

# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG - EPPENDORF

Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

## Pharmakologische und toxikologische Untersuchungen von Phytoestrogenen unter besonderer Berücksichtigung von *Morinda citrifolia* L. - Blättern

### **Dissertation**

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Maria-Luise Schmitt  
aus Würzburg

Hamburg, 2010

**Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 03.12.2010**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg**

**Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Johannes Westendorf**

**Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: Prof. Dr. Andras Schaefer**

**Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Schulze**

1	Einleitung .....	4
2	Literaturübersicht .....	5
2.1	Menopause und Hormonersatztherapie .....	5
2.2	Endometriumkarzinom .....	6
2.3	Mammakarzinom .....	8
2.4	Estrogenrezeptoren .....	10
2.5	Phytoestrogene .....	14
2.6	Untersuchte Pflanzen .....	19
2.6.1	<i>Morinda citrifolia</i> .....	19
2.6.2	<i>Cimicifuga racemosa</i> .....	25
2.6.3	<i>Glycine max</i> .....	28
2.6.4	<i>Phaseolus vulgaris</i> .....	30
2.6.5	<i>Sarothamnus scoparius</i> .....	31
2.7	Prüfung pflanzlicher Drogen auf Toxizität .....	32
2.7.1	Hepatotoxizität durch pflanzliche Produkte .....	32
2.7.2	Hepatotoxizität und Genotoxizität durch <i>Morinda citrifolia</i> ? .....	33
2.7.3	Hepatotoxizität durch <i>Cimicifuga racemosa</i> ? .....	36
3	Zielsetzung der Arbeit .....	37
4	Material und Methoden .....	38
4.1	Estrogenitätstests .....	38
4.1.1	Alkalische Phosphatase Assay mit Ishikawa-Zellen .....	38
4.1.2	Luciferase Assay mit MVLN-Zellen .....	40
4.1.3	Real-time RT-PCR - Versuch .....	42
4.2	Toxizitätstests .....	53
4.2.1	Ames Test .....	53
4.2.2	V79-HPRT-Test .....	56
4.2.3	UDS-Test .....	60
5	Ergebnisse .....	63
5.1	Estrogenitätstests .....	63
5.1.1	Alkalische Phosphatase Assay mit Ishikawa-Zellen .....	63
5.1.2	Luciferase Assay mit MVLN-Zellen .....	65
5.1.3	Real-time RT-PCR - Versuch .....	69
5.2	Toxizitätstests .....	83
5.2.1	Ames Test .....	83
5.2.2	V79-HPRT-Test .....	85
5.2.3	UDS-Test .....	87
6	Diskussion der Ergebnisse .....	90
6.1	Diskussion estrogener Wirkungen von pflanzlichen Drogen .....	91
6.2	Diskussion einer möglichen Genotoxizität von <i>Morinda citrifolia</i> Blättern .....	97
6.3	Ausblick .....	100
7	Zusammenfassung .....	101
8	Summary .....	102
9	Literaturverzeichnis .....	104
10	Anhang .....	115
10.1	Bezugsquellen der Materialien .....	115
10.2	Abkürzungsverzeichnis .....	117
10.3	Beschreibung der verwendeten Proben .....	119
	Danksagung .....	122
	Eidesstattliche Versicherung .....	123

# 1 Einleitung

Frauen im Alter zwischen 45 und 55 Jahren kommen in die Lebensphase der Menopause. Sie leiden unter Wechseljahresbeschwerden und Erkrankungen der Postmenopause, wie z.B. Osteoporose, Schlaganfall und Herz-Kreislaufkrankungen. Eine Therapiemöglichkeit der Beschwerden liegt in der Hormonersatztherapie (HRT). Dabei wird eine Monotherapie mit Estrogenen oder eine Kombinationsbehandlung mit Estrogenen und Gestagenen durchgeführt. Die HRT kam in Verruf, als durch große Studien wie die „WHI Studie“ oder die „Million Women Study“ unerwünschte Nebenwirkungen, insbesondere erhöhte Krebsinzidenzen und vermehrte thrombembolische Ereignisse, publik wurden. In Anbetracht dieser negativen Auswirkungen der HRT werden alternative Therapiemöglichkeiten gesucht. In der Volksmedizin kommen weltweit verschiedenste Phytotherapeutika zum Einsatz. *Morinda citrifolia* (Noni) ist eine der wichtigsten Heilpflanzen der polynesischen Volksmedizin. Verwendet werden die Früchte und die Blätter. Neben einer Fülle von Indikationen wird sie traditionell auch bei Menstruations- oder Menopausebeschwerden eingesetzt. *Cimicifuga racemosa* (Traubensilberkerze), *Glycine max* (Soja) *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne) und *Sarothamnus scoparius* (Besenginster) sind Heilpflanzen, die bereits im Blickpunkt der Forschung bezüglich einer phytoestrogenen Wirkung stehen.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit soll das estrogene Potenzial dieser Pflanzenextrakte an Hand mehrerer zellphysiologischer Untersuchungen geprüft werden. Ein Enzym-Assay zur Untersuchung der alkalischen Phosphatase Induktion an Endometriumzellen und ein Luciferase Reporter-Gen Assay an Mammazellen sollen zum Einsatz kommen. Mittels RT-PCR sollen estrogene Markergene an verschiedenen Leberzellen untersucht werden.

Auch bei pflanzlichen Heilmitteln sind unerwünschte Wirkungen nicht auszuschließen und immer wieder kommt es zu Berichten über Gesundheitsschäden nach der langfristigen Einnahme pflanzlicher Heilmittel oder Nahrungsergänzungsmittel. Vor der Einführung eines Heilmittels auf dem Markt muss deshalb auf jeden Fall die Toxizität untersucht werden. Dabei wird zwischen einer akuten, subchronischen und chronischen Toxizität, einer Reproduktionstoxizität sowie einer Genotoxizität unterschieden. Letztere kann zum Wachstum maligner Tumoren führen, die auch erst Jahrzehnte nach der Einnahme der genotoxischen Substanz auftreten können.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit soll daher die Genotoxizität der Noni-Blätter anhand eines bakteriellen Mutagenesetests (Ames-Test), eines Säugetier-Mutagenesetests (V79-HPRT-Test) und eines DNA-Reparatur-Tests (UDS-Test) untersucht werden, da für die Blätter der Noni-Pflanze solche Untersuchungen bisher noch nicht vorliegen.

## 2 Literaturübersicht

### 2.1 Menopause und Hormonersatztherapie

Bei der Menopause handelt es sich um den Zeitpunkt der letzten Regelblutung. Die ovarielle Estrogen-Produktion wird zunehmend eingestellt. Man spricht nach diesem Zeitpunkt von der Postmenopause. Im allgemeinen Sprachgebrauch wird der Begriff der „Wechseljahre“ angewendet. In Deutschland betrifft dies Frauen zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr.

Der Estrogen-Entzug macht sich bei  $\frac{3}{4}$  aller Frauen mit einer Reihe von Symptomen bemerkbar. Dabei sind im Wesentlichen folgende zu nennen: Hitzewallungen und Schwitzen, depressive Verstimmungen, Schlafstörungen, Abnahme der Knochendichte und Osteoporose, Atrophien des Genitalgewebes und Zunahme von Herz-Kreislaufkrankungen (1). Deshalb wird häufig eine Hormonersatztherapie (HRT) durchgeführt. Diese Behandlung kann durch eine systemische Gabe als Monotherapie mit Estrogenen oder als Kombinationstherapie mit Estrogenen und Gestagenen erfolgen. Eine Anwendung als Transdermales-Therapeutisches-System (TTS) oder auch eine lokale Anwendung z.B. als Vaginalcreme sind möglich. Des Weiteren sind noch Mini-Implantate oder estrogenhaltige Nasensprays zu erwähnen.

Die positiven Wirkungen der HRT liegen in einer Reduktion der vasomotorischen Symptome, einer Prävention der Osteoporose mit Reduktion von Knochenbrüchen, einer Reduktion von kolorektalen Karzinomen sowie einer Minderung der Urogenitalatrophie.

Zu den negativen Auswirkungen der HRT gehören ein vermehrtes Auftreten von Brust-, Endometrium- und Ovarialkrebs. Thrombembolische Ereignisse häufen sich ebenfalls unter einer HRT (2, 3). Das Risiko für ein Endometriumkarzinom steigt gerade bei einer Estrogen-Monotherapie deutlich an.

In den letzten Jahren wurden die Effekte der HRT in mehreren großen Studien untersucht. Dabei wurde zunächst der „Estrogen + Gestagen - Arm“ der WHI Studie wegen der Häufung von Brustkrebsfällen, später auch der „Monotherapie - Arm“ bei hysterektomierten Frauen wegen eines erhöhten Schlaganfallrisikos abgebrochen. Auch die „Million Women Study“ wurde vorzeitig abgebrochen (4, 5).

Seit diesen Veröffentlichungen ist die Zahl der Verschreibungen einer HRT deutlich gesunken. Mittlerweile konnte man sogar schon einen Rückgang der Zahl von Brustkrebsfällen registrieren (6).

In der Kanzerogenese geht man von einer Promotion präexistierender Tumore oder einer Promotion von Vorläuferstufen aus. Nach einem Absetzen der Medikation normalisiert sich wieder das Brustkrebsrisiko (7) und auch das Ovarialkrebsrisiko (3).

Die HRT ist allerdings die wirksamste Behandlungsform klimakterischer Beschwerden, insbesondere der vasomotorischen Symptome. Bisher wurde noch keine ebenbürtige Alternative gefunden.

Die HRT beeinflusst das kardiovaskuläre System. Die Mortalität bzgl. kardiovaskulärer Erkrankungen gleicht sich bei postmenopausalen Frauen an die der Männer an, was auf einen Wegfall des protektiven Einflusses der Estrogene zurückgeführt wird. Insbesondere die Initiation der Arteriosklerose wird auf allen pathophysiologischen Ebenen beeinflusst. Estrogene wirken auf den Stoffwechsel der Lipide und Kohlenhydrate, auf die Gerinnung und in direkter Weise auf das vaskuläre System. Dennoch ist sowohl die Primär- als auch insbesondere die Sekundärprävention von kardiovaskulären Erkrankungen alleinig keine Indikation für eine HRT (8, 9).

Bevor eine HRT eingeleitet wird, muss eine individuelle Nutzen-Risiko-Abwägung erfolgen. Dabei spielen der individuelle Leidensdruck und eine familiäre Vorbelastung eine zentrale Rolle. Anbei ist zu erwähnen, dass die negativen Auswirkungen einer HRT wesentlich durch andere Risikofaktoren wie Übergewicht, Bewegungsmangel, Nikotin- und Alkoholabusus beeinflusst werden können. Falls eine HRT durchgeführt wird, sollte die Dosis so gering wie möglich und die Behandlungsdauer so kurz wie möglich gewählt werden (10, 11).

Phytoestrogene, also pflanzliche Estrogene, besitzen ähnliche Wirkungen wie endogene oder synthetische Estrogene. Es ist allerdings noch nicht geklärt, inwieweit diese Wirkstoffe zur Therapie klimakterischer Beschwerden eingesetzt werden können und inwiefern damit möglicherweise auch die negativen Wirkungen der Estrogene einhergehen. Die meisten bisherigen Studien konzentrierten sich lediglich auf das Symptom der Hitzewallungen. In Deutschland sind bisher zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden lediglich Präparate der Traubensilberkerze zugelassen.

Wenig bekannt ist, ob Phytoestrogene, ähnlich den synthetischen, einen Einfluss auf die Entstehung von hormonabhängigen Tumoren wie das Endometrium- und das Mammakarzinom haben.

## 2.2 Endometriumkarzinom

Die häufigsten Krebserkrankungen der Frau in absteigender Reihenfolge betreffen die Brust, den Darm, die Lunge, Gebärmutterkörper und die Eierstöcke. Jährlich treten etwa 11.300 Neuerkrankungen des Endometriumkarzinoms auf. Das mittlere Erkrankungsalter liegt über 67 Jahren. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate beträgt 77 %. Aufgrund dieser guten

Prognose nimmt das Endometriumkarzinom mit 2,7 % aller krebsbedingten Todesfälle bei Frauen in Deutschland die neunte Stelle ein. In den Neuerkrankungsraten kann man in den letzten 20 bis 30 Jahren einen leicht abfallenden Trend feststellen, verhältnismäßig steil abfallend verläuft hierzu der Trend der Mortalität (12).

Endogene Risikofaktoren sind v.a. Übergewicht ( $\text{BMI} > 25 \text{ kg/m}^2$ ), metabolisches Syndrom, Diabetes mellitus, niedrige Parität, frühe Menarche und späte Menopause, das polyzyklische Ovarialsyndrom, estrogen-sezernierende Tumore und ein Mammakarzinom in der Eigenanamnese. Exogene Risikofaktoren sind nichtzyklische alleinige Estrogensersatztherapie, Tamoxifentherapie und eine vorhergehende Bestrahlungstherapie.

Das Risiko wird vermindert durch Multiparität, Kontrazeptiva-Einnahme und eine lebenslange sojareiche Ernährung.

Das Leitsymptom eines Endometriumkarzinoms ist eine uterine Blutung bei postmenopausalen Frauen. Das Endometriumkarzinom weist eine geringe Prävalenz für Fernmetastasen auf (0,6 % Lunge und 0,2 % Leber). Der Nutzen einer präoperativen Bestimmung des Tumormarkers Ca-125 ist umstritten (13 - 15).

Man unterscheidet grundsätzlich ein estrogenabhängiges Endometriumkarzinom (Typ I) von einem estrogenunabhängigen Endometriumkarzinom (Typ II). Des Weiteren wird der Tumortyp an Hand der Histologie nach der WHO-Klassifikation unterschieden.

Die Therapie des Endometriumkarzinoms erfolgt zunächst durch eine Operation. Entsprechend der Stadien folgt eine adjuvante Therapie. Diese kann eine adjuvante Chemotherapie (Adriamycin plus Cisplatin) und eine Ganzabdomen-Bestrahlung beinhalten. Eine primäre Strahlentherapie wird bei Inoperabilität in kurativer Absicht durchgeführt.

Bei Inoperabilität, progesteronrezeptor-positiven Karzinomen und bei asymptomatischen Metastasen ist die endokrine Therapie mit Gestagen oder Tamoxifen indiziert.

Die Überlebens- und Heilungsraten hängen im Wesentlichen von der Invasionstiefe, vom Lymphknotenstatus und weiteren morphologischen Faktoren ab. Bei einem Endometriumkarzinom besteht meist eine günstige Prognose. Da es allerdings in 6 - 10 % der Fälle zu Zweitmalignomen, v.a. dem Mammakarzinom kommt, ist eine dementsprechende Tumurvorsorge zu treffen. In der Nachsorge ist die symptomorientierte Untersuchung der klinischen und bildgebenden nicht unterlegen. Falls relevante klimakterische Beschwerden bestehen, ist eine systemische Estrogen-Gestagen-Substitution im Stadium I bei Tumorfreiheit möglich, ohne dass das Rezidivrisiko steigt (16, 17).

Eine Estrogen-Monotherapie steht im Zusammenhang mit der Entwicklung eines Endometriumkarzinoms. Daher verbietet sich eine alleinige Therapie mit Estrogenen bei nicht-hysterektomierten Patientinnen.

Bei einer kombinierten Therapie mit Estrogenen und Gestagenen ist das Risiko nicht erhöht. Das zeigten die Ergebnisse aller aktuellen, großen Studien. Allerdings ist zu erwähnen, dass unter dieser kombinierten Therapie das Risiko steigt, an Brustkrebs zu erkranken.

Im Gegensatz dazu wird berichtet, dass Phytoestrogene das Risiko bzgl. des Endometriumkarzinoms vermindern. Dabei hatten normalgewichtige Frauen mit einem hohen Anteil an phytoestrogenreicher Nahrungsmitteln das niedrigste Risiko, im Gegensatz zu übergewichtigen Frauen mit wenigen Phytoestrogenen in ihrer Ernährung. Das erhöhte Risiko bei Adipositas wird auf eine vermehrte Konversion von Androstendion in Estron durch die Aromatase im Fettgewebe zurückgeführt. Die protektive Wirkung der Phytoestrogene wurde deutlicher bei Frauen, die sich bereits in der Postmenopause befanden (18, 19).

## 2.3 Mammakarzinom

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Krebserkrankung bei Frauen dar und zeigt auch die häufigste Krebssterblichkeit bei Frauen und ist im Alter zwischen 35 und 55 Jahren sogar die häufigste Todesursache. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei etwas über 62 Jahren und damit knapp 7 Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter bei Krebserkrankungen insgesamt. Die Inzidenz liegt in Deutschland bei etwa 102 pro 100.000. Das theoretische Risiko, bis zum Alter von 74 Jahren an Brustkrebs zu erkranken, beträgt für jede anderweitig gesunde Frau ca. 8 %. Die relative 5-Jahres-Überlebensrate für Brustkrebspatientinnen beträgt mittlerweile, über alle Stadien betrachtet, 79 % (12).

Die Brustkrebsinzidenz steigt in Deutschland seit 1970 stetig an, während die Mortalität seit Mitte der 1990er Jahre leicht sinkt. Eine neue Analyse eines US-Krebsregisters zeigt einen steilen Abfall der altersstandardisierten Inzidenz von Brustkrebs im Jahre 2003 gegenüber 2002. Zeitlich steht dies im Zusammenhang mit dem ersten Bericht der Women's Health Initiative, welcher viele postmenopausale Frauen dazu veranlasste, eine HRT abzubrechen. Andere mögliche Ursachen bzgl. des Brustkrebsrisikos haben sich in den Jahren 2002 auf 2003 nicht grundlegend geändert. Ob der Inzidenzabfall nur eine Verzögerung eines Tumoraufretens darstellt oder ob tatsächlich eine Langzeitverringerung eintritt, ist noch nicht abschließend geklärt (20).



Ein erhöhtes Risiko für Brustkrebs haben Frauen, in deren naher Verwandtschaft ein Mammakarzinom aufgetreten ist. Etwa 5 % aller Mammakarzinome entstehen aufgrund einer erblichen Disposition. Bei ungefähr 20 % dieser Familien kann bei einer Gendiagnostik die kausale Mutation gefunden werden. Eine Mammakarzinompatientin, die eine Mutation im autosomal-dominant vererblichen BRCA-1- oder BRCA-2-Gen trägt, entwickelt ein kontralaterales Mammakarzinom mit einer Wahrscheinlichkeit von 64 %.

Eine frühe Menarche, Kinderlosigkeit, ein höheres Alter bei der ersten Geburt, der späte Eintritt ins Klimakterium, Übergewicht, Bewegungsmangel und regelmäßiger Alkoholkonsum werden mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert.

Dagegen zeigen Frauen mit Schwangerschaften in jungen Jahren, mehreren Geburten, längeren Stillzeiten und körperlicher Aktivität ein verringertes Risiko.

Estrogen- und progesteronhaltige Ovulationshemmer (»Pille«) erhöhen das Brustkrebsrisiko geringfügig, wirken sich allerdings senkend auf das Risiko für Endometrium- und Ovarialkarzinom aus. Das Risiko verliert sich statistisch außerdem rund zehn Jahre nach dem Absetzen des Ovulationshemmers. In wissenschaftlichen Studien wurde belegt, dass die HRT mit Estrogenen oder insbesondere mit einer Kombination von Estrogenen und Gestagenen das Brustkrebsrisiko erhöht.

Unter einer phytoestrogenreichen Diät wurde im Allgemeinen eine Zunahme der Proliferation vorbestehender Tumore beobachtet. Gesunde Frauen entwickelten hingegen keinen Tumor.

In Deutschland wurde ein Mammographie-Screening-Programm für alle Frauen im Alter von 50 - 69 Jahren zur Früherkennung von Brustkrebs eingeführt. Parallel dazu sind eine ärztliche Tastuntersuchung der Brust sowie die Anleitung zur Selbstuntersuchung für Frauen ab 30 Jahren im gesetzlichen Früherkennungsangebot enthalten. Zur weiteren Basisdiagnostik zählen der Ultraschall mit Hochfrequenzsonden und das MRT zum lokalen Staging nach histologisch nachgewiesenem Tumor (21, 22).

Die Therapie des Mammakarzinoms erfolgt operativ in einer Entfernung des Tumors. Eine Strahlentherapie wird in der Regel postoperativ durchgeführt, in bestimmten Fällen ist auch eine präoperative Radiotherapie von Bedeutung. Eine adjuvant systemische Therapie wird in Form einer Chemotherapie und / oder einer endokrinen Therapie durchgeführt. Als zytotoxisches Schema war bislang CMF (Cyclophosphamid, Methotrexat und 5-Fluorouracil) geläufig, neuerdings ist jedoch eine Chemotherapie mit Anthrazyklinen vorzuziehen. Bei einem axillären Lymphknotenbefall kann eine Behandlung mit Taxanen indiziert sein. Die endokrine Therapie bei hormonsensitiven Tumoren erfolgt mit Tamoxifen oder einem Aromatasehemmer. Bei prämenopausalen Patientinnen mit hormonsensitivem Tumor ist eine

Ausschaltung der Ovarialfunktion durch GnRH-Analoga von Bedeutung. Wenn ein metastasiertes Mammakarzinom vorliegt, das den Wachstumsfaktorrezeptor HER-2-neu überexprimiert, ist eine Therapie mit Trastuzumab indiziert. Eine adjuvant systemische Therapie verlängert die rezidivfreie Phase sowie auch das Gesamtüberleben (22).

## 2.4 Estrogenrezeptoren

Estrogene Wirkungen werden über den Estrogenrezeptor (ER) vermittelt. Der Estrogenrezeptor kommt beim Menschen in Form von zwei Subtypen vor: ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . Von diesen zwei Subtypen wurden zudem verschiedene Splicevarianten und Polymorphismen entdeckt.

Der Estrogenrezeptor steht im Zentrum der Forschung, um die Mechanismen der estrogenabhängigen Karzinogenese aufzuklären. Heutzutage kommt dem Estrogenrezeptor außerdem eine wichtige Rolle zu als voraussagendes Kriterium für die Prognose bei Brustkrebs. Bei einem positiven Rezeptorstatus ist eine endokrine Therapie des Mammakarzinoms möglich.

Auch wenn der Rezeptor schon vor über 30 Jahren entdeckt wurde, gibt es immer noch vieles bzgl. seiner Rolle in der Physiologie und der Pathogenese zu klären, insbesondere, da der ER im Zentrum eines Netzwerks verschiedener Signalwege steht.

### Struktur und biologischer Wirkmechanismus des Estrogenrezeptors

Die Estrogenrezeptoren gehören zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren. In neueren Untersuchungen konnte der ER auch im Cytosol und in Mitochondrien nachweisen werden.

Sie wirken als Transkriptionsfaktoren. Der ER hat eine DNA-bindende Domäne, eine Dimerisierungsdomäne, eine hormon-bindende Domäne und eine Mehrzahl von Domänen zur Transkriptionsaktivierung.

Bindet das Hormon an den Rezeptor, so wird das Rezeptorprotein durch Phosphorylierung aktiviert. Ein Chaperon wie z.B. HSP 90, ein Hitze-Schock-Protein, wird abgespalten und es kommt zur Konformationsänderung des Rezeptors. Dieser aktivierte Rezeptor kann nun eine Dimerisierung mit einem anderen Rezeptor eingehen. Dieses Dimer kann dann an ein Estrogen-Response-Element (ERE) in der Promotorregion eines Zielgens binden. Die Bindung von Estradiol und des ERE führen zu einer Konformationsänderung des Rezeptors (23).

Über diesen gebundenen Rezeptorkomplex können zudem verschiedene Co-Repressoren oder Co-Aktivatoren Einfluss auf die Transkription ausüben.

Durch die Rezeptorbindung wird die Produktion von Proteinen, Second Messengers, in Gang gesetzt. Durch Estrogene beeinflusste Gene stehen z.B. im Zusammenhang mit der Zell-Proliferation, der Apoptose-Hemmung, der Invasion und Metastasierung sowie der Promotion von Angiogenese (24).

Es wurden Analysen der Struktur-Aktivitäts-Beziehungen des Rezeptors und im speziellen der Rezeptor-Bindungsstelle durchgeführt. Ob ein chemischer Stoff estrogene Eigenschaften entfaltet, hängt von einer Reihe von Struktureigenschaften, wie z.B. einer Ringstruktur ab. Es kommt zu stärkeren estrogenen Wirkungen, je stärker hydrophob ein chemischer Stoff ist. Der Rezeptor scheint den Liganden zu umschließen, so dass alle vier Ringe der Bindungsstelle zur Bindung beitragen (25).

Neuerdings wurden auch ER auf Membranen und in Mitochondrien entdeckt. Unter dem Einfluss von 17beta-Estradiol werden, über mitochondriale ER vermittelt, frühe Stadien der Apoptose inhibiert (26).

#### Einflüsse auf die Aktivität:

Die Aktivität des Estrogenrezeptors wird beeinflusst durch den Rezeptor selbst, den Liganden und Co-Regulator-Proteine.

Unterschiedliche strukturelle Stellen der hormon-bindenden-Domäne sind in der Erkennung von Estrogenen oder Antiestrogenen involviert. Eine grundlegende Rolle in der unterschiedlichen estrogenen Aktivität spielen die beiden Subtypen ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . Es gibt Liganden, die mehr oder weniger selektiv an ER- $\alpha$  oder ER- $\beta$  binden.

Es bestehen vielfältige Einflüsse von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren, wie z.B. SRC 1 oder SMRT. So können Co-Regulatoren eine inhibitorische Wirkung von Antiestrogenen oder negativ wirkenden Rezeptoren verstärken. Es wurde ein Protein identifiziert, das als selektiver Repressor am estrogen-besetzten Rezeptor wirkt und die Transkriptionsaktivität unterdrückt (Repressor of Estrogen Activity, REA). Ein anderes Protein ist in der Lage die ER-Aktivität wieder zu stimulieren, indem es den REA vom Rezeptor verdrängt (Prothymosin alpha, PT alpha) (27). Demzufolge binden die Komplexe auch an unterschiedliche Zielgene und entfalten somit eine andere Wirkung (28).

#### Unterschiede zwischen ER- $\alpha$ und ER- $\beta$ :

Im menschlichen Organismus wurden bisher zwei ER-Subtypen identifiziert: ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . Ein dritter Subtyp ER- $\gamma$  wurde erstmalig in Knochenfischen (*Teleostei*) gefunden. Das

Vorhandensein von drei ER-Subtypen in einer Spezies unterstreicht die Rolle der ER Vielfalt bei estrogenen Signalwegen (29).

Die beiden Subtypen ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  besitzen eine große Strukturähnlichkeit, unterscheiden sich aber in der Aminosäureabfolge der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne und der DNA-bindenden Domäne. Des Weiteren besitzt der  $\alpha$ -Rezeptor zwei Aktivierungs-Domänen, AF-1 und AF-2. Der  $\beta$ -Rezeptor besitzt keine starke AF-1, aber ebenfalls eine AF-2 Domäne. Die AF-2 Domäne bindet allerdings im Gegensatz zum ER- $\alpha$  ligandenunabhängig an Targetgen-Promotoren. Anstelle der starken AF-1 Domäne am Amino-Ende findet sich hier beim ER- $\beta$  eine Repressor-Domäne. Wenn die Repressor-Domäne entfernt wird, folgt eine allgemeine erhöhte Transkriptionsaktivität. ER- $\beta$  wirkt hemmend auf ER- $\alpha$  in subsaturierten Hormonmengen und verringert die zelluläre Sensitivität für Estradiol (30). Der ER- $\beta$  wirkt also antagonistisch zu ER- $\alpha$ , bzw. der ER- $\beta$  hemmt die Aktivität des ER- $\alpha$ .

Zum ER- $\beta$  existiert ein Wildtyp ER- $\beta$  / ER- $\beta$ -1 sowie eine Isoform ER- $\beta$ -cx / ER- $\beta$ -2.

Der ER- $\beta$ -cx unterscheidet sich in der Aminosäurenabfolge durch ein verkürztes, c-terminales Ende, aber er besitzt auch zusätzliche Aminosäuren durch alternatives Splicen. Es erfolgt keine Bindung an das Estrogen-Response-Element. ER- $\beta$ -cx bildet hingegen vorzugsweise Heterodimere mit ER- $\alpha$  und hemmt dadurch dessen Transkriptionsaktivität (31). In einem Versuch mit ER- $\beta$  oder ER- $\beta$ -cx transfizierten MCF-7 Zellen, die zudem auch ER- $\alpha$  exprimieren, verringerte sich bei beiden Zelltypen die Anzahl der sich in der S-Phase des Zellzyklus befindenden Zellen. Außerdem zeigte ein Reporter-Gen-Assay eine verminderte Ansprechbarkeit dieser transfizierter Zellen auf Estrogene. Diese Versuche belegen eine hemmende Wirkung der  $\beta$ -Rezeptoren auf durch  $\alpha$ -Rezeptoren vermittelte Aktivität. ER- $\beta$  transfizierte Zellen wiesen DNA-Protein-Komplexe auf, die unter ER- $\beta$ -cx Einfluss nicht auftraten. Auch gab es Unterschiede in den Gen-Expressions-Mustern. Die ER- $\beta$  transfizierten Zellen waren den ursprünglichen MCF-7 Zellen ähnlicher (32).

### Biologische Funktion am Beispiel von Knockout-Mäusen

Es wurden drei verschiedene Knockout-Modelle entwickelt: Mäuse mit einer Nullmutation des ER- $\alpha$ -Gens (alphaERKO), des ER- $\beta$ -Gens (betaERKO) sowie Mäuse ohne ER- $\alpha$ - und ER- $\beta$ -Gene (alphabetaERKO). Alle drei Typen waren lebensfähig, es gab beide Geschlechter und die Lebenszeit war der des Wildtyps entsprechend.

Die Bedeutung des ER- $\alpha$  liegt in der Regulation von Wachstumsfaktor-Signalwegen im Uterus und in den Mammae, der Beeinflussung der hypothalamisch-hypophysären Achse, als

positiver Regulator der Progesteronrezeptor Expression in vielen Geweben sowie in der Steigerung der Prolaktin-Synthese und -Sekretion in der Hypophyse. ER- $\alpha$  spielt eine wichtige Rolle in der Promotion von onkogen-induzierten Mammakarzinomen. Außerdem scheint ER- $\alpha$  ein bedeutender Einflussfaktor für das weibliche sowie das männliche Verhalten zu sein. Die alphaERKO-Mäuse zeigten einen Phänotyp, wie man ihn aus den bisherigen Erkenntnissen über den ER- $\alpha$  erwartet hätte. Der Reproduktionstrakt und die Brustdrüsen der Mäuse wurden nicht ausgebildet und nicht differenziert.

BetaERKO-Mäuse entwickelten sich normal, sie waren fruchtbar und hatten eine normale Entwicklung der Sexualorgane. Allerdings hatten diese Mäuse weniger und kleinere Nachkommen. Im vorangeschrittenen Alter entwickelten sie dann eine Hyperplasie von Prostata und Blase.

AlphabetaERKO-Mäuse wiesen v.a. einen Defekt im männlichen Reproduktionstrakt auf, einige der Defekte waren ähnlich denen der alphaERKO-Mäuse. Erstaunlicherweise waren die weiblichen Defekte, die in alphaERKO auftraten, in den alphabetaERKO-Mäusen intakt (33, 34).

#### Verteilung der Estrogenrezeptoren im Organismus

Die Subtypen ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  sind unterschiedlich in den Gewebearten verteilt. So sind bei Ratten beide Rezeptorentypen stark vertreten in Uterus, Hoden und Ovarien.

Ein Verteilungsmuster mit hohen Konzentrationen von ER- $\alpha$  zeigt sich in Hypophyse, Nieren, Nebenhoden, und Nebenniere. ER- $\beta$  ist vorherrschend vertreten in Prostata, Lunge, Blase und Gehirn sowie im Kolon (35, 36).

#### Beobachtungen bei Brustkrebs und anderen Krebsarten

Wenn ein positiver Rezeptorstatus für ER- $\alpha$  und Progesteronrezeptoren vorliegt, ist heutzutage eine Therapie des Mammakarzinoms mit Antiöstrogenen oder Aromataseinhibitoren möglich. Allerdings tritt in bis zu 30 % der Fälle eine Therapieresistenz auf. Kommt zudem die Isoform ER- $\beta$ -cx im Gewebe vor, ist mit einer besseren Ansprechrate auf die Therapie, sowie mit einem längeren Überleben der Patientinnen zu rechnen (37).

Im Zusammenhang mit einer Therapieresistenz wurde das komplexe Zusammenspiel des ER-Signalweges mit Wachstumsfaktoren-Signalwegen in Brustkrebszellen auf molekularer Ebene erforscht (38).

Für den ER- $\alpha$  codieren 1785 Nukleotide, die in einer Region von 300 000 Nukleotiden liegen. Das Splicen der Precursor-RNA führt oft zu Variationen, denen ein oder mehrere Exons

fehlen. In solchen Fällen kann man häufig eine Assoziation mit Krebs feststellen. In der humanen Mammakarzinom Zelllinie MCF-7 kommt eine Splice Variante vor, der das Exon 4 fehlt (39).

Eine hereditäre Ursache für Brustkrebs liegt in einer Mutation des Gens BRCA-1. Normalerweise blockiert dieses Gen ER- $\alpha$  vermittelte Signalwege. Über den Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) / c-Act Signalweg wird in der Aktivierung-Funktions-1-Domäne des Rezeptors an der Stelle 167 ein Serin phosphoryliert. Die Mutation im Gen bewirkt eine liganden-unabhängige, verstärkte ER- $\alpha$  Aktivität (40).

Der  $\beta$ -Rezeptor wirkt inhibitorisch auf ER- $\alpha$  positives Brustkrebsgewebe. Dabei konnten sowohl in einer Zelllinie als auch in Patientenproben ein bestimmtes Genmuster nachgewiesen werden, das durch ER- $\beta$  herunterreguliert wurde. In der ER- $\beta$ -reichen Patientengruppe kam es zu einem verlängerten krankheitsfreien Intervall sowie einer verlängerten krankheitsspezifischen Überlebenszeit. (41)

Eine bedeutende Rolle in der Brustkrebsbiologie besitzen Steroid-Sulfatasen, die die Menge biologisch aktiver Steroide erhöhen. Diese Steroid-Sulfatasen werden durch ER- $\alpha$  vermittelte Signalwege und durch eine direkt estrogenabhängige Bindung des Rezeptors an den Steroid-Sulfatasen kontrolliert (42).

Auch im Kolon spielen die Estrogenrezeptoren eine Rolle. Der vorherrschende Subtyp in diesem Gewebe ist der ER- $\beta$ . Eine verringerte Menge an m-RNA von ER- $\beta$  und ER- $\beta$ -cx konnte mit der Entwicklung eines Kolonkarzinoms bei Frauen in Verbindung gebracht werden (36).

Im Zusammenhang mit der Entwicklung von Prostatakrebs wurde im ER- $\alpha$  ein abweichender Polymorphismus in einer GGGA-Sequenz festgestellt (43).

## 2.5 Phytoestrogene

Als Phytoestrogene werden pflanzliche Stoffe bezeichnet, die estrogene Wirkungen aufweisen. Diese biologischen Auswirkungen können in Zellsystemen, an Tieren und Menschen beobachtet werden. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Pflanzeninhaltsstoffen als Phytoestrogene identifiziert. Sie wurden in Früchten, Getreidearten und Gemüsesorten gefunden. Die bekanntesten Quellen sind Sojabohnen, Rotklee, Alfalfasprossen und Ölsaaten.

In asiatischen Bevölkerungsgruppen treten kaum Wechseljahresbeschwerden auf, auch die Brustkrebsrate liegt niedriger als in westlichen Bevölkerungen. Diese Tatsache wurde auf eine sojareiche und somit auch phytoestrogenreiche Ernährungsweise zurückgeführt. So liegt in asiatischen Ländern bei traditioneller Ernährung die Aufnahme von Isoflavonen bei 15 - 40 mg/d. Im Gegensatz dazu werden in westlichen Industrieländern weniger als 2 mg/d aufgenommen.

Phytoestrogene weisen eine diphenolische Struktur auf, die eine strukturelle Ähnlichkeit zu natürlichen und synthetischen Estrogenen sowie zu Antiestrogenen haben. Man unterscheidet im Wesentlichen Isoflavonoide, Coumestane, Lignane und Stilbene (44).

Sojabohnen enthalten die Isoflavone Genistein, Daidzein und Glycitein im Verhältnis 10:8:1. Diese Stoffe kommen in der genannten unkonjugierten Form, als Glykoside (Daizin, Genistin und Glycitin), Acetylglykoside oder Malonylglycoside vor.

Rotklee-, Klee- und Alfalfasprouen enthalten vornehmlich die Isoflavone Formononetin und Biochanin A. Diese Isoflavone sind 4-Methylether von Daidzein und Genistein. In Klee- oder Alfalfasprouen werden zudem auch Coumestane, wie z.B. das Coumestrol, gefunden.

Ölsaaten, wie z.B. Leinsamen, enthalten Lignane. Diese Phytoestrogene werden im Darm von Säugern durch Bakterien umgewandelt. So entstehen aus dem pflanzlichen Secoisolariciresinol und Matairesinol die Stoffe Enterodiol und Enterolacton (45).

Im weiteren Sinne spielen auch Stilbene als Phytoestrogene eine Rolle. In Traubenschalen und Rotwein kommt das Resveratrol vor. Hopfen und Bier enthalten das 8-Prenylnaringenin.

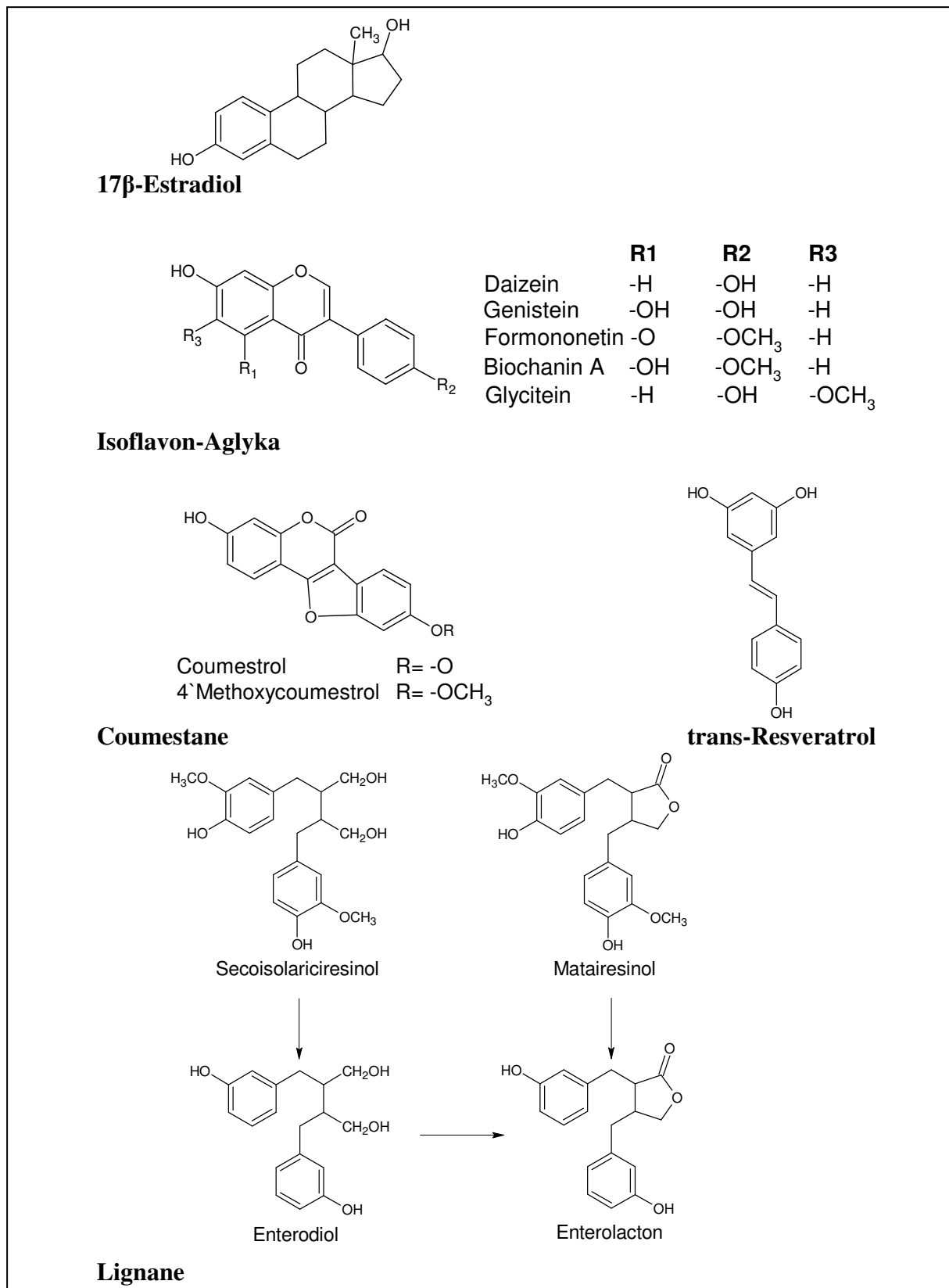


Abb. 1: Strukturformeln von 17- $\beta$ -Estradiol, Isoflavonen, Coumestanen, Resveratrol und Lignan



Als eine wesentliche estrogene Eigenschaft kann die Bindung der Phytoestrogene an den ER betrachtet werden. Diese Affinität zum Rezeptor ist aber im Vergleich zum Estradiol um den Faktor 1000 bis 10.000 geringer. Wenngleich auch die im Körper zirkulierenden Mengen größer sein können als die der endogenen Hormone, ist diese Tatsache für eine Berechnung der benötigten Aufnahmemenge zu berücksichtigen. Die Phytoestrogene binden vornehmlich an den  $\beta$ -Rezeptor (46). Dabei können sie estrogene Effekte nachahmen oder blockieren. Gerade bei hohen Konzentrationen geht man von einer kompetitiven Verdrängung der endogenen Estrogene vom Rezeptor aus.

An MCF-7-Brustkrebs und G-292-Osteosarkom-Zelllinien konnte gezeigt werden, dass Phytoestrogene, über ER- $\beta$  vermittelt, die Transaktivierung von Genen über das Estrogen-Response-Element auslösen. Die Wirkung der Phytoestrogene ist schwächer als die der Estrogene. So war im Versuch von Chrzan et al. 17 $\beta$ -Estradiol ( $E_2$ ) 400- bis 600-fach potenter. ER- $\alpha$  wurde nur von  $E_2$ , und nicht durch die Phytoestrogene, aktiviert. Die Reihenfolge der Fähigkeit zur ER- $\beta$  Aktivierung war wie folgt:  $E_2$  > Genistein > Daidzein (47). In Abwesenheit von endogenen Estrogenen zeigen die Phytoestrogene estrogene Wirkungen. Es werden auch antiestrogene Effekte beobachtet. Dabei wird vermutet, dass es sich um einen kompetitiven Mechanismus handelt (44). Untersuchungen der Arbeitsgruppe bestätigten diesen Mechanismus. Eine alkalische Phosphatase Induktion durch Estrogen wurde nach Zugabe von Quercetin oder Kaempferol in niedrigen Konzentrationen zusätzlich gesteigert. Mit zunehmender Konzentration der phytoestrogenen Substanz wurde dann allerdings der Effekt gehemmt (48).

Neben der rezeptor-vermittelten hormonellen Wirkung nehmen Phytoestrogene Einfluss auf das hormonelle System, indem sie die Bildung von Sex-Hormone-Binding-Globulin in der Leber fördern. Dadurch wird die zirkulierende Menge an freien, aktiven Hormonen verringert. Die Phytoestrogene wirken auch auf den Hormonstoffwechsel. Sie hemmen wesentliche Enzyme, die Estrogenen aus den Vorläuferprodukten bilden, wie z.B. die Aromatase, die 17- oder die 3-Hydroxysteroid-Dehydrogenase. Auch im Estrogenabbau beteiligte Enzyme werden beeinflusst, wie z.B. die Estron-Sulfatase oder die Estron-Sulfotransferase. Es ist noch nicht klar, ob die Phytoestrogene dabei durch kompetitive Hemmung oder durch Einfluss auf die Enzymexpression wirken. Auf diese Art und Weise könnten die Phytoestrogene lokal z.B. im Brustgewebe auf die Menge aktiver Estrogene Einfluss nehmen und somit der Initiation und Progression von Brustkrebs entgegenwirken (49).

Eine Hemmung der Neoangiogenese wurde bei Genistein und anderen Isoflavonen beobachtet (50).

Tumorzellen können durch Phytoestrogene in ihrer Proliferation gehemmt oder auch stimuliert werden. Es werden verschiedene Mechanismen diskutiert: Ein Wechsel der Zelle im Zellzyklus von einer G1- in eine S-Phase, eine Apoptose-Induktion, eine Hemmung der DNA-Topoisomerase II, eine Beeinflussung von Zell-Signalpfaden, wie z.B. über Protein Tyrosin Kinasen.

Die Proliferationshemmung oder -induktion von ER-positiven Brustkrebszellen findet wahrscheinlich über einen ER-vermittelten Mechanismus statt. Das wurde auch bei MCF-7-Zellkulturen beobachtet. Hemmende Effekte, wie sie bei hohen Phytoestrogen-Konzentrationen auftreten, könnten auch schlicht durch Zytotoxizität ausgelöst werden.

Phytoestrogene besitzen auch häufig antioxidative Eigenschaften.

In vitro wurde bzgl. Genistein ein genotoxisches Potential festgestellt. Es wurden DNA-Strangbrüche, Mikrokerne, chromosomale Aberrationen und Genmutationen in Zellsystemen beobachtet, wie sie typischerweise bei einer Topoisomerase II Hemmung auftreten. Diese positiven in vitro Befunde werden allerdings erst bei unphysiologisch hohen Dosen beobachtet (51, 52).

Die biologischen Wirkungsweisen der Phytoestrogene sind sehr komplex. Die Wirkung wird unter anderem entscheidend durch die Estrogenrezeptorzahl, durch Co-Aktivatoren, Co-Repressoren oder den Zelltyp beeinflusst. So kommt es dazu, dass in verschiedenen Versuchen, in vitro und in vivo, je nach Zelllinie, Gewebe oder Tierart, unterschiedliche Ergebnisse erzielt wurden. Gerade in niedrigen Konzentrationen scheinen die Phytoestrogene ein Tumorwachstum zu induzieren, in hohen Konzentrationen hingegen zu hemmen. Als Erklärung für diese experimentellen Ergebnisse dient die Theorie eines Selektiven-Estrogen-Rezeptor-Modulators (SERM). Hierbei werden nicht grundsätzlich alle estrogenspezifischen Wirkungen erzielt, sondern die estrogenen oder auch antiestrogenen Effekte treten selektiv organspezifisch auf.

Beim Menschen könnten diese Wirkungen Einfluss auf menopausale Beschwerden, Osteoporose, koronare Herzerkrankungen oder hormonabhängige Krebsarten haben.

Bei Frauen mit vorbestehenden Brusttumoren trat eine Tumorproliferation auf, nicht hingegen bei Frauen ohne eine Brustkrankung. Die Daten aus Tierversuchen waren bisher widersprüchlich.

Nach sojareicher Diät wurden verringerte Gesamt-, LDL-Cholesterin- und Triglyzeridwerte bei erhöhten HDL-Cholesterinwerten gemessen. Ob diese Wirkung aber allein durch die in Soja enthaltenen Phytoestrogene oder durch andere Wirkstoffe der Sojapflanze erzielt wurde, ist unklar.

Studien, die Auswirkungen einer phytoestrogen-haltigen Diät auf menopausale Beschwerden, insbesondere Hitzewallungen, untersuchen, weisen einen ausgeprägten Placeboeffekt auf (53). Gerade aufgrund der estrogenen und antiestrogenen Eigenschaften im Sinne eines SERM sind Phytoestrogene als Alternative einer HRT mit synthetischen Estrogenen in Betracht zu ziehen. Bei einer Langzeitbehandlung in hoher Dosierung können allerdings, nach dem heutigen Stand des Wissens, Nebenwirkungen nicht ausgeschlossen werden. In der vorliegenden Arbeit werden verschiedene pflanzliche Extrakte auf ihre estrogenen Wirkungen und mögliche toxische Effekte hin untersucht.

## 2.6 Untersuchte Pflanzen

### 2.6.1 *Morinda citrifolia*

*Morinda citrifolia* L. ist auch unter den Namen „Noni“, „indischer Maulbeerbaum“ oder „Käsefrucht“ bekannt. Außerdem besitzt die Pflanze eine Vielzahl regionaler Namen. Sie gehört zur Familie der Rubiaceae. Der Ursprung liegt in Südostasien, besonders Indonesien sowie im nordöstlichen Australien. Heutzutage ist sie weltweit im tropischen Raum angesiedelt. Die Verbreitung erfolgte durch die schwimmbaren Samen oder durch Vögel und andere Tiere. Überdies nahmen die Polynesier auf ihren Wanderzügen vor bis zu 3000 Jahren die Noni-Pflanze als eine ihrer 12 wichtigsten Heilpflanzen in den Kanus mit.

*Morinda citrifolia* zeigt in den warmen Regionen ein robustes Wachstum. Ursprünglich wächst sie in Küstennähe, ist aber auch in Wäldern, in Ebenen oder sogar an Standorten aus Lavagestein zu finden. Sie toleriert relativ trockene bis feuchte Wetterbedingungen und ist unempfindlich gegenüber Salzwasser. Heutzutage wird sie außerdem in Plantagen angebaut und dient in Gärten als Windschutz sowie Zier- und Medizinpflanze.

In der vorliegenden Arbeit wurden Blattproben von Tahiti, den Malediven und den Marquesas Inseln untersucht. Weitere Proben stammen aus Indonesien von Bali und Lombok.

Die Pflanze wächst als immergrüner Strauch oder Baum bis zu einer Höhe von 3 - 6 m. Die Rinde ist grau bis braun und glatt oder nur leicht rau. Die Blätter sind glänzend, mit deutlicher Nervenzeichnung, elliptisch bis oval, 20 - 45 cm lang, 7 - 25 cm breit und haben 1,5 - 2 mm lange Stiele. Etwa 75 - 90 kleine, weiße, tubulöse Blüten stehen dicht gedrängt an den Enden der Äste. Aus den Blüten entstehen Einzelfrüchte, die zu eiförmigen 5 - 7 cm großen Sammelfrüchten zusammenwachsen.

Die reifen blass gelben Sammelfrüchte besitzen einen unangenehmen, käseartigen Geruch. In einer Sammelfrucht befinden sich bis zu 100 rötlichbraune, dreieckige Samen mit einer Luftkammer.



Abb. 2: Noni-Pflanze mit Weber-Ameisen (*Oecophylla sp.*), die von dem süßen Saft angelockt werden, der auf den Früchten und Stängeln austritt. Im Gegenzug schützen sie die Pflanze vor schädlichen Insekten.

#### Traditionelle Anwendung:

Die einheimischen Völker verwenden verschiedene Teile der Pflanze in erster Linie zu Heilzwecken. Ferner wird sie auch als Nahrung in Notzeiten, als Tiernahrung, als Insektizid (das aus den Samen gewonnene Öl) und als Färbemittel (die Wurzeln dienen als gelber, die Rinde als roter Farbstoff für die Färbung traditioneller Textilien) verwendet.

Zur medizinischen Anwendung kommen, je nach Erkrankung, die Blätter oder die Früchte. Die Blätter werden frisch als Umschläge, als Tee oder in Form eines wässrigen Extraktes verwendet. Die Früchte werden jung oder reif geerntet, roh oder gekocht in verschiedenen Speisen verarbeitet, als Saft, als wässriger Extrakt oder extern als Breiumschläge angewendet. Der traditionelle medizinische Anwendungsbereich ist sehr weit gefasst. So soll *Morinda citrifolia* bei Allergien, Alterserscheinungen, Arthritis, Bluthochdruck, Depressionen, Diabetes, Fieber, gastroenterologischen Beschwerden, gynäkologischen Beschwerden, Herzkrankheiten, Infektionen, Konzentrationsstörungen, Krebs, Nierenerkrankungen, Schlafstörungen, Schmerzen, Verbrennungen sowie bei der Wundheilung helfen (54 - 56).



Abb. 3: Herkunft der verwendeten Noni-Proben.

#### Persönliche Beobachtungen auf Bali:

In Indonesien, insbesondere auf Bali und Lombok, wird die Noni-Pflanze als „Tibah“ bezeichnet. Die Pflanze wächst sowohl auf Bali als auch auf Lombok. Dass die Pflanze auf beiden Inseln vorkommt, ist deshalb von Interesse, da zwischen diesen Inseln eine Meeresschneise liegt, die Wallace-Linie, die die indonesische von der australischen Pflanzen- und Tierwelt trennt. Die Noni-Pflanze wächst als Baum sowohl in Bergregionen als auch direkt am Meer. Der Baum trägt das ganze Jahr Früchte. Die Balinesen schätzen die Pflanze als Heilmittel, daher wird in jedem Ort ein Baum kultiviert. Angeblich sind Früchte auf dem Markt erhältlich und in Apotheken kann man Kapseln mit der Trockensubstanz kaufen.

Zur medizinischen Anwendung für den Menschen kommen auf Bali nur die Früchte. Aus den reifen Früchten kann ein Saft hergestellt werden. 1-3 Sammelfrüchte werden in heißes oder auch kaltes Wasser gelegt und dann ausgepresst. Die jüngeren, noch etwas festeren Früchte werden zu einer Art Obstsalat verarbeitet. Dabei werden die geschälten Früchte in kleine Stücke geschnitten und mit Palmzucker, getrockneten Pflaumen, Chili, Curry, Salz und Glutamat gewürzt. Zur Anwendung kommen die Früchte bei aller Art von Bauchbeschwerden. Selten verwenden es die Balinesen bei Bluthochdruck oder unscharfem Sehen und zur Besserung des Allgemeinbefindens. Man trinkt in einem solchen Fall ein Glas Saft morgens, mittags und abends. Bei Bauchschmerzen beträgt die Anwendungsdauer 3 Tage. Bei chronischem Bluthochdruck wird täglich morgens ein Glas Saft getrunken. Das Laub des Noni-Baums wird zur Fütterung kranker Tiere, z.B. in der Geflügelhaltung, verwendet.

### Inhaltsstoffe:

Die Früchte sind nicht besonders nährstoffreich und werden auch aus diesem Grund selten als Nahrungsmittel verwendet. Der Vitamingehalt ist gering und die Früchte zeigen keine ungewöhnliche Mineralstoffzusammensetzung. Der Kaliumgehalt ist hoch wie auch bei anderen Fruchtsäften, z.B. Orangensaft oder Grapefruitsaft. Die Früchte enthalten verschiedene Polysaccharidfraktionen, wie z.B. das sog. „Noni-ppt“. Dies ist ein Präzipitat aus Noni-Saft, das bei Zugabe von Alkohol ausfällt. Dieser Inhaltsstoff stand im Fokus vieler Versuche. Ob diese durch das Noni-ppt verursachten pharmakologischen Wirkungen, wie z.B. ein immunstimulierender Effekt, in vivo zutreffen, ist nicht mit Sicherheit zu sagen.

Das Scopoletin, das zu den Coumarinen gehört, besitzt entzündliche und schmerzstillende Eigenschaften. Auch konnte durch das Scopoletin eine Hemmung der Xanthinoxidase hervorgerufen werden, die eine Senkung des Harnsäurespiegels bewirkt (57).

Noni-Früchte sind reich an Fettsäuren. Reife Früchte enthalten insbesondere die gesättigten Fettsäuren Hexansäure und Oktansäure, die für den käseartigen Geruch der Frucht verantwortlich sind. In jungen Noni-Früchten sind die Fettsäuren glykosidisch gebunden. Im Reifungsprozess erfolgt eine Abspaltung und die freien Fettsäuren verströmen dann den typischen Geruch. Diese Fettsäuren besitzen zudem eine insektizide Wirkung. Dekatriensäure und die Eikosatriensäure konnten identifiziert werden sowie seltene Fettsäuren mit ungerader C-Atom-Anzahl. Die Dekatriensäure (10 C-Atome und 3 Doppelbindungen) kommt sonst nur in Wolfsmilchgewächsen vor. Sie wurde von der Arbeitsgruppe erstmals in Noni-Früchten identifiziert und eignet sich sehr gut zur chemischen Charakterisierung von Noni (58). Der Eikosatriensäure (20 C-Atome und 3 Doppelbindungen), die chemisch der Arachidinsäure ähnlich ist (20 C-Atome, 4 Doppelbindungen) werden entzündungshemmende Eigenschaften über Beeinflussung des Leukotrien-Stoffwechsels nachgesagt.

Die Triterpene Ursolsäure und Oleanylsäure besitzen antioxidative Eigenschaften und kommen sowohl in Früchten als auch in Blättern vor (59).

Ebenfalls sind sowohl in Früchten als auch in Blättern Flavonoide wie das Quercetin oder das Kämpferol vorhanden. Sie sind glykosidisch gebunden oder auch in freier Form vorkommend. Insbesondere das Quercetin war Gegenstand vieler Untersuchungen. Als Hauptwirkungen werden ihm antioxidative und estrogenische Eigenschaften zugeschrieben (60).

Im Gegensatz zu den Früchten sind die Blätter der Noni-Pflanze reich an Proteinen und Aminosäuren. Es sind Phytosterine enthalten, die Einfluss auf den Cholesterinspiegel nehmen. In frischen Blättern besteht ein hoher Gehalt an Vitamin C, der durch den Röstungsprozess des Tees verloren geht. Unbeeinflusst durch die Röstung ist der hohe Gehalt an Vitamin E (61).

### Experimentelle Untersuchungen:

Näher untersucht und nachgewiesen wurden antibakterielle Wirkungen an *Pseudomonas aeruginosa*, *Strept. pyogenes*, *Echerichia coli*, Salmonellen und Shigellen, (62) bzw. auch an *Staph. aureus* sowie MRSA. (63)

Auch wurden antivirale, antihelminthische sowie antituberkulöse Effekte beschrieben (64 - 66). Im Tierexperiment an Mäusen konnten Younos et al. eine zentrale analgetische Wirkung nachweisen (67).

Ein antitumoröser Effekt konnte an Mäusen nachgewiesen werden, die mit implantierten Lewis Lungenkarzinom Zellen länger überlebten, wenn sie intraperitoneal Noni-Saft injiziert bekamen. In weiteren Untersuchungen diesbezüglich stellten Hirazumi et al. fest, dass die Wirkung durch stimulierte Makrophagen und Lymphozyten erfolgt ist und durch Gabe von Immunsuppressiva aufgehoben werden konnte (68, 69).

Liu et al. berichteten über ein Experiment, in dem aus der Noni-Frucht isolierte Glycoside in epidermalen Mäuse-Zellkulturen eine durch UV-B induzierte AP-1 Aktivität hemmten. Dieser Effekt wirkte einer malignen Zelltransformation entgegen (70).

Eine hemmende Wirkung auf die Bildung von DNA-Addukten sowie antioxidative Aktivitäten konnten Wang und Su feststellen (71).

Traditionell werden die Blätter von *Morinda citrifolia* zur Wundbehandlung bei Verletzungen und Verbrennungen angewendet. Diese wundheilenden Eigenschaften wurden im Rattenversuch von Rasal et al. mit wässrigen und von Nayak et al. mit ethanolischen Noni-Blatt-Extrakten untersucht. Beide Arbeitsgruppen beobachteten eine signifikant bessere Wundheilung durch die Testsubstanz im Vergleich zur Kontrollgruppe (72, 73).

Estrogene Wirkungen auf Ratten wurden von Chearskul et al. untersucht. Ein uterotrophischer Effekt wurde durch subcutane Injektionen von *Morinda citrifolia* Extrakten in niedrigen Dosierungen beobachtet. Diese Wirkungen lagen aber deutlich unter dem Effekt, der durch synthetische Estrogene hervorgerufen wurde (74).

### Toxizität und die Zulassung als neuartiges Lebensmittel auf dem europäischen Markt.

Bei den Naturvölkern des Pazifischen Ozeans wird *Morinda citrifolia* seit Jahrhunderten verzehrt. Aufgrund dieser Tatsache wurde bereits 1943 die Noni-Pflanze von der US-Regierung als essbar erklärt (75). Der aktuelle Konsum von Noni-Saft liegt im mehr als zweistelligen Millionen Liter Bereich und findet in über 50 Ländern statt. Da bis vor kurzer Zeit noch keine Produkte von *Morinda citrifolia* im europäischen Raum gebräuchlich waren, unterliegen diese der Prüfung als neuartige Lebensmittel durch die Europäische Union.

Im Jahr 2003 wurde von der Kommission der Europäischen Union pasteurisierter Noni-Saft als neuartiges Lebensmittel für den Europäischen Markt zugelassen (76). Der wissenschaftliche Ausschuss für Lebensmittel (EFSA) ist nach Prüfung zu dem Schluss gekommen, dass der Verzehr von Saft aus *Morinda citrifolia* akzeptabel ist. Ferner wurde darauf hingewiesen, dass aufgrund der bestehenden Informationen, die zur Prüfung als Lebensmittel eingereicht wurden, kein Beweis für besondere gesundheitsfördernde Wirkungen vorliegt, die über die von anderen Fruchtsäften hinausgehen (77).

Im Jahr 2008 wurden die Blätter geprüft und als unbedenklich eingestuft (78). Ebenso wurden 2010 ein Fruchtpüree und ein Fruchtkonzentrat für den europäischen Markt zugelassen (79).

Zu unerwünschten Wirkungen bei der Anwendung von *Morinda citrifolia* gibt es einzelne Fallberichte über Leberschädigungen (80 - 82), Coumarin-Resistenz (83) sowie Kaliumintoxikation bei einem Nierenkranken (84). Zu letzterem ist zu beachten, dass der Kaliumgehalt von Noni-Saft 56,3 +/- 2,5 meq/l beträgt, also ähnlich hoch ist, wie in Orangen-, Tomaten- oder Grapefruitsaft. Der Vitamin K - Gehalt des Saftes lag unter den nachweisbaren Konzentrationen (85). Künstlich zugesetztes Vitamin K wurde in der Saftprobe des o.g. Falles festgestellt, das zu der Coumarin-Resistenz geführt hatte.

Im Gegensatz zu den Fallberichten, in denen der Verdacht auf eine Hepatotoxizität gestellt wurde, stehen experimentelle Untersuchungen, die eher einen hepatoprotektiven Effekt widerspiegeln. Solch ein protektiver Effekt wurde bei Ratten beobachtet, die vor einer CCl<sub>4</sub> - Gabe Noni-Saft verabreicht bekamen. Dieses Ergebnis wurde im Versuch sowohl an lichtmikroskopischer Leberuntersuchung als auch in einem ausbleibenden Transaminasenanstieg festgestellt (86).

Einmalig wurde in einer Veröffentlichung von einer fetotoxischen Wirkung von Noni berichtet (87). Der Verdacht konnte aber entkräftet werden, da es sich bei der getesteten Substanz nicht um ein Noni-Präparat handelte. Der angebliche Noni-Saft wurde aus Indien bezogen und wurde in unterschiedlichen Laboratorien als „Nicht-Noni“ Saft identifiziert. Dieser Vorfall verdeutlicht allerdings, wie durch undurchsichtige Vermarktungsstrategien Verwirrung entstehen kann. Im Tierversuch an Ratten konnten Feng et al. keinerlei fruchtschädigende Wirkungen feststellen (88).

West et al. führten eine Reihe Toxizitätstests durch. Es wurde die akute, subakute und subchronische Toxizität von ethanolischem und wässrigem Blatt-Extrakt an Mäusen getestet. Eine Testung bzgl. des Allergiepentials wurde an Meerschweinchen durchgeführt. Diese Tierversuche zeigten keinerlei negative Einflüsse durch die Testsubstanz im Vergleich zur Kontrollgruppe.



Des Weiteren wurden chemische Analysen durchgeführt. Die Blätter von *Morinda citrifolia* wiesen, im Vergleich zu anderen geläufigen Gemüsesorten, einen durchschnittlichen Gehalt an Tanninsäure und einen geringen Gehalt an Oxalsäure auf. Phytinsäure konnte nicht nachgewiesen werden. Die Autoren erbrachten in diesen Untersuchungen weitere Belege für die Unbedenklichkeit von *Morinda citrifolia* als Nahrungsmittel (89).

Die Bedenken bzgl. der Hepatotoxizität führten zu einer Prüfung durch die Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES) (90). Auch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) stimmt in der Schlussfolgerung überein, dass eine lebertoxische Wirkung nicht nachvollziehbar ist (91).

Bisherige Untersuchungen auf akute, chronische und subchronische Toxizität, Reproduktionstoxizität und Genotoxizität waren unauffällig. Dementsprechend wurden in den Prüfungen durch die EFSA der Fruchtsaft, das Fruchtpüree und auch der Tee von *Morinda citrifolia* als unbedenklich eingestuft.

### **2.6.2 *Cimicifuga racemosa***

Die Traubensilberkerze, *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. bzw. neuerdings *Actaea racemosa* (L.) genannt, gehört zu der Familie der Ranunculaceae (Hahnenfußgewächse).

Der Ursprung der Pflanze liegt in Kanada und den östlichen USA, mittlerweile wird sie auch in Europa kultiviert. Sie ist eine bis zu 2 m hoch wachsende Staude. Von Juni bis September trägt sie kleine weiße Blüten an langen Trauben. Medizinisch verwendet wird das nach der Fruchtreife gesammelte Rhizom mit den Wurzeln.

Der Wurzelstock enthält das harzartige Cimicifugin, die Bitterstofffraktion Racemosin, Triterpenglykoside (Actein und Cimifugosid) und phenolartige Substanzen (Zimtsäure-Ester). Weitere Bestandteile sind Stärke, Fettsäuren und Salizylsäure. Die klassischen Phytoestrogene sind nicht enthalten. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass das Isoflavonoid Formononetin ein Inhaltsstoff sei. Allerdings konnte es bei keinem Extrakt aus 13 verschiedenen Standorten der USA nachgewiesen werden (92).

Historisch wurde die Traubensilberkerze bereits von den Indianern Nordamerikas eingesetzt bei rheumatischen Gelenk- und Muskelschmerzen sowie einer Vielfalt von gynäkologischen Beschwerden. In Europa ist die Traubensilberkerze seit dem 17. Jahrhundert als Heilmittel bekannt.

Heutzutage werden Extrakte aus der Traubensilberkerze therapeutisch angewandt bei Wechseljahresbeschwerden, dem prämenstruellen Syndrom und bei schmerzhaften Menstruationsbeschwerden. Seit vielen Jahren ist in Deutschland der Extrakt aus dem Traubensilberkerze-Wurzelstock zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden zugelassen. Der genaue Wirkungsmechanismus der Traubensilberkerze ist noch nicht geklärt. Es liegen gewebespezifisch estrogen-agonistische und -antagonistische Effekte vor. Im Weiteren wird der Traubensilberkerze eine Funktion als SERM zugeschrieben (93 - 95).

Experimentell kam es zu keiner Bindung an rekombinante ER- $\alpha$ - und ER- $\beta$ -Proteine, allerdings zu einer kompetitiven Bindung an ein noch nicht identifiziertes estrogenbindendes Protein gegenüber radioaktiv markiertem Estradiol.

Die vasomotorischen Symptome werden auf zentraler Ebene durch eine Wirkung als Serotonin- und Dopaminagonist beeinflusst.

In vitro wurde eine Stimulierung von Osteoprotegerin nachgewiesen, was auf einen knochenprotektiven Effekt hinweist. Traubensilberkerze stimuliert ER-vermittelt Osteoblasten und hemmt Osteoklasten (96).

Zierau et al. (97) zeigten experimentell, dass Traubensilberkerze-Extrakte keine estrogenen, sondern sogar estrogen-antagonisierende Effekte haben. Dabei untersuchten sie die Proliferation von MCF-7-Zellen, die Genexpression in einem Hefe-Zellversuch und estrogen-induzierbare MVLN-Zellen.

Auch Lupu et al. (98) konnten in verschiedenen Versuchen keine estrogenen Wirkungen und somit keinen Hinweis auf ein erhöhtes Brustkrebsrisiko nachweisen.

Einbond et al. (99 - 101) untersuchten in einer Zellzyklusanalyse an ER-positiven MCF-7 und ER-negativen MDA-MB-453 Brustkrebszellen die Wachstumshemmung verschiedener Fraktionen eines Traubensilberkerze-Extraktes. Dabei war die Ethyl-Acetat-Fraktion potenter als die Hexan- oder Wasser-Fraktion. Diese Ethylacetat-Fraktion oder das Triterpen-Glykosid Actein zeigten einen synergistischen Effekt mit Chemotherapeutika bei der Proliferationshemmung humaner Brustkrebszelllinien. Später wiesen sie die Expression von Genen, die die Apoptose aktivieren und den Zellzyklus unterdrücken, anhand von real-time RT-PCR nach.

Hostanska et al. (102, 103) zeigten, dass der Traubensilberkerzen-Extrakt keine Proliferation, sondern ein Zellsterben in ER-positiven und ER-negativen Brustkrebszellen hervorruft. Dieser Vorgang erfolgt über eine Aktivierung von Caspasen und eine Induktion der Apoptose.

Außerdem untersuchten sie zwei Hauptbestandteile eines Traubensilberkerzen-Extraktes: Zimtsäure-Ester und Triterpen-Glykoside. Beide Bestandteile zeigten einen signifikanten Effekt auf die Apoptose-Induktion, stärker wirkte jedoch die Zimtsäure-Ester-Fraktion.

Unerwünschte Nebenwirkungen bei der Einnahme von Traubensilberkerze-Präparaten sind im Allgemeinen sehr selten, schwach und reversibel. Es traten z.B. Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Schwindel, Mastalgie, Gewichtszunahme und Hautausschläge auf. Allerdings gibt es einige Fallberichte von schwerwiegenden Nebenwirkungen.

Fünf Fälle von Hepatotoxizität wurden in der Literatur beschrieben. Dabei kam es in vier Fällen zu einem akuten Leberversagen mit notwendiger Lebertransplantation (104 - 107). In einem Fall trat eine Autoimmunhepatitis auf, die mit immunsuppressiver Therapie behandelt werden konnte (108).

Ein weiterer Fallbericht beschreibt das Auftreten einer Rhabdomyolyse im Zusammenhang mit der Einnahme von Traubensilberkerze Präparaten (109).

Außerdem wurde ein Fall beschrieben, in dem eine Patientin unter Hautveränderungen litt. Die Hautinduration stellte sich als ein Pseudolymphom heraus, das bei Nichtbehandlung chronifizieren würde (110).

Bei diesen Fallberichten gab es zeitliche Zusammenhänge mit einer Einnahme von Traubensilberkerze-Extrakten und dem Auftreten der Beschwerden. Andere mögliche Ursachen konnten ausgeschlossen werden. Allerdings konnten weder hepatotoxische noch myopathische Inhaltsstoffe in den Extrakten nachgewiesen werden.

Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte hat nach einer Untersuchung bzgl. möglicher Lebertoxizität gefolgert, dass es einen potentiellen Zusammenhang zwischen der Anwendung von *Cimicifuga*-haltigen Arzneimitteln und dem Auftreten von Leberschädigungen gibt. Daher müssen nun in die Fach- und Gebrauchsinformationen der Produkte Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen bei der Anwendung, sowie Leberschäden als mögliche Nebenwirkungen, aufgenommen werden (111, 112).

Es gibt mehrere Studien bzgl. der Linderung von klimakterischen Beschwerden durch Traubensilberkerzen-Extrakte, die meisten verliefen allerdings über einen kurzen Zeitraum und beinhalteten nur ein kleines Patientenkollektiv. Eine Reihe von Berichten belegt eine positive Wirkung insbesondere auf Hitzewallungen (113 - 117), wogegen andere diese These zu widerlegen scheinen (118 - 120).

In retrospektiven Studien wurde keine Häufung von Rezidiven bei Brustkrebspatienten festgestellt. Es kam sogar zu einem verlängerten krankheitsfreien Überleben (121). Auch wurde ein protektiver Effekt gegenüber Brustkrebs beobachtet (122).

Weitere Studien untersuchten den Einfluss von Traubensilberkerze-Extrakten auf das Endometrium und das vaginale Gewebe (117, 123). Dabei wurden keine proliferativen Effekte gefunden, was auf einen SERM-Mechanismus des Extraktes hinweist. Des Weiteren wurden positive Auswirkungen auf den Knochenstoffwechsel beobachtet (123). In Bezug auf Parameter, die im Zusammenhang mit koronarer Herzkrankheit stehen, konnte keine Wirkung beobachtet werden (124).

Da durch die bisherigen, unzureichenden Studien noch kein überzeugender Beweis für die Wirksamkeit von Traubensilberkerzen-Extrakten vorliegt, sieht die Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft von einer Therapieempfehlung ab (10).

### **2.6.3 *Glycine max***

Die Sojabohne, *Glycine max* (L.) Merr, gehört zur Familie der Hülsenfrüchtler (Fabaceae) und zur Unterfamilie der Schmetterlingsblütler (Faboideae).

Die einjährige Pflanze wächst buschig bis zu einer Höhe von einem Meter, die Blätter sowie der Stängel sind dicht behaart und ihre Schmetterlingsblüten sind unauffällig weiß bis violett. Die kleinen Hülsenfrüchte beinhalten 1 bis 4 gelbe, weiße oder schwarzbraune Samen (125).

Die Pflanze ist in Ostasien heimisch. Mittlerweile wird sie weltweit kultiviert, die Hauptanbauggebiete liegen in den USA, Brasilien, Argentinien, China und Indien (126). Verwendet wird sie als Nahrungsmittel für Mensch und Tier. Man nutzt die Bohnen, die daraus gewonnene Sojamilch, Sojaquark (Tofu), Sojaöl und Sojalecithin. Letzteres wird sehr häufig als Emulgator verwendet.

Der Proteingehalt von Sojabohnen reicht von 36 bis zu 56 %. Dabei handelt es sich v.a. um Speicherproteine. Das Sojaprotein enthält alle essentiellen Aminosäuren und ist daher als ein sehr hochwertiges Proteinäquivalent zu Ei-, Casein- oder anderen tierischen Proteinen, einzuschätzen. Des Weiteren sind in Soja Fettsäuren, Saponine, Isoflavone und Phospholipide enthalten. Die Hauptvertreter der Isoflavone in der Sojabohne sind Genistein und Daidzein.

Soja ist ein Hauptverursacher von Nahrungsmittelallergien. So ist es unter der Gruppe der acht häufigsten Nahrungsmittelallergene zu finden, die zusammen bis zu 90 % aller Nahrungsmittelallergien ausmachen, auch wenn das Sojaprotein im Vergleich zu anderen allergenen Proteinen ein geringeres allergenes Potential hat und die Konzentrationsschwelle niedriger liegt. Im Sojaprotein wurden mittlerweile mindestens 16 verschiedene Allergene identifiziert. Betroffene müssen sojahaltige Lebensmittel meiden, was dadurch

erschwert wird, dass Sojabestandteile in zahlreichen weiterverarbeiteten Nahrungsmitteln enthalten sind. Des Weiteren sind Kreuzallergien zu Kuhmilcheiweiß und anderen Hülsenfrüchten, z.B. Erdnüssen, zu beachten (127).

Der Verdacht, dass sich Soja negativ auf die Schilddrüsenfunktion auswirken könnte, da es bei in vitro- und Tierversuchen die Schilddrüsen-Peroxidase inhibierte und struma-induzierend wirkte, hat sich bisher beim Menschen nicht bestätigt. Allerdings wurden in den Studien nur gesunde Probanden untersucht, was nicht ausschließt, dass bei vorbelasteten Patienten dennoch ein Hypothyroidismus auftreten kann. Diesbezüglich ist bei der Einnahme von Sojaprodukten auf eine ausreichende Jodzufuhr zu achten (128, 129).

Kürzlich veröffentlichten Velasques und Bhatena einen Review Artikel über die Auswirkungen einer sojareichen Diät auf die Obesitas. Dabei wurde in Studien an Tieren und Menschen ein positiver Effekt festgestellt. Die Einnahme von Sojaprotein wirkt sich auf das Sättigungsgefühl, die Reduzierung der Körperfettmasse, die Insulin-Resistenz und die Plasma-Lipide aus. Die in ihrer Vielfalt noch nicht geklärten Wirkungsmechanismen setzen wahrscheinlich auf biochemischer und molekularer Ebene an der Energiebilanz und dem Fettstoffwechsel an (127).

Soja besitzt einen cholesterinsenkenden Effekt, dies belegt eine Metaanalyse von Taku et al. Es werden das Gesamt-Cholesterin, LDL, Cholesterol, Triglyceride sowie die hepatischen Cholesterole und Triglyceride reduziert. Diese Wirkung erfolgt durch eine verminderte intestinale Lipidabsorption, eine vermehrte Ausscheidung von Gallensäuren sowie durch direkte Einflüsse auf den hepatischen Cholesterol- und Fettsäuremetabolismus und die LDL-Rezeptor-Aktivität. Welche Komponenten des Sojaproteins für diese Wirkungen verantwortlich sind, ist nicht vollständig geklärt (130).

Durch die in Soja enthaltenen Isoflavonoide, soll eine sojareiche Diät bei Beschwerden in den Wechseljahren und bei Brustschmerzen vor Einsetzen der Monatsblutung (Mastodynie) helfen sowie vorbeugend gegen Osteoporose, Brustkrebs und Prostatakrebs wirken.

Zur Wirkung auf klimakterische Beschwerden gibt es eine Vielzahl von Studien. Tempfer et al. zeigten in einer aktuellen Metaanalyse keine Verbesserung der vasomotorischen Symptome durch Soja. Nur vereinzelte Studien ergaben eine minimale Verbesserung, v.a. bei Frauen in der frühen Menopause mit schwachen Symptomen. Des Weiteren konnten eine verminderte Inzidenz von Brustkrebs sowie positive Einflüsse auf die Knochendichte, die Blutfette und die Insulin-Resistenz beobachtet werden (131).

Experimentell zeigte sich allerdings eine Tumorpromotion bei niedrigen Phytoestrogen-Dosen und es konnte nur bei sehr hohen Konzentrationen eine protektive Wirkung erzielt werden.

Eine solch hohe Konzentration an Phytoestrogenen ist durch Nahrungsaufnahme aber nur schwierig zu erzielen. Bei bestehender Brustkrankung besteht die Gefahr, dass das Wachstum des Tumors durch die Hormonwirkung isoflavonoidreicher Nahrungsergänzungsmittel angeregt werden könnte (49). Des Weiteren, so stellten Unfer et al. in einer über fünf Jahre dauernden Studie fest, entwickelte sich ein gehäuftes Auftreten von endometrialer Hyperplasie unter sojareicher Diät (132).

Es wurde ein epidemiologischer Unterschied bzgl. klimakterischer Beschwerden und Brustkrebshäufung zwischen Asiatinnen und Frauen der westlichen Bevölkerung beobachtet. Eine Erklärung dafür ist, dass nur eine von Kindheit an isoflavonreiche Ernährung eine Krebsprävention bewirkt. Unterstützt wird diese Hypothese durch einen Tierversuch, in dem Ratten präpubertär mit Genistein behandelt wurden und einem daraus folgendem protektiven Effekt auf die Entwicklung induzierter Mammakarzinome (133).

#### **2.6.4 *Phaseolus vulgaris***

*Phaseolus vulgaris* L., die Gartenbohne oder Grünebohne, gehört zur Familie der Hülsenfrüchtler (Fabaceae) und zur Unterfamilie der Schmetterlingsblütengewächse (Faboideae).

Bereits um 800 v.Chr. war die Gartenbohne Kulturpflanze vom westlichen Südamerika bis Mexiko. Heutzutage ist sie eine vielerorts kultivierte einjährige Gemüsepflanze. Sie wird als Stangenbohne, die rankend bis zu einer Höhe von 4 m wächst, und als Buschbohne, die etwa 20 - 60 cm hoch ist, kultiviert. Die kleinen Blüten im Juni bis September können weiß, gelblich oder violett gefärbt sein und wachsen aus achselständigen, langgestielten Blütenständen. Die dreizähligen Blätter sind gestielt. Die langen hängenden Hülsenfrüchte reifen im September bis Oktober und beinhalten 4 bis 6 Samen (134).

In der Volksmedizin werden die von den Samen befreiten Hülsen verwendet, die als Tee einen harntreibenden und blutzuckersenkenden Effekt haben sollen.

Die Bohnensamen sowie die Hülsen enthalten das giftige Phasin, ein Lektin, welches die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes schädigt. Dieses Protein wird durch Kochen zerstört. Daher sollten Bohnen niemals roh gegessen werden (135, 136).

Boue et al. untersuchten anhand von Zellkultur-Assays an MCF-7-Zellen die estrogenen Effekte eines methanolischen Extraktes. Dabei stimulierte der Extrakt, im Gegensatz zu Estradiol, nicht die Proliferation der Brustkrebszellen.

Sie beobachteten außerdem an HEK-293-Zellen eine erhöhte Präferenz des Extraktes zu ER- $\beta$  gegenüber ER- $\alpha$  (137). Des Weiteren konnten experimentell phytoestrogene Eigenschaften nachgewiesen werden (138).

Die Inhaltsstoffe von rohen, gekochten oder keimenden Bohnen wurden von Diaz-Batalla et al. untersucht. Dabei konnten in rohen Bohnen keine Isoflavone nachgewiesen werden. Die Keimlinge können allerdings Phytoestrogene und Antioxidantien enthalten (139).

### **2.6.5 *Sarothamnus scoparius***

Der Besenginster (*Sarothamnus scoparius* (L.) W.D.J. Koch oder *Cytisus scoparius*) gehört zur Familie der Hülsenfrüchtler (Fabaceae) und zur Unterfamilie der Schmetterlingsblütler (Faboideae). Obwohl er den Wortbestandteil „Ginster“ im Namen trägt, gehört er nicht zur Gattung der Ginster, sondern zu *Cytisus* (Geißklee). Die Pflanze ist in Europa, Vorderindien und Japan beheimatet. Der in verschiedenen Unterarten vorkommende Besenginster wird meist bis zu 2 m hoch. Typisch sind die rutenförmigen, kantigen Zweige, die früher auch als Besen verwendet wurden und der Pflanze ihren Namen gaben. Die Blätter sind meist klein, während die leuchtend gelben Schmetterlingsblüten in der Blütezeit von Mai bis Juni lange Trauben bilden. Die Pflanze trägt flache, zusammengedrückte Hülsenfrüchte mit schwarzen Samen (140).

Alle Teile des Besenginsters sind giftig wegen des Gehaltes an Chinolizidin-Alkaloiden, v.a. Spartein und Lupanin. Weitere medizinisch relevante Inhaltsstoffe sind Tyramin und Flavonoide, insbesondere Isoflavon-Glykoside (141). Vergiftungserscheinungen ähneln denen durch Nicotin. Beobachtet wurden Übelkeit, Erbrechen, Diarrhoe, Salivation, neurologische Symptome, Kreislaufkollaps und Herz-Rhythmusstörungen (142).

Therapeutisch wird *Sarothamnus scoparius* angewandt zur Unterstützung des Kreislaufsystems durch eine Hemmung der Reizbildung und -weiterleitung sowie durch eine blutdrucksenkende Wirkung. Er fördert die Wehentätigkeit und die Diurese.

Sundararajan et al. sowie Raja et al. untersuchten antioxidative Eigenschaften in Bezug auf die traditionelle Anwendung in Indien zum Schutz für die Leber (143, 144).

Im Experiment konnten phytoestrogene Eigenschaften nachgewiesen werden (138).

## 2.7 Prüfung pflanzlicher Drogen auf Toxizität

Im Rahmen der Prüfung eines Arzneimittels kommt eine Reihe von Toxizitätstests zum Einsatz. Man prüft dabei auf akute, subchronische, chronische Toxizität, sowie auf Reproduktions- und Genotoxizität. Das gilt auch für pflanzliche Arzneimittel.

Die akute-, subchronische-, chronische- und Reproduktionstoxizität wird in Tierversuchen an Mäusen und Ratten durchgeführt. Die Genotoxizität kann in Zellkulturversuchen geprüft werden. Hierbei kommen z.B. ein bakterieller Mutagenesetest (Ames Test), ein Mutagenesetest an Säugetieren (V79-Zellen) oder eine DNA-Reparaturinduktion an primären Ratten-Hepatozyten zum Einsatz.

Bei der genotoxikologischen Prüfung pflanzlicher Drogen stellen die enthaltenen Flavonoide, die z.B. auch in Noni enthalten sind, ein Problem dar, da diese den Ames Test in falsch positiver Weise beeinflussen. In Testmethoden unter Verwendung von Säugetierzellen zeigen Flavonoide hingegen keine genotoxischen Effekte.

Pflanzliche Nahrungsergänzungsmittel sind weit verbreitet. Dementsprechend stellen sie einen großen Markt dar. Viele Menschen gehen davon aus, dass diese Produkte sicher seien, weil sie natürlichen Ursprungs sind. Hinzu kommt, dass die Produkte oft ohne medizinische Beratung, in hohen Dosen und über einen langen Zeitraum hinweg eingenommen werden.

Es gibt einige Berichte über schwerwiegende Nebenwirkungen, allerdings treten diese selten auf. Dazu gehören Fälle, bei welchen eine Hepatotoxizität aufgetreten ist.

### 2.7.1 Hepatotoxizität durch pflanzliche Produkte

Bei der Hepatotoxizität unterscheidet man hepatozelluläre von cholestatischen oder gemischten Leberschäden durch den Wirkstoff.

Manchmal ist im pflanzlichen Produkt ein bekannt hepatotoxischer Stoff enthalten. So sind seit langem Pflanzen aus der Gruppe *Heliotropium*, *Senecio*, *Symphytum* oder *Crotalaria* für Hepatotoxizität bekannt, da sie Pyrrolizidin-Alkaloide enthalten. In anderen Fällen ist die Ursache für die Leberschädigung nicht eindeutig zu klären.

Eine Leberschädigung kann durch einen hepatotoxischen Stoff obligat auftreten, d.h. häufig in einer Dosis-Wirkungs-Relation beim Überschreiten einer Grenzdosis. Dies kann durch direkte physikalisch-chemische Leberzellschädigung geschehen oder auf indirektem Wege. Dagegen rufen fakultative Hepatotoxine dosisunabhängig, nur bei einer kleinen Patientengruppe



Leberschäden hervor, entweder durch immunvermittelte Überempfindlichkeitsreaktionen und/oder durch eine vorbestehende Stoffwechselabnormalität des Patienten.

Ein Unterschied pflanzlicher Heilmittel zu pharmazeutischen Medikamenten liegt in der chemischen Komplexität. Des Weiteren besteht immer eine Unsicherheit, ob die verwendeten Pflanzen richtig identifiziert wurden oder eine Kontamination mit anderen Pflanzen vorliegt. Außerdem treten Unterschiede der Zusammensetzung innerhalb einer Pflanzenart auf, im verwendeten Teil der Pflanze, bei unterschiedlichen Entwicklungsstadien und bei unterschiedlichen Wachstumsbedingungen. Auch kommt es zu Unterschieden bei der Ernte, der Weiterverarbeitung und in der endgültigen Produktzusammensetzung. Darüber hinaus enthalten viele Produkte nicht nur eine Pflanzenart sondern eine Mischung, wie es oft in der traditionellen chinesischen Medizin üblich ist (145).

Um einen Verdacht auf einen Leberschaden, ausgelöst durch einen eingenommenen Wirkstoff, zu erhärten, müssen folgende Punkte geprüft werden: Der zeitliche Rahmen muss übereinstimmen. Bestehende Risikofaktoren müssen ausgeschlossen werden: Alter über 55 Jahren, Alkoholkonsum bei hepatozellulärem Schaden, Alkoholkonsum und Schwangerschaft bei cholestatischem oder gemischtem Leberschaden. Die Einnahme anderer Medikamente, auch pflanzlichen Ursprungs, schließt eine eindeutige Ursachenfindung aus. Auch nicht-medikamentöse Ursachen für einen Leberschaden müssen ausgeschlossen werden, wie z.B. die Viruserkrankungen Hepatitis-A, -B, -C, Cytomegalie, Eppstein-Barr oder Herpes, eine Bluttransfusion in den zuvor liegenden Monaten, Reisen in Hepatitis-Endemiegebiete, Cholelithiasis und abnorme Gallengangswege. Des Weiteren muss die hepatotoxische Wirkung in in vivo oder in vitro Untersuchungen bestätigt werden.

Über zwei der in dieser Arbeit getesteten pflanzlichen Substanzen gibt es Berichte über Hepatotoxizität: *Cimicifuga racemosa* und *Morinda citrifolia*.

### **2.7.2 Hepatotoxizität und Genotoxizität durch *Morinda citrifolia*?**

Es gibt vier Fallbeschreibungen über Hepatotoxizität, die in Zusammenhang mit der Einnahme von Saft aus *Morinda citrifolia* gebracht werden (80 - 82). Nach Bekanntwerden der Berichte wurde im Auftrag der österreichischen Behörden dieser Verdacht von der österreichischen Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH (AGES) näher untersucht, mit dem Ergebnis, dass eine lebertoxische Wirkung von Noni-Saft nicht nachvollziehbar ist (146).

Auch die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) sowie deren wissenschaftliches Komitee stimmen in dieser Schlussfolgerung überein (91).

Der erste Fall berichtet über einen 45 Jahre alten Mann. In Laboruntersuchungen hatte er stark erhöhte Transaminasen, eine Leberbiopsie zeigte das Bild einer akuten Hepatitis. Die Vorgeschichte sowie weitergehende Untersuchungen waren unauffällig. In den letzten drei Wochen hatte er täglich ein Glas Noni-Saft eingenommen. Zwei Tage nach Beenden der Noni-Saft-Einnahme besserten sich die Laborbefunde und lagen nach einem Monat im Normbereich. Für den Verdacht auf hepatotoxische Wirkung durch Noni-Saft sprach der zeitliche Zusammenhang. Es kam zu keinerlei Probesicherung und Untersuchungen des eingenommenen Saftes.

Im zweiten Fall handelt es sich um einen 29-jährigen Mann, der im Jahr 2003 zum wiederholten Male mit akutem Leberversagen eingeliefert wurde. Bei einer Routineuntersuchung im Alter von 18 Jahren waren erhöhte Bilirubin-Werte auffällig und die Diagnose eines M. Gilbert-Meulengracht, eine Erkrankung bei der die Aktivität der UDP-Glukuronyltransferase in der Leber herabgesetzt ist, wurde gestellt. Im Jahre 2002 trat ein Leberversagen nach Paracetamol-Einnahme auf. 2003 hatte er über drei Wochen insgesamt 1,5 Liter Noni-Saft zu sich genommen und auch über einige Wochen einen Tee chinesischer Heilkräuter getrunken. Der Verlauf war progredient, so dass der Patient eine notfallmäßige Lebertransplantation benötigte. Der chinesische Kräutertee bestand aus einer Mischung sechs verschiedener Kräuter. Unter anderen war auch *Pinellia ternata* enthalten, eine Pflanze, die bekannte hepatotoxische Wirkungen besitzt. Da bei diesem Patienten zudem eine vorbestehende Lebererkrankung bekannt war, ist eine klare Ursache des Leberversagens nicht auszumachen.

Der dritte Fall beschreibt eine 62-jährige Frau. Sie kam wegen Erbrechen und Diarrhöe ins Krankenhaus. Die Symptome bestanden seit einer Woche. In Laboruntersuchungen hatte sie erhöhte Leber-Parameter, eine Leberbiopsie zeigte das Bild einer Hepatitis. In der Vorgeschichte wurde die Patientin wegen eines B-Zell-Lymphoms behandelt. Bis zwei Monate vor der Einweisung hatte sie über einen Zeitraum von 3 Monaten insgesamt zwei Liter Noni-Saft getrunken. Die Laborparameter besserten sich in den folgenden 30 Tagen und nach neun Monaten lag eine Normalisierung vor. In dieser Fallbeschreibung wurde nicht Bezug auf einen Alkoholkonsum oder eine Autoimmunhepatitis genommen. Außerdem lag der zeitliche Rahmen zu weit gefasst, so dass ein hepatotoxischer Zusammenhang mit dem Noni-Saft-Konsum unwahrscheinlicher wird.

Der vierte Fall berichtet über eine 24-jährige Frau, die wegen Ikterus vorstellig wurde. Zu diesem Zeitpunkt wurde sie wegen einer Multiple Sklerose Erkrankung mit IFN-beta-1a behandelt. Auch eine Woche nach dem Absetzen des Interferons stiegen die Leberparameter weiter an. Die Patientin gab an, 1 - 1,5 Liter Noni-Saft in den vorherigen vier Wochen eingenommen zu haben. Nach Beenden dieser Einnahme verbesserten sich die Leberwerte deutlich und erreichten Normniveau innerhalb eines Monats. Es wurde angemerkt, dass eine Lebertoxizität unter der Behandlung mit IFN- $\beta$  vorkommt, meist in den ersten sechs Monaten der Behandlung auftritt und auch bis zu 3 Wochen nach Therapieende auftreten kann.

In den Fallberichten wurde vermutet, dass für die Hepatotoxizität Antrachinone verantwortlich sein könnten. In den Wurzeln von *Morinda citrifolia*, wie auch in anderen Arten der Rubiaceae Familie, sind bekannterweise Anthrachinone (Lucidin, Rubiadin, Purpurin und Xanthopurin) enthalten. Das bedeutendste darunter ist das Lucidin, welches reaktive Zwischenprodukte und dann Addukte bei Kontakt mit DNA bilden kann (147).

In den Wurzeln von *Morinda citrifolia* konnten tatsächlich Lucidin und Rubiadin nachgewiesen werden. Eine HPLC-Analyse erbrachte aber bis zu einer Sensitivität von < 1 ppm keinen Nachweis von Lucidin und Rubiadin im Frucht-Saft. Es erschienen zwei Publikationen, die Antrachinone in sehr kleinen Konzentrationen auch im Frucht-Saft nachwiesen. Im Vergleich zu anderen anthrachinonhaltigen Pflanzen-Präparaten wie *Senna* oder *Cascara sagrada* ist der Gehalt in der Noni-Frucht insignifikant.

In ihren Untersuchungen konnte die AGES weder die toxikologisch relevanten Anthrachinone Rubiadin und Lucidin noch das Schimmelpilzgift Patulin nachweisen. Auch wiesen die Proben keine Verunreinigungen mit den stark leberschädigend wirkenden Pyrrolizidin-Alkaloiden auf.

Hinsichtlich der Noni-Früchte wurden Versuche bezüglich der akuten, subakuten und chronischen Toxizität an Ratten durchgeführt. Die Genotoxizität wurde anhand von Genmutationstests an Säugerzellen (V79-HPRT-Test), an Ratten-Hepatozyten (In-vivo- und In-vitro-UDS-Assay) und an Mäusezellen (Micronucleus-Test) geprüft. Es ergaben sich keine Hinweise auf Hepatotoxizität oder Genotoxizität von Noni-Früchten.

Weitere Versuche zu Genotoxizität, Zytotoxizität, tierexperimentelle Studien und eine Humanstudie gaben keine Hinweise auf unerwünschte Wirkungen (148, 149).

Aufgrund der vorliegenden Datenlage bewertet auch die EFSA eine Leberschädigung hervorgerufen durch Noni-Frucht-Saft als unwahrscheinlich.

Allerdings besteht weiterhin ein Risiko dadurch, dass viele nicht registrierte, illegale Marken auf dem Markt sind. Diese unterliegen nicht den entsprechenden Qualitätskontrollen, werden nicht unter kontrollierten Bedingungen hergestellt und können nicht gelistete Inhaltsstoffe enthalten (85).

Die Noni-Blätter, die z.B. als Tee angewendet werden, waren bisher noch nicht Gegenstand derartiger Untersuchungen und sollten in der vorliegenden Arbeit auf eine mögliche Genotoxizität hin untersucht werden.

### **2.7.3 Hepatotoxizität durch *Cimicifuga racemosa*?**

Der klinische Verdacht auf Hepatotoxizität hat sich hingegen bei *Cimicifuga racemosa* erhärtet.

Fünf Fälle von Hepatotoxizität wurden in der Literatur beschrieben. Dabei kam es in vier Fällen zu einem akutem Leberversagen und notwendiger Lebertransplantation (104 - 107). In einem Fall trat eine Autoimmunhepatitis auf, die mit immunsuppressiver Therapie behandelt werden konnte (108). Hepatotoxische Inhaltsstoffe konnten allerdings nicht in den *Cimicifuga racemosa*-Extrakten nachgewiesen werden.

Weitere 31 Spontanberichte lagen dem Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte vor, und es stellte daraufhin Untersuchungen bzgl. möglicher Lebertoxizität an. Dabei konnte auf einen potentiellen Zusammenhang geschlossen werden und es müssen nun Warnhinweise und Vorsichtsmaßnahmen für die Anwendung und Nebenwirkungen in die Fach- und Gebrauchsinformationen von *Cimicifuga racemosa*-Präparaten aufgenommen werden (150).

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Die vorliegende Arbeit verfolgt das Ziel, eine eventuelle phytoestrogene Wirkung von Noni-Blättern (*Morinda citrifolia* L.) in einer Batterie von in vitro Testsystemen zu untersuchen. Dabei soll geklärt werden, ob von Noni-Blatt-Extrakten möglicherweise eine solche estrogene Wirkung ausgehen kann, die sich physiologisch zur Beeinflussung von menopausalen Beschwerden nutzen lässt. Folgende Testsysteme sollen verwendet werden:

- Die Induktion von alkalischer Phosphatase in Ishikawa Zellen
- Die Induktion von Luciferase in einem MVLN-Zellen Reporter-gen-Assay
- Die mRNA-Expression der Estrogenrezeptoren ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ , des Calcium-Binding-Proteins und des Angiotensinogens in den Leberzellsystemen H4IIE-Zellen, Fe33-Zellen und primären Hepatozyten

Die Wirkung der Noni-Blätter bzw. der aus ihnen gewonnenen Extrakte sollte mit anderen Pflanzen verglichen werden, deren phytoestrogene Wirkung bereits zuvor beschrieben wurde. Hierbei handelt es sich um die Pflanzen:

- Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*)
- Soja (*Glycine max*)
- Gartenbohne (*Phaseolus vulgaris*)
- Besenginster (*Sarothamnus scoparius*)

Da aufgrund der Zugehörigkeit der Noni-Pflanze zur Familie der Rubiaceen das Vorkommen genotoxischer Anthrachinone vermutet werden kann, sollten auch Untersuchungen zur möglichen Genotoxizität von Noni-Blättern durchgeführt werden. Bei positivem Befund würde sich die Anwendung der Blätter beim Menschen verbieten. Als Testsysteme sollten verwendet werden:

- Der Salmonella-Mikrosomen-Test (Ames-Test)
- Der HPRT-Test an V79 Hamster Fibroblasten
- Die Induktion von DNA-Reparatur in primären Rattenhepatozyten (UDS-Test)

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Estrogenitätstests

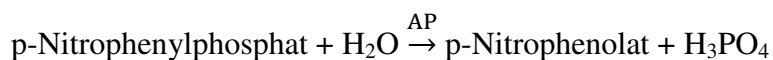
#### 4.1.1 Alkalische Phosphatase Assay mit Ishikawa-Zellen

##### Grundsätzliches:

Bei der Ishikawa-Zelllinie handelt es sich um Zellen eines hochdifferenzierten Adenokarzinoms des Endometriums. Die im Versuch verwendeten Zellen wurden über die American Type Culture Collection bezogen. Die Zellen wurden ursprünglich aus dem Endometrium einer 38-jährigen Frau gewonnen. Die Estrogenrezeptoren- $\alpha$  und - $\beta$  sowie Progesteron-Rezeptoren werden exprimiert (151). In dieser Zelllinie ist die Induktion der alkalischen Phosphatase (AP) durch Estrogene spezifisch (152, 153). Diese Antwort kann durch Anti-Estrogene inhibiert werden. Diese Eigenschaften führen dazu, dass dieses Material als Modell zur Überprüfung von estrogenen Wirkungen auf das Endometrium etabliert wurde. Das Modell eignet sich auch dazu, eine estrogenen Potenz von Phytoestrogenen über die zelluläre Antwort zu überprüfen (154, 155).

Die AP ist ein Enzym, das in den meisten Organismen vorkommt. Sie katalysiert die Hydrolyse von Phosphomonoestern unter Freisetzung von anorganischem Phosphat. Beim Menschen existieren vier Isoenzyme der AP. Eine nicht-gewebe-spezifische Form kommt in allen Geweben und in allen Entwicklungsstadien vor. Die drei gewebe-spezifischen Formen sind die intestinale, die keimzelltypische und die plazentare AP. Die Isoenzyme unterscheiden sich in ihren Eigenschaften u.a. bezüglich der unkompetitiven Hemmung, Hitzestabilität und in allosterischen Eigenschaften (156). Ishikawa-Zellen exprimieren, im Gegensatz zu normalen Endometrium-Zellen, das plazentare Isoenzym (152).

Das Testprinzip des alkalischen Phosphatase Assays liegt in der Bestimmung der Enzymaktivität, die anhand des Umsatzes von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol gemessen wird. Der hierbei im alkalischen Milieu stattfindende gelbe Farbumschlag wird durch die Absorption bei der Wellenlänge 405 nm gemessen und steht proportional zur Aktivität der AP. Eine Verdünnungsreihe von p-Nitrophenol dient als Standard, mit dessen Hilfe die entsprechende AP-Aktivität in U/ml ermittelt werden kann (153).



### Testsubstanzen:

Als Positiv-Proben dienen EE und E<sub>2</sub> in einer Konzentration von 10<sup>-8</sup>M. Als Negativ-Kontrolle wurde reines Medium bzw. Medium mit EtOH angewendet.

Bei den Testsubstanzen handelt es sich um verschiedene Extrakte aus Noni in den folgenden Konzentrationen: Beginnend mit 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml bis 100 µg/ml bei ethanolischem Tee, sowie beginnend bei 10 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml, 300 µg/ml bis 500 µg/ml bei den übrigen ethanolisch-gelösten Substanzen. Die Testung der wässrig-gelösten Substanzen reicht von 0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml bis 10 mg/ml. Eine detaillierte Übersicht der verwendeten Proben ist in Tab. 7 und Tab. 19 dargestellt.

### Versuchsablauf des alkalische Phosphatase Assays:

Am ersten Tag werden die Ishikawa-Zellen in 96-well Mikrotiterplatten ausplattiert. Dabei wird jedes einzelne well mit 10.000 Zellen belegt. Als Medium wird DMEM/F12 mit 10% FBS verwendet. Nach 24 Stunden wird ein Mediumwechsel mit DMEM/F12 + 10 % FBS-cs durchgeführt. Am dritten Tag werden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen in serumfreiem Medium behandelt. Am vierten Tag wird die AP-Aktivität entsprechend dem Protokoll von Sigma und der Beschreibung nach Robinson et al. gemessen (158).

Das Medium wird vorsichtig abgesaugt und die Zellen werden zweimal mit 100 µl PBS gewaschen und dann im 1:1 Verhältnis mit 25 µl der p-Nitrophenylphosphat-Stammlösung und 25 µl alkalischem Puffer (1,5 M 2-Amino-2-methyl-1-propanol, pH 10,3) versehen. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37 °C wird die Reaktion mit 100 µl NaOH 0,05 N gestoppt. Die Absorptionsmessung erfolgt im Hewlett Packard Spectracount® bei 405 nm. Anschließend werden die Zellen eingefroren und später wird der DNA-Gehalt bestimmt.

### DNA-Bestimmung:

Die DNA-Bestimmung erfolgt nach dem Protokoll von Molecular Probes mit einem Pico Green® ds DNA Quantitation Kit (P-7589).

Zuerst wird eine Standard-Verdünnungsreihe angefertigt, aus den für den Versuch verwendeten Zellen und einer DNA-Stammlösung, die im Kit enthalten ist. Die absolute Anzahl der Zellen beträgt 50.000, 40.000, 30.000, 25.000, 20.000, 15.000, 10.000, 5000, 1000. Die DNA-Konzentrationen liegen bei 10 µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml, 0,313 µg/ml, 0,156 µg/ml, 0,078 µg/ml. Die Zellen werden dafür mit Trypsin behandelt, zentrifugiert, gewaschen, erneut zentrifugiert und dann mit 150 µl TE-Pufferkonzentrat, das zuvor auf 1:20 verdünnt wird, für mindestens 24 Stunden eingefroren.

In schwarze 96-well Platten wird je well 50 µl DNA- oder Zell-Standard mit 50 µl Pico Green Lösung, 1:200 in TE-Puffer verdünnt, gegeben. Beim Umgang mit der Pico Green Lösung ist auf Lichtabschluss zu achten. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wird die Lichtemission im Fluorocount® bei 485 / 520 nm (Exzitation / Emission) gemessen.

Für die DNA-Bestimmung der Zellen im Versuch werden die Platten nach der AP-Messung eingefroren. Nach einem Tag können sie wieder aufgetaut werden und es werden je well 50 µl auf eine schwarze 96-well Platte übertragen. Wie zuvor wird nun in jedes well 50 µl Pico Green Lösung, die 1:200 in TE-Puffer verdünnt wird, hinzugefügt, inkubiert und im Fluorocount® gemessen.

Die Ergebnisse der AP-Messung werden auf den DNA-Gehalt normalisiert, d.h. die Absorptionswerte werden durch die DNA-Werte dividiert, der Mittelwert der Quotienten wird gebildet und in Relation zur Negativ-Kontrolle (= 1) graphisch dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Software Programm Statistica®.

#### **4.1.2 Luciferase Assay mit MVLN-Zellen**

##### Grundsätzliches:

Der Luciferase Assay ist ein Reporter-Gen-Assay, bei welchem die Lichtemission gemessen wird, die von Zellen freigesetzt wird, die mit einer Luciferase-DNA transfiziert wurden. Die Luciferase, ursprünglich ein Enzym des nordamerikanischen Glühwürmchens (*Photinus pyralis*), dient hierbei als Indikator für die Transkription anderer Gene.

Im Versuch kommen MVLN-Zellen zum Einsatz. Sie leiten sich von MCF-7-Mammakarzinomzellen ab. Die MCF-7-Zellen werden hierzu mit einem estrogen-regulierten Luciferase-Gen transfiziert. Die Regulation erfolgt über das Estrogen-Response-Element (ERE) des Vitellogenin-A2 Gens (159). In MCF-7-Zellen wurden per Westernblot und Immunfluoreszenz sowohl ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  nachgewiesen (160). Mit Hilfe von klassischer und RT-PCR wurde allerdings festgestellt, dass der ER- $\alpha$ -Anteil stark überwiegt und der ER- $\beta$ -Anteil vernachlässigbar gering ist (138).

Der Luciferase Assay ist ein bewährtes System zur Messung estrogener Wirkungen verschiedener Stoffe in vitro. So wurde er auch zuvor in der Untersuchung der Auswirkung von Isoflavonoiden angewendet (161). Im Vergleich zu anderen Untersuchungsmethoden im Bezug auf Estrogenität ist der Luciferase Assay außerordentlich sensitiv (162).



Die Messung erfolgt mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Kits (LucLite®) in einem Luminometer. Der Vorteil des verwendeten Assay-Systems liegt in einer verlängerten Halbwertszeit auf mehrere Stunden. Ein traditionelles Assay-System zeigt nur eine Halbwertszeit von einigen Minuten. Der Nachteil dieser klassischen Methode ist, dass nur stets eine Platte vorbereitet werden kann und diese ohne Verzögerung gemessen werden muss.

Das Prinzip dieses Assays beruht auf einer durch die Luciferase vermittelten Reaktion einer aktiven Carboxyl-Gruppe des Luciferins mit ATP zu Adenyl-Luciferin und Pyrophosphat. Das enzymgebundene Adenyl-Luciferin reagiert im zweiten Reaktionsschritt mit molekularem Sauerstoff zu Adenyl-Oxyluciferin und führt zur Produktion von CO<sub>2</sub> und AMP, wobei eine Lichtemission auftritt. Die Reaktion, vermittelt durch die *P. pyralis* - Luciferase, emittiert gelb-grünes Licht, das bei der Wellenlänge 560 nm messbar ist (163).

Im angewandten Versuchsansatz wird ein Assay-kit verwendet, der durch verschiedene Substanzen das Adenyl-Oxyluciferin vor einer CoA-Enzym-Oberflächen-Reaktion mit der Luciferase bewahrt. Somit entsteht ein länger anhaltendes „glow-type“ Lichtsignal, im Gegensatz zu einem „flash-type“ Signal bei einem traditionellen System.

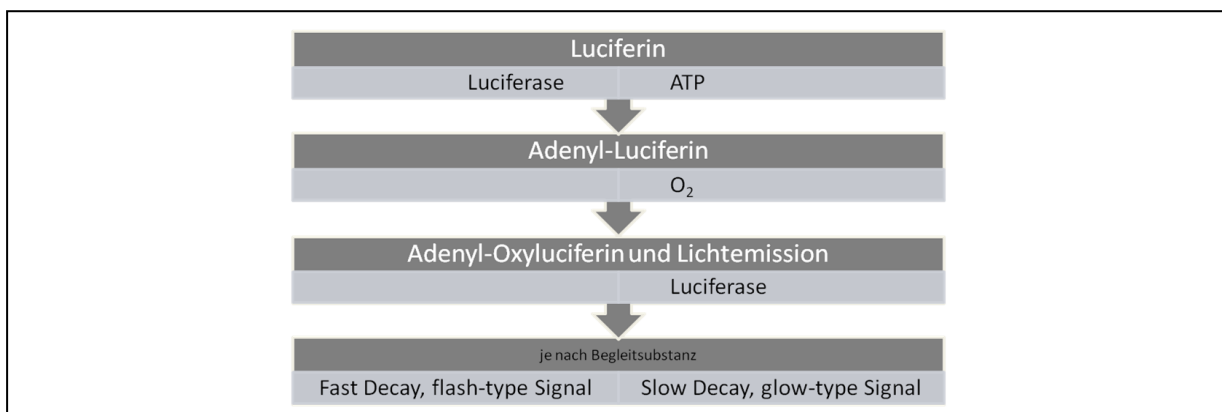


Abb. 4: Prinzip der Lichtemission durch die Luciferase-Reaktion

#### Versuchsablauf des Luciferase Assays:

Die MVLN-Zellen werden in DMEM/Ham's F12 Medium mit 10 % FBS kultiviert. Das Medium enthält außerdem 1 % Penicillin-Streptomycin-Lösung, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat und 1 µg/ml Rinder-Insulin. Die Inkubationsbedingungen sind 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchte.

In 96-well plates werden 3 x 10<sup>4</sup> Zellen pro well pipettiert. Dabei werden weiße Mikrotiterplatten mit durchsichtigem Boden verwendet, die weniger well-zu-well Störeffekte und gute Lichtbedingungen erzielen. Nach 24 Stunden Inkubation in Medium mit 10 % FBS erfolgt ein Mediumwechsel auf 10 % DCC-FBS, hormonreduziert.

Nach erneuten 24 Stunden werden die Zellen mit den zu testenden Substanzen in FBS-freiem Medium über 72 Stunden behandelt.

Die Messung der Luciferase erfolgt mit einem kommerziell erhältlichen Luciferase-kit (LucLite®). Zunächst wird das Medium abgesaugt, dann werden die Zellen mit PBS gewaschen. Es werden 100 µl PBS mit CaCl<sub>2</sub> / MgSO<sub>4</sub> Lösung in jedes well gegeben und 50 ml Assay-Reagenz, die zuvor mit dem Puffer angemischt werden. Prinzipiell sollte im Versuchsablauf möglichst lichtgeschützt gearbeitet werden. Es folgt eine Inkubation über 10 Minuten bei 30°C, bereits im Luminometer. Anschließend wird die Lumineszenz gemessen. Im Anschluss erfolgt eine DNA-Bestimmung nach dem Protokoll von Molecular Probes mit einem Pico Green® ds DNA Quantitation Kit, die im Kapitel des alkalische Phosphatase Assays näher beschrieben wurde. Dazu wird aus jedem well 25 µl entnommen und auf eine schwarze 96-well Platte überführt. Das Volumen je well wird mit dem Pico Green® Reagenz auf 50 µl aufgefüllt und die Probe wird anschließend im Flourocount gemessen.

Die Luciferase-Aktivität wird in relativen Licht-Einheiten (RLU) per DNA-Gehalt berechnet. Als Probesubstanzen kommen verschiedene Noni-Blatt-Extrakte zum Einsatz, die in Tab. 8 im Ergebnisteil sowie in Tab. 19 im Anhang näher beschrieben werden.

Die Proben werden in Konzentrationen von 0,003 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml und 1 mg/ml, bzw. 0,6 µg/ml, 2 µg/ml, 6 µg/ml, 20 µg/ml, 60 µg/ml bis 200 µg/ml eingesetzt. Je Probe erfolgt eine Dreifachbestimmung.

Als Positiv-Kontrolle wird eine E<sub>2</sub>-Standardreihe in den Konzentrationen 100 nM, 30 nM, 10 nM, 3 nM, 1 nM, 0,3 nM mitgeführt. Als Negativ-Kontrolle dient Medium und Medium mit Zusatz des Lösungsmittels EtOH.

### **4.1.3 Real-time RT-PCR - Versuch**

#### Grundsätzliches:

Im Versuch werden Zellkulturen mit der zu untersuchenden estrogenen Substanz inkubiert. Anschließend wird das Maß der Genexpression durch die gebildete Menge an mRNA bestimmt. Zunächst muss dafür die entstandene RNA aus den Zellen isoliert werden. Diese RNA wird im Anschluss in cDNA umgeschrieben. Mit dieser cDNA kann dann die real-time RT-PCR durchgeführt werden.

Wesentliche Unterschiede zwischen der real-time und der klassischen RT-PCR bestehen darin, dass im Verlauf der real-time PCR nach jedem Zyklus das Produkt quantifiziert wird.

Die real-time PCR bedeutet eine Zeitersparnis. So benötigt sie im Vergleich zur klassischen PCR nur in etwa die halbe Laufzeit. Die Phasen der real-time PCR entsprechen denen der klassischen PCR und bestehen aus Denaturierung, Annealing und DNA-Replikation. Es wird eine modifizierte Form der thermostabilen, rekombinanten Taq-Polymerase angewendet, die die Entstehung unspezifischer Amplifikationsprodukte minimiert. Dabei wird vor der Amplifikation eine Präinkubation bei 95 °C über 10 Minuten durchgeführt, um Schutzgruppen an der Polymerase abzuspalten. Schon während eines Durchlaufes kann man die Amplifikation anhand einer sigmoidalen Kurve am Bildschirm verfolgen. In der Messung wird ein Farbstoff eingesetzt, der spezifisch an doppelsträngige DNA bindet, hier also an die amplifizierte DNA, und dann fluoresziert.

Am Ende der Amplifikation wird eine Schmelzkurve erstellt (melting curve), anhand derer die Reinheit und Identität der Produkte überprüft werden kann. Die Schmelzkurve sollte einen deutlichen „Peak“ je Produkt darstellen, entsprechend des jeweiligen Schmelzpunktes. Andernfalls ist von einer Verunreinigung, z.B. einer Primerdimerbildung, auszugehen.

Als Housekeeping-Gen wird in der Arbeit ein humanes Porphobilinogen-Deaminase-Gen (hPBGD) verwendet, das in verschiedensten Zelltypen, auch in Ratten-Hepatozyten, konstitutiv und konstant exprimiert wird.

Die quantitative Analyse erfolgt mit Hilfe einer speziellen, kommerziell erhältlichen Auswertungssoftware. Zunächst erfolgt die Messung des jeweiligen Gens in einer Verdünnungsreihe der zu untersuchenden cDNA. In der eigentlichen Messung wird ein Crossing Point mit der Tangente an der sigmoidalen Messkurve mit der Abszisse, die die Anzahl der Zyklen darstellt, gesetzt. Der berechnete Crossing Point Wert zeigt somit die Menge von Template an.

#### Zellsysteme:

Um in vitro Auswirkungen auf die Regulation von Genen durch Estrogene oder Phytoestrogene zu untersuchen, wurden verschiedene Leber-Zellsysteme ausgewählt. Ein wesentlicher Unterschied der Zellsysteme liegt in der Anwesenheit des Estrogen-Rezeptors (ER) bzw. dessen Subtyps.

Primäre Hepatozyten weisen kurz nach der Isolation einen Estrogenrezeptor auf. Allerdings nimmt die Rezeptorkonzentration in den ersten Stunden stark ab. Die ER-Konzentration ist im Gegensatz zu frisch isolierten Zellen nach fünf Stunden nicht mehr nachweisbar (164).

Daher wurde in der Literatur zunächst nur der Nachweis einer Stimulation durch Dexamethason / Glucagon aber nicht durch EE auf Angiotensinogen-RNA und -Protein beschrieben. Erstmals zeigten dann Klett et al. eine Stimulation von Angiotensinogen-RNA in primären Ratten-Hepatozyten in den ersten zwei Stunden nach der Isolierung (165).

Aufgrund dieser zeitlichen Einschränkung ist das Zellsystem nur bedingt zur Untersuchung von estrogenen Wirkungen geeignet. Im durchgeführten Versuch wurden daher die sonst üblichen Zellkulturzeiten verkürzt. Dennoch weisen die primären Ratten-Hepatozyten im Vergleich zu Zelllinien, die meist Tumorzellen sind, ein hohes Maß an physiologischer und funktioneller Aktivität auf.

Das Fe33-Zellmodell ist bereits zur in vitro Untersuchung von estrogenen Wirkungen auf die hepatische Aktivität etabliert. Die Fe33-Zellen stammen von FTO-2B Ratten-Hepatomzellen ab. Zur Gewinnung des Fe33-Subklons wurden die FTO-2B-Zellen stabil mit einem ER- $\alpha$  Expressions-Plasmid transfiziert (166). Klett et al. beobachteten einen Anstieg von Angiotensinogen-RNA auf eine Dexamethason, Dihydrotestosteron und eine Estrogen Behandlung in vivo an Ratten und in vitro an primären Hepatozyten, FTO-2B- und Fe33-Zellen (165). Krattenmacher et al. machten ähnliche Beobachtungen (164). Somit stellt das Zellmodell eine geeignete Methode dar, um in vitro die hepatische Wirkung von Estrogenen zu untersuchen.

Bei der H4IIE-Zelllinie handelt es sich um Ratten-Hepatomzellen. Die H4IIE-Zelllinie ist ein etabliertes Modell zur Untersuchung hormoneller und toxikologischer Einflüsse. Sie exprimieren eine Angiotensinogen mRNA, die der aus Rattenleber entspricht. Chang und Perlmann konnten nach estrogenen Stimulation keinen Anstieg von Angiotensinogen mRNA feststellen und führten dies auf einen Mangel an Estrogenrezeptoren zurück (167).

#### Bedingungen der Zellkultur:

Die Fe33-Zellen werden in DMEM/Hams F12 Medium mit 1 % Penicillin-Streptomycin Lösung, Glutamaxx und 10 % FBS angezüchtet. Für H4IIE-Zellen wird DMEM Medium w/o Phenolred mit 1 % Penicillin-Streptomycin und 10 % FBS verwendet. Die primären Ratten-Hepatozyten werden nach der Isolation in Williams Medium und 10 % FBS kultiviert. Von letzteren werden 1 Mio. Zellen mit 8 ml Medium in 10 cm dishes gesetzt und bereits 2 Stunden nach der Isolation mit Substanzen versehen. Die anderen Zellarten werden in 6-well plates mit 50.000 Zellen in 2 ml Medium je well ausgesät.

Bei einer Konfluenz von 70 % erfolgt ein Mediumwechsel mit 10 % FBS-cs. Nach 24 Stunden erfolgt die Behandlung mit den Substanzen in serumfreiem Medium in den Konzentrationen 10 µg/ml, 1 µg/ml und 0,1 µg/ml. Nach weiteren 24 Stunden werden die Zellen zur RNA Isolierung geerntet.

Die Inkubationsbedingungen aller hier genannten Zellenkulturen sind 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 90 % Luftfeuchte im Brutschrank.

#### Versuchstiere:

Für den Versuch werden männliche Ratten des Stammes Wistar/WU im Gewicht zwischen 140 - 200 g verwendet. Das Alter der Tiere beträgt 6 - 8 Wochen. Die Tiere werden nach der Lieferung zunächst mindestens 3 Tage im Tierstall der Abteilung für Allgemeine Toxikologie gehalten. Die Tiere leben in Makrolonkäfigen Typ III (höchstens 5 Tiere / Käfig) und erhalten Futter (Altromin Standard-Diät) und Wasser ad libidum. Der Tierstall hat eine Temperatur von 21 °C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 70 %. Die Beleuchtung ist künstlich (Leuchtstoffröhren) mit einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Zyklus von 7:00 - 19:00 Uhr. Die Tiere sind nach Auskunft des Lieferanten gesund. Für den Versuch werden nur Tiere verwendet, die keinerlei Anzeichen einer Abnormität erkennen lassen.

#### Gewinnung der primären Ratten-Hepatozyten:

Die Gewinnung der primären Ratten-Hepatozyten erfolgt nach der Methode Williams et al. Beschrieben (164). Dabei wird die Leber in situ zunächst mit einem Lösungsgemisch I (Hank's Puffer, Hepes, NaOH, Glucose, Heparin, EGTA, Gentamycin) und dann mit einem Lösungsgemisch II (Williams Medium, Hepes, NaOH, Kollagenase, Gentamycin) über die Pfortader perfundiert. Die Lösungen sind auf 37 °C temperiert. Im Anschluss wird die Leber heraus präpariert, die Zellen werden unter sterilen Bedingungen mit einem Kamm aus dem Gewebeverband im Medium gelöst. Grobe Zellklumpen werden mit steriler Gaze abgefiltert. Die Zellsuspension wird zweimal bei 6000 Umdrehungen über 5 Minuten zentrifugiert und in Medium resuspendiert.

Zur Kontrolle der Zellzahl und der „Viability“ wird eine Verdünnung 1:10 hergestellt und mit Trypitanblau versehen. In einem Neubauer Hämatozytometer werden die Gesamtzahl sowie die Zahl der blau angefärbten (toten) Zellen mikroskopisch bestimmt.

Die „Viability“ (Überlebensrate) ergibt sich wie folgt:

$$\text{Viability (\%)} = \frac{\text{Gesamtzahl der toten Zellen}}{\text{Gesamtzahl der Zellen}} \times 100$$

Die Zellen werden nur dann für den Versuch verwendet, wenn die Viability über 70 % liegt. Die weitere Zellkultur erfolgt wie oben beschrieben.

#### Gene:

Um die estrogene Wirkungen zu bestimmen, wurde die Expression der Markergene Angiotensinogen und Calcium-Binding-Protein untersucht.

Da jede estrogene Wirkung im Wesentlichen durch die Signalvermittlung über die Estrogenrezeptoren bestimmt wird, werden im Versuch zunächst die Genexpression der Estrogenrezeptoren ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  untersucht.

Angiotensinogen (AT) wird als Glykoprotein in den Hepatozyten synthetisiert. Es wird in den Blutkreislauf sezerniert und hier durch Renin in Angiotensin I (AT I) gespalten. Letzteres wird dann wiederum durch das Angiotensin-Converting-Enzym (ACE) in das vasoaktive Angiotensin II (AT II) umgewandelt, welches in der Nebenniere die Sekretion von Aldosteron stimuliert. Dieses Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) wirkt entscheidend auf die Blutdruck- und Elektrolyt-Regulation.

Die Inhibition des ACE ist heutzutage eine Standard-Therapie der arteriellen Hypertonie.

Einflüsse auf einen erhöhten AT-Spiegel haben Estrogene, Schilddrüsenhormone, Glucocorticoide und AT II (165).

Feldmer et al. untersuchten die Kontroll-Mechanismen von Estrogenen auf die Transkription von AT in Ratten-Hepatozyten. Dabei fanden sie eine halbpallindromartige Sequenz, die als Estrogen-Response-Element (ERE) dient (169). Die AT-Spiegel werden direkt über den ER beeinflusst. Bei ovariectomierten Ratten stieg der Serum AT-Spiegel nach einer subkutanen Estrogengabe. Auch bei Fe33-Zellen kam es unter Estrogen-Einfluss zu einem mRNA-Anstieg. Hingegen konnte kein Anstieg bei primären, isolierten Ratten-Hepatozyten nachgewiesen werden, da diese Zellen wohl den ER nach kurzer Zeit verlieren (160). Auch konnte bei H4IIE-Zellen kein Anstieg von AT-mRNA beobachtet werden. Letztere Zellen besitzen zwar eine identische AT-mRNA wie die primäre Ratten-Hepatozyten, tragen aber keinen ER (167). In verschiedensten Versuchen konnte also belegt werden, dass das AT durch Estrogene stimuliert wird.

Klinisch konnte man einen höheren AT-Spiegel bei prämenopausalen Frauen, Frauen mit HRT oder Kontrazeption im Vergleich zu postmenopausalen Frauen ohne HRT feststellen. Im Allgemeinen ist der AT-Spiegel bei Frauen höher als bei Männern. Estrogene bewirken nach neuesten Erkenntnissen eine Suppression des gesamten RAAS, durch die Inhibition von Renin, ACE und den AT1-Rezeptor. Im Großen und Ganzen handelt es sich wohl um ein weitaus komplexeres Netzwerk. Unter einer Kontrazeption wurden leicht erhöhte und unter einer HRT wurden leicht erniedrigte Blutdruckwerte gemessen (170).

Die Messung von AT dient hier dazu, estrogene Wirkungen im Versuchsmodell zu untersuchen. Dabei interessiert auch die Frage, ob bestimmte Phytoestrogene einen Einfluss auf die AT-Konzentration im Blut ausüben können, mit möglichen Konsequenzen für den Blutdruck.

Das Calcium-Binding-Protein (CaBP9k), auch CalbindinD(9k) genannt, ist ein kleines, intrazelluläres, Calcium-bindendes Molekül. Es besitzt zwei Calcium-bindende Stellen. Das Gen befindet sich auf dem X-Chromosom und besitzt eine homologe Sequenz zu einem Estrogen-Response-Element (ERE). Bei Säugetieren tritt es im Darmtrakt, im Uterus, in der Plazenta, in den Nieren und in den Knochen auf. Im Darm ist es für mehr als 90 % des Calciumtransportes durch die Duodenalzelle verantwortlich (171).

Die Regulation ist gewebe- und spezies-spezifisch. So ist die Synthese im Darm Vitamin-D-abhängig. Das gilt nicht für den Uterus, in dem die Regulation den Sexualhormonen unterliegt, auch wenn hier Vitamin-D3-Rezeptoren vorhanden sind. Im Ratten-Uterus stimuliert Estrogen die CaBP-Synthese. Bei Mäusen hingegen ist diese von Progesteron abhängig, da sie wahrscheinlich ein nicht vollständiges ERE besitzen. Beim Schwein konnte ein zyklusabhängiger CaBP-Spiegel nachgewiesen werden (172). Bei dieser estrogenen Regulation des CaBP wird ein Signalweg über den ER- $\alpha$  vermutet (173).

Da das Gen durch Estrogen reguliert wird, ist es ein bewährter Parameter zur Untersuchung estrogener Eigenschaften in verschiedenen in vitro- und in vivo-Versuchen. Auch bewirkte das Phytoestrogen Genistein im Versuch einen Anstieg der CaBP-mRNA und des CaBP-Proteins (174, 175). Das CaBP ist ein etablierter Parameter zur Testung von Chemikalien auf mögliche estrogene Wirkungen in der Umwelt (176).

### Testsubstanzen:

Als Positiv-Probe dienen EE und E<sub>2</sub> in der Konzentration 10<sup>-8</sup>M. Als Negativ-Probe wird Medium mit Zugabe des jeweiligen Lösungsmittels verwendet. Auszüge der Pflanzen *Morinda citrifolia* (Noni1 und Noni2), *Cimicifuga racemosa* (CIM), *Phaseolus vulgaris* (PHA) und *Glycine max* (SOY) werden in Konzentrationen 0,1 µg/ml, 1 µg/ml und 10 µg/ml getestet. Eine detaillierte Beschreibung der Extrakte ist in Tabelle 9 und Tab. 19 dargestellt.

### RNA-Isolation:

Die Isolation von RNA aus Zellen ermöglicht eine Momentaufnahme der Zelltätigkeit zu einem bestimmten Zeitpunkt, da nur die Gene, die auch aktuell in der Zelle transkribiert werden, in diesem Moment als RNA vorliegen.

Die Isolierung der RNA erfolgt nach dem Protokoll der Phenol-Guanidinisothoncyanat-Methode. Wie zuvor beschrieben, erfolgt die Zellkultur mit der Inkubation der estrogenen Substanzen. Für die ersten Schritte der RNA-Isolation muss das Medium der Zellkultur abgesaugt werden, die Zellen mit PBS 500 µl zweimal gewaschen und anschließend das PBS wieder abgesaugt werden. Der Zellrasen wird nun mit 500 µl Trizol-Lösung bedeckt. Die Lösung enthält als Wirkstoffe Guanidiniumisothoncyanat zur Zell-Lyse und Phenol, in dem sich die DNA und Proteine lösen. Die Zellen werden mit einem Zellschaber von der Platte abgekratzt und mit einer Pipette nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren in ein Eppendorf Gefäß der Größe 1,5 ml überführt. Hierzu werden 100 µl Chloroform zugegeben und die Mischung wird mit dem Vortex gemischt. Es folgt eine Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C über 10 Minuten. In diesem Schritt erfolgt das Auftrennen in drei Phasen: eine obere wässrige Phase, die die RNA enthält, eine Interphase mit genomischer DNA sowie eine untere organische Phase mit den Proteinen und der DNA. Die wässrige Phase wird vorsichtig abpipettiert, in ein 1 ml Eppendorf Gefäß überführt und mit 300 µl Isopropanol zur ersten Fällung der RNA versehen. Dann wird die Probe bei -20 °C über mindestens 24 Stunden eingefroren. Hiernach schließt sich eine erneute Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C über 20 Minuten an. Der Überstand wird vorsichtig abpipettiert. Der Bodensatz des Gefäßes wird nun mit 300 µl RNase-freiem DEPC-Wasser (Diethylpyrocarbonat-Wasser) re-suspensiert und gemischt. Hierzu wird 100 µl 4 M LiCl-Lösung gegeben. Über Nacht erfolgt bei 4 °C die zweite Fällung. Es folgt wieder eine Zentrifugation bei 10.000 g und 4 °C über 20 Minuten. Der Überstand wird abpipettiert und es wird nochmals eine Re-Suspension mit 300 µl DEPC-Wasser durchgeführt. Dann werden noch 30 µl 3M Natriumacetat und 800 µl Ethanol beigemischt und mit dem Vortex vermischt.



Die letzte Fällung erfolgt bei -20 °C über mindestens 2 Stunden. Nach der Zentrifugation bei 10.000 g, 4 °C über 20 Minuten und Absaugen des Überstandes verbleibt ein Bodensatz, der unter dem Sterilabzug bei Raumtemperatur getrocknet wird. Dieses „Pellet“ wird dann mit 50 µl DEPC-Wasser suspensiert und eingefroren.

Die Konzentration und die Reinheit der Gesamt-RNA werden im Anschluss photometrisch bestimmt. Dazu wird die RNA mit DEPC-Wasser im Verhältnis 1:50 verdünnt. Die Absorption wird bei  $\lambda = 260$  nm (DNA) und  $\lambda = 280$  nm (Proteine) bestimmt. Ist der Koeffizient kleiner als 1,5 - 2,0 bedeutet dies eine Kontamination, z.B. mit Protein, genomischer DNA oder Phenol.

Die Konzentration wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{Konzentration [ng/}\mu\text{l]} = \frac{\text{A}_{260} \times \text{Verdünnungsfaktor (50)} \times 40 \text{ [}\mu\text{g/ml]}}{1000}$$

Daraus ergibt sich das Volumen, das 1µg RNA entspricht, wie folgt:  $V = 1 \text{ [}\mu\text{g]} / \text{RNA [}\mu\text{g/}\mu\text{l]}$

#### cDNA-Herstellung:

Die isolierte RNA als Spiegel der Genexpression der Zelle kann noch nicht als Vorlage für die PCR verwendet werden, da die DNA-Polymerase keine RNA amplifizieren kann. Dafür muss die RNA zunächst mit Hilfe der Reversen-Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden.

Der Reaktionsansatz wird bei Rickard et al. (177) beschrieben. Zunächst wird für jede Probe in ein Eppendorf Gefäß eine Mischung von 10 µl wie folgt zusammengesetzt:

Das Volumen von 1 µg RNA wird anhand der photometrischen Messung bestimmt und mit DEPC-Wasser auf 8 µl ergänzt. 1 µl Random- und 1 µl Oligo dT Primer werden hinzugegeben. Dieser Ansatz wird 10 Minuten lang auf einem Heizblock auf 70 °C erhitzt und im Anschluss 5 Minuten auf Eis abgekühlt. Nun wird 10 µl Mastermix hinzugefügt und der Ansatz wird eine Stunde lang auf 42 °C erwärmt. Jede Probe wird mit 20 µl DEPC-Wasser ergänzt und bis zur weiteren Messung bei -20 °C gelagert.

Der Mastermix setzt sich aus der Reversen Transkriptase, den Nukleotid-Bausteinen und einem Puffer zusammen und muss immer frisch angemischt werden. Hierfür muss zunächst die 20 mM dNTP Stocklösung angesetzt werden, aus je 200 µl eines 100 mM Stocks von ATP, TTP, GTP und CTP und 200 µl DEPC-Wasser.

Tab. 1: Zusammensetzung von 10µl Mastermix je Probe für die Herstellung der cDNA

AMV Reverse Transkriptase (> 10 Einheiten)	0,5 µl	Fa. Roche
RNAsin	0,5 µl	Fa. Promega
dNTP Stocklösung 20 mM	2 µl	Fa. Promega
5X-Inkubationspuffer	4 µl	Fa. Promega
DEPC-Wasser	3µl	Fa. Sigma

Versuchsablauf der real-time RT-PCR:

Die real-time RT-PCR erfolgt mit einem Light Cycler Gerät. Es wird ein Hot Start Master SYBR Green I Mix verwendet, der die notwendigen Substanzen für die PCR enthält: Taq-DNA-Polymerase, dNTP-mix, Reaktionspuffer, MgCl<sub>2</sub> und ein DNA-interkalierender Farbstoff (SYBR Green).

Bei der Herstellung des Reaktionsgemisches ist darauf zu achten, dass auf Eis gekühlt gearbeitet wird. Die Substanzen müssen in der vorgegebenen Reihenfolge zusammengemischt werden. Außerdem muss der Reaktionsmix mit SYBR Green I Farbstoff lichtgeschützt gehandhabt werden. Der verwendete Mastermix setzt sich je Probe wie in Tabelle 2 beschrieben zusammen.

Tab. 2: Zusammensetzung des Mastermixes für die Durchführung der PCR

H <sub>2</sub> O	11,6 µl	evtl. incl. DMSO-Zusatz
MgCl <sub>2</sub>	2,4 µl	4 mM Endkonzentration
Primer forward	1 µl	
Primer reverse	1 µl	
Fast Start Master SYBR Green I	2 µl	
In jede Kapillare Volumen:	18 µl	
cDNA	2 µl	evtl. 1: 10 verdünnt

Tab. 3: Primer-Sequenzen

<b>Gen:</b>	<b>Primer-Sequenz:</b>
rAT	For 5´- CCT CGC TCT CTG GAC TTA TC -3´ Rev 5´- CAG ACA CTG AGG TGC TGT TG -3´
rCaBP	For 5´- CTC TGG CAG CAC TCA CTG AC -3´ Rev 5´- CTT GGA CAG CTG GTT TGG AT -3´
rER alpha	For 5´- CCT AAC TTG CTC TTG GAC AGG -3´ Rev 5´- CAG CAG CAG GTC ATA GAG AGG -3´
rER beta	For 5´- GCC AAT CAT GTG CAC CAG TTC CTT -3´ Rev 5´- AAA GCC AAG AGA AAC GGT GGG CAT -3´
hPBGD	For 5´- CCT GAA ACT CTG CTT CGC TG -3´ Rev 5´- CTG GAC CAT CTT CTT GCT GAA C -3´

Zur Erhöhung der Spezifität der Primer-Bindung wird dem Reaktionsgemisch  $MgCl_2$  zugefügt. Außerdem lässt sich die Spezifität durch Zugabe von DMSO erhöhen. Dies bewirkt eine Schwächung der Basenpaar-Interaktion, so dass die Primer nur an Sequenzen binden, zu welchen sie eine hohe Affinität besitzen (178). Als Nebenwirkung muss man mit einer Absenkung des Schmelzpunktes rechnen, da auch die DNA-Stränge leichter voneinander getrennt werden (179). Die Glaskapillaren mit 30 µl Fassungsvermögen ermöglichen eine optimale Wärmeübertragung im Light Cycler Gerät. Jede Genprobe wird doppelt eingesetzt, zusätzlich wird eine Doppelbestimmung des Housekeeping-Gens untersucht.

Die befüllten Glaskapillaren werden in einem gekühlten Bleiblock in einer Standard-Zentrifuge zentrifugiert (15 s / 50 g / 3000 rpm), um die Kapillarkräfte zu überwinden und einen einheitlichen Füllungsstand zu erzielen. Bei der Besetzung der Zentrifuge ist auf die Balance zu achten. Die Glaskapillaren werden anschließend mit einem Deckel verschlossen. So können die Proben in das Light Cycler Karussell gesetzt werden.

Nach der Einstellung entsprechender PCR-Bedingungen am Gerät (Durchlauf-Temperatur und -Zeiten), wird der Durchlauf („Run“) gestartet (s. Tab.4).

Tab. 4: Bedingungen für den PCR-Lauf

Gen	Denaturierung		Annealing		Elongation		Anmerkung	
	°C	s	°C	s	°C	s	Verdünnung	DMSO-Zusatz
CaBP	95	5	58	2	72	15	1:10	10 %
AT	95	5	56	3	72	15	1:10	0 %
ER- $\alpha$	95	5	56	3	72	15	1:10	5 %
ER- $\beta$	95	5	59	2	72	15	1:1	0 %

Die Denaturierung erfolgt immer bei 95 °C über 5 Minuten als Prä-Inkubationszeit zur Abspaltung der Hitzeschutzgruppen der Taq-DNA-Polymerase.

Die Annealing -Temperatur und -Zeit sind vom jeweiligen Primer abhängig. Die Elongation erfolgt immer bei 72 °C, je nach Produktlänge ca. 25 Sekunden pro Basenpaar.

Am Ende des PCR-Laufes wird die Schmelzkurve erstellt. Das Programm heizt zunächst auf 95 °C und reduziert die Temperatur im Anschluss auf 65 °C. Dann steigt die Temperatur mit 0,1 °C/s wieder auf 95 °C. Zum Abschluss kühlt das Gerät bei 40 °C.

Für die eigentlichen Versuchsmessungen sind die 32 Positionen des Light Cycler Karussells in strikter Reihenfolge zu besetzen, da anderenfalls eine Auswertung durch die Software nicht möglich ist. Es wird ein Kalibrator mit PCR-Wasser als Negativ-Kontrolle mitgeführt. Die Belegung ist wie folgt: Position 1 und 2: Marker-Gen-Kalibrator / Position 3 und 4: HK-Gen-Kalibrator / Position 5 und 6: Probe-1-Marker-Gen / Position 7 und 8: Probe-1-HK-Gen /...

Jedes Gen, auch das Housekeeping-Gen, wird zunächst in einer Verdünnungsreihe (1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50, 1:100 mit Aqua dest.) mit Primer amplifiziert und gemessen. Es wird hierzu die DNA der Medium-Kontrolle des Zellversuchs verwendet. Diese Messung dient als Grundlage für die Auswertung. Ein „coefficient file“, eine Gerade, wird zur Validierung des Systems erstellt. So ist für die späteren Messungen eine quantitative Auswertung mit der RelQuant® Software möglich. Nach jedem Durchlauf ist außerdem eine sofortige qualitative Auswertung anhand der Schmelzkurve möglich.

## 4.2 Toxizitätstests

Die Genotoxizität kann in Zellversuchen geprüft werden. In der vorliegenden Arbeit kommen ein bakterieller Mutagenesetest (Ames Test), ein Mutagenesetest an Säugetieren (V79-HPRT-Test) und ein Test zur DNA-Reparaturinduktion an primären Ratten-Hepatozyten (UDS-Test) zum Einsatz.

### 4.2.1 Ames Test

#### Grundsätzliches:

Der Ames Test, benannt nach dem amerikanischen Biochemiker Bruce Ames, zur Prüfung der bakteriellen Mutagenese, ist ein weit verbreiteter Test, da er relativ einfach, schnell und kostengünstig durchzuführen ist. Zudem besitzt er eine hohe Sensitivität. Bei der Untersuchung zur Genotoxizität von Substanzen wird er daher in der Serie von Untersuchungen als erster Screening-Test durchgeführt.

In diesem Versuchssystem kommen *Salmonella typhimurium* Stämme zum Einsatz, die eine Mutation in einem Gen der Histidin-Biosynthese besitzen. Diese Bakterien sind nicht in der Lage, in Abwesenheit von Histidin zu wachsen, sie sind Histidin-auxotroph. Der DNA-Defekt wird leicht durch eine einzige Rückmutation ausgeglichen und die Zellen können dann in histidinfreiem Medium selektiert werden. Kommt es nach Zugabe von Testsubstanzen zu vermehrten Rückmutationen, kann auf eine mutagene Aktivität der Testsubstanz geschlossen werden. Da viele genotoxische Substanzen ihre Wirkung erst nach metabolischer Aktivierung entfalten, wird der Ames Test durch die Zugabe eines Leber-Enzym-Mixes erweitert. Dieser sogenannte S9-Mix besteht aus Rattenleber-Homogenat. Die Ratten wurden zuvor mit Arochlor 1254 behandelt, welches die mikrosomalen Oxygenasen in der Leber induziert.

Der Versuch wird nach dem internen Protokoll SAA 10101.02 der Arbeitsgruppe durchgeführt.

#### Verwendete Bakterien:

Im Versuch kommen folgende fünf Stämme von *Salmonella typhimurium* zum Einsatz: TA 97, TA98, TA100, TA1537, TA1538. Die Stämme TA97, TA 98, TA1537 und TA1538 detektieren Rasterverschiebungen. Der Stamm TA 100 detektiert Punktmutationen. Der Stamm TA1537 reagiert zudem besonders empfindlich auf DNA-interkalierende Substanzen. Die Bakterienstämme wurden der Arbeitsgruppe von ihrem Hersteller Bruce Ames persönlich zur Verfügung gestellt und werden in Flüssigstickstoff bei -192 °C gelagert.

### Verwendete Proben:

Noni-Blätter-Tee aus Tahiti (TNLT) ist eine kommerzielle Ware der Fa. Tahitian Noni® International. Die Blätter wurden nach der Ernte getrocknet und geröstet.

1 g TNLT wird mit 10 ml Na/K-Phosphatpuffer (0,15 M) (pH 7,35) über 3 Minuten gekocht.

Die wässrige Phase wird abzentrifugiert und über eine 0,2 µ Membran gefiltert.

Die Testsubstanzen werden in folgenden Konzentrationen eingesetzt: 0,6 mg, 2 mg, 6 mg, 20 mg TNLT / Platte.

Die Substanz wird mit Phosphatpuffer wie folgt gemischt und zur Bakteriensuspension hinzugeben: 6 µl:194 µl, 20 µl:180 µl, 60 µl:140 µl, 200 µl:0 µl.

Als Negativ-Kontrolle wird im Test das entsprechende Lösungsmittel, hier also 20 µl DMSO verwendet.

Als Positiv-Proben kommen 2-Nitrofluoren, Natriumazid und 2-Aminoanthracen zum Einsatz. Die Positiv-Proben werden zunächst zu einer Stammlösung wie folgt angemischt: 2-Nitrofluoren (2 mg in 20 ml DMSO), Natriumazid (1 mg in 20 ml DMSO), 2-Aminoanthracen (5 mg in 100 ml DMSO). Auf jede Agarplatte werden später 20 µl der Stammlösung gegeben. 2-Nitrofluoren und Natriumazid wirken direkt mutagen, 2-Aminoanthracen entfaltet die mutagene Wirkung erst nach Metabolisierung durch den S9-Mix. Dementsprechend erfolgt die Plattenbelegung wie in Tabelle 5 beschrieben.

Tab. 5: Positiv-Proben im Ames Test

<b>Salmonella typh. Stamm</b>	<b>Ohne S9-Mix</b>	<b>Mit S9-Mix</b>
<b>TA97</b>	2-Nitrofluoren (2 µg/Platte)	2-Aminoanthracen (1 µg/Platte)
<b>TA98</b>	2-Nitrofluoren (2 µg/Platte)	2-Aminoanthracen (1 µg/Platte)
<b>TA1537</b>	2-Nitrofluoren (2 µg/Platte)	2-Aminoanthracen (1 µg/Platte)
<b>TA1538</b>	2-Nitrofluoren (2 µg/Platte)	2-Aminoanthracen (1 µg/Platte)
<b>TA100</b>	Natriumazid (1 µg/Platte)	2-Aminoanthracen (1 µg/Platte)

### Versuchsvorbereitungen:

Anzucht der Bakterien: Aus der gefrorenen Stammlösung werden 50 µl entnommen und in 20 ml Nährlösung (Nutrient Broth) im Trockeninkubator bei 37 °C über 7 Stunden bei einer Frequenz von 90/min geschüttelt. Im Anschluss wird die Suspension mit Na-Phosphatpuffer im Verhältnis 1:10<sup>6</sup> verdünnt. Es werden 0,1 ml auf Agarplatten ausplattiert und 48 Stunden bei 37 °C bebrütet. Entsprechend der gewachsenen Kulturen wird die Keimzahl/ml berechnet. Es werden 10<sup>8</sup>-10<sup>9</sup> Keime/ml angestrebt.

S9-Mix: Das Leber-Homogenat wurde aus Arochlor induzierten Wistar Ratten gewonnen. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C. Zur Anwendung wird die Fraktion zunächst mit Phosphatpuffer auf einen Proteingehalt von 30 mg/ml verdünnt.

35,2 mg NADP und 14,5 mg Glucose-6-Phosphat werden in 8,5 ml Natriumphosphatpuffer (pH 7,4) gelöst und dann mit 200 µl KCL, 200 µl MgCl<sub>2</sub> sowie 1 ml S9-Fraktion gemischt.

KCL und MgCl<sub>2</sub> können als Stammlösungen zum Einsatz kommen, die zuvor angemischt, steril filtriert und im Kühlschrank aufbewahrt werden. G-6-P und NADP müssen am Versuchstag frisch in destilliertem Wasser gelöst werden. Während des Versuchsablaufes ist zu beachten, dass der S9-Mix auf Eis gekühlt wird.

Die Zusammensetzung der Minimal-Glukose-Platten ist: 1,5 % Agar, 2 % Glukose und Vogel-Bonner-Salzlösung in Aqua dest.

Tab. 6: Herstellung des Vogel-Bonner Mediums

Magnesiumsulfat (MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O)	5 g
Zitronensäure-Monohydrat	50 g
di-Kaliumhydrogenphosphat·3H <sub>2</sub> O	250 g
Natriumammoniumhydrogenphosphat·4H <sub>2</sub> O	87,5 g
Aqua demin.	Ad 500 ml
Die Zutaten werden in ca. 200 ml erwärmten Wasser (demin.) gelöst, auf 500 ml aufgefüllt und bei 120 °C für 20 Minuten autoklaviert. Die Haltbarkeit beträgt in gut verschlossenen Schraubdeckelgläsern bei Zimmertemperatur 6 Monate.	

Nach dem Autoklavieren wird das Medium auf ca. 50 °C abgekühlt und 25 - 30 ml unter sterilen Arbeitsbedingungen in Plastik-Petrischalen gegossen. Nach dem Abkühlen werden die Platten im Kühlschrank aufbewahrt. Ein Tag vor dem Versuch werden die Platten herausgenommen um ein Erwärmen auf Raumtemperatur zu ermöglichen.

Der Top-Agar besteht aus 0,6 % Agar und 0,5 % NaCl in Aqua dest. Es werden 180 ml Portionen abgefüllt, autoklaviert und dann im Kühlschrank aufbewahrt. Vor dem Versuch erfolgt im Erlenmeyerkolben eine Erhitzung über dem Bunsenbrenner. 20 ml einer sterilen Mischung aus 0,5 mM Histidin-HCL und 0,5 mM Biotin werden zugesetzt. Bis zur Anwendung im Versuch wird der Top-Agar im Wasserbad auf 42 °C gehalten.

Alle verwendeten Glas und Plastikartikel werden, soweit erforderlich, vor dem Versuch autoklaviert.

#### Versuchsablauf des Ames-Tests:

Zunächst werden die erforderlichen Agarplatten und entsprechende 5 ml Röhren nummeriert. In jedes dieser Röhren wird 0,1 ml frisch zubereitete Bakteriensuspension des jeweiligen Bakterienstammes und 0,1 ml des S9-Mixes bzw. 0,1 ml Phosphatpuffer gegeben. 20 µl der Prüfsubstanz, Positiv-Kontrolle oder der Negativ-Probe mit dem entsprechenden Lösungsmittel, also 20 µl DMSO, werden hinzugegeben. Die Mischung wird geschüttelt und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C und 120 U/min in einem rotierenden Inkubator vorinkubiert. Es werden 2 ml flüssiger Topagar zupipettiert, erneut geschüttelt und dann auf die Agarplatten ausgegossen, so dass eine gleichmäßige Verteilung auf der Agarplatte vorliegt. Es werden 3 Platten je getesteter Dosis und getestetem Stamm eingesetzt. Die Platten werden über 48 Stunden bei 37 °C bebrütet. Die Auszählung der Revertanten erfolgt mit einem automatischen Koloniezählgerät und wird an einem PC mit einem speziellen Softwareprogramm ausgewertet. Dargestellt werden die Testergebnisse je eines Bakterienstammes in Form der Mittelwerte der Mutationszahlen einer Platte mit der entsprechenden Standardabweichung. Außerdem wird der Quotient des Messwertes der Testsubstanzen zur Negativ-Kontrolle berechnet.

#### **4.2.2 V79-HPRT-Test**

##### Grundsätzliches:

Das V79-HPRT-Testsystem wird angewandt zur Prüfung von Substanzen auf mutagene Wirkungen in Säugetierzellen. Dieser Test wird häufig im Anschluss an einen positiven bakteriellen Mutagenitätstest durchgeführt, weil dieser Mutagenitäts-Nachweis an Eukaryoten eine höhere Relevanz für den Menschen besitzt. In diesem Testsystem kommen chinesische Hamster-Fibroblasten zum Einsatz.



Zur Prüfung der Mutagenität wird der Genlocus des Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HPRT) - Gens verwendet, das sich auf dem X-Chromosom befindet. Die HPRT steht im Zentrum des Purinstoffwechsels. Das Enzym katalysiert die Umwandlung der Purine Hypoxanthin und Guanin zu ihren entsprechenden Nucleosiden und in Verbindung mit Phosphoribosyl-Pyrophosphat zu Nucleosid-5'-Monophosphaten. Auch Purin-Analoga, wie 6-Mercaptopurin, 6-Thioguanin oder 8-Azaguanin, werden durch die HPRT im Purin-Stoffwechsel metabolisiert. Diese Purin-Analoga besitzen jedoch eine zytotoxische Wirkung. Zellen mit normalem HPRT-Gehalt sterben in einem Medium mit Purin-Analoga ab. Unter dem Einfluss genotoxischer Substanzen kommt es zu Mutationen, die u.a. das HPRT-Gen betreffen, so dass diese Zellen das Enzym nicht bilden können. Diese Mutanten wachsen dann auch in einem Medium, das Purin-Analoga enthält. Die Mutationsrate wird durch mutagene Substanzen mit unterschiedlichen Mechanismen (z.B. Basenpaar-Substitution, Lese-Raster-Änderungen, Chromosomen-Aberrationen) erhöht, so dass die Anzahl überlebender Zellen in einem entsprechenden Selektionsmedium ein Maß für die mutagene Wirksamkeit von Substanzen ist.

Der Versuch wird nach dem internen Standardprotokoll SAA 10201.03 der Arbeitsgruppe durchgeführt, das sich an die Methode von Jensen anlehnt. (180)

#### Zellen:

Die V79-Zelllinie stammt von Lungenfibroblasten des chinesischen Hamsters ab. Die Zellen wurden bei der American Type Culture Collection erworben und werden in Flüssigstickstoff gelagert.

3 - 4 Tage vor Beginn des Versuches werden die Zellen aufgetaut und in Flaschen mit DMEM (low glucose) bis zu einer Zelldichte von  $0,5 - 2 \times 10^6$  Zellen/ml herangezogen.

#### Behandlungsmedien:

Ohne S9-Mix: Wachstumsmedium ohne FBS (49,75 ml), jeweilige Testsubstanz in DMSO bzw. Medium (0,25 ml)

Mit S9-Mix: Wachstumsmedium ohne FBS (47,75 ml) Testsubstanz in DMSO bzw. Medium (0,25 ml), S9-Mix (2,0 ml)

Die Testsubstanzen und Referenzsubstanzen werden in 0,25 ml Medium oder DMSO gelöst.

### Testsubstanzen:

Der Noni-Blätter-Tee aus Tahiti (TNLT) wurde im Vorfeld getrocknet und geröstet.

Die Extraktion erfolgt aus 1 g Blättern mit 10 ml Aqua dest. durch 10 minütiges Kochen. Anschließend wird die wässrige Phase mit einem Papierfilter abgefiltert und durch eine Spritzenfiltration (0,22 µ) sterilisiert.

Die Probe kommt in den Konzentrationen 0,3 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml, 6 mg/ml bis 10 mg/ml zum Einsatz. Entsprechend werden 3 µl/ml, 10 µl/ml, 30 µl/ml, 60 µl/ml und 100 µl/ml dem Kulturmedium zugefügt.

### Positiv-Kontrolle:

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) wird in der Konzentration 1 µg/ml Medium zur positiven Kontrolle der direkten Mutagenität angewendet.

7,12-dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) wird in der Konzentration 10 µg/ml Medium zur positiven Kontrolle der indirekten Mutagenität nach Metabolisierung durch den S9-Mix angewendet. Im Versuch werden 2 mg DMBA auf 1 ml DMSO gelöst, daraus werden dann 0,25 ml in 50 ml Medium gegeben.

### S9-Mix:

Die Proteinkonzentration der S9-Fraktion wird auf 15 mg/ml eingestellt. Es werden folgende Co-Faktoren, nach Lösung in Pufferlösung (pH 7,4), hinzugefügt: KCL (33 mM / 2,46 mg/ml), MgCl<sub>2</sub> (8 mM / 1,63 mg/ml), NADP (5 mM / 3,94 mg/ml), G-6-P (5 mM / 1,52 mg/ml).

### Selektionsmedium:

DMEM Medium 15 ml mit 10 % FBS, Penicillin-Streptomycin und 10 µg/ml 6-Thioguanin.

### Versuchsablauf des V79-HPRT-Tests:

Vor Beginn des Hauptversuches muss eine Bestimmung der verwendeten Probenkonzentrationen erfolgen. Es werden hierzu je geprüfter Konzentration zwei Kulturflaschen (25 cm<sup>2</sup>) mit 500 Zellen / 5 ml Medium angesetzt. Nach 24 Stunden wird das Medium abgesaugt und durch 5 ml Medium (ohne FBS) ersetzt, das die Prüfsubstanz in verschiedenen Konzentrationen enthält. Die maximale Dosis beträgt 10 mM oder 5000 µg/ml. Die Inkubation erfolgt über 4 Stunden. Danach wird das Probemedium abgesaugt, die Zellen werden mit PBS gewaschen und erneut mit Wachstumsmedium versehen.

Nach 5 - 6 Tagen im Brutschrank werden die Kolonien nach Anfärbung mit Giemsa Lösung ausgezählt. Die höchste Konzentration sollte eine 20 - 50 %ige Reduktion der Anwachsrate bewirken.

Die Zellkultur erfolgt im Brutschrank bei 37 °C, 90 % relativer Luftfeuchte und 5 % CO<sub>2</sub>.

Am ersten Tag werden die Zellkulturflaschen belegt. Für jede Probe werden 500 Zellen mit 5 ml Medium in je 2 kleinen Flaschen (25 cm<sup>2</sup>) und 500.000 Zellen mit 30 ml Medium in einer großen Flasche (75 cm<sup>2</sup>) angesetzt.

Am zweiten Tag erfolgt die Behandlung mit den Probesubstanzen. Zunächst muss das alte Medium abgesaugt werden. Das Behandlungsmedium ohne FBS verweilt 4 Stunden auf den Zellen und wird dann abgesaugt, ausgewaschen und wieder durch Wachstumsmedium ersetzt. Am vierten Tag müssen die Zellen der großen Flaschen abtrypsiniert und in neue große Flaschen umgesetzt werden.

Am siebten Tag wird die erste Anwachsrate (erste CFE) der kleinen Flaschen vom ersten Tag bestimmt. Sie werden mit 5 ml Methanol fixiert, gefärbt und die Zellkolonien werden im Stereomikroskop ausgezählt.

Es erfolgt die Umsetzung in das Selektionsmedium. Die Zellen der großen Versuchsflaschen werden abtrypsiniert, mit Medium + FBS 10 % gestoppt, in Zentrifugenröhrchen suspensiert und zentrifugiert. Die Zellzahl / ml wird bestimmt. In eine sterile 100 ml Glasflasche werden 80 ml Selektionsmedium und dann 3 x 10<sup>6</sup> Zellen gegeben.

Es werden pro Konzentration 5 Zellkulturflaschen mit 75 cm<sup>2</sup> und 5 Zellkulturflaschen mit 25 cm<sup>2</sup> benötigt. Für die Bestimmung der Anwachsrate (zweite CFE) werden je Testkonzentration zwei kleine Kulturflaschen mit je 5 ml Medium mit 10 % FBS (ohne 6-Thioguanin) versehen und es werden 500 Zellen der Zellsuspension hinzupipettiert. In die großen Flaschen werden für die Bestimmung der Mutationsrate 15 ml Medium mit 10 % FBS und 10 µg/ml 6-Thioguanin gegeben und 500.000 Zellen zugesetzt.

Am 14. Tag wird die zweite Anwachsrate (zweite CFE) der kleinen Flaschen bestimmt. Die Zellen werden fixiert, gefärbt und ausgezählt.

Am 18. Tag werden für die Bestimmung der Mutationsrate die Zellen der großen Flaschen fixiert, gefärbt und die Kolonien werden ausgezählt.

Die Anzahl der Mutanten wird nach der folgenden Gleichung auf jeweils 100.000 überlebende Zellen berechnet:

$$\text{Mutationsrate} = \frac{\text{Kolonien pro Flasche (Mutationstest)}}{\text{Kolonien pro Flasche (zweite CFE)}} \times 40$$

### **4.2.3 UDS-Test**

#### Grundsätzliches:

Ein weiterer Test zur Prüfung der Genotoxizität ist der DNA-Reparaturtest. Es kommen hierbei primäre Ratten-Hepatozyten zum Einsatz, die über die volle metabolische Kompetenz der Leber verfügen. Somit können mit diesem Testverfahren auch indirekt genotoxische Substanzen, die erst nach metabolischer Aktivierung toxisch wirken, detektiert werden. Auch Stoffe, deren toxische, metabolische Zwischenprodukte nur eine kurze Lebensdauer haben, können detektiert werden, da die Zelle gleichzeitig den Ort der Aktivierung und das toxische Ziel darstellt.

Im Test wird durch genotoxische Stoffe ein Schaden an der DNA gesetzt. Solch ein Schaden kann aus kovalenten Addukten elektrophiler Substanzen mit der DNA oder aus chemischen Veränderungen an den DNA-Basen, wie z.B. Desaminierungen oder dem Verlust von Basen bestehen. Diese veränderten DNA-Stränge können nicht mehr fehlerfrei in m-RNA und Proteine übersetzt werden und es käme zu gravierenden Veränderungen in den betroffenen Zellen. Im Replikationszyklus erfolgt aber eine DNA-Reparatur über eine Kaskade von enzymatischen Vorgängen. Zunächst erkennen Endo-Nukleasen die fehlerhafte Sequenz und schneiden die Phosphatkette ein. Exo-Nukleasen entfernen Basen aus dem defekten Strang. Indem der noch intakte Komplementärstrang als Matrize herangezogen wird, schließen DNA-Polymerasen die Lücke. Der letzte Schritt besteht in der Wiederherstellung der Phosphodiester Kette durch eine DNA-Ligase.

Im Versuch wird den Zellen zusammen mit den Testsubstanzen radioaktives Thymidin angeboten. Letzteres wird bei der DNA-Reparatur mit eingebaut. Diese Radioaktivität kann mit Hilfe einer autoradiographischen Technik bestimmt werden. Somit ist also die Anwesenheit von Radioaktivität in der DNA ein Maß für eine stattgefundene DNA-Reparatur nach einem genotoxischen Effekt der Testsubstanz.

Der Versuch wird nach dem internen Arbeitsprotokoll SAA 10301.02 der Arbeitsgruppe durchgeführt.

#### Testsubstanzen:

Der Noni-Blätter-Tee aus Tahiti (TNLT) wird verwendet, der im Vorfeld getrocknet und geröstet wurde. Die Blätter werden mit der 10-fachen Menge Ethanol extrahiert. Die Substanz wird dem Zellmedium (2 ml) in Dosierungen von 0,01 / 0,03 / 0,06 / 0,1 / 0,3 / 0,6 / 1,0 / 3,0 / 6,0 bis 10,0 µl hinzugefügt.

### Positiv-Kontrollen:

2-Acteylaminofluoren (AAF) wird in DMSO gelöst (2 mg/ml). Im Versuch werden drei Testschalen mit 10 µl versehen, was einer Konzentration von 10µg/ml entspricht.

UV-Licht: Eine UV-Lampe mit einer selbstgebauten Bleiblinde wird 4 cm über den Zellen platziert und die Bestrahlung erfolgt über 10 Sekunden bei  $\lambda = 245$  nm. Während der Bestrahlung sind die Zellen ohne Medium.

Die Haltung der Versuchstiere und die Gewinnung der primären Hepatozyten sind im Kapitel 4.1.3 beschrieben worden.

### Versuchsablauf des UDS-Tests:

Die primären Ratten-Hepatozyten werden in Plastik-Petrischalen (3 cm Durchmesser), in die zuvor sterile, runde Plastikscheiben gelegt wurden, ausgesät. Für jede Konzentration der Testsubstanz werden 3 Schälchen benötigt. In jede Schale werden  $10^6$  lebende Zellen in 2 ml WME mit 10 % FBS gegeben.

Nach vier Stunden im Brutschrank (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 90 % Luftfeuchte) wird das Anwachsen kontrolliert. Bei leichtem Schwenken sollten sich die Zellen nicht bewegen.

Das Medium wird abgesaugt und durch 2 ml Behandlungsmedium ersetzt. Das Behandlungsmedium enthält Williams Medium E mit 10 % FBS und 10 µCi/ml <sup>3</sup>H-Thymidin. Hierzu wird je 100 ml Medium 1 ml <sup>3</sup>H-Thymidin-Stammlösung (Konz. 1 mCi/ml, ICN) und 10 µg/ml Gentamycin zugesetzt. Die Testsubstanzen sind in Lösungsmittel gelöst und werden direkt ins Medium pipettiert. Die Negativ-Kontrollen werden mit der entsprechenden Menge Lösungsmittel versehen. Als erste Positiv-Kontrolle werden 10 µl 2-Acteylaminofluoren-Lösung zugegeben. Die zweite Positiv-Kontrolle erfolgt durch UV-Bestrahlung. Vor der Bestrahlung wird das Medium abgesaugt und anschließend wieder ersetzt.

Die Testsubstanzen und das <sup>3</sup>H-Thymidin lässt man 18 Stunden lang auf die Zellen einwirken. Danach wird das Zellplättchen mit einer Pinzette herausgenommen, zweimal in 200 ml Hank's Puffer gewaschen und dann in vorbereitete Petrischalen gegeben. Diese enthalten 2 ml einer 1 %-igen Na-Citratlösung. Nach 10 Minuten werden die Zellen durch Zugabe von 2 ml Ethanol-Eisessig-Gemisch (3:1) fixiert. Die Zeit des Verbringens der Zellen in die Citratlösung bis zur Zugabe der Fixierlösung muss mit der Stoppuhr genau verfolgt werden. Im Abstand von 30 Minuten wird die Fixierlösung jeweils noch zweimal abgesaugt und durch frische ersetzt. Zum Schluss werden die Plastikscheibchen aus den Schalen genommen und auf Fließpapier zum Trocknen ausgelegt. Die Zellplättchen werden mit Entellan auf

Glasobjektträgern fixiert. Zur Verflüchtigung des Lösungsmittels Xylol im Entellan verbleiben die Objektträger 24 Stunden bei Zimmertemperatur.

Es folgt die Beschichtung der Zellen mit Photoemulsion und die Exposition. Zunächst wird die Photoemulsion bei 43 °C im Wasserbad verflüssigt. Die folgenden Arbeitsschritte müssen in völliger Dunkelheit erfolgen. 15 ml Photoemulsion werden in einem Dippgefäß mit 15 ml Aqua dest. vermischt. Die Objektträger werden der Reihe nach zweimal in die Emulsion getaucht, in vorbereiteten Ständern abgelegt und in Aluminiumdosen, die 100 g Blaugel als Trocknungsmittel enthalten, luftdicht verschlossen. Diese Dosen werden über acht Tage im Kühlraum bei 4 °C aufbewahrt.

Auch das Entwickeln der Photoschicht muss in absoluter Dunkelheit geschehen. Zur Vorbereitung werden 3 Kunststoffbechergläser (5000 ml) mit je 3000 ml a) Kodak D10 Entwickler, b) Schnellfixierer und c) 1 %iger Essigsäure gefüllt. Die Präparate werden mitsamt den Ständern in Kodak D10 Entwickler 5 Minuten lang entwickelt, kurz in die Essigsäurelösung getaucht und dann 10 Minuten fixiert. Dann werden die Objektträger über Nacht an der Luft getrocknet.

Am folgenden Tag werden sie durch zweiminütiges Eintauchen in Papanicolaous-Lösung gefärbt. Die Färbelösung muss zuvor im Papierfaltenfilter filtriert werden. Nach der Färbung lässt man die Objektträger erneut über Nacht trocknen.

Die Auswertung erfolgt unter dem Mikroskop bei 1000-facher Vergrößerung. An das Mikroskop ist eine Kamera mit einem Biotran II Colony Counter und einem PC angeschlossen. Am Monitor fokussiert man ein Hellfeld auf einen Zellkern und zählt die Anzahl der Silberkörner über der Kernregion durch Knopfdruck am PC. Außerdem werden drei benachbarte Zytoplasmaregionen ausgezählt. Pro Objektträger werden mindestens 30 Kernregionen und 90 Zytoplasmaregionen ausgewertet. Ein speziell für den UDS-Test entwickeltes Computerprogramm (UDS IV, BIOSYS) ermittelt aus den eingegebenen Einzeldaten die mittlere Silberkornhäufigkeit über Kernen und Zytoplasma sowie die Netto-Silberkornrate über der Zellkernregion, die Anzahl der positiven Nuklei je Konzentration (Netto-Silberkornrate / Kerne > 5), die t-Statistik (Student t-Test) und den p-Wert in Relation zur Negativ-Kontrolle. Eine Probe wird als positiv bewertet, wenn drei Kriterien erfüllt sind:

- a) Nettosilberkornrate der Kernregion > 5
- b) Anzahl der positiven Kerne > 50%
- c) p-Wert < 0,01

# 5 Ergebnisse

## 5.1 Estrogenitätstests

### 5.1.1 Alkalische Phosphatase Assay mit Ishikawa-Zellen

An Hand der Ishikawa-Zelllinie wird die Regulation der alkalischen Phosphatase Aktivität durch estrogene Einflüsse auf das Endometriumgewebe untersucht.

Als Positiv-Proben dienen Ethinylestradiol (EE) und Estradiol (E<sub>2</sub>) in einer Konzentration von 10<sup>-8</sup> M. Als Negativ-Kontrolle wird reines Medium bzw. Medium mit dem Lösungsmittel Ethanol (EtOH) angewendet.

Bei den Testsubstanzen handelt es sich um verschiedene Noni-Blatt-Extrakte (s. Tab. 7 und Tab. 19), die in den folgenden Konzentrationen eingesetzt werden: die Probe des ethanolischen Tees werden beginnend mit 1 µg/ml, 3 µg/ml, 10 µg/ml, 30 µg/ml bis 100 µg/ml eingesetzt. Die übrigen ethanolisch gelösten Substanzen beginnen bei 10 µg/ml, 30 µg/ml, 100 µg/ml, 300 µg/ml bis 500 µg/ml. Die Testung der wässrig gelösten Substanzen reicht von 0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml bis 10 mg/ml. In der graphischen Darstellung werden die Ergebnisse in Relation zur Negativprobe = 1 gesetzt. Die statistische Auswertung erfolgt mit dem Software Programm Statistica®. Die Signifikanz für p < 0,05 wird mit einem Tukeys-HSD-Test berechnet.

Tab. 7: Proben von *Morinda citrifolia* im alkalische Phosphatase Assay.

<b>Probe:</b>	<b>Pflanzenteil:</b>	<b>Auszug:</b>	<b>Herkunft:</b>
1.	Noni-Blätter	wässrig	Tahiti
2.	Noni-Blätter	wässrig	Malediven
3.	Noni-Blätter	wässrig	Marquesas Inseln
4.	Noni-Blätter	Hexan Auszug, in EtOH abs.	Tahiti
5.	Noni-Blätter	Methanol Auszug, gelöst in 80 % EtOH	Tahiti
6.	Noni-Blätter	EtOH	Marquesas Inseln

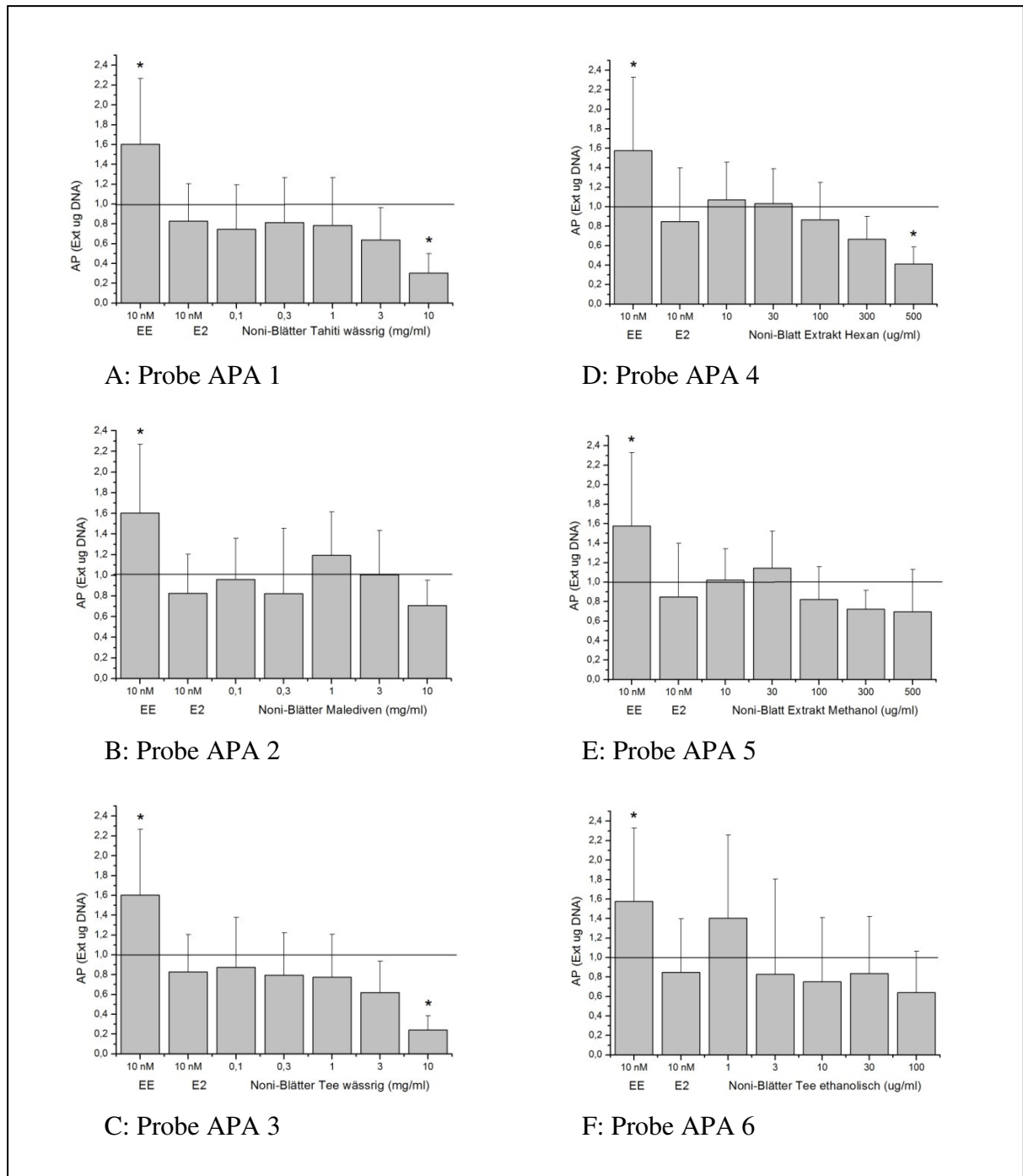


Abb. 5 A - F: Aktivität der AP in Abhängigkeit von steigenden Konzentrationen der Proben APA 1 - APA 6. Die durchgezogene Linie bei 1,0 entspricht der AP-Aktivität ohne Zusatz von Testsubstanz zur Zellkultur. Die mit \* gekennzeichneten Proben sind für  $p < 0,05$  signifikant ( $n = 24$ ).



### Auswertung des Alkalische Phosphatase Assays:

Die Positiv-Probe EE erzielt im Mittel eine 1,6-fache Stimulierung der AP-Aktivität. Die Positiv-Probe E2 bewirkt lediglich eine 0,8-fache Stimulierung, was wahrscheinlich auf eine geringere Stabilität der Substanz zurückzuführen ist.

Betrachtet man die Ergebnisse von wässrigen Auszügen aus Noni-Blättern unterschiedlicher Herkunft, so ist eine dosisabhängige Hemmung der AP-Induktion festzustellen. Diese tritt bei den beiden Proben aus Französisch-Polynesien (Abb. 5 A und C) signifikant und stärker hervor als bei der Probe von den Malediven (Abb. 5 B)

Bei den Extrakten der Blätter mit organischen Lösungsmitteln kommt es im Falle des ethanolschen Blätter-Tee-Auszuges bei einer Konzentration von 1 µg/ml zu einer Erhöhung der AP-Induktion (Abb. 5 F). Wegen der starken Streuung ist diese aber nicht signifikant. In zunehmenden Konzentrationen kommt es wiederum zu einer Hemmung, die aber ebenfalls nicht die Signifikanzgrenze erreicht. Der methanolische Extrakt zeigt in den niedrigen Konzentrationen eine geringe Steigerung, zunehmend aber eine hemmende Wirkung (Abb. 5 E). Diese Tendenz weist keine Signifikanz auf. Einzig der Extrakt mit Hexan zeigt signifikant mit zunehmender Konzentration eine stetig abnehmende AP-Induktion (Abb. 5 D).

### **5.1.2 Luciferase Assay mit MVLN-Zellen**

Der Luciferase Assay dient dazu, die Transkriptionsaktivität darzustellen. Im Versuch kommen MVLN-Zellen zum Einsatz. Diese Zellen wurden mit einem Luciferase Gen transfiziert, das durch ein Estrogen Response Element reguliert ist. Durch die Messung der Biolumineszenz lassen sich somit Rückschlüsse auf die estrogene Wirkung einer Substanz ziehen.

In einem Luminometer erfolgte die Messung der Biolumineszenz in „Relativen Licht Einheiten“ (RLU). Im Anschluss an diese Messung wurde eine DNA-Bestimmung durchgeführt. Je Probe erfolgte eine Dreifachbestimmung. Die Luciferase-Aktivität wurde als Mittelwert mit der Standardabweichung in RLU / DNA dargestellt. Die Ergebnisse wurden auf die jeweilige Negativ-Kontrolle normiert.

Als Negativ-Kontrolle diente reines Medium im Falle der wässrig gelösten Substanzen. Medium mit dem Lösungsmittel EtOH kam bei den ethanolisch gelösten Substanzen zum Einsatz.

Als Positiv-Kontrolle wurde eine E<sub>2</sub>-Standardreihe in den Konzentrationen von 0,3 nM, 1 nM, 3 nM, 10 nM, 30 nM bis 100 nM mitgeführt.

Die Proben wurden in Konzentrationen von 0,003 mg/ml, 0,01 mg/ml, 0,03 mg/ml, 0,1 mg/ml, 0,3 mg/ml und 1 mg/ml eingesetzt. Lediglich die Probe LUC 9 und LUC 10 wurden in folgenden Konzentrationen getestet: 0,6 µg/ml, 2 µg/ml, 6 µg/ml, 20 µg/ml, 60 µg/ml bis 200 µg/ml. Eine detaillierte Übersicht der Substanzen wird in Tab. 8 und Tab. 19 beschrieben.

Zusätzlich zu den im AP-Test verwendeten Proben wurden im LUC-Assay von jeder Herkunft sowohl wässrige als auch ethanolische Extrakte verwendet. Außerdem kam ein gefriergetrockneter Noni-Saft zum Einsatz, der in Ethanol gelöst worden ist.

Tab. 8: Proben von *Morinda citrifolia* im Luciferase Assay

<b>Probe:</b>	<b>Pflanzenteil:</b>	<b>Auszug:</b>	<b>Herkunft:</b>
1.	Noni-Blätter	EtOH	Tahiti
2.	Noni-Blätter	H <sub>2</sub> O	Tahiti
3.	Noni-Blätter	EtOH	Malediven
4.	Noni-Blätter	H <sub>2</sub> O	Malediven
5.	Noni-Blätter	EtOH	Tahiti und Marquesas-Inseln, Teebeutel der Firma TNI
6.	Noni-Blätter	H <sub>2</sub> O	Tahiti und Marquesas-Inseln, Teebeutel der Firma TNI
7.	Noni-Blätter	Aq MeOH Fraktion in 80% EtOH, 100 mg/ml	Tahiti
8.	Noni-Blätter	Hexane Fraktion in EtOH abs. 100 mg/ml	Tahiti
9.	Noni-Blätter	Saft gefriergetrocknet, EtOH abs. 20 mg/ml	Tahiti
10.	Noni-Blätter	Saft gefriergetrocknet, H <sub>2</sub> O 20 mg/ml	Tahiti

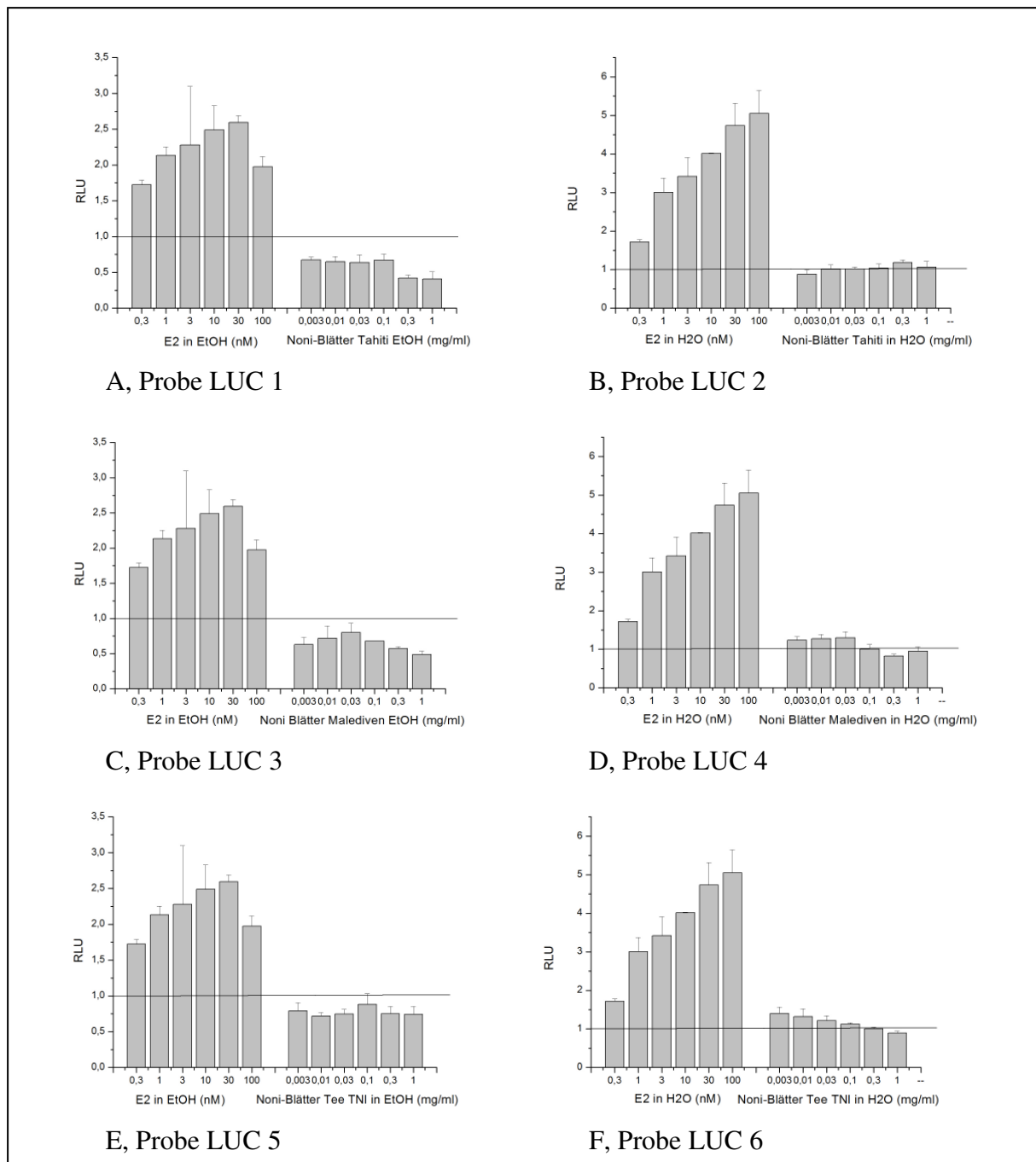


Abb. 6 A - F: Luciferase-Aktivität in „Relativen Licht Einheiten“ (RLU) in MVLN-Zellen in Abhängigkeit der in steigenden Konzentrationen eingesetzten Proben 1 - 6 (n = 3). Die durchgezogene Linie bei 1,0 stellt die Kontrolle der Zellkulturen ohne Testsubstanz dar.

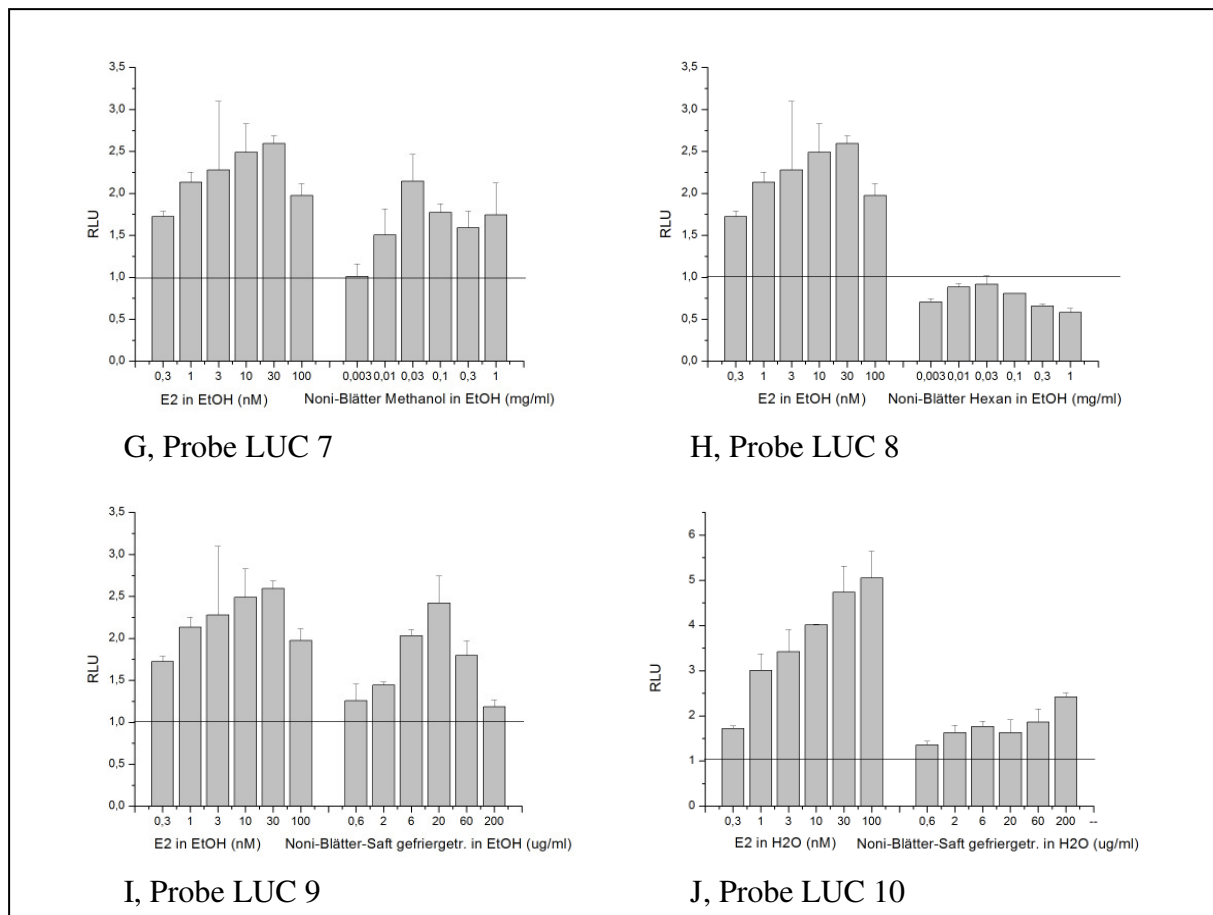


Abb. 7 G - J: Luciferase-Aktivität in „Relativen Licht Einheiten“ (RLU) in MVLN-Zellen in Abhängigkeit der in steigenden Konzentrationen eingesetzten Proben 7 - 10 (n = 3). Die durchgezogene Linie bei 1,0 stellt die Kontrolle der Zellkulturen ohne Testsubstanz dar.

Die in H<sub>2</sub>O gelöste Positiv-Kontrolle E<sub>2</sub> zeigt eine 5-fache Steigerung der Transkriptions-Aktivität. Die in EtOH gelöste Positiv-Kontrolle E<sub>2</sub> zeigt maximal eine 2,5-fache Steigerung. Betrachtet man die wässrigen und ethanolischen Auszüge aus Noni-Blatt-Proben unterschiedlicher Herkunftsgebiete, so ergeben die ethanolischen Extrakte jeweils eine Hemmung, die aber nicht dosisabhängig zunimmt. Offenbar ist bereits bei der geringsten Konzentration eine Sättigung des Effekts eingetreten. Die Ergebnisse der wässrigen Auszüge schwanken alle im Bereich der Nulllinie. Daraus kann gefolgert werden, dass in den wässrigen Blatt-Auszügen keine nennenswerte estrogenere Aktivität nachzuweisen ist.

Der Hexan-Extrakt der Noni-Blätter aus Tahiti zeigt eine Hemmung der Luciferase-Expression. Die geringste Hemmung findet bei 0,03 mg/ml statt (Abb. 7 H). Werden die Blätter mit Methanol extrahiert und der Rückstand in Ethanol wieder aufgenommen, dann resultiert eine deutliche Erhöhung der LUC-Expression, die bei 0,03 mg/ml ein Maximum erreicht (Abb. 7 G).

Die wässrige Lösung des eingetrockneten Noni-Blatt-Saftes ergibt ebenfalls eine deutliche Steigerung der LUC-Expression (Abb. 7 J). Wird der getrocknete Blatt-Saft in Ethanol gelöst, fällt der Effekt noch stärker aus. In diesem Fall erreicht er bei einer Konzentration von 20 µg/ml den Maximalwert der Positiv-Kontrolle, fällt aber bei höheren Konzentrationen wieder ab (Abb. 7 I).

Diese Versuche zeigen, dass Noni-Blätter estrogen aktive Substanzen enthalten, die im Modell der MVLN-Zellen zu deutlichen Effekten führen können. Dieses hängt aber von der Art der Extraktion und einer geeigneten Konzentration ab.

### **5.1.3 Real-time RT-PCR - Versuch**

Die estrogenen Wirkungen wurden an Hand der Genexpression von verschiedenen Leberzelltypen mittels real-time RT-PCR untersucht. Die untersuchten Gene sind das Angiotensinogen (AT) und das Calcium-Binding-Protein (CaBP). Es wurden die wässrig und ethanolisch gelösten Blattauszüge der Noni-Pflanze untersucht. Des Weiteren wurden andere Pflanzenauszüge getestet, die in Voruntersuchungen der Arbeitsgruppe eine estrogen Aktivität aufwiesen. Es handelt sich hier um Auszüge aus CIM, PHA, SAR, und SOY. PHA und SAR sind in Ethanol gelöste Substanzen. Für CIM und SOY wird DMSO als Lösungsmittel eingesetzt. Eine Übersicht der Probesubstanzen ist in Tab. 9 und Tab. 19 dargestellt. Als Positiv-Kontrolle dienten EE und E<sub>2</sub>. In den Abbildungen sind die Mittelwerte, die auf die Medium-Kontrolle – auf den Wert 1 – normiert wurden, mit der Standardabweichung dargestellt.

Tab. 9: Verwendete Proben im RT-PCR-Versuch

<b>Probe:</b>	<b>Pflanze:</b>	<b>Auszug:</b>	<b>Herkunft:</b>
<b>CIM</b>	Trauben-silberkerze ( <i>Cimicifuga racemosa</i> )	In DMSO	Von Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe erhalten.
<b>PHA</b>	Gartenbohne ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	In EtOH	Von Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe erhalten.
<b>SAR</b>	Besenginster ( <i>Sarothamnus scoparius</i> )	In EtOH	Von Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe erhalten.
<b>SOY</b>	Soja ( <i>Glycine max</i> )	In DMSO	Von Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe erhalten.
<b>Noni 1</b>	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> )	Blatt-Saft in EtOH	Tahiti, von Firma TNI erhalten.
<b>Noni 2</b>	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> )	Blatt-Saft in H <sub>2</sub> O	Tahiti, von Firma TNI erhalten.

### Estrogenrezeptoren Expression

Das Expressionsmuster der ER-Subtypen ist bei den in der Arbeit verwendeten Zellkulturen noch unzureichend erforscht und wird deshalb in einer Voruntersuchung mittels real-time RT-PCR untersucht.

In Abb. 8 zeigt sich, dass die Fe33-Zellen, mit dem ersten Kurvenanstieg, am meisten ER- $\alpha$  enthalten. Die primären Hepatozyten folgen unmittelbar. H4IIE-Zellen zeigen erst nach mehreren Amplifikationsläufen einen Anstieg. Insofern bestätigen sich die in der Literatur beschriebenen Daten bezüglich der ER-Expression von Fe33- und H4IIE-Zellen (166, 167), nicht jedoch die Daten der primären Hepatozyten (164), die hier eine deutliche Expression der ER zeigen.

In Abb. 9 wird die Genexpression von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  in primären Hepatozyten dargestellt. Das ER- $\alpha$ -Gen zeigt einen früheren Anstieg als das ER- $\beta$ -Gen.

Die Genexpression von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  der Zellen H4IIE und Fe33 wird in Abb. 10 gezeigt. Die Expressionsstärke ist folgende: Fe33-ER- $\alpha$  > H4IIE-ER- $\beta$  > Fe33-ER- $\beta$  > H4IIE-ER- $\alpha$ .

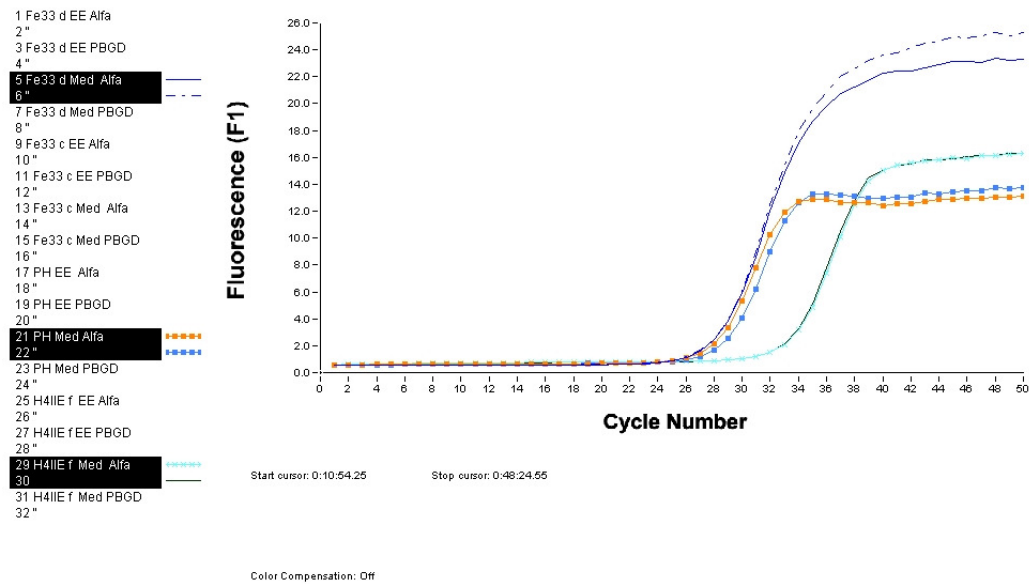


Abb. 8: Genexpression von ER- $\alpha$  im Vergleich der drei Zelllinien Fe33, H4IIE und primären Hepatozyten.

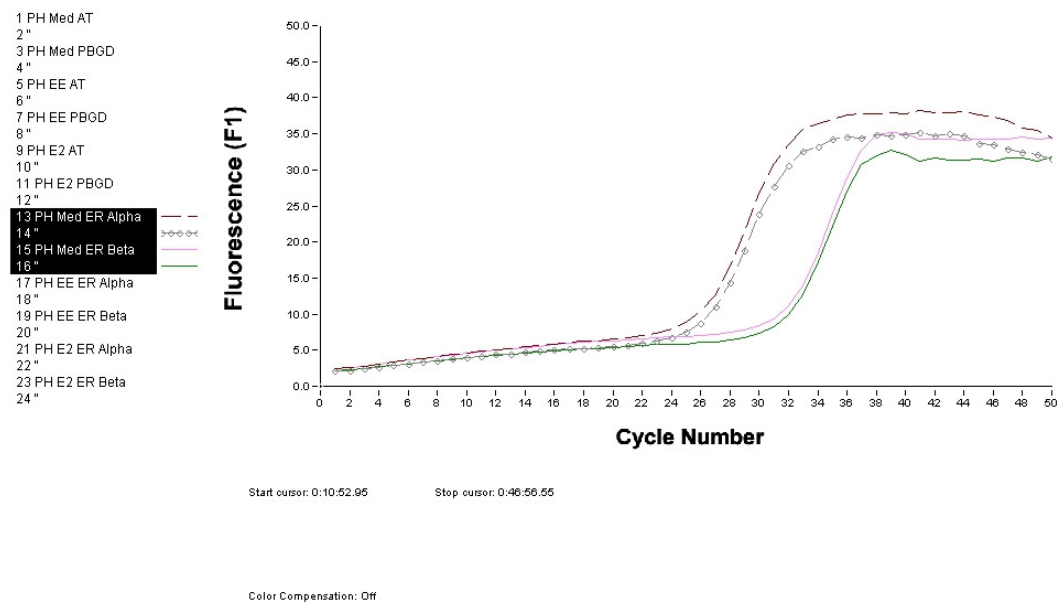
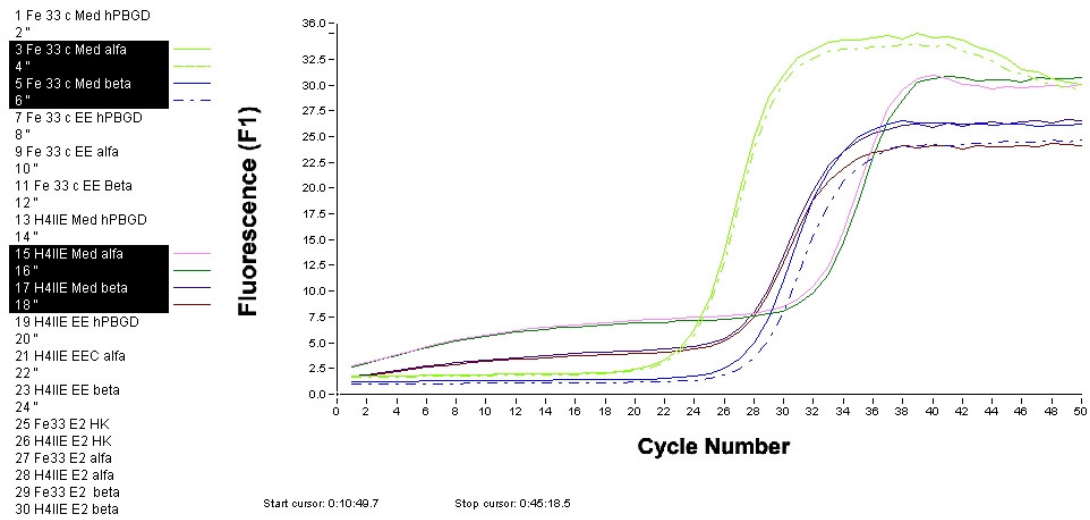


Abb. 9: Genexpression von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  in primären Hepatozyten.



Color Compensation: Off

Abb. 10: Genexpression von ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  in H4IIE- und Fe33-Zellen.

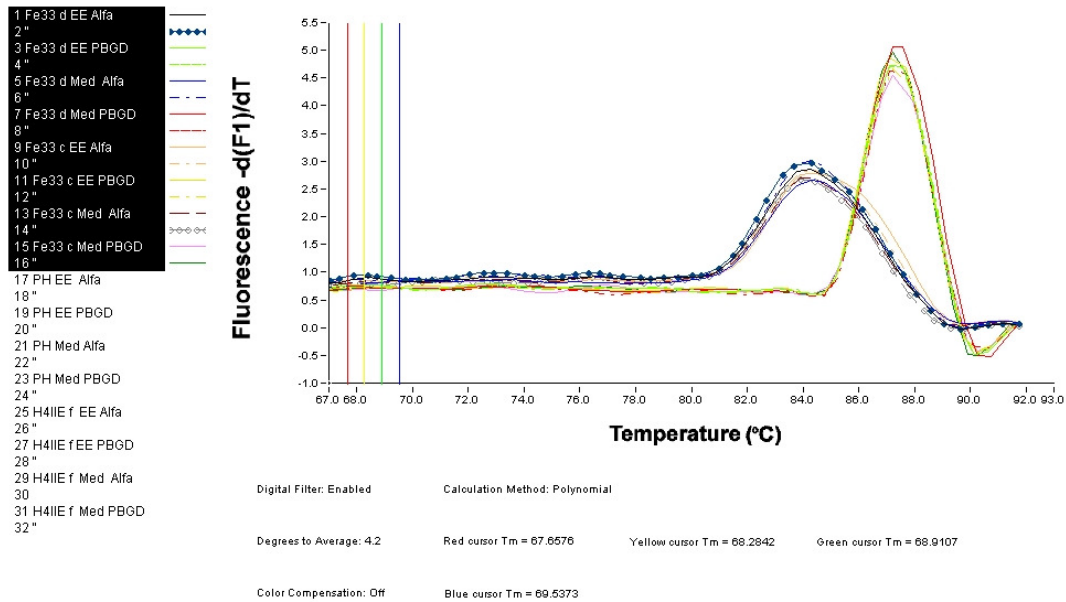


Abb. 11: Beispiel einer Schmelzkurve des Gens ER- $\alpha$  und des Housekeeping-Gens hPBGD. Die reine Genexpression, ohne Verunreinigungen, ist als Peak in der Schmelzkurve zu erkennen.



### Zusammenfassung:

Fe33-Zellen exprimieren beide ER-Subtypen. Der ER- $\alpha$ -Anteil überwiegt gegenüber dem ER- $\beta$ -Anteil deutlich.

H4IIE-Zellen besitzen im Allgemeinen nur eine geringe ER-Ausprägung. Der ER- $\beta$ -Anteil überwiegt gegenüber dem ER- $\alpha$ -Anteil.

Die primären Hepatozyten weisen sowohl einen ER- $\alpha$  als auch einen ER- $\beta$  auf. Der  $\alpha$ -Rezeptor überwiegt gegenüber dem  $\beta$ -Rezeptor.

### Angiotensinogen Expression

Die Positiv-Kontrolle bewirkt in den unterschiedlichen Zellsystemen folgende Expression des AT-Gens: In den Fe33-Zellen ist die Expression ähnlich der Medium-Kontrolle. Die H4IIE-Zellen haben eine deutliche Steigerung und die primären Ratten-Hepatozyten zeigen lediglich eine geringe Steigerung.

### Fe33-Zellen:

Die Positiv-Probe EE hat keinen Effekt auf die AT-Expression, wogegen E<sub>2</sub> eine Hemmung hervorruft. Die Werte liegen in ethanolischer Lösung bei 0,95 bzw. 0,61 und in wässriger Lösung bei 1,1 und 0,74. Die EE-Probe hat eine hohe Standardabweichung und das Ergebnis liegt nahe der Medium-Kontrolle.

Die niedrigste Genexpression ist unter dem Einfluss von E<sub>2</sub> zu beobachten.

Die Noni 1 - Probe zeigt eine mit der Konzentration ansteigende Wirkung ohne wesentliche Überschreitung der Medium-Kontrolle.

Die Noni 2 - Probe hat eine mit der Konzentration abnehmende Wirkung. In der kleinsten Konzentration kommt es zu einer Steigerung über die Medium-Kontrolle hinaus. Die 0,1  $\mu$ g/ml Konzentration hat eine hohe Standardabweichung. Der Anstieg an dieser Stelle ist daher nicht repräsentativ und könnte auf einem Artefakt beruhen.

Eine AT-Genexpression bei Fe33-Zellen durch Phytoestrogene wurde bereits im Vorfeld von K. Effenberger (138) untersucht. Unter einer Vielzahl von Pflanzenextrakten traten insbesondere CIM, PHA, SOY und SAR hervor. Eine Hochregulation des AT-Gens wurde am stärksten durch CIM erzielt, gefolgt von PHA, SAR und schließlich SOY.

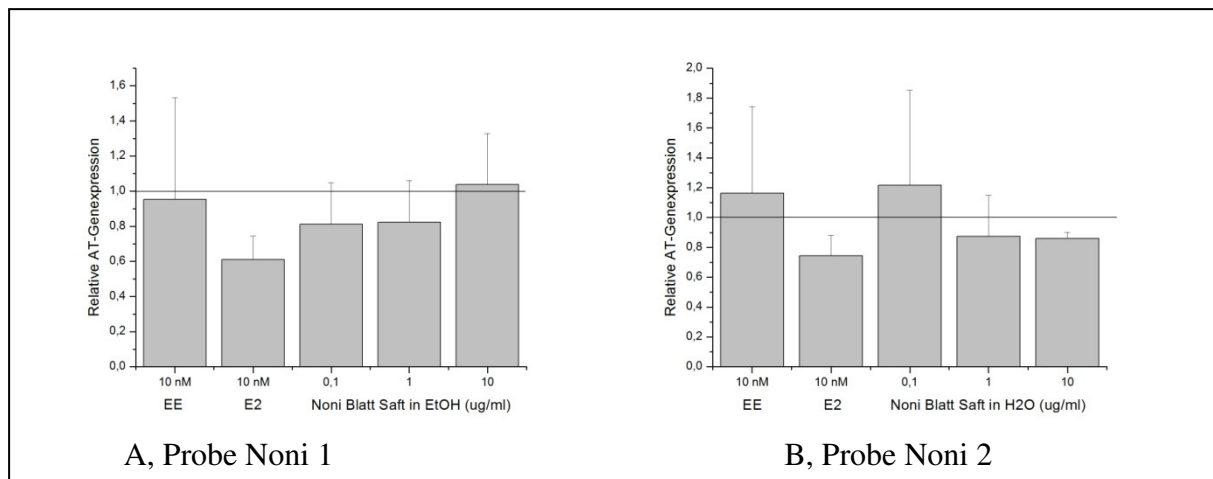


Abb. 12 A - B: Relative Genexpression von AT der mit der Probe Noni 1 bzw. Noni 2 behandelten Fe33-Zellen (n=3). Die durchgezogene Linie bei 1,0 entspricht der Negativ-Kontrolle.

### H4IIE-Zellen

Die Positiv-Proben EE und E<sub>2</sub> bewirken eine 1,39- und 1,41-fache Steigerung im Vergleich zur Medium-Kontrolle in ethanolischer Lösung. Die wässrigen Positiv-Proben liegen knapp über der Medium-Kontrolle bei den Werten 1,16 und 1,17. EE und E<sub>2</sub> bewirken in DMSO-Lösung eine ähnliche Steigerung um 1,65 bzw. um 1,67.

Die Ergebnisse der Testsubstanz Noni 1 liegen um den Wert 1,4 und damit nahe dem der Positiv-Kontrollen.

Die Noni 2 - Probe liegt knapp unter den Werten der Medium-Kontrolle ohne eine deutliche Konzentrationsabhängigkeit darzustellen.

Die PHA-Extrakte hemmen die Genexpression in zunehmender Konzentration.

Die niedrigste Konzentration der SAR-Probe bewirkt die höchste Steigerung bis zu 1,24. Die mittlere Konzentration liegt unter der Negativ-Probe. Die höchste Proben-Konzentration liegt leicht über der Medium-Kontrolle mit hoher Standardabweichung.

Die CIM-Testsubstanz liegt minimal über dem Wert der Medium-Kontrolle.

Die SOY-Probe zeigt in der niedrigsten Konzentration eine Steigerung um das 1,36-fache der Medium-Kontrolle. Mit der Konzentrationszunahme ist eine abfallende Wirkung zu beobachten. Die höchste Konzentration bewirkt eine 0,92-fache Genexpression.

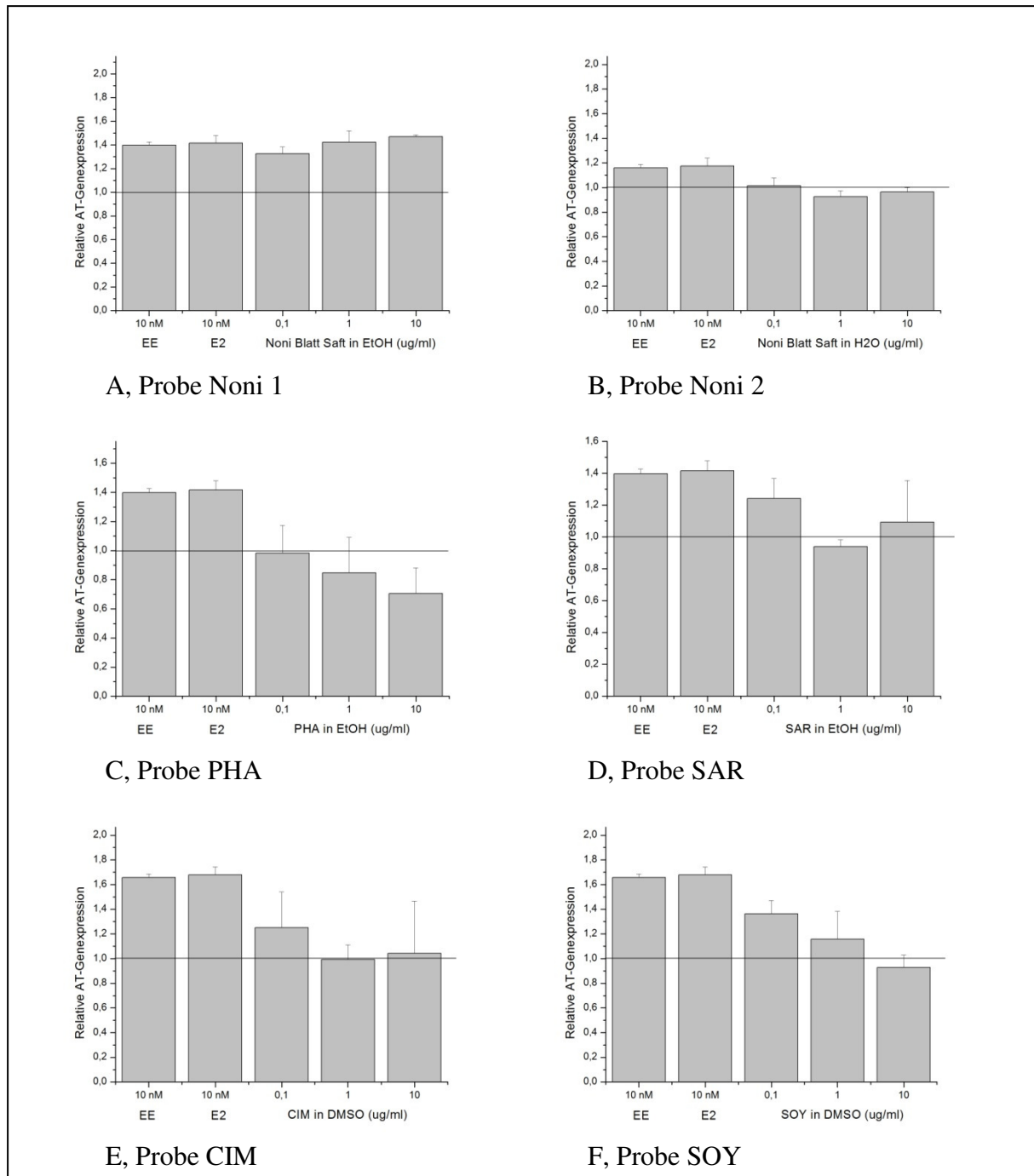


Abb. 13 A - F: Relative Genexpression von AT in H4IIE-Zellen, die mit den Proben Noni 1, Noni 2, PHA, SAR, CIM und SOY behandelt wurden (n=3). Die durchgezogene Linie bei 1,0 entspricht der Negativ-Kontrolle mit der Zugabe des entsprechenden Lösungsmittels.

### Primäre Hepatozyten:

Bei den primären Ratten-Hepatozyten hat die Positiv-Kontrolle EE eine schwächere Wirkung als E<sub>2</sub>. Beide Proben liegen nahe der Medium-Kontrolle bei 1-facher bzw. bei 1,2-facher Genexpression.

Die Ergebnisse der Noni 1 - Probe liegen deutlich über den Ergebnissen der Medium- und Positiv-Kontrollen in abnehmender Tendenz mit steigender Konzentration.

Die Ergebnisse der Noni 2 - Probe zeigen eine Stimulierung um das 1,2-fache. Eine Konzentrationsabhängigkeit ist nicht zu erkennen.

Die PHA-Probe bewirkt eine Steigerung der Genexpression über die Ergebnisse der Positiv-Kontrollen hinaus. Es liegt eine mit der Konzentration ansteigende Tendenz vor.

Die Ergebnisse der SAR-Probe liegen mit einer Steigerung der Genexpression über den Ergebnissen der Positiv-Kontrollen. Es kommt zu einer mit den Konzentrationen ansteigenden Tendenz mit Werten von 1,34 bis 1,61.

Die Ergebnisse der CIM-Probe liegen knapp über der Medium-Kontrolle ohne eine konzentrationsabhängige Tendenz erkennen zu lassen.

Die SOY-Proben haben in Abhängigkeit zur Konzentration einen abnehmenden Effekt. Die niedrigste Konzentration bewirkt eine 1,24-fache, die höchste Konzentration eine 0,98-fache Steigerung der Genexpression.

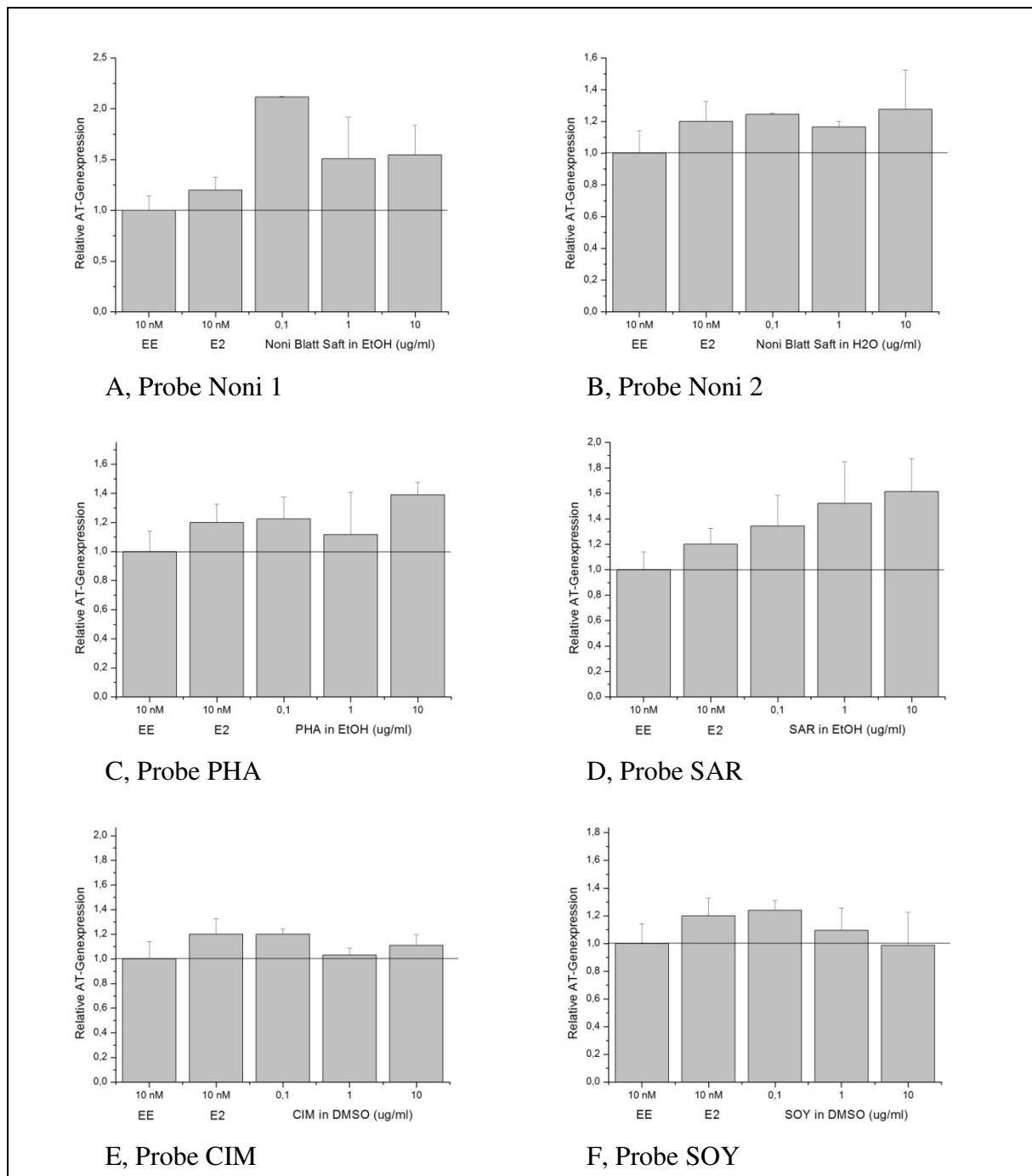


Abb. 14 A - F: Relative Genexpression von AT in primären Hepatozyten, die mit den Proben Noni 1, Noni 2, PHA, SAR, CIM und SOY behandelt wurden (n=3). Die durchgezogene Linie bei 1,0 entspricht der Negativ-Kontrolle mit der Zugabe des entsprechenden Lösungsmittels.

### Calcium-Binding-Protein Expression

In den Zellsystemen bewirken die Positiv-Proben folgende Änderung der Genexpression des CaBP-Gens: In den Fe33-Zellen steigt die Genexpression deutlich. In den H4IIE-Zellen erfolgt eine deutliche Absenkung der Expressionsaktivität durch die Positiv-Proben. Eine Ausnahmeposition nimmt hier die wässrige EE-Probe ein, die eine ähnliche Wirkung wie die Medium-Kontrolle zeigt. Die primären Ratten-Hepatozyten haben unter estrogenen Einflüssen eine geringere Expression des CaBP-Gens.

### Fe33-Zellen:

Die EE-Probe zeigt eine größere Steigerung als die E<sub>2</sub>-Probe. EE führt in ethanolischer Lösung zu einer 2,52-fachen, E<sub>2</sub> zu einer 1,25-fachen Steigerung der Genexpression im Vergleich zur Medium-Kontrolle. In wässriger Lösung liegen die Werte bei 2,6 und 1,29.

Die Ergebnisse der Noni 1 - Probe liegen um den Wert der Medium-Kontrolle. Es kommt zu einer minimalen Steigerung mit dem Konzentrationsanstieg.

Die Noni 2 - Ergebnisse liegen um den Wert der E<sub>2</sub>-Kontrolle. Die Genexpression wird ohne eine Konzentrationsabhängigkeit um den Wert 1,3 gesteigert.

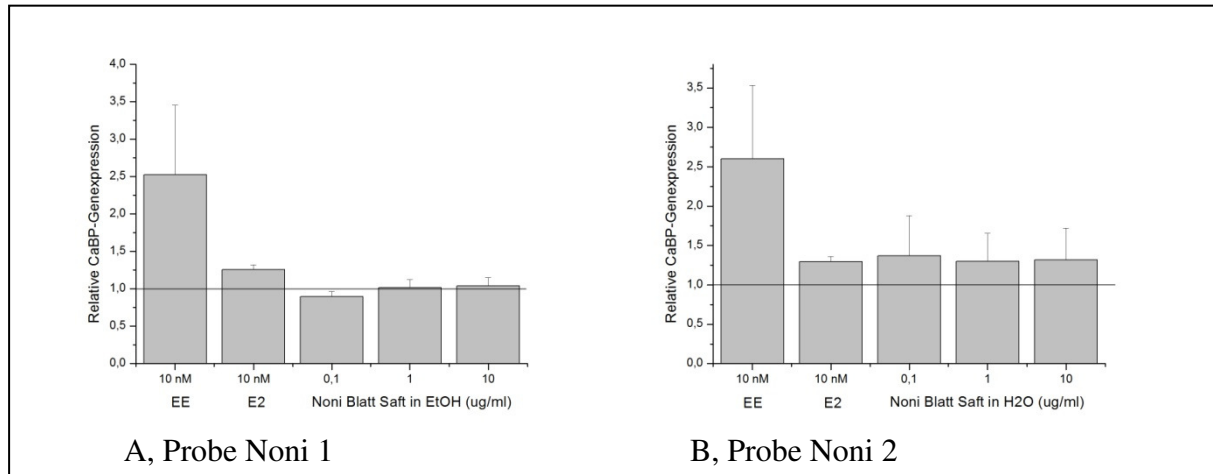


Abb. 15 A - B: Relative Genexpression von CaBP der mit der Probe Noni 1 bzw. Noni 2 behandelten Fe33-Zellen (n=3). Die durchgezogene Linie bei 1,0 entspricht der Negativ-Kontrolle.

Im Vorfeld wurde die CaBP-Genexpression an Fe33-Zellen durch Phytoestrogene von K. Effenberger (138) untersucht. Die Extrakte PHA, SAR und CIM bewirkten eine Steigerung der CaBP-Genexpression, nicht hingegen der SOY-Extrakt.

#### H4IIE-Zellen:

Die Positiv-Proben im ethanolischen Lösungsmittel liegen unter der Medium-Kontrolle mit einem Wert von 0,74 bzw. 0,78. Die wässrig gelösten Proben liegen nahe der Medium-Kontrolle bei 0,97 bzw. 1,02. EE und E<sub>2</sub> bewirken in DMSO eine geringere Genexpression mit einem 0,58-fachen bzw. 0,62-fachen Wert der Medium-Kontrolle.

Die Noni 1 - Ergebnisse liegen bei etwa 0,6-facher Genexpression. Dieser Wert ist sowohl geringer als das Ergebnis der Negativ-, als auch der Positiv-Kontrolle.

Die Ergebnisse der Noni 2 - Probe unterscheiden sich kaum von der Positiv- oder Negativ-Kontrolle. Tendenziell ist eine abnehmende Wirkung mit zunehmender Konzentration zu erkennen.

Die Testsubstanz PHA bewirkt eine zunehmende Genexpression in steigender Konzentration. Die höchste Konzentration bewirkt mit einem Wert von 0,73 eine annähernde Expression an die Positiv-Probe.

Die SAR-Proben zeigen eine mit der Konzentration zunehmende Hemmung von 0,94 bis 0,5. Die Standardabweichung der niedrigsten Konzentration liegt sehr hoch.

Die Ergebnisse der CIM-Probe liegen deutlich unter der Negativ-Kontrolle. Eine Konzentrationstendenz ist nicht auszumachen. Der Wert der mittleren Konzentration liegt bei 0,83-facher Genexpression, die niedrigste und höchste Konzentration liegt unter der Positiv-Kontrolle bei 0,54 bzw. bei 0,43.

Die Ergebnisse der SOY-Probe liegen, unabhängig von der Konzentration, unterhalb der Positiv-Proben bei einem Wert um 0,5.

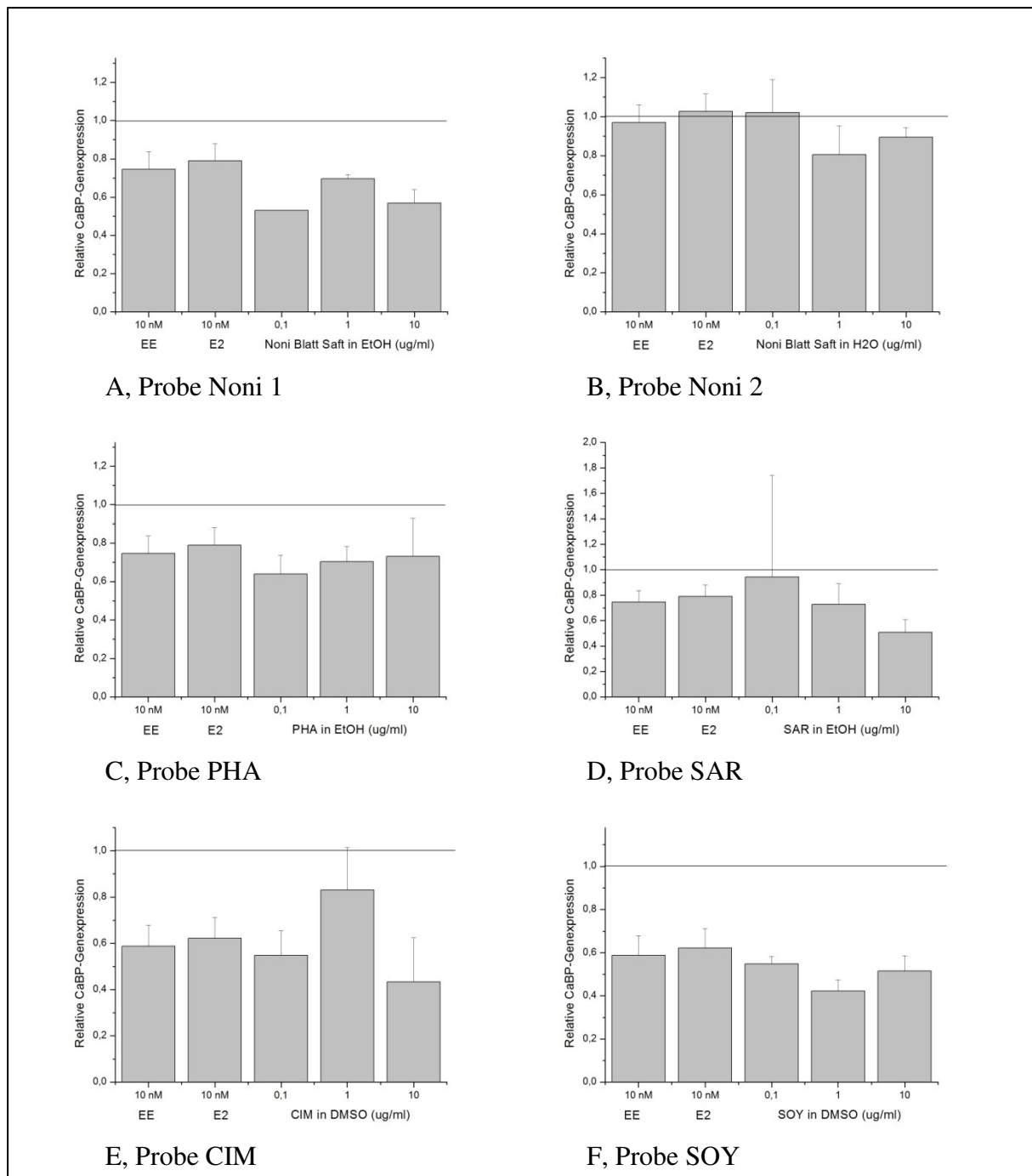


Abb. 16 A - F: Relative Genexpression von CaBP in H4IIE-Zellen, die mit den Proben Noni 1, Noni 2, PHA, SAR, CIM und SOY behandelt wurden (n=3). Die durchgezogene Linie bei 1,0 entspricht der Negativ-Kontrolle mit der Zugabe des entsprechenden Lösungsmittels.



### Primäre Hepatozyten:

Die Werte der Positiv-Proben EE und E<sub>2</sub> liegen unter der Medium-Kontrolle bei 0,85- bzw. 0,77-facher Genexpression. Die Standardabweichung ist hoch.

Die Noni 1-Proben zeigen konzentrationsabhängig eine sinkende Genexpression mit Werten um 0,6.

Die Noni 2-Proben zeigen konzentrationsabhängig eine Steigerung der Genexpression mit Werten von 0,44 bis 1,19.

Die PHA-Probe bewirkt konzentrationsabhängig eine sinkende Genexpression, beginnend bei der niedrigsten Konzentration mit 1,02- bis zu einem 0,52-fachen Wert in der höchsten Konzentration.

Die Werte der SAR-Probe liegen konzentrationsunabhängig mit einer gehemmten Genexpression bei Werten um 0,5.

Die CIM-Probe zeigt, bei hoher Standardabweichung, Ergebnisse mit tendenziell absteigenden Werten von 0,6 bis 0,51. Eine Ausnahme stellt die mittlere Konzentration dar, die eine 1,1-fache Stimulierung vorweist.

Die SOY-Probe zeigt, bei hoher Standardabweichung, Ergebnisse mit tendenziell absteigenden Werten von 0,8 bis 0,53. Eine Ausnahme stellt die mittlere Konzentration dar, die eine 1,47-fache Stimulierung vorweist.

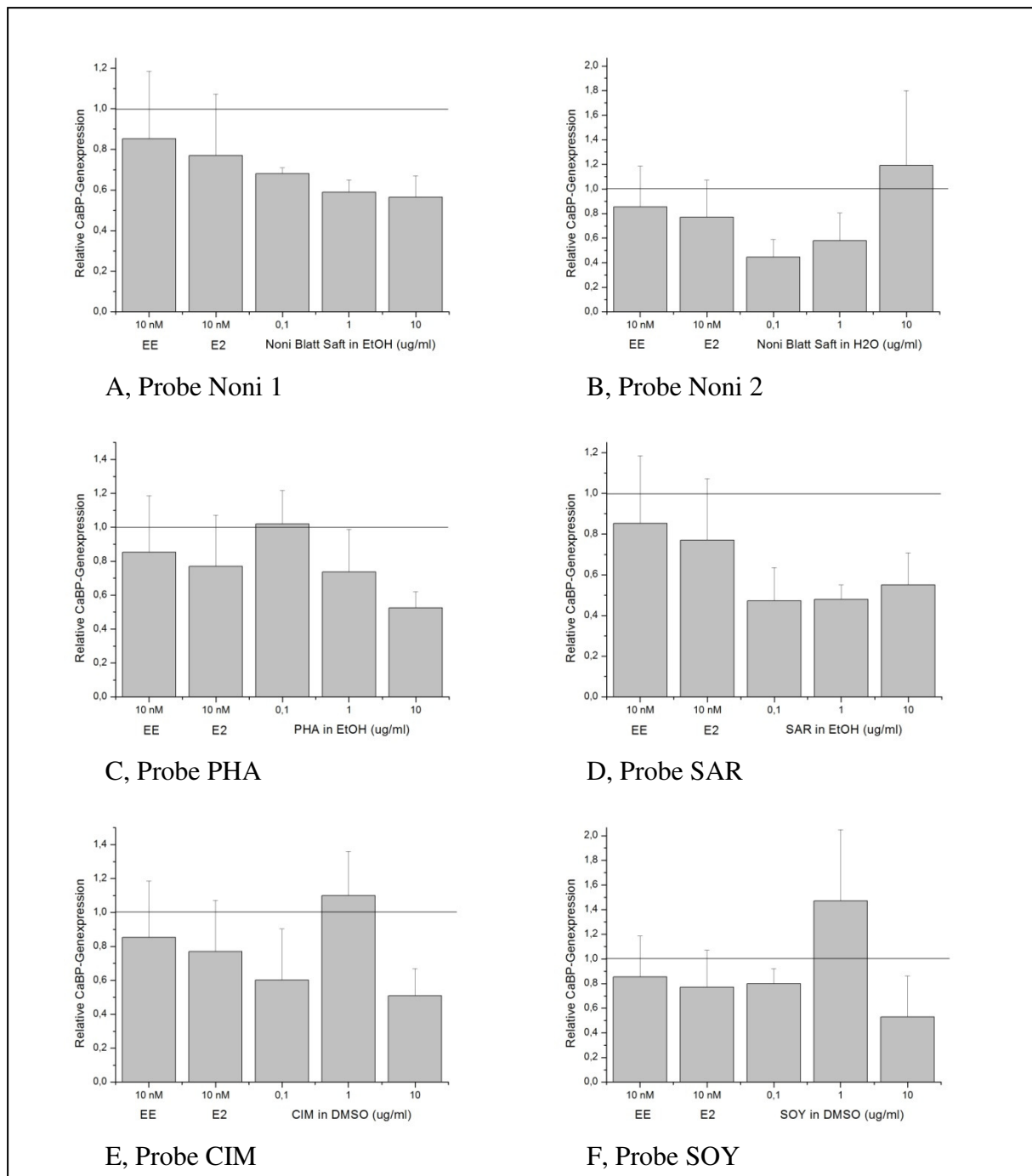


Abb. 17 A - F: Relative Genexpression von CaBP in primären Hepatozyten, die mit den Proben Noni 1, Noni 2, PHA, SAR, CIM und SOY behandelt wurden (n=3). Die durchgezogene Linie bei 1,0 entspricht der Negativ-Kontrolle mit der Zugabe des entsprechenden Lösungsmittels.

## 5.2 Toxizitätstests

### 5.2.1 Ames Test

Im Versuch kommen folgende fünf Stämme von *Salmonella typhimurium* zum Einsatz: TA97, TA98, TA100, TA1537 und TA1538.

Als Positiv-Proben dienen 2-Nitrofluoren, 2-Aminoanthracen und Natriumazid. Als Negativ-Kontrolle wird das entsprechende Lösungsmittel DMSO verwendet. Die Testsubstanz ist Tahiti Noni Leaf Tea (TNLT) in den Konzentrationen 0,6 mg, 2 mg, 6 mg und 20 mg/Platte.

Tab. 10:

Testung der Mutagenität von TNLT in steigenden Konzentrationen am Stamm TA97

Testsubstanz	Konzentration [mg/ Platte]	Mutationen je Platte		Quotient	
		-S9	+S9	-S9	+S9
Negativ-Probe	200 µl	124 ± 20	143 ± 20	1,0	1,0
TNLT	0,6	92 ± 7	94 ± 5	0,7	0,7
TNLT	2	88 ± 9	112 ± 8	0,7	0,8
TNLT	6	112 ± 27	137 ± 13	0,9	1,0
TNLT	20	126 ± 23	135 ± 14	1,0	0,9
2-Nitrofluoren	2 µg/Platte	375 ± 7	X	3,0	X
2-Aminoanthracen	1 µg/Platte	140 ± 15	1040 ± 230	1,1	7,3

Tab. 11:

Testung der Mutagenität von TNLT in steigenden Konzentrationen am Stamm TA98

Testsubstanz	Konzentration [mg/ Platte]	Mutationen je Platte		Quotient	
		-S9	+S9	-S9	+S9
Negativ-Probe	200 µl	33 ± 4	37 ± 4	1,0	1,0
TNLT	0,6	41 ± 5	44 ± 3	1,2	1,2
TNLT	2	39 ± 7	46 ± 6	1,2	1,2
TNLT	6	47 ± 9	72 ± 15	1,4	2,0
TNLT	20	54 ± 2	72 ± 6	1,6	2,0
2- Nitrofluoren	2 µg/Platte	605 ± 87	X	18,1	X
2-Aminoanthracen	1 µg/Platte	67 ± 13	1725 ± 137	2,0	47,0

Tab. 12:

Testung der Mutagenität von TNLT in steigenden Konzentrationen am Stamm TA100

Testsubstanz	Konzentration [mg/ Platte]	Mutationen je Platte		Quotient	
		-S9	+S9	-S9	+S9
Negativ-Probe	200 µl	209 ± 17	198 ± 9	1,0	1,0
TNLT	0,6	206 ± 10	211 ± 18	1,0	1,1
TNLT	2	210 ± 9	189 ± 14	1,0	1,0
TNLT	6	208 ± 23	233 ± 12	1,0	1,2
TNLT	20	249 ± 18	226 ± 24	1,2	1,1
Natriumazid	1 µg/Platte	846 ± 26	X	4,0	X
2-Aminoanthracen	1 µg/Platte	227 ± 19	1332 ± 79	1,1	6,7

Tab. 13:

Testung der Mutagenität von TNLT in steigenden Konzentrationen am Stamm TA1537

Testsubstanz	Konzentration [mg/ Platte]	Mutationen je Platte		Quotient	
		-S9	+S9	-S9	+S9
Negativ-Probe	200 µl	10 ± 3	9 ± 2	1,0	1,0
TNLT	0,6	8 ± 1	10 ± 1	0,8	1,1
TNLT	2	10 ± 1	10 ± 2	1,0	1,1
TNLT	6	10 ± 4	8 ± 2	1,0	0,9
TNLT	20	11 ± 2	13 ± 2	1,1	1,5
2- Nitrofluoren	2 µg/Platte	34 ± 5	X	3,4	X
2-Aminoanthracen	1 µg/Platte	9 ± 3	192 ± 15	0,9	22,2

Tab. 14:

Testung der Mutagenität von TNLT in steigenden Konzentrationen am Stamm TA1538

Testsubstanz	Konzentration [mg/ Platte]	Mutationen je Platte		Quotient	
		-S9	+S9	-S9	+S9
Negativ-Probe	200 µl	11 ± 1	16 ± 3	1,0	1,0
TNLT	0,6	12 ± 4	16 ± 4	1,1	1,0
TNLT	2	Platten sind kontaminiert			
TNLT	6	13 ± 4	13 ± 1	1,2	0,9
TNLT	20	12 ± 1	13 ± 3	1,1	0,8
2- Nitroflouren	2 µg/Platte	554 ± 24	X	50,4	X
2-Aminoanthracen	1 µg/Platte	19 ± 4	1337 ± 106	1,8	85,3

#### Auswertung des Ames Tests:

In Tab. 10 - 14 werden die Mittelwerte einer Dreifachbestimmung mit der entsprechenden Standardabweichung dargestellt. Es erfolgt einmal die Messung ohne und einmal mit metabolischer Aktivierung durch den S9-Mix. Zunächst wird die Zahl der Mutationen je Platte gezeigt. Diese Werte werden anschließend auf die Negativ-Probe normiert.

Die Testsubstanz zeigt in sämtlichen Konzentrationen in den verschiedenen Salmonella Stämmen ein negatives Mutationsergebnis. Lediglich im Stamm TA98 wird in den beiden höchsten Konzentrationen mit der Zugabe von S9-Mix eine zweifache Mutationshäufigkeit festgestellt.

#### **5.2.2 V79-HPRT-Test**

Am V79-Zellsystem wird die Mutagenität von wässrig gelöstem Tahiti Noni Leaf Tea (TNLT) getestet. Die Probe kommt in Konzentrationen von 0,3 mg/ml, 1 mg/ml, 3 mg/ml, 6 mg/ml bis 10 mg/ml zum Einsatz. Von der Substanzstammlösung werden also jeweils 1 µl/ml, 3 µl/ml, 10 µl/ml, 30 µl/ml, 60 µl/ml und 100 µl/ml den Zellen hinzugefügt.

Der Versuch wird sowohl zur Prüfung der direkten Mutagenität als auch zur Prüfung der indirekten Mutagenität, nach metabolischer Aktivierung durch Zugabe eines S9-Mixes, durchgeführt.

N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) wird zur Positiv-Kontrolle der direkten Mutagenität angewendet. 7,12-Dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) wird zur Positiv-Kontrolle der indirekten Mutagenität, nach Metabolisierung durch den S9-Mix, angewendet.

Tab. 15: Testung der Mutagenität von TNLT im V79-Testsystem ohne S9-Mix.

MNNG= N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin

Testsubstanz	Konzentration	CFE1	CFE2	Mutanten	Mutanten
	[ $\mu\text{l/ml}$ ]	Kolonien je Platte			je $10^5$ überlebende Zellen
Negativ-Probe		$66,5 \pm 1,5$	$101,6 \pm 10,7$	$3,0 \pm 1,2$	$1,2 \pm 0,5$
MNNG	1 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$21,5 \pm 5,5$	$28,0 \pm 4,6$	$24,6 \pm 2,1$	$35,1 \pm 3,0$
TNLT	3	$55,0 \pm 1,0$	$98,7 \pm 6,7$	$1,6 \pm 1,1$	$0,7 \pm 0,5$
TNLT	10	$63,0 \pm 4,0$	$78,6 \pm 13,7$	$3,4 \pm 0,9$	$1,7 \pm 0,5$
TNLT	30	$59,0 \pm 1,0$	$87,6 \pm 8,4$	$2,4 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,3$
TNLT	60	$57,0 \pm 5,0$	$132,7 \pm 6,5$	$3,0 \pm 1,2$	$0,9 \pm 0,4$
TNLT	100	$30,0 \pm 2,0$	$121,7 \pm 16,0$	$3,0 \pm 1,4$	$1,0 \pm 0,5$

Tab. 16: Testung der Mutagenität von TNLT im V79-Testsystem mit S9-Mix-Zugabe.

DMBA= 7,12, Dimethylbenz[a]anthracen

Testsubstanz	Konzentration	CFE1	CFE2	Mutanten	Mutanten
	[ $\mu\text{l/ml}$ ]	Kolonien je Platte			je $10^5$ überlebende Zellen
Negativ-Probe		$56,0 \pm 0,0$	$128,7 \pm 9,1$	$4,0 \pm 1,9$	$1,2 \pm 0,6$
DMBA	4 [ $\mu\text{g/ml}$ ]	$24,5 \pm 1,5$	$46,7 \pm 8,4$	$26,0 \pm 3,4$	$22,1 \pm 2,9$
TNLT	3	$60,0 \pm 5,0$	$76,0 \pm 3,5$	$6,8 \pm 2,5$	$3,6 \pm 1,3$
TNLT	10	$61,0 \pm 11,0$	$74,0 \pm 1,0$	$3,0 \pm 1,4$	$1,6 \pm 0,8$
TNLT	30	$58,0 \pm 5,0$	$92,7 \pm 12,6$	$2,2 \pm 1,3$	$1,0 \pm 0,6$
TNLT	60	$54,0 \pm 3,0$	$73,6 \pm 6,8$	$2,4 \pm 1,1$	$1,3 \pm 0,6$
TNLT	100	$54,0 \pm 4,0$	$77,0 \pm 18,0$	$7,0 \pm 3,1$	$3,6 \pm 1,6$

### Auswertungen des V79-HPRT-Tests:

In der Messung wird zunächst die CFE1 (Colony Forming Efficiency), die die Überlebensrate darstellt, bestimmt. Die CEF2 stellt die Koloniezahl nach der Selektionsbehandlung dar. Es handelt sich hierbei um einen Mittelwert aus einer Fünffachbestimmung mit der entsprechenden Standardabweichung. Es werden die Mutationen je Platte fünffach bestimmt und die Mutationsraten pro  $10^5$  überlebende Zellen errechnet.

Die Überlebensrate wird lediglich in der höchsten Substanzkonzentration, ohne S9-Mix, reduziert. In der Messung mit S9-Mix tritt diesbezüglich keinerlei Beeinträchtigung auf. Die Mutationsrate wird im Test ohne S9-Mix durchweg nicht erhöht.

Im Test mit S9-Mix treten positive Mutationsraten auf mit einer annähernden Verdopplung der Kontroll-Werte in den Konzentrationen 3 und 100  $\mu\text{l/ml}$ . Dieser positive Befund weist allerdings keine Dosis - Wirkungsbeziehung auf und wird daher nicht als positives Ergebnis gewertet.

Im Allgemeinen ist die Überlebensrate der Kontrolle geringfügig höher als die der Testsubstanzen, was allerdings auf eine schwache Toxizität hinweist.

### **5.2.3 UDS-Test**

Im DNA-Reparatur-Test wird die DNA-schädigende Wirkung von ethanolisch gelöstem Tahiti Noni LeaF Tea (TNLT) geprüft. Die Substanz wird dem Zellmedium (2 ml) in steigenden Dosierungen von 0,01 / 0,03 / 0,06 / 0,1 / 0,3 / 0,6 / 1,0 / 3,0 / 6,0 bis 10,0  $\mu\text{l}$  hinzugefügt.

Positiv-Kontrollen sind 2-Acteylaminofluoren (AAF) und UV-Licht bei  $\lambda = 245 \text{ nm}$ . Mit AAF wird die indirekte, mit UV-Licht die direkte DNA-schädigende Wirkung überprüft.

Tab. 17: Testung der DNA-schädigenden Wirkung von TNLT im ersten UDS-Test

Testsubstanz	Konzentration [µl/ml]	Anzahl der Silberkörper/ Nukleus	% positive Nuklei	p-Wert
Negativ-Kontrolle		-4,4 ± 5,2	4,4	
UV-Licht	10 s.	47,6 ± 18,9	100	<0,001
AAF	10 µg/ml	41,5 ± 20,1	100	<0,001
TNLT	0,01	-3,1 ± 5,4	3,3	0,055
TNLT	0,03	-4,3 ± 5,4	5,6	0,421
TNLT	0,06	-3,3 ± 4,7	5,6	0,055
TNLT	0,1	-3,3 ± 5,5	4,4	0,081
TNLT	0,3	-4,3 ± 5,3	2,2	0,421
TNLT	0,6	-3,2 ± 5,5	6,7	0,067
TNLT	1	-5,0 ± 5,6	3,3	0,500
TNLT	3	-3,4 ± 4,5	3,3	0,081
TNLT	6	-6,1 ± 5,1	0,0	0,500
TNLT	10	-3,4 ± 6,0	10,0	0,115

Tab. 18: Testung der DNA-schädigenden Wirkung von TNLT im zweiten UDS-Test

Testsubstanz	Konzentration [µl/ml]	Anzahl der Silberkörper/ Nukleus	% positive Nuklei	p-Wert
Negativ-Kontrolle		-2,9 ± 6,9	5,6	
UV-Licht	10 s.	35,0 ± 19,4	98,9	<0,001
AAF	10 µg/ml	26,1 ± 15,4	97,8	<0,001
TNLT	0,01	-4,1 ± 7,4	7,8	0,500
TNLT	0,03	-2,0 ± 4,8	10,0	0,159
TNLT	0,06	-2,1 ± 5,5	6,7	0,184
TNLT	0,1	-2,7 ± 5,3	6,7	0,421
TNLT	0,3	-2,8 ± 5,8	10,0	0,460
TNLT	0,6	-1,9 ± 4,4	7,8	0,136
TNLT	1	-0,8 ± 5,3	12,2	0,008
TNLT	3	-1,8 ± 5,2	8,9	0,097
TNLT	6	-0,7 ± 4,7	21,1	0,001
TNLT	10	-2,5 ± 5,4	7,8	0,345



#### Auswertung des DNA-Reparatur-Tests:

Je Testsubstanz erfolgt eine Dreifachbestimmung. Je Objektträger werden die Silberkörner in 30 Nukleus- und 90 Zytoplasmaregionen ausgezählt. Entsprechend der Auszählung wird der Prozentsatz der positiven Nuklei, deren Netto-Silberkornanzahl über 5 liegt, bestimmt. Der p-Wert wird aus dem t-Wert errechnet.

Der Test wird als positiv gewertet, wenn folgende drei Kriterien zutreffen:

1. Mittelwert der Nettosilberkörner / Nukleus  $\geq 5,0$
2. Prozentsatz der positiven Zellen  $> 50 \%$
3. p-Wert  $< 0,01$

In beiden Testdurchläufen erfüllt die Probe in keiner der getesteten Konzentrationen die Kriterien für einen positiven Befund. Die Positiv-Kontrollen mit UV-Licht und AAF weisen hingegen stark auffällige Werte auf.

Die Testsubstanz zeigt im UDS-Test keinerlei DNA-schädigende Wirkung.

## 6 Diskussion der Ergebnisse

In der Arbeit wurden qualitative und quantitative zellphysiologische Untersuchungen zur Überprüfung von estrogenen Eigenschaften von *Morinda citrifolia* (Noni) Blatt-Extrakten sowie einigen anderen Pflanzen-Extrakten durchgeführt. Im Versuch wurden die Pflanzenextrakte in einem Konzentrationsbereich untersucht, der der ED<sub>50</sub> von Flavonoiden entspricht (181). Die *Morinda citrifolia* Blatt-Extrakte wurden in zwei verschiedenen Zellkulturmethoden und im PCR-Versuch untersucht. Die Pflanzen-Extrakte von *Cimicifuga racemosa* (Traubensilberkerze), *Glycine max* (Soja), *Phaseolus vulgaris* (Gartenbohne) und *Sarothamnus scoparius* (Besenginster) wurden lediglich im PCR-Versuch überprüft. Diese Pflanzen zeigten bereits in Voruntersuchungen von K. Effenberger estrogenen Eigenschaften (138). Die Noni-Pflanze wird in der traditionellen Medizin im tropischen Raum angewandt und ist heutzutage als neuartiges Lebensmittel auch in der westlichen Welt verbreitet. Im Blickpunkt vorausgehender Versuche stand der Noni-Saft, der aus den Früchten gewonnen wird. Die Heilpflanze wird aber auch als Blätter-Tee angewendet. Die vorliegenden Untersuchungen sollten klären, inwieweit estrogenen Wirkungen aus Blatt-Extraktionen nachvollziehbar sind. Es wurden Blatt-Proben verschiedener Herkunft untersucht, um festzustellen, ob Pflanzen verschiedener Regionen eine unterschiedliche Wirkung zeigen. Für die Versuche standen Blattproben aus Tahiti und von den Malediven sowie ein Blätter-Tee von den Marquesas-Inseln zur Verfügung. Weitere Noni-Extrakte wurden geprüft, deren Blätter mit unterschiedlichen Lösungsmitteln extrahiert wurden. Wirkstoffe hoher Polarität sind in wässrigen Extrakten, Wirkstoffe mittlerer Polarität sind in Ethanol- und Methanol-Extrakten und unpolare Wirkstoffe sind in Hexan-Extraktionen zu erwarten. Dennoch wird es sich auch in den jeweiligen Extraktionen um hoch komplexe Stoffgemische handeln. Im Anschluss an die vorliegenden, orientierenden Untersuchungen sollten diese Pflanzenextrakte zielgerichtet auf Inhalts- und Wirkstoffe analysiert werden.

Auch bei pflanzlichen Heilmitteln sind unerwünschte Nebenwirkungen zu erwarten. Insbesondere kommt es immer wieder zu Berichten über eine mögliche Lebertoxizität. Im Zuge der Zulassung von Noni-Produkten als neuartige Lebensmittel auf dem europäischen Markt wurde diesbezüglich die Noni-Pflanze ausführlich untersucht und dieser Verdacht konnte ausgeräumt werden. Bei der Einführung eines neuartigen Lebensmittels sind Toxizitätstests unabdingbar. Von besonderem Interesse sind dabei Verfahren, die mögliche mutagene oder kanzerogene Wirkungen detektieren. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb Noni-Blatt-Extrakte auf eine genotoxische Wirkung hin untersucht.

Genotoxische Wirkungen werden bei der traditionellen Anwendung meistens nicht bemerkt, weil ihre Auswirkungen, z.B. das Wachstum maligner Tumoren, erst Jahre oder Jahrzehnte später auftreten und einen direkten Zusammenhang mit der Anwendung nicht erkennen lassen. Dagegen werden akut toxische Wirkungen alsbald erkannt, weshalb solche Pflanzen auch in den Naturvölkern als „Giftpflanzen“ bekannt sind.

## 6.1 Diskussion estrogener Wirkungen von pflanzlichen Drogen

### Wirkung auf die Induktion von alkalischer Phosphatase in Endometriumkarzinomzellen

Die Stimulation der alkalischen Phosphatase in Ishikawa-Zellen ist ein Standardverfahren zur Ermittlung eines estrogenen Effekts von Chemikalien und komplexen Stoffgemischen. Die Zellen exprimieren beide Estrogenrezeptor-Subtypen. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bestätigen eine Stimulierung der alkalischen Phosphatase Aktivität in Ishikawa-Zellen durch estrogenen Einflüsse. Die Positiv-Kontrolle mit synthetischem Ethinylestradiol führte in den vorliegenden Untersuchungen zu einer 1,5-fachen Stimulierung der Enzymaktivität.

Wässrige Auszüge aus Noni-Blättern, die der Zubereitung eines Tees entsprechen, führten zu hemmenden Effekten auf die AP-Induktion. Diese war im Falle des Tees, der aus Blättern von den Marquesas-Inseln zubereitet wurde, am deutlichsten zu beobachten. Auch Noni-Blatt-Extrakte mit den organischen Lösungsmitteln Methanol, Ethanol und Hexan erzeugten eine dosisabhängige Abnahme der AP-Induktion. Dies trat am stärksten im Hexan-Extrakt hervor. Der Effekt ist mit der These vereinbar, dass Phytoestrogene einen partiellen agonistisch / antagonistischen Effekt entfalten. Man bezeichnet solche Stoffe auch als SERM (Selektive Estrogen Rezeptor Modulator). Das Zellkulturmedium enthält stets geringe Konzentrationen an natürlichen Estrogenen, die aus dem Zusatz von Blutserum stammen. Diese estrogenen Inhaltsstoffe besitzen eine hohe intrinsische Aktivität. Sie könnten durch die schwächer wirksamen Phytoestrogene vom Rezeptor verdrängt werden, wodurch die intrinsische Aktivität insgesamt abgeschwächt wird. Ist der Rezeptor hingegen nicht gesättigt, so können sich die starken intrinsischen Wirkungen der natürlichen Estrogene und die schwächer wirksamen der Phytoestrogene ergänzen, so dass insgesamt eine Steigerung des Effekts resultiert. Da Phytoestrogene überwiegend an ER- $\beta$  binden, könnten die hemmenden Effekte

auch durch Bildung von Komplexen mit diesem Rezeptor-Subtyp verursacht sein, der sich häufig antagonistisch zum ER- $\alpha$ -Komplex verhält.

Einzelne Proben (Tee EtOH / Probe Nr. 6 / 1 $\mu$ g/ml) bewirkten hingegen einen Effekt, der vergleichbar stark war, wie der der Positiv-Kontrolle (1,4-fache Stimulierung). Dieses Ergebnis spricht für die Präsenz von phytoestrogenen Bestandteilen, die auf den  $\alpha$ -Rezeptor wirken.

#### Wirkung auf die Induktion von Luciferase in Mammakarzinomzellen

Der LUC-Assay ist ein bewährtes System zur Untersuchung estrogener Stoffe. Dabei wird ein Luciferase-Gen hinter einem Estrogenrezeptor-Response-Element in die DNA eingebaut, so dass es durch Estrogen-ER-Komplexe aktiviert wird. In Voruntersuchungen wurde eine konzentrations-abhängige estrogene Stimulierung des Systems belegt (155). Auch die Ergebnisse der Positiv-Proben in den eigenen Untersuchungen zeigten einen solchen Effekt. Es fand eine dosisabhängige Stimulierung der Lichtausbeute statt.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit Noni-Blatt-Extrakten erbrachten auch in diesem System Hinweise auf das Vorhandensein estrogen-wirksamer Inhaltsstoffe.

Methanolische Auszüge der Noni-Blätter (Probe Nr. 7) bewirkten in den MVLN-Zellen eine Stimulierung, die annähernd an die der Positiv-Kontrolle herankam. Die wässrigen Extrakte wiesen dagegen keine wesentliche Unterscheidung zur Medium-Kontrolle auf. Hingegen war eine hemmende Wirkung bei den ethanolischen Extrakten zu beobachten. Dieser Effekt tritt wahrscheinlich unabhängig von Estrogenrezeptoren auf, weil MVLN-Zellen im Vergleich zu ER- $\alpha$  nur eine sehr geringe Konzentration von ER- $\beta$  besitzen, der im Allgemeinen eine Hemmung der estrogenen Antwort vermittelt. Die stärkste LUC-Expression fand sich, wenn gefriergetrockneter Presssaft der Blätter angewendet wurde. Offenbar werden in diesem Auszug die höchsten Konzentrationen an Phytoestrogenen erreicht.

Insgesamt sind die Ergebnisse aus diesem Testsystem inhomogen. Offensichtlich scheinen in den Noni-Blättern tatsächlich Phytoestrogene vorhanden zu sein. Ob diese in dem Testsystem zu einem positiven Ergebnis führen, hängt neben der Konzentration aber wesentlich von den Extraktionsbedingungen ab. Man darf auch nicht vergessen, dass es sich hier um ein (artifizielles) in vitro System handelt. Die wirksamen Substanzen liegen in den Extrakten teilweise oder sogar überwiegend als Glykoside vor. In dieser Form gelangen sie nur schwer in die Zelle hinein. Wässrige Auszüge enthalten vorwiegend die gut wasserlöslichen Glykoside, was deren negative Effekte erklären könnte. Hexan hingegen extrahiert nur die sehr lipophilen Aglyka. Scheinbar war davon aber nicht genügend in dem Blattmaterial

vorhanden, um deutliche Effekte hervorzurufen. Offenbar hat Methanol gerade das richtige Extraktionsvermögen, um genügend wirksame Phytoestrogene zu extrahieren. Im gefriergetrockneten Blatt-Saft hingegen wird eine Konzentration erreicht, die mit den Lösungsmitteln nicht erreicht wurde.

MCF-7-Zellen, und somit auch die MVLN-Zellen, besitzen sowohl einen ER- $\alpha$  als auch einen ER- $\beta$ . Der ER- $\alpha$ -Anteil überwiegt allerdings deutlich. Man darf daher vermuten, dass die beobachtete Aktivierung der LUC-Aktivität in erster Linie durch Komplexbildung der Phytoestrogene mit dem ER- $\alpha$  erzielt wurde. Im Allgemeinen binden Phytoestrogene vornehmlich an den ER- $\beta$  (44). Da wir aber nicht wissen, welche Substanzen im vorliegenden Fall die Effekte hervorrufen, können wir nicht ausschließen, dass auch solche darunter sind, die eine genügend hohe Affinität zum ER- $\alpha$  aufweisen.

Weitere ER-unabhängige Einflüsse können auf das LUC-System wirken. Nach estrogener Sättigung des Systems ist durch Estrogenzugabe keine weitere Stimulierung möglich. Gewisse Substanzen vermögen allerdings darüber hinaus eine „Super-Induktion“ zu bewirken. Freyberger und Schmuck stellten dies bei phytoestrogene Substanzen wie Daidzein, Genistein oder Resveratrol und auch bei Substanzen fest, die eigentlich keinerlei Rezeptoraffinität besitzen. Bekannte Anti-Estrogene vermindern die LUC-Aktivität durchweg. Eine Hemmung kann aber auch durch nicht-ER-bindende Substanzen erfolgen (182). Es wurde beobachtet, dass die Rezeptorbindung am Estrogen Response Element eine Konformationsänderung der Bindungsstelle für Co-Aktivatoren am ER verursacht und somit die Genexpression beeinflusst (183). Die komplexen Interaktionsmöglichkeiten bei pflanzlichen Extrakten könnten über verschiedenste molekulare Mechanismen verursacht werden. Eine direkte Interaktion am ER, eine Beeinflussung durch Co-Aktivatoren oder Co-Repressoren, eine Interaktion am Reporterogen oder auch eine direkte Interaktion mit der Luciferase im Testsystem sind z.B. möglich. Diese Unterscheidung konnte im Zuge der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden und müsste in weiteren Versuchen näher untersucht werden.

#### Wirkung auf die Genexpression von Leberzellen:

Geläufige Organsysteme in der Untersuchung estrogener Stoffe sind Knochen, Mamma und Uterus. Im Vorfeld wurden bereits Versuche an Knochenzellen durch S. Lieberei (184) durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurden die Organsysteme Uterus (APA an Ishikawa-Zellen) und Mamma (LUC an MVLN-Zellen) näher untersucht. Die Leber war bisher nur selten das Ziel von experimentellen Untersuchungen.

Deshalb wurden Versuche bzgl. der Genexpression unter estrogenen Einflüssen an verschiedenen Leberzelltypen durchgeführt. Als estrogene Marker wurde die Gen-Expression von Angiotensinogen (AT) und Calcium Binding Protein (CaBP) mit Hilfe der real-time RT-PCR bestimmt. Im Vorfeld wurden die Zellsysteme auf ihre ER-Expression hin untersucht.

Estrogene Wirkungen werden in der Zelle über den Estrogenrezeptor (ER) vermittelt. Man unterscheidet die Subtypen ER- $\alpha$  und ER- $\beta$ . Sie kommen in unterschiedlichen Verteilungsmustern in den Geweben vor. Charakteristisch für Phytoestrogene ist ein partieller agonistisch / antagonistischer Typ (SERM), der in Abwesenheit von endogenen Estrogenen eine estrogene Wirkung zeigt. Andererseits werden aber auch antiestrogene Effekte durch Phytoestrogene beobachtet, insbesondere in einem mit Estrogenen gesättigten System. Ein kompetitiver agonistischer und antagonistischer Mechanismus wird vermutet. Die Bindung der meisten Phytoestrogene erfolgt vornehmlich an den ER- $\beta$ . Bei der Untersuchung pflanzlicher Substanzen auf estrogene Wirkungen an Zellmodellen ist es daher von Bedeutung, die ER-Expression der Versuchssysteme zu kennen.

Die im Versuch verwendeten Zellsysteme wurden in der Literatur auf ihre ER - Expression hin beschrieben. Allerdings wurde bisher nicht bzgl. des Subtyps ER- $\alpha$  und ER- $\beta$  differenziert oder es wurden widersprüchliche Ergebnisse angegeben. Mit Hilfe der RT-PCR wurde deshalb in der vorliegenden Arbeit die Expression des ER-Gens in Fe33-, H4IIE-Zellen und primären Hepatozyten orientierend untersucht.

Im Vorfeld wurde beschrieben, dass primäre Ratten-Hepatozyten Estrogenrezeptoren exprimieren, allerdings nur eine gewisse Zeit nach der Isolation aus dem Gewebeverband (164). In den eigenen Untersuchungen wiesen die primären Hepatozyten sowohl einen ER- $\alpha$  als auch ER- $\beta$  auf. Der  $\alpha$ -Rezeptor überwog dabei gegenüber dem  $\beta$ -Rezeptor.

Fe33-Zellen sind FTO-2B Rattenhepatomzellen, die stabil mit einem ER- $\alpha$ -Expressions-Plasmid transfiziert wurden (166). In den eigenen Untersuchungen wurde der ER- $\alpha$  als vorwiegender Rezeptor bestätigt. Der ER- $\beta$  wurde in einem weitaus geringeren Ausmaß von den Fe33-Zellen exprimiert.

Zu H4IIE-Zellen gibt es in der Literatur nicht viele Angaben. Chang et al. berichteten über einen Mangel an Estrogenrezeptoren (167). Die eigenen Untersuchungen bestätigen diese Aussage insofern, dass der ER-Gehalt im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellen am geringsten war. Der ER- $\beta$ -Anteil überwog leicht gegenüber dem ER- $\alpha$ -Anteil.

Der Angiotensinogen (AT)-Spiegel wird direkt über den ER mittels eines Estrogen Response Element beeinflusst. Unter estrogenen Einflüssen steigt der mRNA-Spiegel von AT. Voruntersuchungen zeigten einen Anstieg des AT-Spiegels bei Fe33-Zellen nach Behandlung mit Estrogenen (164). Phytoestrogene Stoffe wurden im Vorfeld von K. Effenberger (138) an Fe33-Zellen getestet. Die synthetischen Estrogene zeigten hier einen deutlichen AT-Anstieg. Die Pflanzenextrakte wirkten ähnlich, allerdings in einem geringeren Ausmaß. Diese Ergebnisse stehen allerdings im Gegensatz zu den eigenen Untersuchungen.

Weder E<sub>2</sub> oder EE noch Noni-Blatt-Saft, der in den vorausgegangenen Versuchen mit Ishikawa-Zellen die höchsten Effekte erzielt hat, haben bei Fe33-Zellen zu nennenswerten Effekten geführt.

Ein deutlicher Anstieg der AT-mRNA, nach Behandlung mit E<sub>2</sub> oder EE, wurde in den eigenen Untersuchungen nur bei H4IIE-Zellen beobachtet. Hier wurde der stärkste AT-Anstieg also in der Zelllinie mit dem geringsten ER-Aufkommen registriert, was die Vermutung aufkommen lässt, dass die Effekte möglicherweise gar nicht über einen ER vermittelt werden. Ein ethanolischer Extrakt aus Noni-Blatt-Saft zeigte Effekte, die in derselben Größenordnung lagen, wie die der Positiv-Kontrollen. Im untersuchten Dosisbereich (0,1 - 10µg/ml) war keine nennenswerte Dosisabhängigkeit zu erkennen. Offenbar liegt hier eine Sättigung des Effekts vor. Es findet aber auch keine Hemmung in den höheren Konzentrationen statt, was bei den übrigen untersuchten Pflanzen-Extrakten (PHA, SAR, CIM, SOY) durchweg der Fall war. Offensichtlich haben die in den Noni-Blättern vorhandenen Phytoestrogene eine andere Wirkqualität, als diejenigen in den übrigen Pflanzen. Bei primären Hepatozyten kam es lediglich zu einem minimalen Anstieg der AT-mRNA-Expression durch E<sub>2</sub>, wogegen EE keinen Effekt hervorrief. Der ethanolische Noni-Blatt-Saft-Auszug hatte in diesem Modell einen deutlichen Anstieg der AT-mRNA zur Folge, der den von E<sub>2</sub> bei weitem übertraf. Die geringste Konzentration (0,1 µg/ml) zeigte den höchsten Effekt, der bei höheren Konzentrationen wieder rückläufig war, allerdings noch über den Werten der Negativ-Kontrolle. Von den übrigen Pflanzen-Extrakten zeigte SAR eine dosisabhängige Steigerung der AT-mRNA Expression.

Die pflanzlichen Extrakte zeigten in diesem Versuch keine einheitlichen Ergebnisse. Diese komplexen Stoffgemische wirken sich wahrscheinlich mit unterschiedlichen Regulationsmechanismen auf den Zellstoffwechsel und die AT-Expression aus. Das System scheint wegen dieser uneinheitlichen Ergebnisse wenig geeignet zu sein, um als Testsystem für estrogenen Wirkungen zu fungieren. Das gilt besonders für Testsubstanzen aus komplexen Gemischen.

Das Calcium-Binding-Protein (CaBP) - Gen ist ein geläufiger Marker für estrogene Einflüsse. Choi et al. vermuteten eine ER- $\alpha$  vermittelte Regulation des CaBP-Gens (173).

K. Effenberger (138) zeigte in Voruntersuchungen eine Steigerung an Fe33-Zellen durch Estrogene und in geringerem Ausmaß auch durch pflanzliche Extrakte.

Die vorliegenden Untersuchungen ergaben eine vermehrte Expression des CaBP-Gens in der ER- $\alpha$  tragenden Fe33-Zelllinie durch die Positiv-Probe EE. Die ethanolischen bzw. wässrigen Noni-Blatt-Extrakte wiesen keine nennenswerte Steigerung der CaBP-Expression auf.

In H4IIE-Zellen verringerte sich unter estrogenem Einfluss die CaBP-Expression. Bei dieser Zelllinie lagen die Effekte der Pflanzenextrakte ebenfalls unter dem Medium-Niveau. In primären Hepatozyten lagen die CaBP-Expressionen, nach Stimulation der Zellen mit den Hormonen E<sub>2</sub> und EE, ebenfalls unter der Medium-Kontrolle. Nach Behandlung mit ethanolischem Noni-Blatt-Saft-Extrakt war ein weiterer Rückgang zu beobachten, wogegen der wässrige Blatt-Saft-Auszug eine dosisabhängige Steigerung hervorrief, die in der höchsten Konzentration den Wert der Negativ-Kontrolle überstieg. Ein Übersteigen der Nulllinie war auch bei einzelnen Konzentrationen der Pflanzen-Extrakte CIM und SOY zu verzeichnen. Wegen der starken Streuungen und dem Fehlen einer Dosis-Wirkungs-Beziehung könnte es sich dabei aber auch um Artefakte handeln.

In den vorliegenden Untersuchungen fällt ein unterschiedlicher Effekt der Positiv-Proben EE und E<sub>2</sub> auf. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich durch die geringere Stabilität des natürlichen E<sub>2</sub> im Vergleich zum synthetischen EE zu erklären. Es könnte aber auch sein, dass EE eine höhere intrinsische Aktivität als E<sub>2</sub> besitzt.

Auch dieses Modell führt nicht zu überschaubaren Effekten bei den unterschiedlichen Phytoestrogenen. Eine Anwendung als Routineassay zur Abschätzung eines estrogenen Potentials komplexer Pflanzen-Extrakte empfiehlt sich nicht.

#### Zusammenfassende Beurteilung der estrogene Wirkungen der pflanzlichen Probesubstanzen:

Folgende Extrakte sind aus den vorliegenden Estrogenitäts-Untersuchungen hervorzuheben: Im APA zeigten der wässrige Noni-Blatt-Extrakt der Malediven (Probe AP 2) und eine Methanol-Extraktion aus Noni-Blättern (Probe AP 5) eine starke estrogene Wirkung. Im LUC-Assay fallen die Proben LUC 7, LUC 9 und LUC 10 auf. Es handelt sich dabei erneut um den methanolischen Auszug und um einen gefriergetrockneten Blatt-Saft, sowohl als wässrige als auch ethanolisch gelöste Substanz. In den RT-PCR Untersuchungen zeigten die Noni Extrakte durchweg eine mäßige Wirksamkeit. Ein Unterschied bezüglich der Herkunft der *Morinda citrifolia* Proben konnte nicht ausgemacht werden.



In der Gruppe der weiteren Pflanzen-Extrakte fallen SAR auf SOY auf. Im Allgemeinen zeigten die Pflanzen-Extrakte tendenziell eine hemmende Wirkung. Diese Beobachtung ist mit den kompetitiven, agonistischen und antagonistischen Eigenschaften eines SERM vereinbar.

## 6.2 Diskussion einer möglichen Genotoxizität von *Morinda citrifolia* Blättern

Bevor ein Arzneimittel auf dem Markt erscheinen kann, müssen umfangreiche Untersuchungen zur Wirksamkeit und zur Anwendungssicherheit durchgeführt werden. Erstere dienen dazu, dass ein Patient nicht Fremdstoffen ausgesetzt wird, die letztlich keinen Nutzen bringen, aber dennoch Nebenwirkungen besitzen können. Die Wirksamkeit eines Arzneimittels wird in Modellversuchen an Tieren, Zellkulturen, isolierten Makromolekülen oder sogar an Computermodellen dargestellt. Letztlich muss sie aber in klinischen Versuchen an Menschen bewiesen werden.

Der Nachweis der Wirksamkeit pflanzlicher Präparate, speziell von *Morinda citrifolia* Blatt-Extrakten wurde bislang in Zellkulturmodellen erbracht, deren Ergebnisse oben diskutiert wurden. Bevor eine solche Wirksamkeit als bewiesen angesehen werden kann, müssen weitere Untersuchungen an Versuchstieren und schließlich an Menschen erfolgen. Eine Empfehlung der Verwendung von Noni-Blatt-Tee als neuartiges Lebensmittel oder auch als Phytotherapeutikum kann aber nur erfolgen, wenn keine schädigenden Nebenwirkungen bekannt sind.

Toxikologisch wird ein potentiell Arzneimittel oder auch ein neuartiges Lebensmittel auf eine akut-, subchronisch-, chronisch- sowie auf eine reproduktions-toxische Wirkung hin untersucht, wobei sowohl Tierversuche als auch in vitro Versuche verwendet werden.

Die Bestimmung einer möglichen Genotoxizität ist heute ebenfalls fester Bestandteil jeder Arzneimittelzulassung und auch für die Zulassung von „neuartigen Lebensmitteln“ durch die EU. Genotoxische Substanzen führen zur Entstehung maligner Tumore, die oft erst Jahrzehnte nach der Einnahme auftreten. In der traditionellen Volksmedizin wird deshalb das klinische Erscheinungsbild nicht in den kausalen Zusammenhang mit der genotoxischen Wirksubstanz gestellt. Durch die toxikologischen Untersuchungen soll ausgeschlossen werden, dass potentiell krebserzeugende Substanzen zur Anwendung kommen.

Zuerst werden in vitro Untersuchungen an Bakterien und Zellkulturen durchgeführt. Liefert eines dieser Systeme Hinweise auf eine mögliche mutagene / kanzerogene Wirkung, müssen weitere Untersuchungen an Tiermodellen durchgeführt werden, um eine Unbedenklichkeit zu beweisen. In den meisten Fällen aber wird bereits an dieser Stelle von einer weiteren Verwendung des Arzneimittels oder neuartigen Lebensmittels abgesehen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Noni-Blatt-Extrakte in einem bakteriellen Mutagenesetest (Ames Test), einem Mutagenesetest an Säugetierzellen (V79-HPRT-Test) und einem DNA-Reparatur Test an primären Ratten-Hepatozyten (UDS-Test) auf mögliche genotoxische Wirkungen untersucht. Diese Untersuchungen sind im Zuge des erforderlichen Zulassungsverfahrens von Noni-Blatt-Tee als neuartiges Lebensmittel verwendet worden (78).

Der Ames-Test ist ein etabliertes Testsystem zur Prüfung genotoxischer Eigenschaften einer Prüfsubstanz. Er zeichnet sich durch eine hohe Sensitivität aus und wird häufig als erster Screeningtest bei einer toxikologischen Untersuchung eingesetzt. Man verwendet eine Batterie aus fünf verschiedenen *Salmonella*-Teststämmen, die sich hinsichtlich ihrer Mutation im Histidin-Genlocus unterscheiden.

Die Testsubstanz bestand aus einem wässrigen Noni-Blatt-Extrakt. Sie zeigte in sämtlichen Konzentrationen in den verschiedenen *Salmonella*-Stämmen ein negatives Mutationsergebnis. Lediglich im Stamm TA98 war in den beiden höchsten Konzentrationen mit der Zugabe von S9-Mix eine zweifache Mutationshäufigkeit festzustellen. Die Mutation im TA98-Stamm ist wahrscheinlich auf das Flavonoid Quercetin zurückzuführen, das im TNLT enthalten ist. In HPLC-Untersuchungen wurden in ethanolischen Noni-Blatt-Extrakten folgende Flavonole identifiziert: Quercetin-3-O- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-glycopyranosid (Rutin), Kaempferol-3-O- $\alpha$ -l-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 6)- $\beta$ -d-glucopyranosid, sowie die Aglyka Quercetin und Kaempferol (185). Quercetin verursacht bekannterweise ein positives Ergebnis im Ames-Test. Weitere in vitro und in vivo Versuche zeigten aber keine Hinweise für eine Mutagenität (186). Nach der IARC (The International Agency for Research on Cancer) wird Quercetin als „nicht-karzinogen“ klassifiziert (187). Das Flavonoid Kaempferol ist dem Quercetin sehr ähnlich, es unterscheidet sich lediglich durch eine fehlende Hydroxylgruppe. In Pflanzen kommen beide Stoffe in glykosidisch-gebundener Form vor. Im Mutagenitätstest ist Kämpferol ebenfalls positiv, wenngleich schwächer als Quercetin. Dieser Effekt zeigt sich aber erst nach Zugabe von Leberhomogenat (S9-Mix). Der Grund liegt in der Umwandlung des Kämpferols in Quercetin durch die Cytochrom P450 Monooxygenase CYP 1A1 des Rattenleberhomogenats (188). Neuere Untersuchungen bestätigen die positiven Befunde

durch Quercetin in bakteriellen Mutagenese-Tests, nicht allerdings in Eukarionten-Versuchen. Die eigenen Untersuchungen an V79-Lungen-Fibroblasten des Hamsters und ein UDS-Test an Ratten-Hepatozyten unterstreichen diese These.

Nachdem einzelne Untersuchungen im Ames-Test ein positives Ergebnis erzielt haben, waren weitere Untersuchungen auf eine eventuelle mutagene Wirkungen an Säugetierzellen nötig. Diese Ergebnisse sind eher auf die Anwendung beim Menschen zu übertragen. In der Arbeit kam ein Testsystem zur Untersuchung von HPRT-Mutationen an V79-Hamster-Fibroblasten zum Einsatz. Das System basiert auf der Tatsache, dass Zellen, deren HPRT-Genlocus durch eine Mutation geschädigt wurde, in Gegenwart von 6-Thioguanin wachsen können, wohingegen Zellen mit einem funktionsfähigen HPRT-Gen diesen Stoff zu einem toxischen Metaboliten umsetzen.

Im V79-HPRT-Zellversuch zeigten sich keine Hinweise auf eine Mutagenität des wässrigen Auszuges aus Noni-Blättern. Im Versuchsdurchlauf nach metabolischer Aktivierung mit S9-Mix traten allerdings zweimalig leicht positive Mutationsraten auf. Dieser zweimalige positive Befund wies keine Dosis - Wirkungsbeziehung auf. Das Versuchsergebnis ist somit als negativ zu werten.

Zur weiteren Abklärung einer eventuellen genotoxischen Wirkung wurde ein ethanolischer Extrakt aus TNLT (Tahiti Noni Leaf Tea) im DNA-Reparatur-Test an Ratten-Hepatozyten geprüft. Die primären Ratten-Hepatozyten weisen die volle metabolische Kompetenz von Leberzellen auf. Auch toxische Metabolite kurzer Lebensdauer können in diesem Versuchsmodell detektiert werden. Als Endpunkt einer genotoxischen Wirkung dient der Einbau von radioaktivem Thymidin in die DNA der Hepatozyten, die durch das genotoxische Agens geschädigt wurde.

Im UDS-Test zeigen die Ergebnisse bezüglich der DNA-schädigenden Wirkung von Noni-Blatt Tee ein durchweg negatives Ergebnis. Dadurch wird die Vermutung bestätigt, dass Noni-Blätter kein potentiell mutagenes / kanzerogenes Potential besitzen.

Diese vorliegende Reihe toxikologischer Untersuchungen unterstreicht die Sicherheit des Blätter-Tees aus der Noni-Pflanze.

## 6.3 Ausblick

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass die geprüften pflanzlichen Extrakte ein estrogenes Potenzial besitzen.

Bezüglich der verwendeten Systeme scheint der LUC-Assay in MVLN-Zellen die klarsten Ergebnisse zu liefern. Die Untersuchung der Expression der Markergene CaBP und AT in den drei hier verwendeten Leberzellsystemen scheint keine klaren Aussagen bezüglich einer potentiellen estrogenen Wirkung komplexer Pflanzen-Extrakte zuzulassen.

Die heterogenen Ergebnisse sind durch die komplexe Stoffmischung der Extraktionen zu erklären. In den pflanzlichen Auszügen ist eine Vielzahl von Wirkstoffen enthalten, deren Zusammensetzung, molekulare Wirkweisen und Interaktionsmöglichkeiten bisher unbekannt sind.

Analysen der Inhalts- und Wirksubstanzen müssen im Weiteren durchgeführt werden. In wie weit diese vorliegenden in vitro Untersuchungen auf in vivo Verhältnisse übertragbar sind, muss durch weitere Untersuchungen, z.B. tierexperimentell und später in Humanstudien geprüft werden. Die Bioverfügbarkeit der Wirkstoffe muss zudem geklärt werden.

## 7 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden Blätter der Pflanze *Morinda citrifolia* (Noni) auf estrogene Eigenschaften hin untersucht. Daneben wurden Extrakte weiterer Pflanzen untersucht, die in Voruntersuchungen Hinweise auf eine phytoestrogene Wirkung zeigten. Zur Untersuchung der estrogenen Wirkungen wurden etablierte zellphysiologische Versuchssysteme herangezogen. Ein Enzym Assay zur Induktion von alkalischer Phosphatase an Ishikawa-Zellen wurde durchgeführt. Dabei bestätigte sich eine Stimulierung der alkalischen Phosphatase durch die Positiv-Probe Ethinylestradiol. Die Noni-Blatt-Extrakte verursachten mit zunehmender Konzentration eine Hemmung der alkalischen Phosphatase.

Als zweites Testsystem wurde ein Luciferase-Reporter-Gen-Assay an MVLN-Zellen durchgeführt. Die Positiv-Probe bewirkte, wie erwartet, eine Steigerung der Luciferase-Aktivität. Die Ergebnisse der Noni-Blatt-Extrakte waren inhomogen. Wässrige Extrakte zeigten keinerlei Effekte. Die ethanolisch gelösten Extraktionen verursachten mit zunehmender Konzentration eine Hemmung der Luciferase-Aktivität. Dagegen wurden Stimulierungen der Luciferase-Aktivität durch Methanol-Extrakte von Noni-Blättern bewirkt. Ebenfalls positiv reagierten Extrakte, die aus gefriergetrocknetem Noni-Blatt-Saft gewonnen wurden. Diese Effekte reichten bis an die der Positiv-Probe heran.

Mittels real-time RT-PCR wurden an verschiedenen Leberzellkulturen die Markergene Calcium-Binding-Protein und Angiotensinogen untersucht. Als Grundlage wurde zunächst das Expressionsmuster der Estrogenrezeptor-Subtypen der Versuchszellen spezifiziert. Fe33-Zellen exprimierten den ER- $\alpha$ . Die primären Hepatozyten wiesen eine mittlere Menge an ER- $\alpha$  und etwas weniger ER- $\beta$  auf. H4IIE-Zellen zeigten sehr geringe Mengen beider Subtypen. Die Ergebnisse bezüglich der Angiotensinogen-Genexpression waren inhomogen. Das Calcium-Binding-Protein-Gen wurde in der Fe33-Zelllinie durch die Positiv-Probe und in einem geringeren Ausmaß durch die Pflanzen-Extrakte stimuliert. Dieser Effekt blieb in den anderen Zelllinien aus.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass diese pflanzlichen Extrakte ein estrogenes Potenzial besitzen. Allerdings sind die Ergebnisse heterogen. Dies kann an der komplexen Zusammensetzung des Wirkstoffgemisches liegen, das in den Pflanzen-Extrakten enthalten ist. Diese bioaktiven Stoffe verursachen eine Zell-Regulation über einen oder auch beide ER-Subtypen. Die ER-Subtypen können sogar gegenteilige Effekte bewirken oder durch einen SERM beeinflusst werden. Außerdem können die Wirkstoffe über eine Vielzahl anderer Mechanismen den Zellstoffwechsel beeinflussen.

Diese pflanzlichen Stoffgemische sollten daher in weiteren Untersuchungen auf die genaue Zusammensetzung hin analysiert werden. Gerade in Bezug auf die Hormonersatztherapie stellen Phytoestrogene eine alternative Therapieoption dar. Altbewährtes Wissen über Heilpflanzen in der volkstümlichen Medizin kann mit wissenschaftlichen Methoden überprüft werden und sollte zur Weiterentwicklung von Therapieoptionen genutzt werden. Insbesondere die Noni-Pflanze ist ein vielversprechender Vertreter solcher Heilpflanzen.

Gerade auf dem unüberschaubaren Markt der alternativen Heilmittel und Nahrungsergänzungsmittel steht die Sicherheit im Vordergrund. Die Produkte müssen eine toxikologische Prüfung durchlaufen. Immer wieder kommt es zu Berichten von Vergiftungsfällen. Besonders kritisch sind mögliche mutagene und krebserregende Eigenschaften von Stoffen, die von Menschen verwendet werden, zu beurteilen. Die genotoxischen Untersuchungen der Noni-Blatt-Extrakte in der vorliegenden Arbeit zeigen, dass Noni-Blätter in dieser Hinsicht unbedenklich sind.

## 8 Summary

In the attached study, a pharmaceutical and toxicological investigation has been conducted into medicinal plants. The effect of medicinal plants used in folk medicine can now be proved with modern scientific methods and should be used for the development of optimal therapy concepts. In particular, regarding the hormone replacement therapy (HRT), phytoestrogens represent a very viable and alternative treatment approach. The safety of alternative medicine and food additives is especially important, considering the comprehensive market of such products. Even before they appear on the market itself, new products should be carefully investigated for possible toxicity. Of particular importance are possible genotoxic effects of compounds, which are used by humans.

The first question posed, was whether these medicinal plants do indeed have estrogenic effects. In this study the Noni plant (*Morinda citrifolia*) and some other plant extracts, which have shown a phytoestrogenic potential in earlier experiments, have been singled out for further investigation.

The second question was whether the Noni leaves might potentially be genotoxic.

For the estrogenicity testing, well-established tissue culture systems were carried out. An enzyme-assay for the induction of alkaline phosphatase (AP) within the Ishikawa-cell-line was performed. Ethinylestradiol (EE), serving as positive control, induced an AP-related

stimulation, whereas the various Noni leaves` extractions inhibited the overall AP effects dependent on the concentration levels.

Furthermore, a luciferase reporter-gene assay upon MVLN-cells was performed. As expected, the positive control showed a stimulation of the luciferase activity. The results obtained with the Noni leaf extracts were not homogeneous. Aqueous solutions of the Noni leaves had no effect whatsoever. Ethanolic extracts did, however, inhibit the luciferase activity with increasing concentrations and a methanolic extract achieved enzyme stimulation. Extracts obtained from freeze-dried Noni leaf juice induced the activity almost as much as the control samples themselves.

The real-time RT-PCR programme has been used to analyze the marker-genes angiotensinogen (AT) and calcium-binding-protein (CaBP) on three different liver cell-lines. To that end, the estrogen receptor (ER) sub-type expression-pattern, representing a general foundation of this experimental organization, was investigated. Fe33-cells expressed only ER- $\alpha$ . Primary rat hepatocytes expressed a moderate amount of ER- $\alpha$  but considerably less ER- $\beta$ . H4IIE-cells showed a marginal amount of both sub-types. According to the AT-gene expression, all findings were completely inhomogeneous. In the study performed on Fe33-cells the CaBP-gene was stimulated by the control sample, and, to a lesser extent, by the plant extractions as well. Such an effect was not to be found, however, in the two other cell-lines.

The present investigation has revealed that these plant extractions do indeed have an estrogen potential. These findings, however, are inhomogeneous. A possible explanation for this effect is the complex composition of the plant extracts themselves. Such bioactive components may interfere with the cell-regulation process via one, or even via both ER-sub-types. This can result in agonistic or antagonistic effects. Some compounds may also exert a partial agonistic/antagonistic effect (SERM). In addition, it is possible that the active ingredients might well influence the cell-metabolism by a multitude of other mechanisms which are not linked to an ER. In order to clarify these results the composition of the plant-extractions should be carefully analyzed in subsequent investigations.

In order to investigate a potential genotoxicity of Noni leaves three different toxicity-tests were carried out. The Ames-test investigated mutagenesis upon the *Salmonella thyphimurium* bacteria, the HPRT-test investigated mutagenesis upon the V79-mammalian-cells and the USD-test analyzed DNA-damage on primary rat hepatocytes.

All findings revealed no genotoxicity at all and therefore verify the safety of Noni leaves.

## 9 Literaturverzeichnis

1. Davies S (2003) Menopause: new Therapies. *MJA* 178: 634-637.
2. Beral V et al. (2007) Ovarial cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 369 (9574): 1703-10.
3. Mørch LS, Løkkegaard E, Andreasen AH, Krüger-Kjær S, Lidegaard Ø (2009) Hormone Therapy and Ovarial Cancer. *JAMA* 302: 298-305.
4. Writing group of the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Womens's Health Initiative randomized controlled trail. *JAMA* 288: 321-33.
5. Beral V, Million Women Study Collaborators (2003) Breast Cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362: 419-27.
6. Stang A (2008) Rückgang der postmenopausalen Hormonverordnungen und der Brustkrebsinzidenz. *Dtsch Ärzteblatt* 105 (16): 303-9.
7. Flesch-Janys D, Slinger T, Mutschelknauss E, Kropp S, Obi N, Vettorazzi E, Braendle W, Bastert G, Hentschel S, Berger J, Chang-Claude J (2008) Risk of different histological types of postmenopausal breast cancer by type and regimen of postmenopausal hormone therapy. *Int J Cancer* 123(4): 933-41.
8. Hulley S, Grady D, Buch T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E (1998) Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen / Progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* 280 (7): 605-13.
9. Gohlke-Bärwolf C, Regitz-Zagrosek V, Mueck AO, Strasser RH (2002) Stellenwert der Hormonersatztherapie zur Prävention der Koronaren Herzerkrankung bei Frauen. *Z Kardiol* 91: 430-435.
10. AKDAE (2003) Therapieempfehlungen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft: Hormontherapie im Klimakterium. Berlin [Online im Internet] URL: [http://www.akdae.de/35/10/82\\_Hormontherapie\\_2003\\_1Auflage.pdf](http://www.akdae.de/35/10/82_Hormontherapie_2003_1Auflage.pdf) [Stand: 28.11.2009, 13:22].
11. AWMF (2009) Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften: Leitlinie Hormontherapie in Peri- und Postmenopause (HT). Düsseldorf [Online im Internet] URL: <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/015-062.pdf> [Stand: 28.11.2009, 13:43].
12. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut (2008) Krebs in Deutschland 2003-2004, Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage, Saarbrücken [Online im Internet] URL: [http://www.rki.de/cln\\_162/nn\\_203956/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2008,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2008.pdf](http://www.rki.de/cln_162/nn_203956/DE/Content/GBE/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/KID2008,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/KID2008.pdf) [Stand: 28.11.2009, 13:50].
13. Aoki D, Hirasawa A, Susumu N (2005) [Diagnostic significance of tumor markers for gynecologic malignancies] [Article in Japanese]. *Gan To Kagaku Ryoho* 32(3): 411-6.
14. Powell JL, Hill KA, Shiro BC, Diehl SJ, Gajewski WH (2005) Preoperative serum CA-125 levels in treating endometrial cancer. *J Reprod Med*. 50(8): 585-90.
15. Takac I, Gorisek B (2006) Serum CA 125 levels and lymph node metastasis in patients with endometrial cancer. *Wien Klin Wochenschr*. 118: 62-5.
16. Felberbaum R, Kolberg HC (2005) Endometriumkarzinom. In: Friedrich M, Felberbaum R, Tauchert S, Diedrich K (Hrsg.) *Manual Gynäkologische Onkologie*. 1. Aufl., Springer, Heidelberg, S. 55-67.



17. AWMF (1999) Leitlinien der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Diagnostik und Therapie des Endometriumkarzinoms. Düsseldorf [Online im Internet] URL <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/032-034.html> [Stand: 28.11.2009, 13:52].
18. Horn-Ross PL, John EM, Canchola AJ, Steward SL, Lee MM (2003) Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. *J Nat Cancer Inst* 95 (15): 1158-64.
19. AVP, Arzneimittelverordnung in der Praxis, Therapieempfehlungen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft (2003) Hormonersatztherapie im Klimakterium. Berlin [Online im Internet] URL: [http://www.akdae.de/35/82\\_Hormontherapie\\_2003\\_1Auflage.pdf](http://www.akdae.de/35/82_Hormontherapie_2003_1Auflage.pdf) [Stand: 28.11.2009, 13:57].
20. Ravdin PM, Cronin KA, Howlander N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, Edwards BK, Berry DA (2007) The Decrease in Breast-Cancer Incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 356 (16): 1670-1674.
21. Kolberg H-C, Friedrich M, Lemke A (2005) Maligne Erkrankungen der Brustdrüse. In: Friedrich M, Felberbaum R, Tauchert S, Diedrich K (Hrsg.) *Manual Gynäkologische Onkologie*. 1. Aufl., Springer, Heidelberg, S. 5-33.
22. AWMF (2008) Leitlinie der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms der Frau. Düsseldorf [Online im Internet] URL: <http://www.uni-duesseldorf.de/AWMF/II/032-045.pdf> [Stand: 28.11.2009, 14:03].
23. Vijayanthan V, Greenfield NJ, Thomas TJ, Ivanova MM, Tyulmenkov VV, Klinge CM, Gallo MA, Thomas T (2007) Effects of estradiol and 4-hydroxytamoxifen on the confirmation, thermal stability of estrogen receptor  $\beta$ . *Biochem Cell Biol*. 85 (1): 1-10.
24. Osborne CK, Schiff R (2005) Estrogen-Receptor Biology: Continuing Progress and Therapeutic Implications. *J Clin Oncol* 23: 1616-1622.
25. Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM (2001) Structure activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic and environmental estrogens. *Chem Res Toxicol* 14(3): 280-94.
26. Yager JD, Chen JO (2007) Mitochondrial estrogen-receptors – new insight into specific functions. *Trends Endocrinol. Metab.* 18(3): 89-91.
27. Martini PG, Katzenellenbogen BS (2003) Modulation of estrogen receptor activity by selective coregulators. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85(2-5): 117-22.
28. Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ediger TR, Sun J, Ekena K, Lazennec G, Martini PG, McInerney EM, Delage-Mourroux R, Weis K, Katzenellenbogen JA (2000) Estrogen receptors: selective ligands, partners, and distinctive pharmacology. *Recent Prog Hormo Res.* 55: 163-93.
29. Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, Skipper JK, Dotte A, Thomas P (2000) Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (20): 10751-6.
30. Hall JM, McDonnell DP (1999) The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140 (12): 5566-78.
31. Ogawa S, Inoue S, Watanabe A, Orimo A, Hosoi T, Ouchi, Muramatsu M (1998) Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor betacx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic acid Res.* 26 (15): 3505-12.
32. Omoto Y, Eguchi H, Yamamoto-Yamaguchi Y, Hayashi S (2003) Estrogen receptor (ER) beta 1 and ERbetacx/beta2 inhibit ERalpha function differently in breast cancer cell line MCF-7. *Oncogene* 22(32): 501-20.

33. Couse JF, Krorach KS (1999) Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev.* 20 (3): 358-417.
34. Kregge JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafson JA, Smithies O (1998) Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (26): 15677-82.
35. Kuiper GG, Carlsson B, Gradien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3): 863-70.
36. Campbell-Thomson M, Lynch IJ, Bhardwaj B (2001) Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 61(2): 632-40.
37. Palmieri C, Lam EW, Mansi J, McDonald, Shousha S, Madden P, Omoto Y, Sunter A, Warner M, Gustafsson JA, Coombes RC (2004) The expression of ER beta cx in human breast cancer and the relationship to endocrine therapy and survival. *Clin Cancer Res.* 10(7): 2421-8.
38. Massarweh S, Schiff R (2006) Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor / growth factor signaling crosstalk. *Endocrine-Related Cancer* 13(1): 15-24.
39. Ferro P, Forlani A, Muselli M, Pfeffer U (2003) Alternative splicing of the human estrogen receptor alpha primary transcript: mechanisms of exon skipping. *Int J Mol Med* 12(3): 355-63.
40. Ma Y, Hu C, Riegel AT, Fan S, Rosen EM (2007) Growth factor signaling pathways modulate BRCA1 repression of estrogen- $\alpha$  activity. *Mol Endocrinology* 21: 1905-1923.
41. Lin CY, Stöm A, Li Kong S, Kietz S, Thomsen JS, Tee JB, Vega VB, Miller LD, Smeds J, Bergh J, Gustafsson JA, Liu ET (2007) Inhibitory effect of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer. *Breast Cancer Res.* 9(2): R25.
42. Zaichuk T, Ivancic D, Scholtens D, Schiller C, Khan SA (2007) Tissue-specific transcripts of human steroid sulfatase are under control of estrogen signaling pathways in breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 105 (1-2): 76-84.
43. Cancel-Tassin G, Latil A, Roussau F, Mangin P, Bottius E, Escary JL, Berthon P, Cussenot O (2003) Association study of polymorphisms in the human estrogen receptor alpha gene and prostate cancer risk. *Eur Urol.* 44(4): 487-90.
44. Kurzer MS, Xu X (1997) Dietary Phytoestrogens. *Annu. Rev. Nutr.* 17: 353-381.
45. Wang LQ (2002) Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 777 (1-2): 289-309.
46. An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt TC, Lomri N, Leitman DC (2001) Estrogen beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J Biol Chem.* 276 (21): 17808-14.
47. Chrzan BG, Bradford PG (2007) Phytoestrogens activate estrogen receptor beta1 and estrogenic responses in human breast and bone cancer cell lines. *Mol Nutr Food Res.* 51(2): 171-7.
48. Arbeitsgruppe Toxikologie, UKE, Hamburg. Persönliche Mitteilung.
49. Rice S, Whitehead SA (2006) Phytoestrogens and breast cancer - promoters or protectors? *Endocrine-Related Cancer.* 13: 995-1015.
50. Fotis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wähälä K, Montesano R, Schweigerer L (1997) Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and in vitro angiogenesis. *Cancer Res.* 57: 2916-2921.
51. Kulling SE, Watzl B (2003) Phytoöstrogene- Basiswissen aktualisiert. *Ernährungs-Umschau* 50(6): 234-239.

52. Klein CB, King AA (2007) Genistein genotoxicity: critical considerations of in vitro exposure dose. *Toxicol Appl Pharmacol.* 224(1): 1-11.
53. Davis SR (2001) Phytoestrogen therapy for menopausal symptoms? *BMJ* 323(7309): 354-5.
54. Nelson SC (2006) Species Profile: *Morinda citrifolia*. Hawaii [Online im Internet] URL: <http://www.agroforestry.net/tti/Morinda-noni.pdf> [Stand: 28.11.2009, 14:10].
55. Nelson SC (2002) The Noni Website. Hawaii [Online im Internet] URL: <http://www.ctahr.hawaii.edu/noni/> [Stand: 28.11.2009, 14:16].
56. Mc Clatchey W (2002) From Polynesian healers to health food stores: changing perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). *Integr. Cancer Ther.* 1(2): 110-20.
57. Ding Z, Dai Y, Wang Z (2005) Hypouricemic action of scopoletin arising from xanthine oxidase inhibition and uricosuric activity. *Planta Med* 71 (2): 183-5.
58. Basar S, Westendorf J (2010) Identification of (2E, 4Z, 7Z)-Decatrienoic Acid in Noni Fruit and Its Use in Quality Screening of Commercial Noni Products. *Food Anal. Methods.* DOI 10.1007/s12161-010-9125-9.
59. Jadhav GB, Upasani CD, Patil RA (2008) Overview of Flavonoids [Online im Internet] URL: <http://www.pharmainfo.net/reviews/overview-flavonoids> [Stand 29.06.2010, 17:10].
60. Ahmad VU, Bano S (1980) Isolation of -sitosterol and ursolic acid from *Morinda citrifolia* Linn. *J. Chem.Soc. Pak.*, 2(2): 71.
61. Westendorf J, Mettlich C (2009) NONI, *Morinda citrifolia*, Altes Wissen und neue Erkenntnisse. Eigenverlag, Bremen.
62. Bushnell OA, Fukuda M, Makinodian T (1950) The antibacterial properties of some plants found in Hawaii. *Pacific Science* 4: 167-83.
63. Zaidan MR, Noor Rain A, Badrul AR, Adlin A, Norazah A, Zakiah I (2005) In vitro screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. *Trop. Biomed.* 22(2): 165-70.
64. Wang MY, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Su C, Palu AK, Anderson G (2002) *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharmacol Sin* 23 (12): 1127-41.
65. Raj RK (1975) Screening of indigenous plants for antihelminthic action against human *Ascaris lumbricoides*. *Indian J Physiol Pharmacol.* 19(1): unbekannt.
66. Saludes JP, Garson MJ, franzblau SG, Aguinaldo AM (2002) Antitubercular constituents from hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). *Phyther Res* 16(7): 683-5.
67. Younos C, Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, Misslin R, Mortier F (1990) Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Med.* 56(5): 430-4.
68. Hirazumi A, Furusawa E, Chou SC, Hokama Y (1994) Anti-cancer activity of *Morinda citrifolia* (noni) on intraperitoneally implanted lewis lung carcinoma in syngenic mice. *Proc West Pharmacol Soc* 37: 145-146.
69. Hirazumi A, Furusawa E, Chou SC, Hokama Y (1996) Immunomodulation contributes to the anticancer activity of *Morinda citrifolia* (Noni) fruit juice. *Proc West Pharmacol Soc* 39: 7-9.
70. Liu G, Bode A, Ma WY, Sang S, Ho Ct, Dong Z (2001) Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line. *Cancer Res* 61: 5749-5756.
71. Wang MY, Su C (2001) Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). *Ann N Y Acad Sci* 952: 161-8.
72. Rasal VP, Sinnathambi A, Ashok P, Yeshmaina S (2007) Wound healing and Antioxidant Activities of *Morinda citrifolia* Leaf Extract in Rats. *Iranian Journal of Pharmacology and Therapeutics* 7(1): 49-52.

73. Nayak BS, Sandiford S, Maxwell A (2007) Evaluation of the Wound-healing Activity of Ethanolic Extract of *Morinda citrifolia* L. Leaf. *Evid Based Complement Alternat Med* 6(3): 351-6.
74. Chearskul S et al. (2004) *Morinda citrifolia* has very weak estrogenic activity in vivo. *Thai Journal of physiological sciences* 17: 22-29.
75. Mervill ED (1943) Noni (*Morinda citrifolia*) as an edible plant. In *Technical manual: emergency food plants and poisonous plants of the islands of the pacific*. Washington D.C.: US Government Printing Office.
76. European Commission. (2003) Commission Decision of 5 June 2003 authorising the placing on the market of 'noni juice' (juice of the fruit of *Morinda citrifolia* L.) as a novel food ingredient under Regulation (EC) No 258/97 of the European Parliament and of the Council. Brüssel [Online im Internet] URL: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2003:144:0012:0012:EN:PDF> [Stand: 28.11.2009, 13:22].
77. European Commission, Scientific committee on food. (2002) Opinion of the Scientific Committee on Food on Tahitian Noni juice. Brüssel [Online im Internet] URL: [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out151\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scf/out151_en.pdf) [Stand: 28.11.2009, 14:20].
78. EFSA (2008) Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on Safety of 'leaves from *Morinda citrifolia* L.. The EFSA Journal 769: 1-17.
79. EFSA (2009) Scientific Opinion of the Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies on the safety of Tahitian Noni® '*Morinda citrifolia* (noni) fruit puree and concentrate' as a novel food ingredient. The EFSA Journal 998: 1-16.
80. Millonig G, Stadlmann S, Vogel W (2005) Herbal hepatotoxicity: acute hepatitis caused by a Noni preparation (*Morinda citrifolia*). *Eur J Gastroenterol Hepatol* 17(4): 445-7.
81. Stadlbauer V, Fickert P, Lackner C, Schmerlaib J, Krisper P, Trauner M, Stauber RE (2005) Hepatotoxicity of Noni juice: report of two cases. *World J Gastroenterol* 11(30): 4758-60.
82. Yuce B, Gulberg V, Diebold J, Gerbes AL (2006) Hepatitis induced by Noni juice from *Morinda citrifolia*: a rare cause of hepatotoxicity or the tip of the iceberg? *Digestion* 73(2-3): 167-70.
83. Carr ME, Klotz J, Bergeron M (2004) Coumarin resistance and the vitamin supplement "Noni". *Am J Hematol* 77(1): 103.
84. Mueller BA, Scott MK, Sowinski KM, Prag KA (2000) Noni juice (*Morinda citrifolia*): hidden potential for hyperkalaemia? *Am J Kidney Dis* 35(2): 310-2.
85. West BJ, Jensen CJ, Westendorf J, White LD (2006) A Safety Review of Noni Fruit Juice. *Journal of Food Science* Vol. 71, Nr 8: 100-106.
86. Wang MY, Nowicki D, Anderson G, Jensen J, West B (2008) Hepatic Protection by Noni Fruit Juice Against CCL<sub>4</sub>- Induced Chronic Liver Damage in Female SD Rats. *Plant Foods for Human Nutrition* 63 (3): 141-145.
87. Müller JC, Botelho GK, Bufalo AC, Boareto AC, Rattmann YD, Otuki MF, Cabrini DA, Martins ES, Dalsenter PR (2009) *Morinda citrifolia* Linn (Noni): In vivo and in vitro reproductive toxicology. *J Ethnopharm* 121: 229-233.
88. Feng DS, Zhao YM, Zheng DX (2006) Experimental study on the toxicity of noni juice. *China Tropical Medicine*. 5(6): 886-893.
89. West BJ, Tani H, Palu AK, Tolson CB, Jensen J (2007) Safety tests and antinutrient analyses of noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf. *J Sci Food Agric* 87 (14): 2583-2588.

90. Rediger (2005) Stellungnahme der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) zu Noni Saft. Wien [Online im Internet] URL: <http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/neuartige-lebensmittel/noni-saft/> [Stand: 28.11.2009, 14:29].
91. EFSA, European Food Safety Authority (2006) Gutachten des Wissenschaftlichen Gremiums bezüglich der Sicherheit von Noni-Saft (Saft aus der Frucht von *Morinda citrifolia*). Parma [Online im Internet] URL: [http://www.efsa.europa.eu/de/science/nda/nda\\_opinions/novel\\_foods/nda\\_op\\_ej376\\_noni.html](http://www.efsa.europa.eu/de/science/nda/nda_opinions/novel_foods/nda_op_ej376_noni.html) [Stand: 28.11.2009, 14:30].
92. Kennelly EJ, Baggett S, Nuntanakom P, Ososki AL, Mori SA, Duke J (2002) Analysis of thirteen populations of black cohosh for formononetin. *Phytomedicine* 9: 461- 467.
93. Altersberger I, Kurz B (1999) Heilpflanzen-Katalog: Traubensilberkerze. Grünwald [Online im Internet] URL: <http://www.heilpflanzen-katalog.de/beschreibung-traubensilberkerze.html> [Stand: 28.11.2009, 14:22].
94. Viereck V, Emons G, Wuttke W. (2005) Black cohosh: just another phytoestrogen? *Trends Endocrinol Metab.* 16(5): 214-21.
95. Reinhard-Hennch B, Strowitzki T, von Hagens C (2006) Alternative Therapiemöglichkeiten im Klimakterium. *Gynakol Geburtshilfliche Rundsch.* 46(4): 197-213.
96. Viereck V, Grundker C, Friess SC, Frosch KH, Raddatz D, Schoppet M, Nisslein T, Emons G, Hofbauer LC (2005) Isopropanolic extract of black cohosh stimulates osteoprotegerin production by human osteoblasts. *J Bone Miner Res.* 20(11):2036-43. Epub 2005 Jul 18.
97. Zierau O, Bodinet C, Kolba S, Wulf M, Vollmer G (2002) Antiestrogenic activities of *Cimicifuga racemosa* extracts. *J Steroid Biochem Mol Biol.* Jan;80(1):125-30.
98. Lupu R, Mehmi I, Atlas E, Tsai MS, Pisha E, Oketch-Rabah HA (2003) Black cohosh, a menopausal remedy, does not have estrogenic activity and does not promote breast cancer cell growth. *Int J Onc* 23:1407-1412.
99. Einbond LS, Shimizu M, Xiao D, Nuntanakorn P, Lim JTE, Suzui M, Seter C, Pertel T, Kennelly EJ, Kronenberg F, Weinstein IB (2004) Growth inhibitory activity of extracts and purified components of black cohosh on human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 83: 221-231.
100. Einbond LS, Shimizu M, Nuntanakorn P, Seter C, Cheng R, Jiang B, Kronenberg F, Kennelly EJ, Weinstein IB (2006) Actein and a fraction of black cohosh potentiate antiproliferative effects of chemotherapy agents on human breast cancer cells. *Planta Med.* 72(13):1200-6. Epub 2006 Sep 20.
101. Einbond LS, Su T, Wu HA, Friedman R, Wang X, Jiang B, Hagan T, Kennelly EJ, Kronenberg F, Weinstein IB (2007) Gene expression analysis of the mechanisms whereby black cohosh inhibits human breast cancer cell growth. *Anticancer Res.* 27(2): 697-712.
102. Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, Reichling J, Saller R (2004) Evaluation of cell death caused by triterpene glycosides and phenolic substances from *Cimicifuga racemosa* extract in human MCF-7 breast cancer cells. *Biol Pharm Bull* 27: 1970-1975.
103. Hostanska K, Nisslein T, Freudenstein J, Reichling J, Saller R (2004) *Cimicifuga racemosa* extract inhibits proliferation of estrogen receptor- positive and negative human breast carcinoma cell lines by induction of apoptosis. *Breast Cancer Res Treat* 84: 151-160.
104. Lynch CR, Folkers ME, Hutson WR (2006) Fulminant hepatic failure associated with the use of black cohosh: a case report. *Liver Transpl.* 12(6): 989-92.

105. Whiting PW, Clouston A, Kerlin P (2002) Black cohosh and other herbal remedies associated with acute hepatitis. *Med J Aust* 177: 440-443.
106. Lontos S, Jones RM, Angus PW, Gow PJ (2003) Acute liver failure associated with the use of herbal preparations containing black cohosh. *Med J Aust* 179: 390-391.
107. Levitsky J, Alli TA, Wisecarver J, Sorrell MF (2005) Fulminant liver failure associated with the use of black cohosh. *Dig Dis Sci* 50: 538-539.
108. Cohen SM, O'Connor AM, Hart J, Merel NH, Te HS (2004) Autoimmune hepatitis associated with the use of black cohosh: a case study. *Menopause* 11: 575-577.
109. Minciullo PL, Saija A, Patafi M, Marotta G, Ferlazzo B, Gangemi S (2006) Muscle damage induced by black cohosh (*Cimicifuga racemosa*). *Phytomedicine* 13: 115-118
110. Meyer S, Vogt T, Obermann EC, Landthaler M, Karrer S (2007) Cutaneous pseudolymphoma induced by *Cimicifuga racemosa*. *Dermatology* 214(1): 94-6.
111. European Medicines Agency (2006) Assessment of case reports connected to herbal medical products containing *cimicifugae racemosae* rhizome. London [Online im Internet] URL: [http://www.bfarm.de/cln\\_012/nn\\_1160684/SharedDocs/Publikationen/DE/Pharmakovigilanz/stufenplverf/cimicifuga\\_hmpc\\_assessment.templateId=raw,property=publicationFile.pdf/cimicifuga\\_hmpc\\_assessment.pdf](http://www.bfarm.de/cln_012/nn_1160684/SharedDocs/Publikationen/DE/Pharmakovigilanz/stufenplverf/cimicifuga_hmpc_assessment.templateId=raw,property=publicationFile.pdf/cimicifuga_hmpc_assessment.pdf) [Stand: 28.11.2009, 13:22].
112. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte, BfArM (2006) Informationen zum Stufenplanverfahren. Bonn [Online im Internet] URL: [http://www.bfarm.de/cln\\_012/nn\\_421158/DE/Pharmakovigilanz/stufenplanverf/Liste/stp-cimicifuga.html\\_\\_nnn=true](http://www.bfarm.de/cln_012/nn_421158/DE/Pharmakovigilanz/stufenplanverf/Liste/stp-cimicifuga.html__nnn=true) [Stand 28.11.1009, 14:52].
113. Wuttke W, Seidlova-Wuttke D, Gorkow C (2003) The *Cimicifuga* preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 44: 67-77.
114. Frei-Kleiner S, Schaffner W, Rahlfs VW, Bodmer CH, Birkhäuser M (2005) *Cimicifuga racemosa* dried ethanolic extract in menopausal disorders: a double-blind placebocontrolled clinical trial. *Maturitas* 51: 397-404.
115. Osmers R, Friede M, Liske E, Schnitker J, Freudenstein J, Henneicke-von Zepelin HH (2005) Efficacy and safety of isopropanolic black cohosh extract for climacteric symptoms. *Obstet Gynecol.* 105(5 Pt 1): 1074-83.
116. Nappi RE, Malavesi B, Brundu B, Fracchinetti F (2005) Efficacy of *Cimicifuga racemosa* on climacteric complaints: a randomized study versus low-dose transdermal estradiol. *Gynecol Endocrinol* 20: 30-35.
117. Raus K, Brucker C, Gorkow C, Wuttke W (2006) First-time proof of endometrial safety of the special black cohosh extract (*Actaea* or *Cimicifuga racemosa* extract) CR BNO 1055. *Menopause.* 13(4): 678-91.
118. Newton KM, Reed SD, LaCroix AZ, Grothaus LC, Ehrlich K, Guiltinan J (2006) Treatment of vasomotor symptoms of menopause with black cohosh, multibotanicals, soy, hormone therapy, or placebo: a randomized trial. *Ann Intern Med.* 145(12): 869-79.
119. Pockaj BA, Gallagher JG, Loprinzi CL, Stella PJ, Barton DL, Sloan JA, Lavasseur BI, Rao RM, Fitch TR, Rowland KM, Novotny PJ, Flynn PJ, Richelson E, Fauq AH (2006) Phase III double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial of black cohosh in the management of hot flashes: NCCTG Trial N01CC1. *J Clin Oncol.* 24(18): 2836-41.

120. Verhoeven MO, van der Mooren MJ, van de Weijer PH, Verdegem PJ, van der Burgt LM, Kenemans P; CuraTrial Research Group (2005) Effect of a combination of isoflavones and *Actaea racemosa* Linnaeus on climacteric symptoms in healthy symptomatic perimenopausal women: a 12-week randomized, placebo-controlled, double-blind study. *Menopause*. 12(4): 412-20.
121. Zepelin HH, Meden H, Kostev K, Schroder-Bernhardi D, Stammwitz U, Becher H (2007) Isopropanolic black cohosh extract and recurrence-free survival after breast cancer. *Int J Clin Pharmacol Ther*. 45(3): 143-54.
122. Rebbeck TR, Troxel AB, Norman S, Bunin GR, DeMichele A, Baumgarten M, Berlin M, Schinnar R, Strom BL (2007) A retrospective case-control study of the use of hormone-related supplements and association with breast cancer. *Int J Cancer*. 120(7): 1523-8.
123. Wuttke W, Gorkow C, Seidlova-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): 185-96.
124. Verhoeven MO, Teerlink T, Kenemans P, Zuijdgeest-van Leeuwen SD, van der Mooren MJ (2007) Effects of a supplement containing isoflavones and *Actaea racemosa* L. on asymmetric dimethylarginine, lipids, and C-reactive protein in menopausal women. *Fertil Steril*. 87(4): 849-57.
125. Altersberger I, Kurz B (1999) Heilpflanzen-Katalog: Sojabohne. Grünwald [Online im Internet] URL: <http://www.heilpflanzen-katalog.de/beschreibung-sojabohne.html> [Stand: 28.11.2009, 15:40].
126. Food and Agriculture organization of the United Nations, FAOSTAT (2009) Countries by commodity: Soybeans [Online im Internet] URL: <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx> [Stand: 28.11.2009, 15:52].
127. Velasquez MT, Bhatena SJ (2007) Role of dietary soy protein in obesity. *Int J Med Sci*. 4(2): 72-82.
128. Messina M, Redmond G (2006) Effects of soy protein and soybean isoflavones on thyroid function in healthy adults and hypothyroid patients: a review of the relevant literature. *Thyroid*. 16(3): 249-58.
129. Dillingham BL, McVeigh BL, Lampe JW, Duncan AM (2007) Soy protein isolates of varied isoflavone content do not influence serum thyroid hormones in healthy young men. *Thyroid*. 17(2): 131-7.
130. Taku K, Umegaki K, Sato Y, Taki Y, Endoh K, Watanabe S (2007) Soy isoflavones lower serum total and LDL cholesterol in humans: a meta-analysis of 11 randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*. 85(4): 1148-56.
131. Tempfer CB, Bentz EK, Leodolter S, Tscherne G, Reuss F, Cross HS, Huber JC (2007) Phytoestrogens in clinical practice: a review of the literature. *Fertil Steril*. 87(6): 1243-9.
132. Unfer V et al. (2004) Endometrial effects of long-term treatment with phytoestrogens: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil. Steril*. 82: 145-148.
133. Lamartiniere CA, Zhang JX, Cotroneo MS (1989) Genistein studies in rats: potential for breast cancer prevention and reproductive and developmental toxicity. *Am J Clin Nutr*. 68(6): 1400-1405.
134. Altersberger I, Kurz B (1999) Heilpflanzen-Katalog: Gartenbohne. Grünwald [Online im Internet] URL: <http://www.heilpflanzen-katalog.de/beschreibung-gartenbohne.html> [Stand: 28.11.2009, 13:22].

135. Informationszentrale gegen Vergiftungen (2009) Gartenbohne. Bonn [Online im Internet] URL: <http://www.meb.uni-bonn.de/giftzentrale/jahresbericht99-Dateien/typo3/index.php?id=118> [Stand: 28.11.2009, 15:22].
136. Max Planck Institut für Züchtungsforschung (2009) Gartenbohne. Köln [Online im Internet] URL: <http://www.mpiz-koeln.mpg.de/oeffentlichkeitsarbeit/kulturpflanzen/Nutzpflanzen/Gartenbohne/index.html> [Stand: 28.11.2009, 15:25].
137. Boue SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE (2003) Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem.* (8): 2193-9.
138. Effenberger K (2004) Der Einfluss von Phytoestrogenen auf Estrogenrezeptor gesteuerte Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellpopulationen – Untersuchung potentieller pflanzlicher Alternativen zur Hormonersatztherapie in der Menopause. Dissertation. Universität Hamburg.
139. Diaz-Batalla L, Widholm JM, Fahey GC Jr, Castano-Tostado E, Paredes-Lopez O (2006) Chemical components with health implications in wild and cultivated Mexican common bean seeds (*Phaseolus vulgaris* L.). *J Agric Food Chem.* 54(6): 2045-52.
140. Altersberger I, Kurz B (1999) Heilpflanzen-Katalog: Besenginster. Grünwald [Online im Internet] URL: <http://www.heilpflanzen-katalog.de/beschreibung-besenginster.html> [Stand: 28.11.2009, 15:32].
141. Brum-Bousquet M, Lallemand JY, Tillequin F, Faugeras G, Delaveau P. (1981) [Isolation and properties of sarothamnoside, a novel isoflavone glycoside from various sarothamnus species.] [Article in German] *Planta Med.* 43(12): 367-74.
142. Informationszentrale gegen Vergiftungen (2009) Besenginster. Bonn [Online im Internet] URL: <http://www.meb.uni-bonn.de/giftzentrale/jahresbericht99-Dateien/typo3/index.php?id=540> [Stand: 28.11.2009, 15:38].
143. Sundararajan R, Haja NA, Venkatesan K, Mukherjee K, Saha BP, Bandyopadhyay A, Mukherjee PK (2006) *Cytisus scoparius* link - a natural antioxidant. *BMC Complement Altern Med.* 6: 8.
144. Raja S, Ahamed KF, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Mukherjee PK (2007) Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats. *J Ethnopharmacol.* 109(1): 41-7.
145. Willett KL, Roth RA, Walker L (2004) Workshop overview: Hepatotoxicity Assessment for Botanical Dietary Supplements. *Toxicological Sciences* 79: 4-9.
146. Riediger (2005) Stellungnahme der AGES (Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit) zu Noni- Saft. Wien [Online im Internet] URL: <http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/neuartige-lebensmittel/noni-saft> [Stand: 28.11.2009, 15:52].
147. Poginsky B, Westendorf J, Blömeke B, Marquardt H, Hewer A, Grover P, Phillips D (1991) Evaluation of DNA-binding activity of hydroxyanthrachinones occurring in *Rubia tinctorum* L. *Carcinogenesis* 12: 1265-1271.
148. West BJ, Jensen CJ, Westendorf J (2006) Noni juice is not hepatotoxic. *World of Gastroenterol* 12(22): 3616-9.
149. Westendorf J, Effenberger K, Iznaguen H, Bazar S (2007) Toxicological and Analytical Investigations of Noni (*Morinda citrifolia*) Fruit Juice. *J. Agric. Food Chem.* 55: 529-537.
150. Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte( BfArM) (2009) Bescheid zu Cimicifuga- haltige Arzneimittel. Bonn [Online im Internet] URL: [http://www.bfarm.de/cln\\_028/nn\\_1160684/SharedDocs/Publikationen/DE/Pharmakovigilanz/stufenplverf/cimicifuga\\_20\\_\\_bescheid,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/cimicifuga%20\\_bescheid.pdf](http://www.bfarm.de/cln_028/nn_1160684/SharedDocs/Publikationen/DE/Pharmakovigilanz/stufenplverf/cimicifuga_20__bescheid,templateId=raw,property=publicationFile.pdf/cimicifuga%20_bescheid.pdf) [Stand: 28.11.2009, 16:02].



151. Nishida M, Kasahara K, Kaneko M, Iwasaki H, Hayashi K (1985)[Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors] [Article in Japanese] *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* 37: 1103-1111.
152. Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurbide E (1986) Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line). *Cancer Res.* 46: 2771-2774.
153. Littlefield BA, Gurbide E, Markiewicz L, McKinley B, Hochberg RB (1990) A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: estrogenic action of delta 5 adrenal steroids. *Endocrinology* 127: 2757-2762.
154. Markiewicz L, Garey J, Adlercreutz H, Gurbide E (1993) In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 45: 399-405.
155. Wober J, Weisswange I, Vollner G (2002) Stimulation of alkaline phosphatase activity in Ishikawa cells induced by various phytoestrogens and synthetic estrogens. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 83: 227-233.
156. Le Du MH, Millan JL (2002) Structural evidence of functional divergence in human alkaline phosphatases. *J Biol Chem.* 277(51): 49808-14.
157. Linhardt K, Walter K (1962) Phosphatasen (Phosphomonosesterasen). In: *Methoden der enzymatischen Analyse.* Bergmeyer H U, Verlag Chemie, Weinheim, 779-785.
158. Robinson JA, Harris SA, Riggs L, Spelsberg TC (1997) Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. *Endocrinology* 138 (7): 2919-2927.
159. Pons M, Gagne D, Nicolas JC, Mehtali M (1990) A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti) estrogen molecules. *Biotechniques* 9 (4): 450-9.
160. Power KA, Thompson LU (2003) Ligand-induced regulation of ER alpha and ER beta is indicative of human breast cancer cell proliferation. *Breast Cancer Res Treat.* 81(3): 209-21.
161. Joung KE, Kim YW, Sheen YY (2003) Assessment of estrogenicity of isoflavonoids using MCF-7-ERE-Luc cells. *Arch Pharm Res.* 26 (9): 756-62.
162. Gutendorf B, Westendorf J (2001) Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166: 79-89.
163. De Wet JR, Wood KV, DeLuca M, Helinski DR, Subramani S (1987) Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 7(2): 725-37.
164. Krattenmacher R, Knauthe R, Parczyk K, Walker A, Hilgenfeldt U, Fritzscheier KH (1994) Estrogen action on hepatic synthesis of angiotnesinogen and IGF-I: direct and indirect estrogen effects. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 48 (2-3): 207-214.
165. Klett C, Ganten D, Hellmann W, Kaling M, Ryffel GU, Weimar-Ehl T, Hackenthal E (1992) Regulation of hepatic angiotensinogen synthesis and secretion by steroid hormones. *Endocrinology* 130 (6): 3660-8.
166. Kaling M, Weimar-Ehl T, Kleinhans M, Ryffel GU (1990) Transcription factors different from the estrogen receptor stimulate in vitro transcription from promoters containing estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol.* 69 (2-3): 167-78.
167. Chang E, Perlmann AJ (1987) Multiple hormones regulate angiotensinogen messenger ribonucleic acid levels in a rat hepatoma cell line. *Endocrinology* 121 (2): 513-9.
168. Williams GM (1977) Detection of Chemical Carcinogenes by Unscheduled DNA Synthesis in Rat Liver Primary Cell Cultures. *Cancer Research* 37: 1845-1851.

169. Feldmer M, Kaling M, Takahashi S, Mullins JJ, Ganten D (1991) Glucocorticoid- and estrogen-responsive elements in the 5'-flanking region of the rat angiotensinogen gene. *J Hypertens.* 9(11): 1005-12.
170. Fischer M, Baessler A, Schunkert H (2002) Renin angiotensin system and gender differences in the cardiovascular system. *Cardiovascular Research* 53: 672-677.
171. Bronner (2003) Mechanisms and functional aspects of interstitial calcium absorption. *J Exp Zool A comp Exp Biol.* 300: 47-52.
172. Yun SM, Choi KC, Kim ICH, An BS, Lee GS, Hong EJ, Oh GT, Jeung EB (2004) Dominant expression of porcine Calbindin-D9k in the uterus during luteal phase. *Mol Reprod Dev* 67: 251-6.
173. Choi KC, Leung PC, Jeung EB (2005) Biology and physiology of Calbindin-D9k in female reproductive tissues: involvement of steroids and endocrine disruptors. *Reprod Biol Endocrinol.* 3: 66.
174. Diel P, Walter A, Fritzscheier KH, Hegele-Hartung C, Knauth R (1995) Identification of estrogen regulated genes in Fe33 rat hepatoma cells by differential display polymerase chain reaction and their hormonal regulation in a rat liver and uterus. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 55: 363-73.
175. Dang VH, Nguyen TH, Choi KC, Jeung EB (2007) A calcium-binding protein, calbindin-D9k, is regulated through an estrogen-receptor mediated mechanism following xenoestrogen exposure in the GH3 cell line. *Toxicol Sci.* 98: 408-15.
176. An BS, Kang SK, Shin JH, Jeung EB (2002) Stimulation of calbinding-D(9k) mRNA expression in the rat uterus by octyl-phenol, nonylphenol and bisphenol. *Mol Cell Endocrinol.* 191: 177-86.
177. Rickard DJ, Subramaniam M, Spelsberg TC (1999) Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. *J Cell Biochem.* 32-33: 123-132.
178. Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R (1994) Effective amplification of long targets from cloned inserted and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 91(12): 5695-9.
179. Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A, Weissman SM (1996) Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res.* 6(7): 633-8.
180. Jensen D: A quantitative test for mutagenicity in V 79 hamster cells. In Kilbey et al. (1984) *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*, Elsevier, Amsterdam.
181. So FV, Guthrie N, Chambers AF, Carroll KK (1997) Inhibition of proliferation of estrogen receptor-positive MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids in the presence and absence of excess estrogen. *Cancer Letters* 112: 127-133.
182. Freyberger A, Schmuck G (2005) Screening for estrogenicity and antiestrogenicity: a critical evaluation of an MVLN cell-based transactivation assay. *Toxicol Lett.* 155 (1): 1-13.
183. Hall JM, McDonnell DP, Korach KS (2002) Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function, and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol.* 16 (3): 469-86.
184. Lieberei S (2007) Auswirkung von Pflanzenausüngen auf Estrogenrezeptoren in U-2-OS/ ER $\alpha$  und ER $\beta$ - sowie hFOB/ER $\alpha$  - Zellen unter besonderer Berücksichtigung der Extrakte aus *Morinda citrifolia* (Noni). Dissertation. Universität Hamburg.
185. Deng S, Brett J, West C, Jensen J (2008) Simultaneous characterization and quantitation of flavonol glycosides and aglycones in noni leaves using a validated HPLC- UV/ MS method. *Food Chemistry* (111): 526-529.
186. Utesch D, Feige K, Dasenbrock J, Broschard TH, Harwood M, Danielewska-Nikiel B, Lines TC (2008) Evaluation of the potential in vivo genotoxicity of quercetin. *Mutat Res.* 654 (1): 38-44.

187. Okamoto T (2005) Safety of quercetin for clinical application (Review). *Int J Mol Med.* 16 (2): 275-8.
188. Silva ID, Rodrigues AS, Gaspar J, Maia R, Laires A, Rueff J (1997) Involvement of rat cytochrom 1A1 in the biotransformation of kaempferol to quercetin: relevance to the genotoxicity of kaempferol. *Mutagenesis* 12(5): 383-60.

## 10 Anhang

### 10.1 Bezugsquellen der Materialien

2-Aminoanthracen (Sigma, München)

2-Nitrofluoren (Merck/Schuckardt, Darmstadt)

<sup>3</sup>H-Thymidin (NEN Corp., Boston, MA, USA)

6-Thioguanin (Sigma, München)

7,12-dimethylbenz(a)anthracen (DMBA) (Sigma, München)

alkalischer Puffer (1,5 M 2-Amino-2-methyl-1-propanol, pH 10,3 , Nr. 221, Fa. Sigma, St. Louis, MO, USA)

AMV Reverse Transkriptase (Roche, Mannheim)

Auswertungs-Software des Ames Tests (Fa. BioSys GmbH, Karben)

Auswertungs-Software des UDS-Tests (UDS-IV, Fa. BioSys, Karben)

automatisches Koloniezählgerät (Arteck, Modell 880, Fa. BioSys GmbH, Karben)

Biotran II Colony Counter (Fa. BioSys, Karben)

Blaugel (Merck, Darmstadt)

Bleibblock (Roche, Mannheim, Nr. 1909312)

Chloroform Isopropanol (Merck, Darmstadt)

DEPC (Sigma, München)

DMEM / Ham's F12 (Sigma, St. Louis, MO, USA)

DMEM Medium w/o Phenolred (Gibco, Grand Island, NY, USA)

DMSO (Promega Notes Number 65, 1998, Mannheim)

E<sub>2</sub> (Sigma chemicals, St. Louis, MO, USA)

EE (Sigma chemicals, St. Louis, MO, USA)

Entwickler (Kodak D10, Stuttgart)

FBS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

FBS-cs (Gibco, Grand Island, NY, USA)

Giemsa (Merck, Darmstadt)

Glutamaxx (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Glutamin (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Inkubationspuffer (Promega Madison, WI, USA)

Light Cycler – Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Nr. 2239264)

Light Cycler – Glaskapillaren (Roche, Mannheim, Nr. 1909339)

Light Cycler (Roche, Mannheim, Nr. 2011468)

Lithium Chlorid Lösung (Sigma, St. Louis, MO, USA)

LucLite® Luminescence Reporter Gene Assay System (Perkin Elmer, MA, USA licensed from Promega)

Luminometer (Turner Designs 20/20, Sunnyvale, CA, USA)

Molecular Probes mit einem Pico Green® ds DNA Quantitation Kit (P-7589) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

MVLN-Zellen (J. Giesy und A. Blankenship, Michigan State University, USA. Herstellung erfolgte im Labor von M. Pons, Institute National de la Santé et de la Recherche Medicale, Montpellier.)

Natriumazid (Sigma Aldrich, Deisenhofen)

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin (MNNG) (Sigma, München)

NTB2- Photoemulsion (Kodak, Stuttgart)

Nukleotide: ATP, TTP, GTP und CTP (Promega, Madison, WI, USA)

Nutrient Broth Nr.2 (Oxoid, Basingstoke, UK)

Papanicolaou- Lösung (Merck, Darmstadt)

Penicillin-Streptomycin Lösung (Sigma chemicals, St. Louis, MO, USA)

Pico Green® ds DNA Quantitation Kit (P-7589) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

Plastikplättchen (Thermanox cover-slips 2,5cm, Nunc, Thermo Fisher, Roskilde, DK)

p-Nitrophenylphosphat Stammlösung (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Primer (MWG, Ebersberg)

Proben der Nonipflanze (Fa. TNI, und eigene Sammlungen)

Proben für PCR Versuch (Fa. Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe)

Random- und 1µl Oligo dT Primer (Promega, Madison, WI, USA)

Relative Quantification Software RelQuant® (Roche, Mannheim)

Rinder Insulin (Sigma chemicals, St. Louis, MO, USA)

RNAsin (Promega Madison, WI, USA)

S9- Fraktion (Organon Technica, Eppelheim)

Schnellfixierer (Kodak, Stuttgart)  
Spectracount® (Hewlett Packard)  
TE-Pufferkonzentrat (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)  
Trizol Lösung (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)  
UV Lampe (Fa. Heraeus, Typ 5301, 4W)  
Williams Medium E (Gibco, Grand Island, NY, USA)  
Wistar Ratten (Fa. Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld)

## 10.2 Abkürzungsverzeichnis

AAF: 2-Acetylaminofluoren  
ACE: Angiotensinogen Converting Enzyme  
AGES: Österreichische Agentur für Gesundheit und Ernährungssicherheit GmbH  
AP: alkalische Phosphatase  
AT: Angiotensinogen  
ATP, AMP: Adenosintriphosphat, Adenosinmonophosphat  
BMI: Body Mass Index  
CaBP: Calcium-Binding-Protein (CaBP9k), CalbindinD(9k)  
CFE: Colony Forming Efficiency, Anwachsrate  
CIM: *Cimicifuga racemosa* (L.), Traubensilberkerze  
DCC-FBS: Dextran Coated FBS-cs  
DEPC-Wasser: Diethylpyrocarbonat-Wasser  
DMBA: 7, 12-dimethylbenz(a)anthracen  
DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium  
DMSO: Dimethylsulfoxid  
E<sub>2</sub>: 17beta-Estradiol  
EE: Ethinylestradiol  
EFSA: European Food Safety Authority, Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit  
ER: Estrogen Rezeptor  
ERE: Estrogen Response Element  
ERKO: Knockout Maus mit Gendefekt im Estrogen Rezeptor  
EtOH: Ethanol  
FBS-cs: Fetal Bovine Serum - Charcoal Stripped

FBS: Fetal Bovine Serum  
g: Erdbeschleunigung  
HK: Housekeeping Gen, Gen für grundsätzliche Stoffwechselaktivitäten im Zell-turnover.  
hPBGD: humaner Primer für das PBGD-Gen  
HPLC: High Performance Liquid Chromatography  
HPRT: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase  
HRT: Hormon Replacement Therapy  
INF: Interferon  
KHK: Koronare Herz Krankheit  
LUC-Assay: Luciferase - Assay  
MNNG: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin  
MRSA: Methicillin Resistente Saphylococcus Aureus  
N1 - N4: Noni Probe Nr. 1 - 4 im RT-PCR-Versuch  
PBGD: Porphobilibogen Deaminase Gen  
PBS: Phosphat Buffered Saline  
PCR: Polymerase Chain Reaction  
PH: Primäre Hepatozyten  
PHA: Phaseolus vulgaris (L.), Gartenbohne  
RAAS: Renin Angiotensin Aldosteron System  
rAT: Primer der Ratte für das AT-Gen  
rCaBP: Primer der Ratte für das CaBP-Gen  
RLU: Relative Light Units  
RT- PCR: Reverse Transkriptase - PCR  
SAR: Sarthamnus scoparius (L.), Besenginster  
SERM: Selektive Estrogen Rezeptor Modulatoren  
SOY: Glycine max (L.), Sojabohne  
Taq- Polymerase: Thermus aquaticus Polymerase  
TE-Buffer: Tris + EDTA Buffer  
TNI: Tahitian Noni International GmbH  
TNLT: Tahiti Noni Leaf Tea  
Tukeys-HSD-Test: Tukeys Honest Significant Difference Test  
UDS-Test: Unscheduled DNA Synthesis Test  
WHI: Women's Health Initiative

## 10.3 Beschreibung der verwendeten Proben

Die Noni-Pflanzen stammen aus verschiedenen Teilen Französisch-Polynesiens. Dort wurden sie von ausgebildeten Pflückern geerntet. Meistens handelt es sich dabei um Wildsammlungen. Die ausgewachsenen Blätter, die bereits eine dunkelgrüne Farbe aufweisen, werden verwendet. Im Anschluss wurden die Blätter in Trocknungströmmeln bei 50 °C getrocknet. Außerdem wurden Proben verwendet, die vom Leiter der Arbeitsgruppe auf den Malediven gesammelt wurden. Diese wurden in frischem Zustand nach Hamburg verbracht und dort gefriergetrocknet.

Tab. 19 : Verwendete Pflanzen-Proben

<b>Probe:</b>	<b>Pflanzenteil:</b>	<b>Auszug:</b>	<b>Herkunft:</b>
LUC 1	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	In Ethanol gelöst: 2 g getrocknete und zerkleinerte Blätter wurden mit 20 ml EtOH abs. eine Nacht bei Zimmertemperatur unter ständiger Bewegung belassen und im Anschluss mit einem Faltenfilter und Spritzenfilter (22 µm) abgefiltert.	Tahiti
LUC 2 und AP 1	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	In Wasser gelöst: 2 g getrocknete und zerkleinerte Blätter wurden mit 20 ml kochendem Wasser übergossen und nach 30 Minuten mit einem Faltenfilter und Spritzenfilter (22 µm) abgefiltert.	Tahiti
LUC 3	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	In Ethanol gelöst: 2 g getrocknete und zerkleinerte Blätter wurden mit 20 ml EtOH abs. eine Nacht bei Zimmertemperatur unter ständiger Bewegung belassen und im Anschluss mit einem Faltenfilter und Spritzenfilter (22 µm) abgefiltert.	Malediven

LUC 4 und AP 2	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	In Wasser gelöst: 2 g getrocknete und zerkleinerte Blätter wurden mit 20 ml kochendem Wasser übergossen und nach 30 Minuten mit einem Faltenfilter und Spritzenfilter (22 µm) abgefiltert.	Malediven
LUC 5 und AP 6	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	In Ethanol gelöst: 2 g des Teebeutelinhalts wurden mit 20 ml EtOH abs. eine Nacht bei Zimmertemperatur unter ständiger Bewegung belassen und im Anschluss mit einem Faltenfilter und Spritzenfilter (22 µm) abgefiltert.	Käuflich zu erwerbender Teebeutel der Firma TNI. Die Blätter stammen von den Marquesas Inseln.
LUC 6 und AP 3	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	In Wasser gelöst: 2 g des Teebeutelinhalts wurden mit 20 ml kochendem Wasser übergossen und nach 30 Minuten mit einem Faltenfilter und Spritzenfilter (22 µm) abgefiltert.	Käuflich zu erwerbender Teebeutel der Firma TNI. Die Blätter stammen von den Marquesas Inseln.
LUC 7 und AP 5	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	Gelöst in 60 % Methanol, eingedampft, und gelöst in 80 % Ethanol. 100 mg/ml	Tahiti, von Firma TNI erhalten.
LUC 8 und AP 4	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	Hexan Fraktion in EtOH abs. 100 mg/ml	Tahiti, von Firma TNI erhalten.
LUC 10	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	Saft gefriergetrocknet, H <sub>2</sub> O 20 mg/ml	Tahiti, von Firma TNI erhalten.
LUC 9	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	Saft gefriergetrocknet, EtOH abs. 20 mg/ml	Tahiti, von Firma TNI erhalten.



CIM	Trauben- silberkerze ( <i>Cimicifuga racemosa</i> )	In DMSO: Extraktion von 2 kg Droge mit 10-facher Menge 60 % Ethanol bei 50-60 °C, zweifach. Absaugen und Vereinigung mit Extraktlösung.	Von Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe erhalten.
PHA	Gartenbohne ( <i>Phaseolus vulgaris</i> )	In EtOH: Extraktion von 2 kg gemahlener Droge mit 7-facher Menge Heptan über 1 h bei 50 °C, zweifach. Abkühlung auf 20 °C und Absaugen mit Nutsche. Vereinigung mit Extraktlösung. Einengung und Nachtrocknung. Extraktion zweimalig mit 7-facher Menge Ethylacetat über 1 h bei 50 °C. Abkühlen und Absaugen. Einengung und Nachtrocknung.	Von Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe erhalten.
SAR	Besenginster ( <i>Sarothamnus scoparius</i> )	In EtOH: Extraktion von 1 kg Droge mit 7-facher Menge Heptan über 1 h bei 50 °C, zweifach. Abkühlung auf 20 °C und Absaugen mit Nutsche. Vereinigung mit Extraktlösung. Einengung und Nachtrocknung. Extraktion zweimalig mit 7-facher Menge Ethylacetat über 1 h bei 50 °C. Abkühlen. Absaugen. Einengung und Nachtrocknung.	Von Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe erhalten.
SOY	Soja ( <i>Glycine max</i> )	In DMSO: Wirbel- / Rührextraktion von 2 kg Sojaschrot in 80 % Ethanol im Verhältnis 1:10. Zerkleinerung über 5 - 10 Min. mit Ultra-Turrax. 1 h bei 60 °C Rührextraktion.	Von Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe erhalten.
Noni 1	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	Blatt-Saft in Ethanol gelöst	Tahiti, von Firma TNI erhalten.
Noni 2	Noni-Blätter ( <i>Morinda citrifolia</i> L.)	Blatt-Saft in H <sub>2</sub> O gelöst	Tahiti, von Firma TNI erhalten.

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe für Toxikologie des Institutes für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt.

An dieser Stelle möchte ich besonderen Dank an Herrn Prof. Dr. J. Westendorf aussprechen für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung der Arbeit und die stets bereichernden Erläuterungen in fachlichen Diskussionen.

Frau Dr. K. Effenberger bin ich für die Einarbeitung und die fachliche Begleitung des Vorhabens dankbar.

Bei Sabine Schröder möchte ich mich nicht nur für die praktische Hilfe und die zahlreichen Ratschläge in der Laborarbeit, sondern auch ganz besonders für die persönliche Begleitung in all den Jahren bedanken.

Daniela Litzenberger danke ich für die Einarbeitung in die Technik des Luciferase Assays.

Zudem bin ich allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe der Toxikologie zu Dank verpflichtet.

Für die Bereitstellung der pflanzlichen Proben danke ich der Firma Tahitian Noni International Inc. und der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel GmbH.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. P. Jecker für die Durchsicht der Arbeit und die freundliche Unterstützung zum Gelingen der Arbeit.

Ich danke der Familie Lieberei, insbesondere meiner Freundin, Studien- und Promotionskollegin Dr. Swenja Lieberei, die immer ein offenes Ohr hatte und mich in Zeiten des Zweifels zu ermutigen vermochte, sowie Herrn Prof. Dr. R. Lieberei für die persönliche und fachliche Unterstützung.

Mein persönlicher Dank gilt der Familie von Pein, insbesondere Andrea von Pein, für die Durchsicht der Arbeit, die ständige und selbstlose Hilfsbereitschaft, ohne die die Arbeit nie ein Ende gefunden hätte.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Familie für die niemals endende Unterstützung, die es mir ermöglicht hat, an dieses Ziel zu gelangen.

## **Eidesstattliche Versicherung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: .....