

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

Die histomorphometrischen Effekte von
Cimicifuga racemosa CR BNO 1055 und ihren Fraktionen
auf Haut und Skelettmuskulatur der ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratte

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Manuel Scharf
aus München

Göttingen 2015

Die Arbeit ist in der Arbeitsgruppe Endokrinologie an der Medizinische Fakultät unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Wuttke im Zeitraum von Oktober 2011 bis Juni 2014 entstanden.

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

I. Berichterstatterin: Priv.-Doz. Dr. med. D. Seidlová-Wuttke (Betreuerin)

II. Berichterstatter: Prof. Dr. med. S. Emmert (Korreferent)

Promotor-Vertreterin: Prof. Dr. hum. biol. M. Schön

Tag der mündlichen Prüfung: 17.06.2015

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Klimakterium.....	1
1.1.1 Physiologische Grundlagen des Klimakteriums.....	2
1.1.2 Klimakterische Symptome und ihre Auswirkungen.....	2
1.2 Die Hormonersatztherapie HRT.....	3
1.2.1 Pharmakologische Zusammensetzung und Wirkung.....	3
1.2.2 Nebenwirkungen der HRT.....	3
1.3 Alternative Behandlungskonzepte für postmenopausale Beschwerden.....	4
1.4 Cimicifuga racemosa CR.....	5
1.4.1 CR – kein Phytoöstrogen!.....	6
1.4.2 Vorteile der CR-basierten Therapie postmenopausaler Beschwerden.....	7
1.4.3 Der cimicifuga racemosa-Extrakt CR BNO 1055 und seine Fraktionen.....	8
1.5 Die ovx SD-Ratte als Tiermodell des Klimakteriums.....	9
1.6 Die untersuchten Gewebetypen und ihre Veränderungen im Klimakterium.....	10
1.6.1 Die Haut.....	10
1.6.1.1 Hormonelle Einflüsse auf die Haut in der Postmenopause.....	11
1.6.1.2 Die Epidermis.....	12
1.6.1.3 Die Dermis.....	13
1.6.1.4 Die Subkutis.....	13
1.6.1.5 Die subkutane Muskelschicht.....	16
1.6.2 Die quergestreifte Skelettmuskulatur und ihre Veränderungen im Alter.....	16
1.6.2.1 Geschlechtsabhängige Muskelveränderungen im Alter.....	16
1.6.2.2 Einflüsse der Östrogene auf die Skelettmuskulatur.....	17
1.6.2.3 Sarkopenie: ein klinisch relevantes Symptom des Klimakteriums.....	18

1.6.3 Elastisches Fasergewebe.....	18
1.6.3.1 Funktionen elastischen Fasergewebes im menschlichen Körper.....	18
1.6.3.2 Texturänderung elastischer Fasern bei Änderungen im Östrogenhaushalt.....	19
1.6.4 Zwischenfazit.....	20
1.7 Studienziel.....	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1 Tierversuche.....	22
2.1.1 Versuchstiere und Haltung.....	22
2.1.2 Futterbedingungen vor Ovariectomie.....	23
2.1.3 Ovariectomie.....	23
2.1.4 Applikation der Wirkstoffe.....	24
2.1.5 Versuchsende und Obduktion:.....	25
2.2 Histomorphometrische Auswertung.....	25
2.2.1 Präparation und Fixierung der Schnitte.....	25
2.2.2 HE-Färbetechnik.....	26
2.2.3 Elastikafärbung.....	26
2.2.4 Auswertung.....	26
2.2.4.1 Auswertung der HE-Hautschnitte.....	27
2.2.4.2 Auswertung der HE-Muskelschnitte.....	29
2.2.4.3 Auswertung der Elastika-Schnitte.....	29
2.2.5 Statistische Auswertung.....	30
3. Ergebnisse.....	31
3.1 Epidermis.....	32
3.2 Dermis.....	33
3.3. Subkutanes Fettgewebe.....	34
3.4 Subkutanes Muskelgewebe.....	35
3.5 Skelettmuskelfaserumfang und -fläche.....	36
3.6 Elastische Fasern.....	37
3.7 Zusammenfassung der erhobenen Ergebnisse.....	38

4. Diskussion	39
4.1 Übertragbarkeit und Interpretation von Tiermodellstudien.....	40
4.2 Futteraufnahme und Studiendesign.....	40
4.3 Cimicifuga racemosa – ein pharmakologisches Substanzgemisch.....	41
4.4 Die Haut.....	44
4.4.1 Die Epidermis.....	44
4.4.2 Die Dermis.....	46
4.4.3 CR und die Fraktionen: Einflüsse auf Fettgewebe und das metabolische Syndrom.....	48
4.4.4 Die subkutane Fettschicht: das größte Fettdepot des Menschen.....	49
4.5 Die Skelettmuskulatur: subkutan und im Bereich des M. gastrocnemius.....	51
4.5.1 Messmethode.....	51
4.5.2 Ergebnisanalyse der Muskelschnitte.....	53
4.5.3 Zusammenhänge zwischen Sarkopenie und metabolischem Syndrom.....	53
4.6 Elastischer Faseranteil.....	56
5. Zusammenfassung	57
6. Methodischer Anhang	59
6.1 Herstellung und Aufbereitung der Organschnitte.....	59
6.2 Protokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung.....	61
6.3 Protokoll Elastika-Färbung.....	62
7. Literaturverzeichnis	63
8. Abbildungsverzeichnis	76
9. Tabellenverzeichnis	77

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
AWMF	Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften
BMI	Body Mass Index
bzw.	beziehungsweise
CAM	<i>complimentary alternative medicine</i>
CR	<i>Cimicifuga racemosa</i>
CR BNO 1055	der in dieser Arbeit untersuchte und verwendete aufgereinigte Extrakt aus <i>cimicifuga racemosa</i> , Herstellung und Qualitätssicherung durch Bionorica®
CRP	C-reaktives Protein
CT	Computertomographie
CYP	Cytochrom-P450-System
DEXA	Dual-Röntgen-Absorptiometrie
d.h.	das heißt
DHEA	Dihydroepiandrosteron
dt.	deutsch
E2	Östrogene
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ER	Östrogenrezeptor
etc.	et cetera
EWGSOP	European Working Group on Sarcopenia in Older People
Fa.	Firma
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GABA	<i>gamma-aminobutyric-acid</i> , Gamma-Aminobuttersäure
GAG	Glycosaminoglycane
GnRH	<i>gonadotropin releasing hormon</i>
HCl	Chlorwasserstoffsäure, Salzsäure
HE	Hämatoxylin-Eosin
HER2	<i>human epidermal growth factor receptor 2</i>

HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HRT	<i>hormon replacement therapy</i> , Hormonersatztherapie
HT	Hormontherapie
IFN-gamma	Interferon- gamma
IGFBP-1	<i>insulin-like growth factor-binding protein -1</i>
IL-6	Interleukin 6
KHK	koronare Herzkrankheit
KO	Kontrollgruppe
lat.	lateinisch
LH	luteinisierendes Hormon
<i>M. gastrocnemicus</i>	<i>musculus gastrocnemicus</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MS	metabolisches Syndrom
MWS	Million Women Study
o.g.	oben genannt
OR	odds ratio
Ovx	Ovarektomie
ovx	ovarektomiert
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
POF	<i>premature ovarian failure</i>
RF	Restfraktion
S6K1	Protein S6 Kinase 1
Sap	Saponinfraktion
s.c.	subkutan
SD	Sprague-Dawley
SEM	<i>standard error of the mean</i>
sog.	sogenannt
SSRI	selektiver Serotoninwiederaufnahmehemmer
Std.	Stunden
Tab.	Tabelle
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
UV-B	ultraviolettes Licht 290-320 nm

vs

versus

WHI

„Women's Health Initiative“- Studie

WHO

World Health Organization, Weltgesundheitsorganisation

z.B.

zum Beispiel

1. Einleitung

Seit Jahrzehnten steigt in Deutschland und anderen Industrienationen die durchschnittliche Lebenserwartung der Bevölkerung stetig weiter an. Paradoxerweise folgt die gesellschaftliche Akzeptanz für den natürlichen Alterungsprozess einem genau entgegengesetzten Trend. Dies hat einerseits sicher mit dem allseits propagierten Schönheitsideal und „Jugendwahn“ zu tun. Bedeutender ist wahrscheinlich die Tatsache, dass für viele Menschen das Älterwerden mit gravierenden gesundheitlichen Einschränkungen einhergeht. Die Behandlung und Prävention von alterstypischen Krankheitsbildern wie zum Beispiel Osteoporose, metabolischem Syndrom oder einer insgesamt abnehmenden körperlichen Fitness und Mobilität stellen Gesellschaft und Sozialkassen vor große Herausforderungen. Frauen ab dem mittleren Lebensalter sind aufgrund von Hormonumstellungen besonders von den genannten Symptomen betroffen.

1.1 Das Klimakterium

Die Begriffe „Klimakterium“ oder umgangssprachlich „Wechseljahre“ bezeichnen eine natürliche Lebensphase der Frau, die sich unter anderem durch tiefgreifende endokrinologische Veränderungen und daraus resultierende klinische und psychische Symptome auszeichnet. Ursache hierfür ist eine zunehmende Erschöpfung des Follikelpools der weiblichen Ovarien, die schließlich in der letzten Regelblutung, der sog. „Menopause“ ihren Höhepunkt erreicht. Etliche zum Teil gravierende vegetative, funktionelle oder seelische Symptome können aber schon Jahre vor und nach diesem Ereignis auftreten und weisen damit auf lange andauernde hormonelle Fluktuationen hin. Eine Expertengruppe der WHO trug diesem Umstand Rechnung und definierte im Jahr 1996 die Begriffe der „Prä- und Perimenopause“: Sie bezeichnen den gesamten Zeitraum der physiologischen Umstellung vom Auftreten der ersten Symptome bis 12 Monate nach der Menopause (o. Verf. 1996: Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group).

1.1.1 Physiologische Grundlagen des Klimakteriums

Ihre Menopause erleben Frauen im durchschnittlich 51. Lebensjahr (Greendale et al 1999). Es ist bekannt, dass die endgültige Zahl der Oozyten im Ovar bereits bei Geburt festgelegt ist. Durch die kontinuierliche Mobilisierung der Eizellen im Rahmen der Ovulation während der Geschlechtsreife ist diese vordefinierte Menge irgendwann erschöpft. Bereits Monate bis Jahre davor kündigen zunehmende Zyklusunregelmäßigkeiten diesen Zeitpunkt an. Sie sind Ausdruck der hormonellen Dysregulation im komplizierten und vielgliedrigen Regelkreis zwischen weiblichen Ovarien und der Hypothalamus-Hypophysen-Achse. Dabei fallen die Systemspiegel der hauptsächlich in den Follikeln gebildeten Östrogene (E2) und das Progesteron zunehmend ab. Umgekehrt steigen durch den jetzt fehlenden negativen *feedback*-Mechanismus das Gonadotropin bzw. seine hypophysären Agonisten LH und FSH massiv an (O'Connor et al. 2001).

1.1.2 Klimakterische Symptome und ihre Auswirkungen

Es muss betont werden, dass diese Veränderungen bei Frauen ein vollkommen physiologischer Vorgang im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses sind. Jede Frau erlebt diese Phase individuell verschieden mit einer sehr weiten Spanne von vollkommener Beschwerdefreiheit bis hin zu gravierenden Einschränkungen. Für diese charakteristischen klimakterischen Beschwerden werden hauptsächlich die o.g. stark schwankenden und sich verändernden Hormonkonstellationen verantwortlich gemacht. Als eventuelle Komplikationen sind einerseits persistierende Organdefekte wie u.a. koronare Herzerkrankung, Sarkopenie oder Osteoporose zu nennen (Kannel et al. 1976; Maltais et al. 2009; Stevenson 2011).

Andererseits können auch vegetativ-psychische Symptome wie z.B. Hitzewallungen (sog. *hot flashes*) mit Schweißausbrüchen, depressive Verstimmung, Reizbarkeit, Stimmungsschwankungen und Schlafstörungen den Betroffenen über mehrere Jahre bis Jahrzehnte hinweg gravierende Probleme bereiten. In vielen Fällen beklagen die Betroffenen einen erheblichen Verlust an Lebensqualität. Nicht zuletzt die volkswirtschaftlichen Kosten durch medizinische Behandlung und die entstandenen Kranken- und Arbeitsfehltag (vgl. Sasser et al. 2005) verdeutlichen die Dringlichkeit eines wissenschaftlichen Lösungsansatzes.

1.2 Die Hormonersatztherapie HRT

1.2.1 Pharmakologische Zusammensetzung und Wirkung

Vor allem in den 90er Jahren war die sogenannte Hormonersatztherapie (HRT) ein breit angewendetes Therapieverfahren sowohl zur Behandlung klimakterischer Beschwerden als auch zur Prävention der bereits genannten pathologischen Veränderungen (zusammengefasst in Barrett-Connor und Stuenkel 2001). Meist handelt es sich um eine pharmakologische Kombination aus zwei elementaren Bausteinen: Ein Östrogenanteil soll den perimenopausalen Hormonmangel ausgleichen, ein Gestagen stellt bei nicht hysterektomierten Frauen die regelmäßige Transformation des Endometriums sicher. Einige Autoren sprechen in diesem Zusammenhang lieber von einer Hormontherapie (HT), um zu verdeutlichen, dass es sich hierbei nicht um ein bloßes Ersetzen fehlender Hormone zur Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse handelt, wie es bei anderen Substitutionstherapien der Fall ist. Die Wirksamkeit bezüglich der statistisch am häufigsten behandelten Beschwerden Hitzewallungen und Nachtschweiß ist dabei unstrittig: Sowohl die Frequenz als auch die Ausprägung beider Symptome kann mit der Östrogensubstitution um bis zu 75% verringert werden (zusammengefasst in Maclennan et al. 2004). Das Osteoporoserisiko ist unter HRT signifikant reduziert (LaCroix et al. 2011). Die HRT ist damit eindeutig die wirksamste Therapieoption gegen postmenopausale Beschwerden.

1.2.2 Nebenwirkungen der HRT

Allerdings müssen dem anerkannten Effekt der HRT schwerwiegende Nebenwirkungen gegenübergestellt werden. Spätestens seit den großen, plazebokontrollierten Studien der Women's Health Initiative (WHI) und der Million Women Study (MWS) ist die Unbedenklichkeit der postmenopausalen Hormonsubstitution widerlegt. In beiden Studien wurde in der Östrogen/Gestagen-Gruppe ein signifikanter Anstieg von koronarer Herzerkrankung, Schlaganfall, Thrombosen und Lungenembolien sowie invasivem Mammakarzinom beobachtet (Rossouw et al. 2002; Beral 2003). Das Risiko, ein Ovarialkarzinom zu entwickeln ist erhöht (Rodriguez et al. 2001) und obgleich bei Frauen unter HRT ein kolorektales Karzinom seltener auftritt, wird die Progredienz einer eventuell vorbestehenden malignen kolorektalen

Neoplasie deutlich beschleunigt (Chlebowski et al. 2004).

Folgerichtig mussten die entsprechenden Fachgesellschaften den Einsatz der HRT reevaluieren. Abgesehen von Einzeldiagnosen wie z.B. einem vorzeitigen ovariellen Versagen (POF) (Welt 2008), gelten heutzutage innerhalb des Symptomkomplexes klimakterischer Beschwerden laut S3-Leitlinien der AWMF lediglich noch Hitzewallungen, vaginale Atrophie bzw. Trockenheit und mit Einschränkungen eine Osteoporose als Indikationen für eine HRT. Diese darf nur unter strenger Risiko-Nutzen-Abwägung in geringstmöglicher Dosis über den kürzestmöglichen Zeitraum appliziert werden (Ortmann et al. 2011). Obwohl es derzeit keine allgemeinverbindlichen Empfehlungen für die Therapiedauer gibt, werden als Richtlinie, abhängig von der Symptomkontrolle, derzeit ca. zwei bis fünf Jahre ab Behandlungsbeginn genannt. Persistieren die Beschwerden auch nach dieser Zeitspanne, sollte nach alternativen Möglichkeiten gesucht werden.

Auch die Patientinnen selbst stehen trotz ihres Leidensdruckes der HRT zunehmend kritisch gegenüber. Bereits zwei Jahre nach der Veröffentlichung der WHI-Studie in 2002 hatte sich die Zahl der mit Hormonen behandelten postmenopausalen Frauen um 57 % reduziert (Kelly et al. 2005).

1.3 Alternative Behandlungskonzepte für postmenopausale Beschwerden

Viele Frauen entscheiden sich deshalb ganz bewusst für eine alternative Therapie auf pflanzlicher Basis. In 2007 konnte in den USA im „National Health Statistics Report“ ein entsprechender Trend ausgemacht werden: Demnach nutzen 38,3% aller Personen die Möglichkeiten der sog. Komplementär- und Alternativmedizin (engl. *complementary and alternative medicine*, CAM). Statistisch gilt dies besonders für Frauen mit höherem Einkommen und Bildungsniveau. Diese Gruppe erwägt auch für komplexe medizinische Symptome und Erkrankungen Therapien, die der CAM zugerechnet werden (Barnes et al. 2008). Von ärztlicher Seite würden mittlerweile sogar rund 85% der befragten Mediziner ihren Patientinnen, abhängig vom Schweregrad der Symptome, alternative Therapien empfehlen, wie eine Umfrage unter 2548 praktizierenden Gynäkologen ergab (Buhling et al. 2012).

Eine große Wirkstoffklasse im Bereich der CAM zur Behandlung klimakterischer Beschwerden stellen die sog. Phytoöstrogene dar. Dabei handelt es sich um natürlich vorkommende

Substanzen, die in ihrer biochemischen Struktur große Ähnlichkeiten mit Östrogenen aufweisen. Einen hohen Anteil solcher Phytoöstrogene enthalten u.a. pflanzliche Präparate aus Soja (lat. *Glycine max*) oder Rotklee (lat. *Trifolium pratense*). Diese Ähnlichkeiten ermöglichen eine Bindung von Phytoöstrogenen an Östrogenrezeptoren im menschlichen Körper und können eine mehr oder weniger ausgeprägte hormonartige Wirkung hervorrufen. Dieser Umstand wird durch oben genannte Präparate genutzt, um den klimakterischen Hormonmangel „auf pflanzlicher Basis“ auszugleichen und findet deshalb breite Anwendung im Praxisalltag. Allerdings treten die gewünschten Effekte oft nur bei Einnahme hoher und teils gesundheitlich bedenklicher Dosen dieser Wirkstoffe auf. Dagegen konnten in mehreren Metaanalysen plazebokontrollierter Studien (zusammengefasst in Lethaby et al. 2007; zusammengefasst in Jacobs et al. 2009) sowie in Doppelblindstudien (Levis et al. 2011), bei denen die empfohlene Dosierung eingehalten wurde, keine positiven Effekte auf klimakterische Beschwerden beobachtet werden. Es sei außerdem noch einmal darauf hingewiesen, dass sich Phytoöstrogene lediglich durch ihre Herkunft und nicht oder nur unwesentlich durch ihre biochemische Struktur, Eigenschaften oder Rezeptoraffinität von den weiblichen Sexualhormonen unterscheiden. Bei einer östrogenartig spürbaren Wirkung muss deshalb prinzipiell auch mit den entsprechenden Nebenwirkungen gerechnet werden.

1.4 *Cimicifuga racemosa* CR

Ein weiteres, seit mehreren Jahren eingesetztes Phytotherapeutikum ist der Extrakt der nordamerikanischen Traubensilberkerze, lat. *actaea racemosa* (auch *cimicifuga racemosa* (CR) genannt) aus der Familie der Hahnenfußgewächse (lat. *ranunculaceae*). Die aus ihrem Wurzelstock gewonnenen Inhaltsstoffe haben bereits seit Jahrhunderten ihren Platz in der traditionellen Medizin der Ureinwohner Nordamerikas, dem Ursprungsgebiet von CR. In der westlichen Medizin war schon durch frühe klinische Studien und Übersichtsarbeiten die positive Wirkung insbesondere bei *hot flashes* bestätigt worden (aus Watson und Preedy 2008).

1.4.1 CR – kein Phytoöstrogen!

Aufgrund ihres Wirkprofils wurden lange Zeit auch für CR östrogenartige Inhaltsstoffe postuliert. Diese Vermutung erwies sich jedoch als falsch, spätestens als in chemischen Analysen für die bekannten Wirkstoffe von CR eine Bindungsaffinität an Östrogenrezeptoren definitiv ausgeschlossen werden konnte (Onorato und Henion 2001; Jarry et al. 2003). Damit rückte eine andere Theorie über die Wirkungsweise von CR in den Vordergrund: Demnach ist der hohe LH-Spiegel durch einen fehlenden *negativen feedback* während der Peri- und Postmenopause für viele klimakterische Symptome verantwortlich oder zumindest assoziiert (Meldrum et al. 1984) Sowohl im Tierversuch als auch bei Patientinnen in der Postmenopause konnte bereits nach acht Wochen unter CR-Therapie eine signifikante Reduktion des LH-Spiegels beobachtet werden (Düker et al. 1991), was den positiven Einfluss von CR auf Hitzewallungen erklären würde. Wie aber kann CR den LH-Spiegel in einer Art beeinflussen, wie es üblicherweise durch Östrogene passiert, obwohl eine Wirkung an den dafür notwendigen Rezeptoren definitiv nicht stattfindet?

Die Regulation des hypothalamischen GnRH und damit des hypophysären LH geschieht u.a. über die Neurotransmitter Dopamin, Noradrenalin, Gammaaminobuttersäure (GABA) und Serotonin. Hier liegt die Antwort auf obige Frage, denn im Extrakt aus CR sind mehrere Substanzen mit einer Bindungsaffinität für Rezeptoren der eben genannten Neurotransmitter nachgewiesen worden (Burdette et al. 2003; Powell et al. 2008). Über seine serotonerge Aktivität scheint CR sogar eine potentere Wirkung gegen Hitzewallungen und Nachtschweiß entfalten zu können als es bei SSRI-Präparate wie z.B. Fluoxetin zu beobachten ist (Oktem et al. 2007).

CR schafft es also, eine positive östrogenartige Wirkung hervorzurufen, setzt dafür aber an ganz anderen Rezeptoren und Regelkreisen an.

1.4.2 Vorteile der CR-basierten Therapie postmenopausaler Beschwerden

Die Identifikation von östrogenunabhängigen molekularbiologischen Zielstrukturen erklärt, warum bei einer Behandlung mit CR, trotz eindeutig positiver Wirkung auf typische klimakterische Beschwerden, das ernste Nebenwirkungsprofil der herkömmlichen HRT ausbleibt. Dies konnte bereits durch mehrere Studien *in vitro* und *in vivo* belegt werden: So besitzt CR – im Gegensatz zu Estradiol – weder proliferationsfördernde Eigenschaften auf Zellverbände des Endometriums (Raus et al. 2006) noch auf Uterus (Seidlová-Wuttke et al. 2003) und Mammae (Hirschberg et al. 2007). Für entartete Zellen bei ER-/ HER2-exprimierendem Mammakarzinom ist sogar die Hemmung des Wachstums und eine Apoptoseinduktion unter Anwendung von CR beschrieben worden (Einbond et al. 2008) Auf die Gerinnungsparameter im Blut bestehen keine signifikanten Einflüsse (Wuttke W et al. 2006).

Die Beobachtungen zum Serumlipidprofil unter CR-Therapie sind bei unterschiedlichen Studien-Designs bislang inkonsistent. So konnten Spangler und Kollegen (2007) in einer US-amerikanischen Studie mit 351 Frauen nach Behandlung mit CR-haltigen Präparaten keinen signifikanten Einfluss auf Serumlipide, den Blutzucker- und Insulinspiegel feststellen. Der angesetzte Untersuchungszeitraum war mit drei Monaten jedoch relativ kurz. Demgegenüber wurden in mehreren europäischen Arbeiten eindeutig positive Effekte auf Risikoparameter des metabolischen Syndroms (MS) festgestellt. Als MS wird das gemeinsame Auftreten von Bluthochdruck, Dyslipidämie, abdomineller Fettleibigkeit und einer Insulinresistenz als Vorstufe des Diabetes mellitus-Typ II bezeichnet. Ihre Koinzidenz wird mittlerweile als Hauptrisikofaktor für die koronare Herzkrankheit und weitere arteriosklerotische Veränderungen angesehen (Potenza und Mechanick 2009). In Studien konnte nach Gabe von CR-haltigen Präparaten eine Reduktion des Körpergewichts, des intraabdominellen Fettdepots und des Nüchtern-Insulinspiegels im Plasma sowie eine Abnahme des Triglyceridwertes nachgewiesen werden (Rachoń et al. 2008).

Es bleibt festzuhalten, dass die in den verschiedenen Arbeiten verwendeten CR-Präparate teils deutlichen Schwankungen in Wirkstoffkonzentration und Qualität unterworfen sind (Jiang et al. 2011). Ein Vergleich der Studienergebnisse ist deswegen nicht uneingeschränkt möglich.

Die aufgrund von einigen Fallberichten von manchen Autoren angenommene Lebertoxizität

von CR konnte mittlerweile unter Voraussetzung einer sachgemäßen Einnahme und bei Einhaltung der empfohlenen Dosierungen widerlegt werden (Teschke et al. 2009; Firenzuoli et al. 2011).

Neben den bereits genannten positiven Effekten auf *hot flashes* und die Risikoparameter des MS zeichnet sich CR zusätzlich durch einen stark osteoprotektiven Charakter aus. Dies konnte u.a. durch CT-gestützte Knochendichtemessungen, histomorphologische Untersuchungen der Trabekelstruktur und über die Auswertung der für den Knochenumsatz typischen Laborparameter Osteocalcin und Crosslaps bestätigt werden (Seidlová-Wuttke et al. 2003; Wuttke et al. 2006; Seidlová-Wuttke et al. 2012a).

1.4.3 Der *cimicifuga racemosa*-Extrakt CR BNO 1055 und seine Fraktionen

Vorliegende Arbeit wurde durch die bayerische Forschungsförderung unterstützt und entstand im Rahmen des Forschungsprojektes AZ-838-08 „Osteoporoseprophylaxe mit pflanzlichen Wirkstoffen“. Innerhalb dieses Projektes war die in Bayern ansässige Firma Bionorica® (Neumarkt/ Oberpfalz) für die Herstellung der wirkstoffangereicherten Futterpellets (*Cimicifuga*-Extrakt BNO 1055) zuständig und verantwortlich. Trotz des natürlichen pflanzlichen Rohproduktes ist für CR BNO 1055 eine gleichbleibende Qualität und konstante Wirkstoffkonzentration garantiert (Popp et al. 2003). Auf diese Weise können standardisierte und reproduzierbare Versuchsbedingungen gewährleistet werden. Durch verschiedene chemisch-technische Verfahren, z.B. durch Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC), kann CR BNO 1055 nach chemischen Kriterien in zwei Hauptgruppen aufgetrennt werden: Diese im Folgenden als Fraktionen bezeichneten Hauptgruppen sind zum einen lipophile Triterpensaponine (kurz: Saponine) und zum anderen eine wasserlösliche Restfraktion. Es muss betont werden, dass es sich bei diesen Fraktionen trotz der vorangegangenen Trennverfahren immer noch um Stoffgemische aus einer Vielzahl an Inhaltsstoffen, den sog. Subfraktionen, handelt. Weitere Analysen ergeben zum Beispiel Deoxyactein und Actein als Hauptbestandteile der Saponinfraktion, während in der Restfraktion u.a. 5-Methylserotonin, verschiedene Phenolsäuren, Hydroxyzimtsäure, Piscidiasäure, Kaffeesäure, die jeweiligen Ester etc. isoliert wurden (Stromeier et al. 2005; He et al. 2006).

Für die vorliegende Arbeit wurden die Versuchstiere, ausgenommen die Kontrollgruppe, in drei Gruppen aufgeteilt, die anschließend entweder den Gesamtextrakt oder eine der zwei o.g. Fraktionen als Futterzusatz erhielten. Auf diese Weise besteht die Möglichkeit, die Beobachtungen den einzelnen Wirkstoffklassen besser zuzuordnen.

1.5 Die ovx SD-Ratte als Tiermodell des Klimakteriums

Für die vorliegende Arbeit wurde die Wirkung von CR und ihren Fraktionen auf verschiedene Schichten der Haut, die Skelettmuskulatur und elastische Fasern von ovariectomierten Sprague-Dawley-Ratten untersucht. Dieses Tiermodell bietet mehrere Vorteile: Da bei der Ratte wie bei anderen Säugetieren die Follikel epithelzellen des Ovars der Hauptsyntheseort der Östrogene sind, kann durch die Ovx ein endokrinologischer Zustand geschaffen werden, der den klimakterischen Hormonmangelzustand der Frau sehr gut imitiert. Durch das iatrogene Herbeiführen des Östrogenmangels kann hier das Auftreten klimakterischer Symptome im Gegensatz zum Menschen zeitlich genau definiert werden. Viele der Beschwerden und Komplikationen, welche Ratten nachweislich mit dem fallenden Hormonspiegel entwickeln, sind mit denen der klimakterischen Frau vergleichbar. Dazu zählen beispielsweise ein steigendes Risiko für die Entwicklung degenerativer Veränderungen von Knochen und Gelenken, die Atrophie des vaginalen Plattenepithels und sogar die bekannten Hitzewallungen (Bellino 2000; Høegh-Andersen et al. 2004; Jelinsky et al. 2008). Deshalb gilt die ovx SD-Ratte als anerkanntes Tiermodell für die östrogendefizitäre Lebensphase der Postmenopause.

Von praktischem Nutzen sind zweifelsohne ihre gute Verfügbarkeit, eine hohe Fruchtbarkeit und die relativ unschwierige Haltung. Speziell durch den kürzeren Lebenszyklus im Vergleich zu anderen möglichen Versuchstieren, wie z.B. Primaten, Hunden, Schweinen etc., werden Veränderungen schon innerhalb kürzerer Zeiträume sichtbar. All diese Faktoren machen die Ratte zu dem meistgenutzten Tiermodell weltweit, was einen Vergleich der hier gewonnenen Daten mit zahlreichen Fremdstudien ermöglicht (Bellino 2000; Keenan et al. 2005; Sengupta 2013).

Es gibt jedoch auch physiologische Unterschiede im Hormonhaushalt zwischen Mensch und Ratte, die beachtet werden müssen. Beim Menschen wie auch bei anderen Primaten werden Sexualhormone bzw. ihre Vorläufer wie z.B. Dihydroepiandrosteron (DHEA) nicht nur in Testes

oder Ovarien produziert, sondern können in größeren Mengen auch durch Zellen in der *zona reticularis* der Nebennierenrinden synthetisiert werden. Bei Ratten und Mäusen sind dagegen die Geschlechtsorgane die einzigen Syntheseorte für relevante Sexualhormonmengen (Pelletier et al. 1992; van Weerden et al. 1992). Sowohl Ratten als auch Menschen können zwar die besagten Vorläuferhormone in vielen unterschiedlichen Zielgeweben wie Haut und Muskulatur durch ortsständige Enzyme (z.B. 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase, 5α -Reduktase, Aromatase) in die entsprechenden Zielhormone (u.a. Östrogene) verwandeln (Labrie et al. 2000; Aizawa et al. 2007; Inoue et al. 2012). Weil aber ovx Ratten die dafür nötigen Vorläufersexualsteroidhormone gar nicht mehr bilden können, entfällt bei ihnen auch diese Möglichkeit der Östrogensynthese. Das bedeutet, dass durch eine Ovx bei Ratten im Regelfall ein abrupterer Abfall des Hormonspiegels hervorgerufen wird als er bei klimakterischen Frauen zu beobachten ist.

1.6 Die untersuchten Gewebetypen und ihre Veränderungen im Klimakterium

Im Folgenden sollen die Symptomkomplexe der postmenopausalen Hautveränderungen, die Sarkopenie und der Umbau des elastischen Bindegewebes sowie die gewebsspezifischen Gemeinsamkeiten und Unterschiede zwischen Mensch und Ratte beleuchtet werden. Dabei werden auch die Effekte und Wirkmechanismen von Östrogenen thematisiert und mit Hilfe verschiedener Fremdstudien belegt. Auf diese Weise soll eine wissenschaftlich fundierte Vergleichsbasis definiert werden, die der Wirkung von CR und ihrer Fraktionen später gegenübergestellt wird.

1.6.1 Die Haut

Der natürliche Alterungsprozess des Menschen wird nirgendwo offensichtlicher als durch die Veränderungen seiner Haut. Sie ist für jeden Mitmenschen sichtbar, prägt unser Erscheinungsbild ganz entscheidend und wirkt sich deswegen auf unser gesamtes körperliches und seelisches Befinden aus. Vor allem aber erfüllt die Haut neben dem kosmetischen Effekt zahlreiche überlebenswichtige Aufgaben des Körpers. Sie ist mechanische Barriere gegen Umwelteinflüsse, reguliert Verdunstung und Wärmehaushalt, wirkt im Vitamin-D-Stoffwechsel mit und gilt als größtes Sinnesorgan des Menschen. Diese Eigenschaften machen die

menschliche Haut zu einem Objekt großen wissenschaftlichen Interesses.

Bemerkenswert ist auch die positive Korrelation zwischen Hautdicke und Knochendichte. Letztere ist im Rahmen der postmenopausalen Osteopenie von größter klinischer Relevanz (Yoneda et al. 2011).

1.6.1.1 Hormonelle Einflüsse auf die Haut in der Postmenopause

Da auch außerhalb der Geschlechtsorgane in nahezu jedem Gewebe Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden können, verwundert es nicht, dass auch die Haut durch den schwankenden Östrogenspiegel im Klimakterium starken Veränderungen unterworfen ist. So berichten viele Frauen z.B. über eine plötzlich einsetzende Hautalterung oder auch einen schnelleren Progress wenige Monate nach Einsetzen der ersten perimenopausalen Symptome (Stevenson und Thornton 2007) Wissenschaftlich können eine deutlich zunehmende Trockenheit (Sator et al. 2004), eine signifikante Elastizitätsabnahme (Sumino et al. 2004) sowie eine Zunahme der Faltenanzahl und -tiefe (Dunn et al. 1997) bestätigt werden. Dabei ist eine Korrelation der meisten klinischen Veränderungen mit dem sinkenden Östrogenspiegel im Klimakterium gesichert (Affinito et al. 1999; Wend et al. 2012).

Auch im Tiermodell sind deutliche Einflüsse von Östrogenen auf die Haut belegt. Beispielsweise schreiten bei ovx Ratten eine durch UV-B-Bestrahlung hervorgerufene Faltenentwicklung und Elastizitätsabnahme deutlich schneller voran als in der intakten Kontrollgruppe (Tsukahara et al. 2007). Umgekehrt konnte eine Zunahme der mechanischen Elastizität nach topischer Östrogenbehandlung sogar in der Haut von männlichen Tieren festgestellt werden (Ozyazgan et al. 2005). Der Nachweis der dafür notwendigen Östrogenrezeptoren ER- α und ER- β in der Haut von Ratten gelang in zahlreichen Studien zur Rolle der weiblichen Sexualhormone bei der Wundheilung (Gál et al. 2010; Novotný et al. 2011).

1.6.1.2 Die Epidermis

Die Epidermis des Menschen ist die durchschnittlich 30 - 200 µm dicke, an der Fußsohle auch bis zu 1mm starke äußerste Schicht der Haut. Den Hauptanteil im Zellverband dieses mehrschichtig verhornten Plattenepithels machen mit über 90% die sogenannten Keratinozyten aus, die eine besonders hohe Regenerationsfähigkeit besitzen. Während ihrer ca. 30-tägigen Lebensdauer wandern sie von der innersten mitosereichen Regenerationsschicht *Stratum basale* immer weiter nach apikal, bis sie schließlich abgeschilfert werden. Abhängig von den jeweiligen lokalen Erfordernissen unterliegen die Keratinozyten in dieser Zeit charakteristischen Veränderungen, die eine histologische Gliederung ermöglichen. An das *Stratum basale* schließt sich das *Stratum spinosum* an, gefolgt von den oberflächlichen Schichten *Stratum granulosum* und *corneum*. Durch eine gleichzeitig stattfindende stetige Verhornung sowie durch die Bildung von Keratinfilamenten gewährleisten die Keratinozyten in besonderem Maße den mechanischen Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen.

Alters- und hormonelle Einflüsse zeigen sich vor allem in einer Reduktion der Schichtdicke dieses Hautkompartiments. Diese Dickenabnahme kann u.a. über topische Östrogengaben verhindert werden (Verdier-Sévrain et al. 2006). Vermittelt wird diese Wirkung wieder über die zwei hochaffinen Östrogenrezeptortypen ER- α und ER- β , die beide in Abhängigkeit von der Hautregion unterschiedlich stark auf den Keratinozyten exprimiert sind. Sie bewirken sowohl eine erhöhte Zellproliferation als auch eine verringerte Apoptoserate (Kanda und Watanabe 2004; Verdier-Sévrain et al. 2006).

Zwar werden auch bei der Ratte prinzipiell die gleichen Aufgaben durch die Epidermis wahrgenommen, histologisch müssen jedoch einige Unterschiede beachtet werden. So sind in den aufbereiteten Präparaten deutlich mehr Haarfollikel sichtbar. Außerdem ist die Epidermis von intakten Tieren mit durchschnittlich 16 µm deutlich dünner als beim Menschen. Unter dem Mikroskop imponiert das mehrschichtige Epithel der Ratte mit deutlich weniger Zellreihen als es beim klassischen mehrschichtig verhornten Plattenepithel des Menschen der Fall ist. Umfangreiche Versuche zur Östrogenwirkung auf die Epidermis wurden v.a. mit Mäusen durchgeführt. Weibliche Tiere haben grundsätzlich eine dickere epidermale Schicht als ihre männlichen Altersgenossen. Nach Ovx gleicht sich dieser Unterschied jedoch innerhalb

kurzer Zeit an. Behandelt man anschließend Tiere beider Geschlechter mit einem oralen Östrogenpräparat, nimmt die epidermale Schichtdicke wieder zu bis zu einem Wert, wie er für gesunde weibliche Mäuse üblich ist (Azzi et al. 2005).

1.6.1.3 Die Dermis

Die unter der Epidermis befindliche Schicht der Dermis dient der Nährstoffversorgung der gefäßfreien Epidermis und verleiht der Haut Elastizität und Reißfestigkeit, bedingt durch einen hohen Anteil von Kollagenfasern Typ I, Typ III und elastischen Fasern. Außerdem befinden sich in der Dermis zahlreiche Blut- und Lymphgefäße, die meisten Hautanhangsgebilde wie Sinnesorgane, Haarfollikel, Schweiß- und Talgdrüsen sowie freie Nervenendigungen. Auch für die Dermis ist eine positive Korrelation zwischen Östrogenspiegel und Schichtdicke nachgewiesen. Dies geschieht vor allem durch die Stimulation der Kollagenfaserproliferation und eine erhöhte Flüssigkeitsretention (Smith und Allison 1966; Affinito et al. 1999).

Mit einem zur vorliegenden Arbeit sehr ähnlichen Versuchsaufbau untersuchten Polito und Kollegen (2012) die Auswirkungen von Phytoöstrogenen an ovx Ratten nach histomorphometrischen Kriterien. Auch hier konnte in der Dermis der unbehandelten Testgruppe eine signifikante Abnahme der Schichtdicke belegt werden. Im Gegensatz dazu waren die phytoöstrogensubstituierten Tiere von der Schichtreduktion nicht betroffen. Der Glykosaminoglykangehalt (siehe Diskussion) verhielt sich analog. Der proliferationsfördernde Effekt von E2 auf Kollagenfasern könnte auch die bessere Wundheilung bei entsprechend therapierten Mäusen teilweise erklären, wie sie von einigen Autoren in unterschiedlichen Studiendesigns festgestellt wurde (Ashcroft et al. 2003; Campbell et al. 2010).

1.6.1.4 Die Subkutis

Die Subkutis ist eine aus lockerem Bindegewebe bestehende Verbindungsschicht zwischen der Haut und den darunterliegenden Strukturen wie zum Beispiel Muskelfaszien oder Knochen. Neben Blutgefäßen, Nerven und spezialisierten Zellen der Sensorik befinden sich dort in übergroßer Mehrheit sog. Adipozyten (Fettgewebszellen).

Das Fettgewebe ist ein bei allen Säugern an unterschiedlichen Körperstellen vorhandener Gewebetyp, der zahlreiche Aufgaben im Organismus wahrnimmt.

Das sog. braune Fettgewebe erfüllt hauptsächlich den Zweck der Thermogenese und tritt beim Menschen im Erwachsenenalter nur noch mit einzelnen Zellverbänden in wenigen Körperregionen auf. Das weiße Fett dient u.a. der mechanischen Polsterung sowie der Wärmeisolation und ist einer der wichtigsten Energiespeicher des Körpers. Letzteres gelingt durch die Produktion und Einlagerung von energiereichen Lipiden, die in Nährstoffmangelsituationen wiederum metabolisiert werden, um so den Energiehaushalt zu decken. Was in der Evolution als überlebenswichtige Absicherung vor unregelmäßigen Phasen des Nahrungsüberschusses und -mangels gedacht war, wird in den industrialisierten Nationen immer öfter zum gesundheitlichen Problem. Bei konstant überhöhter Energiezufuhr mit einer langfristig positiven Bilanz kommt es zu einer pathologischen Hypertrophie und Hyperplasie des weißen Fettgewebes und damit zur Adipositas. Die Fachgesellschaften geben den optimalen Körperfettanteil gesunder Personen mittleren Alters mit 25-30% für Frauen und 20-25% für Männern an. Diese Werte können sich bei adipösen Personen vervielfachen (Gallagher et al. 2000).

Der markante geschlechtsabhängige Unterschied im Gesamtkörperfettanteil entsteht hauptsächlich durch die regulierenden Einflüsse der Östrogene. Er entwickelt sich deswegen bei jungen und nicht adipösen Frauen erst im Verlauf der Pubertät. Nach Abschluss dieser Entwicklung weisen Frauen, abhängig von der Körperregion, eine höhere Adipozytenanzahl (plus 35%) auf, die außerdem um etwa 45% größer ausfallen als bei ihren männlichen Altersgenossen (Cooke und Naaz 2004). Das bedeutet jedoch nicht, dass ein hoher Östrogenspiegel mit einer vermehrten Nahrungsaufnahme, einem adipöseren Habitus o.ä. gleichzusetzen wäre. Im späteren Erwachsenenalter ist das genaue Gegenteil der Fall. So zeichnet sich die Phase der Postmenopause eher durch einen charakteristischen ungewollten Gewichtszuwachs aus. Dies gilt auch für Frauen, die infolge einer beidseitigen Ovx iatrogen in diesen Zustand versetzt werden mussten (Gibson et al. 2013). Mit Beginn einer Östrogen Therapie sind diese Veränderungen jedoch reversibel.

Zur Erforschung der genannten Zusammenhänge gilt einmal mehr die Ratte als ideales Tiermodell. Viele der dort gemachten Beobachtungen können sehr gut auf den Menschen übertragen werden.

Übereinstimmend beschreiben mehrere Autoren nach Ovx einen signifikanten Anstieg von aufgenommener Nahrungsmenge, Körpergewicht und prozentualem Anteil des viszeralen Fettdepots (Latour et al. 2001; Rachoń et al. 2008). In Experimenten mit sog. Knockout-Mäusen entwickelten Tiere mit einer Aromatase-Defizienz und damit der Unfähigkeit, Östrogene aus Vorläufersteroidhormonen zu synthetisieren, Symptome eines metabolischen Syndroms wie z.B. eine Insulinresistenz und Adipositas (Jones et al. 2000).

Als einfacher Parameter zur Quantifizierung des patienteneigenen Körperfettanteils in der klinischen Praxis dient der sog. BMI. Er berechnet sich lediglich aus den zwei Parametern Körpergewicht und Körpergröße. Damit ermöglicht der BMI zwar eine grobe Abschätzung des Gesamtkörperfettanteils, ist jedoch in seiner Einfachheit auch äußerst fehleranfällig. Eine Berücksichtigung von stark ausgebildetem Muskelapparat oder gar eine Differenzierung der unterschiedlichen Fettdepots ist mit Hilfe des BMI nicht möglich.

Als weitere Methode zur Abschätzung des Körperfettanteils dient die sog. Calipometrie. Damit wird die Vermessung von Hautfalten an unterschiedlichen Körperregionen bezeichnet. Die Ergebnisse können anschließend, nach Einbeziehung weiterer Parameter, mit Hilfe von Tabellen interpretiert werden. Studien zeigen eine signifikante positive Korrelation zwischen der Ausprägung der subscapulären Hautfalte und Risikofaktoren wie beispielsweise Bluthochdruck, Blutzuckerkonzentration und den Serumspiegeln von Triglyceriden und Cholesterol (Pavlica et al. 2013). Eine weitere Arbeit fand sogar eine inverse Korrelation der subscapulären Hautfaltendicke zum IGFBP-1. Dieser Parameter weist charakteristischerweise einen umso niedrigeren Serumspiegel auf, je größer das viszerale Fettdepot des Probanden ist. Damit konnte eine direkte Korrelation von subkutanem und viszeralem Fettdepot belegt werden (Savastano et al. 2012). Demnach bildet die subscapuläre Hautfalte also gleich mehrere bedeutende Risikofaktoren des metabolischen Syndroms (MS) ab. Hier sei erwähnt, dass die in der Calipometrie gemessenen Hautfalten im Wesentlichen das Unterhautfettgewebe repräsentieren, also diejenige Gewebsschicht, die auch Untersuchungsgegenstand dieser Arbeit ist.

1.6.1.5 Die subkutane Muskelschicht

Unter der Subkutis befindet sich bei Säugern eine dünne Schicht quergestreifter Muskulatur. Ihre Funktion für den Menschen findet in der wissenschaftlichen Literatur selten Erwähnung, da sie evolutionsbedingt nur noch rudimentär an wenigen Stellen der Haut vorhanden ist. Das bekannteste Beispiel ist das epifaszial gelegene Platysma des Halses. Bei Ratten wie auch bei anderen Spezies kann diese auch als *panniculus carnosus* bezeichnete Schicht jedoch deutlich dicker ausgeprägt sein. In diesen Fällen erfüllt sie noch immer wichtige Funktionen, bei Weidetieren z.B. das oberflächliche Zucken der Haut zur Vertreibung von Insekten.

Aufgrund ihrer histologischen Zugehörigkeit zur quergestreiften Muskulatur wird die subkutane Muskelschicht im entsprechenden Kapitel zusammen mit den Muskelschnitten des *M. gastrocnemius* behandelt.

1.6.2 Die quergestreifte Skelettmuskulatur und ihre Veränderungen im Alter

Es ist bekannt, dass im Rahmen des natürlichen Alterungsprozesses die Skelettmuskelmasse von Männern und Frauen einer zunehmenden Reduktion unterliegt. Diese Entwicklung setzt durchschnittlich bereits nach dem 20. Lebensjahr ein (Gallagher et al. 1997).

1.6.2.1 Geschlechtsabhängige Muskelveränderungen im Alter

Der weitere Verlauf und das Ausmaß der Skelettmuskelreduktion werden stark durch Umwelteinflüsse, Lebensgewohnheiten und ganz besonders durch das Geschlecht beeinflusst. Phillips und Kollegen wiesen in einer Studie zur geschlechts- und altersabhängigen Muskelkraftentwicklung nach, dass die geschlechtsadaptierte spezifische Muskelkraft – gemessen wurde die maximale Kraftentwicklung des *M. adductor pollicis* – bei jungen Männern und prämenopausalen Frauen noch keine signifikanten Unterschiede aufweist. Kurz nach der Menopause konnte bei Frauen jedoch ein starker Rückgang der Kontraktionskraft gemessen werden. Bei den männlichen Versuchsteilnehmern wurde eine vergleichbare Muskelschwäche erst im durchschnittlich 60. Lebensjahr verzeichnet (Phillips et al. 1993; Maltais et al. 2009).

Bemerkenswerterweise blieb bei einer weiteren Versuchsgruppe aus Frauen, die mit einer östrogenbasierten Hormonersatztherapie behandelt wurden, die Kontraktionskraft des Muskels erhalten.

1.6.2.2 Einflüsse der Östrogene auf die Skelettmuskulatur

Auf molekularer Ebene war dieses Untersuchungsergebnis anfangs nicht begründbar. Während die physiologischen und biochemischen Zusammenhänge eines sinkenden Testosterongehaltes und steigender Muskelschwäche bei Männern schon länger hinreichend erforscht sind (vgl. Ferrando et al. 2002), rückten die Einflüsse der weiblichen Sexualhormone Estron, Estradiol und Estriol auf die Skelettmuskulatur erst später in den wissenschaftlichen Fokus. Allerdings konnten mehrere Studien mit unterschiedlichen Designs eine Östrogenwirkung auf die Skelettmuskulatur hinsichtlich Kraftentwicklung und Funktionalität eindeutig belegen. Zusätzlich gelang über PCR-gestützte Verfahren der Nachweis von ER- α -mRNA in Skelettmuskelzellen (zusammengefasst in Lowe et al. 2010).

Damit konnte neben bereits bekannten Risikofaktoren wie Bewegungsarmut, oxidativem Stress und mangelhafte Proteinzufuhr (Maltais et al. 2009) eine neue molekularbiologische Erklärung für die im Vergleich zu Männern deutlich schnellere Abnahme der Muskelkraft bei postmenopausalen Frauen gefunden werden. Dies könnte die Grundlage für gezielte medikamentös-hormonelle Therapieansätze der auch als Sarkopenie bezeichneten Muskelschwäche im Alter sein.

Auch in quergestreifte Muskelzellen von Mäusen und Ratten werden regelhaft ER präsentiert (Lemoine et al. 2002). Über diesen Signalweg werden bei pathologischen Veränderungen des Östrogenspiegels auch im Tiermodell deutliche Reaktionen der Skelettmuskulatur hervorgerufen. Diese sind u.a. eine abnehmende Dichte der Muskulatur nach histologischen Gesichtspunkten und eine geringere Kraftentwicklung, wie mit Hilfe unterschiedlicher Studiendesigns festgestellt werden konnte (Moreira et al. 2005). Bemerkenswerterweise ist die abnehmende Kontraktilität nicht nur auf eine bloße Verminderung des Proteingehalts zurückzuführen. Der Hormonspiegel scheint sogar unmittelbare Auswirkungen auf die kleinsten muskulären Funktionseinheiten zu haben, die Myosinfilamente. Bei ovx Mäusen war der Anteil der an Muskelbewegungen beteiligten Myosinköpfchen um 15% niedriger als bei

der intakten Kontrollgruppe (Moran et al. 2006). Zusammengenommen hat dies signifikant negative Auswirkungen auf wichtige Leistungsparameter der Muskulatur wie Kontraktions- und Haltekraft (Warren et al. 1996; Moran et al. 2006). Damit entwickelt der Muskelapparat von ovx Ratten dieselben Symptome wie bei klimakterischen Frauen. Im Tiermodell ist zudem eine protektive und/oder regenerationsfördernde Wirkung von E2 auf Skelettmuskulaturzellen nachgewiesen, die nach einer Dauerbelastung Mikroverletzungen aufwiesen (Sotiriadou et al. 2006).

1.6.2.3 Sarkopenie: ein klinisch relevantes Symptom des Klimakteriums

Die altersbedingte Muskelschwäche oder Sarkopenie spielt im klimakterischen Symptomkomplex eine bedeutende Rolle, weil sie nicht nur als eigenständiges Krankheitsbild, sondern auch als wichtiger Einflussfaktor auf andere typische postmenopausale Beschwerden gesehen werden muss: So beschreiben beispielsweise Di Monaco et al. (2011) eine signifikante Korrelation von Sarkopenie und Osteoporose bei einer klinischen Studie an 313 Frauen, die eine Hüftfraktur erlitten hatten. In einer weiteren Studie mit postmenopausalen Frauen verbesserte sich nach plazebo-kontrollierter Hormonersatztherapie die Muskelkraft-, -masse und -textur der Probandinnen deutlich. Dieser Umstand könnte dabei helfen, die erhöhte Sturzgefahr im Alter zu vermindern (Phillips et al. 1993; Sipilä et al. 2001).

1.6.3 Elastisches Fasergewebe

1.6.3.1 Funktionen elastischen Fasergewebes im menschlichen Körper

Elastische Fasern sind wichtiger Bestandteil der extrazellulären Matrix und finden sich in vielen bindegewebigen Kompartimenten des menschlichen Organismus. Die aus elastischen Mikrofibrillen und dem Polymer Elastin bestehenden Fasern sind verantwortlich für flexiblen Halt, Formgebung und Mobilität von großen Blutgefäßen, Bändern und Sehnen, der Lunge und der Haut (Mithieux und Weiss 2005; Kielty 2006). Einige im Alter häufiger auftretende Ereignisse wie Faltenbildung und Abnahme der mechanischen Belastungstoleranz der Haut, Altersemphyse der Lunge oder eine zunehmende Inzidenz von arteriellem Hypertonus (zusammengefasst in Sherratt 2009) sowie verstärkte Kalzium- und Lipidablagerungen in den

Gefäßwänden (Robert et al. 2008) führen viele Autoren zumindest teilweise auf die degenerativ veränderte Textur der elastischen Fasern zurück. Die Regenerationsfähigkeit geschädigter Faseranteile lässt dabei mit steigendem Lebensalter stetig nach (Fritze et al. 2012).

Ein weiterer interessanter Aspekt ist der von mehreren Autoren geäußerte dringende Verdacht, dass in der multifaktoriellen Genese der Harninkontinenz bei älteren Frauen die Elastinfasern eine wichtige Rolle spielen (Ulmsten und Falconer 1999; Goepel und Thomssen 2006; Trabucco et al. 2007). Unter diesem die Lebensqualität mitunter massiv einschränkenden Symptomkomplex leiden in unterschiedlichem Ausmaß bis zu 19,3 % der über 60-jährigen Frauen (Schumacher 2007)

1.6.3.2 Texturänderung elastischer Fasern bei Änderungen im Östrogenhaushalt

Ein Hinweis, dass die sich ändernden Hormonspiegel der Postmenopause einen Einfluss auf die elastischen Fasern im weiblichen Körper haben, findet sich u.a. in einer Studie von Bologna und Kollegen (1989). Sein Team untersuchte Elastinfaserproben einer weitgehend sonnengeschützten Körperregion, der *regio glutealis*, von Frauen mit vorzeitiger Menopause. Eine licht- und elektronenmikroskopisch basierte Auswertung ergab eindeutig degenerative Veränderungen wie eine lakunäre Vergrößerung der Zellzwischenräume, zerfaserte Textur und granuläre Degeneration. Vergleichbare mikroskopische Alterungsmerkmale sind üblich bei Frauen, die rund 20 Jahre älter sind als die untersuchten Personen (Bologna et al. 1989; Lobo et al. 2000). Die Östrogensensibilität elastischer Fasern konnte auch im Tierversuch dargestellt werden. Die bereits zitierte Arbeitsgruppe um Tsukahara stellte nicht nur eine stärkere Elastizitätsabnahme der Haut von UV-B-bestrahlten ovx Ratten fest, sondern fand auch Auffälligkeiten in der dreidimensionalen Struktur der elastischen Faseranteile. Das kann als Teilerklärung für die Progression von Falten bei Östrogendefizienz gelten (Tsukahara et al. 2007).

1.6.4 Zwischenfazit

Man kann also festhalten: Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebetypen unterliegen bei Frauen alterstypischen Veränderungen, wie zum Beispiel einer Schichtdickenabnahme von Epidermis und Dermis, Zunahme des subkutanen Fettgewebes, einer rückläufigen Skelettmuskelmasse und veränderter Textur der insgesamt reduzierten Elastinfasern. Diese Veränderungen sind der Grund für klinisch relevante Erkrankungen. Frauen im postmenopausalen Alter sind davon oftmals besonders betroffen. Zahlreiche zum Teil gravierende Einflüsse des sinkenden Östrogenspiegels auf oben genannte Symptome konnten wissenschaftlich bestätigt werden. Mit der ovx SD-Ratte steht ein Tiermodell zur Verfügung, das aufgrund seiner Ähnlichkeit bei physiologischen Zusammenhängen und der Gleichartigkeit von Symptomausprägungen besonders gut zur Erforschung der Postmenopause geeignet ist.

1.7 Studienziel

Die histomorphometrischen Effekte des Extraktes CR BNO 1055 auf verschiedene Schichten der Haut, auf subkutanes Binde-, Fett- und Muskelgewebe sowie auf die Skelettmuskulatur und angrenzende elastische Faseranteile der extrazellulären Matrix sind Gegenstand dieser Untersuchung. Alle dafür gewonnenen Gewebeproben stammen von ovx SD-Ratten, die als anerkanntes Tiermodell des Klimakteriums gelten.

Der Nachweis eines ernsthaften Nebenwirkungsprofils der bisherigen Standardtherapie klimakterischer Beschwerden, der HRT, erfordert einen neuen, alternativen Therapieansatz. CR findet als zugelassenes Phytotherapeutikum bereits seit vielen Jahren klinische Anwendung, vor allem zur Behandlung psychischer und neurovegetativer Beschwerden während der Wechseljahre. Es ist hinreichend belegt, dass die positiven Effekte dabei nicht östrogenabhängig, sondern über verschiedene andere Transmittersysteme vermittelt werden.

Neben der derzeitigen *on label*-Verwendung weisen zahlreiche Studien auf weitere vielversprechende Effekte von CR hin, beispielsweise eine eindeutige Osteoprotektion sowie eine positive Modulation der Risikoparameter des MS. Gerade zur Prävention typischer Alterskrankheiten ganz besonders bei postmenopausalen Frauen wären diese Eigenschaften von CR von großem therapeutischen Nutzen.

Durch die Untersuchung der oben genannten Gewebe können einerseits bereits gewonnene Erkenntnisse weiter untermauert und erweitert werden. Dies gilt insbesondere für die subkutane Fettgewebsschicht als Indikator des Gesamtkörperfettanteils. Die hier nachgewiesenen Veränderungen sollen Ausgangspunkt für weitere Rückschlüsse auf die Entwicklung eines MS unter CR-Therapie sein. Außerdem soll über die Analyse der Skelettmuskulatur und des elastischen Faseranteils der Einfluss von CR auf den Symptomkomplex der Sarkopenie festgestellt werden. Durch die getrennte Testung von CR-Gesamtextrakt und zweier durch chemische Verfahren gewonnenen Fraktionen soll eine genaue Zuordnung der beobachteten Effekte zu den jeweiligen Substanzklassen ermöglicht werden. Dieses Vorgehen dient nicht nur der Erforschung möglicher synergistischer bzw. antagonistischer Effekte zwischen den unterschiedlichen Stoffgemischen, sondern soll die Grundlage für eine spätere gezielte Wirkstoffentwicklung in der klinischen Praxis schaffen.

2. Material und Methoden

Die hier erwähnten Versuchstiere waren wissenschaftliche Untersuchungsobjekte mehrerer Studien innerhalb derselben Arbeitsgruppe. Die folgenden Ausführungen dienen einer chronologischen Darstellung und detailgenauen Abbildung des Versuchsablaufs und sollen eine Einordnung der vorliegenden Arbeit in den Gesamtkontext ermöglichen. Ich selbst war an der Haltung der Versuchstiere, der Ovariectomie und der Applikation der Testsubstanz nicht beteiligt (Kapitel 2.1.1 bis 2.1.5). Nach Unterweisung in die Techniken der histologischen Gewebsaufbereitung konnte ich die von MTA Frau H. Brüggemann-Meyer bereits angefertigten und gefärbten Gewebeschnitte (Kapitel 2.2.1 bis 2.2.3) freundlicherweise übernehmen. Ab diesem Zeitpunkt (Kapitel 2.2.4) oblag die Vermessung, Analyse und Interpretation der Ergebnisse mir selbst. Die im Kapitel 2.1.1 bis 2.2.3 sowie Kapitel 6.1 bis 6.3 genannten Daten entstammen einem Datenpool der Abteilung, der allen am Versuch teilnehmenden Doktoranden zur Verfügung stand.

2.1 Tierversuche

2.1.1 Versuchstiere und Haltung

Die Tierversuche fanden im Zeitraum von 17.03.2010 bis 05.05.2010 mit Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig (Aktenzeichen 33.11.42504-04-043/08) und unter Aufsicht von Frau PD Dr. med. Seidlová-Wuttke statt. Dabei wurden in der tierexperimentellen Abteilung des Universitätsklinikums Göttingen 40 weibliche, etwa drei Monate alte SD-Ratten (Harlan-Winkelmann, Borcheln) in Gruppen zu jeweils fünf Tieren in acht Makrolonkäfige Typ IV (Tecniplast® Deutschland GmbH, Hohenpeißenberg) gehalten. Der Versuchsraum wurde mit einer Hell-Dunkel-Frequenz von jeweils 12 Stunden mit künstlichem Licht beleuchtet. Die Raumtemperatur lag konstant bei 23°± 1° Celsius mit einer Luftfeuchtigkeit von 50-55%. Während einer ersten Narkose, die alle Tiere im Zeitraum vom 29.03. - 04.04.2010 wegen einer qCT-Untersuchung für weitere Studien bekommen hatten, wurde jeder Ratte zur individuellen Identifikationsmöglichkeit ein Transponder (Transponder-UNO MICRO-ID-System mit ISO-Transponder, Firma Uno-Roesvastaal BV, Zevenaar Niederlande) subkutan in die

Nackenregion implantiert. Zum Scannen der Tiere wurde ein elektronisches Lesegerät (Gesreader II GeS008: ISO-kompatibler Taschenleser) verwendet.

2.1.2 Futterbedingungen vor Ovariectomie

Das Körpergewicht der Tiere lag zu Beginn des Versuchs zwischen 245 und 295 g. In der 20-tägigen Eingewöhnungsphase (Zeitraum bis zur Ovx) erfolgte die Fütterung der Tiere mit Wasser und sojafreiem Kontrollfutter EF R/M, E 150000-04 (ssniff® Spezialdiäten GmbH, Soest), um die östrogenartige Wirkung von Soja zu vermeiden. Eine isocalorische Proteinzufuhr wurde stattdessen mit Kartoffelprotein sichergestellt. Das Futter stand den Tieren dabei zur freien Verfügung, ein Mengenlimit bestand nicht. Am Ende der ersten Versuchsphase wurden einzelne Tiere entsprechend ihrem damals aktuellen Körpergewicht in den Käfigen ausgetauscht, um ein ausgeglichenes Durchschnittsgewicht pro Käfig zu erreichen. Auf diese Weise wurden Gewichtsentwicklung bzw. Gewebezunahme/ -abnahme der einzelnen Testgruppen untereinander vergleichbar gemacht.

2.1.3 Ovariectomie

Die bilaterale Ovariectomie der Versuchstiere erfolgte am 06.04.2010. Die Anästhesie der Tiere wurde in Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene®, Abbott-AG, Baar, Schweiz) durchgeführt, zur intra- und postoperativen Analgesie wurde Carprofen s.c. (Rimadyl®, Pfizer GmbH, Karlsruhe) appliziert. Anschließend erfolgte nach Rasur des Areals eine bilaterale Inzision am Abdomen, die Eröffnung der Bauchhöhle, die Präparation und Darstellung von Uterus und Adnexen, Abklemmung und Resektion der Ovarien und Rückverlagerung des Uterus *in situ*. Zur Wundnaht von Peritoneum und Muskulatur wurde Vicryl®-Nahtmaterial verwendet, die Hautinzisionen wurden geklammert (Michel-Klammern®, Firma Martin, Tuttlingen). Zur Kontrolle des postoperativen Verlaufs wurden die Tiere bis zum Erwachen aus der Narkose in einen separaten Käfig verbracht, bei Ausbleiben von Nachblutungskomplikationen konnten die Tiere in den Versuchskäfig zurückgesetzt werden.

2.1.4 Applikation der Wirkstoffe

In der nun folgenden Applikationsphase mit einer Dauer von im Mittel 32 Tagen wurden jeweils einer Testgruppe à 10 Tieren entweder der Extrakt CR BNO 1055/C001 (Charge Nr. 690 253, Nr. 001) oder eine der beiden zu untersuchenden Fraktionen verabreicht. Die Wirkstoffapplikation geschah *per os* mit entsprechend angereicherten Futterpellets des bereits erwähnten Kontrollfutters EF R/M, E 150000-04. Die vierte Testgruppe bekam weiterhin nur das Kontrollfutter ohne Zusätze. Sämtliche mit Wirkstoffen angereicherten Futtermittel waren im Rahmen des bereits genannten Wissenschaftsprojektes der bayerischen Forschungsförderung von der Firma Bionorica® produziert und zur Verfügung gestellt worden (vgl. Kapitel 1.4.3).

Zur Berechnung des Futterverbrauchs während der Applikationsphase wurde im Zeitabstand von sieben Tagen jeweils vormittags die verbliebene Pelletmenge gewogen. Nach Berechnung des mittleren Tagesverbrauchs konnte mit Hilfe der bekannten Wirkstoffkonzentrationen die durchschnittlich aufgenommene Tagesdosis der Testsubstanzen ermittelt werden. Genaue Zahlenangaben können Tab. 1 entnommen werden. Die dort angeführten Zahlenangaben entstammen dem Datenpool der Abteilung.

Testsubstanz	Wirkstoffkonzentration [mg/kg Futter]	mittlere Futtermenge [g/Tier/Tag]	mittlere Substanzdosis [mg/Tier/Tag]
Kontrolle EF R/M	--	17,64	--
CR BNO 1055/C001	500	18,3	9,15
Saponinfraktion	117,6	17,97	2,11
Restfraktion	382,35	18,04	6,9

Tab.1: Übersicht über den mittleren Futterverbrauch der Versuchsgruppe „Fut Sap kurz“, die Wirkstoffkonzentrationen und die jeweils errechnete mittlere Substanzdosis

2.1.5 Versuchsende und Obduktion:

Alle Versuchstiere wurden am 05.05.2010 obduziert. Hierzu erfolgte, nach Identifikation über den implantierten Transponder, eine Dekapitation unter CO₂-Narkose. Aufgefangenes Blut wurde in Serumröhrchen verbracht und nach Zentrifugation bei -20°C für weitere Studien eingefroren. Anschließend wurden den Tieren Hautproben und verschiedene Organe entnommen, die nach Überführung in Eppendorfcups (Firma Sarstedt, Nümbrecht) umgehend in flüssigem Stickstoff bei -70°C konserviert wurden.

2.2 Histomorphometrische Auswertung

2.2.1 Präparation und Fixierung der Schnitte

Für die vorliegende Arbeit wurden bei jedem Tier jeweils zwei Hautproben links lateral der *linea alba* inklusive des subkutanen Fett- und Muskelgewebes gewonnen. Außerdem wurden je zwei Muskelproben aus dem mittleren Drittel des *M. gastrocnemius* entnommen (siehe Abb. 1). Anschließend wurden die Gewebe für 48 Stunden in Eppendorfgläsern durch 10%ige Formalinlösung fixiert. Danach wurden die Präparate dehydratisiert und in Paraffin (EG 1160, Leica®) eingebettet (siehe auch Kap. 6: Methodischer Anhang).

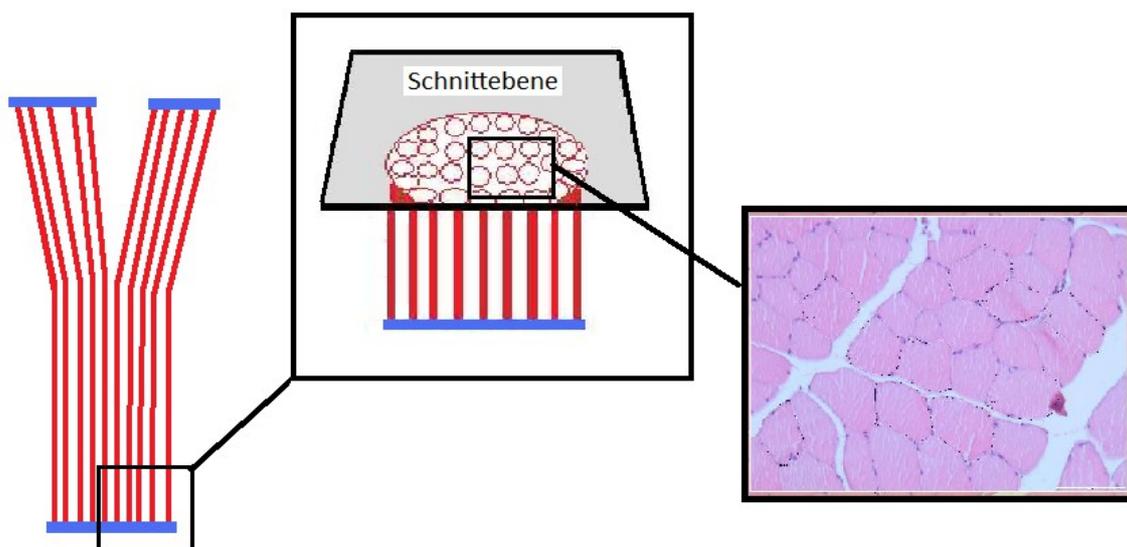


Abb. 1: Schema zur Verdeutlichung der Schnittebene im *M. gastrocnemius*;
ganz li.: Darstellung der longitudinal verlaufenden Muskelfasern mit Ursprung und Ansatz

2.2.2 HE-Färbetechnik

Zur Untersuchung und mikroskopischen Auswertung sowohl der Hautschichten als auch der Muskelfasern wurden pro Versuchstier zwei Objektträger mit je zwei Slices ausgewählt und mit einer routinemäßigen Hämatoxylin-Eosin-Färbung bearbeitet (Hämatoxylin Mayer, Eosin yellow EtOH 70%/ H₂O, Firma Merck, Darmstadt). Die optimale Färbezeit wurde davor über Probefärbungen ermittelt.

2.2.3 Elastikafärbung

Zur mikroskopischen Auswertung der Elastikaschnitte wurden pro Versuchstier zwei Objektträger mit je zwei Slices präpariert. Es folgte eine erste Elastikafärbung der entparaffinierten Proben mit einer 1:1 Mischung aus Resorcinfuchsin und HCL-Alkohol. Nach Spülung in *aqua dest.* und Differenzierung in 96% HCL-Alkohol wurden die Schnitte mit Eisenhämatoxylin-Weigert und schließlich mit Pikrofuchsin-van-Gieson behandelt (Elastikafärbung nach van Gieson). Abschließend wurden die Präparate nach Abtrocknung mit Filterpapier durch 96% Alkohol und Xylol fixiert.

2.2.4 Auswertung

Die histomorphometrische Auswertung aller beschriebenen Gewebetypen erfolgte unter dem Mikroskop (Leica Microsystems, Fa. Zeiss, Nussloch GmbH, Deutschland). Das zufällig ausgewählte Blickfeld wurde digital fotografiert und anschließend mit der Bildbearbeitungssoftware *analySIS*[®] 3.0 maßstabsgetreu nach unten angegebenen Schemata (siehe Tab. 2) vermessen. Die erhobenen Messwerte wurden automatisch in Excel-Tabellen (Microsoft Office 2003) übertragen und entsprechen den realen Größenverhältnissen im μm bzw. μm^2 -Bereich.

2.2.4.1 Auswertung der HE-Hautschnitte

Bei den mit Hämatoxylin-Eosin gefärbten Hautschnitten aller 40 Versuchstiere wurde die Dicke von Epidermis, Dermis, subkutanem Fettgewebe und subkutanem Muskelgewebe mit o.g. Hilfsmitteln bestimmt.

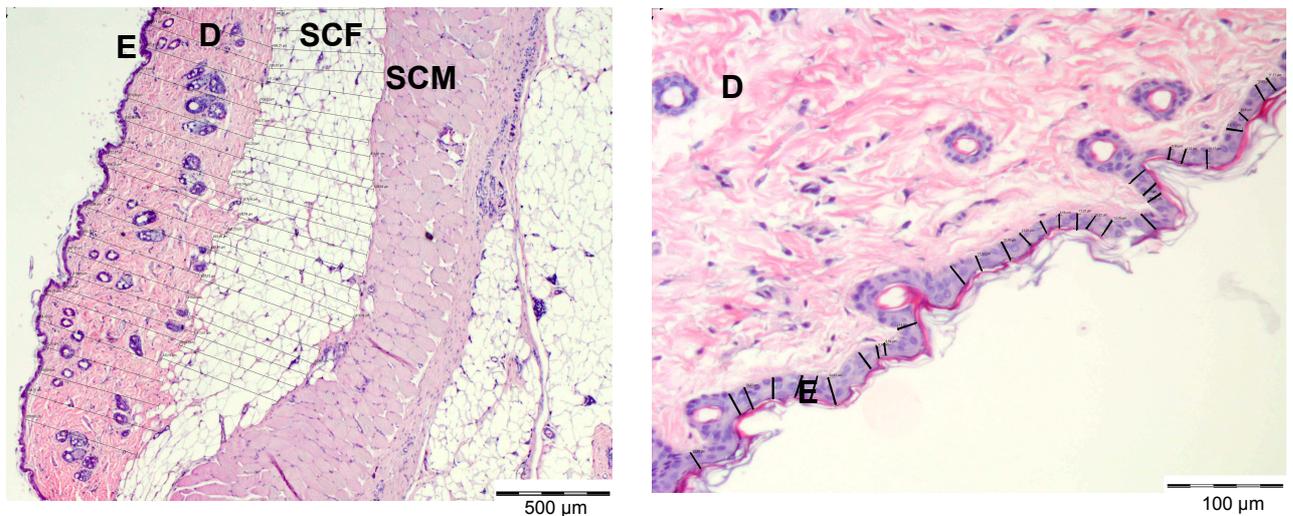


Abb. 2: Hautschichten, HE-Färbung, Vergrößerung li. 3,125x, Vergrößerung re. 16x;

E= Epidermis

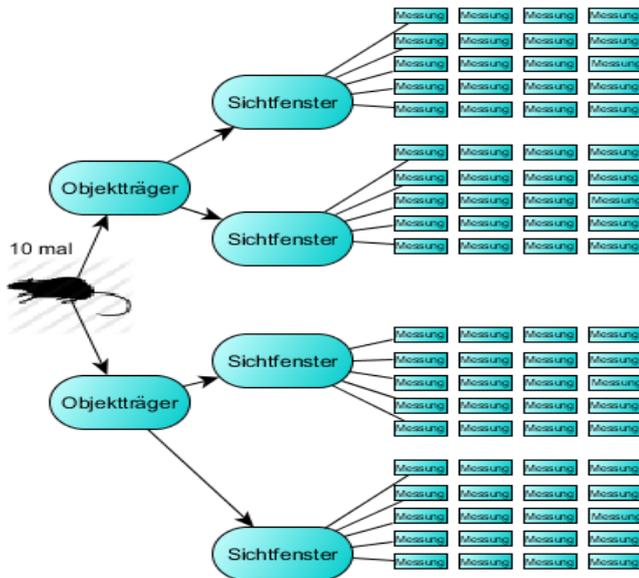
D= Dermis

SCF= subkutanem Fettgewebe

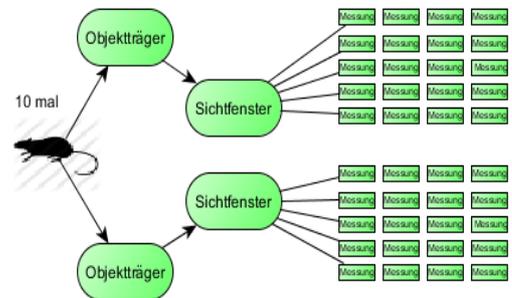
SCM= subkutanem Muskelgewebe;

Für die Epidermismessungen wurden jeweils zwei Sichtfenster pro Objektträger bei 16-facher Vergrößerung analysiert, alle restlichen Hautschichten wurden bei 3,125-facher Vergrößerung in einem Sichtfenster vermessen. Die Sichtfenster waren dabei stets randomisiert ausgewählt. Für jede zu untersuchende Schicht wurden ca. 20-25 senkrecht zur Schicht stehende, lineare Messungen von *superfizial* nach *profund* angelegt. Eine genaue Übersicht gibt Tab. 2.

2. Material und Methoden



■ Messschema Epidermis



■ Messschema Dermis, subkutanes Fett- und Muskelgewebe

Untersuchte Schicht:	Epidermis	Dermis	Subkutanes Fettgewebe	Subkutanes Muskelgewebe
Anzahl der Tiere pro Testgruppe	10	10	10	10
Anzahl der Objektträger pro Tier	2	2	2	2
Anzahl der Sichtfenster pro Objektträger	2	1	1	1
Messung pro Sichtfenster	min. 20	min. 20	min. 20	min. 20
Messungen pro Testgruppe	min. 800	min. 400	min. 400	min. 400

Tab. 2: Übersicht über das Vermessungsschema der jeweiligen Hautschichten; Anzahl der Messungen gerundet;

■ Messschema Epidermis

■ Messschema Dermis, subkutanes Fett- und Muskelgewebe;

2.2.4.2 Auswertung der HE-Muskelschnitte

Die Hämatoxylin-Eosin-gefärbten Muskelpräparate stammen aus dem mittleren Drittel des *M. gastrocnemius* der Versuchstiere. Die Schnittebene der Slices lag transversal zu den *kranio-kaudal* verlaufenden Muskelfasern. Anschließend konnte mit Hilfe von *analySIS*® 3.0 durch eine graphische Umrandung einer Muskelfaser ihr Umfang und ihre Fläche gemessen werden (Abb. 3). Dies geschah in zwei Sichtfenstern pro Objektträger für immer 10 ± 1 Muskelfasern. Dabei waren sowohl die Sichtfenster als auch die analysierten Muskelfasern randomisiert ausgewählt. Der Vergrößerungsfaktor betrug 16x. Die Ergebnisse wurden automatisch in eine Excel-Tabelle (Microsoft Office 2003) übertragen.

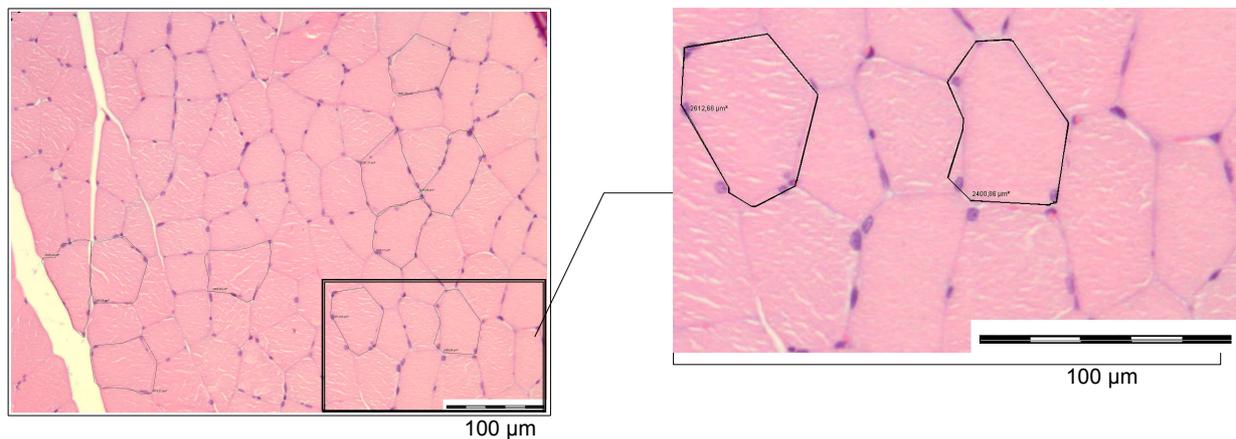


Abb. 3: transversal angeschnittene Muskelfasern, HE-Färbung, Vergrößerung 16fach;
re.: vergrößerter Bildausschnitt mit zwei analysierten Muskelfasern

2.2.4.3 Auswertung der Elastika-Schnitte

Auch die Probenentnahme zur Elastikafärbung erfolgte aus einem Teil des *M. gastrocnemius*. Die Schnittebene lag transversal zur untersuchten Schicht, die Vermessung erfolgte bei jedem Objektträger in zwei randomisiert gewählten Sichtfenstern bei vierfacher Vergrößerung. Dafür wurden im digitalisierten Bild (*analySIS*® 3.0) über eine Anpassung der Farbschwellenwerte die genauen Farbspektren von Muskulatur bzw. elastischen Fasern definiert und entsprechend eingefärbt (siehe Abb. 4).

Danach wurde mit einer Phasenanalyse sowohl die Gesamtfläche aller angefärbten Bereiche (in μm^2) als auch der jeweilige prozentuale Anteil von Muskel- und Elastikafasern ermittelt. Die Zahlenwerte wurden automatisch in eine Excel-Tabelle (Microsoft Office 2003) übertragen.

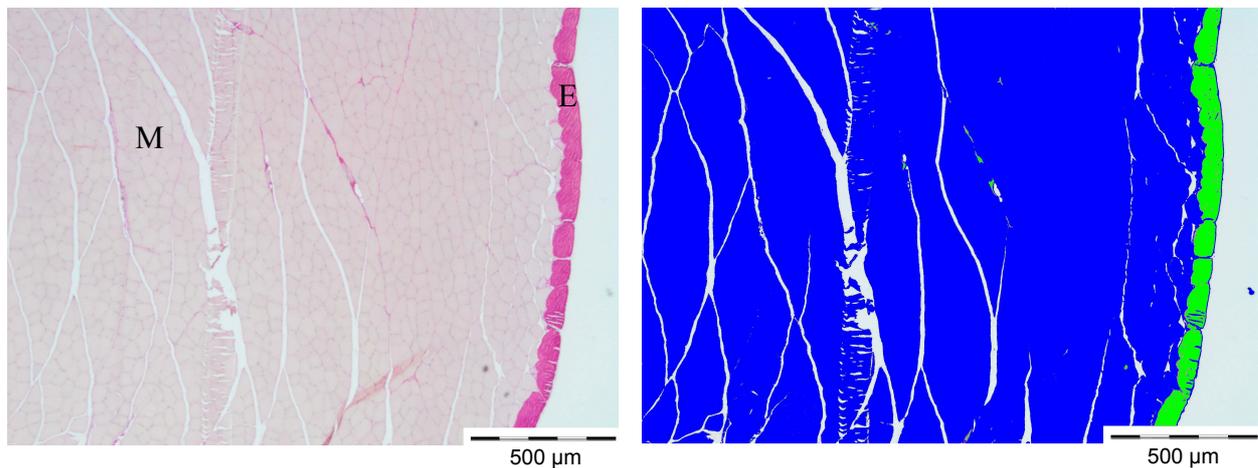


Abb. 4: links: HE-Elastikafärbung, Vergrößerungsfaktor 4x, M = Muskel, E = elastische Fasern
rechts: gleiches Bild mit entsprechend angepassten Farbschwellenwerten

■ = Muskelfläche, ■ = elastische Fasern

2.2.5 Statistische Auswertung

Zur statistische Auswertung wurden alle erhobenen Messergebnisse in das Programm Prism 5 (GraphPad Prism Version 5.00 für Windows, GraphPad Software, San Diego California USA) überführt. Unterschiede zwischen der Kontroll- und jeweils einer weiteren Gruppe wurden per ungepaartem t-Test auf Signifikanz getestet. Das Signifikanzniveau von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant vorgegeben. Graphisch dargestellt sind jeweils die Mittelwerte mit Standardfehler (Mittelwert \pm SEM).

3. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von CR BNO 1055 bzw. ihrer Fraktionen auf die Haut, die subkutane Fett- und Muskelschicht, Skelettmuskeln und elastische Bindegewebskompartimente. Die Proben der genannten Gewebetypen stammten von weiblichen SD-Ratten, die zur Simulation des postmenopausalen Hormonmangelzustandes ovariectomiert worden waren. Die histologisch aufbereiteten Gewebeschnitte dieser Tiere wurden unter histomorphometrischen Gesichtspunkten analysiert. Als Kontrollgruppe galten ovx Ratten, denen keine wirksamen Futterzusätze verabreicht wurden. Auf die Ergebnisse der Untersuchung soll im Folgenden genauer eingegangen werden.

3.1 Epidermis

In Abb. 5 ist die Schichtdicke der Epidermis der verschiedenen Testgruppen in μm aufgetragen. Die Saponinfraktion zeigte eine signifikante Zunahme der Epidermisschichtdicke von im Mittel 7,9% im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert \pm SEM: $12,7 \pm 0,14 \mu\text{m}$). Die Restfraktion hat dagegen einen signifikant kleineren Querdurchmesser der Epidermis zu verzeichnen.

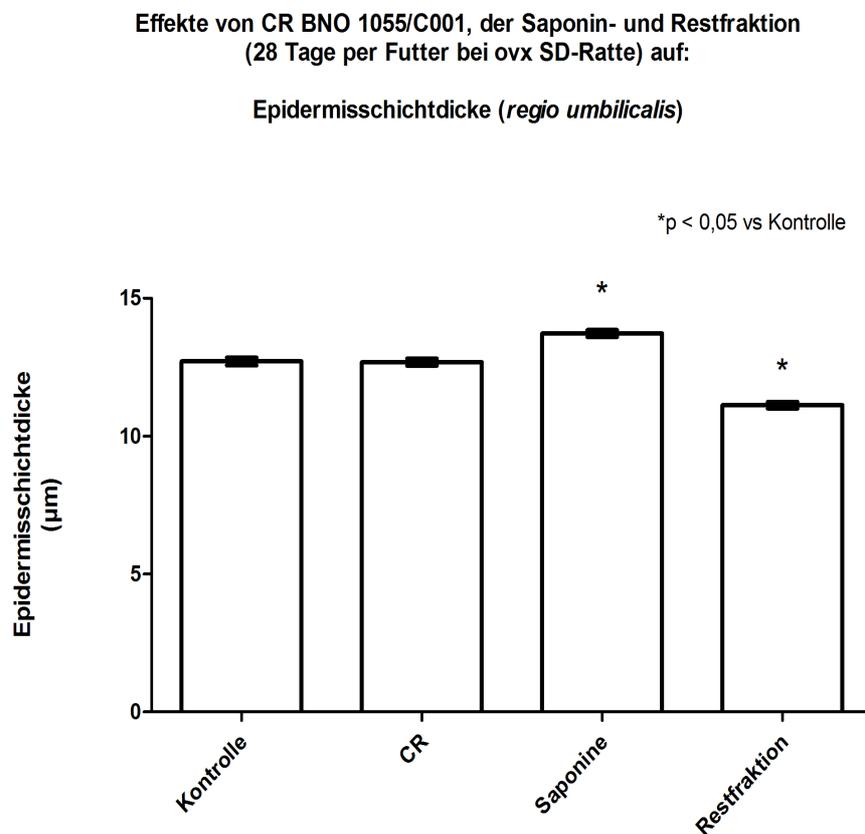


Abb. 5: Darstellung der Epidermisschichtdicke [in μm] der unbehandelten Kontrollgruppe und der Testgruppen, die mit CR bzw. einer der beiden Fraktionen (Saponine oder Restfraktion) behandelt wurden. Sap zeigte eine signifikante Zunahme von durchschnittlich 7,9%, in RF war die Epidermis dagegen signifikant dünner.

Aufgetragen in Means \pm SEM; Signifikanzniveau *p < 0,05 vs Kontrolle

3.2 Dermis

Wie in Abb. 6 dargestellt, waren die Veränderungen der Dermis nach Gabe von CR-Fractionen im Vergleich zur Kontrollgruppe moderat. Eine signifikante Zunahme des Querdurchmessers konnte jedoch in der CR-Gruppe festgestellt werden.

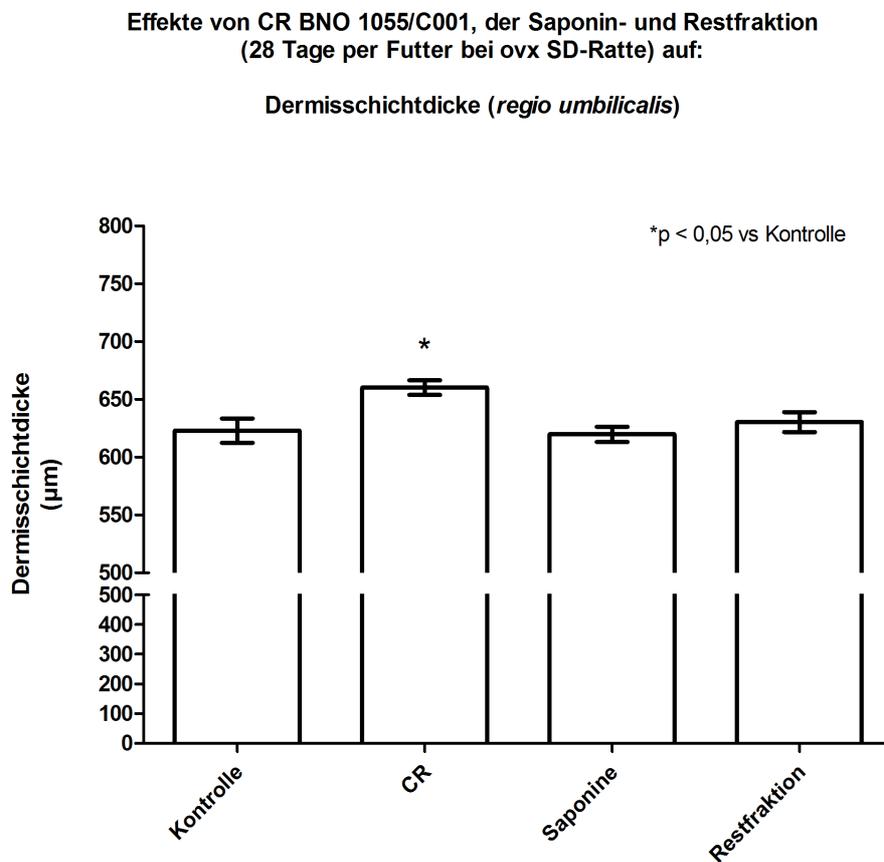


Abb. 6: Darstellung der Dermissschichtdicke [in µm] der unbehandelten Kontrollgruppe und der Testgruppen, die mit CR bzw. einer der beiden Fraktionen (Saponine oder Restfraktion) behandelt wurden. Während die Dermis der CR-Gruppe bei Versuchsende signifikant dicker als in der Kontrollgruppe war, fielen die Unterschiede nach Gabe der Fraktionen jeweils gering aus.

Aufgetragen in Means ± SEM. Signifikanzniveau *p < 0,05 vs Kontrolle

3.3. Subkutanes Fettgewebe

Deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Testgruppen waren beim subkutanen Fettgewebe zu verzeichnen, wie Abb. 7 verdeutlicht. Im Vergleich zur Kontrollgruppe (Mittelwert \pm SEM: $935,2 \pm 14,6 \mu\text{m}$) hatte sich bei allen mit CR oder den Fraktionen behandelten Tieren die Schichtdicke signifikant reduziert. Bei den Fraktionen war die Reduktion auch im Vergleich zur CR-Gruppe signifikant. Der stärkste Effekt zeigte sich in der Restfraktion, die im Mittel eine 29.7% dünnere Subkutanfettschicht hatte als die Kontrollgruppe.

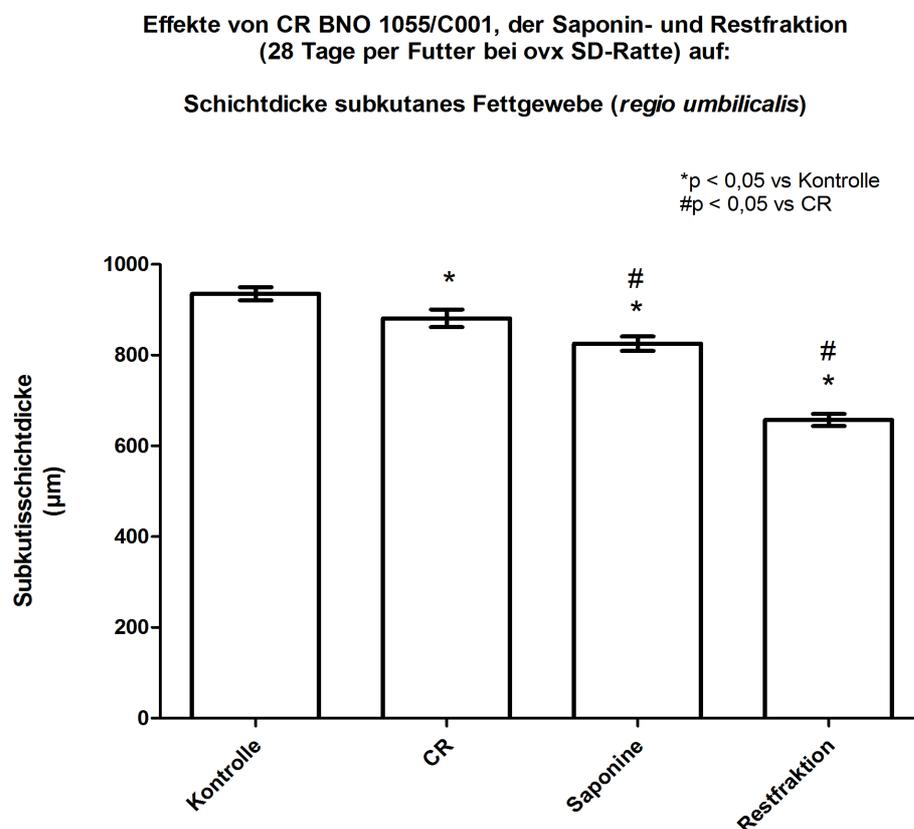


Abb. 7: Darstellung der Subkutanschichtdicke [in μm] der unbehandelten Kontrollgruppe und der Testgruppen, die mit CR bzw. einer der beiden Fraktionen (Saponine oder Restfraktion) behandelt wurden. Alle Versuchsgruppen hatten eine signifikant dünnere subkutane Fettschicht als KO. Selbst verglichen zur CR-Gruppe war die Subkutis der Fraktionen noch signifikant geringer ausgeprägt.

Aufgetragen in Means \pm SEM. Signifikanzniveau *p < 0,05 vs Kontrolle, #p < 0,05 vs CR

3.4 Subkutanen Muskelgewebe

Abb. 8 zeigt die Schichtdicke des subkutanen Muskelgewebes. Diese war bei Versuchsende sowohl in der CR-Gruppe als auch in der Restfraktion tendenziell, jedoch nicht signifikant geringer ausgeprägt als in der Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu hatten Tiere der Saponinfraktion eine signifikant dickere Muskelschicht als die Kontrollgruppe: Mittelwert \pm SEM in μm [Saponinfraktion] : [Kontrollfraktion] = $[640,1 \pm 10,0]$: $[523,6 \pm 9,9]$

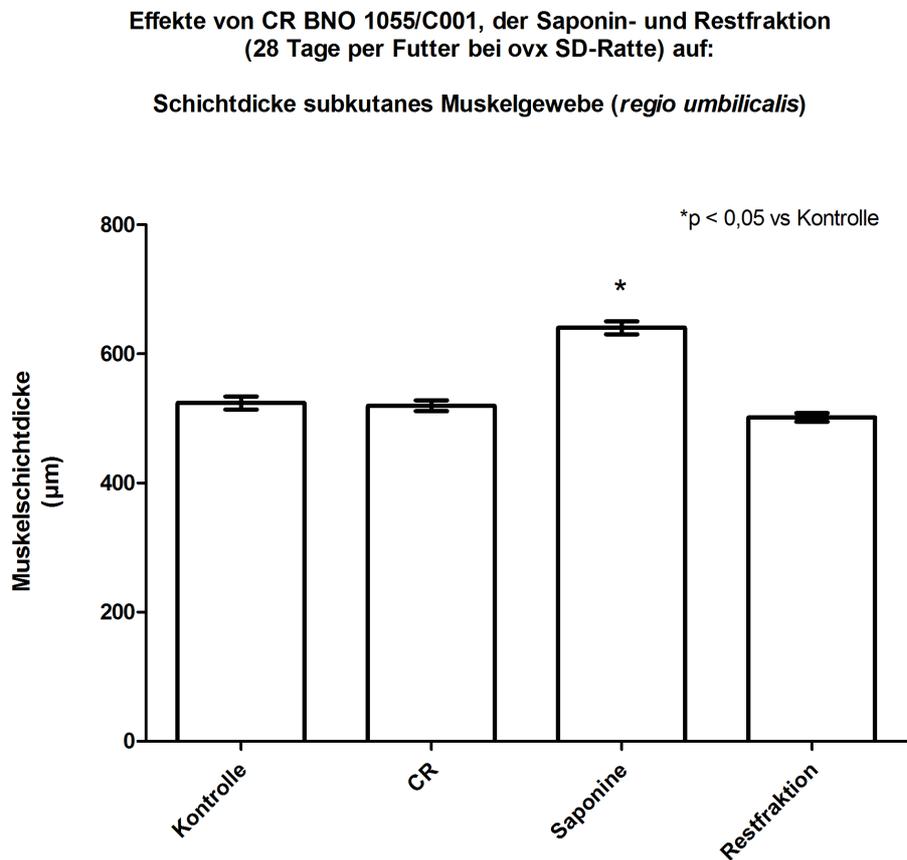


Abb. 8: Darstellung der subkutanen Muskelschichtdicke [in μm] der unbehandelten Kontrollgruppe und der Testgruppen, die mit CR bzw. einer der beiden Fraktionen (Saponine oder Restfraktion) behandelt wurden. Analog zu den unten angeführten Auswertungen der Skelettmuskulatur zeigt die Sap-Fraktion auch hier eine signifikante Zunahme des Muskelgewebes.

Aufgetragen in Means \pm SEM; Signifikanzniveau *p < 0,05 vs Kontrolle

3.5 Skelettmuskelfaserumfang und -fläche

Die statistische Auswertung von Muskelfaserumfang (Abb. 9) und -fläche (Abb. 10) der Skelettmuskulatur erfolgte am Beispiel von Transversalschnitten des *M. gastrocnemius*. Im Mittel wurden Muskelfasern mit dem geringsten Umfang bei den unbehandelten Tieren der Kontrollgruppe (Mittelwert \pm SEM: $232,7 \pm 1,9 \mu\text{m}$) gefunden. Alle anderen Testgruppen wiesen hinsichtlich des Umfangs und der Fläche signifikant vergrößerte Muskelfasern auf. Am deutlichsten war dieser Effekt bei der Saponinfraktion ausgeprägt (Umfang Mittelwert \pm SEM: $287,7 \pm 2,5 \mu\text{m}$).

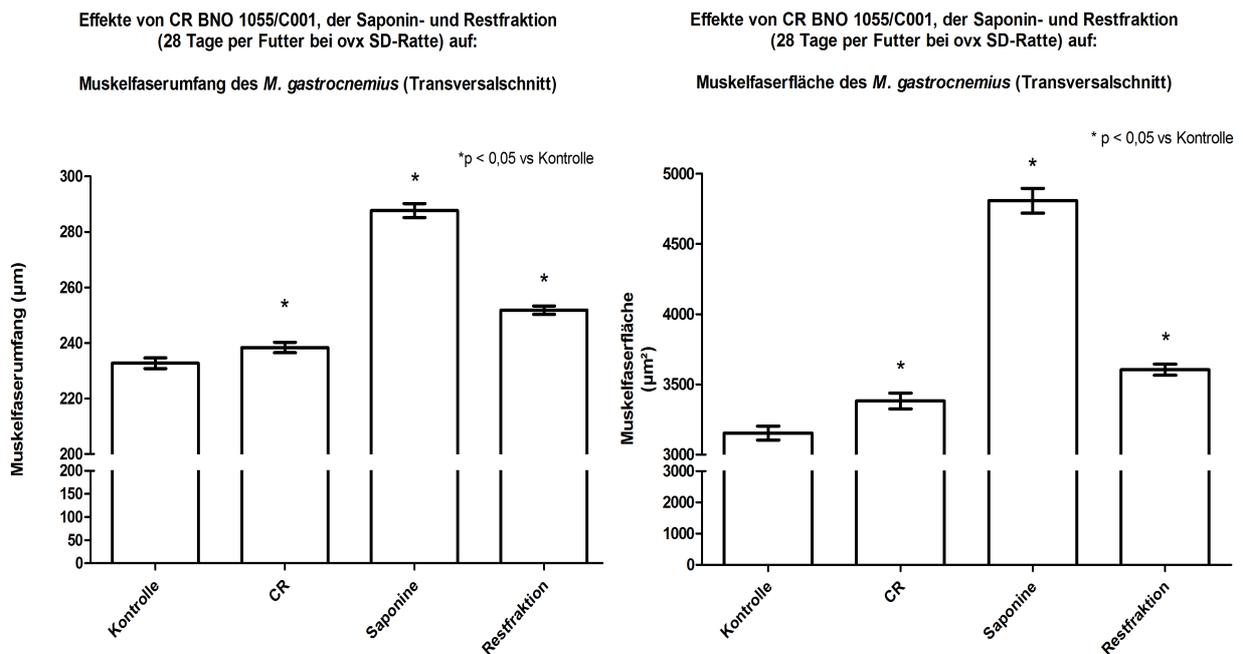


Abb. 9+10: Darstellung des Muskelfaserumfangs (links) und der Muskelfaserfläche (rechts) aus Transversalschnitten im Bereich des *M. Gastrocnemius*. Alle Testgruppen wiesen eine signifikante Zunahme der o.g. Aspekte im Vergleich zur Gruppe KO auf. Die deutlichste Veränderung zeigte, wie auch schon bei der subkutanen Muskelschicht, die Saponin-gruppe.

Aufgetragen in Means \pm SEM; Signifikanzniveau *p < 0,05 vs Kontrolle

3.6 Elastische Fasern

In Abb. 11 ist der prozentuale Anteil elastischer Fasern an der Gesamtgewebefläche im betrachteten Fenster abgebildet. Auch hier konnte für CR und noch deutlicher für die Saponinfraktion ein signifikant größerer Anteil an elastischen Fasern im Vergleich zur Kontrollgruppe nachgewiesen werden. Der Unterschied zwischen Kontrollgruppe und Restfraktion zeigt kein signifikantes Ergebnis.

Effekte von CR BNO 1055/C001, der Saponin- und Restfraktion (28 Tage per Futter an ovx Ratte) auf:

Flächenanteil der elastischen Faserschicht

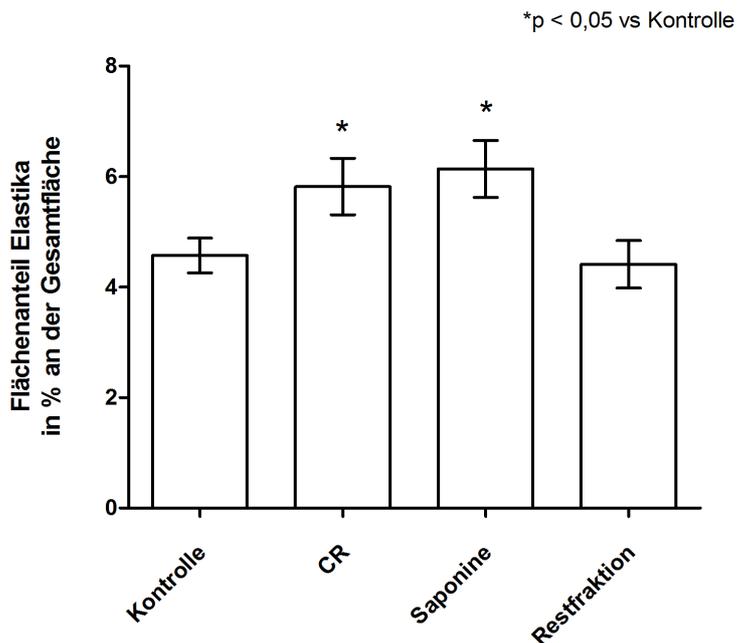


Abb. 11: Darstellung des Flächenanteils elastischer Fasern in % an der Gesamtfläche. CR und die Sap-Gruppe hatten einen signifikant höheren Anteil elastischer Fasern als die unbehandelten Kontrolltiere.

Aufgetragen in Means ± SEM; Signifikanzniveau *p < 0,05 vs Kontrolle

3.7 Zusammenfassung der erhobenen Ergebnisse

<u>Untersucher</u>			
<u>Parameter:</u>	CR	Saponin	Restfraktion
Epidermis	=	↑ +8 %	↓ -12 %
Dermis	↑ +6 %	=	+1 %
subkutane Fettschicht	↓ -6 %	↓ -12 %	↓ -30 %
subkutane Muskelschicht	=	↑ +22 %	-4 %
Skelettmuskelfaserumfang	↑ +2 %	↑ +24 %	↑ +8 %
Skelettmuskelfaserfläche	↑ +7 %	↑ +52 %	↑ +14 %
Proz. Anteil elast. Fasern	↑ +27 %	↑ +34 %	-3 %

Tab. 3: Übersicht über die im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnisse. Als Vergleichswert gilt stets die unbehandelte Kontrollgruppe. Prozentwerte gerundet.

↑ = signifikante Zunahme

↓ = signifikante Abnahme

4. Diskussion

Obwohl es sich bei den postmenopausalen Veränderungen des weiblichen Hormonhaushaltes um einen natürlichen Vorgang handelt, leiden viele Frauen zum Teil Jahre unter erheblichen körperlichen und psychischen Symptomen. Nachdem im Rahmen umfangreicher Studien (u.a. WHI) ernsthafte Nebenwirkungen der klassischen HRT wie ein erhöhtes Malignom-, Thrombembolie- und KHK-Risiko festgestellt worden waren, musste dieser Therapieansatz in Frage gestellt werden. In nur zehn Jahren sank die Rate der mit HRT behandelten Frauen länderabhängig um 40- 80 Prozent (Burger et al. 2012). Zahlreiche Studien suchten nach einer Alternative, die eine dem Östradiol vergleichbare Wirkung besitzt, die zugehörigen Risiken jedoch möglichst ausspart.

CR konnte als Therapieansatz postmenopausaler Beschwerden bereits in vielen wissenschaftlichen Studien überzeugen. So wurde beispielsweise ein osteoprotektiver Charakter ohne gleichzeitige Proliferation des Brustdrüsengewebes und Endometriums nachgewiesen (Raus et al. 2006; Lundström et al. 2011; Seidlová-Wuttke et al. 2012b).

Der Hauptfokus vieler wissenschaftlicher Arbeiten zu CR lag bislang auf den Organsystemen und Regelkreisen, die im Rahmen des Klimakteriums besonders deutlichen Veränderungen unterworfen sind bzw. die gravierendsten Symptome hervorrufen. Außerdem standen Untersuchungen zu Gewebekompartimenten im Vordergrund, bei denen nach klassischer HRT besagte Nebenwirkungen aufgetreten waren und die deshalb von besonderem wissenschaftlichen und öffentlichen Interesse waren. Das klinische Outcome der Patientinnen könnte jedoch auch von bislang weniger untersuchten Organsystemen signifikant beeinflusst werden.

Die vorliegende Arbeit soll mögliche Effekte von CR BNO 1055 auf die Haut, die Skelettmuskulatur und das elastische Bindegewebe genauer beleuchten. Dies geschieht unter Verwendung des etablierten Tiermodells der ovx SD-Ratte. Zur genaueren Zuordnung der beobachteten Effekte, auch im Hinblick auf eine mögliche zielgenaue Wirkstoffentwicklung, wurde die Grundsubstanz CR BNO 1055 zusätzlich in Fraktionen aus Triterpensaponinen und eine Restfraktion aufgeteilt. Jede dieser Gruppen wurde einzeln getestet.

Zwar ist die Wirkung von Östrogenen auf o.g. Gewebekompartimente nicht Gegenstand der

vorliegenden Arbeit, trotzdem sollen die Effekte der Sexualsteroidhormone gewissermaßen als Referenz und Vergleichsbasis gelten und werden deswegen auch im Diskussionsteil an einigen Stellen explizit beschrieben und aufgeführt.

4.1 Übertragbarkeit und Interpretation von Tiermodellstudien

Generell wird die Verwendung von Tiermodellen im Rahmen klinisch-experimenteller Forschungsarbeiten immer wieder kontrovers diskutiert. Dabei geht es nicht ausschließlich um Aspekte des Tierschutzes, vielmehr werden auch die unmittelbare Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen und damit die Aussagekraft solcher Studien angezweifelt oder zumindest kritisch hinterfragt (Prabhakar 2012; McGonigle und Ruggeri 2014). Diese Kritikpunkte sind stellenweise durchaus begründet und müssen im Sinne valider Forschungsergebnisse auch diskutiert werden. Für die vorliegende Arbeit soll deshalb an dieser Stelle noch einmal verdeutlicht werden: Die hier gewonnenen Daten wurden mit Hilfe eines Modells des klimakterischen Hormonmangelzustandes in Form der ovx SD-Ratte erhoben und sind deswegen selbstverständlich nicht unmittelbar auf den menschlichen Organismus übertragbar. Wie bereits in Kapitel 1.5 kurz ausgeführt, gilt das genannte Tiermodell aufgrund mehrerer Argumente trotzdem als eines der besten und erprobtesten, um die komplizierten endokrinologischen Verhältnisse der Postmenopause zu studieren und Wirkstoffe zu erforschen (vgl. Diaz Brinton 2012). Deswegen muss bei der folgenden Interpretation der Ergebnisse der modellhafte Charakter zwar stets berücksichtigt werden, die Daten können aber zumindest als deutliche Indizien für eine klinische Wirkung am Menschen gelten. Im Sinne einer deutlichen Abgrenzung zwischen der Physiologie der Ratte und der des Menschen wird in den folgenden Kapiteln stets auf Gemeinsamkeiten und Unterschiede in den einzelnen Gewebekompartimenten hingewiesen.

4.2 Futteraufnahme und Studiendesign

Die zu untersuchenden Wirkstoffe wurden den Versuchstieren oral in Form von entsprechend angereicherten Futterpellets appliziert. In den meisten herkömmlichen Tierfuttermischungen dient Soja als Haupteisweißlieferant. Wie bereits kurz erwähnt, konnten für Soja bzw. einige seiner Hauptbestandteile, die sogenannten Isoflavone wie zum Beispiel Genistein und

Daidzein, eindeutig metabolische Effekte nachgewiesen werden. Bei Versuchen mit Ratten hatte sojahaltiges Futter unter anderem Einflüsse auf das Serum-Lipoproteinprofil und das Körpergewicht. Zudem wirkte es sich bei entsprechender Dosierung auf die Knochendichte aus (Kim et al. 2006; Crespillo et al. 2011; Lagari und Levis 2012; Liu Z et al. 2012). Direkte Einflüsse haben Isoflavone auch auf Haut und Skelettmuskelzellen (Polito et al. 2012; Yang et al. 2013).

Um die Verfälschung der Studienergebnisse durch Futterbestandteile zu verhindern, wurde deshalb auf sämtliche Sojazusätze verzichtet. Die notwendige Proteinzufuhr war alternativ durch Kartoffelproteine sichergestellt.

Im Gegensatz zu mehreren vorangegangenen Studien über CR wurde in vorliegender Arbeit keine eigenständige mit Östrogenen behandelte Testgruppe geführt. Diese wäre für eine noch genauere Wirkdifferenzierung und Vergleichbarkeit sicher vorteilhaft. Angesichts einer deutlich höheren Versuchseffizienz nach Maßgabe der Ressourcenschonung und aufgrund der Möglichkeit, die Östrogenwirkung auf die hier untersuchten Strukturen in Fremdarbeiten einzusehen, konnte auf diese zusätzliche Testgruppe verzichtet werden.

4.3 *Cimicifuga racemosa* – ein pharmakologisches Substanzgemisch

Bevor in den folgenden Kapiteln die Ergebnisse zur Wirkweise von CR in den jeweiligen Gewebekompartimenten im Einzelnen diskutiert werden, soll zu Beginn auf ein paar grundsätzliche Überlegungen zu ihrer Pharmakodynamik und -kinetik eingegangen werden.

Bekanntlich wurde im vorliegenden Versuch ein Gesamtextrakt aus CR mit zwei Fraktionen verglichen. Wie bereits im Kapitel 2.1.4 ausgeführt, wurde für die Fraktionen eine Dosierung gewählt, die äquivalent zu derjenigen im Gesamtextrakt war. Das heißt, dass z.B. Tiere der Saponingruppe die gleiche Saponindosis erhalten hatten wie die Gruppe CR. Folglich könnte man annehmen, dass die Wirkung in der Gesamtextraktgruppe zwangsläufig die Summe der Einzeleffekte der beiden Fraktionen darstellt. Wenn also der fiktive Mittelwert der Gruppe KO als Referenzwert gilt und sich dieser nach Behandlung mit jeweils einer der Fraktionen A oder B verdoppeln würde, müsste man nach Therapie mit dem Gesamtextrakt (Fraktion A plus B) mit einem vierfach erhöhten Wert rechnen (Variante A). Prinzipiell wäre natürlich auch ein Szenario vorstellbar, bei dem sich die Effekte der beiden Fraktionen gegenseitig aufheben

(Variante C). Die folgenden Modellgraphen sollen nur einige der denkbaren Wirkkombinationen verdeutlichen:

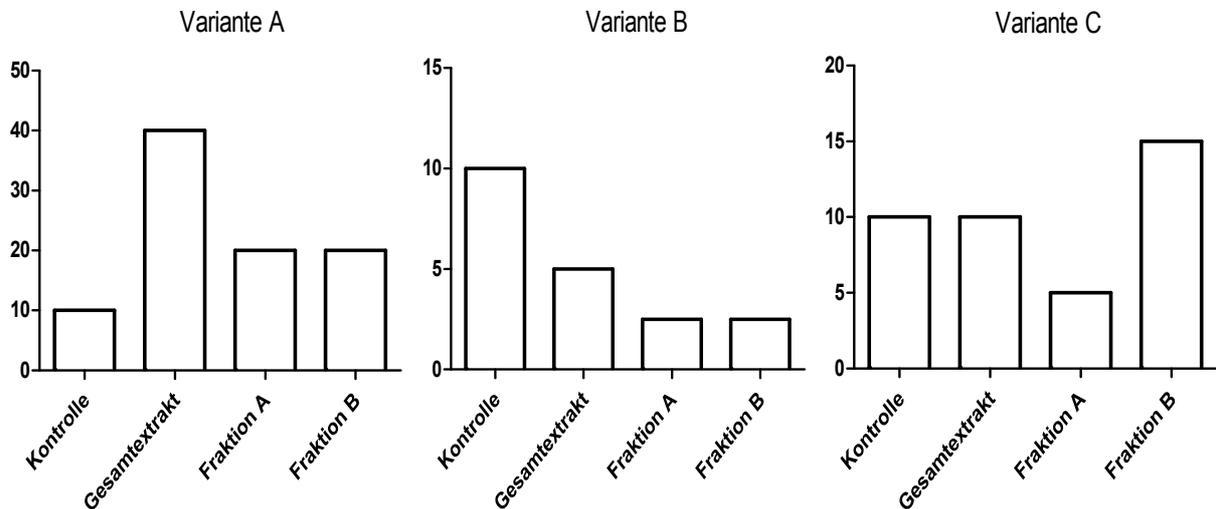


Abb. 12: Vereinfachte theoretische Darstellung additiver pharmakodynamischer Effekte:

- Variante A:* beide Fraktionen bewirken jeweils eine Zunahme von KO um den Faktor 2, d.h. für den Gesamtextrakt wäre eine Zunahme um den Faktor 4 zu erwarten
- Variante B:* nach Applikation einer Fraktion A oder B wird lediglich eine Wirkung beobachtet, die 25% von KO entspricht. Bei einfacher additiver Wirkung könnte nach Gabe des Gesamtextraktes (Fraktion A+B) 50% von KO erreicht werden
- Variante C:* Die spezifische Wirkung der Fraktionen A+B heben sich gegenseitig auf. Bei Gabe des Gesamtextraktes ist deshalb kein Effekt im Vergleich zu KO zu beobachten

Pharmakodynamisch läge bei diesen Konstellationen eine null-interaktive oder auch additive Wirkweise vor. Für die hier erhobenen Ergebnisse trifft dies noch am ehesten auf die Schicht der Epidermis zu. Hier könnte der leicht proliferationsfördernde Effekt der Saponine von einer ähnlich starken Reduktionswirkung der RF aufgehoben worden sein, sodass bei Gabe des Gesamtextraktes keine Wirkung im Vergleich zu KO sichtbar wurde. Wie aber sind dann die Konstellationen aller weiteren Graphen erklärbar?

Ein additiver bzw. null-interaktiver pharmakodynamischer Effekt ist die einfachste Wechselwirkung zwischen Substanzen und beschreibt deswegen die komplexen Interaktionen vieler

Pharmaka nur unzureichend oder falsch. In Wirklichkeit sind zur Vorhersage der Wechselwirkungen bei Gabe von zwei oder mehr Wirkstoffen zahlreiche weitere Faktoren zu beachten, welche Gegenstand eigener Forschungsrichtungen sind. An dieser Stelle seien beispielsweise die pharmakokinetische Metabolisierung über das Cytochrom-P450-System oder die pharmakodynamischen Begriffe der kompetitiven, antagonistischen, synergistischen oder potenzierenden Wechselwirkung als Schlagwörter genannt (aus Herdegen et al. 2008).

Alle diese vielseitigen Interaktionen könnten bereits bei der Verabreichung von nur zwei Substanzen zum Tragen kommen, selbst wenn diese, wie heutzutage in der modernen Pharmakologie üblich, zielgenau für nur einen Rezeptortyp synthetisiert wurden. Spaltet man CR in seine kleinsten chemischen Bestandteile auf, so erhält man jedoch eine Liste von über 200 Inhaltsstoffen (Li und Yu 2006). Damit ist der Extrakt aus CR wie die meisten anderen Phytotherapeutika ein sog. Vielstoffgemisch. S. Gaedcke bezeichnete in einer Abhandlung über Naturheilmittel den aus vielen Einzelsubstanzen bestehenden pflanzlichen Extrakt trotzdem als „Wirkstoff“, weil er die unveränderte stoffliche Gesamtheit darstelle. Anschließend nahm er eine Untergliederung in eigentliche Wirksubstanzen, wirksamkeitsbestimmende Inhaltsstoffe, Koeffektoren sowie Begleit- und Gerüststoffe vor (Gaedcke 1999). Zwar wächst mit der Zahl sämtlicher Inhaltsstoffe die therapeutische Indikationsbreite, gleichzeitig nehmen aber auch die möglichen Interaktionen exponentiell zu (aus Fintelmann 2009). Bekannte Beispiele für pflanzliche Präparate, die starke unerwünschte Effekte durch pharmakologische Wechselwirkungen auslösen können, sind u.a. die Extrakte aus Johanniskraut (lat. *Hypericum perforatum*), einem potenten CYP-Induktor und Grapefruitsaft, der das Cytochrom-P450-System inhibiert. Allein die Beeinflussung dieses prominenten Metabolisierungsweges kann die Wirkung zahlreicher anderer Medikamente verstärken oder abschwächen. Auch für CR wurde solch eine CYP-Induktion (2B, 3A) bekannt (Yokotani et al. 2013). Das soll weniger als ein Hinweis auf ein eventuelles toxisches Potential von CR verstanden werden. Wie bereits mehrfach erwähnt, konnten diesbezüglich bereits mehrere Arbeiten die Unbedenklichkeit von CR attestieren (Teschke et al. 2009; Firenzuoli et al. 2011). Die CYP-Induktion wäre aber einer von vielen Erklärungsansätzen, warum bei den meisten der oben angeführten Ergebnissen ein einfaches additives Wirkverhalten zwischen den Fraktionen nicht erkennbar ist.

4.4 Die Haut

4.4.1 Die Epidermis

Die Epidermis stellt als äußerste Hautschicht die eigentliche Schutzhülle des menschlichen Organismus vor exogenen Umwelteinflüssen dar. Besonders hervorzuheben ist ihre mechanische Barrierefunktion. Diese gelingt vor allem durch eine von basal nach apikal zunehmende Verhornung der Keratinozyten. Eine weitere wichtige Aufgabe ist die durch einen hohen Phospholipidgehalt gewährleistete Vermeidung von Feuchtigkeitsverlusten.

Wie bereits erwähnt, haben die hormonellen Umstellungen nach der Menopause gravierende Einflüsse auf das Organsystem der menschlichen Haut. Untersucht und wissenschaftlich belegt sind beispielsweise degenerative Veränderungen wie eine schlechter werdende Wundheilung, reduzierte Elastizität und eine Zunahme von Trockenheit und Falten (Hall und Phillips 2005). Diesen klinischen Beobachtungen entsprechend, konnten tiermodellbasierte Fremdstudien in der Epidermis von ovx Ratten mikroskopisch einen geringeren Keratinisierungsgrad, eine deutliche Reduktion der Hautdrüsenzahl und des Vaskularisationsgrades sowie eine allgemeine Schichtdickenabnahme belegen (Circosta et al. 2006). Letztere Beobachtung deckt sich mit den Daten, die in der vorliegende Arbeit erhoben wurden. Viele dieser Veränderungen würden sich klinisch als trockene Haut mit progredienter Faltenbildung manifestieren (Circosta et al. 2006).

Generell sind die Eigenschaften der Epidermis für die Ausprägung postmenopausaler Hautprobleme von zentraler Wichtigkeit: Zum einen ist ein möglichst effektiver mechanischer Schutz bei *per se* rückläufiger Wundheilungspotenz im Klimakterium vorteilhaft, zum anderen stellt ein erhöhter Feuchtigkeitsverlust einen direkten Einflussfaktor auf Hautalterung, Faltenentstehung und die Genese verschiedener Dermatosen dar.

Mehrere Studien belegen bereits positive Effekte einer klassischen HRT auf die genannten Aspekte. Beispielsweise beobachteten Piérard-Franchimont et al. (1995) eine signifikante Verbesserung der epidermalen Feuchtigkeitsbindekapazität bei E2-behandelten postmenopausalen Frauen. Auch in klinischen Untersuchungen konnte die geringere Prävalenz trockener Haut bei östrogensubstituierten Frauen bestätigt werden (Dunn et al. 1997). Eine mögliche

Erklärung dafür ist die gesteigerte Menge an Oberflächenlipiden auf der Epidermis bei diesem Patientenkollektiv im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen (Callens et al. 1996; Sator et al. 2001). Histomorphometrisch zeigte sich in zahlreichen Studien übereinstimmend eine Dickenzunahme der Epidermis bei postmenopausalen Frauen, die mit einer HRT behandelt worden waren (Sator et al. 2001; Hall und Phillips 2005). Dies befanden auch Circosta et al. (2006) in der weiter oben zitierten Arbeit. Dort wurde eine Teilgruppe der ovx Tiere mit Phytoöstrogenen aus Rotklee (lat. *Trifolium pratense*) behandelt, worunter die epidermale Schichtdicke und die Hautdrüsenzahl konstant gehalten werden konnte.

Auch in vorliegender Arbeit wurde die Schichtdicke der Epidermis sowie aller weiteren Hautschichten vermessen, um die Wirkung von CR bzw. ihrer Fraktionen zu objektivieren und mit den bereits bekannten Folgen von substituierten Östrogenen vergleichbar zu machen. Die Annahme, dass bei mikroskopisch ähnlichen Effekten nach Substanzapplikation auch die klinische Wirkung von CR derjenigen der Östrogene gleicht, scheint plausibel.

Im hier beschriebenen Versuch konnte nach 28-tägiger Applikation von Extrakt aus CR über Futtergabe keine signifikante Veränderung der Epidermisschichtdicke im Vergleich zur östrogendefizitären unbehandelten Gruppe KO festgestellt werden. Lediglich in der Tendenz wurde eine diskrete Abnahme beobachtet. Die beiden Fraktionen verhielten sich unterschiedlich: Verglichen zu KO verringerte sich der epidermale Querdurchmesser in der Gruppe der Restfraktion um im Mittel 12,5 Prozent, in der Gruppe der Saponine vergrößerte er sich hingegen um 7 Prozent. Die Messergebnisse der beiden letztgenannten Gruppen erreichten Signifikanzniveau.

Die bislang geringe Zahl an Studien, die sich mit der Wirkung von CR auf die Haut befassen, erschwert eine Einordnung der vorliegenden Ergebnisse in den wissenschaftlichen Kontext. Zumindest die regenerationsfördernde Wirkung der Saponine ist bekannt. Bonte et al. (1998) belegten im Rahmen einer Patentanmeldung die durch Saponine hervorgerufene proliferationsfördernde Wirkung auf Keratinozyten und die positive Wirkung gegen Haarverlust.

Die Saponine waren aus Extrakten von *Medicago sativa* (dt. Luzerne) aus der Familie der *Fabaceae* gewonnen worden. Mittlerweile sind zahlreiche saponinhaltige Produkte zur topischen Anwendung auf dem Markt erhältlich, die einen Haarverlust hemmen bzw. das Haarwachstum beschleunigen sollen oder die einen regenerationsfördernden Effekt auf die Haut versprechen.

4.4.2 Die Dermis

Der Feuchtigkeitsgehalt der Haut wird nicht nur durch physiologische Gegebenheiten der Epidermis beeinflusst. Auch die darunter liegende Schicht der Dermis, hier vor allem hydrophile sog. Glykosaminoglykane (GAG) als Hauptbestandteil der extrafibrillären Matrix, spielen bei der Feuchtigkeitsbindekapazität der Haut eine bedeutende Rolle. In Studien wurde für den Anteil an GAG in der Dermis eine positive Korrelation zum bestehenden Östrogenspiegel beobachtet (Grosman et al. 1971; zusammengefasst in Shah und Maibach 2001). Bei der für diese Arbeit verwendeten histologischen Fixiertechnik bzw. durch bloße Bestimmung der Schichtdicke kann für den konkreten Anteil an Glycosaminoglycanen unter CR-Therapie aber keine valide Aussage gemacht werden. Hierfür müssten die betrachteten Gewebsschnitte mit einer weiteren histologischen Färbetechnik behandelt werden, die in der Lage ist, GAG und weitere saure Polysaccharide spezifisch zu markieren. In Fremdstudien, die die Bindegewebsstruktur und den Glykosaminoglykananteil in unterschiedlichen Kompartimenten unter Östrogenmangel untersuchten, wurde als Färbung beispielsweise Alcianblau verwendet (Munakata et al. 1984; Falconer et al. 1996).

Eine wichtige Rolle bei der bereits erwähnten höheren Verletzungsanfälligkeit der Haut und in der multifaktoriellen Genese von Falten spielen die in der Dermis vorhandenen kollagenen Fasern. Die verschiedenen Subtypen machen ca. 70% des Trockengewichts der Haut aus. Sie stellen damit den Hauptanteil aller extrazellulären Strukturen der Haut. Dieser nimmt bei postmenopausalen Frauen um durchschnittlich 1-2% pro Jahr ab (Brincat M. et al. 1987). Studien legen allerdings nahe, dass der Rückgang des kollagenen Faseranteils bei Frauen mehr vom postmenopausalen als vom chronologischen Alter abhängig ist (Affinito et al. 1999). Dies lässt eine Einflussnahme von Östrogenen auf Kollagenfasern vermuten. Andere Studien thematisierten bereits den positiven Effekt sowohl topischer als auch systemischer

Östrogengaben auf Kollagenfasern beim Menschen (Maheux et al. 1994; Callens et al. 1996; zusammengefasst in Shu und Maibach 2011; Archer 2012). Eine oft angewendete Messmethode in den zitierten Studien waren dermale Schichtdickenmessungen, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit erhoben wurden (Maheux et al. 1994; Brincat M.P. 2000; Archer 2012). Im Tiermodell der ovx Ratte konnte die bessere Wundheilung, die hauptsächlich auf einen proliferativen Effekt der weiblichen Sexualhormone auf Kollagenfasern zurückgeführt wird, objektiviert werden (Calvin et al. 1998). Eine aktuelle Studie beschreibt bei Mäusen die bessere Regenerationsfähigkeit der Haut unter Östrogentherapie nach UV-B-Bestrahlung mit erythemaler Dosis. Auch hier wurde zuvor eine Ovx durchgeführt, um eine hormondefiziente Kontrollgruppe zu schaffen. Die dermale Schichtdicke und der Gehalt an feuchtigkeitsbindender Hyaluronsäure in der extrazellulären Matrix war positiv mit dem Östrogenspiegel korreliert. Für verschiedene proinflammatorische Marker in der Dermis ergab sich eine negative Korrelation. Dies geschah durch eine vermehrte parakrine Sekretion von Epidermalem Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*) (Röck et al. 2012).

Insgesamt war die Dermis in der vorliegenden Arbeit die Hautschicht mit den geringsten Unterschieden im Vergleich zur Kontrollgruppe. Lediglich die mit dem Gesamtextrakt aus CR behandelte Gruppe wies eine signifikante Zunahme des Schichtdurchmessers auf. Die Fraktionen zeigten dagegen nur feinste Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe. Dies entsprach nicht den Studienergebnissen von Kusano und Kollegen (2001). Seine Arbeitsgruppe konnte sogar eine spezifische Gewichtung der einzelnen Subfraktionen bei der Kollagenolyseinhibition vornehmen. Allerdings erfolgte das Experiment *in vitro* mit einer aus einem Bakterium isolierten Kollagenase.

4.4.3 CR und die Fraktionen: Einflüsse auf Fettgewebe und das metabolische Syndrom

Die Auswirkungen eines klimakterischen Hormonmangelzustandes auf die unterschiedlichen Fettdepots wurden sowohl im Tiermodell als auch für den Menschen bereits in zahlreichen Studien untersucht. Generell führt ein verminderter Östrogenspiegel, sei er iatrogen beispielsweise über eine Ovx herbeigeführt oder physiologisch im Rahmen des Klimakteriums, zu einer Zunahme des Körpergewichts bzw. des BMI. Unter Östradiolgabe ist dieser Effekt umkehrbar oder ganz zu verhindern. Im Tierversuch kommt es bei Behandlung mit Östrogenen insgesamt zu einer durchschnittlich verringerten Futtermittelaufnahme, einer Reduktion des Körpergewichts und einer Abnahme der Fettdepots, insbesondere im Bereich des Abdomens (Genazzani und Gambacciani 2006; Roesch 2006).

Eine vergleichbare positive Entwicklung wurde bereits bei ovx SD-Ratten beobachtet, die einen Extrakt aus CR als Futterzusatz bekommen hatten. Auch hier waren mittleres Körpergewicht und intraabdominelles Fettdepot im Vergleich zur hormondefizitären und nicht behandelten Kontrollgruppe signifikant vermindert (Rachoń et al. 2008). Unsere Arbeitsgruppe untersuchte im Rahmen einer Studie zur Osteoprotektion von CR bereits die Wirkung von CR BNO 1055 auf den Fettanteil im Knochenmark von ovx SD-Ratten. Hierbei wurden bereits, wie in vorliegender Arbeit, der Gesamtextrakt aus CR bzw. die Fraktionen getrennt voneinander verabreicht und sowohl mit einer östrogensubstituierten als auch mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen. Für CR und insbesondere die Saponinfraktion konnte u.a. eine den Östrogenen vergleichbare, fettreduzierende Wirkung im Knochenmark bestätigt werden, bei der Restfraktion trat hingegen kein Effekt auf (Seidlová-Wuttke et al. 2012b).

Allgemein gilt die Fettleibigkeit oder auch Adipositas laut WHO-Definition als eigenständiger Risikofaktor für die Entwicklung eines MS. Die pathophysiologische Ursache wird in der endokrinen Aktivität der Adipozyten gesehen. Es gilt als gesichert, dass Adipozyten über verschiedene endokrine Botenstoffe wie zum Beispiel Leptin, Resistin oder Adiponectin wesentlich an der Regulation des Stoffwechsels beteiligt sind. Bei einer übermäßigen Ausschüttung dieser Botenstoffe, wie es beispielsweise bei einem pathologisch erhöhten Körperfettanteil geschieht, kommt es nachweislich zu einem Anstieg proinflammatorischer

Zytokine, u.a. TNF-alpha, IL-6 und CRP (Park et al. 2005). Viele Autoren stimmen darin überein, dass genau diese Zytokine die Entstehung einer endothelialen Dysfunktion und Insulinresistenz anstoßen und somit die Ursache für die genannten Erkrankungen sind (Potenza und Mechanick 2009; Espinola-Klein et al. 2011)

Interessanterweise konnte in früheren Arbeiten zu CR nicht nur eine fettreduzierende Wirkung, sondern gleichzeitig auch ein Rückgang des Serum-Leptin-Spiegels nachgewiesen werden (Seidlová-Wuttke et al. 2003). Auch nach Gabe bestimmter einzelner Inhaltsstoffe aus CR ist eine Abnahme der Entzündungsmediatoren IL-6, TNF-alpha und IFN-gamma beschrieben worden (Schmid et al. 2009). CR kann also den Pathomechanismus bedeutender klinischer Komplikationen auf direktem Wege positiv beeinflussen.

4.4.4 Die subkutane Fettschicht: das größte Fettdepot des Menschen

In der vorliegenden Arbeit wurde der Querschnitt der subkutanen Fettschicht vermessen und mit der ovx Kontrollgruppe verglichen. Ältere Studien wiesen bereits mehrfach auf die deutliche Korrelation zwischen der Subkutisschichtdicke und der Insulinsensitivität bei männlichen Probanden hin (Abate et al. 1995; Abate et al. 1996; Goodpaster et al. 1997). Trotzdem lag in den letzten Jahren der wissenschaftliche Fokus v.a. auf dem viszeralen Fettdepot. Hier sehen viele Autoren einen besonders ausgeprägten Zusammenhang zwischen steigender Fettmasse und der Risikozunahme für die Entwicklung einer KHK oder eines Schlaganfalls (Lapidus et al. 1984; Kannel et al. 1991). Die Annahme, dass es sich bei den Fettzellen im Bauchraum um eine endokrin besonders aktive Gruppe handelt, wird mittlerweile jedoch zunehmend kritisch hinterfragt (Patel und Abate 2013). Zumindest die finale Aussage, dass die in Kapitel 4.4.3 erläuterte inflammatorische Reaktion des Organismus ausschließlich durch Fettzellen des viszeralen Depots hervorgerufen wird, gilt als überholt. Vielmehr deuten aktuelle Studien an, dass die Entzündungsreaktion prinzipiell durch alle Adipozyten hervorgerufen werden kann und die spezifische Lokalisation möglicherweise nur ein weiterer aggravierender Faktor ist (Patel und Abate 2013). Das endokrine Potential wäre demnach eher von der reinen Quantität des jeweiligen Fettdepots abhängig. Abhängig von den angewandten Messtechniken und den definierten Arealen wird das subkutane

Fettgewebe in Studien bis zu fünfmal größer angegeben als das viszerale Depot (Ross et al. 1993).

Es ist deshalb wenig überraschend, dass auch die subkutane Fettschicht Auswirkungen auf das Lipoproteinprofil, damit auf das MS und in weiterer Konsequenz auf das kardiovaskuläre Risikoprofil hat (Tulloch-Reid et al. 2004; Liu et al. 2010; Patel und Abate 2013). Speziell die in dieser Arbeit vermessene oberflächliche Subkutis im Bauchbereich wurde als unabhängiger Einflussfaktor auf den Gesamtcholesterinspiegel im Serum identifiziert (Gower et al. 2006). In einer Tiermodellstudie an Ratten, bei der der prädiktive Wert einer Hyperleptinämie bezüglich der Entwicklung einer jugendlichen Adipositas evaluiert wurde, erkannten die Autoren außerdem eine ausgeprägte direkte Verbindung zwischen hohem Leptinspiegel und subkutanem Fettgewebe. Das bedeutet, dass mit einer Vermessung dieser Hautschicht, so wie sie in vorliegender Arbeit durchgeführt wurde, ein unmittelbarer Rückschluss auf einen Serumparameter ermöglicht wird, der zu den wichtigsten Effektoren im Pathomechanismus der systemischen Inflammation gehört (Caprio et al. 1996).

Ezure und Amano (2010) beschrieben außerdem eine signifikant inverse Korrelation zwischen dermalen Elastizität und subkutaner Fettmasse. So beeinflusst auch diese Hautschicht die Faltengeneese und dadurch das optische Erscheinungsbild. Letzteres darf in seiner Relevanz im Hinblick auf Patientenzufriedenheit und Compliance auf keinen Fall unterschätzt werden.

Alle ovx Versuchstiere, die einen Futterzusatz mit Extrakt aus CR BNO 1055 oder einer der Fraktionen erhalten hatten, wiesen nach Testende eine signifikant dünnere Subkutanfettschicht auf als die Gruppe KO. Insofern konnte die in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe (vgl. Seidlová-Wuttke et al. 2003; Rachoń et al. 2008; Seidlová-Wuttke et al. 2012 a und b) nachgewiesene fettreduzierende Wirkung von CR bzw. der Saponine auch in der Subkutis reproduziert werden. Prinzipiell wäre auch eine antianabole Wirkweise denkbar. Ein überraschendes Ergebnis lieferte die Auswertung der Restfraktion. Sie war die Gruppe, für die nach Versuchsablauf die deutlichste Schichtreduktion im Subkutanfett gemessen wurde. In den untersuchten Organen bzw. Gewebeschnitten der oben zitierten Studien hatte die Restfraktion dagegen meist geringe bis gar keine Effekte erbracht.

Wie eingangs bereits erwähnt, handelt es sich bei der Restfraktion von CR BNO 1055 um eine heterogene Mischung aus wasserlöslichen Substanzen. Einige davon wurden, vornehmlich in

Tierversuchsstudien, hinsichtlich ihrer Wirkung auf Fettgewebe und den Lipidmetabolismus untersucht. Positive Effekte auf Lipoproteinprofil und Übergewicht zeigten u.a. Ferula-, Isoferula- und Chlorogensäure, zusätzlich wurden günstige antioxidative Effekte vor allem für Kaffeesäuren, eine Untergruppe der Hydroxyzimtsäure, beobachtet (Chen und Ho 1997; Cho et al. 2010; Jin Son et al. 2010). Alle genannten Substanzen sind bedeutende Subfraktionen der Restfraktion. Somit ist die in der vorliegenden Arbeit beobachtete fettreduzierende Wirkung auf die Subkutanschicht durchaus plausibel. In einer Fremdarbeit war die Isoferulasäure sogar derjenige Inhaltsstoff mit dem größten Einfluss auf proinflammatorische Zytokine im Blut der Probanden. Damit hatte die Isoferulasäure einen deutlich stärkeren Effekt als Actein bzw. Desoxyactein, die beiden Hauptbestandteile der Saponinfraktion (Schmid et al. 2009). Dies soll als weiterer Hinweis auf die hohe Wirkpotenz der in der Restfraktion enthaltenen Inhaltsstoffe gelten.

Allerdings kann die Frage, warum in Diskrepanz zu vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe (Seidlová-Wuttke et al. 2012a und 2012b) gerade durch die Restfraktion die deutlichsten Ergebnisse hervorgerufen wurden, an dieser Stelle nicht beantwortet werden. Weiterführende Studien müssten die nötige therapeutische Wirkdosis oder etwaige synergistische Substanzkombinationen innerhalb der Restfraktion überprüfen. Außerdem wäre eine gleichzeitige Vermessung der intraabdominellen Fettmasse interessant, um die hier erwartete Fettgewebsreduktion zu verifizieren und zu quantifizieren.

4.5 Die Skelettmuskulatur: subkutan und im Bereich des *M. gastrocnemius*

4.5.1 Messmethode

Zur objektiven Bewertung des Muskelstatus der Versuchstiere wurden der Umfang und die Fläche jeweils einzelner Muskelfasern erhoben. Mit Hilfe dieser Parameter können direkte Rückschlüsse auf den Durchmesser und Volumenverlauf des gesamten betrachteten Muskelareals unter Therapie gezogen werden. Damit entspricht dieses Konzept dem grundlegenden Prinzip von zahlreichen etablierten Messtechniken zur Sarkopenie, die mit unterschiedlichen Hilfsmitteln stets auf eine Volumen- und Dickenmessung eines definierten Skelettmuskelareals abzielen. Diese Hilfsmittel reichen laut Konsensus-Kriterien der EWGSOP

(s.u.) von computer- oder magnetresonanstechnischen Methoden bis hin zur Dual-Röntgen-Absorptiometrie (DEXA) als Goldstandard (Cruz-Jentoft et al. 2010; zusammengefasst in Mijnders et al. 2013).

Der bereits in der Einleitung erwähnte Begriff der Sarkopenie ist seit dem Jahr 2010 von der European Working Group on Sarcopenia in Older People (EWGSOP) als geschlechtsunabhängiger, altersbedingter Muskelschwund definiert, der sowohl durch eine reduzierte Skelettmuskelmasse als auch durch die Verringerung der Muskelkraft charakterisiert ist (Cruz-Jentoft et al. 2010). Die Sarkopenie hat weitreichende Folgen im Sinne eines Funktionsverlustes des Bewegungsapparates (Janssen et al. 2002) und verursacht damit eine steigende Mortalität und hohe Folgekosten im Gesundheitssystem (Janssen et al. 2004; Gale et al. 2007).

Es gibt Hinweise, dass mit dem für die vorliegende Arbeit gewählten Studiendesign und der Messmethodik indirekt sogar Aussagen über das zweite Diagnosekriterium der Sarkopenie, den Muskelkraftstatus, getroffen werden können. Strasser und Kollegen (2013) konnten im Rahmen einfacher Sarkopeniescreeningmethoden bei sonographischen Muskelquerschnittsmessungen des *M. vastus medialis* eine signifikante Korrelation zwischen gemessener Muskeldicke und tatsächlicher Muskelkraft feststellen.

Trotzdem könnten in zukünftigen Studien neben der histomorphometrischen Vermessung einzelner Muskelfasern weitere parallele Messverfahren etabliert werden, um eine noch genauere Aussage über die Qualität und Leistungsfähigkeit des Muskels treffen zu können. Denkbar wären beispielsweise Kraftmessungen von elektrisch stimulierten Muskelarealen oder die Auswertung von Laufprotokollen bei zur Verfügung stehendem Laufrad (Kadi et al. 2002; McCormick et al. 2004). Durch die Methodik der soeben zitierten Studien konnten unterschiedliche histologische Charakteristika der Skelettmuskulatur bei ovx Ratten und die Entwicklung der physischen Leistungsfähigkeit (Laufstrecke, Zeitspanne bis zum Erreichen der maximalen Muskelkraft) miteinander in Verbindung gebracht werden.

4.5.2 Ergebnisanalyse der Muskelschnitte

Bei der Auswertung der Muskelpräparate aus dem Bereich des *M. gastrocnemius* konnte für alle mit CR bzw. den Fraktionen behandelten Gruppen eine signifikante Zunahme von Muskelfaserumfang und -fläche im Vergleich zur ovx Kontrollgruppe festgestellt werden. Besonders deutlich war dieser Effekt in der Saponingruppe ausgeprägt. Gleiches gilt für die subkutane Muskelschichtdicke, wo sich trotz unterschiedlichen Messansatzes die Schichtdickenänderung der Saponingruppe kongruent zu den Ergebnissen aus der Region des *M.gastrocnemius* verhielt. Auch in der CR-Gruppe hatten sich die Untersuchungsmerkmale in beiden Muskelregionen gleichsinnig verändert.

Ausgenommen sind die Ergebnisse der Restfraktion. Verglichen zu KO waren die Muskelfasern im Bereich des *M. gastrocnemius* signifikant dicker, die subkutane Muskelschicht war im Gegensatz dazu jedoch tendenziell geringer ausgeprägt (Signifikanzniveau wurde nicht erreicht). In den zwei untersuchten Muskelregionen hatte in RF also eine gegensätzliche Entwicklung stattgefunden.

4.5.3 Zusammenhänge zwischen Sarkopenie und metabolischem Syndrom

Betrachtet man die signifikanten Veränderungen im Bereich des *M. gastrocnemius* (Abb. 9, 10) und vergleicht diese mit den Beobachtungen zur subkutanen Fettschicht (Abb. 7), fallen einige Ähnlichkeiten auf: In allen Testreihen hatte sich verglichen zu KO die Schichtdicke bzw. der Umfang aller restlichen Gruppen signifikant in die jeweils gleiche Richtung verändert. Gleichzeitig mit einer deutlichen Zunahme der Skelettmuskulatur unter CR-Therapie konnte also eine ähnlich intensive Abnahme des subkutanen Fettdepots festgestellt werden. Dies wirft die Frage auf, ob die Sarkopenie mit dem Körperfettanteil bzw. in weiterer Konsequenz mit dem MS in Verbindung stehen könnte.

Tatsächlich kamen Studien mit genau dieser Fragestellung bereits zu einem positiven Ergebnis. So konnte nach Auswertung der Daten von über 10.000 Patienten u.a. eine signifikante inverse Korrelation der Skelettmuskelmasse mit dem Entwicklungsrisiko einer Insulinresistenz oder eines MS belegt werden (Srikanthan und Karlamangla 2011; Moon 2014). Zur weiteren Differenzierung hatte die Arbeitsgruppe um C.W. Lu ein Patientenkollektiv aus 600 Männern

und Frauen in drei Gruppen nach den Kriterien Sarkopenie, Fettleibigkeit oder die Kombination der beiden Diagnosen aufgeteilt. Erwartungsgemäß war das Risiko für ein MS in der Gruppe der Adipösen mit einer Odds Ratio OR von 7,53 deutlich erhöht. Trotzdem war es immer noch deutlich geringer als bei Patienten, die zusätzlich an einer Sarkopenie litten (OR 11,59) (Lu et al. 2013). Diese beiden Krankheitsbilder stehen also in einer Beziehung zueinander, wobei ihr gemeinsames Auftreten die höchste Komplikationsrate hervorruft (Sanada et al. 2012). Für diesen eindeutigen Zusammenhang gibt es in der Fachliteratur zwei unterschiedliche Erklärungsansätze:

Einige Autoren sehen die Sarkopenie als eigenständiges Krankheitsbild, bei dem ein progredienter Muskelschwund und damit eine Abnahme von Zellverbänden, die essentiell für die schnelle Aufnahme und Verstoffwechslung der Blutglukose sind, eine Insulinresistenz und längerfristig ein MS entstehen lässt. Nach Ansicht der Autoren geschieht dies hauptsächlich im Rahmen des chronologischen Alterungsprozesses, unabhängig vom Gesamtkörperfettanteil (Srikanthan et al. 2010; Moon 2014). Die oft zu beobachtende Koinzidenz von Sarkopenie und Adipositas wird dann z.B. mit dem geringer werdenden Aktivitätslevel sarkopener Personen trotz konstant hoher Energiezufuhr erklärt (LaMonte und Blair 2006; Levine und Crimmins 2012).

Umgekehrt besagt die zweite Hypothese, dass gerade ein hoher Körperfettanteil ein wichtiger Ausgangspunkt und wesentliche Ursache für die Entwicklung einer Sarkopenie ist. Als Erklärung werden auch hier wieder die erhöhten Spiegel der bereits erwähnten proinflammatorischen Zytokine, bedingt durch die große Anzahl endokrin aktiver Adipozyten, angeführt. Es ist bekannt, dass erhöhte Zytokinspiegel zu einer Reduktion des Muskelfaserumfangs führen, den Proteinhaushalt der Muskelzellen in eine katabole Richtung lenken sowie die Kraftentwicklung negativ beeinflussen (Jackman und Kandarian 2004; Pasini et al. 2008). Schragar und Kollegen (2007) prüften bei adipösen älteren Testpersonen deren Kraftentwicklung im Händedruck. Bei Personen mit geringerer Kraft fanden sich im Mittel jeweils höhere Serumspiegel von IL-6 und CRP als bei Personen mit stärkerem Händedruck. Vermutlich haben diese Entzündungsmediatoren also negative Einflüsse auf die Muskelkraft und können damit als Auslöser einer Sarkopenie angesehen werden.

Das bedeutet leider nicht, dass normalgewichtige Personen mit empfohlenem BMI vor der

Entwicklung einer Sarkopenie geschützt wären. Selbst bei einer geringen Ausprägung aller offensichtlichen Fettdepots findet mit zunehmendem Alter ein bindegewebiger Umbau der Skelettmuskulatur mit Infiltration durch Fettgewebe statt (Delmonico et al. 2009). Auch diese lokal-intramuskulären Adipozyten können die inflammatorische Reaktion des Organismus auslösen (Taaffe et al. 2009; Zoico et al. 2013). Es entsteht ein gefährlicher Teufelskreis: Ein steigender Körperfettanteil führt zu einer schwindenden Muskulatur, damit zu einer Reduktion des Aktivitätslevels und deswegen zu einer positiven Energiebilanz mit Insulinresistenz und weiterer Gewichtszunahme (Roubenoff 2004). Auch in Tierversuchsstudien mit Ratten konnten jeweils Teile des oben beschriebenen Pathomechanismus nachgestellt werden. Bollheimer und Kollegen (2012) fütterten intakte Ratten mit einer hochkalorischen fettreichen Diät über einen längeren Zeitraum von 23 Monaten. Bei der anschließend durchgeführten Muskelanalyse im MRT ergab sich eine positive Korrelation zwischen Körpergewicht und Muskelfettanteil, während das Volumen der Muskelfasern selbst abgenommen hatte. Wichtige Effektorproteine wie S6K1, welches auch die Biosynthese von Muskelproteinen anstößt, waren bei den adipös-sarkopenen Ratten vermindert. Weigt und Kollegen (2013) studierten den Fettgehalt in verschiedenen Geweben von Wilster-Ratten, die anfangs ovx worden waren und im Verlauf mit Östrogenen oder selektiven Östrogenrezeptoragonisten therapiert wurden. In Leber und Skelettmuskel war der Triglyceridanteil im Vergleich zur unbehandelten ovx Kontrollgruppe signifikant reduziert.

So führt also auch bei Ratten ein hoher Körperfettanteil zu einer Verfettung der Skelettmuskulatur und im weiteren Verlauf zu einer Sarkopenie. Dies kann durch eine Applikation weiblicher Sexualhormone verhindert werden.

Angesichts der Komplexität und Vielschichtigkeit der oben dargestellten Beziehungen erscheint ein multimodales Behandlungskonzept sicher am Erfolg versprechendsten. Wichtige Ziele wären nach aktuellen Erkenntnissen ein moderater Gewichtsverlust bei proteinreicher Ernährung und eine regelmäßige körperliche Aktivität mit Kraft- und Ausdaueranteilen (Bautmans et al. 2009; Parr et al. 2013). Das wachsende Wissen über die Krankheitsgenese auf zellulärer Ebene eröffnet weitere Therapieoptionen. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, dass CR in dieser Beziehung ein äußerst günstiges Wirkprofil aufweist.

4.6 Elastischer Faseranteil

Die Wirkung von CR und ihren Fraktionen auf die elastischen Fasern ist bislang wenig untersucht und findet in der Literatur kaum Erwähnung. Die Ergebnisse des vorliegenden Versuchs zeigen eine signifikante Zunahme der entsprechenden Faserschicht bei Tieren der CR- und Saponingruppe, wobei letztere die am deutlichsten ausgeprägte Veränderung aufweist. Die Auswertung von RF zeigte dagegen tendenziell eine leichte Reduktion des elastischen Faseranteils, allerdings ohne signifikant zu werden.

Bei der Behandlung mit CR ist also von einer Zunahme der elastischen Fasern auszugehen, wobei in diesem Versuch die Fraktion der Saponine als wirksamste Substanz identifiziert wurde. Dies würde der östrogenartigen Wirkung ähneln, die Tsukahara und Kollegen (2007) bei E2-therapierten ovx Ratten beobachtet hatten. Die Tiere zeichneten sich durch eine höhere Hautelastizität und eine signifikant bessere dreidimensionale Struktur der elastischen Fasern aus als die nicht behandelte ovx Kontrollgruppe. Sollte der protektive oder proliferative Effekt von CR auf elastische Fasern nicht nur für den in vorliegender Arbeit untersuchten Bereich, sondern für den gesamten Organismus gelten, könnte das zumindest eine Teilerklärung für die in Experimenten bereits bestätigte höhere Elastizität der Harnblase sein. Dort konnte eine dosisabhängige Steigerung der Harnblasenkapazität nach Behandlung mit CR-Extrakt belegt werden. Aus diesem Grund ist CR u.a. bereits zur Behandlung verschiedener Erkrankungen des Urogenitaltraktes zum Patent zugelassen (Christoffel et al. 2005).

5. Zusammenfassung

Vorliegende Arbeit untersuchte die Wirkung des Extraktes CR BNO 1055 aus *Cimicifuga racemosa* und zweier Fraktionen auf Schichten der Haut, Skelettmuskulatur und elastische Fasern von ovx SD-Ratten als Tiermodell des postmenopausalen Hormonmangelzustandes.

Die klimakterische Lebensphase kann zu gravierenden Endpunkten im klinischen Verlauf führen wie z.B. die Manifestation einer Sarkopenie oder eines MS. Auf der Suche nach Alternativen zur HRT bewies CR bereits in zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Designs ein positives Wirkprofil, ohne die bekannten Nebenwirkungen einer klassischen Östrogentherapie hervorzurufen.

Für die vorliegende Arbeit wurden 40 weibliche SD-Ratten ovariectomiert und anschließend in vier Testgruppen unterteilt. Anschließend erfolgte für die folgenden 28 Tage pro Einzelgruppe die Applikation einer der zu untersuchenden Testsubstanzen *p.o.*, d.h. Gesamtextrakt aus CR BNO 1055, Saponine und Restfraktion. Eine Kontrollgruppe KO blieb unbehandelt. Nach Versuchsende erfolgte eine histomorphometrische, computergestützte Auswertung der entsprechenden Gewebsschnitte.

Als Referenzwert für die folgende Ausführung gilt stets KO. Die Epidermis zeigte nur in Sap eine leichte, aber signifikante Zunahme. CR zeigte keine nennenswerte Schichtdickenänderung, RF hatte eine signifikante Abnahme zu verbuchen. Die Dermis hatte bei Versuchsende in CR signifikant und in RF tendenziell zugenommen. Die subkutane Fettschicht hatte sich in allen drei Testgruppen signifikant reduziert. Dabei zeigten die Fraktionen die deutlichsten Veränderungen, in RF war die Subkutis sogar um fast ein Drittel dünner als in KO.

Bei der subkutanen Muskelschicht und den Muskelschnitten des *M. gastrocnemius* war Sap die Gruppe mit der ausgeprägtesten Massenzunahme bei Versuchsende. Mit größerem Abstand hatten auch die anderen Gruppen zumindest im *M. gastrocnemius* eine signifikante Zunahme des Muskelfaserumfangs zu verzeichnen. Der prozentuale Anteil der elastischen Fasern war in CR und Sap signifikant gestiegen, bei RF wurde nur ein tendenzieller Rückgang festgestellt.

Aufgrund der deutlichen Wirkunterschiede zwischen den Fraktionen erscheinen die Trennung und in Zukunft ggf. eine weitere Aufreinigung des CR-Extraktes generell als sinnvoll und

zielführend. Besonders die Saponingruppe zeigte in diesem Versuch vielversprechende Ergebnisse bei der Skelettmuskelprotektion und der Reduktion des subkutanen Fettgewebes. Dieses Wirkprofil wäre zur Prävention oder Behandlung eines MS und einer Sarkopenie von großem Nutzen. Weiterführende Studien müssten jetzt v.a. die Funktionalität der Gewebetypen während einer längeren Versuchsdauer genauer beleuchten, da für vorliegende Studie eine rein histologisch-deskriptive Auswertung erfolgte. So könnte das Potential von CR und den Fraktionen noch fassbarer gemacht werden auf dem Weg hin zu einer gezielten Therapie postmenopausaler Beschwerden.

6. Methodischer Anhang

6.1 Herstellung und Aufbereitung der Organschnitte

Sämtliche Organgewebe, die im Rahmen von Studien untersucht werden sollten, wurden unmittelbar nach Obduktion der Tiere entweder in flüssigem Stickstoff eingefroren oder sofort für maximal 72 Std. in Formalinlösung 10% verbracht. Auch die zuvor eingefrorenen Gewebeproben wurden für die weitere Verarbeitung nach einer Auftauphase für 24-72 Std. in Formalin 10% konserviert.

Anschließend erfolgte die Entwässerung der Organe durch Behandlung mit aufsteigenden Alkoholreihen und die Stabilisierung mittels Xylol- und Paraffinlösungen nach unten angegebenem Schema. Während dieser Arbeitsschritte waren die Gewebe in Aufbewahrungskästen untergebracht. Das Eintauchen in die verschiedenen Substanzen nach folgendem Schema erfolgte in einem Spezialbehälter (Zitadelle) (Leica® TP 1020, V 2,0, Ordernr: 070430101, Herstellung 03/98):

Substanz	Einwirkzeit
Ethanol 50%	1 Stunde
Ethanol 75%	1 Stunde 20 Minuten
Ethanol 75%	1 Stunde 20 Minuten
Ethanol 96%	1 Stunde 20 Minuten
Ethanol 96%	1 Stunde 20 Minuten
Ethanol 100%	1 Stunde 20 Minuten
Ethanol 100%	1 Stunde 20 Minuten
Ethanol 100%	1 Stunde 20 Minuten
Xylol	1 Stunde 20 Minuten
Xylol	1 Stunde 20 Minuten
Paraffin	1 Stunde
Paraffin	1 Stunde

Nach entsprechender Behandlung wurden die Einbettkästen bis zur endgültigen Fixierung in einem Wärmeschrank (Fa: Schütt Labortechnik®, GFL 7601) bei 56-62°C aufbewahrt.

Zur abschließenden Herstellung der Gewebeschnitte wurden die Organe in einen Paraffinblock (EG 1160, Leica®) gegossen und nach erneutem Einfrieren für mindestens zwei Stunden mit Hilfe eines Mikrotoms (Leica® Model RM 2135 Fabriknr: 2794/10.2000, Kat.Nr: 050029802) in Schichten von 3-5 µm Dicke geschnitten. Es folgte das Aufbringen der Schnitte auf Objektträger (Menzel+Superfrost Plus).

6.2 Protokoll Hämatoxylin-Eosin-Färbung

1. Xylol	10 Minuten
2. Xylol	10 Minuten
3. Xylol	10 Minuten
4. Ethanol 100%	2 Minuten
5. Ethanol 100%	2 Minuten
6. Ethanol 100%	2 Minuten
7. Ethanol 96%	2 Minuten
8. Ethanol 96%	2 Minuten
9. Ethanol 75%	2 Minuten
10. Aqua bidest	2 Minuten
11. Hämatoxylin	zwischen 30 Sekunden und 1,5 Minuten, je nach Alter der Lösung
12. Wässern unter kühlem, fließendem H ₂ O	10 Minuten
13. Aqua bidest	15 x eintauchen
14. Eosin	20 Sekunden bis 1,5 Minuten, je nach Alter der Lösung
15. Ethanol 75%	30 Sekunden
16. Ethanol 96%	30 Sekunden
17. Ethanol 96%	30 Sekunden
18. Ethanol 100%	1 Minute
19. Ethanol 100%	1 Minute
20. Ethanol 100%	1 Minute
21. Xylol	5 Minuten
22. Xylol	5 Minuten
23. Xylol	5 Minuten
24. Eindecken der Schnitte mit DePex. Mounting medium und Deckgläsern (Menzel®) 24 x 40	

6.3 Protokoll Elastika-Färbung

Vorgang	Lösungsbäder	Einwirkdauer
Entparaffinieren	Ethanol 100%	2 Minuten
	Ethanol 100%	2 Minuten
	Ethanol 100%	2 Minuten
	Ethanol 96%	2 Minuten
	Ethanol 96%	2 Minuten
	Ethanol 75%	2 Minuten
Elastika-Färbung	1:1 Resorcinfuchsin + HCL-Alkohol	30-45 Minuten
	Aqua dest	Abspülen
Differenzieren	100ml Ethanol 96%+ 1ml HCL 32%	kurz
	Aqua dest	Abspülen
Eisenhämatoxylin-Weigert	2 fertige Lösungen 1:1 mischen	5-6 Minuten
	Wässern unter Leitungswasser	ca. 10 Minuten
	Aqua dest	1 Minute
Pikrofuchsin van Gieson	Fertige Lösung	ca. 3 Minuten
	Aqua dest	Abspülen
	Ethanol 96%	2 Minuten
	Ethanol 96%	2 Minuten
	Ethanol 100%	2 Minuten
	Ethanol 100%	2 Minuten
	Ethanol 100%	2 Minuten
	Xylol	5 Minuten
	Xylol	5 Minuten
Xylol	5 Minuten	

7. Literaturverzeichnis

- Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Grundy SM (1995): Relationships of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men. *J Clin Invest* 96 (1), 88–98
- Abate N, Garg A, Peshock RM, Stray-Gundersen J, Adams-Huet B, Grundy SM (1996): Relationship of generalized and regional adiposity to insulin sensitivity in men with NIDDM. *Diabetes* 45 (12), 1684–1693
- Affinito P, Palomba S, Sorrentino C, Di Carlo C, Bifulco G, Arienzo MP, Nappi C (1999): Effects of postmenopausal hypoestrogenism on skin collagen. *Maturitas* 33 (3), 239–247
- Aizawa K, Iemitsu M, Maeda S, Jesmin S, Otsuki T, Mowa CN, Miyauchi T, Mesaki N (2007): Expression of steroidogenic enzymes and synthesis of sex steroid hormones from DHEA in skeletal muscle of rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 292 (2), E577–584
- Archer DF (2012): Postmenopausal skin and estrogen. *Gynecol Endocrinol* 28, 2–6
- Ashcroft GS, Mills SJ, Lei K, Gibbons L, Jeong M-J, Taniguchi M, Burow M, Horan MA, Wahl SM, Nakayama T (2003): Estrogen modulates cutaneous wound healing by downregulating macrophage migration inhibitory factor. *J Clin Invest* 111 (9), 1309–1318
- Azzi L, El-Alfy M, Martel C, Labrie F (2005): Gender differences in mouse skin morphology and specific effects of sex steroids and dehydroepiandrosterone. *J Invest Dermatol* 124 (1), 22–27
- Barnes PM, Bloom B, Nahin RL (2008): Complementary and alternative medicine use among adults and children: United States, 2007. *Natl Health Stat Rep* (12), 1–23
- Barrett-Connor E, Stuenkel CA (2001): Hormone replacement therapy (HRT)— risks and benefits. *Int J Epidemiol* 30 (3), 423–426
- Bautmans I, Van Puyvelde K, Mets T (2009): Sarcopenia and functional decline: pathophysiology, prevention and therapy. *Acta Clin Belg* 64 (4), 303–316
- Bellino FL (2000): Nonprimate animal models of menopause: workshop report. *Menopause* 7 (1), 14–24
- Beral V, Million Women Study Collaborators (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362 (9382), 419–427
- Bollheimer LC, Buettner R, Pongratz G, Brunner-Ploss R, Hechtl C, Banas M, Singler K, Hamer OW, Stroszczynski C, Sieber CC (2012): Sarcopenia in the aging high-fat fed rat: a pilot study for modeling sarcopenic obesity in rodents. *Biogerontology* 13 (6), 609–620
- Bologna JL, Braverman IM, Rousseau ME, Sarrel PM (1989): Skin changes in menopause. *Maturitas* 11 (4), 295–304

- Bonte F, Meybeck A, Massiot G (1998): Use of medicago saponins for the preparation of cosmetic or pharmaceutical compositions, especially dermatological compositions, promoting renewal of the epidermis, stimulating hair regrowth or delaying hair loss. US-Patent US5723149 A, Veröffentlichung 3. März 1998
- Brincat M, Kabalan S, Studd JW, Moniz CF, de Trafford J, Montgomery J (1987): A study of the decrease of skin collagen content, skin thickness, and bone mass in the postmenopausal woman. *Obstet Gynecol* 70 (6), 840-845
- Brincat MP (2000): Hormone replacement therapy and the skin. *Maturitas* 35 (2), 107–117
- Buhling KJ, von Studnitz FS, Jantke A, Eulenburg C, Mueck AO (2012): Attitude of German gynecologists towards prescribing HRT before and after the WHI study. *Climacteric* 15 (4), 326–331
- Burdette JE, Liu J, Chen S, Fabricant DS, Piersen CE, Barker EL, Pezzuto JM, Mesecar A, van Breemen RB, Farnsworth NR (2003): Black cohosh acts as a mixed competitive ligand and partial agonist of the serotonin receptor. *J Agric Food Chem* 51 (19), 5661–5670
- Burger HG, MacLennan AH, Huang KE, Castelo-Branco C (2012): Evidence-based assessment of the impact of the WHI on women's health. *Climacteric* 15 (3), 281–287
- Callens A, Vaillant L, Lecomte P, Berson M, Gall Y, Lorette G (1996): Does hormonal skin aging exist? A study of the influence of different hormone therapy regimens on the skin of postmenopausal women using non-invasive measurement techniques. *Dermatology* 193 (4), 289-94
- Calvin M, Dyson M, Rymer J, Young SR (1998): The effects of ovarian hormone deficiency on wound contraction in a rat model. *Br J Obstet Gynaecol* 105 (2), 223–227
- Campbell L, Emmerson E, Davies F, Gilliver SC, Krust A, Chambon P, Ashcroft GS, Hardman MJ (2010): Estrogen promotes cutaneous wound healing via estrogen receptor ? independent of its antiinflammatory activities. *J Exp Med* 207 (9), 1825–1833
- Caprio S, Tamborlane WV, Silver D, Robinson C, Leibel R, McCarthy S, Grozman A, Belous A, Maggs D, Sherwin RS (1996): Hyperleptinemia: an early sign of juvenile obesity. Relations to body fat depots and insulin concentrations. *Am J Physiol* 271 (3.1), E626–630
- Chen JH, Ho CT (1997): Antioxidant Activities of Caffeic Acid and Its Related Hydroxycinnamic Acid Compounds. *J Agric Food Chem* 45 (7), 2374–2378
- Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, Hubbell FA, Ascensao J, Rodabough RJ, Rosenberg CA, Taylor VM, Harris R, Chen C (2004): Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 350 (10), 991–1004
- Cho AS, Jeon SM, Kim MJ, Yeo J, Seo KI, Choi MS, Lee MK (2010): Chlorogenic acid exhibits anti-obesity property and improves lipid metabolism in high-fat diet-induced-obese mice. *Food Chem Toxicol* 48 (3), 937–943
- Christoffel V, Jarry H, Spengler B, Wuttke W (2004): Use of extracts of the genus cimicifuga as organoselective medicines for treating diseases of the genitourinary system caused by sex hormones. Patent EP1427430 A2, Veröffentlichung 16. Juni 2004

- Circosta C, De Pasquale R, Palumbo DR, Samperi S, Occhiuto F (2006): Effects of isoflavones from red clover (*Trifolium pratense*) on skin changes induced by ovariectomy in rats. *Phytother Res* 20 (12), 1096–1099
- Cooke PS, Naaz A (2004): Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp Biol Med* (Maywood) 229 (11), 1127–1135
- Crespillo A, Alonso M, Vida M, Pavón F, Serrano A, Rivera P, Romero-Zerbo Y, Fernández-Llebreg P, Martínez A, Pérez-Valero V (2011): Reduction of body weight, liver steatosis and expression of stearoyl-CoA desaturase 1 by the isoflavone daidzein in diet-induced obesity. *Br J Pharmacol* 164 (7), 1899–1915
- Cruz-Jentoft AJ, Baeyens JP, Bauer JM, Boirie Y, Cederholm T, Landi F, Martin FC, Michel J-P, Rolland Y, Schneider SM (2010): Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People. *Age Ageing* 39 (4), 412–423
- Delmonico MJ, Harris TB, Visser M, Park SW, Conroy MB, Velasquez-Mieyer P, Boudreau R, Manini TM, Nevitt M, Newman AB (2009): Longitudinal study of muscle strength, quality, and adipose tissue infiltration. *Am J Clin Nutr* 90 (6), 1579–1585
- Diaz Brinton R (2012): Minireview: translational animal models of human menopause: challenges and emerging opportunities. *Endocrinology* 153 (8), 3571–3578
- Di Monaco M, Vallero F, Di Monaco R, Tappero R (2011): Prevalence of sarcopenia and its association with osteoporosis in 313 older women following a hip fracture. *Arch Gerontol Geriatr* 52 (1), 71–74
- Düker EM, Kopanski L, Jarry H, Wuttke W (1991): Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Planta Med* 57 (5), 420–424
- Dunn LB, Damesyn M, Moore AA, Reuben DB, Greendale GA (1997): Does estrogen prevent skin aging? Results from the First National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Arch Dermatol* 133 (3), 339–342
- Einbond LS, Wen-Cai Y, He K, Wu H, Cruz E, Roller M, Kronenberg F (2008): Growth inhibitory activity of extracts and compounds from *Cimicifuga* species on human breast cancer cells. *Phytomedicine* 15 (6-7), 504–511
- Espinola-Klein C, Gori T, Blankenberg S, Munzel T (2011): Inflammatory markers and cardiovascular risk in the metabolic syndrome. *Front Biosci* 16, 1663–1674
- Ezure T, Amano S (2010): Influence of subcutaneous adipose tissue mass on dermal elasticity and sagging severity in lower cheek. *Skin Res Technol* 16 (3), 332–338
- Falconer C, Ekman-Ordeberg G, Ulmsten U, Westergren-Thorsson G, Barchan K, Malmström A (1996): Changes in paraurethral connective tissue at menopause are counteracted by estrogen. *Maturitas* 24 (3), 197–204

7. Literaturverzeichnis

- Ferrando AA, Sheffield-Moore M, Yeckel CW, Gilkison C, Jiang J, Achacosa A, Lieberman SA, Tipton K, Wolfe RR, Urban RJ (2002): Testosterone administration to older men improves muscle function: molecular and physiological mechanisms. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 282 (3), E601–607
- Fintelmann V: Lehrbuch Phytotherapie. 12. überarbeitete Auflage; Hippokrates, Stuttgart 2009
- Firenzuoli F, Gori L, Roberti di Sarsina P (2011): Black cohosh hepatic safety: Follow-Up of 107 patients consuming a special cimicifuga racemosa rhizome herbal extract and review of literature. *Evid-Based Complement Altern Med ECAM* 2011, 821392
- Fritze O, Romero B, Schleicher M, Jacob MP, Oh D-Y, Starcher B, Schenke-Layland K, Bujan J, Stock UA (2012): Age-related changes in the elastic tissue of the human aorta. *J Vasc Res* 49 (1), 77–86
- Gaedcke S (1999): Ist die Qualität pflanzlicher Extrakte angemessen gesichert? *Z Phytother* 20, 254-263
- Gál P, Novotný M, Vasilenko T, Depta F, Sulla I, Tomori Z (2010): Decrease in wound tensile strength following post-surgical estrogen replacement therapy in ovariectomized rats during the early phase of healing is mediated via ER-alpha rather than ER-beta: a preliminary report. *J Surg Res* 159 (1), e25–28
- Gale CR, Martyn CN, Cooper C, Sayer AA (2007): Grip strength, body composition, and mortality. *Int J Epidemiol* 36 (1), 228–235
- Gallagher D, Visser M, Meersman RED, Sepúlveda D, Baumgartner RN, Pierson RN, Harris T, Heymsfield SB (1997): Appendicular skeletal muscle mass: effects of age, gender, and ethnicity. *J Appl Physiol* 83 (1), 229–239
- Gallagher D, Heymsfield SB, Heo M, Jebb SA, Murgatroyd PR, Sakamoto Y (2000): Healthy percentage body fat ranges: an approach for developing guidelines based on body mass index. *Am J Clin Nutr* 72 (3), 694–701
- Genazzani AR, Gambacciani M (2006): Effect of climacteric transition and hormone replacement therapy on body weight and body fat distribution. *Gynecol Endocrinol* 22 (3), 145–150
- Gibson CJ, Thurston RC, El Khoudary SR, Sutton-Tyrrell K, Matthews KA (2013): Body mass index following natural menopause and hysterectomy with and without bilateral oophorectomy. *Int J Obes (Lond)* 37 (6), 809–813
- Goepel C, Thomssen C (2006): Changes in the extracellular matrix in periurethral tissue of women with stress urinary incontinence. *Acta Histochem* 108 (6), 441–445
- Goodpaster BH, Thaete FL, Simoneau JA, Kelley DE (1997): Subcutaneous abdominal fat and thigh muscle composition predict insulin sensitivity independently of visceral fat. *Diabetes* 46 (10), 1579–1585
- Gower BA, Muñoz J, Desmond R, Hilario-Hailey T, Jiao X (2006): Changes in intra-abdominal fat in early postmenopausal women: effects of hormone use. *Obes Silver Spring Md* 14 (6), 1046–1055
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER (1999): The menopause. *Lancet* 353 (9152), 571–580

- Grosman N, Hvidberg E, Schou J (1971): The effect of oestrogenic treatment on the acid mucopolysaccharide pattern in skin of mice. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 30 (5), 458–464
- Hall G, Phillips TJ (2005): Estrogen and skin: The effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. *J Am Acad Dermatol* 53 (4), 555–568
- He K, Pauli GF, Zheng B, Wang H, Bai N, Peng T, Roller M, Zheng Q (2006): Cimicifuga species identification by high performance liquid chromatography-photodiode array/mass spectrometric/evaporative light scattering detection for quality control of black cohosh products. *J Chromatogr A* 1112 (1-2), 241–254
- Herdegen T, Böhm R, Cimin-Bredée N, Culman J, Gohlke P, Ley L, Luippold G, Ufer M, Wätzig V: *Kurzlehrbuch Pharmakologie und Toxikologie*. Auflage: 1., Aufl.; Thieme, Stuttgart u.a. 2008
- Hirschberg AL, Edlund M, Svane G, Azavedo E, Skoog L, von Schoultz B (2007): An isopropanolic extract of black cohosh does not increase mammographic breast density or breast cell proliferation in postmenopausal women. *Menopause* 14 (1), 89–96
- Høegh-Andersen P, Tankó LB, Andersen TL, Lundberg CV, Mo JA, Heegaard AM, Delaissé JM, Christgau S (2004): Ovariectomized rats as a model of postmenopausal osteoarthritis: validation and application. *Arthritis Res Ther* 6 (2), R169–180
- Inoue T, Miki Y, Abe K, Hatori M, Hosaka M, Kariya Y, Kakuo S, Fujimura T, Hachiya A, Honma S (2012): Sex steroid synthesis in human skin in situ: the roles of aromatase and steroidogenic acute regulatory protein in the homeostasis of human skin. *Mol Cell Endocrinol* 362 (1-2), 19–28
- Jackman RW, Kandarian SC (2004): The molecular basis of skeletal muscle atrophy. *Am J Physiol Cell Physiol* 287 (4), C834–843
- Jacobs A, Wegewitz U, Sommerfeld C, Grossklaus R, Lampen A (2009): Efficacy of isoflavones in relieving vasomotor menopausal symptoms - A systematic review. *Mol Nutr Food Res* 53 (9), 1084–1097
- Janssen I, Heymsfield SB, Ross R (2002): Low relative skeletal muscle mass (sarcopenia) in older persons is associated with functional impairment and physical disability. *J Am Geriatr Soc* 50 (5), 889–896
- Janssen I, Shepard DS, Katzmarzyk PT, Roubenoff R (2004): The Healthcare Costs of Sarcopenia in the United States. *J Am Geriatr Soc* 52 (1), 80–85
- Jarry H, Metten M, Spengler B, Christoffel V, Wuttke W (2003): In vitro effects of the Cimicifuga racemosa extract BNO 1055. *Maturitas* 44, S31–38
- Jelinsky SA, Choe SE, Crabtree JS, Cotreau MM, Wilson E, Saraf K, Dorner AJ, Brown EL, Peano BJ, Zhang X (2008): Molecular analysis of the vaginal response to estrogens in the ovariectomized rat and postmenopausal woman. *BMC Med Genomics* 1, 27
- Jiang B, Ma C, Motley T, Kronenberg F, Kennelly EJ (2011): Phytochemical fingerprinting to thwart black cohosh adulteration: a 15 Actaea species analysis. *Phytochem Anal* 22 (4), 339–351

- Jin Son M, W. Rico C, Hyun Nam S, Young Kang M (2010): Influence of oryzanol and ferulic acid on the lipid metabolism and antioxidative status in high fat-fed mice. *J Clin Biochem Nutr* 46 (2), 150–156
- Jones ME, Thorburn AW, Britt KL, Hewitt KN, Wreford NG, Proietto J, Oz OK, Leury BJ, Robertson KM, Yao S (2000): Aromatase-deficient (ArKO) mice have a phenotype of increased adiposity. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (23), 12735–12740
- Kadi F, Karlsson C, Larsson B, Eriksson J, Larval M, Billig H, Jonsdottir IH (2002): The effects of physical activity and estrogen treatment on rat fast and slow skeletal muscles following ovariectomy. *J Muscle Res Cell Motil* 23 (4), 335–339
- Kanda N, Watanabe S (2004): 17beta-estradiol stimulates the growth of human keratinocytes by inducing cyclin D2 expression. *J Invest Dermatol* 123 (2), 319–328
- Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T (1976): Menopause and risk of cardiovascular disease: the Framingham study. *Ann Intern Med* 85 (4), 447–452
- Kannel WB, Cupples LA, Ramaswami R, Stokes J, Kreger BE, Higgins M (1991): Regional obesity and risk of cardiovascular disease; the Framingham Study. *J Clin Epidemiol* 44 (2), 183–190
- Keenan KP, Hoe CM, Mixson L, McCoy CL, Coleman JB, Mattson BA, Ballam GA, Gumprecht LA, Soper KA (2005): Diabesity: a polygenic model of dietary-induced obesity from ad libitum overfeeding of Sprague-Dawley rats and its modulation by moderate and marked dietary restriction. *Toxicol Pathol* 33 (6), 650–674
- Kelly JP, Kaufman DW, Rosenberg L, Kelley K, Cooper SG, Mitchell AA (2005): Use of postmenopausal hormone therapy since the Women’s Health Initiative findings. *Pharmacoepidemiol Drug Saf* 14 (12), 837–842
- Kielty CM (2006): Elastic fibres in health and disease. *Expert Rev Mol Med* 8 (19), 1–23
- Kim HK, Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Yang JY, Zhang W, Duan J, Hartzell DL, Hamrick MW, Baile CA (2006): Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J Nutr* 136 (2), 409–414
- Kusano A, Seyama Y, Nagai M, Shibano M, Kusano G (2001): Effects of fukinolic acid and cimicifugic acids from Cimicifuga species on collagenolytic activity. *Biol Pharm Bull* 24 (10), 1198–1201
- Labrie F, Luu-The V, Labrie C, Pelletier G, El-Alfy M (2000): Intracrinology and the skin. *Horm Res* 54 (5-6), 218–229
- LaCroix AZ, Chlebowski RT, Manson JE, Aragaki AK, Johnson KC, Martin L, Margolis KL, Stefanick ML, Brzyski R, Curb JD (2011): Health outcomes after stopping conjugated equine estrogens among postmenopausal women with prior hysterectomy: a randomized controlled trial. *JAMA* 305 (13), 1305–1314
- Lagari VS, Levis S (2014): Phytoestrogens for menopausal bone loss and climacteric symptoms. *J Steroid Biochem Mol Biol* 139, 294–301

7. Literaturverzeichnis

- LaMonte MJ, Blair SN (2006): Physical activity, cardiorespiratory fitness, and adiposity: contributions to disease risk. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 9 (5), 540–546
- Lapidus L, Bengtsson C, Larsson B, Pennert K, Rybo E, Sjöström L (1984): Distribution of adipose tissue and risk of cardiovascular disease and death: a 12 year follow up of participants in the population study of women in Gothenburg, Sweden. *Br Med J Clin Res Ed* 289 (6454), 1257–1261
- Latour MG, Shinoda M, Lavoie JM (2001): Metabolic effects of physical training in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *J Appl Physiol* 90 (1), 235–241
- Lemoine S, Granier P, Tiffocche C, Berthon PM, Thieulant ML, Carré F, Delamarche P (2002): Effect of endurance training on oestrogen receptor alpha expression in different rat skeletal muscle type. *Acta Physiol Scand* 175 (3), 211–217
- Lethaby AE, Brown J, Marjoribanks J, Kronenberg F, Roberts H, Eden J (2007): Phytoestrogens for vasomotor menopausal symptoms. *Cochrane Database Syst Rev* CD001395
- Levine ME, Crimmins EM (2012): The impact of insulin resistance and inflammation on the association between sarcopenic obesity and physical functioning. *Obes Silver Spring Md* 20 (10), 2101–2106
- Levis S, Strickman-Stein N, Ganjei-Azar P, Xu P, Doerge DR, Krischer J (2011): Soy isoflavones in the prevention of menopausal bone loss and menopausal symptoms: a randomized, double-blind trial. *Arch Intern Med* 171 (15), 1363–1369
- Li JX, Yu ZY (2006): *Cimicifugae rhizoma*: from origins, bioactive constituents to clinical outcomes. *Curr Med Chem* 13 (24), 2927–2951
- Liu J, Fox CS, Hickson DA, May WD, Hairston KG, Carr JJ, Taylor HA (2010): Impact of abdominal visceral and subcutaneous adipose tissue on cardiometabolic risk factors: the Jackson Heart Study. *J Clin Endocrinol Metab* 95 (12), 5419–5426
- Liu Z, Lv Y, Xue Y, Ma D, Shao X, Li G, Wang Y, Sheng Q, Zhang Y, Wang P (2012): Effects of soybean isoflavone on reproductive development in SD rats. *Wei Sheng Yan Jiu* 41 (5), 730–734
- Lobo RA, Kelsey J, Marcus R: *Menopause: Biology and Pathobiology*. Academic Press, San Diego 2000
- Lowe DA, Baltgalvis KA, Greising SM (2010): Mechanisms Behind Estrogen's Beneficial Effect on Muscle Strength in Females. *Exerc Sport Sci Rev* 38 (2), 61–67
- Lu CW, Yang KC, Chang HH, Lee LT, Chen CY, Huang KC (2013): Sarcopenic obesity is closely associated with metabolic syndrome. *Obes Res Clin Pract* 7 (4), e301–307
- Lundström E, Hirschberg AL, Söderqvist G (2011): Digitized assessment of mammographic breast density--effects of continuous combined hormone therapy, tibolone and black cohosh compared to placebo. *Maturitas* 70 (4), 361–364
- Maclennan AH, Broadbent JL, Lester S, Moore V (2004): Oral oestrogen and combined oestrogen/progestogen therapy versus placebo for hot flushes. *Cochrane Database Syst Rev*, (4): CD002978

- Maheux R, Naud F, Rioux M, Grenier R, Lemay A, Guy J, Langevin M (1994): A randomized, double-blind, placebo-controlled study on the effect of conjugated estrogens on skin thickness. *Am J Obstet Gynecol* 170 (2), 642-649
- Maltais ML, Desroches J, Dionne IJ (2009): Changes in muscle mass and strength after menopause. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 9 (4), 186-197
- McCormick KM, Burns KL, Piccone CM, Gosselin LE, Brazeau GA (2004): Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. *J Muscle Res Cell Motil* 25 (1), 21-27
- McGonigle P, Ruggeri B (2014): Animal models of human disease: challenges in enabling translation. *Biochem Pharmacol* 87 (1), 162-171
- Meldrum DR, Defazio JD, Erlik Y, Lu JK, Wolfsen AF, Carlson HE, Hershman JM, Judd HL (1984): Pituitary hormones during the menopausal hot flash. *Obstet Gynecol* 64 (6), 752-756
- Mijnarends DM, Meijers JM, Halfens RJ, ter Borg S, Luiking YC, Verlaan S, Schoberer D, Cruz Jentoft AJ, van Loon LJ, Schols JM (2013): Validity and reliability of tools to measure muscle mass, strength, and physical performance in community-dwelling older people: a systematic review. *J Am Med Dir Assoc* 14 (3), 170-178
- Mithieux SM, Weiss AS (2005): Elastin. *Adv Protein Chem* 70, 437-461
- Moon SS (2014): Low skeletal muscle mass is associated with insulin resistance, diabetes, and metabolic syndrome in the Korean population: the Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES) 2009-2010. *Endocr J* 61 (1), 61-70
- Moran AL, Warren GL, Lowe DA (2006): Removal of ovarian hormones from mature mice detrimentally affects muscle contractile function and myosin structural distribution. *J Appl Physiol* 100 (2), 548-559
- Moreira Mde A, Brito MV, Brito NM, Freire Filho Mde S (2005): Skeletal muscle histomorphometric study of rats in anestrus. *Acta Cir Bras* 20 (4), 329-335
- Munakata H, Isemura M, Yosizawa Z (1984): Sulfated glycosaminoglycans synthesized in rabbit uterus. *Tohoku J Exp Med* 143 (2), 205-212
- Novotný M, Vasilenko T, Varinská L, Smetana K Jr, Szabo P, Sarišský M, Dvořánková B, Mojžiš J, Bobrov N, Toporcerová S (2011): ER- α agonist induces conversion of fibroblasts into myofibroblasts, while ER- β agonist increases ECM production and wound tensile strength of healing skin wounds in ovariectomised rats. *Exp Dermatol* 20 (9), 703-708
- O'Connor KA, Holman DJ, Wood JW (2001): Menstrual cycle variability and the perimenopause. *Am J Hum Biol* 13 (4), 465-478
- Oktem M, Eroglu D, Karahan HB, Taskintuna N, Kuscu E, Zeyneloglu HB (2007): Black cohosh and fluoxetine in the treatment of postmenopausal symptoms: a prospective, randomized trial. *Adv Ther* 24 (2), 448-461
- Onorato J, Henion JD (2001): Evaluation of triterpene glycoside estrogenic activity using LC/MS and immunoaffinity extraction. *Anal Chem* 73 (19), 4704-4710

- Ortmann O, Dören M, Windler E, Association of Scientific Medical Societies in Germany AWMF (2011): Hormone therapy in perimenopause and postmenopause (HT). Interdisciplinary S3 Guideline, Association of the Scientific Medical Societies in Germany AWMF. *Arch Gynecol Obstet* **284** (2), 343–355
- Ozyazgan I, Liman N, Eskitaşçıoğlu T (2005): The effects of topical estriol and vehicle cream on the mechanical and histological properties of normal rat skin. *Med Sci Monit* **11** (11), BR405–411
- Park HS, Park JY, Yu R (2005): Relationship of obesity and visceral adiposity with serum concentrations of CRP, TNF-alpha and IL-6. *Diabetes Res Clin Pract* **69** (1), 29–35
- Parr EB, Coffey VG, Hawley JA (2013): „Sarcobesity“: a metabolic conundrum. *Maturitas* **74** (2), 109–113
- Pasini E, Aquilani R, Dioguardi FS, D’Antona G, Gheorghide M, Taegtmeyer H (2008): Hypercatabolic syndrome: molecular basis and effects of nutritional supplements with amino acids. *Am J Cardiol* **101** (11A), 11E–15E
- Patel P, Abate N (2013): Body fat distribution and insulin resistance. *Nutrients* **5** (6), 2019–2027
- Pavlica T, Mikalacki M, Matić R, Korovljev D, Cokorilo N, Vujkov S, Srdić B, Sakac D (2013): Relationship between BMI and skinfold thicknesses to risk factors in premenopausal and postmenopausal women. *Coll Antropol* **37**, 119–124
- Pelletier G, Dupont E, Simard J, Luu-The V, Bélanger A, Labrie F (1992): Ontogeny and subcellular localization of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase (3 beta-HSD) in the human and rat adrenal, ovary and testis. *J Steroid Biochem Mol Biol* **43** (5), 451–467
- Phillips SK, Rook KM, Siddle NC, Bruce SA, Woledge RC (1993): Muscle weakness in women occurs at an earlier age than in men, but strength is preserved by hormone replacement therapy. *Clin Sci (Lond)* **84** (1), 95–98
- Piérard-Franchimont C, Letawe C, Goffin V, Piérard GE (1995): Skin water-holding capacity and transdermal estrogen therapy for menopause: a pilot study. *Maturitas* **22** (2), 151–154
- Polito F, Marini H, Bitto A, Irrera N, Vaccaro M, Adamo EB, Micali A, Squadrito F, Minutoli L, Altavilla D (2012): Genistein aglycone, a soy-derived isoflavone, improves skin changes induced by ovariectomy in rats. *Br J Pharmacol* **165** (4), 994–1005
- Popp M, Schenk R, Abel G (2003): Cultivation of *Cimicifuga racemosa* (L.) nuttall and quality of CR extract BNO 1055. *Maturitas* **44**, S1–S7
- Potenza MV, Mechanick JI (2009): The metabolic syndrome: definition, global impact, and pathophysiology. *Nutr Clin Pract* **24** (5), 560–577
- Powell SL, Gödecke T, Nikolic D, Chen SN, Ahn S, Dietz B, Farnsworth NR, van Breemen RB, Lankin DC, Pauli GF (2008): In vitro serotonergic activity of black cohosh and identification of N(omega)-methylserotonin as a potential active constituent. *J Agric Food Chem* **56** (24), 11718–11726
- Prabhakar S (2012): Translational research challenges: finding the right animal models. *J Investig Med* **60** (8), 1141–1146

7. Literaturverzeichnis

- Rachoń D, Vortherms T, Seidlová-Wuttke D, Wuttke W (2008): Effects of black cohosh extract on body weight gain, intra-abdominal fat accumulation, plasma lipids and glucose tolerance in ovariectomized Sprague–Dawley rats. *Maturitas* 60 (3-4), 209–215
- Raus K, Brucker C, Gorkow CD, Wuttke W (2006): First-time proof of endometrial safety of the special black cohosh extract (*Actaea or Cimicifuga racemosa* extract) CR BNO 1055. *Menopause* 13 (4), 678–691
- Research on the menopause in the 1990s. Report of a WHO Scientific Group. o. Verf. (1996) World Health Organ Tech Rep Ser 866, 1–107
- Robert L, Robert AM, Fülöp T (2008): Rapid increase in human life expectancy: will it soon be limited by the aging of elastin? *Biogerontology* 9 (2), 119–133
- Röck K, Meusch M, Fuchs N, Tigges J, Zipper P, Fritsche E, Krutmann J, Homey B, Reifemberger J, Fischer JW (2012): Estradiol protects dermal hyaluronan/versican matrix during photoaging by release of epidermal growth factor from keratinocytes. *J Biol Chem* 287 (24), 20056–20069
- Rodriguez C, Patel AV, Calle EE, Jacob EJ, Thun MJ (2001): Estrogen replacement therapy and ovarian cancer mortality in a large prospective study of US women. *JAMA* 285 (11), 1460–1465
- Roesch DM (2006): Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 87 (1), 39–44
- Ross R, Shaw KD, Martel Y, de Guise J, Avruch L (1993): Adipose tissue distribution measured by magnetic resonance imaging in obese women. *Am J Clin Nutr* 57 (4), 470–475
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288 (3), 321–333
- Roubenoff R (2004): Sarcopenic obesity: the confluence of two epidemics. *Obes Res* 12 (6), 887–888
- Sanada K, Iemitsu M, Murakami H, Gando Y, Kawano H, Kawakami R, Tabata I, Miyachi M (2012): Adverse effects of coexistence of sarcopenia and metabolic syndrome in Japanese women. *Eur J Clin Nutr* 66 (10), 1093–1098
- Sasser AC, Taylor M, Birnbaum HG, Schoenfeld MJ, Oster EF, Rousculp M (2005): Assessing the economic impact of chronic conditions in postmenopausal women. *Expert Opin Pharmacother* 6 (11), 1803–1814
- Sator PG, Schmidt JB, Sator MO, Huber JC, Hönigsmann H (2001): The influence of hormone replacement therapy on skin ageing: a pilot study. *Maturitas* 39 (1), 43–55
- Sator PG, Schmidt JB, Rabe T, Zouboulis CC (2004): Skin aging and sex hormones in women – clinical perspectives for intervention by hormone replacement therapy. *Exp Dermatol* 13, 36–40

- Savastano S, Barbato A, Di Somma C, Guida B, Pizza G, Barrea L, Avallone S, Schiano di Cola M, Strazzullo P, Colao A (2012): Beyond waist circumference in an adult male population of Southern Italy: Is there any role for subscapular skinfold thickness in the relationship between insulin-like growth factor-I system and metabolic parameters? *J Endocrinol Invest* 35 (10), 925–929
- Schmid D, Woehs F, Svoboda M, Thalhammer T, Chiba P, Moeslinger T (2009): Aqueous extracts of *Cimicifuga racemosa* and phenolcarboxylic constituents inhibit production of proinflammatory cytokines in LPS-stimulated human whole blood. *Can J Physiol Pharmacol* 87 (11), 963–972
- Schrager MA, Metter EJ, Simonsick E, Ble A, Bandinelli S, Lauretani F, Ferrucci L (2007): Sarcopenic obesity and inflammation in the InCHIANTI study. *J Appl Physiol* 102 (3), 919–925
- Schumacher S (2007): Epidemiologie und Ätiologie der Harninkontinenz im Alter. *Urologe A* 46 (4), 357–362
- Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003): Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44, S39–S50
- Seidlová-Wuttke D, Eder N, Stahnke V, Kammann M, Stecher G, Haunschild J, Wessels JT, Wuttke W (2012a): *Cimicifuga racemosa* and its triterpene-saponins prevent the Metabolic Syndrome and deterioration of cartilage in the knee joint of ovariectomized rats by similar mechanisms. *Phytomedicine* 19 (8-9), 846–853
- Seidlová-Wuttke D, Stecher G, Kammann, Wessels, Wuttke (2012b): Osteoprotective effects of *Cimicifuga racemosa* and its triterpene-saponins are responsible for reduction of bone marrow fat. *Phytomedicine* 19(10):855–860
- Sengupta P (2013): The laboratory rat: relating its age with human's. *Int J Prev Med* 4 (6), 624–630
- Shah MG, Maibach HI (2001): Estrogen and skin. An overview. *Am J Clin Dermatol* 2 (3), 143-150
- Sherratt MJ (2009): Tissue elasticity and the ageing elastic fibre. *Age Dordr Neth* 31 (4), 305–325
- Shu YY, Maibach HI (2011): Estrogen and skin: therapeutic options. *Am J Clin Dermatol* 12 (5), 297–311
- Sipilä S, Taaffe DR, Cheng S, Puolakka J, Toivanen J, Suominen H (2001): Effects of hormone replacement therapy and high-impact physical exercise on skeletal muscle in post-menopausal women: a randomized placebo-controlled study. *Clin Sci (Lond)* 101 (2), 147–157
- Smith QT, Allison DJ (1966): Studies on the uterus, skin and femur of rats treated with 17-beta-oestradiol benzoate for one to twenty-one days. *Acta Endocrinol (Copenh)* 53 (4), 598–610
- Sotiriadou S, Kyparos A, Albani M, Arsos G, Clarke MS, Sidoras G, Angelopoulou N, Matziari C (2006): Soleus muscle force following downhill running in ovariectomized rats treated with estrogen. *Appl Physiol Nutr Metab* 31 (4), 449–459
- Spangler L, Newton KM, Grothaus LC, Reed SD, Ehrlich K, LaCroix AZ (2007): The effects of black cohosh therapies on lipids, fibrinogen, glucose and insulin. *Maturitas* 57 (2), 195–204

- Srikanthan P, Karlamangla AS (2011): Relative muscle mass is inversely associated with insulin resistance and prediabetes. Findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey. *J Clin Endocrinol Metab* 96 (9), 2898–2903
- Srikanthan P, Hevener AL, Karlamangla AS (2010): Sarcopenia exacerbates obesity-associated insulin resistance and dysglycemia: findings from the National Health and Nutrition Examination Survey III. *PLoS One* 5 (5), e10805
- Stevenson JC (2011): A woman's journey through the reproductive, transitional and postmenopausal periods of life: impact on cardiovascular and musculo-skeletal risk and the role of estrogen replacement. *Maturitas* 70 (2), 197–205
- Stevenson S, Thornton J (2007): Effect of estrogens on skin aging and the potential role of SERMs. *Clin Interv Aging* 2 (3), 283–297
- Strasser EM, Draskovits T, Praschak M, Quittan M, Graf A (2013): Association between ultrasound measurements of muscle thickness, pennation angle, echogenicity and skeletal muscle strength in the elderly. *Age Dordr Neth* 35 (6), 2377–2388
- Stromeier S, Petereit F, Nahrstedt A (2005): Phenolic esters from the rhizomes of *Cimicifuga racemosa* do not cause proliferation effects in MCF-7 cells. *Planta Med* 71 (6), 495–500
- Sumino H, Ichikawa S, Abe M, Endo Y, Nakajima Y, Minegishi T, Ishikawa O, Kurabayashi M (2004): Effects of aging and postmenopausal hypoestrogenism on skin elasticity and bone mineral density in Japanese women. *Endocr J* 51 (2), 159–164
- Taaffe DR, Henwood TR, Nalls MA, Walker DG, Lang TF, Harris TB (2009): Alterations in muscle attenuation following detraining and retraining in resistance-trained older adults. *Gerontology* 55 (2), 217–223
- Teschke R, Bahre R, Fuchs J, Wolff A (2009): Black cohosh hepatotoxicity: quantitative causality evaluation in nine suspected cases. *Menopause* 16 (5), 956–965
- Trabucco E, Soderberg M, Cobellis L, Torella M, Bystrom B, Ekman-Ordeberg G, Petraglia F, Colacurci N (2007): Role of proteoglycans in the organization of periurethral connective tissue in women with stress urinary incontinence. *Maturitas* 58 (4), 395–405
- Tsukahara K, Moriwaki S, Ohuchi A, Fujimura T, Takema Y (2001): Ovariectomy accelerates photoaging of rat skin. *Photochem Photobiol* 73 (5), 525–531
- Tulloch-Reid MK, Hanson RL, Sebring NG, Reynolds JC, Premkumar A, Genovese DJ, Sumner AE (2004): Both subcutaneous and visceral adipose tissue correlate highly with insulin resistance in African Americans. *Obes Res* 12 (8), 1352–1359
- Ulmsten U, Falconer C (1999): Connective tissue in female urinary incontinence. *Curr Opin Obstet Gynecol* 11 (5), 509–515.
- Van Weerden WM, Bierings HG, van Steenbrugge GJ, de Jong FH, Schröder FH (1992): Adrenal glands of mouse and rat do not synthesize androgens. *Life Sci* 50 (12), 857–861

- Verdier-Sévrain S, Bonté F, Gilchrist B (2006): Biology of estrogens in skin: implications for skin aging. *Exp Dermatol* 15 (2), 83–94
- Warren GL, Lowe DA, Inman CL, Orr OM, Hogan HA, Bloomfield SA, Armstrong RB (1996): Estradiol effect on anterior crural muscles-tibial bone relationship and susceptibility to injury. *J Appl Physiol* 80 (5), 1660–1665
- Watson RR, Preedy VR: *Botanical Medicine in Clinical Practice*. CAB International, Wallingford 2008
- Weigt C, Hertrampf T, Kluxen FM, Flenker U, Hülsemann F, Fritzemeier KH, Diel P (2013): Molecular effects of ER alpha- and beta-selective agonists on regulation of energy homeostasis in obese female Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol* 377 (1-2), 147–158
- Welt CK (2008): Primary ovarian insufficiency: a more accurate term for premature ovarian failure. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68 (4), 499–509
- Wend K, Wend P, Krum SA (2012): Tissue-specific effects of loss of estrogen during menopause and aging. *Front Endocrinol* 3, 19
- Wuttke W, Gorkow C, Seidlová-Wuttke D (2006): Effects of black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) on bone turnover, vaginal mucosa, and various blood parameters in postmenopausal women: a double-blind, placebo-controlled, and conjugated estrogens-controlled study. *Menopause* 13 (2), 185–196
- Yang H, Li F, Xiong X, Kong X, Zhang B, Yuan X, Fan J, Duan Y, Geng M, Li L (2013): Soy isoflavones modulate adipokines and myokines to regulate lipid metabolism in adipose tissue, skeletal muscle and liver of male Huanjiang mini-pigs. *Mol Cell Endocrinol* 365 (1), 44–51
- Yokotani K, Chiba T, Sato Y, Nakanishi T, Murata M, Umegaki K (2013): Effect of three herbal extracts on cytochrome P450 and possibility of interaction with drugs. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi* 54 (1), 56–64
- Yoneda Pde P, Biancolin SE, Gomes MS, Miot HA (2011): Association between skin thickness and bone density in adult women. *An Bras Dermatol* 86 (5), 878–884
- Zoico E, Corzato F, Bambace C, Rossi AP, Micciolo R, Cinti S, Harris TB, Zamboni M (2013): Myosteosis and myofibrosis: relationship with aging, inflammation and insulin resistance. *Arch Gerontol Geriatr* 57 (3), 411–416

8. Abbildungsverzeichnis

			Seite
Abbildung	1	Schema zur Verdeutlichung der Schnittebene im <i>M.gastrocnemius</i>	25
Abbildung	2	Lichtmikroskopische Aufnahme der zu vermessenden Hautschichten	27
Abbildung	3	Lichtmikroskopische Aufnahme der zu vermessenden Muskelareale	29
Abbildung	4	Lichtmikroskopische und mittels Phasenanalyse eingefärbte Aufnahme der Elastikaschnitte	30
Abbildung	5	Wirkung von CR BNO 1055 und den Fraktionen auf die Epidermis	32
Abbildung	6	Wirkung von CR BNO 1055 und den Fraktionen auf die Dermis	33
Abbildung	7	Wirkung von CR BNO 1055 und den Fraktionen auf die Subkutis	34
Abbildung	8	Wirkung von CR BNO 1055 und den Fraktionen auf die subkutane Muskelschicht	35
Abbildung	9	Wirkung von CR BNO 1055 und den Fraktionen auf den Umfang von Skelettmuskelfasern des <i>M. gastrocnemius</i>	36
Abbildung	10	Wirkung von CR BNO 1055 und den Fraktionen auf die Fläche von Skelettmuskelfasern des <i>M. gastrocnemius</i>	36
Abbildung	11	Wirkung von CR BNO 1055 und den Fraktionen auf den Flächenanteil elastischer Fasern	37
Abbildung	12	Vereinfachte Darstellung additiver pharmakodynamischer Effekte	42

9. Tabellenverzeichnis

			Seite
Tabelle	1	Futtermittelverbrauch und Wirkstoffkonzentration	24
Tabelle	2	Vermessungsschema der verschiedenen Schichten der Haut	28
Tabelle	3	Ergebniszusammenfassung	38

Danksagung

Vielmals bedanken möchte ich mich bei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke und Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke für die Möglichkeit, eine wissenschaftliche Arbeit in der Arbeitsgruppe für Experimentelle Endokrinologie der Abteilung für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitätsmedizin Göttingen anzufertigen.

Mein besonderer Dank gilt dabei Frau Priv.-Doz. Dr. med. Dana Seidlová-Wuttke für die kompetente fachliche Beratung, die persönliche Betreuung während sämtlicher Abschnitte meiner Arbeit und die stets sehr freundliche Unterstützung.

Außerdem gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke für die konstruktiven und äußerst hilfreichen Ratschläge zu meiner Arbeit.

Danken möchte ich nicht zuletzt auch der chemisch-technischen Assistentin Frau Heidi Brüggemann-Meyer, die mir bei der praktischen Laborarbeit sowie bei der Anfertigung der Gewebeschnitte eine unschätzbare Hilfe war. Weiterhin bedanke ich mich bei Frau Sabine Lünemann für die organisatorische Begleitung.