

**Der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität
eingereicht von PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke**

**Die Wirkung der Fraktionen des Extraktes
Cimicifuga racemosa BNO 1055 auf die Brustdrüse
ovarektomierter Sprague-Dawley-Ratten**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von

Jessica Viola Kübler

geb. Frank

aus

Neuwied

Göttingen 2017

Die vorliegende Dissertation wurde in Göttingen im Zeitraum von August 2011 bis Dezember 2016 unter der Betreuung von PD Dr. D. Seidlová-Wuttke angefertigt.

Dekan: Prof. Dr. H. K. Kroemer

Referentin: PD Dr. D. Seidlová-Wuttke

Ko-Referent/in: Prof. Dr. C. Gründker

Drittreferent/in: Prof. Dr. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 17.01.2018

Hiermit erkläre ich, die Dissertation mit dem Titel „Die Wirkung der Fraktionen des Extraktes *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 auf die Brustdrüse ovariectomierter Sprague-Dawley-Ratten“ eigenständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	III
I. Einleitung	1
I.1 Anatomie und Histologie der Mamma	2
I.1.1 Ratte	2
I.1.2 Mensch	3
I.2 Klimakterium	4
I.2.1 Ratte	4
I.2.2 Mensch	4
I.3 Östrogene	6
I.4 Hormonersatztherapie (HET)	8
I.4.1 Die „Women’s Health Initiative“ und die „Million Women Study“	9
I.4.2 Die Renaissance der HET	10
I.5 <i>Cimicifuga racemosa</i> (CR)	12
I.5.1 Inhaltsstoffe CR BNO 1055	13
I.5.2 Wirkungen und Nebenwirkungen	14
I.6 Mammakarzinom	16
I.6.1 Ätiologie	16
I.6.2 Lokalisation, Histologie und Klinik	17
I.6.3 Therapie	17
I.7 Fragestellung	18
II. Material und Methoden	19
II.1 Thematik	19
II.2 Versuchsaufbau und -ablauf	19
II.3 Histologische Aufarbeitung des Gewebes	21
II.4 Auswertung der histologischen Präparate	22
II.5 Statistische Auswertung	27
II.5.1 Verteilung der Werte	27
II.5.2 Signifikanztest	27
III. Ergebnisse	29
III.1 Vergleich der Kontrollgruppe mit der Estradiolgruppe	29
III.2 Ergebnisse für Ductus/mm ²	30
III.3 Ergebnisse für Lobulus 1/mm ²	33
III.4 Ergebnisse für Lobulus 2/mm ²	36

IV. Diskussion.....	39
IV.1 Die Wirkung von Estradiol auf das Mammagewebe	39
IV.2 Die Wirkung von <i>CR</i> BNO 1055 auf das Mammagewebe.....	40
IV.3 Die Wirkung der Fraktionen von <i>CR</i> BNO 1055 auf das Mammagewebe.....	41
IV.3.1 Ergebnisse der Saponinfraktion	42
IV.3.2 Ergebnisse der Gruppen S1, S2 und S3	42
IV.3.3 Ergebnisse der Restfraktion	43
IV.3.4 Ergebnisse der Gruppen R1 und R2	43
IV.3.5 Ergebnisse der Gruppe R3.....	44
IV.3.6 Fazit	44
IV.4 <i>CR</i> bei Mammakarzinom-Patientinnen	46
IV.5 Schlussfolgerung und Ausblick.....	47
V. Zusammenfassung.....	48
VI. Anhang	50
VI.1 Tabellen 8-15.....	50
VI.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	55
VII. Literaturverzeichnis.....	56

Abkürzungsverzeichnis

5-HT1A-Rezeptor	5-Hydroxytryptamin-1A-Rezeptor
5-HT1D-Rezeptor	5-Hydroxytryptamin-1D-Rezeptor
5-HT7-Rezeptor	5-Hydroxytryptamin-7-Rezeptor
AB	<i>alveolar buds</i> = alveoläre Knospen
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BRCA	<i>breast cancer gene</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CR	<i>Cimicifuga racemosa</i>
d	<i>day</i> = Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ER α / ER β	Östrogen-Rezeptor α / β
FDA	Food and Drug Administration, Behörde zur Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassung der USA
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
GABA	Gamma-Amino-Buttersäure
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
HET	Hormonersatztherapie
Ki-67	Protein, das zur Markierung von sich teilenden menschlichen Zellen geeignet ist = Proliferationsmarker
LA	<i>lobulo-alveolar structures</i> = lobulo-alveoläre Strukturen
LH	luteinisierendes Hormon
Lob 1	Lobulus/-i 1
Lob 2	Lobulus/-i 2
M.	Musculus
MWS	Million Women Study
Ovx	Ovarektomie
ovx	ovarektomiert/e/r
p	Signifikanzniveau
PaPE	<i>pathway preferential estrogen</i>
POF/POI	<i>premature ovarian failure</i> = prämatüre Ovarialinsuffizienz
Q	Interquartilsabstand
R-Fraktion	Restfraktion
R1	Rest-Subfraktion 1
R2	Rest-Subfraktion 2
R3	Rest-Subfraktion 3
S-Fraktion	Saponinfraktion
S1	Saponin-Subfraktion 1
S2	Saponin-Subfraktion 2
S3	Saponin-Subfraktion 3
SERM	selektiver Estrogenrezeptormodulator
SD-Ratten	Sprague-Dawley-Ratten
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin

SSRI	<i>selective serotonin reuptake inhibitors</i> = selektive Serotonin-Wiederaufnahme-Hemmer
TEB	<i>terminal end buds</i> = terminale Endknospen
TSEC	<i>tissue-selective estrogen complex</i>
WHI	Women's Health Initiative
ZNS	zentrales Nervensystem

I. Einleitung

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau und die häufigste Todesursache bei den 35- bis 55- jährigen Frauen der westlichen Welt. Etwa jede elfte Frau erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs, jährlich sind es weltweit mehr als eine Million, in Deutschland 72.000 Neuerkrankungen (Weyerstahl 2013). Durch eine frühe Diagnostik und verschiedene Therapiemöglichkeiten hat sich die Prognose der Erkrankung in den letzten Jahren verbessert, die Mortalität hat um 25% abgenommen (Weyerstahl 2013). Auch die Risikofaktoren für die Erkrankung werden stetig genauer ergründet. Bedeutende Ereignisse für die Ursachenforschung des Mammakarzinoms stellen Studien über die Effekte einer Hormonsubstitution im Klimakterium dar. So hat beispielsweise die „Women’s Health Initiative“ die Zunahme von Schlaganfällen, kardiovaskulären Komplikationen und bösartigen Neubildungen, insbesondere der Brust, aufgezeigt (Taylor und Manson 2011). Aufgrund der mit ihr verbundenen Risiken kam es zu einem Umbruch in der Verwendung von Hormonersatzpräparaten bei klimakterischen Beschwerden, und die betroffenen Frauen suchten vermehrt nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten (Obi et al. 2009; Taylor und Manson 2011). Infolgedessen werden beispielsweise Arzneimittel aus der Wurzel der nordamerikanischen Traubensilberkerze, *Cimicifuga racemosa*, einer Pflanze aus der Familie der Hahnenfußgewächse, zur Linderung klimakterischer Beschwerden eingesetzt. Mittlerweile erleben wir eine Renaissance der Hormonersatztherapie (HET), trotzdem sind pflanzliche Alternativen für die postmenopausale Frau enorm wichtig.

Die Forschungen zur vorliegenden Dissertation wurden im Rahmen des *Bayrischen Forschungsprogrammes „Osteoporoseprophylaxe mit pflanzlichen Mitteln“* AZ-838-08 des Pharmaunternehmens Bionorica durchgeführt. Bei dem Forschungsprojekt handelt es sich um eine Kooperation der bayrischen staatlichen Forschungsstiftung, des Pharmaunternehmens Bionorica und der wissenschaftlichen Kooperation der Universitäten Göttingen, Würzburg und Innsbruck. Kürzlich gelang es Mitarbeitern von Bionorica, den Extrakt *CR (Cimicifuga racemosa)* BNO 1055 in seine Fraktionen und Subfraktionen zu differenzieren und darüber hinaus die Inhaltsstoffe der Subfraktionen zu definieren. In der Phytopharmakologie erhalten Spezialextrakte, die nach einer streng definierten und kontrollierten Methode hergestellt sind, einen Produktcode (in diesem Fall BNO 1055). Dadurch ist die Vergleichbarkeit der Extrakte und die

Reproduzierbarkeit von Studien gewährleistet. Die detaillierte Analyse von CR BNO 1055 ermöglicht es, Aussagen über die Wirkungen des Gesamtextraktes und der Subfraktionen zu machen und gegebenenfalls durch Eliminierung oder Kombination einzelner Subfraktionen ein besseres Wirkungs-Nebenwirkungs-Profil zu erzielen.

Die Wirkung der Fraktionen des Extraktes *Cimicifuga racemosa* (im Folgenden CR) BNO 1055 auf das Mammagewebe ovariectomierter (ovx) Sprague-Dawley-(im Folgenden SD-)Ratten ist Gegenstand der vorliegenden Dissertation.

I.1 Anatomie und Histologie der Mamma

I.1.1 Ratte

Das Modell der SD-Ratte stellt aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zum menschlichen Brustgewebe eine sehr geeignete Vorlage zur Erforschung der Brustkrebsentstehung dar. Die SD-Ratte gilt als Standardmodell zur Erforschung endokrinologischer Fragestellungen (Russo und Russo 1996; Seidlová-Wuttke et al. 2012b).

Die Brustdrüsen der weiblichen Ratte sind in sechs Paaren entlang der Milchleiste von zervikal bis inguinal angeordnet. Von außen sind nur die Brustwarzen sichtbar, das Parenchym befindet sich im subkutanen Fettgewebe. Die Brustdrüsen der männlichen Ratten sind rudimentär. Histologisch lässt sich die Mamma in Parenchym und Stroma einteilen. Das Parenchym besteht aus ein oder zwei großen Milchgängen, die sich von der Brustwarze in das umliegende Gewebe erstrecken. Im mittleren Drittel der Drüse befinden sich Aufzweigungen in kleinere Ausführungsgänge (Ductus) und Knospen. Es folgen die terminalen Endknospen (*terminal end buds*=TEB). Die Hauptgänge bestehen aus einem flachen bis isoprismatischen Epithel mit Mikrovilli, die in das Lumen ragen. Die Ductus sind tubuläre Strukturen und bestehen aus einer inneren, das Lumen auskleidenden Epithelschicht und einem Myoepithel, dem sich die Basalmembran anschließt. Die terminalen Endknospen sind von einem mehrschichtigen isoprismatischen Epithel ausgekleidet, das eine hohe Zellproliferationsrate zeigt (Britt et al. 2007; Russo und Russo 1996). In der reifen Brustdrüse zeigen sich anstelle der TEB vermehrt alveoläre

Knospen (*alveolar buds*=AB), die bei Eintreten einer Schwangerschaft extensiv proliferieren und sich zu lobulo-alveolären Strukturen entwickeln (Britt et al. 2007).

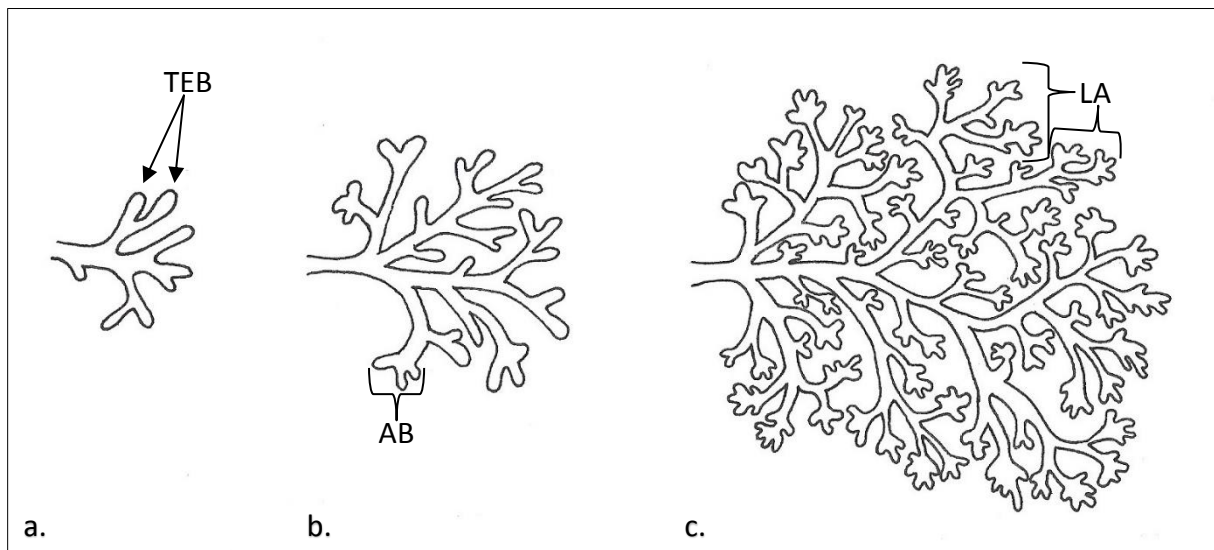


Abbildung 1: Brustdrüse der Ratte.

a. junge Brustdrüse. TEB=*terminal end buds*. b. reife Brustdrüse ohne vorhandene Schwangerschaft. AB=*alveolar buds*. c. reife Brustdrüse mit bestehender Schwangerschaft. LA=*lobulo-alveolar structures*. Eigene Skizze.

I.1.2 Mensch

Die weibliche Brustdrüse ist in jeder Brust aus zwölf bis 20 Lappen (Lobi) aufgebaut, die jeweils einen eigenen Ausführungsgang an der Mamillenoberfläche besitzen. Kurz vor der Ausmündung aus der Mamille durch den Ausführungsgang (Ductus excretorius) befindet sich eine Erweiterung, der Milchsinus (Sinus lactiferus). Darauf folgen die Milchgänge (Ductus lactiferi), die als Gangsystem zusammen mit den Läppchen (Lobuli) die Lobi bilden. Die Drüsenstrukturen sind in ein straffes Bindegewebe eingebettet (Welsch und Sobotta 2006).

Je nach Zustand der Laktation unterscheiden sich die Drüsenläppchen in ihrer Morphologie. In der nicht-laktierenden Drüse sind die Ductus weniger verzweigt, und die Endstücke, die Azini, setzen sich aus einer isoprismatischen Epithelschicht und mäßig ausgeprägtem Myoepithel zusammen. In der laktierenden Drüse werden die Strukturen größer und weitlumiger, die Epithelzellen der Azini produzieren Milch, und das stärker ausgeprägte Myoepithel hilft bei deren Auspressen aus der Drüse (Welsch und Sobotta 2006).

Abbildung 2 zeigt eine Skizze der weiblichen Brustdrüse.

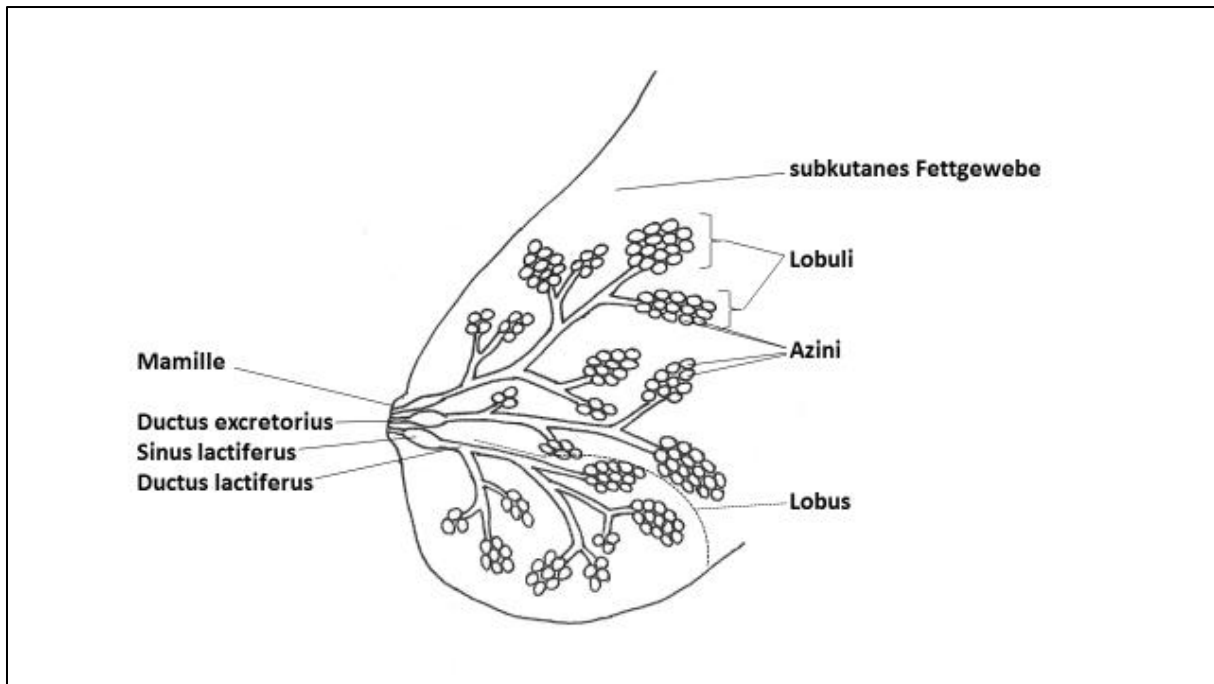


Abbildung 2: Schematische Darstellung der weiblichen Brustdrüse.
Eigene Skizze.

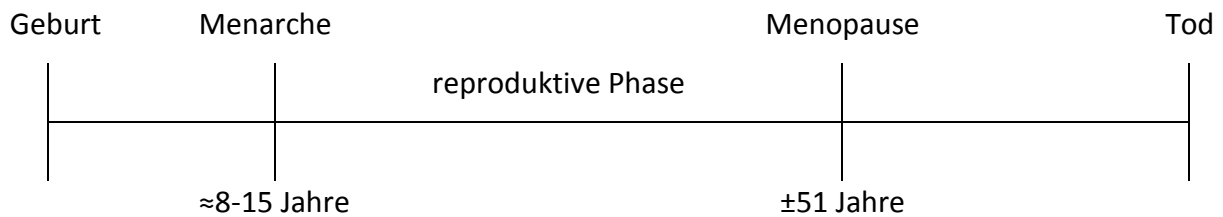
I.2 Klimakterium

I.2.1 Ratte

Die ovx SD-Ratte ist in der Forschung über das Klimakterium ein etabliertes Modell. Physiologisch kommt es im Leben einer SD-Ratte nicht zu einer mit den menschlichen Wechseljahren vergleichbaren Lebensphase. Durch Ovariectomie (Ovx) wird jedoch das Klimakterium simuliert, und es kommt bei der Ratte zu typischen klimakterischen Beschwerden wie Hitzewallungen, genitale Involution und Knochenabbau (Rachoń et al. 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2012b).

I.2.2 Mensch

Die Wechseljahre stellen den Übergang von der reproduktiven Phase zur nicht-reproduktiven Phase (Senium) einer Frau dar. Die letzte Blutung, Menopause genannt, tritt bei Frauen in Deutschland mit durchschnittlich 51 Jahren auf (Aidelsburger et al. 2012).



Man kann das Klimakterium in drei Phasen unterteilen. Die Prämenopause beginnt ca. vier bis fünf Jahre vor der Menopause und ist durch erste Zyklusunregelmäßigkeiten gekennzeichnet. Die Menopause beschreibt die letzte spontane Menstruationsblutung. Die Übergangsphase rund um die Menopause wird als Perimenopause bezeichnet. Die Postmenopause, die etwa ein Jahr nach der Menopause beginnt, kennzeichnet sich durch Amenorrhoe, absolute Sterilität und genitale Atrophie (Behrends 2010; Kiechle 2011).

Das Klimakterium ist charakterisiert durch einen Verlust der endokrinen Funktion der Ovarien, welcher durch Gefäßsklerosierung und Follikelmangel bedingt ist. Durch den entstehenden Mangel an Östrogenen fehlt im hormonellen Regelkreis die negative Rückkopplung auf Hypothalamus und Hypophyse. Es resultiert ein reaktiver Anstieg der Gonadotropine (Siehe Abb. 3: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse, S.7) (Behrends 2010; Kiechle 2011).

Die Symptome des Klimakteriums lassen sich in drei Gruppen unterteilen: vegetative, psychosomatische und somatische Beschwerden. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht über die Symptome.

Vegetativ	Psychosomatisch	Somatisch
- vasomotorische Symptome = Hauptsymptome: Hitzewallungen, nächtliches Schwitzen (Drewe et al. 2015; Thurston 2011)	- Stimmungsschwankungen, Depressionen, Nervosität und Schlafstörungen (Drewe et al. 2015; Thurston 2011)	- vaginal: Trockenheit, Pruritus und Atrophie → Dyspareunie, Probleme im Sexualleben - urologisch: rezidivierende Harnwegsinfekte, Inkontinenz - kardiovaskulär: Vermehrung des viszeralen Fettgewebes, erhöhte Blutfette → Erhöhung des kardiovaskulären Risikos - Abnahme von Knochendichte, Muskelmasse und Kraft → Förderung der Entstehung von Frakturen (Drewe et al. 2015; Maltais et al. 2009; Pandit und Ouslander 1997; Seidlová-Wuttke et al. 2012b)

Tabelle 1: Übersicht über die Symptome des Klimakteriums.

Etwa zwei Drittel der Frauen leiden unter oben aufgeführten klimakterischen Beschwerden, durch die es zu einer erheblichen Beeinträchtigung der Lebensqualität kommen kann (Aidelsburger et al. 2012).

Aufgrund dieser vielfältigen Symptome und der entstehenden Risiken (u.a. kardiovaskuläre Erkrankungen) ist eine suffiziente Therapie zur Linderung der Beschwerden notwendig. Daher wurde in der Vergangenheit und auch heute häufig eine HET eingeleitet.

I.3 Östrogene

Östrogene spielen eine große Rolle in der Proliferation sowohl des normalen Brustgewebes als auch bösartiger Neubildungen des Drüsenläppchenepithels oder der Milchgänge. Es besteht ein Zusammenhang zwischen der Dosis und Expositionsdauer von Östrogenen und einem erhöhten Erkrankungsrisiko für Mammakarzinome. Beispielsweise sind eine frühe Menarche und späte Menopause, also eine längere Exposition mit endogenen Östrogenen, mit einem erhöhtem Mammakarzinom-Risiko assoziiert (Russo J, Russo IH 2006). Östrogene fördern zusätzlich die Entstehung von Endometrium- und Ovarialkarzinomen (Kiechle 2011; Taylor und Manson 2011).

Östrogene sind Steroidhormone, die bei der Frau vor allem in den Granulosa- und Theca interna-Zellen der Ovarialfollikel, aber auch in der Nebennierenrinde, und beim Mann in geringen Mengen im Hoden gebildet werden. Die Östrogensekretion der Ovarien unterliegt der Steuerung des Hypothalamus und der Hypophyse. Entscheidend ist dabei der Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Pulsgenerator im Hypothalamus. Durch die pulsatile GnRH-Freisetzung werden die Gonadotropine luteinisierendes Hormon (LH) und follikelstimulierendes Hormon (FSH) aus der Adenohypophyse sezerniert. Das FSH bewirkt die Reifung der Follikel im Ovar. Der entstehende dominante Follikel produziert zunehmend Estradiol, was bei Überschreiten eines bestimmten Schwellenwertes zur positiven Rückkopplung auf die Hypophyse führt. Zur Ovulation kommt es durch einen LH- und FSH-Peak. Nach der Ovulation fallen die Gonadotropinkonzentrationen durch die negative Rückkopplung des vom Corpus luteum (Gelbkörper) gebildeten Progesterons ab. Bleibt eine Befruchtung aus, sinkt die Progesteronproduktion des sich zurückbildenden Gelbkörpers und das FSH steigt wieder an. Der Regelkreis beginnt von vorne (Behrends 2010; Kiechle 2011).

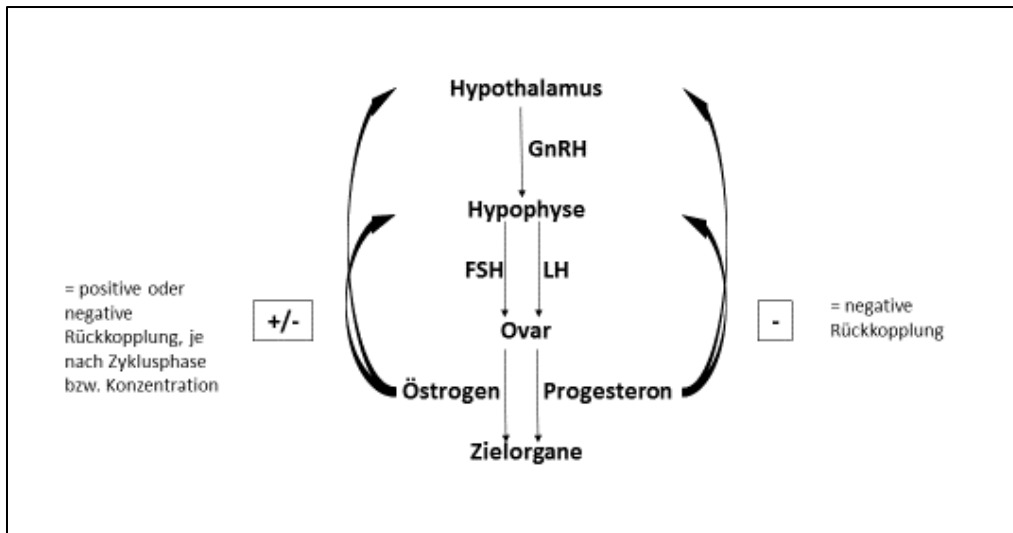


Abbildung 3: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.
Eigene schematische Darstellung.

Die Wirkungen auf den weiblichen Körper sind unter anderem Wachstum und Proliferation der Brustdrüse, der Uterusschleimhaut, der Uterusmuskulatur und des Vaginalepithels sowie Förderung und Entwicklung des subkutanen Fettgewebes. Es kommt zu einer Zunahme der Menge und Spinnbarkeit des Zervixsekretes und zu einer Abnahme der Viskosität. Östrogene sind an der neuroendokrinen Steuerung des weiblichen Zyklus, der Stimulation der Osteoblasten im Knochen und der Synthese von Gerinnungsfaktoren in der Leber beteiligt. Darüber hinaus haben sie Einfluss auf Stimmungsaufhellung und Aktivitätssteigerung (Behrends 2010; Kiechle 2011; Stauber und Weyerstahl 2007).

Daraus lassen sich die Symptome des durch Östrogenmangel gekennzeichneten Klimakteriums ableiten (siehe Kapitel I.2.2).

Die wichtigsten natürlichen Östrogene sind 17- β -Estradiol, Estron und Estriol; die synthetischen Verbindungen sind Ethinylestradiol und Mestranol. Therapeutisch werden reine Östrogene zur Zusatzbehandlung zur oralen Kontrazeption bei Zwischenblutungen, zur Lokalbehandlung bei Kolpitis und trockener Vagina in der Postmenopause, sowie zur systemischen Therapie klimakterischer Beschwerden bei hysterektomierten Frauen eingesetzt. Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparate finden Verwendung bei der hormonellen Kontrazeption und der peri- und postmenopausalen Hormonsubstitution (Schmidt 2012; Stauber und Weyerstahl 2007). Eine Übersicht über menopausale HET-Präparate gibt Tabelle 8 im Anhang.

I.4 Hormonersatztherapie (HET)

Zur hormonellen Substitution im Klimakterium werden Östrogen-Gestagen-Kombinationspräparate bei nicht-hysterektomierten Frauen (aufgrund des erhöhten Risikos, unter Östrogen-Monotherapie an einem Endometriumkarzinom zu erkranken), sowie Östrogen-Monopräparate bei hysterektomierten Frauen eingesetzt. Indikationen sind starke, anderweitig nicht behandelbare klimakterische Beschwerden, der frühzeitige Beginn des Klimakteriums vor dem 40. Lebensjahr (Climacterium praecox, z.B. im Rahmen einer prämaturnen Ovarialinsuffizienz (POI), englisch *premature ovarian failure* (POF)), sowie eine frühzeitige operative Entfernung der Ovarien. Die Behandlung sollte so kurz und niedrigdosiert wie möglich erfolgen. Kontraindikationen für eine HET sind beispielsweise schwere Leberschäden, Thrombembolien und Corpus- oder Mammakarzinome (Behrends 2010; Schmidt 2012; Stauber und Weyerstahl 2007). Auch nach überstandener Brustkrebserkrankung ist die HET kontraindiziert. Nach anderen hormonabhängigen Tumoren sollte die Behandlung mit Hormonen sorgfältig abgewogen werden, die Datenlage hierzu ist gering (Ortmann und Lattrich 2012). Aufgrund der mit ihr verbundenen Risiken ließ der Gebrauch der HET zur Linderung menopausaler Beschwerden in Deutschland zwischen 1998 und 2004 deutlich nach (um 40%) (Du et al. 2007). Aufgrund des vielschichtigen Nutzen-Risiko-Profiles gibt es sowohl viele Gegner als auch zahlreiche Befürworter der HET. Die Vor- und Nachteile sind in der folgenden Tabelle 2 zusammengefasst.

Vorteile	Nachteile
<ul style="list-style-type: none"> • Verbesserung vasomotorischer Symptome (Ortmann und Lattrich 2012) • Reduktion der Entstehung von Adipositas und Osteoporose (Seidlová-Wuttke et al. 2012b; Wuttke et al. 2006) • Wiederherstellung des vaginalen pH-Milieus und Beheben vaginaler Trockenheit (Seidlová-Wuttke et al. 2012b; Wuttke et al. 2006) • Verringerung von Harninkontinenz und Häufigkeit von Infektionen der ableitenden Harnwege (Ortmann und Lattrich 2012) • Verbesserung der Sexualfunktion und von Schlafproblemen (Taylor und Manson 2011) 	<ul style="list-style-type: none"> • Uterine Blutungen, Endometriumhyperplasie, erhöhtes Endometriumkarzinom-Risiko (Ortmann und Lattrich 2012; Schmidt 2012) • Brustschmerzen, erhöhte Brustzellproliferation, erhöhtes Brustkrebs-Risiko (Chen 2011; Schmidt 2012) • Koronare Herzkrankheit, erhöhte Schlaganfall-, Thrombose- und Lungenembolierate (Beral 2003; Rossouw et al. 2002) • Zunahme von bösartigen Neubildungen des Ovars und der Lunge (Beral et al. 2011; Taylor und Manson 2011) • Gelenkschmerzen, Veränderungen der Stimmungslage, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Juckreiz, Gewichtsschwankungen (Ortmann und Lattrich 2012)

Tabelle 2: Zusammenfassende Übersicht der Vor- und Nachteile einer HET.

I.4.1 Die „Women’s Health Initiative“ und die „Million Women Study“

Studien zeigten, dass eine HET über einen längeren Zeitraum neben anderen Nebenwirkungen das Brustkrebs-Risiko erhöht. Insbesondere die „Women’s Health Initiative“ (WHI) und die „Million Women Study“ (MWS) haben Aufsehen erregt. Diese klinischen Studien wurden in den USA (WHI) und in Großbritannien (MWS) zur Untersuchung der Effekte einer Hormonsubstitution durchgeführt. An der WHI nahmen von 1993 bis 1998 161.809 postmenopausale Frauen teil, die in zwei Gruppen mit Hormontherapie (Östrogen-Progesteron-Kombination und Östrogen-Monotherapie) und zwei Placebogruppen eingeteilt wurden. Die Studie musste wegen eines signifikant erhöhten Auftretens von Brustkrebsfällen unter Hormontherapie mit Östrogen-Progesteron-Präparaten, im Vergleich zur Gruppe ohne Einnahme von Hormonpräparaten, vorzeitig abgebrochen werden. Die Anzahl der Brustkrebs-Diagnosen stieg auf acht zusätzliche Fälle pro 10.000 Frauen bei einer Östrogen-Progesteron-Therapie über fünf Jahre

(Beral 2003; Rossouw et al. 2002). Unter Östrogen-Monotherapie zeigte sich eine Abnahme der Brustkrebserkrankungen mit sechs Erkrankungsfällen weniger pro 10.000 Frauen und Therapiejahr nach einer durchschnittlichen Therapiedauer von 7,1 Jahren. Dieses Ergebnis ist allerdings nicht signifikant und könnte ein zufälliges Auftreten der geringeren Anzahl an Brustkrebserkrankungen bedeuten. Diejenigen Frauen in der Östrogen-Gruppe, die Brustkrebs entwickelten, wiesen jedoch größere Tumoren und häufiger einen positiven Lymphknotenstatus auf als betroffene Frauen der Placebogruppe (Schmidt 2012; Stefanick et al. 2006). Weitere Analysen ergaben, dass die Östrogen-Therapie das Brustkrebs-Risiko insbesondere bei den Teilnehmerinnen senken konnte, denen bereits aufgrund der Betrachtung weiterer Risikofaktoren ein geringeres Brustkrebs-Risiko zugesprochen wurde. Bei Frauen mit ohnehin erhöhtem Brustkrebs-Risiko kam es zu einem erhöhten Erkrankungsrisiko unter Östrogen-Therapie (Stefanick et al. 2006). In der „Million Women Study“ wurden von 1996 bis 2001 1.129.025 postmenopausale Frauen untersucht. Auch in dieser Studie kam es zu einer signifikant höheren Anzahl von Brustkrebserkrankungen bei den Teilnehmerinnen mit Hormontherapie im Vergleich zu den Teilnehmerinnen, die keine Hormonpräparate zu sich nahmen. Dies galt sowohl für eine Östrogen-Progesteron-Kombinationstherapie (6 zusätzliche Fälle pro 1000 Frauen bei einer Therapiedauer von 5 Jahren, erwartete 19 zusätzliche Fälle pro 1000 Frauen bei einer Therapiedauer von 10 Jahren) als auch für eine Östrogen-Monotherapie (1,5 Fälle pro 1000 Frauen bei einer Therapiedauer von 5 Jahren, erwartete 5 zusätzliche Fälle bei einer Therapiedauer von 10 Jahren) (Beral 2003; Rossouw et al. 2002). Zusätzlich stellte sich heraus, dass der Einsatz von Östrogen-Progesteron-Präparaten und (zu einem geringeren Ausmaß) von Östrogenen Brustschmerzen, eine erhöhte Brustzellproliferation und eine erhöhte Dichte des Brustgewebes in der Mammographie bedingt, was zu einer erschwerten und verzögerten Diagnose von Brustkrebs führen kann (Chen 2011; Schmidt 2012).

I.4.2 Die Renaissance der HET

Aktuell erleben wir eine Renaissance der nach der WHI, MWS und weiteren Studien in Verruf geratenen HET. Die HET stellt nach wie vor die suffizienteste Behandlung klimakterischer Beschwerden dar. Ihre Befürworter weisen darauf hin, dass die HET heute unter Berücksichtigung der Substanzen, Pharmakologie und Darreichungsform ein deutlich günstigeres Nutzen-

Risiko-Profil darstellt. Wichtig ist dabei die Verwendung natürlicher Hormone in „niedrig-physiologischem Wirkspiegelbereich“ unter Berücksichtigung des persönlichen Risikoprofils der Patientin (Tramontana 2016). Östrogene werden heute in deutlich niedrigerer Dosierung als beispielsweise in der WHI und zudem zunehmend transdermal appliziert (Abdi et al. 2016). Durch die transdermale Applikation wird eine überschießende Reaktion des Östrogenmetabolismus verhindert, die eine Risikoerhöhung für Karzinome darstellt (Tramontana 2016). Die Entwicklung in der HET geht zu natürlichen, bioidentischen Hormonen, die im Vergleich zu ihren synthetischen Äquivalenten Vorteile im Wirkungs-Nebenwirkungs-Profil zeigen. Zudem ist der frühe Behandlungsbeginn einer HET bei entsprechender Indikation entscheidend (Tramontana 2015). Einen weiteren Fokus der aktuellen Forschung stellen „*pathway preferential estrogens*“ (PaPE) dar, die durch eine strukturelle Veränderung von Östrogen-Liganden entstehen. Ziel ist es, durch eine günstigere Gewebe-selektive Aktivität die gewünschten Wirkungen von Östrogenen zu unterstützen, während die unvorteilhaften Wirkungen verhindert werden sollen (Madak-Erdogan et al. 2016). Darüber hinaus ist der Einsatz von TSEC, *tissue-selective estrogen complex*, möglich: Die Kombination von konjugiertem Östrogen und Bazedoxifen, einem selektiven Östrogenrezeptormodulator (SERM), ist wirkungsvoll gegen menopausale Beschwerden, insbesondere vasomotorische Symptome, und zeigt eine positive Wirkung auf die Knochendichte (Taylor und Manson 2011). Bazedoxifen wirkt östrogenantagonistisch im Endometrium sowie in Brustkrebszellen und östrogenagonistisch im Knochen (Al-Safi und Santoro 2014). Die unerwünschten Nebenwirkungen sind gering (Taylor und Manson 2011). Von der FDA (=Food and Drug Administration, Behörde zur Lebensmittelüberwachung und Arzneimittelzulassung der USA) wurde dieser TSEC aus Östrogen und Bazedoxifen zur Behandlung von menopausalen Beschwerden sowie zur Osteoporose-Prävention bei nicht-hysterektomierten Frauen zugelassen (Al-Safi und Santoro 2014). Dennoch sind weiterführende Studien zur Langzeitwirkung und Sicherheit, vor allem im Hinblick auf das Risiko der Karzinomentstehung, notwendig.

Von verschiedenen Organisationen, unter anderem der „International Menopause Society“, der „Endocrine Society“ und der „North American Menopause Society“, wurde ein Konsens bezüglich des Gebrauchs von Hormonersatzpräparaten bei klimakterischen Beschwerden getroffen: Die Therapie sollte ein Patientenalter von 60 Jahren nicht überschreiten beziehungsweise höchstens zehn Jahre nach der Menopause andauern. Für ältere Patientinnen sowie für

Patientinnen, bei denen eine HET kontraindiziert ist, besteht weiterhin eine erhebliche Notwendigkeit alternativer risikofreier Behandlungen (Drewe et al. 2015). Die Entscheidung, eine HET zu beginnen, hängt wesentlich von dem individuellen Gesundheitszustand, der persönlichen Gesundheitsgeschichte und dem Alter der Patientin sowie der Schwere der klimakterischen Beschwerden ab. In jedem Fall müssen die Patientinnen sorgfältig über Risiken und Nebenwirkungen aufgeklärt werden, so dass im Anschluss eine gemeinsame Entscheidung über das Therapieregime getroffen werden kann (Cedars 2014; Ortmann und Lattrich 2012).

1.5 *Cimicifuga racemosa* (CR)



Die Traubensilberkerze (Synonyme *Black Cohosh*, *Cimicifuga racemosa*, *Actaea racemosa*) ist eine Staude aus der Familie der Hahnenfußgewächse (*Ranunculaceae*). Sie stammt aus Nordamerika. Die Pflanze wurde traditionell von Indianern zur Milderung von Beschwerden während Menstruation und Geburt sowie zur Stimulation der Laktation eingesetzt. Außerdem wurde sie zur Behandlung von Husten, Erkältung, Rheuma und Müdigkeit verwendet (Firenzuoli et al. 2011; Geller und Studee 2005).

Abbildung 4: *Cimicifuga racemosa*
Wikipedia, die freie Enzyklopädie

Der spezielle Extrakt CR BNO 1055 aus der Wurzel der Pflanze wird heute zur Symptomlinderung bei klimakterischen Beschwerden eingesetzt. Bekannte Handelsnamen sind beispielsweise Klimadynon® und Remifemin®. Die deutsche „Kommission E“, ein Ausschuss zur Beratung des Bundesinstituts für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) bezüglich der Zulassung von Arzneimitteln der Phytotherapie, genehmigt den Gebrauch von CR für sechs Monate bei menopausalen Beschwerden, prämenstruellem Syndrom und Dysmenorrhoe (Fritz et al. 2014; Geller und Studee 2005).

I.5.1 Inhaltsstoffe CR BNO 1055

CR BNO 1055 lässt sich in zwei Fraktionen, die lipophile Saponinfraktion und die hydrophile Restfraktion, mit jeweils drei Subfraktionen differenzieren. Diese Differenzierung durch Bionorica stellt eine Neuheit dar. Tabelle 3 führt die Inhaltsstoffe auf (Seidlová-Wuttke et al. 2012a). Der genaue Wirkmechanismus der Bestandteile ist jedoch bislang ungeklärt (Geller und Studee 2006).

<i>Cimicifuga racemosa</i> BNO 1055					
Saponinfraktion			Restfraktion		
S1	S2	S3	R1	R2	R3
Polare Saponine Actein Deoxyactein Isoferulasäure	Hauptbestandteil: Actein Deoxyactein Kaffeesäure Ferulasäure Isoferulasäure	Hauptbestandteil: Lipophile Saponine	Kaffeesäure Ferulasäure Isoferulasäure Spuren: Methylserotonin	Hauptbestandteil: Phenylpropanoide Spuren: Methylserotonin	Methylserotonin
Spuren: Methylserotonin Cimipronidin Cyclocimipronidin Betasisphenol	Spuren: Methylserotonin Cimipronidin Cyclocimipronidin	Spuren: Actein Deoxyactein Methylserotonin Keine: Zimtsäurederivate	Cimipronidin Cyclocimipronidin Y-Guanidobutyraldehyd Betasisphenol Salsolinol	Cimipronidin Cyclocimipronidin Betasisphenol Cimiphenol	Cimipronidin Cyclocimipronidin

Tabelle 3: Inhaltsstoffe CR BNO 1055.

Bionorica, 12.04.2011, (Seidlová-Wuttke et al. 2012a)

a. Saponinfraktion

Die Saponinfraktion (S-Fraktion) besteht aus drei Gruppen, S1, S2 und S3. S1 enthält hauptsächlich polare Saponine, Actein, Deoxyactein und Isoferulasäure. Die Hauptbestandteile von S2 sind Actein und Deoxyactein, zusätzlich sind Kaffee-, Ferula- und Isoferulasäure enthalten. Lipophile Saponine bilden den Hauptbestandteil von S3.

b. Restfraktion

Die wasserlösliche Restfraktion (R-Fraktion) besteht ebenfalls aus drei Gruppen, R1, R2 und R3. R1 setzt sich hauptsächlich aus Kaffee-, Ferula- und Isoferulasäure zusammen. Der Hauptbestandteil von R2 sind Phenylpropanoide, während R3 vorwiegend aus Methylserotonin besteht.

I.5.2 Wirkungen und Nebenwirkungen

Der spezielle Extrakt *CR BNO 1055* aus der Wurzel der Pflanze wird heute zur Symptomlinderung bei klimakterischen Beschwerden eingesetzt. Dazu gehören Hitzewallungen mit Tachykardien, depressive Verstimmungen, emotionale Labilität, Nachtschweiß und Schlafstörungen (Rahal et al. 2013; Seidlová-Wuttke et al. 2012a). *CR BNO 1055* ist wirksam in der Verhinderung des Auftretens von Hitzewallungen und der Entstehung von Osteoporose. Es wurde gezeigt, dass der Extrakt bei postmenopausalen Frauen klimakterische Beschwerden in gleichem Maße wie konjugierte Östrogene - und signifikant besser als Placebo - lindert (Wuttke et al. 2014).

Es besteht eine antiinflammatorische und antioxidative Wirkung: Die Produktion von Interleukin 8 (insbesondere durch den Inhaltstoff Isoferulasäure) und anderen proinflammatorischen Zytokinen wird inhibiert und die Histaminfreisetzung herabgesetzt. Durch das Abfangen freier Radikale werden DNA-Schäden reduziert. Auch die Entstehung von Osteoporose und postmenopausaler Adipositas können durch *CR BNO 1055* reduziert werden. Das Hormon Leptin, das von Adipozyten produziert wird, zeigte sich in Studien mit ovx Ratten unter *CR*-Therapie vermindert. Zusätzlich wurde bei ovx Ratten, die mit der Saponinfraktion gefüttert wurden, eine Abnahme der viszeralen Fettdepots sowie eine Senkung der Serum-Cholesterin- und -Glukosewerte nachgewiesen (Seidlová-Wuttke et al. 2012a). In in-vitro-Studien sowie in Tierversuchen konnte eine osteoprotektive Wirkung belegt werden. Dafür werden die unpolaren Inhaltsstoffe, wie Actein und Deoxyactein, verantwortlich gemacht. Letzteres stimuliert die

Osteoblasten-Funktion und somit den Knochenaufbau (Wuttke et al. 2014). Die Verringerung der Osteoporoseentstehung durch *CR* wird zudem vermutlich durch eine Fettreduzierung im Knochenmark und ebenfalls durch eine Verminderung der Sekretion proinflammatorischer Substanzen, wie zum Beispiel Tumornekrosefaktor und Interleukin 6, erreicht (Rahal et al. 2013; Seidlová-Wuttke et al. 2003; Seidlová-Wuttke et al. 2012a; Wuttke und Seidlová-Wuttke 2013). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass durch *CR* die Entstehung von Osteoarthritis im Kniegelenk durch einen protektiven Effekt auf das Knorpelgewebe (Reduktion des Fettgewebes im Kniegelenk sowie Zunahme der Dicke des Knorpelgewebes) vermindert werden kann (Seidlová-Wuttke et al. 2012a; Wuttke et al. 2014).

CR BNO 1055 enthält keine östrogenartigen Substanzen und bindet nicht an Östrogenrezeptoren. Die Serum-Hormon-Spiegel für LH, FSH, Östrogen, Prolaktin und SHBG (Sexualhormonbindendes-Globulin) bleiben bei Einnahme unverändert. *CR* hat keinen proliferativen Einfluss auf das Endometrium und die vaginale Zytologie. Die Endometriumdicke und das Uterusgewicht, die unter Östrogenbehandlung zunehmen, blieben bei ovx Ratten unter *CR*-Therapie unverändert. Auch in klinischen Studien konnte kein Einfluss von *CR* auf Endometrium oder vaginales Gewebe nachgewiesen werden (Fritz et al. 2014; Wuttke et al. 2014). Es besteht demzufolge keine uterotrophe Wirkung und zudem anscheinend keine stimulierende Wirkung auf das Wachstum des Brustgewebes (Geller und Studee 2006; Wuttke und Seidlová-Wuttke 2013), was in der vorliegenden Dissertation auch für die Fraktionen und Subfraktionen von *CR* BNO 1055 untersucht werden soll. Es gibt dementsprechend keine östrogene Wirkung an diesen Organen. Die positive Wirkung auf klimakterische Beschwerden kann durch den Inhalt von Substanzen mit dopaminergen, serotonergen und GABAergen Eigenschaften erklärt werden. Dadurch bewirkt *CR* Effekte, die prämenopausal physiologisch von Estradiol im Hypothalamus verursacht werden (Wuttke und Seidlová-Wuttke 2013). Die serotonergen Eigenschaften werden von dem Inhaltsstoff Methylserotonin hervorgerufen, der an den Serotonin-Rezeptor 5-HT₇ bindet und damit die Serotonin-Wiederaufnahme hemmt. Diese Wirkung entspricht der Wirkweise von Selektiven-Serotonin-Wiederaufnahmehemmern (SSRI=*selective serotonin reuptake inhibitors*), die in der Behandlung von Depressionen und auch bei depressiven Verstimmungen im Klimakterium eingesetzt werden. Darüber hinaus vermindert Methylserotonin durch Bindung an Serotonin-Rezeptoren (5-HT_{1A} und 5-HT_{1D}) in Temperaturregulationszentren im Hypothalamus das Auftreten von Hitzewallungen (Drewe et al. 2015; Fritz et al. 2014; Kapur et al. 2010; Rahal et al. 2013). Die Tatsache, dass *CR* postmenopausale Symptome

verbessert, ohne dabei ungewollte negative östrogene Wirkungen zu haben, verleiht der Bedeutung von *CR* als Hormontherapie-Alternative Nachdruck (Fritz et al. 2014; Wuttke et al. 2014).

Als Nebenwirkungen der Behandlung mit *CR* BNO 1055 können leichte gastrointestinale Beschwerden, wie Diarrhoe oder Obstipation, Blähungen und abdominelles Druckgefühl, auftreten. Bei zu hoher Dosierung kann es zu Kopfschmerzen, Erbrechen und Schwindel kommen. Der Gebrauch von *CR* ist in Schwangerschaft und Stillzeit kontraindiziert, insbesondere da die Datenlage für diese Lebenssituationen nicht ausreichend ist (Drewe et al. 2013; Geller und Studee 2005, 2006). Es sind keine Medikamenten-Interaktionen bekannt (Geller und Studee 2005).

I.6 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Erkrankung der Frau und die häufigste Todesursache bei den 35- bis 55- jährigen Frauen der westlichen Welt (Weyerstahl 2013). Laut dem Statistischen Bundesamt war Brustkrebs im Jahr 2014 die vierthäufigste Todesursache bei allen Frauen in Deutschland (siehe Tabelle 9 im Anhang: Sterbefälle weiblich im Jahr 2014) (Statistisches Bundesamt). Etwa jede elfte Frau in Deutschland erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Jährlich sind deutschlandweit etwa 72.000 Neuerkrankungen zu verzeichnen (Weyerstahl 2013).

I.6.1 Ätiologie

In der Ätiologie sind sowohl endogene als auch exogene Faktoren entscheidend. Zu den Risikofaktoren gehören fleisch- und fettreiche Ernährung, Rauchen, Alkoholgenuss, Adipositas, höheres Lebensalter (>30J.) bei ausgetragener Erstschwangerschaft sowie Nulliparität. Des Weiteren spielen eine genetische Disposition (*breast cancer gene*=BRCA 1 und 2), familiäre Belastung, Mastopathie und langer Östrogeneinfluss durch frühe Menarche und späte Menopause in der Entstehung des Mammakarzinoms eine große Rolle. Eine länger als fünf Jahre andauernde Hormonsubstitution mit Östrogen-Progesteron-Kombinationspräparaten im Klimakterium führt darüber hinaus zu einem Anstieg des Karzinomrisikos (Russo J, Russo IH 2006; Stau-

ber und Weyerstahl 2007). Die Mehrzahl der Mammakarzinome (ca. 70%) exprimieren Östrogen-Rezeptoren (ER), wobei das Vorhandensein von ER α prognostisch ungünstiger ist, mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für Malignität und invasives Wachstum, das Vorkommen von ER β hingegen eher für einen benignen Tumor spricht (Mense et al. 2008; Rice und Whitehead 2006).

I.6.2 Lokalisation, Histologie und Klinik

Der Großteil der Mammakarzinome ist im oberen äußeren Quadranten lokalisiert. Die Metastasierung erfolgt primär lymphogen in die regionären Lymphknoten, aber auch hämatogen in zum Beispiel Knochen, Lunge, Leber und ZNS. Es lassen sich verschiedene histologische Typen unterscheiden. Die häufigsten sind invasiv-duktales (70-80% der Fälle) und invasiv-lobuläres (ca. 10%) Karzinome. Außerdem treten medulläre, tubuläre, muzinöse, papilläre, adenoid-zystische, apokrine und sekretorische Karzinome auf. Zu den klinischen Symptomen gehören tastbare Knoten, Größen-, Form- oder Hautveränderungen der Brust (z.B. „*peau d'orange*“), entzündliche Prozesse, Mamillenretraktion oder -sekretion sowie axilläre Lymphknotenschwellung. Schmerzen sind nur selten vorhanden (Kiechle 2011; Stauber und Weyerstahl 2007).

I.6.3 Therapie

Die Therapie des Mammakarzinoms ist sehr vielschichtig. Sie wird stetig dem aktuellen Wissenschaftsstand angepasst. Sie richtet sich nach Alter und Vorerkrankungen der Patientin sowie der Anatomie der Brust, dem Hormonrezeptorstatus und molekularen Eigenschaften des Tumors. Weitere entscheidende Aspekte stellen das Grading und das Staging des Tumors dar. Die Therapie beinhaltet dabei sowohl operative Maßnahmen, wie die Brusterhaltende Therapie oder die radikale Mastektomie, als auch Radiotherapie und (neo)adjuvante Systemtherapie.

Eine detaillierte Übersicht der Leitlinien zur Therapie des Mammakarzinoms finden sich auf www.awmf.org (Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e.V.)

I.7 Fragestellung

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Auswirkungen der Fraktionen von *Cimicifuga racemosa* (CR) auf das Proliferationsverhalten des Brustdrüsengewebes von Sprague-Dawley-(SD-)Ratten zu untersuchen. Als anerkanntes Modell für die Forschung über die klimakterische Frau wurden SD-Ratten gewählt, bei denen es durch Ovx zu typischen klimakterischen Beschwerden wie Hitzewallungen, genitaler Involution und Knochenabbau kommt.

Untersucht wurden die einzelnen Fraktionen des CR BNO 1055-Extraktes: die Saponinfraktion und ihre drei Untergruppen (S1-S3) sowie die Restfraktion und ihre drei Untergruppen (R1-R3). Zusätzlich gab es eine Estradiolgruppe als Positiv- und eine Kontrollgruppe als Negativkontrolle. Die Proliferation des Brustdrüsengewebes wurde anhand histologischer Präparate mikroskopisch beurteilt.

Folgende Fragestellungen sollen bearbeitet werden:

1. Wie äußert sich die Wirkung der einzelnen Fraktionen auf das Mammagewebe per histologischer Analyse? Gibt es östrogene Wirkungen einzelner Fraktionen?
2. Gibt es Unterschiede bezüglich der Auswirkungen auf das Mammagewebe zwischen der Behandlung mit dem Gesamtextrakt und der Behandlung mit den Fraktionen?
3. Ist es möglich, durch die detaillierte Analyse der Inhaltsstoffe eine geeignete Alternative für Patientinnen mit Kontraindikationen für eine HET zu etablieren?

Die Forschungen zu dieser Dissertation wurden im Rahmen des Bayrischen Forschungsprogramms „Osteoporoseprophylaxe mit pflanzlichen Mitteln“ AZ-838-08 von Bionorica durchgeführt. Es wurden parallel unterschiedliche Fragestellungen behandelt. Mehrere Doktoranden bearbeiteten verschiedene Gewebe, was zu kollektiven Ergebnissen führen wird.

II. Material und Methoden

II.1 Thematik

Untersucht wurde die Wirkung von *Cimicifuga racemosa* (CR) BNO 1055 auf die Brustdrüse ovx SD-Ratten. Dafür wurden 100 Tiere mit verschiedenen Testsubstanzen des Extraktes gefüttert. Untersucht wurden die Wirkung der zwei Fraktionen des Extrakts (Saponinfraktion und Restfraktion) und ihre jeweiligen drei Untergruppen (S1-S3, R1-R3). Zusätzlich gab es eine Kontrollgruppe und eine Estradiolgruppe, so dass insgesamt zehn Gruppen, bestehend aus je zehn Ratten, verglichen werden konnten. Von den Brustdrüsen erfolgte die Anfertigung von jeweils zwei histologischen Präparaten pro Tier. Diese wurden mikroskopisch beurteilt. Es wurden die Ductus (Ausführungsgänge), die Lobuli 1 (Drüsenläppchen, entsprechend 1-10 Azini (Drüsenendstücke)) und die Lobuli 2 (entsprechend 11-20 Azini) gezählt. Die Fläche des Mammagewebes wurde ausgemessen und die Anzahl der verschiedenen Strukturen in Beziehung zu der ausgemessenen Fläche gesetzt. Für jedes Tier wurde aus den zwei Präparaten ein Mittelwert ermittelt. Somit ergaben sich für jede der zehn Gruppen jeweils acht bis zehn Werte (je nach Verwertbarkeit des Präparates) für Ductus/mm², Lobuli 1/mm² und Lobuli 2/mm².

Ziel der Auswertung war es, signifikante Unterschiede in der Proliferation des Brustdrüsengewebes der einzelnen Gruppen zu zeigen.

II.2 Versuchsaufbau und -ablauf

Die Versuche wurden von der Bezirksregierung Braunschweig unter dem Aktenzeichen Nr. G 43.08 genehmigt. Durchgeführt wurden sie unter der Aufsicht von Frau Priv.-Doz. Dr. Dana Seidlová-Wuttke an der Universitätsmedizin Göttingen.

Meine Aufgabe begann mit der histologischen Auswertung der Präparate. Die Betreuung und Vorbereitung der Tiere sowie die Herstellung und Färbung der Präparate wurden von anderen Mitarbeitern der Abteilung übernommen. Die untersuchten Tiere waren 100 drei Monate alte Sprague-Dawley-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln), die zu jeweils fünf Tieren pro Käfig

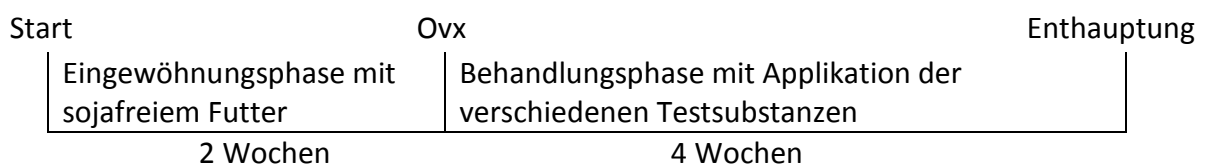
(Makrolon®-Käfig Typ IV, Firma Techniplast) bei 22-26°C in den Tierställen der Universitätsmedizin Göttingen gehalten wurden. Die Ratten hatten freie Wasser- und Futtermittelverfügung und waren täglich von 6-18 Uhr unter Beleuchtung. Die einzelnen Ratten wurden gewogen (durchschnittliches Gewicht zu Versuchsbeginn 250 g) und gleichmäßig zu jeweils fünf Tieren in die Käfige verteilt. Für die Wiedererkennung wurden die Tiere mit Transpondern ausgestattet (Emsikon Jung GmbH, Fastinning). Zunächst gab es eine zweiwöchige Eingewöhnungsphase mit sojafreiem Futter (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland, siehe Tabelle 10 im Anhang: Inhaltsstoffe sojafreies Pallet-Futter ssniff®). Anschließend folgte die Ovx unter Isofluran-Narkose.

Als Testsubstanz wurde der Extrakt CR BNO 1055 (Bionorica SE, Neumarkt) verwendet, der aus dem Wurzelstock der Taubensilberkerze gewonnen wird. Zum sojafreien Basisfutter wurden je nach Gruppe (jeweils zehn Tiere) die Testsubstanzen gemischt. Somit ergaben sich folgende Gruppen: Kontrollgruppe (sojafreies Futter), Estradiolgruppe (Estradiolbenzoat, ordering no. 9000, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München), Saponinfraktion, S1, S2, S3, Restfraktion, R1, R2, R3.

Bei einer durchschnittlichen Futtermenge einer Ratte von ca. 17-18g pro Tag und der Kenntnis der prozentualen Zusammensetzung des CR BNO 1055-Gesamtextraktes konnte der Anteil der einzelnen Fraktionen bestimmt werden. Die Dosis der Fraktionen entsprach dem jeweiligen Anteil an einer bekannten wirksamen Menge Gesamtextrakt von ca. 9 mg/d. Damit wurde sichergestellt, dass die Tiere durch das Futter die gleiche Menge an Inhaltsstoffen entsprechend des Gesamtextraktes erhielten. In den vier Behandlungswochen wurde die gefressene Futtermenge nach jeweils einer Woche bestimmt und der mittlere Futterumsatz pro Tier und Tag errechnet. Genauere Angaben sind der Tabelle 11 im Anhang (Übersicht über die Gruppen und das jeweilige Futter) zu entnehmen.

Nach der vierwöchigen Fütterung und Betreuung der Tiere kam es zur Tötung durch Enthauptung unter CO₂-Narkose.

Versuchsablauf:



Zur Organentnahme wurde der Bauch des jeweiligen Tieres rasiert, und es wurde von der fünften und sechsten Brustdrüse (von cranial nach caudal, entsprechend den inguinalen Brustdrüsen) ein Präparat entnommen (siehe Abbildung 5: Organentnahme). Die Gewebestücke hatten einen Durchmesser von 0,3 bis 0,4 cm.

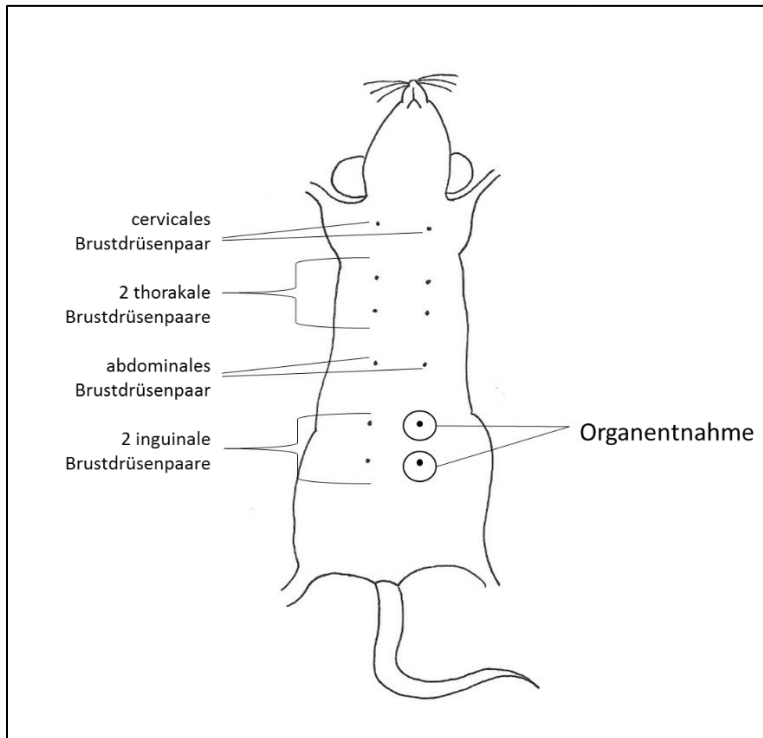


Abbildung 5: Organentnahme.
Ansicht der Ratte von ventral. Eigene Skizze.

II.3 Histologische Aufarbeitung des Gewebes

Die histologische Aufarbeitung des Gewebes wurde von der Chemisch-Technischen Assistentin H. Brüggemann-Meyer durchgeführt. Es erfolgte die Entwässerung und Stabilisierung mit Alkohol, Xylol und Paraffin. Nach dem Aushärten der Paraffinblöcke wurden pro Tier zehn Hartschnittpräparate angefertigt. Die Schnitte wurden auf beschriftete Objektträger aufgetragen, es folgte die Entplastung und die Färbung mit Hämatoxylin-Eosin. Genaue Angaben können den Tabellen 12-15 im Anhang (Tab. 12. Histologische Aufarbeitung des Gewebes, Tab. 13. Schema der Organentwässerung, Tab. 14. Ansetzen der Eosinlösung, Tab. 15. Detailliertes Schema der Hämatoxylin/Eosin- Färbung) entnommen werden.

II.4 Auswertung der histologischen Präparate

Von den zehn Objektträgern pro Tier wurden je zwei Präparate ausgewählt und untersucht. Zum Zeitpunkt der mikroskopischen Auswertung war für den Untersucher nicht erkennbar, zu welcher Gruppe die Präparate zugeordnet waren, um eine mögliche Beeinflussung zu vermeiden. Das Mammagewebe war nicht in allen Schnitten optimal getroffen, so dass nicht alle 200 Präparate evaluiert werden konnten. Die Präparate wurden in Quadranten eingeteilt und es wurde eine systematische Untersuchung aller vier Quadranten durchgeführt (siehe Abb. 6: Schematische Darstellung der histologischen Auswertung).

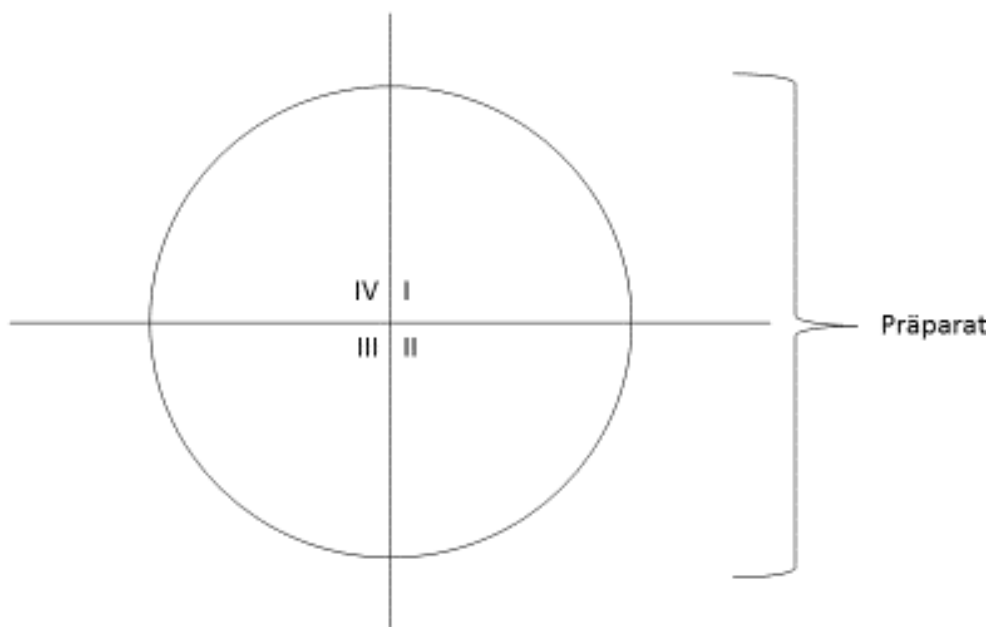


Abbildung 6: Schematische Darstellung der histologischen Auswertung.
I-IV: Quadranten. Eigene Skizze.

Unter dem Mikroskop (Zeiss Axiophot, Carl Zeiss AG, Jena) wurde die Zählung von Ductus, Lobulus 1 und Lobulus 2 bei einer Vergrößerung von 20x1,25 vorgenommen. Als Lobulus 1 wurden histologische Strukturen gewertet, die aus 1-10 Azini bestanden und als Lobulus 2 solche mit 11-20 Azini. Mit der digitalen Fotokamera (Olympus Color View, Soft Imaging System GmbH, Münster) wurden repräsentative Bilder aufgenommen. Die Messung der Fläche des untersuchten Gewebes erfolgte unter 10x1,25-facher Vergrößerung per Software (analysis® 3,0, Soft Imaging System GmbH, Münster). Die Anzahl der unterschiedlichen Strukturen

und die Fläche des untersuchten Gewebes wurden in einer Excel-Tabelle dokumentiert (Microsoft Office Excel 2007, Microsoft Corporation, USA). Zur Objektivierung und Vergleichbarkeit der Ergebnisse wurden die Werte auf Anzahl pro 1 mm² ausgemessener Fläche umgerechnet und ein Mittelwert für jedes Tier berechnet. Somit ergaben sich pro Gruppe je nach Verwertbarkeit des Präparates je acht bis zehn Ergebnisse für Ductus/mm², Lobulus 1/mm² und Lobulus 2/mm². Die Abbildungen 7-10 zeigen repräsentative histologische Bilder.

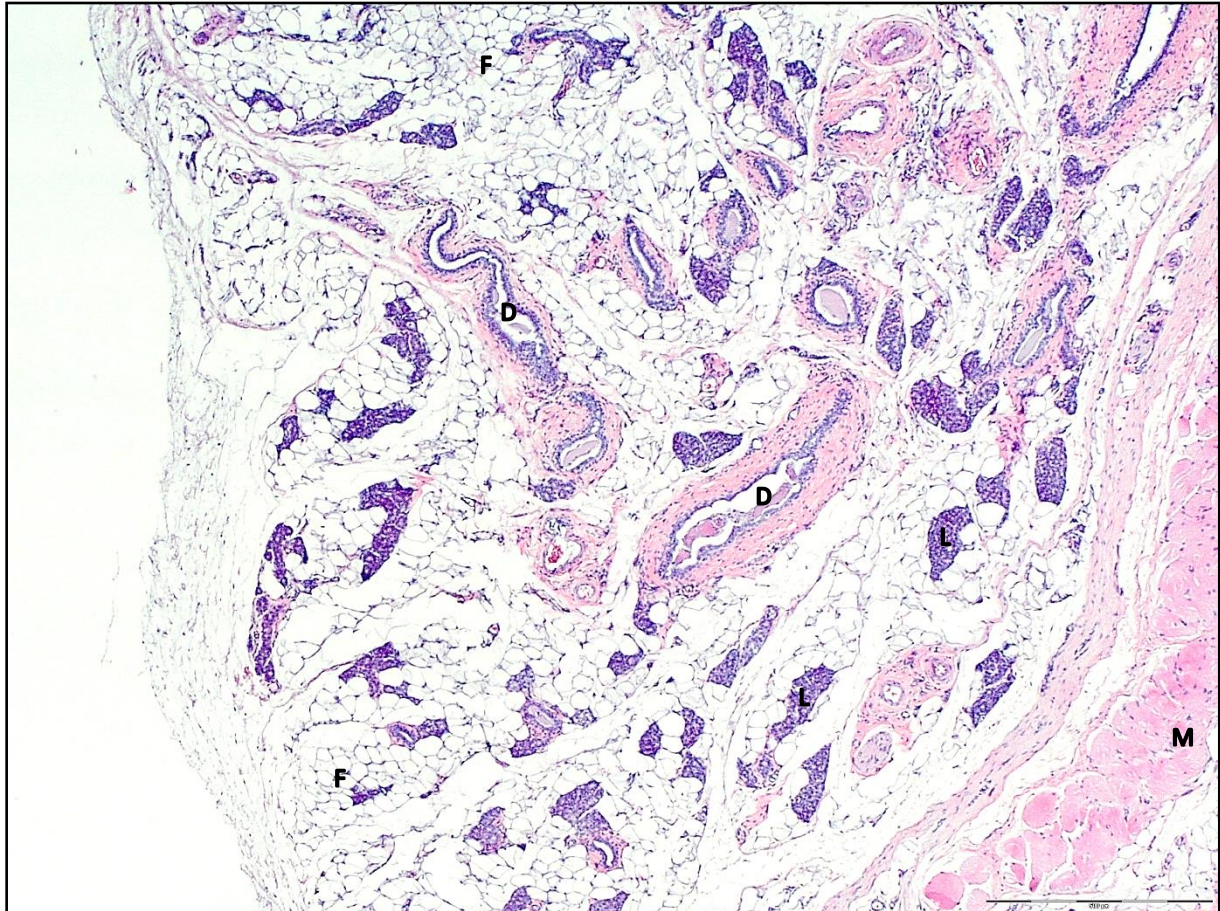


Abbildung 7: Übersicht (Beispiel); Vergrößerung 10x1,25

D=Ductus, F=Fett, L=Lobulus, M=Muskulatur



Abbildung 8: Lobulus 1 (Beispiel); Vergrößerung 20x1,25
F=Fettzelle, L1=Lobulus 1

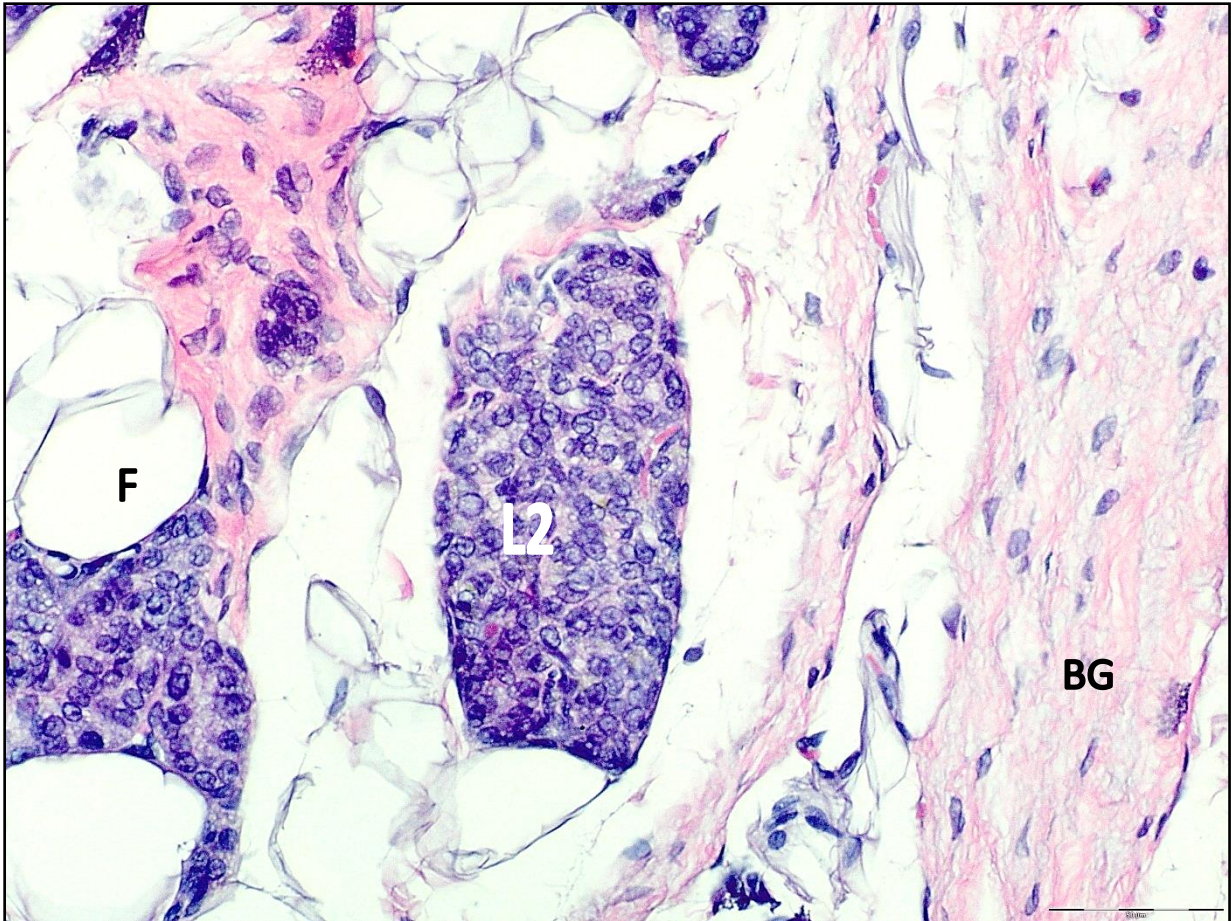


Abbildung 9: Lobulus 2 (Beispiel); Vergrößerung 20x1,25
BG=Bindegewebe, F=Fettzelle, L2=Lobulus 2

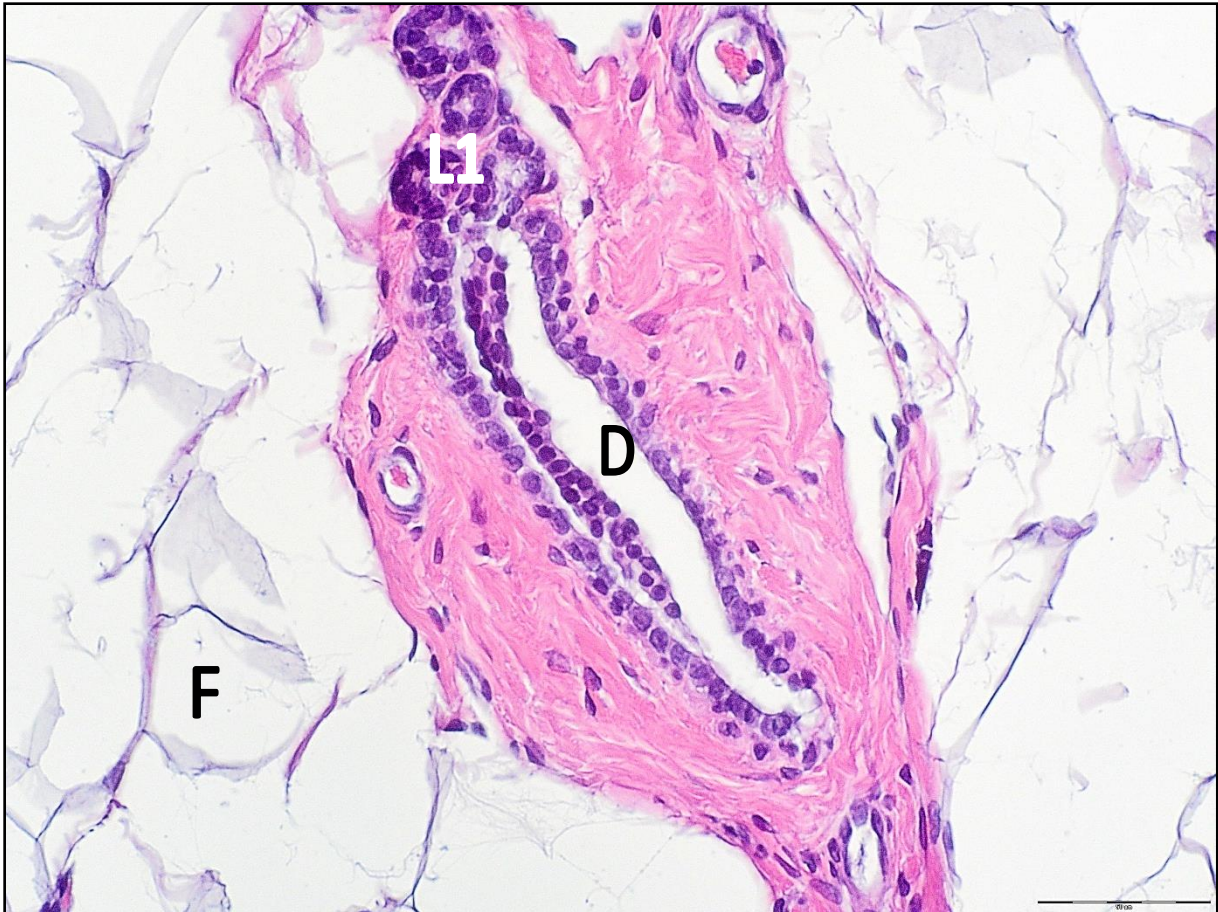


Abbildung 10: Ductus mit Lobulus 1 (Beispiel); Vergrößerung 20x1,25
D=Ductus, F=Fett, L1=Lobulus 1

II.5 Statistische Auswertung

Für jedes Tier der zehn Gruppen wurde aus den zwei Präparaten je ein Mittelwert für Ductus/mm², Lobulus 1/mm² und Lobulus 2/mm² ermittelt. Bei insgesamt 178 Präparaten (22 Präparate entsprechend elf Tieren konnten aufgrund eines falschen Anschnittes nicht verwertet werden) ergaben sich 534 Werte bzw. 276 Mittelwerte. Die jeweils acht bis zehn Werte pro Struktur pro Gruppe wurden in einer Excel-Tabelle (Microsoft Office Excel 2013, Microsoft Corporation, USA) festgehalten. Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit der Abteilung Medizinische Statistik der Universitätsmedizin Göttingen mit dem Programm Statistica für Windows (Software-System für Datenanalyse, Version 10.0, StatSoft).

II.5.1 Verteilung der Werte

Zur Veranschaulichung der Verteilung der Werte wurden Boxplots jeweils für die Ductus/mm², Lobulus 1/mm² und Lobulus 2/mm² angefertigt. Die Boxplots wurden nach den zehn Gruppen (Kontrolle, Estradiol, Saponin, S1, S2, S3, Rest, R1, R2, R3) gruppiert. Sie zeigen die Streuung der Werte, den Interquartilsabstand, den Median, Ausreißer und Extremwerte. Der Median ist der Wert, bei dem 50% der Werte niedriger und 50% der Werte höher liegen. Der Interquartilsabstand (Q) beinhaltet 50% der Werte und erstreckt sich vom unteren Quartil (25%) bis zum oberen Quartil (75%). Werte, die sehr "weit" von einem Verteilungszentrum entfernt sind, werden unter bestimmten Bedingungen als Ausreißer und Extremwerte bezeichnet. Dabei sind Ausreißer als das 1,5- bis 3-Fache des Interquartilsabstandes und Extremwerte als das über 3-fache des Interquartilsabstandes definiert.

II.5.2 Signifikanztest

Zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den Gruppen wurden t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau für diese Tests wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Das bedeutet, dass Werte größer gleich 0,05 als nicht signifikant gelten, während Ergebnisse mit Werten zwischen $< 0,05$ und 0,01 als signifikant bezeichnet werden. Zwischen $< 0,01$ und 0,001 sind die Ergebnisse als hoch signifikant, $< 0,001$ als höchst signifikant definiert. Zunächst

wurden die Estradiolgruppe und die Kontrollgruppe als Positiv- bzw. Negativkontrolle miteinander verglichen. Daraufhin folgten die Tests für die Behandlungsgruppen, verglichen mit der Kontroll- und der Estradiolgruppe.

III. Ergebnisse

In der vorliegenden Dissertation wurde die Proliferation des Mammagewebes von insgesamt 100 ovx Sprague-Dawley-Ratten, die mit je zehn Tieren in zehn verschiedenen Gruppen je nach Futterzusatz eingeteilt wurden, unter dem Mikroskop beurteilt. Als Negativkontrolle diente die Kontrollgruppe, die mit sojafreiem Futter ernährt wurde und keine Vermehrung des Brustdrüsengewebes aufweisen sollte. Als Positivkontrolle fungierte die Estradiolgruppe, bei der eine Proliferation erwartet wurde. Die Ratten der übrigen Gruppen wurden mit Testsubstanzen des Extraktes *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 gefüttert, so dass eine Saponin-, eine S1-, eine S2-, eine S3-, eine Rest-, eine R1-, eine R2- und eine R3-Gruppe untersucht wurden. Zur Beurteilung der Proliferation wurden die verschiedenen histologischen Strukturen Ductus (Ausführungsgänge), Lobuli 1 (entsprechend 1-10 Azini) und Lobuli 2 (entsprechend 11-20 Azini) gezählt und in Verhältnis zu der untersuchten Fläche des Präparates gesetzt. Somit ergaben sich für jede der zehn Gruppen Werte für die Ductus pro mm², die Lobuli 1 pro mm² und die Lobuli 2 pro mm².

Zur Veranschaulichung der Verteilung der Werte für Ductus/mm², Lobuli 1/mm² und Lobuli 2/mm² in den zehn Gruppen wurden Boxplots erstellt. Zur Beurteilung der Unterschiede zwischen den Gruppen wurden t-Tests für unabhängige Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau für die folgenden Tests wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

III.1 Vergleich der Kontrollgruppe mit der Estradiolgruppe

Bei einem t-Test für unabhängige Stichproben zeigt sich im Vergleich der Kontrollgruppe und der Estradiolgruppe ein signifikanter Unterschied der Werte für Ductus/mm², Lobulus 1/mm² und Lobulus 2/mm². Dabei ist ein hoch signifikanter Unterschied bezüglich der Ductus und der Lobuli 2, und ein höchst signifikanter Unterschied bezüglich der Lobuli 1 zu verzeichnen:

	Vgl. Kontrolle - Estradiol		
	Ductus/mm ²	Lob 1/mm ²	Lob 2/mm ²
p-Wert	0,002762	0,000589	0,001342

Tabelle 4: p-Werte des Vergleiches Kontrollgruppe und Estradiolgruppe

Das Mammagewebe proliferiert folglich unter Estradioltherapie signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Dies gilt für alle ausgewerteten Strukturen (Ductus, Lobulus 1 und Lobulus 2).

III.2 Ergebnisse für Ductus/mm²

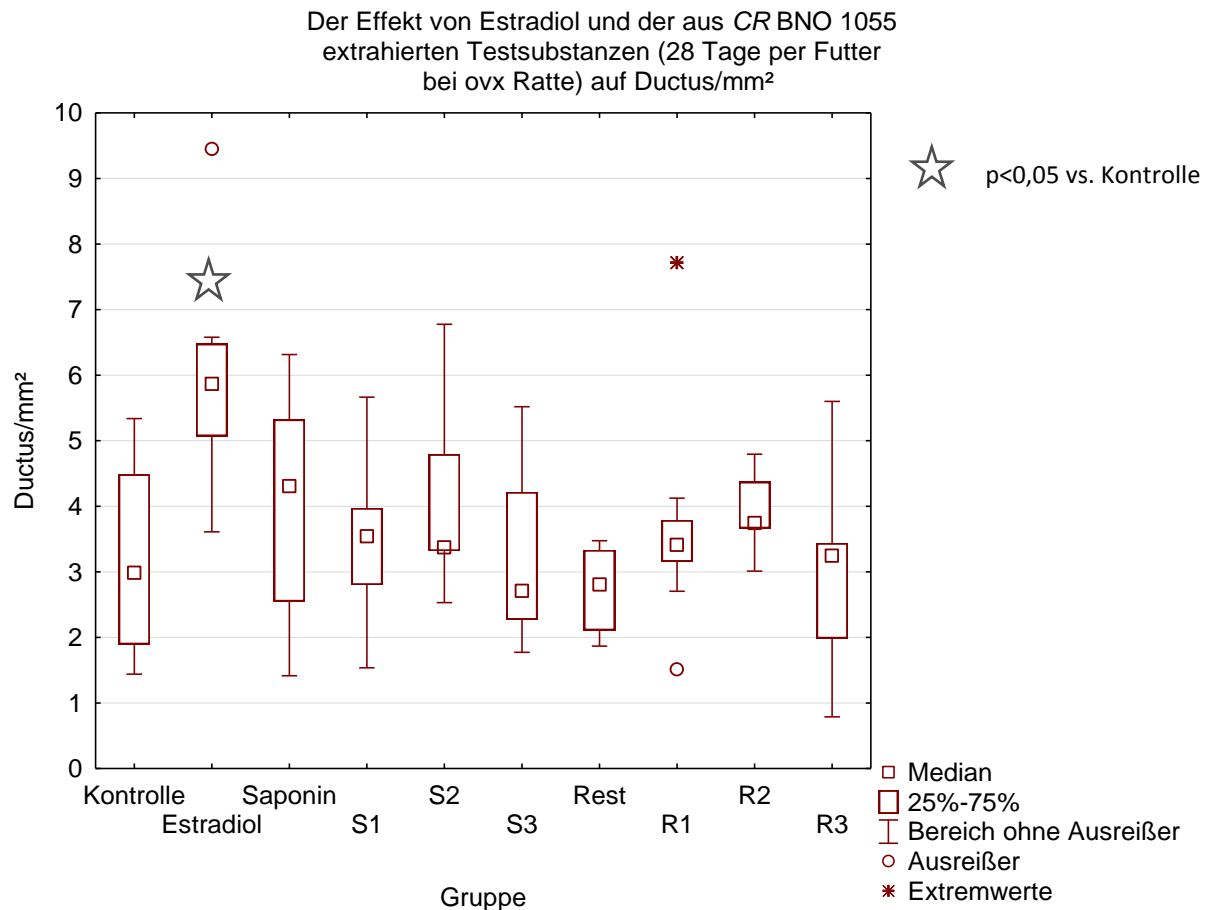


Abbildung 11: Boxplot: Der Effekt von Estradiol und der aus CR BNO 1055 extrahierten Testsubstanzen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf Ductus/mm².

In diesem Boxplot ist die Anzahl der Ductus/mm² (Ordinate), korreliert zu den unterschiedlichen Gruppen (Abszisse) dargestellt. ☆= signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Betrachtet man den Boxplot für die Ductus/mm² gruppiert nach den zehn Gruppen, so lassen sich folgende Werte feststellen:

In der Kontrollgruppe wurden acht Werte dokumentiert. Der Median liegt bei 2,98 Ductus/mm², der Gesamtbereich reicht von 1,44 bis 5,34, der Interquartilsabstand reicht von 1,9 bis 4,5 Ductus/mm² (Q= 2,6). In dieser Gruppe gibt es keine Ausreißer.

In der Estradiolgruppe gibt es einen Ausreißer mit 9,45. Die Verteilung der neun errechneten Werte ohne Ausreißer reicht von 3,61 bis 6,58, der Median liegt bei 5,87 und der Interquartilsabstand erstreckt sich von 5,07 bis 6,48 ($Q=1,41$; alle Werte in Ductus/mm²).

In der Saponingruppe wurden zehn Werte dokumentiert. Diese erstrecken sich von 1,42 bis 6,31 ohne Ausreißer. Der Median stellt sich bei 4,31 dar, der Interquartilsabstand reicht von 2,55 bis 5,32 ($Q=2,77$; alle Werte in Ductus/mm²).

Der Median der S1-Gruppe liegt bei 3,54. Der Bereich der acht errechneten Werte reicht von 1,54 bis 5,66. Der Interquartilsabstand reicht von 2,8 bis 3,97 ($Q=1,17$). Einen Ausreißer gibt es nicht (alle Werte in Ductus/mm²).

Innerhalb der neun dokumentierten Werte der S2-Gruppe gibt es keinen Ausreißer. Der Gesamtbereich erstreckt sich von 2,53 bis 6,78, wobei der Interquartilsabstand zwischen 3,32 und 4,79 liegt ($Q=1,47$). Der Median lässt sich bei 3,37 verzeichnen (alle Werte in Ductus/mm²).

In der S3-Gruppe reicht die Verteilung der acht verzeichneten Werte von 1,77 bis 5,52, der Interquartilsabstand erstreckt sich von 2,27 bis 4,22 ($Q=1,95$) und der Median liegt bei 2,71 (alle Werte in Ductus/mm²). Ein Ausreißer wurde nicht dokumentiert.

In der Restgruppe liegen die acht errechneten Werte zwischen 1,87 und 3,47, ohne Ausreißer. Dabei reicht der Interquartilsabstand von 2,11 bis 3,33 ($Q=1,22$). Der Median stellt sich bei 2,8 dar (alle Werte in Ductus/mm²).

Innerhalb der zehn dokumentierten Werte in der R1-Gruppe zeigen sich ein Ausreißer (1,51) und ein Extremwert (7,71). Der Bereich ohne Ausreißer liegt zwischen 2,70 und 4,13, der Interquartilsabstand zwischen 3,16 und 3,79 ($Q=0,63$) und der Median bei 3,41 (alle Werte in Ductus/mm²).

In der R2-Gruppe lassen sich acht Werte ohne Ausreißer im Bereich von 3,01 und 4,80 verzeichnen. Der Interquartilsabstand erstreckt sich von 3,67 bis 4,37 ($Q=0,7$), wobei der Median 3,74 beträgt (alle Werte in Ductus/mm²).

In der R3-Gruppe wurden zehn Werte ohne Ausreißer dokumentiert. Sie liegen zwischen 0,79 und 5,60, der Interquartilsabstand reicht von 1,99 bis 3,44 ($Q=1,45$) und der Median stellt sich bei 3,25 dar (alle Werte in Ductus/mm²).

In dem Boxplot zeigt sich, dass die Estradiolgruppe eher höhere Werte für die Ductus/mm² aufweist als die übrigen Gruppen, deren Werte eher der Kontrollgruppe gleichen. Bezüglich der Signifikanz zeigen sich folgende Ergebnisse:

Ductus/mm²

Gruppe	p-Wert	
	Vgl. Kontrolle	Vgl. Estradiol
Saponin	0,250343	0,023658
S1	0,671539	0,004215
S2	0,174213	0,037006
S3	0,976240	0,002804
Rest	0,430776	0,000147
R1	0,511746	0,008487
R2	0,207312	0,007164
R3	0,810156	0,000824

Tabelle 5: p-Werte aller Testsubstanzen im Vergleich zur Kontroll- und Estradiolgruppe bezüglich der Parenchymstruktur Ductus/mm².

Bei dem t-Test für unabhängige Stichproben zeigt sich für die Variable Ductus/mm² im Vergleich der Kontrollgruppe mit den übrigen Gruppen (die Estradiolgruppe ausgenommen) kein signifikanter Unterschied. Alle p-Werte sind größer als 0,05.

Der Unterschied zwischen der Estradiolgruppe und den übrigen Gruppen (die Kontrollgruppe ausgenommen) ist hingegen signifikant (jedes $p < 0,05$). Dabei gelten die Werte der Gruppen Saponin und S2 als signifikant, der Gruppen S1, S3, R1, R2 als hoch signifikant, diejenigen der Gruppen Rest und R3 als höchst signifikant.

Die Anzahl der Ductus pro Quadratmillimeter hat folglich unter der Behandlung mit den Testsubstanzen nicht signifikant zugenommen und unterscheidet sich gleichzeitig signifikant von der Estradiolgruppe.

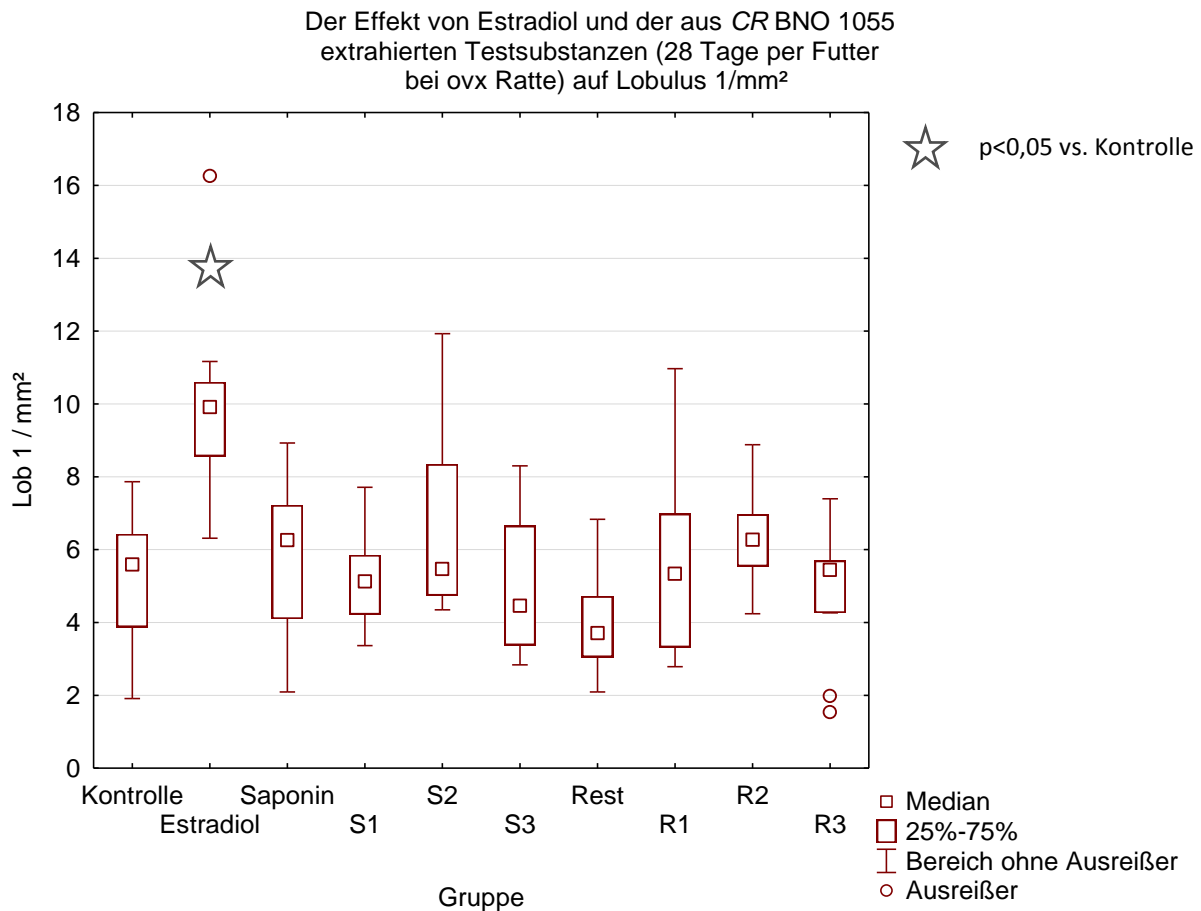
III.3 Ergebnisse für Lobulus 1/mm²

Abbildung 12: Boxplot: Der Effekt von Estradiol und der aus CR BNO 1055 extrahierten Testsubstanzen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf Lobulus 1/mm².

In diesem Boxplot ist die Anzahl der Lobuli 1/mm² (Ordinate), korreliert zu den unterschiedlichen Gruppen (Abszisse) dargestellt. ☆ = signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Im Boxplot für die Lobuli 1/mm² gruppiert nach den zehn Gruppen lassen sich folgende Werte feststellen:

In der Kontrollgruppe wurden acht Werte dokumentiert, einen Ausreißer gibt es nicht. Der Median liegt bei 5,59 Lobuli 1/mm², der Gesamtbereich reicht von 1,91 bis 7,86, der Interquartilsabstand von 3,88 bis 6,43 Lobuli 1/mm² (Q=2,55).

In der Estradiolgruppe gibt es unter den zehn verzeichneten Werten einen Ausreißer mit 16,26. Die Verteilung ohne Ausreißer reicht von 6,32 bis 11,17, der Median liegt bei 9,92 und der Interquartilsabstand erstreckt sich von 8,56 bis 10,60 (Q=2,04; alle Werte in Lobuli 1/mm²).

In der Saponingruppe wurden zehn Werte dokumentiert. Diese erstrecken sich von 2,09 bis 8,93 ohne Ausreißer. Der Median stellt sich bei 6,26 dar, der Interquartilsabstand reicht von 4,10 bis 7,22 ($Q=3,12$; alle Werte in Lobuli $1/\text{mm}^2$).

Der Median der S1-Gruppe liegt bei 5,13. Der Bereich der acht errechneten Werte reicht von 3,36 bis 7,71. Der Interquartilsabstand reicht von 4,22 bis 5,85 ($Q=1,63$). Einen Ausreißer gibt es nicht (alle Werte in Lobuli $1/\text{mm}^2$).

Innerhalb der neun dokumentierten Werte der S2-Gruppe gibt es keinen Ausreißer. Der Bereich erstreckt sich von 4,35 bis 11,93, wobei der Interquartilsabstand zwischen 4,74 und 8,34 liegt ($Q=3,60$). Der Median lässt sich bei 5,47 verzeichnen (alle Werte in Lobuli $1/\text{mm}^2$).

In der S3-Gruppe reicht die Verteilung der acht verzeichneten Werte von 2,84 bis 8,30, der Interquartilsabstand erstreckt sich von 3,38 bis 6,65 ($Q=3,27$) und der Median liegt bei 4,46 (alle Werte in Lobuli $1/\text{mm}^2$). Ein Ausreißer wurde nicht dokumentiert.

In der Restgruppe liegen die acht errechneten Werte zwischen 2,09 und 6,83, ohne Ausreißer. Dabei reicht der Interquartilsabstand von 3,05 bis 4,72 ($Q=1,67$). Der Median stellt sich bei 3,71 dar (alle Werte in Lobuli $1/\text{mm}^2$).

Innerhalb der zehn dokumentierten Werte in der R1-Gruppe zeigt sich kein Ausreißer. Der Gesamtbereich liegt zwischen 2,79 und 10,97, der Interquartilsabstand zwischen 3,32 und 6,98 ($Q=3,66$) und der Median bei 5,34 (alle Werte in Lobuli $1/\text{mm}^2$).

In der R2-Gruppe lassen sich acht Werte ohne Ausreißer im Bereich von 4,24 und 8,88 verzeichnen. Der Interquartilsabstand erstreckt sich von 5,55 bis 6,97 ($Q=1,42$), wobei der Median 6,27 beträgt (alle Werte in Lobuli $1/\text{mm}^2$).

In der R3-Gruppe wurden zehn Werte mit zwei Ausreißern (1,54 und 1,99) dokumentiert. Der Bereich ohne Ausreißer liegt zwischen 4,27 und 7,40, der Interquartilsabstand reicht von 4,27 bis 5,70 ($Q=1,43$) und der Median stellt sich bei 5,44 dar (alle Werte in Lobuli $1/\text{mm}^2$).

Dieser Boxplot veranschaulicht, dass die Estradiolgruppe eher höhere Werte für die Lobuli $1/\text{mm}^2$ aufweist als die übrigen Gruppen, deren Werte eher der Kontrollgruppe gleichen. Bezüglich der Signifikanz zeigen sich folgende Ergebnisse:

Lobulus 1/mm²

Gruppe	p-Wert	
	Vgl. Kontrolle	Vgl. Estradiol
Saponin	0,697314	0,001033
S1	0,990822	0,000261
S2	0,194677	0,014423
S3	0,858937	0,000470
Rest	0,186840	0,000033
R1	0,689189	0,001241
R2	0,199120	0,002795
R3	0,710628	0,000091

Tabelle 6: p-Werte aller Testsubstanzgruppen im Vergleich zur Kontroll- und Estradiolgruppe bezüglich der Parenchymstruktur Lobulus 1/mm².

Bei dem t-Test für unabhängige Stichproben zeigt sich für die Variable Lobulus 1/mm² im Vergleich der Kontrollgruppe mit den übrigen Gruppen (die Estradiolgruppe ausgenommen) kein signifikanter Unterschied. Die p-Werte erstrecken sich über dem Signifikanzniveau von 0,05. Der Unterschied zwischen der Estradiolgruppe und den übrigen Gruppen (die Kontrollgruppe ausgenommen) ist hingegen signifikant (jedes $p < 0,05$). Dabei lassen sich die Werte der Gruppe S2 als signifikant, der Gruppen Saponin, R1 und R2 als hoch signifikant, diejenigen der Gruppen S1, S3, Rest und R3 als höchst signifikant verzeichnen.

Die Anzahl der Lobuli 1 pro Quadratmillimeter hat folglich unter der Behandlung mit den Testsubstanzen nicht signifikant zugenommen und unterscheidet sich zugleich signifikant von der Estradiolgruppe.

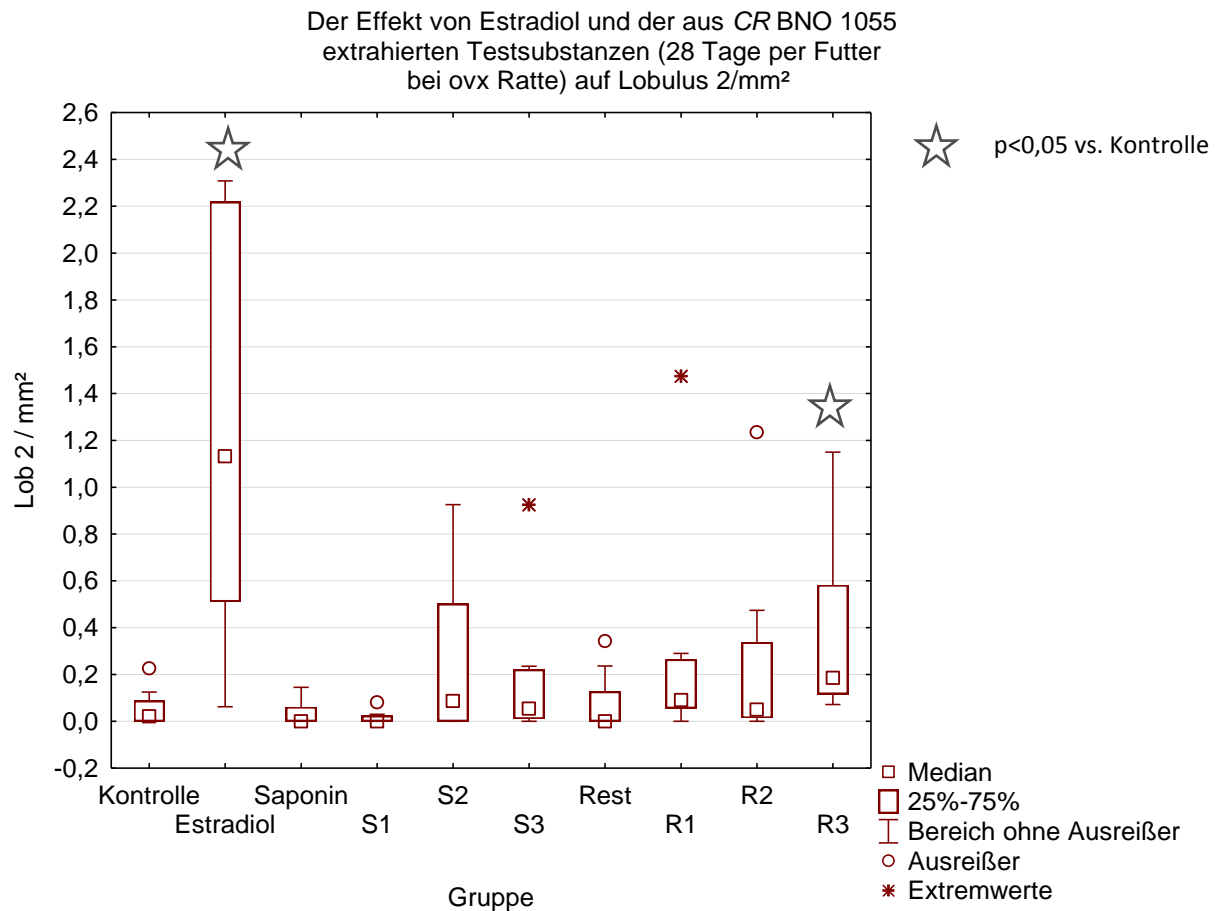
III.4 Ergebnisse für Lobulus 2/mm²

Abbildung 13: Boxplot: Der Effekt von Estradiol und der aus CR BNO 1055 extrahierten Testsubstanzen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf Lobulus 2/mm².

In diesem Boxplot ist die Anzahl der Lobuli 2/mm² (Ordinate), korreliert zu den unterschiedlichen Gruppen (Abszisse) dargestellt. ☆ = signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Im Boxplot für die Lobuli 2/mm² gruppiert nach den zehn Gruppen lassen sich folgende Werte feststellen:

In der Kontrollgruppe wurden acht Werte dokumentiert, wobei sich ein Ausreißer bei 0,23 darstellt. Der Median liegt bei 0,02 Lobuli 2/mm², der Gesamtbereich reicht von 0 bis 0,13, der Interquartilsabstand von 0 bis 0,09 Lobuli 2/mm² (Q= 0,09).

In der Estradiolgruppe reicht die Verteilung der zehn registrierten Werte von 0,06 bis 2,31, der Median liegt bei 1,13 und der Interquartilsabstand erstreckt sich von 0,51 bis 2,22 (Q=1,71; alle Werte in Lobuli 2/mm²). Es gibt keinen Ausreißer.

In der Saponingruppe wurden zehn Werte dokumentiert. Diese erstrecken sich von 0 bis 0,15 ohne Ausreißer. Der Median liegt bei 0, der Interquartilsabstand reicht von 0 bis 0,06 ($Q=0,06$; alle Werte in Lobuli 2/mm²).

Der Median der S1-Gruppe mit insgesamt acht errechneten Werten liegt bei 0. Der Bereich ohne Ausreißer reicht von 0 bis 0,03. Der Interquartilsabstand reicht von 0 bis 0,02 ($Q=0,02$). Ein Ausreißer liegt bei 0,08 (alle Werte in Lobuli 2/mm²).

Innerhalb der neun dokumentierten Werte der S2-Gruppe gibt es keinen Ausreißer. Der Bereich erstreckt sich von 0 bis 0,93, wobei der Interquartilsabstand zwischen 0 und 0,50 liegt ($Q=0,50$). Der Median lässt sich bei 0,09 verzeichnen (alle Werte in Lobuli 2/mm²).

In der S3-Gruppe mit acht verzeichneten Werten zeigt sich ein Extremwert mit 0,93. Die Verteilung der Werte ohne Ausreißer reicht von 0 bis 0,24. Der Interquartilsabstand erstreckt sich von 0,01 bis 0,22 ($Q=0,21$) und der Median liegt bei 0,05 (alle Werte in Lobuli 2/mm²).

In der Restgruppe liegen sieben der acht errechneten Werte zwischen 0 und 0,24, ein Ausreißer liegt bei 0,34. Der Interquartilsabstand reicht von 0 bis 0,13 ($Q=0,13$). Der Median stellt sich bei 0 dar (alle Werte in Lobuli 2/mm²).

Innerhalb der zehn dokumentierten Werte in der R1-Gruppe zeigt sich ein Extremwert mit 1,47. Der Bereich ohne Ausreißer liegt zwischen 0 und 0,29, der Interquartilsabstand zwischen 0,06 und 0,26 ($Q=0,20$) und der Median bei 0,09 (alle Werte in Lobuli 2/mm²).

In der R2-Gruppe mit acht Werten lassen sich sieben im Bereich von 0 und 0,47 verzeichnen, ein Ausreißer liegt bei 1,24. Der Interquartilsabstand erstreckt sich von 0,01 bis 0,34 ($Q=0,33$), der Median beträgt 0,05 (alle Werte in Lobuli 2/mm²).

In der R3-Gruppe wurden zehn Werte ohne Ausreißer im Bereich von 0,07 bis 1,15 dokumentiert. Der Interquartilsabstand reicht von 0,12 bis 0,58 ($Q=0,46$) und der Median stellt sich bei 0,19 dar (alle Werte in Lobuli 2/mm²).

In diesem Boxplot wird deutlich, dass die Estradiolgruppe eher höhere Werte für die Lobuli 2/mm² aufweist als die übrigen Gruppen, deren Werte eher der Kontrollgruppe gleichen. Bezüglich der Signifikanz zeigen sich folgende Ergebnisse:

Lobulus 2/mm²

Gruppe	p-Wert	
	Vgl. Kontrolle	Vgl. Estradiol
Saponin	0,515782	0,000313
S1	0,217686	0,000997
S2	0,102430	0,006280
S3	0,268909	0,004592
Rest	0,739087	0,001608
R1	0,237973	0,004418
R2	0,216345	0,009180
R3	0,036374	0,006383

Tabelle 7: p-Werte aller Testsubstanzen im Vergleich zur Kontroll- und Estradiolgruppe bezüglich der Parenchymstruktur Lobulus 2/mm².

Bei dem t-Test für unabhängige Stichproben zeigt sich im Vergleich der Kontrollgruppe mit den Gruppen Saponin, S1, S2, S3, Rest, R1 und R2 kein signifikanter Unterschied. Die Anzahl der Lobuli 2 pro Quadratmillimeter hat folglich unter der Behandlung mit diesen Testsubstanzen nicht signifikant zugenommen.

Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe R3 ist hingegen signifikant ($p=0,036$). Jedoch unterscheidet sich R3 ($p=0,006$), wie auch die Gruppen S2, S3, Rest, R1 und R2, hoch signifikant von der Estradiolgruppe. Bei den Gruppen Saponin und S1 sind die Ergebnisse im Vergleich zur Estradiolgruppe höchst signifikant.

Somit zeigt sich, dass die Lobuli 2 unter Behandlung mit der Testsubstanz R3 zwar nicht so wenig proliferieren wie in der Kontrollgruppe, aber auch nicht so ausgeprägt wie in der Estradiolgruppe. Der Unterschied zur Estradiolgruppe ist jedoch signifikanter.

Für alle Testsubstanzen ist für die Variable Lobulus 2/mm² ein signifikanter Unterschied zur Estradiolgruppe zu verzeichnen.

IV. Diskussion

Ziel der vorliegenden Dissertation war es, die Auswirkungen der Fraktionen des Extraktes *Cimicifuga racemosa* BNO 1055 auf das Proliferationsverhalten des Brustdrüsengewebes ovariectomierter Sprague-Dawley-Ratten zu erforschen.

Die Differenzierung des Extraktes in Subfraktionen und Inhaltsstoffe stellt ein Novum dar. Durch die vorliegende Untersuchung können Aussagen über die Wirkung der einzelnen Fraktionen und Subfraktionen, auch im Vergleich mit dem Gesamtextrakt, getroffen werden. Zudem soll erarbeitet werden, ob durch Eliminierung einzelner Subfraktionen die Sicherheit des Extraktes CR BNO 1055 im Hinblick auf Nebenwirkungen bezüglich des Mammagewebes verbessert werden kann.

IV.1 Die Wirkung von Estradiol auf das Mammagewebe

Östrogene sind maßgeblich an Wachstum und Proliferation sowohl des normalen Brustgewebes als auch bösartiger Neubildungen beteiligt. Beispielsweise sind eine frühe Menarche und späte Menopause, also eine längere Exposition mit endogenen Östrogenen, mit einem erhöhten Mammakarzinom-Risiko assoziiert (Russo J, Russo IH 2006; Stauber und Weyerstahl 2007). Rimoldi et al. testeten in einer Studie mit ovx SD-Ratten den Einfluss von Estradiol u.a. auf das Mammagewebe. Die Ratten wurden über 3 Monate mit sojafreiem Futter und Estradiol in zwei unterschiedlichen Konzentrationen gefüttert. Eine Gruppe erhielt 0,17 mg Estradiol pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag, eine andere Gruppe 0,7 mg pro Kilogramm Körpergewicht pro Tag. Eine Gruppe mit sojafreiem Futter diente als Kontrollgruppe. Das Mammagewebe wurde mikroskopisch beurteilt sowie immunhistochemisch zur Bewertung der Proliferationsrate untersucht. Für beide Gruppen zeigte sich eine Zunahme der epithelialen Strukturen; für die Gruppe mit der höheren Estradiolkonzentration in größerem Ausmaß. Die Immunhistochemie ergab für beide Estradiolkonzentrationen eine Zunahme der Proliferationsrate (Rimoldi et al. 2007). In einer weiteren Studie mit ovx Mäusen wurde gezeigt, dass Tiere, die mit Estradiol behandelt wurden, eine höhere Brustkrebs-Inzidenz bei einer kürzeren Latenzzeit entwickeln als eine Kontrollgruppe ohne Estradioleinfluss (Russo J, Russo IH 2006).

In In-vitro-Studien mit MCF-10-Zellen, einer ER α -negativen Zellreihe humaner Brustepithelien, wurde gezeigt, dass die Zellen unter Östrogeneinfluss ihre Fähigkeit verlieren, geordnete Ductus zu bilden. Stattdessen entwickeln sich neoplastische Umwandlungen mit soliden Zellmassen (Russo J, Russo IH 2006). Die karzinogene Wirkung von Östrogenen wird durch eine Stimulation von Wachstum und Zellproliferation sowohl über Rezeptoren (wobei im Mammagewebe der ER α maßgeblich beteiligt ist (Gajewska et al. 2013)) als auch über genotoxische Metabolite vermittelt (Mense et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass unter Einfluss von Estradiol die Proliferation der drei parenchymatösen Strukturen des Mammagewebes gefördert wird. Die Estradiolgruppe diente als Positivkontrolle, die Kontrollgruppe als Negativkontrolle. Im Vergleich der Estradiolgruppe und der Kontrollgruppe zeigt sich im t-Test für unabhängige Stichproben für alle errechneten Werte ein signifikanter Unterschied (p -Werte $< 0,05$). Dabei sind die Werte für Ductus/mm² und Lobulus 2/mm² hoch signifikant, der Wert für Lobulus 1/mm² höchst signifikant.

Das Mammagewebe proliferiert folglich wie erwartet unter Estradioltherapie signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Diese Aussage ist Voraussetzung für den Vergleich der Testsubstanzen des Extraktes CR BNO 1055 sowohl mit der Kontroll- als auch mit der Estradiolgruppe.

IV.2 Die Wirkung von CR BNO 1055 auf das Mammagewebe

Der Gesamtextrakt CR BNO 1055 bindet nicht an Östrogenrezeptoren und vermittelt keine östrogenen Effekte an Östrogen-Rezeptor-positiven Brustkrebszellen in vitro sowie am Mammagewebe ovx Ratten (Fritz et al. 2014; Wuttke et al. 2014). Für verschiedene humane Brustkrebs-Zellreihen konnte ein hemmender Effekt von CR-Extrakten auf die Zellproliferation gezeigt werden. Der genaue Wirkmechanismus der antiproliferativen Effekte ist noch nicht bekannt. Es werden jedoch die Triterpenglykoside sowie die Zimtsäureester für die proliferationshemmende und Apoptose-fördernde Wirkung verantwortlich gemacht. In Studien mit Östrogen-sensitiven MCF-7 Zellen wurde gezeigt, dass CR-Extrakte keine stimulierende Wir-

kung auf das Zellwachstum haben und gleichzeitig eine Östrogen-bedingte Proliferation verhindern (Drewe et al. 2015). Des Weiteren konnte in klinischen Studien bereits gezeigt werden, dass die Dichte der Brustdrüse in der Mammographie unter *CR*-Therapie (über 12 Monate) nicht beeinflusst wird. Im Vergleich zu der Behandlung mit einem Östrogen-Progesteron-Präparat über 24 Wochen zeigte sich ein höchst signifikanter Unterschied in der mammographisch ermittelten Brustdrüsendichte sowohl unter *CR*- als auch unter Placebo-Einnahme. Zusätzlich konnte in Mamillen-Aspiraten weder eine veränderte Zellmorphologie noch ein bestimmter Proliferationsmarker (Ki-67, färbt sich teilende Zellen und gibt Information über die Wachstumsgeschwindigkeit eines Tumors) nachgewiesen werden. Folglich gibt es weder in experimentellen noch in klinischen Versuchen Hinweise auf eine schädliche Wirkung von *CR* BNO 1055 auf das Mammagewebe (Drewe et al. 2015; Fritz et al. 2014; Wuttke et al. 2014).

Die Wirkung des Gesamtextraktes *CR* BNO 1055 auf das Mammagewebe ovx SD-Ratten wurde mit einem ähnlichen Versuchsaufbau und –ablauf (Verabreichung der Testsubstanzen *CR* BNO 1055 und Estradiol oral für drei Monate) bereits untersucht. Es konnte eine signifikant geringere Anzahl aller Strukturen (Lobulus 1, Lobulus 2 und Ductus) im Vergleich zur Estradiolgruppe und kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe gezeigt werden (Wuttke et al. 2014).

Nach der Identifizierung der Subfraktionen und ihrer Inhaltsstoffe ergab sich nun zum ersten Mal die Möglichkeit, zu untersuchen, ob es einen Unterschied zu der Wirkung des Gesamtextraktes gibt und ob durch die Kombination oder Eliminierung einzelner Subfraktionen eine bessere Wirksamkeit und Sicherheit bei der alternativen Therapie klimakterischer Beschwerden gewährleistet werden könnte.

IV.3 Die Wirkung der Fraktionen von *CR* BNO 1055 auf das Mammagewebe

Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich mit der Fragestellung, ob die einzelnen Fraktionen des Extraktes *CR* BNO 1055 eine Östrogen-ähnliche Wirkung auf das Brustdrüsengewebe ovx SD-Ratten (als Modell für die postmenopausale Frau) haben. Da die Differenzierung des Extraktes in die Subfraktionen und Inhaltsstoffe eine Neuheit darstellt, gibt es in der Literatur keine vergleichbaren Studien.

Der Extrakt wurde in seine zwei Fraktionen, die Saponin- und die Restfraktion, und diese wiederum in ihre jeweiligen Subfraktionen, S1-3 und R1-3, unterteilt. Zum Vergleich dienten eine Estradiol- und eine Kontrollgruppe. Letztere erhielt keine Testsubstanzen. Die verwendeten SD-Ratten wurden zu Beginn der Versuche ovariectomiert und zuvor sojafrei ernährt. Die Serum-Estradiolwerte wurden bestimmt und waren nicht messbar. Diese Tatsache verdeutlicht, dass die ovx SD-Ratte zur Untersuchung von Substanzen mit potentiell östrogenen Wirkung ein ideales Modell darstellt. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass die Proliferation des Brustdrüsengewebes in den verschiedenen Gruppen verglichen mit der Kontrollgruppe allein auf die Stimulation durch die verabreichten Testsubstanzen zurückzuführen ist. Zum Basisfutter wurden je nach Gruppe die Testsubstanzen gemischt. Somit ergaben sich folgende Gruppen: Kontrollgruppe (sojafreies Futter), Estradiolgruppe, Saponinfraktion, S1, S2, S3, Restfraktion, R1, R2, R3.

IV.3.1 Ergebnisse der Saponinfraktion

Im Vergleich der Saponinfraktion mit der Kontrollgruppe im t-Test für unabhängige Stichproben zeigen sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der unterschiedlichen Parenchymstrukturen. Die p-Werte betragen jeweils über 0,05.

Vergleicht man die Saponinfraktion mit der Estradiolgruppe, so zeigen sich signifikante Unterschiede bezüglich aller Parenchymstrukturen. Im t-Test für unabhängige Stichproben beträgt jeder p-Wert unter 0,05.

Unter Einfluss der Saponinfraktion mit ihren Hauptbestandteilen Actein, Deoxyactein, Isoferulasäure, lipophilen und polaren Saponinen kommt es folglich nicht zu einer Proliferation des Brustdrüsengewebes. Sie verhält sich analog der Kontrollgruppe.

IV.3.2 Ergebnisse der Gruppen S1, S2 und S3

Der Vergleich der Saponin-Subfraktionen S1-S3 mit der Kontrollgruppe ergibt keine signifikanten Unterschiede für Ductus/mm², Lobulus 1/mm² und Lobulus 2/mm². Im Gegensatz dazu unterscheiden sich alle Parenchymstrukturen in diesen Gruppen signifikant zur Estradiolgruppe. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Gruppen S1-S3 nicht proliferativ auf das Mammagewebe wirken.

Die Bestandteile der Saponin-Subfraktionen sind polare und lipophile Saponine, Actein, Deoxyactein, Kaffee-, Ferula- und Isoferulasäure. Diesen Bestandteilen wird insbesondere die antiinflammatorische und die osteoprotektive Wirkung, sowie die Reduktion von Serum-Cholesterin und –glukose, durch CR BNO 1055 zugeschrieben (Seidlová-Wuttke et al. 2012a; Wuttke et al. 2014). Da es sich bei der Definition dieser Inhaltsstoffe um ein Novum handelt, steht keine Literatur zur Diskussion dieser Ergebnisse zur Verfügung.

IV.3.3 Ergebnisse der Restfraktion

Im t-Test für unabhängige Stichproben zeigen sich im Vergleich der Restgruppe mit der Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede bezüglich der unterschiedlichen Parenchymstrukturen Ductus/mm², Lobulus 1/mm² und Lobulus 2/mm². Die p-Werte betragen jeweils über 0,05.

Vergleicht man die Restgruppe mit der Estradiolgruppe, so zeigen sich signifikante Unterschiede bezüglich aller Parenchymstrukturen. Im t-Test für unabhängige Stichproben beträgt jeder p-Wert unter 0,05.

Eine Proliferation des Brustdrüsengewebes bleibt folglich unter Einfluss der Restfraktion mit ihren Bestandteilen Kaffee-, Ferula- und Isoferulasäure sowie Phenylpropanoide und Methylserotonin aus. Die Gruppe verhält sich analog der Kontrollgruppe.

IV.3.4 Ergebnisse der Gruppen R1 und R2

Der Vergleich der Rest-Subfraktionen R1 und R2 mit der Kontrollgruppe ergibt keine signifikanten Unterschiede für Ductus/mm², Lobulus 1/mm² und Lobulus 2/mm². Im Gegensatz dazu unterscheiden sich alle Parenchymstrukturen in den Gruppen R1 und R2 signifikant zur Estradiolgruppe. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Gruppen R1 und R2 nicht proliferativ auf das Mammagewebe wirken.

Die Hauptbestandteile der Subfraktionen R1 und R2 bilden Phenylpropanoide, Kaffee-, Ferula- und Isoferulasäure. Isoferulasäure wird insbesondere für die antiinflammatorischen Effekte von CR BNO 1055 verantwortlich gemacht (Rahal et al. 2013). Da es sich bei der Definition dieser Inhaltsstoffe um ein Novum handelt, steht keine Literatur zur Diskussion dieser Ergebnisse zur Verfügung.

IV.3.5 Ergebnisse der Gruppe R3

Bezüglich der Werte für Ductus/mm² und Lobulus 1/mm² demonstriert der t-Test für unabhängige Stichproben keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der Gruppe R3 zur Kontrollgruppe mit p-Werten über 0,05. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe R3 bezüglich der Lobuli 2/mm² ist hingegen signifikant mit einem p-Wert von 0,04 (gerundet). Die Anzahl der Lobuli 2 pro Quadratmillimeter ist folglich signifikant höher als in der Kontrollgruppe, was einen proliferativen Einfluss von R3 auf das Mammagewebe darlegt. Im Vergleich der Subfraktion R3 mit der Estradiolgruppe lassen sich im t-Test für unabhängige Stichproben bezüglich aller drei Parenchymstrukturen signifikante Unterschiede verzeichnen. Die p-Werte betragen jeweils unter 0,05. Die Proliferation der Lobuli 2/mm² unter Behandlung mit der Testsubstanz R3 ist dementsprechend zwar ausgeprägter als in der Kontrollgruppe, jedoch geringer als in der Estradiolgruppe.

Der Hauptbestandteil der Subfraktion R3 ist Methylserotonin. Es ist in allen Subfraktionen enthalten, in den anderen Subfraktionen (S1-S3, R1, R2) ist die Konzentration jedoch gering. Es wurde nachgewiesen, dass Methylserotonin durch Bindung an den Serotonin-Rezeptor 5-HT₇ die Serotonin-Wiederaufnahme hemmt und somit vergleichbar wie ein SSRI wirkt. Darüber hinaus wird durch Bindung an Serotonin-Rezeptoren in Temperaturregulationszentren des Hypothalamus das Auftreten von Hitzewallungen vermindert (Fritz et al. 2014; Kapur et al. 2010; Rahal et al. 2013). Folglich ist davon auszugehen, dass die stimmungsaufhellenden Effekte von CR BNO 1055 und auch die Reduktion von Hitzewallungen maßgeblich der Subfraktion R3 zuzuschreiben sind.

IV.3.6 Fazit

Die Ergebnisse zeigen, dass sich jede Testsubstanzgruppe, mit Ausnahme der Subfraktion R3, analog der Kontrollgruppe verhält und eine signifikante Proliferation des Brustdrüsengewebes unter Einnahme dieser Substanzen ausbleibt. Die zudem signifikant geringere Proliferation aller Testsubstanzgruppen (Saponin, S1, S2, S3, Rest, R1, R2 und R3) im Vergleich zur proliferationsfördernden Estradiolgruppe verdeutlicht die Sicherheit der Substanzen im Hinblick auf das Mammagewebe. Dabei muss jedoch folgendes beachtet werden:

Die Subfraktion R3 unterscheidet sich bezüglich der Lobuli 2/mm² sowohl von der Kontrollgruppe ($p=0,04$) als auch von der Estradiolgruppe ($p=0,006$) signifikant. Die Anzahl der Lobuli 2/mm² ist folglich nicht in gleichem Maße gering wie in der Negativkontrolle, jedoch ebenfalls nicht so ausgeprägt wie in der Positivkontrolle.

Eine mögliche Begründung für die ausgeprägtere Zunahme der Lobuli 2/mm² im Vergleich zur Kontrollgruppe wäre eine inkomplette Ovx eines oder mehrerer Tiere in der Gruppe R3. Außerdem wäre eine vermehrte ektope Estradiolproduktion, z.B. durch einen Estradiol-produzierenden Tumor der Nebenniere, denkbar. In dem Boxplot der Lobuli 2/mm² ist eine größere Streuung der Werte in der Gruppe R3 im Vergleich zu den anderen Gruppen erkennbar (siehe Kapitel III.4). Die Ratte mit dem höchsten Wert für die Lobuli 2/mm² (mit 1,15 Lob 2/mm² deutlich über dem Mittelwert der Gruppe R3 mit 0,34 Lob 2/mm²), weist bezüglich der Ductus/mm² einen unterdurchschnittlichen Wert auf (1,99 Ductus/mm² bei einem Mittelwert der Gruppe R3 von 3,02 Ductus/mm²); und bezüglich der Lobuli 1/mm² einen leicht erhöhten Wert im Vergleich zu dem durchschnittlichen Wert der anderen Tiere derselben Gruppe (5,7 Lob 1/mm² bei einem Mittelwert der Gruppe R3 von 4,85 Lob 1/mm² und einem Höchstwert von 7,4 Lob 1/mm²). Diese Ergebnisse sprechen gegen eine vermehrte Estradiolzirkulation, bei der alle Parenchymstrukturen proliferieren müssten. Des Weiteren waren die Serum-Estradiol-Werte aller Versuchstiere nicht messbar, was die Theorie einer verbliebenen Estradiolproduktion ebenfalls verwirft.

Der Unterschied der Werte für Lobulus 2/mm² im Vergleich zur Estradiolgruppe ist hoch signifikant, also signifikanter als der Vergleich zur Kontrollgruppe. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Subfraktion R3 für Ductus/mm² und Lobulus 1/mm², scheint eine schwerwiegende Proliferation des Brustdrüsengewebes unter Behandlung mit der Testsubstanz R3 insgesamt unwahrscheinlich. Jedoch muss berücksichtigt werden, dass sich die Behandlungsphase im vorliegenden Versuch nur über vier Wochen erstreckt hat.

Da die positiven Wirkungen von CR BNO 1055 auf depressive Verstimmungen und Hitzewallungen im Klimakterium vermutlich maßgeblich der Subfraktion R3 mit ihrem Hauptbestandteil Methylerotonin zuzuschreiben sind, würde eine Eliminierung von R3 zur Verbesserung der Sicherheit des Extraktes in Hinblick auf das Mammagewebe gleichzeitig eine Abnahme der Wirksamkeit gegen klimakterische Beschwerden bedeuten.

Die positiven Eigenschaften des Gesamtextraktes sind am ehesten durch ein Zusammenspiel der unterschiedlichen Inhaltsstoffe der verschiedenen Fraktionen und derer Ergänzung zu erklären (siehe auch (Wuttke et al. 2014)). In der vorliegenden Arbeit ließen sich bei der Saponinfraktion keine negative Eigenschaften bezüglich der Brustdrüse nachweisen. Aufgrund der nicht eindeutigen Ergebnisse hinsichtlich der Subfraktion R3 sind weitere Studien in Bezug auf die Sicherheit der Restfraktion notwendig.

IV.4 CR bei Mammakarzinom-Patientinnen

Durch die fehlende östrogene Wirkung am Mammagewebe stellt sich die Frage, ob *CR* zur Therapie klimakterischer Beschwerden von Patientinnen geeignet ist, die aktuell an Brustkrebs erkrankt sind oder diese Erkrankung überstanden haben. In diesen Fällen ist eine HET kontraindiziert.

Die Datenlage bezüglich dieser Fragestellung ist limitiert. Ein Review von Fritz et al., das unter anderem vier Studien über den Einfluss von *CR* auf das Brustkrebsrisiko einbezieht, signalisiert, dass es keinen Zusammenhang zwischen dem Gebrauch von *CR* und einem erhöhten kanzerogenen Risiko gibt, unabhängig davon, ob eine Brustkrebserkrankung in der Vorgeschichte bestand (Fritz et al. 2014). Rebbeck et al. berichten sogar von einer signifikanten Reduktion des Erkrankungsrisikos unter Behandlung mit *CR*. U.a. aufgrund der unterschiedlichen verfügbaren *CR*-Präparate mit verschiedenen Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe sind hierzu laut der Autoren weitere Studien notwendig (Rebbeck et al. 2007). Bezüglich eines Brustkrebsrezidivs wird ebenfalls von einem verminderten Risiko bei Patientinnen mit *CR*-Therapie in Vergleich zu solchen, die keine *CR*-Produkte zu sich nahmen, berichtet. Die Wirkung von Tamoxifen und Raloxifen, beides selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM), wird offenbar von *CR* nicht vermindert oder negativ beeinflusst. Des Weiteren scheint eine Kombination von *CR* und diesen Arzneistoffen weder das Rezidivrisiko zu erhöhen, noch andere schwerwiegende Nebenwirkungen aufzuweisen (Fritz et al. 2014; Henneicke-von Zepelin et al. 2007). Aufgrund dieser Erkenntnisse bei jedoch limitierter Datenlage und unterschiedlichen Studiendesigns kommen die Autoren zu dem Schluss, dass der Einsatz von *CR* zur Linderung vasomotorischer Symptome bei Brustkrebspatientinnen zwar gerechtfertigt ist, aber weitere Untersuchungen

notwendig sind, um die Wirkung und Sicherheit zu bestätigen (Fritz et al. 2014; Wuttke et al. 2014).

IV.5 Schlussfolgerung und Ausblick

In der vorliegenden Dissertation wurde nachgewiesen, dass die Saponinfraktion des speziellen Extraktes *CR* BNO 1055 und ihre Subfraktionen keine proliferationsfördernde Wirkung auf das Mammagewebe ovx SD-Ratten ausüben. Die Restfraktion und die Subfraktionen R1 und R2 wirkten ebenfalls nicht proliferativ. Eine exakte Aussage über die Subfraktion R3 lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht treffen, da die Lobuli 2 zwar signifikant geringer als in der Estradiolgruppe, aber gleichzeitig signifikant mehr als in der Kontrollgruppe proliferierten. Diesbezüglich sind weiterführende Versuche über einen längeren Zeitraum notwendig. Des Weiteren scheint es indiziert, die Wirksamkeit des Extraktes *CR* BNO 1055 auf klimakterische Beschwerden nach Eliminierung der Subfraktion R3 zu untersuchen. In dieser Arbeit dauerte die Behandlungsphase vier Wochen. Es ist von großem Interesse, zu ergründen, inwieweit sich die Ergebnisse in klinischen (Langzeit-)Studien widerspiegeln. Als diagnostisches Mittel wäre dabei die hochempfindliche Mamma-MRT-Untersuchung denkbar. Aufgrund der guten Wirksamkeit gegen menopausale Beschwerden bei ausbleibenden negativen östrogenen Wirkungen stellen weiterführende Untersuchungen bezüglich *CR* bei Mammakarzinom-Patientinnen einen bedeutenden Schritt der Forschung dar.

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurden verschiedene andere Gewebe (u.a. Uterus, Vagina und Haut) der Versuchstiere von anderen Doktoranden der Abteilung untersucht. Nach Veröffentlichung der übrigen Dissertationen wird es sehr interessant sein, die Ergebnisse zusammenzutragen und ein umfassendes Fazit über die Wirkungen und Nebenwirkungen der Fraktionen und Subfraktionen von *CR* BNO 1055 zu publizieren.

V. Zusammenfassung

Im Rahmen des demographischen Wandels, der u.a. durch eine Abnahme der Geburtenrate und eine höhere Lebenserwartung der Bevölkerung bedingt ist, steigt die Anzahl der älteren Menschen stetig an. Daraus ergeben sich immer wieder neue Herausforderungen für Medizin und Gesundheitswesen. Frauen verbringen aktuell mehr als ein Drittel ihres Lebens postmenopausal. Die Wechseljahre und die damit verbundenen Beschwerden beeinträchtigen die Lebensqualität der betroffenen Frauen zum Teil erheblich. Die Hormonersatztherapie mit Östrogen- oder Östrogen-Progesteron-Kombinationspräparaten stellt die suffizienteste Therapie klimakterischer Beschwerden dar. Jedoch weist sie zahlreiche Nebenwirkungen, wie z.B. ein erhöhtes Auftreten von Mammakarzinomen, auf. Ziel aktueller Forschungen ist es zum einen, eine alternative Behandlungsmöglichkeit mit einer größeren Sicherheit bei gleichzeitig guter Wirksamkeit für die betroffenen Frauen zu finden, zum anderen im Rahmen der „Renaissance der HET“ unter Anpassung der Substanzen, Pharmakologie und Darreichungsform ein günstigeres Nutzen-Risiko-Profil der ursprünglichen HET zu entwickeln.

CR BNO 1055, ein Extrakt aus der Wurzel der nordamerikanischen Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*), lindert klimakterische Beschwerden in gleichem Maße wie konjugierte Östrogene. Er reduziert das Auftreten von Hitzewallungen und Osteoporose, wirkt antiinflammatorisch und senkt Körperfettanteil und Cholesterinwerte. Durch seine serotonergen Eigenschaften kann er depressive Verstimmungen mildern. CR BNO 1055 bindet nicht an Östrogen-Rezeptoren. Die Serumkonzentrationen der Sexualhormone (z.B. der Gonadotropine LH und FSH) bleiben unter der Einnahme unverändert. Es konnten bisher keine Medikamenten-Interaktionen oder negative Auswirkungen auf das Endometrium des Uterus nachgewiesen werden.

Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich mit der Auswirkung von CR BNO 1055 auf das Brustgewebe. Die Untersuchung des Extraktes mit seinen Fraktionen und Subfraktionen stellt eine Neuheit dar. Unlängst gelangen die Differenzierung des Extraktes in seine unterschiedlichen Fraktionen (Saponin- und Restfraktion) sowie in die Subfraktionen (S1-S3, R1-R3) und die Identifizierung der Inhaltsstoffe. Für den Versuch wurden 100 ovariectomierte Sprague-Dawley-Ratten in Gruppen zu je zehn Tieren eingeteilt und mit den unterschiedlichen Testsubstanzen gefüttert. Eine Estradiolgruppe diente als Positiv-, eine Kontrollgruppe ohne Einnahme von Testsubstanzen als Negativkontrolle. Somit ergaben sich folgende Gruppen: Kontrollgruppe,

Estradiolgruppe, Saponinfraktion, S1, S2, S3, Restfraktion, R1, R2, R3. Nach der vierwöchigen Behandlungsphase wurden von jedem Versuchstier jeweils zwei Brustgewebsschnitte mikroskopisch untersucht. Die verschiedenen Parenchymstrukturen Ductus (Ausführungsgänge), Lobulus 1 (Drüsenläppchen mit 1-10 Drüsenendstücken) und Lobulus 2 (Drüsenläppchen mit 11-20 Drüsenendstücken) wurden gezählt und ins Verhältnis zu der ausgemessenen Fläche gesetzt. Pro Tier wurde für jede Struktur ein Mittelwert errechnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Boxplots zur Veranschaulichung der Verteilung der Werte sowie t-Tests für unabhängige Stichproben zur Prüfung der Signifikanz der Ergebnisse.

Im Vergleich der Kontroll- und Estradiolgruppe zeigte sich ein signifikanter Unterschied. Wie erwartet, proliferierten alle drei parenchymatösen Strukturen unter Estradioleinnahme signifikant. Die Ergebnisse der Testsubstanzgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe legen dar, dass die Anzahl der Ductus und der Lobuli 1 pro Quadratmillimeter nicht signifikant zugenommen haben. Die Substanzen verhalten sich also analog der Kontrollgruppe, ohne eine Proliferation des Mammagewebes zu fördern. Angesichts der Lobuli 2 pro Quadratmillimeter lässt sich bezüglich der Gruppen Saponin, S1, S2, S3, Rest, R1 und R2 ebenfalls keine signifikante Zunahme im Vergleich zur Kontrollgruppe verzeichnen. Der Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der Gruppe R3 im Hinblick auf die Lobuli 2 pro Quadratmillimeter ist hingegen signifikant. Da sich aber die Subfraktion R3 hinsichtlich der Anzahl aller Brustgewebsstrukturen (mindestens hoch) signifikant von der proliferationsfördernden Estradiolgruppe unterscheidet, scheint eine schädigende Wirkung von R3 auf das Mammagewebe unwahrscheinlich. Ebenso ist die Proliferation des Brustdrüsengewebes in der Gesamtheit der anderen Testsubstanz-Gruppen (Saponin, S1, S2, S3, Rest, R1 und R2) signifikant geringer als in der Estradiolgruppe.

In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich in der vorliegenden Dissertation die Sicherheit der Substanzen der Saponinfraktion im Hinblick auf die Proliferation des Brustdrüsengewebes demonstrieren. Bezüglich der Restfraktion, insbesondere der Subfraktion R3, sind umfassendere Untersuchungen notwendig. Aufgrund unserer Ergebnisse empfehlen wir weiterführende Studien.

VI. Anhang

VI.1 Tabellen 8-15

Östrogen	Progesteron
Oral:	Oral:
17-β-Estradiol	Medroxyprogesteronacetat
Ethinylestradiol	Norethindronacetat
Konjugiertes Östrogen	Drospirenon
	Mikronisiertes Progesteron
Transdermal:	Transdermal:
17-β-Estradiol Patch	Norethindronacetat Patch
17-β-Estradiol Gel	Levonorgestrel Patch
17-β-Estradiol Spray	
17-β-Estradiol Emulsion	
Vaginal:	
17-β-Estradiol Vaginalcreme	
Konjugiertes Östrogen Vaginalcreme	
17-β-Estradiol Vaginaltablette	
17-β-Estradiol Vaginalring	

Tabelle 8: Übersicht über menopausale HET-Präparate.
Modifiziert nach (Al-Safi und Santoro 2014).

Sterbefälle weiblich nach der ICD-10 im Jahr 2014			
ICD-10 Positionsnr.	Todesursache	Gestorbene ¹	
		An- zahl	Anteil in %
I25	Chronische ischämische Herzkrankheit	34 491	7,7
I50	Herzinsuffizienz	28 513	6,4
I21	Akuter Myokardinfarkt	20 993	4,7
C50	Bösartige Neubildung der Brustdrüse	17 670	4,0
F03	Nicht näher bezeichnete Demenz	17 410	3,9
I11	Hypertensive Herzkrankheit	16 453	3,7
C34	Bösartige Neubildung der Bronchien und der Lunge	15 513	3,5
J44	Sonstige chronische obstruktive Lungenkrankheit	11 644	2,6
I48	Vorhofflattern und Vorhofflimmern	10 990	2,5
I64	Schlaganfall, nicht als Blutung oder Infarkt bezeichnet	10 621	2,4
¹ Ohne Totgeborene und ohne gerichtliche Todeserklärungen.			

Tabelle 9: Sterbefälle weiblich im Jahr 2014.
Statistisches Bundesamt, modifiziert.

Energie	[MJ/ kg]	Aminosäuren	[%]	Vitamine	[/kg]
Bruttoenergie	16,8	Lysin	1,22	Vit. A	15.000 IE
Umsetzbare Energie	13,3	Methionin	0,44	Vit. D ₃	1.000 IE
		Met+Cys	0,83	Vit. E	115 mg
Rohnährstoffe	[%]	Threonin	0,97	Vit. K (als Menadion)	5 mg
Trockensubstanz	88,2	Tryptophan	0,28	Thiamin (B ₁)	18 mg
Rohprotein (Nx6,25)	21,7	Arginin	1,13	Riboflavin (B ₂)	22 mg
Rohfett	4,3	Histidin	0,51	Pyridoxin (B ₆)	20 mg
Rohfaser	4,2	Valin	1,25	Cobalamin (B ₁₂)	100 mg
freie Extraktstoffe	52,2	Isoleucin	1,03	Nicotinsäure	120 mg
Stärke	34,0	Leucin	1,95	Panθοthensäure	40 mg
Zucker	3,0	Phenylalanin	1,21	Folsäure	7 mg
		Phe+Tyr	2,20	Biotin	460 µg
Fettsäuren	[%]	Glycin	1,05	Cholin-Cl	2.380 mg
C 12:0	-	Glutaminsäure	3,96	Inositol	100 mg
C 14:0	0,01	Asparaginsäure	2,18		
C 16:0	0,56	Prolin	1,53	Spurenelemente	[/kg]
C 16:1	0,01	Alanin	1,26	Eisen	169 mg
C 18:0	0,08	Serin	1,17	Mangan	78 mg
C 18:1	0,82			Zink	101 mg
C 18:2	2,26	Mineralstoffe	[%]	Kupfer	14 mg
C 18:3	0,22	Calcium	1,00	Iod	2,2 mg
C 20:0	0,01	Phosphor	0,70	Selen	0,4 mg
C 20:1	0,02	Natrium	0,19	Cobalt	2,2 mg
C 20:5	-	Magnesium	0,20		
C 22:6	-	Kalium	0,67		

Tabelle 10: Inhaltsstoffe sojafreies Pallet-Futter ssniff®.

Gruppe	Anzahl der Tiere	Dosis [mg/kg Futter]	Futter-aufnahme [g/Tier/Tag]	Substanz-einnahme [mg/Tier/Tag]
Kontrollgruppe (Ko), östrogenfrei	10	-	17,95	-
Estradiolgruppe (E2)	10	10	10,81	0,108
Saponinfraktion (Sap)	10	117,6	17,17	2,019
Saponin-Subfraktion 1 (S1)	10	31,2	18,37	0,573
Saponin-Subfraktion 2 (S2)	10	46,06	17,63	0,802
Saponin-Subfraktion 3 (S3)	10	46,04	19,56	0,900
Restfraktion (Rest)	10	382,35	19,03	7,260
Rest-Subfraktion 1 (R1)	10	276,81	18,75	5,190
Rest-Subfraktion 2 (R2)	10	75,37	18,71	1,410
Rest-Subfraktion 3 (R3)	10	35,98	18,52	0,666

Tabelle 11: Übersicht über die Gruppen und das jeweilige Futter.

1.	Konservierung in zehnpromzentigem Formalin (Firma Sigma®) für maximal 72 Stunden
2.	Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe und in zwei Bädern Xylol, Stabilisierung in zwei Bädern Paraffin (siehe Tab. 13) in einer Zitadelle (Leica TP 1020, V 2,0, Ordernr.: 070430101, Herstellung 03/98)
3.	Lagerung der Einbettkapseln in einem Wärmeschrank (Schütt Labortechnik, GFL 7601) bei einer Temperatur von 56-62°C
4.	Endgültige Paraffineinbettung: Nacheinander wurden die vorbehandelten Organteile in einen Paraffinblock gegossen (EG 1160, Leica) und durch eine Kühlplatte ausgehärtet
5.	Aufbewahrung im Gefrierschrank bei -20° Celcius
6.	Herstellen der Hartschnittpräparate mit einem Rotations-Tischmikrotom (Leica 2065 Supercut, Leica Biosystems GmbH, Nussloch)
7.	Auftragen der Schnitte auf beschriftete Objektträger (SuperFrost Ultra Plus, Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig)
8.	Entplastung und Färbung mit Hämatoxylin-Eosin (siehe Tab. 14 und 15)

Tabelle 12: Histologische Aufarbeitung des Gewebes.

Substanz	Einwirkzeit
50%-iger Alkohol	1 Std.
75%-iger Alkohol	1 Std. 20 Min.
75%-iger Alkohol	1 Std. 20 Min.
96%-iger Alkohol	1 Std. 20 Min.
96%-iger Alkohol	1 Std. 20 Min.
100%-iger Alkohol	1 Std. 20 Min.
100%-iger Alkohol	1 Std. 20 Min.
100%-iger Alkohol	1 Std. 20 Min.
Xylol	1 Std. 20 Min.
Xylol	1 Std. 20 Min.
Paraffin	1 Std.
Paraffin	1 Std.

Tabelle 13: Schema der Organentwässerung.

1.	Ansetzen der Stocklösung: 1 g Eosin (Cerestain/ Eosin, 1.15935.0025, MERCK) 50 ml 70%-iger Ethanol 50 ml Aqua dest.
2.	Durch Auffüllen mit 200 ml Aqua dest. entsteht eine Arbeitslösung
3.	Die fertige Arbeitslösung wird in Einbettschalen überführt

Tabelle 14: Ansetzen der Eosinlösung.

Substanz	Einwirkdauer
Xylol	5 Min.
Xylol	5 Min.
Xylol	5 Min.
Ethanol 100%	2 Min.
Ethanol 100%	2 Min.
Ethanol 100%	2 Min.
Ethanol 96%	2 Min.
Ethanol 96%	2 Min.
Ethanol 75%	2 Min.
Aqua dest.	2 Min.
Hämatoxylin	40 Sek.
Leitungswasser	10 Min.
Eosin	50 Sek.
Aqua bidest	5- 10 Sek.
Ethanol 75%	30 Sek.
Ethanol 96%	30 Sek.
Ethanol 96%	30 Sek.
Ethanol 100%	1 Min.
Ethanol 100%	1 Min.
Ethanol 100%	2 Min.
Xylol	5 Min.
Xylol	5 Min.
Xylol	5 Min.

Tabelle 15: Detailliertes Schema der Hämatoxylin/Eosin- Färbung.

VI.2 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Brustdrüse der Ratte.....	3
Abbildung 2: Schematische Darstellung der weiblichen Brustdrüse.	4
Abbildung 3: Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse.....	7
Abbildung 4: <i>Cimicifuga racemosa</i>	12
Abbildung 5: Organentnahme.....	21
Abbildung 6: Schematische Darstellung der histologischen Auswertung.....	22
Abbildung 7: Übersicht (Beispiel); Vergrößerung 10x1,25.....	23
Abbildung 8: Lobulus 1 (Beispiel); Vergrößerung 20x1,25.....	24
Abbildung 9: Lobulus 2 (Beispiel); Vergrößerung 20x1,25.....	25
Abbildung 10: Ductus mit Lobulus 1 (Beispiel); Vergrößerung 20x1,25.....	26
Abbildung 11: Boxplot: Der Effekt von Estradiol und der aus CR BNO 1055 extrahierten Testsubstanzen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf Ductus/mm ²	30
Abbildung 12: Boxplot: Der Effekt von Estradiol und der aus CR BNO 1055 extrahierten Testsubstanzen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf Lobulus 1/mm ²	33
Abbildung 13: Boxplot: Der Effekt von Estradiol und der aus CR BNO 1055 extrahierten Testsubstanzen (28 Tage per Futter bei ovx Ratte) auf Lobulus 2/mm ²	36

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die Symptome des Klimakteriums.....	5
Tabelle 2: Zusammenfassende Übersicht der Vor- und Nachteile einer HET.....	9
Tabelle 3: Inhaltsstoffe CR BNO 1055.....	13
Tabelle 4: p-Werte des Vergleiches Kontrollgruppe und Estradiolgruppe.....	29
Tabelle 5: p-Werte aller Testsubstanzgruppen im Vergleich zur Kontroll- und Estradiolgruppe bezüglich der Parenchymstruktur Ductus/mm ²	32
Tabelle 6: p-Werte aller Testsubstanzgruppen im Vergleich zur Kontroll- und Estradiolgruppe bezüglich der Parenchymstruktur Lobulus 1/mm ²	35
Tabelle 7: p-Werte aller Testsubstanzgruppen im Vergleich zur Kontroll- und Estradiolgruppe bezüglich der Parenchymstruktur Lobulus 2/mm ²	38
Tabelle 8: Übersicht über menopausale HET-Präparate.....	50
Tabelle 9: Sterbefälle weiblich im Jahr 2014.....	50
Tabelle 10: Inhaltsstoffe sojafreies Pallet-Futter ssniff®.....	51
Tabelle 11: Übersicht über die Gruppen und das jeweilige Futter.....	52
Tabelle 12: Histologische Aufarbeitung des Gewebes.....	52
Tabelle 13: Schema der Organentwässerung.....	53
Tabelle 14: Ansetzen der Eosinlösung.....	53
Tabelle 15: Detailliertes Schema der Hämatoxylin/Eosin- Färbung.....	54

VII. Literaturverzeichnis

- Abdi F, Mobedi H, Mosaffa N, Dolatian M, Ramezani Tehrani F (2016): Hormone Therapy for Relieving Postmenopausal Vasomotor Symptoms: A Systematic Review. *Arch Iran med* 19, 141–146
- Aidelsburger P, Schauer S, Grabein K, Wasem J (2012): Alternative methods for the treatment of post-menopausal troubles. *GMS Health Technol Assess* 8, Doc03
- Al-Safi ZA, Santoro N (2014): Menopausal hormone therapy and menopausal symptoms. *Fertil Steril* 101, 905–915
- Behrends JC: *Physiologie (Duale Reihe)*. 1. Auflage; Thieme, Stuttgart 2010
- Beral V (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419–427
- Beral V, Reeves G, Bull D, Green J (2011): Breast Cancer Risk in Relation to the Interval Between Menopause and Starting Hormone Therapy. *Nat Cancer Inst* 103, 296–305
- Britt K, Ashworth A, Smalley M (2007): Pregnancy and the risk of breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 14, 907–933
- Cedars MI (2014): Introduction: menopausal hormone therapy: where are we today? *Fertil Steril* 101, 885–886
- Chen WY (2011): Postmenopausal Hormone Therapy and Breast Cancer Risk: Current Status and Unanswered Questions. *Endocrinol Metab Clin North Am* 40, 509–518
- Drewe J, Zimmermann C, Zahner C (2013): The effect of a *Cimicifuga racemosa* extracts Ze 450 in the treatment of climacteric complaints - an observational study. *Phytomedicine* 20, 659–666
- Drewe J, Bucher KA, Zahner C (2015): A systematic review of non-hormonal treatments of vasomotor symptoms in climacteric and cancer patients. *Springerplus* 4, 65
- Du Y, Dören M, Melchert HW, Scheidt-Nave C, Knopf H (2007): Differences in Menopausal Hormone Therapy Use among Women in Germany between 1998 and 2003. *BMC Women's Health* 7, 19
- Firenzuoli F, Gori L, Di Sarsina PR (2011): Black Cohosh Hepatic Safety: Follow-Up of 107 Patients Consuming a Special *Cimicifuga racemosa* rhizome Herbal Extract and Review of Literature. *Evid Based Complement Alternat Med* 2011, 1–7
- Fritz H, Seely D, McGowan J, Skidmore B, Fernandes R, Kennedy DA, Cooley K, Wong R, Sagar S, Balneaves LG et al. (2014): Black Cohosh and Breast Cancer: A Systematic Review. *Integr Cancer Ther* 13, 12–29
- Gajewska M, Zielniok K, Motyl T (2013): Autophagy in Development and Remodelling of Mammary Gland: In: Bailly Y (Hrsg.): *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* O. Verl., o. Ort [Open Access: <https://www.intechopen.com/books/autophagy-a-double-edged-sword-cell-survival-or-death>- ISBN 978-953-51-1062-0]
- Geller SE, Studee L (2005): Botanical and dietary supplements for menopausal symptoms: what works, what does not. *J Womens Health* 14, 634–649

- Geller SE, Studee L (2006): Contemporary alternatives to plant estrogens for menopause. *Maturitas* 55, 3–13
- Henneicke-von Zepelin HH, Meden H, Kostev K, Schröder-Bernhardi D, Stammwitz U, Becher H (2007): Isopropanolic black cohosh extract and recurrence-free survival after breast cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther* 45, 143–154
- Kapur P, Wuttke W, Seidlova-Wuttke D (2010): The Cimicifuga racemosa special extract BNO 1055 prevents hot flashes in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 890–894
- Kiechle M: Gynäkologie und Geburtshilfe, 2., überarb. Auflage; Elsevier, Urban & Fischer, München 2011
- Madak-Erdogan Z, Kim SH, Gong P, Zhao YC, Zhang H, Chambliss KL, Carlson KE, Mayne CG, Shaul PW, Korach KS et al. (2016): Design of pathway preferential estrogens that provide beneficial metabolic and vascular effects without stimulating reproductive tissues. *Sci Signal* 9, ra53
- Maltais ML, Desroches J, Dionne IJ (2009): Changes in muscle mass and strength after menopause. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 9, 186–197
- Mense SM, Hei TK, Ganju RK, Bhat HK (2008): Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action. *Environ Health Perspect* 116, 426–433
- Obi N, Chang-Claude J, Berger J, Braendle W, Slinger T, Schmidt M, Steindorf K, Ahrens W, Flesch-Janys D (2009): The use of herbal preparations to alleviate climacteric disorders and risk of postmenopausal breast cancer in a German case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 2207–2213
- Ortmann O, Lattrich C (2012): Deutsches Ärzteblatt international: The Treatment of Climacteric Symptoms. *Dtsch Arztebl Int* 109, 316–324
- Pandit L, Ouslander JG (1997): Postmenopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Am J Med Sci* 314, 228–231
- Rachoń D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W (2008): Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague-Dawley rats. *Maturitas* 60, 209–215
- Rahal A, Kumar A, Chakraborty S, Tiwari R, Latheef S, Dhama K (2013): Cimicifuga - A Revisiting Indigenous Herb with Multi-utility Benefits for Safeguarding Human Health – A Review. *Int J Agron Plant Prod* 4, 1590–1601
- Rebbeck TR, Troxel AB, Norman S, Bunin GR, DeMichele A, Baumgarten M, Berlin M, Schinnar R, Strom BL (2007): A retrospective case-control study of the use of hormone-related supplements and association with breast cancer. *Int J Cancer* 120, 1523–1528
- Rice S, Whitehead SA (2006): Phytoestrogens and breast cancer -promoters or protectors? *Endocr Relat Cancer* 13, 995–1015
- Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W (2007): Effects of Chronic Genistein Treatment in Mammary Gland, Uterus, and Vagina. *Environ Health Perspect* 115, 62–68
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford, Shirley A A, Howard BV, Johnson KC et al. (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin

- in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321–333
- Russo IH, Russo J (1996): Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104, 938–967
- Russo J, Russo IH (2006): The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102, 89–96
- Schmidt PJ (2012): The 2012 Hormone Therapy Position Statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 19, 257–271
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003): Pharmacology of Cimicifuga racemosa extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44, 39–50
- Seidlová-Wuttke D, Eder N, Stahnke V, Kammann M, Stecher G, Haunschild J, Wessels JT, Wuttke W (2012a): Cimicifuga racemosa and its triterpene-saponins prevent the Metabolic Syndrome and deterioration of cartilage in the knee joint of ovariectomized rats by similar mechanisms. *Phytomedicine* 19, 846–853
- Seidlová-Wuttke D, Stecher G, Kammann M, Haunschild J, Eder N, Stahnke V, Wessels J, Wuttke W (2012b): Osteoprotective effects of Cimicifuga racemosa and its triterpene-saponins are responsible for reduction of bone marrow fat. *Phytomedicine* 19, 855–860
- Stauber M, Weyerstahl T: Gynäkologie und Geburtshilfe (Duale Reihe). 3., aktual. Auflage; Thieme, Stuttgart 2007
- Stefanick ML, Anderson GL, Margolis KL, Hendrix SL, Rodabough RJ, Paskett ED, Lane DS, Hubbell FA, Assaf AR, Sarto GE et al. (2006): Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA* 295, 1647–1657
- Taylor HS, Manson JE (2011): Update in hormone therapy use in menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 96, 255–264
- Thurston RC (2011): Vasomotor Symptoms and Menopause: Findings from the Study of Women's Health Across the Nation. *Obstet Gynecol Clin North A* 38, 489–501
- Tramontana A (2015): Menopause heute und morgen - Menopausekongress 2014. *J Gynäkol Endokrinol* 9, 28
- Tramontana A (2016): Menopause heute und morgen -Menopausekongress 2015. *J Gynäkol Endokrinol* 10, 27–28
- Welsch U, Sobotta J: Lehrbuch Histologie: Zytologie, Histologie, mikroskopische Anatomie. 2., völlig überarb. Auflage; Elsevier, Urban und Fischer, München Jena 2006
- Weyerstahl T: Duale Reihe Gynäkologie und Geburtshilfe. 4., vollst. überarb. Auflage; Thieme, Stuttgart 2013
- Wuttke W, Seidlová-Wuttke D (2013): Sind Phytoöstrogene eine Alternative zur Hormon(ersatz)therapie? *Gynäkologische Praxis* 37, 453–466
- Wuttke W, Raus K, Gorkow C (2006): Efficacy and tolerability of the Black cohosh (*Actaea racemosa*) ethanolic extract BNO 1055 on climacteric complaints: A double-blind, placebo- and conjugated estrogens-controlled study. *Maturitas* 55, 83–91

Wuttke W, Jarry H, Haunschild J, Stecher G, Schuh M, Seidlova-Wuttke D (2014): The non-estrogenic alternative for the treatment of climacteric complaints: Black cohosh (*Cimicifuga* or *Actaea racemosa*). *J Steroid Biochem Mol Biol* 139, 302–310

Internetquellen

Robert Koch Institut - Zentrum für Krebsregisterdaten - http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Krebsarten/Brustkrebs/brustkrebs_node.html, Zugriff am 18.11.2015

Statistisches Bundesamt - <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Tabellen/HaeufigsteTodesursachen.html>, Zugriff am 05.02.2016

Wikipedia- die freie Enzyklopädie - https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Actaea_racemosa_002.JPG, Zugriff am 23.11.2015

Danksagung

Für die Unterstützung und Hilfestellung im wissenschaftlichen und experimentellen Arbeiten sowie für die Betreuung bei der Bearbeitung und Fertigstellung meiner Dissertation möchte ich mich herzlich bei Frau PD Dr. med. D. Seidlová-Wuttke bedanken. Zudem gilt mein Dank der CTA H. Brüggemann-Meyer, die immer freundlich und hilfsbereit meine Präparate bearbeitet und mir jederzeit mit Erklärungen und Hilfestellungen zu Seite stand.

Vielen Dank an Herrn Dr. med. Edgar Frank, Frau Karin Hatzfeld-Frank und Herrn Dr. med. Benedikt Kübler für die tatkräftige Unterstützung, die Motivation und die Korrekturen der Arbeit.