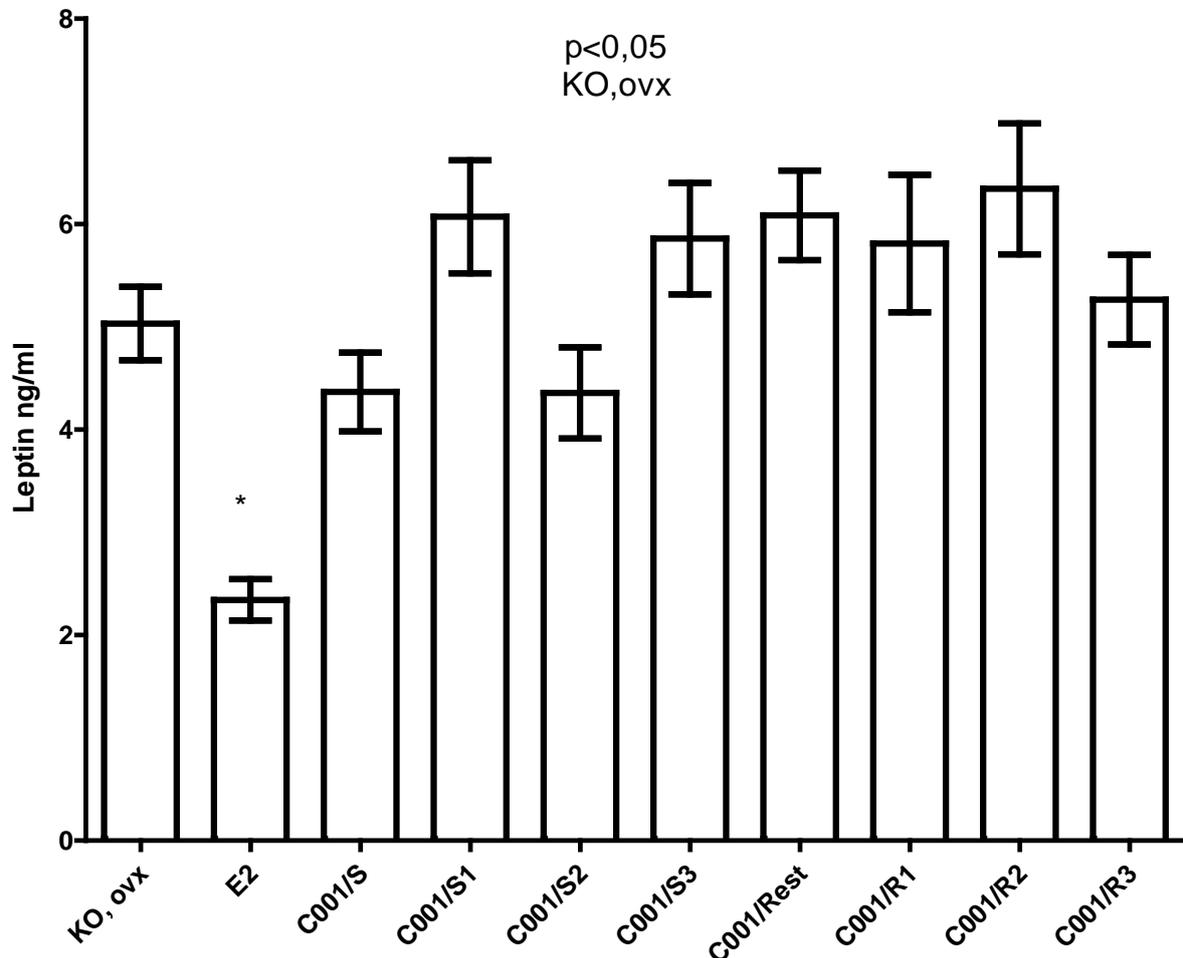


Abb. 12: Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration des Leptins. * = $p < 0,05$ vs KO, ovx (t-Test; 1way ANOVA – Dunnett's Multiple Comparison Test). Abweichung als SEM

Der Serumwert von Leptin ist bei der Gruppe der mit Estradiolbenzoat behandelten Tiere signifikant gegenüber der Kontrollgruppe vermindert ($p < 0,0001$, t-Test). Die Gruppen der mit den Subfraktionen behandelten Tiere zeigen keinen signifikanten Effekt auf den Leptinwert im Serum nach 4-wöchiger Behandlung. Man kann bei der Gesamtsaponin- und S2-Fraktion eine Tendenz der Mittelwerte zu niedrigeren Leptinserumspiegeln im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennen. Die Daten des Serum-Leptins der Tiere entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand.

3.6. Korrelationsanalysen

3.6.1. Korrelationsanalyse von Leptin und Körpergewicht

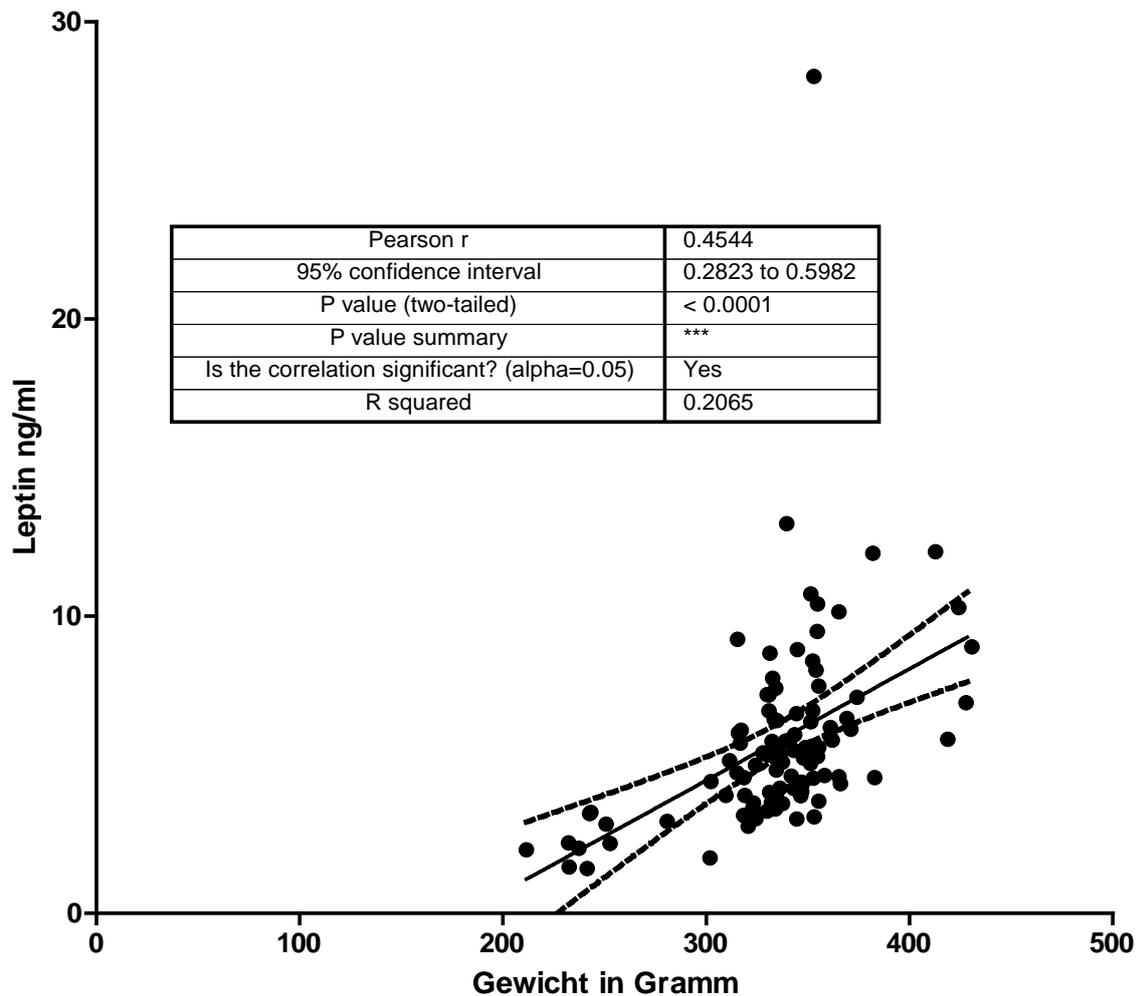


Abb. 13: Korrelationsanalyse von Leptinwerten und Körpergewicht. Die Leptinwerte korrelieren positiv mit dem Körpergewicht

Diese Korrelationsanalyse zeigt eine positive Korrelation der Leptinwerte im Verhältnis zum Körpergewicht. Verglichen wurde das Gewicht der Tiere aller Gruppen im Verhältnis mit den den Tieren zugehörigen Leptinwerten. Dies bedeutet je höher das Körpergewicht der Tiere ist, desto höhere Leptinspiegel sind zu erwarten. Die Werte zu Serum-Leptin und Körpergewicht der Tiere entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand.

3.6.2. Korrelationsanalyse PCNA-positive Zellen zu Serumleptin

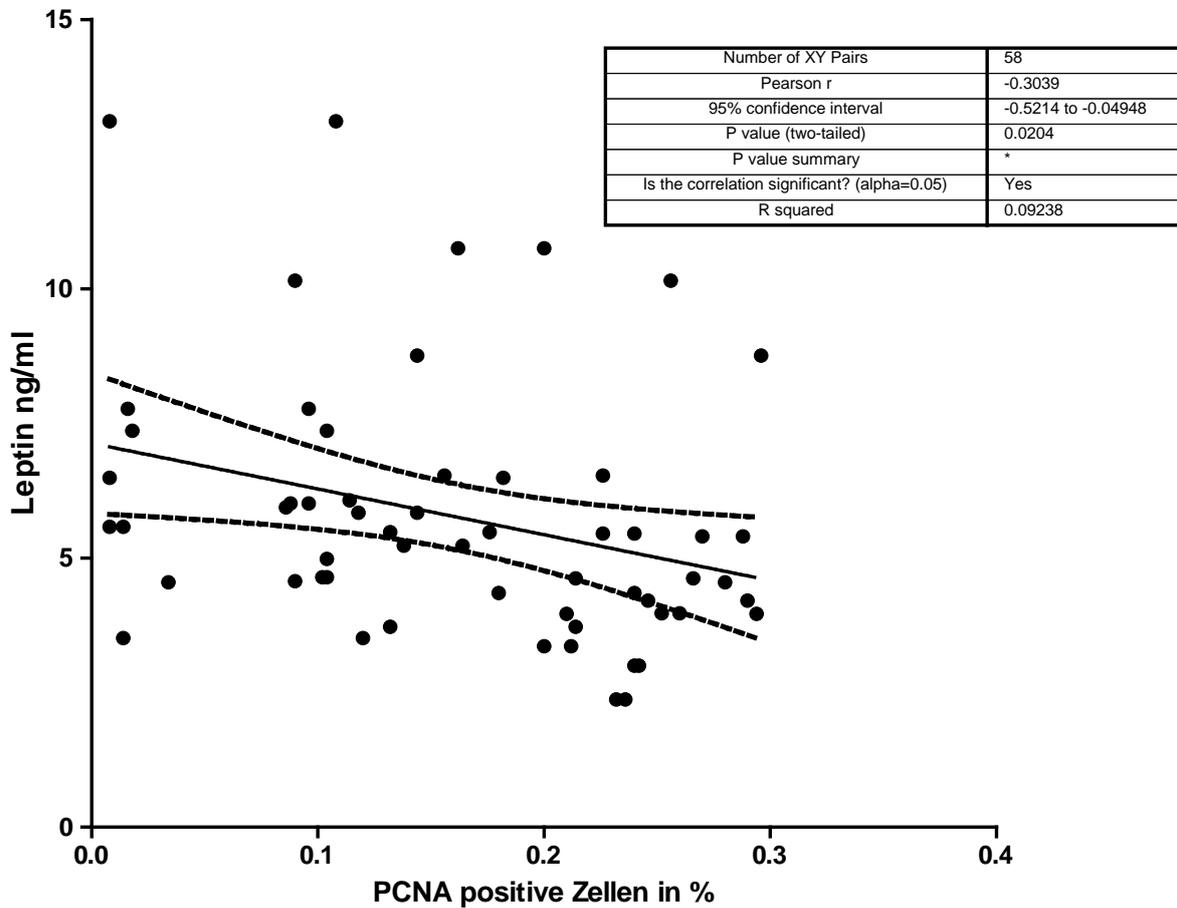


Abb. 14: Korrelationsanalyse von Leptinwerten und PCNA-positiven Kolonzellen. Die Leptinwerte korrelieren negativ mit den PCNA-positiven Zellen.

Diese Korrelationsanalyse zeigt eine negative Korrelation der Leptinwerte im Verhältnis zu den PCNA-positiven Kolonzellen. Verglichen wurde das Verhältnis der PCNA-positiven Enterozyten zur Gesamtzahl der gezählten Enterozyten pro Subgruppe. Dies bedeutet, je höher die Proliferationsrate der Enterozyten, desto niedrigere Leptinwerte waren zu erkennen. Die Werte des Serum-Leptins der Tiere entstammen einem Datenpool, der mehreren an diesem Projekt beteiligten Doktoranden zur Verfügung stand.

3.6.3. Weitere Korrelationsanalysen

Die Korrelationsanalysen der folgenden Parameter zeigen keine Korrelation zueinander und werden daher nicht gesondert graphisch dargestellt.

1) PCNA-positive Zellen in % zu Serumcholesterol in mg/dl (p-Wert: 0,0715)

2) PCNA-positive Zellen in % zu Serum-LDL in mg/dl (p-Wert: 0,0794)

3) Leberfettgehalt in % zu Serumcholesterol in mg/dl (p-Wert: 0,4569)

4) Leberfettgehalt in % zu Serumleptin in ng/ml (p-Wert: 0,921)

5) Leberfettgehalt in % zu Serum-LDL in mg/dl (p-Wert: 0,2023)

4. Diskussion

4.1. Leberfettanteile

Nach 4-wöchiger Therapie der ovx Ratten mit CR BNO 1055-Subfraktionen und Estradiolbenzoat ergab die Untersuchung des Anteils von Fettgewebe am Leberparenchym im Vergleich zur Kontrollgruppe einen signifikant erhöhten Fettgehalt bei einer Gruppe von Versuchstieren, welche mit der R3-Subfraktion behandelt wurden. Diese Fraktion enthält als Hauptbestandteil Methylserotonin und in Spuren Zimtsäurederivate. Die übrigen Versuchstiere, welche mit den anderen Subfraktionen oder Estradiolbenzoat behandelt wurden, zeigten keinen signifikanten Anstieg des Leberfettanteiles im Vergleich zu Kontrollgruppe. Lüde et al. konnten 2007 als erste in einer tierexperimentellen Studie an Wistar-Ratten zeigen, dass eine Dosis von 1000 mg/kg Körpergewicht CR-Extrakt eine mikrovesikuläre Steatose auslösen kann. Sie erklären diesen Effekt mit einer Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation und einer Störung der mitochondrialen Zellmembranstabilität. Die gestörte β -Oxidation führt zu einer Akkumulation von langkettigen Fettsäuren und Triglyceriden und somit zu einer mikroskopisch sichtbaren Leberzellverfettung. Die gestörte mitochondriale β -Oxidation konnte 1995 bereits von Fromenty und Pessayre als Ursache für eine mikrovesikuläre Hepatosteatose identifiziert werden. Sie konnten zudem in Studien zeigen, dass eine milde Inhibition der mitochondrialen β -Oxidation auch zu einer mildereren Form der Leberzellverfettung, der makrovesikulären Steatose (siehe Einleitung Kapitel 1.3.1.1 – 1.3.1.2) führen kann (Fromenty und Pessayre 1995). Campos et al. zeigten 2012, dass CR-Extrakt Gabe bei Wistar-Ratten zu einer gestörten β -Oxidation in der Leber führen kann (Campos et al. 2012). Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Dosen waren im Vergleich zu der Studie von Lüde et al. gering. So wurde den Versuchstieren der R3-Gruppe 35,97 mg der R3-Subfraktion pro kg Futter verabreicht, was einer täglichen Substanzeinnahme von ca. 0,666mg Methylserotonin entsprach. Es existieren einige Studien, die einen Zusammenhang zwischen Serotonin und der Entwicklung einer Fettleber, bzw. einer NAFLD nachgewiesen haben. So zeigten Nocito et al. 2007 an Knockout-Mäusen ohne periphere Serotoninproduktion, dass diese bei hochkalorischer Diät signifikant seltener an einer Leberzellverfettung im Vergleich zu wildtyp Tieren erkrankten. Der Grund wird in der Bildung von Reaktiven Sauerstoffmetaboliten (ROS) bei der Degradation von Serotonin in der Leber gesehen. Verantwortlich für den Abbau von Serotonin und der Entstehung von ROS ist die Monoaminoxidase A (MAO-A). Die entstehenden ROS schädigen die mitochondriale Membran und führen zu Steatose und im weiteren Verlauf zu einer Leberzellapoptose.

Nocito et al. untersuchten den Effekt einer Hemmung der MAO-A auf die Leberfettanteile und kamen zu dem Ergebnis, dass die Fettakkumulation als Zeichen eines Leberzellschadens bzw. eines mitochondrialen Schadens bei hochkalorischer Diät in Kombination mit MAO-A-Hemmern geringer ausgeprägt war, als bei den Wildtyp-Tieren unter hochkalorischer Diät (Nocito et al. 2007). In einer weiteren Studie wurde der Effekt eines peripheren Serotoninantagonisten auf den Grad der Leberverfettung bei adipösen Mäusen untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Serotoninantagonisten Palonosetron und Tropisetron den Grad einer NAFLD verringern können (Haub et al. 2011). Der in der vorliegenden Arbeit gefundene erhöhte Leberfettanteil in der R3-Gruppe lässt sich theoretisch pathophysiologisch durch die zitierten Studien erklären. Der Pathomechanismus, über den Serotonin an der Entstehung einer NAFLD mitwirkt, bezieht den mitochondrialen Stoffwechsel als zentralen Aspekt für deren Entstehung mit ein. In den meisten Studien, die sich mit der Lebertoxizität von CR-Extrakt befassen, ist auf die Akutschädigung der Leber im Sinne einer Transaminasenerhöhung eingegangen worden. Lüde et al. untersuchten die Auswirkung von CR-Extrakt auf den Leberfettanteil. Die Dosis an CR-Extrakt, die eine mikroskopisch nachweisbare Leberzellverfettung ergab, war mit 1000 mg/kg KG höher als die in der vorliegenden Arbeit verwandten Dosen. Eine Substanzeinnahme von 1000 mg/kg Körpergewicht entspricht bei einem Rattengewicht von durchschnittlich 300g einer Aufnahme von 300mg CR-Extrakt pro Tag. Lüde et al. konnten bei geringeren Dosen von 10mg/kg KG, 100 mg/kg KG und 300mg/kg KG CR-Extrakt keinen Effekt auf den Fettstoffwechsel der Leber von Wistar-Ratten feststellen. Campos et al. stellten bereits bei einer CR-Extrakt Dosis von 0,6mg/kg KG eine Auswirkung auf den Fettstoffwechsel in der Leber fest. Jedoch ist zu sagen, dass bei den untersuchten Ratten ebenfalls eine renovaskuläre Hypertonie induziert wurde und der Leberfettgehalt nicht untersucht wurde (Campos et al. 2012). Abschließend ist zu sagen, dass die Ergebnisse von erhöhten Leberfettanteilen in der R3-Gruppe mit den Studien zu der Wirkung von Serotonin auf die Leber vereinbar sind. Die vorliegenden Ergebnisse der R3-Gruppe präsentieren sich zwar signifikant, aber in einer kleinen Gruppe bei hoher Standardabweichung, sodass ohne einen langfristigen Verlauf beobachtet zu haben auch nur eine eingeschränkte Aussage über einen möglichen pathologischen Effekt gemacht werden kann. Fromenty und Pessayre beschrieben 1995, dass eine milde Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation zu einer makrovesikulären Steatose führen kann. Es ist möglich, dass die in dieser Arbeit gezeigten makrovesikulären Fettansammlungen in der R3-Gruppe auf eine solch milde Hemmung der mitochondrialen β -Oxidation zurückzuführen sind. Weshalb Lüde et al. 2007 im Unterschied zu dieser Arbeit bei den niedrigeren Dosen keine makrovesikuläre Steatose gefunden haben,

könnte sich dadurch erklären lassen, dass kompletter CR-Extrakt und nicht selektiv einzelne Subfraktionen getestet wurden, sodass mögliche Interaktionen zwischen den einzelnen Wirkstoffen bei geringerer Dosierung keinen Lebereffekt gezeigt haben oder einzelne Inhaltsstoffe des CR-Extraktes gar Leberzellprotektiv wirken könnten. Diese Überlegung deckt sich mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, denn in der ebenfalls verabreichten Gesamtestraktion, welche die Subfraktionen R1 – R3 beinhaltet, wurde kein Lebereffekt gesehen. Die Dosis der Gesamtestraktion liegt mit 7,26 mg/Tag Substanzeinnahme zudem in dem getesteten Dosisbereich von Lüde et al. zwischen 10 mg/kg KG und 100 mg/kg KG. Der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Effekt lässt sich möglicherweise deutlicher darstellen, wenn man in folgenden Studien die verwendete Dosis in der R3-Gruppe in verschiedenen Gruppen abgestuft erhöht und die Therapie über einen längeren Zeitraum laufen lässt. Man sollte untersuchen, ob sich überhaupt ein funktioneller Leberschaden entwickeln kann und ob die in dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse einen pathologisch relevanten Effekt zeigen. Eine weitere Überlegung für zukünftige Experimente ist, Ratten bei hochkalorischer Diät mit ausgesuchten Subfraktionen zu behandeln und zu untersuchen, ob eine von diesen Subfraktionen sich protektiv auf den Grad der Verfettung auswirken könnte.

4.2. Proliferationsaktivität in der Kolonschleimhaut

Die Proliferationsaktivität der Kolonschleimhaut wurde mithilfe der PCNA-Färbung bestimmt. Östrogene wirken im apikalen Teil der Krypten antiproliferativ über den ER β und im basalen Anteil der Krypten proliferationsfördernd über den ER α . Wloda-Hiraike et al. zeigten 2006, dass Mäuse ohne ER β eine gestörte Apoptoserate und einen geringeren Differenzierungsgrad des Kolonepithels aufweisen. Cho et al. konnten eine Proliferationssteigerung der Enterozyten unter Östrogentherapie sowie im Gegensatz dazu eine Erhöhung der adenomatösen Entartung und Minderung der Proliferationsaktivität des Kolonepithels bei ER-Knockout-Mäusen zeigen (Cho et al. 2007).

Epidemiologische Daten aus großen Kohortenstudien über HET in der Postmenopause zeigen einen protektiven Effekt der HET auf das Risiko an einem KRK zu erkranken (Delellis Henderson et al. 2010). Dieser positive Effekt von Östrogenen auf die Gesundheit der Kolonschleimhaut, vermittelt über ER α und ER β , soll den Wirkungen der CR BNO 1055-Subfraktionen auf das Kolonepithel gegenüber gestellt und diskutiert werden. Bei der Analyse der Zellproliferation der Kontrollgruppe fällt eine im Vergleich zu Vorstudien relativ hohe Zellproliferationsrate von ungefähr 15% PCNA-positiven Zellen auf. So zeigten Hoff und

Chang 1979 eine unter Östrogenmangel entstehende Kryptenhypoplasie und eine niedrige Zellsyntheserate (Hoff und Chang 1979). Auch Untersuchungen in unserer Abteilung mit unterschiedlichen Substanzen im Vergleich zu Estradiolbenzoat und ovx Kontrolltieren ergab eine niedrigere Proliferationsrate im Kolonepithel bei den Tieren der Kontrollgruppe (Bein 2010). Diese Studie lief jedoch über einen Zeitraum von 3 Monaten, wohingegen die hier diskutierten Ergebnisse die Proliferationsrate nach 4-wöchiger Behandlung und Beobachtung widerspiegeln. Dies kann einen kleineren Effekt auf die initiale Abnahme der Proliferationsrate bei den Kontrolltieren erklären. Die Proliferationsaktivität der Kolonschleimhaut unter der Gabe von CR-Extrakt oder deren Subfraktionen ist bisher noch nicht eingehend untersucht worden. Eine Studie unserer Abteilung stellte nach einer 3-monatigen Therapiestudie mit u.a. CR-Extrakt keinen Effekt auf die Expression von ER α oder ER β in der Kolonschleimhaut fest (Seidlová-Wuttke et al. 2009).

In meiner Arbeit konnte ich im Vergleich zur ovx Kontrollgruppe ebenfalls keinen signifikanten Effekt der CR BNO 1055-Subfraktionen auf die Proliferationsaktivität im Kolonepithel finden. Die Proliferationsaktivität der getesteten Subgruppen bewegt sich, mit einer pro Gruppe unterschiedlichen Standardabweichung um 15-17% PCNA positiver Zellen und entspricht somit der Proliferationsrate der Kontrollgruppe bzw. weicht nicht signifikant von dieser ab. Die E2-Fraktion zeigt im Vergleich zur Kontrollgruppe eine signifikant höhere Proliferationsrate. Diese erhöhte Proliferationsrate unter E2-Therapie lässt sich mit den Studien von Cho et al. 2007 in Einklang bringen und wird vor dem Hintergrund einer geringeren Inzidenz von KRK nach Hormonersatztherapie wohl als positiver Effekt gewertet werden können (Delellis Henderson et al. 2010; Cho et al. 2007; Barzi et al. 2013). Abschließend ist zu sagen, dass die CR BNO 1055-Subfraktionen keinen nachweisbaren Effekt auf die Darmschleimhaut im Sinne der Proliferationsrate ausüben. Die Analyse der Apoptoserate wäre unter dem Gesichtspunkt der Kolonkarzinomprotektion eine weitere interessante Methode, welche detaillierter Aufschluss über die Wirkweise der untersuchten Substanzen auf die Kolonschleimhaut geben könnte. Wie oben erwähnt, ist die protektive Wirkung von Östrogenen auf das KKR über die Epidemiologie und besonders über die Verteilung und Funktion der beiden Östrogenrezeptoren erklärbar, sodass im Vergleich erhöhte Proliferationsraten als positiv zu werten wären. In weiteren Arbeiten sollte insbesondere detaillierter auf die Grenze zwischen benigner Proliferationsrate im Rahmen eines gesunden Zellturnovers und potentiell maligner Proliferationsrate eingegangen werden.

4.3. Körpergewicht und Futteraufnahme

Wie im Material- und Methoden-Teil bereits erwähnt, entstammen die Daten über die Futteraufnahme und das Körpergewicht der Tiere einem Datenpool, der mehreren Doktoranden der Abteilung Endokrinologie zur Verfügung stand. Die Tiere hatten im gesamten 4-wöchigen Versuchsablauf freien Zugang zu Futter und Wasser. Das Futter der Tiere bis zur Ovx war eine spezielle sojafreie Futtermischung, da konventionelles Rattenfutter üblicherweise Soja enthält und darin partiell östrogenaktive Substanzen, sogenannte Phytoöstrogene, zu finden sind, die den Effekt von Therapiestudien an ovariectomierten Ratten verfälschen können. Nach der Ovx bekamen die Tiere für 4 Wochen dieses spezielle, mit den verschiedenen Subfraktionen und Estradiolbenzoat angereicherte sojafreie Futter, zu welchem sie ebenfalls *ad libitum* freien Zugang hatten. In der ersten Woche nach Ovx reduzierte sich die Futteraufnahme in allen Gruppen, erholte sich im Verlauf jedoch gleichmäßig bei 9 Gruppen, bis auf die E2-Gruppe, wieder auf eine Futteraufnahmemenge von 17-19 Gramm pro Tier pro Tag. Die Abnahme der anfänglichen Futteraufnahme lässt sich durch den postoperativen Stress der Ratten erklären. Die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme der mit Estradiolbenzoat behandelten Tiere blieb jedoch mit 10,8 Gramm pro Tier pro Tag signifikant unter den anderen Gruppen. Die Reduktion der Futteraufnahme unter Estradioltherapie stimmt mit den Beobachtungen anderer Studien überein (Landau und Zucker 1976). Eine Korrelationsanalyse bestätigt eine positive Korrelation zwischen der durchschnittlichen Futteraufnahme und dem Körpergewicht am Ende der Studie und zeigt die E2-Gruppe als Ausreißer mit niedriger Futteraufnahme von 10,8 Gramm/Tag und niedrigstem durchschnittlichen Körpergewicht von 248,4 Gramm am Ende der Studie. Die reduzierte Futteraufnahme unter Östradioltherapie in Verbindung mit einer höheren Aktivität der Ratten wurde bereits in früheren Studien beschrieben (Zucker und Landau 1976; Stern und Murphy 1972). Meli et al. beobachteten 2004 zudem, dass eine Estradioltherapie bei ovx Ratten die Futteraufnahme und das Körpergewicht auf physiologisches Niveau reduzieren kann. Wie in der Korrelationsanalyse gezeigt werden konnte, hängt das Körpergewicht der Ratten mit der täglichen Futteraufnahme zusammen. Unabhängig von der Nahrungszufuhr lässt sich kein Effekt durch die getesteten Substanzen auf das Körpergewicht erkennen.

4.4. Einfluss von CR 1055-Subfraktionen und E2 auf Serumlipidparameter

4.4.1. Serumcholesterol

Wie zu den Graphen im Ergebnisse-Teil bereits beschrieben, entstammen die Daten über das Serumcholesterol einem Datenpool, der mehreren Doktoranden, die an diesem Projekt beteiligt waren, zur Verfügung stand. Die Analyse des Serumcholesteroles zeigt eine signifikante Reduktion der Cholesterolkonzentration bei der mit Estradiolbenzoat behandelten Gruppe E2. Die Gruppen, die mit den CR BNO 1055-Subfraktionen behandelt wurden, zeigen keinen signifikanten Effekt auf die Serumcholesterolkonzentration nach 4-wöchiger Therapie. In bisher durchgeführten Studien konnte an postmenopausalen Frauen kein Effekt von CR-Extrakt auf das Serumcholesterol festgestellt werden (Spangler et al. 2007; Verhoeven et al. 2007). Eine kürzlich publizierte Studie aus unserer Abteilung zeigt eine Reduktion des Serumcholesteroles nach 4-wöchiger CR BNO 1055-Extrakt Behandlung bei ovx SD-Ratten (Seidlová-Wuttke et al. 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte unter Therapie mit Subfraktionen des CR BNO 1055-Extraktes kein positiver Effekt im Sinne einer Reduktion des Gesamtcholesteroles an SD-Ratten gezeigt werden. Die Mittelwerte in allen Gruppen entsprechen denen der Kontrollgruppe. Die beobachtete Reduktion des Serumcholesteroles in der E2-Gruppe stimmt mit vorherigen Studien überein. So konnten Liu und Bachmann 1998 ebenfalls am Rattenmodell zeigen, dass eine Therapie mit Östrogenen den Serumcholesterolspiegel senkt. Neben den tierexperimentellen Studien belegen zahlreiche Studien an postmenopausalen Frauen den Effekt von HET auf den Cholesterolspiegel (Walsh et al. 1991, Tonstad et al. 1995, Van der Mooren et al. 1992; De Franciscis et al. 2013). Der niedrigere Serumcholesterolspiegel bei der E2-Gruppe lässt sich über eine estradiolstimulierte Aufnahme von LDL und HDL in die Leber und das periphere Gewebe erklären (Cooper et al. 1987). Durch die Aufnahme der Lipoproteine steigt der Cholesterolgehalt in den Zellen und hemmt dadurch die endogene Produktion. Zudem wird Cholesterol aus dem Serum eliminiert. Die Auswertung der Serumcholesterolkonzentrationen der einzelnen Subfraktionen in der vorliegenden Arbeit zeigt eine Übereinstimmung mit bisherigen Studien in Bezug auf die cholesterolsenkende Wirkung von Estradiolbenzoat. In zukünftigen Untersuchungen sollte näher auf die Rolle der Saponinfraktionen des CR BNO 1055-Extraktes in Bezug auf die Serumcholesterolkonzentration eingegangen werden. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich zwar keine signifikante Reduktion des Serumcholesteroles, neuere Studien wiesen diese Reduktion jedoch nach (Seidlová-Wuttke et al., 2012), sodass in diesem Bereich weitergehende Untersuchungen über einen

möglichen positiven Effekt von CR BNO 1055-Extrakt auf die Serumcholesterolwerte interessant sind.

4.4.2. LDL

Die Daten über das Serum-LDL entstammen einem Datenpool, der mehreren Doktoranden, die an diesem Projekt beteiligt waren, zur Verfügung stand. Es konnte bereits 1998 gezeigt werden, dass eine Ovariectomie bei Ratten das LDL erhöhen kann (Suda et al. 1998). Die Ursache liegt in einer durch Östrogenmangel und steigendem Alter verminderten Expression von LDL-Rezeptoren in der Leber und im peripheren Gewebe (Chao et al. 1979; Cooper et al. 1987). Des Weiteren konnten Studien zeigen, dass eine Therapie mit Östrogenen die Konzentration von LDL senken kann (Liu und Bachmann 1998, Kuller et al. 1990). In bisherigen Studien über den Effekt von CR-Extrakt auf die Serumlipide konnten keine Auswirkungen auf den LDL-Spiegel beobachtet werden (Spangler et al. 2007; Verhoeven et al. 2007). In der Analyse der Konzentration des LDL-Cholesterols in den verschiedenen Gruppen zeigte sich eine signifikante ca. 60%ige Reduktion bei der mit Estradiolbenzoat behandelten Gruppe E2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die CR BNO 1055-Subfraktionen zeigen keinen Effekt auf die LDL-Konzentration nach 4-wöchiger Therapie. Diese Ergebnisse stimmen mit den bisherigen Studien zur Wirkung von Östrogenen und CR-Extrakt überein. Die Reduktion des LDLs in der E2-Gruppe wird pathophysiologisch durch eine erhöhte Expression von LDL-Rezeptoren und einer erhöhten Aufnahme des LDLs in die mit LDL-Rezeptoren ausgestatteten Gewebe unter Östrogeneinfluss erklärt (Cooper et al. 1987).

4.4.3. HDL

Die Daten über das Serum-HDL entstammen einem Datenpool, der mehreren Doktoranden, die an diesem Projekt beteiligt waren, zur Verfügung stand. HDL sind bekannt als die guten Fette und üben ihre protektive Wirkung auf das Herz-Kreislauf System über den Rücktransport von überschüssigem Cholesterol aus der Peripherie zurück zur Leber aus. Das Cholesterol wird dann in die Gallenflüssigkeit abgegeben und somit aus dem Körperkreislauf eliminiert. Im Gegensatz zum Menschen, dessen größter Anteil der Lipoproteine aus LDL besteht, ist der Anteil des HDL am Gesamtcholesterol bei Ratten viel höher. Die Ratte ist dennoch ein etabliertes Tiermodell zur Analyse der Blutlipidparameter, da sich trotz der unterschiedlichen Verteilung der Fraktionen ein mit menschlichen Daten vergleichbarer Wirkeffekt auf Veränderungen des Lipidprofils unter beispielsweise Östrogentherapie finden lässt. Die

Analyse der Serumkonzentration des HDLs in den verschiedenen Gruppen zeigt eine signifikante Reduktion des HDLs bei der E2-Gruppe. Ein Effekt der CR BNO 1055-Subfraktionen auf die HDL-Konzentration lässt sich nicht erkennen. Diese Ergebnisse stimmen mit bisherigen Studien zur Wirkung von CR-Extrakt auf Blutlipidparameter überein (Spangler et al. 2007; Verhoeven et al. 2007). Die Reduktion des HDLs in der Gruppe der mit Estradiolbenzoat behandelten Tiere erklärt sich über eine gleichzeitig gesteigerte Aufnahme von HDL und LDL. Beide Lipoproteine binden Apo-E vermittelt an den LDL-Rezeptor, der durch Östrogeneinfluss in höherem Ausmaß synthetisiert wird (Cooper et al. 1987; Chao et al. 1979). Diese estradiolabhängige Reduktion des HDL wurde durch meine Analyse bestätigt.

4.4.4. Triglyceride

Die Daten über die Serum-Triglyceride entstammen einem Datenpool, der mehreren Doktoranden, die an diesem Projekt beteiligt waren, zur Verfügung stand. Triglyceride erfüllen im Körper hauptsächlich eine Funktion als Energiespeicher in den Adipozyten. Postmenopausal erfolgt eine östrogenmangelbedingte Zunahme der Adipozyten, gepaart mit einer erhöhten Aktivität der endothelständigen Lipoproteinlipase, was zu steigenden Serumspiegeln von Triglyceriden führen kann (Hamosh und Hamosh 1975). Die Analyse der Triglyceridkonzentration in der vorliegenden Arbeit zeigte keinen signifikanten Unterschied der verschiedenen Gruppen zu den Werten der Kontrollgruppe. In der E2-Gruppe lässt sich eine Tendenz zu höheren Triglyceridwerten erkennen, was mit einigen Studien unserer Abteilung übereinstimmt. Nach 3 monatiger Behandlung mit Estradiolbenzoat wurde hier eine signifikante Zunahme der Triglyceridkonzentration beobachtet (Seidlová-Wuttke et al. 2010). Andere Studien zeigten keinen Effekt auf die Triglyceridwerte unter Östrogen Therapie (Suda et al. 1998). Die erhöhte Triglyceridkonzentration unter Erstradiolbehandlung erklärt sich durch eine erhöhte Syntheserate in der Leber in Kombination mit einer Hemmung der Lipoproteinlipase, welche zu einer erhöhten Serumkonzentration führen kann, da weniger Triglyceride in den Adipozyten aufgenommen werden (Weinstein et al. 1986; Pedersen et al. 1992). Rachón et al. konnten 2008 einen Abfall der Triglyceridkonzentration unter Therapie mit CR-Extrakt beobachten. Dieser Effekt kann in meiner Untersuchung nicht bestätigt werden. Es konnte kein Effekt der CR BNO 1055-Subfraktionen auf die Konzentration der Triglyceride beobachtet werden, was mit den Studien von Spangler et al. und Verhoeven et al. aus dem Jahr 2007 übereinstimmt.

4.4.5. Leptin

Die Daten über das Serum-Leptin entstammen einem Datenpool, der mehreren Doktoranden, die an diesem Projekt beteiligt waren, zur Verfügung stand. Studien konnten zeigen, dass der Leptinspiegel bei der postmenopausalen Frau als Konsequenz des östrogenmangelbedingten höheren Körperfettanteiles zunimmt (Poehlmann et al. 1995; Gower et al. 2000). Weitere Experimente an ovx Ratten zeigten, dass sich unter Estradioltherapie die Leptinwerte wieder auf ein physiologisches Maß reduzieren ließen (Meli et al. 2004). In anderen Studien hingegen ließ sich jedoch kein Effekt von Estradioltherapie auf die Leptinwerte bei postmenopausalen Frauen beobachten (Gower et al. 2000; Springer et al. 2013). In der Analyse der Leptinwerte fällt eine signifikante Reduktion bei der E2 Gruppe auf. Die CR BNO 1055-Subfraktionen zeigen in meinen Untersuchungen keinen signifikanten Effekt auf das Leptin. Seidlová-Wuttke et al. zeigten 2012 in einer Studie eine signifikante Reduktion des Leptinwertes unter CR BNO 1055-Extrakt bei SD-Ratten im Vergleich zur ovx Kontrollgruppe (Seidlová-Wuttke et al. 2012). Die zuvor erwähnte Studie legt nahe, dass eine Reduktion des Leptinspiegels ein Resultat aus dem Zusammenspiel der einzelnen Subfraktionen sein könnte. In meiner Arbeit konnte ich bei der isolierten Gabe der CR BNO 1055-Subfraktionen keine Reduktion des Leptinspiegels im Serum der untersuchten Ratten feststellen. Die Reduktion der Werte unter Estradioltherapie gehen mit den Ergebnissen von Meli et al. einher (Meli et al. 2004). Die tägliche Nahrungsaufnahme der Tiere war in den ersten Wochen signifikant niedriger als in den anderen Gruppen. Die reduzierte Futtermittelaufnahme und eine erhöhte Aktivität der Tiere unter E2-Therapie wird in Kapitel 4.3 diskutiert. Die Leptinkonzentration im Serum ist abhängig vom Körperfettanteil. Eine reduzierte Futtermittelaufnahme und eine erhöhte Aktivität unter E2-Therapie können somit auch einen niedrigeren Leptinspiegel als Folge geringerer Fettmasse der Tiere der E2-Gruppe erklären. Der Leptinspiegel korreliert positiv mit dem Körpergewicht und bestätigt den bekannten Zusammenhang von Körpergewicht, Körperfettanteil und Leptinwerten (Considine et al. 1996).

4.5. Korrelationsanalysen

4.5.1. Korrelation von PCNA-positiven Zellen zu Serumleptin

Diese Korrelationsanalyse zeigt einen Zusammenhang zwischen erhöhter Proliferationsaktivität und niedrigeren Leptinwerten. Dieser Effekt gründet vornehmlich auf der Wirkung von Estradiolbenzoat auf die Serumleptinwerte und auf die Kolonepithelproliferation. Nimmt man die Estradiolbenzoat-Gruppe aus der Korrelationsanalyse heraus, so ergibt sich keine Korrelation zwischen den Leptinwerten der CR-Subfraktionsgruppen und der Kolonepithelproliferation in den Gruppen der mit den CR-Subfraktionen behandelten Tiere. Der Einfluss von Estradiolbenzoat auf die Leptinwerte und auf das Kolonepithel wurde in den vorangegangenen Kapiteln diskutiert.

4.5.2. Weitere Korrelationsanalysen

Es wurden weiterhin die Serumparameter LDL, Cholesterol und Leptin jeweils mit dem Leberfettgehalt und den PCNA-positiven Enterozyten korreliert. Eine Fragestellung dieser Korrelationsanalysen betraf einen möglichen Zusammenhang von Leberfettgehalt und Kolonepithelproliferation mit diesen Serumlipidparametern im Sinne eines möglichen metabolischen Effektes der CR BNO 1055-Subfraktionen. Es konnte in keiner der Analysen eine - weder positive noch negative - Korrelation nachgewiesen werden. Bezüglich des Leberfettgehaltes bedeutet dies auch, dass mit dem relativ hohen Leberfettgehalt der R3-Subfraktion des CR BNO 1055-Extraktes keine Verbindung zu einem entgleisten Lipidstoffwechsel gezogen werden kann. Dies kann auf einen leberspezifischen Prozess in der R3-Subfraktion hindeuten. Pathophysiologische Aspekte und Studien zu dem in der R3-Subfraktion vorherrschendem Methylserotonin und der Steatose wurden in Kapitel 4.1. diskutiert.

5. Zusammenfassung

Die in der Einleitung dieser Arbeit beschriebene positive Wirkung von CR-Extrakt auf postmenopausale Beschwerden und Hitzewallungen kann auf Grundlage der durchgeführten Versuche nicht um die Faktoren „Kolonkarzinomprophylaxe“ und „positiver Effekt auf ausgewählte Blutlipidparameter“ ergänzt werden. Die fördernde Wirkung von Estradiolbenzoat auf die Zellproliferation in der Darmschleimhaut stimmte mit vorherigen Studien überein. Auch die festgestellte Senkung der Blutlipidparameter Gesamtcholesterol, LDL, HDL und Leptin durch Estradiolbenzoat war kohärent mit vorherigen Studien zu diesem Thema. Für die verwendeten Dosen der CR BNO 1055-Subfraktionen konnte keine signifikante Erhöhung der Kolonzellproliferation gefunden und auch kein Effekt auf die Blutlipidparameter gesehen werden.

In Bezug auf die Lebersicherheit konnte bei einer Subfraktion, der R3-Fraktion, ein im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöhter Leberfettgehalt nach 4-wöchiger Applikation festgestellt werden. Die übrigen 7 Subfraktionen zeigten jedoch keine Erhöhung des Fettanteiles und stellen insgesamt ein positives Ergebnis dar, was die Lebersicherheit des CR BNO 1055-Extraktes betrifft. Für das als Hauptbestandteil in der R3-Fraktion vorkommende Methylserotonin konnten einige Studien gefunden werden, die einen Zusammenhang zwischen Serotoninstoffwechsel und Leberzellschädigung und Leberverfettung beschreiben, sodass das Ergebnis dieser Arbeit pathophysiologisch konsistent mit bisherigen Untersuchungen zu diesem Thema ist und in weiteren Studien eingehender untersucht werden sollte.

6. Methodischer Anhang

Substanz	Zeit
50%ig Ethanol	1 Std
75%ig Ethanol	1 Std 20 Min
75%ig Ethanol	1 Std 20 Min
96%ig Ethanol	1 Std 20 Min
96%ig Ethanol	1 Std 20 Min
100%ig Ethanol	1 Std 20 Min
100%ig Ethanol	1 Std 20 Min
100%ig Ethanol	1 Std 20 Min
Xylol	1 Std 20 Min
Xylol	1 Std 20 Min
Paraffin	1 Std
Paraffin	1 Std

6.1. Ölrot Färbung:

	Lösung	Dauer
1	60% Isopropyl-Alkohol	5 Min.
2	Ölrot-O	Ca. 10 Min
3	60% Isopropyl-Alkohol	Kurz
4	Aqua Dest.	Kurz abspülen
5	Hämalaun nach Mayer	3-5 Min
6	Destilliertes Wasser	kurz abspülen
7	Leitungswasser mehrmals wechseln	10 Min
8	Eindecken der Schnitte mit Xylol	

Nach Herstellung einer 0,5%igen Oil red O-Stammlösung wurde diese über Nacht stehen gelassen. Die Gebrauchslösung wurde aus 6 Teilen der Stammlösung und 4 Teilen zweifach destilliertem Wasser hergestellt und 24 Stunden ruhen gelassen. Vor jedem Gebrauch wurde die Gebrauchslösung durch Faltenfilter (Whatman GmbH (Schleicher und Schuell), Dassel)

gefiltriert. Nachdem die Objektträger 30 Minuten lang auf Zimmertemperatur gebracht worden waren, wurden diese für 5 Minuten in 60%igen Isopropyl-Alkohol getaucht und anschließend 10 Minuten lang in Oil red O-Gebrauchlösung gefärbt. Nach weiteren kurzen Bädern in 60% Isopropyl-Alkohol und destilliertem Wasser erfolgte die Färbung mit Hämatoxylin für 10 Minuten. Um eine Blaufärbung zu erreichen, wurden die Präparate für weitere 10 Minuten unter fließendes Leitungswasser gehalten und schließlich mit Deckgläsern in Aquatex (Merck) eingedeckt.

6.2. Immunzytologische PCNA Färbung

Basierend auf dem Basisprotokoll für Immunzytologische Färbungen in der Arbeitsgruppe-Endokrinologie der Universitätsmedizin Göttingen

1	Entparaffinierung	Xylol 5 Min
		Xylol 5 Min
		Xylol 5 Min
	Rehydratation in aufsteigender Ethanolkonzentration	100% Ethanol 3 Min
		100% Ethanol 3 Min
		100% Ethanol 3 Min
		96% Ethanol 2 Min
		96% Ethanol 2 Min
		75% Ethanol 2 Min
		Destilliertes Wasser 5 Min
	Epitop-Auffindung	Schnitte in ein Plastikgefäß mit 0,01M Zitratpuffer pH 6,0.
		Kochen bei 750 Watt (Mikrowelle) für 5 Min.
		Mit Zitratpuffer auffüllen
		Abkühlen lassen 20 Min
	Dehydratation in aufsteigender Alkoholkonzentration	75% Ethanol für 2 Min

		96% Ethanol für 2 Min
		96% Ethanol für 2 Min
		100% Ethanol für 2 Min
	Blocken der Peroxidaseaktivität	3% Wasserstoffperoxid in Methanol für 30 Min
	Rehydratation in aufsteigender Ethanolkonzentration	100% Ethanol für 2 Min
		96% Ethanol für 2 Min
		96% Ethanol für 2 Min
		75% Ethanol für 2 Min
		Destilliertes Wasser. Für 3 Min
		Schnitte in 1x PBS waschen für 10 Min
	Blocken der nicht spezifischen Immunglobuline mit Normalserum der Ziege	Bedecken der Schnitte für 30 Min
		Schnitte in 1x PBS waschen für 10 Min
	Auftragen des Primärantikörpers	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)(PC10) mouse monoclonal IgG 2a, 200µg/ml (Santa Cruz Biotechnology, Cat' sc-56, Lot I1902) mit der Arbeitsverdünnung von 1:800. Verdünnt mit DakoCytomation Antibody Diluent with Background Reducing Components Ready-to-use Code S3022
		Bedecken der Schnitte für 30 Min
		Schnitte in 1x PBS waschen für 10 Min
	Auftragen des Sekundärantikörpers	DakoCytomation EnVision+Dual Link System-HRP(DAB+) Code K4046 für Primärantikörper rabbit und mouse. Der Antikörper ist ohne weitere Verdünnung zu nutzen.
		Bedecken der Schnitte für 30 Min
		Schnitte in 1x PBS waschen für 10 Min
	DAB Reagenz	Bedecken der Schnitte für 10 bis 15 Min, je nachdem, wann der Farbton in Braun umschlägt
		Mit destilliertem Wasser abspülen

		Mit destilliertem Wasser auf Schüttler waschen für 3 Minuten
	Gegenfärbung	Hämatoxin. Eintauchen für 5 bis 10 Sekunden
		Wässern unter Leitungswasser für 3 Minuten
		Schnitte in Leitungswasser stehen lassen für 8 Minuten
	Dehydratation in aufsteigender Alkoholkonzentration	75% Ethanol für 2 Minuten
		96% Ethanol für 2 Minuten
		96% Ethanol für 2 Minuten
		100% Ethanol für 2 Minuten
		100% Ethanol für 2 Minuten
		100% Ethanol für 2 Minuten
		Xylol 5 Minuten
		Xylol 5 Minuten
		Xylol 5 Minuten
	Eindecken der Schnitte	Eindecken der Schnitte mit DePex. Mounting medium und Deckgläsern der Fa. Menzel 24x40

6.3. Protokoll für Technovit Kunststoffblockherstellung:

Fixation	4% neutral gepufferte Formalinlösung mit 0,1 M Phosphatpuffer	36Std	Temperatur °C
Dehydratation 1	Ethanol 70%	24Std	T 20°C
Dehydratation 2	Ethanol 80%	24Std	T 20°C
Dehydratation 3	Ethanol 96%	24Std	T 20°C
Dehydratation 4	Ethanol 96%	24Std	T 20°C
Dehydratation 5	Ethanol 100%	24Std	T 20°C
Dehydratation 6	Ethanol 100%	24Std	T 20°C
Dehydratation 7	Ethanol 100%	24Std	T 20°C
Intermedium 1	Xylol	24Std	T 20°C
Intermedium 2	Xylol	24Std	T 20°C
Präinfiltration 1	Xylol/MMA Basis (stab.) 1:1	24Std	T 10°C
Präinfiltration 2	MMA Basis (entstab.)	24Std	T 4°C
Präinfiltration 3	MMA Basis (entstab.)+ Härter 1	24Std	T 4°C
Infiltration	MMA Basis (entstab.)+ Härter 1+PMMA	3Tage	T 4°C

6.4. Verwendete Substanzen und Geräte

Hämatoxylin	Von Mayers Hämalaunlösung für die Mikroskopie, Artikel-Nr.: 109249, Merck KGaA Verdünnung 1:2 mit Aqua bidestillata
Isopropyl-Alkohol	Merck KGaA, Nr.: 1.09634.1000
Xylol	Jtbaker, Mallinckrodt Baker, Griesheim, Bestell-Nr. 8118
Alkohole	75% Ethanol vergällt abgefüllt durch das Universitätsklinikum Göttingen (UKG) 96% Ethanol vergällt abgefüllt durch das UKG 100% Ethanol vergällt abgefüllt durch das UKG
Aqua bidestillata	Abgefüllt durch das UKG
Zitratpuffer	0,01M Zitratpuffer pH 6,0: 2,94g tri-Natriumcitrat Dihydrat Merck KGaA, Darmstadt, Bestell-Nr: 1.06447.5000 1l Aqua bidestillata
Phosphatpuffer	10-fach konzentrierter Phosphatpuffer (PBS):

	<p>Herstellung auf 1 Liter Aqua bidestillata</p> <p>80g NaCl Merck KGaA, Darmstadt, Bestell-Nr.: 106404</p> <p>2g KCl Merck, KGaA, Darmstadt, Bestell.-Nr. :104936</p> <p>11,5g H₂SO₄ Merck, KGaA, Darmstadt, Bestell.-Nr.: 106329</p> <p>2g KH₂PO Merck, KGaA, Darmstadt, Bestll.-Nr.: 104873</p> <p>1-fach konzentrierter PBS:</p> <p>100ml 10-fach konzentrierter PBS</p> <p>900ml Aqua bidestillata</p>
Peroxidase-Blockerlösung	<p>90ml Methanol JT Baker, Mallinckrodt Baker,Griesheim, Bestell-Nr.: 9263</p> <p>10ml 30% H₂O₂ Merck, KGaA, Darmstadt, Bestell-Nr.: 107209</p>
Unspezifische Blockerlösung	<p>Für 3ml:</p> <p>400 µl Bovinealbumin 7,5% Sigma-Aldrich Chemie GmbH München, Bestell-Nr.: A6003</p> <p>30 µl Ziegen Serum Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Bestell-Nr.: G9023</p> <p>2570 µl 1-fach konzentrierter PBS</p>
Antikörper-verdünnungsmedium	<p>Antibody Diluent with Background Reducing Components Ready to use, DakoCytomation Deutschland GmbH, Hamburg, Bestell-Nr.: S3022</p>
Primärantikörper	<p>Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)(PC10) mouse monoclonal IgG 2a, 200µg/ml Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Cat'sc-538, Lot' A2705</p>
Sekundärantikörper	<p>EnVision+ Dual Link System-HRP (DAB+) DakoCytomation Deutschland GmbH, Hamburg, Code K4065</p>
DAB(Diaminobenzidin)	<p>DAB, DakoCytomation Deutschland GmbH, Hamburg, Bestell-Nr.: K5007</p>
Eindeckmedium	<p>DePex, Mounting Medium, Fa. SERVA Electrophoresis GmbH, Heidleberg, Bestell-Nr.: 18243</p>
Betäubung	<p>CO₂-Gemisch aus Xylazin (Rompun, 2%), Bayer AG, Leverkusen und Ketamin (Ketavet), Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe</p>

Futter	EF R/M, E 150000-04, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest
Phytoöstrogene Zusatzsubstanzen zum Grundfutter	Changzhou Dahua Imp. & Exp Group, China
Estradiol-Zusatz zum Grundfutter	B-Estradiol-3-benzoate, Sigma Aldrich Chemie GmbH, München, Bestell-Nr.: E8515
Objektträger	SuperFrost Plus 26x76x1mm, Fa. Menzel, Braunschweig, Bestell-Nr.: J1800AMNZ
Rotationsmikrotom	Leica 2065 Supercut, Leica Biosystems GmbH, Nussloch
Paraffinstreckbad	Paraffinstreckbad 400 Watt, MEDAX GmbH & Co KG, Rendsburg, Bestell-Nr.: 25900
Trockenschrank	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Lichtmikroskop	Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG, Jena
Kamera	Olympus ColorView, Soft Imaging System GmbH, Münster
Software	analySIS® 3,0 (Soft Imaging System GmbH, Münster)
Statistik und Grafi- kauswertung	GraphPadPrism 5.01 (GraphPad Software, Inc, USA)
Ölrot O	Firma Sigma, Deisenhofen

7. Literaturverzeichnis

- Altunbas K, Yagci A, Bulbul A, Sevimli A, Ozdemir V (2007): The Effect of Ovarian Steroids on Colonic Epithelial Cell Proliferation and Apoptosis in Rats, *Acta Vet BRNO* 76, 605-612
- Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B; (2004): Women's Health Initiative Steering Committee. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 291, 1701- 12
- Anstee QM, Goldin RD (2006): Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research. *Int J Exp Pathol*. 87, 1-16
- Arbeeny CM, Rifichi VA, Eder HA (1987): The uptake of the apoprotein and cholesteryl ester of high-density lipoproteins by the perfused rat liver. *Biochim Biophys Acta*. 917, 9-17
- Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, Gustafsson JA, Löwik CW, Pols HA, van Leeuwen JP (1997) Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology* 138, 5067-70
- Assy N, Kaita K, Mymin D, Levy C, Rosser B, Minuk G (2000): Fatty infiltration of liver in hyperlipidemic patients. *Dig Dis Sci* 45, 1929-34
- Barzi A, Lenz AM, Labonte MJ, Lenz HJ. (2013): Molecular pathways: estrogen pathway in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 19(21), 5842-8
- Bedir E, Khan IA (2000): Cimracemoside A: A New Cyclolanostanol Xyloside from the Rhizome of *Cimicifuga racemosa*. *Chem Pharm Bull* 48, 425-427
- Bein, M., (2010): Der Einfluss von 20-Hydroxyecdysen und 17 β -Östradiol auf das Colonepithel und die Serumfette der Ovarerktomierten Sprague-Dawley Ratte als Therapiemodell der postmenopausalen Frau, *Med. Diss. Göttingen 2010*
- Bellentani S, Marino M. (2009): Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol. Suppl* 1, S4-8
- Bellino FL. (2000): Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 7, 14-24
- Beral V. (2003): Million Women Study Collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419-27
- Blumel JE, Castelo-Branco C, Binfal L, Gramegna G, Tacla X, Aracena B, Cumsille MA, Sanjuan A. (2000): Quality of life after the menopause: a population study. *Maturitas* 34, 17-23

- Brailion A, Capron JP, Hervé MA, Degott C, Quenum C. (1985): Liver in obesity. *Gut*. 26 (2), 133-9
- Bravo R, Celis JE. (1980): A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. *J Cell Biol* 84 (3), 795-802
- Campos LB, Gilglioni EH, Garcia RF, Brito Mdo N, Natali MR, Ishii-Iwamoto EL, Salgueiro-Pagadigorria CL. (2012): *Cimicifuga racemosa* impairs fatty acid β -oxidation and induces oxidative stress in livers of ovariectomized rats with renovascular hypertension. *Free Radic Biol Med*. 53(4), 680-9
- Castelli WP, Garrison RJ, Wilson PW, Abbott RD, Kalousdian S, Kannel WB. (1986): Incidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. The Framingham Study. *JAMA* 256 (20), 2835-8
- Chao YS, Windler EE, Chen GC, Havel RJ. (1979): Hepatic catabolism of rat and human lipoproteins in rats treated with 17 alpha-ethinyl estradiol. *J Biol Chem* 254 (22), 11360-6
- Cho NL, Javid SH, Carothers AM, Redston M, Bertagnolli MM. (2007): Estrogen receptors alpha and beta are inhibitory modifiers of Apc-dependent tumorigenesis in the proximal colon of Min/+ mice. *Cancer Res* 67 (5), 2366-72
- Chow EC, Teo M, Ring JA, Chen JW. (2008) Liver failure associated with the use of black cohosh for menopausal symptoms. *Med J Aust* 188 (7), 420-2
- Cinti S, Frederich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. (1997): Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. *Endocrinology* 138 (2), 797-804
- Clark JM, Brancati FL, Diehl AM. (2002): Nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 122 (6), 1649-57
- Cohen SM, O'Connor AM, Hart J, Merel NH, Te HS. (2004): Autoimmune hepatitis associated with the use of black cohosh: a case study. *Menopause* 11 (5), 575-7
- Considine RV, Sinha MK, Heiman ML, Kriauciunas A, Stephens TW, Nyce MR, Ohannesian JP, Marco CC, McKee LJ, Bauer TL (1996): Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. *N Engl J Med* 334 (5), 292-5
- Cooper AD, Nutik R, Chen J. (1987): Characterization of the estrogen-induced lipoprotein receptor of rat liver. *J Lipid Res* 28 (1), 59-68
- Davey DA, (2012): Update: estrogen and estrogen plus progestin therapy in the care of women at and after the menopause. *Womens Health (Lond Engl)* 8 (2), 169-89
- Day CP, James OF. (1998): Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology*. 114(4), 842-5

- De Franciscis P, Mainini G, Labriola D, Leo S, Santangelo F, Luisi A, Russo C, Cerreto FV, Ambrosio D, Torella M (2013): Low-dose estrogen and drospirenone combination: effects on metabolism and endothelial function in postmenopausal women with metabolic syndrome. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 40(2), 233-5
- Deetjen P., Speckmann E. J., Hescheler J.: *Physiologie*, 4.Auflage; S. 607,617; Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH; München 2005
- Delellis Henderson K, Duan L, Sullivan-Halley J, Ma H, Clarke CA, Neuhausen SL, Templeman C, Bernstein L. (2010): Menopausal hormone therapy use and risk of invasive colon cancer: the California Teachers Study. *Am J Epidemiol* 171 (4), 415-25
- Dennerstein L, Dudley EC, Hopper JL, Guthrie JR, Burger HG. (2000): A prospective population-based study of menopausal symptoms. *Obstet Gynecol* 96 (3), 351-8
- Dietschy JM. (1984): Regulation of cholesterol metabolism in man and in other species. *Klin Wochenschr* 62 (8), 338-45
- Di Leo A, Barone M, Maiorano E, Tanzi S, Piscitelli D, Marangi S, Lofano K, Ierardi E, Principi M, Francavilla A. (2008): ER-beta expression in large bowel adenomas: implications in colon carcinogenesis. *Dig Liver Dis* 40 (4), 260-6
- Farriol M, Venereo Y, Orta X, Castellanos JM, Segovia-Silvestre T. (2000): In vitro effects of melatonin on cell proliferation in a colon adenocarcinoma line. *J Appl Toxicol* 20 (1), 21-4
- Ferrannini E, Natali A, Bell P, Cavallo-Perin P, Lalic N, Mingrone G. (1997): Insulin resistance and hypersecretion in obesity. European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR). *J Clin Invest* 100 (5), 1166-73
- Frei-Kleiner S, Schaffner W, Rahlfs VW, Bodmer Ch, Birkhäuser M. (2005): Cimicifuga racemosa dried ethanolic extract in menopausal disorders: a double-blind placebo-controlled clinical trial. *Maturitas* 51 (4), 397-404
- Fromenty B, Pessayre D. (1995): Inhibition of mitochondrial beta-oxidation as a mechanism of hepatotoxicity. *Pharmacol Ther* 67 (1), 101-54
- Fromenty B, Pessayre D. (1997): Impaired mitochondrial function in microvesicular steatosis. Effects of drugs, ethanol, hormones and cytokines. *J Hepatol* 26 (2), 43-53
- Fromenty B, Berson A, Pessayre D. (1997): Microvesicular steatosis and steatohepatitis: role of mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *J Hepatol* 26 (1), 13-22
- Gower BA, Nagy TR, Goran MI, Smith A, Kent E. (2000): Leptin in postmenopausal women: influence of hormone therapy, insulin, and fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (5), 1770-5
- Gracia CR, Freeman EW, Sammel MD, Lin H, Mogul M. (2007): Hormones and sexuality during transition to menopause. *Obstet Gynecol* 109 (4), 831-40

- Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P. (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*. 1986 320 (6058), 134-9
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER. (1999): The menopause. *Lancet* 353 (9152), 571-80
- Grodstein F, Stampfer M. (1995): The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. *Prog Cardiovasc Dis* 38 (3), 199-210
- Grodstein F, Newcomb PA, Stampfer MJ. (1999): Postmenopausal hormone therapy and the risk of colorectal cancer: a review and meta-analysis. *Am J Med* 106 (5), 574-82
- Gudbrandsen OA, Rost TH, Berge RK. (2006): Causes and prevention of tamoxifen-induced accumulation of triacylglycerol in rat liver. *J Lipid Res* 47 (10), 2223-32
- Haffner SM, Valdez RA, Hazuda HP, Mitchell BD, Morales PA, Stern MP. (1992): Prospective analysis of the insulin-resistance syndrome (syndrome X). *Diabetes* 41 (6), 715-22
- Hall JM, McDonnell DP. (1999): The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140 (12), 5566-78
- Hamosh M, Hamosh P. (1975): The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat Adipose tissue. *J Clin Invest* 55 (5), 1132-5.
- Haub S, Ritze Y, Ladel I, Saum K, Hubert A, Spruss A, Trautwein C, Bischoff SC. (2011): Serotonin receptor type 3 antagonists improve obesity-associated fatty liver disease in mice. *J Pharmacol Exp Ther* 339 (3), 790-8
- Hautekeete ML, Degott C, Benhamou JP. (1990): Microvesicular steatosis of the liver. *Acta Clin Belg* 45 (5), 311-26
- Hendrix SL, Wassertheil-Smoller S, Johnson KC, Howard BV, Kooperberg C, Rossouw JE, Trevisan M, Aragaki A, Baird AE, Bray PF, Buring JE, Cricqui MH, Herrington D, Lynch JK, Rapp SR, Torner J. (2006): WHI Investigators. Effects of conjugated equine estrogen on stroke in the Women's Health Initiative. *Circulation* 113 (20), 2425-34
- Herold Gerd, Innere Medizin, Herausgeber: Dr. Herold Brink, S. 481-483, Köln 2012
- Hoff MB, Chang WW. (1979): The effect of estrogen on epithelial cell proliferation and differentiation in the crypts of the descending colon of the mouse: a radioautographic study. *Am J Anat*. 155(4):507-16
- Hunter M, Battersby R, Whitehead M. (1986): Relationships between psychological symptoms, somatic complaints and menopausal status. *Maturitas* 8 (3), 217-28

- Jarry H, Metten M, Spengler B, Christoffel V, Wuttke W. (2003): In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. *Maturitas*. 14 (44) 31-8
- Jeanrenaud B. (1978): Hyperinsulinemia in obesity syndromes: its metabolic consequences and possible etiology. *Metabolism* 27 (2), 1881-92
- Jensen J, Nilas L, Christiansen C. (1990): Influence of menopause on serum lipids and lipoproteins. *Maturitas* 12 (4), 321-31.
- Johnson JR, Lacey JV Jr, Lazovich D, Geller MA, Schairer C, Schatzkin A, Flood A. (2009): Menopausal hormone therapy and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18 (1), 196-203
- Joy D, Joy J, Duane P. (2008): Black cohosh: a cause of abnormal postmenopausal liver function tests. *Climacteric* 11 (1), 84-8
- Kalu DN. (1991): The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 15 (3), 175-91
- Kapur P, Wuttke W, Seidlová-Wuttke D. (2010): The *Cimicifuga racemosa* special extract BNO 1055 prevents hot flashes in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17 (11), 890-4
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, Vandroos G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG. (2003): Oestrogen receptor Beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 39 (9), 1251-8
- Korach KS, Emmen JM, Walker VR, Hewitt SC, Yates M, Hall JM, Swope DL, Harrell JC, Couse JF. (2003): Update on animal models developed for analyses of estrogen Receptor biological activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86 (3-5), 387-91
- Krinke GJ, *The Laboratory Rat: The handbook of laboratory animals. Synopsis of the organ anatomy – Large intestine (intestinum crissum)*, S.293; Academic Press; London, San Diego 2000
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (12), 5925-30
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138 (3), 863-70
- Labbe G, Pessayre D, Fromenty B. (2008): Drug-induced liver injury through mitochondrial dysfunction: mechanisms and detection during preclinical safety studies. *Fundam Clin Pharmacol* 22 (4), 335-53
- Landau IT, Zucker I. (1976): Estrogenic regulation of body weight in the female rat. *Horm Behav* 7 (1), 29-39

- Lettéron P, Sutton A, Mansouri A, Fromenty B, Pessayre D. (2003): Inhibition of microsomal triglyceride transfer protein: another mechanism for drug-induced steatosis in mice. *Hepatology* 38 (1), 133-40
- Levitsky J, Alli TA, Wisecarver J, Sorrell MF. (2008): Fulminant liver failure associated with the use of black cohosh. *Dig Dis Sci* 50 (3), 538-9
- Liu D, Bachmann KA. (1998): An investigation of the relationship between estrogen, estrogen metabolites and blood cholesterol levels in ovariectomized rats. *J Pharmacol Exp Ther* 286 (1), 561-8
- Lobo RA. (2008): Metabolic syndrome after menopause and the role of hormones. *Maturitas* 60 (1), 10-8
- Lontos S, Jones RM, Angus PW, Gow PJ. (2003): Acute liver failure associated with the use of herbal preparations containing black cohosh. *Med J Aust* 179 (7), 390-1
- Lüde S, Török M, Dieterle S, Knapp AC, Kaeufeler R, Jäggi R, Spornitz U, Krähenbühl S. (2007): Hepatic effects of *Cimicifuga racemosa* extract in vivo and in vitro. *Cell Mol Life* 64 (21), 2848-57
- Lüllmann-Rauch R.: Taschenlehrbuch Histologie. 2. Auflage; S. 363, 382-383; Thieme-Verlag; Kiel 2006
- Lundeen SG, Carver JM, McKean ML, Winneker RC. (1997): Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology* 138 (4), 1552-8
- Lynch CR, Folkers ME, Hutson WR. (2006): Fulminant hepatic failure associated with the use of black cohosh: a case report. *Liver Transpl* 12 (6), 989-92
- Meli R, Pacilio M, Raso GM, Esposito E, Coppola A, Nasti A, Di Carlo C, Nappi C, Di Carlo R. (2004): Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology* 145 (7), 3115-21
- Morris GF, Mathews MB (1989): Regulation of proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle. *J Biol Chem* 264 (23), 13856-64
- Newcomb PA, Zheng Y, Chia VM, Morimoto LM, Doria-Rose VP, Templeton A, Thibodeau SN, Potter JD. (2007): Estrogen plus progestin use, microsatellite instability, and the risk of colorectal cancer in women. *Cancer Res* 67 (15), 7534-9
- Newton KM, Reed SD, LaCroix AZ, Grothaus LC, Ehrlich K, Guiltinan J. (2006): Treatment of vasomotor symptoms of menopause with black cohosh, multibotanicals, soy, hormone therapy, or placebo: a randomized trial. *Ann Intern Med* 145 (12), 869-79
- Nocito A, Dahm F, Jochum W, Jang JH, Georgiev P, Bader M, Renner EL, Clavien PA. (2007): Serotonin mediates oxidative stress and mitochondrial toxicity in a murine model of nonalcoholic steatohepatitis. *Gastroenterology* 133 (2), 608-18

- Osmer R, Friede M, Liske E, Schnitker J, Freudenstein J, Henneicke-von Zepelin HH. (2005): Efficacy and safety of isopropanolic black cohosh extract for climacteric symptoms. *Obstet Gynecol* 105 (5),1074-83
- Pedersen SB, Børglum JD, Møller-Pedersen T, Richelsen B. (1992): Effects of in vivo estrogen treatment on adipose tissue metabolism and nuclear estrogen receptor binding in isolated rat adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* 85 (1-2), 13-9
- Poehlman ET, Toth MJ, Gardner AW. (1995): Changes in energy balance and body composition at menopause: a controlled longitudinal study. *Ann Intern Med* 123 (9), 673-5
- Rachón D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W. (2008): Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 60 (3-4), 209-15
- Rannevik G, Jeppsson S, Johnell O, Bjerre B, Laurell-Borulf Y, Svanberg L. (1995): A longitudinal study of the perimenopausal transition: altered profiles of steroid and pituitary hormones, SHBG and bone mineral density. *Maturitas* 21 (2), 103-13
- Rassow J., Hauser K., Netzker R., Deutzmann R.: *Duale Reihe Biochemie*. 2. Auflage; S. 512, 335, 247, 249, 123-124; Thieme-Verlag; Stuttgart 2008
- Raus K, Brucker C, Gorkow C, Wuttke W. (2006): First-time proof of endometrial safety of the special black cohosh extract (*Actaea or Cimicifuga racemosa* extract) CR BNO 1055. *Menopause* 13 (4), 678-91
- Reddy Kilim S, Chandala SR (2013) A comparative study of lipid profile and oestradiol in pre- and post-menopausal women. *J Clin Diagn Res*. 7(8):1596-8
- Riis BJ, Hansen MA, Jensen AM, Overgaard K, Christiansen C. (1996): Low bone mass and fast rate of bone loss at menopause: equal risk factors for future fracture: a 15-year follow-up study. *Bone* 19 (1), 9-12
- Rolo AP, Teodoro JS, Palmeira CM. (2012): Role of oxidative stress in the pathogenesis of nonalcoholic steatohepatitis. *Free Radic Biol Med*. 52(1), 59-69
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J. (2002): Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288 (3), 321-33
- Roush K. (2012): Managing menopausal symptoms. *Am J Nurs*. 112 (6):28-35
- Schiebler T.H, Junqueira L.C., Carneiro J.: *Histologie*. 4. Auflage; Springer Verlag; S. 512; Berlin 1996

- Schwartz MW, Seeley RJ. (1997): Seminars in medicine of the Beth Israel Deaconess Medical Center. Neuroendocrine responses to starvation and weight loss. *N Engl J Med* 336 (25), 1802-11
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Spengler B, Becker T, Wuttke W. (2003)a: Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17beta. *Eur J Endocrinol* 149 (4), 351-62
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W. (2003)b: Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 39-50
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. (2009): Effects of estradiol benzoate, raloxifen and an ethanolic extract of *Cimicifuga racemosa* in nonclassical estrogen regulated organs of ovariectomized rats. *Planta Med* 75 (12), 1279-85
- Seidlová-Wuttke D, Ehrhardt C, Wuttke W. (2010): Metabolic effects of 20-OH-ecdysone in ovariectomized rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 119 (3-5), 121-6
- 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 (8-9), 846-53
- Shams T, Setia MS, Hemmings R, McCusker J, Sewitch M, Ciampi A. (2010): Efficacy of black cohosh-containing preparations on menopausal symptoms: a meta-analysis. *Altern Ther Health Med* 16 (1), 36-44
- Shao Y, Harris A, Wang M, Zhang H, Cordell GA, Bowman M, Lemmo E (2000) Triterpeneglycosides from *Cimicifuga racemosa*. *J Nat Prod* 63 (7), 905 – 910
- Silverman JF, O'Brien KF, Long S, Leggett N, Khazanie PG, Pories WJ, Norris HT, Caro JF. (1990): Liver pathology in morbidly obese patients with and without diabetes. *Am J Gastroenterol* 85 (10), 1349-55
- Spangler L, Newton KM, Grothaus LC, Reed SD, Ehrlich K, LaCroix AZ. (2007): The effects of black cohosh therapies on lipids, fibrinogen, glucose and insulin. *Maturitas* 57 (2), 195-204
- Springer AM, Foster-Schubert K, Morton GJ, Schur EA. (2013) Is there evidence that estrogen therapy promotes weight maintenance via effects on leptin? *Menopause* [Epub ahead of print]
- Stern JJ, Murphy M. (1972): The effects of thyroxine and estradiol benzoate on wheel running activity in female rats. *Physiol Behav* 9 (1), 79-82
- Stevenson JC, Crook D, Godsland IF. (1993): Influence of age and menopause on serum lipids and lipoproteins in healthy women. *Atherosclerosis* 98 (1), 83-90

- Struck D, Tegtmeier M, Harnischfeger G. (1997) Flavones in extracts of *Cimicifuga racemosa*. *Planta Med* 63 (3), 289
- Suda Y, Ohta H, Makita K, Takamatsu K, Horiguchi F, Nozawa S. (1998): Influence of bilateral oophorectomy upon lipid metabolism. *Maturitas* 29 (2), 147-54
- Sutherland RL, Reddel RR, Green MD. (1983): Effects of oestrogens on cell proliferation and cell cycle kinetics. A hypothesis on the cell cycle effects of antioestrogens. *Eur J Cancer Clin Oncol* 19 (3), 307-18
- Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. (2012): Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis. *World J Gastroenterol* 18 (19), 2300-8
- Tandra S, Yeh MM, Brunt EM, Vuppalanchi R, Cummings OW, Unalp-Arida A, Wilson LA, Chalasani N; NASH Clinical Research Network (NASH CRN) (2011): Presence and significance of microvesicular steatosis in nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 55 (3), 654-9
- Tartaglia LA. (1997): The leptin receptor. *J Biol Chem* 272 (10), 6093-6
- Teschke R, Schwarzenboeck A, Schmidt-Taenzer W, Wolff A, Hennermann KH. (2011): Herb induced liver injury presumably caused by black cohosh: a survey of initially purported cases and herbal quality specifications. *Ann Hepatol* 10 (3), 249-59
- Tonstad S, Ose L, Gørbitz C, Djøseland O, Bard JM, Fruchart JC. (1995) Efficacy of sequential hormone replacement therapy in the treatment of hypercholesterolaemia among postmenopausal women. *J Intern Med.* 238(1), 39-47
- Trevisan M, Liu J, Bahsas FB, Menotti A. (1998): Syndrome X and mortality: a population-based study. Risk Factor and Life Expectancy Research Group. *Am J Epidemiol* 148 (10), 958-66
- Tsukamoto K, Ariga H, Mantyh C, Pappas TN, Yanagi H, Yamamura T, Takahashi T. (2007): Luminally released serotonin stimulates colonic motility and accelerates colonic transit in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293 (1), R64-9
- Van der Mooren MJ, Demacker PN, Thomas CM, Rolland R. (1992): Beneficial effects on serum lipoproteins by 17 beta-oestradiol-dydrogesterone therapy in postmenopausal women; a prospective study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 47 (2), 153-60
- Verhoeven MO, Teerlink T, Kenemans P, Zuijdgeest-van Leeuwen SD, van der Mooren MJ. (2007): Effects of a supplement containing isoflavones and *Actaea racemosa* L. on asymmetric dimethylarginine, lipids, and C-reactive protein in menopausal women. *Fertil Steril* 87 (4), 849-57
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med.* 319(9), 525-32

- Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM. (1991): Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 325 (17), 1196-204
- Wang H, Eriksson H, Sahlin L. (2000): Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biol Reprod* 63 (5), 1331-40
- Weinstein I, Wilcox HG, Heimberg M. (1986): Effects of high-dose ethinyl estradiol on Serum concentrations and hepatic secretion of the very-low-density lipoprotein, triacylglycerol, cholesterol, and apolipoprotein A-I in the rat. *Biochim Biophys Acta* 876 (3) 450-9
- Wlada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA. (2006): Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 103 (8), 2959-64
- Woods AJ, Stock MJ. (1996): Leptin activation in hypothalamus. *Nature* 381 (6585), 745
- 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 (1) 67-77
- Zhang F, Basinski MB, Beals JM, Briggs SL, Churgay LM, Clawson DK, DiMarchi RD, Furman TC, Hale JE, Hsiung HM, Schonert BE, Smith DP, Zhang XY, Wery JP, Schevitz RW. (1997): Crystal structure of the obese protein leptin-E100. *Nature* 387 (6629), 206-9
- Zimmerman HJ. (1978): Drug-induced liver disease. *Drugs* 16 (1), 25-45
- Zou Y, Li J, Lu C, Wang J, Ge J, Huang Y, Zhang L, Wang Y. (2006): High-fat emulsion-induced rat model of nonalcoholic steatohepatitis. *Life Sci* 79 (11), 1100-7

Abbildungsverzeichnis

			Seite
Abbildung:	1	Cimicifuga racemosa BNO 1055 und ihre für diesen Versuch verwendeten Subfraktionen	12
Abbildung:	2	<u>Zeitstrahl Versuchsablauf</u>	29
Abbildung:	3	Kolonschnittpräparat, Zellproliferation, Gruppe R3, Vergrößerung 40x, PCNA-Färbung	33
Abbildung:	4	Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf durchschnittliches Körpergewicht der Versuchstiere pro Gruppe	35
Abbildung:	5	Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Fettanteil pro Fläche Leberparenchym	37
Abbildung:	6	Leberschnittpräparat, R3-Gruppe, Vergrößerung 12,5-fach, Ölrot-Färbung	38
Abbildung:	7	Effekt von CR BNO 1055-Subfraktionen und E2 auf Zellproliferation in der Kolonschleimhaut; Anteil der positiven PCNA-Zellen an 500 Gesamtzellen	39
Abbildung:	8	Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration des Gesamtcholesterols	40
Abbildung:	9	Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration des LDLs	41
Abbildung:	10	Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration des HDLs	42
Abbildung:	11	Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration der Triglyceride	43
Abbildung:	12	Effekt von E2 und CR BNO 1055-Subfraktionen auf Serumkonzentration des Leptins	44
Abbildung:	13	<u>Korrelationsanalyse von Leptinwerten und Körpergewicht</u>	45
Abbildung:	14	Korrelationsanalyse von Leptinwerten und PCNA-positiven Kolonzellen	46

Tabellenverzeichnis

			Seite
Tabelle:	1	Tab. 1: Testsubstanz, Name der Gruppe, Anzahl der Tiere, <u>Substanzdosis in mg/kg Futter</u>	<u>28</u>
Tabelle :	2	Tab. 2: Testsubstanz, Name der Gruppe, Anzahl der Tiere, Substanzdosis in mg/kg Futter, Futterraufnahme in g/Tier/Tag und <u>Substanzeinnahme in mg/Tag</u>	<u>36</u>

Danksagung

Ich danke Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke für die Möglichkeit zur Anfertigung einer wissenschaftlichen Arbeit in der Arbeitsgruppe für experimentelle Endokrinologie der Abteilung Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitätsmedizin Göttingen.

Ein besonderer Dank gilt Frau Priv.-Doz. Dana Seidlová-Wuttke für die umfassende und professionelle Betreuung während des gesamten Projektes, ohne die die Arbeit so nicht entstanden wäre. Ebenfalls besonders danken möchte ich nochmals Herrn Prof. Wolfgang Wuttke für die sehr hilfreiche und produktive Kritik an meiner Arbeit. Mein Dank gilt auch der chemisch-technischen Assistentin Heidi Brüggemann-Meyer, die mir bei der praktischen Arbeit im Labor eine unschätzbare Hilfe war. Ebenso danken möchte ich Sabine Lünemann für die organisatorische Unterstützung bei allen wichtigen Fragen.