

Aus dem Department für Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

Untersuchungen pflanzlicher Futterzusätze
mit fraglich HRT-alternativen Wirkungen bezüglich ihres Einflusses
auf die Mammae weiblicher, ovariectomierter Ratten
im Vergleich zu Placebo-, Östradiol- und Raloxifenbehandlung

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät der
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Ulrike Cheema, geborene Jacobs

aus Kigali, Ruanda

Göttingen 2010

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

- I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke
- II. Berichterstatter/in:
- III. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

Inhaltsverzeichnis

I	Einleitung	1
I.1.	Das Klimakterium	1
I.2.	Die hormonelle Substitutionstherapie (HRT = Hormone Replacement Therapy)	1
I.3.	Die Östrogenrezeptoren und SERM (= Selective Estrogen Receptor Modulator)	3
I.4.	Phytoöstrogene und andere Pflanzeninhaltsstoffe als HRT-Alternative?	4
I.5.	Bedeutung der Östrogenrezeptoren und des Wachstumsfaktors IGF-1 generell und für die Mamma	17
I.6.	Ziel der Arbeit	20
II	Material und Methoden	22
II.1.	Tierexperimente	22
II.1.1.	Versuchstiere und ihre Laborhaltung	22
II.1.2.	Ovarektomie	22
II.1.3.	Futterapplikation	23
II.1.4.	Organentnahme	23
II.2.	Molekularbiologische Methoden	24
II.2.1.	Übersicht der Materialaufarbeitung für die quantitative Polymerasekettenreaktion	24
II.2.2.	Aufarbeitung der Rattenmammas und die RNA-Isolierung	24
II.2.3.	Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA	25
II.2.4.	Reverse Transkription	26
II.2.5.	Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) mit dem Taqman Tm -PCR Assay (Applied Biosystems, Weiterstadt)	26
II.3.	Histologische Methoden	27
II.3.1.	Vorbereitung der Mammas zur histologischen Weiterverarbeitung	27
II.3.1.1.	Fixieren der Mammas	27
II.3.1.2.	Entwässern und Einbetten der Präparate	28
II.3.1.3.	Schneiden der Paraffinblöcke	28
II.3.2.	Hämatoxylin-/Eosinfärbung	28
II.3.3.	Beurteilung der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparate	29
II.3.4.	Immunhistologische Bestimmungen	31
II.3.4.1.	Immunhistologische Detektion von Zytokeratinen des Epithels mittels der PAP-Methode	31
II.3.4.2.	Immunhistologische Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 gegen das MIB-5-Antigen der Ratte mittels der APAAP-Methode	33

II.3.4.3.	Immunhistologische Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 gegen das MIB-5-Antigen der Ratte mittels des DAKO EnVision™-2-Schritt Detektionssystems	34
II.3.4.4.	Auswertung der immunhistologischen Färbungen des Proliferationsfaktors Ki-67	34
II.4.	Statistische Methoden	34
III.	Ergebnisse	35
III.1.	Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf das Rattengewicht	35
III.2.	Molekularbiologische Ergebnisse	36
III.2.1.	Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER- α in der Mamma	36
III.2.2.	Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER- β in der Mamma	37
III.2.3.	Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression des Wachstumsfaktors IGF-1 in der Mamma	38
III.3.	Ergebnisse der histomorphologischen Untersuchungen	39
III.3.1.	Immunhistologischer Nachweis von Zytokeratinen	39
III.3.2.	Auswertung der histologischen Ergebnisse	39
III.3.3.	Auswertung der immunhistologischen Färbungen auf den Proliferationsfaktor Ki-67	42
IV.	Diskussion	43
IV.1.	Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf das Rattengewicht	43
IV.2.	Molekularbiologische Ergebnisse	46
VI.2.1.	Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER- α in der Mamma	47
VI.2.2.	Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER- β in der Mamma	52
VI.2.3.	Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression des Wachstumsfaktors IGF-I in der Mamma	54
IV.3.	Histomorphologische Ergebnisse	56
VI.3.1.	Histologie: Effekt der verschiedenen Futtersubstanzen auf Fettgewebe, Gefäße und Drüsengewebe in der Mamma	56
VI.3.2.	Immunhistologie: Effekt von Placebo, Östradiol und Raloxifen auf den Proliferationsfaktor Ki-67 im Vergleich zur laktierenden Mamma	65
V.	Zusammenfassung	69

VI. Anhang	73
VI.1. Versuchsprotokolle	73
VI.1.1. Immunzytochemische Detektion des Zytokeratins in der Mamma der Ratte mittels der PAP-Färbemethode	73
VI.1.2. Immunzytochemische Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 gegen das MIB-5-Antigen der Ratte mittels der APAAP-Färbemethode	74
VI.1.3. Immunzytochemische Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 gegen das MIB-5-Antigen der Ratte mittels der EnVision™-Färbetechnik	75
VI.2. Abbildungsverzeichnis	77
VI.3. Abkürzungen	78
VII. Literaturverzeichnis	80

I Einleitung

I.1. Das Klimakterium

Das Klimakterium ist im Leben der Frau die Phase des Überganges von der Geschlechtsreife in die Postmenopause. Es findet mit starken, individuellen Schwankungen im Alter zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr statt. In diesem Alter kommt es langsam fortschreitend zum Erlöschen der Ovarialfunktion, die schließlich mit der Menopause, der letzten von den Ovarien gesteuerten Menstruationsblutung, endet.

Vor, während und nach der Menopause leiden 50 bis 75% der Frauen in unterschiedlichem Maße an Symptomen, die unter dem Begriff des klimakterischen Syndroms zusammengefasst sind. Die Intensität dieser Symptome ist bei 10-20 % der Frauen so stark, dass sie als behandlungsbedürftig anzusehen sind [Powell et al. 2008]. Es kann außer zu uterinen Blutungsstörungen vor allem zu durch Östrogenmangel bedingter Klinik kommen. Darunter fallen vegetativ-vasomotorische Störungen (Hitzewallungen, profuses Schwitzen, Herzklopfen, -rasen, Schwindel, Erröten, Erblassen, Schlafstörungen, Parästhesien, Tinnitus), Atrophie an Haut und Schleimhäuten, Inkontinenzerscheinungen, Osteoporose und zunehmende kardiovaskuläre Erkrankungen.

Der menopausale Involutionseffekt auf das Mammagewebe durch sinkende Östrogenkonzentrationen wird allgemein mit Verminderung der Drüsenstrukturen und der kollagenen Bindegewebssubstanz und relativer Erhöhung des Fettgehaltes beschrieben. Fendrick et al. (1998) haben an Tierversuchen (ovarektomierter Ratten) mit Eintreten der Mammainvolution eine erhöhte Östrogenempfindlichkeit und histologisch einen Verlust von Milchduktulusend- und -verzweigungen beschrieben [Fendrick et al. 1998].

I.2. Die hormonelle Substitutionstherapie (HRT = Hormone Replacement Therapy)

Abgesehen von der Suche nach einem Mittel gegen die teilweise starken subjektiven Leiden mancher perimenopausaler Frauen liegt die Motivation in der Suche nach Therapiemöglichkeiten bzw. Symptombekämpfung des klimakterischen Syndroms ebenfalls im wirtschaftlichen Sektor. Mit der Beschleunigung der Atherosklerose kommt es zu einer starken Zunahme der Inzidenz von zerebrovaskulären Insulten und koronaren Herzkrankheiten, beides Erkrankungsgruppen, die abgesehen von der Häufigkeit in unserer

Gesellschaft in der Therapie und Rehabilitation einen großen Kostenfaktor darstellen. Außerdem ist der rapide Anstieg der Osteoporose bei peri- und postmenopausalen Frauen ein großer finanzieller und überlebensbedrohender Faktor. Aus den genannten Gründen ist es wichtig, hier präventiv vorzugehen.

Es wird bisher eine hormonelle Substitutionstherapie (HRT = Hormone Replacement Therapy) mit Östrogenen in Kombination mit Gestagenen empfohlen. Die zyklusimitierende Kombinationstherapie besitzt nicht mehr das durch eine alleinige Östrogentherapie bedingt erhöhte Risiko für atypische Endometriumhyperplasien [Ziel & Finkle 1975, Smith et al. 1975]. Eine Metaanalyse der Cochrane Collaboration mehrerer klinischer Studien über die Effekte und Nebenwirkungen von HRT ergab 2005 folgende Ergebnisse:

Vorteile der HRT (sowohl Östrogene allein als auch Progesteron-Östrogenkombinationstherapie) sind eine 75%ige Reduktion von Hitzewallungen bei peri- und postmenopausalen Frauen, eine Verbesserung von Symptomen vaginaler Atrophie, eine Reduktion von Frakturen nur bei Langzeittherapie und ein vermindertes Risiko, ein kolorektales Karzinom zu entwickeln. Dieser protektive Effekt tritt jedoch ebenfalls erst nach mehr als 4 Jahren Therapiedauer auf.

Demgegenüber haben sich folgende Nachteile herauskristallisiert: es kommt schon ab dem ersten Therapiejahr zu einem erhöhten Risiko von Schlaganfällen, vor allem solcher mit schlechter Prognose. Unter der HRT-Kombinationstherapie kommt es zu erhöhtem Auftreten von koronarer Herzkrankheit (KHK) und venösen Thrombosen. Östrogentherapie allein scheint keinen Effekt auf KHK-Entwicklung zu haben.

Bezüglich des Einflusses von HRT auf das Vorkommen von Mammakarzinomen wurde festgestellt, dass anfänglich unter Östrogen-Progesteron-Kombinationstherapie die Mammakarzinominzidenz geringer zu sein schien als unter Placebo. Ab dem vierten Behandlungsjahr jedoch stieg die Inzidenz mit steigender Tendenz über die der unter Placebo. Es zeigte sich ebenfalls, dass diagnostizierte Mammakarzinome sich häufiger in weiter fortgeschrittenen Stadien befanden. Der Grund anfänglich geringerer Mammakarzinomdiagnosen unter HRT im Vergleich zu Placebo wurde in verspäteter mammographischer Detektion verursacht durch das Vorhandensein von hormonbedingt dichterem Mammagewebe vermutet. Aus der Metaanalyse wurde weiterhin geschlossen, dass Östrogene in Kombination mit Progesteron ein stärker erhöhtes Mammakarzinomrisiko haben als bereits unter Östrogentherapie allein [The Cochrane Collaboration 2008: Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women].

I.3. Die Östrogenrezeptoren und SERM (= Selective Estrogen Receptor Modulator)

Für die differentielle Wirkung von Östrogenen in verschiedenen Organen sind bislang zwei spezifische Subtypen der Östrogenrezeptoren bekannt, der Östrogenrezeptor Alpha (ER- α) und der Östrogenrezeptor Beta (ER- β) und ein fraglich existenter Östrogenrezeptor Gamma (ER- γ). Diese Rezeptoren gehören der Gruppe der steroidbindenden Kernrezeptoren an. Durch Bindung eines Agonisten kommt es zu Konformationsänderungen des Rezeptorproteins, so dass Bindungsstellen für Koaktivatoren freiliegen, deren Anlagerung für die Transkriptionsinduktion oder -repression von spezifischen DNA-Sequenzen nötig ist.

Die Rezeptor-Ligand- bzw. -Steroidkomplexe bilden Homodimere, die an die spezifischen DNA-Abschnitte zum Start der Transkription, im Falle des Östrogenrezeptors u.a. die Estrogen Response-Elements (ERE) genannt, andocken [Enmark & Gustafsson 1999, Craig Jordan 2006].

ER- α und - β besitzen eine verschiedenartige Verteilung in den Geweben und verschiedene Bindungsaffinitäten für Östrogene und andere Liganden [Enmark & Gustafsson 1999].

In Ratten liegt die höchste Dichte von ER- α im Uterus, Mamma, Hypophyse, Testes, Nebenhoden, Ovar, Niere und Nebenniere vor, während ER- β vor allen in den Organen Gehirn, kardiovaskuläres System, Immunsystem, männlichen und weiblichen Urogenitaltrakt, Knochen, Niere und Lunge vorkommt [Enmark & Gustafsson 1999].

Als Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERM) bezeichnet man chemisch verschiedenartige, nichtsteroidale Substanzen, die als Liganden der Östrogenrezeptoren nach Bindung selektive, gewebe-, zellabhängig und zum Teil speziesabhängige, östrogene Wirkung hervorrufen (Östrogenagonismus), oder östrogene Effekte in anderen Zelltypen blockieren (Östrogenantagonismus) [Russell et al. 2002].

Neben dem für die adjuvante Therapie des ER-positiven Mammakarzinoms prämenopausaler Frauen bekannten Tamoxifen sind weitere bisher bekannte SERM das ICI-164384 und das Raloxifen.

Raloxifen ist ein gängiges Mittel gegen Osteoporose bei postmenopausalen Frauen (östrogene Wirkung auf den Knochen). An der humanen Mamma [Dowsett et al. 2001] und in In-vitro-Untersuchungen von humanen Mammakarzinomzelllinien [Glaeser et al. 2006] haben sich unter Raloxifeneinfluss im Brustgewebe antiöstrogene Effekte ohne Änderungen in der ER- α Expression nachweisen lassen [Glaeser et al. 2006].

In der internationalen, multizentrischen, randomisierten, doppelblinden RUTH (Raloxifene Use for the Heart)-Studie mit 11101 postmenopausalen Frauen konnte unter Raloxifen verglichen mit der Placebogruppe ein um 55% vermindertes Risiko für östrogenrezeptorpositive, invasive Brustkarzinome nachgewiesen werden, jedoch ohne Effekte auf die Inzidenz von östrogenrezeptornegativen Tumoren. Obwohl es unter Raloxifentherapie zu einer Senkung des Gesamt- und LDL-Cholesterins und des Serum-Homozysteins kommt, konnte wider Erwarten in der RUTH-Studie kein verändertes kardiovaskuläres Risiko nachgewiesen werden. Es zeigte sich dagegen ein um 44% erhöhtes Risiko für venöse Thrombosen und ein um 49% erhöhtes Risiko für tödliche Schlaganfälle unter Raloxifentherapie verglichen mit der Kontrolle, sodass bei der Therapieentscheidung der Nutzen des Schutzes vor Osteoporose und Mammakarzinom gegen das Risiko von Thrombosen und tödlichen Schlaganfällen individuell abgewogen werden muss [Barrett-Connor et al. 2006].

In der STAR (Study of Tamoxifen and Raloxifen 2006) mit einer Größe von 20000 Frauen zeigte der Vergleich von Raloxifen zu Tamoxifen, dass es zu ähnlicher Reduktion von invasiven Mammakarzinomen kommt, jedoch unter Raloxifen zu geringerem Vorkommen von thromboembolischen Ereignissen, Katarakten und Endometriumhyperplasien [Lee et al. 2007]. Unter Raloxifen konnte kein erhöhtes Auftreten von Leberkarzinomen, Endometriumkarzinomen (wie unter Tamoxifentherapie) oder anderen Malignomen nachgewiesen werden [Barrett-Connor et al. 2006, Lee et al. 2007].

I.4. Phytoöstrogene und andere Pflanzeninhaltsstoffe als HRT-Alternative?

Ebenso wie in anderen Bereichen der Medizin geht der Trend in der Therapie der peri- bzw. postmenopausalen Symptome zu alternativen Behandlungsmethoden und zur Verwendung pflanzlicher Substanzen. Zunehmend mehr Frauen weichen aus Angst vor dem Mammakarzinom auf als ungefährlich angenommene pflanzliche Stoffe wie z.B. den Phytoöstrogenen aus.

Phytoöstrogene kommen in verschiedenen Pflanzen und Kräutern vor. Viele dieser Phytoöstrogene, wie zum Beispiel Soja, Hopfen, Alfalfa, grüner Tee, Sesam [Russell et al. 2002] und andere pflanzliche Inhaltsstoffe, wie die des Christophskrautes (*Cimicifuga racemosa*, engl. black cohosh) werden traditionell schon sehr lange bei perimenopausalen

Beschwerden eingesetzt und sind zum Teil auch Bestandteil der Therapie der traditionellen chinesischen Medizin [ABC Clinical Guide to Herbs 2002].

Phytoöstrogene sind natürlich vorkommende, pflanzliche SERM und häufig den Östrogenen funktionell und strukturell ähnlich. Sie haben östrogene bzw. antiöstrogene Effekte in Abhängigkeit von den Konzentrationen zirkulierender, endogener Östrogene und von dem vorhandenen prädominierenden Östrogenrezeptorsubtyp.

Die häufigsten Gruppen der Phytoöstrogene sind die der Isoflavone (Genistein, Daidzein, Quercetin aus Soja, Gemüse, Äpfeln, grünem Tee, Sesam, Weizen, etc.), Lignane (Enterolakton, Enterodiol aus beispielsweise Leinsamen) und der selteneren Coumestane, Resorcyssäurelaktone, Stilbene und der Mykotoxine [Russell et al. 2002].

Potentielle positive Wirkungen von Phytoöstrogenen wurden ebenfalls durch Stimulation des Immunsystems, antioxidative Effekte und Hemmung der Angiogenese berichtet [Duffy et al. 2007].

Es ist wichtig, den genauen Wirkungsmechanismus und Effekt dieser Stoffe zu untersuchen, da diese Substanzen als pflanzliche Bestandteile als ungefährlich angenommen und oft unreflektiert eingenommen werden, ohne dass Daten über ihre Wirksamkeit vorliegen. Außerdem ist es aufgrund ihrer möglichen östrogenagonistischen Wirkungsweisen nicht ausgeschlossen, dass es ähnlich wie unter Östrogenen zu erhöhter Proliferation unter anderem in Mamma- und Uteruszellen kommen kann.

Im Folgenden soll kurz auf die bisherigen Erkenntnisse über die einzelnen in unserem Rattenversuch untersuchten Substanzen eingegangen werden. Abgesehen von den als Phytoöstrogenen bekannten und hier untersuchten Substanzen (Soja, *Belamcanda chinensis*) wurden ebenfalls einige andere Pflanzenextrakte untersucht, die eine fragliche Wirkung auf peri- bzw. postmenopausale Beschwerden haben.

In epidemiologischen Studien ist aufgefallen, dass asiatische Frauen signifikant seltener und in geringerer Intensität an perimenopausalen Symptomen leiden. Es kam bei ihnen überdies seltener zu osteoporotischen Frakturen, zu Erkrankungen des kardiovaskulären Formenkreises und Karzinomen (Ovarial-, Endometrium-, Kolon- und Mammakarzinomen) als bei europäischen und amerikanischen Frauen [Umland et al. 2000, Parker et al. 1996]. Es wurde vermutet, dass einer der Gründe für diesen Unterschied im höheren Sojagehalt der dortigen Ernährung liegen könnte. Dabei darf jedoch bei solch vergleichender Betrachtung nicht außer Acht gelassen werden, dass andere Faktoren der Kultur, Lebensweise, Ernährung,

medizinische Faktoren wie Kontrazeptionsverhalten und morphologische bzw. genetische Unterschiede Einflüsse auf jeweilige Symptome und Erkrankungen haben.

Die Ergebnisse klinischer Studien sind bezüglich der Effektivität einer Sojabehandlung auf peri- und postmenopausaler Klinik widersprüchlich [Albertazzi et al. 1998, Abstract Sievert et al. 2007].

Eine Metaanalyse der Cochrane Collaboration von mehreren klinischen Studien in 2006 konnte keinen überzeugenden Beweis der Effektivität von Phytoöstrogenen (v.a. Soja, Roter Klee, Alfalfa) in der Therapie von postmenopausalen vasomotorischen Symptomen nachweisen, ebenso wenig wie in Bezug auf östrogene Effekte auf Endometrium und Vaginalschleimhaut. Dieser Review wurde jedoch dadurch beschränkt, dass viele Studien ausgeschlossen werden mussten, da keine Originaldaten vorlagen, keine angemessene Statistik betrieben wurde, bzw. die Studien aufgrund verschiedener Studiengestaltungen nicht kompatibel waren [The Cochrane Collaboration 2008: Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms (Review)].

Auf experimenteller Ebene hat die Arbeitsgruppe Arjmandi et al. (1996) mittels Rattenversuchen unter Sojatherapie einen Schutz des Knochens vor Osteoporose nachgewiesen [Arjmandi et al. 1996]. Unter sojareicher Ernährung wurde eine Reduktion der Blutlipide (Gesamtcholesterin, LDL-Cholesterin und Triglyceride) festgestellt [Anderson JW et al. 1995], Verminderung der Atheromentstehung und Verbesserung der Gefäßreagibilität [Übersicht von Setchell 2001].

Der Effekt von Isoflavonen als Sojabestandteil auf das Mammagewebe wird ebenfalls kontrovers diskutiert. Wie in der Übersichtsarbeit der Arbeitsgruppe Duffy et al. (2007) zusammengefasst, konnten von den 15 untersuchten klinischen Studien aus dem Zeitraum 1986-2002 die meisten Studien am Menschen keinen Effekt der Sojaeinnahme auf das Brustkarzinomrisiko nachweisen. Einige Fall-Kontrollstudien zeigten einen protektiven Effekt v.a. für prämenopausale Frauen im Gegensatz zu postmenopausalen Frauen. In einer Studie aus Großbritannien zeigte sich sogar ein erhöhtes Brustkarzinomrisiko, wobei hier beachtet werden muss, dass nur geringe Isoflavonmengen eingenommen wurden (<1 mg/d) [Duffy et al. 2007].

Die größere Metaanalyse der Arbeitsgruppe Trock et al. (2006) von 18 klinischen Studien aus dem Zeitraum von 1978 bis 2004 konnte eine geringe Reduktion des Brustkarzinomrisikos unter hohen Dosen im Vergleich zu geringer Sojaaufnahme nachweisen. Dieser Effekt ist stärker bei prä- als bei postmenopausalen Frauen. Es sei jedoch erwähnt, dass die Metaanalyse eine große Heterogenität aufwies, keine Dosis-Effektbeziehung nachweisbar war und mit

verschiedenen Phytoöstrogenen und -nahrungsquellen (man bedenke den Einfluss von Sojaverarbeitung auf seine Wirkung: Allred et al. 2004) gearbeitet wurde. Außerdem wurden z.T. unterschiedliche Populationen untersucht und bei Messung von Urin-Isoflavonkonzentrationen wurde kein Bezug zur Tageszeit und Diäteeinnahme notiert. Schließlich wurden in mehreren Studien andere beeinflussende Faktoren außer Acht gelassen, wie beispielsweise BMI, andere interagierende Nahrungsmittel, Menarche, Alter bei Erstschwangerschaft, Stilldaten und körperliche Aktivität und Zeitraum des Beginns der Sojaeinnahme (Kindes-, Pubertäts-, Erwachsenenalters). Aus diesen aufgezählten Gründen war das Standardisieren und Poolen der Studien schwierig. Es dürfen bei retrospektiven Fall-Kontrollstudien weiterhin der Einfluss verschiedener Verzerrungen der Ergebnisse nicht vergessen werden, wie z.B. die Verzerrung der Erinnerung (Recall bias) nach Brustkarzinomdiagnose, Änderungen in der Diät nach Diagnose, Darmmotilitätsveränderungen durch diesen Stress und der Effekt von Antibiotika- und Chemotherapie auf die Darmfunktion und -flora und damit auf den Sojametabolismus [Trock et al. 2006].

Es sei ebenfalls erwähnt, dass möglicherweise eine hohe Variabilität im Metabolismus und in der Absorption von Isoflavonen vorliegt, welche die Ergebnisse v.a. kleinerer Studien unbewußt beeinflusst haben könnte. Setchell et al. (2002) behaupten, dass nur 30-40% der nordamerikanischen Bevölkerung Darmbakterien besitzen, die Daidzein, eines der Hauptisoflavone des Sojas zum aktiveren Equol konvertieren können. Damit haben nur ein Teil der untersuchten Frauen SERM-Effekte von diesen Phytoöstrogenen [Setchell et al. 2002].

In einem Versuch mit postmenopausalen Primaten von Wood et al. (2006) wurde der Effekt von verschiedenen Isoflavonkonzentrationen (Sojafutteraufnahme \approx Serum-Isoflavonkonzentration: 60mg/d \approx 0,3 μ M - wie durch traditionelles asiatisches Essen im Menschen erreichbar; 120mg/d \approx 0,7 μ M - Hochdosis Isoflavone; 240mg/d \approx 1,3 μ M - pharmakologische Dosis) kombiniert mit entweder niedrigem (0,09mg/d) oder hohem (0,5mg/d) 17 β -Östradiolzusatz im Futter auf die Mamma untersucht. Durch die jeweiligen Östradiolzusätze soll ein Modell der postmenopausalen Frau im Vergleich zur postmenopausalen Frau mit hohem BMI bzw. unter HRT-Therapie geschaffen werden. Unter hohem Östradiolzusatz kam es dabei dosisabhängig zu einer verminderten Mammagewebsproliferation bis unter pharmakologischer Sojadosis eine entsprechend geringe Proliferation wie unter der niedrigen Östradiolkontrolle vorlag. Es konnten im Gegensatz zu anderen erwähnten (Tier- und In-vitro-) Studien dabei keine östrogenagonistischen Effekte

von Sojaisoflavonen unter niedrigen Östradiolkonzentrationen nachgewiesen werden [Wood et al. 2006].

Isoflavone wurden von Burdette et al. (2002) als schwache, partielle Östrogenagonisten klassifiziert. Dies begründeten sie damit, dass es trotz der höheren Affinität von Isoflavonen zu ER- β durch vermehrtes Vorkommen von ER- α im Uterus zu dem von ihnen festgestellten, schwach östrogenagonistischen Effekt von Isoflavonen (250mg/kg und 500mg/kg Roter-Klee-Extrakt mit 15%igem Isoflavoninhalte) auf Rattenuteri im Sinne einer Uterusgewichtszunahme und zu einer schwachen östrogenähnlich verminderten Körpergewichtszunahme im Vergleich zur Kontrolle kam. Überraschenderweise konnten sie keinen Proliferationseffekt auf die Mamma nachweisen, welche ebenfalls eine höhere ER- α - als ER- β -Dichte besitzt [Burdette et al. 2002].

Der Rattenversuch der Arbeitsgruppe Santell et al. (1997) konnte unter Genisteinbehandlung (150 μ g/g, 375 μ g/g, 750 μ g/g Genistein) eine Hemmung der östrogenentzugbedingten Mammaryregression und damit östrogene Wirkung nachweisen [Santell et al. 1997].

Die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen mit Isoflavonen werden in der Literatur gleichfalls kontrovers diskutiert, sie könnten jedoch einen Erklärungsansatz für einige sich scheinbar widersprechender Ergebnisse aus klinischen Studien und Tierversuchen anbieten.

In mehreren Studien wurde eine antiproliferative Wirkung [Duffy et al. 2007] postuliert, während einige Arbeitsgruppen einen konzentrationsabhängigen, biphasischen Effekt von Soja auf Mammaryzellen festgestellt haben [Maggiolini et al. 2001, This et al. 2001]. Die Arbeitsgruppe von Maggiolini et al. (2001) und This et al. (2001) haben nachweisen können, dass es unter niedrigen Konzentrationen (0,1-1 μ M) von Genistein und Quercetin zu einem Östrogenagonismus sowohl an ER- α als auch - β kommt, d.h. dass östrogenrezeptorpositive Mammarykarzinomzellen zur Proliferation angeregt werden. Unter hohen Konzentrationen (>10 μ M) dieser beiden Sojabestandteile kommt es zu einem östrogenrezeptorunabhängigen, zytotoxischen Effekt sowohl auf die gleichen östrogenabhängigen Zellen, als auch auf östrogenrezeptornegative Karzinomzellen. Unter Genistein und physiologischen Konzentrationen von Östrogenen (Modell des Effektes auf prämenopausale Frauen) kommt es nach This et al. (2001) ebenfalls zu einer leichten Hemmung der Proliferation von ER-positiven Brustkarzinomzelllinien, die sich durch Konkurrenz des schwächeren Östrogenagonisten mit geringerer Affinität zum Östrogenrezeptor mit Östrogenen erklären lässt. Dies bietet eine gute Erläuterung für die Befunde einiger von Duffy et al. (2007) und Trock et al. (2006) zitierten Studien sowie der im Review von Wu et al. (1998) festgestellten

Tatsache, dass es bei prämenopausalen Frauen unter hoher Sojaaufnahme zu einer Verminderung des relativen Risikos für die Erkrankung an Mammakarzinomen kommt.

Allred et al. (2001) haben den Effekt von Sojaisolat, einer komplexen, doch verarbeiteten Mischung von Sojabestandteilen, mit steigenden Genisteinkonzentrationen auf das Wachstum der östrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7, die in Mäuse implantiert wurde untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass dosisabhängig bei Futterkonzentrationen von 150, 300 und 750ppm (ppm=mg Genistein/kg Sojafutter) eine Proliferationsstimulation (750ppm konsumiert durch Ratten ergibt eine Plasmakonzentration von ca. 2 μ M) stattfand, jedoch bei Konzentrationen von 15ppm das Tumorstadium unbeeinflusst geblieben war. Daraus vermuteten sie, dass abgesehen von einem biphasischen Effekt ein unterer Schwellenwert für die stimulatorische Wirkung vorliegen könne unter dem keine Proliferationsänderung stattfindet [Allred et al. 2001].

Es scheint noch unklar zu sein, inwiefern die oben genannten hohen, zytotoxischen Konzentrationen der In-vitro-Untersuchungen mit sojareicher Ernährung aufgrund von z.B. individuellem Metabolismus im Brustgewebe des einzelnen Menschen erreicht werden können und dort auch *in vivo* antiproliferative Effekte haben. Weiterhin ist fraglich inwiefern ohne beabsichtigte, phytoöstrogenreiche Ernährung durch „normale Nahrungsmittel“ Phytoöstrogene aufgenommen werden, die eine niedrige, proliferationsinduzierende, östrogene Wirkung erzeugen könnten. Es sei dazu erwähnt, dass nach This et al. (2001) und Maggiolini et al. (2001) in Frauen mit typischer japanischer Diät und in Säuglingen mit sojabasierter Ersatzmilch Phytoöstrogenkonzentrationen im Blut von >5 μ Mol erreicht werden können und dass die maximal physiologisch erreichte Konzentration von Phytoöstrogenen als 18,5 μ Mol angegeben wurde. Dies ist wiederum im Gegensatz zu der in Trock et al. (2006) zitierten Maximalkonzentration von <4 μ M Genistein und zu der in Allred et al. (2004) von 0,8-2 μ M Genistein im Blut von Frauen mit Sojamilchernahrung.

Ein weiterer Erklärungsansatz für die Hypothese des präventiven Schutzes von Soja gegen das Mammakarzinom in prämenopausalen Frauen bieten McMichael-Phillips et al. (1998) an. Sie fanden in ihren In-vitro-Versuchen zwar eine (wenn auch insignifikante) Erhöhung der Proliferationsrate der Mammaepithelien von gesunden, prämenopausalen Frauen unter Soja, begründeten einen Schutz vor Mammakarzinomen durch Sojaeinnahme in sojabedingten Einflüssen auf den Menstruationszyklus. Sojadiät führt zu einer Verlängerung des Menstruationszyklus, wobei die Länge der Lutealphase, während der die höchste Proliferation in der Mamma stattfindet, konstant bleibt. Dies führt dazu, dass diese Frauen sich während ihres ganzen Lebens hormonell länger in der Follikelphase mit der geringeren

Mammaproliferation befinden als Frauen ohne vermehrte Sojaaufnahme [McMichael-Phillips et al. 1998].

Anhand der Ergebnisse ihrer Rattenversuche postulierten Lamartinière et al. (2002) neben einer Dosisabhängigkeit eine Abhängigkeit des Sojaeffektes vom jeweiligen Entwicklungsstadium des Individuums, in dem es zur Sojaexposition kommt. Die Arbeitsgruppe stellte eine reduzierte chemische Induktion von Mammakarzinomen fest, wenn Ratten in der präpubertären Phase mit sojareichem Futter ernährt wurden. Es kam zu einem additiv protektiven Effekt, wenn die Sojabehandlung im „Erwachsenenleben“ fortgesetzt wurde. Dies erklären sie mit der vermehrten Ausdifferenzierung der Mammastrukturen während dieser Phase der Gewebeentwicklung, z.B. im Sinne vermehrter Ausbildung von Mammaläppchen und Verminderung der Anzahl noch relativ undifferenzierter und gegen Karzinogene empfindlichen Drüsenalveoli, und außerdem mit einer Verringerung der Rezeptordichte für den Wachstumsfaktor EGF in diesen Strukturen [Lamartinière et al. 2002]. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen von zwei klinischen Fall-Kontrollstudien. Shu et al. (2001) konnten einen geringeren Sojagebrauch im Alter von 13-15 Jahren in 1459 chinesischen Brustkarzinompatientinnen im Vergleich zu 1556 Kontrollfrauen gleichen Alters aufzeigen [Shu et al. 2001]. Die klinische Studie von Wu et al. (2002) mit 501 versus 594 Frauen asiatischer Herkunft, die in Amerika leben, weist einen protektiven Effekt von Sojaernährung (im Durchschnitt 12mg/d Isoflavone) in der Adoleszenz auf, der noch möglicherweise verstärkt wird durch Fortsetzung im Erwachsenenalter [Wu et al. 2002].

Die bisherigen Ergebnisse zu den Effekten und Nebenwirkungen von *Cimicifuga racemosa*, ebenfalls Traubensilberkerze, Wanzenkraut oder Christophskraut (engl. black cohosh) genannt, einer zu den Hahnenfußgewächsen zugehörigen Pflanze, sind uneinheitlich. Diese Pflanze ist in Nordamerika einheimisch und wurde bereits seit langem dort und in Europa traditionell zur Therapie von Menstruations- und menopausalen Beschwerden, jedoch auch in der Behandlung von Rheuma, Asthma, Nierenfunktionsstörungen, Dyspepsie, Epilepsie, Malaria eingesetzt. Sie ist ebenfalls Bestandteil der Homöopathie und der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) gegen Entzündung, Fieber, Kopf- und Halsschmerzen und Schüttelfrost [Pahlow: Das große Buch der Heilpflanzen 2001, Russell et al. 2002, ABC Clinical Guide to Herbs 2002]. Trotz uneinheitlicher Ergebnisse über ihre Effektivität in Bezug auf diese Indikationen ist ein Extrakt dieser Pflanze als Therapeutikum (Remifemin®, Klimadynon®) gegen neurovegetative Beschwerden in der Perimenopause, gegen Symptome des prämenstruellen Syndroms (PMS) und Dysmenorrhö von der Deutschen Kommission E,

wenn auch aufgrund fehlender Langzeituntersuchungen nur für einen Behandlungszeitraum von maximal 6 Monaten anerkannt und in Deutschland freiverkäuflich erhältlich.

Es sind verschiedene Inhaltsstoffe der *CR*-Rhizome bekannt, mehrere Triterpenglykoside (Actein, Deoxyactein), Polyphenolsäuren (Cimicifuginsäure A, B, E, F, Fukinolinsäure) [Powell et al. 2008], Flavonoide, ätherische Öle und Tannine, die vermutlich alle synergetisch ihren Effekt haben [Borrelli & Ernst 2002].

Im Falle der *Cimicifuga racemosa* sind die Resultate bezüglich der Effektivität auf die klimakterischen Beschwerden und des genauen Wirkmechanismus (Phytoöstrogen mit Östrogenagonismus/-antagonismus/SERM, oder andere pharmakobiologische Wege, wie zentral dopaminerg, partieller Serotoninagonist und μ -Morphinrezeptoragonist) kontrovers. Man beachte hierbei, dass widersprüchliche Ergebnisse bezüglich der Effektivität in unterschiedlichen, verwendeten *CR*-Konzentrationen, Interaktionen unterschiedlicher Inhaltsstoffsstoffe von *CR*, in verschiedenen in *CR* enthaltenen Substanzen und in einem möglichen Einfluss des Extraktionsverfahrens (isopropranolisch versus äthanolisch versus methanolisch) begründet sein könnten.

In einem Review von zehn klinischen Studien, in denen neun positive Effekte auf neurovegetative und psychische Perimenopausenbeschwerden zeigten, hat der ABC Clinical Guide to Herbs 2002 eine gute Wirkung der *CR*-Extrakte mit widersprüchlichen Ergebnissen über den Einfluss von *CR* auf die Urogenitalschleimhäute, den LH-Spiegel und über den genauen Wirkungsmechanismus postuliert.

In aktuelleren Veröffentlichungen wird *CR* in den klinischen Studien der Arbeitsgruppen Pockaj et al. (2006) und Newton et al. (2006) ein Effekt auf vasomotorische Symptome/ Hitzewallungen abgesprochen, im Gegensatz zu den Ergebnissen der klinischen Studien der Arbeitsgruppen Wuttke et al. (2003), Nappi et al. (2005) und Osmers et al. (2005). Osmers et al. (2005) beschränken die signifikante Verbesserung der Hitzewallungen auf die frühe Menopause (<3 Jahre klimakterische Symptome).

Des Weiteren wurde (am Menschen) eine geringe Verbesserung der urogenitalen Atrophie-symptome, (am Menschen und der ovariectomierten Ratte) eine Erhöhung der Osteoblasten- und Verminderung der Osteoklastenaktivität und damit einen Osteoporoseschutz [Seidlová-Wuttke et al. 2003 B, Wuttke et al. 2003] ohne Effekt auf LH, FSH und Endometriumdicke gemessen [Seidlová-Wuttke et al. 2003 B, Wuttke et al. 2003, Nappi et al. 2005].

Diese Befunde können mit der Hypothese von Bodinet et al. (2002) in Übereinstimmung gebracht werden, dass es sich bei Bestandteilen von *CR* um SERM mit einem Östrogenagonismus auf den Knochen und das vasomotorische Zentrum im Gehirn (Einfluss auf

Hitzewallungen) und einem Östrogenantagonismus auf den Uterus und die Mamma handle [Bodinet & Freudenstein 2002].

Bei der Suche nach der Wirkungsweise von *CR* hat sich in mehreren Studien anstatt eines Effektes über die Östrogenrezeptoren (ER- α/β), Progesteron-, oder Androgenrezeptoren eine schwache Arylhydrokarbon-Rezeptoraktivität aufzeigen können [Jarry et al. 2005]. Dies ist ein zytosolischer Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung eine Rolle in der Modifizierung der Zellproliferation und -differenzierung und in der Detektion und Biotransformation sowohl synthetischer als auch natürlicher Stoffe im Körper spielt. Polyzyklische aromatische Hydrokarbone (PAH) als Umweltnoxen können, ebenso wie sich für *CR*-Extrakt gezeigt hat, über den AhR im Menschen antiöstrogene und antitumoröse Wirkungen ausüben, wie beispielsweise wachstumshemmende Effekte auf Prostatakarzinomzellen und sowohl auf ER-positive als -negative Mammakarzinomzellen [Jarry et al. 2005].

Die Arbeitsgruppe von Jarry et al. (2003) konnte anhand ihrer In-vitro-Studien durch Östrogen- und Dopaminverdrängungsuntersuchungen und durch chromatographische Separation mindestens zwei verschiedene, bisher unbekannte *CR*-Inhaltsstoffe nachweisen.

Einer dieser Stoffe wird durch Östrogenzugabe aus menschlichem Endometriumgewebe und Schweineuterussuspension, jedoch nicht von ER- α oder - β verdrängt und ist damit ein Stoff, der seine östrogene bzw. antiöstrogene Wirkung unabhängig von ER- α oder - β ausübt [Jarry et al. 2003]. Interessant ist ebenfalls die Feststellung, dass es durch Hydrolyse des *CR*-Extraktes zu erhöhter Bindung an das Uteruszytosol kommt, was auf eine Erhöhung der Effektivität von *CR* durch bakterielle Konversion ähnlich der unter Soja hinweisen könnte. Der zweite von diesem Phytoöstrogen verschiedene Inhaltsstoff wird durch Dopamin vom D2-Rezeptor verdrängt [Jarry et al. 2003]. Letzteres könnte eine gute Erklärung für den *CR*-Einfluss auf Hitzewallungen sein, die als Überaktivität des GnRH- und damit LH-Pulsgenerators im Hypothalamus mit Koaktivierung anderer hypothalamischer Neurone, die die Körpertemperatur regeln, erklärt werden können und deren Modulation mit Dopaminagonisten im Sinne einer Reduktion der Hitzewallungen klinisch am Menschen bewiesen wurde. Entsprechend der Hypothese einer dopaminagonistischen Wirkungsweise wurde in Untersuchungen an ER-positiven Mammakarzinomzellen von Bodinet et al. (2002) beobachtet, dass es unter *CR*, ähnlich wie unter Dopaminagonisten, zu einer Hemmung der Proliferation und zu einer erhöhten Expression von Östrogenrezeptoren in den Zellen kommt [Bodinet & Freudenstein 2002].

Aufgrund der Feststellungen eines parallel zur Reduktion von Östrogenen im Kreislauf (vermutlich durch verminderte Tryptophanhydroxylase) verminderten zirkulierenden

Serotonins und eines verminderten Auftretens von menopausalen vasomotorischen Symptomen unter der Behandlung mit selektiven Serotonin Reuptake Inhibitoren (SSRI) wurde auf eine Verknüpfung östrogenener und serotoninerger Systeme im Körper geschlossen. Aus diesem Grund konzentrierten sich weitere Forschungen an In-vitro-Untersuchungen [Fabricant et al. 2005, Powell et al. 2008] und an ovariectomierten Ratten [Burdette et al. 2003] auf *CR*-Effekte an den Serotoninrezeptoren [Burdette et al. 2003, Fabricant et al. 2005, Powell et al. 2008]. Es konnten keine östrogene oder antiöstrogene Effekte von *CR* festgestellt werden, stattdessen wurde entdeckt, dass Bestandteile von *CR* stark an die Serotoninrezeptorsubtypen 5HT1A und 5HT7 mit agonistischer Wirkung binden. Diese Rezeptoren stehen bekanntlicherweise im Hypothalamus mit der Generation von Hitzewallungen im Zusammenhang. Deshalb wurde vermutet, dass evt. diese *CR*-Bestandteile die Bluthirnschranke überwinden und so ihre Wirkungen zentral haben könnten [Burdette et al. 2003]. Bei diesen *CR*-Inhaltsstoffen handele es sich um die Polyphenolsäuren Cimicifuginsäure A, B, F, Fukinolsäure, Ferulinsäure, Isoferulinsäure, einem neu entdeckten Inhaltsstoff namens Cimipronidine, einem zyklischem Guanidin-Alkaloid [Fabricant et al. 2005] und v.a. dem N ω -Methylserotonin mit der höchsten Affinität zum Rezeptor und stärksten agonistischen Effekt nach Bindung [Powell et al. 2008].

Kürzlich wurde von Rhyu et al. (2006) entdeckt, dass der *CR*-Extrakt (Äthanolisches>Methanolisches>Isopropranolisches Extraktionsverfahren) einen partiellen Agonisten am menschlichen μ -Opiatrezeptor enthält, der neben einer hohen Affinität zum Rezeptor eine der Bindung folgende agonistische Wirkung geringer als nach Bindung des natürlichen Enkephalinliganden besitzt [Rhyu et al. 2006].

Die Ergebnisse über den Einfluss von *CR* auf die Brustdrüse sind ebenfalls gegensätzlich. Kruse et al. (1999) hat unter *CR* eine leichte, aber signifikante Proliferationsinduktion auf MCF-7-Zellen, d.h. ER-positive Mammakarzinomzellen nachgewiesen. An Mammakarzinomzelllinien hat Neßelhut et al. (1993) hat wie auch Russell et al. (2002) und Freudenstein et al. (2002) am Rattenmodell keinen wachstumsstimulierenden Effekt von *CR* aufzeigen können, während die Versuche an Mammakarzinomzelllinien der Arbeitsgruppen Bodinet et al. (2002) und Zierau et al. (2002) einen Östrogenantagonismus ergaben. Es kam in ihren Versuchen auf die MCF-7- Mammakarzinomzelllinie zu einer Hemmung östrogeninduzierter Proliferation. Die Tatsache, dass unter hohen *CR* -Konzentrationen der antagonistische Effekt im Gegensatz zu unter niedrigen Konzentrationen nicht durch Östrogengaben aufgehoben werden konnte, unterstützt die Theorie, dass *CR* außerdem über

östrogenunabhängige Regulationswege die Mamma beeinflussen kann [Bodinet & Freudenstein 2002].

Kürzlich hat die Arbeitsgruppe Gaube et al. (2007) ein von Östrogen- und Tamoxifeneinfluss unterschiedliches Genexpressionsmuster von 431 Genen in der ER- α -positiven menschlichen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 festgestellt, wenn diese einem CR-Extrakt, einer Cycloartenol-Aglykonmischung (Imitierung der bakteriellen Hydrolyse des CR-Glykosiden) oder dem CR-Bestandteil Actein ausgesetzt war. In ihren Proliferationsuntersuchungen zeigten MCF-7-Zellen unter 1nM/ml Östradiolzugabe nach 120min Inkubation eine maximale Proliferationsstimulation (184% versus Kontrolle), unter 10 μ M Tamoxifen eine 50%ige Reduktion der Proliferation im Vergleich zur Kontrolle, ebenso wie es unter sowohl dem CR-Extrakt als auch dem Actein und Aglykon dosisabhängig zu einer Proliferationsverminderung kam (50% Proliferationsinhibition unter 14,7 μ g/ml CR-Extrakt, 19,6 μ M Actein, 30 μ M Aglykon). Die Veränderungen in der Genexpression in den MCF-7-Zellen wurden nach 24 Stunden Inkubation mit 15 μ g/ml CR-Extrakt untersucht. Die durch CR-Einfluss veränderten 431 Gene beinhalteten, abgesehen von ER- α -Gen(\downarrow) und VEGF, keine östrogenregulierten Gene, sodass aufgrund der verschiedenen und komplexeren Genexpression verglichen zu Tamoxifen und Östradiol Gaube et al. (2007) annahmen, dass CR weder eine östrogene noch antiöstrogene Wirkungsweise besitzt. Insgesamt wurde die Genexpression im Sinne einer Zellzyklusinhibition, Proapoptose, eines Stress Response und durch beispielsweise erhöhte AhR- und CYP1A1-Expression und durch Downregulation der ER- α -Expression einer möglichen Antitumoraktivität verändert [Gaube et al. 2007].

Belamcanda chinensis, auch Leopardenblume (engl. blackberry lily, leopard lily) genannt, gehört zu den Irisgewächsen, ist in Korea, China und Japan einheimisch und wird in China traditionell zur Therapie von Husten und Pharyngitis verwandt. Ihre chemischen Bestandteile sind Triterpenoide und Isoflavonoide (Iridin, Iridogenin, Tectorigenin, Tectorigin, Irisflorentin, Rhamnocitrin) im Rhizom bzw. Wurzelstock, Phenole, Benzochinone und Benzofurane in den Pflanzensamen [Ito et al. 2001]. Soweit bisher bekannt, werden Bestandteilen von BC antiproliferative Fähigkeiten nachgesagt. Durch Tectorigenin konnte an Lungenkarzinomen eine Reduktion an Tumolvolumen nachgewiesen werden und es kommt unter Tectorigenin und Tectoridin zu einer Verminderung der Angiogenese, was ein wesentlicher Bestandteil der wachstumsreduzierenden Wirkung in Tumoren ist [Jung et al. 2003].

Auf Prostatakarzinomzelllinien (LNCaP), die subkutan in Mäuse injiziert wurden, zeigten sich unter *BC* durch Veränderungen in der Genexpression, Proteinsynthese und Aktivität verschiedener Zellsubstanzen antiproliferative, proapoptotische Wirkungen und ein vermindertes, invasives Tumorwachstum [Thelen et al. 2005].

Die Arbeitsgruppe Wang et al. (2001) hat eine Substanz namens Isorhapontigenin (ISOR) aus *BC* isoliert, die ähnlich dem u.a. in Rotwein enthaltenen Resveratrol antiinflammatorische und antioxidative Fähigkeiten auf verschiedenen, molekularbiologischen Ebenen besitzt. Dazu gehörten ein 100x höherer Schutz des Organismus vor Lipidperoxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren als unter Vitamin E in gleicher Konzentration, Reduktion des Glutathionverbrauchs und Schutz vor oxidativem DNA-Schaden, der zu Mutation, Karzinogenese und Zellalterung führt. So wäre ihre hypothetische Wirkung gegen Tumore und protektiven Effekte gegen Krankheiten, in deren Pathogenese oxidativer Stress eine Rolle spielt (kardiovaskuläre Erkrankungen, M. Alzheimer, M. Parkinson) zu erklären [Wang et al. 2001].

Anhand von Ergebnissen aus Tierversuchen an ovariectomierten Ratten und In-vitro-Untersuchungen wurden einigen Inhaltsstoffen der *BC* SERM-artige Wirkungen nachgesagt. So wurde für Tectorigenin als einer der *BC*-Inhaltsstoffe anhand von ER-Ligandbindungsanalysen nachgewiesen, dass es sowohl über ER- α als auch - β wirkt, jedoch mit einer geringeren Bindungsaffinität (670x und 400x geringer) als Östradiol [Seidlová-Wuttke et al. 2004]. Es konnte eine östrogenähnliche, jedoch kürzer andauernde LH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus und damit eine mögliche Effektivität von *BC* in der Behandlung peri- bzw. postmenopausaler Symptome aufgezeigt werden. Weiterhin konnte eine schwach östrogene Wirkung auf den Knochen im Sinne einer Prävention bzw. Reduktion von Osteoporose nachgewiesen werden, ohne dass östrogene Effekte auf die Mamma oder den Uterus auftraten [Seidlová-Wuttke et al. 2004].

Silybum marianum, auch Mariendistel (engl. milk thistle, holy thistle, St.Mary thistle) genannt, ist ursprünglich im Mittelmeerraum beheimatet. Sie wurde schon seit mehr als 2000 Jahren zur Behandlung von Leber-, Magendarmtrakt- und Gallenblasenerkrankungen eingesetzt. Sie ist ein anerkanntes Mittel in der Prophylaxe und Therapie von Leber- und Gallenerkrankungen (Legalon®) und als Antidot bei Knollenblätterpilzvergiftungen (*Amanita phalloides*), obwohl dessen Effektivität in menschlichen Lebererkrankungen noch nicht sicher etabliert ist [Ladas & Kelly 2003].

Ihr Wirkstoff ist Silymarin, ein Extrakt aus Pflanzensamen, das aus 70-80% Flavonolignanen (mit den aktivsten Lignanen Silybin/in, Silydianin und Silychristin), dem Isoflavonoid Taxifolin und zu 20-30% aus chemisch noch undefinierten Substanzen besteht [Review Kren & Walterova 2005].

Silymarin wurde in mehreren Studien antiinflammatorische, antifibrotische, antioxidative, antiangiogenetische Effekte über dosisabhängige Reduktion von VEGF und Wachstumsunterdrückung und Apoptoseinduktion auf menschliche Nabelschnurvenenendothelzelllinie sowie tumorprogressionshemmende und immunmodulierende Wirkungen nachgesagt [Review Luper 1998, Ladas & Kelly 2003, Review Kren & Walterova 2005].

Ladas & Kelly (2003) weisen auf den eventuellen leberprotektiven Nutzen von *SM* in der adjuvanten Therapie von Tumoren hin, da viele Chemotherapien ein hohes Potential von meist ernstzunehmenden hepatischen Nebenwirkungen haben.

Außerdem besteht die Möglichkeit einer gewünschten, synergetischen Erhöhung der Toxizität von Chemotherapien auf Tumorzellen, sodass auch chemotherapieresistente Zellen erreicht werden können, wie Scambia et al. (1996) dies mit doxorubicinresistenten MCF-7-Mammakarzinomzellen unter der Kombination von Doxorubicin und *SM* nachweisen konnten [Scambia et al. 1996 zitiert in Ladas & Kelly 2003].

Die Arbeitsgruppe von Bhatia et al. (1999) hat unter Silybinineinfluss eine Hemmung auf das Karzinomwachstum von menschlichen Mamma- (u.a. ER-positive Karzinomzelllinie MCF-7) sowie Prostata- und menschlichen ektozervikalen Karzinomzelllinien zeigen können [Bhatia et al. 1999 zitiert in Ladas & Kelly 2003].

Es scheinen jedoch bezüglich des Effektes von *SM* auf Mammakarzinome widersprüchliche Ergebnisse vorzuliegen, die nicht allein durch Dosisunterschiede der Studien erklärt werden können.

Malewicz et al. (2006) konnten anhand von Versuchen an prä- und postpubertären Ratten- und Mausmodellen (*SM* im Futter in Konzentrationen von 0,03 ; 0,1 ; 0,3 ; 1% w/w führte zu Silibininplasmakonzentrationen von ca. 5-35 µg/ml) einen östrogenähnlichen, Mammakarzinominzidenz und -tumoranzahl erhöhenden Effekt aufzeigen. Es zeigte sich bei Erhöhung der *SM*-Konzentrationen im In-vitro-Versuch auf die ER-positive MCF-7-Zelllinie ein biphasischer, möglicherweise östrogenener Effekt, der durch gleichzeitige Behandlung mit Antiöstrogenen aufgehoben wird. Unter niedrigeren Dosen (Konzentrationen von 5-20 µg/ml) kommt es proportional zur *SM*-Konzentration zum Wachstum der MCF-7-Zellen, während hohe Dosen (Konzentrationen von >50 µg/ml) zu einer starken Wachstumshemmung der

Mammakarzinomzellen führen. Während einige in ihrer Diskussion erwähnte Studien (Abstract von Tyagi et al. 2004), die einen protektiven Effekt von *SM* auf Mammakarzinomzellen (MCF-7 und MDA-MB468) gezeigt hatten, tatsächlich mit hohen *SM*-Konzentrationen experimentiert hatten (25-100µg/ml) und damit nicht mehr im Widerspruch zu den oben genannten Ergebnissen steht, trifft dies nicht auf die Ergebnisse von Zi et al. (1998) zu.

Die Arbeitsgruppe Zi et al. (1998) hat den Effekt von *SM*-Konzentrationen von 10-75 µg/ml auf die östrogenunabhängige Mammakarzinomzelllinie MDA-MB468 untersucht und dabei eine signifikante, dosis- und zeitabhängige Inhibition des Zellwachstums nachgewiesen mit Veränderung der Expression von zellzyklusregulierenden Proteinen, die auf einen G1-Arrest im Zellzyklus hinweisen [Zi et al. 1998].

Die Arbeitsgruppe Seidlová-Wuttke et al. (2003) hat anhand von Rattenversuchen für *SM* eine SERM-Wirkung mit ausschließlicher ER-β-Bindungsspezifität festgestellt. Sie hat im Gegensatz zu Östradiol keine LH-beeinflussende Wirkung auf den Hypothalamus (entspräche ER-α-Funktion), keinen Effekt auf in der Leber produzierte Cholesterintransportproteine HDL und LDL (entspräche ER-α-Funktion), keinen Effekt auf Uterusproliferation (entspräche ebenfalls ER-α-Funktion), wohl aber eine Triglyceridreduzierende Wirkung (fragliche ER-β-Funktion) nachgewiesen. Im Uterus kam es zur Downregulation der C3- und HbGEF-Expression, sodass vermutet werden kann, dass *SM* via ER-β einen antiproliferativen und antiöstrogenen Effekt ausüben könnte. Auf den Knochen kam es unter *SM* zu einem östrogenen, antiosteoporotischen Effekt. Überraschenderweise war dort jedoch kein ER-β nachzuweisen, was dazu veranlasste, entweder das Vorkommen einer ER-β-Splice-Variante oder eines anderen Wirkungsmechanismus anzunehmen, wie beispielsweise über einen fraglichen ER-γ [Seidlová-Wuttke et al. 2003].

I.5. Bedeutung der Östrogenrezeptoren und des Wachstumsfaktors IGF-1 generell und für die Mamma

Generell besteht das funktionelle Mammagewebe aus dem Mammaplastoma, das unter anderem aus Bindegewebe, Fettgewebe und Gefäßnetzwerk besteht, und dem eigentlichen Mammaplastenepithel. Das Epithel kann man in die sekretorischen, luminalen Epithelien und die am Rande der Drüsenstrukturen befindlichen, lumenfernen Myoepithelien und präluminalen Progenitorzellen unterteilen.

Aus der Übersichtsarbeit von Palmieri et al. (2002) und den Ergebnissen aus In-vitro- und Rattenversuchen von Russo et al. (1999) ergibt sich folgende Hypothese zur Karzinomentstehung in der Mamma: im gesunden Zustand sind ER- α positive Zellen nicht zur Proliferation fähig, sondern wirken bei Östrogeneinfluss über Ausschüttung von Wachstumsfaktoren parakrin wachstumstimulierend auf benachbarte ER- α -negative, Ki-67 positive, d.h. zur Proliferation fähige Zellen [Russo et al. 1999]. Dadurch beeinflussen sie Mammawachstum, -entwicklung und duktales Morphogenese. Normalerweise würde unter erhöhten Östrogenkonzentrationen ER- α -positiven Zellen daraufhin ER- α downregulieren. Dies ist in Übereinstimmung mit der gemessenen, niedrigen ER- α - und der erhöhten ER- β -Expression in der natürlichen Phase erhöhter Proliferation während der Schwangerschaft [Palmieri et al. 2002]. Der Unterschied zwischen normaler Zellproliferation und Mammakarzinomwachstum ist, dass hierbei der Zellzyklus trotz unreguliert hoher ER- α -Expression stattfindet. Mit zunehmender duktalem Hyperplasie-Atypie kommt es zur Erhöhung der ER- α -Expression und zu vermehrter Dysregulation der Proliferation im Sinne vermehrten Vorkommens von ER- α - und Ki-67-koexprimierender Zellen [Palmieri et al. 2002]. Dies könnte erklären, warum 60-70% der Mammakarzinome ER- α -positiv sind und ihr Wachstum östrogenabhängig erhöht wird, während nur 6-10% der normalen Mammaepithelzellen ER exprimieren [Parentes-Vieira et al. 2007]. Je mehr die Tumorzellen dysreguliert und undifferenziert werden, desto eher verlieren sie die Fähigkeit, ER zu exprimieren, und es kommt zur Entstehung der ER-negativen Mammakarzinomzellen mit schlechterer Prognose [Palmieri et al. 2002].

Im Zusammenhang mit der ER- α -Expression ist interessant, dass die Arbeitsgruppe Holst et al. (zitiert in Fowler & Alarid 2007) eine ER- α -Überexpression in prä- und kanzerösen im Vergleich zu normal reguliert proliferierenden Mammazellen aufgezeigt haben.

Für die Entwicklung und das Wachstum der Mammaepithelien ist neben dem Vorhandensein von Östrogenen u.a. IGF-1 nötig. IGF-1 wird als lokaler Mediator des Wachstumshormons (GH) vor allem im Mammafettgewebe gebildet und wirkt autokrin auf produzierende Stromazellen und parakrin auf das Epithel der Mammaalveoli [Couse & Korach 1999].

Die Funktion von IGF-1 liegt allgemein in der Regulation von normalem and malignem Zellwachstum, -differenzierung und -entwicklung. Es scheint mitogen, antiapoptotisch, proangiogen zu sein und erhöht die Zellmigration *in vitro* [Renehan et al. 2006].

Es scheinen komplexe Interaktionen zur Proliferationsstimulation von normalen und malignen Mammazellen zwischen Östrogenen und IGF-1 stattzufinden, die noch nicht ganz geklärt

sind. Östrogene scheinen über die ER die Expression von IGF-1- und seinem Rezeptor IGF-1-R-I zu induzieren. IGF-1 scheint durch Bindung seines Rezeptors die Expression von Transkriptionsfaktoren zu regulieren, wie unter anderem die des ER [Martin & Stoica 2002]. IGF-1 scheint die Expression von ER- α zu vermindern und dadurch die Östrogenbindungsstellen und die Östrogenabhängigkeit des Zellwachstums zu reduzieren. Es wurde jedoch bezüglich der ER-Aktivität festgestellt, dass IGF-1 die PR- und pS2- Expression induziert, beides typischerweise durch endogene Östrogene über die ER-regulierte Proteine. Obwohl Östrogene den ER aktivieren, scheint IGF-1 den ER unabhängig von Östrogenen aktivieren zu können [Martin & Stoica 2002].

Weiterhin wurde von mehreren Arbeitsgruppen eine synergetische Wirkung der Kombination von physiologischen Östrogenen und IGF-I auf Expression und Aktivierung von Zellzykluskomponenten, die zum S-Phaseneintritt und damit zu Erhöhung der Proliferationsraten der Mammakarzinomzellen führt, beschrieben [Hamelers & Steenbergh 2003].

Insgesamt scheinen dem IGF-I, IGF-II, IGF-1-Rezeptor und IRS (Insulin Receptor Substrate) im Mammakarzinomwachstum eine kritische Rolle zuzukommen [Hamelers & Steenbergh 2003, Ibrahim & Yee 2005].

Eine Metaanalyse von Renehan et al. (2006) zeigte, dass hohe normale IGF-1-Konzentrationen in prämenopausalen, nicht jedoch in postmenopausalen Frauen mit einem erhöhtem Risiko, sowohl prä- als auch postmenopausal am Mammakarzinom zu erkranken, assoziiert zu sein scheinen [Renehan et al. 2006].

In einigen Studien hat sich in Mammakarzinomen eine verminderte ER- β -Expression gezeigt, sodass ER- β eventuell eine Rolle als Tumorsuppressor durch Modulation der ER- α - Effekte haben könnte [Hall & McDonnell 1999, Weihua et al. 2000].

Bezüglich der ER- α - und ER- β -Interaktion haben Weihua et al. (2000) anhand von Knockout-Mäusen festgestellt, dass der Verlust von ER- β in den Uteri zu erhöhter Empfindlichkeit gegenüber Östrogenen, Verlust der östrogenbedingten Downregulation von PR (dessen Expression über ER- α induziert wird) und erhöhter Ki-67- und IGF-1-Expression führt. Damit kommt es zu vermehrter Zellproliferation und über erhöhte VEGF-Expression zu vermehrter Gefäßpermeabilität und Sekretion. ER- β wäre damit antiproliferativ und moduliere die ER- α -Funktion, indem es ihm entgegengesetzt wirkt. Nach ihrer Hypothese würden die Ovarien präpubertär den Uterus ruhigstellen, indem bei niedrigen Östrogenumgebungskonzentrationen Androstadiol ausgeschüttet wird. Androstadiol wirkt über beide ER, wobei über ER- β die

Wirkung von ER- α unterdrückt wird. Ab der Pubertät steigen die Östrogenkonzentrationen, ER- β wird downreguliert und ER- α wird voll funktionsfähig [Weihua et al. 2000].

Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit denen der In-vitro-Untersuchungen der Arbeitsgruppe Hall et al. (1999). Sie stellten anhand ihrer Ergebnisse eine ähnliche Hypothese der Östrogenrezeptorzusammenarbeit auf:

Unter niedriger Hormonkonzentration bindet ligandenunabhängiges inaktives ER- β an bestimmte DNA-Sequenzen und blockiert kompetitiv die ER- α -Bindung, sodass dessen abhängige Transkription unterdrückt wird. Wenn die Hormonkonzentrationen ansteigen, binden diese an ER- α und ER- β und aktivieren beide, sodass diese mit dem ER- β ohne Liganden an der DNA konkurrieren, ihn verdrängen und so die hormonabhängige Transkription in Gang setzen [Hall & McDonnell 1999].

Es wäre möglich, dass das Zusammenspiel der beiden ER in der Mamma ähnlich ist.

Es liegen zwar kontroverse Ergebnisse bezüglich ER- β vor, doch in einer Übersicht von 2002 schloss Speirs (2002), dass möglicherweise ER- β in der Mamma ebenfalls eine Rolle als Tumorsuppressor haben könnte. ER- β -Protein-Expression in Mammatumoren scheint mit verminderter Aggressivität, niedrigerem Tumorgrad, geringerer S-Phasenfraktion und negativem Lymphknotenstatus assoziiert zu sein [Speirs 2002]. Die widersprüchlichen Ergebnisse in der Literatur ergaben sich aus dem Fehlschluss, dass erhöhte, mit PCR detektierte m-RNA-Expression des Rezeptors gleich zu setzen wäre mit erhöhter Translation in ER- β -Protein [Speirs 2002].

I.6. Ziel der Arbeit

Als seit Jahrzehnten etabliertes Versuchstier wird die Ratte (*Rattus norvegicus*) häufig auch bei Untersuchungen zu endokrinologischen Fragestellungen eingesetzt v.a. für invasivere Untersuchungen der Organe.

Trotz ihres nur vier bis fünf Tage dauernden Zyklus zeigen sich zahlreiche Parallelen zur Physiologie des Menschen. Nach Ovariectomie bilden sich innerhalb weniger Wochen durch Östrogenmangel bedingte Beschwerden heraus, die denen der Frau in der Peri- bzw. Postmenopause weitgehend entsprechen. So dient die ovariectomierte Ratte mittlerweile als Standardmodell für die klimakterische Patientin, wie die zahlreichen Versuche zu diesem Thema beweisen.

Zur Behandlung peri- bzw. postmenopausaler Beschwerden werden häufig HRT verschrieben. Die Angst vor kardiovaskulären Erkrankungen, die zu den häufigsten Ursachen von Behinderungen gehört, und die Angst vor dem Mammakarzinom, welches statistisch gesehen

jede zehnte Frau befällt, hat viele Frauen und die wissenschaftliche Forschung dazu veranlasst, nach alternativen Behandlungsmethoden der perimenopausalen Beschwerden zu suchen.

Viele Medikamente und pflanzliche Produkte werden zunehmend mit oder ohne ärztliches Wissen eingenommen, ohne dass ausreichend Daten über ihre Effektivität, Nebenwirkungs-, Interaktionsprofile und ihre Sicherheit vorliegen. Außerdem sind die vorliegenden Daten wie oben erläutert häufig widersprüchlich.

Zusammengefasst ist die heutige Forschung auf diesem Gebiet mit der Suche nach dem idealen SERM, Phytoöstrogen bzw. Medikament beschäftigt, das östrogenagonistisch auf den Knochen, das Urogenitalsystem und das Gehirn im Sinne einer Prävention und Therapie der Osteoporose, Inkontinenz- und Schleimhautatrophiebeschwerden, Hitzewallungen und der psychischen Komponente der perimenopausalen Beschwerden ist, ohne dabei durch östrogenagonistische Effekte auf Mamma und Uterus ein erhöhtes Risiko für Tumorerkrankungen dieser Organe zu beinhalten.

Unser Versuch am Rattenmodell wurde durchgeführt, um mehr Klarheit über die Wirkungsweisen und Nebenwirkungen verschiedener Substanzen mit bekanntem, kontroverserem oder fraglichem Einfluss auf peri- bzw. postmenopausale Symptome am Menschen zu bringen. In dieser Arbeit sollen die Effekte auf die Rattenmammas untersucht werden.

II Material und Methoden

II.1. Tierexperimente

II.1.1. Versuchstiere und ihre Laborhaltung

156 vier Wochen alte, weibliche Sprague-Dawley-Ratten wurden vom Züchter Harlan Winkelmann bezogen und in der tierexperimentellen Einrichtung des Universitätsklinikums Göttingen in Käfigen (Makrolon®IV) zu je fünf oder sechs Tieren gehalten. Es wurden folgende Standardbedingungen in dem Tierstall aufrechterhalten: 20 °C Lufttemperatur, eine relative Luftfeuchtigkeit von 55% und künstlicher, geregelter Lichteinfluss zwischen 6.00 und 18.00 Uhr. Wasser und Futter *ad libitum*.

Die Tiere bekamen einen subkutan implantierten Sensor zur Identifizierung und wurden randomisiert verschiedenen Futtergruppen zugeordnet.

II.1.2. Ovariectomie

Die beidseitige Ovariectomie erfolgte im Alter von 4 Wochen.

Die Ratten wurden bis zur Bewusstlosigkeit einer Äthernarkose ausgesetzt und dann über eine intraperitoneale Gabe von 11 mg Ketamin (Hostaket®, Hoechst) und 2,5 mg Xylazin (Rompun®, Bayer) pro Tier narkotisiert.

Um die Ovariectomie durchzuführen, wurde das Fell an den beiden Flanken rasiert und nach Desinfektion des Operationsgebietes und Seitenlagerung der Ratte die Peritonealhöhle eröffnet. Das nun erreichbare Ovar wurde mobilisiert und nach außen verlagert.

Die distale Tube mitsamt den Gefäßen wurde nach Zuklemmen mit einer Arterienklemme beidseitig der Klemme mit einem Catgut-Faden zugebunden und inmitten der Legierungen mit einem Skalpell durchtrennt. Das verbleibende Uterushorn wurde zurück in die Bauchhöhle verlagert und die darüber liegende Muskulatur und die Haut einschichtig verschlossen.

Um die Aufwachphase zu verkürzen, wurde der Ratte postoperativ ca. 0,25 mg Atipamezolhydrochlorid (Antisedan®, Pfizer), das entspricht 1mg/kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert.

Es wurden zusätzlich 5 ml isotonische Kochsalzlösung subkutan appliziert, um postoperative Exsikkationszustände zu verhindern.

II.1.3. Futterapplikation

Das Futter, von der Firma Sniff geliefert, bestand aus einer sojaarmen, auf Basis von Kartoffeln und Getreide hergestellten Mischung.

Von der Firma Bionorica wurden folgende Testsubstanzen bereitgestellt und jeder Futtergruppe mit Ausnahme der Ratten-Kontrollgruppe eine Substanz in definierter Menge dem reinen Futter untergemischt:

Futtergruppen-Nr. der weiblichen Ratten	Name der zugefügten Testsubstanz	Konzentration der zugefügten Testsubstanz (mg Substanz/20g Futter)
Gruppe 1	-	-
Gruppe 4	<i>Belamcanda chinensis</i> (BC) 400	133,33
Gruppe 6	<i>Belamcanda chinensis</i> 100	33,33
Gruppe 8	<i>Cimicifuga racemosa</i> (CR)400	133,33
Gruppe 10	<i>Cimicifuga racemosa</i> (CR)100	33,33
Gruppe 12	<i>Silybum marianum</i> (SM)80	33,33
Gruppe 14	<i>Silybum marianum</i> (SM)20	8,33
Gruppe 20	Östradiol (E2)	0,50
Gruppe 21	Raloxifen (Ral)	3,33
Gruppe 23	Soja 172	50,20

Die 156 weiblichen, ovariectomierten Ratten wurden randomisiert, doppelblind den Futtergruppen zugeordnet.

II.1.4. Organentnahme

Die Ratten wurden im Alter von 3 Monaten nach Überführung in die CO₂-Kammer mit einer Guillotine dekapitiert.

Das Blut wurde für weitere Laboruntersuchungen aufgefangen und die Organe Uterus, Mamma, Aorta thoracalis, Aorta abdominalis, Herz, Leber, Femur, Wirbelsäule, Milz, Niere, Nebenniere, Harnblase, Urethra, Vagina, Hypophyse, Gehirn, Kolon, Lungen und Schilddrüse entnommen.

Die Ratte besitzt sechs Milchdrüsen, die in Milchleisten vorliegen. Es gibt bei ihr beidseits eine thorakale und eine inguinale Milchleiste, die jeweils drei Mammae inklusive Mamille enthält.

In diesem Versuch wurde als erstes die Haut der toten Ratte herausgeschnitten und das inguinale Dreieck auf einem Styroporkarton mit Nadeln aufgespannt. Es wurde versucht, den

kaudalen und, falls möglich, auch den mittleren Komplex der inguinalen Milchleiste auf beiden Seiten zu präparieren. Die maximal 5x5x5 mm großen Drüsen mit anhaftendem Fett- und Muskelgewebe wurden ebenso wie die anderen aus der Ratte entnommenen Organe sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bis zur weiteren Verarbeitung bei -70° C gelagert.

Parallel zu den Mammae der Ratten dieses Futtersversuches wurde eine Mamma einer laktierenden Ratte (ohne Futterzusatz) entnommen und nach Protokoll mitverarbeitet um bessere Aussagen bei den histologischen Untersuchungen machen zu können.

II.2. Molekularbiologische Methoden

II.2.1. Übersicht der Materialaufarbeitung für die quantitative Polymeraseketten-Reaktion

Die Taqman®-Technologie wurde zur Amplifikation von Genen, die in der Zelle die Expression von Östrogenrezeptor- α (ER- α), von Östrogenrezeptor- β (ER- β) und vom Peptid Insulin-like-growth-factor-1 (IGF-1) bewirken, angewandt, um einen eventuellen Effekt des zum Teil hormonhaltigen Futters auf die Genexpression festzustellen.

Dazu mussten die Rattenmammaryen zu Anfang zerkleinert werden, dann aus der entstandenen Suspension die RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben werden, bevor diese schließlich für den Taqman®-Lauf eingesetzt wurde. Auf die genaue Verfahrensweise wird in den folgenden Unterkapiteln detaillierter eingegangen.

II.2.2. Aufarbeitung der Rattenmammaryen und die RNA-Isolierung

Da die RNA empfindlich auf Wärme reagiert und schnell durch RNasehaltige Verunreinigungen bzw. durch endogene RNasen abgebaut wird, wurde schnell, möglichst kühl und unter sterilen Bedingungen gearbeitet. Es wurden nur sterile Reaktionsgefäße verwendet oder wiederverwendbare Glasgefäße, die vor Gebrauch bei 240° C für 12 Stunden im Heraeus-Sterilisator behandelt waren. Anstelle von Wasser wurde spezielles RNasefreies Velcorin®-wasser gebraucht. Dazu wurde eine 1:1000 Verdünnung von Velcorin® (= Dimethyldicarbonat = DMDC = E242, Bayer AG) mit bidestilliertem Wasser hergestellt, diese zur Hydrolyse der RNasen mindestens 3 Stunden bei Raumtemperatur stehengelassen und diese Lösung 30 min bei 120° C autoklaviert.

Das bidestillierte Wasser wurde in einer Millipore-Anlage hergestellt.

Die RNA-Isolierungen erfolgten mit Hilfe des RNeasy®-Kits von Qiagen, Hilden. Zur Zerstörung des Gewebezusammenhaltes und der Zellintegrität wurde in jedes Reaktionsgefäß auf das Präparat jeweils 25 µl des Guanidin Thiozyanat- und β-Merkaptoethanol-haltigen Lysispuffer (10 µl β-Merkaptoethanol sind in 1 ml RLT-Puffer enthalten) pipettiert, das durch seine denaturierende Wirkung im Gewebe vorhandene RNasen inaktiviert. Falls noch Haut und Haare an den Geweben hingen, wurden diese mit zwei Pinzetten auf einer kleinen Petrischale (Nunclon® von Delta) unter Erhalt einer möglichst großen Gewebemenge abgezupft. Anschließend wurde das Mammagewebe durch schnelles Hin- und Herbewegen im Reaktionsgefäß zwischen der Spitze einer sterilen Einmalkanüle 100 Sterican® von Braun® und der Gefäßwand mechanisch zerkleinert.

Diese Suspension wurde mit 275 µl Lysispuffer aufgefüllt und zur Homogenisierung der Suspension jeweils zweimal 10 Sekunden mit zwischenzeitlicher Abkühlung auf Crasheis in ein Ultraschallbad (Sonifier® B12 Danberg.Connection cell disruptor, Branson Sonic Power Company) gehalten.

Anschließend wurden diese Suspensionen auf jeweils eine Schreddersäule (QIAshredder Spin Column) pipettiert und in einer amicon-Mikrozentrifuge MC-13 in 2 Minuten bei 12000 Umdrehungen/Minute die groben Gewebestücke aus der Suspension herausgefiltert.

In den darauf folgenden Schritten wurde die RNA selektiv an eine silikonbasierte Membran gebunden, durch Waschschrte von Proteinverunreinigungen befreit und schließlich von der Membran gewaschen. Dazu wurde nach dem Protokoll aus dem Handbuch der Firma Qiagen verfahren.

Das Eluat wurde nach Entnahme von 5 µl für die Konzentrationsmessung am Photometer sofort auf Eis gestellt und dann bei -70°C tiefgefroren.

II.2.3. Reinheits- und Konzentrationsbestimmung der isolierten RNA

Die RNA-Konzentration wurde bei einer Verdünnung von 1:16 in einer Hellma® Präzisionsküvette aus Quarzglas im Eppendorf Bio Photometer gemessen.

Zu jeder Probe wurde entsprechend ihrer Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm, die dem Absorptionsmaximum der Nukleotide entspricht, die Konzentration der Probe in (ng/µl) und ihre Sauberkeit (ausgedrückt durch den Quotienten: Extinktion bei 260 nm/Extinktion bei 280 nm) bestimmt. Es mussten dabei die Proben mit ungünstigem RNA/Proteinratio unter 1,4 bzw. über 2,0 herausgenommen werden, sodass nur 4 bis 8 Tiere pro Behandlungsgruppe verblieben.

Die RNA-Konzentrationen der Proben schwankten stark aufgrund der anfangs unterschiedlichen Größe und Konsistenz der Mammæ. Alle Proben wurden auf eine Konzentration von 5ng/ μ l verdünnt. Dadurch war es möglich, von jeder Probe in den folgenden Arbeitsschritten gleiche Mengen an RNA in cDNA umzuschreiben und so im anschließend stattfindenden Taqman®-Lauf vergleichbare Werte zu haben.

II.2.4. Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase, einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase die RNA-Sequenzabfolge in cDNA (complementary DNA) übersetzt.

Die Reverse Transkription wurde mit dem M-MLV Reverse Transcriptase, Rnase H Minus, Point Mutant-Kit der Firma Promega® vorgenommen.

Dazu wurden 5ng/ μ l-konzentrierte RNA-Probe eingesetzt.

II.2.5. Quantitative Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) mit dem TaqmanTm-PCR Assay (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient der Vermehrung eines definierten DNA-Fragmentes, hier bestimmter Hormonrezeptor-kodierender Sequenzen auf der hergestellten cDNA.

Die PCR läuft während sich wiederholender Temperaturzyklen ab: Zuerst wird das Reaktionsgemisch aus cDNA, spezifischem Primer, Desoxynukleotiden und der thermostabilen Taq-DNA-Polymerase, einem Enzym aus dem thermophilen Bakterium *Thermophilus aquaticus*, auf 90°C erhitzt, damit sich die DNA-Doppelstränge lösen. Dann erfolgt zur Primer-Hybridisierung eine Abkühlung auf ca. 50°C und im dritten Schritt eine Erhitzung auf ca. 70°C zur Synthese des cDNA-DNA-Doppelstranges durch Anlagerung von Nukleotiden mit Hilfe der hitzestabilen Taq-DNA-Polymerase. Diese drei Teilschritte laufen häufig hintereinander ab, sodass die gesuchte cDNA-Sequenz, an die sich der Primer spezifisch anlagert, amplifiziert wird.

Diesem Prinzip unterliegt auch die TaqMan®-PCR, jedoch mit dem Vorteil, dass mit diesem Verfahren während jedes Amplifikationszyklusses ein Lichtstrahl definierter Wellenlänge durch die Proben in einer 96-well-Mikrotiterplatte geschickt wird, und so über ein integriertes Fluoreszenzphotometer zu jeder Probe in jedem Zyklus, jeweils die Mengen an Amplifikat der Hormonrezeptorkodierenden Sequenz, die abhängig ist von der Ausgangskonzentration,

bezogen auf eine Standardkurve, miteinander verglichen werden kann. Um dies zu erreichen, werden fluorogene Sonden eingesetzt, die sich an die cDNA anlagern und zwei Fluoreszenzfarbstoffe enthalten, den „Quencher“, ein Rhodamin-Derivat, und den „Reporter“, ein Fluoreszein-Derivat. Bei ausreichender Nähe zueinander, das heißt bei intakter Sonde, wird die Energie, die der „Reporter“ bei Anregung durch den Lichtstrahl erhält, nicht als Fluoreszenz abgestrahlt, sondern durch den „Quencher“ durch einen Fluoreszenz-Energie-Transfer unterdrückt. Wird die Sonde jedoch durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq-DNA-Polymerase während der Doppelstrangsynthese zerstört, so wird der Fluoreszenz-Energie-Transfer unterbrochen, die aufgenommene Energie wird vom „Reporter“ als Licht emittiert und kann vom Photometer gemessen. Der ABI PRISM 7700 Sequence Detector des Taqman erstellt aus den Messdaten eine exponentielle Kurve der Licht-Signalintensität in Abhängigkeit von der Zykluszahl und berechnet den Schwellenwert $C_t =$ Crossing point, der Zyklusanzahl, bei der die Amplifikatmenge in die exponentielle Vermehrung übergeht. Durch diese C_t -Werte werden die Proben, die in einem Taqman®-Lauf pipettiert wurden, miteinander relativ vergleichbar; die Menge an entsprechendem Hormonrezeptor war niedriger, wenn der C_t -Wert der Probe größer war, also, wenn die exponentielle Amplifikation der Sequenz erst nach mehreren PCR-Zyklen eingetreten ist, was bedeutet, dass wenig der entsprechenden RNA in der Mamma-Probe enthalten war.

Eine Standardkurve in Doppelbestimmung wurde bei jeder Messung eingesetzt und zusammen mit den cDNA-Proben in die 96 Well Multiply-PCR Platte (MicroAmp® Optical 96-Well reaction plate, PE Applied Biosystems, Sarstedt, Weiterstadt) pipettiert.

Die kalkulierten C_t -Werte wurden mit Word Excel prozentrelativiert und Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet. Mit dem Prism Programm wurden sie mit dem Dunnett's Multipel Vergleichstest auf Signifikanz getestet.

II.3. Histologische Methoden

II.3.1. Vorbereitung der Mammae zur histologischen Weiterverarbeitung

II.3.1.1. Fixieren der Mammae

Um die Mammae für die histologische Aufbereitung und Aufbewahrung zu konservieren und zu verhärten, wurden sie fixiert. Dazu wurden die in Reaktionsgefäßen bei -70°C aufbewahrten Mammae auf Eis vorsichtig aufgetaut, unter einem Abzug zu jeder Probe $250\mu\text{l}$

4%-iges, in Phosphatpuffer gepuffertes Paraformaldehyd hinzugefügt und eine halbe Stunde in der Fixierung belassen. Schließlich wurden die Präparate durch Spülen in warmem Wasser von überflüssigem Paraformaldehyd befreit.

II.3.1.2. Entwässern und Einbetten der Präparate

Zur weiteren Fixierung, Entwässerung und Durchtränkung mit Paraffin wurde der programmierte LEICA TP1020-Gewebeinfiltrationsautomat verwendet. Dabei wurden die Präparate über eine langsam aufsteigende Äthanolreihe entwässert, damit die weniger festen Strukturen im Präparat nicht durch Konzentrationsausgleichsströme zerstört wurden. Über eine Xyoldurchtränkung als „Intermedium“ zwischen dem hydrophilen Alkohol und dem lipophilen Paraffin wurden die Präparate schließlich in heißes, flüssiges Paraffin überführt.

Mithilfe der Leica EG1140 H Paraffinausgießstation wurden schneidbare Paraffinblöcke der Präparate hergestellt und bis zum Schneiden bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

II.3.1.3. Schneiden der Paraffinblöcke

5µm dicke Schnittserien wurden mit einem Rotationsmikrotom (Leica RM2135) hergestellt. Das Präparat musste möglichst gerade in den Probenhalter eingespannt werden.

Es wurden positiv geladene, geputzte und geschliffene Objektträger (SuperFrost®Plus von Menzel-Gläser®) benutzt.

Die entstandenen Schnittserien wurden vorsichtig mit einer weiteren Klinge manuell voneinander getrennt. Jeder einzelne Schnitt wurde der Reihenfolge nach durch mit Velcorin®wasser angefeuchtete Pinsel auf einen vorbereiteten Objektträger übertragen. Meist glätteten sich die Schnitte durch die Oberflächenspannung des Wassers von selbst, zum Teil musste vorsichtig mit den Pinseln nachgeholfen werden.

Die Objektträger wurden einige Stunden auf einer maximal 37 °C warmen Wärmeplatte (Präzitherm, electronic) im Liegen getrocknet und dann stehend in einem Präparatekasten mindestens zwei Tage bei 37 °C im Brutschrank (Heraeus) getrocknet, bevor sie problemlos bei Raumtemperatur im Präparatekasten bis zur Weiterverarbeitung aufbewahrt werden konnten.

II.3.2. Hämatoxylin-/Eosinfärbung

Die Hämatoxylin/ Hämalaun- Eosinfärbung diente der Beurteilung der Morphologie der Rattenmammas. Dies bewirkt eine intensiv blaue Färbung der Zellkerne durch den

natürlichen Farbstoff Hämatoxylin aus dem ätherischen Extrakt des Blauholzes (*Haematoxylon campechianum*) und eine Rotfärbung des Zellzytoplasmas durch das Eosin.

II.3.3. Beurteilung der Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Präparate

Untersucht wurden die Mammae von drei Tieren pro Behandlungsgruppe, wovon drei Schnitte pro Tier mit der H/E-Färbung für die folgende Untersuchung gefärbt wurden. Dabei wurden drei Schnitte aus unterschiedlicher Tiefe verwendet, nämlich jeweils der erste, der 14. und der 25. Schnitt der Schnittbänder eines Paraffinblockes.

Die Präparate wurden mit dem Leica-Mikroskop bei 62,5-facher und 250-facher Vergrößerung angesehen, und mit einer am Mikroskop angeschlossenen digitalen Kamera Colorview 12 und dem analySIS-Programm (SIS Imaging System GmbH) ausgewertet.

Für die Auswertung eventueller Veränderungen im Mammagewebe unter dem Hormoneinfluss wurden übersichtlichshalber folgende Kriterien berücksichtigt und nach dem folgenden Schema mit Kreuzen dargestellt:

Fettgewebe des Gesamtpräparates in %, bei 62,5x Vergrößerung betrachtet:

- kein Fettgewebe vorhanden
- + < 12,5% des Präparates
- ++ zwischen 12,5% und 25% des Präparates
- +++ > 25% des Präparates

Auszählung der Gefäße in dem am besten vaskularisierten Areal unter 250x Vergrößerung:

- keine Gefäße sichtbar
- + 1-10 Gefäße pro Gesichtsfeld
- ++ 11-20 Gefäße pro Gesichtsfeld
- +++ >21 Gefäße pro Gesichtsfeld

Einteilung der Drüsendichte durch Abzählen der Drüsenalveoli in geringem Bindegewebe oder im Fettgewebe in der am dichtest bestückten Region bei 250-facher Vergrößerung:

- keine Drüsenalveoli in der gesamten Mamma
- + < 4 Drüsenalveoli pro Gesichtsfeld
- ++ 5-9 Drüsenalveoli pro Gesichtsfeld
- +++ 10-15 Drüsenalveoli pro Gesichtsfeld
- ++++ 16-30 Drüsenalveoli pro Gesichtsfeld
- +++++ > 30 Drüsenalveoli pro Gesichtsfeld

Beurteilung des Sekretes sowohl der eben ausgezählten Drüsenalveoli als auch des Sekretes der großen Drüsengänge im dichten Bindegewebe bei 250x Vergrößerung:

- kein Sekret im Endbudlumen
- + helles/weißes Sekret
- ++ rotes Sekret im Lumen

Klassifikation der Zellkerne der Drüsenalveoli, aber auch der Zellkerne, die die großen Drüsengänge umrahmen (bei 250x Vergrößerung):

1. Form der Zellkerne

- platt
- kubisch
- zylindrisch

2. Anzahl der Zellkernschichten bzw. -reihen

Auszählen der Zahl großer Drüsengänge im dichten Mammastroma des gesamten Präparates bei 62,5facher Vergrößerung.

Nach diesem entworfenen Klassifikationsschema wurden die nach dem obigen Konzept ausgewerteten HE-Schnitte (jeweils der erste, 14. und 25. Schnitt von je drei pro Behandlungsgruppe zufällig ausgewählten Rattenmammas) eingeteilt.

Um die Ergebnisse mit Word Excel und PRISM statistisch auswerten zu können, musste die Klassifikation mit den Kreuzen umgestaltet werden.

Dazu wurde für die Untersuchung auf den Fettanteil aus den Prozentzahlen der drei Schnitte pro Tier der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Ebenso wurde ein Mittelwert und eine Standardabweichung aus den drei Mittelwerten jedes der drei pro Behandlungsgruppe histologisch untersuchten Tiere bestimmt. Die berechneten Werte wurden auf die Werte der Kontrollgruppe bezogen prozentrelativiert und mit dem PRISM® 2.01 (Fa. GRAPHPAD, San Diego)-Programm in Form von Boxplots dargestellt.

Bei der Auswertung der Gefäßanzahl in den einzelnen Präparaten oder Behandlungsgruppen wurde die Überlegung angestellt, dass die Mitte der Zahlenspanne, die einem “+” entspricht, die Anzahl von 6 Gefäßen ist, damit es möglich ist, von der Darstellung mit den “+” über einen Dreisatz die Anzahl Gefäße zu errechnen. Zur statistischen Auswertung wurden wieder aus den drei Schnitten pro Tier der Mittelwert an “+” und die Standardabweichung berechnet. Ein Rechenbeispiel zur Verdeutlichung: Kontrolltiermamma 307 hat in der Klassifikation im

1. Schnitt des Schnittbandes: +++

14. Schnitt: ++ und im

25. Schnitt: ++ -> Mittelwert: $7/3 = 2,33$ „+“;

bei der Kontrolltiermamma 308 ergab sich als Mittelwert: 2 „+“,

bei Kontrolltiermamma 309 ergab sich ebenfalls ein Mittelwert von 2 „+“, aus diesen drei Mittelwerten pro Tier wurde ein Mittelwert und eine Standardabweichung aus den drei Mittelwerten jedes der drei pro Behandlungsgruppe untersuchten Tiere bestimmt, diese bezogen auf die Werte der Kontrollgruppe prozentrelativiert und mit dem PRISM® 2.01 (Fa. GRAPHPAD, San Diego)-Programm in Form von Boxplots dargestellt.

Zur statistischen Auswertung der Anzahl großer Drüsengänge im Präparat wurden nach dem oben beschriebenen Methode aus der gezählten Anzahl großer Drüsengänge pro Präparat ein Mittelwert aus den Schnitten pro Tier und aus den drei Mittelwerten jeder Behandlungsgruppe ein Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Die Ergebnisse wurden prozentrelativiert auf die Kontrollgruppe und mit den Boxplots des PRISM-Programms dargestellt.

Für die Auswertung der kleinen Drüsenalveoli wurden die Rohdaten verwendet, d.h. die genau ausgezählte Anzahl Drüsenalveoli. Mittelwerte und Standardabweichungen wurden wie oben beschrieben berechnet und in Form von Boxplots dargestellt.

II.3.4. Immunhistologische Bestimmungen

II.3.4.1. Immunhistologische Detektion von Zytokeratinen des Epithels mittels der PAP-Methode

Die Untersuchung auf diese Marker epithelialer Strukturen wurde vorgenommen, um die in H/E-gefärbten Präparaten häufig schwierige Unterscheidung zwischen Drüsenepithel und Gefäßen in manchen Gewebearealen zu ergänzen. Durch den Nachweis von Zytokeratinen in fraglichen Strukturen konnten diese als epithelartig, d.h. als Drüse klassifiziert werden, bzw. durch ihr Fehlen die Strukturen als Gefäßendothel differenziert werden.

Das Protokoll, nach dem die Färbungen vorgenommen worden sind, ist im Anhang beigefügt. Die Zytokine wurden mit der indirekten Färbemethode der PAP-Technik (Peroxidase-Antiperoxidase) auf den histologischen Präparaten nachgewiesen. Es wurden dazu drei verschiedene Antikörper-Lösungen verwandt: ein polyklonaler Primäantikörper, ein Sekundär- oder auch Brückenantikörper (link antibody genannt) und der Peroxidase-Antiperoxidase(PAP)-Komplex. Als Primäantikörper wurde der polyklonale Antikörper Cytokeratin, Wide Spectrum Screening (DAKO Z 0622) verwendet.

Die polyklonale Primäantikörper-Lösung besteht aus einer Mischung von Antikörpern, die von verschiedenen B-Lymphozyten gegen unterschiedliche Epitope des jeweils

nachzuweisenden Rezeptors gebildet wurden. Sie wurde aus dem gepoolten Serum von Kaninchen hergestellt, die gegen das jeweilige Rattenantigen sensibilisiert wurden.

Der Brückenantikörper reagiert mit Kaninchenantigenen und ist für unseren Versuch im Schwein hergestellt worden (Schwein-Antikaninchen-Antikörper). Er verbindet durch Anlagerung eines seiner beiden Fab(fragment antigen binding)-Regionen an den ersten Antikörper und seines zweiten Fab-Teils an das Fc(fragment crystalline)-Areal (den konstanten Anteil des zum PAP-Komplex gehörenden Kaninchenantikörpers) den antigenbindenden Antikörper mit dem PAP-Komplex.

Der PAP-Komplex besteht aus drei Peroxidase-molekülen und zwei Antikörpern gegen dieses Enzym, die im Kaninchen durch Sensibilisierung gegen Peroxidase aus Meerrettich (HRP=horseradish peroxidase) hergestellt wurden. Die Antikörper binden mit ihren Fab-Anteilen die Epitope der Peroxidasen derart, dass die Peroxidase in diesem löslichen Enzym-Immunkomplex von beiden Antikörpern umgeben ist.

Alle verwendeten Antikörper wurden von der Firma DAKO hergestellt.

Durch anschließende Zugabe eines Chromogens, das bei Reaktion mit dem Enzym Peroxidase einen Farbstoff ergibt, wurden das Vorhandensein und die Lokalisation der Rezeptoren bzw. des Peptids nachgewiesen.

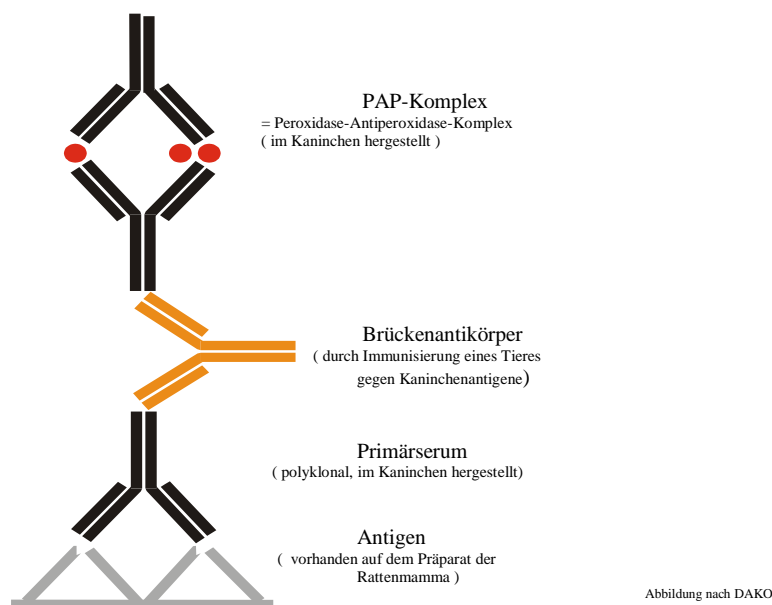


Abb.1: Prinzip der Immunhistochemie mit Östrogenrezeptor-alpha, Östrogenrezeptor-beta, IGF-1 und Zytokeratin: PAP-Färbemethode

Durchgeführt wurden die Färbungen folgendermaßen:

Für jedes zu färbende Präparat wurden zwei beim Schneiden aufeinander folgende Objekte genommen, eines als Negativkontrolle, um Färbungen von Schmutzartefakten zu unterscheiden, das andere für die Färbung auf Zytokine.

Nach Entparaffinierung und Rehydrierung wurden die Präparate nach dem Protokoll im Anhang der Arbeit mit den von der gebundenen Peroxidase des PAP-Komplexes umgesetzten Chromogensubstrate AEC bzw. DAB gefärbt. Anschließend wurde mit Hämatoxylin gegengefärbt.

II.3.4.2. Immunhistologische Detektion des Proliferationsmarker Ki-67 gegen das MIB-5-Antigen der Ratte mittels der APAAP-Methode

Eine weitere von mir verwendete indirekte immunhistologische Färbemethode zum Nachweis des Proliferationsmarkers Ki-67 auf dem Präparat ist die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase). Hierbei ist das das Farbsubstrat umsetzende Enzym eine alkalische Phosphatase, die aus dem Darm von Kälbern gewonnen wird und in einen Immunkomplex eingebaut wurde. Sie hat gegenüber der PAP-Methode den großen Vorteil, dass es keine Hintergrundfärbung durch die endogene Peroxidase gibt und die endogene alkalische Phosphatase aus einigen Leukozyten einfach durch Zugabe von Levamisol gehemmt werden kann. Das Prinzip ist dabei dem der PAP-Methode sehr ähnlich. Der monoklonale Primärantikörper (DAKO M 7248), der durch Sensibilisierung einer Maus gegen dieses Rattenantigen hergestellt wurde, wird ebenfalls über einen Brückenantikörper mit dem APAAP-Antikörper verbunden. Der APAAP-Antikörper besteht aus einem Antikörper, der mit seinen beiden Fab-Regionen je zwei Moleküle alkalische Phosphatase bindet, die über eine Farbreaktion die Lokalisation des Ki67-Antigens im Gewebe sichtbar machen.

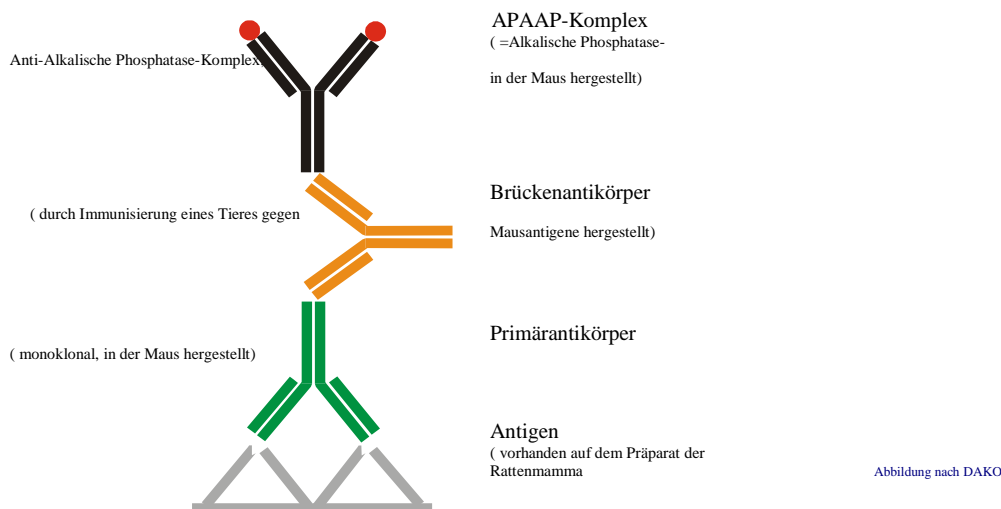


Abb.2: Prinzip der Immunhistochemie mit dem Proliferationsmarker Ki-67: APAAP-Färbemethode

II.3.4.3. Immunhistologische Detektion des Proliferationsmarker Ki-67 gegen das MIB-5-

Antigen der Ratte mittels des DAKO EnVision™-2-Schritt-Detektionssystems

Beim EnVision-Detektionssystem wird auf den Primärantikörper, d.h. auf den Antikörper gegen das Ki-67-Antigen, ein Dextranpolymer gegeben, das außer gebundenen Antikörpern gegen den Primärantikörper auch mehrere Chromogen-umsetzende Enzyme enthält.

Diese Methode hat den Vorteil, dass die Nachweisempfindlichkeit durch Verstärkung des Signals erhöht und durch die Zwei-Schritt-Technik der Versuchsaufbau verkürzt wird.

II.3.4.4. Auswertung der immunhistologischen Färbungen des Proliferationsfaktors Ki-67

Zur Feststellung von Anzeichen von Proliferation wurden die Präparate der Placebo-, Östradiol- und Raloxifenbehandelte Tiere auf das Vorhandensein des Proliferationsfaktors Ki-67 untersucht. Es wurde außerdem als Positivversuch im gleichen Färbevorgang das Präparat einer laktierenden Mamma mitgefärbt. Zur Auswertung der Präparate wurde nach Aufsuchen von vier verschiedenen Regionen auf dem jeweiligen Mammapräparat mit den höchsten Drüsendichten bei 500x Vergrößerung die Anzahl der Ki-67 positiven Zellen bezogen auf die Anzahl der sichtbaren Drüsenendbuds bestimmt. Aus den vier Quotienten der Ki-67 positiven Zellen zur Anzahl Drüsenendbuds pro Präparat wurden der Mittelwert und die Standardabweichung bestimmt. Die Ergebnisse wurden prozentrelativiert auf die Kontrollgruppe und mit den Boxplots des PRISM-Programms dargestellt.

II.4. Statistische Methoden

Mit den Ergebnissen der PCR-Untersuchungen, der histologischen Färbungen und der immunhistologischen Färbungen auf Ki-67 wurden mit dem Microsoft Word Excel Programm die Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Sie wurden sie prozentrelativiert auf die Kontrollgruppe und mit Student T-Tests im Word Excel Programm und Dunnett's Multipel Vergleichstests im PRISM Programm auf Signifikanz getestet und in Form von Boxplots dargestellt.

III Ergebnisse

III.1. Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf das Rattengewicht

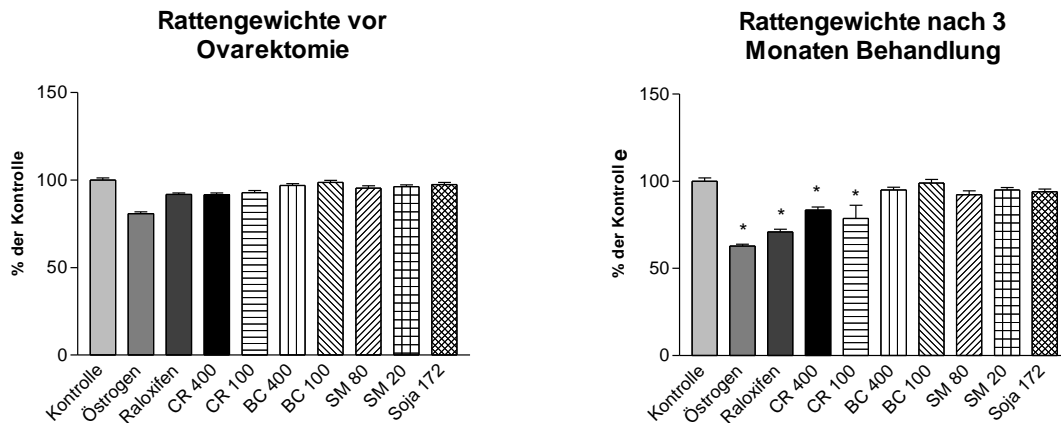


Abb.3: Messung der Körpergewichte der Ratten aus den verschiedenen Behandlungsgruppen direkt vor der Ovariectomie im Alter von 4 Wochen (es lag noch keine Behandlung mit den dem Futter zugemischten Substanzen vor) und nach 3 Monaten der Aufnahme des spezifischen Futters
Der Mittelwert und der SEM jeder Behandlungsgruppe wurden bestimmt und die Werte prozentrelativiert auf die Kontrollgruppe dargestellt. *: $p < 0,001$

Vor dem Beginn der Behandlung der Ratten mit den verschiedenen Substanzen, also nach zufälliger Verteilung der Ratten auf die verschiedenen Futtergruppen war das Gewicht der Ratten, die in ihrem Futter 17β -Östradiol (in der Abb. „Östrogen“ genannt) zu sich nehmen werden ($81\pm 4\%$) leicht, jedoch insignifikant im Vergleich zu den Tieren, denen nach der Ovariectomie Placebo zum Futter zugegeben wird ($100\pm 4\%$) vermindert. Insgesamt schwankte das Körpergewicht der 4 Wochen alten Ratten zwischen 117g und 257g.

Im Anschluss an die Ovariectomie erhielten die Ratten das entsprechende Futter und nach weiteren 3 Monaten der Therapie wurde ihr Gewicht erneut bestimmt. Dabei zeigte sich, dass das Gewicht der Ratten unter 17β -Östradioltherapie ($63\pm 4\%$) am stärksten, jedoch in geringerem Maße auch unter Raloxifen- ($71\pm 5\%$), *Cimicifuga racemosa* in höherer ($83\pm 6\%$) und in niedriger Konzentration ($76\pm 26\%$) im Vergleich zur Placebobehandlung ($100\pm 7\%$) signifikant vermindert war.

III.2 Molekularbiologische Ergebnisse

III.2.1. Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER- α in der Mamma

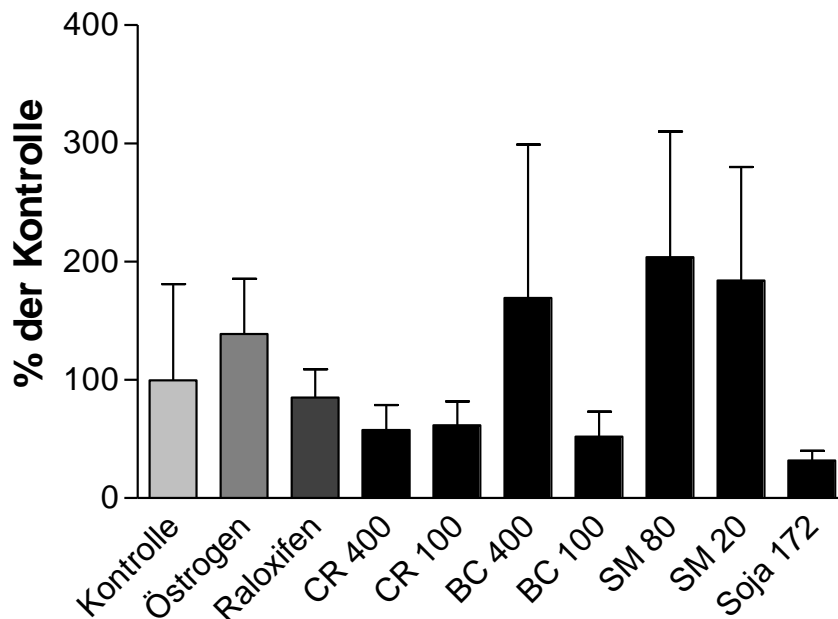


Abb.4: Darstellung des Einflusses 3-monatiger Behandlung mit dem Futter zugefügten Substanzen auf die Genexpression von ER- α in den Rattenmammar. Es handelt sich um prozentrelativierte Mittelwerte und SEM bezogen auf die Expression in den Kontrolltieren, d.h. dem Mittelwert der Genexpression in den Mammar von Ratten, denen nach Ovariectomie keine zusätzlichen Substanzen zum Futter zugefügt wurden

In der Abbildung ist der Einfluss der dem Futter über 3 Monate zugefügten Substanzen auf die Genexpression von ER- α dargestellt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Placebo, 17 β -Östradiol (hier „Östrogen“ benannt), Raloxifen, *Cimicifuga racemosa* in höherer Konzentration (CR 400 entspricht 133,33 mg/20g Futter), *Cimicifuga racemosa* in niedriger Konzentration (CR 100 entspricht 33,33 mg/20g Futter), *Belamcanda chinensis* in höherer Konzentration (BC 400 entspricht 133,33 mg/20g Futter), *Belamcanda chinensis* in niedriger Konzentration (BC 100 entspricht 33,33 mg/20g Futter), *Silybum marianum* in höherer Konzentration (SM 80 entspricht 26,67mg/20g Futter), *Silybum marianum* in niedriger Konzentration (SM 20 entspricht 26,67mg/20g Futter) und Soja 172 (entspricht einer Konzentration von 50,20 mg Soja/20g Futter).

In den Mammæ der 17 β -Östradiolbehandelten Ratten (139 \pm 132%) ist die ER- α -Genexpression, ebenso wie in den Ratten unter *Belamcanda chinensis* in höherer Konzentration(170 \pm 259%) und in den Ratten unter *Silybum marianum* in höherer(204 \pm 237%) und niedriger(184 \pm 234,8%) Konzentration verglichen zu der Genexpression in den placebobehandelten Ratten (100 \pm 162,3%) angestiegen, wobei sich keiner der Anstiege als signifikant erweist. In den Behandlungsgruppen Raloxifen(85 \pm 48%), *Cimicifuga racemosa* in höherer (58 \pm 37%) und niedriger (62 \pm 49%) Konzentration, *Belamcanda chinensis* in niedriger Konzentration(52 \pm 50%) und in den sojabehandelten(32 \pm 19%) Tieren ist die Genexpression im Vergleich zur Kontrolle vermindert, es kommt jedoch ebenfalls zu keinem signifikanten Unterschied.

III.2.2. Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER- β in der Mamma

Bei den dem Rattenfutter zugefügten Substanzen handelt es sich ebenfalls um Placebo, 17 β -Östradiol (hier„Östrogen“ benannt), Raloxifen, *Cimicifuga racemosa* in höherer Konzentration (CR 400 entspricht 133,33 mg/20g Futter), *Cimicifuga racemosa* in niedriger Konzentration (CR 100 entspricht 33,33 mg/20g Futter), *Belamcanda chinensis* in höherer Konzentration (BC 400 entspricht 133,33 mg/20g Futter), *Belamcanda chinensis* in niedriger Konzentration (BC 100 entspricht 33,33 mg/20g Futter), *Silybum marianum* in höherer Konzentration (SM 80 entspricht 26,67mg/20g Futter), *Silybum marianum* in niedriger Konzentration (SM 80 entspricht 26,67mg/20g Futter) und Soja 172 (entspricht einer Konzentration von 50,20 mg Soja/20g Futter).

In der Untersuchung der Rattenmamæ auf die Genexpression der Östrogenrezeptors ER- β stellte sich heraus, dass sich in 2/4 bis 6/6 Rattenmamæ von maximal 8 Rattenmamæ pro Behandlungsgruppe nach 40 Zyklen noch keine exponentielle Vermehrung von ER- β cDNA-Fragmenten zeigte.

III.2.3. Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression des Wachstumsfaktors IGF-1 in der Mamma

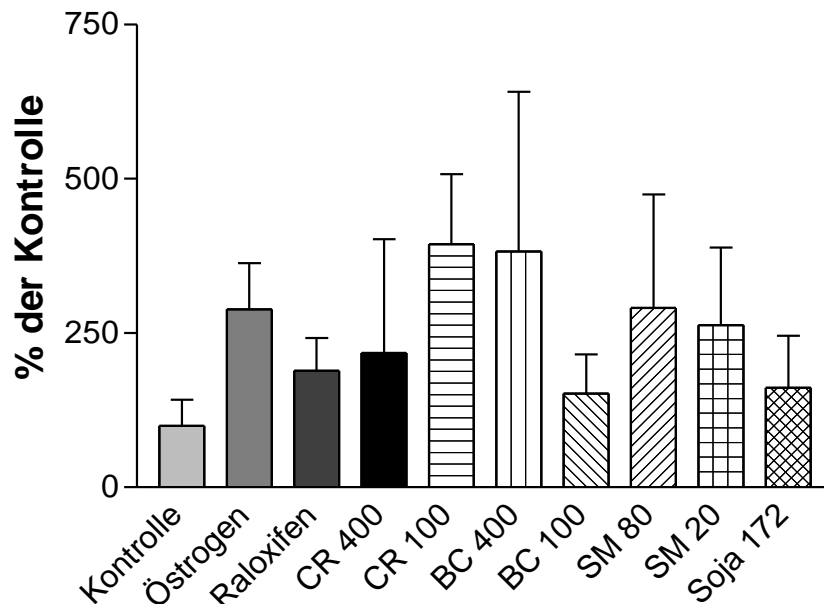


Abb.5: Darstellung des Einflusses 3-monatiger Behandlung mit den dem Futter zugefügten Substanzen auf die Genexpression des Wachstumsfaktors IGF-1 in den Rattenmammas. Es handelt sich um prozentrelativierte Mittelwerte und SEM bezogen auf die Expression in den Kontrolltieren.

Die Genexpression des Wachstumsfaktors IGF-1 in den Rattenmammas hat verglichen mit der Kontrolle (100±85%) unter dem Einfluss der dem Futter zugefügten Substanzen bei allen Behandlungsgruppen zugenommen, wobei keine der Expressionszunahme signifikant ist. Die größten Anstiege der Genexpression liegen bei den Behandlungsgruppen mit 17β-Östradiol (288±212%), *Cimicifuga racemosa* in niedriger Konzentration (393±302%), *Belamcanda chinensis* in höherer Konzentration (382±517%) und *Silybum marianum* in höherer Konzentration (291±411%) vor.

III.3 Ergebnisse der histomorphologischen Untersuchungen

III.3.1 Immunhistologischer Nachweis von Zytokeratinen

Zur Untersuchung der Rattenmammas auf Einflüsse durch die dem Futter zugegebenen Substanzen mussten die wichtigen histologischen Strukturen der Mammas erarbeitet werden, auf die Effekte auftreten können. Da häufig die Differenzierung zwischen Drüsen und (Blut- und Lymph-)Gefäßendothel nur anhand der H/E-Färbungen oft nicht möglich war, musste an fraglichen Präparaten eine immunhistologische Färbung auf Zytokeratine gemacht werden. Der verwendete Primärantikörper bindet sich außer an Drüsenepithel ebenfalls an myoepitheliale Zellen der Drüsenalveoli, an Adenokarzinome der Mamma und an alle epidermalen Schichten der Haut. Durch den Nachweis von Zytokeratinen in fraglichen, lumenhaltigen Strukturen konnte diese als Drüse gewertet und so in die Zählung der Drüsen mit aufgenommen werden.

III.3.2 Auswertung der histologischen Ergebnisse

In den Mammapräparaten stellen sich als wesentliche Strukturen Fettgewebe mit Adipozyten, verschieden dichtes Bindegewebe, konfluierende, große Drüsengänge hauptsächlich im dichten Bindegewebe, kleine Drüsenalveoli, die in unterschiedlicher Dichte, vor allem im Fettgewebe zu finden sind, glatte und quergestreifte Muskelzellen, Lymph- und Blutgefäße sowohl im dichten Bindegewebe als auch in schmalen Bindegewebsstraßen im Fettgewebe, mehrschichtig verhornendes Plattenepithel der Haut und Haare mit Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen dar. Makroskopisch und in der Übersichtsmikroskopie der Präparate war kein auffälliger Unterschied im übermäßigen Vorkommen bestimmter Strukturen oder im Sinne einer stattgefundenen Proliferation einer Struktur zwischen den Behandlungsgruppen feststellbar, nicht einmal an den Mammas der beiden Extreme, der placebobehandelten und östrogenbehandelten Tiere.

Aus diesem Grund mussten die einzelnen Strukturen, wie es unter Material und Methoden beschrieben ist, nach festgelegten Kriterien ausgezählt werden, um einen Vergleich der Behandlungsgruppen zu standardisieren. Es fanden dabei der Anteil des Fettgewebes, die Anzahl Gefäße, die Anzahl der großen Drüsengänge, die Anzahl der kleinen Drüsenalveoli die Form und Schichtig- bzw. Reihigkeit der Drüsenzellen und das Vorhandensein oder die Abwesenheit von Sekret in den Drüsen Eingang in die Betrachtung.

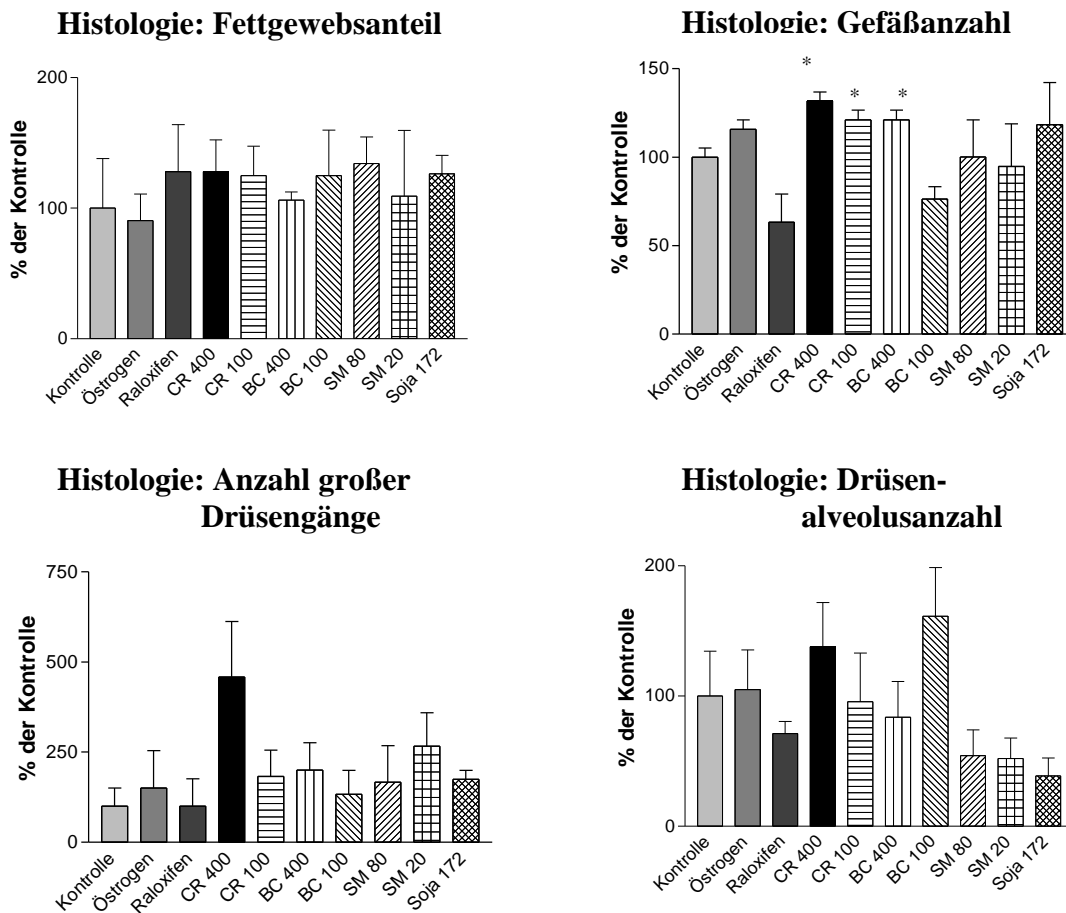


Abb.6: Ergebnisse der Auszählung 1. des prozentualen Anteiles des Fettgewebes am Mammagewebe bei 62,5x Vergrößerung, 2. der Anzahl Gefäße an der gefäßdichtesten Stelle des jeweiligen Präparates bei 62,5x Vergrößerung aufgesucht und bei 250x Vergrößerung ausgezählt, 3. der Anzahl der großen Drüsengänge im gesamten Mammapräparat und 4. die Anzahl der Drüsenalveoli bei 250x Vergrößerung an dem drüsendichtesten Areal ausgezählt
Es werden die Mittelwerte und SEM prozentrelativiert auf die placebobehandelte Gruppe (Kontrolle) dargestellt. * : $p < 0,05$

Der Fettanteil am Präparat ist bei den 17 β -Östradiolbehandelten Tieren(90,45 \pm 35%) (hier „Östrogen“ benannt) im Vergleich zur placebobehandelten Kontrolle(100 \pm 66%) nicht signifikant vermindert. Bei den anderen Behandlungsgruppen ist der Fettanteil am Gewebe bezogen auf die Kontrolle insignifikant vermehrt: Raloxifen (128 \pm 62%), *Cimicifuga racemosa* in höherer Konzentration (128 \pm 42%), CR in niedriger Konzentration (125 \pm 39%), *Belamcanda chinensis* in höherer Konzentration (106 \pm 11%), BC in niedriger Konzentration (125 \pm 60%), *Silybum marianum* in höherer Konzentration (134 \pm 35%) und niedriger Konzentration (109 \pm 87%) und Soja (126 \pm 20%). Der Anteil des Fettgewebes schwankt dabei

zwischen den Behandlungsgruppen zwischen 10 und 15 % des Gesamtpräparates, wenn die Mittelwerte der Rohdaten betrachtet werden.

Die Gefäßanzahlen der Behandlungsgruppen *Cimicifuga racemosa*- in höherer (132±9%) und niedriger (121±9%) Konzentration und *Belamcanda chinensis*- (121±9%) in höherer Konzentration waren signifikant gegenüber der Kontrolle erhöht. Eine insignifikant größere Gefäßdichte findet sich unter 17β-Östradiolbehandlung (116±9%) (hier „Östrogen“ benannt) und unter Sojabehandlung (118±24%). Die Gefäßanzahl der Behandlungsgruppen Raloxifen (63±27%), *Belamcanda chinensis* in niedriger Konzentration (76±12%) sind stark, jedoch insignifikant und leicht ebenfalls *Silybum marianum* in niedriger Konzentration (95±42%) im Vergleich mit der Kontrolle (100±9%) vermindert. Unter Betrachtung der Rohdaten entsprechen diesen Werten Schwankungen in der Gefäßanzahl von 1 und 25 Gefäßen pro Gesichtsfeld.

Wie in der Abbildung dargestellt, ist die Anzahl der großen Drüsengänge im Vergleich zur Kontrolle (100±87%) unter Einfluss aller dem Futter zugefügten Substanzen insignifikant vermehrt. Die größte Anzahl Drüsengänge liegt in der Behandlungsgruppe mit *Cimicifuga racemosa* in höherer Konzentration (458±267%) und in der Behandlungsgruppe mit *Silybum marianum* SM20 (266±161%) vor. Den prozentrelativierten Werten entsprechen in Rohdaten Schwankungen in der Anzahl großer Drüsengänge zwischen keinem bis 6 Drüsengängen.

Die Drüsenalveolidichte ist im Vergleich zur Kontrolle (100±49%) unter Raloxifen-Behandlung (105±53%), *Silybum marianum* in höherer (54±34%) und niedriger Konzentration (52±27%) und unter Sojabehandlung (38±20%) insignifikant vermindert, während sie vor allem unter *Cimicifuga racemosa* in höherer (138±59%) und unter *Belamcanda chinensis* in niedriger Konzentration (161±65%) insignifikant vermehrt ist. Dies entspricht in Rohdaten einer Variabilität von einem bis 50 Drüsenalveoli pro Gesichtsfeld. Im Vergleich dazu liegt die Drüsenalveolidichte bei einer laktierenden Rattenmamme (hier nicht graphisch dargestellt) zwischen 70 und 85 pro Gesichtsfeld.

Bei der Betrachtung eines Sekretes im Lumen der großen Drüsengänge und der kleinen Drüsenalveoli fällt auf, dass keine Häufung im Vorhandensein oder Fehlen bzw. der Farbe des Sekretes (hell oder rot) in einer der Behandlungsgruppen vorliegt. Was die Form der Lumen der Drüsengänge bzw. Drüsenalveoli betrifft, waren die Epithelzellen bei der Kontrollgruppe häufiger kubisch und ein-bis zweischichtig, bei den Mammeae der 17β-Östradiolbehandelten Tiere in der Mehrzahl zylindrisch und ein- bis zweischichtig bzw.-reihig und bei den raloxifenbehandelten Tieren sowohl kubisch als auch zylindrisch ein- bis zweischichtig.

III.3.3. Auswertung der immunhistologischen Färbungen auf den Proliferationsfaktor Ki-67

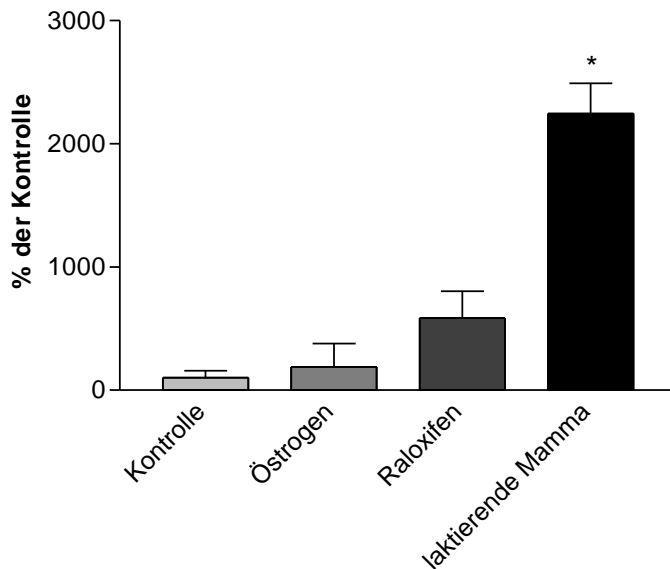


Abb.7: Darstellung der Auszählung Ki-67-positivgefärbter Zellen/ Anzahl Drüsenalveoli in den Mammae der Behandlungsgruppen Placebo, 17 β -Östradiol (hier „Östrogen“ benannt) und Raloxifen bei 500x Vergrößerung. Es wurde außerdem das Präparat einer laktierenden Mamma als Positivkontrolle mit gefärbt und ausgewertet. Es werden die Mittelwerte und SEM prozentrelativiert auf die placebobehandelte Gruppe (Kontrolle) dargestellt; * : p<0,05

Die Färbung der auf den Proliferationsfaktor Ki-67 positiven Zellen befindet sich in den Zellkernen und lässt sich in allen Zellen nachweisen, die sich im Zellzyklus nicht gerade in der Ruhephase G₀ befinden. Es finden sich mehr Ki-67-positive Zellen pro Drüsenalveolidichte in den Mammae der 17 β -Östradiolbehandelten Ratten im Vergleich zu den placebobehandelten. Unter Raloxifen (587 \pm 436%) ist die Anzahl Ki-67-positiver Zellen höher als unter Placebo (100 \pm 116%) und 17 β -Östradiol (189 \pm 379%), jedoch sind diese Erhöhungen insignifikant. Nur die Auszählung der Ki-67-positiven Zellen/ Drüsenalveolidichte in der laktierenden Mamma als Positivkontrolle (2245 \pm 494%) ergibt eine signifikante Erhöhung im Vergleich zur Kontrolle. Bei der laktierenden Mamma, bei der sich die einzelnen Mammaläppchen gut von einander abgrenzen lassen, fällt auf, dass die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen sich von Läppchen zu Läppchen stark unterscheiden.

IV. Diskussion

IV.1. Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf das Rattengewicht

In unserem Versuch zeigte sich während der dreimonatigen Futterzugabe eine signifikant geringere Gewichtszunahme verglichen zur Kontrolle in folgenden nach absteigender Effektivität aufgezählten Therapiegruppen:

17 β -Östradiol > Raloxifen > CR 100 > CR 400.

In den anderen Behandlungsgruppen zeigte sich keine von der Kontrolle signifikant verschiedene Wirkung auf das Rattenkörpergewicht.

Unglücklicherweise liess sich am Ende des Versuchs erkennen, dass die Rattengewichte vor der Ovariectomie bereits zufällig, wenn auch nicht signifikant in gleicher Reihenfolge geringer waren als in den anderen Behandlungsgruppen.

In einer Metaanalyse der Cochrane Collaboration von 28 einbezogenen doppelten Blindversuchen zeigte sich klinisch an peri- und postmenopausalen Frauen über mindestens einen Zeitraum von drei Monaten bis maximal vier Jahren weder unter Östrogenen allein noch unter Östrogen-Progesterontherapie (in moderaten Dosen entsprechend einer Konzentration konjugierter Östrogene von 0,625-1,25mg/d) verglichen zur Placebokontrolle ein Effekt auf das Körpergewicht oder BMI. Es lagen zu wenig Daten vor, um eine Aussage über einen eventuellen Einfluss auf die Fettverteilung (Taille-zu-Hüfte Fettverhältnis und Hautfaltenstärke) zu machen [The Cochrane Collaboration 2008: Oestrogen and progesteron hormone replacement therapy for peri-menopausal and post-menopausal women: weight and body fat distribution (Review)]. Generell scheint es in der Menopause zu einer Umverteilung des Körperfettes von peripher nach abdominal zu kommen, was sich als unabhängiger Risikofaktor für kardiovaskuläre Erkrankungen erwiesen hat [Tchernof et al. 2000, Gill & Malkova 2006 zitiert in der Einleitung der Metaanalyse der The Cochrane Collaboration 2008: Oestrogen and progesteron hormone replacement therapy for peri-menopausal and post-menopausal women: weight and body fat distribution (Review)].

Im Gegensatz dazu findet man in der Literatur in Ratten- und Primatenversuchen (als menopausales Tiermodell) unter Östrogenen im Vergleich zur Kontrolle eine dosisabhängig geringere Gewichtszunahme. Außerdem zeigte sich unter Östrogenen verglichen zu Placebo ein vermindertes abdominales Fettgewebe [Wood et al. 2006, Seidlová-Wuttke et al. 2003 B,

Freudenstein et al. 2002]. Dies steht im Einklang mit unseren Ergebnissen des Östrogeneinflusses.

In Übereinstimmung mit unserem Befund einer geringeren Gewichtszunahme unter Raloxifen verglichen zu Placebo ist das Ergebnis einer kleinen (25x Raloxifen 60mg/d versus 25x Placebo), klinischen Studie, die unter Raloxifentherapie eine Redistribution des menopausalen, androgenen, abdominalen Fettgewebes zur weiblichen Fettverteilung an Hüften und Beinen und einen reduzierenden Effekt auf die menopausale Gewichtszunahme nachweisen konnte [Abstract Francucci et al. 2005].

Wir fanden unter *CR*-Therapie eine signifikant geringere Rattengewichtszunahme als unter Placebo. Der in unserem Versuch nicht vorhandene dosisabhängige Effekt bei der *CR*-Behandlung lässt sich durch die hohe Variationsbreite der Ergebnisse von *CR100* erklären.

Die Arbeitsgruppe von Burdette et al. (2003) hat ebenso wenig wie Freudenstein et al. (2002) in Bezug auf das Körpergewicht an Ratten unter Placebo und verschiedenen *CR*-Extraktkonzentrationen (0,714mg/kg; 7,14mg/kg; 71,4mg/kg) einen Unterschied im Gegensatz zur bekannten signifikant geringeren Gewichtszunahme unter Mestranolbehandlung feststellen können [Freudenstein et al. 2002]. Dieser Extrakt wird zwar als 1mal, 10mal bzw. 100mal der menschlichen therapeutischen Dosis beschrieben, ist aber möglicherweise geringer als in unserem Versuch. Demgegenüber wurde im Einklang mit unserem Ergebnis der *CR*-bedingte, eine geringere Gewichtszunahme als unter Placebo erzeugende Effekt ebenfalls von Seidlová-Wuttke et al. (2003 B) im Zusammenhang mit verminderter, abdominaler Fettgewebsverteilung, östrogen gleich reduzierten, paratibialen Fettdepots und reduzierten Leptinkonzentrationen als Marker vorhandener Fettzellen festgestellt [Seidlová-Wuttke et al. 2003 B].

Unter Sojabehandlung kam es in unserem Versuch zu einer wenn auch insignifikant geringeren Gewichtszunahme als unter Placebo.

Eine Phytoöstrogenbedingte geringere Gewichtszunahme im Vergleich zu Placebo wurde von Weber et al. (2001), Burdette et al. (2002), Wood et al. (2006) und Penza et al. (2006) beschrieben. Es ist jedoch schwierig, die Ergebnisse über Effekte auf das Körpergewicht in der Literatur aufgrund verschiedener originaler Fragestellungen, verschiedener verwendeter Soja- bzw. Isoflavonprodukte und unterschiedlicher Versuchstiere (Primat, Ratte, Maus) und Geschlechter (weibliche, männliche Ratte) miteinander zu vergleichen. Weiterhin muss man auch bedenken welchen Effekt Veränderungen in Lokomotik [Weber et al. 2001], Essverhalten [Seidlová-Wuttke et al. 2003 B] und individuelle Resorption und Metabolismus

(z.B. im Sinne einer „Aktivierung“ von Daidzein durch bakteriellen Umbau im Darm [Setchell et al. 2002]) durch Phytoöstrogene auf das Körpergewicht hat.

Burdette et al. (2002) testete den Effekt von Placebo im Vergleich zu verschiedenen Isoflavonkonzentrationen aus Rotem Klee +/- 17 β -Östradiol an ovariectomierten Ratten und stellte dabei eine konzentrationsabhängige, eine geringere Gewichtszunahme erzeugende Wirkung von Rotem Klee-Isoflavonen im Vergleich zur Kontrolle fest und damit einen den Östrogenen ähnlichen, wenn auch schwächeren Effekt [Burdette et al. 2002]. Originaldaten waren leider im Artikel nicht vorhanden.

Wood et al. (2006) verwendeten für ihre Versuche „postmenopausale“ weibliche Primaten und verglichen die Wirkung von hohen versus niedrigen 17 β -Östradioldosen in Kombination mit Placebo und steigenden Phytoöstrogenkonzentrationen (Sojaproteinisolat und anderem Isoflavonextrakt). Sie benutzten die Gewichtsmessungen nur als Bezugspunkt, um zu beweisen, dass ihre gemessenen Effekte nicht durch verminderte bzw. vermehrte Futteraufnahme bedingt seien. Aus diesem Grund sind die Originaldaten zu den Gewichten nicht aufgeführt und es ist schwierig, diese Interpretation nachzuvollziehen. Sie stellten entsprechend den oben genannten Befunden eine signifikante Verminderung des Körpergewichtes in den hochdosierten Östradiol-Behandlungsgruppen und eine leichte Gewichtszunahme in den niedrigdosierten Östradiol-Behandlungsgruppen fest. Weiterhin erwähnen Wood et al. (2006), dass in den Tieren, die mit der Kombination aus hoher Östradiol- und höchster Phytoöstrogenkonzentration behandelt wurden, ein signifikant geringerer Gewichtsverlust stattgefunden hat als in der „Kontrolle“, die ich als Hochdosisöstradiol ohne Phytoöstrogen annehme. Daraus könnte man schließen, dass diese Phytoöstrogene eine Gewichtsänderung zwischen der durch hochdosierte Östradiol Behandlungen verursachten Reduktion und den durch niedrige Östradiolmengen bedingten menopausalen Gewichtszunahmen erzeugt [Wood et al. 2006].

Die Studie von Weber et al. (2001) testete auf östrogene Effekte an männlichen Ratten unter Phytoöstrogentherapie (diese erzeugte im Plasma ca. 400ng Genistein/ml) und fand verminderte Androgenkonzentrationen und ein geringeres Rattengewicht im Vergleich zu Tieren unter phytoöstrogenlosem Futter. Sie stellten ebenfalls erhöhte lokomotorische Aktivität in den phytoöstrogenbehandelten Ratten fest, wie es bereits in der Literatur als östrogener Effekt auf Ratten beschrieben worden ist [Weber et al. 2001]. Man beachte bei der Übertragung dieser Ergebnisse, dass Penza et al. (2006) neben einem dosisabhängigen Effekt von Genistein, einem Inhaltsstoff des Sojas, eine geschlechtsspezifische Wirkung entdeckt haben. Auf das Fettgewebe männlicher Mäuse hat p.o. Genistein im Gegensatz zu weiblichen

(„prämenopausalen“) Mäusen in niedrigen, durch Sojadiät im Menschen physiologisch erreichbaren Konzentrationen ($<50000\mu\text{g}/\text{kgxd}\approx\text{Plasma Genistein } 35\text{-}100\text{nM}$) einen adipogenen Effekt. Durch hohe pharmakologische Konzentrationen ($>200000\mu\text{g}/\text{kgxd}\approx\text{höher als } 100\text{nM Plasma-Genistein}$) tritt wie bei weiblichen Mäusen eine antiadipogene Wirkung ähnlich der unter Östrogeneinfluss auf. Penza et al. (2006) fanden, dass dieser antiadipogene Effekt hoher Konzentrationen durch Downregulation von $\text{ER-}\beta > \text{ER-}\alpha$, PR und von adipogenen Genen stattfindet, die das Vorhandensein von $\text{ER-}\beta$ benötigen. $\text{ER-}\beta$ kommt dadurch eine wichtige Rolle in der östrogenbedingten Regulation des Fettgewebes zu. Da sich jedoch die Expressionsmuster unter Genistein und Östradiol unterschieden, muss das Vorhandensein weiterer nichtöstrogener Regulationsmechanismen angenommen werden [Penza et al. 2006].

Entgegen der Annahme, dass die verminderten Gewichtszunahmen unter Phytoöstrogenen u.a. durch östrogenagonistische Wirkungen hervorgerufen werden, haben Seidlová-Wuttke et al. (2003 B) bei nur gering und insignifikant verminderten Gewichtszunahmen unter Sojabehandlung eine placeboartige, signifikante Erhöhung des abdominalen und Verminderung des paratibialen Fettgewebes gefunden [Seidlová-Wuttke et al. 2003 B]. Dies würde Soja einen östrogenen Effekt auf die Fettgewebsverteilung und Gewichtsreduktion absprechen. Obwohl im Rattenversuch eine eventuell SERM-artige Wirkung mit $\text{ER-}\alpha$ - und $\text{ER-}\beta$ -Bindungsfähigkeit für *BC* [Seidlová-Wuttke et al. 2004, Thelen et al. 2005] und mit $\text{ER-}\beta$ Spezifität für *SM* [Seidlová-Wuttke et al. 2003 A] beschrieben worden ist, konnte ich keine Literaturhinweise über einen Einfluss dieser Substanzen auf das Rattengewicht oder – fettgewebe finden.

IV.2. Molekularbiologische Ergebnisse

Zu Beginn der Diskussion der molekularbiologischen Ergebnisse möchte ich erwähnen, dass die Rattenmamme aufgrund ihrer geringen Größe und der schwer zu markierenden Grenze zu Nachbargeweben ein schwieriges Untersuchungsorgan zur Bearbeitung mit der extrem sensiblen Methodik der PCR ist.

Die tiefgefrorenen Mammapräparate waren unterschiedlich groß, hatten unterschiedliche Konsistenz und beinhalteten unterschiedliche große Mengen von zusätzlichem Gewebe, was vor allem bei späterer histologischer Aufarbeitung offensichtlich wurde. Vor der Aufarbeitung für die PCR wurden so gründlich wie möglich die Fellhaare und offensichtlich zusätzliches Gewebe entfernt, doch es war unmöglich, das Mammagewebe makroskopisch vollständig von

Haut, Hautanhangsdrüsen, Gefäßen, Unterhautfettgewebe und unterliegendem quergestreiften Muskelgewebe zu entfernen.

Unter der Berücksichtigung, dass die Rattenbrust im Vergleich zum umliegenden Gewebe sehr klein ist, sind alle Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen als ein Effekt der jeweilig untersuchten Substanz auf alle genannten Gewebe und dabei von Präparat zu Präparat ebenfalls in verschiedenen Gewebsmengenverhältnissen zu werten.

Die Verarbeitung fand nach einem in unserer Arbeitsgruppe üblichen und gängigen Protokoll statt. Um einen generellen Methodenfehler auszuschließen, wurde eine Probenaufarbeitung und ein PCR-Lauf von einer zweiten Person durchgeführt mit ähnlich unbefriedigenden Ergebnissen. Alle Lösungen wurden wiederholt neu und steril angesetzt, um Verunreinigungen durch RNAsen auszuschließen, die zu niedrigen RNA/Protein-Verhältnissen führen würden. Es wurde auf Eis gearbeitet, um die Wärmedestruktion der RNA in Gewebe bzw. Suspension möglichst gering zu halten. Unglücklicherweise geht generell bei der Aufarbeitung mit dem RNeasy Kit (siehe Material und Methoden) eine große Menge an RNA verloren.

Diese genannten Verarbeitungsschwierigkeiten können die starken Schwankungen der Ergebnisse pro Behandlungsgruppe erklären und Probleme in ihrer Interpretation hervorgerufen haben. Genau genommen dürfen die aufgetretenen Effekte nur als Genexpressionsänderungen in einer komplexen Gewebsmischung von Mammagewebe, Fettgewebe, Gefäßen, Hautanhangsdrüsen, Muskelgewebe und Haaren gewertet werden.

IV.2.1. Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER- α in der Mamma

In unserem Versuch war die Expression von ER- α in der Mamma unter den verschiedenen verwendeten Substanzen nur insignifikant von der Kontrolle verschieden und es lagen sehr starke Schwankungsbreiten in den Ergebnissen vor. Vor allem die große Variationsbreite der Kontrolle als Bezugspunkt macht Aussagen über die anderen Substanzen schwierig.

Die ER- α -Expression scheint im Vergleich zur Kontrolle insignifikant unter Östradiol, höherdosiertem *BC* und unter *SM* dosisabhängig anzusteigen. Demgegenüber ist die ER- α -mRNA unter *CR* (dosisabhängig) und unter *BC* in niedriger Dosierung moderat und unter Soja stark vermindert. Diese Ergebnisse sind jedoch ebenfalls insignifikant.

Die Bedeutung des ER- α ist in der Literatur sehr vielseitig beschrieben und die genauen lokalen Effekte noch größtenteils unerforscht. Eine Aussage über die Bedeutung der Änderungen in der Genexpression ist schwierig. Erstens lässt sich aus einer erhöhten

Expression aufgrund vieler posttranskriptioneller Regulationsmechanismen nicht zwangsläufig auf eine Änderung in der Rezeptorproteinkonzentration schließen. Zweitens lässt sich aus erhöhter Proteinkonzentration nicht direkt die entsprechende Funktion oder Aktivität des Rezeptors ableiten [Review Speirs 2002].

Normales, benignes Mammawachstum benötigt Östrogene und IGF-I, die in vielen noch nicht ganz verstandenen Interaktionen miteinander und mit anderen Substanzen stehen. Östrogene können über ER- α die IGF-I-Expression erhöhen und so das Mammaepithelwachstum beeinflussen [Martin & Stoica 2002, Renehan et al. 2006]. IGF-I kann in negativer Rückkopplung über den IGF-I-R die ER-Expression reduzieren und so das Wachstum vermindert östrogenabhängig machen [Martin & Stoica 2002].

Es wurde festgestellt, dass in normalem Mammawachstum durch Östrogene die ER- α -Expression downreguliert wird. Entsprechend führt eine östrogenarme Umgebung, wie sie in der Postmenopause vorkommt, zur ER- α -Upregulation, was die Östrogenempfindlichkeit erhöht, ohne einen direkten Einfluss auf proliferierende Zellen zu haben [Fendrick et al. 1998]. ER- α -positive Zellen sind nur extrem selten Ki-67-positiv d.h. zur Proliferation fähig. Sie sind eher als Regulatoren des Wachstums benachbarter ER-negativer Mammepithelien zu werten. Nach Tumorentstehung kann durch Dysregulation ER- α vermehrt exprimiert werden und so Östrogene einen proliferationserhöhenden Effekt ausüben [Palmieri et al. 2002]. Interessanterweise hat Gaube et al. (2007) mit seiner Genexpressionsstudie über den Effekt von *CR* eine reduzierte ER- α -Expression im Zusammenhang mit der Verminderung der Expression antiproliferativer Gene als antitumorös beschrieben. Inwieweit hierbei eine geringe ER- α -Expression direkt mit anti-tumoröser Wirkung, bzw. geringer Proliferation gleichgesetzt werden kann, bleibt offen, da Gaube et al. (2007) ebenfalls festgestellt hat, dass *CR* viele östrogenunabhängige Genexpressionen zu beeinflussen scheint.

Damit könnte eine erhöhte ER- α -Expression bzw. -translation u.a. durch geringe Östrogenkonzentrationen (Menopause), durch Dysregulation und damit Karzinogenese, oder gar wie bei *CR* mit anderen Signalwegen im Zusammenhang stehen. Bezüglich der Frage nach proliferiertem Mammagewebe muss beachtet werden, dass sich anhand von ER- α Knockout MMTV-Wnt-1 Mäusen (transgenen Mäusen mit hoher Anfälligkeit, Mammaadenokarzinome zu entwickeln, denen außerdem ER- α fehlt) gezeigt hat, dass Östrogene zwar über ER- α eine verstärkende Rolle in der Proliferation haben und damit eventuell auch fragliche SERM bzw. Phytoöstrogene. In normalem Mammagewebe haben Östrogene jedoch keine Hyperplasie- oder Tumorigenese induzierende Funktion [Couse & Korach 1999].

Es fehlt also zu der Aussage über Mammakarzinome der tumorinduzierende Stimulus, der zumindest wesentlich nicht in unserem Versuch aufgetreten ist.

Mit dieser Information ist die Auswertung dieser insignifikanten Ergebnisse schwierig und es gibt sehr verschiedene Erklärungsansätze.

Unter Östradiolbehandlung würde normalerweise eine Downregulation der ER- α -Expression erwartet werden. Der unter Östradiol, *BC* in hoher Konzentration und dosisabhängig unter *SM* sichtbare Trend zur Upregulation von ER- α könnte demnach drei Erklärungsansätze haben. Erstens könnte er durch nicht-Östrogene oder ER-abhängige Signalwege bzw. Modulation zustande gekommen sein. Zweitens könnte er durch eine Erhöhung der Expression ohne zwangsläufige Erhöhung der Translation in Rezeptorprotein bedingt sein. Drittens könnte der unwahrscheinliche Fall einer Dysregulation im Sinne einer Präkanzerose oder durch ein ER- α nicht downregulierendes oder überexprimierendes Tumorstadium eingetreten sein. Es wäre jedoch unwahrscheinlich, dass es spontan ohne bekannten äußeren Einfluss in dieser Häufigkeit zur Tumorinduktion gekommen wäre. Außerdem ist eine präkanzeröse bzw. kanzeröse Induktion in diesem Maße beispielsweise unter *BC* in der Literatur nicht bekannt.

Ein wahrscheinlicherer Erklärungsansatz für den Befund unter Östrogeneinfluss wäre, dass Östrogene lokal in entsprechend hoher Konzentration vorhanden gewesen wären, dass es - wie in der Literatur beschrieben - zu einem blockierenden, antiöstrogenen Effekt gekommen sei [Hanstein et al. 2004]. Durch diesen antiöstrogenen Einfluss von Östrogenen kommt es dann zu einer Sensibilisierung und Upregulation des ER- α -Proteins.

Raloxifentherapie scheint keinen Effekt auf die ER- α -Expression zu haben, was in Übereinstimmung ist mit vorherigen Veröffentlichungen [Abstract Glaeser et al. 2006].

BC-Inhaltsstoffen wurden in der Literatur zwar ER- α - und $-\beta$ -Bindungsfähigkeiten nachgesagt, Seidlová-Wuttke et al. (2004) konnte jedoch keinen östrogenen, proliferationserhöhenden Effekt von *BC* auf die Rattenmamma nachweisen. Unsere Ergebnisse sind aufgrund der großen Variationsbreite schwer auszuwerten. Wenn wir den Erklärungsansatz der Dysregulation im Sinne der Tumorentstehung außer Acht lassen und von regulierten Zuständen ausgehen, so könnten unsere insignifikanten Ergebnisse tendenziell auf einen biphasischen SERM-Effekt von *BC* hindeuten mit Upregulation von ER- α und damit fraglich antiöstrogenem Effekt in hohen Konzentrationen und östrogenagonistischer Downregulation der ER- α -Expression unter geringen Konzentrationen. Diese Aussage kann nur mit besonderer Vorsicht gemacht werden, da die extrem große Schwankungsbreite in der ER- α -Expression unter der hohen Konzentration von *BC* und die geringere

Schwankungsbreite unter niedriger Konzentration ebenfalls im Sinne eines nur östrogenen Effektes ausgelegt werden kann, oder ein SERM-Effekt von *BC* ganz abgestritten werden kann.

Mit dem Wissen, dass *SM* ausschließlich über ER- β wirken würde und ER- β in östrogenarmer Umwelt eher einen ER- α inhibitorisch modulierenden Effekt hätte [Hall & McDonnell 1999, Weihua et al. 2000], lässt sich ein tendenzieller Anstieg der ER- α -Expression im Zusammenhang mit der *SM*-Behandlung nur indirekt über andere unbekannte Regulationswege erklären.

Bezüglich des *SM*-Effektes auf die Mammaproliferation liegen wie in der Einleitung erwähnt kontroverse Ergebnisse vor. Bhatia et al. (1999) (zitiert in Ladas & Kelly 2003) fanden einen karzinomhemmenden Effekt auf MCF-7-Zellen, ebenso wie Zi et al. (1998) auf MDA-MB468-Zellen. Malevicz et al. (2006) jedoch konnten auf Mäusemammas einen Mamma-karzinomvorkommen- und Tumorzahlerhöhenden Effekt und auf MCF-7 Zellen einen biphasischen Effekt feststellen. Unter niedrigen *SM*-Konzentrationen erhöhte sich das Tumorzellwachstum dosisabhängig mit additivem Effekt bei Zugabe von Östradiol. Unter hohen Konzentrationen ($>50\mu\text{g/ml}$ Silibinin) kam es unabhängig von der Östradiolkonzentration zur Wachstumshemmung [Malevicz et al. 2006]. Unter Beachtung des von Malevicz et al. (2006) beschriebenen Effektes von niedrigdosiertem *SM* könnte unsere wenn auch insignifikant gemessene tendenzielle ER- α -Expressionserhöhung unter *SM* durch Dysregulation bedingt sein und als östrogenbedingte Proliferationserhöhung interpretiert werden.

Unter Soja scheint die ER- α -Expression insignifikant, jedoch am stärksten von allen Behandlungsgruppen reduziert zu sein. In der Literatur liegen kontroverse Ergebnisse bezüglich des Effektes von Soja und seinen Inhaltsstoffen, wie unter anderem Genistein und Quercetin, vor. Es scheint sich jedoch in In-vitro-Untersuchungen ein dosisabhängiger Effekt herauszukristallisieren, der bi- bzw. triphasisch ist, mit keinem Effekt unter ganz niedrigen Konzentrationen, einem östrogenagonistischem (mit dosisabhängiger ER- α -Protein-Downregulation), das Wachstum von Mammakarzinomzellen erhöhenden Effekt in mittleren Dosen und einem östrogenunabhängigen, toxischen Effekt auf die Zellen unter hohen Konzentrationen [Allred et al. 2001, Maggiolini et al. 2001, This et al. 2001, Duffy et al. 2007]. Die Tierversuche mit Soja oder ähnlichen, Isoflavone enthaltenden Substanzen ergeben an Ratten keine Änderung der Mammaproliferation [Burdette et al. 2002]. An Primaten wurde ein dosisabhängiger, die ER- α -Expression nicht verändernden proliferationsreduzierenden Effekt [Wood et al. 2006] sowie an Ratten durch die

Arbeitsgruppe Santell et al. (1997) eine östrogenähnliche, proliferationserhöhende Wirkung festgestellt [Santell et al. 1997]. Diese scheinbar verschiedenen Ergebnisse könnten mit der anhand von In-vitro-Untersuchungen an menschlichen Mammakarzinomzellen aufgestellten (Bi-/Triphasen)Theorie durch Dosisunterschiede im Versuchsansatz erklärt werden. Vergleiche der Ergebnisse der verschiedenen Studien sind jedoch schwer, da mit unterschiedlichen Tiermodellen und verschiedenen Substanzen bzw. Extrakten gearbeitet wurde, in einigen Studien Mammatumore vorlagen und weiterhin nicht die Plasmakonzentrationen der gleichen Inhaltsstoffe gemessen wurden. Außerdem ist der Sojaeffekt von vielen Einflussfaktoren abhängig. Die Futterzusammensetzung spielt aufgrund möglicher Interaktionen mit anderen Stoffen eine Rolle. Verschiedene Inhaltsstoffe liegen in variierenden Konzentrationen und Relationen zueinander vor. Ihre Effektivität wird durch Substanzextraktionsverfahren, -veredelung, sogar durch Standort des Wachstums, Zeit der Ernte und bestandene Wetterbedingungen während des Wachstums beeinflusst [Duffy et al. 2007]. Ebenfalls hat sich bereits innerhalb einer Spezies eine große Variabilität in der Absorption, Darmtransitzeit und Mikroflorazusammensetzung gezeigt [Duffy et al. 2007], was vergleichende Betrachtungen zwischen Spezies und damit Rückschlüsse auf Effekte im Menschen schwierig macht.

Ebenso schwer ist es, unsere Ergebnisse aus ähnlichem Grund mit denen anderer zu vergleichen. Wir haben ähnlich wie bei den In-vitro-Untersuchungen mit mittlerer Genisteinkonzentration [Maggiolini et al. 2001, This et al. 2001, Duffy et al. 2007] zumindest tendenziell einen östrogenen Effekt im Sinne einer verminderten ER- α -Expression festgestellt. Damit könnten wir einen Trend zu einem wachstumserhöhenden, bzw. einen ovariectomiebedingte Mammaregression verhindernden Effekt an Rattenmammas ähnlich wie bei Santell et al. (1997) vermuten.

Unter CR hatte sich in unserem Versuch eine insignifikante, dosisabhängige Reduktion der ER- α -Expression gezeigt.

Bezüglich der Daten in der Literatur ist die CR-Wirkung komplex und es haben sich bereits verschiedene Signaltransduktionswege und Transkriptionsmodulationen neben der ER-regulierten Genexpression ergeben, die auf verschiedenen Ebenen Einfluss auf die Proliferation der Mamma- und andere Zellen zu nehmen scheinen [Bodinet & Freudenstein 2002, Seidlová-Wuttke et al. 2003 B, Wuttke et al. 2003, Jarry et al. 2003, Jarry et al. 2005, Burdette et al. 2003, Fabricant et al. 2005, Powell et al. 2008, Rhyu et al. 2006]. In Übereinstimmung mit dem Trend unserer Ergebnisse hat Gaube et al. (2007) im Rahmen

eines genomweit aufgestellten Genexpressionsprofil unter *CR*-Einfluss eine Downregulation der *ER- α* -Genexpression festgestellt. Neben diesem Befund ergab sich bei Gaube et al. (2007) eine Expressionsänderung von wesentlich mehr und unterschiedlichen Genen als unter Östradiol- und Tamoxifenbehandlung, was andere Signalwege als Hauptwirkaktoren vermuten lässt. Die meisten Expressionsänderungen können als proapoptotisch und antiproliferativ ausgelegt werden. Neben diesem Genexpressionsprofil haben sie das Wachstum von MCF-7-Zellen untersucht und dabei unter Tamoxifen wie unter *CR*-Extrakt dosisabhängig eine bis zu 50% geringere Proliferation als unter Östradioleinfluss gefunden [Gaube et al. 2007]. Die unter *CR*-Behandlung festgestellte Tendenz zur *ER- α* -Downregulation, die normalerweise auf östrogene Wirkung hinweisen würde, lässt im Zusammenhang mit bei Gaube et al. (2007) nachgewiesener verminderter Proliferation vermuten, dass die antiproliferativen Effekte von *CR* auf die Mammaepithelien hauptsächlich über andere Signalwege vermittelt werden.

IV.2.2. Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von *ER- β* in der Mamma

In der Literatur wird dem *ER- β* eine antiproliferative, tumorsuppressive und vor allem unter niedrigen Östrogenumgebungskonzentrationen eine *ER- α* hemmend modulierende Wirkung nachgesagt [Hall & McDonnell 1999, Weihua et al. 2000, Saji et al. 2000]. Aufgrund dieser die *ER- α* -Funktion verringernden Effekte durch *ER- β* bei Koexpression in Mammazellen haben Saji et al. (2000) die Tatsache erklärt, dass in der laktierenden Mamma von Ratten beide Östrogenrezeptorproteine stark exprimiert sind und doch laktierende Mammae sich bekanntlicherweise östrogenunsensibel verhalten. In ihren Untersuchungen an Mammae schwangerer und laktierender Ratten haben sie festgestellt, dass *ER- β* m-RNA Menge niedrig ist, d.h. die PCR-Amplifikation erst nach mindestens 33 Zyklen auftritt, die Translation in *ER- β* -Protein jedoch hoch ist. Er hat diesen scheinbaren Widerspruch mit dem Vorhandensein von vom Entwicklungsstadium abhängigen Regulationsmechanismen erklärt, die beispielsweise die Proteindegradation und die Effizienz der m-RNA-Translation in Protein beeinflussen [Saji et al. 2000].

Weiterhin ist in der Literatur beschrieben, dass es während der Transition von benignem zu malignem Mammakarzinom *in situ* zu einer Verminderung des *ER- β* -Proteins kommt [Speirs 2002].

Nach Speirs (2002) sei viel Verwirrung über die Funktion des *ER- β* durch Interpretationen von *ER- β* m-RNA-Überexpression in Tumoren im Zusammenhang mit maligneren

Indikatoren entstanden. Eine m-RNA-Überexpression sei mit einer vermehrten Translation in aktives Protein gleichgesetzt worden, was sich in entsprechenden immunhistologischen Untersuchungen nicht nachweisen lässt. Mit der Immunhistologie habe sich ER- β -Vorkommen als ein guter prognostischer Marker ergeben [Speirs 2002].

Aus dieser Diskrepanz von m-RNA und Proteinexpression lässt sich auf eine große Rolle der posttranskriptionellen und -translationalen Modulationen in der ER- β -Wirkung schließen.

Damit wäre die Aussagekraft einer ER- β m-RNA-Expression in den Mammæ der verschiedenen Behandlungsgruppen schwierig.

Bei der Bewertung unserer Ergebnisse war auffällig, dass sich in 2 von 4 bis 6 von 6 Rattenmammæ von maximal 8 Rattenmammæ pro Behandlungsgruppe nach 40 Zyklen noch keine exponentielle Vermehrung von ER- β cDNA-Fragmenten zeigte.

Daraus lässt sich vermuten, dass in der Rattenmamma keine ER- β m-RNA der mit der Sonde detektierbaren Sequenz vorhanden war und es sich in den wenigen Fällen, in denen mit der sensiblen RT-PCR etwas detektiert worden war, um Verunreinigungen handeln könnte.

In diesem Zusammenhang muß bedacht werden, dass Palmieri et al. (2002) erwähnt, dass sich zwar in Untersuchungen der Rattenmammæ ein hohes Vorkommen von ER- β gezeigt habe, ER- β jedoch in wesentlichen Mengen als ER- β Splice-Variante mit verminderter Affinität zu Östrogenen vorkommt [Palmieri et al. 2002]. Ebenso wurde in der Übersicht über die Östrogenrezeptoren der International Union of Pharmacology [Dahlmann et al. 2006] das häufige Vorkommen von verschiedenen ER- α sowie ER- β Splice-Varianten auf Protein- als auch m-RNA Ebene in Ratten erwähnt. Dies könnte für unseren Versuch bedeuten, dass ER- β als Splice-Variante zwar in unserem Versuch vorhanden sein könnte, jedoch nicht unbedingt mit der von uns verwendeten Sonde detektierbar ist. Die Arbeitsgruppe Seidlová-Wuttke et al. (2003 A) konnten ebenfalls wider Erwarten unter *SM* keine ER- β Expression im Knochen der Ratten nachweisen und erklärten die östrogene Wirkung von *SM* entweder mit dem Vorkommen einer ER- β Splice-Variante oder eines weiteren Östrogenrezeptors, dem ER- γ [Seidlová-Wuttke et al. 2003 A].

IV.2.3. Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die

Genexpression des Wachstumsfaktors IGF-I in der Mamma

In unserem Versuch ist die IGF-I-Genexpression in dem Komplex aus Mamma-, Fett-, Gefäß-, Hautanhangsdrüsen- und Muskelgewebe in allen Behandlungsgruppen verglichen zur Kontrolle ohne weitere Futterzusätze unterschiedlich stark, jedoch insignifikant angestiegen. Im Vergleich ist IGF-I m-RNA unter *CR* in hoher Dosierung, Raloxifentherapie und unter Soja- und *BC*-Behandlung in niedriger Konzentration tendenziell geringer angestiegen als unter 17 β -Östradiol. Die IGF-I-Genexpression unter *SM* scheint östrogenähnlich und unter *CR* in niedriger und *BC* in hoher Konzentration höher als unter Östradiol zu sein. Alle Veränderungen waren insignifikant.

Aus der Literatur ist bekannt, dass IGF-I vor allem im Zusammenhang mit Östrogenen für die Regulation des normalen Mammawachstums und -entwicklung sowie für das Mamma-tumorwachstum von Bedeutung sind und diese in vielen größtenteils noch unbekanntem Interaktionen zueinander stehen [Couse & Korach 1999, Renehan et al. 2006]. Es hat sich gezeigt, dass es bei Primaten unter IGF-I-Behandlung zu vermehrten Mammahyperplasien kommt und IGF-I-Überexpression mit erhöhtem Risiko, Mammaadenokarzinome zu entwickeln, assoziiert ist [Ibrahim & Yee 2005]. Mammaepithelien werden jedoch durch hohes IGF-I eher für einen zweiten entartenden Stimulus zur Tumorentstehung sensibilisiert als dass IGF-I direkt zur Tumorentstehung führen würde [Ibrahim & Yee 2005].

Neben den in der Einleitung erwähnten sich gegenseitig beeinflussenden Signalwegen [Couse & Korach 1999, Martin & Stoica 2002, Hamelers & Steenbergh 2003] scheint bei IGF-I und Östrogenen eine synergetische, das Wachstum erhöhende Wirkung vorzuliegen [Hamelers & Steenbergh 2003]. Leider sind uns die Konzentrationen von lokalen, parakrin produzierten Östrogenen für eine entsprechende Diskussion nicht bekannt.

Aus allen genannten Gründen sind Aussagen sowohl über den Effekt erhöhter IGF-I m-RNA auf eventuelle Proliferation der Mammae als auch der Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen bezüglich der Befunde schwierig.

Die in allen Gruppen stattgefundenen IGF-I m-RNA-Erhöhung könnte bei Annahme der Translation zu entsprechendem Protein als östrogene bzw. SERM-Wirkung, als Effekt anderer Signalwege, als zum Erhalt normalen Mammagewebes notwendig oder als Folge einer Hyperplasie oder Tumorentstehung ausgelegt werden.

Beispielsweise könnte die tendenziell erhöhte IGF-I-Expression unter Östradioleinfluss durch ihre aktivierende Wirkung auf die IGF-I-Expression über die gemessene erhöhte ER- α -Expression erklärt werden. Im umgekehrten Fall könnte unter Sojatherapie die tendenziell

geringere IGF-I-Expression im Vergleich zu unter Östradiolbehandlung durch verminderte ER- α -Expression bedingt sein.

Hiermit lässt sich jedoch nicht der Zusammenhang zwischen dem von uns im Vergleich zur Kontrolle gemessenen Trend zu erhöhter IGF-I m-RNA und der vielfach beschriebenen antiöstrogenen, antiproliferativen Wirkung von Raloxifen auf die Mammaepithelien erklären. Man beachte hierbei, dass die m-RNA in den Zellen verschiedenen posttranskriptionellen Regulationsprozessen unterliegt und aus m-RNA Vorkommen nicht zwangsläufig auf Translation in funktionsfähiges Protein geschlossen werden kann. Weiterhin muss man bedenken, dass die untersuchten Mammagewebe nicht nur aus Drüsenmaterial bestanden, sondern verschieden große Anteile anderer Gewebe enthielten wie z.B. sich kontinuierlich erneuernde Epidermis, welche durch ihren Gehalt an IGF-I m-RNA und Protein das Ergebnis verzerrt haben könnte.

Ebenso schwierig ist die Auswertung unserer Ergebnisse bezüglich des *BC*-Einflusses, der in unserem Versuch aus einer dosisabhängig tendenziell geringeren ER- α -Expression als unter Kontrollbedingungen bestand und über den bisher in der Literatur trotz gemessener ER-Bindungsfähigkeit keine proliferativen Effekte auf die Mamma beschrieben wurden [Seidlová-Wuttke et al. 2004]. Weiterhin würde man, wenn man unsere Ergebnisse derart interpretiert, dass es unter niedrigen Konzentrationen zu einer tendenziellen ER- α -Downregulation als östrogenartigem Effekt gekommen wäre, erwarten, dass die IGF-I-Expression unter dieser Konzentration höher als unter hochdosiertem *BC* sei. Dies lässt sich nicht mit unseren Ergebnissen nachweisen, sodass Interpretationen der insignifikanten Ergebnisse beider Expressionuntersuchungen bezüglich des *BC*-Effektes nicht möglich sind. Dazu sei auch erwähnt, dass die IGF-I-Expression unter *BC* in hoher Konzentration im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen am höchsten ausgefallen war, hier jedoch auch die stärksten Schwankungen zwischen den Einzelergebnissen in dieser Gruppe vorlagen. *SM* hat in unserem Versuch tendenziell östradiolähnlich erhöhte IGF-I m-RNA-Werte und ein Trend zu stark erhöhter ER- α -Expression ergeben. Wenn *SM* nur über ER- β östrogene Effekte ausüben könnte, wie es in der Literatur beschrieben ist [Seidlová-Wuttke et al. 2003 A] und ER- β eher tumorsuppressive und damit wachstumsreduzierende Wirkungen habe [Hall & McDonnell 1999, Weihua et al. 2000, Saji et al. 2000], lassen sich unsere Ergebnisse nur über andere Signalwege erklären. Die in der Tendenz erhöhte IGF-I-Expression unter *SM* scheint unsere bei den ER- α -Expressionsergebnissen aufgestellte Hypothese einer Dysregulation zu unterstützen. Unsere IGF-I Expressionsergebnisse scheinen zumindest tendenziell mit den

Ergebnissen von Malewicz et al. (2006), wie im Zusammenhang mit der ER- α Expression diskutiert zu korrespondieren.

Bei CR kann die fehlende Dosisabhängigkeit durch starke Variation der Ergebnisse vor allem in der hochdosierten Konzentration erklärt werden. Die in unserem Versuch insignifikant erhöhte IGF-I Expression könnte man als tendenziell leicht erhöhte Proliferation der Mamma ähnlich dem Befund von Kruse et al. (1999) auf MCF-7-Zellen werten. Demgegenüber darf nicht vergessen werden, dass die meisten Studien mit menschlichen Karzinomzelllinien wachstumsvermindernde, antiöstrogene oder andere Signalwege beinhaltende Effekte gezeigt haben [Bodinet & Freudenstein 2002, Gaube et al. 2007].

Aufgrund der anfänglich erläuterten Schwierigkeiten in der Aufarbeitung der Rattenmammas ist es insgesamt problematisch, diese insignifikanten Veränderungen mit starken Schwankungen als Effekte auf die Mamma allein auszulegen und zu interpretieren, sondern sind vermutlich als Effekt in einem Gewebegemisch mit geringem, oder variierendem Mammadrüsenanteil zu werten.

IV.3. Histomorphologische Ergebnisse

IV.3.1. Histologie: Effekt der verschiedenen Futtersubstanzen auf

Fettgewebe, Gefäße und Drüsengewebe in der Mamma

Vor der histologischen Aufarbeitung wurden die bei -70°C in kleinen Reaktionsgefäßen eingefrorenen Mammapräparate zuerst aufgetaut, in den Reaktionsgefäßen mit Paraformaldehyd fixiert, dann entwässert, mit Paraffin durchtränkt, eingebettet und auf $5\mu\text{m}$ Dicke geschnitten. Da die Mammas trotz verschieden großer Mengen an Zusatzgewebe bereits sehr klein waren und in verschiedener Orientierung in kegelförmige Reaktionsgefäße eingefroren wurden, war es oft schwierig, die Mammas in richtiger Orientierung in die Paraffinblöcke einzuschließen. Zu dieser Schwierigkeit kam hinzu, dass die Mammas unterschiedlich stark durch den Fixierungs- und Entwässerungsprozess geschrumpft waren und sich verformt hatten. Es war also unmöglich sicherzustellen, dass die Präparate immer in gleicher Lage in Paraffin eingebettet wurden.

In der vergleichenden Betrachtung der Präparate war zwischen den Behandlungsgruppen histologisch weder ein offensichtlicher Unterschied in der Gewebszusammensetzung von

Drüsengewebe zu Fettgewebe, in der Gefäßdichte noch in der Form und Reihig- bzw. Schichtigkeit der Drüsenepithelien festzustellen. Aus diesem Grund musste ich eine Methode zur Quantifizierung der jeweiligen Gewebsbestandteile, wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben, festlegen.

Es mußten einige Präparate zusätzlich immunhistologisch auf Zytokeratine gefärbt werden, da zur Zählung einer lumenhaltigen Struktur fraglichen Ursprungs als Drüsenanteil, diese Strukturen sich als epithelartig zytokeratinpositiv, oder als Gefäß/Lymphendothel als zytokeratinnegativ darstellen mussten. Der verwendete Primärantikörper bindet sich außer an Drüsenepithelien, an Myoepithelien, an epidermale Schichten der Haut und interessanterweise ebenfalls an Adenokarzinome der Mamma.

Es wurden jedoch in keinem der mikroskopisch untersuchten Präparate auffällig dichte Drüsenschichten, auffällige Kernstrukturen oder übermäßig dichte zytokeratinpositiv Zellen als Hinweis auf Tumorentstehung gesehen.

Leider waren die quantifizierten Ergebnisse auf Untersuchungen aller Gewebsstrukturen im Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen im Dunnett's Multipel Vergleichstest nur insignifikant verändert. Die durchgeführten t-Tests von Kontrolle im Vergleich zu jeweils einer Behandlungsgruppe ergab nur Signifikanzen in der Messung der Gefäßzahl und nur für die Behandlungsgruppen *CR100*, *CR400* und *BC400*. In diesen Gruppen zeigte sich eine signifikant erhöhte Gefäßzahl gegenüber der Kontrolle.

Histologie: Fettgewebsanteil

Zum besseren Verständnis der Bedeutung einer Aussage über den Fettgewebsgehalt der Mamma möchte ich vorerst eine Zusammenfassung aus der Literatur über die Rolle des Fettgewebes in der Mamma geben.

Der menopausale Involutionseffekt auf das Mammagewebe wird allgemein mit Verminderung der Drüsenstrukturen und der kollagenen Bindegewebssubstanz und relativer Erhöhung des Fettgehaltes beschrieben.

Dem Mammafettgewebe kommt generell als prädominierender Stromaler Zelltyp außer der Funktion als Energiespeicher eine wichtige Rolle als endo-, para- und autokrines Organ in der normalen Mammaentwicklung als auch im Mammakarzinomwachstum und in der Metastasenentstehung zu [Celis et al. 2005].

Reife Adipozyten produzieren und sezernieren große Mengen von löslichen Faktoren, Hormone, Wachstumsfaktoren und Adipokrine in den Extrazellularraum, die unter anderem den Mammaepithelien helfen, sich in duktalem Strukturen zu arrangieren, die Zellmorphologie

beeinflussen, die Proliferation modulieren und ein Wachstumshormonreservoir für die allgemeine Zirkulation darstellen. Die von reifen Adipozyten sezernierten Substanzen beinhalten proinflammatorische Zytokine, die Zellproliferation stimulierende Wachstumsfaktoren (u.a. IGF-I, IGFBP) und angiogene Faktoren, die für Fettgewebsgrößenzunahme, für das Drüsenwachstum und für Tumorwachstum wichtig sind [Celis et al. 2005]. Darunter fallen u.a. VEGF, Leptin [Celis et al. 2005] und Kollagen VI, dessen Expression mit der Entstehung von hyperplastischen Epithelfoci und Tumorigenese in Verbindung steht [Lyengar et al. 2005]. Reife Adipozyten besitzen ER und haben einen wachstumserhöhenden Effekt unter anderem auf ER-positive Mammakarzinomzelllinien gezeigt [Celis et al. 2005]. Leptin ist ein von Adipozyten in Abhängigkeit der Fettmasse sezernierter Wachstumsfaktor. Seine Expression findet unter anderem zwar in normalen und tumorösen Zellen statt, sein Rezeptor wird jedoch allein in Tumorgewebe exprimiert. Der Leptinrezeptor scheint sowohl den ER östrogen- bzw. ligandunabhängig aktivieren zu können als auch mitogen für ER-negative Mammakarzinomzellen zu sein [Lorincz & Sukumar 2006]. Adipozyten und Tumorzellen beeinflussen sich über parakrine Substanzen im Extrazellularraum gegenseitig. Es wurde beispielsweise festgestellt, dass Tumorzellen pluripotente Mesenchymzellen zur Differenzierung zu Adipozyten anregen, diese über genannte Substanzen im Extrazellularraum positiv Einfluss auf Tumorwachstum, -angiogenese und Metastasierung nehmen [Celis et al. 2005, Lyengar et al. 2005, Lorincz & Sukumar 2006].

Der das Mammakarzinomrisiko erhöhende Effekt von vermehrtem Fettgewebe bzw. Adipositas in postmenopausalen Frauen, das vor allen an Mamma, Abdomen, Oberschenkel und Gesäss lokalisiert ist, kann über drei hypothetische Wege erklärt werden [Lorincz & Sukumar 2006]:

1. Über im Fettgewebe vorhandene Aromatase, die Androgene zu Östrogenen konvertiert, sodass lokale Östrogenkonzentrationen 10mal höher sind als in der Zirkulation und diese über in der Postmenopause vermehrt vorhandener ER im Stroma agieren
2. Insulinresistenz und Hyperinsulinismus führen zu erhöhter IGF-I-Synthese mit mitogener und antiapoptotischer Wirkung vor allem bei Tumorüberexpression von IGF-IR. Außerdem führen erhöhte Insulinkonzentrationen zu vermindertem SHBG (Sexhormon Binding Globulin), sodass vermehrt Östrogene und Testosterone ungebunden zur Verfügung stehen. Zusätzlich würde der hemmende Effekt auf östrogeninduzierte Mammakarzinomproliferation von SHBG vermindert sein

3. Über genannte endo-, para- und autokrine Substanzen können Adipozyten durch Upregulation von Genen der Zellproliferation und -migration und Downregulation von Tumorsuppressorgenen das Tumorzellwachstum beeinflussen [Lorincz & Sukumar 2006].

Mit diesem Wissen stellt sich in unserem Versuch die Frage, wie sich die Mammae im Vergleich zur (menopausalen) Kontrollmamma verändert haben, ob ein die Mammainvolution östrogenähnlich vermindernder Effekt vorliegt, eine kontrollähnliche Mammainvolution oder gar eine das Fettgewebe erhöhende Wirkung mit eventuell größerem Risikos einer Mammakarzinomentstehung (vor allem auf Basis von vermehrtem, hyperplasieinduzierenden Kollagen VI aus Adipozyten) bzw. Tumorwachstumserhöhung auftritt.

Aus unseren Versuchsergebnissen ergab der Vergleich des Prozentsatzes des Fettgewebes am Gesamtpräparat in drei aus verschiedenen Schnittiefen hergestellten HE-Färbungen jeweils dreier Tiere pro Behandlungsgruppe keinen signifikanten Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen. Unglücklicherweise wies schon die Kontrolle als Bezug starke Schwankungen auf und es handelt sich pro Behandlungsgruppe nur um eine kleine Stichprobenzahl. Im Durchschnitt schwankte der Fettgehalt der Mammae insignifikant zwischen 10-15% des Gesamtpräparates.

Unter Östradiolbehandlung war der Fettgewebsanteil insignifikant geringer als in allen anderen Behandlungsgruppen. Dies ist tendenziell in Übereinstimmung mit der in der Literatur beschriebenen, verminderten allgemeinen Gewichtszunahme, Fettgewebsmasse und Adipozytenvolumen [Penza et al. 2006] in Ratten nach Ovariectomie mit darauf folgenden Östrogengaben im Vergleich zu Placebo, sowie auch des die menopausale Mammainvolution verhindernden Effektes von HRT [Zitate in der Eileitung der Cochrane Collaboration (2008): Oestrogen and progestogen hormone replacement therapy for peri-menopausal and post-menopausal women: weight and body fat distribution (Review)]. Interessanterweise hat sich unter keiner der anderen untersuchten Substanzen eine östrogene, das Fettgewebe vermindernde Wirkung gezeigt. Im Gegenteil war der Fettgewebsanteil -nach aufsteigender Größe geordnet- unter Soja, *BC* in niedriger Konzentration (inverse Dosis-Wirkungsbeziehung), *CR* dosisabhängig, *Ral* und hochdosiertem *SM* insignifikant höher als unter Placebo- bzw. Kontrollbehandlung.

Bezüglich der Sojabehandlung ist unser Ergebnis im Vergleich zu unserer insignifikanten, östrogenartigen ER- α -Downregulation und Befunden von Penza et al. (2006) überraschend. Penza et al. (2006) beschreiben an weiblichen Mäusen eine vermutlich über ER- β stattfindende antiadipogene, östrogene Wirkung von Genistein auf die Gesamtfettmasse.

Ebenfalls in Bezug auf die festgestellten, signifikant verminderten Rattengewichte in Raloxifen- und *CR*-behandelten Tieren ist unser Fund tendenziell erhöhten Fettanteils in den Mammæ überraschend. Dies könnte bedeuten, dass es unter diesen Substanzen speziell zu erhöhter Fettgewebsakkumulation in der Mamma im Vergleich zur Kontrolle und zur Gesamtkörperfettmasse gekommen ist, was die Frage nach einem folglich erhöhten Mammakarzinomrisiko aufwirft [Lorincz & Sukumar 2006]. Dabei ist jedoch genau genommen eine solch vergleichende Aussage schwierig, da uns keine Daten über die jeweilige Fettverteilung im Körper bzw. über den jeweiligen Anteil des Fettgewebes versus z.B. Muskelmasse/Knochen etc. am Gesamtkörpergewicht vorliegen. Außerdem hat Raloxifen zwar antiöstrogene Wirkung auf die Mamma mit zu erwartender Mammainvolution mit relativer Fettzunahme, jedoch allgemein bekanntlicherweise eine die Mammakarzinominzidenz vermindernde Wirkung.

Am Wahrscheinlichsten sind unsere Befunde einer Zunahme des Fettgewebsanteils über der unter Placebo als präparationsbedingt (s.o.) zu werten. Bei der Betrachtung all dieser Ergebnisse muss außerdem bedacht werden, dass die Ergebnisse insignifikant waren und damit nur zufällig verschieden sein könnten.

Histologie: Gefäßanzahl:

Um einen eventuellen Einfluss der im Versuch verwendeten Substanzen auf die Gefäßdichte der Mammæ festzustellen, wurden wie bei der Fettanteilsuntersuchung drei aus verschiedenen Schnitttiefen hergestellte HE-Färbungen jeweils dreier Tiere pro Behandlungsgruppe untersucht. Es wurde die Gefäßanzahl im gefäßreichsten Areal jedes Präparates ausgezählt.

In den Behandlungsgruppen *CR400*, *CR100* und *BC400* zeigte sich eine signifikant erhöhte Gefäßanzahl im Vergleich zur Kontrolle. Die gemessenen Unterschiede in der Gefäßanzahl der restlichen Behandlungsgruppen waren insignifikant und wiesen vermutlich durch die kleine Stichprobenzahl pro Behandlungsgruppe bedingt zum Teil große Variationsbreiten auf. Pro Präparat schwankte die Gefäßanzahl pro Gesichtsfeld bei 250facher Vergrößerung zwischen 1 und 25 Gefäßen.

Den Gefäßen kommt als Lieferant von Sauerstoff, Nährstoffen, zur Entfernung metabolisierter Stoffe und durch Ermöglichung eines lokalen Einflusses zirkulierender Substanzen (Hormonen u.a.) eine wichtige Rolle in der Zellerhaltung zu. Sie sind außerdem ein wichtiger begrenzender Faktor für normales und malignes Wachstum. Die Angiogenese als Prozess der Formation von neuen Gefäßabzweigungen aus vorhandenen Gefäßen durch

Endothelproliferation wird durch viele Substanzen beeinflusst und am stärksten durch VEGF reguliert [Hyder et al. 2000]. Es hat sich herausgestellt, dass in menschlichen Mammakarzinomzellen die VEGF-Expression neben multifaktoriellen, zum Teil noch nicht bekannten Einflüssen durch Östrogene über ER- α als auch $-\beta$ induzierbar ist [Hyder et al. 2000]. VEGF reguliert die Gefäßpermeabilität und führt damit zu vermehrter Durchblutung des Gewebes. VEGF bedingt durch Neovaskularisation eine erhöhte Einschwemmung von Wasser, Nährstoffen, kleinen Molekülen, Proteinen und anderen Wirkstoffen ins Gewebe. Außerdem kann VEGF die Endothelzellen zur Sekretion parakriner Wachstumsfaktoren und damit zur Proliferation stimulieren [Hyder et al. 2000].

In aufsteigender Reihenfolge hat sich die Gefäßanzahl insignifikant unter 17β -Östradiol und Soja und unter *BC* in hoher Dosis und *CR* dosisabhängig signifikant und am meisten erhöht. *SM*-Behandlung scheint verglichen zur Kontrolle keinen, oder einen insignifikant gering reduzierenden Effekt auf die Gefäßanzahl zu haben. Verglichen zur Kontrolle war die Gefäßanzahl in der Rattenmamma unter Raloxifen- und *BC* in niedriger Konzentration insignifikant vermindert.

Im Zusammenhang mit der Mammainvolution wäre eine geringe Gefäßanzahl in den Mammae unter Placebobehandlung einleuchtend. Östrogeneinfluß, speziell lokal in der Mamma hat sich als mit erhöhter VEGF-Expression und erhöhter Mikrogefäßdichte assoziiert gezeigt [Pavlakakis et al. 2008], womit die insignifikant erhöhte Gefäßanzahl in unserem Versuch erklärbar wäre.

Raloxifen hat sich in Übereinstimmung mit der Tendenz unserer Befunde in der Literatur im Zusammenhang mit vermindertem Vorkommen solider Mammatumoren als antiangiogen bewiesen.

Bezüglich eines eventuellen Angiogeneseeffektes von *CR* konnte ich in der Literatur keine Ergebnisse finden. Die von uns gemessene signifikant dosisabhängig erhöhte Gefäßanzahl und die oben erwähnte zumindest tendenziell erhöhte IGF-I-Expression unter *CR* sind überraschend. Wenn auch die in der Literatur publizierten Ergebnisse zum Teil widersprüchlich und damit einige auch unser Ergebnis unterstützend sind [siehe Kruse et al. 1999], wurden *CR* häufiger antiproliferative Effekte vor allem unter Berücksichtigung der großen Genexpressionsstudie von Gaube et al. (2006) zugeschrieben. Eine biphasische, dosisabhängige Wirkung, die die gegensätzlichen Befunde erklären könnte und wie sie für Östrogene, Soja und *SM* beschrieben wurde, ist für *CR* bisher nicht bekannt.

BC hat bei uns in niedriger Konzentration einen insignifikant gefäßvermindernden Trend und in hoher Konzentration einen signifikant gefäß erhöhenden Effekt gezeigt. Dies ist interessanterweise entsprechend der von uns gemessenen IGF-I-Expression, die jedoch unter niedriger *BC*-Konzentration im Gegensatz zum Effekt auf die Gefäßanzahl nicht geringer als die Kontrolle ausfällt. Dies steht im Gegensatz zu in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. *BC* wird generell eine die Angiogenese vermindernde Wirkung nachgesagt und hat soweit mir bekannt bisher keinen Effekt auf die Mamma gezeigt. Da die antiangiogene Wirkung und Antitumoraktivität von *BC in vivo* (an Mauslungenkarzinomen und –Sarkomen) und *in vitro* (auf Allantoinmembranen von Hühnerembryonen) bisher nur an Nicht-Mammageweben nachgewiesen wurde [Jung et al. 2003], könnten unsere Ergebnisse auf gewebspezifisch andersartige Effekte auf die Mamma hinweisen.

Ergebnisse bezüglich *SM*-Effekt auf die Mamma sind wie oben erklärt kontrovers und es wurde ein dosisabhängiger, biphasischer Effekt hypothetisiert [Malewicz et al. 2006]. Es wird *SM* ein antiangiogener Effekt mit Downregulation von Genen der Angiogenese (VEGF) im Zusammenhang mit antiproliferativem Effekt auf Mammakarzinomzellen nachgesagt [Abstract Agarwal et al. 2006]. Leider liegt mir zu dieser Veröffentlichung nur ein Abstract vor, sodass eine weitere Diskussion dieses Ergebnisses schwierig ist. Man könnte jedoch vermuten, dass sich der Angiogeneseeffekt ebenso biphasisch verhält wie der Effekt auf die Proliferation. Damit wären unsere Ergebnisse der tendenziell placebogleichen bzw. verminderten Gefäßanzahl nicht in Übereinstimmung mit unserer anhand der PCR *ER- α* - und IGF-I-Ergebnisse angenommene Dysregulationshypothese, die unter Außerachtlassen ihrer Insignifikanz eher einen proliferativen, östrogenen Effekt vermuten ließ.

Soja hat in unserem Versuch einen Trend zu geringer Erhöhung der Gefäßanzahl bei großer Variation der Ergebnisse gezeigt, was eine Aussage schwierig macht. Unter der bei uns verwendeten Sojakonzentration kam es nur zu einer tendenziell leicht höheren IGF-I-Expression im Vergleich zu Placebo. In der Literatur wird Soja unter anderem ein biphasischer, dosisabhängiger Effekt mit proliferationserhöhender Wirkung in niedrigen Konzentrationen und –vermindernder Wirkung unter hohen Sojakonzentrationen zugeschrieben [This et al. 2001, Maggiolini et al. 2001, Duffy et al. 2007]. Damit könnte man die von Gallo et al. (2006) festgestellte antiangiogenetische Wirkung von Soja im Zusammenhang mit von ihnen festgestellter, fehlender Proliferationserhöhung auf Mammakarzinomzellen erklären und vermuten, dass die Angiogenese sich ebenfalls biphasisch, dosisabhängig und proportional zur Proliferation verhält. Demnach könnte durch

unsere Ergebnisse die von uns verwendete Sojakonzentration als niedrig mit proliferationsinduzierender Wirkung gewertet werden.

Man darf bei all diesen Schlüssen und Vermutungen jedoch die Insignifikanz unserer Ergebnisse nicht außer Acht lassen.

Die Anzahl und Größe der Gefäße ist ebenfalls abhängig von der Schnittebene. Aufgrund anfänglich erklärter Präparatevorbereitungen konnte nicht gewährleistet werden, dass die Mammae in gleicher Orientierung in Paraffin eingebettet und geschnitten wurden. Vorhandene, insignifikante Schwankungen könnten deshalb dadurch erklärt werden, dass beispielsweise die Gefäße größer und in geringerer Anzahl an der Mammabasis in Muskelnähe sind und kleiner mit vergrößerter Gefäßfläche in der Peripherie der Mamma in Hautnähe sind.

Unsere Ergebnisse der Gefäßanzahlen erlauben maximal eine Aussage über einen eventuellen Gewebsvaskularisierungseffekt der Substanzbehandlungen im Vergleich zur Kontrolle und machen nicht zwangsläufig eine Aussage über stattgefundene Angiogenese im Sinne einer Neubildung von Gefäßen, die als Zeichen einer Proliferation von normalem Gewebe oder Tumorwachstum gewertet werden könnten.

Histologie: Drüsengewebe:

Die anfänglich beschriebenen Schwierigkeiten der Orientierung der Rattenmammar bei der Paraffineinbettung und dem Präparate schneiden sind vermutlich die Ursache der zum Teil extrem schwankenden Anzahl großer Drüsengänge in den Mammae. In Präparaten, in denen der Schneideprozess von der Haut und damit der Brustwarze angefangen wurde, sind mehr große, konfluierende Drüsengänge zu erwarten als verständlicherweise in Präparaten, die von der Thorax- oder Brustbasis aus geschnitten wurden. Die Anzahl großer Drüsengänge schwankte von Präparat zu Präparat zwischen 0 und 6. Aufgrund dieser offensichtlich fraglichen Aussagekraft der großen Drüsengänge möchte ich die Diskussion auf die Ergebnisse der Auszählung der kleinen Drüsenalveoli konzentrieren, die in geringerem Ausmaße durch die Schnittrichtung beeinflusst werden.

Es wurden wieder drei aus verschiedenen Schnittiefen hergestellte HE-Färbungen jeweils dreier Tiere pro Behandlungsgruppe untersucht. Dabei wurde bei 250facher Vergrößerung das drüsendichteste Areal aufgesucht und die Anzahl lumenhaltiger Drüsenalveoli ausgezählt. Es lagen im Vergleich der Behandlungsgruppen keine signifikanten Unterschiede in der Drüsenalveolienzahl vor und es kam vermutlich durch oben erwähnten, präparationsbedingten Einfluss zu starken Schwankungen in der Anzahl innerhalb jeder Behandlungsgruppe. Die

Drüsenanzahl schwankte von 1 Drüse bis zu 50 Drüsen pro Präparat. Die Auszählung der Drüsenalveoli in einer laktierenden Mamma als Vergleich einer unter bekanntem Proliferationseinfluß stehenden Rattenmamma ergab eine Drüsenanzahl von 70-85 pro Gesichtsfeld.

Unter Raloxifen-, *SM*- und Sojabehandlung kam es zu insignifikant verminderter Anzahl Drüsenalveoli verglichen zu unter Placebo. *CR* in niedriger Konzentration und *BC* in hoher Konzentration haben einen tendenziell placeboähnlichen Effekt auf die Drüsenanzahl. Ebenfalls die Ergebnisse unter Östradiolbehandlung sind überraschenderweise als kontrollähnlich zu werten. Letzteres unterstützt unsere zuvor erwähnte Vermutung, dass zumindest lokal in der Mamma hohe, antiöstrogen wirkende Östrogenkonzentrationen erreicht wurden.

Unter *BC* in geringer und *CR* in hoher Konzentration kam es zu insignifikant erhöhten Drüsenalveolienzahlen.

Dabei würde das Ergebnis unter *CR* dosisabhängig in Übereinstimmung mit signifikant erhöhter Gefäßzahl und insignifikant erhöhtem IGF-I als eventueller proliferationserhöhender Trend im Sinne der Ergebnisse von Kruse et al. (1999) ausgelegt werden können. Dies steht jedoch wie bereits diskutiert im Widerspruch zur Genexpressionsanalyse von Gaube et al. (2007).

Bei *BC* fehlt eine Dosisabhängigkeit und Drüsen- und Gefäßanzahl verhalten sich jeweils entgegengesetzt, während die IGF-I-Expression dem Gefäßtrend folgt. Diese Ergebnisse sind schwer in Zusammenhang zu bringen, sodass vorliegende Veränderungen als zufallsbeeinflusst erklärt werden müssen. In der Literatur wurde bisher kein Proliferationseffekt auf die Mamma gefunden [Seidlová-Wuttke et al. 2004] und es fehlen Untersuchungen über einen eventuellen Angiogeneseeffekt im Brustgewebe.

Wenn man die Insignifikanz unserer Ergebnisse ignoriert, um einen Trend aus unseren bisherigen Ergebnissen zu bekommen, so kann unter Raloxifen der Trend mit verminderter Drüsen- und Gefäßanzahl, vermehrtem Fettgewebe und geringerer IGF-I-Expression als unter Östradiol erwarteterweise in gegensätzlicher Richtung im Sinne einer Mammainvolution ausgelegt werden.

Der *SM*-Einfluss auf die Mamma könnte anhand unserer histologischen Ergebnisse mit kontrollähnlicher bzw. insignifikant verminderter Gefäßanzahl, verminderter Drüsenanzahl und gleich gebliebenem bzw. erhöhtem Fettgehalt im Vergleich zur Kontrolle als anti-proliferativ ausgelegt werden. Dabei sind begründet in der Tendenz der PCR Ergebnisse zu erhöhten IGF-I m-RNA, der östrogenartig downregulierten ER- α m-RNA im Zusammenhang mit in der Literatur beschriebenen unter anderem proliferativen Effekten [Malewicz et al.

2006] vor einer solchen Aussage weitere Untersuchungen nötig und *SM* muss als zumindest möglich riskante Substanz eingeordnet werden.

Die Ergebnisse unter Sojatherapie sind weniger einfach auszulegen. Während der Trend in Bezug auf die IGF-I-Expression, Fettgehalt und Drüsenzanzahl sich raloxifenähnlich, antiöstrogen verhielt, so ist überraschenderweise die Gefäßanzahl tendenziell erhöht und es zeigt sich eine wenn auch insignifikante östrogenartige ER- α m-RNA-Downregulation. Dies ist vor allem mit den im Zusammenhang mit antiproliferativen Konzentrationen von Soja beschriebenen antiangiogenetischen Wirkungen [Duffy et al. 2007] schwer zu erklären. Man könnte unter Beachtung der Theorie einer biphasischen, dosisabhängigen Wirkung von Soja annehmen, dass es zwischen den Phasen eine Übergangskonzentration gebe, bei der noch keine Proliferation vorkommt, doch wie bekannt für Wachstum benötigte erhöhte Vaskularisation in Vorbereitung bereits eingetreten ist.

Ein empirischer Vergleich der Epithelformen in den Drüsengängen und den Drüsenalveoli ergab, dass die Epithelzellen der Kontrollgruppe häufiger kubisch und ein-bis zweischichtig, in den östradiolbehandelten Tieren in der Mehrzahl zylindrisch und ein- bis zweischichtig bzw. -reihig und in den raloxifenbehandelten Tieren sowohl kubisch als auch zylindrisch ein-bis zweischichtig waren. Man beachte jedoch den Einfluss, den der Grad der Schnittebene in Bezug auf den Drüsengang auf die Form der Drüsengangsepithelien bei der histologischen Betrachtung hat. Um eine wissenschaftliche Aussage über die Epithelien machen zu können, müsste man in weiteren Untersuchungen entweder die Zell-/Nukleusdichte pro Drüsengang/Drüsenalveolus, die Zell-/Nukleusdichte in Relation zu gemessener Drüsenfläche oder die Größe bzw. Volumen der Epithelzellen ausmessen und diese Daten aus den verschiedenen Behandlungsgruppen mit einander vergleichen.

IV.3.2. Immunhistologie: Effekt von Placebo, Östradiol und Raloxifen

auf den Proliferationsfaktor Ki-67 im Vergleich zur laktierenden Mamma

Aufgrund der insignifikanten und schwer zu interpretierenden RT-PCR- und Histologieergebnisse in Bezug auf eine fragliche proliferationsinduzierende Wirkung der untersuchten Substanzen wurden Präparate der extremen Behandlungsgruppen Placebo bzw. Kontrolle, Östradiol und Raloxifen immunhistologisch auf den Proliferationsfaktor Ki-67 untersucht. Davon war neben der Etablierung der Färbungsmethode zu erwarten, die PCR- und Histologieergebnisse einfacher in den Kontext einer Proliferation stellen zu können und wenn

nötig ebenfalls Präparate der verbleibenden Behandlungsgruppen mit dieser Methode zu färben.

Das Ki-67-Antigen ist in den Zellkernen von allen sich in den Phasen G1, S, G2 und Mitosephase befindenden Zellen exprimiert. Ein erhöhter Index von Ki-67-positiven Zellen kann damit als Hinweis auf eine mögliche Proliferation im Gewebe angenommen werden. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass eine hohe Ki-67-Expression, wie Weihua et al. (2000) feststellt, nicht zwangsläufig mit erhöhter Proliferation und Zellteilung gleichgesetzt werden darf, da Zellen auch Ki-67-positiv sind, wenn sie in einem Zellzyklusstadium (G1, S, G2) vor der Mitosephase gehemmt worden sind.

Es konnten zwei immunhistologische Färbemethoden für Ki-67 etabliert werden, die APAAP-Methode (Alkalische Phosphatase - Anti-Alkalische Phosphatase) sowie die Färbung mit dem DAKO EnVision™-2-Schritt-Detektionssystem, das durch höhere Nachweisempfindlichkeit und verkürzten Versuchsablauf von Vorteil ist.

Es wurden wie bei den histologischen Färbungen jeweils drei aus verschiedenen Schnitttiefen hergestellte Präparate jeweils dreier Tiere der Behandlungsgruppen Placebo/Kontrolle, Östradiol und Raloxifen auf Expression des Proliferationsfaktor Ki-67 untersucht. Zur Auswertung der Präparate wurde nach Aufsuchen von vier verschiedenen Regionen auf dem jeweiligen Mammapräparat mit den höchsten Drüsendichten bei 500facher Vergrößerung die Anzahl der Ki-67-positiven Zellen bezogen auf die Anzahl sichtbarer Drüsenalveoli bestimmt. Aufgrund der überraschenden Ergebnisse wurden als Positivkontrolle mit sicher erhöhter Proliferationsrate im gleichen Färbeprozess Präparate einer laktierenden Mamma mitgefärbt und ausgewertet.

Nur die laktierende Mamma konnte signifikant erhöhte Ki-67-positive Zellen pro Drüsenalveoli aufweisen. Überraschenderweise ist die Anzahl Ki-67-positiver Drüsenalveoli unter Östradiolbehandlung verglichen zu Kontrolle/Placebo nur insignifikant und minimal erhöht mit starken Schwankungen der Einzelergebnisse. Demgegenüber ist unerwarteterweise, wenn auch ebenfalls insignifikant mit starken Schwankungen unter Raloxifenbehandlung das Verhältnis Ki-67-positiver Zellen zu Drüsenalveolanzahl stärker als unter Östradiol erhöht.

Diese Ergebnisse könnten mehrere Erklärungen haben. Es könnte durch die oben genannten Schwierigkeiten in der Präparateherstellung und der geringen Anzahl untersuchter Präparate pro Behandlungsgruppe zufällig zu geringerer Drüsenalveolanzahl und damit noch stärker vom Zufall abhängiger Schwankungen von Ki-67-positiven Zellen gekommen sein. In der laktierenden Mamma war mir aufgefallen, dass die Ki-67-positiven Zellen nicht gleichmäßig

in allen Alveoli verteilt sind, sondern dass es von Drüsenläppchen zu Drüsenläppchen starke Schwankungen in der Ki-67-Dichte gab. Es könnten aufgrund der kleinen Stichprobenzahl zufällig für Raloxifen mehr positive Läppchen gezählt worden sein als für Östradiol. Außerdem hat die Lokalisation der gezählten Drüsenalveoli in der Gesamtmamma einen Einfluss. Die Proliferation der Drüsen wäre vor allem in der Peripherie in Umgebung des Fettgewebes zu erwarten und wir könnten eventuell in den Präparaten der östradiol-behandelten Tiere dieses Areal nicht untersucht haben, wenn sie zufällig von der Brustwand aus angeschnitten worden wären.

Man beachte auch die Schwierigkeit nach Weihua et al. (2000), um erhöhte Ki-67-Positivität mit Proliferation gleichzusetzen. Raloxifen, das sich in der Literatur meist als ohne Einfluss auf das Mammagewebe oder als östrogenantagonistisch darstellt, könnte eventuell seine antiproliferative Wirkung durch Regulationsmechanismen ausüben, die die Zellen vor der Mitosephase arrestieren und damit trotzdem erhöhte Ki-67-positive Zellen aufweisen.

Wenn wir diese methodenabhängigen Einflüsse außer Acht lassen, wäre eine Überlegung, ob die Raloxifendosis für die Ratten entsprechend hoch war, dass antiproliferative Effekte vermindert sind. In einer Studie über den Effekt verschiedener Raloxifendosen auf die Mammae von Karzinompatientinnen haben Dowsett et al. (2001) festgestellt, dass Raloxifen keinen Effekt auf Apoptosemarker hat, in hoher Dosis (600mg im Gegensatz zu 60mg) keinen signifikanten antiproliferativen, d.h. Ki-67-positive Zellen reduzierenden Effekt im Vergleich zu Placebo hat und auf ER-negative Zellen wirkungslos ist. Diese Ergebnisse ergeben mehrere Erklärungsansätze für unsere tendenziell erhöhten Ki-67-positiven Zellen.

Der Rattenmetabolismus nach Nahrungsaufnahme variiert bekanntlicherweise im Vergleich zum Menschen und es wäre möglich, dass es ähnlich wie für unter Sojabehandlung beschrieben zu sehr viel höheren Plasma-Raloxifenkonzentrationen in den Ratten gekommen wäre als die beabsichtigten Menschenäquivalente und so eine proliferationshemmende Wirkung auf die Mamma nicht vorhanden war. Wenn Raloxifen keinen Effekt auf Apoptosemarker hat, könnte es bedeuten, dass Ki-67-positive Zellen (vorausgesetzt, dass sie sich nicht im sich teilenden Stadium befinden) nicht vermehrt abgebaut werden, da Abbauraten der Zellen entsprechend denen in der Kontrolle sind, aber aufgrund von oben angenommenen Regulationsmechanismen vermehrt Ki-67-positive Zellen vorhanden sind. Da Raloxifen nicht auf ER-negative Zellen proliferationshemmend wirken kann und die Mehrheit der Mammaepithelien in normaler Mamma ER-negativ sind, ist Raloxifen auf diese ineffektiv.

Weiterhin könnten unsere überraschenden Ergebnisse des Vergleiches von Östradiol- und Raloxifeneffekt durch die proliferationshemmende Östrogenwirkung bedingt sein. Östrogene haben in den In-vitro-Untersuchungen der Arbeitsgruppe Neßelhut et al. (1993) einen biphasischen Effekt auf Mammakarzinomzellen mit Hemmung der Proliferation in hohen Konzentrationen gezeigt. Hanstein et al. (2004) erwähnt ebenfalls in seinem Review klinische Studien, die eine antiöstrogene und das Mammakarzinomwachstum hemmende Wirkung von hochdosierten Östrogenen nachgewiesen hatten. Man muss sich fragen, ob es wie bereits für die ER- α -Genexpression und Drüsengewebshistologie diskutiert durch Rattenmetabolismus bedingt zu proliferationshemmend, antiöstrogen wirkenden, hohen Östrogenkonzentrationen lokal in der Mamma gekommen sei. Dieser Erklärungsansatz scheint vor allem unter Beachtung der Ergebnisse von Fendrick et al. (1998) möglich. Nach den Resultaten der Arbeitsgruppe Fendrick et al. (1998) würden wir an ovariectomierten Ratten nach Östrogengaben eine dramatische Proliferation mit Wachstum der Mammarydrüse entsprechend der Rattenpubertät und 3fach höherer Proliferationsinduktion auf Epithel- als auch Stromazellen in Drüsennähe unter Östrogenen als in nicht-ovariectomierten gleichaltrigen Kontrolltieren erwarten. Ein solcher Effekt ist, wie aus unseren PCR- und histologischen Daten ersichtlich, nicht eingetreten, was die Hypothese der unbeabsichtigt lokal hemmend hohen Östrogenkonzentrationen unterstützt.

V. Zusammenfassung

Das Leiden an teils starken subjektiven und körperlichen perimenopausalen Beschwerden veranlasst viele Frauen trotz der bekannten, teilweise schwerwiegenden Nebenwirkungen (erhöhte thromboembolische Komplikationen, erhöhtes Risiko zu KHK, Schlaganfällen mit schlechterer Prognose und Mammakarzinomen) zu der Einnahme von HRT als hormoneller Substitutionstherapie. Nebenbei spielt diese Lebensphase aufgrund ihrer physiologisch bedingten Effekte (verstärkte Osteoporose mit erhöhter Frakturhäufigkeit) wirtschaftlich eine große Rolle, sodass HRT ebenfalls gerne verschrieben werden. Es haben sich im Laufe der Zeit mehrere pflanzliche Produkte, u.a. die „Phytoöstrogene“ mit fraglichen positiven, eventuell östrogenen Effekten auf perimenopausale Symptome als Alternativen zu HRT herauskristallisiert. Diese werden bereits zum Teil von Ärzten verschrieben oder von Frauen in der Selbsttherapie als harmlos angesehen und zur Nahrungsergänzung eingenommen. Vielfach liegen in der Literatur wenige oder kontroverse Daten bezüglich ihrer Effektivität, Wirkung, ihres Wirkungsmechanismus inklusive Wechselwirkungen und vor allem ihres Risikoprofiles vor.

In der vorliegenden Arbeit wurde anhand von ovariectomierten Ratten der Effekt der Substanzen Soja, *Cimicifuga racemosa*, *Belamcanda chinensis* und *Silybum marianum* im Vergleich zu 17 β -Östradiol, Kontrolle und Raloxifen außer auf das Rattengewicht hauptsächlich auf die Mamma untersucht.

Die Rattenmammas wurden mittels histologischer Färbemethoden zur generellen Beschreibung der Mammamorphologie und durch Beobachtung eventueller Effekte auf Vaskularisation, Drüsen- und Fettdichte auf Veränderungen durch zu erforschende Substanzen untersucht.

Zur Analyse fraglicher östrogenen Wirkungen wurde der Effekt der Behandlungssubstanzen auf die Östrogenrezeptoren auf m-RNA-Ebene mittels Genexpressionsstudien (PCR) festgestellt. Zur Beantwortung der Frage nach möglichen proliferativen Effekten auf Mammastrukturen wurde die Genexpression von IGF-I m-RNA mit der PCR-Methode quantifiziert. Schließlich wurde zur Etablierung der Methode für spätere Versuche das Vorkommen des Proliferationsfaktors Ki-67 immunhistologisch in den Mammas der östradiol-, placebo- und raloxifenbehandelten Tiere dargestellt.

Morphologisch bestanden die Mammas mit anhängendem Gewebe aus Fettgewebe mit Adipozyten, verschieden dichtem Bindegewebe, konfluierenden, großen Drüsengängen,

kleinen Drüsenalveoli, glatten und quergestreiften Muskelzellen, Lymph- und Blutgefäßen, mehrschichtig verhornendem Plattenepithel der Haut und Haaren mit Haarfollikeln, Talg- und Schweißdrüsen.

ER- β m-RNA war mit unseren PCR-Untersuchungen nicht nachweisbar. Gegensätzliche Aussagen in der Literatur über häufiges ER- β -Vorkommen in der Mamma sind vermutlich in spezies- und gewebspezifischem, oft beschriebenem Vorhandensein von m-RNA- und Protein Splice-Varianten begründet [Palmieri et al. 2002, Dahlman et al. 2006].

Zusammenfassend kann folgendes über die einzelnen Behandlungsgruppen gesagt werden:

Östradiolbehandlung hat erwarteterweise signifikant das Körpergewicht der Ratten reduziert und insignifikant im Sinne einer Involutionshemmung war der Fettgewebsanteil der Mamma vermindert, die Gefäßanzahl, ebenso wie IGF-I tendenziell im Vergleich zur Kontrolle angestiegen. Die Effekte auf die Mamma waren jedoch insignifikant und nicht entsprechend den nach Fendrick et al. (1998) erwarteten starken Östrogeneffekten im Sinne einer Proliferation verändert. Deshalb kann unter Berücksichtigung der insignifikanten, antiöstrogenen ER- α -Upregulation, der kontrollähnlichen Drüsenzahzahl und geringen Ki-67-Positivität der Drüsenepithelien angenommen werden, dass in der Mamma ebenso lokal hemmend hohe Östrogenkonzentrationen [Neßelhut et al. 1993, Hanstein et al. 2004] erreicht worden sein könnten.

Wie von der Arbeitsgruppe Glaeser et al. (2006) zuvor beschrieben, hatte Raloxifenbehandlung bei uns keinen Einfluss auf die ER- α -Expression. Erwartungsgemäß zeigten sich im Sinne eines SERM zumindest tendenziell eine östrogene Wirkung auf das Körpergewicht und eine antiöstrogene Wirkung auf die Mamma. Letzteres kann aus dem Trend einer geringeren IGF-I-Expression als unter 17 β -Östradiol und histologisch kontrollähnlich verminderten Gefäßanzahl und Drüsengewebe bei tendenziell vermehrtem Fettgewebsanteil abgeleitet werden. Der fehlende Ki-67 reduzierende Effekt im Vergleich zu 17 β -Östradiol könnte, abgesehen von präparationsbedingten Einflüssen an lokal hohen Raloxifenkonzentrationen in der Mamma liegen, wodurch sein antiproliferativer Effekt nachgewiesenerweise vermindert ist [Dowsett et al. 2001], an raloxifenbedingten, antiproliferativen Effekten möglicherweise durch Arrest der Mammaepithelien vor der Teilungsphase, oder im Vergleich an stärker die Proliferation hemmenden hohen Östrogenkonzentrationen [Neßelhut et al. 1993, Hanstein et al. 2004].

Sojabehandlung hat die ER beeinflussende Effekte, wie an der Tendenz einer ER- α -Downregulation ersichtlich. Das Körpergewicht ist insignifikant, jedoch mit leichtem, östrogenartig reduzierendem Trend verändert, die IGF-I-Expression ist insignifikant leicht im Vergleich zu Placebo erhöht. Demgegenüber verhalten sich der (insignifikant) erhöhte Fettgehalt und die (insignifikant) verminderte Drüsenanzahl in der Mamma im Vergleich zur Kontrolle im Sinne einer Involution, was auf keinen bzw. einen proliferationshemmenden Effekt hinweist. Die -wenn auch insignifikant- erhöhte Gefäßanzahl muss jedoch als Warnung einer möglicherweise in Vorbereitung einer Proliferation stattgefundenen Reaktion gewertet werden. Damit ist die lokale Sojakonzentration in der Mamma als möglicherweise in der mehrfach beschriebenen, biphasischen, dosisabhängigen Wirkungstheorie [Maggiolini et al. 2001, This et al. 2001, Allred et al. 2001, Duffy et al. 2007] im Übergangsbereich zwischen Hervorrufung östrogenen und antiöstrogenen Effekte lokalisiert.

Unsere Ergebnisse bezüglich des Effektes von *CR* weisen ähnlich denen von Kruse et al. (1999) zumindest im Rattenmodell auf einen möglichen proliferativen Effekt auf die Mamma hin. Das Körpergewicht war signifikant, dem östrogenen Trend folgend vermindert. Es fand sich eine Tendenz zur östrogenen ER- α -Downregulation unter *CR*, was die mehrfach in der Literatur beschriebene Feststellung unterstützt [Gaubé et al. 2007], wenn auch nach der Literatur nichtöstrogene Regulationswege eine größere Rolle in der *CR*-Wirkung zugesprochen werden. *CR*-Behandlung führte bei uns zu insignifikant erhöhter IGF-I Expression, Drüsenanzahl und signifikant erhöhter Gefäßanzahl. Trotz der von Gaubé et al. (2007) behaupteten antiproliferativen Wirkung von *CR* könnten aufgrund möglicherweise verschiedener Inhaltsstoffkonzentrationen, verschiedener Relationen der Inhaltsstoffe mit unterschiedlichen Wirkungen (beispielsweise phytoöstrogene Bestandteile mit proliferativem Effekt versus dopaminerge mit antiproliferativem), Wirkungsabhängigkeit vom Extraktionsverfahren, Wirkungsdauer und dem Einfluss individuell variierender Metabolismen unsere von Gaubé et al. verschiedenen Ergebnisse begründet sein. Aufgrund unserer Ergebnisse im Zusammenhang mit ähnlichen, publizierten Resultaten von Kruse et al. (1999) muß momentan ohne weitere Forschung zu Vorsicht im Gebrauch von *CR* geraten werden.

Unsere Ergebnisse hinsichtlich des *BC*-Effektes sind abgesehen von signifikant erhöhter Gefäßzahl (unter hoher *BC* Konzentration) insignifikant. Sie unterliegen starken Schwankungen und scheinen sich teilweise zu widersprechen, doch kann ein möglicher Effekt auf erhöhte Vaskularisation der Mamma und Erhöhung der Proliferation (tendenziell

vermehrte Drüsenanzahl und erhöhte IGF-I-Expression) nicht völlig abgestritten werden. Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass meines Wissens die Effekte von *BC* auf die Rattenmamma nicht häufig untersucht worden sind und keine Untersuchungen zum Angiogeneseeffekt von *BC* auf die Mamma vorliegen, muss der Effekt von *BC* auf die Mamma vor seiner Verwendung als Alternative zu HRT noch weiter untersucht werden.

Ebenfalls bezüglich des *SM*-Effektes sind unsere Ergebnisse aufgrund von Insignifikanz und starken Schwankungen schwer auszuwerten. Der Trend zur ER- α -Expressionsupregulation könnte ähnlich Bhatia et al. (1999) und Zi et al. (1998) im Sinne antiöstrogener, antiproliferativer Effekte auf die Mamma ausgelegt werden, ebenso wie die insignifikant verminderte Gefäß- und Drüsenanzahl und unter der Annahme hemmender Östrogenkonzentrationen die östrogenähnliche IGF-I-Expression.

Inwiefern die zum Teil widersprüchlichen Ergebnisse aus Tier- und In-vitro-Versuchen auf den Menschen übertragbar sind, inwieweit mit *SM* aufgrund der schlechten Bioverfügbarkeit im Menschen ausreichende Konzentrationen (nach 360mg *SM* ist maximale Silybinplasmakonzentration ca. 0,05 μ g/ml und damit 5-10mal geringer als in Ratten [Malewicz et al. 2006] erreicht werden können, um Effekte hervorzurufen, und inwiefern verschiedene Substanzen im *SM*-Extrakt unterschiedliche Wirkung haben, muß noch weiter erforscht werden. Wenn man jedoch die von Malewicz et al. (2006) beschriebenen dosisabhängigen, biphasischen Effekte auf menschliche Mammakarzinomzelllinien und den sogar tumor-induzierenden Effekt auf Mäusemammas beachtet, kann *SM* gleichermaßen zur Zeit nicht als sichere HRT-Alternative ohne weitere Untersuchungen empfohlen werden.

Bei dem Vergleich der Ergebnisse der verschiedenen Futtergruppen muß die Insignifikanz unserer Ergebnisse, die präparationsbedingten Einflüsse, die Stichprobengröße und die fragliche Übertragbarkeit der Ergebnisse vom Rattenmodell auf den Menschen im Auge behalten werden. Aufgrund unserer Resultate zusammen mit den in der Literatur teilweise kontroversen Ergebnissen können entsprechende Schlüsse nur mit Vorsicht gemacht werden und es ist noch mehr Forschungsarbeit nötig, bevor (einige) diese(r) Substanzen als sichere Alternativen ohne Effekt auf die Mamma klassifiziert werden können.

VI. Anhang

VI.1. Versuchsprotokolle

VI.1.1. Immunzytochemische Detektion des Zytokeratins in der Mamma der Ratte mittels der PAP-Färbemethode

1. Präparate werden durch 2x10 min Aufenthalt in Xylol entparaffiniert
2. Sie werden rehydriert, indem sie je eine Minute in 100%igen, dann 96%igen und schließlich 75%igen Äthanol gehalten werden
3. 3x5 min Waschen unter der Bewegung eines Schüttlers in Trispuffer (TBS = 0,05M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6) zur Reduzierung der Hintergrundfärbung
4. 15 min Inkubation der Schnitte bei 37 °C mit einer 0,1%-igen Trypsinlösung (mit 0,1%-igen CaCl₂-Lösung, 0,05 M Tris/HCl und 0,15 M NaCl, pH 7,8 angesetzt) zum proteolytischen Andau der formalinfixierungsbedingten Aldehydvernetzungen
5. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
6. 10min Inkubation mit dem Peroxidase-Blockingreagenz (DAKO S-2001) zum Hemmen der endogenen Peroxidaseaktivität
7. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
8. 30 min Inkubation der Schnitte mit 5% Rinderserumalbumin (BSA =Bovine Serum Albumin) in TBS-Puffer verdünnt zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen bedingt durch stark geladenes Kollagen und andere Gewebebestandteile
9. 30 min Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem jeweiligen Antikörper, in Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S 3022) gelöst
Antikörper und verwendete Verdünnung:
polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen gegen Zytokeratin der Ratte
Cytokeratin, Wide Spectrum Screening, DAKO Z 0622;
wurde für diese Färbungen 1:1000 verdünnt
10. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
11. 30 min Inkubation mit dem 1:100 - ebenfalls mit dem Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S 3022) - verdünntem Schwein-Antikaninchen-Brückenantikörper (DAKO Z 0196) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
12. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
13. 30 min Inkubation mit dem 1:100 - ebenfalls mit dem Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S 3022) - verdünntem Kaninchen PAP-Komplex (DAKO Z 0113) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
14. 2x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
15. kurz in bidestilliertes Wasser
16. 20 min Inkubation mit dem Chromogen bei Raumtemperatur im Dunkeln:
 - 16.1. AEC-Chomogensubstrat
 - AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol in N,N-Dimethylformamid gelöst, zum Gebrauch in Azetatpuffer pH 5,2 angesetzt und Wasserstoffperoxid zugefügt)-Chromogensubstrat
 - kurz in bidestilliertes Wasser
 - 3 min Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
 - 5 min in lauwarmen Leitungswasser bläuen
 - Eindecken mit dem Einschlußmedium Glycergel (DAKO C 0563), da das Chromogen in organischen Lösungsmitteln löslich ist bzw. alternativ

16.2. DAB-Chromogensubstrat

- DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid in Trispuffer, pH7,6 gelöst) - Chromogensubstrat, DAB Plus-Substrat DAKO K 3468
- kurz in bidestilliertes Wasser
- 3 min Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 5 min in lauwarmen Leitungswasser bläuen
- Entwässern der Präparate über eine aufsteigende Äthanolreihe (je 1min in 75%igem, 96%igem und schließlich 100%igem Äthanol)
- 2x 5min in Xylol
- Eindecken mit dem Einschlussmedium DePeX auf der Basis von Xylol, da dieses Chromogen wasserlöslich ist

VI.1.2. Immunzytochemische Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 gegen das MIB-5-Antigen der Ratte mittels der APAAP-Färbemethode

1. Präparate werden durch 2x10 min Aufenthalt in Xylol entparaffiniert
2. Sie werden rehydriert, indem sie je eine Minute in 100%igen, dann 96%igen und schließlich 75%igen Äthanol gehalten werden
3. kurz in bidestilliertes Wasser
4. 5 min Waschen unter der Bewegung eines Schüttlers in Trispuffer (TBS = 0,05M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6) zur Reduzierung der Hintergrundfärbung
5. 30min Inkubation im 95 °C Wasserbad unter Bewegung in Target Retrieval Solution, pH6 (DAKO S 1699)
6. 20 min abkühlen lassen bei Raumtemperatur
7. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
8. 30min Inkubation der Schnitte mit 5% Rinderserumalbumin (BSA =Bovine Serum Albumin) in TBS-Puffer verdünnt zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen bedingt durch stark geladenes Kollagen und andere Gewebebestandteile
9. 30min Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem monoklonalen Antikörper MIB-5 (DAKO M 724859) aus der Maus gegen das Ki-67-Antigen der Ratte, der in Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S 3022) 1:50 verdünnt wurde
10. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
11. 30min Inkubation mit dem 1:50 - ebenfalls mit dem Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S 3022) - verdünntem Kaninchen-Antimaus-Brückenantikörper (DAKO Z 0259) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer
12. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
13. 30 min Inkubation mit dem 1:50 - ebenfalls mit dem Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S 3022) - verdünntem Maus APAAP-Komplex (DAKO D 0651) bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln
14. 2x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
15. kurz in bidestilliertes Wasser
16. 15 min Inkubation mit dem Chromogen bei Raumtemperatur im Dunkeln:
 - 16.1 DAKO Fuchsin Substrate Chromogen System (DAKO K 0624), Levamisol (DAKO X 3021) wurde zum Blocken der endogenen alkalischen Phosphatase hinzugefügt
 - kurz in bidestilliertes Wasser
 - 3 min Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
 - 5 min in lauwarmen Leitungswasser bläuen

- Eindecken mit dem Einschlussmedium Glycergel (DAKO C 0563), da das Chromogen in organischen Lösungsmitteln löslich ist
bzw. alternativ

16.2. Fast Red-Substrat

- kurz in bidestilliertes Wasser
- 3 min Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 5 min in lauwarmen Leitungswasser bläuen
- Eindecken mit dem Einschlussmedium Glycergel (DAKO C 0563), da das Chromogen in organischen Lösungsmitteln löslich ist

VI.1.3. Immunzytochemische Detektion des Proliferationsmarkers Ki-67 gegen das MIB-5-Antigen der Ratte mittels der EnVision™-Färbetechnik

(Zur Optimierung der Färbeergebnisse mußte darauf geachtet werden, daß alle verwendeten Substanzen bei Gebrauch Raumtemperatur besaßen)

1. Präparate werden durch 2x10 min Aufenthalt in Xylol entparaffiniert
2. Sie werden rehydriert, indem sie je eine Minute in 100%igen, dann 96%igen und schließlich 75%igen Äthanol gehalten werden
3. kurz in bidestilliertes Wasser
4. 5 min Waschen unter der Bewegung eines Schüttlers in Trispuffer (TBS = 0,05M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, pH 7,6) zur Reduzierung der Hintergrundfärbung
5. 30 min Inkubation im 95 °C Wasserbad unter Bewegung in Target Retrieval Solution, pH6 (DAKO S 1699)
6. 20 min abkühlen lassen bei Raumtemperatur
7. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
8. 30 min Inkubation mit dem Peroxidase-Blockingreagenz (DAKO S-2001) zum Hemmen der endogenen Peroxidasereaktivität
9. kurz in bidestilliertes Wasser
10. 10 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
11. 30 min Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit dem monoklonalen Antikörper MIB-5 (DAKO M 724859) aus der Maus gegen das Ki-67-Antigen der Ratte, der in Antikörperverdünnungsmedium (DAKO S 3022) 1:50 verdünnt wurde
12. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
13. 30 min Inkubation der Schnitte bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer mit EnVision™+ Ziege Anti-Maus Peroxidase (DAKO K 4000), Ready To Use
14. 3x5 min Waschen in Trispuffer (s.o.) unter der Bewegung
15. kurz in bidestilliertes Wasser
16. 20 min Inkubation mit dem Chromogen bei Raumtemperatur im Dunkeln:
 - 16.1. AEC-Chromogensubstrat
 - AEC (3-Amino-9-ethylcarbazol in N,N-Dimethylformamid gelöst, zum Gebrauch in Azetatpuffer pH 5,2 angesetzt und Wasserstoffperoxid zugefügt)-Chromogensubstrat
 - kurz in bidestilliertes Wasser
 - 3 min Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
 - 5 min in lauwarmen Leitungswasser bläuen
 - Eindecken mit dem Einschlussmedium Glycergel (DAKO C 0563), da das Chromogen in organischen Lösungsmitteln löslich ist
bzw. alternativ
 - 16.2. DAB-Chromogensubstrat

- DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid in Trispuffer, pH7,6 gelöst) - Chromogensubstrat, DAB Plus-Substrat DAKO K 3468
- kurz in bidestilliertes Wasser
- 3 min Gegenfärben mit Mayers Hämalaun
- 5 min in lauwarmen Leitungswasser bläuen
- Entwässern der Präparate über eine aufsteigende Äthanolreihe (je 1min in 75%igen, 96%igen und schließlich 100%igen Äthanol)
- 2x5 min in Xylol
- Eindecken mit dem Einschlussmedium DePeX auf der Basis von Xylol, da dieses Chromogen wasserlöslich ist

VI.2. Abbildungsverzeichnis

Abb 1.: Prinzip der Immunhistochemie mit Östrogenrezeptor-alpha, Östrogenrezeptor-beta, IGF-1 und Zytokeratin: PAP-Färbemethode	32
Abb 2.: Prinzip der Immunhistochemie mit dem Proliferationsmarker Ki-67: APAAP-Färbemethode	33
Abb 3.: Messung der Körpergewichte der Ratten aus den verschiedenen Behandlungsgruppen direkt vor der Ovariectomie im Alter von 4 Wochen (es lag noch keine Behandlung mit den dem Futter zugemischten Substanzen vor) und nach 3 Monaten der Aufnahme des spezifischen Futters	35
Abb 4.: Darstellung des Einflusses 3-monatiger Behandlung mit dem Futter zugefügten Substanzen auf die Genexpression von ER- α in den Rattenmammas	36
Abb 5.: Darstellung des Einflusses 3-monatiger Behandlung mit dem Futter zugefügten Substanzen auf die Genexpression von ER- α in den Rattenmammas	38
Abb 6.: Ergebnisse der Auszählung 1. des prozentualen Anteiles des Fettgewebes am Mammagewebe bei 62,5x Vergrößerung, 2. der Anzahl Gefäße an der gefäßdichtesten Stelle des jeweiligen Präparates bei 62,5x Vergrößerung aufgesucht und bei 250x Vergrößerung ausgezählt, 3. der Anzahl der großen Drüsengänge im gesamten Mammapräparat und 4. die Anzahl der Drüsenalveoli bei 250x Vergrößerung an dem drüsendichtesten Areal ausgezählt	40
Abb 7.: Darstellung der Auszählung Ki-67-positivgefärbter Zellen/ Anzahl Drüsenalveoli in den Mammas der Behandlungsgruppen Placebo, 17 β -Östradiol und Raloxifen bei 500x Vergrößerung. Es wurde außerdem das Präparat einer laktierenden Mamma als Positivkontrolle mit gefärbt und ausgewertet.	42

VI.3. Abkürzungen

AEC	3-Amino-9-Ethyl-Karbazol, ein immunhistologisches „rotes“ Chromogen
AhR	Aryl-Hydrokarbon-Rezeptor
Anti-Dig-Ak	Antikörper gegen das Digitalissteroid einer Sonde
APAAP	Alkalische-Phosphatase-antialkalische-Phosphataseantikörper
BC	<i>Belamcanda chinensis</i>
BMI	Body Mass Index
C3	Komplementfaktor 3, sensitiver östrogenregulierter Parameter in der Ratte
cDNA	komplementäre DNA
CR	<i>Cimicifuga racemosa</i>
CYP1A1	ein Zytochrom P450, involviert in der Biotransformation von synthetischen und natürlichen Substanzen, aktiviert über den AhR-Signalweg
DAB	3,3'-Diaminobenzidine, ein immunhistologisch verwendetes „braunes“ Chromogen
DMDC	Dimethyldicarbonat=E242
DNA	Desoxyribonukleinsäure
D2R	Dopaminrezeptor 2
E ₂	Estradiol-17-beta
EGF	Epidermal Growth Factor
ER	Östrogen Rezeptor
ER- α	Östrogen Rezeptor alpha
ER- β	Östrogen Rezeptor beta
ERE	estrogen response element
Fab	Fragment eines Antikörpers für die Antigenbindung
Fc	fragment crystalline
FCS	fetal calf serum
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
HbGEF	Hemoglobin Binding Epidermal Growth Factor, ein das Uteruswachstum fördernder Wachstumsfaktor
HDL	high density lipoprotein
HE oder H/E	Hämatoxilin-Eosin
HRE	hormone response element
HRP	horse radish peroxidase
HRT	hormone replacement therapy
5HT1A	Serotoninrezeptor 1A
5HT7	Serotoninrezeptor 7
ICI-164384	SERM mit reiner östrogenantagonistischer Wirkung
IGF-1	insulin-like growth factor 1
IGFBP	insulin-like growth factor binding protein
IGF-1R	insulin-like growth factor 1 receptor
IH	Immunhistochemie
IL	Interleukin
i.p.	intraperitoneal
IRS	Insulin Receptor Substrate
ISOR	Isorhapontigenin (BC)

i.v.	intravenös
KHK	koronare Herzkrankheit
Ki-67	Proliferationsfaktor
LDL	low density lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
LNCaP	Prostatakarzinomzelllinie
MCF-7	östrogenrezeptorpositive, menschliche Mammakarzinomzelllinie
MDA-MB468	östrogenunabhängige, menschliche Mammakarzinomzelllinie
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
MMTV-Wnt-1	Mäuse - transgene Mäuse, anfällig für die Entwicklung von Mammaadenokarzinomen
mRNA	messenger- Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
ovex	ovarektomiert
PAH	Polyzyklische aromatische Hydrokarbone
PAP	Peroxidase-Antiperoxidasekomplex
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PMS	prämenstruelles Syndrom
p.o.	per os, oral
pS2	Epithelialer Zellmarker und ein sensitiver Marker der ER- α Aktivierung
Ral	Raloxifen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute
RT	Reverse Transkription
RUTH	Raloxifene Use for the Heart/ klinische Studie
s.c.	subkutan
SEM	Standard error of the mean
SERM	selective estrogen receptor modulator
SHBG	Sexhormone Binding Globulin
SM	<i>Silybum marianum</i>
S-Phase	Synthesephase im Zellzyklus
STAR	Study of Tamoxifen and Raloxifen 2006/klinische Studie
Taq	Thermophilus aquaticus
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
VEGF	Vascular endothelial growth factor
Wnt-1	Protoonkogen, kodiert sekretorische Glykoproteine, die auto- und parakrin die Zellproliferation und -differenzierung regulieren
ZNS	Zentrales Nervensystem

VII. Literaturverzeichnis

ABC Clinical Guide to Herbs. Thieme Stuttgart, New York 2003

Agarwal R, Agarwal C, Ichikawa H, Singh RP, Aggarwal BB (2006): Anticancer potential of silymarin: from bench to bed side.

Anticancer Res 26(6B):4457-98

Albertazzi P, Pansini F, Bonaccorsi G, Zanotti L, Fortini E & De, Aloysio D (1998): The effects of dietary soy supplementation on hot flushes. *Obstet Gynecol* 9: 6-11

Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM, Helferich WG (2001): Soy Diets Containing Varying Amounts of Genistein Stimulate Growth of Estrogen-dependent (MCF-7) Tumors in a Dose-dependent Manner. *Cancer Res* 61: 5045–5050

Allred CD, Allred KF, Ju YH, Goepfing TS, Doerge DR, Helferich WG (2004): Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors.

Carcinogenesis 25(9): 1649-1657

Anderson JW, Johnstone BM & Cook-Newell ME (1995): Metaanalysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 333:276-282

Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacemicz-Sauntzakis M, Guo P & Kukreja SC (1996): Dietary soy bean protei prevents bone loss in an ovariectomised rat model of osteoporosis. *J Nutr* 126: 161-167

Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK (2006): Effects of Raloxifen on Cardiovascular Events and Breast Cancer in Postmenopausal Women. *N Eng J Med* 355(2):125-137

Bhatia N, Zhao J, Wolf DM, Agarwal R (1999): Inhibition of human carcinoma cell growth and DNA synthesis by Silybinin, an active constituent of milk thistle: comparison with Silymarin. *Cancer Lett* 147:77-84

Bodinet C, Freudenstein J (2002): Influence of *Cimicifuga racemosa* on the proliferation of strogen receptor-positive human breast cancer cells.

Breast Cancer Res Treat 76: 1-10

Borrelli F, Ernst E (2002): *Cimicifuga racemosa*: a systematic review of its clinical efficacy. *Eur J Clin Pharmacol* 58: 235-241

Burdette JE, Lui J, Lantvit D, Lim E, Booth N, Bhat KPL, Hedayat S, Van Breemen RB, Constantinou AI, Pezzuto JM, Farnsworth NR, Bolton JL (2002): *Trifolium pratense* (Red Clover) exhibits estrogenic effects *in vivo* in ovariectomized Sprague-Dawley rats.

J Nutr 132: 27-30

Burdette JE, Liu J, Chen SN, Fabricant DS, Piersen CE, Barker EL, Pezzuto JM, Mesecar A, Van Breemen RB, Farnsworth NR, Bolton JL (2003): Black Cohosh Acts as a Mixed Competitive Ligand and Partial Agonist of the Serotonin Receptor.

J Agric Food Chem 51(19):5661-70

Celis JE, Moreira JMA, Cabezo´ n M, Gromov P, Friis E, Rank F, Gromova I (2005): Identification of Extracellular and Intracellular Signaling Components of the Mammary Adipose Tissue and Its Interstitial Fluid in High Risk Breast Cancer Patients.

Mol Cell Proteomics 4(4):492-522

The Cochrane Collaboration: Farquhar CM, Marjoribanks J, Lethaby A, Lamberts Q, Suckling JA and the Cochrane HT Study Group (2008): Long term hormone therapy for perimenopausal women (Review)

The Cochrane Collaboration: Kongnyuy EJ, Norman RJ, Flight IHK, Rees MCP (2008): Oestrogen and progestogen hormone replacement therapy for peri-menopausal and post-menopausal women: weight and body fat distribution (Review)

The Cochrane Collaboration: Lethaby AE, Brown J, Marjoribanks J, Kronenberg F, Roberts H, Eden J (2008): Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms (Review)

Couse JF, Korach KS (1999): Estrogen Receptor Null Mice; What Have We Learned and Where Will They Lead Us? *Endocr Rev* 20(3): 358-417

Craig Jordan V (2006): The Science of Selective Estrogen Receptor Modulators: Concept to Clinical Practice. *Clin Cancer Res* 12(17): 5010-5013

Dahlman-Wright K, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson J-Å (2006): International Union of Pharmacology.LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacol Rev* 58(4):773-81

Dowsett M, Bundred NJ, Decensi A, Sainsbury RC, Lu Y, Hills MJ, Cohen FJ, Veronesi P, O'Brien MER, Scott T, Muchmore DB (2001): Effect of Raloxifene on Breast Cancer Cell Ki67 and Apoptosis: A Double-Blind, Placebo-controlled, Randomized Clinical Trial in Postmenopausal Patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10: 961–966

Duffy C, Perez K, Partridge A (2007): Implications of Phytoestrogen Intake for Breast Cancer. *CA Cancer J Clin* 57:260–277

Enmark E & Gustafsson JA (1999): Oestrogen receptors-an overview. *J Intern Med* 133-8

Fabricant DS, Nikolic D, Lankin DC, Chen S-N, Jaki BU, Kronic A, Van Breemen RB, Fong HHS, Farnsworth NR, Pauli GF (2005): Cimipronidine, a Cyclic Guanidine Alkaloid from *Cimicifuga racemosa*. *J Nat Prod* 68(8): 1266-1270

Fendrick JL, Raafat AM, Haslam SZ (1998): Mammary Gland Growth and Development from the Postnatal Period to Postmenopause: Ovarian Steroid Receptor Ontogeny and Regulation in the Mouse. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3(1): 7-22

Fowler AM, Alarid ET (2007): Amping up estrogen receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 9(4):305

Francucci CM, Daniele P, Iori N, Camilletti A, Massi F, Boscaro M. (2005): Effects of raloxifene on body fat distribution and lipid profile in healthy post-menopausal women. *J Endocrinol Invest* 28(7):623-31

Freudenstein J, Dasenbrock C, Nißlein T (2002): Lack of promotion of estrogen-dependent mammary gland tumors in vivo by an isopropanolic *Cimicifuga racemosa* extract. *Cancer Res* 62:3448-3452

Gallo D, Ferlini C, Fabrizi M, Prislei S, Scambia G (2006): Lack of stimulatory activity of a Phytoestrogen-containing soy extract on the growth of breast cancer tumors in mice. *Carcinogenesis* 27(7):1404–1409

Gaube F, Wolf S, Pusch L, Kroll TC, Hamburger M (2007): Gene expression profiling reveals effects of *Cimicifuga racemosa* (L.) NUTT. (black cohosh) on the estrogen receptor positive human breast cancer cell line MCF-7. *BMC Pharmacol* 7:11

Gill JM, Malkova D (2006): Physical activity, fitness and cardiovascular disease risk in adults: interactions in insulin resistance and obesity. *Clin Sci (London)* 110:409–25.

Glaeser M, Niederacher D, Djahansouzi S, Hanstein B, Dittrich R, Beckmann MW, Fasching PA, Ackermann S (2006): Effects of the antiestrogens tamoxifen and raloxifene on the estrogen receptor transactivation machinery. *Anticancer Res* 26(1B):735-44.

Hall J, McDonnell DP (1999): The Estrogen Receptor b-Isoform (ERb) of the Human Estrogen Receptor Modulates ERa Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinology* 140(12): 5566-5578

Hamelers IHL, Steenbergh PH (2003): Interaction between estrogen and insulin-like growth factor signalling pathways in human breast tumor cells.

Endocr Relat Cancer 10:331-345

Hanstein B, Djahansouzi S, Dall P, Beckmann M W, Bender H G (2004): Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. Eur J Endocrinol 150:243–255

Holst F, Stahl PR, Ruiz C, Hellwinkel O, Jehan Z, Wendland M, Lebeau A, Terracciano L, Al-Kuraya K, Janicke F et al. (2007): Estrogen receptor alpha (ESR1) gene amplification is frequent in breast cancer. Nat Genet 39: 665-660

Hyder SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM (2000): Identification of Functional Estrogen Response Elements in the Gene Coding for the Potent Angiogenic Factor Vascular Endothelial Growth Factor. Cancer Res 60:3183-90

Ibrahim YH, Yee D (2005): Insulin-Like Growth Factor-I and Breast Cancer Therapy. Clin Cancer Res 11:944–950

Ito H, Onoue S, Yoshida T (2001): Isoflavonoids from *Belamcanda chinensis*. Chem Pharm Bull 49:1229-1231

Jarry H, Metten M, Sprengler B, Christoffel V, Wuttke W (2003): In vitro effects of the *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055. Maturitas 44(1):31-38

Jarry H, Thelen P, Christoffel V, Sprengler B, Wuttke W (2005): *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 inhibits proliferation of the human prostate cancer cell line LNCaP. Phytomedicine 12(3):178-182

Jung SH, Lee YS, Lee S, Lim SS, Kim YS, Ohuchi K, Shin KH (2003): Anti-angiogenic and anti-tumor activities of isoflavonoids from the rhizomes of *Belamcanda chinensis*. Planta Med 69: 617-22

Křen V, Walterová D (2005): Silibin and Silymarin-new effects and Applications. Biomed Papers 149(1):29–41

Kruse SO, Löhning A, Pauli GF, Winterhoff H, Nahrstedt A (1999): Fukiic and piscidic acid esters from the rhizome of *Cimicifuga racemosa* and the in vitro estrogenic activity of fukinolic acid. Planta Med 65:763-764

Ladas EJ, Kelly KM (2003): Milk thistle: is there a role for its use as an adjunct therapy in patients with cancer? J Alternative Complementary Med 9(3):411-416

Lamartinière CA, Cotroneo MS, Fritz WA, Wang J, Mentor-Marcel R, Elgavish A (2002): Genistein Chemoprevention: timing and mechanism of action in murine mammary and prostate. J Nutr 132:552-558

LeeW-L, Cheng M-H, Chao H-T, Wang P-H (2007): The Role of Selective Estrogen Receptor Modulators on Breast Cancer: from Tamoxifen to Raloxifene. Taiwan J Obstet Gynecol 47 (1): 24-31

Lorincz AM, Sukumar S (2006): Molecular links between obesity and breast cancer. Endocr Relat Cancer 13:279–292

Luper S (1998): A review of plants used in the treatment of liver diseases. Altern Med Rev 3(6):410-421

Lyengar P, Espina V, Williams TW, Lin Y, Berry D, Jelicks LA, Lee H, Temple K, Graves R, Pollard J, Chopra N, Russell RG, Sasisekharan R, Trock BJ, Lippman M, Calvert VS, Petricoin EF, Liotta L, Dadachova E, Pestell RG, Lisanti MP, Bonaldo P, Scherer1 PE (2005): Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. J Clin Invest 115(5):1163-76

Maggiolini M, Bonogiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D, Ando S (2001): Estrogen receptor α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. Mol Pharmacol 60:595-602

Malewicz B, Wang1 Z, Jiang C, Guo J, Cleary MP, Grande JP,

Lu J (2006): Review. Enhancement of mammary carcinogenesis in two rodent models

by silymarin dietary supplements. *Carcinogenesis* 27(9):1739–1747

Martin MB, Stoica A (2002): Insulin-Like Growth Factor-I and Estrogen Interactions in Breast Cancer. *J Nutr* 132:3799S–3801S

McMichael-Phillips DF, Harding D, Morton M, Roberts SA, Howell A, Potten CS, Bundred NJ (1998): Effects of soy-protein supplementation on epithelial proliferation in the histologically normal human breast. *Am J Clin Nutr* 68(suppl):143S-6S

Nappi RE, Malavasi B, Brundu B, Facchinetti F (2005): Efficacy of *Cimicifuga racemosa* on climacteric complaints: a randomized study versus low-dose transdermal estradiol. *Gynecol Endocrinol* 20(1):30-5.

Neßelhut T, Schellhase C, Dietrich R, Kuhn W (1993): Untersuchungen zur proliferativen Potenz von Phytopharmaka mit östrogenähnlicher Wirkung bei Mammakarzinomzellen. *Arch Gynecol Obstet* 254:817-818

Newton KM, Reed SD, LaCroix AZ, Grothaus LC, Ehrlich K, Guiltinan J (2006): Treatment of Vasomotor Symptoms of Menopause with Black Cohosh, Multibotanicals, Soy, Hormone Therapy, or Placebo. *Ann Intern Med* 145(12):869-879

Osmers R, Friede M, Liske E, Schnitker J, Freudenstein J, Henneicke-von Zepelin HH (2005): Efficacy and safety of isopropanolic black cohosh extract for climacteric symptoms. *Obstet Gynaecol* 105(5 Pt 1):1074-83.

Pahlow M: Das große Buch der Heilpflanzen. Aktualisierte Auflage, Bechtermünz Verlag, Augsburg, 2001

Palmieri C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Wärrri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson J-A (2002): Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 9:1-13

Parentes-Vieira JB, Lopes-Costa PV, Pires CG, dos Santos EA, Pereira-Filho JD, da Silva BB (2007): Quantification of angiogenesis in estrogen receptor-positive and negative breast carcinoma. *Int Semin Surg Oncol* 4:22

Parker SL, Tong T, Bolden S, Wingo PA (1996): Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin* 65:5-27

Pavlakakis K, Messini I, Vrekoussis T, Yiannou P, Keramopoulos D, Louvrou N, Liakakos T, Stathopoulos EN (2008): The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer* 8:88

Penza M, Montani C, Romani A, Vignolini P, Pampaloni B, Tanini A, Brandi ML, Alonso-Magdalena P, Nadal A, Ottobriani L, Parolini O, Bignotti E, Calza S, Maggi A, Grigolato PG, Di Lorenzo D (2006): Genistein Affects Adipose Tissue Deposition in a Dose-Dependent and Gender-Specific Manner. *Endocrinology* 147(12):5740–5751

Pockaj BA, Gallagher JG, Loprinzi CL, Stella PJ, Barton DL, Sloan JA, Lavasseur BI, Rao RM, Fitch TR, Rowland KM, Novotny PL, Flynn PJ, Richelson E, Fauq AH (2006): Phase III Double-Blind, Randomised, Placebo-Controlled Crossover Trial of Black Cohosh in the Management of Hot Flashes: NCCTG Trial N01CC. *J Clin Oncol* 24:2836-2841

Powell SL, Gödecke T, Nikolic D, Chen S-N, Ahn S, Dietz B, Farnsworth NR, Van Breemen RB, Lankin DC, Pauli GF, Bolton JL (2008): In Vitro Serotonergic Activity of Black Cohosh and Identification of N ω -Methylserotonin as a Potential Active Constituent. *J Agric Food Chem* 56: 11718-11726

Rehnan AG, Harvie M, Howell A (2006): Insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF binding protein-3, and breast cancer risk: eight years on. *Endocr Relat Cancer* 13: 273-278

Rhyu MR, Lu J, Webster DE, Fabricant DS, Farnsworth NR, Wang ZJ (2006): Black Cohosh (*Actaea racemosa*, *Cimicifuga racemosa*) Behaves as a Mixed Competitive Ligand and Partial Agonist at the Human μ Opiate Receptor. *J Agric Food Chem* 54(26):9852-9857

- Russell L, Hicks GS, Low AK, Shepherd JM, Brown CA** (2002): Phytoestrogens: A Viable Option? *Am J Med Sci* 324(4):185-188
- Russo J, Ao X, Russp IH** (1999): Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor α and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary glands. *Breast Cancer Res Treat* 53:217-227
- Saji S, Sakaguchi H, Anderson S, Warner M, Gustafsson J-A** (2000): Qualitative Analysis of Estrogen Receptor Proteins in Rat Mammary Gland. *Endocrinology* 142(7):3177-3186
- Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG** (1997): Dietary genistein exerts estrogenic effects upon uterus, mammary gland and hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr* 127:263-269
- Scambia G, De Vincenzo R, Ranelletti FO, Panici PB, Ferrandina G, D'Agostino G, Fattorossi A, Bombardelli E, Mancuso S** (1996): Antiproliferative effect of silybin on gynaecological malignancies: synergism with cisplatin and doxorubicin. *Eur J Cancer* 32A:877-882
- Seidlová-Wuttke D, Becker T, Christoffel V, Jarry H, Wuttke W** (2003 A): Silymarin is a selective estrogen receptor beta (ERbeta) agonist and has estrogenic effects in the metaphysis of the femur but no or antiestrogenic effects in the uterus of ovariectomized (ovx) rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(2):179-88
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Jarry H, Wuttke W** (2003 B): Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rat: bone, fat, uterus. *Maturitas* 44(Suppl 1): 39-50
- Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Rimoldi G, Thelen P, Christoffel V, Wuttke W** (2004): *Belamcanda chinensis* and the thereof purified tectorigenin have selective estrogen receptor modulator activities. *Phytomedicine* 11(5):392-403
- Setchell KDR** (2001): Soy Isoflavones-benefits and Risks from Nature's Selective Estrogen Receptor Modulators (SERM). *J Am Coll Nutr* 20(5):354-362
- Setchell KDR, Brown NM, Lydeking-Olsen E** (2002): The Clinical Importance of the Metabolite Equol—A Clue to the Effectiveness of Soy and Its Isoflavones. *J Nutr* 132:3577–3584.
- Shu XO, Jin F, Dai Q, Wen W, Potter JD, Kushi LH, Ruan Z, Gao YT, Zheng W** (2001): Soyfood intake during adolescence and subsequent risk of breast cancer among Chinese women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10:483–488
- Sievert LL, Morrison L, Brown DE, Reza AM** (2007): Vasomotor symptoms among Japanese-American and European-American women living in Hilo, Hawaii. *Menopause* 14(2):261-9
- Smith DC, Prentice R, Thompson DJ, Herrmann WL** (1975): Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 293:1164-1167
- Speirs V** (2002): Oestrogen Receptor β in Breast Cancer: Good, Bad or Still Too Early to Tell? *J Pathol* 197(2):143-147
- Tchernof A, Poehlman, Depress JP** (2000): Body fat distribution, menopause transition and hormone replacement therapy. *Diabetes Metab* 26:12–20
- Thelen P, Scharf J-G, Burfeind P, Hemmerlein B, Wuttke W, Spengler B, Christoffel V, Ringert R-H, Seidlová-Wuttke D** (2005): Tectorigenin and other Phytochemicals extracted from leopard lily *Belamcanda chinensis* affect new and established targets for therapies in prostate cancer. *Carcinogenesis* 26(8):1360-1367
- This P, De la Rochefordière A, Clough K, Fourquet A, Magdelenat H, Breast Cancer Group of the Institut Curie** (2001): Phytoestrogens after breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 8:129-134
- Trock BJ, Hilakivi-Clarke L, Clarke R** (2006): Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 98(7):459-71

- Tyagi AK, Agarwal C, Chan DC, Agarwal R** (2004): Synergistic anti-cancer effects of silibinin with conventional cytotoxic agents doxorubicin, cisplatin and carboplatin against human breast carcinoma MCF-7 and MDA-MB468 cells. *Oncol Rep* 11(2):493-9
- Umland EM, Cauffield JS, Kirk JK** (2000): Phytoestrogens as therapeutic alternatives to traditional hormone replacement in postmenopausal women. *Pharmacotherapy* 20:981-90
- Wang QL, Lin M, Lui GT** (2001): Antioxidative activity of natural Isorhapontigenin. *Jpn J Pharmacol* 87:61-66
- Weber KS, Setchell KDR, Stocco DM, Lephart ED** (2001): Dietary soy-phytoestrogens decrease testosterone levels and prostate weight without altering LH, prostate 5 α -reductase or testicular steroidogenic acute regulatory peptide levels in adult male Sprague-Dawley rats. *J Endocrinol* 170:591-599
- Weihua Z, Saji S, Ma` kinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA** (2000): Estrogen receptor (ER) β , a modulator of ER α in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11):5936–5941
- Wood CE, Register TC, Franke AA, Anthony MS, Cline JM** (2006): Dietary Soy Isoflavones Inhibit Estrogen Effects in the Postmenopausal Breast. *Cancer Res* 66(2): 1241-9
- Wu AH, Ziegler R, Nomura AMY, West DW, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Hoover RN, Pike MC** (1998): Soy intake and risk of breast cancer in Asians and Asian Americans. *Am J Clin Nutr* 68(suppl):1437–43
- Wu AH, Wan P, Hankin J, Tseng CC, Yu MC, Pike MC** (2002): Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Carcinogenesis* 23:1491–1496
- Wuttke W, Seidlová-Wuttke D, Gorkow C** (2003): The *Cimicifuga* preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effect on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 44(1):67-77
- Zi X, Feyes DK, Agarwal R** (1998): Anticarcinogenic Effect of a Flavonoid Antioxidant, Silymarin, in Human Breast Cancer Cells MDA-MB 468: Induction of G1 Arrest through an Increase in Cipl/p21 Concomitant with a Decrease in Kinase Activity of Cyclin-dependent. *Clin Cancer Res* 4:1055-1064
- Ziel HK, Finkle WD** (1975): Increased risk of endometrial carcinoma among users of conjugated estrogens. *N Engl J Med* 293:1167-1170
- Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M, Vollmer G** (2002): Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80:125-130

Danksagung

Frau Dr.med. D. Seidlová-Wuttke danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und ihr als auch Herrn Prof. Dr.med. W. Wuttke für die Möglichkeit, die Experimente in ihrer Abteilung durchzuführen.

Bei Frau Dr.med. D. Seidlová-Wuttke, Frau Dr.biol. Y.Balzer und Frau Dr.biol. C. Koester bedanke ich mich für die Anleitungen zum Erlernen der Laborarbeit, ihre Unterstützung und Anregungen.

Frau Sabine Lüdemann danke ich unter anderem für die Hilfe bei der Beschaffung einiger themabezogener Artikel der Abteilung.

Allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für klinische und experimentelle Endokrinologie der Frauenklinik, die mir behilflich waren, gilt ebenfalls mein Dank.

Lebenslauf

Am 26.6.1977 wurde ich als erste von drei Töchtern von Stefaan Jacobs und Ute Jacobs-Eickermann in Kigali, Ruanda geboren.

Ich besuchte ein Jahr die Grundschule in Leuven, Belgien, gefolgt von meinem restlichen schulischen Werdegang (Grundschule Dorfkampsweg, Orientierungsstufe und Gymnasium an der Butjadingerstraße und Oberstufe am Schulzentrum Neustadt) bis zum Abitur 1996 in Bremen.

Ich studierte Medizin an der Georg-August-Universität Göttingen von August 1996 bis November 2003. In dieser Zeit arbeitete ich vom September 2001 bis März 2002 in Vollzeit im Labor der Abteilung für klinische und experimentelle Endokrinologie der Frauenklinik von Prof.Dr.med.W.Wuttke.

Im Anschluss an mein Studiums war ich als ÄiP in der Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Klinikums Villingen-Schwennigen bei Freiburg tätig. Infolge meines Wunsches, in Großbritannien zu praktizieren, wechselte ich anschließend dorthin. Aufgrund des etwas anderen Ausbildungssystems arbeitete ich dort ein halbes Jahr in der Inneren Medizin (Rheumatologie und „Acute Medicine“) und ein halbes Jahr in der Chirurgie (Allgemein- und Brustchirurgie) als ÄiP-Äquivalent in Hull (GB), danach ein Jahr in der Inneren Medizin als Assistenzärztin (Infektologie, Neurologie, Onkologie) in Hull (GB), ein halbes Jahr in der Allgemein- und Gefäßchirurgie in Grimsby (GB) und schließlich ein halbes Jahr in der Orthopädie und Traumatologie in Hull (GB). Nachfolgend bestand ich einen Tropen- und Hygieneniplomkurs an der Tropenmedizinischen Universität Liverpool (GB).

Zur Zeit befinde ich mich im Mutterschutz aufgrund meiner beiden Kinder und habe in dieser Zeit meine Dissertation zu Ende geschrieben.