

Aus der Universitätsfrauenklinik der Universitätsmedizin Rostock

**Die Wirkung der kommerziell erworbenen Flavonoide (Quercetin, Kampferol und Chrysin) auf die malignen Mammakarzinomzellen (MCF7 und BT20) und die benignen veränderten Mammazellen (MCF10a und MCF12a) (Östrogenrezeptor positiv und negativ) in vitro.**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Universitätsmedizin

Rostock

2014

Vorgelegt von

**Ahmed Abutayeh**

geboren am 18.11.1987

in Gaza (Palästina)

1. Gutachter: Prof. Dr. med. V. Briese, Universitätsfrauenklinik,  
Klinikum Südstadt Rostock,  
Südring 81, 18059 Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Karin Kraft, Lehrstuhl für Naturheilkunde  
Universitätsmedizin Rostock  
Ernst-Heydemann-Str. 6, 18057 Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. Udo Jeschke,  
Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe,  
Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München,  
Maistrasse 11, D-80337 München

Datum der Einreichung: 30.09.2014

Datum der Verteidigung: 08.12.2015

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>10</b>
1.1. Das Mammakarzinom.....	10
1.1.1. Epidemiologie .....	10
1.1.2 Ursache und Risikofaktoren.....	11
1.1.3 Die Entstehung von Brustkrebs.....	12
1.1.4 Therapiemöglichkeiten.....	13
1.2 Sekundäre Pflanzenstoffe .....	16
1.2.1 Flavonoide.....	17
1.2.2 Phytoöstrogene.....	21
1.3 Östrogene .....	23
1.3.1 Wirkung der Östrogene .....	24
1.3.2 Östrogenrezeptor .....	25
1.4 Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) .....	28
1.4.1 Tamoxifen .....	29
<b>2. Zielsetzung .....</b>	<b>30</b>
<b>3. Materialien und Chemikalien.....</b>	<b>31</b>
3.1 Testsubstanzen .....	31
3.2 Kontrollsubstanzen .....	31
3.3 Zellkulturmedien.....	31
3.3 Zelllinien.....	31
3.4 Geräte.....	33
3.5 Chemikalien.....	34
3.6 Antikörper zur Immunhistochemie .....	35
<b>4. Methoden.....</b>	<b>35</b>
4.1 Kultivierung der Zellen.....	35
4.2. Bestimmung der Zellvitalität .....	36
4.3 Test- und Substanzvorbereitung .....	37
4.4 Immunhistochemie (IHC).....	38

4.4.1 Durchführung der Immunhistochemie .....	39
4.5 LDH-Zytotoxizitätstest .....	39
4.5 BrdU-Zellproliferationstest.....	41
4.6 MTT-Test.....	43
4.7 Statistische Auswertung.....	44
<b>5. Ergebnisse .....</b>	<b>45</b>
5.1. Immunhistochemie (IHC).....	45
5.2 LDH-Zytotoxizitätstest .....	48
5.2.1 MCF-7 Zelllinie .....	48
5.2.2 BT-20 Zelllinie.....	51
5.2.3 MCF-10a Zelllinie.....	54
5.2.4 MCF-12a Zelllinie.....	57
5.3 BrdU-Zellproliferationstest.....	59
5.3.1 MCF-7 Zelllinie .....	60
5.3.2 BT-20 Zelllinie.....	63
5.3.3 MCF-10a Zelllinie.....	66
5.3.4 MCF-12a Zelllinie.....	69
5.4 MTT-Test.....	71
5.4.1 MCF-7 Zelllinie .....	72
5.4.2 BT-20 Zelllinie.....	75
5.4.3 MCF-10a Zelllinie.....	78
5.4.4 MCF-12a Zelllinie.....	81
<b>5.5 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse .....</b>	<b>84</b>
<b>6. Diskussion.....</b>	<b>89</b>
6.1 Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren .....	89
6.2 Die Wirkung von Kaempferol auf die verschiedenen Zelllinien MCF-7, BT-20, MCF-10A und MCF-12A Zellen.....	90
6.3 Die Wirkung von Quercetin auf die verschiedenen Zelllinien MCF-7, BT-20, MCF-10A und MCF-12A Zellen.....	93
6.4 Die Wirkung von Chrysin auf die verschiedenen Zelllinien MCF-7, BT-20, MCF-10A und MCF-12A Zellen .....	95

<b>7. Zusammenfassung .....</b>	<b>98</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>100</b>
<b>9. Thesen.....</b>	<b>108</b>
<b>10. Danksagung.....</b>	<b>110</b>
<b>11. Eidesstattliche Erklärung .....</b>	<b>111</b>
<b>L E B E N S L A U F .....</b>	<b>112</b>

## **Abkürzungen:**

IARC (The International Agency for Research on Cancer)

BRCA1 Breast cancer 1

BRCA2 Breast cancer 2

ca. circa

HER2 Humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor 2

CMF-Chemotherapie Cyclophosphamid-Methotrexad-5-Fluororacil-Chemotherapie

EC-Schema Epirubicin-Cyclophosphamid-Schema

EGFR Epidermal Growth Factor Receptor

DCSI Duktale Karzinom in situ

LCIS Lobuläre Karzinom in situ

ADH Atypical Duktal Hyperplasia

LN Lobular Neoplasia

MRT Magnetresonanztomographie

GnRH-Analoga Gonadotropin Releasing Hormon

TCH-Schema Taxan-Carboplatin-Herceptin-Schema

in vitro Bezeichnung für organische Vorgänge, die außerhalb eines Organismus unter künstlichen Bedingungen stattfinden.

in vivo Bezeichnung für organische Prozesse oder auch biologische Experimente, wenn sie am oder im lebendigen Organismus ablaufen

VEGF Vascular Endothelial Growth Factor

PgR Progesteron-Rezeptoren

IRS -1 Insulinrezeptorsubstrat 1

SHBG	Sex hormone-binding globulin
FSH	das follikelstimulierende Hormon
LH	das luteinisierende Hormon
ATP	Adenosintriphosphat
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
HDL	High-density lipoprotein
LDL	Low-density Lipoprotein
CYP3A4	Cytochrom P450 3A4
DANN	Desoxyribonucleinsäure
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor alpha
ER $\beta$	Estrogenrezeptor beta
DBD	DNA-Bindungsdomäne
LBD	Ligandenbindungsdomäne
AF-1	Aktivierungsfunktion 1
AF-2	Aktivierungsfunktion 2
ERE	Östrogen-response-element
MAPK	mitogen-activated protein kinase
ERK	extracellular signal-regulated kinase
EGF	Epidermal-Wachstumsfaktor
IGF-1	insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
SERMs	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren
FDA	Food and Drug Administration
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
Ham's F-12	Nutrient Mixture F-12
°C	Grad Celsius, Temperatur
cm <sup>2</sup>	Quadratmeter
ml	Milliliter
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
DMSO	Dimethylsulfoxyd
PBS	Puffer (10x Dulbecco´s)
FKS	Fetales Kälberserum
HCL	Salzsäure
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
ICH	Immunhistochemie
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Trypsin-EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Rpm	revolutions per minute
µl	Mikroliter
MTT	3-[4, 5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid
LDH	Laktatdehydrogenase
BrdU	Bromdesoxyuridin
M	molar, mol/l
µg	Mikrogramm
NADH <sup>+</sup>	Nicotindiamadenindinukleotid

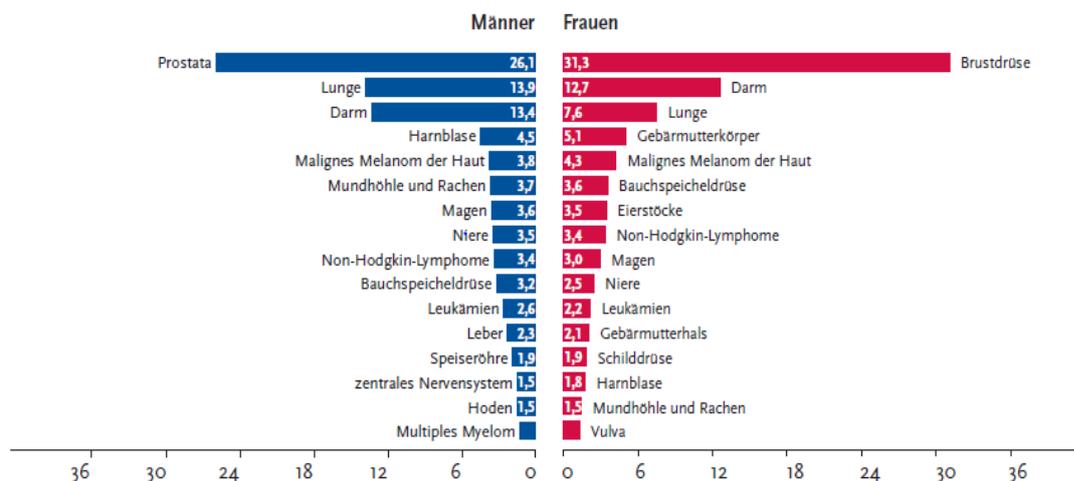
INT	2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
TMB	Tetramethylbenzidin
SPSS	Data Mining Statistical Analysis Software
usw.	und so weiter
z.B.	zum Beispiel
bzw.	beziehungsweise
PLK -1	Polo-like Kinase 1
PARP	Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase
CDK1	Cyclin-abhängigen Kinase 1
IRS -1	Insulinrezeptorsubstrat 1
AhR	Aryl- Kohlenwasserstoff –Rezeptor
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor

# 1. Einleitung

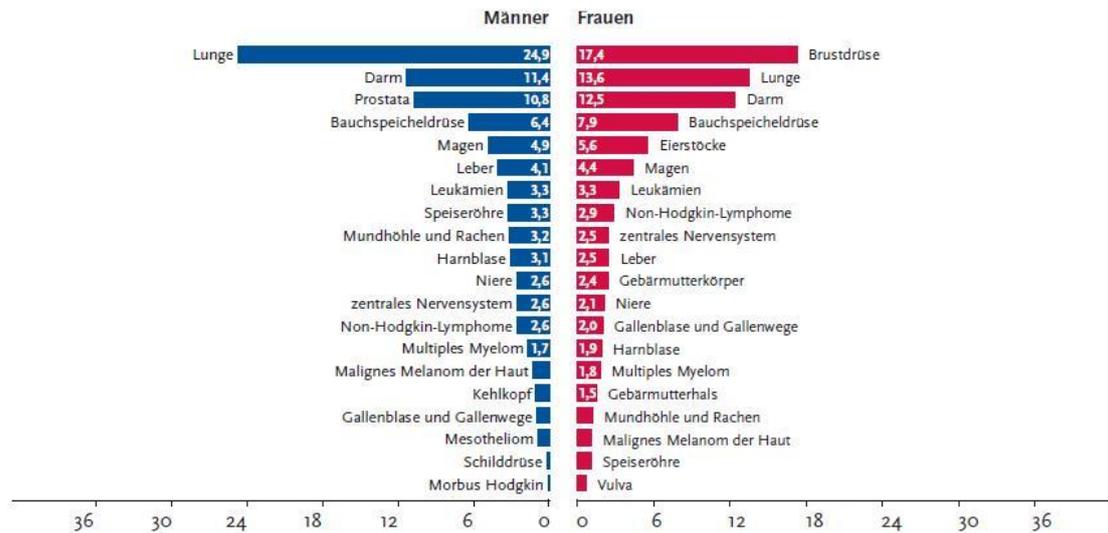
## 1.1. Das Mammakarzinom

### 1.1.1. Epidemiologie

Brustkrebs stellt die häufigste weibliche Krebserkrankung sowohl in Entwicklungs- als auch in Industrieländern dar, und ist die primäre Todesursache bei Frauen weltweit. Trotz gut dokumentierter Senkung der Sterblichkeit an Brustkrebs in den letzten zwei Jahrzehnten ist die Inzidenz weiter gestiegen. Durch die fortgeschrittene Therapie haben sich die Überlebenschancen deutlich verbessert [1]. Im Jahr 2010 betrug die Zahl der neu erkrankten Frauen in Deutschland 70.340, etwa 31% (s. Abb. 1-1) und der Sterbefälle 17.466, etwa 17% (s. Abb. 1-2). Etwa eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs [2]. Nach Angaben der IARC (The International Agency for Research on Cancer) wurden im Jahr 2012 weltweit 1,7 Millionen Frauen mit Brustkrebs diagnostiziert. Mit 522.000 Todesfällen stellt Brustkrebs weltweit die häufigste Krebstodesursache bei Frauen im Jahr 2012 dar[3]. Zur Früherkennung von Brustkrebs wird das Mammographie-Screening eingesetzt. Dadurch wird die Sterblichkeit gesenkt und die Lebenserwartung verlängert [4]. Eine Studie in 7 schwedischen Landkreisen, die ungefähr 33 % der Bevölkerung von Schweden ausmachen, zeigte durch ein organisiertes Mammographie- Screening-Programm an Frauen eine Reduktion der Sterblichkeit um 40-45% [4].



**Abb. 1-1:** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebsneuerkrankungen in Deutschland im Jahr 2010 ( ohne nicht-melanotischen Hautkrebs ) [2].



**Abb. 1-2:** Prozentualer Anteil der häufigsten Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland im Jahr 2010 [2].

### 1.1.2 Ursache und Risikofaktoren

Als wichtigster Risikofaktor für Brustkrebs gilt die genetische Disposition, wobei etwa 5-10% aller Mammakarzinome erblich bedingt sind. Bei den meisten Frauen, die an erblichen Formen des Mammakarzinoms erkranken, lassen sich Mutationen in den Breast-Cancer-Genen BRCA1 und BRCA2 nachweisen [5]. Frauen, die Mutationen an diesen Genen tragen, erkranken ungefähr 20 Jahre früher als Frauen ohne genetische Mutation und haben ein lebenslanges Risiko von 50-80% an Brustkrebs zu erleiden. Ca. 60% der Genmutation tragenden Frauen können zusätzlich an einem kontralateralen Mammakarzinom und 10-40% dieser betroffenen Frauen an einem Ovarialkarzinom erkranken [5]. Auch zu den Risikofaktoren gehören frühe Menarche, späte Menopause, Kinderlosigkeit, ein höheres Alter bei der ersten Geburt, Hormonsubstitution (Östrogene und Gestagene), orale Kontrazeptiva, Übergewicht, Bewegungsmangel, Alkoholabusus, Nikotinabusus und Frauen mit bestimmten gutartigen Brustveränderungen (lobuläre Neoplasien und atypische duktaile Hyperplasien) [2]. Auch dichtes Brustdrüsengewebe ist mit einem erhöhten Risiko für Brustkrebs assoziiert und erschwert die Früherkennung von Brusttumoren mithilfe der Mammographie [6]. Frauen, die Linkshänderinnen sind, haben ein höheres Risiko an Brustkrebs zu erkranken, als Frauen, die mit der rechten Hand schreiben. Linkshändigkeit kann ein Indikator für intrauterine Exposition gegenüber Östrogenen sein, die das Risiko von Brustkrebs erhöhen können [7]. Darüber hinaus ist statistisch belegt, dass die linke Brust häufiger betroffen ist als die rechte Brust. Hierfür sind die Ursachen noch unklar. Aktualisierte Daten aus Schweden über

Seitenhäufigkeit zeigten, dass von 1970 bis 2006, 616 Männer an der linken Brust und 545 an der rechten Brust erkrankten, was ein Verhältnis von 1,13, oder ein 13% höheres Risiko auf der linken Seite aufweist. Im gleichen Zeitraum wurden 96.354 Frauen mit linksseitigem Brustkrebs und 90304 mit rechtsseitigem Brustkrebs diagnostiziert, was ein Verhältnis von 1,07 oder 7% höheren Risiko auf der linken Seite darstellt[8].

### **1.1.3 Die Entstehung von Brustkrebs**

Mammakarzinom ist eine bösartige Veränderung der Brustdrüse. Ein Tumor entsteht wenn neue Zellen ungebremst wachsen und alte Zellen nicht mehr absterben. Durch Streuung von lebensfähigen Tumorzellen können in anderen Organen Metastasen gebildet werden [9]. Je früher der Brustkrebs diagnostiziert wird, desto besser sind im Allgemein die Behandlungsoptionen. 85-90% der Brusttumoren gehen von den Epithelzellen der Milchgänge (duktales Karzinom) (*Ductuli* = lat. Gang) aus und 10-15% entwickeln sich aus den Drüsenläppchen (lobuläres Karzinom) (*Lobuli* = lat. Läppchen) der Brust [10]. Für die Größenzunahme und den aggressiven Krankheitsverlauf des Brustkrebses spielen spezielle Wachstumsfaktoren eine wichtige Rolle. Dabei stellt HER2-neu (human epidermal growth factor receptor2) einen speziellen Wachstumsfaktor-Rezeptor dar. Die Überexpression des humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors 2 (HER2) wurde in 15% aller Brustkrebserkrankungen beobachtet und ist mit einer schlechten Prognose hinsichtlich der Gesamterwartung verbunden [11]. Mit der Überexpression sind prädiktiv z.B. schlechtes Ansprechen auf Cyclophosphamid-Methotrexad-5-Fluorouracil-Chemotherapie (CMF-Chemotherapie), besseres Ansprechen auf Epirubicin-Cyclophosphamid-Schema (EC-Schema), schlechtes Ansprechen auf eine hormonelle Behandlung bei rezeptorpositivem Karzinom und gutes Ansprechen auf eine Trastuzumabbehandlung zu erwarten [12]. Ein anderer Wachstumsfaktor-Rezeptor ist der EGF-Rezeptor (Epidermal Growth Factor Receptor, EGFR). EGF-Rezeptor-positive Karzinome sind häufig mit Lymphknotenmetastasen verbunden [12]. In vielen Fällen entsteht das Mammakarzinom multizentrisch. Am häufigsten (50-55%) sind die Mammakarzinome im oberen äußeren Quadranten lokalisiert. Der obere innere Quadrant und die retromamilläre Region sind mit gleicher Häufigkeit (jeweils ca. 15%) betroffen. Der untere innere Quadrant ist in seltenen Fällen betroffen (ca.5%) [13]. Zu den häufigsten gutartigen Veränderungen der Brustdrüse gehören die Mastopathie und das Fibroadenom. Bei dem Fibroadenom handelt es sich um ein gutartigen knotigen Geschwulst, bestehend aus einem drüsen- und einem bindegewebigen Anteil [14]. Es gibt auch einige gutartige Zellveränderungen der Brustdrüse, aus denen

ein Mammakarzinom entstehen könnte. Dazu gehören DCIS (duktales Carzinoma in situ), LCIS (lobuläres Carcinoma in situ), ADH (Atypische duktales Hyperplasie) und LN (lobuläre Neoplasie) [14] [15]. Diese Zellveränderungen sind weder tastbar noch erkennbar bei der Mammographie, welche die Erkennung diese Veränderungen erschwert. So können sich diese Zellveränderungen in der Mammographie als erkennbare Mikroverkalkungen darstellen. Andere diagnostische Untersuchungen sind Sonographie, MRT (Magnetresonanztomographie) und Farbdoppler. Diese noch auf ihren Ursprungsort begrenzten entarteten Zellen lassen sich meistens entfernen [14]. Überdies entwickeln sich ca. 80% der bösartigen Mammakarzinome aus den Milchgängen der Brustdrüse und werden als duktales Karzinom bezeichnet. Außerdem entstehen ungefähr 10% der bösartigen Mammakarzinome aus den Drüsenläppchen und werden als lobuläres Karzinom bezeichnet. Morbus Paget manifestiert sich als seltene meistens invasive Krebsform der Mamille und des Warzenvorhofs. Etwa 30% der Brustkrebspatientinnen bilden im Laufe der Erkrankung Metastasen. Metastasen treten häufig in den Lymphknoten, dem Knochen (z.B. Wirbelsäule, Rippen), der Lunge, der Haut, dem Gehirn und der Leber auf [16].

#### **1.1.4 Therapiemöglichkeiten**

Zur Behandlung von Frauen mit Brustkrebs stehen verschiedene Therapiemöglichkeiten zur Verfügung: Operation, Bestrahlung, Hormontherapie, Chemotherapie und Antikörpertherapie [17]. Die Behandlungswahl ist von verschiedenen Faktoren abhängig, z.B. Art des Tumors, seiner Größe und Ausbreitung, Alter und Zustand der Patienten (prä- oder postmenopausal) sowie Tumorempfindlichkeit auf Hormone [18]. Auch unter Therapieverfahren und Krankheitsverlauf muss die psychosoziale und emotionale Lage der Patienten berücksichtigt werden. Dabei zeigen Entspannungsverfahren, psychoedukative Interventionen sowie psychotherapeutische Einzel- und Gruppenintervention Verbesserung auf die Kriterien Angst, Depression, psychisches Wohlbefinden und Lebensqualität [5].

Die Operation des Brustkrebses steht zunächst im Vordergrund [17]. Durch die operative Entfernung von Brusttumoren kann dies zur Heilung führen (kurative Therapie). Dabei wird das Tumorgewebe vollständig entfernt einschließlich der zugehörigen Lymphknoten. Heutzutage wird bei 60-70% aller Mammakarzinome eine brusterhaltende Operation durchgeführt [18]. Kontraindikationen gegen eine brusterhaltende Operation sind Tumorbefall der Mamille, multizentrisches Wachstum, ungünstiges Verhältnis von Tumorgröße und Brustvolumen, inflammatorisches Karzinom sowie Kontraindikationen gegen die obligatorische

Nachbestrahlung bei brusterhaltender Operation [18]. Im Anschluss an die brusterhaltende Operation ist eine Bestrahlung der erkrankten Brustdrüse inkl. der Thoraxwand obligativ. Dadurch wird verbliebenes Tumorgewebe in der Brust entfernt und die Lokalrezidivrate von 30% auf 5% reduziert [19].

In den letzten Jahren hat die Anwendung der sog. neoadjuvanten systemischen Chemotherapie zugenommen. Das Ziel dieses Verfahrens besteht darin die Rate brusterhaltender Therapien zu erhöhen sowie die Verkleinerung eines inoperablen Tumors, um ein operablen Zustand des Tumors zu erreichen. Eine weitere Indikation dieses Verfahrens besteht beim Vorliegen eines inflammatorischen Mammakarzinoms. Dabei wird die Operation erst nach präoperativer neoadjuvanter Chemotherapie durchgeführt [12][19].

Ergänzend zur Operation und Bestrahlung wird oft zusätzlich bei den Patientinnen eine postoperative sog. adjuvante Chemotherapie durchgeführt. Dabei erhalten die Patienten zellteilungshemmende Medikamente, sog. Zytostatika. Zytostatika wirken systemisch d.h. im ganzen Körper und werden in mehreren Zyklen als Infusion, Injektion oder in Tablettenform verabreicht [20]. Hierbei verwendet man am häufigsten Antrazykline, Cyclophosphamid und taxanhaltige Chemotherapeutika, wobei eine Polychemotherapie wirksamer als eine Monotherapie ist [19][21]. Durch eine adjuvante Chemotherapie kann eine Senkung der Rezidivrate und der Todesrate am Mammakarzinom erreicht werden. Das relative Risiko, innerhalb von 10 Jahren am Mammakarzinom zu versterben, kann etwa um 25-30% gesenkt werden [21]. Frauen, die im fortgeschrittenen Stadium sind und Metastasen haben, erhalten eine palliative Chemotherapie. Diese Behandlung hat zum Ziel, das Krebswachstum aufzuhalten, die Beschwerden der Patientinnen zu lindern und das Leben zu verlängern [22].

Heutzutage nimmt die Hormontherapie einen wichtigen Platz in der adjuvanten Therapie des Mammakarzinoms ein. Das Tumorwachstum kann durch Geschlechtshormone z.B. Östrogen und Testosteron beeinflusst werden, wenn deren Gewebe spezielle Bindungsstellen (Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren) besitzen [23]. Bei prämenopausalen Frauen sind ungefähr die Hälfte der Brusttumoren rezeptorpositiv, wobei hingegen bei postmenopausalen Frauen etwa drei Viertel der Tumoren rezeptorpositiv sind. Hormonrezeptorpositive Karzinome zeigen eine bessere Prognose [19]. Im Mittelpunkt der Hormontherapie steht Tamoxifen als ein starker Östrogenantagonist. Tamoxifen wird in der Regel für 5 Jahre verabreicht, wobei eine mehr als 5jährige Behandlung keine Verbesserung zeigte. Unter der Tamoxifentherapie wurde eine deutliche Verlängerung des rezidivfreien Intervalls und des Überlebens in allen Al-

tersgruppen beobachtet. Dabei wird auch die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines kontralateralen Mammakarzinoms um die Hälfte reduziert [18, 21]. Weiterhin wird die Therapie nach fünfjähriger Tamoxifengabe für noch weitere 2-3 Jahre auf Aromatasehemmer (z.B. Anastrozol, Letrozol, Aminoglutethimid und Exemestan) umgestellt [19]. Aromatasehemmer wirken durch Aufhebung der Wirkung des Enzyms Aromatase, die Androgene in Östrogene durch Aromatisierung umwandelt. Im Gegensatz zu prämenopausalen Frauen, in denen die meisten der Östrogene in den Eierstöcken gebildet werden, bei postmenopausalen Frauen sind vor allem in den peripheren Geweben des Körpers (z.B. Muskel und Fettgewebe) synthetisiert. Sie dürfen nur bei postmenopausalen Patientinnen verwendet werden [24]. Bei prämenopausalen Frauen stellen sowohl die Anwendung von GnRH- Analoga (Gonadotropin Releasing Hormon) als auch die operative ovarielle Ablation eine Therapiemöglichkeit dar. Im Gegensatz zur Ovariectomie besteht bei GnRH- Analoga die Möglichkeit einer zeitlich begrenzten Suppression der Ovarialfunktion [18]. GnRH-Analoga (z.B. Buserelin, Gosserelin und Leuporelin) werden normalerweise für 2 bis 5 Jahre verabreicht [12, 23]. Bei langfristiger kontinuierlicher Gabe von GnRH-Analoga wird die Produktion von Sexualhormonen gehemmt. Der Östrogenspiegel einer Frau, die mit GnRH-Analoga behandelt wird, ähnelt dem einer Frau in der Postmenopause [24].

Bei etwa einem Viertel aller Mammakarzinome liegt eine Überproduktion von HER2-neu vor. Für diese Patienten kommt eine Behandlung mit dem Antikörper Trastuzumab infrage [23]. Die einjährige Zugabe von Trastuzumab verbessert signifikant das krankheitsfreie sowie das Gesamtüberleben bei Frauen mit HER2-positivem Brustkrebs. Trastuzumab in Kombination mit Paclitaxel ist für die Behandlung von metastasiertem Mammakarzinom auch zugelassen, wenn keine anthrazyklinhaltige Chemotherapie vorher durchgeführt wurde. In der letzten Zeit ist das TCH-Schema (Taxan, Carboplatin, Herceptin) bei metastasiertem Mammakarzinom bevorzugt, hierbei wird auf ein Antrazyklin insbesondere bei Patienten mit kardialer Vorschädigung verzichtet. Im Gegensatz zu der anthrazyklinhaltigen Chemotherapie zeigt das TCH-Schema ein niedrigeres Risiko für Kardiotoxizität und Leukämie [12, 25].

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, Mammakarzinome mittels sekundären Pflanzenstoffen zu beeinflussen. Diese sekundären Pflanzenstoffe werden im folgenden Kapitel erläutert.

## 1.2 Sekundäre Pflanzenstoffe

Pflanzliche Naturstoffe teilen sich in primäre und sekundäre Pflanzenstoffe. Primäre Pflanzenstoffe sind essentielle Bestandteile des zellulären Stoffhaushalts, die für das Leben der Pflanze notwendig sind. Als Beispiel lassen sich Kohlenhydrate (einschließlich Ballaststoffe), Proteine und Fette bzw. Öle benennen. Mit Ausnahme von Ballaststoffen wirken sie beim Menschen als Nährstoffe [26]. Daneben produzieren Pflanzen eine große Anzahl an chemisch sehr unterschiedlichen Verbindungen, die keine direkte Funktion für das Wachstum und die Entwicklung haben. Diese Verbindungen werden sekundäre Pflanzenstoffe genannt [27]. Sie kommen im Gegensatz zu den primären Pflanzenstoffen nur in sehr geringen Mengen in den Pflanzen vor. Mit einer gemischten Kost beträgt die tägliche Aufnahme von sekundären Pflanzenstoffen etwa 1,5g [28]. Die sekundären Pflanzenstoffe haben für die Pflanzen viele ökologische Funktionen. Eine wichtige Funktion ist die Verteidigung gegen Fraß (Herbivorie), Pathogene (Krankheitserreger) oder Konkurrenten. Einige wirken als Farbstoff, Duftstoff oder Geschmacksstoff, andere begünstigen die Verbreitung von Pollen und Samen. Für den menschlichen Körper leisten viele sekundäre Pflanzenstoffe einen Beitrag zum Schutz vor Krankheiten wie z.B. Krebs, Infektionen und Herz-Kreislauf-Störungen [29, 30].

Abb. Aufgrund ihrer chemischen Struktur und ihren funktionellen Eigenschaften lassen sich die sekundären Pflanzenstoffe in verschiedenen Substanzklassen einteilen: Carotinoide, Phytosterine, Glucosinolate, Saponine, Polyphenole, Protease-Inhibitoren, Terpene, Phytoöstrogene und Sulfide. Bei den Polyphenolen handelt es sich um aromatische Kohlenstoffverbindungen, die keine einheitlichen Stoffklassen darstellen. Chemisch lassen sie sich auf die Struktur des Phenols zurückführen. Sie kommen in allen Pflanzen überwiegend in den äußeren Schichten des Pflanzenaufbaus vor. Hauptvertreter sind Phenolsäuren, Flavonoide, Cumarine und Lignane [28, 30].

### 1.2.1 Flavonoide

Flavonoide sind in Pflanzen weit verbreitet und erfüllen viele Funktionen. Sie sind die wichtigsten Pflanzenpigmente, die Pflanzen eine rote, violette oder blaue Färbung geben [26]. Etwa 5000 natürlich vorkommende Flavonoide wurden aus verschiedenen Pflanzen beschrieben und sie sind damit die am häufigsten untersuchten Polyphenole. Der Name für Flavonoide leitet sich vom lateinischen Wort *flavus* = gelb ab. Flavonoide liegen hauptsächlich in den Randschichten und Blättern der Pflanzen, deswegen sollten beispielsweise Äpfel nicht geschält und Tomatenhaut nicht entfernt werden. Interessanterweise ist der Flavonidgehalt einer Pflanze auch von der Sorte, dem Klima, der Erntezeit und Dauer der Lagerung abhängig [28]. Flavonoide bestehen aus 2 aromatischen (A und B) und einem O-heterozyklischen Ring(C). Für die Biosynthese von Flavonoiden stellen Acetat und Phenylalanin die Grundsubstanzen dar. Nach Zusammenfügen der C-Gerüste dieser beiden Elemente entsteht das C6-C3-C6-Grundgerüst (s. Abb. 1-3), woraus alle Flavonoide entstehen können [29]. Anhand der strukturellen Unterschiede am heterozyklischen C-Ring lassen sich die Flavonoide in 6 Untergruppen einteilen: Flavonole, Flavanole, Flavanone, Flavone, Anthocyane und Isoflavonoide (Tab. 1-1) [31]. Die Flavonoide haben ein großes Wirkungsspektrum. Bei den Pflanzen spielen sie eine wichtige Rolle beim Aufbau und Reparatur der Zellwand und sie bieten Schutz vor UV-Licht und Krankheitserregern. Sie hemmen das Wachstum von Bakterien und Viren, wirken entzündungshemmend und beeinflussen die Blutgerinnung im menschlichen Körper. Ebenfalls schützen sie vor freien Radikalen, Krebs und Herzinfarkt [32]. Flavonoide, die in dieser Arbeit verwendet werden, sind Quercetin, Chrysin und Kaempferol.

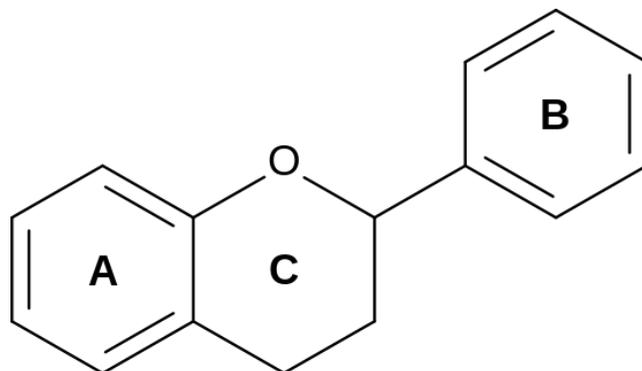


Abb. 1-3: Grundgerüst der Flavonoide [27].

A und B: aromatische Ringe

C: O-heterozyklischer Ring

**Tab. 1-1: : Die Verbindungsklassen der Flavonoide [31].**

<b>Verbindung</b>	<b>Beispiel</b>	<b>Vorkommen</b>	<b>Eigenschaften</b>
Flavonole	Quercetin Kaempferol	Zwiebeln Endivie	Hellgelbe Pigmente
Falvanole	Catechin Epicatechingallate	Rotwein, Apfel Grüner Tee	Adstringierende Wirkung
Flavanone	Naringenin Hesperidin	Grapefruit Orange	Bitterstoffe
Flavone	Apigenin Luteolin	Sellerie Paprika	Hallgelbe Pigmente
Anthocyane	Malvidin Cyanidin	Blaue Trauben Kirschen	Rote und blaue Farbpigmente
Isoflavonoide	Genistein Daidzein	Sojabohnen Sojabohnen	Phytoöstrogene

### **1.2.1.1 Quercetin**

Das im Pflanzenreich weit verbreitete Quercetin ist ein gelber Naturfarbstoff, der in vielen Pflanzen vorkommt. Große Mengen an Quercetin findet man in Äpfeln, Zwiebeln, Brokkoli, grünen Bohnen, Kirschen, Grünkohl und Traubenschalen [28,33]. Quercetin kommt auch in Heilpflanzen wie z.B. *Ginkgo biloba*, *Hypericum perforatum* (Johanniskraut) und *Sambucus canadensis* (Holunder) vor [34]. In der Natur kommen die meisten Flavonoide in Form von Glykosiden vor, d.h. gebunden an ein Zuckermolekül. Man bezeichnet das Glykosid vom Quercetin als Rutin. Durch die Glykosylierung steigt die Polarität der Flavonoide, was die Speicherung von Flavonoiden in den Vakuolen der Pflanzenzelle ermöglicht [35]. Dem Quercetin werden in zahlreichen Studien gesundheitsfördernde Wirkungen zugeschrieben. Neben antikanzerogenen, antimikrobiellen, antiödematösen, antiinflammatorischen und immunmodulierenden Wirkungen zeigt Quercetin ausgeprägte antioxidative Wirkung [34]. Die antiinflammatorischen Eigenschaften beruhen auf der Inhibition entzündungsfördernder Enzyme (Cyklooxygenase, Lipoxygenase), sowie auf der anschließenden Hemmung der Freisetzung von Entzündungsmediatoren wie z.B. Leukotrienen und Prostaglandinen [33,34]. Verschiedene Studien zeigen, dass Quercetin *in vitro* den Redoxstatus von Zellen beeinflussen kann. Dabei kann Quercetin entweder direkt als Radikalfänger oder indirekt (z.B. durch das Abfangen von freien Metallionen, Modulation bestimmter Enzymsysteme, Regeneration physiologischer Antioxidantien) den Redoxzustand der Zelle beeinflussen [35]. Darüber hinaus zeigten *in vitro*-Studien eine wachstumshemmende Wirkung von Quercetin auf fast alle Tumorzelllinien[33]. In der Tumorzelle beeinflusst Quercetin zahlreiche Moleküle, die innerhalb der verschiedenen Signalkaskaden der Tumorzellen für die Prolife-

ration und antiapoptisch wirken [33]. Zusätzlich hemmt Quercetin die Topoisomerase 1 und 2, vermindert Her-2-neu und Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) und hemmt die Migration der Tumorzellen [33]. Durch die östrogenartige Wirkung von Quercetin auf die Prostata kann Quercetin sowohl in der Behandlung als auch in der Prävention von Prostatakrebs helfen [36]. Des Weiteren verstärkt Quercetin die Wirkung von Zytostatika. Bemerkenswert ist die Eigenschaft von Quercetin, „Multidrug“-resistente Tumorzellen gegenüber Zytostatika zu sensibilisieren [33].

Neben diesen protektiven Wirkungen von Quercetin weisen einige Studien ebenfalls auf mutagene und kanzerogene Eigenschaften des Quercetin hin [37]. Die Mutagenität von Quercetin wurde ebenfalls sowohl im Ames-Test als auch in verschiedenen *in vivo*-Studien nachgewiesen [38, 39]. Auch in Tierexperimenten konnte eine deutlich erhöhte Inzidenz von Tumorbildung nachgewiesen werden [37]. Dennoch kann beim Menschen kein kanzerogenes Risiko abgeleitet werden [32].

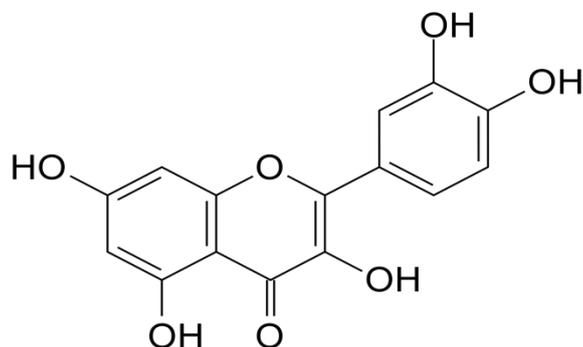
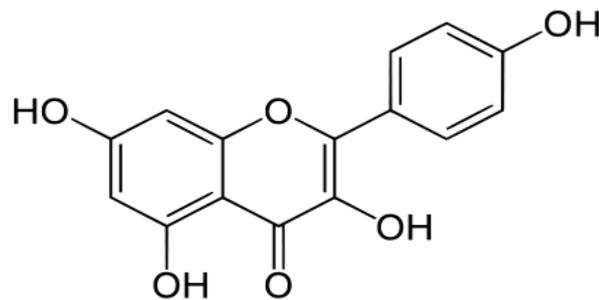


Abb. 1-4: Die Strukturformel von Quercetin [40].

### 1.2.1.2 Kaempferol

Kaempferol ist ein Flavonoid, das in vielen essbaren Pflanzen vorkommt (z. B. Tee, Brokkoli, Weißkohl, Grünkohl, Bohnen, Endivien, Porree, Tomaten, Erdbeeren und Trauben). Kaempferol ist einer der wichtigsten Bestandteile der in der traditionellen Medizin verwendeten Pflanzenarten (z.B. *Ginkgo biloba*, *Tilia spp*, *Equisetum spp*, *Moringa oleifera*) [41]. Einige epidemiologische Studien zeigen einen positiven Zusammenhang zwischen der Kaempferolaufnahme und einem geringen Risiko für die Entwicklung mehrerer Erkrankungen wie Karzinome und Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Zahlreiche präklinische Studien haben gezeigt, dass Kaempferol und einige Glykoside von Kaempferol pharmakologisch unter anderem antioxidative, entzündungshemmende, antimikrobielle, antikanzerogene, kardioprotektive, neuroprotektive, antidiabetische, antiosteoporotische, schmerzstillende und antial-

lergische Wirkungen haben[41]. Auf der molekularen Ebene kommt es unter Einwirkung von Kaempferol zu einer Beeinflussung von Signalmolekülen, Hemmung der Proliferation und Metastasen und Auslösung der Apoptose [42]. Darüber hinaus hemmt Kaempferol die Sekretion von VEGF und unterdrückt dadurch die Angiogenese [42, 43]. Immunozytochemische Studien zeigten, dass Kaempferol zur Hemmung der Expression und der Funktion von Östrogen-Rezeptor- $\alpha$  in menschlichen Brustkrebszellen führt [44]. Zusätzlich beruht die anti-proliferative Wirkung von Kaempferol auf Abnahme der Expression von Progesteron-Rezeptoren ( PgR ), Cyclin D1 und Insulinrezeptorsubstrat1 (IRS -1). Überdies blockiert Kaempferol die durch Östradiol induzierte Zellproliferation [44].



**Abb. 1-5:** Die Strukturformel von Kaempferol [45].

### 1.2.1.3 Chrysin

Chrysin ist ein unter anderem aus der Passionsblume extrahiertes natürlich vorkommendes Flavonoid [46]. In hohen Konzentrationen ist Chrysin in Honig und Propolis zu finden [47,48]. Chrysin ist ein hocheffektiver Aromatasehemmer, dieser blockiert das Enzym Aromatase, das beim Mann für die Umwandlung von Testosteron in Östrogen benötigt wird und bei der Frau für die Aktivierung von Östrogenvorstufen zu aktiven Östradiol verantwortlich ist [46,47]. Das Enzym Aromatase ist im Fettgewebe besonders aktiv [46]. Mit zunehmendem Alter wird daher immer mehr Testosteron in Östrogen umgewandelt, weil die Muskelmasse im Menschen abnimmt und somit das Fettgewebe zunimmt. Darüber hinaus werden Aromatasehemmer besonders bei hormonempfindlichen Mammakarzinomen eingesetzt. Während die Krebs vorbeugende Wirkung von Chrysin hauptsächlich für Frauen von Interesse ist, hilft es Männern, ihren Testosteronspiegel zu erhöhen. Ein hoher Testosteronspiegel verbessert die Potenz und die Vitalität, hebt die Stimmung, beugt Herz-Kreislauferkrankungen und Diabetes vor und vermindert die altersbedingte Muskelatrophie [46].

In vitro-Studien zeigten sich die positiven Wirkungen von Chrysin auf Spermienparameter bei Ratten. Hierbei haben sich die Spermienkonzentration, die Spermienbeweglichkeit und der Serumtestosteronspiegel offensichtlich verbessert, während abnorme Spermienraten durch Chrysin-Behandlung deutlich verringert wurden. Abschließend wird vorgeschlagen, dass Chrysin die Fortpflanzungsorgane bei Ratten positiv beeinflussen kann. Des Weiteren kann Chrysin für die Behandlung der männlichen Unfruchtbarkeit eingesetzt werden [49].

Interessanterweise zeigt Chrysin in einem Tierversuch auch eine angstlösende und entspannende Wirkung. Dieser Effekt wird offenbar insbesondere über GABA- bzw. Benzodiazepin-Rezeptoren vermittelt [50].

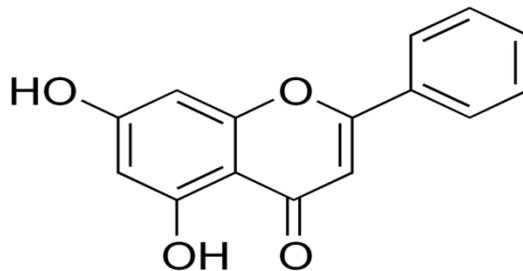
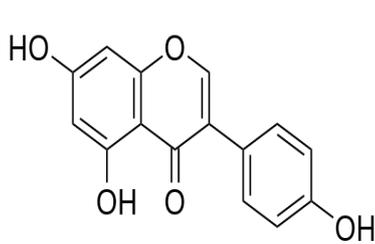


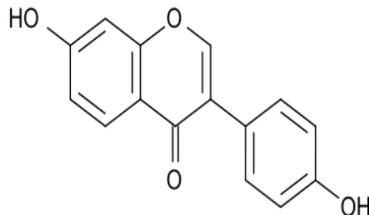
Abb. 1-6: Die Strukturformel von Chrysin [51].

### 1.2.2 Phytoöstrogene

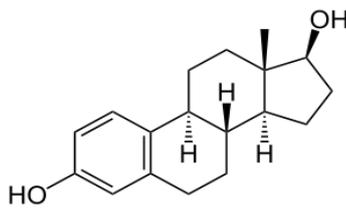
Phytoöstrogene sind sekundäre Pflanzenstoffe, die lediglich strukturelle Ähnlichkeiten mit Östrogenen haben [52]. Durch den ähnlichen chemischen Aufbau können Phytoöstrogene an die Östrogenrezeptoren im menschlichen Stoffwechsel gebunden werden, wodurch eine östrogene oder auch antiöstrogene Wirkung erzielt wird. Sie lassen sich in 4 Gruppen einteilen: Isoflavone, Lignane, Stilbene und Coumestane [52]. Ihre östrogene Wirkung liegt jedoch im Vergleich zum 17-Beta-Östradiol um das 1000 bis 10000 fache niedriger. Andererseits kann die Konzentration von Phytoöstrogenen im Körper bis zu 100 oder 10000 fache höher sein als die der endogenen Östrogene [53]. Lignane und Isoflavone (Genistein, Daidzein) sind die Phytoöstrogene, die die größte Bedeutung für den menschlichen Stoffwechsel haben [53].



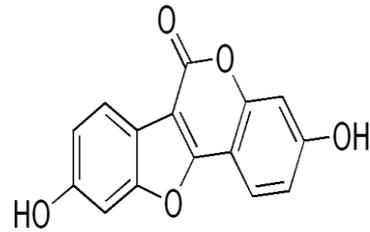
**Genistein**



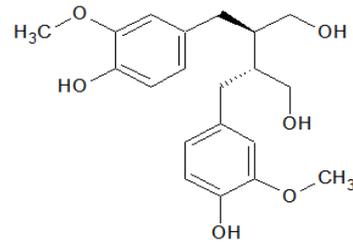
**Daidzein**



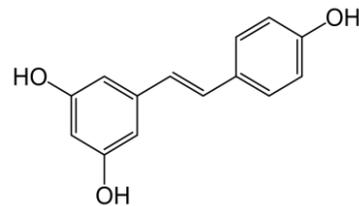
**17β-estradiol.**



**Coumestrol**



**Secoisolariciresinol (Lignan)**



**Resveratrol (Stilbenoid)**

**Abb. 1-7:** Strukturformeln der Phytoöstrogene und 17β-Östradiol [55].

Am Häufigsten findet man Phytoöstrogene in Nüssen, Ölsaaten, Sojaprodukten, Getreide, Brot, Hülsenfrüchten, Fleischprodukten und anderen verarbeiteten Lebensmitteln, die Soja, Gemüse, Obst, alkoholische und alkoholfreie Getränke enthalten. Besonders reich an Isoflavonen sind Sojabohnen und deren Produkte, im Gegensatz dazu stellen Leinsamen die wichtigste Hauptquelle für Lignane dar [54]. Coumestane kommen in sehr wenigen pflanzlichen Lebensmitteln vor, z. B. in Alfalfa, Soja und Kleearten. Der wichtigste Vertreter ist Coumestrol, das die stärkste östrogene Wirkung unter den Phytoöstrogenen aufweist[53]. Resveratrol ist ein bekannter Stilben-Vertreter und kommt besonders in den Schalen der Weintrauben vor [55].

Die Phytoöstrogene haben zahlreiche positive Einflüsse. Aufgrund ihrer Möglichkeit an Östrogenrezeptoren zu binden und dadurch eine östrogenähnliche Wirkung auszulösen, werden sie als Alternative zur Hormonersatztherapie zur Linderung

der klimakterischen Beschwerden und Senkung des Osteoporose-Risikos bei postmenopausalen Frauen eingesetzt [56,57]. Darüber hinaus haben Studien ergeben, dass phytoöstrogenreiche Ernährung eine präventive Wirkung auf verschiedene Krebsarten (u.a. Mammakarzinom) sowie auf Herz-Kreislaferkrankungen ausübt[56,57]. Asiatische Frauen erkranken 5-mal seltener an Brustkrebs als Frauen in Amerika und Europa. Dies wird hauptsächlich auf die Ernährung in Asien zurückgeführt: geringerer Fettanteil, viele Ballaststoffe, reichlich Fisch und nicht zuletzt ein hoher Anteil an Sojaprodukten mit den darin enthaltenen Phytoöstrogenen [58]. Des Weiteren haben mehrere Studien ergeben, dass die Konzentration von Sex Hormone Binding Globulins (SHBG) sich durch die Einnahme von Soja (Isoflavonen) verändert hat [59]. Durch Phytoöstrogene kann die Produktion des Sex Hormone Binding Globulins (SHBG) in der Leber erhöht werden. Das SHBG bindet im Blut Geschlechtshormone. Dadurch sinkt der Serumspiegel von freien Geschlechtshormonen (Östrogen, Testosteron und Dihydrotestosteron). Das hat ebenso eine protektive Wirkung auf verschiedene Krebsarten (u.a. Prostata-, Brust- und Darmkarzinom) [59].

### 1.3 Östrogene

Östrogene sind Steroidhormone, die bei der Frau die Ausbildung und Entwicklung der weiblichen Geschlechtsorgane und -merkmale beeinflussen und zusammen mit Testosteron auf den Stoffwechsel und die Knochenbildung einwirken [60]. Sie werden hauptsächlich im Ovar (in den Granulosazellen der Ovarialfollikel) bzw. in der Plazenta, aber auch in der Nebennierenrinde gebildet. Bei Männern werden sie auch in kleinen Mengen im Hoden produziert. Zusätzlich werden sie auch in geringer Konzentration in anderen Organen produziert, welche Aromataseaktivität aufweisen (Muskel, Fettgewebe und Nerven) [60]. Die wichtigsten Vertreter der Östrogene sind Östradiol, Östriol und Östron [61].

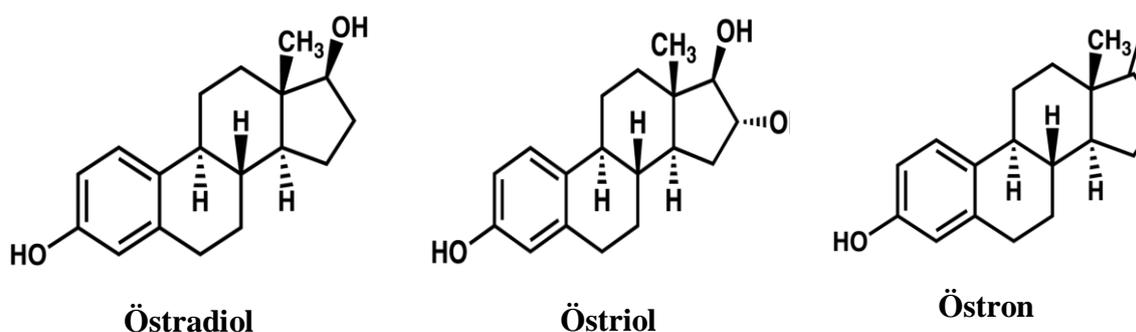


Abb. 1-8: Strukturformeln der wichtigsten Östrogene [61].

Ausgehend von Cholesterin werden alle Steroidhormone gebildet [62]. Die Vorläuferhormone für die Östrogene sind die Androgene (Androstendion und Testosteron), die zunächst in Thekazellen gebildet werden. Diese Östrogen-Vorstufen gelangen dann wieder in die Granulosazellen, wo die Östrogene synthetisiert werden [62]. Diese Reaktion wird durch das Enzym Aromatase katalysiert. Dabei wird eine Methylgruppe von C-19 abgespalten und der A-Ring in eine aromatische Form umgewandelt [62]. Die Biosynthese der Östrogene wird durch Gonadotropine z.B. das follikelstimulierende Hormon (FSH) und das luteinisierende Hormon (LH) reguliert. Die Granulosazellen des reifen Follikels exprimieren FSH-Rezeptoren [63]. Im Gegensatz dazu findet man initial auf den Thekazellen nur LH-Rezeptoren. Die FSH-Stimulation bewirkt eine Erhöhung der FSH-Rezeptoren-Dichte und der Aromataseaktivität sowie die Induktion von LH-Rezeptoren in den Granulosazellen. Durch die LH-Stimulation werden Androgene vermehrt in den Thekazellen gebildet [63]. Etwa 69% der Östrogene im Blut sind an SHBG gebunden, während ca. 30% an Albumin gekoppelt sind. Außerdem liegt ca. 1% des Östradiols im Serum frei vor und können sich damit an Östrogenrezeptoren binden und dadurch eine biologische Funktion entfalten [63].

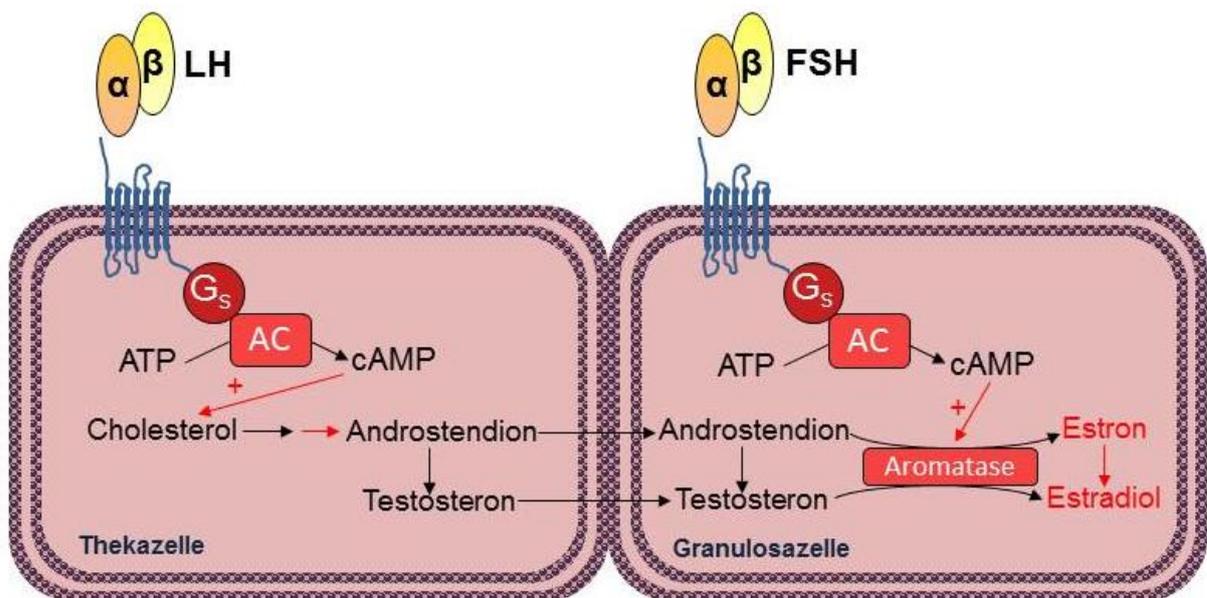


Abb. 1-9: Das Zwei-Zell-System des Ovars: LH= das luteinisierende Hormon, FSH= das follikelstimulierende Hormon, ATP= Adenosintriphosphat, cAMP= Cyclisches Adenosinmonophosphat [63].

### 1.3.1 Wirkung der Östrogene

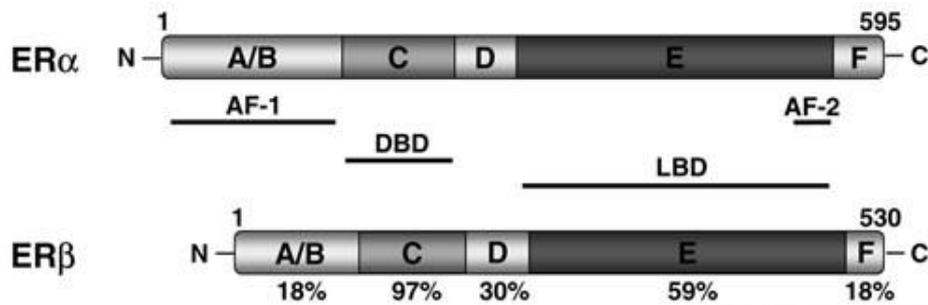
Die hauptsächliche Wirkung der Östrogene ist die Förderung des Wachstums und Reifung der weiblichen Fortpflanzungsorgane und der Entwicklung der sekundären Geschlechts-

merkmale [60]. Bis zur Menopause bewirken Östrogene eine Proliferation der Schleimhaut des Uterus, die für eine Follikelreifung notwendig sind. Östrogene spielen eine wichtige Rolle beim Knochenwachstum und beim Schließen der Epiphysenfuge während der Pubertät. Durch Verringerung des Östrogenspiegels im Blut, z.B. in der Menopause, ist das Osteoporoserisiko bei Frauen stark erhöht. Außerdem schützt dieses Hormon vor Arteriosklerose [60]. Darüber hinaus kann ein verminderter Östrogenspiegel das Hörvermögen verschlechtern. Überdies sind sie wichtig für das Speichern von Gedächtnisinhalten, die Geräusche und Sprache betreffen [64]. Östrogene beeinflussen das Lipidmetabolismus, indem sie Serum-Triglyzeride und den High-density lipoprotein (HDL)-Cholesterinspiegel erhöhen und den Low-density Lipoprotein (LDL)-Cholesterinspiegel vermindern. Der günstige Effekt von Östrogenen auf das HDL/LDL-Cholesterinverhältnis kann die kardiovaskulären Erkrankungen beeinflussen [65]. Neben ihrer rezeptorvermittelten wachstumsfördernden Wirkung auf Tumorzellen trägt die genotoxische Wirkung von Östrogenen zur Kanzerogenität bei. So werden beispielsweise geringere Mengen von Östrogenen in der Leber durch CYP3A4 und in extraheptischen Organen durch CYP1A1 zu 2-OH-Catechol-Östrogenen umgesetzt, aus denen weiter Chinone entstehen können. Diese Chinone können stabile bzw. depurinierende DNA-Addukte bilden und somit möglicherweise zu Mutationen führen [63].

### 1.3.2 Östrogenrezeptor

Östrogenrezeptoren sind Steroidrezeptoren, die zur Gruppe der nukleären Rezeptoren gehören und somit als DNA-bindender Transkriptionsfaktor die Genexpression des Zielgens regulieren. Man unterscheidet zwei Subtypen von Östrogenrezeptoren (ER), ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Im Gegensatz zu ER $\beta$  wird ER $\alpha$  in mehr Geweben exprimiert und stellt einen stärkeren Aktivator der Transkription dar [65]. Im Körper sind die beiden Östrogenrezeptortypen unterschiedlich verteilt. Besonders hohe Konzentrationen an ER $\alpha$  findet man im weiblichen Fortpflanzungstrakt, in der Brustdrüse, im Knochen, in der glatten Muskulatur peripherer Blutgefäße und im Hypothalamus. Hingegen ist ER $\beta$  im Ovar, in der Prostata, im Hoden, in der Lunge, im Thymus und in der Milz stark angereichert [63]. Beide Östrogenrezeptoren bestehen aus sechs funktionellen Domänen (A-F): der N-terminalen A/B-Domäne, der DNA-Bindungsdomäne DBD (C-Domäne), der Dimerisierungsdomäne (D-Domäne), der Liganandenbindungsdomäne LBD (E-Domäne) und der am C-terminalen Ende liegenden F-Domäne (**Abb. 1-10**) [66]. Die Transaktivierungsfunktion des Östrogenrezeptors wird durch die beiden Domänen AF-1 und AF-2 vermittelt. Während die am N-terminalen Ende liegende Ak-

tivierungsfunktion 1 (AF-1, A/B Domäne) Liganden-unabhängig ist, ist die Aktivierungsfunktion 2 (AF-2 Domäne) für die Liganden-abhängige Transaktivierung verantwortlich [66].



**Abb. 1-10: Domänenstruktur der Östrogen-Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ :** A/B Domäne= Aktivierungsfunktion 1 (AF-1), C-Domäne= DNA-bindenden Domänen (DBD), D-Domäne= Dimerisierungsdomäne, E-Domäne= Ligandenbindungsdomäne (LBD), AF-2 Domäne= Aktivierungsfunktion 2, F-Domäne [66].

Bezüglich der Aminosäuresequenz zeigen beide Östrogenrezeptoren eine sehr ähnliche Domänenstruktur. Die DNA-bindenden Domänen DBD (C-Domäne) der beiden Rezeptortypen weisen eine 97%ige Übereinstimmung auf, während die Homologie der Liganden-bindenden Domänen (LBD) zwischen beiden Rezeptoren nur ca. 59 % beträgt. Durch die große Ähnlichkeit der DNA-Bindungsdomänen ist es möglich, dass die beiden Rezeptortypen an die gleichen DNA-Sequenzen binden und ein gleiches Spektrum von Zielgenen regulieren [63,66].

Normalerweise liegt der Östrogenrezeptor in Abwesenheit eines Liganden im Zytosol oder im Kern als Komplex mit anderen intrazellulären Proteinen vor [65]. Nach Hormonbindung kommt es zur Dissoziation dieser Komplexe und einer Konformationsänderung (Transformation). Der transformierte Rezeptor kann nun in den Zellkern gelangen, wo zwei hormongebundene Rezeptormoleküle ein Dimer ausbilden. Dies kann mit hoher Affinität über ein Östrogen-response-element (ERE) in der Promotorregion Östrogen-sensitiver Gene an die DNA binden. Dadurch kann mithilfe verschiedener Co-Regulatoren die Transkription beeinflusst werden [63, 65]. Neben diesem klassischen Signalweg gibt es auch andere Wege der Aktivierung, unabhängig vom genomischen System. Ein alternativer ER-abhängige Mechanismus ist der Membran-initiierte-Signalweg, bei der Östrogen-induzierten-Signalisierung in der Zellmembran oder im Zytoplasma ausgelöst wird [67]. Dieser Weg ist hauptsächlich verantwortlich für eine Reihe von akuten und schnellen Östrogeneffekten und spielt eine

entscheidende Rolle im Nervensystem, Skelett, Leber und in anderen Geweben. Die membran-assoziierte-Östrogenwirkung wird mindestens durch zwei Mechanismen vermittelt: Crosstalk mit anderen Membranrezeptoren oder Aktivierung einer Vielzahl von zytoplasmatischen Signalkaskaden. Studien zeigten, dass der Membran-assoziierte-ER-Weg auch über die Aktivierung verschiedener Proteinkinasekaskaden, wie zum Beispiel MAPK/ERK (mitogen-activated protein kinase / extracellular signal-regulated kinase) und Tyrosinkinase vermittelt werden kann. Obwohl die Mehrzahl der biologischen Wirkungen von Östrogen durch ERs vermittelt wird, haben neue Studien gezeigt, dass Östrogene durch einen ER-unabhängigen Signalweg eine antioxidative Wirkung ausüben und den oxidativen Stress herabsetzen. Zusätzlich zum östrogenabhängigen ER-Weg haben neue Beweise gezeigt, dass in der normalen Physiologie von Tieren, ERs auch auf eine liganden-unabhängige Weise durch vielfältige Faktoren, einschließlich dem Neurotransmitter Dopamin, Wachstumsfaktoren wie Epidermal-Wachstumsfaktor (EGF) und insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (IGF-1), Aktivatoren von besonderen intrazellulären Signalpfaden, wie beispielsweise Proteinkinase C, Proteinkinase A, MAPK, Phosphatidylinositol 3-kinase aktiviert werden können. Die liganden-unabhängige Pfadaktivierung ist größtenteils mit Phosphorylierung von ERs durch das Zellprotein Kinase verbunden. Zum Beispiel kann EGF die Phosphorylierung von Ser 118 in der AF-1-Domäne von ER $\alpha$  auslösen und die Transkriptionsaktivität von ER $\alpha$  aktivieren [67].

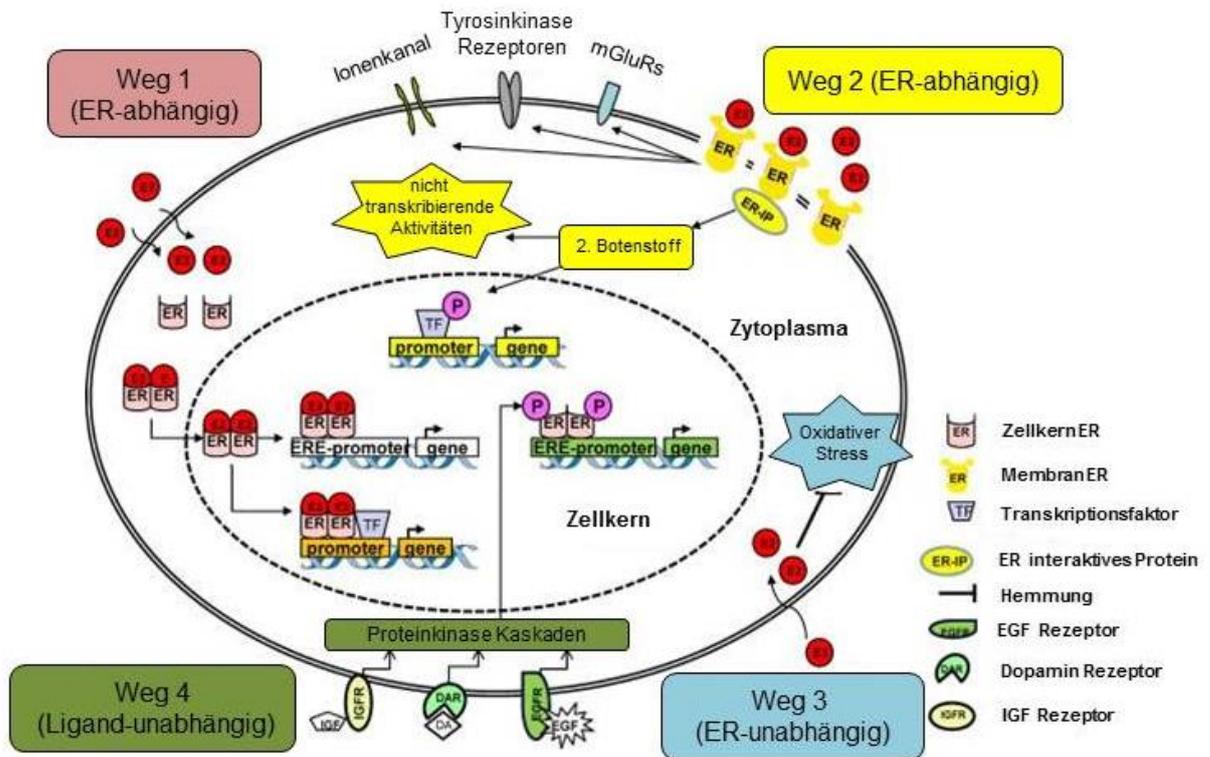


Abb. 1-11: Schematische Darstellung der zellulären Östrogensignalwege [67].

#### 1.4 Selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs)

SERMs sind synthetische, nicht-steroidale Substanzen, die an die Östrogenrezeptoren binden und gewebespezifische agonistische und antagonistische Östrogenwirkungen ausüben können. Die am häufigsten klinisch eingesetzten SERMs sind Tamoxifen, Toremifen, Raloxifen und Clomifen. Die SERMs besitzen eine antiöstrogene Wirkung auf das Brustgewebe und können zur Wachstumshemmung von östrogen-rezeptor-positiven Brustkrebszellen eingesetzt werden [65]. Am Knochengewebe verhält sich Raloxifen wie ein Östrogenagonist und kann dadurch zur Behandlung und Vorbeugung von Osteoporose bei postmenopausalen Frauen eingesetzt werden [65, 66]. Auf molekularer Ebene wird die AF-2-Domäne des ERs durch die verschiedenen SERMs in unterschiedlichen Konformationen stabilisiert, die unterschiedliche Affinitäten für verschiedene Co-Regulatoren besitzen. Die gewebespezifische ausgeprägte agonistische bzw. antagonistische Wirkung der SERMs ist abhängig von der gewebespezifischen Expression von Co-Aktivatoren und Co-Repressoren [65].

### 1.4.1 Tamoxifen

Tamoxifen ist ein nicht-steroidales SERM der 1. Generation und stellt heutzutage das am häufigsten verschriebene Arzneimittel für die Behandlung von allen Stadien von Mammakarzinom dar. Tamoxifen wurde von der Food and Drug Administration (FDA) im Jahr 1977 für die Behandlung von Frauen mit fortgeschrittenem Brustkrebs und später für die adjuvante Behandlung vom Mammakarzinom zugelassenen [66]. Bei Frauen mit ER-positiven Mammakarzinom führt die Behandlung mit Tamoxifen zu einer 50% jährlichen Reduktion der Rezidivrate und einer 28% jährlichen Reduktion der Mortalität. Darüber hinaus haben Studien gezeigt, dass Tamoxifen die Auftretenswahrscheinlichkeit vom kontralateralen Brustkrebs um die Hälfte reduzieren kann, jedoch wurde eine deutlich höhere Rate von venösen thromboembolischen Ereignissen in der Tamoxifen-Gruppe beobachtet [21,66]. Die Wirksamkeit von Tamoxifen ist am stärksten ausgeprägt bei Frauen mit ER-positivem Mammakarzinom, hingegen profitieren Frauen mit ER-negativem Mammakarzinom nur wenig von Tamoxifen[21]. Im Vergleich zum Östradiol ist die Affinität von Tamoxifen zu ER $\alpha$  und ER $\beta$  um den Faktor 100 niedriger, sodass relativ hohe Dosen von Tamoxifen eingesetzt werden müssen [63]. Während Tamoxifen eine antagonistische Wirkung auf das Brustgewebe ausübt, besitzt es eine agonistische Wirkung auf die Knochen, das Serum-Lipidprofil und das Herz-Kreislauf-System. Eine schwerwiegende unerwünschte Wirkung von Tamoxifen ist eine erhöhte Inzidenz von Endometriumkarzinom aufgrund seiner unerwünschten agonistische Aktivität in der Gebärmutter [66]. Die erforderliche tägliche Dosis von Tamoxifen beträgt 20 mg, eine Dosiserhöhung auf 30 oder 40 mg/Tag bringt eine Verbesserung der Behandlungsergebnisse. Der Tamoxifeneffekt ist abhängig von der Therapiedauer. Klinische Studien zeigten, dass eine 3-bis 5-jährige Tamoxifenbehandlung effektiver ist als die 2-jährige Behandlung. Eine mehr als 5-jährige Behandlung führt zu keiner Verbesserung der Behandlungsergebnisse [21]. Fast alle Patienten mit fortgeschrittenem Brustkrebs, die am Anfang auf die Tamoxifen-Therapie ansprachen, entwickelten schließlich eine Resistenz gegen diese Therapie [66]. Diese ist meistens assoziiert mit der Herunterregulation der Östrogenrezeptoren, einem verändertem ER $\alpha$ /ER $\beta$  Verhältnis, einem verändertem Expressionsspektrum von Coregulatoren sowie gesteigerte MAPK- und Aromataseaktivität [63].

## 2. Zielsetzung

Neben den bekannten lebenswichtigen Vitaminen, Mineralstoffen und Ballaststoffen stellen die sog. sekundären Pflanzenstoffen, u.a. Flavonoide, seit einigen Jahren für die Wissenschaftler ein interessantes Forschungsgebiet dar. Sekundäre Pflanzenstoffe schützen die Zellen in unserem Körper und können Krebserkrankungen vorbeugen. Dabei zeigten epidemiologische Studien, dass asiatische Frauen, die häufig sekundäre Pflanzenstoffe über Sojaprodukte zu sich nehmen, ein geringeres Risiko für klimakterische Beschwerden und Mammakarzinome haben.

Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle und zytotoxische Untersuchung der Wirkung kommerziell erworbener Flavonoide (Quercetin, Kaempferol und Chrysin) auf maligne Mammakarzinomzellen (MCF7 und BT20) und benigne veränderte Mammazellen (MCF10a und MCF12a). Die Einflüsse von diesen Flavonoiden auf den oben erwähnten Zelllinien werden durch drei verschiedene *in vitro*-Testverfahren beobachtet. Dabei wurden die Zytotoxizität und deren Einfluss auf Vitalität und Proliferation der malignen und benignen Mammazellen getestet. Darüber hinaus ist die Wirkung von Testsubstanzen auf Mammakarzinomzellen dosisabhängig, deswegen wurden in dieser Arbeit auch verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen überprüft. In dieser Arbeit wurden Tamoxifen und 17- $\beta$ -Östradiol als Kontrollsubstanzen verwendet. Beim Mammakarzinom ist auch die Kenntnis über die Abhängigkeit des Wachstums der Tumorzellen von den Hormonen Östrogen und Progesteron von großer therapeutischer Bedeutung. Ein Hormon kann nur das Zellwachstum beeinflussen, wenn die Zellen auf deren Oberfläche spezielle Rezeptoren für das betreffende Hormon besitzen. Der Rezeptorstatus der Zelltypen wurde durch immunhistochemische Verfahren untersucht. Sekundäre Pflanzenstoffe, welche strukturelle Ähnlichkeit mit Östrogen besitzen, können an Östrogenrezeptoren binden und somit das Zellwachstum beeinflussen.

### 3. Materialien und Chemikalien

#### 3.1 Testsubstanzen

- Quercetin: (SIGMA)
- Kaempferol: (SIGMA)
- Chrysin: (SIGMA)

#### 3.2 Kontrollsubstanzen

- Tamoxifen (SIGMA)
- 17- $\beta$ -Östradiol (SIGMA)

#### 3.3 Zellkulturmedien

- Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM): High Glucose (4,5 g/l) mit L-Glutamine, Phenol Red und 3,7 g/l NaHCO<sub>3</sub>, ohne Sodium Pyruvate (PAA THE CELL CULTURE COMPANY) .  
    ⇒ Für MCF-7 Zellen
- Roswell Park Memorial Institute (RPMI): mit L-Glutamine, ohne Phenol Red (PAA THE CELL CULTURE COMPANY).  
    ⇒ Für BT-20 Zellen
- Nutrient Mixture F-12 (Ham's F-12): mit 10% Horse Serum, Pen. /Strep., Amphot. und Supp. Mammaepithel (PAA THE CELL CULTURE COMPANY).  
    ⇒ Für MCF 10a und MCF 12a Zellen

#### 3.3 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden vier verschiedene Zelllinien verwendet:

##### (1) MCF-7 : Östrogenrezeptorpositive maligne Mammakarzinomzellen

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um humane Mammakarzinomzellen der Linie MCF-7. Die MCF-7 Zellen bestehen aus epithelialen Adenokarzinomzellen und besitzen  $\alpha$  und  $\beta$  Östrogenrezeptoren [68]. Vor einigen Jahrzehnten wurden die MCF-7 Zellen der 69-jährigen Ordensschwester Catherine Frances aus einem Pleuraerguss entnommen. In dem Namen MCF-7 steht MCF für Michigan Cancer Foundation, der Institution in Detroit, die diese Zellen für Forschungseinrichtungen weltweit ermöglichte. Die Zahl 7 gibt die notwendigen Biopsien an, die unerlässlich waren, um die der Patientin entnommenen Zellen im Labor weiter

zu züchten. Dies erfolgte schließlich nach der siebten Biopsie. Das Wachstum von MCF-7 Zellen ist einschichtig und adhärent auf dem Boden von Zellkulturflaschen [68].

**(2) BT-20 : Östrogenrezeptornegative maligne Mammakarzinomzellen.**

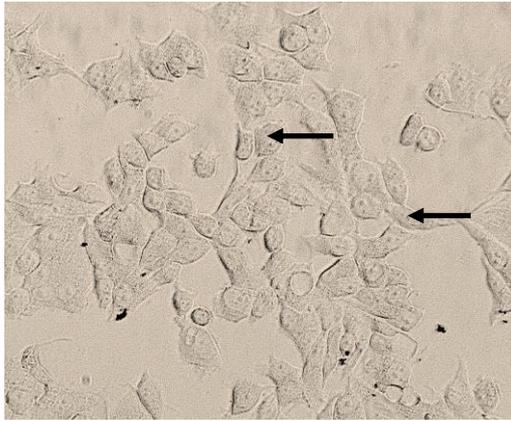
Die Zellkulturlinie BT-20 ist eine humane epitheliale Mammakarzinomzelllinie. Die BT-20 Zelllinie wurde im Jahre 1958 durch die Entnahme eines Tumors, bei einer 74-jährigen Kaukasierin durch Lasfarques und L.Ozzello etabliert [69]. BT-20 Zellen weisen keine Expression für die Östrogenrezeptoren auf. Außerdem exprimieren sie die Östrogenrezeptor mRNA, welche eine Deletion im Exon 5 aufweist [70]. Das Wachstum der BT-20 Zellen wird durch den Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF-alpha) inhibiert [70].

**(3) MCF-10a : Östrogenrezeptornegative benigne Brustepithelzellen.**

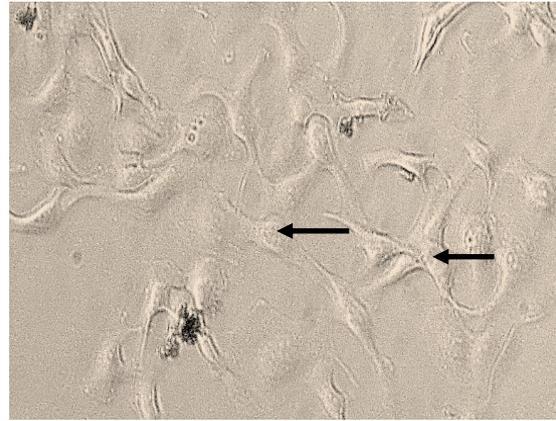
Der Name der in dieser Arbeit verwendeten MCF-10a Zellen stammt ebenso von der Michigan Cancer Foundation. Die MCF10-a Zellen leiten sich vom Mamma-Epithel ab. Die menschlichen Brustepithelzellen MCF-10 sind eine Subklasse von spontan immortalisierten Epithelzellen, die aus einer Mastektomieprobe einer 36-jährigen prämenopausalen Patientin mit einer fibrozystischen Erkrankung hervorgingen [71]. Von den ursprünglichen diploiden sterblichen Zelllinie (MCF-10M) wurden die zwei unsterblichen Zelllinien MCF-10A (anhaftend wachsende Zellen) und MCF-10F (Schwimmzellen) etabliert und für mehr als 4 Jahre kultiviert. Die MCF10-a Zellen sind östrogenrezeptornegative Zellen [72].

**(4) MCF-12a : Östrogenrezeptorpositive benigne Brustepithelzellen.**

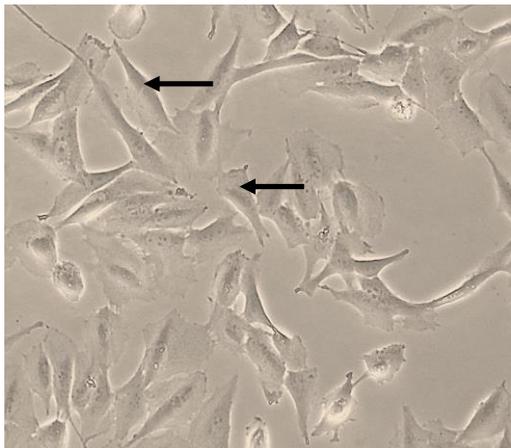
Bei den MCF-12a Zellen handelt es sich um modifizierte weibliche Brustdrüsenepithelzellen humanen Ursprungs. Bei diesen Zellen besteht eine genetische Ausschaltung der Apoptose. Dadurch können sie sich unter idealen Wachstumsbedingungen endlos teilen [73]. Wegen dieser Veränderung besitzen sie eine erhöhte Chromosomenzahl (hier 64), statt der normalen 46 in humanen Zellen [74]. Die MCF-12a Zellen sind Östrogenrezeptor  $\alpha$  und  $\beta$  positiv. sie exprimieren ebenso den G-Protein-gekoppelten Östrogen-Rezeptor 1 (GPER). Dadurch können Östrogene die Proliferation von MCF-12a Zellen beeinflussen [75].



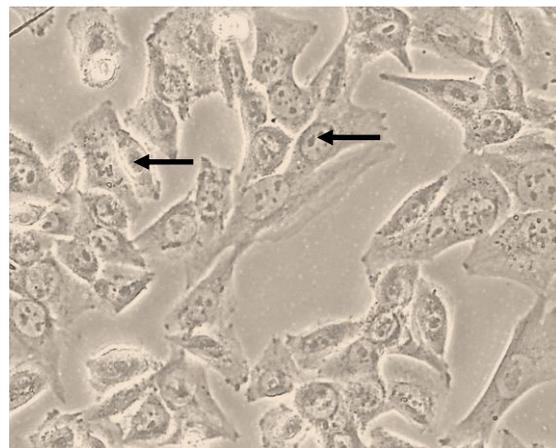
**MCF-7 Zellen 18. Passage**



**BT-20 Zellen 20. Passage**



**MCF-10a Zellen 24. Passage**



**MCF-12a Zellen 45. Passage**

**Abb. 4-1:** Lichtmikroskopische Bilder der Zelllinien, 20x Bildvergrößerung (diverse Zellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert).

### 3.4 Geräte

- Brutschrank: (Temperatur ist 37 °C, 5% Kohlenstoffdioxid), Function Line (Heraeus Instruments GmbH, Hanau)
- Kühl- und Gefrierschrank: Liebherr Premium (Liebherr)
- Zellkulturflaschen: 25cm<sup>2</sup>, 75cm<sup>2</sup>, 150cm<sup>2</sup> (TPP Techno Plastic Products AG)
- Zellkulturplatten: 24- und 96-Well-Platten (TPP Techno Plastic Products AG)
- Reaktionsgefäße 50 ml, Grüner bio- one Cellstar R
- Pipetten, Eppendorf
- Pipettenspitzen
- Rörchen- und Eppendorfständer
- Kryoröhrchen: 2.0 ml (TPP Techno Plastic Products AG)

- Reagenzglasschüttler: (Heidolph)
- Röhrchenschüttler: (Heidolph)
- Zentrifuge: Hettrich
- Zentrifugenröhrchen
- Sterilbox: Heraeus
- Desinfektionsmittel: Bacillol R plus, Bode
- Parafilm: (American National CanTM)
- Bürker-Zählkammer: Poly-Optik GmbH, Bad Blankenburg
- Objektträger, Deckgläser
- ELISA-Photometer: BioRad Modell 680 (Microplate Reader, BioRad Laboratories GmbH, München)
- Mikroskop: Olympus CK2-TR (Optical Co., Ltd., Japan). Carl Zeiss Axiovert 40 C (Carl Zeiss Micro Imaging GmbH Göttingen)
- PH-Messgerät
- Laborwaage
- Messzylinder
- Bechergläser

### **3.5 Chemikalien**

- Penicillin / Streptomycin (PAA THE CELL CULTURE COMPANY)
- Amphotericin B (PAA THE CELL CULTURE COMPANY)
- Absoluter Ethanol
- DMSO: Dimethylsulfoxyd rein (G. Vogler b.v. Rotterdam)
- PBS: Dulbecco's PBS (PAA THE CELL CULTURE COMPANY)
- Trypsin (PAA)
- Trypanblaulösung (GIBCO)
- Tritonlösung (FERAK Berlin)
- Fetales Kälberserum: 10% FKS (Biochrom AG)
- HCL: 37%, für LDH-Zytotoxizitätstest (Carl ROTH)
- Tetramethylbenzidin: zum BrdU- Zellproliferationstest (KIT BrdU-Test)
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 30%, zum BrdU-Zellproliferationstest (Carl ROTH)
- Formafix : 4%ig, zum IHC (Grimm med. Recyclin GmbH)
- Wasserstoffperoxid: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3% (MERCK)

- Chromogen LinRed: zum IHC, (Linaris-Biologische Produkte GmbH)
- Sekundärantikörper: Imm PRESS TM Reagent Peroxidase, zum IHC

### **3.6 Antikörper zur Immunhistochemie**

- Östrogenrezeptor  $\alpha$ : Monoclonal Mouse Anti-Human Primary Estrogen Receptor (NOVOCASTRA)
- Östrogenrezeptor  $\beta$ : Mouse Anti-Estrogen Receptor. BETA 1 (Serotec)
- Progesteronreceptor: Monoclonal Mouse Anti-Human Progesteron Receptor Clone PgR636 (DAKO)

## **4. Methoden**

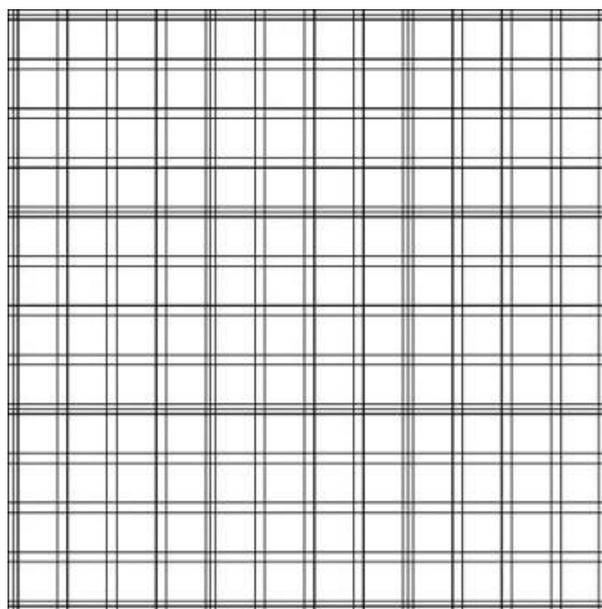
### **4.1 Kultivierung der Zellen**

Die Zelllinien wurden in einem Einfriermedium (entsprechender Nährmedium mit 20% FKS und 10% DMSO bei -80 °C) gelagert, um sie für lange Zeit zu erhalten. Nach Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension in ein 50 ml Röhrchen mit 15 ml des geeigneten Nährmediums und 10% FKS pipettiert. Danach wurde die Zellsuspension bei 1000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Die Zellen haften nur am Boden des Röhrchens. Der Überstand wurde abgossen und die Zellen wurden in 5 ml Zellkulturmedium aufgenommen und in eine kleine Zellkulturflasche überführt. Danach erfolgte die Kultivierung der Zellen im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub>. Alle Arbeiten an den Zellkulturen fanden unter der Sterilbank statt. Die Zellmedien wurden dreimal pro Woche gewechselt. Wenn mehr als 70 % des Flaschenbodens mit adhärennten Zellen zugewachsen war, wurden die Zellen in größere Flaschen passagiert. Zuerst wurde das gesamte Medium mit einer Glaspipette abgesaugt. Danach wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, um das FKS auszuwaschen. Für die Ablösung der Zellen vom Flaschenboden erfolgte die Zugabe von 5 ml Trypsin-EDTA. Außerdem wurde die Kulturflasche für Ca. 5-10 min im Brutschrank inkubiert. Zum Neutralisieren erfolgte die Zugabe von 7,5 ml Medium, dadurch wurde die Trypsin-Reaktion beendet und die Zerstörung der Zellen durch Trypsin verhindert. Das Ganze wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Danach erfolgte die Zentrifugation für 5 Minuten bei 1000 rpm und der Überstand wurde abdekantiert. Es wird nun ein neues Medium zugegeben und der Inhalt gut geschüttelt. Die Zellsuspension kann jetzt als neue Passage in eine neue Zellkulturflasche gegeben werden oder für verschiedene Untersuchungen verwendet werden.

## 4.2. Bestimmung der Zellvitalität

Eine Voraussetzung für die Durchführung aller Untersuchungen ist die Zählung der Lebendzellzahl, weil für alle Experimente eine bestimmte Lebendzellzahl eingesetzt werden sollte. Mithilfe von einer Bürker-Zählkammer wurde die Lebendzellzahl bestimmt. Es wurden 360 µl Medium, 20 µl Zellsuspension und 20 µl Trypanblau in einer Eppendorf-Tube vermischt, sodass eine 1:20 Verdünnung erfolgte. Durch Zugabe von Trypanblau können die toten Zellen kenntlich gemacht werden. Trypanblau ist ein anionischer Azofarbstoff, der durch defekte Zellmembranen ins Zytosol eindringt und dann an Zellproteine bindet. Dadurch erhalten diese Zellen eine blaue Färbung und werden unter dem Mikroskop sichtbar. Hingegen bleiben die lebenden Zellen hell, wodurch eine Unterscheidung zwischen den beiden Zellen möglich wird. Nach dem Auflegen des Deckglases auf die Bürker-Zählkammer wurden darauf 20 µl angefärbten Suspension aufgetragen. Dann erfolgte die Lichtmikroskopische Auszählung der lebenden Zellen aus jeweils 5 x 5 kleinen Quadranten beider Seiten der Kammer. Die Berechnung der Gesamtlebendzellzahl pro ml konnte mit der folgenden Formel bestimmt werden. Der Verdünnungsfaktor beträgt 10. Auf die gewünschte Zellzahl pro ml können noch weitere Verdünnungen durchgeführt werden.

$$\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellzahl (2 x 25 Quadranten)} \times 10 \text{ (Verdünnungsfaktor)} \times 10^4$$



**Abb. 4-1:** Schematische Darstellung einer Bürker-Zählkammer unter dem Mikroskop.

### 4.3 Test- und Substanzvorbereitung

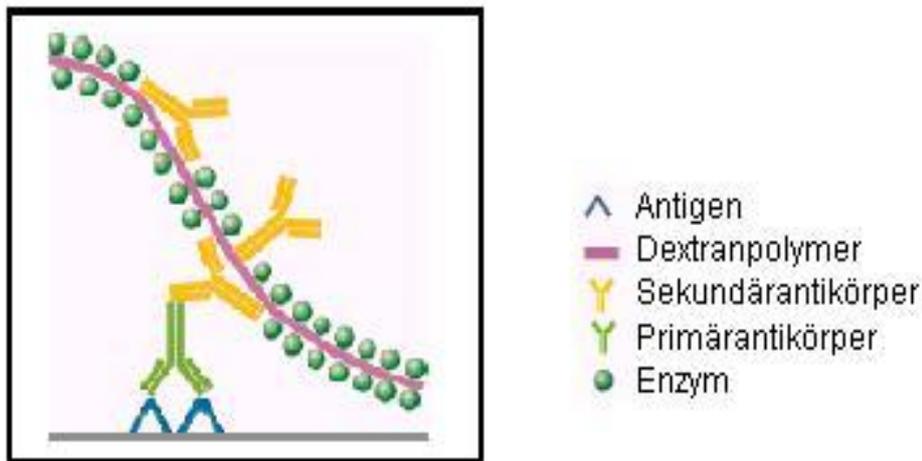
Mithilfe der folgenden Tests (MTT-Test, BrdU-Test und LDH-Test) wurde die Wirkung der drei Flavonoide (Quercetin, Kaempferol und Chrysin) auf die Vitalität, Zellproliferation und Zytotoxizität in den verschiedenen Zelllinien untersucht. Für die Durchführung der Experimente benötigt man möglichst die gleichen Mengen an Zellzahl pro Experiment. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl wurden bei allen Experimenten jeweils etwa  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellt. Die Durchführung der folgenden Experimente erfolgte unter sterilen Bedingungen auf 96-Wellplatten. Die untersuchten Flavonoide hatten eine Ausgangskonzentration von 10 mg/ml und wurden weiter mit Ethanol verdünnt. Sie wurden jeweils in einem Verhältnis von 1:100 in die 96-Wellplatten gegeben. Die Endkonzentration der Testsubstanzen sieht man in Tab. 4-1. Für jede Zelllinie wurde jeder Test drei- bis viermal wiederholt und pro Versuch wurden vier Ansätze durchgeführt. Darüber hinaus wurden auch auf jeder Wellplatte weitere Kontrollen durchgeführt. Dazu gehören Blindwert und Negativkontrolle 1 und 2. Der Blindwert enthielt nur das entsprechende Medium ohne Zellen. Die Negativkontrolle 1 enthielt die Zellen mit ihrem jeweiligen Nährmedium. Zusätzlich zur Negativkontrolle 1 enthielt die Negativkontrolle 2 auch 96% Ethanol, das als Lösungsmittel für alle Extrakte verwendet wurde. Durch die Verwendung von Tamoxifen und Östradiol wurden deren Wirkungen auf die Zelllinien dargestellt. Dabei beträgt die Ausgangskonzentration von Tamoxifen für die Tests  $10^{-2}$  M (=mol/l) und nach 1:100 Verdünnung betrug die Endkonzentration  $10^{-4}$  M (=mol/l). Als Basiskonzentration von Östradiol wurde  $10^{-7}$  M (=mol/l) festgelegt.

**Tab. 4-1: Endkonzentration der Testsubstanzen.**

Endkonzentration der Testsubstanzen in µg/ml		
Quercetin	Kaempferol	Chrysin
100	100	100
50	50	50
5	5	5
0,5	0,5	0,5
0,2	0,2	0,2
0,1	0,1	0,1
0,05	0,05	0,05

#### 4.4 Immunhistochemie (IHC)

Mithilfe der Immunhistochemie wurde die Expression der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Östrogenrezeptoren in den verwendeten Zelllinien untersucht. Daneben wurde auch das Vorhandensein von Progesteronrezeptoren nachgewiesen. diese Rezeptoren wurden mithilfe des „ImmPRESS Universal Reagenz Anti Moause/Rabbit Ig Kit“ von Vector Laboratories und dem „LinRed Substratkit für Peroxidase“ von LINARIS nachgewiesen. Der Nachweis beruht auf eine Antigen-Antikörper-Reaktion, wobei eine sensible Peroxidase-Reaktion eine wichtige Rolle spielt. Durch Bindung der Antikörper an den Rezeptoren können die Östrogenrezeptoren markiert und gekennzeichnet werden. Hierbei binden die Primär-Antikörper an das Epitop des entsprechenden Antigens (z.B. an  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -ER oder Progesteron-Rezeptor). Die enzymmarkierten Sekundär-Antikörper, an denen Peroxidase gekoppelt wurde, sind gegen Primär-Antikörper gerichtet und können an diese binden. Als Substrat für die Peroxidase wurde das sensitive Chromogen „LinRed“ dazugegeben, wobei durch die Peroxidase-reaktion eine rote Farbe entstand und dadurch die zellulären Antigene nachgewiesen werden konnten.



**Abb. 4-2:** Schematische Darstellung vom immunhistochemischen Verfahren [76].

#### **4.4.1 Durchführung der Immunhistochemie**

Bei der Immunhistochemie erfolgte die Zellaussaat auf eine 24-Well-Platte. Es wurden 300 µl der jeweiligen Zellsuspension mit einer Konzentration von 250.000 bis 300.000 Zellen/ml in jedes Well pipettiert. Danach wurden die Wellplatten für 1-2 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Danach wurde das Medium abdekantiert und es erfolgte die Spülung der Zellen mit 200 µl PBS (1- bis 2-mal). Nach Fixierung der Zellen mit 4% Formafix für 20 min wurden alle Wells zweimal hintereinander mit PBS für jeweils 5 min gewaschen. Danach wurde die endogene Peroxidase-Aktivität der Zellen durch Zugabe von 0,3 %igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 30 min inhibiert und anschließend wieder 2 mal mit PBS gewaschen. Um unspezifische Reaktionen in den Zellen durch natürlich vorhandenes Biotin (Vitamin B7) zu blockieren wurde ein Horse-Serum tropfenweise für 20 min hinzugefügt. Es erfolgte danach die Zugabe der spezifischen Primär-AK (ER $\alpha$ , ER $\beta$  und PR). In die Negativkontrolle wurden anstatt eines Primärantikörpers 2 Tropfen Horse-Serum gegeben und die Zellen so über Nacht im Kühlschrank bei ca. 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen 3-mal mittels PBS gespült und anschließend wurden 2 bis 4 Tropfen des Sekundärantikörpers (Peroxidase ImmPRESS) für ca. 30 bis 45 min dazugegeben. Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen nochmals 3-mal mit PBS gespült. Zuletzt erfolgte das immunhistochemische Färbeverfahren. Hierbei wurden als Substrat für die Peroxidase pro Well ca. 3-5 Tropfen des sensitiven Chromogens „LinRed“ dazugegeben und die Wellplatten anschließend lichtgeschützt für ca. 5-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann erfolgte die Spülung mit Leitungswasser, um die Färbereaktion abzustoppen. Unter dem Mikroskop konnte die Farbreaktion betrachtet und fotografisch registriert werden. Somit konnte der Rezeptorstatus der Zellen beurteilt werden.

#### **4.5 LDH–Zytotoxizitätstest**

Durch den LDH-Test lässt sich der Zelltod bzw. die Zellyse und damit die Zytotoxizität der jeweiligen Testsubstanzen auf die verwendeten Zelllinienzellen quantitativ bestimmen. Das Prinzip dieses Verfahren basiert auf die Bestimmung bzw. Messung der LDH-Aktivität im Zellkulturüberstand. LDH ist ein stabiles, im Zytoplasma aller Zellen exprimiertes Enzym, das ein Schlüsselenzym im anaeroben Stoffwechsel der Zelle darstellt. Nach Zerstörung oder Schädigung der Zelle bzw. der Zellmembran fließt LDH schnell in das Zellkulturmedium, wo dies nachgewiesen werden kann. Zuerst katalysiert das LDH-Enzym die Oxidation von

Lactat zu Pyruvat. Gleichzeitig erfolgte die Reduktion von Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid (NAD)<sup>+</sup> zu NADH/H<sup>+</sup>. Dann katalysiert die Diaphorase die Reduktion vom schwach gelb gefärbten Tetrazolium-Salz 2-(4-iodophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT) zu dem rot gefärbten Formazan-Salz. Gleichzeitig erfolgte die Oxidation vom NADH/H<sup>+</sup> zu NAD<sup>+</sup>. Das gebildete Formazan kann jetzt am ELISA-Reader photometrisch bei einer Wellenlänge von 490 nm und einer Referenz von 620 nm quantifiziert werden. Die Menge des entstandenen Formazans ist also proportional zur Anzahl geschädigter bzw. toter Zellen. Die Zytotoxizität ist umso größer, je mehr die Farbumwandlung von Hellgelb (INT) zu Rot (Formazan) ist [77].

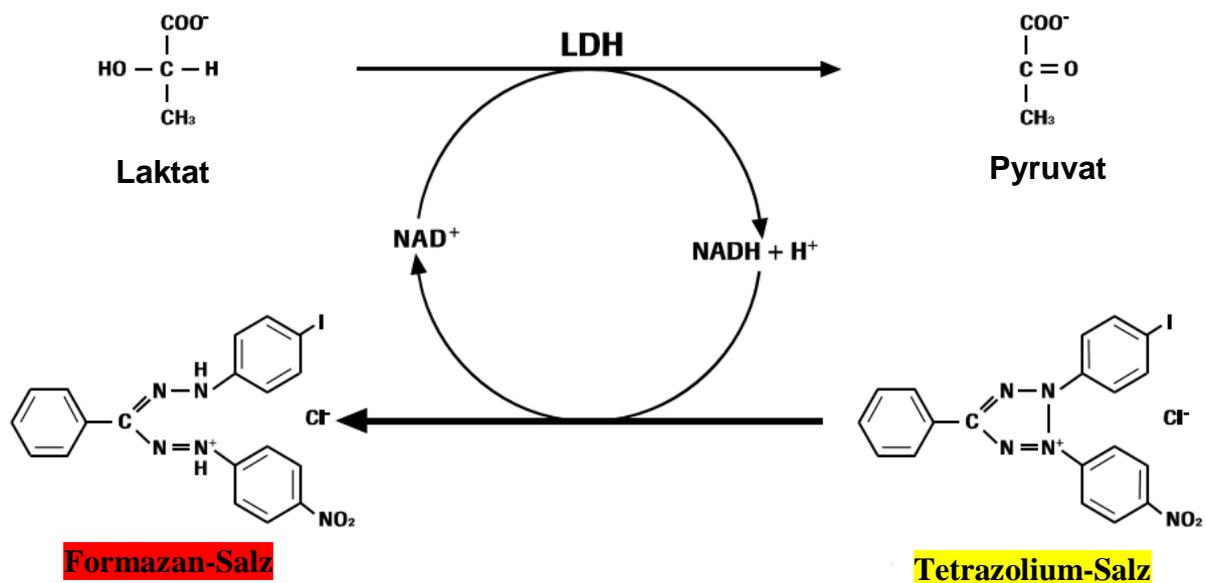


Abb. 4.3: Prinzip des LDH-Testes [77].

## Durchführung

1. Zellkultivierung: Pro Well wurden 100 µl Zellsuspension der jeweiligen Zelllinie mit einer Konzentration von ca. 500.000 Zellen/ml auf eine 96 Well-Platte pipettiert. Über Nacht wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 24 h inkubiert. Auf jeder 96-Well-Platte wurden jede Testsubstanz, der high control, der Negativkontrolle 1 und 2 viermal untersucht.
2. Mediumwechsel: das alte Medium (10% FKS) wurde abgenommen und durch 198 µl frisches Medium (1% FKS) pro Well ersetzt. Danach wurden 2 µl Testsubstanz in das entsprechende Well zugegeben. Bei der high control wurden Triton x-100 und das 1% FKS Medium (1:100 Verdünnung) verwendet und davon 200 µl in jeweils

vier Wells pipettiert. Dann erfolgte 24 h Inkubation im Brutschrank (37° C, 5 % CO<sub>2</sub>).

3. Pro Well wurden 100 µl der Zellsuspension aus dem Überstand abgenommen und in neue 96 Well-Platte gegeben, wobei die alten 96 Well-Platten entsorgt wurden. Dazu wurden 100 µl/Well Reaction mixture gegeben und das Ganze bei Raumtemperatur für 10 bis 30 min im Dunklen inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 µl/Well 1 HCl abgestoppt.
4. Messung am ELISA-Reader: die Farbreaktion wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (Wellenlänge: 490 nm, Referenz: 620 nm, Mischungszeit der Färbereagenz: 5 sec) viermal in Form der Extinktion kolorimetrisch gemessen und mit Hilfe des Computerprogrammes „Microplate-Manager“ registriert. Aus den gemessenen Werten wurde die Zytotoxizität mithilfe dieser Gleichung festgestellt.

$$\text{Zytotoxizität(\%)} = 100 \times \frac{\text{Extinktion Probe} - \text{Extinktion Negativkontrolle 2}}{\text{Extinktion hohe Kontrolle} - \text{Extinktion Negativkontrolle 2}}$$

#### **4.5 BrdU-Zellproliferationstest**

Durch dieses Testverfahren konnte die Zellproliferation nach Verwendung der Testsubstanzen quantitativ bestimmt werden. Bromdesoxyuridin (BrdU) ist ein chemisches Analogon des Thymidin, das während der DNA-Synthese anstelle der Base Thymidin in DNA eingebaut werden kann. Hierbei wurden die Zellen mittels Reagenz FixDenat fixiert und somit die DNA denaturiert. Danach erfolgte die Zugabe von BrdU-Antikörper, die durch ihre Bindung an der neu synthetisierten DNA das eingebaute BrdU detektieren können. Danach erfolgte die Zugabe eines Peroxidase-gekoppelten Anti-BrdU-Antikörpers. Dadurch entsteht ein Immunkomplex, welches mittels Zugabe von Tetramethylbenzidin (TMB) zu einer Farbumsetzung führen kann. Die resultierende Farbintensität korreliert mit der Menge der neu synthetisierten DNA und dementsprechend auch mit der Anzahl lebendiger bzw. proliferierender Zellen. Die Absorption des Reaktionsproduktes wird mithilfe vom ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm photometrisch gemessen [78].

## Durchführung

1. Zellkultivierung: genauso wie LDH-Test wurden pro Well 100 µl Zellsuspension mit einer Konzentration von 500.000 Zellen/ml in 96-Well-Platten pipettiert und im Brutschrank für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.
2. Zugabe der Extrakte: in diesem Schritt erfolgte kein Mediumwechsel. In den jeweiligen Wells auf der 96-Well-Platte wurde 1 µl der Testsubstanz pipettiert und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.
3. Nach der Kultivierung wurden in jedes Well außer der background control 10 BrdU (verdünnt mit Nährmedium 1:100) pipettiert und das Ganze für 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank inkubiert.
4. Denaturierung der DNA: nach 3 h erfolgte die Entfernung des Mediums und wurden 200 µl/Well „Fix-Denat“ für ca. 30 min dazugeben. Danach wurde das Fix-Denat durch Abklopfen entfernt.
5. Antikörperbindung: 100 µl/Well „Anti-BrdU-POD working solution“ (AK) wurden für 60 min dazugeben. Danach erfolgte die Entfernung der Anti-BrdU-POD-working-solution
6. Die Zellen werden nun 3-mal mit 200 µl/Well BrdU- Waschpuffer (gelöst in destilliertem Wasser 1:10) gewaschen.
7. 100 µl/Well Substratsolution (Tetramethylbenzidin) wurden für 10-15 min dazugegeben. Danach erfolgte das Abstoppen der Farbreaktion durch Zugabe von 25 µl/Well 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.
8. Messung am ELISA-Reader: die Farbreaktion wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (Wellenlänge: 490 nm, Referenz: 620 nm, Mischungszeit der Färbereagenz: 5 sec) viermal in Form der Extinktion kolorimetrisch gemessen und mit Hilfe das Computerprogrammes „Microplate-Manager“ registriert. Aus den gemessenen Werten wurde die Zellproliferationsrate mithilfe dieser Gleichung festgestellt.

$$\text{Zellproliferation (\%)} = \frac{\text{Extinktion Testsubstanz} \times 100\% (\text{Negativkontrolle 2})}{\text{Extinktion Negativkontrolle 2}}$$

## 4.6 MTT-Test

Der MTT-Test ist ein kolorimetrischer Test für die Beurteilung der Zellproliferation und Zellviabilität. Das Prinzip basiert auf der Umwandlung des gelben Tetrazoliumsalses 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5 Diphenyl Tetrazolium Bromid (MTT) in violette, wasserunlösliche Formazankristalle. Diese Reaktion erfolgte in den Mitochondrien durch mitochondriale Dehydrogenasen des Succinat-Tetrazolium-Reduktase-Systems mit dem Cofaktor NADH. Diese Enzyme sind nur in lebensfähigen Zellen aktiv, deswegen eignet sich die Umwandlung von MTT zu Formazan als Maß für die Viabilität und Proliferation lebendiger Zellen. Bei der Negativkontrolle 2 beträgt die Viabilität 100%. Je stärker die Farbumwandlung von Gelb (MTT) nach Violett (Formazankristalle) ist, desto höher ist die Anzahl der vitalen Zellen und deren Stoffwechselaktivität. Die Absorption dieser gefärbten Lösung kann mittels ELISA-Reader bei einer bestimmten Wellenlänge (in der Regel zwischen 500 und 600 nm) quantifiziert werden [79].

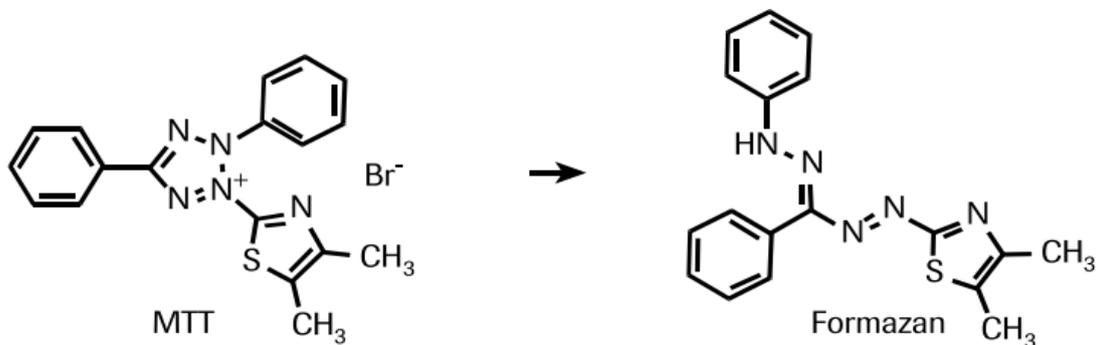


Abb. 4.4: Prinzip des MTT-Tests [78].

### Durchführung

1. Zellkultivierung: Pro Well wurden 100  $\mu$ l Zellsuspension der jeweiligen Zelllinie mit einer Konzentration von ca. 500.000 Zellen/ml auf eine 96 Well-Platte pipettiert. Für ca. 24h wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.
2. Zugabe der Extrakte: in diesem Schritt erfolgte kein Mediumwechsel. In den jeweiligen Wells auf der 96-Well-Platte wurde 1  $\mu$ l der Testsubstanz pipettiert und für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank kultiviert.
3. Zugabe des MTT-Reagenz: 10  $\mu$ l/Well MTT-Reagenz wurden dazugegeben und die 96 Well-Platte für 4 h im Brutschrank (37°C und 5% CO<sub>2</sub>) inkubiert.
4. 100  $\mu$ l/Well Solubilisierungslösung (10% SDS in 0,01 M HCL) wurden dazugegeben und für 24 h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

5. Messung am ELISA-Reader: die Farbreaktion wurde mit Hilfe eines ELISA-Readers (Wellenlänge: 570 nm, Referenz: 655 nm, Mischungszeit der Färbereagenz: 5 sec) viermal in Form der Extinktion kolorimetrisch gemessen und mit Hilfe des Computerprogrammes „Microplate-Manager“ registriert. Aus den gemessenen Werten wurde die Zellproliferationsrate mithilfe dieser Gleichung festgestellt.

$$\text{Relative Vitalität(\%)} = \frac{\text{Extinktion Testsubstanz} \times 100\% (\text{Negativkontrolle 2})}{\text{Extinktion Negativkontrolle 2}}$$

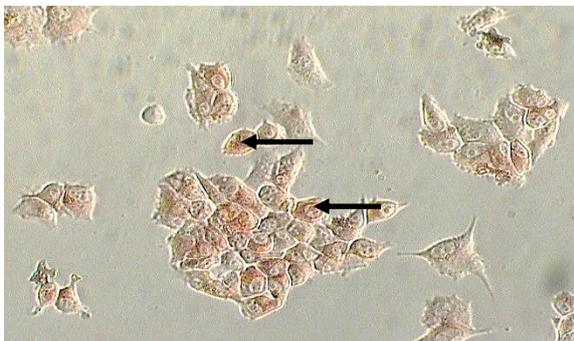
#### 4.7 Statistische Auswertung

Die Experimente zur Überprüfung der Zytotoxizität, Proliferation und Vitalität (LDH, BrdU, MTT-Test) wurden bei allen vier Zelllinien (MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a) für jede Testsubstanz 3-mal wiederholt. Pro Versuch wurden die Negativkontrollen, die Substanzkontrollen, die high control (LDH-Test), die background control (BrdU-Test) sowie die Substanzkonzentrationen vierfach bestimmt. Damit die relativen und systematischen Fehler minimiert werden können, wurde ein Feld der Wellplatte lediglich nur mit Medium befüllt. Nach den einzelnen Durchführungen wurden alle Felder der Wellplatte kontrolliert und ausgewertet einschließlich des Feldes, welches nur mit Medium befüllt war (Blindwert s. obige Formel). Daraus folgt, dass man die Messwerte des leeren Wells von den Messwerten der Kontrollwells als auch von den Messwerten der Testwells subtrahiert hat. Damit die Zytotoxizität, die Proliferation und die Vitalität ermittelt werden konnte, wurden die high control (LDH-Test) und die Negativkontrolle 2 (BrdU- und MTT-Test) auf 100% gesetzt. Aus den ermittelten Werten der Zytotoxizität, der Proliferation und der Vitalität wurde der Mittelwert und die Standardabweichung durch das Programm Microsoft Excel berechnet. Darüber hinaus wurden die verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen sowie die Kontrollsubstanzen mithilfe vom Programm SPSS getestet, ob sie einen signifikanten Einfluss besitzen. Um die Signifikanz der Ergebnisse in Bezug auf die Negativkontrolle 2 (BrdU-, MTT-Test) bzw. der high control (LDH-Test) zu erkennen, wurden die Variablen (die einzelnen Konzentrationen der Testsubstanzen und die Kontrollsubstanzen) auf Signifikanz mittels einer Regressionsanalyse getestet, die auf den T-Test basieren. Das Konfidenzintervall der statistischen Tests lag bei 95%, wodurch eine 5%ige Fehlerwahrscheinlichkeit resultiert ( $P < 0,05$ ,  $\alpha = 5\%$ ). Die statistischen Verfahren, die in dieser Arbeit verwendet wurde, wurden mithilfe des Instituts für Biostatistik und Informatik der Universität Rostock durchgeführt.

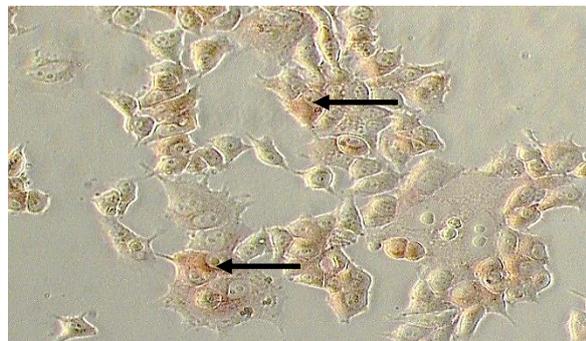
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Immunhistochemie (IHC)

Mithilfe der Immunhistochemie wurde die Expression der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Östrogenrezeptoren und der Progesteronrezeptoren in den verwendeten Zelllinien (MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a) nachgewiesen. Beim Vorhandensein dieser Rezeptoren zeigten die Zellen eine Rotfärbung. Die Stärke der Rotfärbung korreliert mit der Häufigkeit dieser Rezeptoren in den Zellen. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen wurden bei allen Zelllinien Negativkontrollen durchgeführt, bei denen keine Primärantikörper verwendet wurden. Die Negativkontrollen waren bei allen Zelllinien immer farblos. Abb. 5-1 zeigte im Gegensatz zu der Negativkontrolle eine deutliche Rotfärbung der MCF-7 Zellen. Analog zu den MCF-7 Zellen zeigen auch die MCF-12a Zellen bei den immunhistochemischen Verfahren auch eine Rotfärbung (Abb. 5-2). Jedoch ist die Farbintensität abhängig vom Rezeptortyp:  $ER\alpha > ER\beta > PR$ . Das deutet daraufhin, dass die MCF-7 und MCF-12a Zellen den  $ER \alpha/\beta$ , sowie den Progesteronrezeptor besitzen.



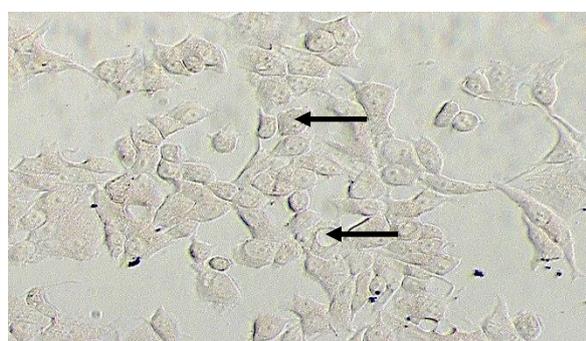
MCF-7,  $ER\alpha$  positiv



MCF-7,  $ER\beta$  positiv

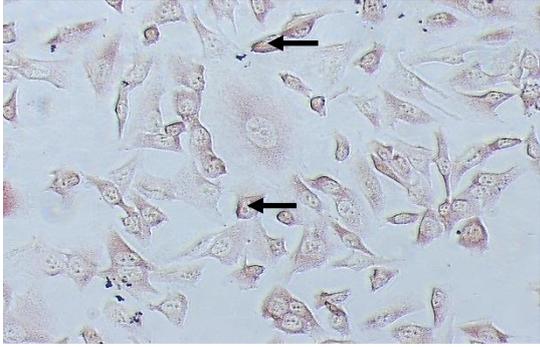


MCF-7, PR positiv

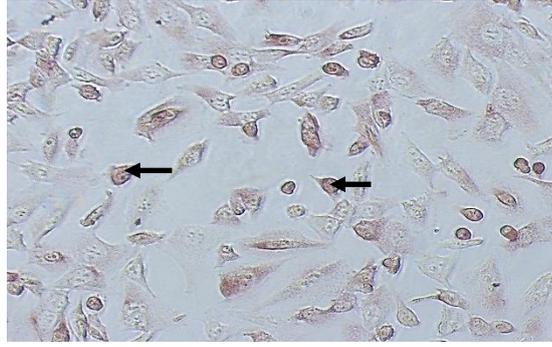


MCF-7, Negativkontrolle

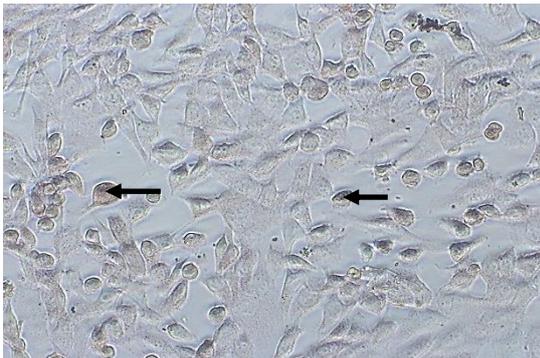
**Abb. 5-1:** Mikroskopischer Nachweis der immunhistochemischen Reaktion der Expression von Rezeptoren ( $ER \alpha/\beta$  und PR) bei MCF-7 Zellen, 20x Bildvergrößerung (diverse Zellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert)



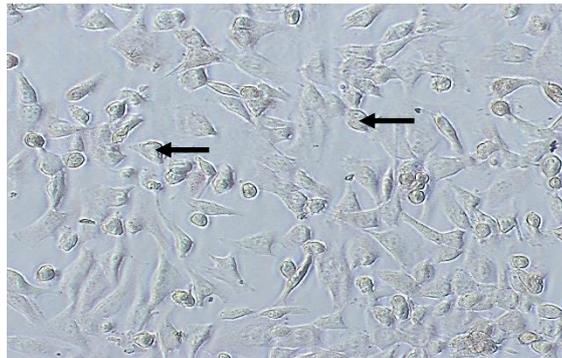
MCF-12a, ER $\alpha$  positiv



MCF-12a, ER $\beta$  positiv



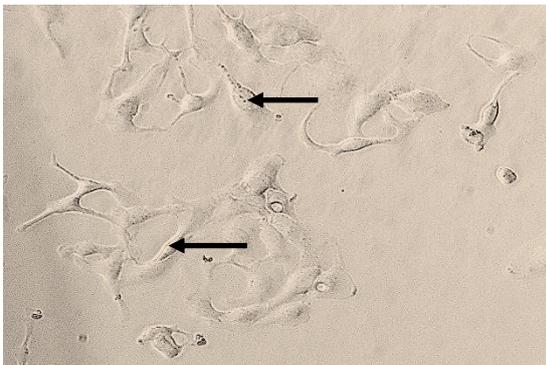
MCF-12a, PR positiv



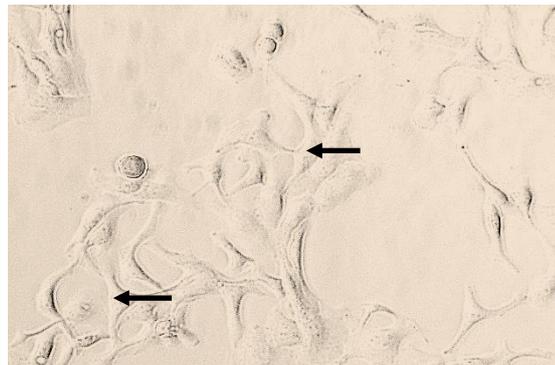
MCF-12a, Negativkontrolle

**Abb. 5-2:** Mikroskopischer Nachweis der immunohistochemischen Reaktion der Expression von Rezeptoren (ER  $\alpha/\beta$  und PR) bei MCF-12a Zellen, 10x Bildvergrößerung (diverse Zellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert)

Im Gegensatz dazu zeigten die BT-20 und MCF-10a Zellen keine kolometrische Reaktion der Zellmembran, was auf ein Fehlen von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptor hinweist. Jedoch konnte hier nur eine leichte Anfärbung der Zellvakuolen bei den MCF-10a beobachtet werden (Abb. 5-3).



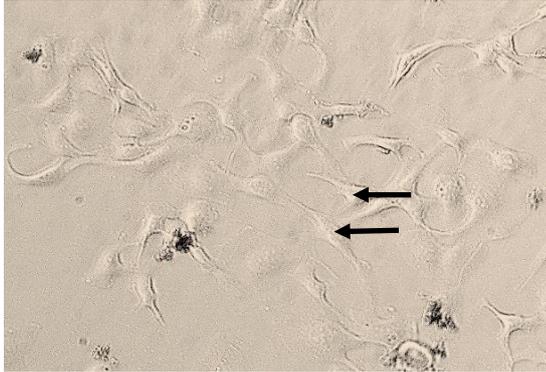
BT-20, ER $\alpha$  negativ



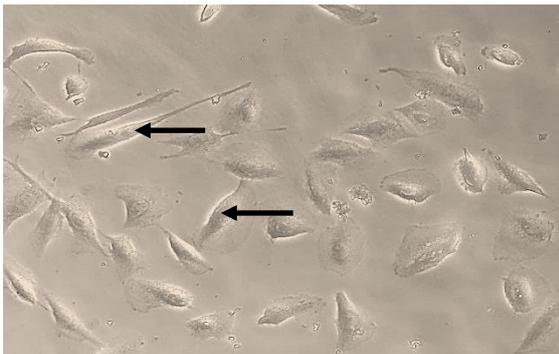
BT-20, ER $\beta$  negativ



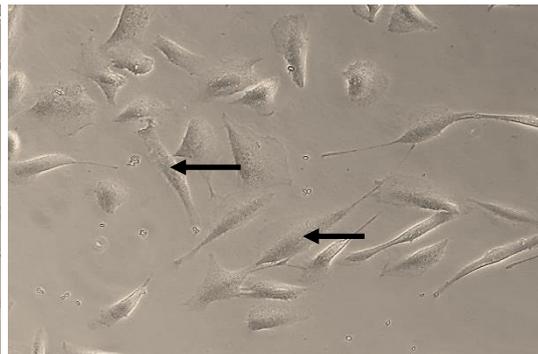
BT-20, PR negativ



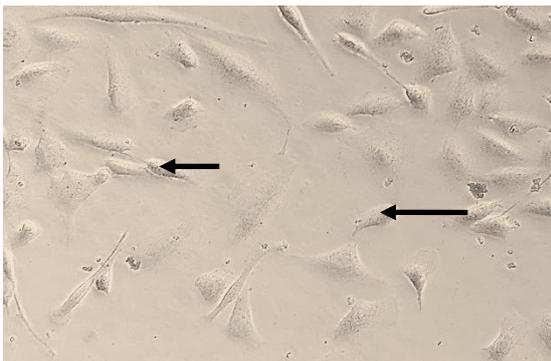
BT-20, Negativkontrolle



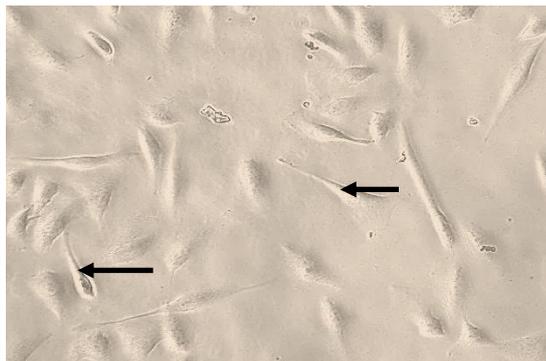
MCF-10a, ER $\alpha$  negativ



MCF-10a, ER $\beta$  negativ



MCF-10a, PR negativ



MCF-10a, Negativkontrolle

**Abb. 5-3:** Mikroskopischer Nachweis der immunohistochemischen Reaktion der Expression von Rezeptoren (ER  $\alpha/\beta$  und PR) bei BT-20 und MCF-10a Zellen, 20x Bildvergrößerung (diverse Zellen sind mit schwarzen Pfeilen markiert).

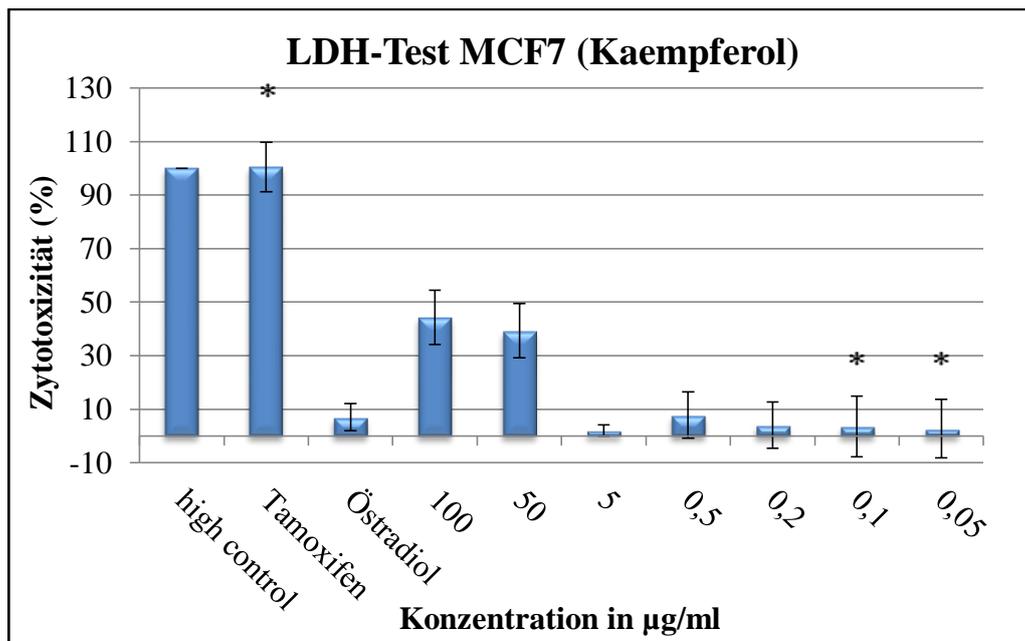
## 5.2 LDH–Zytotoxizitätstest

Der LDH-Test zeigt die zytotoxische Wirkung der Test- und Kontrollsubstanzen auf die verschiedenen Zelllinien. Die Ergebnisse werden in den folgenden Abbildungen dargestellt. Auf der Abszissenachse werden die verschiedenen Extraktkonzentrationen sowie Tamoxifen und Östradiol gezeigt. Die Ordinatenachse gibt den prozentualen Anteil der toten Zellen an. Der zytotoxische Einfluss der verschiedenen Konzentrationen der Substanzen auf die Zelllinie ist in Bezug auf high control, welche hierbei auf 100% gesetzt wurde.

### 5.2.1 MCF-7 Zelllinie

#### Kaempferol

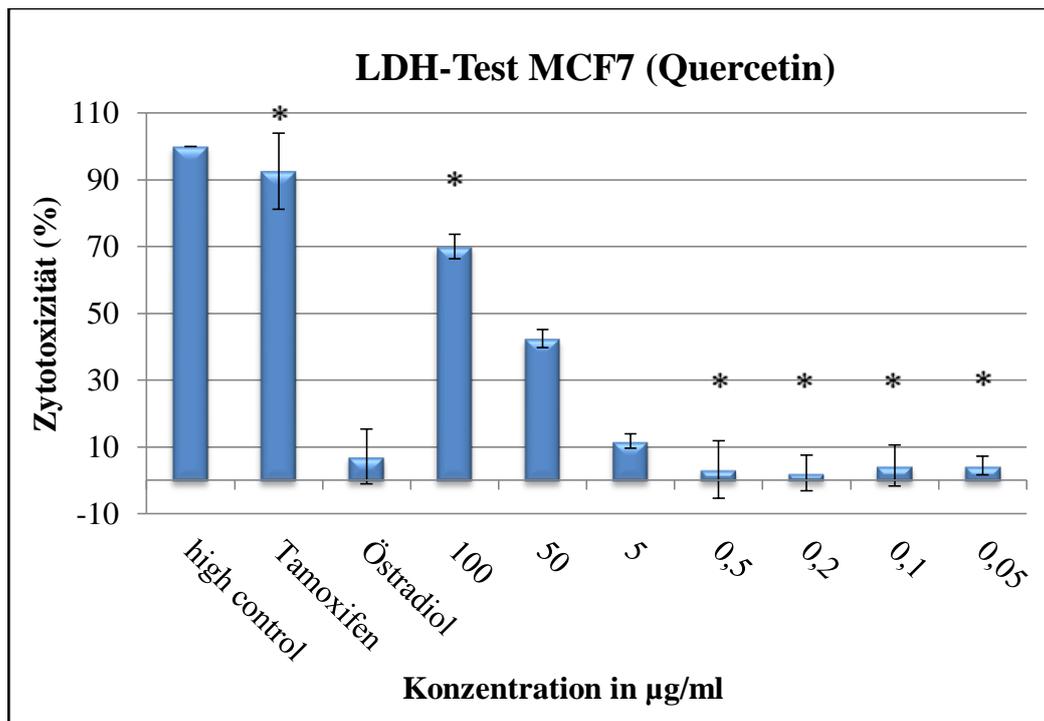
Die Abb. 5-4 zeigt, dass Kaempferol bei einer Konzentration von 100 und 50 µg/ml eine zytotoxische Wirkung auf MCF-7 Zellen hat. Jedoch wies das statistische Testverfahren keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle (high control) auf. Die Zytotoxische Wirkung liegt hier bei ca. 39 bis 44%. Dagegen zeigen andere Konzentrationen von Kaempferol (5 µg/ml, 0,5 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,05 µg/ml) nur leichte zytotoxische Wirkung auf MCF-7-Zellen. Tamoxifen wirkte stark zytotoxisch. Dabei betrug die Zellletalität etwa 100%. Östradiol besitzt eine leicht signifikante Zytotoxizität von etwa 5%.



**Abb. 5-4: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

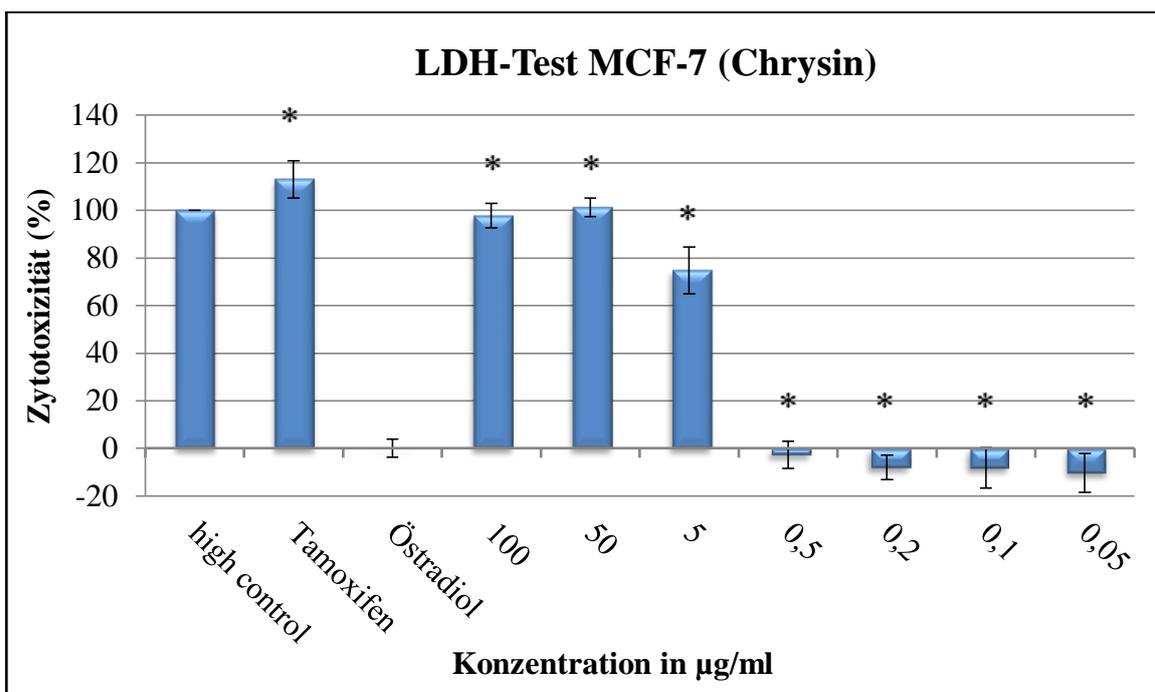
Quercetin zeigt bei einer Konzentration von 100  $\mu\text{g/ml}$  und 50 $\mu\text{g/ml}$  einen zytotoxischen Effekt auf MCF-7 Zellen, allerdings war die Konzentration 100  $\mu\text{g/ml}$  in den durchgeführten statistischen Testverfahren signifikant gegenüber der Kontrolle (high control) (Abb. 5-5). Dabei beträgt die Zellletalität ca. 70% bei 100  $\mu\text{g/ml}$  und ca. 42% bei 50 $\mu\text{g/ml}$ . Bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  zeigte Quercetin nur leichte zytotoxische Effekte um 11%. Des Weiteren verursachte Quercetin in den Konzentrationen von 0,5; 0,2; 0,1 und 0,05  $\mu\text{g/ml}$  nur leichte, aber dennoch signifikante zytotoxische Wirkungen um etwa 2 bis 8% auf MCF-7 Zellen.



**Abb. 5-5: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Chrysin

Die Abbildung 5-6 zeigt, dass Chrysin bei den Konzentrationen von 5; 50 und 100 µg/ml eine signifikante Zerstörung der Zellen bewirkt. Hierbei beträgt die Zytotoxizität bei 5 µg/ml etwa 74%, bei 50 µg/ml etwa 101% und bei 100 µg/ml etwa 97%. Andere Konzentrationen, die niedriger als 5 µg/ml sind, besitzen keine zytotoxischen Effekte auf MCF-7 Zellen, dennoch waren sie im statistischen Testverfahren signifikant gegenüber der Kontrolle (high control).

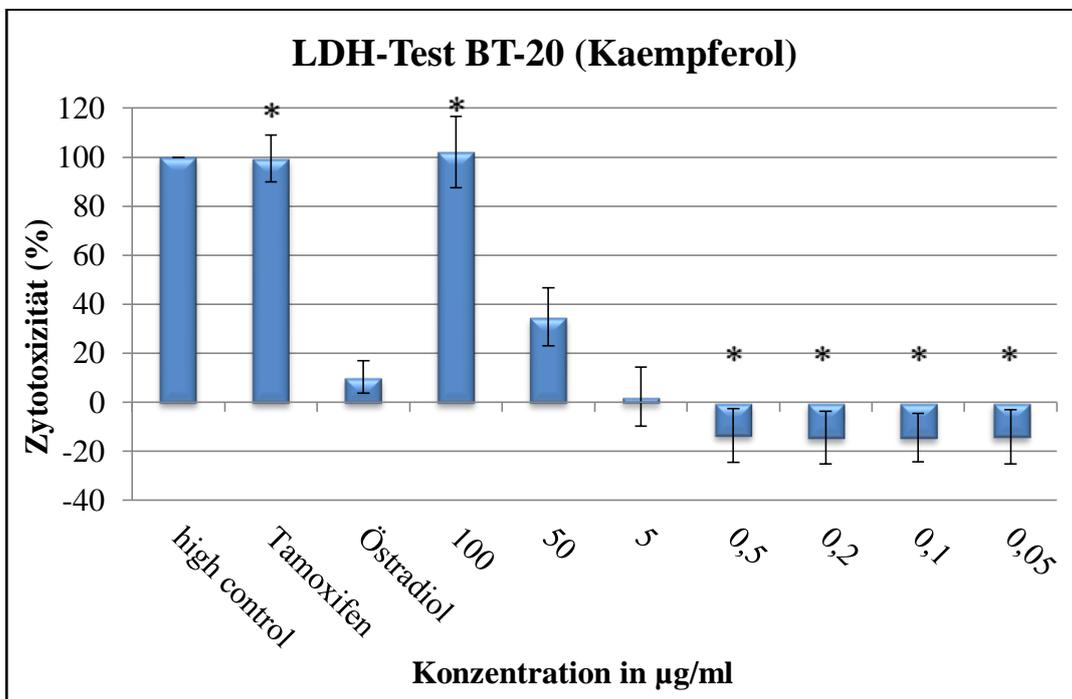


**Abb. 5-6: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## 5.2.2 BT-20 Zelllinie

### Kaempferol

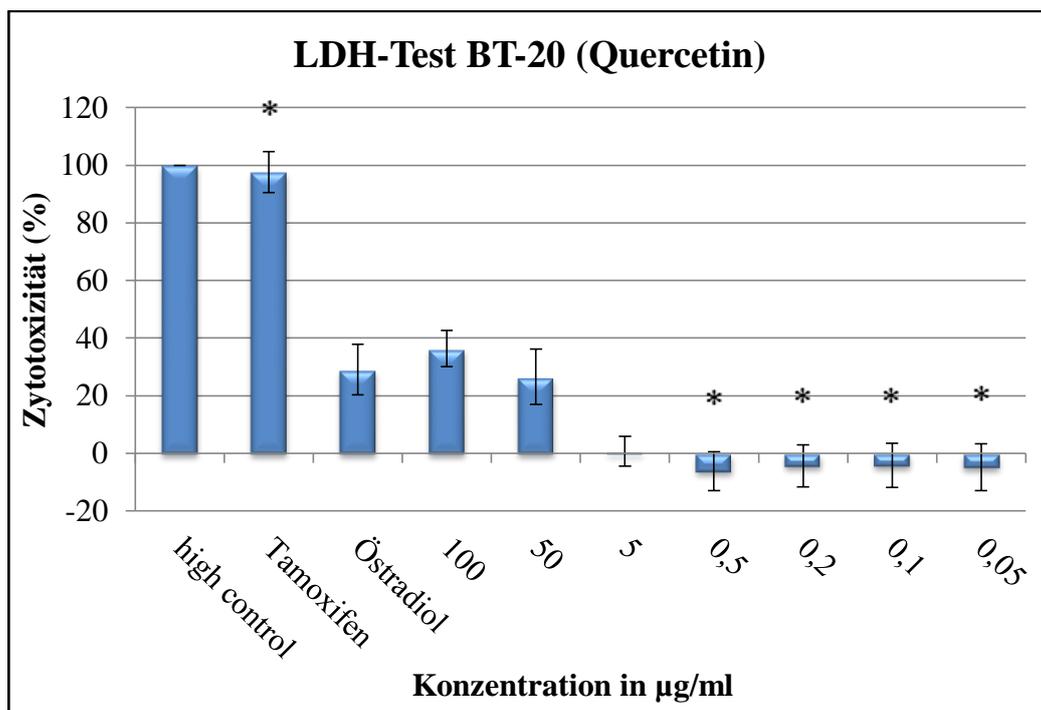
Kaempferol wirkt bei 100 µg/ml stark zytotoxisch auf BT-20 Zellen und signifikant gegenüber der Kontrolle (high control), wobei die Zytotoxizität etwa 102% beträgt. Analog dazu zeigt hier die Zugabe von 50 µg/ml Kaempferol eine Zerstörung der BT-20 Zellen von ca. 34%, jedoch zeigte das statistische Testverfahren keine Signifikanz. Des Weiteren besitzt Kaempferol in seiner Konzentration von 5 µg/ml einen geringeren, aber keinen signifikanten zytotoxischen Effekt (ca. 2%) auf die Zellen. Dagegen weisen die weiteren getesteten Konzentrationen keine Zytotoxizität auf. Außerdem zeigt Östradiol einen schwachen, leicht signifikanten zytotoxischen Effekt auf die BT-20 Zellen von ca. 10%. Des Weiteren weist Tamoxifen im Vergleich zur Kontrolle (high control) eine hohe signifikante Zytotoxizität auf BT-20 Zellen mit entsprechend 99% Zellletalität auf (Abb.5-7).



**Abb. 5-7: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

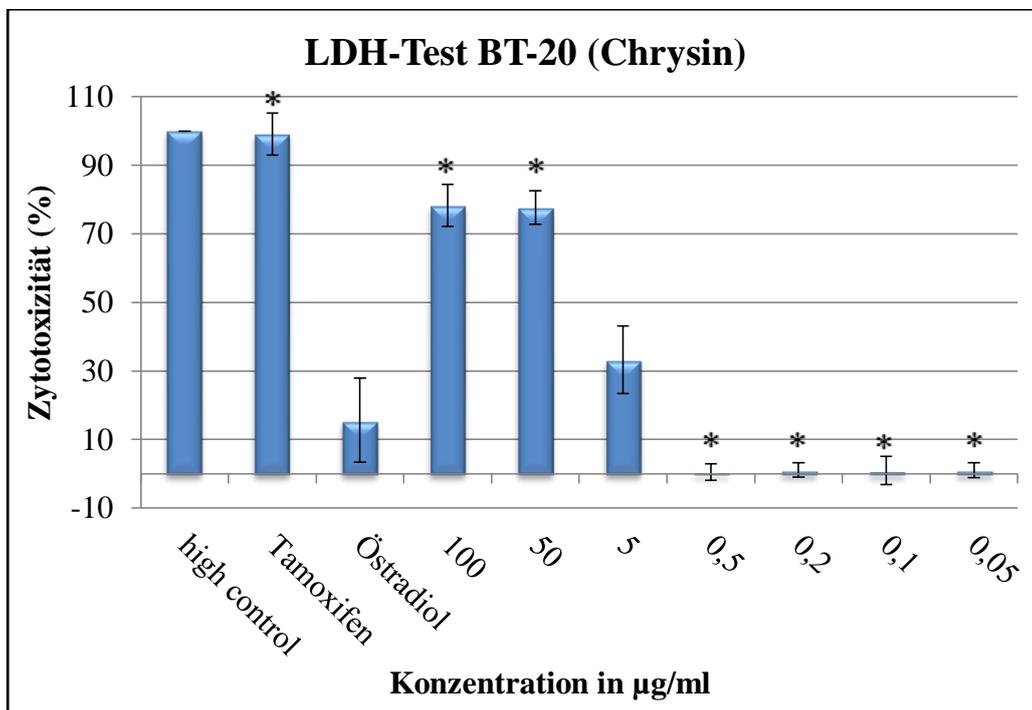
Auf BT-20 wirkte Quercetin auch zytotoxisch, jedoch erneut nur in den höheren Konzentrationen mit einer Zellletalitäten von 0,6% bei 5 µg/ml, 26% bei 50 µg/ml, 36% bei 100 µg/ml. Hierbei liegt bei diesen Konzentrationen keine Signifikanz gegenüber der high control vor. Die anderen niedrigeren Konzentrationen von Quercetin (0,5; 0,2; 0,1; 0,05 µg/ml) waren nicht toxisch. Darüber hinaus führte hier Östradiol zum nicht signifikanten Absterben der Zellen (etwa 29%) (Abb. 5-8). Dies zeigte keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle (high control).



**Abb. 5-8: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Chrysin

Die Abbildung 5-9 zeigt das Ergebnis des LDH-Tests für Chrysin und die Kontrollsubstanzen in ihrer zytotoxischen Wirkung auf BT-20 Zellen. Chrysin besitzt in den höheren Konzentrationen (50 und 100 µg/ml) im Vergleich zur Kontrolle (high control) eine signifikante Zytotoxizität auf BT-20 Zellen, hierbei beträgt die gemessene Zellletalität ungefähr 78%. Im Gegensatz zu Kaempferol und Quercetin weist Chrysin bei 5 µg/ml eine deutlich höhere Zellzerstörung (33%) auf, die keine Signifikanz im statistischen Testverfahren aufweist. Die Konzentrationen 0,5 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,1 µg/ml und 0,05 µg/ml haben keinen zytotoxischen Einfluss auf die BT-20 Zellen. Außerdem zeigt Östradiol eine leicht signifikante Zytotoxizität von etwa 12% (Abb. 5-9).

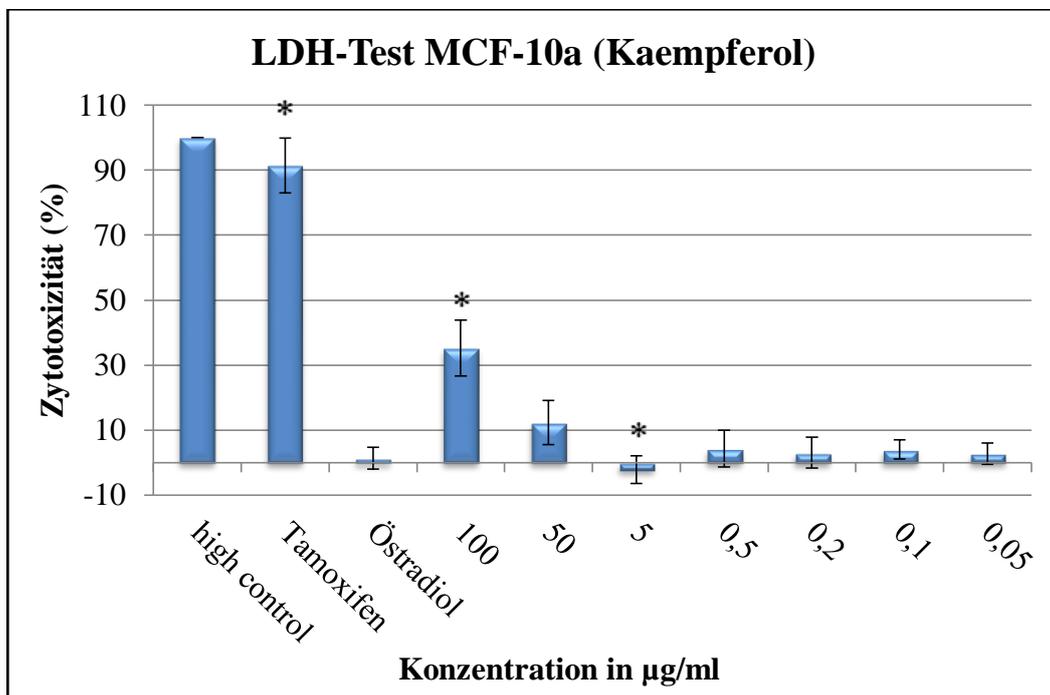


**Abb. 5-9:** : LDH-Test: Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### 5.2.3 MCF-10a Zelllinie

#### Kaempferol

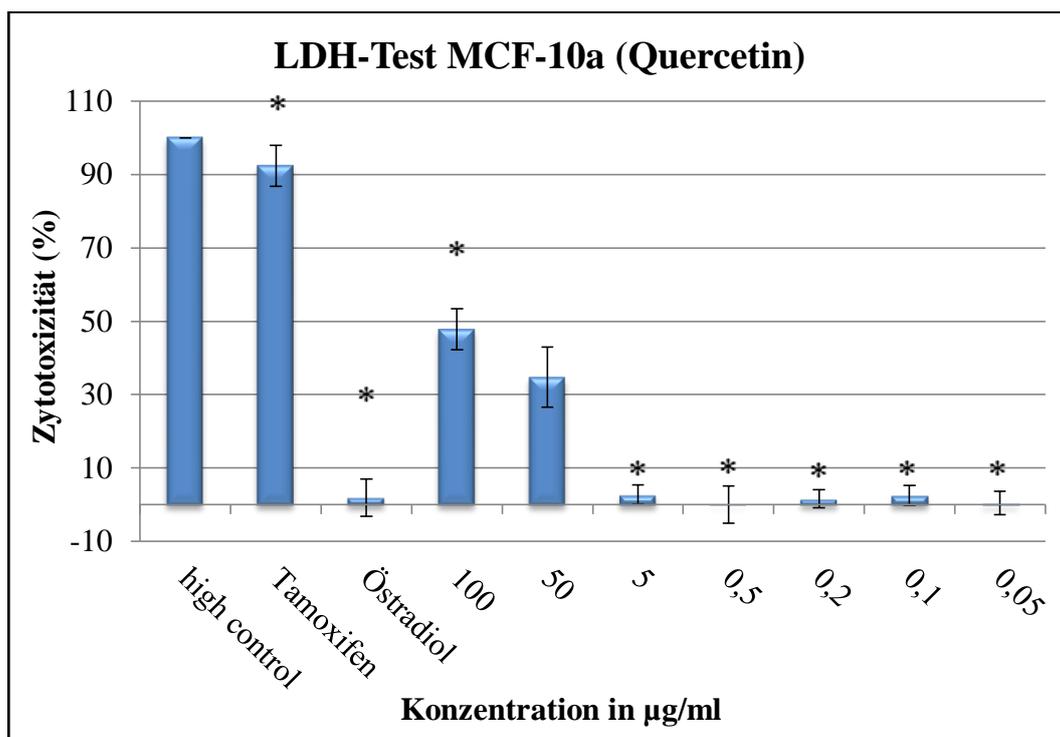
Kaempferol besitzt in seiner Konzentration von 100 µg/ml eine signifikante zytotoxische Wirkung von etwa 35% auf MCF-10a Zellen. Außerdem verursachte Kaempferol bei 50 µg/ml nur leichte aber keine signifikante zytotoxische Effekte, die ca. 12 % betragen. Im Übrigen weisen die weiteren getesteten Konzentrationen eine deutlich geringere zytotoxische Wirkung auf MCF-10a Zellen auf, wobei nur bei der Konzentration 5 µg/ml eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle (high control) vorliegt. Darüber hinaus zeigt Östradiol eine schwache Zytotoxizität von ca. 3% auf MCF-10a Zellen. Analog zu MCF7 und BT-20 Zellen wirkte Tamoxifen auf die MCF-10a stark toxisch.



**Abb. 5-10: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

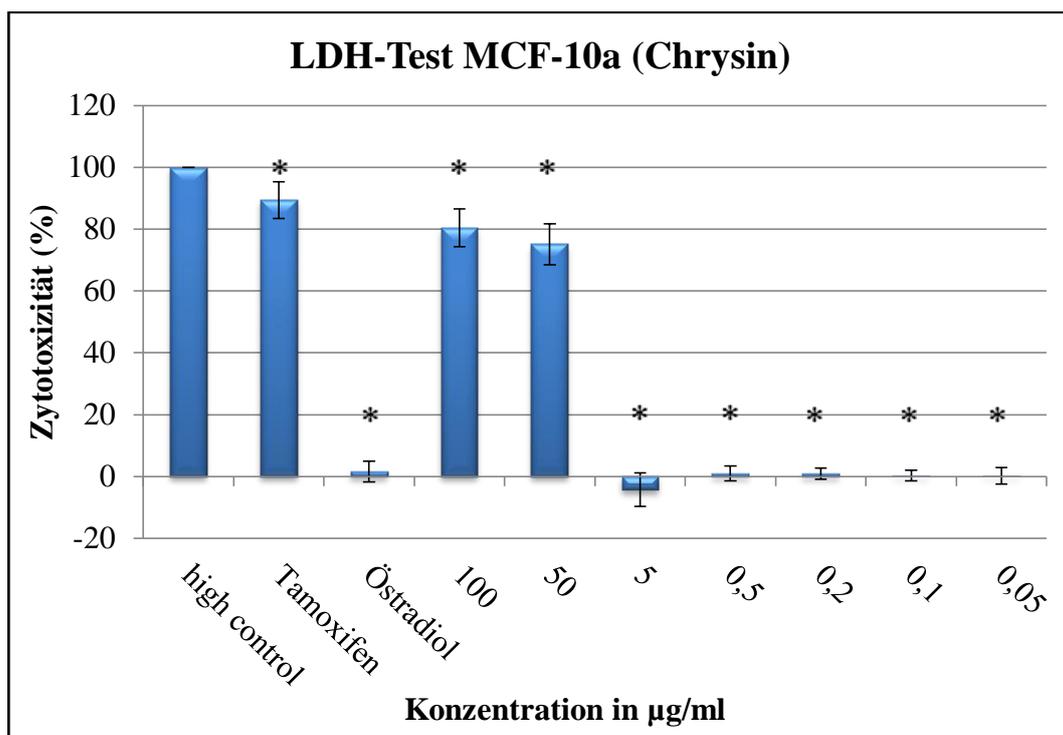
Die Abbildung 5-11 zeigt die zytotoxische Wirkung vom Quercetin auf MCF-10a Zellen. Quercetin wirkt bei 50 µg/ml (34%) und bei 100 µg/ml (47%) zytotoxisch. Jedoch zeigte das statistische Testverfahren bei der Konzentration 50 µg/ml keine Signifikanz gegenüber der Kontrolle (high control). Die Konzentrationen 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5 µg/ml besitzen sehr geringe signifikante zytotoxische Wirkung auf MCF-10a Zellen. Diese liegt bei etwa 2% (Abb. 5-11).



**Abb.5-11: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### Chrysin

Auf MCF-10a Zellen wirkte Chrysin auch zytotoxisch, jedoch erneut nur in den höheren Konzentrationen mit signifikanten Zelltalitäten von 75% bei 50 µg/ml und 80% bei 100 µg/ml. Die weiteren getesteten Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 5µg/ml) sowie Öst-radiol weisen dagegen keine Zytotoxizität auf. Das angewandte statistische Verfahren zeigte in allen Konzentrationen von Chrysin eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle (high control) auf (Abb. 5-12).

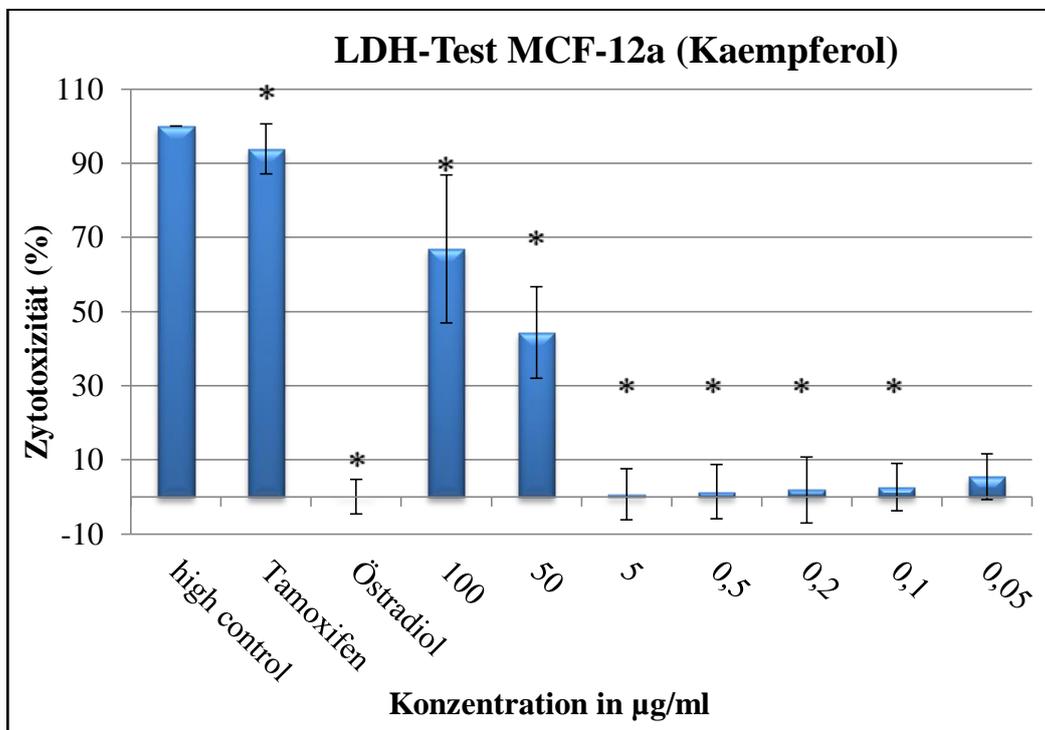


**Abb. 5-12: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## 5.2.4 MCF-12a Zelllinie

### Kaempferol

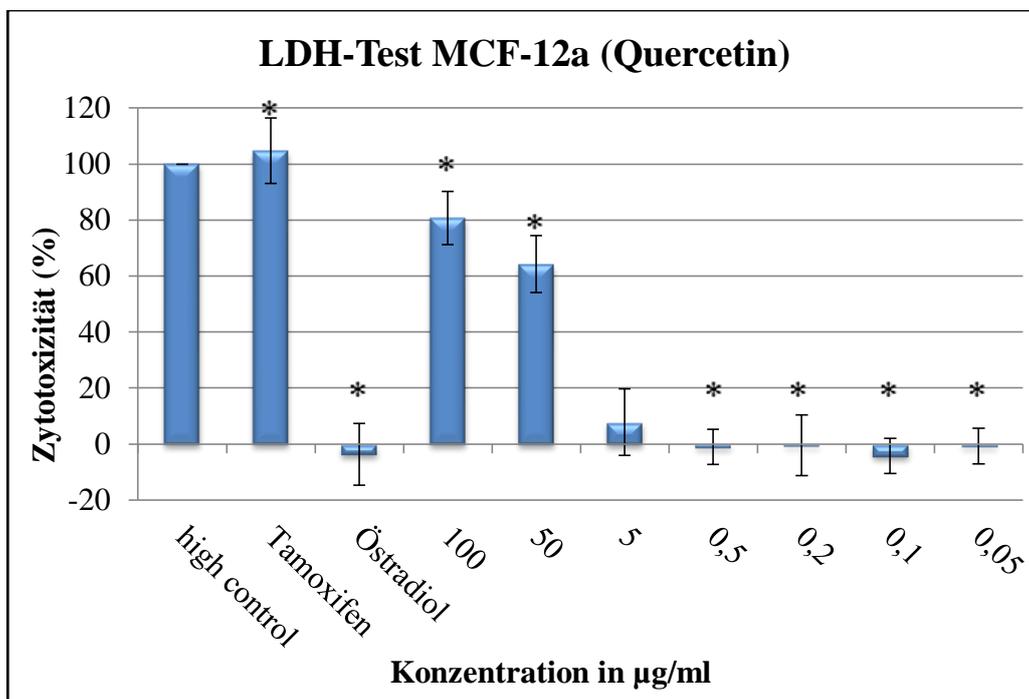
Die Abbildung 5-13 zeigt das Ergebnis des LDH-Tests für Kaempferol und die Kontrollsubstanzen in ihrem zytotoxischen Effekt auf MCF-12a Zellen. Im Vergleich zur Kontrolle (high control) besitzt Kaempferol in den höheren Konzentrationen (50 und 100 µg/ml) eine signifikante Zytotoxizität mit entsprechender 44%iger und 66%iger Zellzerstörung. Die Konzentrationen 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5 µg/ml haben eine geringe zytotoxische Wirkung auf MCF-12a Zellen, diese tritt bis ca. 8% auf. Statistisch besitzt Kaempferol nur bei der Konzentration von 0,05 µg/ml keinen signifikanten Einfluss auf die MCF-12a Zellen. Darüber hinaus weist Östradiol keine Zytotoxizität auf MCF-12a Zellen auf. Dagegen zeigte Tamoxifen einen starken signifikanten zytotoxischen Effekt auf die MCF-12a Zellen mit einer etwa 93% Zellletalität (Abb. 5-13).



**Abb. 5-13: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

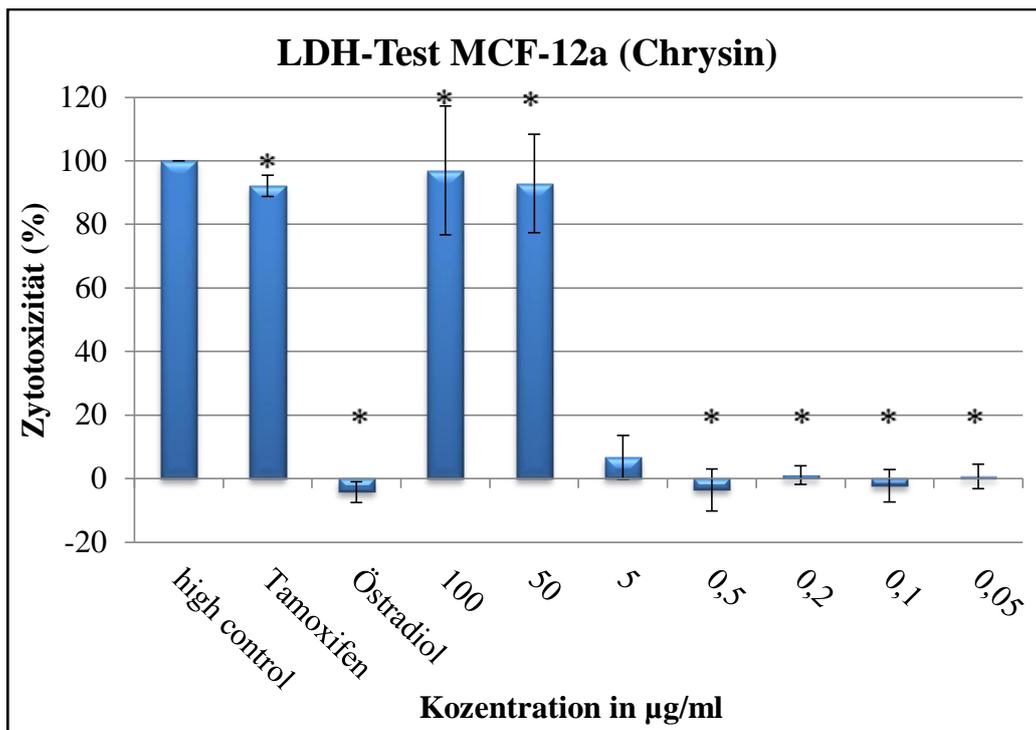
Auf MCF-12a Zellen wirkte Quercetin auch zytotoxisch, jedoch erneut nur in den höheren Konzentrationen mit signifikanten Zellletalitäten von 7% bei 5 µg/ml, 64% bei 50 µg/ml und 80% bei 100 µg/ml. Jedoch ist die Zytotoxizität bei 50 und 100 µg/ml deutlich stärker. Im Gegensatz dazu weisen die weiteren überprüften Konzentrationen von Quercetin keine Zytotoxizität auf. Mit Ausnahme von 5 µg/ml stellen alle anderen Konzentrationen von Quercetin statistisch eine Signifikanz gegenüber der Kontrolle (high control) dar (Abb. 5-14). In dieser Abbildung wurde auch die signifikante und stark zytotoxische Wirkung von Tamoxifen auf die MCF-12a Zellen dargestellt.



**Abb. 5-14: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Chrysin

Eine signifikante, 92%ige und 96%ige Zelllitalität fügte Chrysin mit seiner Konzentration von 50 und 100 µg/ml auf MCF-12a Zellen zu. Chrysin, welche eine Konzentration von 5 µg/ml aufwies, erzielte eine geringfügige Zytotoxizität von etwa 6 %. Außerdem hatten die niedrigen Konzentrationen von Chrysin (0,05; 0,1; 0,2 und 0,5 µg/ml) keine zytotoxischen Effekte auf MCF-12a Zellen (Abb. 5-15). Diese Abbildung zeigt, dass Chrysin nur in seiner Konzentration von 5 µg/ml statistisch keinen signifikanten Einfluss gegenüber der Kontrolle (high control) besitzt.



**Abb. 5-15: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Triton-Kontrolle (high control = 100 % Zytotoxizität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### 5.3 BrdU-Zellproliferationstest

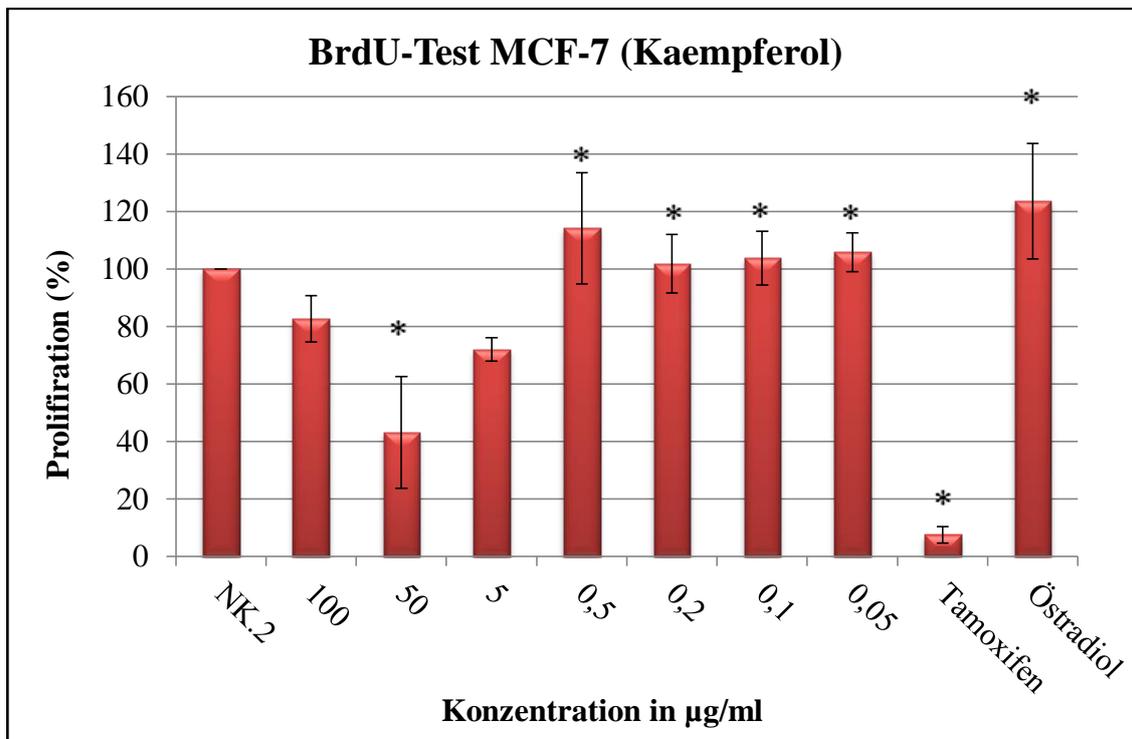
Dieses Testverfahren ermöglicht die Bestimmung des Zellwachstums und der Zellproliferation nach der unmittelbaren Verwendung von Testsubstanzen. Die Ergebnisse werden in verschiedenen Abbildungen dargestellt. Auf der Abszissenachse werden die verschiedenen Extraktkonzentrationen sowie Tamoxifen und Östradiol gezeigt. Die Ordinatenachse gibt

den prozentualen Anteil der Zellproliferation an. Der proliferative Einfluss der verschiedenen Substanzkonzentrationen wurde mithilfe der Negativkontrolle 2 definiert. Das Zellwachstum wurde bei der Negativkontrolle 2 auf 100% gesetzt.

### 5.3.1 MCF-7 Zelllinie

#### Kaempferol

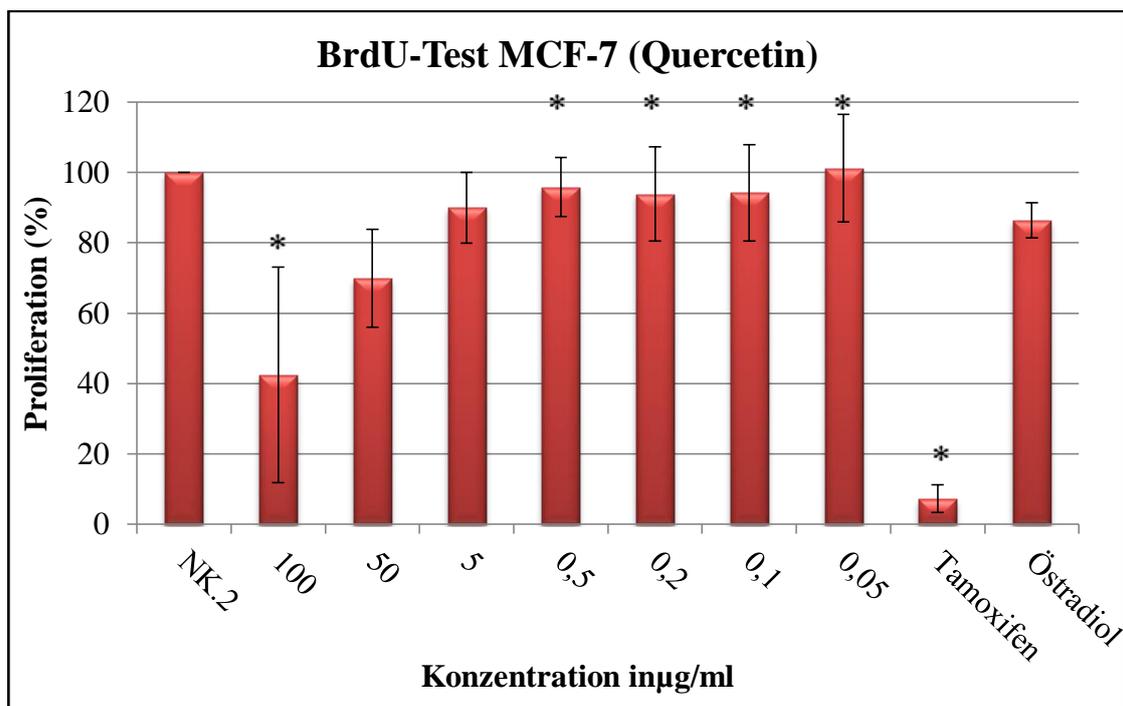
Durch Kaempferol wird das Zellwachstum der MCF-7 Zellen bei höheren Konzentrationen gehemmt. Bei 5 und 100 µg/ml zeigte Kaempferol eine antiproliferative Wirkung auf MCF-7 Zellen von 18 bis 28%, jedoch zeigte das statistische Testverfahren keine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2). Eine deutliche und signifikante Reduktion der Zellproliferation auf 43% erwies Kaempferol bei einer Konzentration von 50 µg/ml. Die geringeren Konzentrationen von Kaempferol (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 µg/ml) besitzen dagegen eine signifikante und geringfügige Förderung des Wachstums von maximal 14%. Tamoxifen verhindert stark und signifikant die Zellproliferation um etwa 92%. Im Gegensatz zu Tamoxifen fördert Östradiol signifikant das Zellwachstum um 23%.



**Abb. 5-16: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

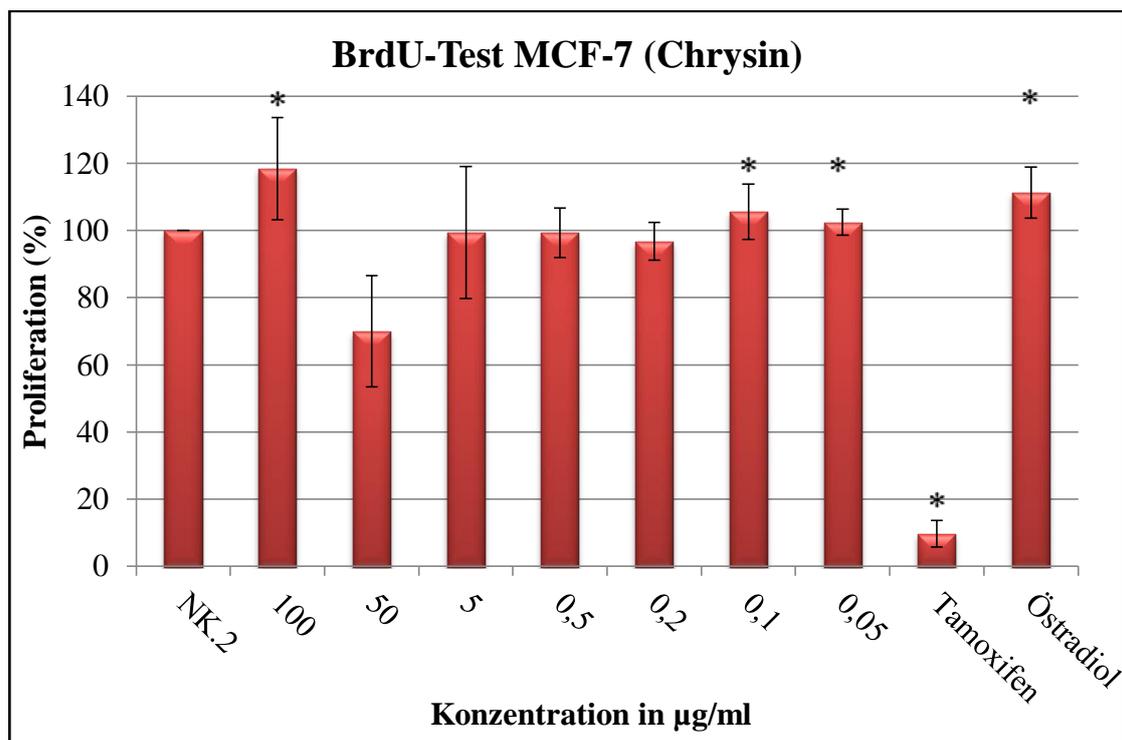
Die Abbildung 5-17 zeigt den proliferativen Effekt von Quercetin auf MCF-7 Zellen. Auf das Zellwachstum von MCF-7 wirkte Quercetin progredient hemmend beginnend mit 5 bis 10% bei den Konzentrationen 0,1; 0,2; 0,5 und 5  $\mu\text{g/ml}$ , 30% bei 50  $\mu\text{g/ml}$  und 58% bei 100  $\mu\text{g/ml}$ . Darüber hinaus wies Quercetin in seiner Konzentration von 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 100  $\mu\text{g/ml}$  eine signifikante Proliferationswirkung auf die MCF-7 Zellen auf. Im Vergleich zur Negativkontrolle 2 (NK.2) führte das statistische Verfahren bei den Konzentrationen 5 und 50  $\mu\text{g/ml}$  zur keiner Signifikanz (Abb. 5-17).



**Abb. 5-17: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte  $\pm$  SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Chrysin

Chrysin zeigte in seiner Konzentration von 100 µg/ml eine signifikante Proliferationsförderung von ca. 18%. Interessanterweise verursachte Chrysin in 50 µg/ml eine deutliche, jedoch leicht signifikante Proliferationshemmung von etwa 30%. Die weiteren niedrigeren getesteten Konzentrationen von Chrysin (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 5 µg/ml) hatten keine großen Auswirkungen auf das Wachstum der MCF-7 Zellen. Daneben liegt statistisch bei den Konzentrationen von 0,05 µg/ml und 0,1 µg/ml eine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2 vor. (Abb. 5-18).

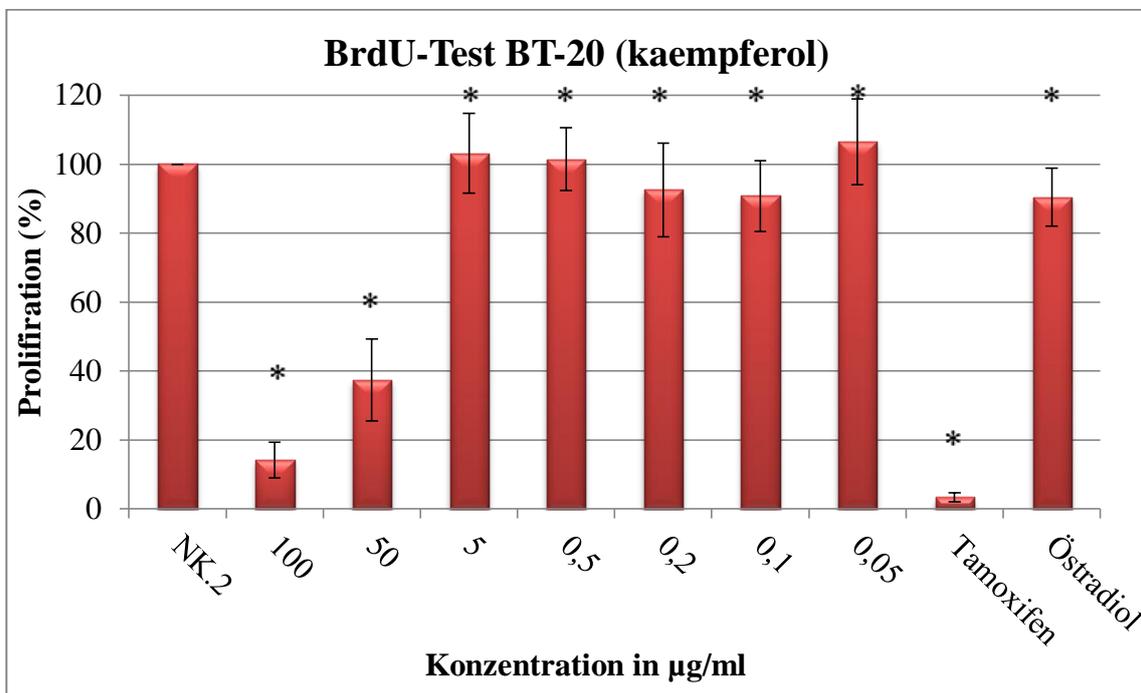


**Abb. 5-18: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### 5.3.2 BT-20 Zelllinie

#### Kaempferol

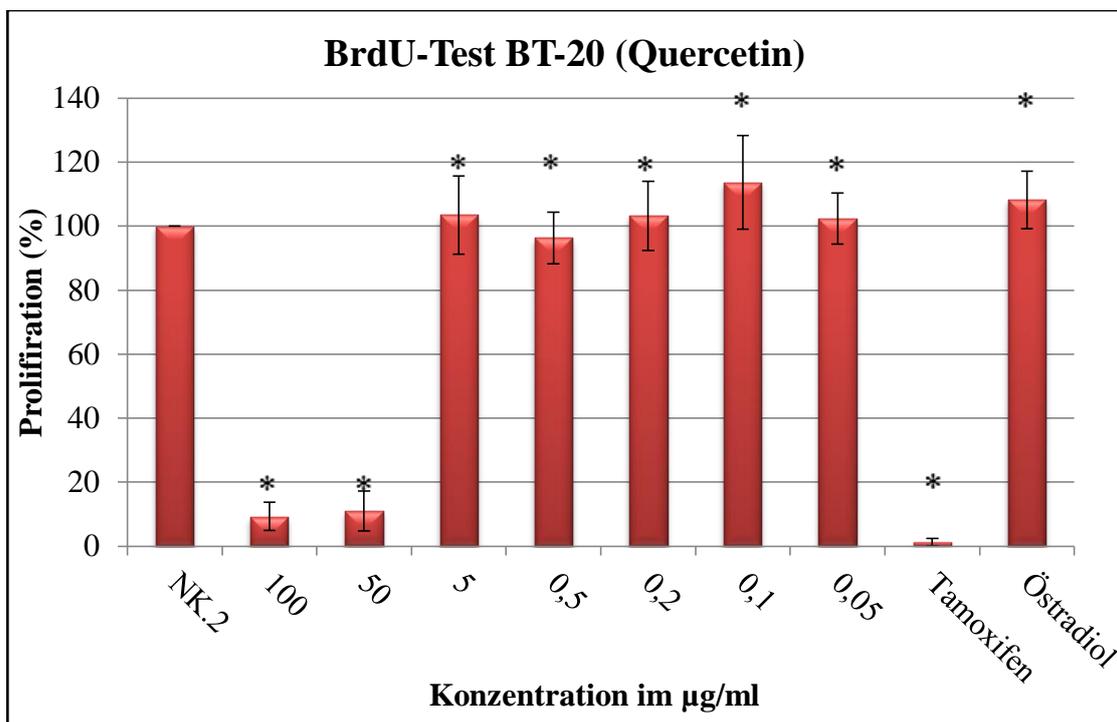
Im Verhältnis zur Negativkontrolle 2 (NK.2) besitzt Kaempferol in seinen höheren Konzentrationen eine signifikante starke zellproliferationshemmende Wirkung auf BT-20 Zellen, mitentsprechend 86% bei 100 µg/ml und 63% bei 50 µg/ml. Des Weiteren fördert Kaempferol signifikant die Proliferation von BT-20 Zellen bis ungefähr 6%, jedoch nur in den Konzentrationen 0.05 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5µg/ml. Darüber hinaus besitzt Kaempferol in seinen Konzentrationen von 0,1 und 0,2 µg/ml eine signifikante geringfügige Proliferationsförderung von etwa 8 bis 10%. Auf BT-20 Zellen wirkte Tamoxifen jedoch stark wachstumshemmend bei einem Wert von ca. 97%. In der Abbildung 5-19 zeigt Östradiol einen signifikanten hemmenden Effekt von ca. 10% auf die BT-20 Zellen (Abb. 5-19).



**Abb. 5-19: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolsche Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

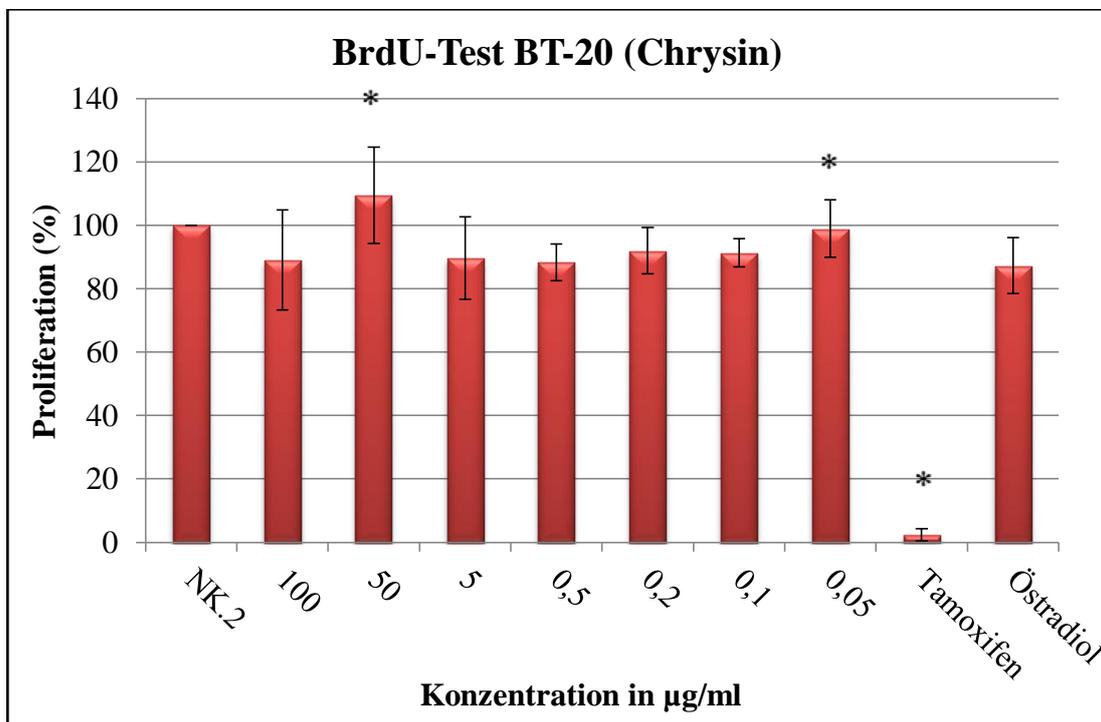
Die Abbildung 5-20 stellt die anti-proliferative Wirkung von Quercetin auf das Zellwachstum der BT-20 Zellen dar. Hierbei führte Quercetin nur in den höheren Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml zu einem signifikanten und extremen wachstumshemmenden Effekt auf BT-20 Zellen. Die Hemmung der Zellproliferation liegt hier um ca. 90%. Die niedrigeren Konzentrationen von Quercetin (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 5 µg/ml) sowie Östradiol besitzen auf die BT-20 Zelllinie keinen großen aber dennoch signifikanten Einfluss (Abb. 5-20). Hierbei zeigte das statistische Testverfahren bei allen Konzentrationen von Quercetin eine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2.



**Abb.5-20: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Chrysin

Im Vergleich zu Kaempferol und Quercetin zeigte Chrysin in seiner Konzentration von 100 µg/ml eine leichte zellproliferationshemmende Wirkung auf BT-20 Zellen von etwa 10%, welche im statistischen Verfahren gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2) keine Signifikanz darstellte. Bei 50 µg/ml bewirkte Chrysin dagegen eine signifikante jedoch schwache Erhöhung des Zellwachstums um ca. 9,5%. Bei den Konzentrationen 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5 µg/ml liegt die Hemmung der Zellproliferation von BT-20 Zellen zwischen 1 und 10%, wobei nur die Konzentration von 0,05 µg/ml einen statistisch signifikanten Einfluss auf die BT-20 Zellen hat (Abb. 5-21). In dieser Abbildung besitzt Tamoxifen eine starke signifikante wachstumshemmende Wirkung auf die Zelllinie.

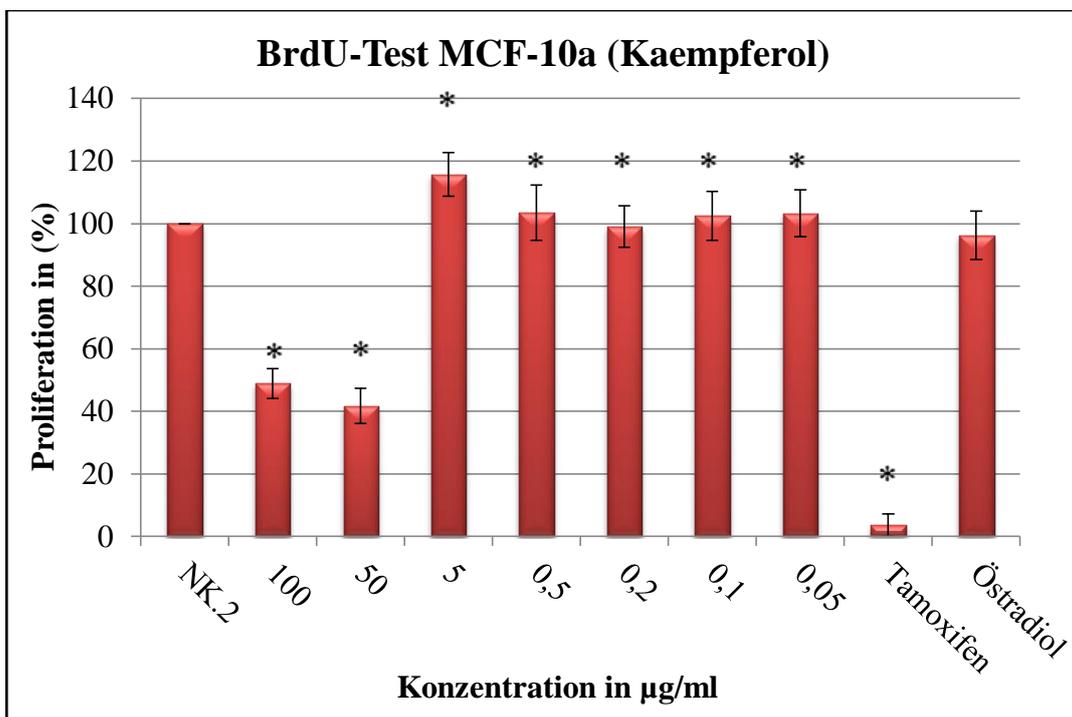


**Abb. 5-21: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolsche Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### 5.3.3 MCF-10a Zelllinie

#### Kaempferol

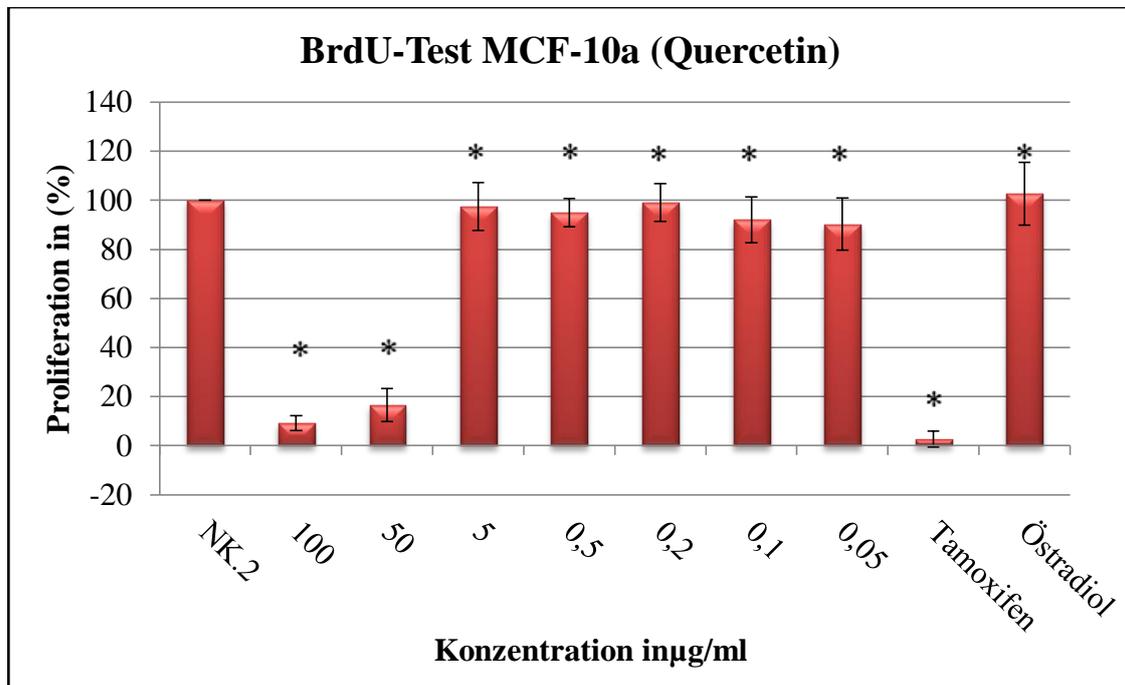
Im Bezug zur Negativkontrolle 2 (NK.2) verursachte Kaempferol eine signifikante Inhibition der Proliferation von MCF-10a Zellen in den Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml von etwa 52 bis 59%. Darüber hinaus zeigten die MCF-10a Zellen bei der Zugabe von 5 µg/ml Kaempferol eine signifikante Proliferationsförderung von etwa 15%. Des Weiteren besitzen die niedrigeren Konzentrationen von Kaempferol sowie Östradiol keinen großen, aber signifikanten Einfluss auf MCF-10a Zellen. Auf der anderen Seite hemmt Tamoxifen das Zellwachstum von MCF-10a Zellen signifikant auf rund 3% (5-22).



**Abb. 5-22: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

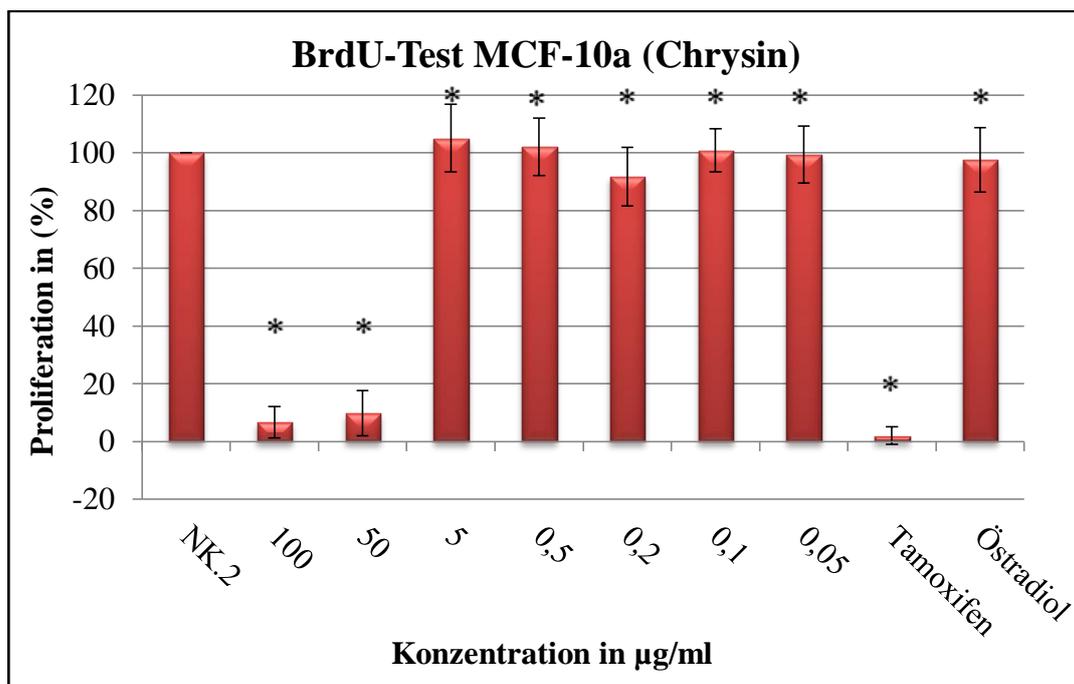
Quercetin verringerte die Zellproliferation von MCF-10a Zellen signifikant in den höheren Konzentrationen auf 16,6% bei 50 µg/ml und auf 9,2% bei 100 µg/ml. Gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2) zeigte Quercetin bei den Konzentrationen 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml, 0,5 µg/ml und 5 µg/ml eine signifikante und leichte Hemmung von maximum 10%. Das Östradiol weist in der Konzentration von  $1 \cdot 10^{-9}$  mol/l eine signifikante jedoch geringfügige Proliferationsförderung der MCF-10a Zellen um maximal 2,74% auf. Dagegen besitzt Tamoxifen einen signifikanten hohen hemmenden Effekt auf das Wachstum der MCF-10a Zellen (Abb. 5-23).



**Abb. 5-23: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Chrysin

Verglichen mit der Negativkontrolle 2 (NK.2) verursachte Chrysin eine starke signifikante Inhibition der Proliferation von MCF-10a Zellen auf 9,8% bei 50 µg/ml und auf 6,7% bei 100 µg/ml. Die getesteten geringeren Konzentrationen von Chrysin besitzen keinen großen Einfluss auf das Wachstum der MCF-10a Zellen. Darunter fand sich bei der Konzentration 0,2 µg/ml eine geringfügige anti-proliferative Hemmung von etwa 8%. Das statistische Testverfahren zeigte bei allen Konzentrationen von Chrysin eine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2) (Abb. 5-24).

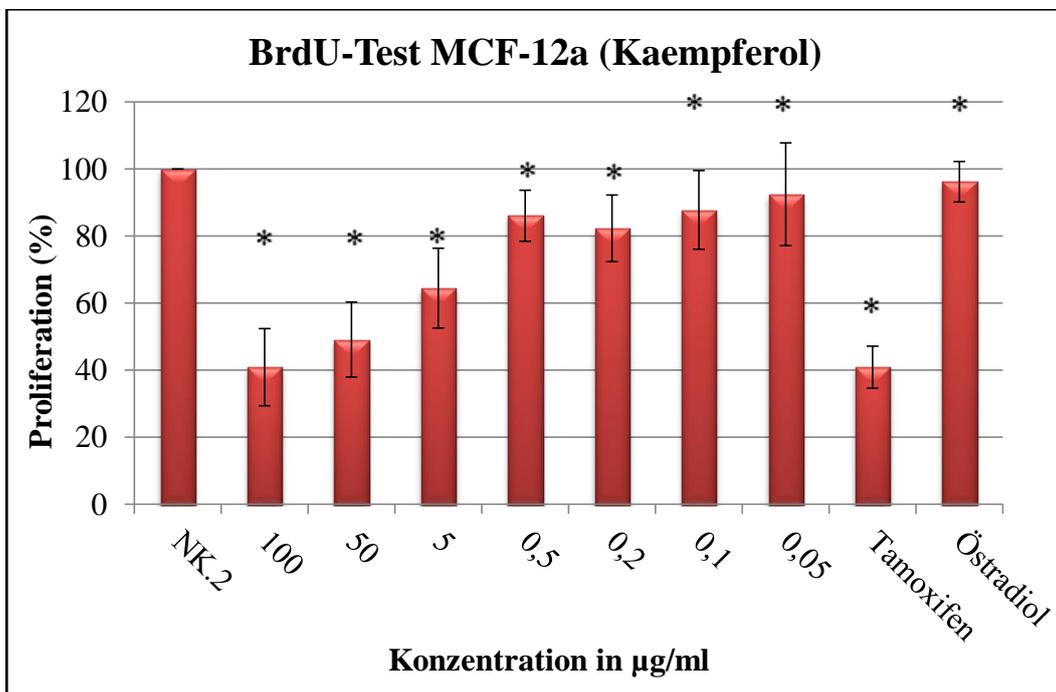


**Abb. 5-24: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

### 5.3.4 MCF-12a Zelllinie

#### Kaempferol

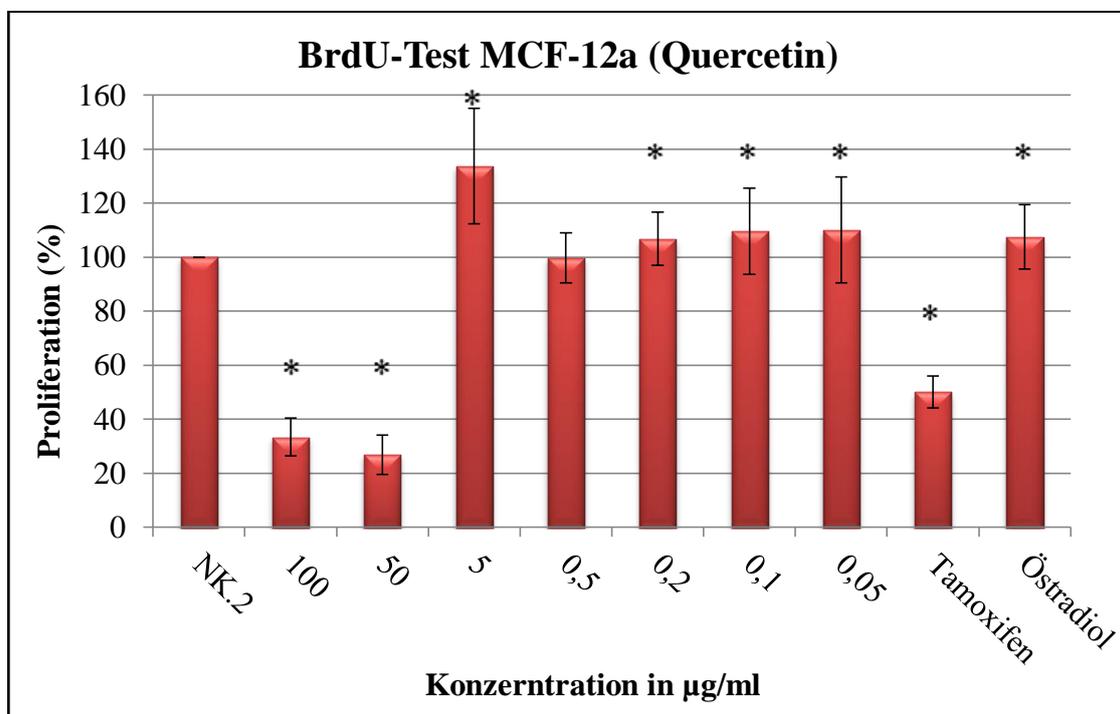
Kaempferol verursachte eine signifikante Hemmung der MCF-12a Zellproliferation auf rund 64,5% bei 5 µg/ml, auf 50 % bei 50 µg/ml und auf 40% bei 100 µg/ml. Darüber hinaus zeigte Kaempferol eine leichte, jedoch signifikante Hemmung des Zellwachstums von etwa 8% bei 0,05 µg/ml, 13% bei 0,1 µg/ml, 18% bei 0,2 µg/ml und 14% bei 0,5 µg/ml. Außerdem führte Tamoxifen ebenfalls zu einer Reduktion der Zellproliferation von MCF-12a Zellen auf 40%. Hingegen besitzt Östradiol keinen großen Effekt auf die Zellproliferation von MCF-12a Zellen. Statistisch besitzen alle Konzentrationen von Kaempferol, Tamoxifen und Östradiol eine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2) (Abb. 5-25).



**Abb. 5-25: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

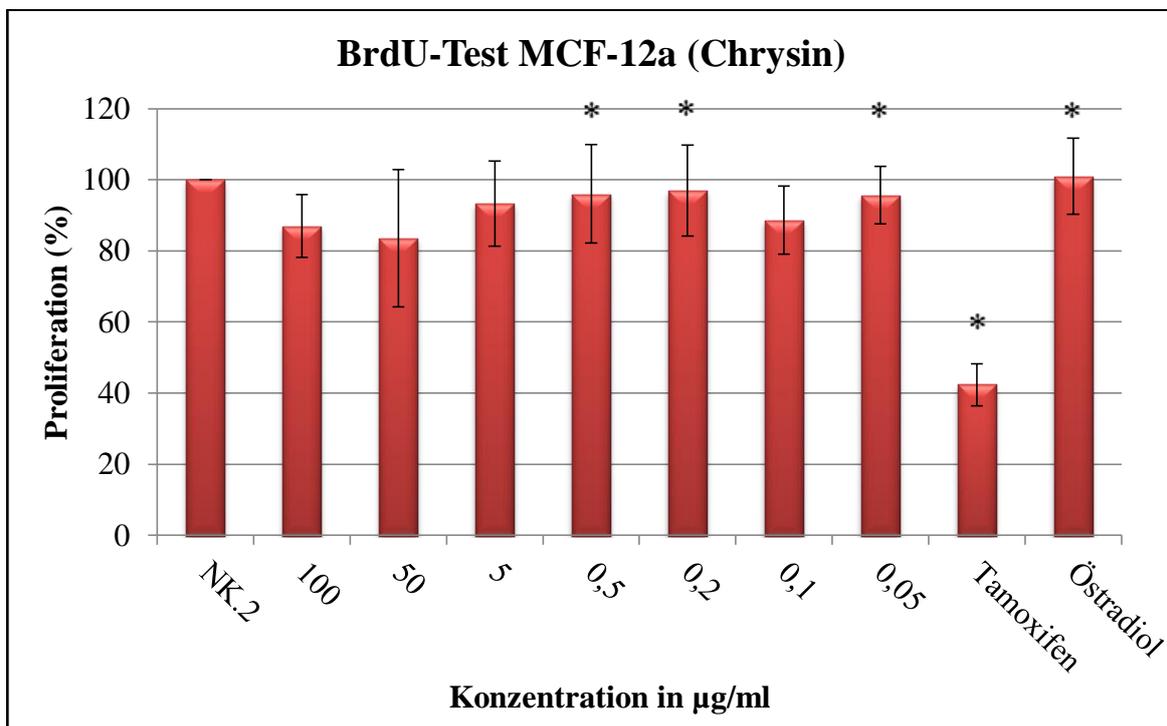
Die Abbildung 5-26 stellt den Einfluss des Quercetins auf die Zellproliferation bei der Zelllinie MCF-12a Zellen dar. MCF-12a Zellen werden in ihrem Wachstum von Kaempferol bei einer Konzentrationen von 50 µg/ml und 100 µg/ml signifikant um 67 bzw. 74% gehemmt. Bei der Konzentration von 5 µg/ml bewirkt Quercetin im Gegensatz zu Kaempferol und Chrysin eine signifikante Erhöhung der Zellproliferation um etwa 33%. Des Weiteren weisen die niedrigen Konzentrationen von Quercetin keinen großen Einfluss auf das Zellwachstum der MCF-12a Zellen auf. In dieser Abbildung zeigte Tamoxifen verglichen mit der Negativkontrolle 2 (NK.2) eine signifikante Hemmung der Proliferation von MCF-12a Zellen auf 50%. Mit Ausnahme der Konzentration von 0,5 µg/ml beeinflussen die anderen Konzentrationen von Quercetin die Zytotoxizität der MCF-12a Zellen statistisch signifikant (Abb. 5-26).



**Abb. 5-26: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolische Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Chrysin

Im Vergleich zu Kaempferol und Quercetin hat Chrysin bei den Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml einen geringfügigen anti-proliferativen Effekt auf MCF-12a Zellen. Das Zellwachstum der MCF-12a Zellen wird bei diesen Konzentrationen nicht signifikant um 17 bzw. 13% gehemmt, welche im statistischen Verfahren keine Signifikanz zeigte. Analog dazu verursachte Chrysin eine Hemmung der MCF-12a Zellproliferation auf rund 95% bei 0,05 µg/ml, 88% bei 0,1 µg/ml, 96% bei 0,2 µg/ml, 96% bei 0,5 µg/ml und 93% bei 5 µg/ml. Tamoxifen zeigte eine signifikante Inhibition des Zellwachstum von MCF-12a Zellen auf. Dagegen besitzt Östradiol keinen Einfluss auf die Proliferation der MCF-12a Zellen. Bei den Konzentrationen 0,1 µg/ml, 5 µg/ml, 50 µg/ml und 100 µg/ml liegt keine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2 (Abb. 5-27).



**Abb. 5-27: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die ethanolsche Negativkontrolle (NK. 2 = 100 % Zellproliferation) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## 5.4 MTT-Test

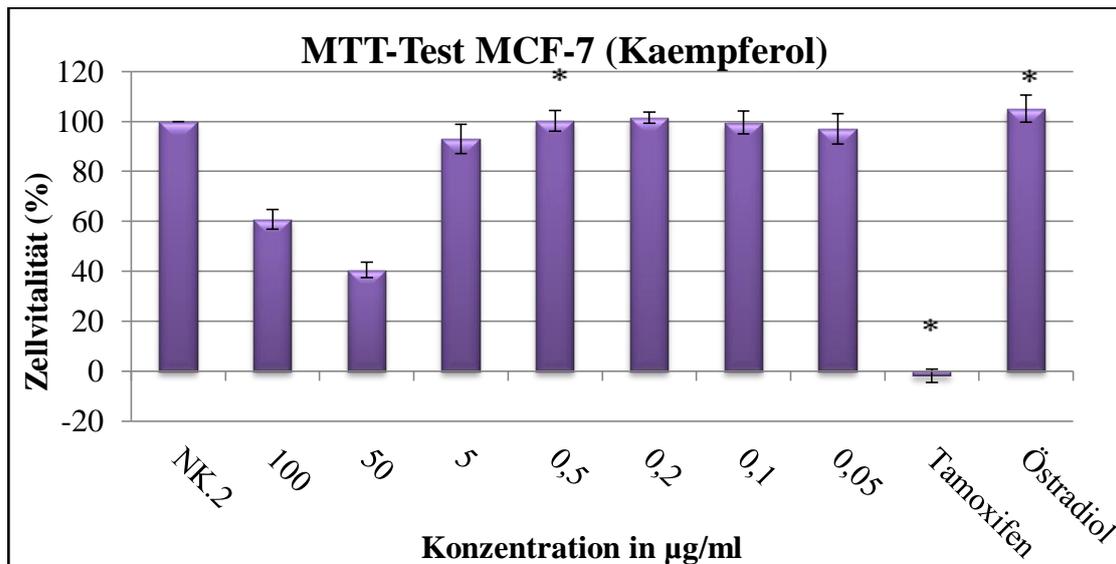
Mithilfe vom MTT-Test kann die Stoffwechselaktivität der Zellen nach der Verwendung der Testsubstanzen bestimmt werden. Dieser Test basiert auf der Messung der Enzymaktivität vom mitochondrialen Succinat-Terazolium-Reduktase-System. Die Ergebnisse werden in

den folgenden verschiedenen Abbildungen veranschaulicht. Auf der Abszissenachse werden die verschiedenen Extraktkonzentrationen sowie Tamoxifen und Östradiol dargestellt. Die Ordinatenachse gibt den prozentualen Anteil der Zellvitalität an. Der Einfluss der verschiedenen Konzentrationen der Substanzen auf die Vitalität der verwendeten Zelllinien ist im Bezug zur Negativkontrolle 2 (Zellen und Ethanol) gesetzt worden. Den Vitalitätseffekt auf die verschiedenen Zelllinien wurde bei der Negativkontrolle 2 auf 100% definiert.

#### 5.4.1 MCF-7 Zelllinie

##### Kaempferol

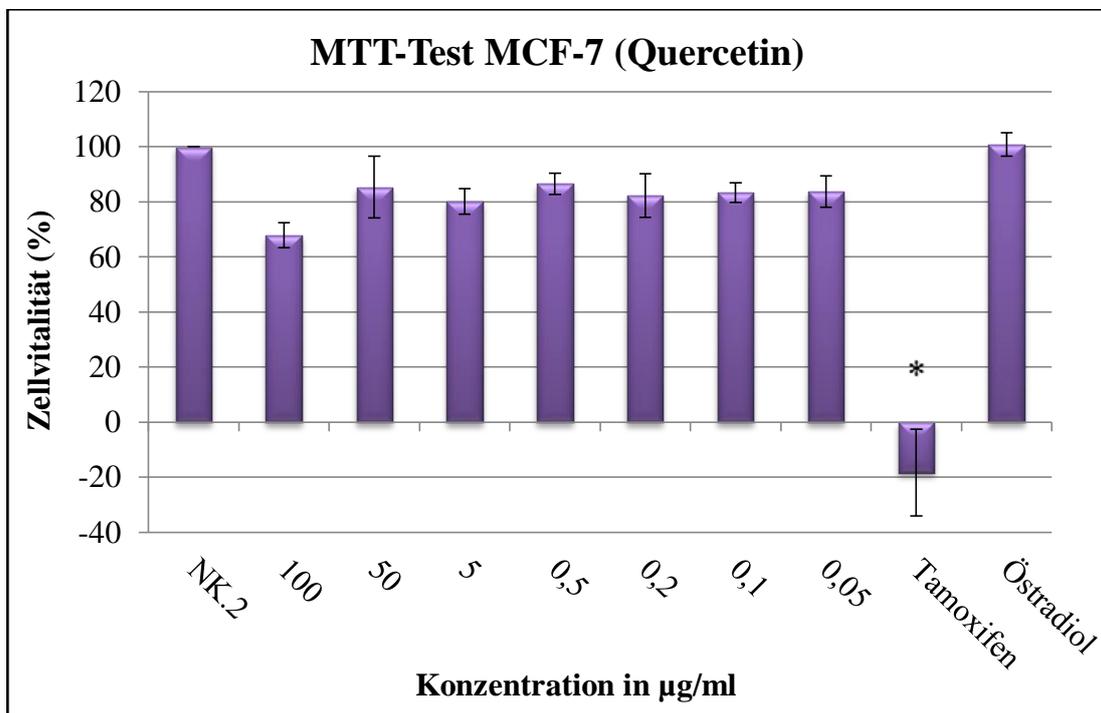
Auf MCF-7 Zellen bewies Kaempferol eine starke Inhibition der Zellvitalität von etwa 60% bei 50 µg/ml und 40% bei 100 µg/ml. Bei 5 µg/ml konnte eine leichte Verringerung der Zellvitalität von ca. 8% gemessen werden. Die anderen Konzentrationen von Kaempferol 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml und 0,5 µg/ml besitzen keinen großen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der MCF-7 Zellen. Gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2) zeigte Kaempferol nur bei 0,5 µg/ml eine Signifikanz. Die Abbildung 5-28 zeigte eine leichte stimulierende und signifikante Wirkung von Östradiol auf MCF-7 Zellen. Darüber hinaus verfügt Tamoxifen eine signifikante und deutliche Hemmung der Zellvitalität auf rund 2,7% auf (Abb. 5-28).



**Abb. 5-28: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin

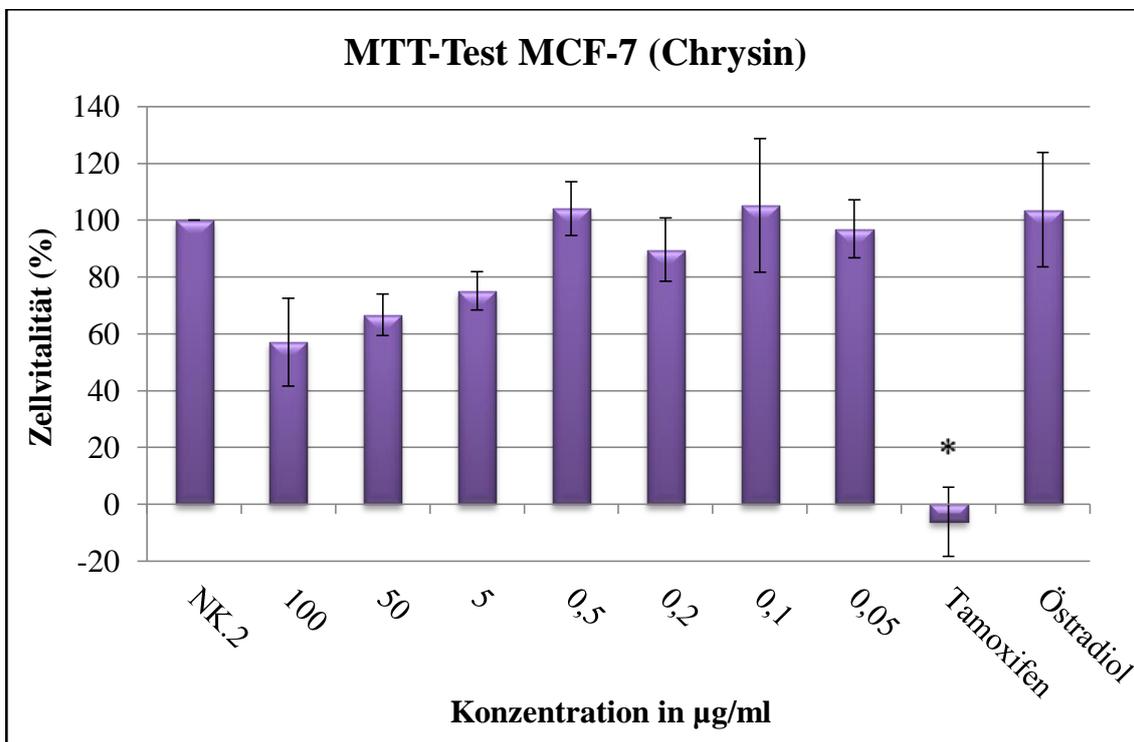
Quercetin stellte ebenso eine Hemmung der Zellvitalität von MCF-7 Zellen auf rund 67,9 % bei 100 µg/ml dar. Bei der Konzentration von 50 µg/ml liegt eine geringfügige Verringerung der Stoffwechselaktivität der MCF-7 Zellen um ca. 15% vor. Darüber hinaus verursachten die Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 5 µg/ml eine unterschiedliche Reduktion der Zellstoffwechselaktivität von etwa 14 bis 20%. Bei allen Konzentrationen von Quercetin besteht jedoch keine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2. In der Abbildung 5-29 besitzt Östradiol ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Vitalität von MCF-7 Zellen. Des Weiteren hemmt Tamoxifen stark und signifikant die Stoffwechselaktivität der MCF-7 Zellen (Abb. 5-29).



**Abb. 5-29: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Chrysin

Chrysin verursachte eine deutliche Hemmung der Zellvitalität von MCF-7 Zellen auf rund 75% bei 5 µg/ml, rund 66% bei 50 µg/ml und rund 57% bei 100 µg/ml. Die anderen geringeren Konzentrationen stellten unterschiedliche Effekte auf die Stoffwechselaktivität der MCF-7 Zellen dar. Darunter besitzen die Konzentrationen 0,05 µg/ml und 0,2 µg/ml eine leichte Reduktion der Zellvitalität von ca. 4 bzw. 11%. Dagegen bewirken die Konzentrationen 0,1 µg/ml und 0,5 µg/ml eine leichte Erhöhung der metabolischen Aktivität der MCF-7 Zellen um einen Betrag von 5%. Im Bezug zur Negativkontrolle 2 (NK.2) besteht bei allen Konzentrationen von Chrysin keine Signifikanz (Abb.5-30). Anhand dieser Abbildung weist Östradiol keinen signifikanten Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der MCF-7 Zellen.

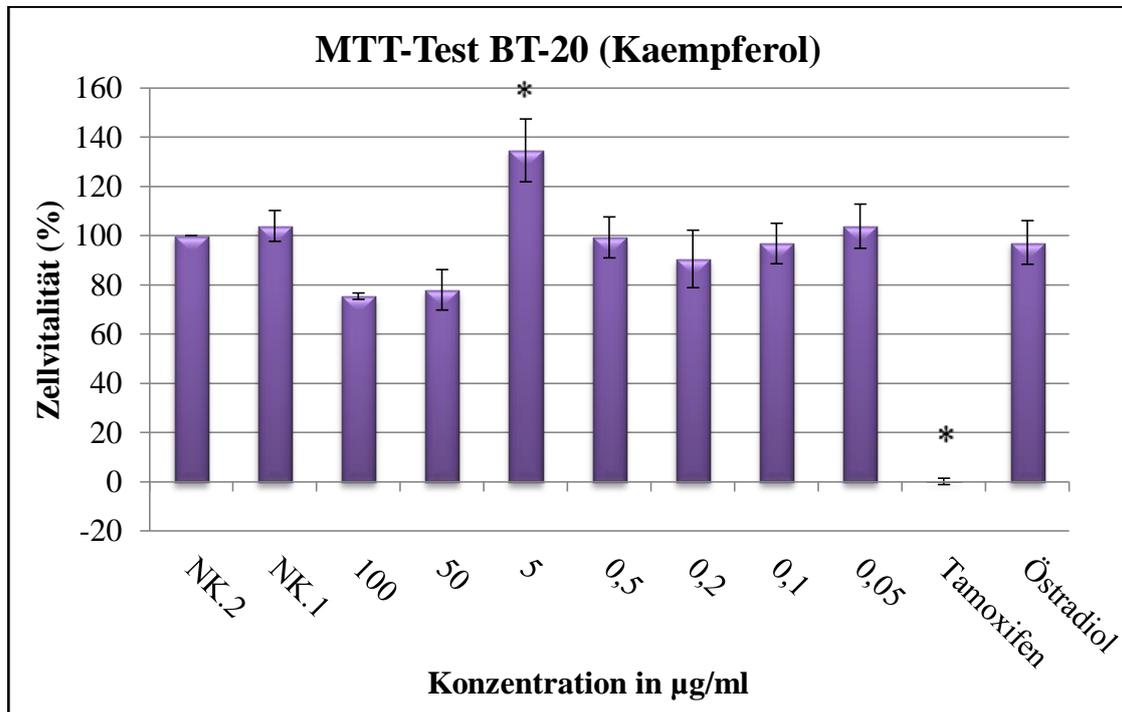


**Abb. 5-30: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-7 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## 5.4.2 BT-20 Zelllinie

### Kaempferol

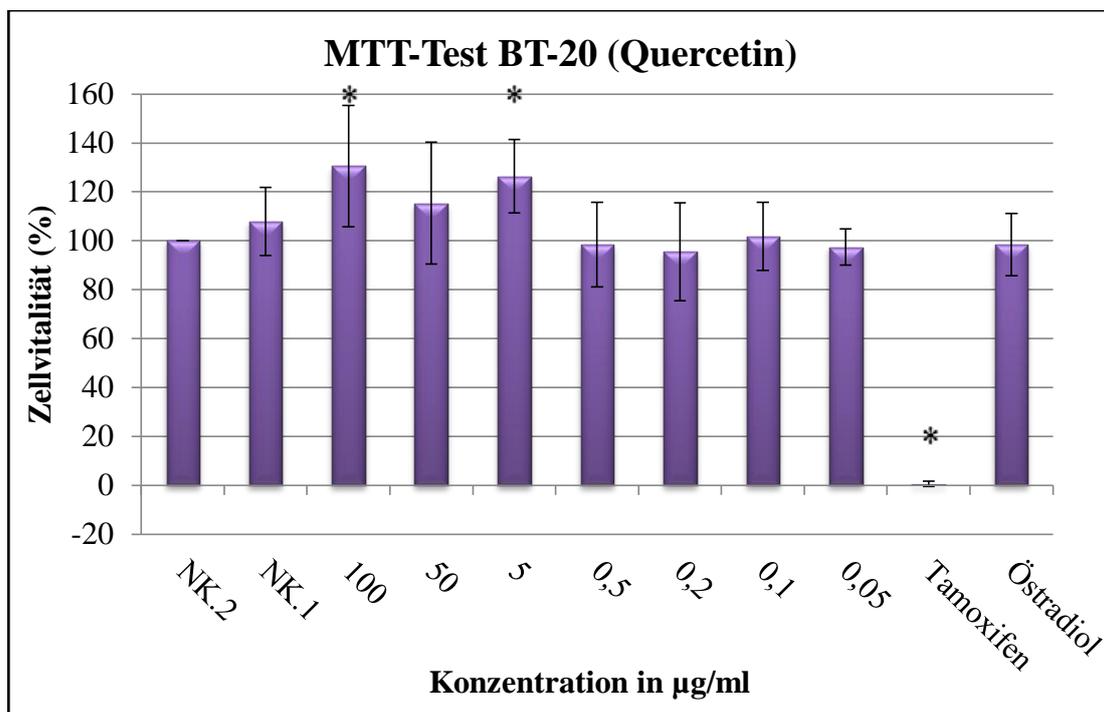
Auf BT-20 Zellen zeigte Kaempferol eine leicht signifikante Hemmung der Zellvitalität von etwa 22 % bei 50 µg/ml und 25 % bei 100 µg/ml. Dagegen war bei der Konzentration 5 µg/ml einen stimulierenden und signifikanten Effekt von ca. 34% auf die BT-20 Zellen zu beobachten. Es zeigten jedoch schon die Konzentrationen 0,1; 0,2 und 0,5 µg/ml supprimierende Wirkungen auf die BT-20 Zellen, die nur sehr gering waren. Darüber hinaus bewirkt die Konzentration 0,05 µg/ml eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung von ca. 3% der metabolischen Aktivität der BT-20 Zellen. Außerdem hemmt Tamoxifen die Stoffwechselaktivität der BT-20 Zellen stark. Dies stellte eine statistische Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2) dar (Abb. 5-31).



**Abb. 5-31: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

## Quercetin

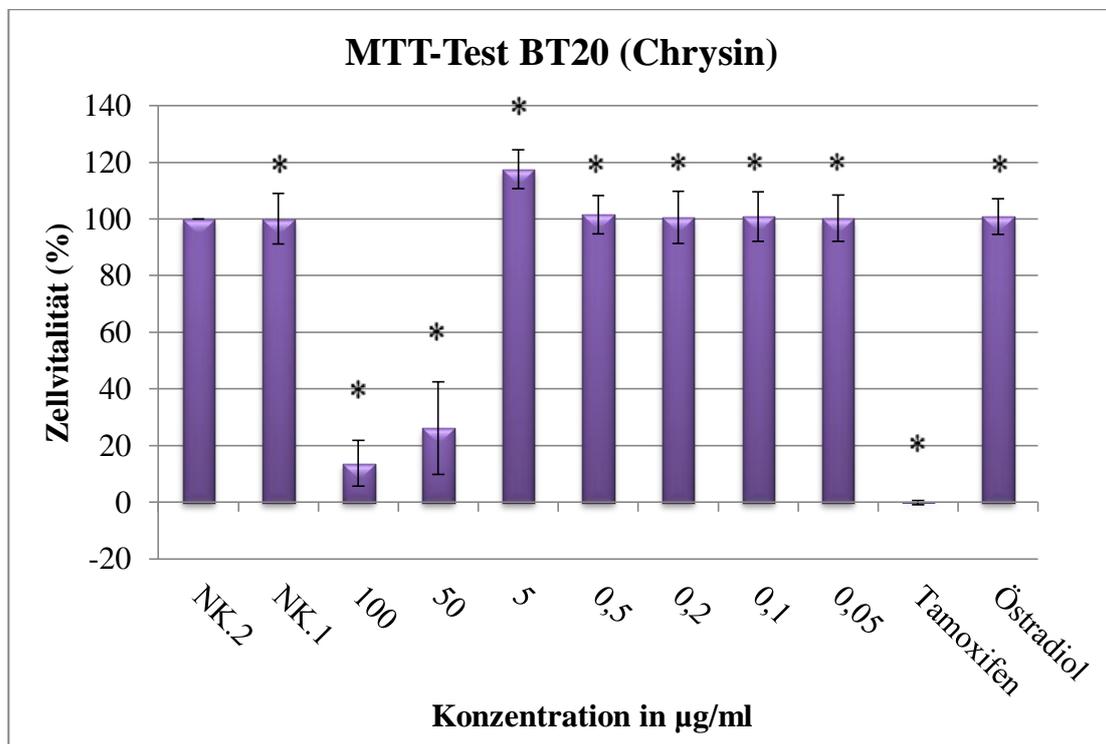
Quercetin verursachte eine deutliche Stimulation der Zellvitalität von BT-20 Zellen auf rund 126% bei 5 µg/ml, rund 115% bei 50 µg/ml und rund 130% bei 100 µg/ml, wobei diese Stimulationen nur bei den Konzentrationen 5 und 100 µg/ml statistisch signifikant im Vergleich zur Negativkontrolle 2 (NK.2) waren. Des Weiteren besitzen die anderen Konzentrationen von Quercetin (0,05; 0,1; 0,2 und 0,5 µg/ml) sowie Östradiol keinen größeren und keinen signifikanten Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der BT-20 Zellen. Darüber hinaus bewirkte Tamoxifen eine starke und statistisch signifikante Verringerung der Zellvitalität (Abb. 5-32).



**Abb. 5-32: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

## Chrysin

Anhand der Abbildung 5-33 wurde die Wirkung von Chrysin, Tamoxifen und Östradiol auf die BT-20 Zellen dargestellt. Chrysin zeigte starke, aber dennoch signifikante hemmende Effekte auf die Stoffwechselaktivität der BT-20 Zellen von rund 74% bei 50 µg/ml und rund 87% bei 100 µg/ml. Dagegen stimuliert Chrysin in seiner Konzentration von 5 µg/ml die Zellvitalität signifikant auf ca. 117%. Die Konzentrationen 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml und 0,5 µg/ml sowie Östradiol zeigten keinen großen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität von BT-20 Zellen. Jedoch war dies im statistischen Testverfahren signifikant gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2). Im Vergleich dazu reduzierte Tamoxifen die Vitalität der BT-20 Zellen signifikant auf etwa 0% (Abb. 5-33).

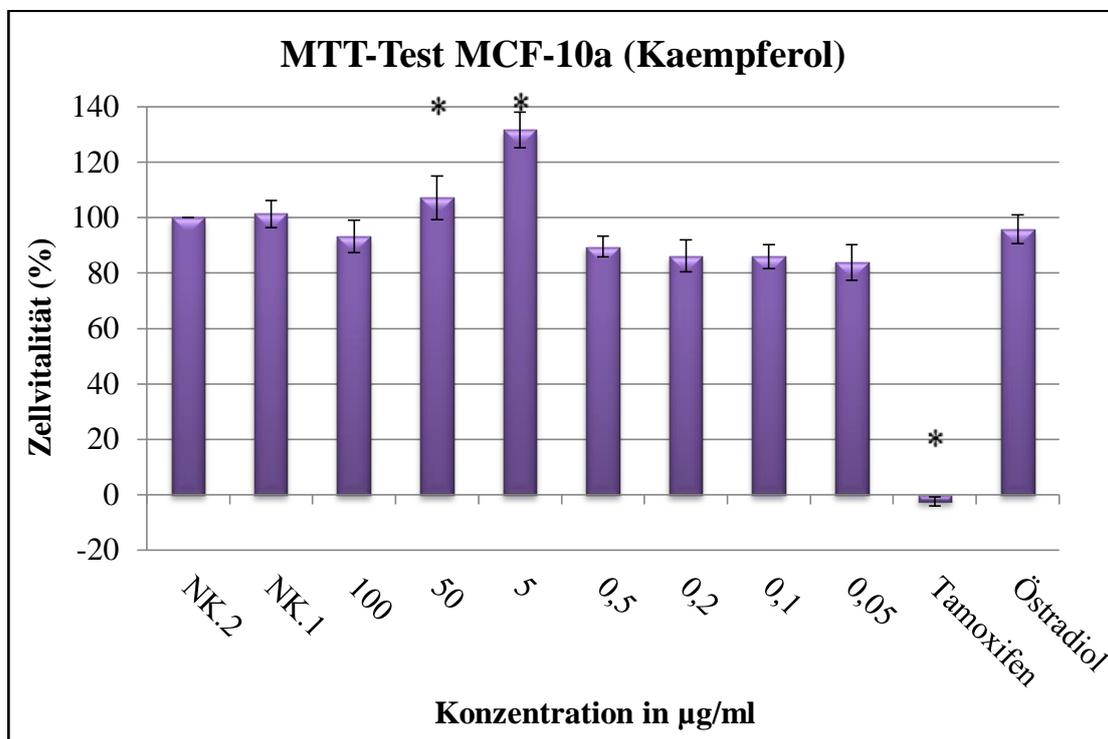


**Abb. 5-33: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von BT-20 Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

### 5.4.3 MCF-10a Zelllinie

#### Kaempferol

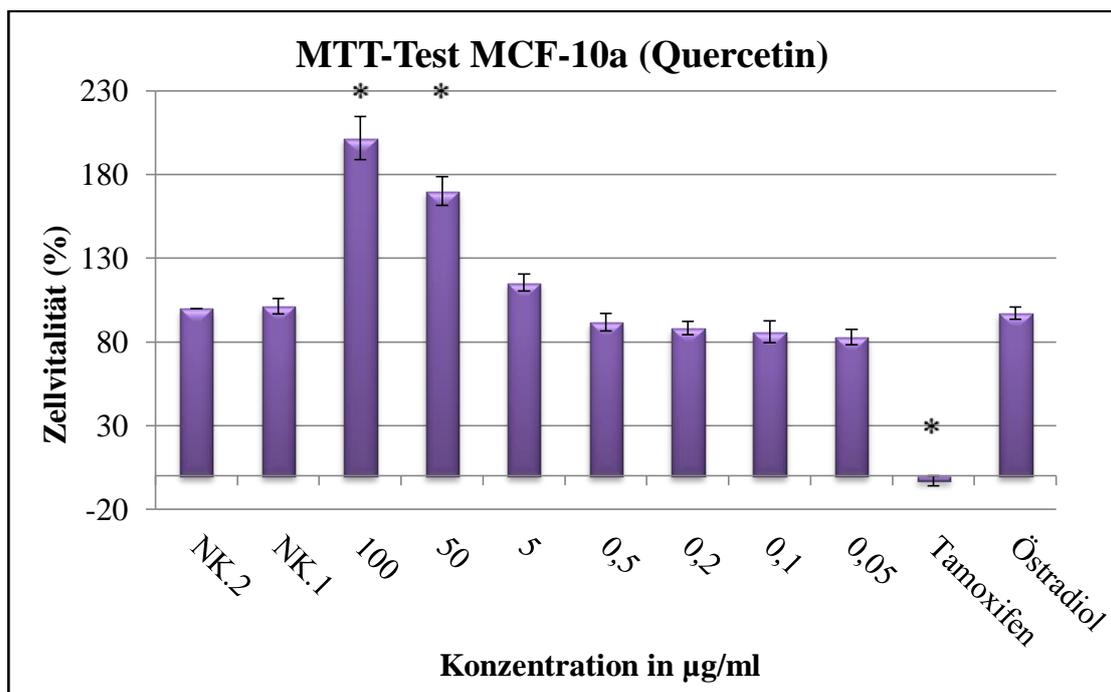
Kaempferol bewirkte in seiner Konzentrationen von 100 µg/ml eine leichte, jedoch keine signifikante Verringerung der metabolischen Aktivität der MCF-10a Zellen von etwa 7%. Außerdem stimulierte Kaempferol die Zellvitalität von MCF-10a Zellen signifikant mit ca. 131% bei 5 µg/ml und ca. 107% bei 50 µg/ml. Bei den Konzentrationen 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml und 0,5 µg/ml liegt keine Signifikanz zur Negativkontrolle 2 vor. Hierbei verminderte sich die Stoffwechselaktivität der MCF-10a Zellen um etwa 11-17%. Eine maximale Hemmung der Vitalität von MCF-10a Zellen wurde bei der Zugabe von Tamoxifen beobachtet. Beim statistischen Verfahren war eine Signifikanz erkennbar. Außerdem zeigte Östradiol keine größeren Auswirkungen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-10a Zellen (Abb. 5-34).



**Abb. 5-34: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

## Quercetin

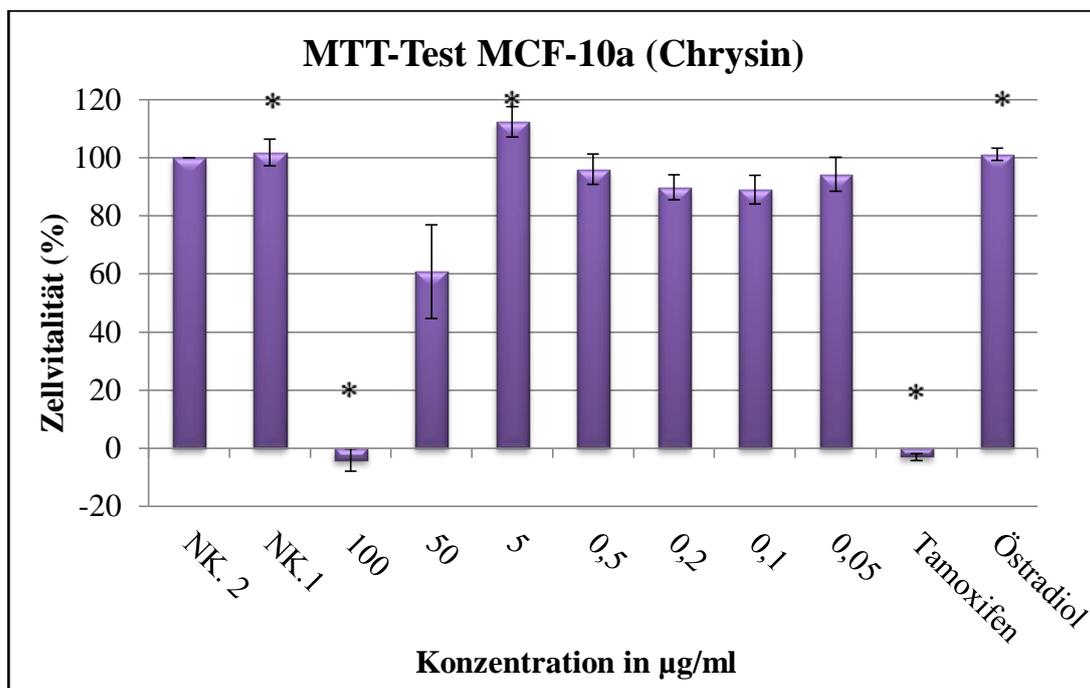
Quercetin verursachte eine starke und signifikante Stimulation der Zellvitalität von MCF-10a Zellen auf rund 170% bei 50 µg/ml und rund 201% bei 100 µg/ml. Des Weiteren bewirkte Quercetin in seiner Konzentration von 5 µg/ml eine Erhöhung der metabolischen Aktivität der MCF-10a Zellen um ca. 15%. Dies stellte im Bezug zur Negativkontrolle 2 (NK.2) keine Signifikanz dar. Darüber hinaus besitzen die folgenden Konzentrationen 0,05 µg/ml, 0,1 µg/ml, 0,2 µg/ml und 0,5 µg/ml einen hemmenden, aber dennoch keinen signifikanten Effekt auf die Stoffwechselaktivität der MCF-10a Zellen von etwa 9 bis 18% (Abb. 5-35).



**Abb. 5-35: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

## Chrysin

Die Abbildung 5-36 veranschaulicht den Einfluss von Chrysin auf die Stoffwechselaktivität von MCF-10a Zellen. Auf MCF-10a Zellen stellte Chrysin eine starke signifikante Hemmung der Zellvitalität auf rund -4% bei 100 µg/ml dar. Darüber hinaus hemmte Chrysin in seiner Konzentration von 50 µg/ml die Zellvitalität auf rund 60%, welche im statistischen Verfahren keine Signifikanz aufwiesen. Bei der Konzentration 5 µg/ml führte Chrysin zu einer signifikanten Erhöhung der Vitalität von MCF-10a Zellen um 12%. Bei den Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,2 und 0,5 µg/ml wurde die Stoffwechselaktivität von MCF-10a Zellen um 4 bis 11% minimiert. Hier lag im statistischen Testverfahren keine Signifikanz zu der Negativkontrolle 2 vor.

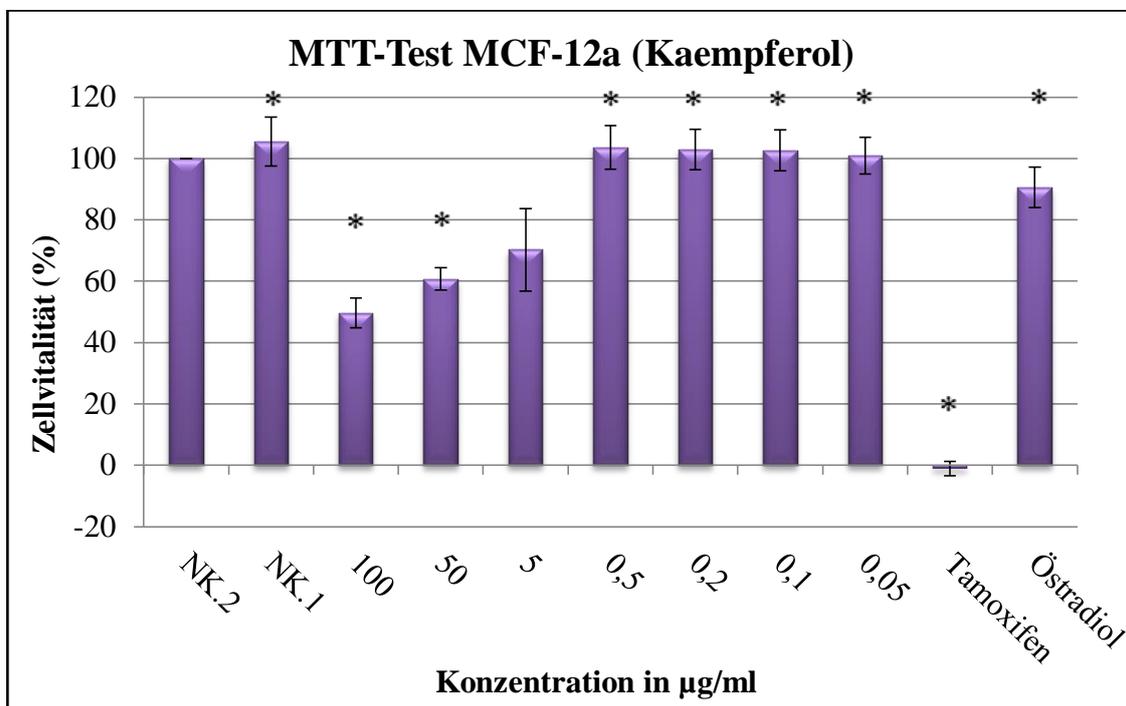


**Abb. 5-36: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-10a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

#### 5.4.4 MCF-12a Zelllinie

##### Kaempferol

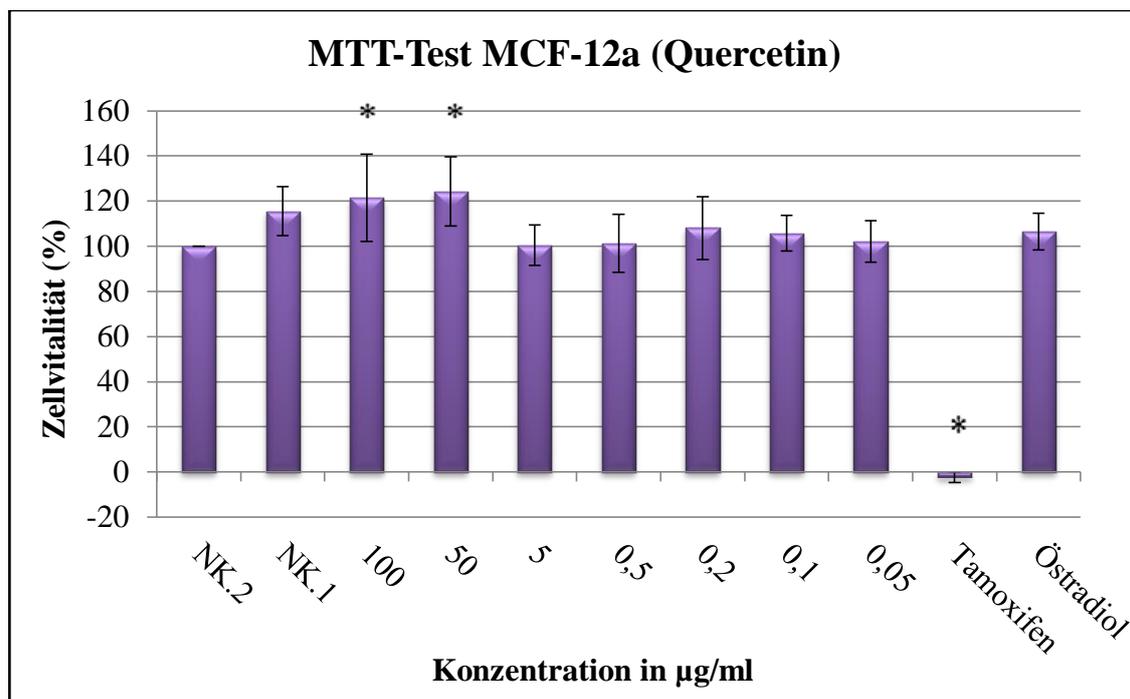
Kaempferol zeigte eine stufenweise stagnierende Hemmung der Zellvitalität von MCF-12a Zellen in den höheren Konzentrationen auf rund 70% bei 5 µg/ml, 60% bei 50 µg/ml und 49% bei 100 µg/ml, wobei die Werte nur bei 50 und 100 µg/ml eine statistische Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2) darstellten. Darüber hinaus besitzt Kaempferol in den Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,2 und 0,5 keinen größeren, jedoch signifikanten Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der MCF-12a Zellen. Im statistischen Verfahren beeinflusst Tamoxifen die metabolische Aktivität von MCF-12a Zellen signifikant. Hier ist die Zellvitalität auf etwa 2% reduziert. Außerdem hemmte Östradiol die Zellen ebenfalls nur leicht, dennoch signifikant auf rund 90 %.



**Abb. 5-37: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Kaempferol und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

## Quercetin

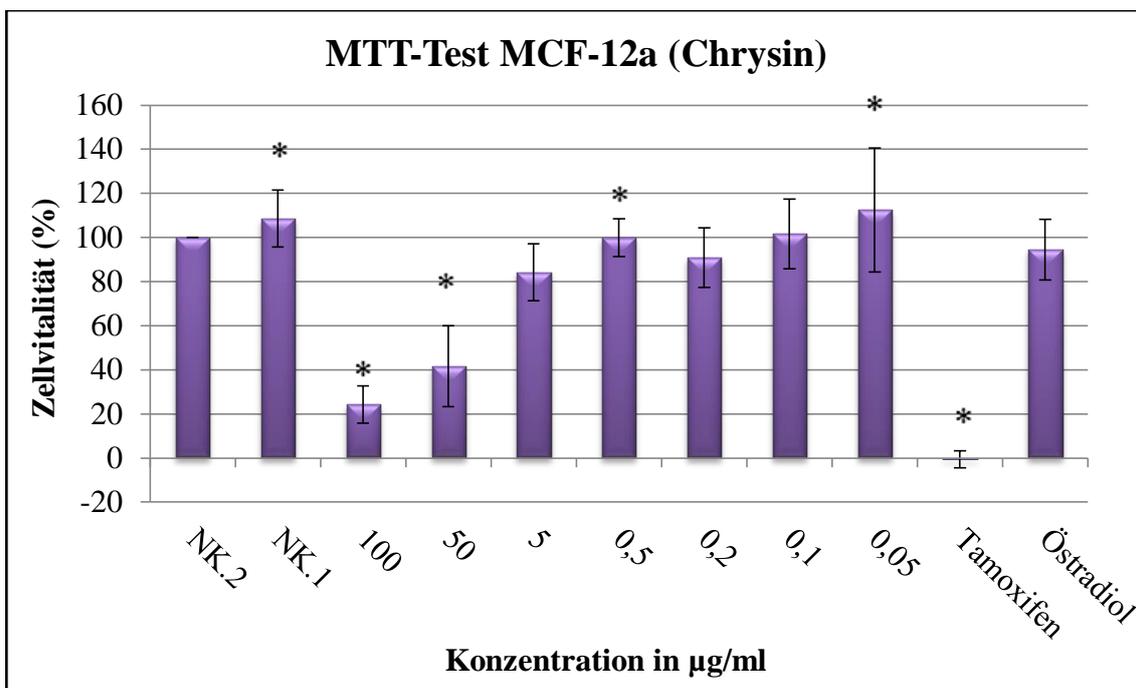
Quercetin bewirkte in seinen Konzentrationen 50 µg/ml und 100 µg/ml eine signifikante Erhöhung der metabolischen Aktivität von MCF-12a Zellen um 21 bis 24%. Die weiteren getesteten Konzentrationen 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 5 verursachten eine geringfügige Stimulation der Zellvitalität von maximal 8%, welche statistisch keine Signifikanz gegenüber der Negativkontrolle 2 (NK.2) zeigten. Darüber hinaus hemmt Tamoxifen stark die Stoffwechselaktivität von MCF-12a Zellen, wobei Tamoxifen einen signifikanten Einfluss besitzt. Des Weiteren wies Östradiol keine größere Wirkung auf die Zellvitalität von MCF-12a Zellen auf (Abb. 5-38).



**Abb. 5-38: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Quercetin und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

## Chrysin

Bezogen auf die Negativkontrolle 2 (NK.2) hemmte Chrysin in seinen höheren Konzentrationen die Zellvitalität von MCF-12a Zellen stark auf rund 84% bei 5 µg/ml, 41% bei 50 µg/ml und 24% bei 100 µg/ml, wobei die Werte nur bei 50 und 100 µg/ml statistisch signifikant waren. Die niedrigeren Konzentrationen von Chrysin 0,05; 0,1; 0,2; und 0,5 µg/ml wirkten unterschiedlich auf die Stoffwechselaktivität von MCF-12a Zellen. Hierbei verursachte Chrysin bei 0,2 µg/ml eine leichte Verringerung der metabolischen Aktivität von MCF-12a Zellen. Dagegen stimulierte Chrysin bei 0,05 µg/ml die Zellvitalität um ca. 12 % (Abb. 5-39).

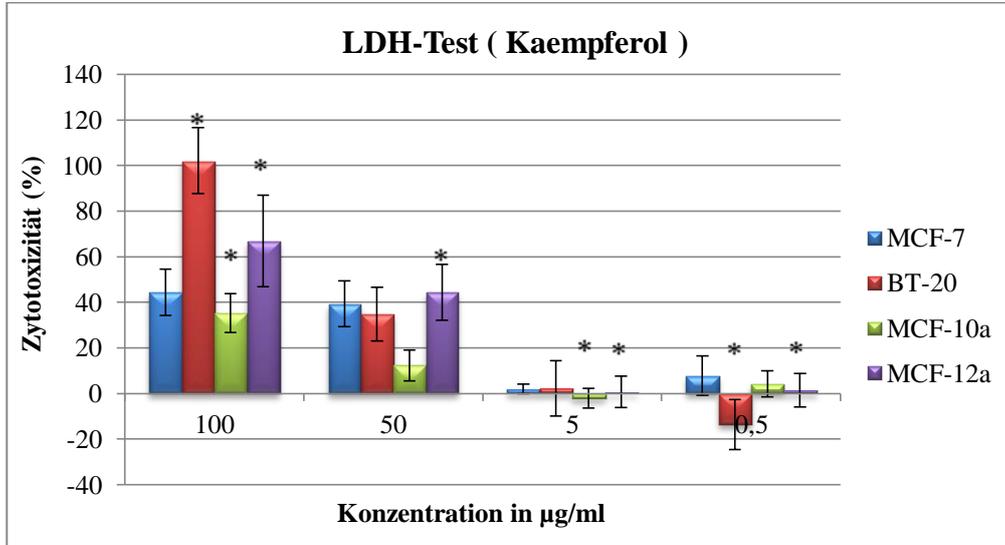


**Abb. 5-39: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Chrysin und Kontrollsubstanzen auf die Stoffwechselaktivität von MCF-12a Zellen, prozentuale Werte sind auf die Negativkontrolle mit Ethanol (NK. 2 = 100 % Zellvitalität) bezogen, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ . NK.1= Negativkontrolle 1 (Zellen und Medium).

## 5.5 Darstellung der wichtigsten Ergebnisse

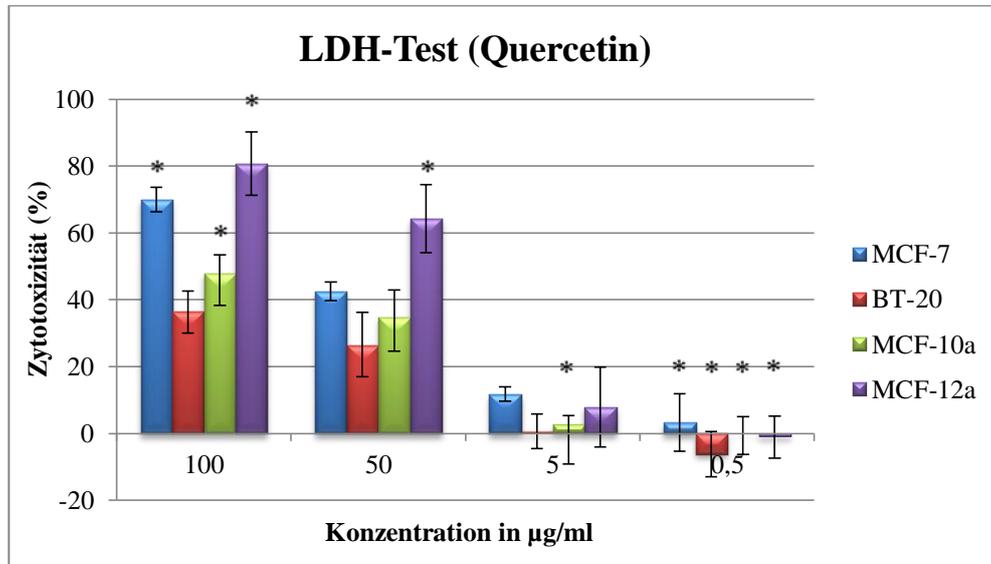
### 5.5.1 LDH-Zytotoxizitätstest

#### Kaempferol



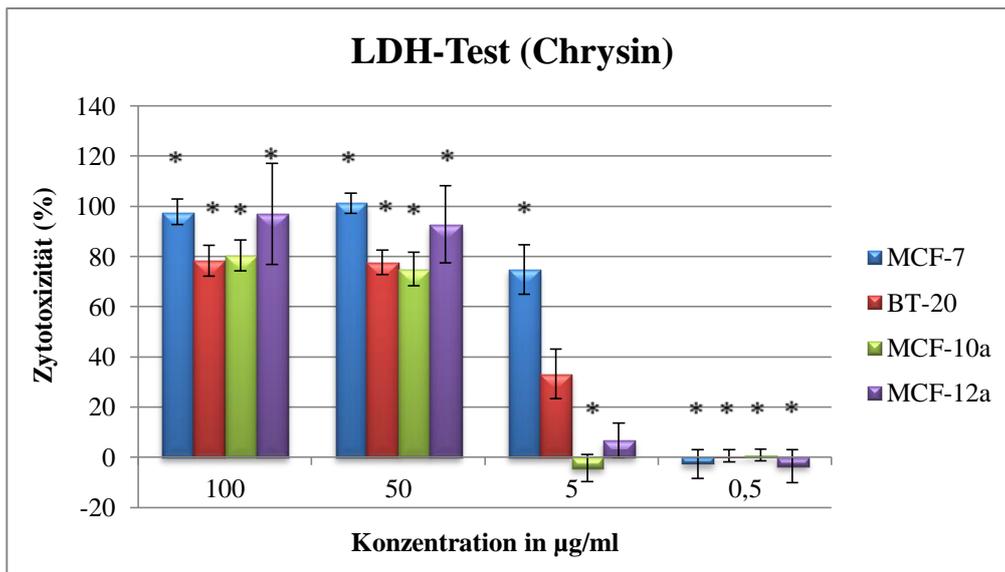
**Abb. 5-40: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol auf die verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

#### Quercetin



**Abb. 5-41: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin auf die verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

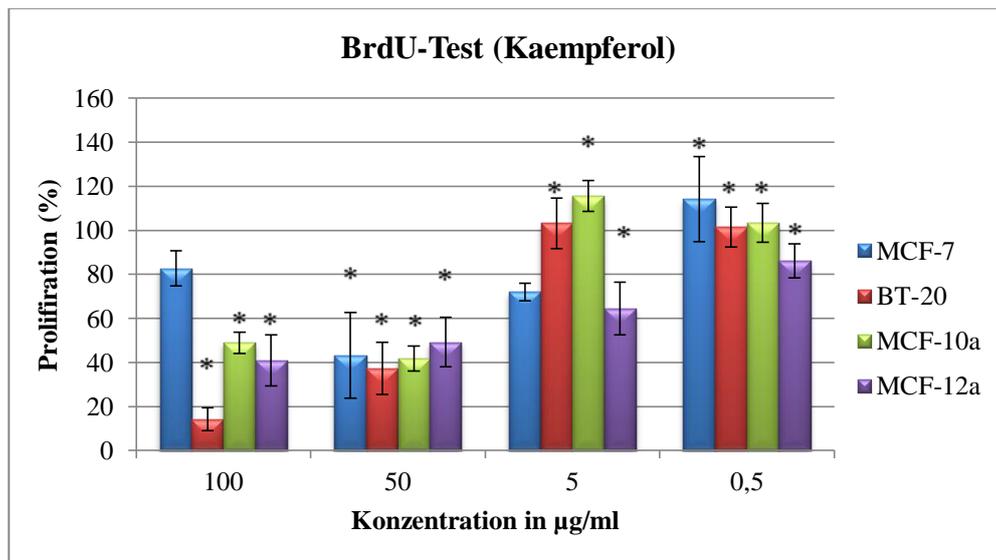
## Chrysin



**Abb. 5-42: LDH-Test:** Zytotoxische Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin auf die verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

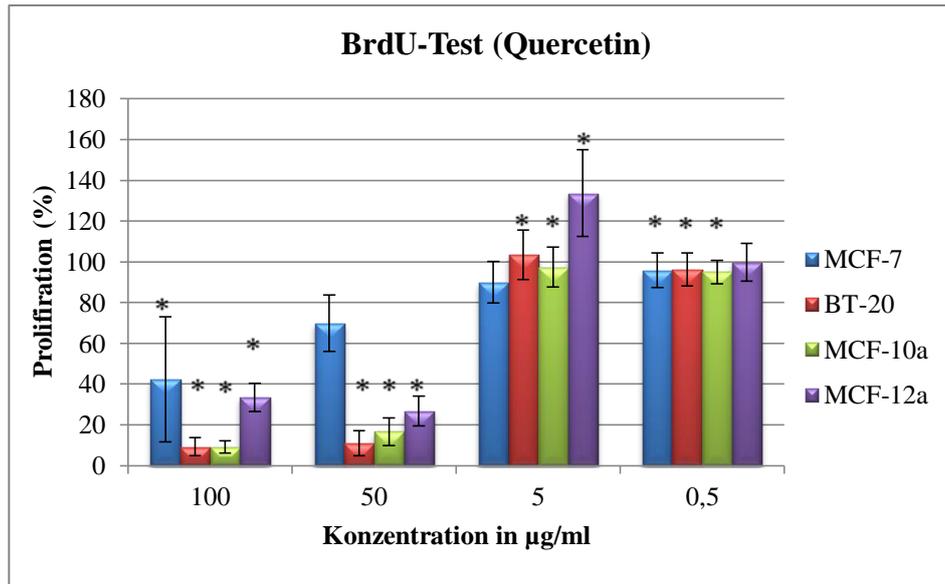
### 5.5.2 BrdU-Zellproliferationstest

## Kaempferol



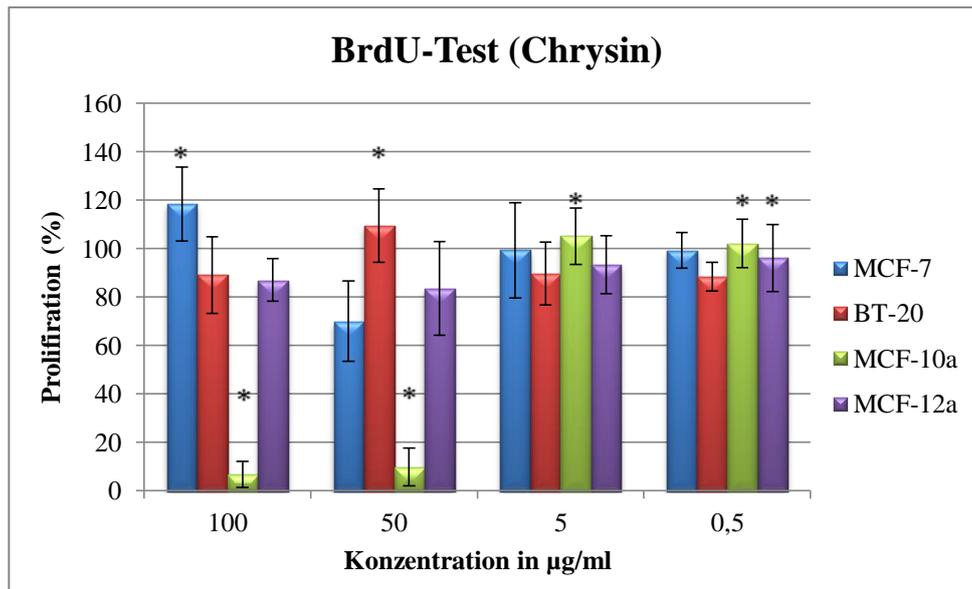
**Abb. 5-43: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Kaempferol auf die verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## Quercetin



**Abb. 5-44: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Quercetin auf die verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

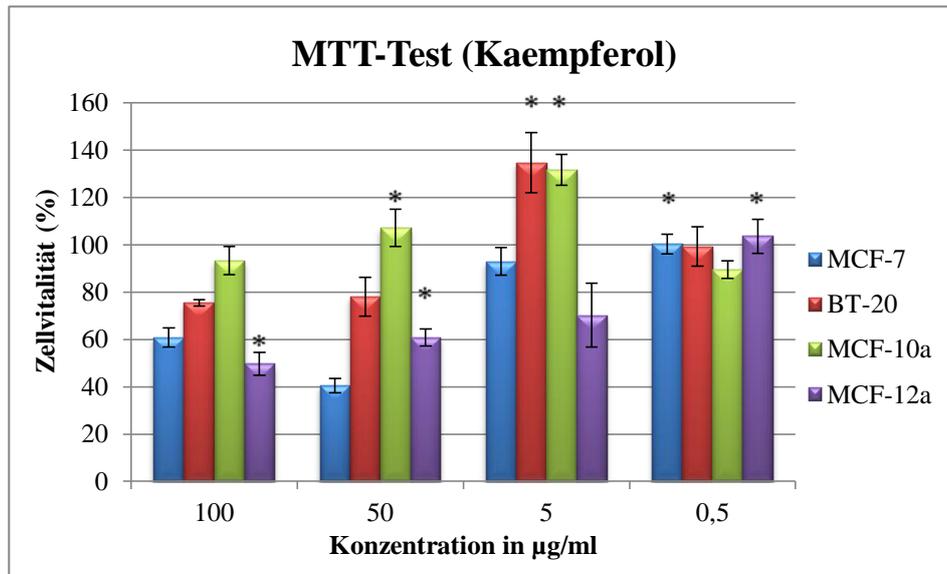
## Chrysin



**Abb. 5-45: BrdU-Test:** proliferative Effekte verschiedener Konzentrationen von Chrysin auf die verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

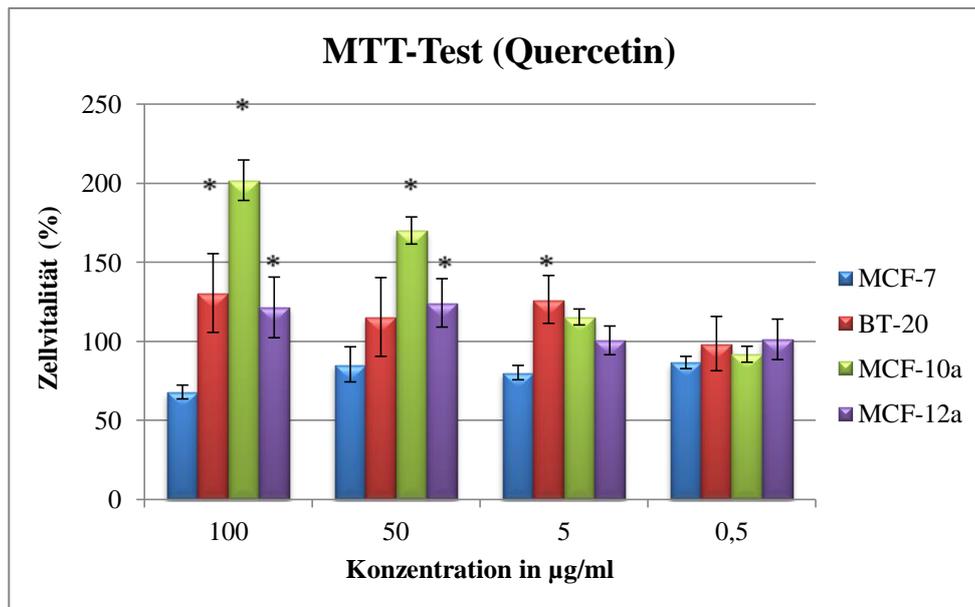
### 5.5.3 MTT-Test

#### Kaempferol



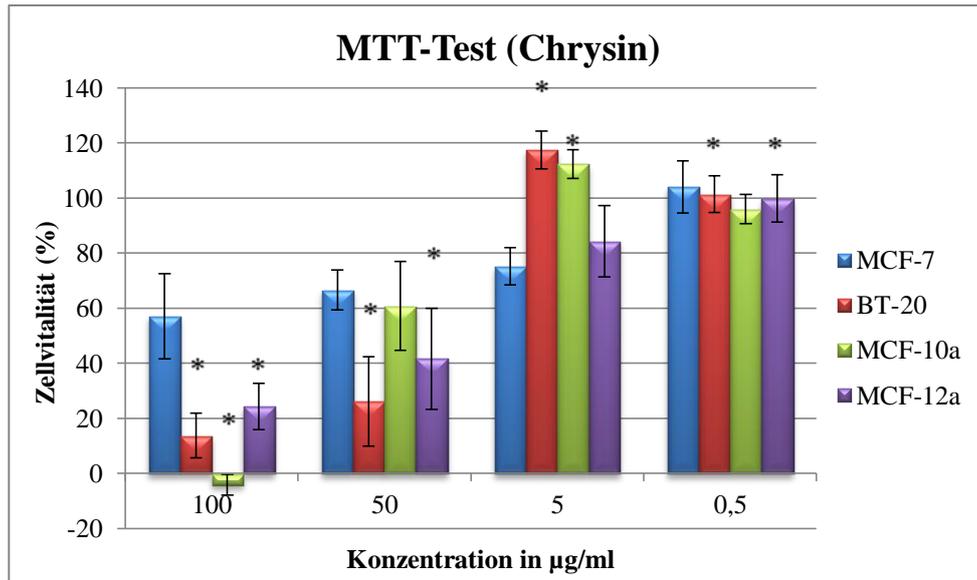
**Abb. 5-46: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Kaempferol auf die Stoffwechselaktivität der verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

#### Quercetin



**Abb. 5-47: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Quercetin auf die Stoffwechselaktivität der verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

Chrysin



**Abb. 5-48: MTT-Test:** Der Effekt verschiedener Konzentrationen von Chrysin auf die Stoffwechselaktivität der verschiedenen Zelllinien, dargestellt ist der Mittelwert mit der Standardabweichung. Mittelwerte +/- SD (n=3); \* Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

## **6. Diskussion**

Diese Arbeit zeigte die Wirkung kommerziell erworbener Flavonoide (Quercetin, Kämpferol und Chrysin) auf maligne Mammakarzinomzellen (MCF7 und BT20) und benigne veränderte Mammazellen (MCF10a und MCF12a). Hierbei wurden die Zytotoxizität (LDH-Test), die Proliferation (BrdU-Test) und die Vitalität (MTT-Test) der malignen und benignen Mammazellen getestet. Es kamen Tamoxifen und 17- $\beta$ -Östradiol als Kontrollsubstanzen zum Einsatz. Darüber hinaus erfolgte die Untersuchung des Rezeptorstatus der Zelltypen mittels immunhistochemischen Verfahren. In diesem Kapitel kommt es zur Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit sowie deren Vergleich mit anderen Literaturen.

### **6.1 Expression der Östrogen- und Progesteronrezeptoren**

Bei der Therapie des Mammakarzinoms stellt der Hormonrezeptorstatus einen wichtigen Aspekt dar. Bei der Expression der Hormonrezeptoren (Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren) können die Geschlechtshormone z. B. Östrogene das Tumorwachstum beeinflussen. Hormonrezeptorpositive Karzinome zeigen eine bessere Prognose und eine geringere Mortalitätsrate sowie besseres Ansprechen auf die Hormontherapie mit Tamoxifen als hormonrezeptornegative Karzinome [19]. Die erste Verbindung zwischen einem Steroidhormon (z.B. Östrogene) und der Entwicklung von Mammakarzinomen kam von Beatsons Beobachtungen im Jahre 1896 zustande. Hier wurde eine Rückbildung von Mammakarzinomen bei erkrankten Patientinnen, bei denen eine bilaterale Ovariectomie durchgeführt wurde, beobachtet. Diese stellte das Grundprinzip für die Hormontherapie des Mammakarzinoms dar. Einige Jahrzehnte später beobachtete man die Rolle von Östrogenen in der Transkriptionsregulation von Tumoren. Unmittelbar nach dieser Feststellung wurde eine umfangreiche Suche nach einem Östrogenrezeptor im Jahre 1971 geleistet. Infolgedessen entdeckte man einen spezifischen Östrogenrezeptor, der in Brusttumoren vorhanden war und sein Expressionsniveau mit endokrinen Störungen korrelieren konnte. Aus diesem Grund konnte eine Verbindung zwischen Brustkrebs und Östrogenen entdeckt werden. Später zeigten überwältigende Beweise die Überexpression von Östrogenrezeptoren in 60-70% aller Fälle von Mammakarzinomen, wodurch dieser Rezeptor einen enormen Stellenwert bei der Therapie von Brustkrebs bekam[80].

Um das Vorhandensein der Hormonrezeptoren nachzuweisen, wurde ein immunhistochemisches Verfahren durchgeführt. Dabei zeigten die Zelllinien eine Rotfärbung bei der Expression von Östrogen- bzw. Progesteronrezeptoren. Die Intensität der Rotfärbung korreliert mit

der Häufigkeit der Hormonrezeptoren in den Zellen:  $ER\alpha > ER\beta > PR$ . Analog zu den Angaben in der Literatur fanden sich immunhistochemische Reaktionen bei der malignen Brustkrebszelllinie (MCF-7) und den benignen Brustepithelzellen (MCF-12a). Daraus resultiert eine deutliche Rotfärbung (Abb.5-1 und Abb. 5-2), welche die Präsenz von Östrogenrezeptoren  $\alpha$  sowie  $\beta$  und dem Progesteronrezeptor aufweist [81]. Im Vergleich dazu konnte man im immunhistochemischen Verfahren bei der malignen Brustkrebszelllinie (BT-20) und den benignen Brustepithelzellen (MCF-10a) keine Rotfärbung feststellen, was nach heutigem Erkenntnisstand der Wissenschaft an der fehlenden Anwesenheit von Östrogen und Progesteronrezeptoren liegt (Abb. 5-3) [82, 83].

## **6.2 Die Wirkung von Kaempferol auf die verschiedenen Zelllinien MCF-7, BT-20, MCF-10A und MCF-12A Zellen**

Das Kaempferol besitzt eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die Zytotoxizität der MCF-7, BT-20, MCF-10A und MCF-12A Zellen. Hierbei zeigte Kaempferol in den niedrigeren Konzentrationen (5 $\mu$ g/ml, 0,5 $\mu$ g/ml, 0,2 $\mu$ g/ml, 0,1 $\mu$ g/ml und 0,05 $\mu$ g/ml) keinen relevanten Einfluss auf die Zytotoxizität der verschiedenen Zelllinien. Außerdem verursachte Kaempferol bei 50  $\mu$ g/ml zytotoxische Effekte auf die MCF7, BT-20 und MCF-12A Zellen, die ca. 34 bis 44 % betragen. Im Vergleich dazu hat Kaempferol bei 50 $\mu$ g/ml eine leichte aber nicht signifikante zytotoxische Wirkung auf die MCF-10A Zellen. Darüber hinaus wirkte Kaempferol in seiner Konzentration von 100 $\mu$ g/ml stark zytotoxisch auf allen Zelllinienzellen.

In den Vorarbeiten vom Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock (Südstadt), unter anderem in der Arbeit von J. Stapel 2010 wurde die zytotoxische Wirkung vom Kaempferol auf MCF-7 und BT-20 Zellen getestet. Hier zeigte Kaempferol in seinen Konzentrationen von 5 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml, 20 $\mu$ g/ml und 50 $\mu$ g/ml keinen zytotoxischen Effekt auf die MCF-7 und BT-20 Zellen [84]. Darüber hinaus konnte in einer Studie von G. Y. Kang nachgewiesen werden, dass Kaempferol in MCF-7 Zellen die Apoptose durch die Einleitung des intrinsischen Caspase-Kaskaden sowie der Herunterregulation der Expression von Polo-like Kinase 1 (PLK -1) induzierte [85]. Hier wurde nach Verabreichung vom Kaempferol mittels Western-Blot-Analyse eine Spaltung von Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP), Caspase-7, Bax und Caspase-9 in den MCF-7 Zellen beobachtet, die eine wichtige Rolle beim intrazellulären Signalweg der Apoptose von MCF-7 Zellen spielen [85].

Mittels MTT-Tests wurde der dosisabhängige Einfluss von Kaempferol auf die Zellvitalität der verschiedenen Zelllinien dargestellt. Kaempferol zeigte in den Konzentrationen 5; 50; und 100 µg/ml eine relevante Wirkung auf die Zellvitalität. Des Weiteren verursachte Kaempferol in seiner Konzentration von 5µg/ml eine Stimulation der Stoffwechselaktivität von BT-20 und MCF-10a Zellen. Diese lag bei 31 bis 34%. Die gleiche Konzentration von Kaempferol bewirkte eine Hemmung der metabolischen Aktivität der MCF-12a Zellen von ca. 30%. Die verwendeten höheren Konzentrationen 50µg/ml und 100µg/ml von Kaempferol zeigten eine starke Hemmung der Stoffwechselaktivität der MCF-7 und MCF-12a Zellen von etwa 40 bis 60%. Hingegen dazu betrug die Inhibition bei BT-20 Zellen ca. 25%.

In den BrdU-Zellproliferationstests wurden die Zellproliferation und das Zellwachstum nach der unmittelbaren Verwendung von den Testsubstanzen bestimmt. Hier zeigte Kaempferol vor allem in den höheren Konzentrationen (50µg/ml und 100µg/ml) eine deutliche anti-proliferative Wirkung auf die Zelllinienzellen MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a. Außerdem verursachte Kaempferol in seiner Konzentration von 5µg/ml eine Hemmung der Zellproliferation, jedoch nur in den ER-positiven Zelllinien MCF-7 und MCF-12a. Hingegen dazu besitzt hier Kaempferol mit gleicher Konzentration einen leichten stimulierenden Effekt auf die ER-negativen Zelllinien BT-20 und MCF-10a. Interessanterweise konnte unter diesen Ergebnissen bei den MCF-7 Zellen einen biphasischen Effekt von Kaempferol auf die Zellproliferation sowie auf die Zellvitalität beobachtet werden.

Eine Studie von Min Seung Oh im Jahr 2006 ermittelte die biphasische Wirkung von Kaempferol auf die Zellproliferation von MCF-7 Zellen. Hier konnte sowohl die östrogene als auch die antiöstrogene Wirkung von Kaempferol in Abhängigkeit von seiner Konzentration gezeigt werden, welche mit den Ergebnissen meiner Arbeit übereinstimmen [86].

Darüber hinaus zeigte eine Arbeit in der Universität Chungbuk im Jahr 2012, dass Kaempferol die Zellproliferation von MCF-7 Zellen in einer dosisabhängigen Weise durch Regulierung von der Cyclin-abhängigen Kinase 1 ( CDK1 ) und Cyclin B , ein Marker für den Übergang von der G2 zur M-Phase, und durch die Regulierung eines Tumor-Suppressorgens, welches eine wichtige Rolle in dem Zellzyklus-Arrest und bei der Einleitung der Apoptose mittels p53 oder PLK-1 spielt, hemmt [87]. Hier wurde eine zweiphasige Wirkung von Kaempferol dargestellt. Darüber hinaus bewirkten die höheren Konzentrationen von Kaempferol eine deutliche Hemmung des Tumorwachstums. Im Vergleich dazu zeigten

*in-vitro*-und *in-vivo*-Studien, dass niedrigere Konzentrationen von Kaempferol für die Verhinderung der Krebsbildung vorteilhaft sein können [87].

Des Weiteren zeigten die Ergebnisse, dass Kaempferol das Zellwachstum der ER-positiven Zellen MCF-7 und MCF-12a stärker hemmt, als bei den ER-negativen Zellen BT-20 und MCF-10a. Außerdem beruht die stärkere Hemmung der Zellproliferation von den ER-positiven Zellen auf den Einfluss des Kaempferols auf die Expression des Östrogenrezeptors alpha. Hierbei stellte eine Studie von H. Hung (2004) dar, dass Kaempferol zu einer zeit- und dosisabhängigen Verringerung der mRNA des Östrogenrezeptors alpha führte und dadurch die Zellproliferation der ER-positiven Zellen reduziert wurde [44].

Eine andere Studie aus dem Jahre 2009 zeigte, dass der Aryl- Kohlenwasserstoff -Rezeptor (AhR) -Signalweg die Produktion von CYP1B1 und CYP1A1 reguliert, die an der Entstehung und der Bioaktivierung von verschiedenen Tumoren (Karzirogenese) beteiligt ist. Die genannte Studie stellte die Wirkung von Ginkgo biloba-Extrakt und einige seiner chemischen Bestandteile unter anderem Kaempferol auf CYP1B1 und CYP1A1 Gen-Expression und AhR -Aktivität in den kultivierten MCF -10A Brustepithelzellen dar. Hierbei wurde gezeigt, dass Kaempferol eine konstitutive Unterdrückung der CYP1B1 Gen-Expression verursachte und die AhR-Aktivierung bekämpfte. Auf diesem Signalweg könnte Kaempferol das Zellwachstum von MCF-10A Zellen regulieren und beeinflussen [88].

Anhand der in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse ist der Einfluss von Kaempferol auf die verschiedenen Zelllinien deutlich abhängig von der Expression des Östrogenrezeptors, was ebenfalls mit den Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmt. Hierbei hemmt Kaempferol die Zellproliferation der ER-positiven Zellen (MCF-7 und MCF-12A Zellen) stärker als bei den ER-negativen Zellen (BT-20 und MCF-10A Zellen) [44]. Eine antiproliferative Wirkung von Kaempferol auf allen Zelllinienzellen wurde bei den Konzentrationen 50µg/ml und 100µg/ml beobachtet. Im Vergleich dazu verursachte Kaempferol bei seiner Konzentration von 5µg/ml eine Hemmung der Zellproliferation jedoch nur bei den ER-positiven Zellen (MCF-7 und MCF-12A Zellen). Mit dieser Schlussfolgerung stellte Kaempferol in seinen Konzentrationen von 0,5µg/ml bis 50µg/ml bei der Hemmung der Zellproliferation der getesteten Zelllinien eine wesentliche Bedeutung für die Forscher sowie für weitere Forschungsarbeiten.

### **6.3 Die Wirkung von Quercetin auf die verschiedenen Zelllinien MCF-7, BT-20, MCF-10A und MCF-12A Zellen**

In den LDH-Tests wurde dargestellt, dass Quercetin in seiner Konzentration von 0,05µg/ml, 0,1µg/ml, 0,2µg/ml, 0,5µg/ml und 5µg/ml eine sehr geringe Wirkung auf die Zytotoxizität von allen verwendeten Zelllinien besitzt. Bei den höheren Konzentrationen 50 und 100µg/ml führte Quercetin zu einem deutlichen Absterben der Zellen. Jedoch ist die Zytotoxizität bei 100µg/ml deutlich stärker. Darüber hinaus zeigten die Ergebnisse, dass die zytotoxische Wirkung von Quercetin bei den ER-positiven Zellen MCF-7 und MCF-12a stärker ist als bei den ER-negativen Zellen BT-20 und MCF-10a. Bei 50µg/ml beträgt der zytotoxische Effekt auf die ER-positiven Zellen ca. 42 bis 64%, auf die ER-negativen Zellen ca. 26 bis 34%. Im Vergleich dazu wirkte Quercetin bei 100µg/ml zytotoxisch auf die ER-positiven Zellen mit einer Zellletalität von etwa 70 bis 80% und auf die ER-negativen Zellen mit einer Zellletalität von etwa 36 bis 47%.

Mithilfe von den MTT-Tests wurde der dosisabhängige Effekt von Quercetin auf die Zellvitalität der verschiedenen Zelllinien dargestellt. Bei den BT-20 Zellen verursachte Quercetin in seiner Konzentration von 5µg/ml eine statistisch signifikante Erhöhung der metabolischen Aktivität um etwa 26%. Darüber hinaus bewirkte Quercetin in den Konzentrationen 50µg/ml und 100µg/ml eine Stimulation der Zellvitalität, jedoch nur bei den BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen. Hingegen dazu zeigte Quercetin in diesen Konzentrationen eine Verringerung der Zellvitalität von MCF-7 Zellen um ca. 15% bei 50µg/ml und um ca. 33% bei 100µg/ml.

Die in dieser Arbeit durchgeführten BrdU-Proliferationstests zeigten, dass Quercetin in den niedrigeren Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,2 und 0,5) eine geringe Proliferationswirkung auf die MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen hatte. Interessanterweise bewirkte Quercetin in seiner Konzentration von 5µg/ml im Gegensatz zu Kaempferol und Chrysin eine signifikante Erhöhung der Zellproliferation jedoch nur bei den MCF-12a Zellen auf rund 133%. Darüber hinaus führte Quercetin in den höheren Konzentrationen 50 und 100µg/ml zu einer signifikanten und sehr starken wachstumshemmenden Wirkung auf die BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen. Auf die Zellproliferation von MCF-7 wirkte Quercetin hemmend mit ca. 30% bei 50µg/ml und ca. 58% bei 100µg/ml. Jedoch führte hier das statistische Verfahren bei der Konzentration 50µg/ml zu keiner Signifikanz.

In einer Arbeit von Jana Stapel im Jahr 2010 im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik Rostock (Südstadt) wurde die Wirkung von Quercetin auf die Zelllinien MCF-7 und BT-20 untersucht. Hierbei besitzt Quercetin in den Konzentrationen (5; 10; 20 und 50 µg/ml) keinen Einfluss auf die Zytotoxizität und Vitalität der MCF-7 Zellen und BT-20 Zellen. Jedoch zeigte Quercetin bei den MCF-7 Zellen eine Hemmung des Zellwachstums um 10-21% (bei den Konzentrationen 20 µg/ml und 50 µg/ml). Des Weiteren verursachte Quercetin in den untersuchten Konzentrationen (5; 10; 20 und 50 µg/ml) eine Verringerung der Zellproliferation von BT-20 Zellen um ca. 10 bis 19% [84].

Eine Studie vom Jian Duo im Jahre 2012 untersuchte die Wirkung der Flavonoid-Verbindung Quercetin auf das Wachstum und die Apoptose von menschlichen Brustkrebszellen. Hierbei zeigte Quercetin eine signifikante Inhibition der Proliferation von MCF-7-Zellen, die sowohl dosis- als auch zeitabhängige Weise darstellte. Darüber hinaus hemmt Quercetin das Zellwachstum und veranlasst die Apoptose in den MCF-7 menschlichen Brustkrebszellen. Die Mechanismen hinter diesen Effekten können von der Herabregulation von Bcl-2-Protein-Expression und Hochregulation des Ausdrucks von Bax, welche als Co-Faktor des Tumorsuppressor-Proteins p53 ausübt, stammen [89].

Eine Studie aus dem Jahre 2010 zeigte einen Zusammenhang zwischen der Nahrung Polyphenole und einem reduzierten Risiko der Entwicklung von Krebs [90]. Quercetin (ein natürliches Polyphenol- Verbindung) induzierte die Apoptose in vielen menschlichen Krebszelllinien, einschließlich Brustkrebs MCF -7-Zellen. In dieser Studie verursachte Quercetin eine Abnahme der lebensfähigen Zellen bis zu ca. 90,25% [90]. Des Weiteren wurde auch dargestellt, dass Quercetin eine bemerkenswerte Zunahme in der Anzahl der S-Phase und sub-G1-Phase-Zellen in einer dosis-und zeitabhängigen Weise bewirkte. Dies basiert auf der Verringerung der Proteinexpression von CDK2, Cycline A und B, sowie auf die Erhöhung der p53 und p57-Proteine. Außerdem bewirkte Quercetin den apoptotischen Zelltod der MCF-7 Zellen durch einen verringerten Spiegel der Bcl-2 Proteine und eine erhöhte Aktivierung der Caspase 6, 8 und 9 [90].

Eine andere Studie im Jahre 2011 untersuchte den Effekt von Quercetin auf die Östrogen-Rezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ )-negativen Brustzellen z.B. die normalen MCF-10A und die malignen MDA-MB-231. Die Ergebnisse zeigten, dass Quercetin das Wachstum von MCF-10A und MDA-MB-231-Zellen unterdrückte. Auf der Ebene der intrazellulären Signalmoleküle wurde in dieser Studie herausgefunden, dass Quercetin das Niveau der aktiven p53 (Phospho-

p53) in beiden Zelltypen erhöhte. Des Weiteren bewirkte Quercetin auch eine Zunahme der p21 und eines p53-Zielgens und eine Abnahme in Bcl-xL oder in Cyclin B1 in beiden Zelltypen. Diese Daten stellten dar, dass Quercetin die Apoptose von ER $\alpha$ -negativen Brustkrebszellen durch p53-abhängigen Weg induzierte und darauf hinwies, dass Quercetin in der Behandlung und Prävention des ER $\alpha$ -negative Brustkrebses eine wichtige Rolle spielt [91].

Anhand der in dieser Arbeit dargestellten Resultaten präsentierte Quercetin eine konzentrationsabhängige Wirkung auf die verschiedenen getesteten Zelllinien. Quercetin verursachte in den geringeren Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 5  $\mu\text{g/ml}$ ) keine wachstumshemmende Wirkung auf die MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen. Außerdem führte Quercetin in den höheren Konzentrationen 50 und 100  $\mu\text{g/ml}$  zu einer starken Hemmung der Zellproliferation der verschiedenen Zellen. Quercetin zeigte in seinen Konzentrationen 5 und 50  $\mu\text{g/ml}$  ein interessantes Forschungsgebiet bei seinem Einfluss auf die Zellproliferation von den MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen. Weitere Konzentrationen von Quercetin zwischen 5 und 50  $\mu\text{g/ml}$  wurden in dieser Arbeit aufgrund von zu großem Aufwand nicht getestet.

#### **6.4 Die Wirkung von Chrysin auf die verschiedenen Zelllinien MCF-7, BT-20, MCF-10A und MCF-12A Zellen**

Die Ergebnisse der LDH-Zytotoxizitätstests stellten dar, dass die zytotoxische Wirkung von Chrysin auf die verwendeten Zelllinien ebenso von seiner Konzentration abhängig ist. Im Gegensatz zu Kaempferol und Quercetin zeigte Chrysin in seiner Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  bei den malignen Mammakarzinomzellen MCF-7 und BT-20 eine deutlich höhere Zellzerstörung. Hierbei beträgt die gemessene Zellletalität ca. 74% bei MCF-7 Zellen und ca. 33% bei BT-20 Zellen. Außerdem verursachte Chrysin in den weiteren getesteten Konzentrationen 50  $\mu\text{g/ml}$  und 100  $\mu\text{g/ml}$  hohe signifikante Zytotoxizitäten bei den MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen.

Die MTT-Tests-Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten, dass Chrysin in seiner Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  bei den ER-negativen Zelllinien BT-20 und MCF-10a zu einer leichten signifikanten Stimulation der Stoffwechselaktivität um ca. 12 bis 17% führte. Dagegen verursachte Chrysin in seiner Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  bei den ER-positiven Zelllinien MCF-7 und MCF-12a eine hemmende Wirkung auf die Zellvitalität von etwa 16 bis 25%. Darüber hin-

aus bewirkte Chrysin bei den höheren Konzentrationen 50µg/ml und 100µg/ml eine starke Reduktion der metabolischen Aktivität von allen Zelllinien MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen.

Außerdem zeigte Chrysin in den durchgeführten BrdU-Tests einen unterschiedlichen und dosisunabhängigen Effekt auf die Zellproliferation von den verschiedenen Zelllinien. Zudem besitzen die getesteten geringen Konzentrationen von Chrysin (0,05; 0,1; 0,2; 0,5; und 5 µg/ml) einen geringfügigen Einfluss auf die Zellproliferation von den Zelllinienzellen. Außerdem verursachte Chrysin bei 50µg/ml eine starke signifikante Hemmung der Proliferation von MCF-10a Zellen auf 9,8%. Bei MCF-7 und MCF-12a beträgt hier die antiproliferative Wirkung etwa 17 bis 30%. Im Vergleich dazu bewirkte Chrysin bei 50µg/ml eine signifikante Erhöhung des Zellwachstums von BT-20 um etwa 9,5%. Interessanterweise zeigte Chrysin in seiner Konzentration von 100µg/ml eine signifikante Stimulation der Proliferation der MCF-7 Zellen von etwa 18%. Hingegen besitzt Chrysin in dieser Konzentration eine starke signifikante antiproliferative Hemmung der MCF-10a von etwa 93%. Zusätzlich verursachte Chrysin in seiner Konzentration von 100µg/ml bei BT-20 und MCF-12a Zellen einen geringfügigen wachstumshemmenden Effekt von ca. 10 bis 13%.

Eine Arbeit von Fen Yang im Jahre 2013 zeigte, dass Chrysin einen signifikanten dosisabhängigen Hemmungseffekt auf die Proliferation von MCF-7, HepG2 und Colo205 menschlichen Krebszelllinien bewirkte. Im Vergleich dazu besitzt Chrysin eine geringfügige zytotoxische Wirkung auf die MCF-10A normalen menschlichen Brustzellen. Diese Ergebnisse haben darauf hingewiesen, dass Chrysin eine erhöhte Anti-Krebs-Wirkung und hohe Selektivität zwischen Krebszellen und normalen Zellen besaß [93].

In einer Vorarbeit des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock wurde die Wirkung von Chrysin in den Konzentrationen (5; 10; 20 und 50µg/ml) auf die MCF-7 und BT-20 Zellen getestet. Hierbei zeigte Chrysin keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Zellproliferation der MCF-7 Zellen und BT-20 Zellen. Dies stimmt mit den dargestellten Ergebnissen von den in dieser Arbeit durchgeführten BrdU-Tests überein. Bei den MCF-7 Zellen erfolgte eine Reduktion der Zellproliferation um 28 bis 30% (10 µg/ml, 20 µg/ml, 50 µg/ml). Darüber hinaus wurde das Zellwachstum der BT-20 Zellen um 10 % gehemmt (10 µg/ml und 50 µg/ml). Die Ergebnisse dieser Arbeit stellten dar, dass das Chrysin das Zellwachstum der ER-positiven Zellen stärker hemmt, als bei ER-negativen Zellen [84].

In einer Studie aus dem Jahre 2007 wurden Zwei mögliche Mechanismen demonstriert, die das Tumorwachstum modulieren können, einerseits über eine Wechselwirkung mit dem Östrogen-Rezeptor (ER) und andererseits über die Hemmung der Aromatase (CYP19). Diese Studie zeigte, dass Chrysin bei den MCF-7 Zellen eine Hemmung der Aromatase bewirkte und somit eine Reduktion des Zellwachstums dieser Zellen [93].

In einer anderen Studie wurde berichtet, dass Chrysin und seine Analoga das Zellzyklusarrest und die Apoptose in humanen Östrogenrezeptor-positiven und -negativen Brustkrebszellen induzierte. Hierbei wurde gezeigt, dass Chrysin und seine Analoga das Zellwachstum von humanen epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptor-2 (HER-2)/neu-überexprimierenden Brustkrebsarten hemmte. Western-Blot-Analyse stellte dar, dass die HER-2/neu Expression und die Tyrosin-Phosphorylierung durch Chrysin und seine Analoga in einer konzentrationsabhängigen Weise inhibiert wurden [94].

Anhand der in dieser Arbeit dargestellten Abbildungen zeigte Chrysin keinen konzentrationsabhängigen Effekt auf die Zellproliferation der verschiedenen getesteten Zelllinien, was ebenfalls mit den Ergebnissen aus der Literatur übereinstimmt [84]. Chrysin verursachte in den Konzentrationen (0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 5  $\mu\text{g/ml}$ ) keine wachstumshemmende Wirkung auf die Zelllinien. Darüber hinaus besitzt Chrysin in seiner Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$  eine starke antiproliferative Hemmung der MCF-10a Zellen von etwa 92%. Bei MCF-7 und MCF-12a betrug die antiproliferative Wirkung ca. 17 bis 30%. Im Vergleich dazu zeigte Chrysin bei 50 $\mu\text{g/ml}$  eine Förderung des Zellwachstums der BT-20 Zellen um etwa 9,5%. Außerdem bewirkte Chrysin in der Konzentration 100 $\mu\text{g/ml}$  eine Inhibition der Zellproliferation, jedoch nur bei den BT-20, MCF-12a und MCF-10a Zellen. Hingegen dazu zeigte Chrysin in seiner Konzentration von 100 $\mu\text{g/ml}$  eine signifikante Stimulation der Proliferation der MCF-7 Zellen von etwa 18%. Mithilfe dieser Ergebnisse stellte Chrysin in den Konzentrationen zwischen 5 $\mu\text{g/ml}$  und 50 $\mu\text{g/ml}$  ein wichtiges sowie interessantes Forschungsgebiet bei seiner Wirkung auf die Zellproliferation von den MCF7, BT-20, MCF-12a und MCF-10a Zellen dar.

## 7. Zusammenfassung

Mammakarzinom ist die häufigste weibliche Krebserkrankung sowohl in Entwicklungs- als auch in Industrieländern. Zur Behandlung von Frauen mit Mammakarzinom stehen verschiedene Therapiemöglichkeiten zur Verfügung. Dafür wird weltweit in vielen Arbeitsgruppen *in vitro* und *in vivo* geforscht. Bei der Therapie von hormonabhängigen Mammakarzinomen sind die Forscher in den letzten Jahren an pflanzlichen Stoffen sehr interessiert, um zusätzlich zur Hormonersatztherapie andere antikanzerogene Substanzen zu finden. In dieser Arbeit wurde die Wirkung der drei Flavonoide (Quercetin, Kaempferol und Chrysin) auf die Vitalität, Zellproliferation und Zytotoxizität der malignen Mammakarzinomzellen (MCF7 und BT20) und der benignen veränderten Mammazellen (MCF10a und MCF12a) untersucht. Außerdem wurde diese Wirkung mithilfe von drei verschiedenen *in vitro*-Testverfahren (MTT-Test, BrdU-Test und LDH-Test) erfasst. Darüber hinaus konnte mithilfe der Immunhistochemie die Expression der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Östrogenrezeptoren und der Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden. Dadurch wurde gezeigt, dass die MCF-7 und MCF-12a Zellen die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  sowie  $\beta$  als auch den Progesteronrezeptor exprimieren. Im Gegensatz dazu wurde bei den BT-20 und MCF-10a Zellen keine Expression für die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  sowie  $\beta$  und den Progesteronrezeptor festgestellt.

Des Weiteren stellen die Ergebnisse in dieser Arbeit dar, dass die verwendeten Flavonoide (Kaempferol, Quercetin und Chrysin) eine ganz unterschiedliche Wirkung auf die Zytotoxizität, metabolische Aktivität und Zellproliferation aller vier Zelllinien haben.

In den LDH-Tests wurde eine zytotoxische Wirkung der Flavonoide dargestellt. Dieser zytotoxische Effekt zeigte sich vorwiegend in den höheren Konzentrationen (50 $\mu$ g/ml und 100 $\mu$ g/ml). Bei der Konzentration 5 $\mu$ g/ml verursachte Chrysin im Gegensatz zu Kaempferol und Quercetin eine deutliche Zellzerstörung der MCF-7 und BT-20 Zellen. Die geringeren Konzentrationen besitzen keinen zytotoxischen Einfluss auf die Zelllinien.

Die MTT-Tests-Ergebnisse in dieser Arbeit zeigten, dass Kaempferol und Chrysin in den höheren Konzentrationen 50 $\mu$ g/ml und 100 $\mu$ g/ml eine hemmende Wirkung auf die Zellvitalität besitzen. Im Vergleich dazu bewirkte Quercetin in diesen Konzentrationen eine Erhöhung der metabolischen Zellaktivität. Die anderen Konzentrationen der Flavonoide haben einen geringfügigen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der Zellen.

In den BrdU-Tests zeigte sich eine antiproliferative Wirkung der Flavonoide auf die verwendeten Zelllinien. Diese Hemmung stellte sich vorwiegend in den höheren Konzentrationen der Flavonoide (50µg/ml und 100µg/ml) dar. Bei den Ergebnissen stellte sich heraus, dass Chrysin in seiner Konzentration von 50µg/ml eine Förderung des Zellwachstums der BT-20 Zellen um etwa 9,5% verursachte. Des Weiteren zeigte Chrysin in seiner Konzentration von 100µg/ml eine Erhöhung der Proliferation der MCF-7 Zellen von etwa 18%. Interessanterweise bewirkte Kaempferol bei seiner Konzentration von 5µg/ml eine Inhibition der Zellproliferation jedoch nur bei den ER-positiven Zellen (MCF-7 und MCF-12A Zellen).

Für die Forscher zeigten die untersuchten Flavonoide in den Konzentrationen zwischen 0,5 und 50 µg/ml ein interessantes Forschungsgebiet bei dem Einfluss von den Flavonoiden auf den MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen.

Derzeit können keine konkreten Dosisempfehlungen zu den in dieser Arbeit verwendeten Flavonoiden bei der Therapie von Mammakarzinom gegeben werden. Die vorliegenden Ergebnisse sowie Vorarbeiten des Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik Rostock zu den sekundären pflanzlichen Stoffen bezüglich der Flavonoide haben vielversprechende Wirkungen bei der Hemmung der Tumorzellen dargestellt.

## 8. Literaturverzeichnis

- (1) Benson JR, Jatoi I. **The global breast cancer burden.** Future Oncol. 2012 Jun;8(6):697-702.
- (2) Kaatsch P, Spix C, Hentschel S, Katalinic A, Luttmann S, Stegmaier C, Caspritz S, Cernaj J, Ernst A, Folkerts J, Hansmann J, Kranzhöfer K, Kriehoff-Hennig E, Kunz B, Penzkofer A, Treml K, Wittenberg K, Baras N, Barnes B, Bertz J, Buttman-schweiger N, Dahm S, Franke M, Haberland J, Kraywinkel K, Wienecke A, Wolf U: **Krebs in Deutschland 2009/2010** In: Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland eV. Edited by Koch-Institut R, vol. , 9. Ausgabe, edn. Berlin; 2013.
- (3) WHO/IARC, **Latest world cancer statistics**, Lyon/Geneva, 12 December 2013.
- (4) Duffy SW, Tabár L, Chen HH, Holmqvist M, Yen MF, Abdsalah S, Epstein B, Frodis E, Ljungberg E, Hedborg-Melander C, Sundbom A, Tholin M, Wiege M, Akerlund A, Wu HM, Tung TS, Chiu YH, Chiu CP, Huang CC, Smith RA, Rosén M, Stenbeck M, Holmberg L. **The impact of organized mammography service screening on breast carcinoma mortality in seven Swedish counties.** Cancer. 2002 Aug 1;95(3):458-69
- (5) **Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms.** Leitlinienprogramm Onkologie, S3-Leitlinie Brustkrebs, Juli 2012. AWMF-Register-Nummer: 032 – 045OL .
- (6) Boyd NF, Guo H, Martin LJ, Sun L, Stone J, Fishell E, Jong RA, Hislop G, Chiarelli A, Minkin S, Yaffe MJ. **Mammographic density and the risk and detection of breast cancer.** N Engl J Med. 2007 Jan 18;356(3):227-36.
- (7) Fritschi L, Divitini M, Talbot-Smith A, Knuihan M. **Left-handedness and risk of breast cancer.** Br J Cancer. 2007 Sep 3;97(5):686-7. Epub 2007 Aug 7.
- (8) Hallberg O, Johansson O. **Sleep on the right side-Get cancer on the left?, Pathophysiology.** 2010 Jun;17(3):157-60. doi: 10.1016/j.pathophys.2009.07.001. Epub 2009 Aug 3.
- (9) Kreienberg R, Albert U, Naß-Griegoleit I, Schulte H, Wöckel A. Brustkrebs. **Die Ersterkrankung und DCIS – Eine leitlinie für Patienten.** „Leitlinienprogramm Onkologie“, der Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften e. V., der Deutschen Krebsgesellschaft e. V. und der Deutschen Krebshilfe e. V. Berlin, 15. Dezember 2009.
- (10) [www.brustkrebs.com.de/](http://www.brustkrebs.com.de/)

- (11) Jacob J, Kirova YM. **Locoregional breast radiotherapy and concurrent treatment with trastuzumab.** Bull Cancer. 2014 Jan 20.
- (12) Baltzer J, Friese K, Graf M, Wolff F. **Praxis der Gynäkologie und Geburtshilfe.** edn. Stuttgart. 2004 Georg Thieme Verlag KG. 1. Auflage, S. 483-495.
- (13) Schmidt-Matthiesen H, Wallwiener D. **Gynäkologie und Geburtshilfe.** 10. Auflage. 2005 by Schattauer GmbH. end. Stuttgart. S.418.
- (14) Breckwoldt M, Kaufmann M, Pfleiderer A. **Gynäkologie und Geburtshilfe.** 2008 Georg Thieme Verlag KG, Stuttgart, 5. Auflage, S. 238-243.
- (15) [www.frauenaeerzte-im-netz.de/de\\_brustkrebs-entstehung\\_366.html](http://www.frauenaeerzte-im-netz.de/de_brustkrebs-entstehung_366.html)
- (16) Kiechle. **Gynäkologie und Geburtshilfe.** 2. Auflage 2011, Elsevier GmbH, München. S.475-500.
- (17) Autor: Dr. H.-J. Koubenec. **Therapie von Brustkrebs.** [www.brustkrebs-info.de/patienten-info/index.php?id=6.0&stat=open#oben](http://www.brustkrebs-info.de/patienten-info/index.php?id=6.0&stat=open#oben),
- (18) [www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=48722](http://www.aerzteblatt.de/pdf.asp?id=48722)
- (19) Tomas weyerstahl, Manfred Stauber. **Duale Reihe, Gynäkologie und Geburtshilfe.** 2013 Georg Thieme Verlag KG, 4. Auflage. Stuttgart. S. 362-370.
- (20) [www.brustkrebsaktuell.de/therapie](http://www.brustkrebsaktuell.de/therapie)
- (21) Feige, Rempfen, Würfel, Jawny, Caffier. **Frauenheilkunde (Fortpflanzungsmedizin, Geburtsmedizin, Onkologie).** 2.Auflage, 2001 Urban & Fischer Verlag, München, Jena. S. 539-554.
- (22) **Berliner Krebsgesellschaft e.V. Moderne Krebstherapie, Wirkungen und Nebenwirkungen.** Stand: September 2008, Berlin. [http://www.berliner-krebsgesellschaft.de/fileadmin/user\\_upload/Flyer-Broschueren/downModerneKrebstherapie.pdf](http://www.berliner-krebsgesellschaft.de/fileadmin/user_upload/Flyer-Broschueren/downModerneKrebstherapie.pdf)
- (23) [www.brustkrebs-info.de](http://www.brustkrebs-info.de)
- (24) Institut für Qualität und Wirtschaftlichkeit im Gesundheitswesen (IQWiG). **Aromatasehemmer beim Mammakarzinom der Frau.** vorläufiger Berichtsplan A10-03, Version 1.0, Stand: 29.03.2012, Köln.
- (25) Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, Mackey J, Glaspy J, Chan A, Pawlicki M, Pinter T, Valero V, Liu MC, Sauter G, von Minck-witz G, Visco F, Bee V, Buyse M, Bendahmane B, Tabah-Fisch I, Lindsay MA, Riva A, Crown J; **Breast Cancer International Research Group. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer.** N Engl J Med. 2011 Oct 6;365(14):1273-83

- (26) Raven, Evert, Eichhorn. **Biologie der Pflanzen**. 4. Auflage. Copyright 2006 by Walter de Gruyter GmbH & Co.KG. S. 33-40
- (27) Lincoln Taiz / Eduardo Zeiger. **Physiologie der Pflanzen**. 2000 Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg. Berlin. S. 349-376.
- (28) Bernhard Watzl, Claus Leitzmann. **Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln**. Hippokrates Verlag GmbH, Stuttgart 1995.
- (29) Schopfer, Brennicke. **Pflanzenphysiologie**. 7. Auflage 2010. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg 2010. S. 355-371.
- (30) **Bioaktive Substanzen im Gemüse**. [www.fh-erfurt.de/lgf/fileadmin/GB/Dokumente/Forschung/Bioaktive\\_Substanzen\\_im\\_Gemuese](http://www.fh-erfurt.de/lgf/fileadmin/GB/Dokumente/Forschung/Bioaktive_Substanzen_im_Gemuese).
- (31) Bernhard Watzl, Gerhard Rechkemmer. Institut für Ernährungsphysiologie, Karlsruhe. Basiswissen aktualisiert: **Flavonoide**. **Ernährungs-Umschau**. Band 48 , 2001, Heft 12
- (32) R. Hänsel, O. Sticher. **Pharmakognosie – Phytopharmazie**. 9. Auflage, Springer Medizin Verlag Heidelberg 2010. S. 1113-1137.
- (33) Jutta Hübner. **Komplementäre Onkologie, supportive Maßnahmen und evidenzbasierte Empfehlungen**. 2008 by Schattauer GmbH, Stuttgart, Germany. S. 241-244.
- (34) Vitalstoff Journal, **Quercetin: Studien und wichtige Informationen**. COM Marketing AG, Fluelistrasse 13, CH - 6072 Sachseln. [www.vitalstoff-journal.de](http://www.vitalstoff-journal.de) .
- (35) Miriam Lühring. **Interaktionen zwischen Quercetin und Vitamin E in vivo-Untersuchungen am wachsenden Schwein**. Shaker Verlag 2009 Aachen.
- (36) Sharmila G, Bhat FA, Arunkumar R, Elumalai P, Raja Singh P, Senthilkumar K, Arunakaran J. **Chemopreventive effect of quercetin, a natural dietary flavonoid on prostate cancer in in vivo model**. Clin Nutr. 2013 Sep 3. pii: S0261-5614(13)00235-5. doi: 10.1016/j.clnu.2013.08.011.
- (37) National Toxicology Program. **Toxicology and carcinogenesis studies of Ginkgo biloba extract** (CAS No. 90045-36-6) in F344/N rats and B6C3F1/N mice (Gavage studies). Natl Toxicol Program Tech Rep Ser. 2013 Mar;(578):1-183.
- (38) Resende FA, Vilegas W, Dos Santos LC, Varanda EA. **Mutagenicity of flavonoids as-sayed by bacterial reverse mutation (Ames) test**. Molecules. 2012 May 7;17(5):5255-68.
- (39) Gaspar J, Laires A, Monteiro M, Laureano O, Ramos E, Rueff J. **Quercetin and the mutagenicity of wines**. Mutagenesis. 1993 Jan;8(1):51-5.

- (40) Sun S, Zhang M, Li Y, He X. **A molecularly imprinted polymer with incorporated graphene oxide for electrochemical determination of quercetin.** *Sensors (Basel)*. 2013 Apr 25;13(5):5493-506.
- (41) Calderón-Montaña JM, Burgos-Morón E, Pérez-Guerrero C, López-Lázaro M. **A review on the dietary flavonoid kaempferol.** *Mini Rev Med Chem*. 2011 Apr;11(4):298-344.
- (42) Chen AY, Chen YC. **A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention.** *Food Chem*. 2013 Jun 15;138(4):2099-107.
- (43) Luo H, Rankin GO, Juliano N, Jiang BH, Chen YC. **Kaempferol inhibits VEGF expression and in vitro angiogenesis through a novel ERK-NF $\kappa$ B-cMyc-p21 pathway.** *Food Chem*. 2012 Jan 15;130(2):321-328.
- (44) Hung H. **Inhibition of estrogen receptor alpha expression and function in MCF-7 cells by kaempferol.** *J Cell Physiol*. 2004 Feb;198(2):197-208.
- (45) SE Park, et al. *Br J Pharmacol*. 2011 October;164(3):1008-1025. Figure 1. From: **Kaempferol acts through mitogen-activated protein kinases and protein kinase B/AKT to elicit protection in a model of neuroinflammation in BV2 microglial cells.**
- (46) Dr. med. Friedrich R. Douwes. **Chrysin macht natürliche Testosteronsteigerung möglich;** Naturprodukt verändert den Hormonstoffwechsel und steigert die Liebeslust. Klinik St. Georg, Fachklinik für Innere Medizin. Ausgabe: Dezember 2009.
- (47) Oliveira GA, Ferraz ER, Souza AO, Lourenço RA, Oliveira DP, Dorta DJ. Evaluation of the mutagenic activity of chrysin, a flavonoid inhibitor of the aromatization process. *J Toxicol Environ Health A*. 2012;75(16-17):1000-11.
- (48) Gambelungho C, Rossi R, Somavilla M, Ferranti C, Rossi R, Ciculi C, Gizzi S, Micheletti A, Rufini S. **Effects of chrysin on urinary testosterone levels in human males.** *J Med Food*. 2003 Winter;6(4):387-90.
- (49) Ciftci O, Ozdemir I, Aydin M, Beytur A. **Beneficial effects of chrysin on the reproductive system of adult male rats.** *Andrologia*. 2012 Jun;44(3):181-6.
- (50) Brown E, Hurd NS, McCall S, Ceremuga TE. Evaluation of the anxiolytic effects of chrysin, a *Passiflora incarnata* extract, in the laboratory rat. *AANA J*. 2007 Oct;75(5):333-7.
- (51) <http://en.wikipedia.org/wiki/Chrysin>
- (52) Liu MM, Huang Y, Wang J. **Developing phytoestrogens for breast cancer prevention.** *Anticancer Agents Med Chem*. 2012 Dec;12(10):1306-13.

- (53) Sabine E. Kulling und Bernhard Watzl. **Phytoöstrogene**, *Ernährungs-Umschau* 50 (2003) Heft 6, Karlsruhe. S. 234-239.
- (54) Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. **Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan**. *Nutr Cancer*. 2006;54(2):184-201
- (55) Gencil VB, Benjamin MM, Bahou SN, Khalil RA. **Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease**. *Mini Rev Med Chem*. 2012 Feb;12(2):149-74.
- (56) Tham DM, Gardner CD, Haskell WL (1998) Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83: 2223–2235. doi: 10.1210/jcem.83.7.4752
- (57) Messina MJ, Wood CE (2008) Soy isoflavones, estrogen therapy, and breast cancer risk: analysis and commentary. *Nutr J* 7: 17. doi: 10.1186/1475-2891-7-17
- (58) Leitfaden Ernährungsmedizin, H. Koula-Jenik, M. Kraft, M. Miko, R. J. Schultz, Urban und Fischer Verlag, München (2006).
- (59) Tanaka M, Fujimoto K, Chihara Y, Torimoto K, Yoneda T, Tanaka N, Hirayama A, Miyanaga N, Akaza H, Hirao Y. **Isoflavone supplements stimulated the production of serum equol and decreased the serum dihydrotestosterone levels in healthy male volunteers**. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2009;12(3):247-52.
- (60) Rassow, Hauser, Netzker, Deutzmann. **Duale Reihe Biochemie** 3. Auflage. 2012 Georg Thieme Verlag KG. Stuttgart. S. 602-607.
- (61) <http://en.wikipedia.org/wiki/Estrogen>.
- (62) Dettmer, Kunisch, Schindler, Folkerts, Lantermann, Sönnichsen. **Mediscript Kurzbuch Biochemie** 1. Auflage 2013. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München. S. 346-353.
- (63) Aktories, Förstermann, Hofmann, Starke. **Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie** 11. Auflage 2013. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, München. S. 653-668.
- (64) **Estrogen Controls How The Brain Processes Sound**. Meldung im Science Daily vom 6. Mai 2009.
- (65) Freissmuth, Offermanns, Böhm. **Pharmakologie und Toxikologie**. Springer Medizin Verlag Heidelberg 2012. S. 549-564.

- (66) Shao W, Brown M. **Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy**. Breast Cancer Res. 2004;6(1):39-52.
- (67) Cui J, Shen Y, Li R. **Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain**. Trends Mol Med. 2013 Mar;19(3):197-209.
- (68) Schmidt, A. S. [2003] Dissertation. **Charakterisierung ausgesuchter Pflanzeninhaltsstoffe in Hinblick auf ihre estrogene Wirkung**. Rheinischen Friedrich-Wilhelms Universität Bonn, Mathematisch-Naturwissenschaftliche Fakultät.
- (69) **Growth-promoting Activity of Acid Mucopolysaccharides on a Strain of Human Mammary Carcinoma Cells\***. Luciano Ozzello, Etienne Y. Lasfargues, and Margaret R. Murray. Cancer Res 1960;20:600-604. © 1960 American Association for Cancer Research.
- (70) CLS Cell Lines Service GmbH. Eppelheim, Germany. CLS Product Information: BT-20. Designation: BT-20. CLS order number: Cryovial: 300130. Vital: 330130.
- (71) Tait L, Soule HD, Russo J . **Ultrastructural and immunocytochemical characterization of an immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10**. Cancer Res. 1990 Sep 15;50(18):6087-94.
- (72) Lane MA1, Romagnoli L, Cruise B, Cohn GM. **Spontaneous conversion to estrogen receptor expression by the human breast epithelial cell line, MCF-10A**. Oncol Rep. 1999 May-Jun;6(3):507-11.
- (73) Paine TM1, Soule HD, Pauley RJ, Dawson PJ. **Characterization of epithelial phenotypes in mortal and immortal human breast cells**. Int J Cancer. 1992 Feb 1;50(3):463-73.
- (74) Elke Wolfring. **Untersuchung strahleninduzierter Chromosomenaberrationen. Bestrahlung der Brustdrüsenepithelzelllinie MCF-12A mit Röntgenstrahlung aus konventionellen Röntgenröhren und Bestimmung der Dosis-Effekt-Kurve**. Forschungszentrum Rossendorf, Dresden. 2004.
- (75) Marchese S1, Silva E. **Disruption of 3D MCF-12A breast cell cultures by estrogens--an in vitro model for ER-mediated changes indicative of hormonal carcinogenesis**. 2012;7(10):e45767. doi: 10.1371/journal.pone.0045767. Epub 2012 Oct 2.
- (76) [http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/wentges-marek-2004-12-13/HTML/wentges\\_html\\_m39f90f68.png](http://edoc.hu-berlin.de/dissertationen/wentges-marek-2004-12-13/HTML/wentges_html_m39f90f68.png)

- (77) Roche: **Cytotoxicity Detection Kit [LDH], Instruction Manual**. Version 08, Content version: February 2011. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany.
- (78) Roche: **Cell Proliferation ELISA BrdU (colorimetric) Kit**. Version 14.0, Content version: November 2010. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany.
- (79) Roche: **Cell Proliferation Kit I (MTT)**. Version 17, Content version: September 2005. Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany.
- (80) Bramanandam Manavathi, corresponding author Oindrilla Dey, Vijay Narsihma Reddy Gajulapalli, Raghavendra Singh Bhatia, Suresh Bugide, and Rakesh Kumar. **Derailed Estrogen Signaling and Breast Cancer: An Authentic Couple**. *Endocr Rev*. Feb 2013; 34(1): 1–32.
- (81) Dong Xie, Carl W. Miller, James O'Kelly, Kei Nakachi, Akiko Sakashita, Jonathan W. Said, Jeffrey Gornbein and H. Phillip Koeffler. **Breast Cancer, Cyr61 IS OVEREXPRESSED, ESTROGEN-INDUCIBLE, AND ASSOCIATED WITH MORE ADVANCED DISEASE**. Published, JBC Papers in Press, January 31, 2001, DOI
- (82) Agyeman AS1, Chaerkady R, Shaw PG, Davidson NE, Visvanathan K, Pandey A, Kensler TW. **Transcriptomic and proteomic profiling of KEAP1 disrupted and sulforaphane-treated human breast epithelial cells reveals common expression profiles**. *Breast Cancer Res Treat*. 2012 Feb;132(1):175-87.
- (83) Carl G. Castles, Suzanne A. W. Fuqua, Diane M. Klotz, and Steven M. Hill<sup>2</sup>. **Expression of a Constitutively Active Estrogen Receptor Variant in the Estrogen Receptor-negative BT-20 Human Breast Cancer Cell Line<sup>1</sup>**. *Cancer Res* December 15, 1993 53; 5934.
- (84) J. Stapel, Diplomarbeit. **Der Einfluss des Holunderblüten und Beerenextrakten auf die Zelllinien MCF-7, BT-20 und Fibroblasten**. Der Universitätsfrauenklinik Rostock und das Institut für Biowissenschaften, Abteilung Biochemie, Universität Rostock November 2010.
- (85) Kang GY, Lee ER, Kim JH, Jung JW, Lim J, Kim SK, Cho SG, Kim KP. **Downregulation of PLK-1 expression in kaempferol-induced apoptosis of MCF-7 cells**. *Eur J Pharmacol*. 2009 Jun 2;611(1-3):17-21.
- (86) Oh SM1, Kim YP, Chung KH. **Biphasic effects of kaempferol on the estrogenicity in human breast cancer cells**. *Arch Pharm Res*. 2006 May;29(5):354-62.

- (87) Kim SH, Choi KC. **Anti-cancer Effect and Underlying Mechanism(s) of Kaempferol, a Phytoestrogen, on the Regulation of Apoptosis in Diverse Cancer Cell Models.** Toxicol Res. 2013 Dec 31;29(4):229-234.
- (88) Rajaraman G1, Yang G, Chen J, Chang TK. **Modulation of CYP1B1 and CYP1A1 gene expression and activation of aryl hydrocarbon receptor by Ginkgo biloba extract in MCF-10A human mammary epithelial cells.** Can J Physiol Pharmacol. 2009 Sep;87(9):674-83.
- (89) Duo J, Ying GG, Wang GW, Zhang L. **Quercetin inhibits human breast cancer cell proliferation and induces apoptosis via Bcl-2 and Bax regulation.** Mol Med Rep. 2012 Jun;5(6):1453-6.
- (90) Chou CC1, Yang JS, Lu HF, Ip SW, Lo C, Wu CC, Lin JP, Tang NY, Chung JG, Chou MJ, Teng YH, Chen DR. **Quercetin-mediated cell cycle arrest and apoptosis involving activation of a caspase cascade through the mitochondrial pathway in human breast cancer MCF-7 cells.** Arch Pharm Res. 2010 Aug;33(8):1181-91.
- (91) Seo HS, Ju JH, Jang K, Shin I. **Induction of apoptotic cell death by phytoestrogens by up-regulating the levels of phospho-p53 and p21 in normal and malignant estrogen receptor  $\alpha$ -negative breast cells.** Nutr Res. 2011 Feb;31(2):139-46.
- (92) Yang F, Jin H, Pi J, Jiang JH, Liu L, Bai HH, Yang PH, Cai JY. **Anti-tumor activity evaluation of novel chrysin-organogermanium(IV) complex in MCF-7 cells.** Bioorg Med Chem Lett. 2013 Oct 15;23(20):5544-51.
- (93) van Meeuwen JA, Korthagen N, de Jong PC, Piersma AH, van den Berg M. **(Anti)estrogenic effects of phytochemicals on human primary mammary fibroblasts, MCF-7 cells and their co-culture.** Toxicol Appl Pharmacol. 2007 Jun 15;221(3):372-83. Epub 2007 Mar 27.
- (94) Cao XZ, Xiang HL, Quan MF, He LH. **Inhibition of cell growth by BrMC through inactivation of Akt in HER-2/neu-overexpressing breast cancer cells.** Medical College, Hunan Normal University, Changsha, Hunan 410013, P.R. China. 2014, 7(5):1632-1638.

## 9. Thesen

1. Das Mammakarzinom ist die häufigste maligne Tumorerkrankung bei Frauen. Etwa eine von acht Frauen erkrankt im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs. Jährlich erkranken in Deutschland ca. 71.000 Frauen an Mammakarzinom.
2. Flavonoide sind sekundäre Pflanzenstoffe, die für die Farbgebung der Pflanzen verantwortlich sind. In wissenschaftlichen Studien zeigten Flavonoide positive Einflüsse auf den menschlichen Organismus. Dazu gehören antikanzerogene, antimikrobielle, antiödematöse, antiinflammatorische, immunmodulierende und antioxidative Wirkungen.
3. Flavonoide, die in dieser Arbeit verwendet sowie untersucht wurden, sind Quercetin, Chrysin und Kaempferol.
4. Mithilfe der Immunhistochemie konnte die Expression der  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Östrogenrezeptoren und der Progesteronrezeptoren nachgewiesen werden. Dadurch wurde dargestellt, dass die MCF-7 und MCF-12a Zellen die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  sowie  $\beta$  als auch den Progesteronrezeptor exprimieren. Im Vergleich dazu wurden bei den BT-20 und MCF-10a Zellen keine Expression für die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  sowie  $\beta$  und den Progesteronrezeptor festgestellt.
5. Ziel dieser Arbeit ist die funktionelle und zytotoxische Untersuchung der Wirkung kommerziell erworbener Flavonoide (Quercetin, Kaempferol und Chrysin) auf maligne Mammakarzinomzellen (MCF7 und BT20) und benigne veränderte Mammazellen (MCF10a und MCF12a).
6. Die zytotoxische Wirkung der Flavonoide zeigte sich vorwiegend in den höheren Konzentrationen (50 $\mu$ g/ml und 100 $\mu$ g/ml). Bei der Konzentration 5 $\mu$ g/ml bewirkte Chrysin im Gegensatz zu Kaempferol und Quercetin eine deutliche Zellzerstörung der MCF-7 und BT-20 Zellen.
7. Kaempferol und Chrysin besitzen in den höheren Konzentrationen 50 $\mu$ g/ml und 100 $\mu$ g/ml einen hemmenden Effekt auf die Zellvitalität. Im Vergleich dazu bewirkte Quercetin in diesen Konzentrationen eine Erhöhung der metabolischen Zellaktivität.
8. Eine antiproliferative Wirkung der Flavonoide wurde bei den höheren Konzentrationen der Flavonoide (50 $\mu$ g/ml und 100 $\mu$ g/ml) dargestellt. Jedoch verursachte Chrysin in seiner Konzentration von 50 $\mu$ g/ml eine Stimulation des Zellwachstums der BT-20 Zellen um etwa 9,5%. Außerdem bewirkte Chrysin in seiner Konzentration von 100 $\mu$ g/ml eine Erhöhung der Proliferation der MCF-7 Zellen von etwa 18%.

9. Kaempferol zeigte bei seiner Konzentration von 5µg/ml eine Hemmung der Zellproliferation jedoch nur bei den ER-positiven Zellen (MCF-7 und MCF-12A Zellen).
10. Für die Forscher stellen die untersuchten Flavonoide in den Konzentrationen zwischen 0,5 und 50 µg/ml ein interessantes Forschungsgebiet bei dem Einfluss von den Flavonoiden auf den MCF-7, BT-20, MCF-10a und MCF-12a Zellen dar.

## 10. Danksagung

Zunächst möchte ich mich ganz herzlich bei den folgenden Personen bedanken, die durch ihre fachliche und persönliche Unterstützung zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

- Herrn Prof. Dr. V. Briese, für die Überlassung des hochinteressanten Themas, hilfreiche Ratschläge sowie für die hochwertigen Hinweise, Anregungen und seine ausgiebige Unterstützung im Verlaufe dieser Arbeit.
- Frau Dr. D.-U. Richter, die mit sehr viel Engagement, wertvolle Ideen und Geduld meine Arbeit betreut hat, sowie für die interessanten Beiträge und Änderungsvorschläge.
- Frau E. Greschkowitz, für die umfangreiche Betreuung bei der Laborarbeit.
- Frau M. Szewczyk und Frau J. Stapel für die freundliche Hilfsbereitschaft, die ausführliche Anleitung im Labor sowie für die Verbesserungsvorschläge und Korrektur meiner Arbeit.
- Frau Dipl.-Math. Ä. Glass, für die methodisch-statistische Beratung sowie die Hilfe bei der Benutzung des Statistik-Programmpaketes SPSS.
- Ferner möchte ich mich bei allen meinen Freunden bedanken, die bei dieser Arbeit mich tatkräftig unterstützt und bei der Korrektur geholfen haben.
- Abschließend möchte ich mich im Besonderen bei meiner Familie bedanken, die mich nicht nur finanziell, sondern auch moralisch sehr unterstützt hat.

## **11. Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, Ahmed Abutayeh, geboren am 18.11.1987 in Gaza (Palästina), dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den herangezogenen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Ahmed Abutayeh

Rostock, September 2014

## LEBENS LAUF

### Angaben zur Person:

Vor- und Zuname: Ahmed Abutayeh  
Geburtstag: 18.11.1987  
Geburtsort: Gaza, Palästina  
Wohnort: Theodor-Körner-Straße 12  
57627 Hachenburg  
Handy Nummer: 017664164207  
E-mailadresse: abutayeh1987@hotmail.de  
Staatsangehörigkeit: Palästinenser, Deutsch  
Familienstand: ledig

### Schulbildung:

09/1993 - 05/1999 Grundsule in Gaza  
09/1999- 05/2002 Realschule in Gaza  
09/2002- 05/2005 Gymnasium in Gaza, Abschluss: Abitur (1,3)

### Weiterbildung:

07/2005 - 12/2005 Deutsche Sprachschule in Gaza (Goethe-Institut)  
01/2006 - 09/2006 Deutsche Sprachschule in Frankfurt am Main  
(Media-Institut)

### Universitätsbildung:

09/2006 - 12/2013 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock  
12/2013 Abschluss des Humanmedizin-Studiums

### Praktika/ Berufsausbildung:

07/2005 - 10/2005 Krankenpflege-Praktikum in Gaza  
02/2010 - 03/2010 Famulatur Allgemein Chirurgie Hochwaldkrankenhaus in  
Bad Nauheim  
08/2010 Famulatur HNO-Praxis in Rostock  
02/2011- 03/2011 Famulatur Allgemeinmedizin-Praxis in Rostock  
08/2011 Famulatur Gynäkologie MAHDI-CENTER-Krankenhaus  
08/2012 - 07/2013 Das praktische Jahr im HANSE-Klinikum Wismar  
Seit 04/2014 Assistenzarzt in der Allgemein Chirurgie DRK-Krankenhaus  
Hachenburg

